

氏 名 宮本貴史

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第1166号

学位授与の日付 平成20年3月19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6条第1項該当

学位論文題目 UV-sensor motifs in promoters

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之
教授 仁木 宏典
教授 小林 武彦
准教授 柴原 慶一
教授 饗場 弘二（名古屋大学）

It is well known that transcription elongation and repair of UV-damage is coupled. In eukaryotes, stalled RNA pol II recruits several repair proteins to form a complex containing RNA pol II, TFIIH, and the repair proteins. In prokaryotes, stalled RNAP recruits Mfd protein. Mfd has a domain homologous to the domain in UvrB which recognizes a wide range of structurally diverse lesions in addition to a domain for interaction with RNAP. Mfd binds to the DNA segment immediately upstream of the stalled RNAP and pushes it towards downstream by using the energy of ATP-hydrolysis to dissociate it from DNA, and speculated to recruit UvrA to perform the repair similar to the global nuclear excision repair. These mechanisms provide the concept on the triggering DNA repair rather than that on transcriptional regulation.

Although RNAP tends to stall at all kinds of UV-damages, the efficiency of stall at a UV-damage has not been measured. Therefore, it is possible that inhibition of transcription is carried out by a mechanism other than the stall of RNAP. The stall could be overcome by a read-through of the damaged base by misincorporation, slippage, jump, and switching the template strand. These considerations indicate the mechanism of coupling of UV-damages and initiation, because initiation generally has the largest dynamic range of transcriptional regulation. Irrespective of the efforts to find specific factors triggering the inhibition in initiation, such factors have not been found yet, suggesting an alternative possibility that the triggering function has been already installed in RNAP.

Transcription initiation is biochemically separated into several steps. RNAP in the form of holoenzyme binds to a promoter and then DNA duplex in the complex is partially unwound to expose the template strand of DNA by mostly unknown mechanism. The resultant complex is called open complex and this complex was once considered to be homogeneous. However, it is now known to involve two or more conformations which have different catalytic properties, forming branched pathway mechanism. One branch leads to produce the full-length transcripts (productive pathway), while another leads to produce only short transcripts iteratively synthesized by "moribund complex" which is defined as a complex that produces only abortive but no full-length transcripts (non-productive pathway). On some promoters, moribund complex is converted into dead-end complex which still maintains transcript but lacks elongation activity. Accumulation of dead-end complex causes less stoichiometric synthesis of the full-length products in a single-round transcription assay.

To examine the potential coupling and its mechanism, I have studied on the relationship between transcription initiation and UV-damage by using purified reconstitution system of *E. coli*. This well-characterized system allows me to consider the relationship between the structure and the function. The system is composed of

RNAP holoenzyme, a promoter DNA, and four NTPs as substrates. I selected the T7A1 promoter because little moribund and dead-end complexes are accumulating on this promoter, simplifying the analysis of the branched pathway. By irradiating the promoter DNA with UV light, UV damages are generated at adjacent pyrimidine bases in the promoter region. If the generated damages are upstream from the transcription start site, such damages are nothing to do with elongation pause and thus their effect on transcription must be limited to the effect on initiation.

In this study, UV-irradiation of the template DNA was found to enhance abortive initiation and to induce dead-end complex, namely enhancing the nonproductive pathway. The positions of UV-damage in the template DNA in moribund and dead-end complex was compared with those in the binary complex that contains productive complex. The pyrimidine dimers at several sites in the upstream from the transcription start site, but not all, were enriched in the moribund and dead-end complexes, indicating that these UV-damaged pyrimidine bases induce these complexes. These positions of the damages are on both template and non-template strands. The induction by the damaged pyrimidine residues are confirmed by the transcription on DNA fragments which contain single UV-damages in the upstream region. Furthermore, I found that adjacent pyrimidine bases are conserved at one or more positions of those identified on T7A1 promoter among the majority of the *E. coli* promoters, suggesting that these positions would be UV-sensor motif in promoters.

論文の審査結果の要旨

転写中の RNA ポリメラーゼは、鋳型 DNA 上の傷害により、転写を停止し鋳型上に滞留すると考えられている。このポリメラーゼには修復酵素が呼び寄せられ、DNA 上の傷害が修復される。しかし、実際に RNA ポリメラーゼが傷害を持つ鋳型 DNA 上で停止する頻度を測定した研究例はない。また、転写中だけでなく転写開始時にも鋳型が傷害を受けていると転写が阻害を受ける可能性があるが、これまで調べられていない。宮本貴史君は、鋳型 DNA の傷害と転写開始の関係を明らかにする目的で研究を行った。

まず、紫外線による傷害を受けた鋳型 DNA 上での転写開始反応を、T7 ファージの A1 プロモーター (T7A1) と精製した大腸菌 RNA ポリメラーゼにより調べた。転写開始反応は、RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合するとまず Binary complex を作り、その後 2 つの分岐した経路を取る。即ち、Productive complex を作った場合には転写は最後まで進むが、Moribund complex を作ると短い Abortive transcript を作り途中で止まってしまう。Moribund complex は Binary complex を経て Productive complex へと変換するか、そのまま Dead-end complex となる。大腸菌 RNA ポリメラーゼの強いプロモーターである T7A1 プロモーターで、紫外線を照射した鋳型 DNA 上での転写産物を調べると、Abortive transcript の量が増加していた。そしてこれが転写開始時に起こっていることを Inversed pulse labeling 法と Moribund complex の生成により明らかにした。このことは、鋳型 DNA が傷害を受けると転写開始反応が阻害されることを意味する。

次に、鋳型 DNA 上のどこに傷害 (ピリミジンダイマー) があると Abortive transcript が出来るようになるか調べた。そのため、紫外線照射により生じるピリミジンダイマーの位置を決めるとともに、Moribund complex を分離してその中に含まれるピリミジンダイマーの位置を決めた。そして、Moribund complex には転写開始上流域に生じる 5ヶ所のピリミジンダイマーが濃縮されていることが分かった。そこで、この 5ヶ所 (T2, T4, T5, NT1, NT3) の内一ヶ所だけにピリミジンダイマーを含む鋳型 DNA をそれぞれ調製し、精製 RNA ポリメラーゼを用いて転写を調べた。その結果、どの位置にピリミジンダイマーを持つ鋳型 DNA でも、RNA ポリメラーゼと Binary complex を作るが、全領域を転写する産物は減少することが分かった。さらに、T5 にピリミジンダイマーが生じると、Abortive transcript の増加が観察される。

大腸菌ゲノム配列を調べるとピリミジンの連続する配列を持つプロモーターが多数存在し、多くのプロモーターからの転写は紫外線照射により減少している。宮本君は、自身の実験結果とこのことからプロモーター領域に今回同定したようなピリミジンダイマーがあると紫外線のセンサーとして働くというモデルを提示している。

本研究は、これまで解析の行われていなかった紫外線照射による転写開始効率の変化を実験的に初めて示したものである。また、転写への影響は転写開始点上流のプロモーター上でのピリミジンダイマーの形成により Moribund complex が形成され、Abortive transcript への生成に繋がることを明らかにしたことも、転写開始と鋳型 DNA の傷害の関係に新たな研究の道筋を示したもので関連分野への寄与が大きい。さらに、このことから提示したモデルは、紫外線傷害時のプロモーターの挙動への一般的理解を深めるものであり、意味深いものである。以上の理由から、宮本貴史君の学位提出論文は博士号授与の

要件を満たすと審査員全員一致で判断した。