

氏名(本籍)	伊藤道恭 (埼玉県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	博甲第561号
学位授与年月日	昭和63年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Biochemical studies on Pre-messenger RNA splicing in vitro (メッセンジャー RNA 前駆体スプライシングの試験管内における生化学的研究)
主査	筑波大学教授 医学博士 眞崎知生
副査	筑波大学教授 医学博士 小磯謙吉
副査	筑波大学教授 医学博士 安羅岡一男
副査	筑波大学助教授 医学博士 内山安男
副査	筑波大学助教授 医学博士 金沢一郎

論文の要旨

Pre-mRNA の splicing 機構を調べるために本論文ではまず β -グロビン mRNA 前駆体の最初のエクソン-イントロン-エクソンの部分をモデルとして用い、HeLa cell の核抽出液を用い、試験管内でスプライシング反応を行わせてその機構を調べた。その結果まずイントロンの 5'側で切断されて、最初のイントロンが lariat 構造をとり、次いでイントロンの 3'側が切断されてエクソン同士の間で結合がおこること、また核抽出物を DEAE-Sephadex にかけて、1 M KCl で溶出される分画にスプライシングに重要な因子が含まれており、この分画には低分子 RNA, U₁, U₂, U₄, U₅及び U₆が含まれていることを示した。またこれらの反応には ATP とマグネシウムイオンが必要であることも示した。

この研究成果をもとに、複数のイントロンを持つ真核細胞のより複雑な mRNA 前駆体のスプライシングの機構を探るため、著者らはヒト β -グロビンの上記の mRNA の前駆体の単位を2つくり返して持っている全長1038ヌクレオチドの mRNA 前駆体を作製、HeLa cell の核抽出液を用いて試験管内でスプライシングを行わせた。反応終了後変性条件ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって反応産物を分析したところ11種類の RNA が観察された。これらの RNA の構造を決めて、種々の条件下でどのような構造の RNA が出来るかを観察した。その結果、同一のイントロンが2つ繰り返した構造をもつ mRNA 前駆体のスプライシングにおいては、1) 2つの同一のイントロ

ンの除去は同じような時間経過でおこり、前後のイントロンによって順序があるとはいえない、2) 中間のエクソンをジャンプして第1エクソンと第3エクソンが結合することはない、3) イントロン除去の効率 mRNA 前駆体上の位置に関係なくほぼ等しい。つまりイントロンの除去には順番はなく、途中のエクソンを飛ばしてつながることもなく、エクソンとエクソンはもっとも近い位置でそれぞれ独立に結合することが示された。さらに同一構造の2つのイントロンを持つ mRNA 前駆体上の一方のイントロンの5', 3'スプライス部位、もしくは枝分れ部位に、スプライシングの効率や正確度に影響を与える変異を導入した前駆体RNAを作製し、試験管内スプライシング反応を行った。この結果、変異を導入したイントロンのスプライシングは非常に低い効率でしか起こらなかった。また大部分の変異ではエクソンジャンプは起こらなかった。しかし、第1イントロンの3'スプライス部位の連続したピリミジン及びAG配列の欠失した変異をもつ前駆体を基質とするジャンプスプライシングの中間体と考えられるスーパーラリアット構造のRNAが観察された。このことから5'及び3'スプライス部位の組の選択にはまず5'スプライス部位に近い3'スプライス部位が選ばれてスプライシングが起こるといった機構が示唆された。

審 査 の 要 旨

高等真核生物の蛋白質遺伝子の大部分は介在配列(イントロン)により分断されており、遺伝子が発現し、機能的な蛋白質となるためには、まず遺伝子が転写され、イントロンを含む遺伝子全長に対応するRNA(mRNA前駆体)が生成される。mRNAはこのmRNA前駆体からイントロン部分が除去され、その前後のエクソン部位が再結合されること、つまりスプライシング反応によって生成される。このスプライシング反応の機構については現在多くの研究者によって研究が進められている。申請者らの所属する研究室ではこの方面で顕著な業績をあげており、その活動の一環として申請者の研究は遂行された。申請者らはヒト、 β -グロビンの最初のエクソン、イントロン、エクソンの構造が2つくり返すDNAを作製、これをヒトHeLa cellの核抽出液を用いて試験管内でスプライシング反応を起こさせ、その反応物を解析した。同じイントロンがくり返しているにもかかわらず、中間のエクソンジャンプがおこることはない、イントロンはまず5'で切られて、まずlariat構造をつくり、次いでそのイントロンの3'端が切断されて隣同士のエクソンの結合がおこること、しかもイントロンの切断が順におこるものでなく、それぞれのイントロンが独立に切断されることを示した。この研究成果はきわめて独創的であり、また技術的にも極めて高度の技術を用いており十分に博士論文の内容たり得る。また、この研究の過程で申請者が中心的な役割を果たしてきたことが確認された。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。