

氏 名 石 黒 亮

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第433号

学位授与の日付 平成11年9月30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 Molecular Assembly of Fission Yeast RNA Polymerase II and

Mutation Analysis of Rpb6

論文審査委員 主 査 教 授 廣瀬 進

教 授 嶋本 伸雄

教 授 荒木 弘之

教 授 原島 俊（大阪大学）

論文内容の要旨

The subunit-subunit contact network was studied for the *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II involving small subunits Rpb6, Rpb7, Rpb8, Rpb10, Rpb11 and Rpb12 by far-Western blot analysis using these six small-sized subunits as probes. Taken the results together, the subunit-subunit interaction was observed for a total of 18 (or 19) combinations. All eight small-sized subunits exhibited binding activities to two large subunits, Rpb1 and Rpb2. In addition, bimolecular interaction was observed for the combination of Rpb3-Rpb11. The subunit-subunit contact within the assembled RNA polymerase was then analyzed by protein-protein cross-linking using five species of bifunctional cross-linkers with different length and specificity. Cross-linking was observed for a total of 19 combinations, including five combinations between small subunits, Rpb3-Rpb10, Rpb3-Rpb11, Rpb5-Rpb6, Rpb6-Rpb7 and Rpb6-Rpb8. The results altogether indicate that two large subunits Rpb1 and Rpb2 provide a platform for assembly of small subunits and that small subunits interact each other for limited combinations. Direct contact of the two large subunits, Rpb1 and Rpb2, was also demonstrated by cross-linking.

Since Rpb6 makes multiple contacts with not only the two large subunits but also three small subunits Rpb5, Rpb7 and Rpb8, Ishiguro started genetic analysis of the common subunit Rpb6 shared by RNA polymerases I, II and III. Deletion and truncation analyses of the *rpb6* gene indicated that Rpb6 consisting of 142 amino acid residues is an essential protein for cell viability, but the essential region is located in the carboxy (C)-terminal proximal half between residues 61-139. After random mutagenesis, a total of 14 temperature-sensitive (Ts) mutants were isolated, each carrying a single (or double in three cases and triple in one case) mutation. Four mutants each carrying a single mutation in the essential region were sensitive against 6-azauracil (6AU) that inhibits transcription elongation by depleting the intracellular pool of GTP and UTP. Both the 6AU sensitivity and Ts phenotypes of these *rpb6* mutants were suppressed by over-expression of TFIIS, a transcription elongation factor. In agreement with the genetic studies, the direct interaction between TFIIS and RNA polymerase II was observed *in vitro* by pull-down assay using a fusion form of TFIIS with glutathione S-transferase (GST), and the mutant RNA polymerases containing the mutant Rpb6 subunits showed reduced affinity for TFIIS. Taken together, Ishiguro proposes that Rpb6 plays a central role in protein-protein assembly with both the RNA polymerase II subunits and the transcription elongation factor TFIIS.

論文審査結果の要旨

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の RNA ポリメラーゼ II は Rpb1 から 12 までの 12 個のサブユニットから構成されている。これらのサブユニットのうち、Rpb1, Rpb2 及び、Rpb3 と Rpb11 はそれぞれ原核生物の RNA ポリメラーゼの β' , β 及び、 α サブユニットとホモロジーが有り、Rpb1~3 と Rpb11 は原核生物の RNA ポリメラーゼコア酵素 $\alpha 2 \beta \beta'$ と相同の複合体を形成すると考えられている。

本研究で石黒君は分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II のサブユニット間の相互作用を、ファーウェスタン解析と架橋距離や特異性の異なる 5 種の薬剤を用いた架橋実験により解析した。その結果、Rpb1 と Rpb2 が直接結合し、他の小さなサブユニット集合のためのプラットフォームを形成すること及び、Rpb3-Rpb10, Rpb3-Rpb11, Rpb5-Rpb6, Rpb6-Rpb7 と Rpb6-Rpb8 間の相互作用が示された。

次に、Rpb6 は Rpb1, Rpb2 だけでなく、Rpb5, Rpb7, Rpb8 とも相互作用することに注目し、Rpb6 に関する遺伝学的解析を行った。 *rpb6* 遺伝子のいろいろな欠失変異を用いた解析から、Rpb6 は 142 アミノ酸から成る生育に必須なタンパク質で、その必須領域は C 末端側半分のアミノ酸残基 61-139 に有ることがわかった。 *rpb6* 遺伝子に変異を誘起し、14 種の温度感受性変異株を分離した。必須領域内の 4 種の単一アミノ酸置換変異株は、GTP や UTP の細胞内プールを減少させることにより転写伸長を阻害する 6 アザウラシルに感受性で、温度感受性と 6 アザウラシル感受性は共に転写伸長因子 TFIIS の過剰発現で抑圧された。また、GST pull-down assay により、RNA ポリメラーゼ II が TFIIS と直接相互作用すること、変異型 Rpb6 を含む RNA ポリメラーゼ II では TFIIS への親和性が下がることが示された。これらの結果から、石黒君は Rpb6 が RNA ポリメラーゼ II のサブユニット集合と TFIIS への結合に重要な役割を果すことを提唱した。

以上のように、この論文の内容は RNA ポリメラーゼ II の構造と機能に関して基礎的なデータを提供するもので、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満すものであることを、審査委員全員が認めた。なお、本研究の一部は国際学術誌である *J. Mol. Biol.* にすでに発表されている。