

Title	RNA Polymerase $\alpha$ Subunit from <i>Thermus thermophilus</i> HB8 : Cloning of the Gene, and the Solution Structure of the C-terminal Domain
Author(s)	和田, 崇
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41545">https://hdl.handle.net/11094/41545</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	わ だ たかし 和 田 崇
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 14421 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	RNA Polymerase $\alpha$ Subunit from <i>Thermus thermophilus</i> HB8 : Cloning of the Gene, and the Solution Structure of the C-terminal Domain (高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> 由来のRNA ポリメラーゼ $\alpha$ サ ブユニット: 遺伝子の同定とC末端ドメインの溶液構造)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正  (副査) 教授 倉光 成紀 教授 品川 日出夫

### 論文内容の要旨

構造生物学では生体分子の構造と機能の相関関係を明らかにすることが重要である。その際、好熱菌由来の蛋白質ならば、その高い安定性のために構造解析が行いやすいと考えられる。また、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* (*Tt*) では、遺伝子操作系が確立されているので、*in vivo* レベルでの機能の解析が可能である。ところで大腸菌 *Escherichia coli* (*Ec*) では、RNA ポリメラーゼの  $\alpha$  サブユニットの C 末端ドメイン ( $\alpha$  CTD) が様々な蛋白質の活性化因子と相互作用するとともに、UP エlement とよばれる AT-rich な DNA 配列に作用して転写を活性化することが知られている。この  $\alpha$  CTD の立体構造はすでに決定されている。そこで本研究では、*Tt* 由来の  $\alpha$  CTD の立体構造を解明し、*Ec*  $\alpha$  CTD のそれと比較することで、構造生物学の観点から高度好熱菌における転写機構を研究することを目的とした。

まず、*Tt* HB8 のゲノム DNA から、RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニット遺伝子 (*rpoA*) および周辺の 5 つのリボソーム蛋白質遺伝子を単離、同定した。これらの遺伝子のゲノム上での配置順序は *rpl36-rps13-rps11-rps4-rpoA-rpl17* であり、多くの真正細菌の場合と一致した。さらに、*Tt* RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニットを *Ec* の T7 発現系で大量発現させ、調製した。その熱安定性は *Ec* のものより高いことが、CD 測定で示された。

また、*Tt*  $\alpha$  CTD (85 残基) に相当する遺伝子を、大腸菌での大量発現に適した塩基配列をもつ DNA として全合成し、これを用いて *Tt*  $\alpha$  CTD を大量発現することに成功した (13mg/1 in LB 培地)。その熱安定性は *Ec*  $\alpha$  CTD のものより高いことが、CD 測定で示された。ところで、*Ec*  $\alpha$  CTD には C 末端にループ構造があるが、*Tt*  $\alpha$  CTD にはこれがない。したがって *Ec*  $\alpha$  CTD における C 末端ループの役割は、構造の安定化ではなく、転写の活性化のような生物学的な機能に関与しているのであろう。さらに、 $^{15}\text{N}$  または  $^{13}\text{C}$  均一ラベルされた *Tt*  $\alpha$  CTD を NMR で解析し、その立体構造を決定した。その構造は *Ec*  $\alpha$  CTD の立体構造と非常に似ている。しかし、*Tt*  $\alpha$  CTD と *Ec*  $\alpha$  CTD の立体構造における静電ポテンシャルの比較から、*Tt*  $\alpha$  CTD-DNA の相互作用のモードは *Ec* のものとは異なると思われる。最近の研究によると、*Ec*  $\alpha$  CTD は UP エlement の intrinsic bending を認識することが示唆されている。しかし intrinsic bending が 75°C という *Tt* の至適生育温度でも存在するかどうか疑問である。この点からも *Tt*  $\alpha$  CTD-DNA の相互作用のモードは *Ec* のものとは異なると思われる。このことを明らかにするには、高温下での *Tt*  $\alpha$  CTD-DNA の相互作用の実験が *in vivo* と *in vitro* で行われることが必要である。

## 論文審査の結果の要旨

和田崇君は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のRNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニットの遺伝子 *rpoA* をクローニングして、遺伝子上の位置、塩基配列を決定した。さらに  $\alpha$  サブユニットおよびそのC末端ドメイン ( $\alpha$ CTD) を発現させ、 $\alpha$ CTD に関してその溶液内立体構造をNMRによって決定し、大腸菌のそれと比較し、機能との対応を検討した。高温で成育する生物の機能的差異が、構造にも反映していることを示した点で、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。