

「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 研究主幹・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。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、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と真核生物の代表として分裂酵母を解析し、またこのモデルを検証するための最も単純なウイルスを解析した。過去 3 年間ほぼ当初の計画通りに進行している。本年度での研究実施の概要は次の通りである。

### 2. 研究実施内容

#### 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

大腸菌ゲノムに存在する約4,000の遺伝子の内で発現されているものを、本研究で開発した新原理に基づく高分解能二次元電気泳動法を用いて、対数増殖期から増殖停止定常期 1 週間まで経時的に、大腸菌全蛋白質を分画して解析した。発現パターンは増殖相に相関して変動し、定常期だけで発現する約100の新規遺伝子を同定した。我々は、遺伝子発現ヒエラルキーは転写装置の遺伝子選択段階で決定されると提唱したが、増殖に応じた遺伝子発現ヒエラルキーの変動は、転写装置の遺伝子選択の変化によると推定した。推論を実証する目的で、転写装置の機能構造の変化を解析した。

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は、遺伝子プロモーターを認識する、7種類のシグマ因子のひとつと会合してホロ酵素に分化する。大腸菌シグマ因子7種のすべてを純化して、コア酵素への結合定数を実測した。試験管内転写反応で、プロモーター識別特性を解析し、また、識別に関

わる機能ドメインの分子解剖を実施した。各シグマ因子に対する特異抗体コレクションを作製し、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(図1)。各種の細胞培養条件で測定した結果、シグマ因子7種の細胞内存在量が変動したので、確かにシグマ因子濃度変化が、遺伝子発現ヒエラルキー決定のひとつの要因になっていることが推測された。しかし、存在するシグマ因子が全て機能しているとは限らない。シグマ因子に結合しその活性を抑制するアンチシグマ因子を発見した。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ことが予測されるに至った。

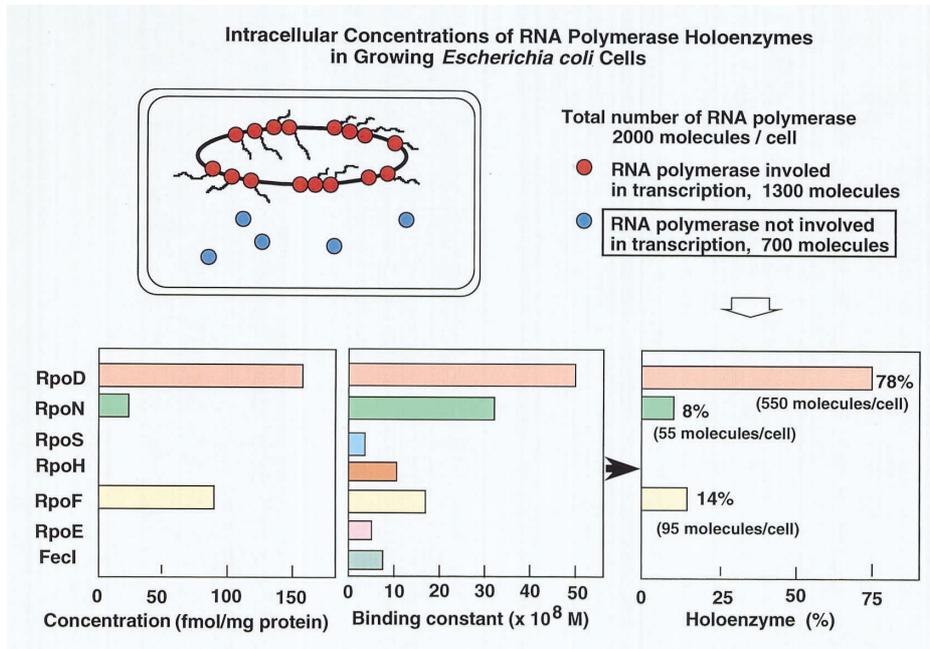


図1： 大腸菌RNAポリメラーゼのホロ酵素への機能分化

大腸菌は、様々な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。ゲノム全遺伝子の推定から、転写に影響する因子は、約100 - 150種類存在すると予想した。これら転写因子は、RNAポリメラーゼホロ酵素に作用し、その機能を制御している。転写装置機能制御の全体像を知るため、転写因子の全てについての系統的・組織的解析を開始した。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するか、また、蛋白質 - 蛋白質の接触を直接証明する、新規の化学的方法を開発し、この研究に導入した（図 2）。

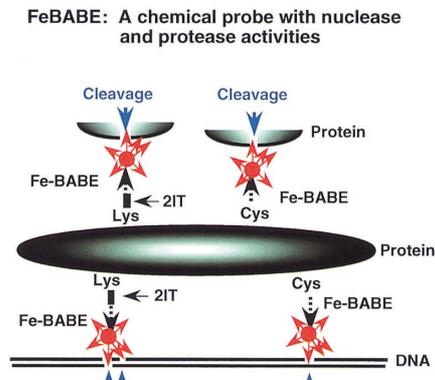


図 2 : 新規に開発した蛋白質 - 核酸、蛋白質 - 蛋白質接点同定法

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 3）。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り、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。

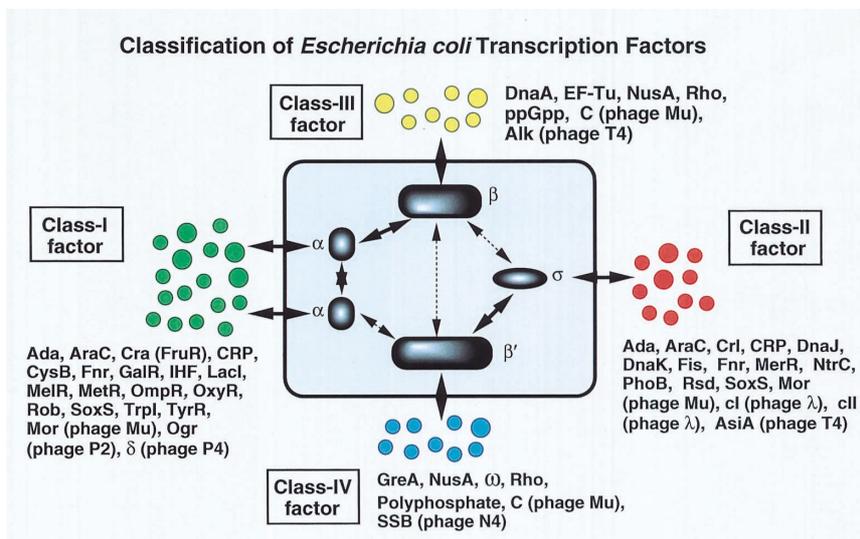


図 3 : RNAポリメラーゼとの接点による大腸菌転写因子の分類

## 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、シグナ

ル伝達から転写調節に関する蛋白因子の探索が盛んである。また、ゲノム全配列が決定された出芽酵母では、全遺伝子プローブを含むジーンチップが開発され、存在するmRNA種を広く同定する試みが始まり、やがて発現されている遺伝子と発現量のスペクトラムが決定されるに違いない。しかし、遺伝子発現ヒエラルキーが決まる仕組みの解明を目指した研究は、真核生物ではまだ殆ど着手されていない。研究が開始できない理由のひとつは、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た。我々は、分裂酵母を素材として、先ずRNAポリメラーゼの実体解明を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、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。本年度は、分裂酵母細胞内での、RNAポリメラーゼIIの12種類サブユニットのmRNA量、サブユニット蛋白含量、RNAポリメラーゼへの集合量を測定した(図4)。その結果、分裂酵母のハプロイドゲノム当たり、RNAポリメラーゼIIは、約5,000分子と推定され、現在推定されているゲノム上の遺伝子総数6,000 - 7,000よりは少ないことが判明した。従って、原核生物同様、少ない転写装置を多くの遺伝子が奪い合う様相が推測された。転写包括制御は、同じ原理で行われていることが推察された。

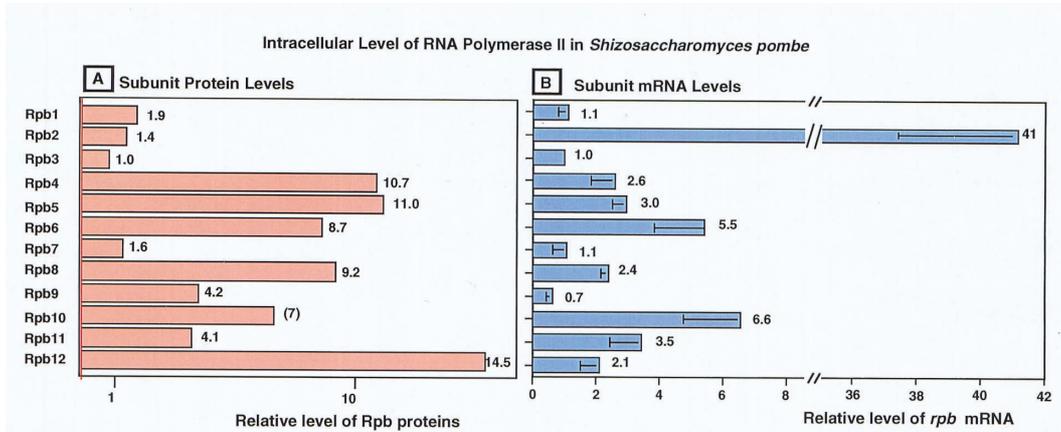


図4： 分裂酵母のRNAポリメラーゼIIの細胞内含量

次に12種類のサブユニットの集合機構を解析した。ひとつの方向は、純化RNAポリメラーゼを蛋白解離変性剤を用いて、徐々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の確立である。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。一方、各サブユニットcDNAをバキュロウイルス発現ベクターに導入し、各種の組み合わせで、組換え体ウイルスを感染

させて細胞内で形成されるサブユニット集合体を分析することで、生体内でのサブユニット集合機構を解析した。結果を統合して、作業仮説として、次のモデルを想定した(図5)。

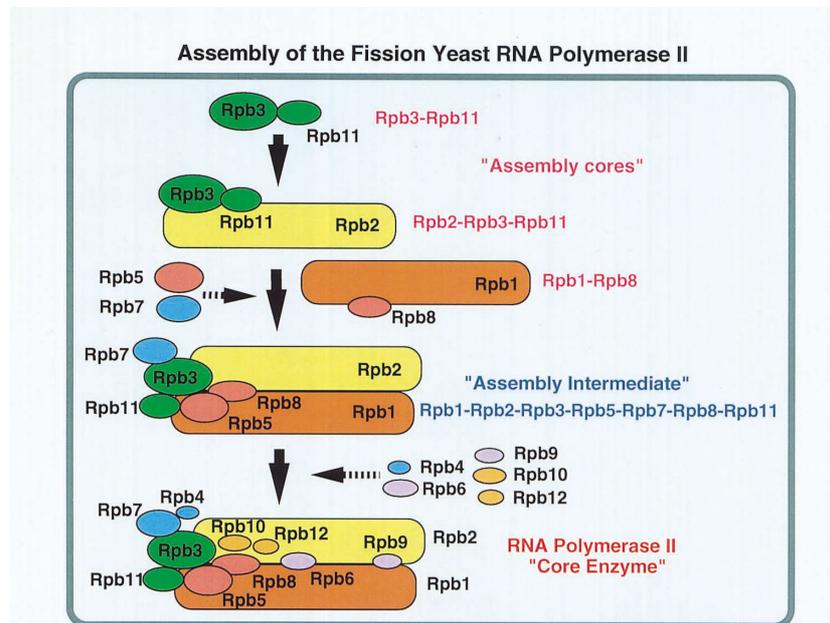


図5： 分裂酵母RNAポリメラーゼ II の集合機構

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。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、各サブユニットと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。この方向の研究の中から、早速にも本年度、サブユニット6に転写伸長因子TF-IISが相互作用をすることを発見した。この方向の研究が軌道に乗れば、真核生物におけるRNAポリメラーゼの機能分化の実体についても、本プロジェクトの中で解明できる見通しが出来た。

### 3) ウイルスにおける遺伝子発現ヒエラルキー決定機構の研究

RNAウイルスのRNAポリメラーゼは、転写も複製も行う多機能酵素である。RNAポリメラーゼの機能制御による遺伝子転写ヒエラルキー決定機構、転写装置-複製装置相互変換の機構を、インフルエンザウイルス及びタバコモザイクウイルスをモデルとして研究した。それぞれRNAポリメラーゼ酵素の構造と機能地図の作成に成功した(図6)。現在、機能制御に関わる宿主蛋白因子群の同定が進行している。

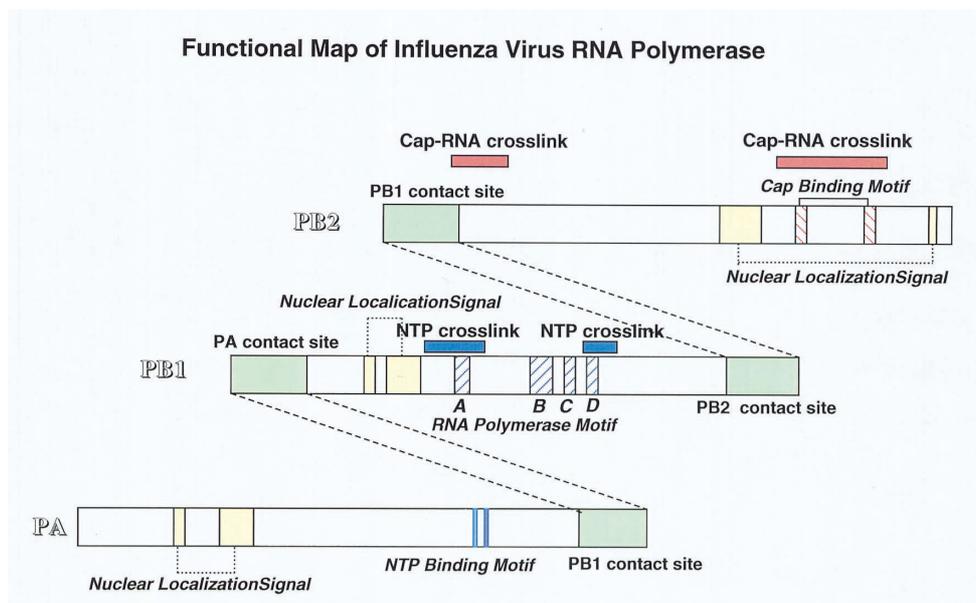


図6 . インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの機能地図

### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Hwang, J.-S., Yamada, K., Honda, A., Nakade, K. and Ishihama, A.: Expression of functional influenza viral RNA polymerase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol.* 74, 4074-4084 (2000)

Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A.: Ppb6 subunit of the fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1263-1270 (2000)

Katayama, A., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of subunit-subunit contact surfaces on the  $\beta'$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275, 3583-3592 (2000)

Kimura, M. and Ishihama, A.: Involvement of multiple subunit-subunit contacts in the assembly of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* 28, 952-959 (2000)

Maeda, H., Jishage, M., Nomura, T., Fujita, N. and Ishihama, A.: Promoter selectivity of the RNA polymerase holoenzyme containing the extracytoplasmic function (ECF) sigma subunit  $\sigma^{E}$  or  $\sigma^{FecI}$ . *J. Bacteriol.* 182, 1181-1184 (2000)

Ozoline, O., Fujita, N. and Ishihama, A.: Transcription activation mediated by the carboxy-terminal domain of RNA polymerase alpha-subunit: Multipoint monitoring using fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* 275, 1119-1127 (2000)

Schpakovski, G.V., Gadal, O., Lararre-Mariotte, S., Lebedenko, E.N., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S.A., van Mullem, V., Ishihama, A. and Thuriaux, P.: Functional conservation of RNA polymerase II subunits between the fission and budding yeasts. *J.*

Mol. Biol. 295, 1119-1127 (2000)

Yamamoto, K., Nagura, R., Tanabe, H., Fujita, N., Ishihama, A. and Utsumi, R.: Negative regulation of the *bolA1p* of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor OmpR for osmolarity response genes. FEMS Microbiol. Lett. 186, 257-262 (2000)

Apirakaramwong, A., Kashiwagi, K., Raj, V.S., Sakata, K., Kakinuma, A., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Involvement of ppGpp, ribosome modulation factor, and stationary phase-specific sigma factor  $\sigma^S$  in the decrease in cell viability caused by spermidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 643-647 (1999)

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  $\sigma^{70}$  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  $\alpha$  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  $\sigma^S$ , the stationary phase  $\sigma$  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)

Honda, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A.: Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. Genes Cells 4, 475-485 (1999)

Imai, K., Imazawa, Y., Yao, Y., Yamamoto, K., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Nogi, Y.: The fission yeast *rpb17* encodes a functional homolog of AC19, a subunit of RNA polymerase I and III of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 261, 364-373 (1999)

Imazawa, Y., Imai, K., Fukusha, A., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Nogi, Y.: Isolation and characterization of the fission yeast *rpa42* gene encoding a subunit shared by RNA polymerases I and III. Mol. Gen. Genet. 262, 749-757 (1999)

Ishihama, A.: Stringent control. In: Encyclopedia of Molecular Biology, T.E. Creighton, Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 2451-2455 (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)

Jishage, M. and Ishihama, A.: Transcriptional organization and *in vivo* role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. J. Bacteriol. 181, 3768-3776 (1999)

Masuda, H., Suzuki, T., Sugiyama, Y., Murakami, K., Miyamoto, D., Jwa Hidari, K.I., Ito, T., Kida, M., Fukunaga, K., Obuchi, M., Toyoda, T., Ishihama, A., Kawaoka, Y. and Suzuki, Y.: Substitution of amino acid residue in influenza A virus hemagglutinin affects recognition of glycosphingolipid containing N-glycolylneuraminic acid. FEBS Lett. 464, 71-74 (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)

Mitobe, J., Mitsuzawa, H. and Ishihama, A.: Isolation and characterization of temperature-sensitive mutations in the subunit 3 gene (*rpb3*) of RNA polymerase II of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Gen. Genet. 262, 73-84 (1999)

Nishiyama, M., Kobayashi, N., Tanaka, K., Takahashi, H. and Tanokura, M.: Cloning and characterization in *Escherichia coli* of the gene encoding the principal sigma factor of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. FEBS Microbiol. Lett. 172, 179-186 (1999)

Nomura, T., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of subunit-subunit contact sites on the subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Biochemistry 38, 1346-1355 (1999)

Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A.: Functional topology of the bacterial RNA polymerase. Multipoint monitoring by a fluorescent probe. In: Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions (eds. J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherland. pp. 87-89, 1999.

Prost, J.-F., Negre, D., Oudot, C., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzone, A.J. and Cortay, J.-C.: Cra-dependent transcriptional activation of the *icd* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181, 893-898 (1999)

Sakurai, H., Mitsuzawa, H., Kimura, M. and Ishihama, A.: Rpb4 subunit of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II is essential for cell viability and similar in structure to the corresponding subunits of higher eukaryotes. Mol. Cell. Biol. 19, 7511-7518 (1999)

Shimamoto, N., One dimensional diffusion of proteins along DNA: its biological chemical significance revealed by single-molecule measurements. J. Biol. Chem. 274, 15293-15296 (1999)

- Stevens, A.M., Fujita, N., Ishihama, A. and Greenberg, E.P.: Involvement of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. J. Bacteriol. 181, 4704-4707 (1999)
- Talukder A.Z. and Ishihama, A.: Twelve species of DNA-binding protein from *Escherichia coli*: Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. J. Biol. Chem. 274, 33105-33113 (1999)
- Talukder A.Z., Iwata, A., Ueda, A. and Ishihama, A.: Growth phase-dependent variation in the protein composition of *Escherichia coli* nucleoid. J. Bacteriol. 181, 6361-6370 (1999)
- Tsuchiya, K., Okuno, K., Ano, T., Tanaka, K., Takahashi, H. and Shoda, M.: High magnetic field enhances stationary phase-specific transcription activity of *Escherichia coli*. Bioelectrochem. Bioenerg. 48, 383-387 (1999)
- Travaglia, S.L., Datwyler, S.A., Yan, D., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Targeted protein footprinting: Where different transcription factors bind to RNA polymerase. Biochemistry 38, 15774-15778 (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)