

氏 名 安 井 潔

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第333号

学位授与の日付 平成10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 分裂酵母RNAポリメラーゼIIサブユニット3の

構造と機能に関する研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 廣瀬 進

教 授 嶋本 伸雄

助 教 授 藤山 秋佐夫

助 教 授 禾 泰寿（埼玉医科大学）

助 教 授 白木原 康雄（国立遺伝学研究所）

論文内容の要旨

遺伝子発現の主要な制御は転写制御によるmRNA合成の調節である。中でも転写開始段階での調節が主要な制御機構である。

真核生物における転写開始制御の研究が盛んになってきたが、その実体解明にはまだ遠い。その理由の一つに、転写を行う酵素であるRNAポリメラーゼの構造と機能に関する知見が少ないことがあげられる。安井君は遺伝子発現様式が高等真核生物に近いと考えられている分裂酵母を材料とし、蛋白質をコードする遺伝子の転写に関与するRNAポリメラーゼIIの構造形成と機能発現の相関の解明を目指して研究を実施した。

RNAポリメラーゼIIは10数種類のサブユニットより構成される酵素であるが、各々のサブユニットの機能に関する知見は少ない。しかし、RNAポリメラーゼIIの各サブユニットの分担機能はサブユニットが集合して初めて発現されRNAポリメラーゼの機能として集約している。従って、各サブユニットの機能同定のためには、各構成サブユニットの相互作用ネットワークを明らかにし集合様式を明らかにすることが重要であると考えた。

分裂酵母のRNAポリメラーゼII (pol II)は10個のサブユニットより構成されている。各遺伝子がコードするアミノ酸配列は、他生物の対応するサブユニットのアミノ酸配列との間で高い相同性を示すとともに、サブユニット1 (Rpb1), 2 (Rpb2), 3 (Rpb3) および、11 (Rpb11) は大腸菌のRNAポリメラーゼのコア酵素を構成するサブユニットb', b および aともそれぞれ配列上の相同性を有している。大腸菌では、まず初めにaサブユニットが結合し、a₂b, a₂bb' となりコア酵素を形成することから、aサブユニットがRNAポリメラーゼ形成の核となっているということが分っている。

そこで、安井君はaサブユニットの真核生物における相同体と考えられている3番目に大きなサブユニットRpb3に着目し、Rpb3を中心としたサブユニット間相互作用ネットワークの解析を行った。まず、初めにRpb3と相互作用するサブユニットを決定するために、GST (glutathione S-transferase)-Rpb3 融合蛋白質およびRpb3のC末端にヒスチジンタグを付加したRpb3-CKHを作製し、いずれにも更にプロテインキナーゼAの認識部位を挿入し、³²Pによってリン酸化し、プローブを準備した。精製RNAポリメラーゼII画分のファーウェスタン解析を行ったところ、Rpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb5およびRpb8もしくはRpb11との相互作用を示すシグナルが検出された。しかし、精製RNAポリメラーゼIIを用いた解析では精製RNAポリメラーゼIIに挟雑蛋白質やサブユニットの分解物が含まれているため、それらのものとも一部結合が見られた。また、Rpb8とRpb11のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での移動度が非常に似ているためRpb3がどちらのサブユニットと相互作用しているのかということが分からない。このような問題点を克服するために大量発現した各サブユニットの等量混合物をもちいたファーウェスタン解析を行い、Rpb3が結合する相手としては、Rpb3, Rpb5, Rpb11を同定した。さらに、GST-pull down assayを用いてGST-Rpb3がRpb5とRpb11に溶液中でも結合するということを証明した。以上の実験によりRpb3がRpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb5 および Rpb11と相互作用していると結論した。

次に、Rpb3蛋白質上での各サブユニットの結合に関わる部位を同定した。Rpb3には真核生物各種間で保存された4つの領域が存在する。これらの領域のどの部位がRpb4 およびRpb11との相互作用に必要なのかということ調べるため、Rpb3断片のコレクション

を作製し、それらを用いてファーウェスタン解析、GST-pull downを行った。その結果、Rpb5と相互作用するために必要なRpb3上の領域105アミノ酸残基から297アミノ酸残基までであるという結論を得た。この結果から考えると、Rpb3上のRpb5とRpb11と相互作用に関わる部位は一部重なっている可能性がある。そこで、Rpb3-Rpb5相互作用とRpb3-Rpb11相互作用が互いにどのような影響を及ぼすのかということ調べるために、Rpb3へのRpb5の結合に対するRpb11の影響、Rpb5により濃度依存的に増強されるということが明らかになった。サブユニット集合のコアがRpb2-Rpb3-Rpb11あるとする石浜研究室の観察から推論すると、Rpb5が結合することで、コア集合体が安定化される可能性を示唆される。

最後に、Rpb3の機能と構造を遺伝学的に解析することによって、RNAポリメラーゼIIの会合に関して *in vitro* で得られた知見が検証されるのではないかと考え、*rp3* 遺伝子に変異を持つ温度感受性株の解析を行った。許容温度で温度感受性株を培養することにより、RNA合成能をもつRNAポリメラーゼIIを得ることができた。RNAポリメラーゼIIの熱安定性と反応至適温度を調べることにより、RNAポリメラーゼIIのタイプの異なる機能異常を区別できる可能性を示した。

論文の審査結果の要旨

真核生物の転写制御に関する研究は盛んに行われているが、実際に転写反応を行う酵素であるRNAポリメラーゼの構造と機能については不明の点が多い。特に、RNAポリメラーゼを構成する各サブユニットの相互作用ネットワークと集合様式に関する知見は乏しい。分裂酵母のRNAポリメラーゼIIは10個のサブユニットより構成されている。安井君は大腸菌RNAポリメラーゼ形成の核となっている α サブユニットの真核生物におけるホモログと考えられているRpb3に着目し、Rpb3を中心としたサブユニット間相互作用を解析した。

分裂酵母から精製したRNAポリメラーゼIIや、大腸菌で大量発現した各サブユニットの等量混合物を用いてRpb3の結合をファーウェスタン法により解析した。その結果、Rpb3がRpb1, Rpb2, Rpb3, Rpb5, Rpb11と相互作用することが示された。さらに、GST pull down assayにより、GST-Rpb3にRpb5とRpb11が溶液中でも結合することを確認した。次に、Rpb3分子上で、Rpb5やRpb11との相互作用に関わる領域を解析した。その結果、Rpb5との相互作用はRpb3の105～263アミノ酸残基が、Rpb11との相互作用は105～297アミノ酸残基があれば起きることが判明した。また、Rpb3とRpb11間の相互作用がRpb5により濃度依存的に増強されることを見出した。最後に、*rpb3* 遺伝子に変異をもつ温度感受性株からRNAポリメラーゼIIを部分精製し、その熱安定性と反応至適温度を調べることにより、RNAポリメラーゼIIの異なるタイプの機能異常を区別できる可能性を示した。

以上のように、この論文の内容は真核生物のRNAポリメラーゼIIの構造と機能に関して基礎的データを提供するものであり、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすことを認めた。