

「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 副所長・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、それら生物のもつ遺伝子の全体像が明らかになってきた。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であるとの認識から、本研究が開始された。

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する遺伝子を選択し、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が、本プロジェクト研究では、その理論の実証を目指した研究を実施した。研究対象として、原核生物の代表としての大腸菌、真核生物の代表としての分裂酵母、及び最も単純な系としてウイルスを選び集中的に解析した。過去 4 年間の研究は、ほぼ当初提案した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、高分解能二次元電気泳動RFHR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(和田研)。増殖期ではこれまでに約300の蛋白質を同定し、1種類の細菌で同定された蛋白の種類では最高に到達した。遺伝子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65の蛋白質を同定した。その半分以上は、機能未知の新規蛋白であった。

一方、こうした遺伝子発現ヒエラルキーの変化は、転写装置の遺伝子選択特性の変化によるとした我々の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(石浜研・田中研)。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機能を担うシグマ因子のひとつと結合してホロ酵素に分化する。

大腸菌シグマ因子 7 種全ての、コア酵素への結合定数と細胞内濃度を実測し、

ホロ酵素7成分の存在量を予測できた。その上で、大腸菌各種培養条件での、シグマ因子7種の細胞内存在量を測定し、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を示唆した。

しかし、シグマ因子の機能量は、存在量とは必ずしも比例しないことを発見した。大腸菌主要シグマ因子(シグマD及びシグマS)に結合しその活性を抑制するアンチシグマ因子(Rsd = アンチシグマD、Dps = アンチシグマS)の存在を発見した。そこで今回、新にアンチシグマ因子の細胞内量をも測定した。更に、シグマ因子の活性が、グルタミン酸濃度、水素イオン濃度、トレハロースなどの貯蔵炭水化物濃度で顕著に影響を受けることを発見した。定常期遺伝子転写のシグマSは、高グルタミン酸濃度環境で作動することを実証し、さらにグルタミン酸を感知する蛋白領域を特定した。

大腸菌は、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。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、その機能を制御する。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、系統的・組織的解析を開始した。これまでに、約50種類の転写因子を単離し、RNAポリメラーゼ上の接触部位の同定を開始した。その為に、接触不良となったRNAポリメラーゼ変異体の単離と解析の遺伝学的解析に加えて、FeBABEを用いて蛋白質-蛋白質の接触点切断を同定する生化学的解析を動員した。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1)。

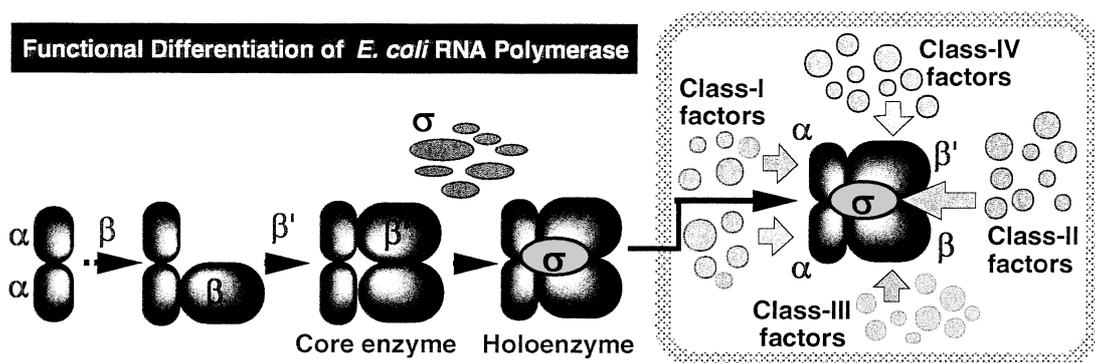


図1 . 大腸菌RNAポリメラーゼの集合機構と機能分化

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

えていることが実証された。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。

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については、個別遺伝子を対象として、シグナル伝達から転写調節に至る過程に関する転写因子の探索研究が盛んである。しかし、全遺伝子の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。包括転写制御の研究がない理由のひとつに、転写酵素RNAポリメラーゼの分子実体の知識の欠如がある。我々は、分裂酵母を素材として、RNAポリメラーゼの実体解明を目標として研究を実施してきた(石浜研、禾研)。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。更に、分裂酵母細胞の、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。その結果、分裂酵母ゲノム当たり、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約6,000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。

RNAポリメラーゼⅡの12種類のサブユニット間相互作用、サブユニット集合機構を、多くの方法を駆使して解析した。また、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状態についての解析にも広げた。これらの結果を総合してサブユニット集合順序を予想した(図2)。

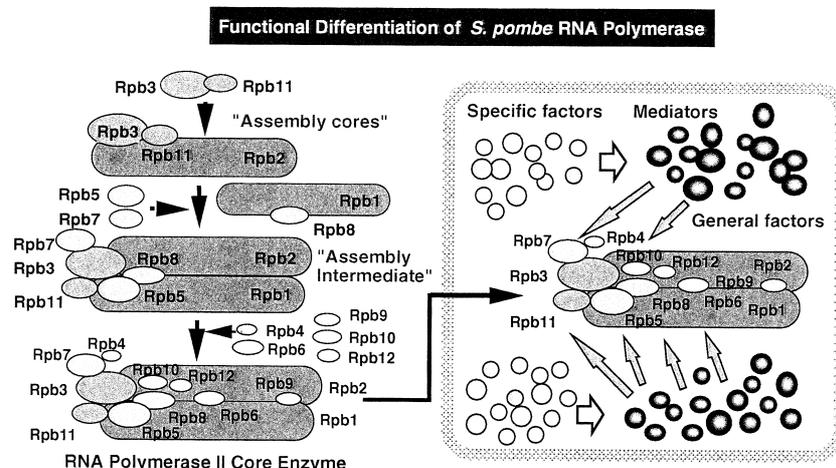


図2： 分裂酵母RNAポリメラーゼⅡの集合機構と機能分化

本年度は更に、分裂酵母のRNAポリメラーゼ I 及び II 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する系統的研究を実施した。各サブユニット遺伝子に変異を導入して機能異常を解析し、更に、これら変異体の抑圧変異の単離と分析から、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と、タグを付加したサブユニットを発現し、それを利用してRNAポリメラーゼ集合体を単離し含まれる成分を分析する研究を平行して実施した。その結果、RNAポリメラーゼ II については、RNA合成の開始・伸長・終結に関する転写因子、RNAポリメラーゼのリン酸化・脱リン酸化酵素、RNA産物の修飾に関する因子など、多数の因子を同定できた。

一方、RNAポリメラーゼ I のサブユニットについても同様の解析を行い、SpRPA12, SpRPA21, SpRPA51などについて、その機能を推定し、さらに相互作用因子を同定した。RNAポリメラーゼを中軸として、それに直接接触する因子を網羅する、新たな研究を開始した。プロジェクトの終結を控えて、この方向の研究を伸ばし、転写装置を巡る蛋白間ネットワークの全体像の完成を目指したい。

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をモデルとして研究した。このウイルスRNAポリメラーゼは、宿主細胞mRNAを切断し、その断片を利用(石浜研)して転写を開始する特異な転写機構を示し、更に、宿主因子に依存して複製酵素へ転換するので、極めて宿主依存性が強い。これまでに、3種類のサブユニットそれぞれの構造と機能地図の作成に成功した。また、機能制御に関わる宿主蛋白因子群の同定する目的で、酵母two-hybrid法を利用して、幾つかの宿主因子候補を単離し、現在は、その機能分析が進んでいる。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

石浜研究室

2001

Jishage, M., Dasgupta, D. and Ishihama, A(2001) Mapping of the Rsd contact site on the sigma-70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 183, 2952-2956.

Kimura, M., Sakurai, H. and Ishihama, A(2001) Intracellular contents and assembly states of all twelve subunits of the RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* 268, 612-619.

Mitsuzawa, H., Seino, H., Yamao, F. and Ishihama, A(2001)Two WD repeat-containing TAFs in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. J. Biol. Chem. 276, 17117-17124.

Sakurai, H. and Ishihama, A(2001)Transcription organization and mRNA levels of the genes for all twelve subunits of the fission yeast RNA Polymerase II. Genes Cells 6, 13-24.

S. Sujatha, Ishihama, A. and Chatterji, D(2001)Functional complementation between two distant positions in *E. coli* RNA polymerase as revealed by second-site suppression. Mol. Gen. Genet. 264, 531-538.

Wigneshweraraj, S.R., Chaney, M.K., Ishihama, A. and Buck, M(2001)Regulatory sequences in sigma 54 localise near the start of DNA melting. J. Mol. Biol. 306. 681-701.

Wigneshweraraj, S.R., Ishihama, A. and Buck, M(2001)*In vitro* roles of invariant helix-turn-helix motif residue R383 in sigma 54(sigma N) Nucleic Acids Res. 29, 1163-1174.

Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A. and Kyogoku, Y(2001)Interaction of the C-terminal domain of *E. coli*

RNA polymerase α subunit with the UP element: Recognizing the backbone structure in the major groove surface. J. Mol. Biol. 306, 213-225.

Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A. and Igarashi, K(2001) Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translation level and the consequential stimulation of the synthesis of RNA polymerase σ^{28} subunit. J. Biol. Chem., in press.

2000

Bown, J.A., Kolb, A., Meares, C.F., Ishihama, A., Minchin, S.D. and Busby, S.J.W. (2000)Positioning of region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit by a transcription activator. J. Bacteriol. 182, 2982-2984.

Fujita, N., Endo, S. and Ishihama, A(2000)Structural requirements for the interdomain linker of α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Biochemistry 39, 6243-6249.

Hatta, M., Asano, Y., Masunaga, K., Ito, T., Okazaki, K., Toyoda, T., Kawaoka, Y., Ishihama, A. and Kida, H(2000)Epitope mapping of the influenza A virus RNA polymerase PA using monoclonal antibodies. Arch. Virol. 145, 895-903.

Ishihama, A. and Kida, H(2000)Mapping of functional domains on the influenza

A virus RNA polymerase PB2 molecule using monoclonal antibodies. Arch. Virol. 145, 1947-1961.

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

Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A(2000) The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. Mol. Cell. Biol. 20, 1263-1270.

Ishihama, A(2000) Molecular anatomy of RNA polymerase using protein-conjugated metal probes with nuclease and protease activities. Chem. Commun. 2000, 1091-1094.

Ishihama, A(2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annu. Rev. Microbiol. 54, 499-518.

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

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

Maeda, H., Fujita, N. and Ishihama, A(2000) Competition among seven *Escherichia coli* σ subunits : relative binding affinities to the core RNA polymerase. Nucleic Acids Res. 28, 3497-3503.

Maeda, H., Jishage, M., Nomura, T., Fujita, N. and Ishihama, A(2000) Two extracytoplasmic function sigma subunits, σ^E and σ^{FecI} , of *Escherichia coli* : Promoter selectivity and intracellular levels. J. Bacteriol., 182, 1181-1184.

Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and Takahashi, H(2000) A carboxy-terminal 16-amino-acid region of σ^{38} of *Escherichia coli* is important for transcription under high-salt conditions and sigma activities *in vivo*. J. Bacteriol. 182, 4628-4631.

Otomo, T., Yamazaki, T., Murakami, K., Ishihama, A. and Kyogoku, Y(2000) Structural study of the N-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase solubilized with non-denaturing detergents. J. Biochem. 128, 337-344.

Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A(2000) Transcription activation mediated by the carboxyl-terminal domain of the RNA polymerase α -subunit. J. Biol. Chem. 275, 1119-1127.

Shpakovski, G.V., Gadal, O., Labarre-Mariotte, S., Lebedenko, E.N., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S.A., Van Mullem, V., Ishihama, A. and Thuriaux, P. (2000) Functional conservation of RNA polymerase II in fission and budding yeasts. *J. Mol. Biol.* 295, 1119-1127.

Talkuder, A.A., Hiraga, S. and Ishihama, A. (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* 5, 613-626.

Wada, A., Mikkola, R., Kurland, C.G. and Ishihama, A. (2000) Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 2893-2899.

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

嶋本研究室

2001

Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N. and Kinoshita, K., Jr. (2001) Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* 409, 113-115.

2000

Matsumoto, T., Morimoto, Y., Shibata, N., Kinebuchi, T., Shimamoto, N., Tsukihara, T. and Yasuoka, N. (2000) Roles of functional loops and the C-terminal segment of a single-stranded DNA binding protein elucidated by X-ray structure analysis. *J. Biochem.* 127, 329-335.

Sen, R., Nagai, H. and Shimamoto, N. (1999) Polymerase arrest at the λP_R promoter during transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 10899-10904.

Yamamoto, T., Kurosawa, O., Kabata, H., Shimamoto, N. and Washizu, M. (2000) Molecular surgery of DNA based on electrostatic micromanipulation. *IEEE Trans. Indst. Appl.* 36, 1010-1017.

和田研究室

2001

Maki, Y., Yoshida, H. and Wada, A. (2000) Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. *Genes Cells* 5, 965-974.

Wada, A., Mikkola, R., Kurland, C.C. and Ishihama, A. (2000) Growth phase-

coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182, 2893-2899.

禾研究室

2001

Imazawa, Y., Imai, K., Yao, Y., Yamamoto, K., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Nogi, Y. (2001) Isolation and characterization of the fission yeast gene *Sprpa12+* reveals that the conserved C-terminal zinc-finger region is dispensable for the function of its product. Mol. Gen. Genet. 264, 852-859.

Yamamoto, K., Yamamoto, M., Nogi, Y. and Muramatsu, M. (2001) Species specific interaction of transcription factor p70 with the rDNA core promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 1001-1005.

2000

Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A. (2000) The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. Mol. Cell. Biol. 20, 1263-1270.

Orimo, A., Tominaga, N., Yoshimura, K., Yamauchi, Y., Nomura, M., Sato, M., Nogi, Y., Suzuki, M., Suzuki, H., Ikeda, K., Inoue, S. and Muramatsu, M. (2000) Molecular cloning of ring finger protein 21 (RNF21) / interferon-responsive finger protein (ifp 1) which possesses two RING-B box-coiled coil domains in tandem. Genomics 69, 143-149.

Orimo, A., Yamagishi, T., Tominaga, N., Yamauchi, Y., Hishinuma, T., Okada, K., Suzuki, M., Sato, M., Nogi, Y., Suzuki, H., Inoue, S., Yoshimura, K., Shimizu, Y. and Muramatsu, M. (2000) Molecular cloning of testis-abundant finger protein / ring finger protein 23 (RNF23), a novel RING-B box-coiled coil-B30.2 protein on the class 1 region of the human MHC. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 45-51.

田中研究室

2000

Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000) Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 481, 47-52.

Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000) A carboxy-terminal 16-amino acid region of sigma-38 of *Escherichia coli* is important for transcription under high-salt conditions and sigma activities *in vivo*. J. Bacteriol. 182, 4628-4631.

Oikawa, K., Fujiwara, M., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000)

Characterization of two plasmid sigma factors, SigA 1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacu*. *Gene* 31, 221-228.

Shirano, Y., Shimada, H., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Tanaka, K., Takahashi, H., Unno, K., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, H., Miyake, C., Yokota, A. and Shibata, D. (2000) Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor sigma B. *FEBS Lett.* 485, 178-182.