

氏名 久堀智子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第86号

学位授与の日付 平成6年3月24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 固定化DNAを用いた転写複合体の動的反応機構

論文審査委員 主査 教授 石濱 明

教授 堀内 賢介

教授 柱 勲

教授 杉山 勉

教授 饗場 弘二（名古屋大学）

固定化 DNA を用いた転写複合体の動的反応機構

転写伸長反応は直列に並んだ単純な反応の繰り返しではない。転写初期には RNA 伸長反応を継続する以外に、合成した短鎖 RNA の解離 (abortive synthesis) 等の経路を取り得る。Abortive synthesis では RNA ポリメラーゼは DNA から解離することなく、およそ 9nt に至る短鎖 RNA を合成しては放出し、再び転写開始点にもどることを多数回繰り返す (abortive cycling)。従来のモデルでは、RNA ポリメラーゼは abortive cycling を経た後、RNA の解離に抵抗性のある“伸長”モードに移行すると仮定されてきた。しかし、abortive synthesis を含め、転写初期反応の機構の動的解析による検討は殆どなされていなかった。そこで、RNA ポリメラーゼが processivity を獲得する機構を解明するため、転写初期におこる現象を動的に解析した。

大腸菌 RNA ポリメラーゼと λP_R プロモーターを有する固定化 DNA を用いた *in vitro* 転写系で一連の解析を行った。固定化 DNA を用いることにより、転写複合体から解離する転写産物や RNA ポリメラーゼを簡便に分離することができる。RNA 合成の時間経過を解析した結果、9nt に代表される短鎖 RNA の大部分は転写複合体から解離しており、その合成量は長鎖 RNA の合成量が飽和した後も増加を続けた。反応時間を通じて、長鎖 RNA の大部分は転写複合体に結合していた。

このことから、RNA ポリメラーゼが abortive cycle を経てから長鎖 RNA を合成する、という従来提唱されてきた順次的な反応経路を示すモデルが、成り立たないことが明らかとなり、分岐した反応経路が示唆された。つまり、長鎖 RNA を合成する転写複合体とは別の、abortive synthesis を担う新たな転写複合体の存在が示唆された。

新たな転写複合体が RNA を解離し易い特性を有していることを利用して、この複合体を直接検出することを試みた。固定化 DNA と RNA ポリメラーゼの複合体を微小カラムに詰め、反応基質であるヌクレオチドをパルス的に注入することによりカラム中で一定時間の転写反応を行った。反応後、転写バッファーとともに解離した RNA が認められたことから、目的の複合体が直接検出された。この不安定な転写複合体は、長鎖 RNA を合成する複合体が転写反応の過程で変換して生成したものであることが示唆された。また、転写反応後に非放射性的のヌクレオチドを注入し、RNA が伸長するかどうかを調べることにより、この複合体は、基質存在下でも RNA を伸長しない dead-end complex に変換することが示された。このように溶出パターンを解析することにより、変換しうる様々な転写複合体が検出できる実験系を確立した。同定した新たな複合体を、その特性から“瀕死の”という意味の moribund complex と名付けた。

転写初期の反応機構を解明するためにとったもうひとつのアプローチは、転写開始直後の RNA ポリメラーゼの進行を物理的に阻害することである。大腸菌 RNA ポリメラーゼと λP_R プロモーターを用いた同様の転写系において、特定のヌクレオチドを反応系から除くことにより、転写開始点を基準に +32 の位置で反応が停止する鋳型 DNA を作製した。DNA に対し過剰の RNA ポリメラーゼを反応させると、1つのオペロンに複数の RNA ポリメラーゼ分子が作用しタンデムな転写が起こることが、RNA の解析と footprinting により示された。先行する RNA ポリメラーゼの反応を +32 で止めると、後続のポリメラーゼは進行を阻止され +5 の位置で misincorporation を起こすことが判明し

た。Misincorporate された RNA は、伸長することができず 6nt の鎖長で転写複合体から解離した。

また、タンデムな転写により abortive synthesis が促進された。6nt より短い RNA は、先行のポリメラーゼの停止によりさらに解離が促進されることもわかった。

Misincorporate された RNA と abortive transcripts は転写複合体からの解離という点で挙動をともにすることから、同一の転写複合体により合成された可能性が高いと考えられる。これらの結果は、RNA ポリメラーゼが転写の初期に物理的に進行を阻止されたため abortive cycle を回り続けるモードに保持されたことを示唆する。おそらく物理的障害が上述の moribund complex への変換を促進すると考察した。

論文審査結果の要旨

転写は、RNAポリメラーゼがプロモーターを認識し、RNA合成を開始するまでの段階で制御され、一旦開始した転写は、暫くは短鎖オリゴヌクレオチド合成を繰り返すとしても、やがて支障なくRNA伸長反応に継続すると考えられていた。しかし、その間の反応の動態を解析する研究はなかった。申請者は、固定化DNAを用いて、転写複合体を転写産物から短時間で容易に分離する方法を開発し、転写開発からRNA伸長に至る過程の時間経過を詳細に解析した。その結果、短鎖オリゴヌクレオチドを合成しつづける転写複合体の相当の部分が、やがてRNA合成を停止する運命にある"Moribund complex"であることを示した。この発見は、abortive initiationは、RNA伸長のための準備段階と考える常識を覆す理論である。周到に準備された実験系と、よく訓練された技術で生み出されたと推定される実験結果は、理論の正当性を支持している。

なお、この実験系を用いて、転写中のRNAポリメラーゼの進行を物理的に阻害することで、誤転写を高めたという観察も興味深い。本学の博士の学位を授与するに相応しい先駆的研究である。

申請者が学位論文に提案した新しい理論をめぐる諸問題について尋ねたが、転写研究の現状と其中での本研究の位置づけ、実験の不備や欠陥もふくめて全体像をよく理解し、完全に自己の課題として消化している様子が伺えた。もはや、指導者と対等に議論できる資質を備えていると判断された。