国立遺伝学研究所　副所長・教授

石浜　　明

「ゲノム全遺伝子の発現ヒエラルキー決定機構の解明」

１．研究実施の概要

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、やがては、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、本研究開始前には予想できていた。ポストゲノムシークエンスの最も重要な研究課題のひとつが、ゲノム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であると考えて、本研究を開始した。

細菌の遺伝子転写装置の分子的実体についての研究結果から我々は、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いた。その理論の実証を最終目標として、(1) ゲノム全遺伝子のなかで発現されている遺伝子の同定と、(2) 発現遺伝子が決定される機構の解明を目指した研究を実施した。研究対象としては、モデル原核生物「大腸菌」（*Escherichia coli*）と、真核生物の代表として「分裂酵母」（*Schizosaccharomyces pombe*）を利用した。また、RNA ポリメラーゼの機能特異性変化の典型として、転写・複製のいずれにも関与する、稀な多機能酵素ウイルス RNA ポリメラーゼについても解析した。

x　x　x　x　x　x　x

大腸菌ゲノムの解析から、遺伝子は約 4,000 と推定された。発現遺伝子を同定する目的で、プロテオーム分析を行った。また、大腸菌 DNA チップを利用したトランスクリプトーム分析も並行して実施した。新規に開発した、分離精度が高い二次元電気泳動によるプロテオーム解析により、約 350 の蛋白を同定し、従来のデータと統合すると、大腸菌菌体を構成する約 500 種類の蛋白質が同定できた。定常期の大腸菌を分析し、対数増殖期からの移行時期特異的に出現する、定常期蛋白を約 100 種類同定した。発現に時間差があることから、定常期適応過程は、一定の遺伝的プログラムで制御されていることが示唆された。定常期移行に伴う、遺伝子発現ヒエラルキー変動プログラムを解析する目的で、分化時期の異なる大腸菌細胞を物理的に分画する方法を開発した。パーコール密度勾配遠心法で、浮遊密度の小さい対数増殖期の細胞から、密度が増加した定常期細胞までが、約 20 の集団に分画された。各細胞集団が、独立の遠心バンドを形成することから、大腸菌形質分化が非連続であることが示唆された。

大腸菌遺伝子発現ヒエラルキー決定の分子的基盤は、転写装置の遺伝子間分配の制御であるとの仮説を実証する研究を展開した。RNA ポリメラーゼコア酵素約 2,000 分子は、先ず７種類シグマ因子のどれかと会合してホロ酵素になり、さらに約 100－150 種類の転写因子との相互作用で転写装置となる、２段階機能分化の実体を解明する目的で、７種類シグマ因子と約 65 種類の転写因子について、細胞内濃度を測定し、またシグマ因子については、コア酵素結合強度を測定した。主要シグマ因子２成分（増殖期シグマ D と定常期シグマ S）について、新に活性抑制因子アンチシグマを同定した。活性シグマ量を推定する目的で、７種類シグマ因子それぞれのアンチシグマ因子の濃度測定も実施した。これらの全ての測

定結果を統合して、細胞内のホロ酵素量の具体的推定に初めて成功した。７種類のシグマ因子のうち、定常期発現遺伝子群の転写に関わるのは、シグマ S であることを示した。定常期移行期や高浸透圧ストレス応答時に高まるグルタミン酸濃度を感知するセンサーが、シグマ S 蛋白自体の C 端領域にあることを発見した。

大腸菌転写因子の多種類について、試験管内転写反応で作用機構を解析した。その結果、転写因子は、アクチベーター、レプレッサーを問わず、RNA ポリメラーゼと直接接触して機能制御に関わり、さらに、転写因子は一般に、DNA 結合部位に応じて、転写促進と転写抑制のいずれにも作用することを明らかにし、従来の転写因子二分類の概念の再考を迫った。転写因子の RNA ポリメラーゼ上の接点、DNA 結合部位を迅速に同定する目的で、接点依存的に接触相手を切断する人工プロテアーゼ・ヌクレアーゼ FeBABE を開発し利用した。多くの転写因子の作用機構と、RNA ポリメラーゼ接点を比較して、転写因子が転写に与える影響は、RNA ポリメラーゼ上の接点に相関することを発見した。α サブユニットと接触して作用するクラス I 転写因子は、プロモーター上流域 DNA に結合し、RNA ポリメラーゼがプロモーターに安定に結合するのを支援する。一方、σ サブユニットに接点のあるクラス II 転写因子はプロモーター近傍 DNA に結合し、転写開始複合体によるプロモーターDNA の局所的開鎖を助ける。なお、クラス III/IV の転写因子は、β β'に結合し、転写開始から終結に至る RNA 合成過程のどこかを制御しているものが多い。従って、最近では、転写因子を純化し、RNA ポリメラーゼとの接点を先ず同定することで、作用機構を知る研究戦略を採用することとした。

転写因子の作用機構解析の一環として、転写開始機構を詳細に解析した。プロモーター開鎖複合体（open complex）は、往々にして、オリゴヌクレオチド合成を繰り返し（abortive initiation）、そのまま反応を停止し、転写過程に移行しない moribund 複合体を形成することを発見した。クラス III/IV 転写因子 GreA/GreB は、moribund 複合体を、転写複合体に転換する活性を示した。

大腸菌研究グループ各研究室は、以下の役割を果たした。

<u>和田研究室</u>（大阪医大）：二次元電気泳動 O'Farrell 法は、操作中での蛋白の変性が無視できないので、新たに蛋白変性の原因となるラジカルや過酸化物を除き、しかも蛋白変性剤 SDS を使わない二次元電気泳動（RFHR）法を開発した。これを利用して大腸菌プロテオーム分析をした結果、対数増殖期大腸菌には、約 1,000 種類の蛋白質が検出され、発現遺伝子は、約 20－30％と推定された。検出された蛋白スポットの内、従来同定されたのは、約 200 に過ぎない。末端アミノ酸配列と質量分析から、凡そ 350 の蛋白の素性を同定した。これらを合わせると、二次元電気泳動で同定された大腸菌蛋白は、約 500 となり、解析が進んでいる細菌では、最大のデータとなった。また、定常期で出現する蛋白約 100 種類を同定し、それらの出現の時間経過を８日間に亘って追跡した。定常期遺伝子群が一定の順序で発現するので、その過程を制御する遺伝子プログラムがあることを示唆した。

石浜研究室（遺伝研）：定常期移行過程の大腸菌が、分化段階に応じて、浮遊密度が増加することを発見し、パーコール密度勾配遠心で、約 20 の均質細胞集団に分画することに成功した。大腸菌分化過程の形質変化が、不連続であることを示した。各細胞集団を特徴付ける分子マーカーを多数同定した。細菌の自然環境適応の分子機構解明へ、新たな突破口を開いた。石浜研究室は、RNA ポリメラーゼの機能変換の分子機構を解明する、国際共同研究を先導した。２段階のコア酵素機能分化過程のうち、第１段階のシグマ因子７種類については、様々の細胞培養条件で、細胞内濃度、コア酵素結合強度を実測し、ホロ酵素量を理論予測した。また、第２段階の約 65 種類の転写因子に関しては、試験管内転写反応で、作用機構を解析し、RNA ポリメラーゼ上の接触点を、影響を与える転写過程の間に密接な相関があることを見いだした。クラス I 転写因子群は、α サブユニットに接触し、RNA ポリメラーゼがプロモーターに安定に結合するのを支援し、クラス II 転写因子は σ サブユニットに接触し、転写開始複合体によるプロモーターDNA の局所的開鎖を支援する。一方、クラス III/IV の転写因子は、β β'に結合し、転写開始から終結に至る RNA 合成過程のどこかを制御しているものが多い。この発見があってからは、転写因子を純化し、RNA ポリメラーゼとの接点を先ず同定する研究戦略を採用することとした。この目的の為に、接触すると、接触相手の接点周辺を切断する人工プロテアーゼ FeBABE を開発し利用した。

田中研究室（東大）：大腸菌定常期に発現する遺伝子群の転写に関わるシグマ S を世界に先駆け同定した。シグマ S は、定常期移行時期に発現される遺伝子群のみならず、高浸透圧応答のために発現する遺伝子群の転写にも関わり、ストレス応答で上昇する細胞内グルタミン酸濃度の上昇を、シグマ S 蛋白の C 端 16 アミノ酸残基領域で感受することを発見した。

嶋本研究室（遺伝研）：転写機構を詳細に解析し、転写因子の作用点の解析を行った。特に、RNA ポリメラーゼや転写因子が、DNA シグナルに到達する過程で、非特異的に結合した蛋白質が DNA 上をスライドすることが、シグナルへの集積効率を上げることに寄与していることを実証し、またプロモーターで形成された転写開始複合体が、オリゴヌクレオチドを合成しながら、転写を継続するかどうかを決める制御があることを発見した。転写因子 GreA/GreB に、この過程を転写伸長に引き戻す作用があることを示した。

x　x　x　x　x　x　x

分裂酵母のゲノム解析からは、約 6,000 の遺伝子の存在が示唆されている。転写装置は、本研究で、RNA ポリメラーゼ I 及び II のサブユニット分子構成を同定し、各サブユニット遺伝子を単離し、一次構造を決定した。真核生物の遺伝子発現包括制御の原理が、原核生物と異なるかどうかを知る目的で、細胞内の RNA ポリメラーゼ量の測定を行った。この目的の為に、各サブユニットを大量発現・純化し、特異抗体を調製し、細胞粗抽出液をイ

ムノブロット法で分析した。その結果、RNA ポリメラーゼ II の量は、細胞当り約 10,000 分子、ハプロイドゲノム当り 5,000 分子と推定された。大腸菌同様、転写基幹装置の数量は、ゲノム全遺伝子よりは多くはない。サブユニット蛋白量の測定からは、RNA ポリメラーゼ II の 12 種のサブユニットは、必ずしも、当量同調して合成されているのではないことが示唆された。mRNA 量もサブユニット間で不均等であった。しかし、蛋白及び mRNA のサブユニット間の合成比に差があるので、サブユニット遺伝子間での翻訳効率の差が示唆された。なお、５種類のサブユニットは、３種 RNA ポリメラーゼ間で共有している。RNA ポリメラーゼ I 特有のサブユニット濃度の測定を基礎に RNA ポリメラーゼ I の量を推定できた結果、共通サブユニットの利用の割合が推定できた。

RNA ポリメラーゼ量測定の結果、分裂酵母遺伝子発現ヒエラルキー決定の分子的基盤は、再び、転写装置の遺伝子間分配の制御であるとの仮説を支持した。そこで、大腸菌で成功したように、RNA ポリメラーゼの機能制御に作用する転写因子の探索とその作用機作の解明に絞った研究を展開した。RNA ポリメラーゼ II については、先ず、12 種類のサブユニット間の相互作用ネットワークと集合機構を同定した。大腸菌 α サブユニット相同の Rpb3-Rpb11 ヘテロダイマーを中核として、β 相同の Rpb2, β’相同の Rpb1 の順に集合する様相は、基本的には、大腸菌と同じ機構であることが判明した。

サブユニット集合機構の知見の基盤の上で、各サブユニットに直接作用する転写因子を遺伝学的・生化学的方法を駆使して実施した。RNA ポリメラーゼ II に関しては、直接接触する多数の転写因子を同定し、さらに接点に関しても、CTD 脱リン酸化酵素（Fcp1）が Rpb4 と、転写伸長因子 TFIIS が Rpb6 と、mRNA3’端形成に関与する転写因子 Nrd1 が Rpb7 と相互作用をするなど、新知見が出た。一方、RNA ポリメラーゼ I に関しては、rRNA 合成転写因子 RRN3 が、Rpa21（出芽酵母 RPB43 ホモログ）に作用することを同定し、加えて、同サブユニットに作用する、新規の転写因子 Ker1p（Lys/Glu-rich 転写因子）を発見した。

真核生物 RNA ポリメラーゼ II に特有の機能制御として、Rpb1 サブユニット C 端の Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser 配列の繰り返しがある。分裂酵母では、29 回の繰り返し構造のうち、Tyr、Ser、Thr は、いずれもリン酸化のターゲットで、多数のリン酸化酵素候補が提案されている。生体内でのリン酸化状態を知る目的で、リン酸化アミノ酸に対する抗体を用いて解析した。その結果、Ser リン酸化が、転写装置を転写過程に稼働させる引き金になっていることを示唆した。分裂酵母では、リン酸化状態の制御でも、限られた RNA ポリメラーゼの利用制御がなされている。

x　x　x　x　x　x　x

分裂酵母研究グループ各研究室は、以下の役割を果たした。

<u>禾研究室</u>（埼玉医大）: 分裂酵母 RNA ポリメラーゼ I の 14 種類サブユニットの分子構成を同定した。RNA ポリラーゼ特有サブユニット I 遺伝子５種類（*rpa12*、*rpa17*、*rpa21*、*rpa42*、*rpa51*）を同定、遺伝子クローニングをした。３種 RNA ポリメラーゼ共通サブユニット５

種類については、石浜研究室で単離同定されたので、ほぼ全サブユニット遺伝子を得ることが出来た。各遺伝子を破壊した変異系統を作製し、生理機能を予測した。変異形質の相補実験から、Rpa21 サブユニットが rRNA 合成転写因子 RRN3 と相互作用をすることが判明し、またこのサブユニットに接点のある、新規転写因子 Ker1p を発見した。

石浜研究室（遺伝研）: 分裂酵母 RNA ポリメラーゼ II の全 12 種のサブユニット遺伝子・cDNA を単離し、大量発現・純化をし、特異抗体を作製した。抗体を利用し、菌体内の全 12 種サブユニット量を測定することに初めて成功した。また、各サブユニット遺伝子の転写開始点を同定し、また mRNA を測定して、翻訳効率を予測した。転写、翻訳いずれも、12 種サブユニット間では、顕著な差があり、結果として、12 種サブユニットの細胞内含量には、10 倍以上の差が認められた。その上で、サブユニット集合機構を解析し、大腸菌同様に、サブユニットが順々に集合する逐次集合機構を明らかにした。細胞内 RNA ポリメラーゼ II 濃度が、ゲノム全遺伝子数より多くないことが判明し、大腸菌同様に、RNA ポリメラーゼの特異性制御で、発現遺伝子が決定される可能性が示唆された。そこで、RNA ポリメラーゼ II と直接接触する転写因子を、遺伝学的・生化学的方法で探索し、その上で、接触相手のサブユニットの同定を進めた。

２．研究構想

平成８年、大腸菌を含めた各種モデル細菌のゲノム全シークエンス発表を控えた時期に、本研究は提案された。予想されたゲノム全シークエンスからは、大腸菌全遺伝子は約 4,000 と推定されていた。しかし、大腸菌に同定される蛋白質の全種類は、凡そ 1,000 に過ぎず、ゲノムに存在する遺伝子の多くは、実験室培養条件では、発現されないでいると推定された。しかし、自然界で大腸菌が様々の環境で生存する時には、ゲノムに存在する全遺伝子から、必要なセットが選択され、遺伝子間では、蛋白の必要量に応じた発現水準の段差が形成されているに違いない。そこで、本研究では、大腸菌がさまざまの環境で生存するために必要な遺伝子セットを同定し、発現される遺伝子が選択される機構、遺伝子間で発現水準の順位が決まる仕組み、即ち遺伝子発現ヒエラルキーが決定される機構の解明を目指した。従って、この研究は、ゲノム全体を対象にして発現制御の全体像の解明を目指す、全体論的研究であり、部分の解明のための強力な武器であった分子生物学の方法で、全体の解明に挑戦する試みでもあった。

遺伝子発現ヒエラルキー形成機構を説明する我々の提唱する仮説は、“転写装置” が転写対象遺伝子を選択し、またそれぞれの転写水準を決定すると考えたモデルである。仮説の根拠は、転写装置の基幹要素 RNA ポリメラーゼの総分子数は、遺伝子総数より少なく、転写調節諸因子との相互作用で、特定遺伝子群だけを転写する特異性を獲得する現象の発見に拠っている。「転写装置の特異性変換による遺伝子転写順位変動」理論が、大腸菌で実証されれば、恐らく同じ機構が、真核生物でも作用していると考えられる。そこで、細菌

を用いた研究成果をもとに、酵母及びウイルスを用いて、真核生物転写装置の基幹 RNA ポリメラ−ゼと各種転写因子との相互作用による、転写装置の機能修飾を解析し、遺伝子選択転写による発現ヒエラルキー形成機構の本質を解明することを目標に設定した。

大腸菌グループでは、ゲノム全遺伝子を対象としたプロテオーム（大阪医大・和田研）とトランスクリプトーム（遺伝研・石浜研、嶋本研）分析によって、発現遺伝子の全体像を解析しながら、一方、RNA ポリメラーゼの転写対象遺伝子選択機能の変換を、転写因子の RNA ポリメラーゼ上の接点同定と接触強度の測定、転写因子作用機構の解析と、細胞内の転写因子濃度の実測から推定した（遺伝研・石浜研、嶋本研、東大・田中研）。一方、分裂酵母グループでは、RNA ポリメラーゼ I（埼玉医大・禾研）、RNA ポリメラーゼ II（遺伝研・石浜研）の分子的実体解析を先ず行い、その知見の上で、直接接触転写因子の同定、作用機作、RNA ポリメラーゼ上の接点の同定を系統的に進めることで、機能制御機構を解明することを目指す研究を実施してきた。

３．研究実施体制

原核生物研究グループ　（大腸菌）
代表者：　石浜　明　（国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門）
　大阪医科大学物理学教室：　和田　明
　国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門：　藤田信之
　東京大学分子細胞生物学研究所：　田中　寛
　国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター：　嶋本伸雄

真核生物研究グループ　（分裂酵母）
代表者：　石浜　明　（国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門）
　埼玉医科大学分子生物学教室：　禾　泰壽
　国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門：　光澤　浩
　国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門：　木村　誠

ウイルス研究グループ　（ウイルス）
代表者：　石浜　明　（国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子遺伝研究部門）

４．ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

平成９年８月７－８日

CREST 石浜研究チーム　第１回全体会議

遺伝研・図書館セミナー室（三島）　　参加人数　32 名

概要：CREST 石浜研究チーム・大腸菌、分裂酵母、ウイルスグループ参加全研究室、全研究員の研究構想と、その背景・現状・意義等の報告と、関連研究者からの質疑応答と助言５年間の具体的研究実施計画策定

平成 10 年６月３日

CREST 石浜研究チーム　第２回全体会議

東京大学山上会館（東京）　　参加人数　25 名

概要：CREST 石浜研究チーム・大腸菌、分裂酵母、ウイルスグループ参加全研究室、全研究員の研究進行状況の報告と、研究構想の再検討と修正、関連研究者からの質疑応答と助言研究計画の修正

平成 12 年 12 月 25－26 日

CREST 石浜研究チーム　第３回全体会議

遺伝研・ゲストハウスセミナー室（三島）参加人数　27 名

概要：CREST 石浜研究チーム・大腸菌、分裂酵母、ウイルスグループ参加全研究室、全研究員の中間報告と、プロジェクト終結までの研究構想提案と討論、関連研究者からの質疑応答と助言研究終結に向けての実施計画策定

石浜研究チーム企画研究集会

平成 11 年 12 月７－８日

転写制御ワークショップ

福岡シーホークホテル及び九州大学（福岡）参加人数　300 名

概要：我が国大腸菌転写研究関係者を招き、CREST 石浜研究チーム招聘研究者・Prof. S. Kustu (Univ. Calif., Berkeley) を交えて、大腸菌転写研究の先端的課題について、研究討論会を実施した。

５．主な研究成果

（1）論文発表

石浜研究室（国内　9 報、海外 120 報）

2002

Colland, F., Fujita, N., Meares, C., Ishihama, A. and Kolb, A.: The interaction between σ^S, the stationary phase σ factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, 7, 233-247 (2002)

Ishihama, A., Zou, C., Kobayashi, M., Kumar, A., Fujita, N., Sakurai, H. and Hayward, R.S.: Molecular recognition in gene transcription. In: *Biomolecular Interactions in DNA and Proteins.* (Buckin, V. and Funck, T., eds.), Nova Sci. Publ., in press (2002)

Ivanova, A., Glinsky, G., Smith, G., Ishihama, A. and Eisenstark, A.: Peptide sequences that bind *Escherichia coli* RpoS protein from phage peptide display libraries. *Biochemistry*, in press.

Kimura, M., Suzuki, H. and Ishihama, A.: Formation of CTD-phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (Pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and Rpb4 subunit of Pol II. *Mol. Cell. Biol.,* in press (2002)

Makinoshima, H., Nishimura, A. and Ishihama, A.: Discontinous transition of *E. coli* phenotype during growth transition from exponential to stationary phase. *Mol. Microbiol.* in press (2002)

Yamamoto, K., Ogasawara, H., Fujita, N., Utsumi, R. and Ishihama, A.: Transcription regulation of the *Escherichia coli* magnesium transporter gene (*mgtA*) by PhoP, the regulator of PhoP/PhoQ two-component system sensing external magnesium availability. *J. Bacteriol.*, in press

2001

Culham, D.E., Lu, A., Jishage, M., Krogfelt, K., Ishihama, A. and Wood, J.M.: The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: Contribution of RpoS, ProP, ProU and osmoregulatory mechanisms not detected in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 147, 1657-1670 (2001)

Ghosh, P., Ishihama, A. and Chatterji, D.: *Escherichia coli* RNA polymerase subunit ω and its N-terminal domain bind full length $\beta\ \beta'$ to facilitate incorporation into the $\alpha_2\beta$ subassembly. *Eur. J. Biochem.* 268, 4621-4627 (2001)

Honda, A., Endo, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A.: Differential roles of vRNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase *J. Biol. Chem.* 276, 31179-31185 (2001)

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

Kimura, M., Sakurai, H. and Ishihama, A.: 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 (2001)

Mitobe, J., Mitsuzawa, H. and Ishihama, A.: Functional analysis of RNA polymerase Rpb3 mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet*. 39, 210-221 (2001)

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

Ozoline, O.N., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mode of DNA-protein interaction between the C-terminal domain of *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit and T7*D* promoter UP element. *Nucelic Acids Res*. 29, 4909-4919 (2001)

Raj, V.S., Tomitori, H., Yoshida, M., Apirakaramwong, A., Kashiwagi, K., Takio, K., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Properties of a revertant of *Escherichia coli* viable under spermidine accumulation: Increase in L-glycerol 3-phosphate. *J. Bacterol.* 183, 4493-4498 (2001)

Sakurai, H. and Ishihama, A.: Transcription organization and mRNA levels of the genes for all twelve subunits of the fission yeast RNA Polymerase II. *Genes Cells* 6, 24-36 (2001)

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

Shin, M., Kang, S., Hyun, S.-J., Fujita, N., Ishihama, A. Poul Valentin-Hansen, P., and Choy, H.E.: Repression of *deo*P2 in *Escherichia coli* by CytR: Conversion of a transcription activator into a repressor. *EMBO J.* 20, 5392-5399 (2001)

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

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

Yamamoto, K., Yata, K., Fujita, N. and Ishihama, A.: Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Mol. Microbiol.* 41, 1187-1198 (2001)

Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A. and Kyogoku, Y.: 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 (2001)

Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A. and Igarashi, K.: 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.* 276, 16289-16295 (2001)

石浜　明：金属で遺伝子転写装置の構造を見る。「生物と金属」第 15 回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編、クバプロ、167-179 頁（2001）

石浜　明：プレゼンテーションの工夫：講演の工夫。*蛋白質核酸酵素* 46、1306-1309（2001）

石浜　明：大腸菌分子生物学。「部分から全体へ」、そして再び「全体から部分へ」。*蛋白質核酸酵素* 46、1868-1871（2001）

石浜　明：ひとつの大腸菌まるごとを知る。*Biohistory 生命誌* 31、10-11（2001）

村上勝彦、石浜　明：RNA ポリメラーゼ機能の構造的基盤。*蛋白質核酸酵素* 46、1608-1617（2001）

2000

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

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

Hatta, M., Asano, Y., Masunaga, K., Ito, T., Okazaki, T., Toyoda, T., Kawaoka, Y., Ishihama, A. and Kida, H.: Epitope mapping of the influenza A virus polymerase PA using monoclonal monoclonal anbitodies. *Arch Virol*. 145, 957-964 (2000)

Hatta, M., Asano, Y., Masunaga, K., Ito, T., Okazaki, K., Toyoda, T., Kawaoka, Y., Ishihama, A. and Kida, H.: Mapping of functional domains on the influenza A virus RNA polymerase PB2 molecule using monoclonal antibodies. *Arch Virol*. 145, 1947-1961 (2000)

Hwang, J.-S., Yamda, 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.: Rpb6 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)

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

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

Katayama, A., Fujita, N. and Ishihama, A.: Mapping of subunit-subunit contact surfaces on the $\beta\ \beta'$ 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., Fujita, N. and Ishihama, A.: Sigma competition: Comparison of binding affinity to the core RNA polymerase among seven *E. coli* sigma subunits. *Nucleic Acids Res.* 28, 3497-3503 (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 σ^{E} or σ^{FecI}. *J. Bacteriol.* 182, 1181-1184 (2000)

Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and Takahashi, H.: 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 (2000)

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

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

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.: Functional conservation of RNA polymerase II in the fission and budding yeasts. *J. Mol. Biol.* 295, 1119-1127 (2000)

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

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

Yamamoto, K., Nagura, R., Tanabe, H., Fujita, N., Ishihama, A. and Utsumi, R.: Negative regulation of the *bolA*1p of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor OmpR for osmolarity response genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 257-262 (2000)

石浜　明：蛋白－核酸・蛋白－蛋白相互作用接点同定の革新的方法－FeBABE（Fe・*p*-bromoacetamidobenzyl EDTA）の利用－。*Dojin News* 94、1-13 (2000)

1999

Apirakaramwong, A., Kashiwagi, K., Raj, V.S., Sakata, K., Kakinuma, Y., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Involvement of ppGpp, ribosome modulation factor, and stationary phase-specific sigma factor σ^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: Location 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 initiatioin at the *Escherichia coli gal*P1 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)

Honda, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A.: Two separate sequences of PB2 subunit consitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* 4, 475-485 (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* 4, 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 aggects 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., Yasui, K. and Ishihama, A.: Isolation and characterization of temperature-sensitive mutations in the *rpb3* gene for subunit 3 of RNA polymerase II in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Mol. Gen. Genet.* 262, 73-84 (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)

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.: The Rpb4 subunit of 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)

Stevens, A.M., Fujita, N., Ishihama, A. and Greenberg, E.P.: Involvement of the RNA polymerase α subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J. Bacteriol.* 181, 4704-4707 (1999)

Talukder A.A. 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.A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, A. and Ishihama, A.: Growth phase-dependent variation in the protein composition of *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181, 6361-6370 (1999)

Traviglia, 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 from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized templaet-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 130K/180K protein heterodimer. *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)

石浜　明：動物ウイルス　*蛋白質核酸酵素*　44、1419-1422（1999）

1998

Apirakawamwong, A., Fukuchi, J., Kashiwagi, K., Kakinuma, Y., Ito, E., Ishihama, A. and Igarashi, K.: Enhancement of cell death due to decrease in Mg^{2+} 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 αCTD. *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, 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. Opn. 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.: The dimeric association of *E. coli* RNA polymerase alpha subunits, studied by cleavage of Fe-BABE conjugated single-cysteine alpha subunits. *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, HarpinEcc and extracellular proteins in *Ervinia carotovora. J. Bacteriol.* 180, 3629-3634 (1998)

Nagai, S., Nagasawa, Y., Yagihashi, T. and Ishihama, A.: The cyclic AMP receptor protein (CRP) gene function is required for expression of α (cell-bound)-type hemolysis in an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun*. 60, 227-238 (1998)

Negre, D., Oudot, C., Prost, J.-F., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzone, A.J. and Cortay, J.-C.: FruR-mediated transcriptional activation at the *ppsA* promoter of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 276, 355-365 (1998)

Owens, J.T., Murakami, K., Chmura, A., Fujita, N., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Mapping *lac*UV5 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)

Ozoline, O.N., Fujita, N., Murakami, K. and Ishihama, A.: Topology of the *Escherichia coli* RNA polymerase surface involved in interaction with promoter upsteam 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)

Ryu, S., Fujita, N., Ishihama, A. and Adhya, S.: GalR-mediated repression and activation of *lac*UV5 promoter: Different 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 the 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)

Yasui, K., Ishiguro, A. and Ishihama, A.: Molecular assembly of RNA polymerase II from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Subunit-subunit contact sites on Rpb3. *Biochemistry* 37, 5542-5548 (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)

1997

Asano, Y. and Ishihama, A.: Identification of two nucleotide-biding sites on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J. Biochem.* 122, 627-634 (1997)

Boucher, P.E., Murakami, K., Ishihama, A. and Stibitz, S.: The nature of DNA-binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertusis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J. Bacteriol.* 179, 1755-1763 (1997)

Buyukuslu, N., Trigwell, S., Lin, P.P., Ralphs, N.T., Fujita, N., Ishihama, A. and Glass, R.E.: Physical mapping of a collection of *MaeI*-generating amber mutations and the functional effect of internal deletions constructed through their manipulation. *Genes and Function* 1, 119-130 (1997)

Chugani, S.A., Parsek, M.R., Douglas, Hershberger, C.D., Murakami, K., Ishihama, A. and Chakrabarty, A.M.: Activation of the *catBCA* promoter: Probing the interaction of CatR and RNA polymerase through *in vitro* transcription. *J. Bacteriol.* 179, 2221-2227 (1997)

Choy, H.E., Hanger, R.R., Aki, T., Mahoney, M., Murakami, K., Ishihama, A. and Adhya, S.: Repression and activation of prooter-bound RNA polymerase activity by Gal repressor. *J. Mol. Biol.* 272, 293-300 (1997)

Greiner, D.P., Miyake, R., Moran, J.K., Jones, A.D., Negishi, T., Ishihama, A. and Meares, C.F.: Synthesis of the protein cutting reagent iron (*S*)-1-(*p*-bromoacetamidebenzym) ethylenediaminetetraacetate and conjucation to cysteine side chains. *Bioconjugate Chemistry*, 8, 44-48 (1997)

Honda, A. and Ishihama, A.: The molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase. *Biol. Chem.* 378, 483-488 (1997)

Ishihama, A.: Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids & Molecular Biology, Vol. 11*, *Mechanism of Transcription,* Eds. F. Eckstein and D. Lilley, Springer-Verlag, Heidelberg, pp.53-70, 1997.

Ishihama, A.: Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opn. Genet. Devel.* 7, 582-588 (1997)

Jeon, Y.H., Yamazaki, T., Otomo, T., Ishihama, A. and Kyogoku, Y.: Flexible linker in the RNA polymerase a subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J. Mol. Biol.* 267, 953-962 (1997)

Jishage, M. and Ishihama, A.: Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* strain W3110. *J. Bacteriol.* 179, 959-963 (1997)

Kang, J.G., Hahn, M.Y., Ishihama, A. and Roe, J.H.: Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nucleic Acids Res.*25, 2566-2573 (1997)

Kimura, M., Ishiguro, A. and Ishihama, A.: RNA polymerase II subunits 2, 3 and 11 form a core subassembly with DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 272, 25851-25855 (1997)

Kundu, T.K., Kusano, S. and Ishihama, A.: Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^F holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *J. Bacteriol.* 179, 4264-4269 (1997)

Kusano, S. and Ishihama, A.: Stimulatory effect of trehalose on the formation and activity of *Escherichia coli* RNA polymerase E σ^{38} holoenzyme. *J. Bacteriol.,* 179, 3649-3654 (1997)

Kusano, S. and Ishihama, A.: Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes Cells* 2, 433-441 (1997)

McFall, S.M., Klem, T.J., Fujita, N., Ishihama, A. and Chakrabarty, A.M.: DNase I footprinting, DNA bending and *in vitro* transcription analysis of ClcR and CatR on the *clcABD* promoter: Evidence of a conserved transcriptional activation mechanism. *Mol. Microbiol.* 24, 965-976 (1997)

Murakami, K., Kimura, M., Owens, J.T., Meares, C.F. and Ishihama, A.: The two alpha subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact diferent halves of the DNA UP element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1709-1714 (1997)

Murakami, K., Owens, J.T., Belaeva, T.A., Meares, C.F., Busby, S.J.W. and Ishihama, A.: Positioning of two alpha subunits carboxy-terminal domains of RNA polymerase at promoters by two transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. UISA* 94, 11274-11278 (1997)

Negre, D., Bonod-Bidaud, C., Oudor, C., Prost, J.-F., Kolb, A., Ishihama, A., Cozzone, A.J. and Cortay, J.-C.: DNA flexibility of the UP element is a major determinant for transcriptional activation at the *Escherichia coli* acetate promoter. *Nucleic Acids Res*. 25, 713-718 (1997)

Ozoline, O.N., Masulisi, I.S., Chasovi, V.V. and Ishihama, A.: Functional topology of the bacterial RNA polymerase. In: *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends.* P. Carmona, R. Navarro and A. Hernanz (eds.), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1997. pp.163-164.

Rajkumari, K., Ishihama, A. and Gowrishankar, J.: Evidence for transcription attenuation rendering cryptic σ^{S}-dependent promoter for the osmotically regulated *proU* operon of *Salmonella typhimurium. J. Bacteriol.* 179, 7169-7173 (1997)

Sakurai, H. and Ishihama, A.: Gene organization and protein sequence of the small subunits of *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II. *Gene* 196, 165-174 (1997)

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 α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1475-1483 (1997)

Yang, J., Murakami, K., Camakaris, H., Fujita, N., Ishihama, A. and Pittard, A.J.: Amino acid residues in the α subunit C-terminal domain of *Escherichia coli* RNA polymerase involved in interactions with an UP-like sequence and the TyrR protein in the control of transcription from the *mtr* promoter. *J. Bacteriol.* 179, 6187-6191 (1997)

本田文江、石浜　明：インフルエンザウイルスの増殖。*日本臨床*　55、2555-2561（1997）

石浜　明：インフルエンザウイルスの増殖：転写と複製。*ウイルス感染と防御*（静岡県健康長寿フォーラム）、1-10（1997）

和田研究室（国内　0 報、海外　13 報）

2001

Izutsu, K., Wada, C., Komine, Y., Sako, T., Ueguchi, C., Nakura, S. and Wada, A.: *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *J. Bacteriol*. 183, 2765-2773 (2001)

Izutsu, K., Wada, A., and Wada, C.: Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells* 6, 665-676 (2001)

Shirakura, T., Maki, Y., Yoshida, H., Arisue, N., Wada, A., Sanchez, L.R., Nakamura, F., Miller, M. and Hashimoto, T.: Characterization of ribosomal proteins of the amitochondriate protist, *Giardia lamblia Mol. Biochem. Parasitol*. 112, 153-156 (2001)

Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A. and Watanabe, K.: Proteomic analysis of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of protein components in the 28S small subunit. *J. Biol. Chem*. 276, 33181-33195 (2001)

Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A. and Watanabe, K.: Structual compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammarian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem*. 276, 21724-21736 (2001)

2000

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

Ogata, K., Ohno, R., Morishita, R., Endo, Y. and Wada, A.: Studies on ATPase (GTPase) intrinsic to *E.coli* ribosomes *J. Biochem*. 128, 309-313 (2000)

Maeda, T., Yoshinaga, I., Shiba, T., Murakami, M., Wada, A. and Ishida, Y.: Cloning and sequencing of the gene encoding an aldehyde dehydrogenase that is induced by

growing *Alteromonas* sp. strain KE10 in a low concentration of organic nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1883-1889 (2000)

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

Maki, Y., Tanaka, A. and Wada, A.: Stoichiometric analysis of barley plastid ribosomal proteins. *Plant Cell Physiol.* 41, 289-299 (2000)

1999

Uchiumi, T., Sato, N., Wada, A. and Akira Hachimori: Interaction of the sarcin/ricin domain of 23S ribosomal RNA with proteins L3 and L6 *J. Biol. Chem*. 274, 681-686 (1999)

1998

Wada, A.: Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells* 3, 203-208 (1998)

1997

Sato, N., Tachikawa, T., Wada, A. and Tanaka, A.: Temperature-dependent regulation of the ribosomal small-subunit protein S21 in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis M3. J. Bacteriol.* 179, 7063-7071 (1997)

田中研究室（国内　0 報、海外　19 報）

2001

Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H.: An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 42, 1034-1043 (2001)

Oikawa, K., Fujiwara, M., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Characterization of two plastid sigma factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 261, 221-228 (2000)

Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda, S., Omata, T., Tanaka, K. and Takahashi, H. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 99, 4251-4255 (2002)

2000

Shirano, Y., Shimada, H., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Tanaka, K., Takahashi, H., Unno, K., Sato, S., Tabata, S., H., Miyake, C., Yokoto A. and Shibata, D.: Chloroplast development in

Arabidopsis thaliana requires the nuclear-encoded transcription factro Sigma B. *FEBS Lett*. 485, 178-182 (2000)

Kanamaru, K., Fujiwara, M., Kim, M., Nagashima, A., Nakazato, E., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of AtMinD1, a eubacteria-type factor critical for chloroplast division. *Plant Cell Physiol*. 41, 1119-1128 (2000)

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

Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and Takahashi, H.: 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 (2000)

1999

Goto-Seki, A., Shirokane, M., Masuda, S., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Specificity crosstalk among group 1 and group 2 sigma factors in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942: *in vitro* specificity and a phylogenetic analysis. *Mol. Microbiol*. 34, 473-484 (1999)

Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, M., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 40, 832-842 (1999)

Nishiyama, M., Kobashi, 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*. *FEMS Microbiol. Lett*. 172, 179-186 (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)

1998

Oikawa, K., Tanaka, K. and Takahashi, H.: Two types of differentially photo-regulated nuclear genes that encode sigma factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium* strain RK-1. *Gene* 210, 277-285 (1998)

Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. and Wakasa, K.: Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. Nucleic Acids Res.26, 415-419 (1998)

You, Z., Fukushima, J., Tanaka, K., Kawamoto, S. and Okuda, K.: Induction of entry into the stationary growth phase in Pseudomonas aeruginosa by N-acylhomoserine lactone. *FEMS Microbiol. Lett*. 164, 99-106 (1998)

1997

Tanaka, K., Tozawa,Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K. and Takahashi, H.: Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS lett*. 413, 309-313 (1997)

Sugimoto, Y., Tanaka, K., Masuda, S. and Takahashi, H.: The *rpoD1* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 encodes the principal sigma factor of RNA polymerase. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 43, 17-21 (1997)

Tanaka, K., Peter, H., Loewen, C. and Takahashi, H.: Identification and analysis of the rpo_S dependent promoter of kat_E, encoding catalase HPII in *Escherichia coli*. *Biophys. Biochim. Acta* 1352, 161-166 (1997)

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K. Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N. and Kornberg, A.: Inorganic polyphosphate and the induction of rpo_S expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11210-11215 (1997)

Asayama, M., Suzuki, A., Nozawa, S., Yamada, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Aida, T. and Shirai, M.: A new sigma factor homolog in a cyanobacterium: cloning, sequencing, and light-responsive transcripts of *rpoD2* from *Microcystis aeruginosa* K-81. *Biochim. Biophys. Acta* 1351, 31-36 (1997)

嶋本研究室（国内　0 報；海外　13 報）

2001

Sen, R., Nagai, H. and Shimamoto, N.: Conformational switching of *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter binary complex is facilitated by elongation factors GreA and GreB. *Genes Cells* 6, 389-402 (2001)

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

2000

Sen, R., Nagai, H. and Shimamoto, N.: Polymerase-arrest at the λ P_R promoter during transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 10899-10904 (2000)

Muramatsu, H., Homma, K., Yamamoto, N., Wang, J., Sakata-Sogawa, K. and Shimamoto, N.: Imaging of DNA molecules by scanning near-field microscope. *Mater. Sci. Eng. C*12, 29-32 (2000)

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

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

1999

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

Mukherjee, K., Nagai, H., Shimamoto, N. and Chatterji, D.: GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of omega subunit *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 266, 228-235 (1999)

1998

Shimamoto, N., Kasciukovich, T., Nagai, H. and Hayward, R. S.: Efficient solubilization of proteins overproduced as inclusion bodies by use of an extreme concentration of glycerol. *Tech. Tips Online* t0 1576 (1998)

Sen, R., Nagai, H., Hernandez, V. J. and Shimamoto, N.: Reduction in abortive transcription from the λP_R promoter by mutations in region 3 of the σ^{70} subunit of *E. coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 273, 9872-9877 (1998)

1997

Kinebuchi, T., Shindo, H., Nagai, H., Shimamoto, N. and Shimizu, M.: Functional domain of Esherichia coli Single-stranded DNA binding protein as assessed by analysis of the deletion mutants. *Biochemistry* 36, 6732-6738 (1997)

Nagai, H. and Shimamoto, N.: Most conserved regions of the *E. coli* primary sigma factor are involved in interaction with RNA polymerase core enzyme. *Gene. Cells* 2, 725-734 (1997)

Kubori, T. and Shimamoto, N.: Physical interference between *Esherichia coli* RNA polymerase molecules transcribing in tandem enhances abortive synthesis and misincorporation.

Nuc. Acids Res. 25, 2640-2647 (1997)

禾研究室（国内　３報、海外　12 報）

2001

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

Matsumoto, M., Hisatake, K., Nogi, Y. and Tsujimoto, M.: Regulation of receptor activator of NF-kB ligand-induced tartrate resistant acid phosphatase gene expression by PU-interacting protein/interferon regulatory factor-4. *J. Biol. Chem.* 276, 33086-33092 (2001)

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

2000

Yamamoto, K., Koga, A., Yamamoto, M., Nishi, M., Tamura, T., Nogi, Y. and Muramatsu, M.: Identification of a novel 70 kDa protein that binds to the core promoter element and is essential for ribosomal DNA transcription. *Nucl. Acids Res.* 28, 1199-1205 (2000)

Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A.: Rpb6 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)

Orimo, A., Tominaga, N., Yoshimura, K., Yamuchi, Y., Nomura, M., Saito, M., Nogi, Y., Suzuki, M., Suzuki, M.H., Ikeda, K., Inoue, S. and Muramatsu, M.: Molecular cloning of ring-finger protein (*ifp1*), which possesses two-ring-B box-coiled coil domains in tandem. *Genomics* 69, 143-149 (2000)

Orimo, A., Yamagishi, T., Tominaga, N., Yamauchi, Y., Hishinuma, T., Okada, K., Suzuki, M., Sata, M., Nogi, Y., Suzuki, H., Inoue, S., Yoshimura, K., Shimizu, Y. and Muramatsu, M.: 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 I region of the human MHC. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 276, 45-51 (2000)

1999

Imazawa, Y., Imai, K., Fukushima, 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. Genetics*. 262, 749-757 (1999)

Imai, K., Imazawa, Y., Yeqi, Y., Yamamoto, K., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Nogi, Y: The fission yeast *rpa17*$^{+}$ gene encodes a functional homolog of AC19, a subunit of RNA polymerases I and III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genetics*. 261, 364-373 (1999)

禾泰壽 : RNA ポリメラーゼ。18－19 頁。*BioScience 新用語ライブラリィー*、（田村、山本、安田編著）羊土社（1999）。

1998

禾泰壽：タンパク質の生合成の機構、酵母の遺伝学、バクテリオファージ、酵素、タンパク質。８-11、34-37、102-103、114-117 頁、*図解生物科学講座*、分子生物学(村松正實編著)、朝倉書店（1998）。

1997

Imai, T., matsuda, K., Shimojima, T., Hashimoto, T., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Sugita, S., Suzuki, K., Matsumoto, H., Masushige, S., Nogi, Y., Muramatsu, M., Handa, H. and Kato, S: ERC-tt, a binding protein for the papilloma virus E6 oncoprotein, specifically interracts with vitamin D receptor among nuclear receptos. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 233, 765-769 (1997)

Nishi, Y., Yamamoto, K., Yao, Y., Yamamoto, M., Nogi, Y. and Muramatsu, M.: Isolation and characterization of cDNA encoding mouse RNA polymerase II subunit RPB14. *Gene* 187, 165-170 (1997)

Korobko, I.V., Yamamoto, K., Nogi, Y. and Muramatsu, M.: Protein interaction cloning in yeast of the mouse third largest RNA polymerase II subunit, mRPB31. *Gene* 185, 1-4 (1997)

禾泰壽：分子細胞生物学辞典（村松正實編）、東京化学同人（1997）。

(2) 特許出願（国内　３件、海外　２件）

国内特許

「ガラクトース感受性を用いた逆ツー・ハイブリッド法」

発明者　：　禾泰壽、石浜　明、村松正實

発明の名称　：　ガラクトース感受性を用いた逆ツー・ハイブリッド法

出願番号　：　特願平 10-332458

出願日　：　平成 10 年 11 月 24 日

「ウイルス RNA ポリメラーゼの製法」

発明者　：　本田文江、石浜　明

発明の名称　：　ウイルス RNA ポリメラーゼの製法

出願番号　：　特願 2000-319156

出願日　　：　平成 12 年 10 月 19 日

「単細胞微生物の分離方法」

発明者　　：　石浜　明

発明の名称　：　単細胞微生物の分離方法

出願番号　：　特願 2001-356118

出願日　　：　平成 13 年 11 月 21 日

国際特許

「ウイルス RNA ポリメラーゼの製法」

発明者　　：　本田文江、石浜　明

発明の名称　：　ウイルス RNA ポリメラーゼの製法

出願番号　：　PCT/JP01/08476

出願日　　：　2001 年９月 27 日

「単細胞微生物の分離方法」

発明者　　：　石浜　明

発明の名称　：　単細胞微生物の分離方法

出願番号　：　PCT/JP02/04718

出願日　　：　2002 年５月 15 日

(3) 受賞、新聞報道等

受賞

和田　明：　日本植物生理学会論文賞　1999 年３月

Naoki Sato and Akira Wada: Disruption analysis of the gene for a cold-regulated RNA-binding protein, *rbsA1*, in *Anabaena*: Cold-induced initiation of the heterocyst differentiation pathway. *Plant Cell Physiology* 37, 1150-1160 (1996)

新聞報道

和田　明：　「プロテオーム研究用電気泳動法の開発」

日経バイオテク　1998 年 12 月 21 日号

(4) その他特記事項

開発試薬技術の製品化

「RFHR (Radical-Free Highly Reducing) 法二次元電気泳動装置」

発明者　：和田　明（大阪医大）

特許取得：日本エイドー㈱

製品化　：日本エイドー㈱

「蛋白質及び核酸主鎖切断試薬 FeBABE (Iron-(2-romoacetyl) aminobenzyl EDTA)」

（蛋白－蛋白相互作用、蛋白－核酸相互作用の作用点同定試薬）

発明者　：石浜　明（国立遺伝学研究所）

製品化　：同仁化学㈱

研究推進・支援システムの確立

１.「大腸菌転写研究センター」の構築（石浜　明）

大腸菌ゲノム 4,000 遺伝子の破壊株の構築と、遺伝子ミクロアレーの供給による、Transcriptome の共同解析システム（国内大腸菌研究者、破壊株作製：九大・三木健良研究室、奈良先端大・森 浩禎研究室担当）及び大腸菌 Proteome 共同解析システムの構築（二次元電気泳動法開発改良：大阪医大・和田　明研究室、京大・ウ研・和田千恵子研究室）

２.「転写研究国際ネットワーク」の構築（石浜　明）

RNA ポリメラーゼ（基本転写装置）と転写因子の専門家集団の協業を促進し、資材の共同開発と共同管理利用システムの構築と、国際協力集団の構築、研究者交換による共同実験プランの実施（大腸菌 70 種類転写因子純化標品及びそれらの抗体等の資材の備蓄と利用、15 カ国 60 研究室参加）