

氏 名 野 村 扶

学位 (専攻分野) 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第534号

学位授与の日付 平成13年3月23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 Protein-protein interactions on the β Subunit of
Esherichia coli RNA polymerase

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 嶋本 伸雄
教授 荒木 弘之
助教授 白木原 康雄
教授 饗場 弘二 (名古屋大学)
助教授 田中 寛 (東京大学)

論文内容の要旨

The RNA polymerase core enzyme of *Escherichia coli* with the catalytic activity of RNA synthesis is assembled sequentially under the order: $2\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$ (premature core) \rightarrow E (active core; E represents the active form of $\alpha_2\beta\beta'$). The core enzyme gains the activities of promoter recognition and transcription initiation after binding one of seven molecular species of the σ subunit. The β subunit plays a major role in the catalytic activity of RNA polymerization and provides the binding sites for substrates and nascent RNA. The expression of these intrinsic activities, however, completely depends on the interaction with the α and β' subunits. In order to get further insight into the structure-function relationship of β , I tried in this study to map the protein-protein contact surfaces on β with other core subunits. For the identification of α subunit contact sites, the tryptic cleavage pattern was compared between isolated free β and β in the $\alpha_2\beta$ complex. Results indicated that the central part of β between the conserved regions E and F were protected from tryptic digestion after binding of the α subunit. *In vitro* binding assays of various β fragments with the α subunit indicated that two regions, $\beta(737-936)$ including the regions E and F and $\beta(937-1138)$, are involved in α binding. These two regions were also shown to be required for binding of β' to the $\alpha_2\beta$ complex to form the core enzyme.

The β subunit of assembled RNA polymerase is involved in molecular interaction with a group of transcription factors (β -contact or class-III factors), leading to modulation of the specificity and activity of RNA polymerase. In order to identify novel species of the class-III transcription factor, I tried to isolate β -associated proteins from extracts of cells expressing GST(glutathione S-transferase)-tagged β at low levels. Protein complexes containing GST- β were isolated by glutathione affinity column chromatography, and separated by SDS-PAGE. After micro-sequencing and mass-spectroscopy, the candidate proteins of class-III transcription factor have been identified, including HepA, glycerol kinase (GlpK), adenosyl methionine transferase (MATase), YfhO, elongation factor EF-Tu, ribosomal proteins L1, L13 and S6. Binary complex formation test between the purified class-III factor candidates and the RNA polymerase indicated that HepA forms a stable complex with the RNA polymerase core enzyme, but not with the holoenzyme. Six proteins, GlpK, MATase, YfhO, L1, L13 and S6, so far tested did not form stable complexes under the conditions employed. As predicted from the

binding specificity, HepA competed with the σ^{70} subunit in binding with the core enzyme. The quantitative Western blot analysis indicated that the HepA protein is expressed only at the exponential growth phase at the concentration of about one-third the level of σ^{70} subunit. Taken together I propose a model that HepA is a class-III transcription factor, which plays a regulatory role in transcription of growth-related genes at a step(s) after σ^{70} release.

論文の審査結果の要旨

大腸菌RNA polymerase コア酵素は $\alpha_2\beta\beta'$ のサブユニットを持ち、 β サブユニットは活性部位の一部とDNAとRNA結合部位の一部を担う重要なサブユニットである。サブユニット間の接触に必須の部位を同定するために、野村君はトリプシンで遊離状態の β サブユニットとコア酵素の中間産物である $\alpha_2\beta$ 複合体を部分消化し、 α サブユニットの存在により切断の阻害が起こる部位が β サブユニットの中央部とC末であることを見いだした。トリプシン分解で生成するペプチド断片を固定化して検討したところやはりこの2つの部分を含む断片のみが α サブユニットを結合した。そこで、 β サブユニットのaa737-aa936とaa937-aa1138が、サブユニット間の接触に必須であると結論した。

次に彼は、クラスIII因子と呼ばれる β サブユニットに接触する転写因子を、細胞内でglutathione S-transferaseと融合した β サブユニットを発現して、融合タンパク質に結合するタンパク質を分離することにより探索した。glutathione カラム、ゲル電気泳動、マイクロペプチド配列決定法により8つのタンパク質を同定したが、いくつかの確認のための結合アッセイの後、HepAタンパク質のみが候補として生き残った。HepAが対数増殖期に多く発現されることを発見した。また過去に報告されたように、HepAは σ^{70} を持つホロ酵素よりも持たないコア酵素の方に親和性が高いことを確認、定量的ウェスタン法により、対数増殖期において σ^{70} の半分量細胞内に存在することを見いだした。

これらの成果は、膨大な実験をこなした上での新規の発見を含んでいるので、学位論文としての必要条件を満たすとの結論に到達した。