

氏名 田 淵 久 大

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大乙第6号

学位授与の日付 平成6年3月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 Negative Supercoiling of DNA and the
Initiation of Eukaryotic Gene Transcription

論文審査委員 主査教授 石 濱 明

教授 堀 内 賢 介

助教授 嶋 本 伸 雄

教授 半 田 宏（東京工業大学）

Transcription of the *Bombyx mori* fibroin gene in a posterior silk gland extract can be separated into three functional steps on the basis of sensitivity to Sarkosyl: 1) formation of preinitiation complex, which is blocked by 0.025% Sarkosyl; 2) conversion of the preinitiation complex to an elongation complex, a step sensitive to 0.05% Sarkosyl; 3) the subsequent elongation of RNA chain which occurs in the presence of 0.05% Sarkosyl. Whereas the last two steps are rapid and unaffected by template topology, the first step is slow and affected by DNA conformation. In the posterior silk gland extract, closed circular DNA forms a superhelical state and supports more rapid assembly of the preinitiation complex than linear DNA does. Both DNA supercoiling and rapid assembly of the preinitiation complex require ATP and are abolished by the addition of a topoisomerase II inhibitor etoposide(VP16). These results suggest that DNA supercoiling enhances the fibroin gene transcription by facilitating formation of the preinitiation complex.

In most eukaryotic protein-coding genes, the formation of a stable preinitiation complex is directed by TATA element. The TATA box-binding factor TBP is an essential component for the initiation of transcription by RNA polymerase II. I investigated the effect of supercoiling on TBP:promoter interactions using recombinant yeast (ry)TBP. DNase I footprinting analysis showed that ryTBP has a higher affinity for the adenovirus major late(AdML) promoter in the negatively supercoiled state than that in the relaxed state. On the contrary, its affinity for the *Drosophila* hsp70 promoter is constant irrespective of DNA topology. Binding of ryTBP to these promoters induces underwinding of duplex DNA. The functional TATA box and active ryTBP are essential for the underwinding. The step is facilitated by negative supercoiling of DNA on the AdML promoter but not on the *Drosophila* hsp70 promoter. The observed underwinding of DNA might trigger the subsequent entry of other initiation factors and RNA polymerase II into preinitiation complexes.

論文審査結果の要旨

カイコ絹糸腺抽出液を用いた試験管内転写系は、鋳型DNAの高次構造の影響を観察できる貴重な実験系である。申請者は、これを用いて超らせんDNA、弛緩型DNAなど形状の異なる鋳型を用いて転写素過程を追跡し、転写開始複合体形成が転写の律速段階で、しかもDNA高次構造が影響する段階であることを示した。その上で、プロモーター領域での転写開始複合体形成の鍵となるプロモーターTATA配列とそこに結合する転写開始因子(TBP=TATA結合蛋白)の会合が、最もDNA高次構造の影響を受けると考えて、単離成分を用いてモデル実験を行った。その結果、負の超らせん構造は、確かに、TBPのTATA配列への結合を加速することを実証した。しかも、TBP結合によって、プロモーター領域でDNA二本鎖が部分的に解離し(underwinding) またわん曲構造(bending)を誘導していることを示唆した。この結果から、このDNA局所構造変化が転写開始複合体形成加速の原因ではないかと推論した。この研究は、1987年頃より5年以上の長期に亘って、主として国立遺伝学研究所で、断続的に行われたもので、実験の進め方は論理的である。当時の知識と条件では、最善をつくした実験と判断される。事実それらの結果は、原著論文3報として国際誌に発表されている。従って、論文内容は本学の学位授与に相応しい水準と判断される。

遺伝学専攻における最初の論文博士申請者に対して、主として提出論文の内容とその背景をめぐる課題を素材として学力試験を実施した。研究領域の背景と自己の実験系の利点と欠点などよく理解して研究を行っている様子が伺えた。企業研究所で、現在異なった研究課題(酵母細胞壁の研究)で研究に従事しているために、DNAの構造解析の新技术やDNAの構造-活性相関の最新の知見に関する知識は欠けているとしても、そのことは学力の不足に相当するものではないと判断した。