

| | |
|---------|--|
| 学位授与番号 | 甲第 1717 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 17 年 9 月 30 日 |
| 氏 名 | Le Thi Thu Thuy |
| 学位論文題目 | Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and Hepatitis B Virus X protein (ヒト RNA ポリメラーゼサブユニット 5 (R P B 5) の変異解析: T F I I F サブユニット R A P 30 と B 型肝炎ウイルス X 蛋白 (H B x) との相互作用に必須な残基) |
| 論文審査委員 | 主 査 教 授 福田 龍二 副 査 教 授 金子 周一 市村 宏 |

内容の要旨及び審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) X 蛋白 (HBx) は多機能制御因子である。HBx の宿主標的として最初に同定されたのは、RNA ポリメラーゼの 1 つの共通サブユニット RPB5 である。HBx は RPB5 と相互作用し、活性化転写反応を修飾する coactivator として機能する。RPB5 は RNA ポリメラーゼ II の中で、転写開始点下流の DNA と近接した位置にあり、転写制御因子との相互作用が報告されている。HBx は RPB5 の中央部との相互作用により活性化転写反応を修飾する。一方、転写基本因子 TFIIF は、そのサブユニット RAP30 が RPB5 の中央部と相互作用することにより、polII と会合することが報告されている。しかし、これらの相互作用に必要な RPB5 のアミノ酸残基は、特定されていない。

著者は、RPB5 の転写における役割を検討する目的で、RPB5 中央部の系統的な変異解析を行った。RPB5 の中央部をカバーする集約型アラニン置換変異 (cm) ライブラリーとアラニン点置換変異 (pm) ライブラリーを作成した。GST、或は FLAG 標識した変異 RBP5 タンパク質を大腸菌系で発現・精製し、*in vitro* で HBx 或は TFIIF RAP30 との結合アッセイを行うこと、また異なる標識をした変異 RPB5 と HBx、或は変異 RPB5 と TFIIF を COS1 細胞で共発現させ、*in vivo* におけるこれらのタンパク質間相互作用を GST pull-down 法を行うことで解析した。

得られた結果は以下のように要約される。

1. 精製タンパク質を用いた *in vitro* 相互作用解析で、18 種の RPB5 cm 変異の中で 5 クローンが RAP30 との相互作用、及び或は HBx との相互作用に欠損を示した。次に、培養細胞中の *in vivo* タンパク質間相互作用解析で、同じ 5 種の cm 変異が TFIIF 複合体中の RAP30 との相互作用、及び或は HBx との相互作用に欠損を示した。
2. 5 種の cm 変異をカバーする pm ライブラリーを用いて、*in vitro* 及び *in vivo* の蛋白間相互作用解析を行った結果、4 残基 (F76, I104, T111 及び S113) が TFIIF との結合、および HBx との結合の両方に共通に不可欠な残基として特定された。RPB5 の 2 残基 (V74 and N98) は HBx との結合に不可欠であり、他の 2 残基 (T56 and L58) は RAP30 との結合に必須であった。
3. RPB5 の結晶モデルから、共通に不可欠な 4 残基 (F76, I104, T111 及び S113) の内、明らかに溶媒に表出した 2 残基、T111 と S113 は DNA に近接した部位にあり、残りの 2 残基は内部構造維持に関わる残基と推定された。これらの結果は、RPB5 の共通の領域が TFIIF 結合と HBx 結合の両方に必要であることを示すとともに、RPB5 と相互作用するこれらの因子が RPB5 と DNA との相互作用を修飾する可能性を示唆した。

本研究は、RPB5 と、転写制御因子 HBx および TFIIF の相互作用に必須なアミノ酸残基を特定し、RPB5 の転写制御と HBx の転写修飾能の理解に資する新しい知見を提供するものであり、学位に値する価値ある労作であると評価された。