

氏 名 村 上 勝 彦

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第274号

学位授与の日付 平成9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 **Functional Analysis of the Carboxyl-Terminal
Transcription Regulation Domain of *Escherichia
coli* RNA Polymerase Alpha Subunit**

論文審査委員 主 査 教 授 嶋本 伸雄
教 授 廣瀬 進
教 授 堀内 賢介
教 授 饗場 弘二(名古屋大学)
助 教 授 白木原 康雄(国立遺伝学研究所)

論文内容の要旨

The carboxy-terminal one-third of *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit plays a key role in transcription regulation by a group of protein transcription factors and DNA enhancer (UP) elements. The roles of individual amino acid residues within this regulatory domain of α subunit were examined after systematic mutagenesis of the putative contact regions (residues 258–275, and 297–298) for cAMP receptor protein (CRP). The reconstituted RNA polymerases containing the mutant α subunits were examined for their response to transcription activation by cAMP-CRP and the *rrnBP1* UP element. Mutations affecting the response to CRP were located on the surface of the putative CRP contact helix and most of these mutations also influenced the response to the *rrnB* UP element. These observations raise a possibility that the CRP contact surface is also involved in contact with the DNA UP element, although some amino acid residues within this region play different roles in molecular communication with CRP and the UP element. Among the amino acid residues constituting the contact surface, Arg-265 was found to play a major role in response to both CRP and the DNA UP element. Judging by DNase I footprinting analysis, α mutants defective in transcription from the CRP-dependent *lacP1* promoter showed decreased activity in the cooperative binding of CRP. Likewise, mutants defective in *rrnBP1* transcription showed decreased binding to the UP element. The amino acid residues important for contact with both CRP and DNA are conserved in the α subunits of not only bacterial but also chloroplast RNA polymerases.

Each RNA polymerase contains two α subunits, but it is not known yet whether one or both of the α subunits are required in the molecular interactions with transcription factors and DNA UP elements, and whether each α subunit plays a different role in the interaction. To answer these questions, I have developed a reconstitution method of the hybrid RNA polymerase consisting of different α subunit derivatives under a defined orientation (“oriented α -heterodimer”). Results of in vitro transcription analysis indicated that one C-terminal domain is sufficient to interact with CRP and *rrnBP1* UP element, but two C-terminal domains are necessary for the full response to transcription activation by CRP and UP element. The binding sites and locations of two α C-terminal domains on the UP element and CRP-dependent promoters, respectively, were determined after analysis of DNA cleavage by hydroxyl radicals generated by $\text{Fe} \cdot \text{BABE}$ [(p-bromoacetamidobenzyl)-EDTA·Fe], which was conjugated to Cys-269 on one or both of the α subunits.

論文の審査結果の要旨

村上勝彦君は、転写における活性化因子のリセプターである、大腸菌RNAポリメラーゼの α サブユニットの機能を、アミノ酸残基レベルで解析した。 α サブユニットのC末ドメインは、転写をおこなうDNAとの複合体の中で、cAMP receptor protein (CRP)をはじめとする蛋白因子との相互作用部位であるとともに、UP elementと呼ばれるDNAセグメントとも相互作用して転写の活性化をもたらす機能をもつことが知られていた。

そこで、このC末ドメインの20のアミノ酸を一つづつAlaやTrp等に置換した、35種の変異体サブユニットを作製し、RNAポリメラーゼに再構成して、各アミノ酸残基の寄与を調べた。その結果、CRPによる活性化とUP elementによる活性化の変化は平行しており、 α サブユニットが蛋白因子及びDNA因子と相互作用する部位は、互いに重なっていることが示唆された。この知見は、蛋白質上の同一領域が、蛋白因子とも核酸因子とも相互作用して、同一の効果をもたらすことを示唆した初めての例である。また、最も重要な残基は、異なる種のRNAポリメラーゼにも保存されているArg-265であることが、生化学的に明らかになった。

次に、RNAポリメラーゼ中の、2つの α サブユニットの役割の差を見いだすことを試みた。転写機能には影響は無いが、再構成時に β との結合が阻害されるArg-45-Ala変異体と、親和性ペプチドタグを巧妙に用いて、計画的に2つの α を非対称にしたRNAポリメラーゼを再構成するオリジナルな手法を確立した。

導入された非対称性は、化学的クロスリンクで確認した。この酵素を用いて転写を行うことにより、CRPとUP elementにたいする感受性を調べた。この結果、両方の α サブユニットが、異なる程度で、活性化に貢献していることが判明した。

また、機能の変化を伴わずに α サブユニットの269以外のCysをAlaに置換し、Cys-269に鉄イオンをキレートして、周辺のDNA等を切断する(4-bromoacetoamidebenzyl)ethylenediaminetetraacetic acidを導入して、DNAとの接触を調べた。この結果、*rrnBP1*プロモーターと*CCD4*プロモーターの場合は、下流に β サブユニットとクロスリンクされる α サブユニットが来るが、*lacP1*プロモーターの場合は、両方の α が同位置に来ることが示された。また*CCD4*の場合に、2つのCRPダイマーが存在するとき、スペースがある限り下流側から2つの α が位置し、無いときにはさらに上流の空き位置に、2つめの α が位置することが明らかになった。

これらの膨大な量の実験の結果をもとに、 α サブユニットの機能ドメインを高分解能で解析し、また2つの α 各々の役割分担の有無を総合して議論した。提出された論文(英文)は、以上の研究に用いられた手法、得られた結果、それに基づく議論を明瞭に記述し、その内容は、学位の要件を満たすものであった。

公開発表に続き、5名の審査委員と村上君との間で質疑応答がなされた。その議論と提出された論文を元に、博士論文及び関連分野での知識、実験結果の解釈とその有効性について審査委員で審議し、学位にふさわしい知識と考察力、および英語による表現力を有していると判断した。