

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成16年度博士課程進学

氏名 今清水正彦

指導教員 田中寛

論文題目 Structural and functional analyses of a basal transcription apparatus in oxygenic photosynthetic organisms

(酸素発生型光合成生物における基本転写装置の構造・機能解析)

シアノバクテリアの基本転写装置RNA polymerase (RNAP) は、 $\alpha_2\beta\beta'$ サブユニットで構成されるコア酵素と、転写開始に必要な σ 因子から成るバクテリア型であるが、通常のバクテリア型RNAPとは異なる独自の構造的特徴が2点挙げられる。1つは、コア酵素の β' サブユニットがN末端側とC末端側の2つの独立のサブユニットに分断され、そのうちC末端側のサブユニットに約70 kDaに及ぶ巨大な挿入ドメインが存在することである。この挿入ドメインはシアノバクテリアの他に葉緑体RNAPにも保存されており、サイズ縮小の進化圧がかかる葉緑体ゲノムにコードされているにも拘らず、さらに大きくなる傾向が見られるため、酸素発生型光合成代謝との繋がりが予想される。もう1つの特徴は主要 σ 因子 (SigA) のN末端側 (1.1領域) にみられ、通常のバクテリア型では酸性アミノ酸が保存されているこの領域に塩基性アミノ酸のクラスターが存在することである。これまでの研究の中で、シアノバクテリアと大腸菌のRNAPにおけるプロモーター認識の相違を示唆する結果が得られた。また、シアノバクテリアRNAPの構造予測により、上記の酸素発生型光合成生物に特有の特徴は、転写反応の多くのステップで構造的に重要な位置を占め得ることが推察された。本研究では、これらのRNAPの構造的特徴が、転写反応において、どのような役割を持つのかを明らかにすることを目的として以下に示す解析を行った。

(1) シアノバクテリアにおける β' サブユニットの挿入ドメインの構造・機能解析

RNAP の β' 挿入ドメイン (β' subunit Insertion Domain, BID) は、進化系統によって分子量が大きく異なるが、葉緑体・シアノバクテリア型 RNAP では上述したように著しく大きい。大腸菌における BID の機能は、転写開始や伸長反応の一部への関与が知られており、一方で、構造的に BID に対応する真核生物 RNA polymerase II (PolII) のサブユニットである Rpb9 は、転写の正確性維持への寄与が知られている。また、BID と Rpb9 の両者において、それぞれ転写伸長因子である Gre、TFIIS との相互作用が示されている。これらの結果は、BID が転写開始反応、及び伸長反応において重要な役割を持つことを示唆する。

BID 解析の出発点として、葉緑体・シアノバクテリア型 RNAP の全体構造を解き、巨大な BID を持つ RNAP の構造モデルを作ることを試みた。生物材料として、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を用い、大量培養からの高純度のコア酵素精製系を確立した。従来、酸素発生型光合成生物の RNAP 精製は、細胞内に多量に含まれるチラコイド膜成分との相互作用を外す操作が煩雑であり、長時間を要するとともに収率も悪かった。本研究では、初期精製で疎水性クロマトグラフィーと DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることにより、細胞に多量に含まれる膜と色素タンパクを除去し、従来の超遠心とポリエチレンイミン (PEI) 沈殿を使う方法に比べ、収率と時間効率を3倍以上高めることに成功した (図1)。また、精製に用いる PEI は真核生物の RNAP において転写前複合体の形成を阻害することが知られているが、シアノバクテリアにおいても、PEI を用いて精製した酵素に比べ、比活性の高い酵素を得ることができた。しかし、この精製 RNAP コア酵素を用いて結晶化を試みたが、反射を示す単結晶を得ることができなかった。そこで本研究では、BID を単独で大腸菌に大量発現させ、高純度まで精製し、結晶化に成功した (図2)。発現 BID タンパク質は、単独で DNA 結合能があることから、単独での構造を用いても機能的な考察が得られると考えられる。得られた単結晶は、低分解能であったため、さらに Trypsin 消化による BID タンパク質の安定領域の探索、沈殿剤と温度

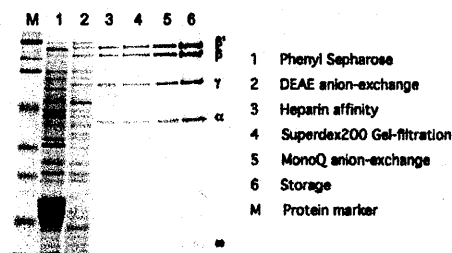


図1 RNAP コア酵素の精製過程 (SDS-PAGE)

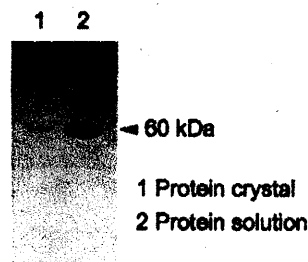


図2 精製 BID タンパク質 (SDS-PAGE)

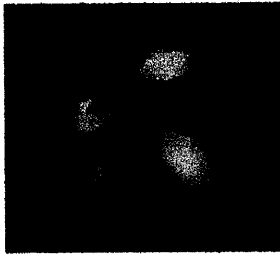


図3 BIDの単結晶

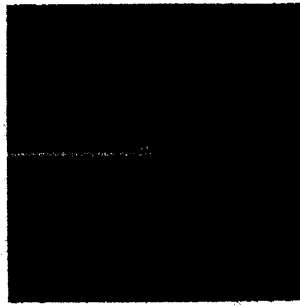


図4 BID結晶(図3)の回析図

条件の検討により高分解能の反射が得られるように結晶に改良を加え、得られた単結晶(図3)から、約3Åの分解能の反射を得た(図4)。構造解析の戦略として、BIDタンパク質にMetを3カ所点変異

で導入し、合計7個のMetをSeMetに置換し、シンクロトロン放射光を駆使した多波長異常分散(MAD)法による解析を行った。シンクロトロンにおいて3つのSeMet置換体結晶からのMADデータセットを得ることにより、初期位相の決定に必要な情報を集めることができた。現在、MADデータによる構造解析を進めている。

(2) シアノバクテリアにおけるSigAのN末端領域(R1.1)の機能解析

これまで、主要σ因子(SigA)は、RNAPコア酵素と結合しない限りDNAに結合しないという定説があった。その説では、酸性であるN末端領域(R1.1)がDNAの類似体のような役割をして、σ因子のDNA結合領域を不活性し、この阻害がコア酵素との結合により解除されると言われているが、未だ議論の余地が残されていた。本研究では、シアノバクテリアと葉緑体のSigAにおけるR1.1のC末端側に注目してみると、塩基性アミノ酸のクラスターが見られることから、R1.1の静電作用による働きは上記の説とは異なる可能性を予想した。

このシアノバクテリアにおけるR1.1の機能を調べるため、*T. elongatus*のR1.1欠損SigAを発現・精製し、全長のSigAとDNA結合性を比較した。興味深いことに、結果は通常のパクテリアにおける結果とは逆で、R1.1はSigA単独でのDNAとの結合に必須であった。このSigAにおけるDNAの結合は、プロモーター配列特異的ではなかった。SigAには、ホロ酵素の状態でプロモーターDNAへの結合に必須な領域(R2、R4)が知られている。R1.1には直接的なDNA結合能が無く、これらのDNA結合領域を活性化することにより、SigA単独でのDNA結合を可能にしていることが示唆された。また、*T. elongatus*から精製したコア酵素と、これらSigAを再構成させ、*in vitro*転写系を構築し、転写反応におけるR1.1の機能を調べた。R1.1は、σ因子とRNAPコア酵素との再構成効率、及びDNAの開鎖複合体の安定化には影響を与えないが、最終的な転写量を1/10程度低下させた。この転写量低下の原因は、転写開始反応の第一段階であるRNAPホロ酵素とDNAによる複合体(binary complex)形成の阻害であることを明らかにした。

今後、SigA の R1.1 による転写調節の生理的意義を明確にしていく必要があるが、本研究で見出されたシアノバクテリア SigA R1.1 による DNA 結合能と binary complex 形成の阻害的効果は、他のバクテリアには見られない、酸素発生型光合成生物の基本転写装置の特徴となる転写反応への新たな知見を与えると思われる。

(3) シアノバクテリア RNAP の進化的位置づけと機能的特徴

現在の植物細胞の出現の過程における重要なイベントの1つは、光化学系における水の分解機構の獲得である。この水から酸素を発生させるシステムには、光化学系 II の Mn クラスタが必須であるため、酸素発生型光合成細菌のシアノバクテリアは、それ以前に誕生した紅色光合成細菌に比べ、細胞内 Mg^{2+} 濃度が約 100 倍高いとされている。 Mn^{2+} の細胞内毒性の1つには、RNAP の活性中心 Mg^{2+} との交換による転写エラー（転写時における誤ったヌクレオチドの取り込み）が挙げられるが、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアと植物の葉緑体の RNAP は、転写エラーを抑えるべく、独自の構造的進化を遂げた可能性がある。この仮説の検証を行うため、大腸菌とシアノバクテリアの RNAP を用いて、現在 *in vitro* 転写反応溶液の Mg/Mn 比の変化による転写反応への影響を比較している。これまでに、両 RNAP 活性の至適 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 濃度、および転写開始から伸長反応への移行段階での機能的な相違点を明らかにした。今後、シアノバクテリア RNAP の BID 欠損型と SigA R1.1 欠損型を用いて、これらのドメインと転写反応における Mn^{2+} 濃度効果との相関を調べる予定である。

終わりに、本研究では酸素発生型光合成生物の RNAP の特徴のうち、SigA における R1.1 の機能についての新しい知見と、シアノバクテリアの転写研究における幾つかの基礎データ（RNAP 精製法および *in vitro* 転写系の改善、大腸菌 RNAP による転写機能との比較情報）を得ることができた。また、BID タンパク質の結晶化に成功し、構造決定に必要な全情報を整えることができた。BID の構造と機能に関する情報が得られた後、これらの情報をまとめて BID と R1.1 の転写における作用機構を類推し、酸素発生型光合成生物の RNAP に独自の機能について、新しい概念を提示したいと考えている。

参考文献

1. Imashimizu M, Hanaoka M, Seki A, Murakami KS, Tanaka K. *FEBS Lett.* 2006, 580:3439-44.
2. Imashimizu M, Fujiwara S, Tanigawa R, Tanaka K, Hirokawa T, Nakajima Y, Higo J, Tsuzuki M. *J Bacteriol.* 2003, 185:6477-80.