

氏名 東 谷 なほ子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第50号

学位授与の日付 平成5年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 大腸菌繊維状ファージにおけるマイナス鎖DNA複製
に関する研究

論文審査委員 主 査 教 授 廣 瀬 進
教 授 石 濱 明
教 授 杉 山 勉
助 教 授 嶋 本 伸 雄
教 授 水 本 清 久（北里大学）

論文内容の要旨

大腸菌繊維状ファージ f1 は、環状の一本鎖 DNA (ssDNA) ファージであり、大腸菌に感染後、ファージの ssDNA (プラス鎖) 上に相補鎖 (マイナス鎖) が合成され、二本鎖 DNA (複製型: RF) になる。このマイナス鎖複製は、大腸菌 RNA ポリメラーゼがプライマー RNA を合成することによって開始される。ファージ ssDNA のマイナス鎖複製開始領域 (origin) には、二つの安定なヘアピン構造 [B] 及び [C] をとり得る塩基配列が存在し、この構造に大腸菌 RNA ポリメラーゼが結合し、特定の塩基からプライマーを合成すると考えられるが、その機構の詳細は明らかではない。そこで本研究では、マイナス鎖合成の開始に必要なファージ ssDNA 上のシグナルと、これが大腸菌 RNA ポリメラーゼによって確認される機構について解析がなされた。まず、マイナス鎖 origin としての機能に必要な塩基配列ならびに構造を調べる目的で、この領域における欠失、挿入及び、塩基置換変異が作製され、それらの origin 活性について検討された。その結果、(1) 二つのヘアピン構造の大部分が必要であること、(2) 両ヘアピンの先端付近の数塩基は、欠失させたり或は異なる塩基配列で置換することが可能であること、(3) ヘアピン [B] と [C] の間の距離も重要であることが示された。さらに、(4) ヘアピン [B] の一部の領域には、構造のみならず特定の塩基配列を必要とする領域が存在することが明らかにされた。

また、プライマー RNA の合成開始位置として既に報告された部位 (nucleotide 5756: Geider et al, 1978) を含む、ヘアピン [C] の 3' 側の十数塩基の欠失は、マイナス鎖 origin 機能に強い影響を与えないことが示された。そこで、プライマー RNA の合成開始位置が再検討された。基質アナログ (3'-deoxy NTP's) を用いてプライマー RNA の塩基配列が決定され、キャッピング酵素を用いて 5' 末端の塩基が同定された。その結果、プライマーの配列は、野生型ファージにおいても、またヘアピン [C] の 3' 側の十数塩基を欠失した変異ファージにおいても共に (5')

pppAGGGCGAUGGCCACUACGU-OH(3') の 20-mer であり、プライマーはゲノム DNA 上の nucleotide 5736 から 5717 に相補的に合成されることが判った。このことは、プライマー RNA が、実際には先の報告よりも、20 塩基下流から合成されていることを示している。

また、RNA 合成と DNA 合成をカップルさせた *in vitro* 系においても、RNA 合成のみの系と同じ開始位置 (nucleotide 5736) から、ほぼ同じ長さの RNA が、プライマーとして合成され機能していることが確認された。

次に、大腸菌 RNA ポリメラーゼとマイナス鎖 origin DNA との複合体が footprinting により解析され、RNA ポリメラーゼは、 σ^{70} 因子に依存してヘアピン [B] の stem の下半分程から、プライマー RNA 合成開始位置を含むヘアピン [C] の stem の下半分程までの、凡そ 50 数塩基の範囲に結合することが明らかにされた。

プライマー RNA の合成開始点が正しく決定されたこと及び、footprinting の結果から、マイナス鎖 origin 領域と転写プロモーターに類似性があることが示唆され、大腸菌 RNA ポリメラーゼによる、マイナス鎖 origin 領域の認識機構は、転写の機構と関係があるものと考察された。マイナス鎖 origin において大腸菌 RNA ポリメラーゼが結合する

領域の塩基配列には、in vivo で弱い転写プロモーター活性が認められ、この考えを支持している。

また、マイナス鎖複製開始領域の欠失変異ファージによって大腸菌にSOS応答が誘発されることが見いだされた。大腸菌におけるSOS応答は、RecA蛋白とLexA蛋白により制御されている。In vitro においては、RecAがssDNAとATPとの複合体を形成することによって活性化され、これがSOS遺伝子群のリプレッサーであるLexAを不活化する。変異ファージを大腸菌に感染させると、マイナス鎖 origin が欠損しているためにssDNAが二本鎖DNAへ変換されにくく、より長い間ssDNAとして菌体内に留まり、その結果、SOS機能を誘発したものと考えられた。従って、in vivo においても、ssDNAによりSOS応答が誘発されることが明らかにされた。この系では、大腸菌の染色体DNAを傷つけることなくSOSを誘発することができるので、SOS応答の機構や細胞複製の制御を研究する上で有用な系であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

大腸菌繊維状ファージ f 1 は感染後、まずプラス鎖 DNA を鋳型にしてマイナス鎖 DNA が複製され、その結果生じた 2 本鎖 DNA からプラス鎖 DNA が次々と合成されて複製を完了する。本研究で東谷なほ子氏はマイナス鎖の DNA 複製に関する種々の欠失、挿入、塩基塩換変異株を作製し、その機能を測定することによって複製に必須な DNA 塩基配列とヘアピン構造を特定した。また、RNA ポリメラーゼによるプライマー RNA 合成開始点および、プライマー RNA から DNA への合成切り替え点を決定した。さらに、マイナス鎖 DNA 複製が起きない変異株は感染後、宿主大腸菌に SOS 応答を誘発させることも見出した。本研究中で、プライマー RNA の合成開始点を正確に決定し、RNA ポリメラーゼによるプロモーター認識という視点からマイナス鎖 DNA 複製に必須な DNA 領域と配列について考察したことは高く評価される。これらの結果の一部は国際学術誌である *J. Bacteriology* に発表および *J. Virology* に印刷中である。

以上のように、この論文の内容は繊維状ファージ f 1 のマイナス鎖 DNA 複製に関して重要な基礎的データを提供するもので、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすものであることを、審査委員全員一致で認めた。