

氏名(本籍)	まえだ 前田	あきら 明	(京都府)
学位の種類	医学博士		
学位記番号	博甲第684号		
学位授与年月日	平成元年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	Short Donor Site Sequences Inserted Within The Intron Of $\beta$ -Globin Pre-mRNA Serve For Splicing In Vitro ( $\beta$ -グロビン mRNA 前駆体のイントロン内に挿入された短いドナーサイト配列は, in vitro でスプライシングのために働く)		
主査	筑波大学教授	医学博士	真崎知生
副査	筑波大学教授	医学博士	柏木平八郎
副査	筑波大学教授	医学博士	杉田良樹
副査	筑波大学助教授	医学博士	金澤一郎
副査	筑波大学助教授	医学博士	藤田禎三

## 論文の要旨

### 《目的と方法》

mRNA の前駆体のスプライシングにおける 5'スプライス部位の認識機構を研究するため、ヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子の第一エクソン、イントロン、第二エクソン断片が SP6 フェージプロモーター下流にサブクロニングされたプラスミドを用い、そのイントロン内の一定の部位に人工的に種々の短い 5'スプライス部位関連配列を挿入した。このような DNA 断片に in vitro 転写反応により 2つの 5'スプライス部位と 1つの 3'スプライス部位をもつ mRNA 前駆体を調整した。このような mRNA 前駆体を基質として、HeLa 細胞核抽出液を用いて in vitro スプライシング反応を行った。その産物を電気泳動により分析してスプライシングの過程を検討した。スプライスの産物はプライマー伸長法によって同定し、液体シンチレーション計数での放射能測定により定量した。また核抽出液中のスプライシング配列に結合するスプライシング因子の、挿入 5'スプライシング部位への結合実験はフィルター法によって行った。

### 《結果》

9個から16個程度の長さの 5'スプライス塩基配列で十分認識され得ることがわかった。その活性は挿入した配列自身に依存している。さらに、スプライシング活性に関与している要因について調べた。その結果、高塩濃度の方が挿入 5'スプライシング部位の活性が高いことがわかった。

次に、挿入5'スプライス部位のスプライシングにおける利用効率がその5'スプライス配列自体とそれに結合するスプライシング因子との親和性に関係があるかを調べるため、それぞれの配列に対する核抽出液中の因子の結合活性を測定した。その結果、挿入5'スプライシング配列の結合活性の強さと、スプライシングにおけるその利用効率は必ずしも一致しないことがわかった。

#### 《考 察》

以上の結果から挿入5'スプライス部位へのスプライシング結合因子（おそらくU1-RNA）の結合が塩によって、本来の5'スプライス部位に対して相対的に増強される。高塩濃度では、mRNA前駆体の二次構造が挿入5'スプライス部位の利用にとって有利になるように変化するなどがわかった。また、スプライシング因子の結合の実験からスプライシングにおける利用効率は5'スプライス配列への因子の結合といった初期の反応だけではなく、その後起きる切断や再結合といった反応にも依存していると考えられる。

### 審 査 の 要 旨

本研究は $\beta$ -グロビンの一部をモデルとして用いて mRNA のスプライシングの機構について、どの程度の配列の長さ、また配列の厳密さなどが活性発現に重要であるかを検証し、さらにイオン強度との関連を調べている。また、スプライス因子である小分子 RNA のその配列への結合がスプライス部位の利用効率とは必ずしも一致しないことがわかった。これら一連の結果は、スプライシング機構を解明する上できわめて重要な貢献を行ったものであると判断できる。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格があるものと認める。