

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 今清水 正彦

本論文は、酸素発生型光合成生物の基本転写装置 RNA polymerase (RNAP) における特有の構造と機能の相関を明らかにすることを目的に行われた研究であり、3章からなる。

第1章では、シアノバクテリアにおける主要 σ 因子 (SigA) の N 末端領域 (R1.1) の機能解析について述べている。通常のバクテリアの SigA では、R1.1 は酸性であり、 σ 因子単独での DNA 結合を阻害することが知られているが、シアノバクテリアと葉緑体の R1.1 には特異的な塩基性アミノ酸のクラスターが存在する。本研究では、シアノバクテリア *T. elongatus* の主要 σ 因子 (SigA) を材料として用いて R1.1 の機能解析を行った。まず、大腸菌の過剰発現系を用いて SigA、および R1.1 を欠失した SigA を組換えタンパク質として調製し、これらの DNA 結合能を比較することで、R1.1 が σ 因子単独での DNA 結合に必須であることを明らかにした。また、SigA の N 末端断片タンパク質を数種作製して DNA 結合機構について解析した結果、R1.1 には直接的な DNA 結合能が無く、プロモーター-DNA 結合領域 (R2、R4) 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。さらに *in vitro* 転写反応において R1.1 は、RNAP ホロ酵素による転写開始反応の第一段階である DNA との binary complex 形成を阻害することを明らかにしている。 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 R1.1 の影響がないことから、転写におけるシアノバクテリアの R1.1 の役割の一つを *in vitro* で同定することに成功している。

第2章では、シアノバクテリア RNAP における β' サブユニットの挿入ドメインの X 線結晶構造と機能解析について述べている。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 では著しく大きい。RNAP の活性中心に近接し、独立した柔軟な構造ドメインを作る BID には転写反応における重要な役割が推察されるが、構造・機能的に未知の点が多く残されている。酸素発生型光合成生物に特有の巨大 BID の構造解析の出発点として、まず好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* を用い、大量培養からの高純度の RNAP コア酵素精製系を確立し、従来の方法に比べ時間効率と収率を約3倍上げることに成功した。この精製 RNAP 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ため、BID を単独で大腸菌に大量発現させ、高純度まで精製し、結晶化に成功している。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、分解能 3.3 Å の MAD

データセットを得ることに成功し、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。

第3章では、シアノバクテリア RNAP の機能解析から得られた新しい知見について述べている。さらに、シアノバクテリアと大腸菌 RNAP の構造・機能比較から、酸素発生型光合成生物に固有の RNAP の構造的特徴と機能の繋がりについて論じている。これまで、様々な生物由来の RNAP を用いた *in vitro* 転写反応で、転写の initiation complex から安定な elongation complex への移行段階における不活性な初期の oligo RNA 合成が起こることが知られており、この現象は abortive サイクルと呼ばれている。本研究では、シアノバクテリア RNAP を用いた *in vitro* 転写反応で、この abortive サイクルが大腸菌 RNAP と比べて極めて起こりにくいこと。そして、シアノバクテリア RNAP が大腸菌 RNAP と比較して高いクリアランス能を持ち、効率良く elongation complex を形成することを示した。シアノバクテリア RNAP の promoter との binary complex 形成効率が、大腸菌 RNAP と比較して約 1 桁低かったことから、申請者は Promoter DNA に対する親和性の強さが abortive RNA の合成と相関するという、転写反応における新しい概念を本章で提唱している。また、本研究では大腸菌とシアノバクテリアの RNAP の機能的違いを決定する構造因子について、BID に基づいた議論を進めた。BID は酵母 RNAPII やバクテリアの RNAP の結晶構造解析から、RNAP の全体構造において、活性中心から下流の DNA と相互作用する位置に存在することが推定される。本研究では、大腸菌を用いて調製した組換え BID タンパク質が、1 本鎖および 2 本鎖 DNA と結合することを示し、この結合によりシアノバクテリアにおける elongation complex の安定性が高められていることを示唆している。

以上、本論文ではシアノバクテリア RNAP を用い、酸素発生型光合成生物における RNAP の構造的特徴 (R1.1 と BID) の機能についての新しい知見と、転写開始反応における abortive サイクルの解釈において新しい概念を示している。また、BID の構造解析の全データ取得に成功し、光合成生物の RNAP 結晶化に必要な精製法を確立しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。