

氏 名	みや お たけ のり 宮 尾 武 孝
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 393 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	分裂酵母 RNA ポリメラーゼⅡサブユニット 5 の構造と機能に 関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充	教 授 河 合 明 彦	教 授 川 寄 敏 祐
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

転写制御システムに関与する調節因子が数多く発見されているが、転写因子の作用機構を理解するには、それらの標的分子である RNA ポリメラーゼ自体の性質を解明することが不可欠と考えられる。真核生物の RNA ポリメラーゼⅡは mRNA を合成する酵素であり、一般に10数種類のサブユニットと推定される成分から構成されている。しかし、それらサブユニットの分担機能については全く不明である。そこで著者は、分裂酵母 RNA ポリメラーゼⅡのサブユニット 5 (Rpb5) に着目し、その構造および機能の解明を目的として研究した。まず、Rpb5 の遺伝子を単離しその塩基配列を決定した。つぎに、大腸菌で大量発現し精製した Rpb5 タンパクを用いて、RNA ポリメラーゼⅡ個々のサブユニットに対して Far-western 解析をおこない、Rpb5 と相互作用するサブユニットを見い出した。さらに、出芽酵母 two-hybrid スクリーニング法により、Rpb5 と相互作用する分裂酵母タンパクを探索していくつかの候補を見い出した。

I. RNA ポリメラーゼⅡサブユニット 5 遺伝子 (*rpb5*) の単離と構造解析

分裂酵母 *rpb5* 遺伝子を単離するために、すでに遺伝子が単離されていた出芽酵母 RPB5 (ScRPB5) とヒト hRPB25 のアミノ酸配列を比較し、両者の保存領域をプライマー部位として、分裂酵母 mRNA 由来 cDNA を鋳型とした PCR により *rpb5* 遺伝子を含む DNA 断片を合成した。これをプローブに用いて、*rpb5* 遺伝子の全長を単離し、その塩基配列を決定した。*rpb5* 遺伝子より予想される Rpb5 タンパクのアミノ酸配列は 210 アミノ酸残基からなり、ScRPB5 や hRPB25 とそれぞれアミノ酸配列上 55%, 43% の同一性を有し、特にカルボキシ末端側の約 3 分の 1 の領域が高く保存されていた。この単離した分裂酵母 *rpb5* 遺伝子産物が、RNA ポリメラーゼⅡの構成サブユニットであることは、1) 単離した遺伝子がコードするポリペプチドを大腸菌で大量発現させたのち精製し、それを用いて調製したポリクローナル抗体が RNA ポリメラーゼⅡの 27kDa のサブユニットに反応すること、2) その 27kDa のサブユニットの部

分アミノ酸配列が、*rpb5* 遺伝子より予想される Rpb5 タンパクのアミノ酸配列の一部と一致することにより確認された。

II. Rpb5 と相互作用するサブユニットの探索

つぎに、Rpb5 が RNA ポリメラーゼ II のなかでどのサブユニットと接触して多サブユニット酵素 RNA ポリメラーゼが形成されているのかを明らかにする目的で、Rpb5 タンパクをプローブにした Far-western 解析をおこなった。その結果、Rpb5 はサブユニット Rpb1, Rpb2, Rpb3 と強く結合し、また Rpb5 およびサブユニット Rpb8 あるいは Rpb11 と弱く結合することが判明した。Rpb3 タンパクをプローブに用いた同様の実験では、Rpb3 はサブユニット Rpb1, Rpb2, Rpb5 と強く結合した。Rpb3 と Rpb5 の相互作用を確認するために、グルタチオンセファロースビーズに固定化した Rpb3 または Rpb5 タンパクを用いて、それらに結合するサブユニットの検出を試みた。その結果、ウサギ網状赤血球抽出液中で *in vitro* 翻訳により合成された ³⁵S 標識 Rpb3 あるいは Rpb5 タンパクは、それぞれ Rpb5 および Rpb3 ビーズに結合回収され、Rpb3 と Rpb5 の相互作用が確認された。また、大腸菌で発現し精製した Rpb1 および Rpb2 の部分ポリペプチドに対して、Rpb3 または Rpb5 タンパクをプローブにした Far-western 解析をおこない、Rpb3 が Rpb1 の中央部分と Rpb2 の C-末端部分に、Rpb5 が Rpb1 の中央および C-末端部分と Rpb2 の N-末端部分に強く結合し、Rpb1 および Rpb2 ポリペプチド分子上の Rpb3 あるいは Rpb5 に対する結合領域が示唆された。

III. Rpb5 と相互作用するタンパクの探索

分裂酵母内で Rpb5 と相互作用するタンパクを探索するために、出芽酵母 two-hybrid スクリーニング法により約200万の分裂酵母 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンのうち4クローンが RNA ポリメラーゼ I の最大サブユニット Rpa1 の C 末端領域をコードしていた。そこで、RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット Rpb1 の相同領域について同様に分裂酵母 two-hybrid 法により調べたところ、Rpb5 との相互作用が検出された。これらの結果により、核内 RNA ポリメラーゼ I, II, III 間で共通のサブユニット Rpb5 と、各 RNA ポリメラーゼの最大サブユニット C 末端領域との相互作用が、サブユニット集合に寄与していることが示唆された。出芽酵母 two-hybrid スクリーニングで得られた陽性クローンのなかに、新規な蛋白質をコードするクローンを得た。その予想される 1957 残基よりなるアミノ酸配列はほぼ全長にわたって coiled-coil 構造モチーフを有することから、いわゆる核骨格成分タンパクとして RNA ポリメラーゼと相互作用している可能性が示唆された。

以上、著者は分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II サブユニット 5 (Rpb5) の遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することによりタンパクの全一次構造を決定した。また、大腸菌大量発現系により Rpb5 タンパクを得ることに成功し、それを用いて Rpb5 と相互作用するサブユニットを明らかにした。さらに、Rpb5 と相互作用するいくつかの分裂酵母タンパクを出芽酵母 two-hybrid 法で同定した。これらの知見により、真核生物 RNA ポリメラーゼの Rpb5 を中心としたサブユニット間相互作用ネットワークおよび

Rpb5 に相互作用する転写因子のネットワークを解明する突破口が得られた。

論文審査の結果の要旨

転写制御システムに関与する調節因子が数多く発見されているが、転写因子の作用機構を理解するには、それらの標的分子である RNA ポリメラーゼ自体の性質の解明が必要である。真核生物の RNA ポリメラーゼ II は mRNA を合成する酵素であり、一般に10数種類のサブユニットと推定される成分から構成されているが、サブユニットの分担機能については明らかにされていない。著者は、分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II のサブユニット 5 (Rpb5) に着目し、その構造および機能の解析を目的として、Rpb5 の遺伝子を単離し塩基配列を決定した後、Rpb5 タンパクと相互作用する RNA ポリメラーゼ II サブユニットをみつけ、さらに分裂酵母内で Rpb5 と相互作用するタンパクの候補を見いだした。単離した分裂酵母 *rpb5* 遺伝子より予想される Rpb5 タンパクのアミノ酸配列は 210 アミノ酸残基からなり、出芽酵母 RPB5 やヒト hRPB25 とアミノ酸配列上 55%, 43% の同一性を有して、特にカルボキシ末端側の約 3 分の 1 の領域が高く保存されていた。次に、本遺伝子産物 Rpb5 が RNA ポリメラーゼ II のなかでどのサブユニットと接触して多サブユニット酵素 RNA ポリメラーゼが形成されているのかを明らかにする目的で、Rpb5 タンパクをプローブにした Far-western 解析を行った結果、Rpb5 が Rpb1, Rpb2, Rpb3 と強く結合し、また Rpb8 あるいは Rpb11 と弱く結合することが判明した。また、Rpb5 以外のサブユニット間における相互作用についても明らかにすることができた。さらに、分裂酵母内で Rpb5 と相互作用するタンパクを検索するために、出芽酵母 two-hybrid スクリーニング法により約 200 万の分裂酵母 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、得られた陽性クローンの内 4 クローンが RNA ポリメラーゼ I の最大サブユニット Rpa1 の c 末端領域をコードしていた。そこで、RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット Rpb1 の相同領域について同様に分裂酵母 two-hybrid 法により調べたところ、Rpb1 との相互作用が検出された。本結果より、核内 RNA ポリメラーゼ I, II, III 間で共通のサブユニット Rpb5 と、各 RNA ポリメラーゼの最大サブユニット C 末端領域との相互作用が、サブユニット集合に寄与していることが示唆された。

以上、著者は分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II サブユニット 5 の遺伝子を単離し、そのタンパクの全一次構造を塩基配列より決定すると共に、これと相互作用するサブユニットを明らかにし、さらに分裂酵母内で相互作用するタンパクについても出芽酵母 two-hybrid 法で同定した。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 9 年 3 月 3 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。