

「生命活動のプログラム」
平成8年度採択研究代表者

石浜 明
(国立遺伝学研究所 教授)

「ゲノム全遺伝子の発現ヒエラルキー決定機構の解明」

1. 研究実施概要

ゲノムプロジェクトによって、各種生物の代表種で、ゲノム全塩基配列の決定が進み、いずれは、それら生物のもつ遺伝子の全体像が明らかとなることが予想できた。そこで、全遺伝子のなかから、どれをどの程度に発現し利用するかを決定する機構の解明が、ポストゲノムプロジェクトの最も重要な研究課題との立場から、本研究が開始された。

これまでの研究から我々は、転写酵素RNAポリメラーゼが、ゲノム全遺伝子から発現遺伝子を選択し、またそれぞれの発現水準を決め、遺伝子間の発現水準の順位を決定していると考えた理論を提唱して来た。本研究では、その実証を目指した研究を実施した。研究対象として、主として原核生物の代表大腸菌を解析し、一部分裂酵母を利用し真核生物での比較に用いた。本年度では、大腸菌RNAポリメラーゼが、その生育環境で、構造と機能特異性を変換し、転写遺伝子のスペクトラムが変換する機構のほぼ全容を明らかにできた。また、分裂酵母では、RNAポリメラーゼの分子構成の全貌を解明し、その構造機能変化解析の基盤を構築できた。

2. 研究実施内容

ゲノムのDNA全構造が解明された生物については、ゲノムに存在する遺伝子の全容が明らかになった。その結果、それらの遺伝子がどのように利用されているかの全貌を解明することが、次の段階の主要な研究課題と成ってきた。我々は、ゲノム全構造が解明された、原核生物の代表・大腸菌を素材として、「遺伝子発現ヒエラルキー決定機構」の解明を目指し、またその過程で開発した研究方法を基盤として、真核生物代表として分裂酵母を選択し、比較検討を行ってきた。また、最も単純な系として、ウイルスゲノムの遺伝子発現ヒエラルキー決定機構も比較した。これまでに以下の研究を展開した。

1) 大腸菌における遺伝子発現ヒエラルキー決定機構の研究

大腸菌転写酵素は、RNA合成を担当するRNAポリメラーゼコア酵素と、遺伝

子プロモーターを認識するシグマ因子からなっている。コア酵素は、1種類しかないが、シグマ因子は、少なくとも7種類ある。これまでに7種類のシグマ因子すべてを精製し、それぞれが識別する遺伝子プロモーターの探索を行った。その結果、ゲノムの全遺伝子は、シグマ因子のいずれかで認識されることが予想できた。大腸菌全遺伝子を、7種シグマ因子の支配下に分類することが、今後の大きな課題となってきた（図1）。

遺伝子プロモーターを認識するシグマ因子7種のすべてを純化し特異抗体コレクションを作製した。それを利用し、全7種のシグマ因子の細胞内濃度の実測に初めて成功した。我々は先に、大腸菌細胞当たりコア酵素は約2,000分子と実測した。今回実測した7種シグマ因子の合計は、細胞当たり約1,000分子であった。その結果、シグマ因子を結合したホロ酵素各成分の量を予測出来た。

大腸菌RNAポリメラーゼの第一段階機能分化

シグマサブユニット分子種	既知支配下遺伝子群
RpoD (613)	 1,000 遺伝子
RpoN (477)	 5 遺伝子
RpoS (330)	 100 遺伝子
RpoH (284)	 30 遺伝子
RpoF (239)	 40 遺伝子
RpoE (202)	 2-4 遺伝子
FecI (173)	 1-2 遺伝子

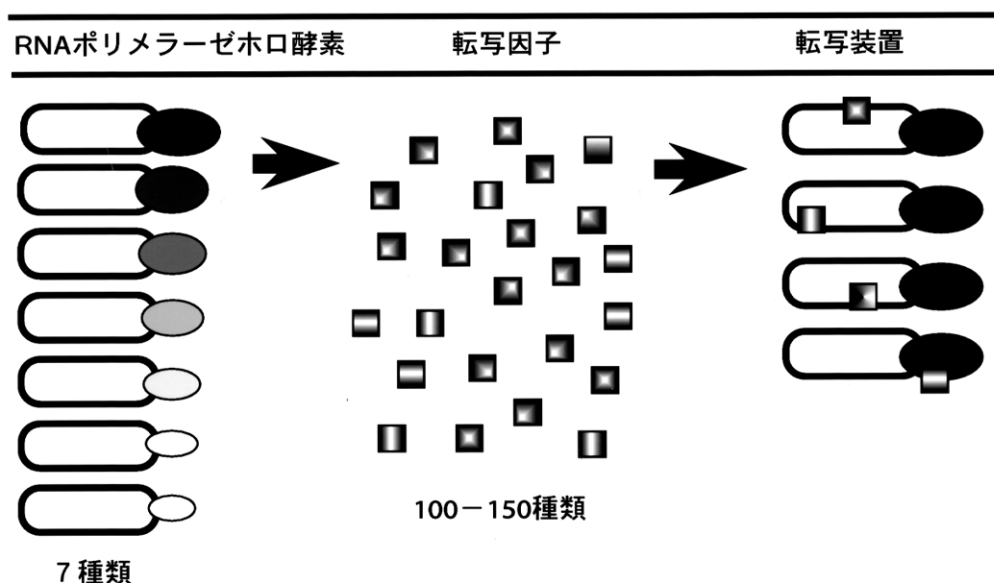
各種の細胞培養条件で測定した結果、各シグマ因子の細胞内存在量が、遺伝子発現ヒエラルキー決定要因になっていることが推測された。シグマ因子が存在するにもかかわらず、時に支配下遺伝子が発現されないことがあることから、シグマ因子の活性調節の存在を予測し、アンチシグマ因子を発見した。その結果、細菌では、シグマ因子の量の変化と活性調節の両面で、遺伝子転写制御を行っている

ることが予測されるに至った。

大腸菌が、生育に相応しくない状況では、様々の転写因子を誘導合成し、遺伝子発現パターンの切り換えを行っていることを予想させる断片的知識が蓄積している。ゲノム全遺伝子の推定から、転写に影響する因子は、約100ー150種類存在すると予想した(図2)。これらの転写因子の全てについて、作用機構を解析することとした。これまでに、約30種類の転写因子を単離したところ、いずれもRNAポリメラーゼと直接接触し、その特異性に影響を与えていることが判明した。直接接触は、接触不良となったRNAポリメラーゼ変異体の単離によって証明した。また、蛋白質ー蛋白質の接触を直接照明する、新規の方法を開発し、この研究に導入した。その結果、転写因子は、RNAポリメラーゼの接触サブユニットに応じて、4群に分類できることを提唱した(図2)。

以上の研究から、RNAポリメラーゼが、2段階で機能分化し、各機能形態の成分の存在量で、遺伝子発現ヒエラルキーが決定されると考えた理論が、本質を捉えていると確信できるに至った(図3)。転写装置の機能分化機構の解明が、全ゲノムの発現ヒエラルキーの本質の理解に至ると確信できるに至った。

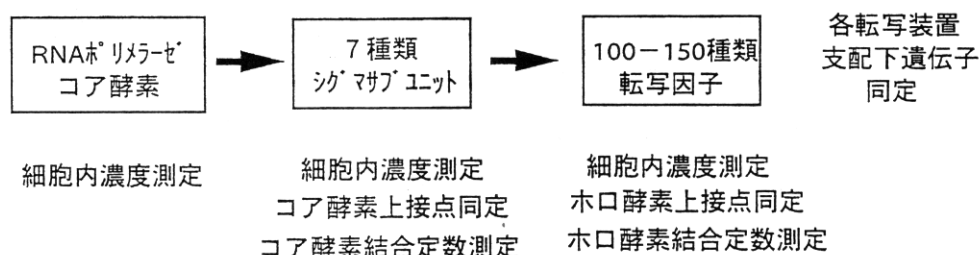
大腸菌RNAポリメラーゼの第二段階機能分化



RNAポリメラーゼ機能分化による遺伝子発現ヒエラルキー決定理論

「転写装置各成分の細胞内濃度から、4000遺伝子の発現水準を予測する」

ーCREST研究戦略ー

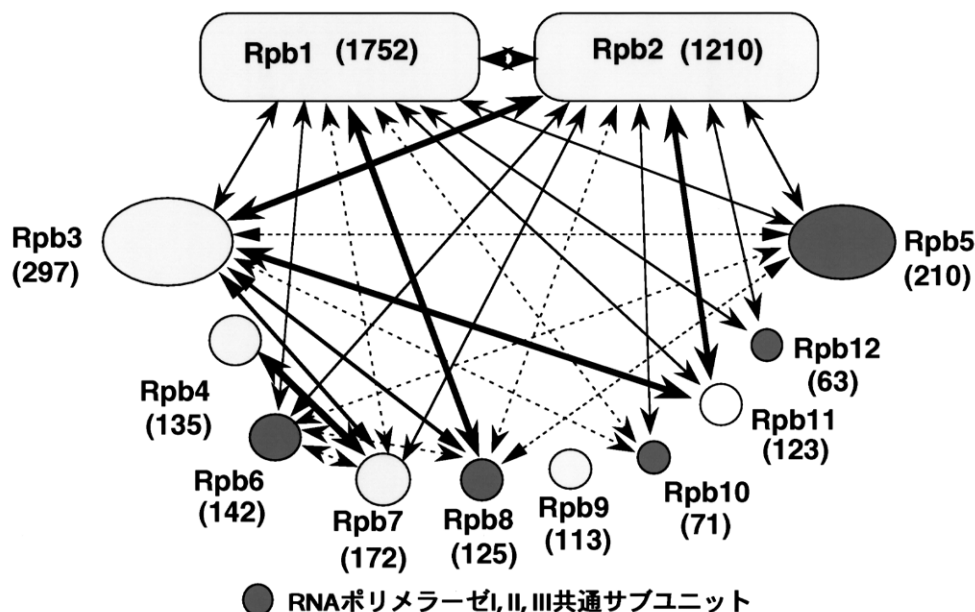


2) 分裂酵母における遺伝子発現ヒエラルキー決定機構の研究

真核生物の遺伝子発現機構の研究は、多くの個別遺伝子を対象として、転写調節に関する蛋白因子の探索が盛んであるが、ゲノム全体の遺伝子発現ヒエラルキーの解明を目指した研究はまだ誰も着手していない。研究が開始できない理由は、未だに、転写酵素RNAポリメラーゼの分子の実体が不明であることに依っている。我々は、高等真核生物に近い分裂酵母を素材として、RNAポリメラーゼの実体解明を先ず目標として研究を開始した。その結果、今日までに、RNAポリメラーゼII (mRNA合成酵素)については、12 種類のサブユニット全部の遺伝子を同定単離し、構造決定を行った。また、RNAポリメラーゼI (rRNA合成酵素)についても、ほぼ全部の遺伝子を単離した。

次の課題は、分裂酵母のRNAポリメラーゼを構成する多数のサブユニットそれぞれの生理機能を同定し、遺伝子識別を担当する成分を同定することである。そのために、サブユニットに解離し、再び集合させ活性酵素を再構成する実験系を確立することを試みた。現在までに、サブユニット解離の順序を同定したので、集合順序が予想できるようになった。また、単離サブユニット2成分間の相互作用を、多くの方法で観測し、サブユニット相互作用のネットワークの全容を推測することに成功した(図4)。一方、各サブユニット遺伝子が単離できたので、変異を導入し、それぞれのサブユニットの生体内での役割を解析すると同時に、それら変異体を出発材料として、相互作用するサブユニットや、転写因子を探索する研究が可能となった。先に、大腸菌で提唱した、RNAポリメラーゼの機能変化による、遺伝子発現ヒエラルキー決定理論が、分裂酵母にも当てはまるか、実際に検証する研究基盤が出来つつある。

分裂酵母RNAポリメラーゼIIのサブユニット間相互作用ネットワーク



3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Bown, J.A., Owens, J.T., Meares, C.F., Fujita, N., Ishihama, A., Busby, S.J. and Minchin, S.D.: Organisation of open complexes at *Escherichia coli* promoters: mapping the promoter DNA sites close to region 2.5 of the σ^{70} subunit of RNA polymerase. J. Biol. Chem. 274, 2263-2270 (1999)
- Burns, H.D., Ishihama, A. and Minchin, S.D.: Open complex formation during transcription initiation at the *Escherichia coli* *galP1* promoter: the role of the RNA polymerase α subunit at promoters lacking an UP-element. Nucleic Acids Res. 27, 2051-2056 (1999)
- Colland, F., Fujita, N., Kotlarz, D., Bown, J.A., Meares, C.F., Ishihama, A. and Kolb, A.: Positioning of σ^S , the stationary phase σ factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. EMBO J. 18, 4049-4059 (1999)
- Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Ishihama, A. and Yanagida, T.: Single molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time. Biophys. J. 76, 709-715 (1999)
- Ishihama, A.: Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. Genes & Cells 3, 135-143 (1999)
- Masunaga, K., Mizumoto, K., Kato, H., Ishihama, A. and Toyoda, T.: Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies. Virology 256, 130-141 (1999)
- Nomura, T., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of subunit-subunit contact sites on the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Biochemistry 38, 1346-1355 (1999)
- Prost, J.-F., Negre, D., Oudot, C., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzzone, A.J. and Cortay, J.-C.: Cra-dependent transcriptional activation of the *icd* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181, 893-898 (1999)
- Watanabe, T., Honda, A., Iwata, A., Ueda, S., Hibi, T. and Ishihama, A.: Isolation of 130K/180K heterodimer with RNA-dependent RNA polymerase activity from TMV-infected tobacco. J. Virol. 73, 2633-2640 (1999)
- Wlassoff, W.A., Kimura, M. and Ishihama, A.: Functional organization of two large subunits of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II: Location of the catalytic sites. J. Biol. Chem. 274, 5104-5113 (1999)
- Apirakawong, A., Fukuchi, J., Kashiwagi, K., Kakinuma, Y., Ito, E.,

- Ishihama, A. and Igarashi, K.: Enhancement of cell death due to decrease in Mg²⁺ uptake by OmpC (cation-selective porin) deficiency in RMF (ribosome modulation factor)-deficient mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 482-487 (1998)
- Ballesteros, M., Kusano, S., Ishihama, A. and Vicente, M.: The *ftsQ1p* gearbox promoter of *Escherichia coli* is a major sigma S-dependent promoter in the *ddlB-ftsA* region. *Mol. Microbiol.* 30, 419-430 (1998)
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A. and de Lorenzo, V.: Active recruitment of σ^{54} -RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and α CTD. *EMBO J.* 17, 5120-5128 (1998)
- Chatterji, D., Fujita, N. and Ishihama, A.: The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the β -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes & Cells*, 3(5), 279-287 (1998)
- Honda, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A.: A simple enzymatic method for analysis of RNA 5'-terminal structures: Quantitative determination of the 5'-termini of influenza virus genome RNAs. *Virus Res.* 55, 199-206 (1998)
- Ishiguro, A., Kimura, M., Yasui, K., Iwata, A., Ueda, S. and Ishihama, A.: Two large subunits of the fission yeast RNA polymerase II provide a platform for the assembly of small subunits. *J. Mol. Biol.* 279, 703-712 (1998)
- Ishihama, A., Kimura, M. and Mitsuzawa, H.: Subunits of yeast RNA polymerases in structure and function. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 190-195 (1998)
- Jishage, M. and Ishihama, A.: A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major σ subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4953-4958 (1998)
- Miyake, R., Murakami, K., Owens, J.T., Greiner, D.P., Ozoline, O.N., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Dimeric association of *E. coli* RNA polymerase alpha subunits, studied by cleavage of single-cysteine alpha subunits conjugated to iron-(S)-[p-(bromoacetamide) ethylenediaminetetraacetate]. *Biochemistry*, 37, 1344-1349 (1998)
- Miyao, T., Honda, A., Qu, Z. and Ishihama, A.: Mapping of Rpb3 and Rpb5 contact sites on two large subunits, Rpb1 and Rpb2, of the fission yeast RNA polymerase II. *Mol. Gen. Genet.* 259, 123-129 (1998)
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W.L., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A. and Chatterjee, A.K.: RpoS (Sigma-S) controls the expression of *rmsA*, a global

- regulator of secondary metabolites, Harpin_{Ecc} and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. J. Bacteriol. 180, 3629-3634 (1998)
- Nagai, S., Yagihashi, T. and Ishihama, A.: An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. Veterinary Microbiol. 60, 227-238 (1998)
- Negre, D., Oudot, C., Prost, J.-F., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzzone, A.J. and Cortay, J.-C.: FruR-mediated transcriptional activation at the *ppsA* promoter of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 276, 355-365 (1998)
- Ozoline, O.N., Fujita, N., Murakami, K. and Ishihama, A.: Topology of the *Escherichia coli* RNA polymerase surface involved in interaction with promoter upstream enhancer elements. Eur. J. Biochem. 253, 371-381 (1998)
- Ozoline, O.N., Murakami, K., Negishi, T., Fujita, N. and Ishihama, A.: Specific fluorescent labeling of two functional domains in RNA polymerase alpha subunit. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 30, 183-192 (1998)
- Owens, J.T., Murakami, K., Chmura, A., Fujita, N., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Mapping lacUV5 DNA sites proximal to conserved regions of sigma-70 in an *Escherichia coli* RNA polymerase-DNA open promoter complex. Biochemistry 37, 7670-7675 (1998)
- Owens, J.T., Miyake, R., Murakami, K., Fujita, N., Chmura, A.J., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Mapping the Sigma-70 Subunit Mapping the Contact Sites on the Core Enzyme Subunits of *Escherichia coli* RNA Polymerase by Site-Specific Cleavage with Sigma-Conjugated Chemical Protease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6021-6026 (1998)
- Ryu, S., Fujita, N., Ishihama, A. and Adhya, S.: GalR-mediated repression and activation of hybrid lacUV5 promoter: Differential contacts with RNA polymerase. Gene 223, 235-245 (1998)
- Sakurai, H., Kimura, M. and Ishihama, A.: Identification of the gene and the protein of RNA polymerase II subunit 9 (Rpb9) from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Gene 221, 11-16 (1998)
- Sun, W., Hattman, S., Fujita, N. and Ishihama, A.: Activation of bacteriophage Mu mom transcription by C protein does not require specific interaction with the carboxyl-terminal region of the α and σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Bacteriol. 180, 3257-3259 (1998)
- Thomas, M.S., Zou, C., Ishihama, A. and Glass, R.E.: The effect of a nested set

of C-terminal substituted deletions on the function of the σ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 1475-1483 (1998)

○Wang, P., Yang, J., Ishihama, A. and Pittard, A.J.: Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits the binding of RNA polymerase to the major promoter P1 of the *aroP* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 5466-5472 (1998)

○Yasui, K., Ishiguro, A. and Ishihama, A.: Location of subunit-subunit contact sites on RNA polymerase II from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Biochemistry 37, 5542-5548 (1998)

他 3 件