

氏 名 三戸部 治 郎

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第469号

学位授与の日付 平成12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 RNA polymerase II Rpd3 subunit of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

論文審査委員 主 査 教 授 廣瀬 進
教 授 荒木 弘之
助 教 授 藤山 秋佐夫
教 授 禾 泰壽（埼玉医科大学）
助 教 授 古久保 哲朗（奈良先端科学技術大学院大学）

論文内容の要旨

Three types of the nuclear RNA polymerase in eukaryotes are all multi-subunit enzymes, each consisting of more than 10 subunits. The RNA polymerase II is involved in the synthesis of mRNA and plays a key role in transcription of protein-coding genes. The RNA polymerase II from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is composed of 12 putative subunits. Sequence analysis indicated that, as in the case of other eukaryotic RNA polymerases, the largest subunit Rpb1 and the second largest subunit Rpb2 of *S. pombe* RNA polymerase II have notable homology with the β' and β subunits, respectively, of the prokaryotic RNA polymerases. The third largest subunit Rpb3 also has homology with the amino (N)-terminal domain of prokaryotic RNA polymerase α subunit (α NTD), which plays a key role in subunit assembly of this complex enzyme by providing the contact surfaces for both β and β' subunits. The *Schizosaccharomyces pombe* Rpb3 protein forms a core subassembly together with Rpb2 (the β homologue) and Rpb11 (the second α homologue) subunits as in the case of the prokaryotic $\alpha_2\beta$ complex. Several lines of evidence indicate that in addition to these core subunits, Rpb1, Rpb5, Rpb7 and Rpb8 also interact with Rpb3.

Sequence comparison between prokaryotes and eukaryotes also indicated Rpb3 has four conserved regions A to D. Among which two (A and D) are conserved among Rpb3 homologues from both prokaryotes (α subunits) and eukaryotes and two (B and C) are conserved only within eukaryotes. The regions A and D correspond to the N-terminal proximal and the C-terminal proximal regions of the α NTD, each playing critical roles in the contact with α and β subunits (motif-1) or the contact with α and β' subunits (motif-2), respectively. On the other hands, two regions in the middle part of Rpb3 protein (Region B and C) do not exist in the prokaryotic RNA polymerases, Region B is specifically conserved in eukaryotic RNA polymerase II, and Region C is conserved among all three types of eukaryotic RNA polymerases. Therefore these two regions have been considered to be involved in eukaryote specific function(s).

In order to get insight into *in vivo* roles of Rpb3 in the assembly and function of RNA polymerase II, Mr. Mitobe has performed mutant studies for the *S. pombe rpb3* gene of RNA polymerase II. First, he carried out a systematic search for temperature-sensitive (Ts) or cold-sensitive (Cs) *S. pombe* mutants with

mutations throughout the *rpb3* gene. After PCR mutagenesis of the entire *rpb3* sequence, he isolated 9 Ts⁻ and 3 Cs⁻ mutants. After the sequence analysis of mutant *rpb3* gene, each mutant was found to carry a single (or double in a few cases) mutation in one of the four regions (A to D) conserved among the eukaryotic subunit 3 homologues. The 3 Cs⁻ mutations were all located in the region A, in agreement with its most important role in the assembly of prokaryotic RNA polymerase, while the Ts⁻ mutations were scattered in all four regions. Since the metabolic stability of most Ts⁻ mutant Rpb3 proteins was markedly reduced at a non-permissive temperature, he predicts that these mutant Rpb3 proteins are defective in the assembly or the mutant RNA polymerases containing the mutant Rpb3 are thermolabile. The assembly state of mutant RNA polymerase II was tested by treating purified mutant RNA polymerases with low concentrations of urea. One representative Ts⁻ mutant complex was indeed dissociated more easily than the wild-type RNA polymerase. Moreover, the Ts⁻ phenotype of all the mutants were suppressed to various extents by overexpression of Rpb11, the pairing subunit in the initial stage of RNA polymerase II assembly. He concludes that the majority of *rpb3* mutations affects the subunit assembly of Rpb3, even though the extent of influence on the subunit assembly is different depending on the location of mutations.

Since the conserved regions B and C are unique for eukaryotic Rpb3 homologues, he thought that eukaryotic-specific transcription factors interact with one or both of these regions. He started the analysis of factor-dependent *in vitro* transcription activity for the mutant RNA polymerases. For this purpose, he constructed activator-dependent *in vitro* transcription system of *S. pombe* using *S.cerevisiae* GAL4-VP16. Results of the preliminary experiments indicate loss of the factor-dependent transcription activity after heat treatment of the cell extracts from *rpb3* mutants carrying mutations in the B or C region.

論文の審査結果の要旨

真核生物の核には3種のRNAポリメラーゼが存在するが、そのうちRNAポリメラーゼIIはmRNA合成に関わっている。分裂*Schizosaccharomyces pombe*のRNAポリメラーゼIIは12個のサブユニットから成り、そのうち最大サブユニットRpb1と次に大きいRpb2はそれぞれ原核生物RNAポリメラーゼの β' および β サブユニットと有意なホモロジーをもっている。3番目の大きさのサブユニットRpb3は原核生物のRNAポリメラーゼにおいて β, β' サブユニットとの集合に重要な役割を果たす α サブユニットのN末端ドメイン(α NTD)とホモロジーを示す。分裂酵母のRpb3は β サブユニットホモログであるRpb2ともうひとつの α サブユニットホモログであるRpb11と共にコア集合体を形成する。また、Rpb3はRpb1, Rpb5, Rpb7, Rpb8とも相互作用することが示唆されている。種々の真核生物のRpb3と原核生物 α サブユニットの配列の比較から、Rpb3には4つの保存された領域が存在することが判った。そのうち、領域AとDは真核、原核の両方で保存されており、それぞれ β サブユニットとの接触に関わる α NTDのN末端側と β' サブユニットの接触に関わる α NTDのC末端側に相当する。一方、領域BはRNAポリメラーゼIIにのみ保存されており、領域Cは真核生物の3種のRNAポリメラーゼで保存されているため、これらの領域は真核生物に特異的な機能に関わると考えられる。

RNAポリメラーゼIIのサブユニット集合と機能に果たすRpb3の役割を明らかにする目的で、三戸部君は分裂酵母*rpb3*遺伝子の変異株を分離し、その解析を行った。まず、PCRを用いた変異導入法により、9種の高温感受性と3種の低温感受性変異株を分離した。全ての変異株は保存領域A~Dのいずれかに変異をもっていた。そのうち3種の低温感受性変異は保存領域Aに落ち、この領域が原核生物でサブユニット集合に重要な役割を果たすことと良く一致している。一方、高温感受性変異は領域A~Dに分散して存在した。高温感受性変異株のRpb3は非許容温度に移すと分解されたので、サブユニットの集合に欠陥があるか、変異株RNAポリメラーゼIIは高温で不安定であると予想された。精製したRNAポリメラーゼIIを尿素処理したところ、ひとつの高温感受性変異株では野生株に比べて不安定であった。また、RNAポリメラーゼIIのサブユニット集合初期段階でRpb3と結合するRpb11を過剰発現すると、全ての高温感受性変異が抑圧された。これらの結果から、得られた*rpb3*変異株のほとんどはRpb3サブユニットの集合に欠陥があると考えられる。

領域B, Cは真核生物のRNAポリメラーゼにのみ保存されているので、これらの領域が転写制御因子と相互作用する可能性を検討した。このため、強力な転写活性化能をもつGAL4-VP16を野生株と変異株由来の*in vitro*転写系に加えて解析したが、領域B, CがGAL4-VP16に依存した転写活性化に関わることを示す結果は得られなかった。

以上のように、この論文の内容はRNAポリメラーゼIIのサブユニット集合と機能に関して重要な基礎となるもので、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たす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*Mol. Gen. Genet.*にすでに発表されている。

博士論文審査に関わる公開発表会の後に、三戸部君と論文審査委員より、質疑応答がなされた。その結果、三戸部君は博士論文に関わる研究分野および、関連する研究分野につ

いて十分な知識をもっており、その知識にもとずいて考察する能力もそなえていることがわかった。また、語学力については、本論文および、国際学術誌に掲載された英語論文について検討した結果、学位にふさわしい英語の能力をもつと判断した。