

新 制
理
474
京大附図

學位申請論文

梶谷正行

大腸菌RNAポリメラーゼの プロモーター 選択活性

…… *in vitro* 混合転写系の開発とそれを用いた解析 ……

梶谷 正行

要旨

遺伝情報の水平伝達における発現調節は各段階で行われているが、重要な調節段階は最初の転写反応である。この転写反応は 鋳型DNAの量と質、転写酵素 RNAポリメラーゼの量と質、および 基質 リボヌクレオシドとリン酸の三要素の相互作用により制御されている。このうち DNA側の調節は、オペロン説提出以来解析が進められ、その詳細が明らかにされてきたが、RNAポリメラーゼ側の調節はその量的な調節機構が明らかにされてきたのみで、質的な調節機構はいまだに不明な部分が多い。

RNAポリメラーゼの質的制御機構としては、酵素のリン酸化などの化学修飾による様式と、酵素成分以外の因子との相互作用による物理的修飾による様式が考えられる。申請者の所属した 京都大学ウイルス研究所化学部門 石浜研究室では RNAポリメラーゼの研究の一環として、大腸菌 RNAポリメラーゼの質的制御機構の解析を行っている。そしてRNAポリメラーゼの *in vitro* リン酸化系の開発や転写に影響を与える転写因子の精製等に取り組んでいる。しかし、石浜研究室に限らず、質的制御機構を解析するにあたり適切な検出系がなかったため、研究の進展が遅れていた。

このような状況を打破するために申請者は新たに「*in vitro* 混合転写系」の開発に取り組み、目的とする検出系を確立した。この転写系は 大腸菌の各種プロ

モーターを含む DNA 断片を複数種含む反応系を一本のチューブ内で反応させ、その RNA 産物をゲル電気泳動で分離して定量する。したがって、この系では全く同一の条件下で各種プロモーターからの RNA 産物を個別に定量できる、すなわち転写条件の変動が転写にどのような影響を与えるのか各プロモーターごとに検出できる。

申請者はプロモーター含有 DNA 断片を、ラクトース (*lac*)、トリプトファン (*trp*)、リボソーム蛋白質 S1 (*rpsA*)、リボソーム蛋白質 L10 (*rplJ*)、リボソーム RNA E (*rrnE*)、および *recA* 蛋白質 (*recA*) 各オペロンから調製し、新開発した転写系を用いて各プロモーターごとの転写特性を解析した。転写開始の RNA ポリメラーゼ・プロモーター複合体形成反応を解析し、プロモーター強度として複合体形成の速さ (パラメーター I) と平衡レベル (パラメーター II) の2つのパラメーターを求め比較検討した。その結果、パラメーター I とパラメーター II とは相関せず、独立した特性であることが明らかとなった。また、塩濃度や反応温度の反応条件を変化させるとパラメーター値が変化することが明らかとなり、プロモーター強度は絶対的な特性ではなく、変動する特性であることがわかった。

さらに申請者は、この転写系を用いて繁殖制御系の重要な作用因子であるグアノシン-5'-リン酸-3'-ユリジン酸 (ppGpp) の作用を検討した。そして、ppGpp によるプロモーター種特異的転写抑制を検出し、その作用点は複合体形成後、転写

(ii)

開始前にあることを示唆した。

この一連の解析において、オペロン上流に複数のプロモーターを持つ *rpsA* および *rrnE* 両オペロンのプロモーター群は 各々異なる特性を示した。特に、*rpsAp1* および *rrnEp1* は ppGpp による転写抑制が おきる 聚縮プロモーターであるのに対し、*rpsAp3* および *rrnEp2* は そうではないという新しい知見は 特筆すべき発見である。

このように 新たに開発した「*in vitro* 混合転写系」は プロモーターごとの転写特性解析に有効である。今後の RNAポリメラーゼの質的制御機構の解析において、その有用性が発揮されるものと期待される。

目次

序章	遺伝情報発現制御機構解析の歴史	p.1 ~ p.3
第1章	序論……大腸菌 RNAポリメラーゼの質的制御機構解析の背景	p.4 ~ p.21
第1節	転写の機構とその制御	4
第2節	Travers のモデル	6
第3節	質的制御を検出するシステム	10.
第4節	質的制御機構解析の戦略	15.
第2章	材料と方法	p.22 ~ p.36
第1節	試薬と酵素	22
第2節	プラスミド	23
第3節	truncated templates の調製	24
第4節	<i>in vitro</i> 転写系	31
第5節	転写産物の分離・同定と定量	32
第3章	結果と考察 1 ……転写産物の分離と同定	p.37 ~ p.44
第1節	truncated templates の構造	37
第2節	転写産物の同定	39
第3節	<i>in vitro</i> 混合転写系への展開	43
第4章	結果と考察 2 ……プロモーター強度の比較	p.45 ~ p.71
第1節	複合体形成	45
第2節	複合体形成の速度と平衡レベル	47
第3節	2つのパラメーター間の相関関係	53
第4節	転写反応の回転効率	56
第5節	塩濃度の影響	59
第6節	反応温度の影響	62
第7節	2つのパラメーターの生理的意味	66
第8節	プロモーター強度の比較	70

第5章	結果と考察 3 …… ppGpp による転写特異性の変換	p.72~p.86
-----	------------------------------	-----------

第1節	繁殖プロモーター	72
第2節	ppGpp 添加の影響	73
第3節	ppGpp の作用する段階	78
第4節	ppGpp の作用機構	83

第6章	考察 …… 複数プロモーター系の転写	p.87~p.94
-----	--------------------	-----------

第1節	複数プロモーター系	87
第2節	<i>rrnE</i> オペロン	91
第3節	<i>rpsA</i> オペロン	91
第4節	複合転写調節系	92

終章	<i>in vitro</i> 混合転写系の将来	p.95~p.98
----	--------------------------	-----------

第1節	<i>in vitro</i> 混合転写系の有効性	95
第2節	転写因子の解析	96
第3節	応用	96
第4節	将来	97

謝辞		p.99~p.100
----	--	------------

参考文献		p.101~p.106
------	--	-------------

序 章 遺伝情報発現制御機構解析の歴史

遺伝子に保存されている遺伝情報は、RNAに転写され、そして蛋白質に翻訳さ

(1)
れて発現する。この一連の流れにおいて、特定の遺伝子が必要な時に必要なだけ
発現されるよう巧妙な制御機構が存在し機能している。それらは、鋳型(template)の活性化、RNAへの転写、RNAのprocessing(切断、再結合や修飾)、蛋白質への翻訳、蛋白質のprocessingや高次構造等々各段階に存在している。これらは原核細胞と真核細胞の両者に共通して存在しているが、原核細胞では遺伝情報発現量のほとんどが転写の段階で制御されている。

(2,3,4)
る。

転写反応は、(1) 鋳型の量と活性、(2) 転写酵素の量と活性、および

(3) 基質 リボヌクレオシド ヌリン酸(rNTPs)の濃度により制御されている。

これら三者間の相乗結果として、その時その場の生理条件に応じた転写反応が起きている。この制御機構解明の歴史をふり返ってみると、まずオペロン

(5)
説に基づいて鋳型活性の調節が注目された。この方向の研究は、鋳型側にプロモーターやオペレーター等の調節遺伝子の存在、リプレッサーやアクチベーター等の転写調節因子の存在を示し、それらの相互作用による調節機構を明らかにした。その後、DNAクローニング法、塩基配列決定法、コンピューターの利用等の新技術の開発・改良にともない、現在では鋳型の塩基配列、立体

構造モデルでのシミュレーション、あるいは二本鎖DNAの熱力学的安定性を示すパラメーターとの関係等々のレベルで議論されるようになってきている。⁽⁶⁾

転写酵素 (EC 2.7.7.6)

オペロン説におけるRNAポリメラーゼ²の位置づけは、ただ転写反応を触媒

するだけの認識しか与えられていなかった。だが、転写開始因子のサブユニット

の発見が、RNAポリメラーゼも転写制御に関与しているとの認識を芽ばえさせ

た。そして、ファージ感染時や細菌の孢子形成時における転写様相の変化

(2.3.4, 7a, 7b)

とともに、RNAポリメラーゼが化学修飾されたり、RNAポリメラーゼに新

(7c)

しい転写調節因子が付加されたりする等の構造変化が起きて転写反応が質的

に変化する事実が明らかにされ、転写制御におけるRNAポリメラーゼの積極的

(2, 3, 4)

寄与の考えが確立した。

ところで、分子遺伝学・分子生物学の研究は、大腸菌とそのファージの系を中心に進歩・発展し、現在の繁栄の基礎を築きあげてきたのだが、RNAポリメラーゼの研究もこの例に外れない。そして、その研究を通じて、転写反応の部分反応機能の発現とサブユニット集合中間体との関係、複合した最終の酵素活

(8)

性発現に先立つ高次構造体の形成と機能発現への成熟 (maturation)、あ

るいはリボソーム蛋白質・RNAポリメラーゼサブユニット遺伝子オペロンのオペロン

内部に存在する転写減衰域の発見や転写後翻訳レベルでの量的制御機構

(9)

の存在等々、RNAポリメラーゼだけに限定されず、生物に普遍的に存在する

と思われる遺伝情報発現制御機構をも明らかにしてきた。これらの研究は、主に、大腸菌 RNA ポリメラーゼ^(9,10) の活性酵素量の調節 すなわち、量的制御についてのものであった。量的制御機構の大意が解明された現在、今度は大腸菌内においても枯草菌と同様に RNA ポリメラーゼの RNA 合成活性そのもの、あるいは、プロモーター特異性の変換、すなわち、質的制御機構の解明が新たなテーマとして注目されている。

第1章 序論……大腸菌 RNA ポリメラーゼの質的制御機構解析の背景

第1節 転写の機構とその制御

大腸菌 RNA ポリメラーゼは 4つの異なるサブユニットから構成される分子
量約50万の巨大酵素である。各サブユニットは、 α 、 β 、 β' 、および σ のサブユ
ニットと呼ばれている（表1）。RNAポリメラーゼの各サブユニット遺伝
子が蛋白質合成装置の諸要素遺伝子と同一オペロンを構成し、かつ、クラスター
をなしているということが 転写・翻訳の共転という観点から興味をもたれ
る。

RNA合成の様相を模式的に図1に表わす。4つのサブユニットが集合した
ホロ酵素 E₀ ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) は、DNA上のプロモーター領域を認識し転写を
開始する。この時、RNAポリメラーゼは転写開始点から上流約35 bp (塩
基対) 付近にある (5')-TTGACA... (3') またはこれに類似の配列を認識
し、約10 bp 上流付近にある (5')-TATAAT... (3') または類似の配列を中心
に結合する。後者の配列は Pribnowの配列と呼ばれ、RNA合成開始
点の信号となっていると考えられている。最近、これら2つの領域、すなわち、
-35領域と-10領域に加えて両者の距離（スパーサー領域）が約16~
18 bp であることがプロモーターとして機能するかどうかの重要なパラメーターで
あることが明らかにされた。これら3つのパラメーターをもつプロモーター領域

表1. 大腸菌 RNAポリメラーゼ" のサブユニット

サブユニット	分子量	⁽¹¹⁾ 遺伝子(座位)	分担機能	文献
α サブユニット	36,111	<i>rpoA</i> (72 min)	$\beta\beta'$ 連結	12, 13
β サブユニット	150,543	<i>rpoB</i> (89 min)	基質結合, RNA合成, RNA結合	14, 15, 15a
β' サブユニット	155,163	<i>rpoC</i> (89 min)	DNA結合, σ 結合	14, 16, 16a
σ サブユニット	70,263	<i>rpoD</i> (66 min)	プロモーター認識, 転写開始	17, 18

大腸菌 RNAポリメラーゼ" ホロ酵素を構成する4種のサブユニットについて、それらの特性をまとめた。文献欄には、遺伝子座位を決定した報告と DNA塩基配列を決定した報告を載せた。分担機能は *in vitro* における単離サブユニットの再構成実験に負うところが大きい(文献 8, 10, 19 等参照)。分子量は DNA塩基配列から推算された値を示した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でサブユニットを分離すると、 $\alpha, \beta, \beta', \sigma$ 各サブユニットは、分子量 39K, 155K, 165K, 90K (K=1,000) の蛋白質として挙動する。

なお、各サブユニット遺伝子のオペロン構成は以下のとおりである。

α サブユニットオペロン: *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA*, & *rplQ*. (*str-spc* 領域中)⁽⁴⁾
 $\beta\beta'$ サブユニットオペロン: (*rplK*, *rplA*) *rplJ*, *rplL*, *rpoB*, & *rpoC*. (*rif* 領域中)⁽⁴⁾
 (*rplKp* からの転写が通達転写し、*rplJp* より下流も読めて転写)^(4a)
 σ サブユニットオペロン: *rpsU*, *dnaG*, & *rpoD*.

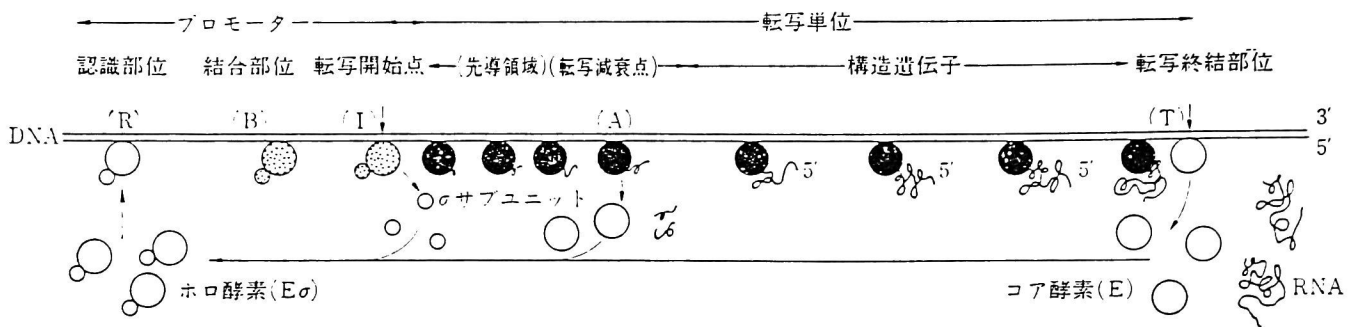


図1. 転写の機構

RNAポリメラーゼ ホロ酵素($E\sigma = \alpha\beta\beta'\sigma$)は、オペロン上流域の特定部位、プロモーター領域の信号を認識して結合し、特定部位から転写を開始する。開始後、転写開始因子のサブユニットは酵素から遊離し、RNA鎖伸長反応はコア酵素($E = \alpha\beta\beta'$)で進行し、オペロン末端の特定部位、ターミネーター領域で転写を終結する。オペロン内部に弱い転写終結領域(転写減衰領域、アテニュエーター)をもつオペロンもある。

域の非対称性・方向性により、RNAの合成方向が決定される。言い換えれば、RNAポリメラーゼの結合方向が決定されることになり、そのためにもRNAポリメラーゼの非対称サブユニット構造がプロモーターの識別に参与していると考えられる。

RNA合成開始後、 σ サブユニットはホロ酵素を離れ、RNA鎖伸長反応はコア酵素E ($\alpha\beta\beta'$)のみで進行する。そしてオペロン末端に位置する転写終結(ターミネーター)領域において、RNA合成を停止するとともに鋳型DNAから離脱し、新生RNA鎖を放出して、一連の転写反応は終了する。転写終結には、転写終結因子 ρ 因子依存性と非依存性の2つの機構がある⁽²⁶⁾。後者の機構では、ターミネーター領域にGC塩基対が多く、2回回対称構造をもつ配列に就き、転写される側のDNA鎖(sense strand)に連続するA残基が認められている。おそらく^{RNA側の}GC塩基の多い対称部位がヘアピン構造をとり、これが転写終結の信号となつて、鋳型DNA側の連続したA残基と新生RNAの連続したU残基間の相互作用力の弱い部分で、転写複合体が離散するものと考えられている。オペロンによつては、オペロン内部の特定領域でRNA合成が減衰してしまう転写調節領域(アテニューエーター)をもつ。この転写減衰領域は、ターミネーター様の構造をもっている^(26a)。

このような一連の転写反応において、前述したようにオペロン説に従つてDNA

側の信号構造が注目され、その塩基配列の変化が「プロモーター・RNAポリメラーゼ」複合体形成の効率に影響を及ぼしたり、オペロン内部でのRNA合成速度に影響を与えたりすることが示されてきた。^(たとえば27, 28, 28a, 28b, 29)このような変化が「RNAポリメラーゼ」の変化によっても生じ、遺伝情報発現制御に関与しているとも考えられる。すなわち、RNAポリメラーゼが化学的修飾を受けたり、あるいは他の転写調節因子（私の所属した石浜研究室では「転写因子」「Transcription Factors」と呼んでいる）がRNAポリメラーゼに物理的に作用することによってRNAポリメラーゼの状態が変化し、鋳型DNA上の信号の認識能が変化したり、RNA鎖伸長速度が変化したりすると考えるのである。^(29, 30)このような制御の機構を、RNAポリメラーゼの量的制御（酵素の合成・存在制御）に対して、活性状態の変化であるから質的制御と言う。

第2節 Travers のモデル

RNAポリメラーゼには質的に異なる状態があると初めて提唱したのは Travers である。彼は緊縮制御（stringent control）の研究を通じて、RNAポリメラーゼに転写特異性（プロモーター選択性）の異なる状態があるとするモデルを発表した。⁽³¹⁾

緊縮制御と呼ばれる現象は、大腸菌をアミノ酸飢餓培養条件下に移すと

tRNA と rRNA の合成がたゞちに抑制され、その結果 引き続いて mRNA や蛋白質の合成も低下する現象である。^(32, 33, 34) この制御機構は、培地の環境変化に対応して一時的に細胞の増殖を抑制し、新しい環境に対する適応を促進するための調節機構のひとつであると解釈されている。培地の栄養価によって細胞の増殖速度が変化し、その速度に対応して リボソームや RNA ポリメラーゼの量変動する細胞増殖速度依存性の調節機構も知られている。これらの緊密制御と細胞増殖速度依存制御とは、誘導酵素系と違い、細胞の構成的成分であるリボソームや tRNA の合成の変動が見られる数少ない実験系である。

緊縮調節期の大腸菌において特徴的なこととして、マジックスポットと呼ばれる pppGpp (グアノシン-5'-リン酸-3'-リン酸) や ppGpp (グアノシン-5'-リン酸-3'-リン酸) などの高リン酸ヌクレオチドや緊縮調節蛋白質 (stringent starvation protein = SSP) と呼ばれる蛋白質が認められることである。これらの因子が飢餓環境へ適応するための重要な因子であると考えられている。

このような緊縮制御下の転写制御について Travers らは、 ppGpp と RNA ポリメラーゼの相互作用、転写と翻訳との共転を重視して、翻訳装置誘発素と RNA ポリメラーゼとの相互作用による RNA ポリメラーゼの転写時異性変換モデルを提唱した。tRNA, rRNA 合成の即時停止と ppGpp 蓄積との対応に注目した彼ら

in vitro RNA合成系を用いて rRNA や ラクトース・オペロン mRNA などの合成量と ppGpp 添加の効果と比較した。その結果 ppGpp が rRNA 合成を特異的に抑制するが、全 RNA 合成には顕著な影響を与えないことを示した。⁽³⁵⁾ その後 ppGpp が RNA ポリメラーゼに結合し、その結果転写特異性が変換したと結論した。また、翻訳開始アミノ酸を転移する fMet-tRNA^{Met} が RNA ポリメラーゼに結合し mRNA 合成の促進傾向をもつこと、^(36,37) 翻訳延長因子 EF-Tu・Ts 複合体が RNA ポリメラーゼに結合し tRNA 合成の促進傾向をもつこと、^(38,39) そして翻訳開始因子 IF-2a がやはり RNA ポリメラーゼに結合し rRNA 合成の促進傾向をもつことを示した。⁽⁴⁰⁾ これらの結果は、RNA ポリメラーゼは種々の因子の結合により転写特異性を変えるプロステリク酵素であり、その転写特異性から分類して複数以上の状態の RNA ポリメラーゼが存在しているとするモデルを提唱させるにいたった(図2)。このモデルによると、翻訳装置諸要素の中で非機能状態にあるものが RNA ポリメラーゼに作用して mRNA, rRNA または tRNA を優先的に転写する機能型に変換することにより、転写と翻訳の共通をとらえようとしている。

第3節 質的制御を検出するシステム

Trautens のモデルは彼を中心とするグループによる一連の研究により、少

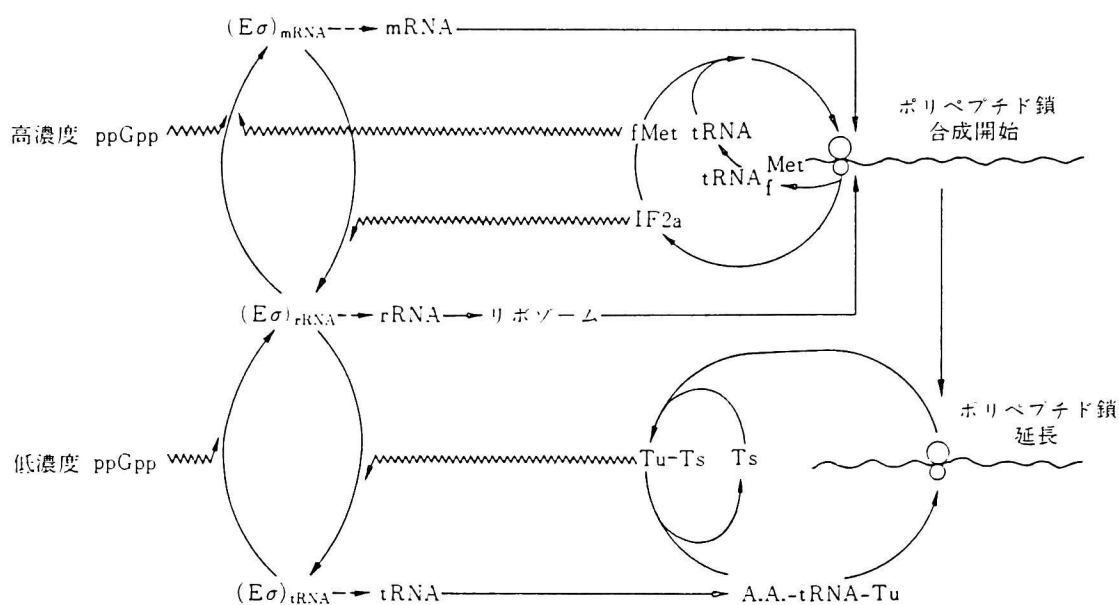


図 2. Travers のモデル: 翻訳装置要素による RNA ポリメラーゼの転写特異性変換

RNA ポリメラーゼにアロステリック酵素の考え方を導入した Travers らのモデルによれば、大腸菌 RNA ポリメラーゼは翻訳装置の各要素の濃度変化に応じた相互作用により、mRNA 転写型 $(E\sigma)_{mRNA}$ 、rRNA 転写型 $(E\sigma)_{rRNA}$ 、および tRNA 転写型 $(E\sigma)_{tRNA}$ の 3 状態を変換する。

なくとも 彼らの実験した範囲内で 質的制御が存在していることを示した。 Travers のような一貫性はないが、 彼らの以前にも 質的制御につながる考察を行っている単発的な報告が多数ある。 これらの報告は、 (1) *in vitro* RNA合成系を促進したり抑制したりする効果を指標として同定された因子 (表2)、 または、 (2) RNAポリメラーゼ遺伝子の変異を抑制したり、 RNAポリメラーゼの変異によって抑制される遺伝的変異を示す遺伝子のつくる蛋白質 (表3) という二つのカテゴリーに大別される。 だが、 これらの報告の多くは RNAポリメラーゼに作用して質的制御を行うと思われる因子を含む粗精製画分を扱っていたり、 その効果を確定する系が不十分であったり、 あるいは、 遺伝学的な解析のみに終わり実体の追求が不十分である等々、 端的に言えば 現象の発見のみで 詳細な実体研究がなされておらず、 質的制御を研究するものにとって満足すべき報告は少ない。

質的制御の研究は、 最終的には因子を分離同定し、 その転写因子としての性質を *in vitro* の精製した RNA合成系で再現させて示すことが重要であり、 同時に 遺伝学的手法を用いて遺伝子座位を決定するとともに *in vivo* での役割を明らかにしなければならない。

これまでの研究報告を振り返ってみると、 RNAポリメラーゼに質的な変換が起きていたとしても、 それを確実に検出する適当なシステムがなかったことが、 質的制御の実体を明らかにする上で一つの関門になっていたとみられる。 今までに

表2. *in vitro*系で検出された大腸菌蛋白質因子

因子	分子量	作用点、性質	文献
IF-2a	118K	木口 rRNA合成促進	40
τ_1	105K	コア 未知	29
M	85K	木口 転写開始の促進	41, 42
musA(L)	69K	コア 通過転写促進	43, 44
σ'	56K	コア 転写開始の促進 (転写開始因子機能)	45, 46
ρ	50K	RPase RNA鎖伸長反応の抑制 (転写終結因子)	47
EF-Tu	47K	RPase stable RNA合成の促進	48
EF-Ts	36K	RPase stable RNA合成の抑制	49
SSP	23K	木口 転写抑制	50
ω	10K	RPase 未知	51

*in vitro*転写系でRNA合成に影響を与えたり、RNAポリメラーゼと相互作用したりすることと指標として報告された転写因子候補をまとめた。

表3. 遺伝学的にRNAポリメラーゼ機能に影響を与えることが示された因子

遺伝子	座位 ⁽¹⁾	産物	性質	文献
<i>finA</i>	4 ^{min}	17K (HLP-1)	リファンピシン耐性を抑制	52,53,54
<i>nusB</i>	10	25K	λ N蛋白質の機能発現に關与する宿主因子	55
<i>fusB</i>	14		転写と S6蛋白質合成に多面的影響	56,57
<i>nusA</i>	68	69K (L)	λ N蛋白質の機能発現に關与する宿主因子	44,58
<i>nusE</i> (<i>rpsJ</i>)	73	12K (S10)	λ N蛋白質の機能発現に關与する宿主因子	59
<i>strA</i> (<i>rpsL</i>)	73	14K (S12)	S12蛋白質の変異をリファンピシン耐性で抑制	60,61,62
<i>dnaA</i>	82	53K	<i>dnaA</i> 蛋白質の変異をリファンピシン耐性で抑制	63
<i>rho</i>	84	50K (ρ)	<i>rho</i> 蛋白質の変異をリファンピシン耐性で抑制	64,65
<i>finB</i>	90		リファンピシン耐性を抑制	53
<i>mop</i> (<i>groE</i>)	94	64K (ATPase)	転写と ATPase合成に多面的影響	66,67

遺伝学的にRNAポリメラーゼの機能に影響を与え相互作用が示唆された因子をまとめた。

リファンピシン耐性は RNAポリメラーゼ β サブユニットの変異によって生じる。

用いられてきた方法は、*in vitro* RNA 合成系で 標識した 基質の 取込量を 追う というシステムが多い。この方法では RNA 合成活性全般への影響は すぐ 判定できる のだが、どの遺伝子が どのように 影響を受けているのか 判断できない。場合によっては 促進と抑制とが 相殺しあい、見かけ上 何の変化も 検出できないことも ありうる。この欠点を改善するため、DNA-RNA ハイブリダイゼーションにより、特定の遺伝子の 転写量を 個別に 測定する システムを用いた 報告も なされている。しかし、このシステムでは ある遺伝子の 転写量を 測定するのに 各々の遺伝子を もつ DNA プローブ と その バックグラウンド を 測定するための DNA プローブの 2種類ずつ 調製して 数点の 測定を重ねねばならず、多種類の遺伝子で 解析する際、複雑になる。

このような状況の下で RNA ポリメラーゼの 質的制御機構を 解析するには、やはり 変化を 効率的に 検出する 新しい システムの 開発 が 重要なポイントとなる。

第4節 質的制御機構解析の戦略

私の所属した石浜研究室では RNA ポリメラーゼ研究の一環として その質的制御機構の 解析を手がけた。^(29,30) そのめざすところは、化学修飾による RNA ポリメラーゼの 質的変換と 物理的相互作用による RNA ポリメラーゼの 質的変換の2つ

の機構の存在とその機作とを明らかにすることである。化学修飾による機構の解析では RNA ポリメラーゼのリン酸化をとりあげ、大腸菌内において RNA ポリメラーゼも含めてリン酸化された蛋白質が存在することを示し、RNA ポリメラーゼの *in vitro* リン酸化系の確立をめぐっている。^(30,68) 物理的相互作用による機構の解析では、前節で述べた 2つのカテゴリーとは異なる第3のカテゴリー、すなわち、RNA ポリメラーゼ精製時に共精製されてくる (co-purified) 蛋白質の中に RNA ポリメラーゼと相互作用をしている蛋白質が存在していると考え、そのような「転写因子 (transcription factors)」を分離同定しようとしている。^(29,30) 私は後者を担当し研究を続けてきた。

以下に、これまでの概要を述べておく。

大腸菌 RNA ポリメラーゼは 図 3 に示した過程を経て、まず粗精製標品として得られる。⁽⁴⁵⁾ この標品中には 同図 に模式的に表わしたような蛋白質が混在している。粗精製 RNA ポリメラーゼは、この後さらにグリセロール密度勾配遠心や、⁽⁶⁹⁾ フォスフォセルロースカラムクロマトグラフィーなどを通じて精製 RNA ポリメラーゼとなる。粗精製 RNA ポリメラーゼ標品中に混在していた転写因子候補には、その後の精製段階で RNA ポリメラーゼと分別されていく蛋白質もあるし、精製 RNA ポリメラーゼ標品まで挙動をともにする蛋白質もある。^(29,30) 後者の場合 (①蛋白質など) には、精製 RNA ポリメラーゼを穏和な条件でサ

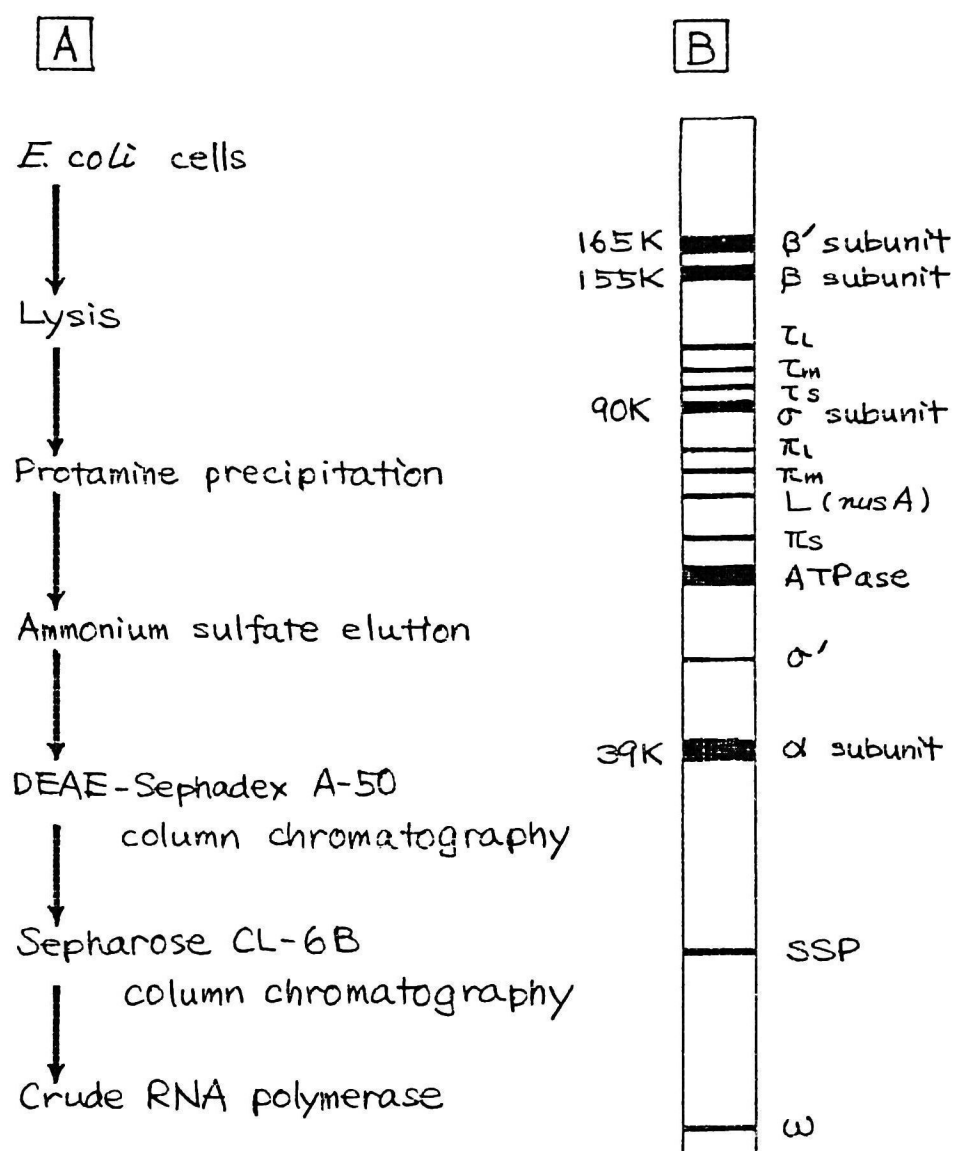


図 3. 大腸菌粗精製RNAポリメラーゼと共精製される蛋白質

大腸菌を溶菌させた後、左A図に示した過程を経て粗精製RNAポリメラーゼを得ている。この段階までRNAポリメラーゼと挙動を共にする蛋白質を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して調べると、右B図に模式的に示した10余種の蛋白質が見い出される。一部の蛋白質は既に報告されており、一般名もついている。一般名のない蛋白質については、σサブユニットの相対分子量 $M_r = 90K$ （表1参照）を基準にして、それより大きい（tau）蛋白質群と小さいπ（pi）蛋白質群に分けて仮称をつけている。表4も合わせて参照のこと。

サブユニット分離を行い転写因子候補を分離している。

このようにして分離された転写因子候補は、RNAポリメラーゼの各サブユニット抗体（抗血清）と交差させサブユニット分解産物ではないことを確認する。次に、各転写因子候補に対する抗体（抗血清）を用意し、それぞれがRNAポリメラーゼの各サブユニットと交差するかどうかを確認している。これらの抗体（抗血清）を用いて大腸菌の溶菌液（lysate）を処理すれば、RNAポリメラーゼと転写因子候補とが共沈してくるかどうかで、お互いに相互作用しているかどうかを判定できる。また、各種プロテアーゼ処理によって生じるペプチド断片の一次元および二次元電気泳動パターンの比較によっても確認している。

他方、精製したRNAポリメラーゼと転写因子候補を混合し、密度勾配遠心にかけてRNAポリメラーゼ・転写因子複合体形成の確認も行っている。

このような特性解析を行ってきた転写因子候補が、実際に転写反応においてRNAポリメラーゼの転写活性に影響を与えているかどうかを検出することが最大の課題である。当初、フーシ DNA や合成ポリマーを鋳型 DNA として用い、糖基基質の総取り込量の変動で追求していたが、^(70,71) 前節で述べたようにこの方法では転写因子候補の影響を確実に検証することは不可能であった。この時点までに明らかにした各転写因子候補の特性を表4にまとめておく。

やはり確実な検出系、特にプロモーターが多数存在し、その各々のプロモ-

表 4. 大腸菌 RNAポリメラーゼと共精製される蛋白質因子

蛋白質	分子量	性質	文献
τ_L	105K	コア酵素に結合	29, 30
τ_m	100K	ヌクレアーゼ活性	29, 30
τ_s	96K	RNA合成阻害活性	29, 30
π_L	87K		30
π_m	76K	コア酵素に結合	30
L	69K	nusA蛋白質, コア酵素に結合	30
π_s	67K		30
ATPase	64K	mop (groE) 蛋白質, ATPase 活性	72, 73
σ'	56K	コア酵素に結合, 転写開始因子機能	45, 46
SSP	23K	ホロ酵素に結合, 転写抑制	50
ω	10K	ホロ酵素, コア酵素に結合	51

大腸菌 RNAポリメラーゼ精製時, 挙動を共にする蛋白質をまとめた。図3参照。
 ここにあげた因子以外に サブユニットの分解物を 酵素に結合したままに精製される。1970
 年代初め Zillig らによって報告された μ , ν , κ サブユニットなどは サブユニットの分解物と
 推定される。

ターからの転写量を個別に測定しうるシステムの開発が必要であった。このような状況になり改めてまわりを見直してみると、遺伝子工学関連の新技術の開発・改良には目玉みはるものがあった。^(例えば 73a, 73b)プラスミド DNA の抽出法, 豊富な市販制限酵素群, クローニング技術, ゲル電気泳動法, DNA 断片の精製法 等々, これらの技術の複合した成果として、各種の遺伝子がクローニングされ、その DNA が簡単に調製できるようになってきていた。

このような状況の中で、本論文で報告する「*in vitro* 混合転写系 (*in vitro mixed transcription system*)」⁽⁷⁴⁾が誕生した。これは、一本の反応チューブの中に多数種のプロモーター含有 DNA 断片, いわゆる *truncated templates* を入れ、それらに由来する短い転写産物をゲル電気泳動して分離し、同一レーンの中で全ての転写産物を個々のプロモーターごとに比較定量しようとするものである。このようなシステムを組むことにより、全く同一の反応条件下で個々のプロモーターからの転写の様相を個別に解析することが可能になった。

次章以下でこの *in vitro* 混合転写系の詳細を述べる。本論文では、ラクトース (*lac*)、トリプトファン (*trp*)、リボソーム蛋白質 S1 (*rpsA*)、リボソーム蛋白質 L10 (*rplJ*)、リボソーム RNA E (*rrnE*) および *recA* 蛋白質 (*recA*) 以上 6 つのオペロンのプロモーターを用い、新開発のシス

テムを用いて プロモーター 強度の比較 や 緊密制御の調節因子 ppGpp の機能
 についての解析を行った。 その結果、 プロモーター 強度には 2つのパラメーター
 があり、 どちらかは 互いに独立で、 また 絶対的な ものでなく 環境条件により変
 化するものであること、^(74,75) ppGpp による プロモーター 種 特異的な 転写抑制を再
 現することができ、⁽⁷⁶⁾ このシステムは 転写因子解析に有効であること 等の知見を
 得ることができた。 以下、 これらの結果と考察を 詳細に報告する。

第2章 材料と方法

第1節 試薬と酵素

大腸菌 RNA ポリメラーゼ⁽⁴⁵⁾は Fukuda らの方法に拠り W3350 株より調製した。⁽⁴⁵⁾ その概略は 第1章 第4節 に述べてある。ホロ酵素とコア酵素とは、粗精製 RNA ポリメラーゼを 50% グリセロール存在下に フォスフォセルロール カラムクロマトグラフィー⁽⁶⁹⁾を行い分離した。基質 rNTPs (リボヌクレオシド 5'-三リン酸)は、P-L Biochemicals 社 (米国) および Boehringer Mannheim 社 (西ドイツ) から購入した。標識基質 [α -³²P] UTP は Amersham 社 (英国) から購入した。

制限酵素 Bam HI, Eco RI, Hae III, Hap II, Hha I, Hind III, Hinf I, Pst I, および Sal I は 宝酒造 (日本) から購入した。制限酵素 Alu I は Bio Lab 社 から、制限酵素 Tag I は BRL 社 (米国) から各々購入した。リボヌクレアゼ RNase A は Sigma 社 (米国) から購入した。

ゼラチンは Difco 社 (米国) から購入した。ヌクレアゼ・フリーの BS A (ウシ血清アルブミン) は BRL 社 (米国) から購入した。アガロース (タイプ II) は Sigma 社 (米国) から、アクリルアミド および メチレンビスアクリルアミドは 和光純薬 (日本) から各々購入した。X線フィルムは フジ

フィルム社(日本)のタイフ^oRxを用いた。

第2節 プラスミド DNA

プロモーターを含む DNA 断片 (truncated templates) を調製するため、下記のプラスミドを用いた。

pKB252⁽⁷⁷⁾ : 糖代謝系 ラクトース・オペロンのプロモーター (lacP) を持つ。 Dr. H. Ohmori (京都大学) から分与していただいた。UV5変異株である。

pAS621⁽⁷⁸⁾ : アミノ酸合成系 トリプトファンオペロンのプロモーター (trpP) を持つ。 Dr. T. A+lung (Univ. of Copenhagen) から分与していただいた。

pWT101⁽⁷⁹⁾ : trpP を持つ。 Dr. W. Tacon (Searle Research and Development 社, 英国) から分与していただいた。

pJL0-2⁽⁸⁰⁾ : リボソーム蛋白質 L10 オペロンのプロモーター (rplTp) を持つ。 このオペロンには、RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ サブユニット遺伝子 (rpoBC) も含まれている。 Dr. R. Fukuda から分与していただいた。

pSP261⁽⁸¹⁾ : リボソーム蛋白質 S1 オペロンのプロモーター (rpsAp) を持つ。 Dr. S. Pedersen (Univ. Institute of Microbiology, Copenhagen) から分与していただいた。

pRP-1⁽⁸²⁾ : リボソーム RNA E オペロンのプロモーター (rrnEp) を

持つ。 Dr. A. Muto (広島大学) から 分与していただいた。

pTM-2⁽⁸³⁾: DNA組換え・修復系 *recA* 蛋白質オペロンのプロモーター (

recAp) を持つ。 Dr. H. Ogawa (大阪大学) から 分与していただいた。

プラスミド DNA の抽出・精製は以下の方法に拠った。 プラスミド

保持菌を レーブロス 中で増殖させ、対数増殖期後期に $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のクロ

ラムフェニコールを添加して プラスミド数増幅をかけた。 約15時間後に

菌体を集め、Boliver & Beckman の方法に準拠してプラスミド DNA

の抽出を行った。⁽⁸⁴⁾ すなわち、リゾチーム・EDTA 処理した菌体を Triton X-

100 で溶菌させ、溶菌液を高速遠心して グリアード・ライセートを得た。

そしてフェノール処理で除蛋白質をした後、エチジウムブロミド (EtBr)-塩

化セシウム (CsCl) 平衡密度勾配超遠心で プラスミド DNA を精製した。

DNA は TSE buffer (10mM Tris-HCl, $\text{pH} 7.4$, 50mM NaCl および

0.1mM EDTA) 中に保存した。

第3節 truncated templates の調製

すでに発表されている (一部は発表に先立つ私信) プラスミドの構造

および各オペロンのプロモーター付近の塩基配列を基に、truncated tem-

plates 調製の目標として 各プロモーターごとに 約 $200 \sim 300 \text{ bp}$ の DNA

断片で、約 60~100^b のプロモーター由来の転写産物が生じてくるよう設計した。プラスミドの構造は前節に示した文献を参考にし、また、DNA塩基配列は以下の文献を参考にした: *lacP* は Dickson et al.⁽⁸⁵⁾, *trpP* は Yanofsky et al.⁽⁸⁶⁾, *rplJp* は Post et al.⁽¹⁵⁾, *rpsAp* は Pedersen et al.⁽⁸⁷⁾, *rrnEp* は de Boer et al.⁽⁸⁸⁾, および *recAp* は Horii et al.⁽⁸³⁾。

各 truncated templates の調製法は後述するが、その前に、共通する方法を述べておく。制限酵素の反応条件は、Cold Spring Harbor Laboratory の手法にほぼ準拠した。変遷点として、長時間反応させるため、安定剤として 100 µg/ml のゼラチンを添加したことがあげられる。DNA濃度および DNA制限酵素地図から使用する制限酵素で認識される座位の全数を算出し、制限酵素の活性から指定された温度で 1 時間で完全切断をおこなす酵素必要量が求められる。その必要量の 1/5 を反応系に添加して反応を開始し、適宜切断状況をミニゲル電気泳動でモニターしながら長時間反応を行った。場合によっては、途中から制限酵素を適当量追加し、完全切断を行った。

調製の各段階で目的とする DNA 断片は、制限酵素で切断した DNA 断片混合液を preparative なゲル電気泳動で分離し、抽出・精製した。その際、ゲル上での分離度およびゲルからの抽出効率を考慮し、次の3

め。

種の方法を使い分けた。すなわち、(1) 約900bpより大きい DNA 断片：1.2% アガロース・ゲルで分離し、目的する DNA 断片を含むゲル断片から電気泳動法で抽出した、(2) 約400 ~ 900bp の DNA断片：3% ないし5% のポリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離し、ゲル断片から電気泳動法で抽出した、および (3) 約400bpより小さい DNA 断片：4% ないし6% のポリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離し、ゲル断片をすりつぶし溶出させた (soaking 法)。電気泳動の泳動緩衝液は $\frac{1}{2}$ TBE buffer (50mM Tris-Borate, pH 8.3 および 1mM EDTA) を用いた。

DNA 断片溶液の濃度は 精製度を見るため ゲル電気泳動にかけ、Et Br 染色後、その発色度を Joyce-Loebl 社の マイクロデンシトメーターで定量して算出した。

以下に各プロモーターごとに その truncated templates の調製法を述べる。各 truncated templates の構造は 図4 および 5 に示した。

lac (UV5) プロモーター： pKB252 を EcoRI で切断後、lac P を含む 205bp の DNA 断片を 残りの ベクター部分から ゲル電気泳動で分離し、精製した。

trp プロモーター： pWT101 を HindIII で切断し、アテニュエーターを含む 512bp の DNA 断片、trp P(L) を ベクター部分から分離した。この DNA

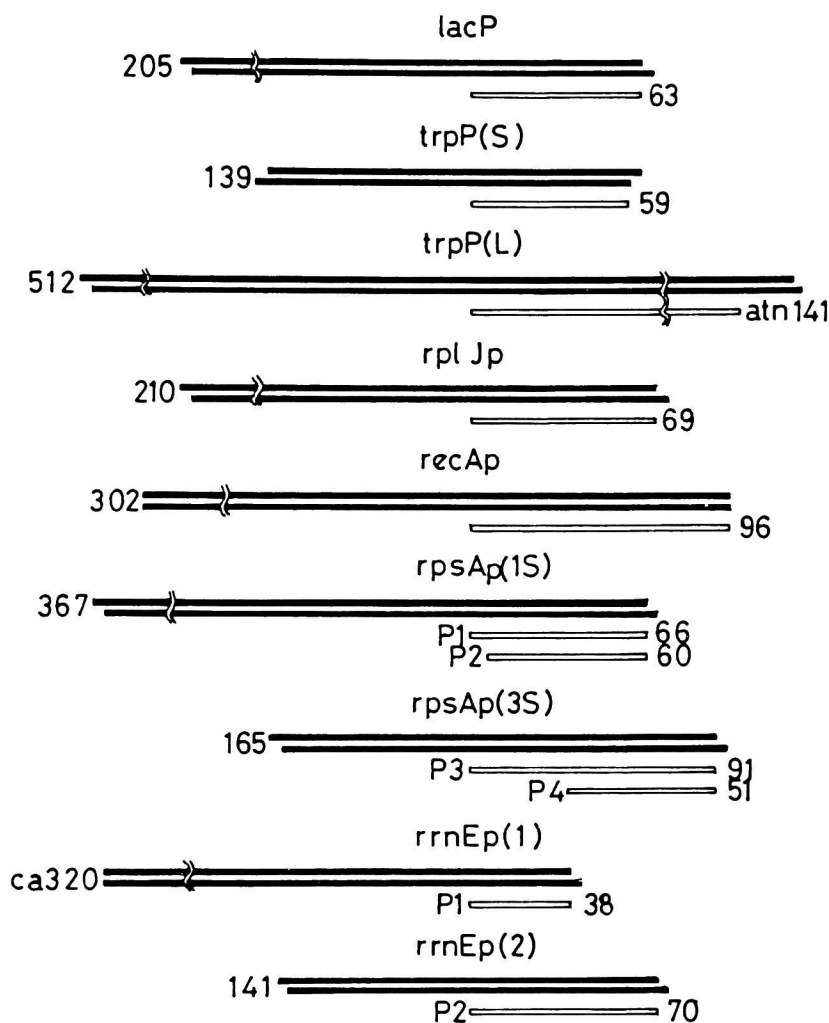


図4 truncated templatesの構造と転写産物(その1)

各種プロモーターを含む組換え体プラスミドを制限酵素で切断し、生じたDNA断片をゲル電気泳動で分離後精製した。詳細は本文参照。黒、2本線がDNA断片、白線がプロモーターから転写されるRNAを表わす。DNA断片末端の1本鎖部分の構造の相違をばりせりさせるために強調して描いてある。左側にDNA断片の長さ(単位 bp = base pairs), 右側にRNAの長さ(単位 b = bases)を各々示した。

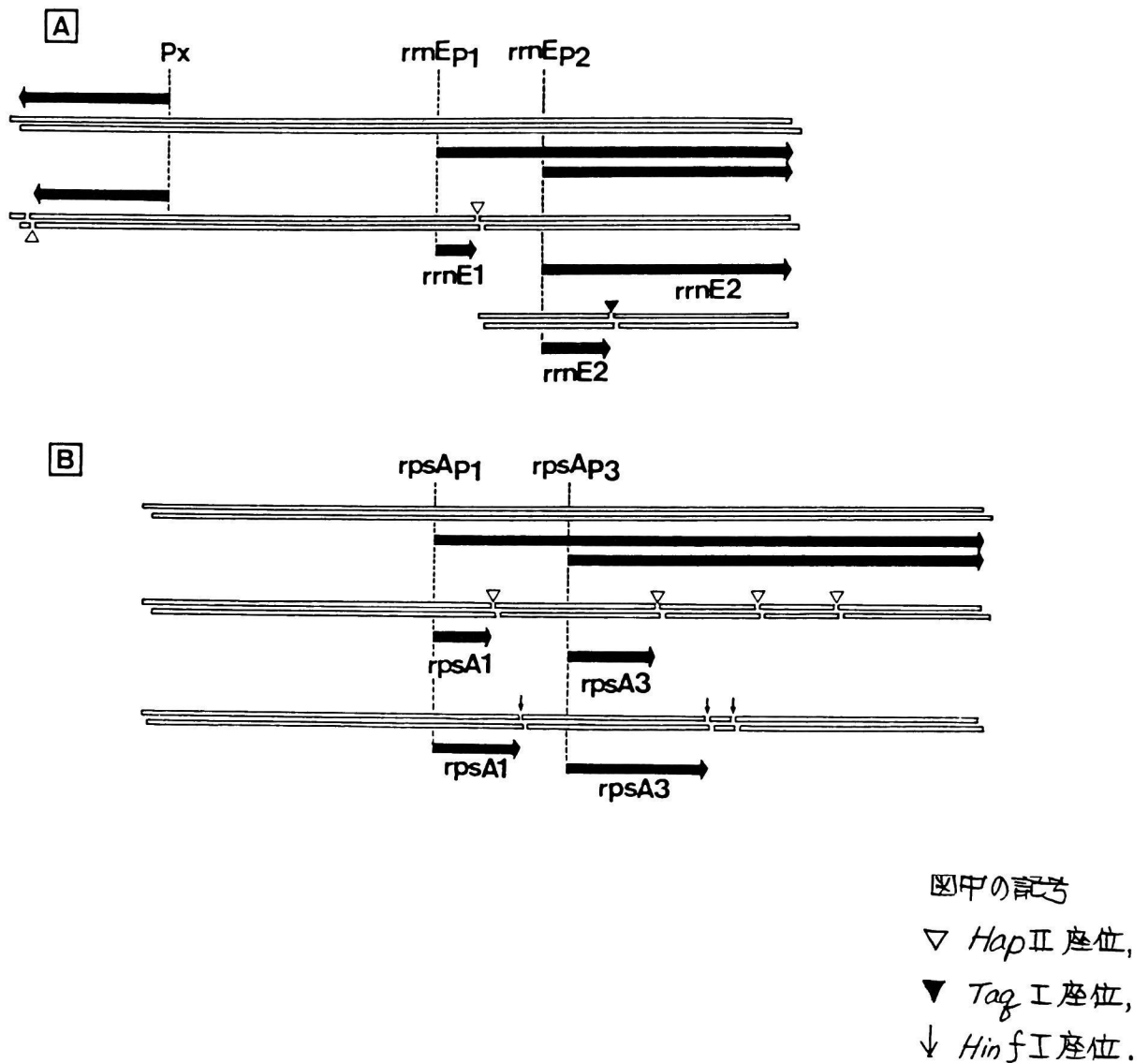


図5 truncated templates の構造と転写産物 (その2)

rrnE オペロンと *rpsA* オペロンのプロモーターを含む DNA 断片群を示した。白2本線が DNA 断片。黒線がプロモーターから転写される RNA である。

[A] *rrnE* DNA 断片群： 上段が *rrnEp1*, *rrnEp2* 2つのプロモーターをもつ約800bpの *EcoRI* ~ *HindIII* 切断 *rrnEp* (L) DNA 断片。中段に *rrnEp1* をもつ約470bpの HapII ~ HapII 切断 *rrnEp1* DNA 断片と、*rrnEp2* をもつ325bpの HapII ~ *HindIII* 切断 *rrnEp2* DNA 断片。下段に *rrnEp2* をもつ141bpの HapII ~ TagI 切断 *rrnEp* (2) DNA 断片を示した。

[B] *rpsA* DNA 断片群： 上段が *rpsA* オペロンのプロモーター群を含む877bpの *SalI* ~ *HindIII* 切断 DNA 断片。中段が HapII 切断で得られる *rpsAp* (1) および *rpsAp* (3) 各 DNA 断片。下段が *HinfI* 切断で得られる *rpsAp* (1L) および *rpsAp* (3L) 各 DNA 断片である。

断片をさらに *Hha*I で切断し、デフェニエーターを含まない 139 bp の DNA 断片, *trpP*(S) を得た。 *trpP*(S) DNA 断片は、もうひとつのプラスミド pAS621 から得た。 pAS621 を *Eco*RI と *Ast*I とで切断して得た 1227 bp の DNA 断片を、さらに *Hha*I で切断することによって得た。しかし、こうして得た pAS621 由来の *trpP*(S) DNA 断片のあるロットでは、139 bp の DNA 断片の他に 1227 bp DNA 断片から由来した約 130 bp と約 170 bp の DNA 断片が混在していた。プラスミドの構造およびトリプトファン・オペロン付近の制限酵素地図から推測して、前者は 139 bp DNA 断片に隣接するトリプトファン・オペロンより上流域から由来し、後者はバクテリアのアンピシリン耐性遺伝子 (*bla*) のプロモーターを含む領域から由来したものと考えられる。

rplJ プロモーター： pJL0-2 を *Hind*III で切断し、得られた 1603 bp の DNA 断片をさらに *Hinf*I で切断し、*rplJp* を含む 210 bp の DNA 断片を得た。

rpsA プロモーター： pSP261 を *Sal*I と *Hind*III とで切断し、877 bp の DNA 断片を得た。当初、Dr. K. Isono (Max Planck Institut) からの私信 (後に論文として公表⁽⁹⁰⁾) に基づき、この DNA 断片上には *rpsA* のプロモーターが1つだけ存在していると予想されたが、この DNA 断片を *in vitro* 転写系で用いると、複数種の RNA 産物が検出された。この DNA 断片上のプロモ-

ターを詳細に検索した結果、4つの *rpsA* プロモーター (P1~P4) があり、さらに解析が不充分であるが同一の転写方向をもつ未知のプロモーターが P1の上流にあることがわかった (P0と仮に呼んでいる) (詳細は省略する)。(91) これらのプロモーターを分離するために、877bpの DNA断片を *Hap II* で切断し、上流の P1, P2 (および P0) を含む 367bp の *rpsAp* (1S) DNA断片と、下流の P3, P4を含む *rpsAp* (3S) DNA断片を得た。また、別に、877bpの DNA断片を *Hinf I* で切断し、P1, P2を含む 391bp の *rpsAp* (1L) DNA断片と P3, P4を含む 194bp の *rpsAp* (3L) DNA断片を得た。

rrnE プロモーター : pRP-1 を *EcoRI* と *HindIII* とで切断し、約800bpの *rrnEp* (L) DNA断片を得た。この DNA断片上には *rrnE* の2つのプロモーター P1 と P2 が含まれている。さらに解析の結果、*rrnE* とは逆方向に未知遺伝子のプロモーター (仮に P_x と呼んでいる) が存在していることがわかった。これらのプロモーターを分離するために *rrnEp* (L) DNA断片を *Hap II* で切断した。この結果、上流の P1 と P_x とを含む 約470bp の DNA断片と下流の P2 を含む 約320bp の DNA断片を得た。約470bp DNA断片上のプロモーター P_x は *A_{lu}I* 切断で不活性とされることがわかったので、*A_{lu}I* 切断 DNA断片混合液を *rrnEp* (1) DNA断片として用いた。このとき P1 は 約320bp の DNA断片上に存在している。他方、P2 を含む 約320bp の DNA断片から転

得られる P2 由来の RNA を短くするため、*TagI* で切断し、その DNA 断片混合液を *mmp* (2) DNA 断片として用いた。このとき P2 は 141bp の DNA 断片上に存在している。

recA プロモーター : pTM-2 を *EcoRI* と *BamHI* とで切断し、得られた約 1.7 kbp の DNA 断片をさらに *HaeIII* で切断し、302bp の *recAp* を含む DNA 断片を得た。

第4節 *in vitro* 転写系

標準的な反応条件は以下のとおりである：反応総容量は 50 μ l, 反応液組成は 50mM Tris-HCl (pH 7.8 at 37°C), 3mM Mg-acetate, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 25 μ g/ml ヌクレオ-ゼ-フリー-BSA, 50mM (または指定した濃度のない 200mM) NaCl, 各 0.16mM ATP, CTP および GTP, 0.05mM [α - 32 P]UTP (sp. act. $1 \sim 2 \times 10^6$ cpm/nmol), 0.3 pmol ずつの truncated templates, および プロモーター総量の 10 倍量の RNA ポリメラーゼ ホロ酵素 である。反応によっては、0.2mM ないし 1.0mM ppGpp を添加した。

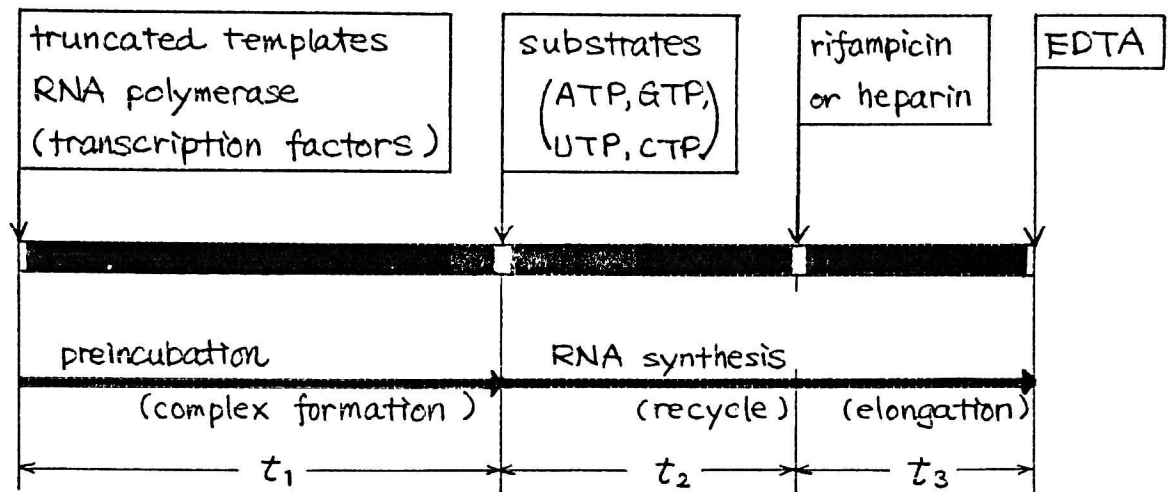
RNA 合成反応は以下の手順に従って行った。基質を含まず、DNA と RNA ポリメラーゼを含む 35 μ l の反応液を 37°C (または指定した温度、27°C ないし 47°C)

で時間 t_1 だけ事前加温 (preincubate) した (図6)。そこにむけて、基質を含み同じ温度で保温しておいた $15\mu\text{l}$ の基質溶液を加えて RNA合成を開始させた。時間 t_2 後、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のリファンピリン (または、一部の実験において $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のハロリン) を加えて、新たな転写開始を抑制し、時間 t_3 だけ RNA鎖伸長反応を充分行わせた。反応停止は、キャリアーとして $300\mu\text{g}/\text{ml}$ の大腸菌 tRNA または rRNA を含む 40mM EDTA 溶液 $50\mu\text{l}$ を加えることにより、時間 t_2 を 0 として 基質と RNA合成開始阻害剤とを同時に添加することにより、一回きり (single round) の転写反応を測定することができる。また、時間 t_2 を長くすれば"するほど"転写反応の繰返し (recycle) が起き、複数回 (multiple round) の転写反応となる。

なお、標準的な反応条件と言った場合は、 50mM NaCl で 37°C 、DNA と RNAポリメラーゼ"混合液の事前加温は $t_1 = 60\text{min}$ 、基質とリファンピリンは同時添加 (すなわち $t_2 = 0$)、そして RNA鎖伸長反応は $t_3 = 5\text{min}$ という条件を定めている。細部を改変した場合には、そのつど改変箇所を明示するようにした。

第5節 転写産物の分離・同定と定量

in vitro 転写系の反応停止後のサンプル $100\mu\text{l}$ のうち、 $10\mu\text{l}$ は総 RNA

1. *in vitro* transcription

2. polyacrylamide-urea gel electrophoresis

3. autoradiography

4. densitometry

5. calculation

図 6. *in vitro* 混合転写系の概要

新たに開発した *in vitro* 混合転写系 (*in vitro* mixed transcription system) の概要を示した。詳細は本文 (材料と方法) を参照のこと。

合成量を定量するため TCA 不溶性カウント測定に使い、残り $90\mu\text{l}$ を個々の RNA 産物と分離・定量するためにゲル電気泳動にかけた。

電気泳動にかけるサンプルは、 0.3M NaOAc (酢酸ナトリウム) 含有に調整した後、エタノール沈殿し、沈殿物を $100\mu\text{l}$ の 0.3M NaOAc 含有 TES buffer (30mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.4$, 50mM NaCl , および 5mM EDTA) に再溶解させ、再びエタノール沈殿、そしてエタノール・リンスを行った。沈殿物は、減圧乾燥させた後、 $18\mu\text{l}$ のサンプル溶液 (80% 脱イオン・ホルムアミド, 0.1% SDS, 8% グリセロール, 8mM EDTA , 0.1% BPB および 0.1% XC) に溶解し、 65°C 5分間の加熱後氷上で急冷させた。このうち $2\mu\text{l}$ は、以上の操作での RNA 産物回収率を計算するため TCA 不溶性カウントを測定し、残り $16\mu\text{l}$ を電気泳動で分析した。

電気泳動には、 8M 尿素を含む 5% ないし 10% のポリアクリルアミド (1mm 厚) を用いた。ゲルの重合・固化を充分行わせるため、使用に先立ち室温で1晩静置した。また、泳動パターンを良くするため、実際の電気泳動に先立ち、定電圧約 200V で $1\sim 2$ 時間の通電を実施した。泳動後溶液は $1/2$ TBE buffer である。本泳動はサンプルをゲルに乗せた後、まず定電圧 400V または 500V で5分間泳動を行い、サンプルをゲル中に移動させ、その後定電圧 200V または 250V で色素 BPB がゲル最下部に

達するまで（泳動距離 約 13 cm）泳動を続けた。室温で、通例 4 ないし 5 時間を使った。

泳動後のゲルは乾燥せず、^(サランラップ)ポリ塩化ビニリデン製ラップフィルムを間に
はさんで X 線フィルムと密着させ、 -20°C で適当な時間感光させた後 現像した。

オートラジオグラムは、薄いバンドから濃いバンドまでより正確に相互比較
定量するため、1 枚のゲルあたり 3 ないし 4 枚とった。

オートラジオグラムは、Joyce-Loebel 社のマイクロデンシトメーターで
定量した。この際、 ^{32}P の放射活性と ピーク領域面積とが比例する範
囲内にあるよう留意した。デンシトメーターで得られた各 RNA バンドの量
は、さらに サンプル回収量と各 RNA 種ごとの U 残基数で補正し、各
RNA 種の数量値とした後、相互比較を行った。各 truncated templates
から得られる プロモーター由来の RNA 種の塩基数と U 残基数は、以下のとおり
である（図 4 および 5 参照）。

lacP DNA 断片： 63^b の lacP RNA ($15^{\text{(85)}}$ U 残基)。

trpP(S) DNA 断片： 59^b の trpP RNA ($15^{\text{(86)}}$ U 残基)。

trpP(L) DNA 断片： 141^b の trpP RNA (転写減衰産物) ($36^{\text{(86)}}$ U 残基)。

rplJp DNA 断片： 69^b の rplJp RNA ($17^{\text{(15)}}$ U 残基)。

rpsAp (IS) DNA 断片: 66^b の *rpsAp*₁ RNA (11 U 残基)⁽⁸⁷⁾。

rpsAp (IL) DNA 断片: 90^b の *rpsAp*₁ RNA (18 U 残基)⁽⁸⁷⁾。

rpsAp (3S) DNA 断片: 91^b の *rpsAp*₃ RNA (17 U 残基)⁽⁸⁷⁾。

rpsAp (3L) DNA 断片: 144^b の *rpsAp*₃ RNA (28 U 残基)⁽⁸⁷⁾。

rrnEp (1) DNA 断片: 38^b の *rrnEp*₁ RNA (6 U 残基)⁽⁸⁴⁾。

rrnEp (2) DNA 断片: 70^b の *rrnEp*₂ RNA (18 U 残基)⁽⁸⁴⁾。

recAp DNA 断片: 96^b の *recAp* RNA (16 U 残基)⁽⁸³⁾。

これらの RNA 種に加え, *rpsAp* (IS) DNA 断片からは 60^b の *rpsAp*₂ RNA, *rpsAp* (IL) DNA 断片からは 84^b の *rpsAp*₂ RNA, *rpsAp* (3S) DNA 断片からは 55^b の *rpsAp*₄ RNA, *rpsAp* (3L) DNA 断片からは 108^b の *rpsAp*₄ RNA, *rrnEp* (L) DNA 断片からは 363^b の *rrnEp*₁ RNA, 254^b の *rrnEp*₂ RNA, 約 160^b の *Px* (前述) 由来の RNA (RNA-X または *rrnPx* RNA) が得られる。これらの数値は発表されている DNA 塩基配列から求めたものである。

第3章 結果と考察 1 …… 転写産物の分離と同定

第1節 truncated templates の構造

本論文で解析に用いたプロモーターを選んだ基準は、すでにプロモーター付近の構造解析が行われ塩基配列が既知であること および そのオペロンの遺伝子産物の生理機能が異なる種類に属しない範囲におよんでいること の2点である。 その結果、以下の6つのオペロンのプロモーターを選定した。

糖代謝系 ラクトース オペロン (*lac*)

アミノ酸合成系 トリプトファン オペロン (*trp*)

リボソーム蛋白質 L10 オペロン (*rplJ*)

リボソーム蛋白質 S1 オペロン (*rpsA*)

リボソームRNA E オペロン (*rrnE*)

DNA 組換え・修復系 *recA* オペロン (*recA*)

以上のオペロンから得た truncated templates と予想されるプロモーター由来の RNA を図4 および5 に示した。 プロモーターからの転写は、既報の転写開始点から始まり DNA 2本鎖部分の末端で終わるとした。

この結果、各々の truncated templates は いわゆる run-off product RNA を与える : 205 bp の *lacP* DNA 断片から 63^b の RNA , 139 bp の *trpP(S)* DNA 断片から 59^b の RNA , 210 bp の *rplJp* DNA 断片から

69^bのRNA, 302^{bp}の *recAp* DNA断片から 96^bのRNA。

また、複数のプロモーターが存在していることが判明した リボリーム蛋白質S1 オペロン (詳細は省略) からは 以下のRNAが得られる: *HapII* 切断に由来する 302^{bp}の *rpsAp* (1S) DNA断片からは 66^bのP1-RNA および 60^bのP2-RNA, 165^{bp}の *rpsAp* (3S) DNA断片からは 91^bのP3-RNA および 51^bのP4-RNA, また *HinfI* 切断に由来する 367^{bp}の *rpsAp* (1L) DNA断片からは 90^bのP1-RNA および 84^bのP2-RNA, 194^{bp}の *rpsAp* (3L) DNA断片からは 144^bのP3-RNA および 108^bのP4-RNA。

同様に 2つのプロモーターをもつ *rrnE* オペロンからは 以下のRNAが得られる: 約 0.8 kbpの *rrnEp* (L) DNA断片からは 363^bのP1-RNA および 254^bのP2-RNA, 約 320^{bp}の *rrnEp* (1) DNA断片からは 38^bのP1-RNA, 141^{bp}の *rrnEp* (2) DNA断片からは 70^bのP2-RNA。

512^{bp}の *trpP* (L) DNA断片は 上記の前提に基づくと 186^bのRNAを与えるが、このDNA断片上には *trp* オペロンの 転写減衰域 (atn.) があるため、プロモーター由来のRNAのほとんどは 141^bのRNAを与えると考えられた。

第2節 転写産物の同定

前節で述べた予想を確かめるために 各々の truncated templates を一
種類ずつ *in vitro* 転写系 で 転写させ. その RNA 産物を分離した結果を
図7 に示す. 各 template とともに最低 2本の 主要転写産物が みられた。
移動度から判断して. 上側の バンド を与える 転写産物は template サイズの
いわゆる end-to-end product RNA であり. このことは プロモーターから
の転写能を欠く コア酵素を用いた *in vitro* 転写系 においても 検出されるこ
と (データ省略) から も 示された. 下側の バンド は. その移動度と.
コア酵素を用いた系では 検出されなかったことから判断して. 各々のプロ
モーターから 転写された 正確な 転写産物 であると判定した. 図7には示さ
なかった 残りの truncated templates を用いた場合も. 同様の結果を得
た。

図7には示さなかったが. *trpP* (L) DNA 断片を用いた場合には ほとん
どの プロモーター由来の RNA が 転写減衰域で 減衰し 141^b の RNA を与え
た. run-off product RNA (186^b) は バンドが薄く 検出しにくい
上. 後述する *in vitro* 混合転写系 において用いた場合 他の DNA 断片に
由来する end-to-end product RNA と バンドが重なり 定量ができないた
め 定量の対象からはずした。

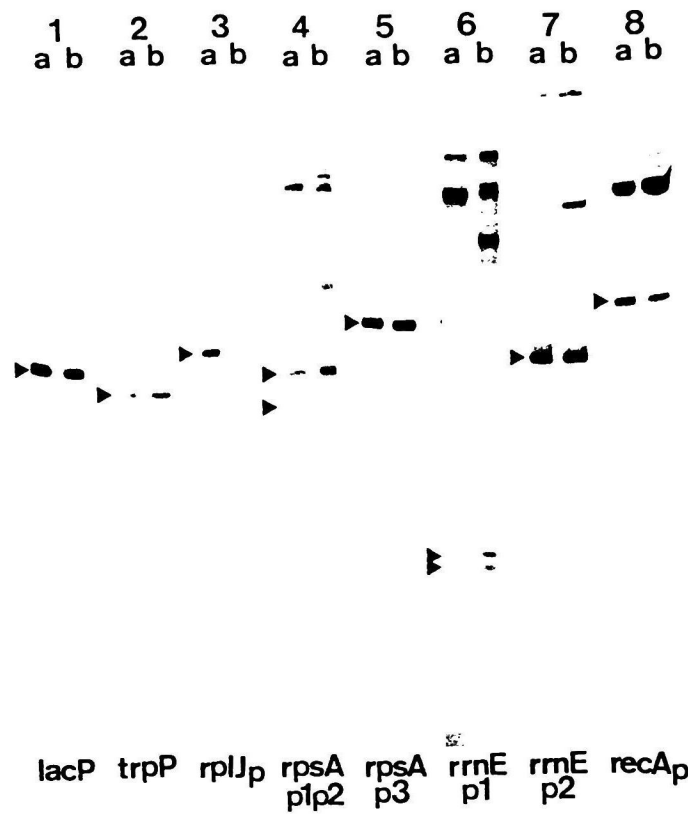


図7 truncated templates由来の転写産物の同定

truncated templates を 1 種類ずつ含む *in vitro* 転写系は、NaCl 不在 (a) または 50mM NaCl 存在 (b) の条件下で実施した。RNA は 8% ポリアクリルアミド凝胶泳動で分離後、オートラジオグラフィーで解析した。レーン 1 は、*lacP* DNA 断片；2. *trpP* (S) DNA 断片；3. *rplJp* DNA 断片；4. *rpsAp* (1S) DNA 断片；5. *rpsAp* (3S) DNA 断片；6. *rrnEp* (1) DNA 断片；7. *rrnEp* (2) DNA 断片；8. *recAp* DNA 断片を用いた産物を泳動した。各レーン左側にある黒三角印が示すバンドが各 DNA 断片上のプロモーターから転写された RNA である。無印の他のバンドは DNA 断片長の end-to-end 産物または未同定の RNA 種である。

rpsA オペロンの P2 および P4 プロモーター由来の RNA は予想される位置にバンドが検出できたものの P1 および P3 プロモーターと比較して薄く、プロモーターとしての活性が弱い、いわゆるマイナー (minor) なプロモーターと推定され、これらの RNA も定量対象外とした。*rpsAp*(IS) および *rpsAp*(IL) DNA 断片を用いた時、約 200^b と推定される薄いバンドが検出された。2つの DNA 断片は *rpsA* 遺伝子側の末端が Hap II 切断および Hinf I 切断に由来しており、24bp 長さが異なっている。先の RNA は用いた DNA 断片に依存してゲル上の移動がわずかに違うことから判断して、その転写方向は P1 から P4 までの *rpsA* プロモーター群と同方向であると判定し、PO と仮称することにした (データ省略)。この RNA を産生するプロモーターは未解析である。P1 から P4 まで4つの *rpsA* プロモーターを持つ Sal I - Hinf I の 877 bp DNA 断片を用いると、プロモーター由来と推定されるディスクリート (discrete) なバンドが P1 ~ P4-RNAs 以外に、さらに大きなサイズ"の位置に複数検出 (データ省略) されたが、PO との関係等詳細は未解析である。

rrnE プロモーターの場合にも予想された RNA バンドに加えて、予想していなかったバンドが検出された。*rrnEp*(1) DNA 断片を用いると 38^b の P1-RNA が転写されるが、この RNA は二重になって出現してき

た。この現象の原因は未解析であるが、定量は両者の合計値をとって行った。
rrnEp (L) DNA 断片を用いた場合、約 150 ~ 160^{bp} と推定される RNA が検出された (後述する 図 23 参照)。このバンドは *rrnE* 遺伝子とは反対側にあたる *EcoRI* 末端部分を *Hap II* 切断で約 10^{bp} 短くすると、出現する RNA も短くなることから判断して *rrnE* プロモーターの転写とは逆方向であると結論した (データ省略)。*rrnE* 遺伝子の上流に位置する遺伝子が何であるか未知であるので、この RNA を与えるプロモーターは *Px* と仮称することにした。*rrnEp* (L) DNA 断片の *EcoRI* 末端側をさらに *A₁₄I* で切断すると、*Px* 由来の RNA バンドが消失する (データ省略) ことから判断して、プロモーター *Px* 領域には *A₁₄I* 座位があると推定される。

当初用いていた *pAS621* 由来の 139^{bp} *trpP* (S) DNA 断片の標品中には、*trp* オペロン上流に隣接する約 130^{bp} の DNA 断片と、ベクターの *bla* オペロンのプロモーターを含む約 170^{bp} の DNA 断片の 2 つの混在が認められた。この標品を用いた場合、混在している DNA 断片に対応する end-to-end product RNA が検出され、また 低塩濃度 または 高塩濃度でのみ機能する masked promoter が存在するのでないかと推測させるバンドも検出された (後述の 図 15 参照)。

第3節 *in vitro* 混合転写系 への展開

各プロモーターからの正確な転写産物は、各々ほぼ予想されたとおりに検出できた。これらの結果を基に、*in vitro* 混合転写系 (mixed transcription system) へと展開させていった。

この系の基本的な考え方は以下のとおりである。一連の実験で解析する DNA 断片上のプロモーター由来転写産物は、プロモーターごとに各々 RNA 鎖長が、異なり、そのためゲル上の移動度が異なる。したがって、各種の DNA 断片を混合して同じ反応液中で一斉に RNA 合成をさせる、すなわち全く同一の反応条件下で転写させても、^{RNA産物は}ゲル上で分離され、個別に定量できる。個々別々に反応させた場合、反応条件の微妙な差や収率の違い等々で *in vitro* 転写系は影響を受けやすいが、混合転写系を用いた場合はそのような不確実性を排除できより信頼度の高い正確な判断が下せる。

この考え方に基づいて実際に *in vitro* 混合転写系を実行してみると、

ゲル長 約 13 cm のシステムでは、RNA 鎖長が異なるにもかかわらず一部
の RNA 種が 近接 または 重なり合^{今回解析に用いた}い。RNA 種全てを一つのレーン内で

比較定量することは不可能であることがわかった (データ省略)。そこ

で、相互比較をするための共通する基準 RNA を設定した上で、trun

cated templates を 2つのグループに分けて 別々 *in vitro* 混合転写系で分離定量を行うことにした。

次章以下で、*in vitro* 混合転写系を用いた解析の結果と考察を述べる。

第4章 結果と考察 2 …… プロモーター強度の比較

第1節 複合体形成

転写開始の初期反応は一般に次に述べる4つの相に分類されている。

第1段階 …… プロモーター領域の認識

DNA上のプロモーター領域の信号をRNAポリメラーゼが認識する段階。

第2段階 …… closed complex の形成

プロモーターとRNAポリメラーゼとの間に特異的結合が生じる段階。

第3段階 …… open complex への遷移

closed complex の状態が変化し、プロモーター領域のDNA2本鎖の部分的開裂をつくり出し、基質添加と同時に転写を開始する状態の open complex へ異性化する段階。

第4段階 …… 転写開始

特定部位からDNAのセンス鎖(sense strand)に相補的なRNAを合成し始める段階。

このように4つの相があることは多くの研究者が認めている概念であるが、

細部の酵素反応機構については統一見解がまとまるまでには至っていない部分もある。第1段階の認識の機構には2つのモデルが提出されている。

そのひとつは von Hippel らのモデルである。⁽⁹²⁾ 彼らは、DNA上の任意の場所に結合した RNA ポリメラーゼが、DNA上をスライドしてゆきプロモーター位置のあるところで停止して特異的複合体を形成すると考えている。もうひとつは chamberlin らのモデルである。⁽⁹³⁾ 彼らは、DNA と RNA ポリメラーゼとは常に非特異的な会合と離散を繰り返しており、偶然にプロモーター領域と RNA ポリメラーゼとが会合した時に特異的複合体形成へと遷移すると考えている。また、RNA 鎖の伸長反応に先立ち、abortive initiation と呼ばれている、ライディング状態があることも知られている。⁽⁹⁴⁾ この時 RNA ポリメラーゼはプロモーター領域に結合したまま移動せずにセンス鎖に相補的な2ないし数ヌクレオチドの短い RNA を産生し脱け、ある確率で本当の RNA 鎖を合成する伸長反応へ遷移する。^(94a, 94b) 核酸合成関係の他の反応、すなわち、DNA複製時にはプライマー RNA が必要であり、また、逆転写反応でも tRNA や相補的オリゴマーなどのプライマー RNA が必要である。これに対し、RNA 合成ではプライマーが必要でないとされていたが、見方を変えれば、abortive initiation をプライマー合成と其の利用を兼ねた反応とみることができる。

このように転写に先立つ反応機構は複雑である。さらにプロモーターはオペロンごとに異なる塩基配列をもち、その相違が転写開始の各段階の素反応においてその反応速度や反応の平衡時のレベル等の反応特性の差

をもたらしと考えられる。また、転写因子が作用した RNA ポリメラーゼでは、酵素自身の認識能や反応活性度が変化し、転写全体の反応特性に変化が生じると考えられる。これらの相違が転写反応における律速段階である複合体形成の反応特性を規定し、転写開始の頻度の差となって反映されてくる。そして、頻度が高く転写量の多いプロモーターは「強く」、また頻度が低く転写量の少ないプロモーターは「弱い」と言われるプロモーター強度を規定することになる。将来的には転写因子が作用して RNA ポリメラーゼのプロモーター選択性の能力が変化したことを明らかにしようとしているが、まず、転写因子を添加しない、要素の少ない *in vitro* 混合転写系において、転写開始におけるプロモーター種固有の諸特性を解析した。

第 2 節 複合体形成の速度と平衡レベル

複合体形成の特性を解析する手段として、基質添加前の RNA ポリメラーゼとプロモーターとのプレインキュベーション（図 6 中の t_1 ）を変化させる実験系を組んだ。結果を図 8, 9 および 10 に示す。転写反応は、基質添加時に同時にリファンピリンが添加されているので 1 回きり (single round) となっている。したがって転写量が形成されていた複合体の量を表わすことになる。

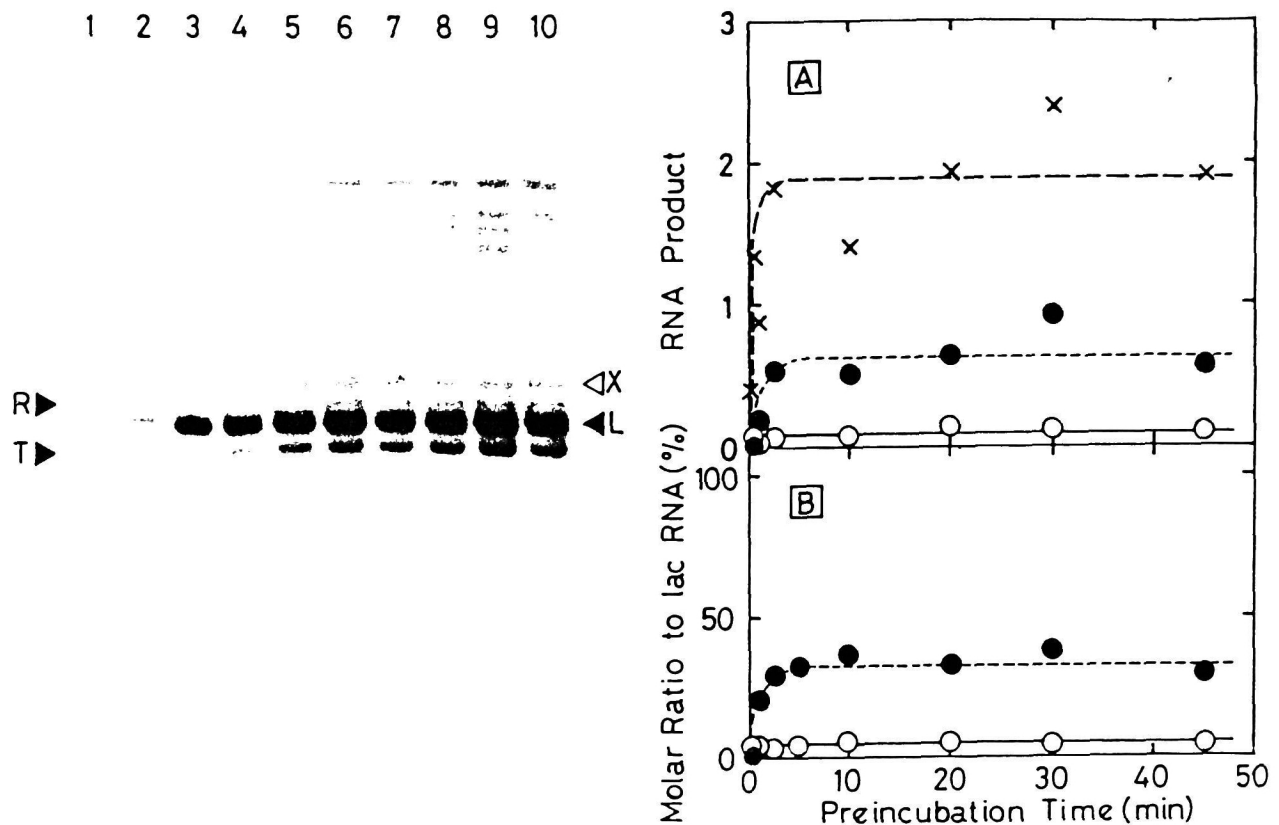


図 8 preincubation time の時間変化による影響 (その1)

〔I〕(左図) *lacP*, *trpP(S)* および *rpLJp* 各 DNA 断片を 0.3 pmol ずつ (total 0.9 pmol) と RNA ポリメラーゼ 9.0 pmol (enzyme/promoter = 10) とを含む 35 μ l の preincubation mixture を 37°C で、後で示す時間 保温した。その後、基質 4 rNTPs と リファンピロシンを含む 15 μ l の substrate mixture を添加して転写を開始させた。5 分後に反応を停止し、RNA 産物は 10% ホリダクリルアミドゲル電気泳動で分離した。各レーンの preincubation time は以下のとおりである：レーン 1、0 秒；2、10 秒；3、30 秒；4、1 分；5、2.5 分；6、5 分；7、10 分；8、20 分；9、30 分；および 10、45 分。図中の記号は R が *rpLJ* RNA，T が *trp* RNA，L が *lac* RNA を表わし、また X は μ p の放射能活性が非特異的に付着したキャリアー用 tRNA である。

〔II〕(右図) I のオートラジオグラムをデンシトメトリーで定量し、U 含量と収率を考慮して数値化したものである (A 図、縦軸は arbitrary unit)。さらに *lac* RNA を基準とする相対値を示した (B 図)。図中の記号は X---X が *lac* RNA を、●---● が *trp* RNA を、そして O---O が *rpLJ* RNA を示す。

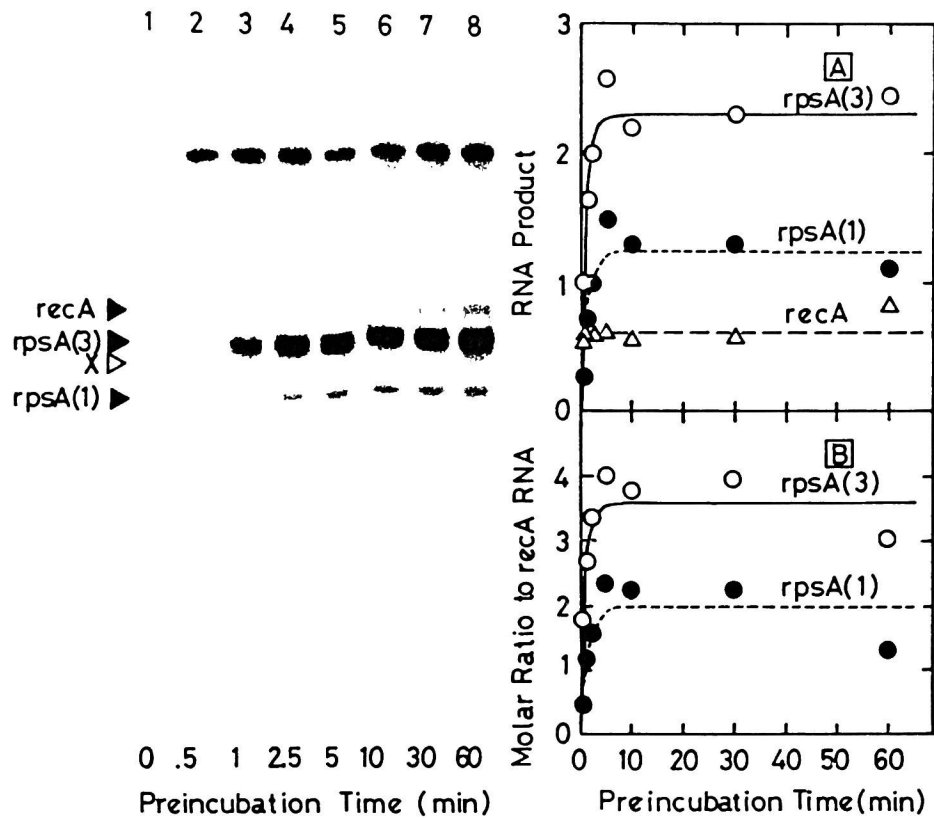


図9 preincubation time の時間変化による影響 (その2)

〔I〕(左図) 鋳型DNAとして *rpsAp* (1S), *rpsAp* (3S) および *recAp* 各DNA断片を 0.3 pmol ずつ用いた。実験の内容は 図7の実験と同様である。

〔II〕(右図) Iのオートラジオグラムを定量・数値化し (A図), さらに *recA* RNAを基準とした相対値で示した (B図)。図中の記号は: Δ --- Δ , *recA* RNA; $\bullet$ --- $\bullet$, *rpsA* (1) RNA; および $\bigcirc$ --- $\bigcirc$, *rpsA* (3) RNA を各々表わす。

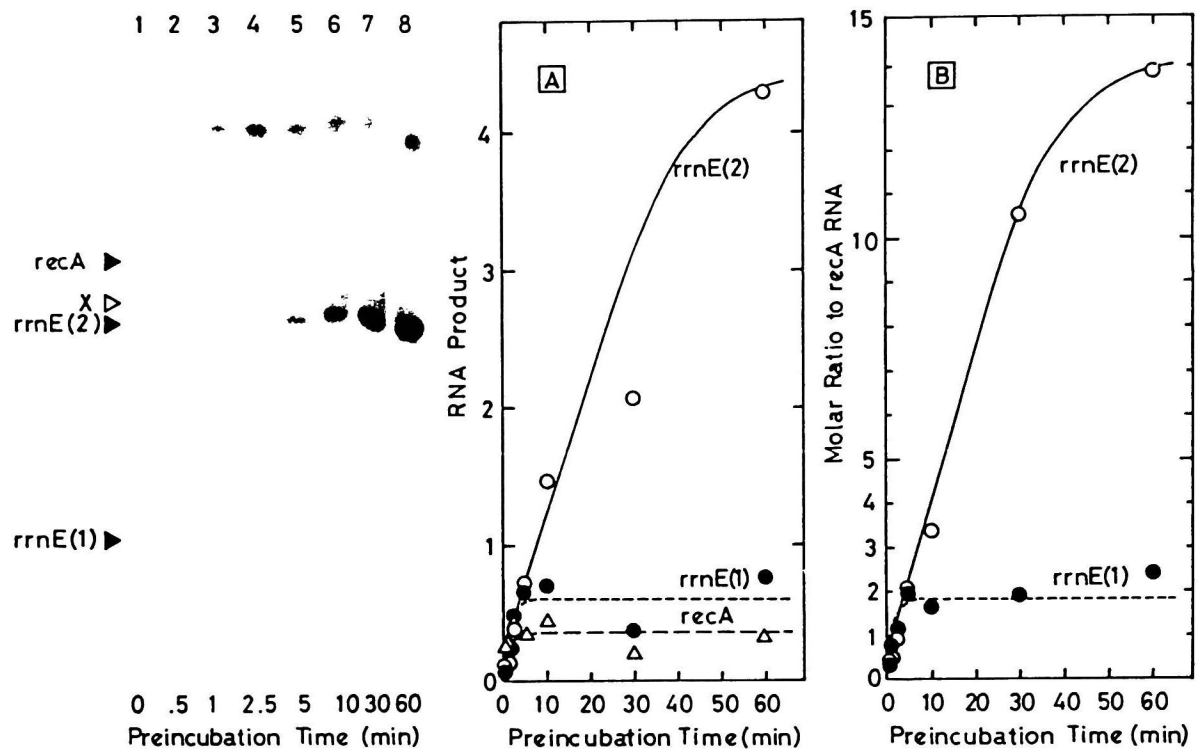


図10 preincubation time の時間変化による影響 (その3)

[I] (左図) 鋳型DNAとして *rrnEp*(1), *rrnEp*(2) および *recAp* 各DNA断片を 0.3pmolずつ用いた。実験の内容は図7の実験と同様である。

[II] (右図) Iのオートラジオグラムを定量・数値化し (A), さらに *recA* RNAを基準とした相対値を示した (B)。図中の記号は: $\Delta---\Delta$, *recA* RNA; $\bullet---\bullet$, *rrnE*(1) RNA; および $\bigcirc---\bigcirc$, *rrnE*(2) RNA を各々表わす。

この実験の結果から読みとれる複合体形成反応の特性。すなわちプロモーター強度に関するパラメーターが2種類ある。その1つは複合体形成の速さであり、もう1つは複合体形成の平衡レベルである。これら2つのパラメーターがプロモーターごとに各々特徴ある値をとっていることが図から明らかである。たとえば *recAp* は 10分早く平衡レベルに達するも、そのレベルは低い。一方、*rrnEpz* は複合体形成反応の速さが遅く、平衡レベルに達するのに60分以上（図に示した実験とは別の実験で60~90分）を要するが、平衡レベルは高い。この速さは、今回調べた範囲内で他のプロモーターのそれと大きく異なっている（図11）。他のプロモーターではほとんど5ないし10分以内に平衡レベルに到達している。以上の経緯があり、この後の実験では標準条件としてプレインキュベーションの時間 t_1 を60分間に設定した。

ところで、従来この種の複合体形成反応解析においては、RNAの5'末端の救塩基に相当する基質のみを用い、特定のNTP種を除いてオリゴヌクレオチドを含む安定複合体を得て解析するという方法がとられていた。^(たとえば95) この方法によらずに *in vitro* 混合転写系においても複合体形成時に、4種のNTPsのうち1種だけを除いて3種類のNTPsを存在させて複合体を形成させ、残った第4番目のNTPとリファンピシンとを同時に添加する系を組

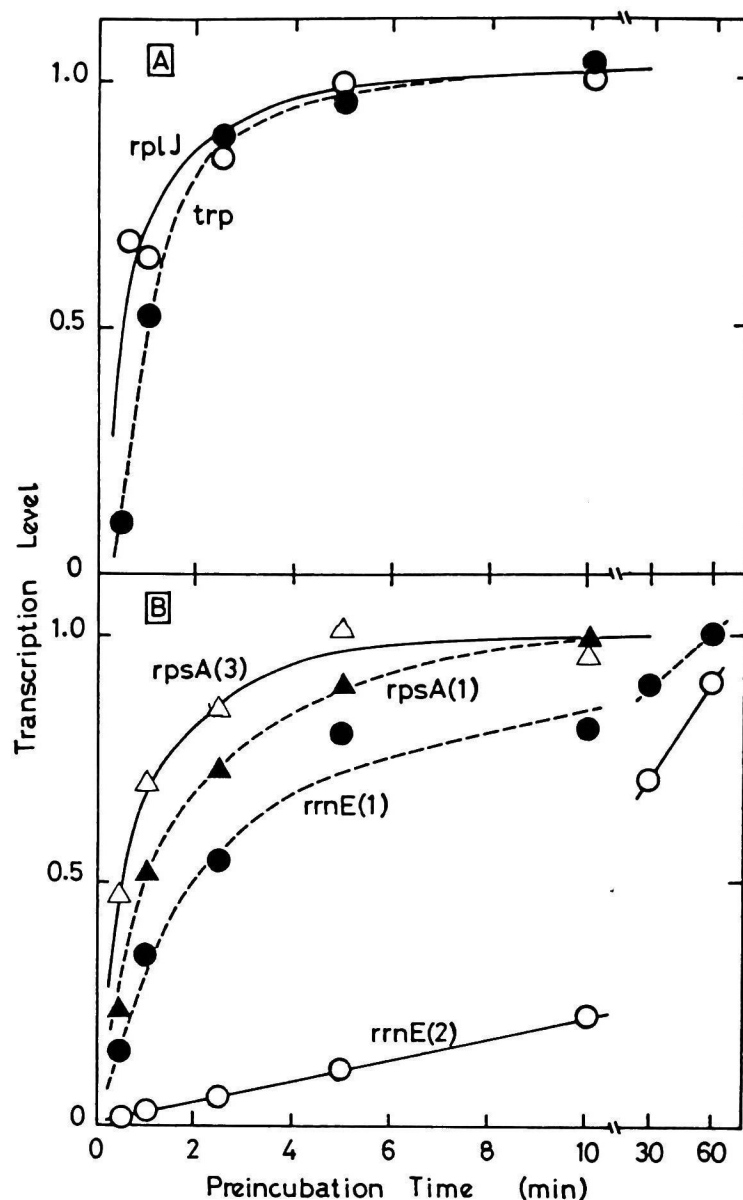


図11 preincubation time と複合体形成の経時変化 (まとめ)

Open Complex の形成量を preincubation time の関数で示した。 *lacP* および *recAp* の複合体形成は 1 分以内に平衡レベルに達しており (図 8 および図 9 参照)。 これら 2 種の RNA に対する相対値を求め、さらに各々の RNA 種ごとに平衡 (最高) レベルに対する割合を求めてその変動を示した。

[A] *lacP* 基準。 ○—○, *rplJ* RNA ; ●---●, *trp* RNA .

[B] *recAp* 基準。 ○—○, *rrnE*(2) RNA ; ●---●, *rrnE*(1) RNA ;

△—△, *rpsA*(3) RNA ; ▲---▲, *rpsA*(1) RNA .

んでみた。そして、その転写レベルを定量し比較したところ、複合体形成時に
 欠除させた NTP 種によってレベルに変動があった (データ省略)。これは、
 RNA の 5' 末端において 4 種類目の NMP が出現するまでの オリゴヌクレオ
 チドの長さがプロモーターごとに異なり、RNA ポリメラーゼ = プロモ
 ーター - オリゴヌクレオチド 三者複合体の安定度が異なるために生じたと考えら
 れる。よって、この方法では特定のプロモーター 1 種類のみで限定した条
 件下で行う解析には有効であらうが、複数種のプロモーターを同時に比
 較検討しようとする当系においては、各プロモーターを同じ条件で解析
 するという趣旨からずれることになり、適した方法ではない。

第 3 節 2 つのパラメーター間の相関関係

今回調べた 6 種のオペロンに由来する 8 種のプロモーターの各パ
 ラメーターを表 5 に一覧表としてまとめ、それらの相関関係を図 12 に
 示した。図からわかるようにプロモーターの強弱を考える時、レベルと
 速さの 2 つのパラメーター間で正の相関関係は認められなかった。
 2 つのパラメーターは独立した特性であり、個々のプロモーターごとに
 特徴づけられる。したがって、2 つのパラメーターを基にプロモーターが
 4 つのクラスに分類できる。

表5. プロモーター強度の比較

プロモーター	プロモーター強度 パラメーターI, パラメーターII	
<i>lacP</i> (UV5)	<u>100</u>	<u>100</u>
<i>trpP</i>	40	35
<i>rpl Jp</i>	70	10
<i>rps Ap1</i>	30	10
<i>rps Ap3</i>	50	20
<i>rrn Ep1</i>	20	10
<i>rrn Ep2</i>	2	70
<i>rec Ap</i>	200	5

大腸菌の各種プロモーターの強度を決定した。プロモーター強度は2つのパラメーターで表わした：パラメーターI, open complex形成の速度；パラメーターII, open complex形成の平衡レベル。各パラメーター値は, *lacP* を基準とした相対値で示した。

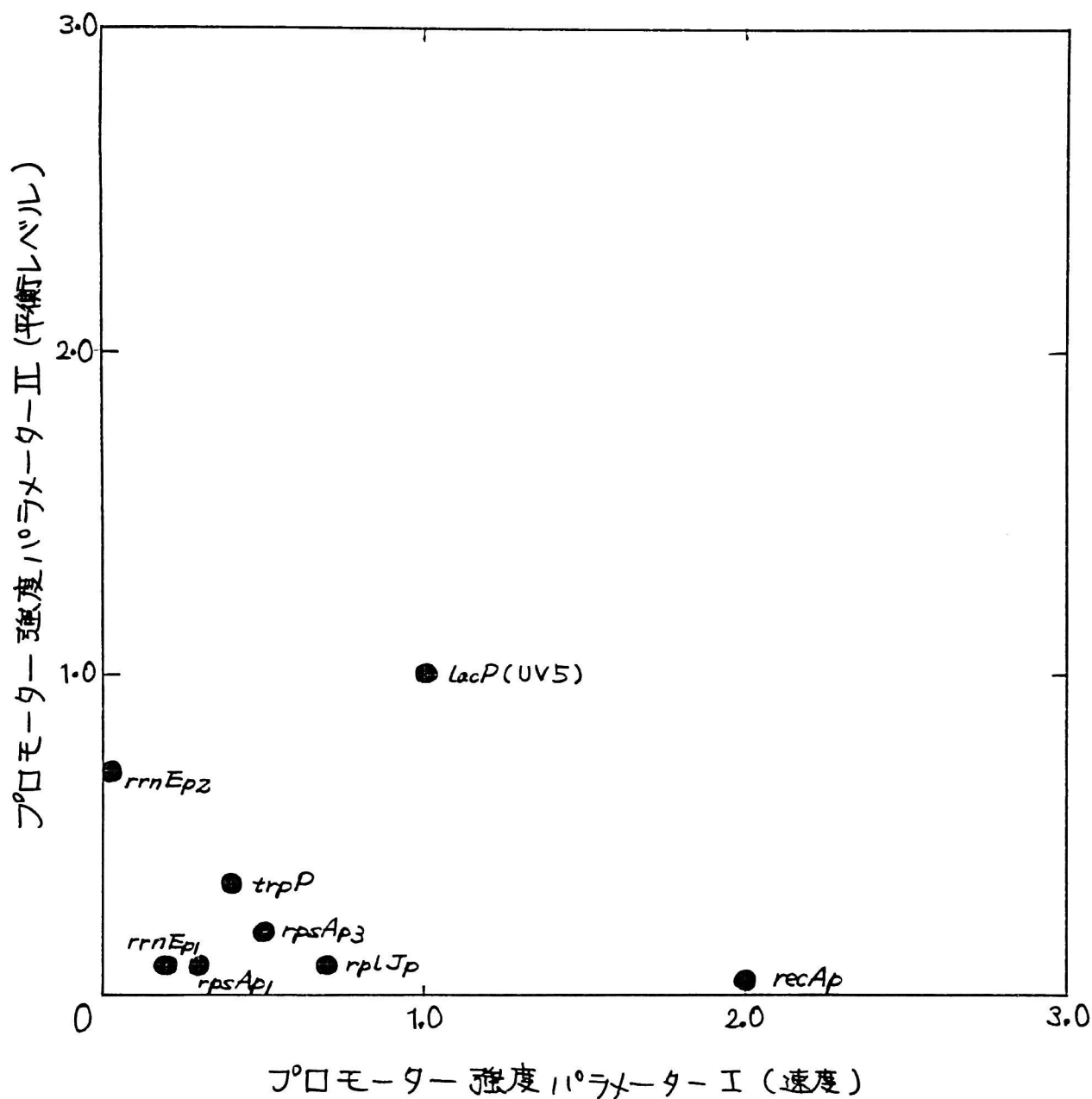


図12. プロモーター強度の比較

大腸菌の各種プロモーターの速度を *LacP(UV5)* を基準とした相対値で比較した (表5参照)。2つのパラメーターがともに高い値を示す「強い」プロモーター、ともに低い値を示す「弱い」プロモーターに加えて、どちらか片方のパラメーターで高い値を示すプロモーターもあることがわかった。

第4節 転写反応の回転効率

時間変化を追う時、リファンピシンの添加の間隔（図6中の t_2 ）を変化させ、転写を何度も起きるようにしてやると、図13に示したように時間とともに転写量が増加する。ところが、 $trpP(S)$ DNA断片上の $trpP$ からの転写量だけは増減がほとんどなく一定のレベルを維持していた。このことは、何らかの原因により転写が1回しかおこらず、回転していないことを示している。この現象が $trpP$ 固有の性質によるものかどうかを明らかにするため、別の $trpP$ 含有 DNA 断片、 $trpP(L)$ を用いて検討を加えた。 $trpP(L)$ DNA断片は、 trp オペロンの転写減衰域を持つ DNA断片である（図4参照）。図14に、 $trpP(S)$ DNA断片と $trpP(L)$ DNA断片の両 $trpP$ DNA断片を用いて時間変化を追った結果を示す。図14から明らかなように、 $trpP(S)$ DNA断片の転写量は図12の場合と同じく一定レベルであるのに対し、 $trpP(L)$ DNA断片の転写量は時間とともに増加し、効率よく転写が回転している。したがって $trpP(S)$ DNA断片での転写回転不良は、 $trpP$ 固有の性質ではなく、 $trpP(S)$ DNA断片に特異的なものと言える。

この原因については、DNA断片の末端構造が違つたためと推測している。

今回用いた各 truncated templates の末端は、そのほとんどが 5'末端突出

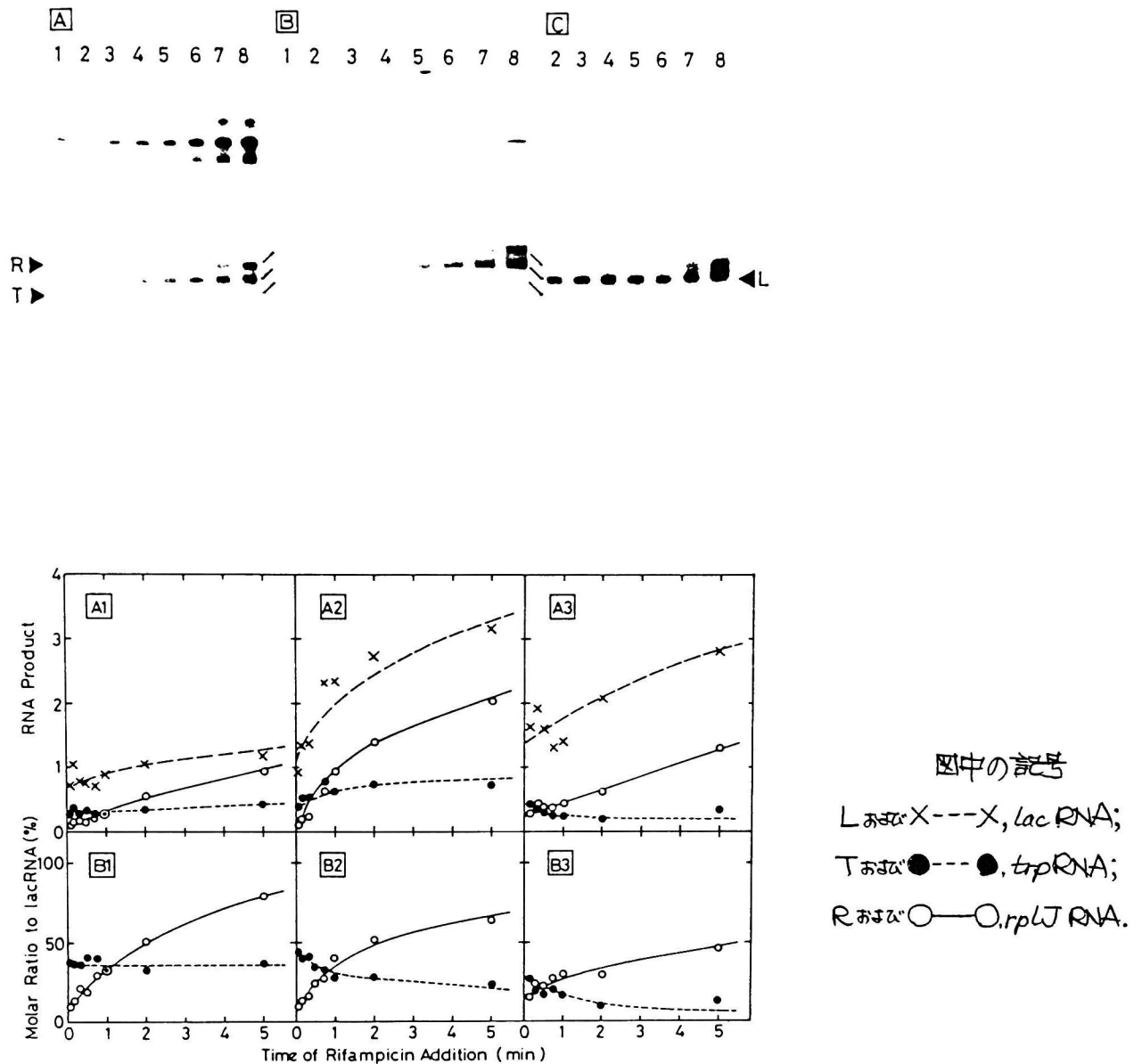


図13 multiple-round の転写 (リファンピシソ添加時間の変化と転写パターン)

【I】(上図) *lacP*, *trpP*, および *rplJp* 各DNA断片を 0.3 pmol ずつと RNAポリメラーゼを (A) 0.9 pmol (enzyme/promoter = 1), (B) 9.0 pmol (enzyme/promoter = 10), (C) 90 pmol (enzyme/promoter = 100) 混合し 37°C 5分間 preincubate した後、基質を添加して転写を開始させた。その後、以下に示す間隔 (図6で示す t_2) をおいて、リファンピシソを加え、その時以降の転写の再開始を防いだ。レーン 1. 5秒; 2. 10秒; 3. 20秒; 4. 30秒; 5. 45秒; 6. 1分; 7. 2分; 8. 5分。塩濃度は 50mM NaCl。RNA は 10% ホリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離した。

【II】(下図) I のオートラジオグラムを定量し、数値化して A1, A2, A3 に示した (1, 2, 3 は I の A, B, C に相当)。さらに、*lac* RNA に対する相対値を示したのが B1, B2, B3 である。

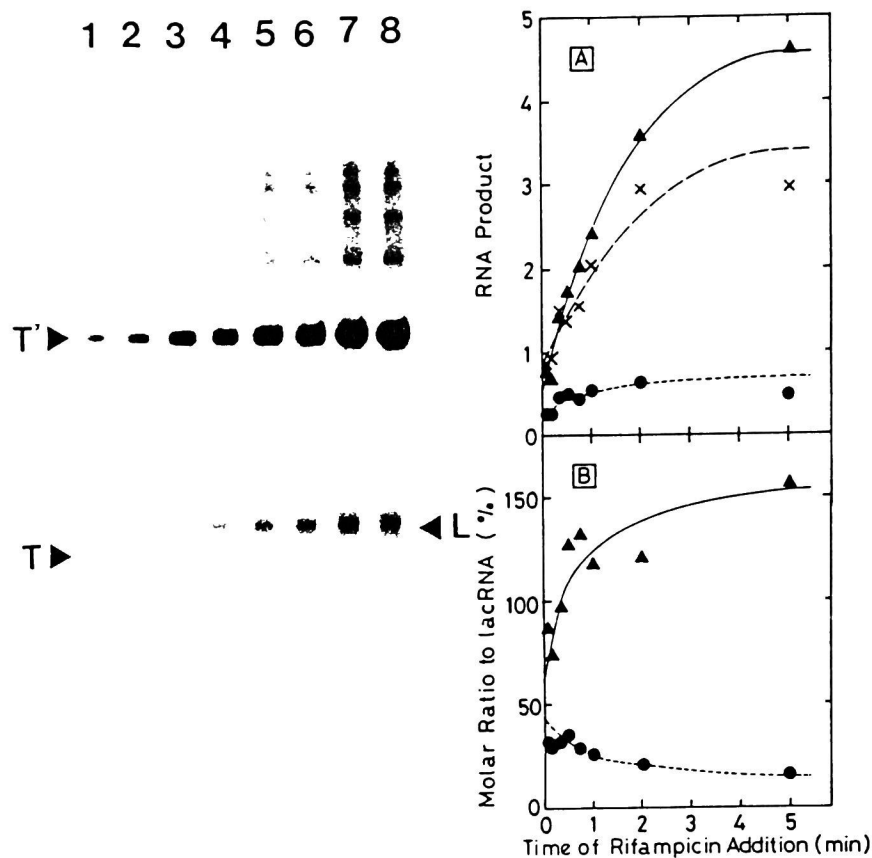


図14 2種類の異なる *trpP* DNA断片の転写

〔I〕(左図) 鋳型DNAとして 205bp の *lacP*, 139bp の *trpP*(S), および転写減衰調節領域を持つ 512bp の *trpP*(L) 各DNA断片を用いた。RNAポリメラーゼはプロモーターの10倍量存在している。他の条件は図12と同一である。RNAは7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。図中、Lは *lacP* 由来の65bp-RNA, Tは *trpP*(S) 由来の63bp-RNA, そしてT'は *trpP*(L) 由来の leader (or attenuated) RNAで141bp-RNAを表わす。

〔II〕(右図) Iのオートラジオグラムを定量化し、数値化した(A)。さらに *lac* RNAに対する相対値を示した(B)。図中、●---●は *trp* RNA, ▲---▲は *trp* leader RNAを表わす。x---xは *lac* RNAを表わす。

型であるのに対し、*trpP*(S) DNA 断片のみ ナンセンス 鎖 (strand) の 3' 末端が突出する構造をもっている。この構造が RNA ポリメラーゼ と DNA 断片、新生 RNA 鎖 の 転写複合体の 解離を防ぐ^{5分間では}。見かけ上、転写の再開が起さない状態になっているのではないかと考えている。このような現象に注目した報告は例がなく原因の解明が待たれる。

第5節 塩濃度の影響

次に、転写反応の反応条件を変化させた場合、転写反応にどのような影響を与えるか検討を加えることにした。以下の実験では、RNA ポリメラーゼ・プロモーター 複合体形成のための時間を 60 分間に固定して、複合体形成速度の変化を無視できるようにし、複合体形成レベルの変化に注目した。

まず、塩濃度環境の変化の影響を調べた。NaCl 濃度を基底 (ほとんど 0 mM) から + 200 mM まで 25 mM ずつ 変化させた時のレベルの変動を 図 15 および 16 に示す。環境の塩濃度に依存して複合体形成レベルが変動していることがわかる。+ 100 mM 以上の NaCl 濃度下では転写反応そのものが抑制され、基質総取り込み量が減少する (データ省略) ことを考慮しなければならぬが、プロモーター^種によっては無塩の条件で

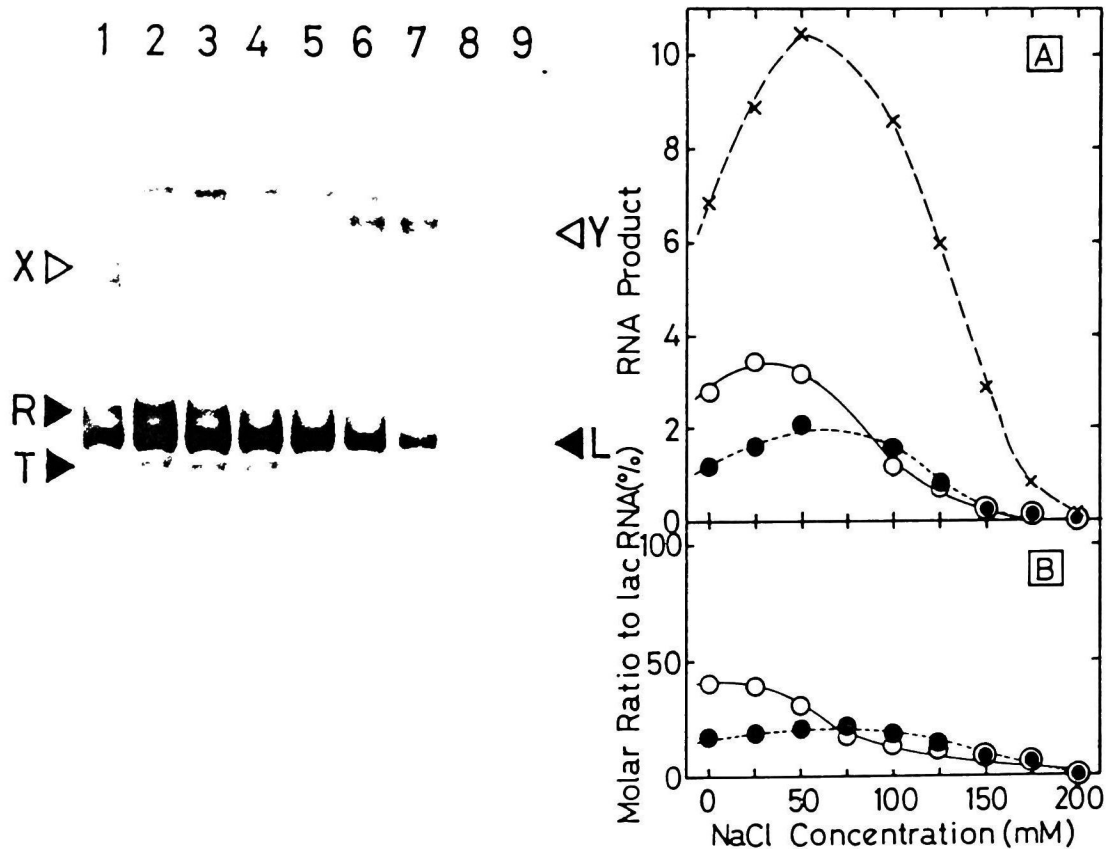


図15 塩濃度の影響 (その1)

【I】(左図) 鋳型DNAとして *lacP*, *trpP(S)*, および *rpLJp* 各DNA断片を0.3 pmolずつ (合計0.9 pmol プロモーター), RNAポリメラーゼを10倍量の9.0 pmol を含む反応系を37°C 5分間 preincubate した後, 基質を加え1分後にリファンピシンを加えた。NaCl濃度は0~200 mMの間で25 mMずつ変化させ, その影響を調べた: レーン1は0 mM; 2. 25 mM; 3. 50 mM; 4. 75 mM; 5. 100 mM; 6. 125 mM; 7. 150 mM; 8. 175 mM; 9. 200 mM。RNAは10%ホリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。図中の記号は, R, L, Tが各々 *rpL*, *lac*, *trp* RNAを表わし, X, Yはこの時に用いた *trpP(S)* DNA断片標品中に混入していたDNA断片に由来するRNAを表わす。

【II】(右図) Iのオートラジオグラムを定量し, 数値化した(A)。さらに, *lac* RNAに対する相対値を示した(B)。図中の記号は, X---Xが*lac*, ●---●が*trp*, ○---○が*rpLJ*各RNAを表わす。

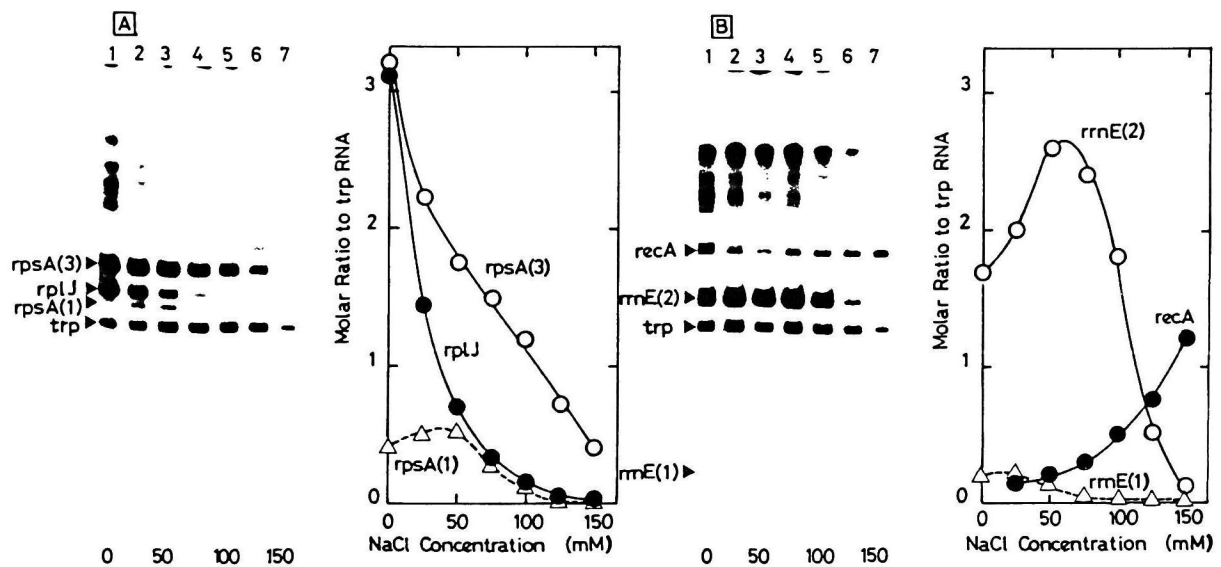


図16 塩濃度の影響 (その2)

鋳型DNAを各々0.3pmolずつとRNAポリメラーゼを10倍量 (enzyme/promoter = 10) を37°C 60分間 preincubate (した後、リブソホシンと基質とを同時に加えて37°C 5分間反応させた。この時、NaClを0~150mMの間で25mMずつ変化させた条件下で反応させ、その影響を試みた。RNAは10%ホルリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離した。A, Bともに、左側にオートラジオグラムを示し、右側にデンストメトリーで定量し、補正した各RNA量をtrpRNAを基準とする相対値で表わしたものを示す。用いたDNA断片と図中の記号は以下のとおり: (A) ○—○, *rpsA*(3) RNA (*rpsAp*(3S) DNA断片); ●—●, *rplJ* RNA; △---△, *rpsA*(1) RNA (*rpsAp*(1S) DNA断片), (B) ○—○, *rrnE*(2) RNA; ●—●, *recA* RNA; △--△, *rrnE*(1) RNA. および A, B 共通で trpP(5) DNA断片。

最も高いレベルを示すもの (*rplJp*, *rpsAp3*, *rrnEp1*), 100mM NaCl 以上の高塩濃度で高いレベルを示すもの (*recAp*), 中程度の塩濃度 (50mM NaCl 前後) で最も高いレベルを示すもの (*lacP*, *rpsAp1*, *rrnEp2*). および ほとんど影響を受けないもの (*trpP*) に分類できる。

第6節 反応温度の影響

大腸菌は一般的に 37°C で培養し, *in vitro* 転写系も 37°C で反応させるのが通例である。この反応温度を変化させて複合体形成レベルに対するその影響をみた。反応温度を 27°C から 47°C まで 5度おきに変化させた場合の結果を 図17, 18 および 19 に示す。基質の総取込量は 37°C で最大値を示し, それよりも高温 および 低温 側では減少した (データ省略) 。各プロモーターごとのレベルをみると, ここでも各々特徴のある温度依存性の変動を示した。たとえば, 図17 で *lacP* のレベルが高温で急激に低下するため, みかけ上 *trpP*, *rplJp* とほぼ同じレベルになってしまっている。また, 図19 の *recAp* は 低温 側にずれた方がレベルが高くなる傾向を示している。

前節 および 当節で示してきた結果は, RNAポリメラーゼ・プロモ-

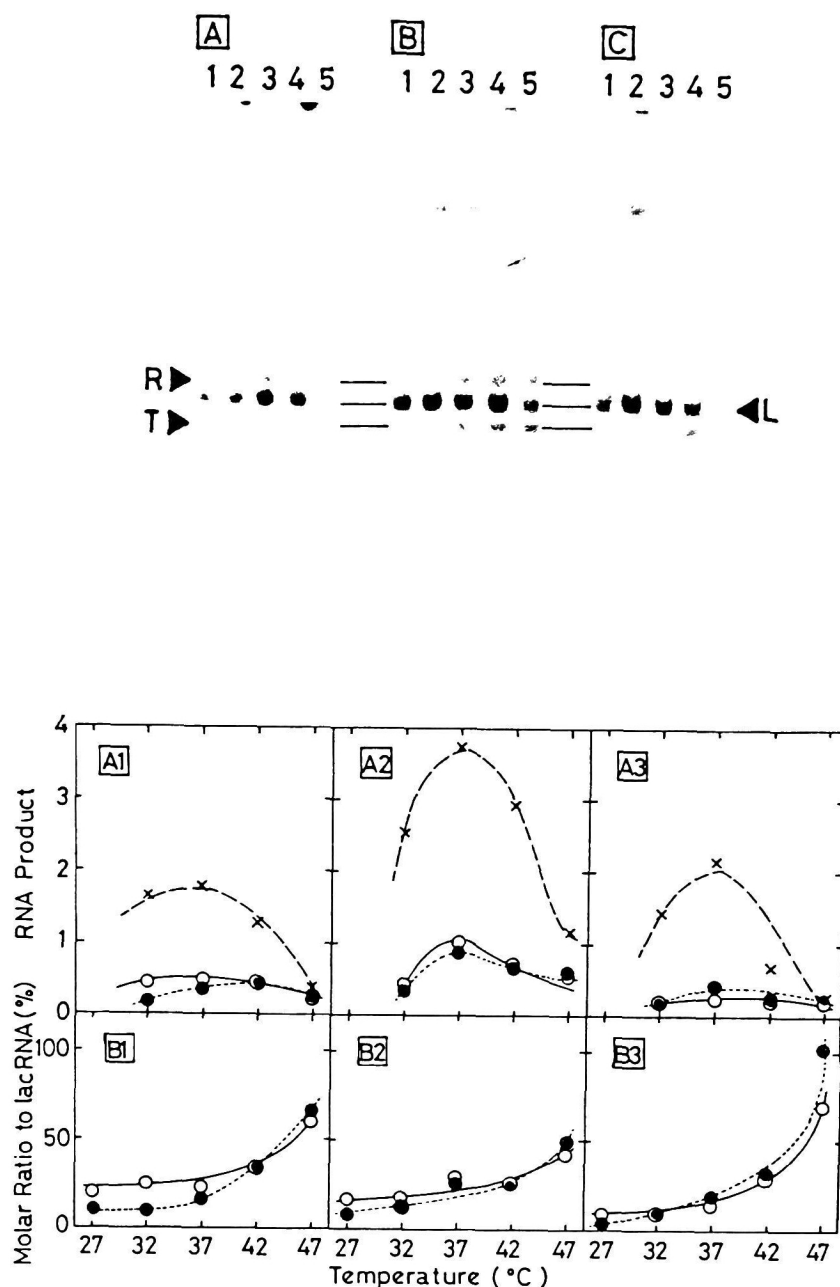


図17 反応温度の影響 (その1)

〔I〕(上図) 鋳型DNAとして *lacP*, *trpP(S)*, および *rplJp* 各DNA断片を用いた。反応条件は、Aが NaCl 不存下、Bが 50mM NaCl、Cが 100mM NaCl 存在下で、以下に示す温度で全反応を実施し、他の条件は標準条件(材料と方法 参照)に準ずる。反応温度: レーン1は 27°C; 2, 32°C; 3, 37°C; 4, 42°C; 5, 47°C。RNAは10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

〔II〕(下図) Iのオートラジオグラムを定量化した(A)。それを *lac* RNAを基準とした相対値で示した(B)。1, 2, 3がIのA, B, Cに相当する。

図中の記号は、L および X---X が *lac* RNA, T および ●---● が *trp* RNA, R および O---O が *rplJ* RNA を 各々表わす。

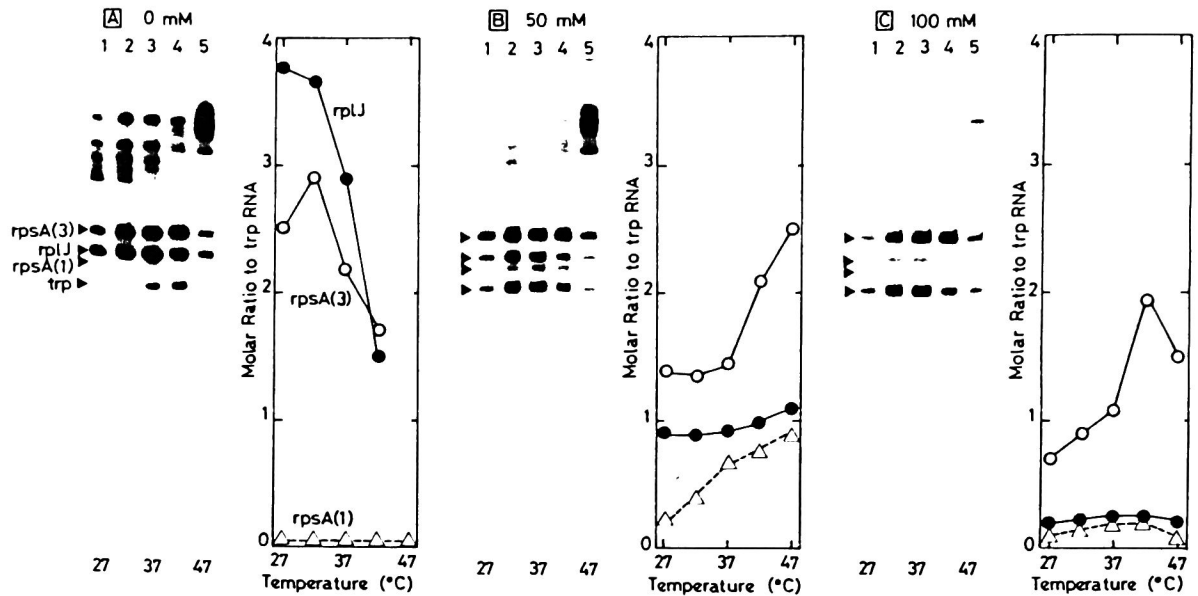


図18 反応温度の影響 (その2)

特異DNAとして *trpP*(S), *rplJp*, *rpsAp*(1S), および *rpsAp*(3S) 以上4種のDNA断片を用いた。反応は以下に示す温度で行い。塩濃度はAがNaCl不存下、Bが50 mM、Cが100 mM NaCl存在下でその他の条件は標準条件(材料と方法参照)に準ずる。反応温度はレーン1が27°C; 2. 32°C; 3. 37°C; 4. 42°C; 5. 47°Cである。RNAは10%ポリアクリリルミド・ゲル電気泳動で分離した。A, B, Cともに左側にオートラジオグラム、右側にそれを定量化した上で、*trp* RNAに対する相対値を示した。図中の記号は、A, B, Cともに、○—○, *rpsA*(3) RNA; ●—●, *rplJ* RNA; △---△, *rpsA*(1) RNA である。

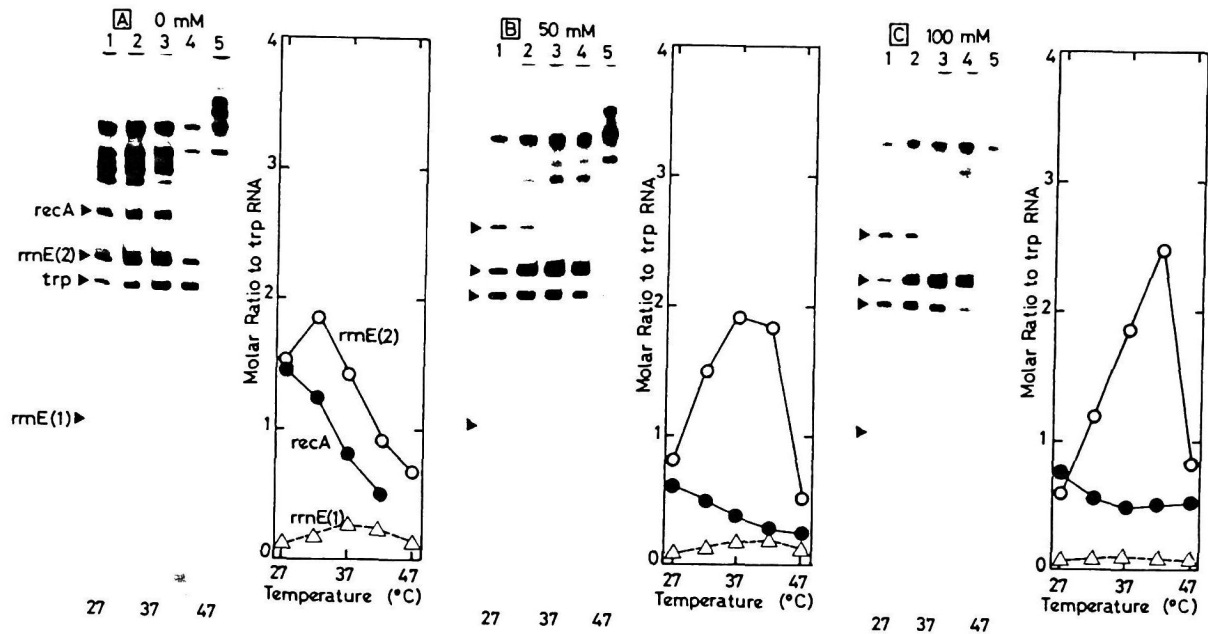


図19. 反応温度の影響 (その3)

鎖型DNAとして *trpP*(S), *recAp*, *rrnEp*(1) および *rrnEp*(2) 以上4種のDNA断片を用いた。転写反応は以下に示した温度で行い、また塩濃度は(A) NaCl 不在、(B) 50 mM NaCl, (C) 100 mM NaCl 存在である。その他の反応条件は標準条件(材料と方法 参照)に準じた。反応温度はレーン1が27°C; 2 32°C; 3. 37°C; 4. 42°C; 5. 47°Cである。RNAは10%ホリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離した。A, B, Cと共に左側にオートラジオグラム。右側にそれを定量化し、*trp* RNAを基準とした相対値を示した。図中の記号は、A, B, Cと共に ○—○, *rrnE*(2) RNA; ●—●, *recA* RNA; Δ—Δ, *rrnE*(1) RNAである。

ター複合体の形成レベルは絶対的なものではなく、環境によって変動することと明らかにした。このことはプロモーター強度の比較検討を行う

際に充分留意すべき点であり、全く同一の条件下でプロモーターごとの

転写量を定量できる *in vitro* 混合転写系はその点、優れたシステムであると言えよう。また、*in vivo* に目をむけると、多数増殖期から定常期への移行時^(96,97)や、熱ショック時^(98,99)において、遺伝子発現様相が変化することが知られているが、ここで示したような転写反応系の変動が細胞内微小環境の変化に応じた発現制御に関与している可能性がある。

第7節 2つのパラメーターの生理的意味

以上、*in vitro* 混合転写系を用い、このシステムの基本的特性を検討してきたが、ここで2つのパラメーターの生理的意味およびプロモーター強度について考察を加えてみる。

プロモーター突然変異株が各種のオペロンで多数分離され、それらの解析の結果、-35領域や-10領域のプロモーター機能に関する重要性が明らかにされてきた。^(21,22)そして近年では人工的に変異を起こし、スパーサー領域の重要性も確立したと言える。^(24,25)

2つのパラメーターを解析してきて、その生理的意味を逐える際、遺伝学的に示されたこれらの信号領域と関連があるかどうかということが検討事項としてあげられる。今回用いた各 *truncated templates* のプロモーター領域の塩基配列を図20に示す。第3章で述べたように、転写の開始時 RNAポリメラー

	-50	-40	-30	-20	-10	+1	+10
lacP(UV5)						▼	
	TAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC						
trpP	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	TCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAAGTTCACGT						
rplJp	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	TCTGTAAACTAATGCCTTTACGTGGGCGGTGATTTTGTCTACAATCTTACCCCCACGTAT						
recAp	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	AATTTCTACAAAACACTTGATACTGTATGAGCATACAGTATAATTGCTTCAACAGAACAT						
rpsAp ₍₁₎	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	TCGCCGCATGCTACAGTTGCAGGAGAAGGGCTTTAGTGTTAACTTTGAGCGCCTTTTGGC						
rpsAp ₍₃₎	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	ATTCCACCACCTTAAGCATTGAGCAAGTGATTGAAAAAGCGCTACAATACGCGCGCCAGG						
rrnEp ₍₁₎	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	CTGCAATTTTCTATTGCGGCCTGCGGAGAACTCCCTATAATTGCGCCTCCATCGACACGG						
rrnEp ₍₂₎	┆	┆	┆	┆	┆	▼	┆
	TCCTGAAATTCAAGGTTGACTCTGAAAGAGGAAAGCGTAATATACGCCACCTCGCGACAG						

図 20. プロモーター領域の DNA塩基配列

本論文で解析に用いた 8 種の大腸菌 プロモーターの プロモーター領域、(-50 ~ +10) の DNA塩基配列を示した。出典は本文(材料と方法)参照。-35 領域 および -10 領域の信号配列は下線で示した。

セ"が -35 領域 (TTGACA 近似配列) を認識して -10 領域 (TATAAT 近似配列) を中心に複合体形成を行うと考えられている。これらの塩基配列と 2 つのパラメーターとの間に何らかの相関があるのかどうか改めて見直してみる。その機能からの推論で、-35 領域が複合体形成速度、-10 領域が複合体形成レベルに関連しているものと考え、各領域の塩基配列とパラメーターの順位とを相関させてみると、~~速~~では相関があるように思われるが、TTGACA である *trpP* が"最速"ではない。またレベルとの相関は、TATAAT である *lacP* が最高、同じ配列の *rrnE_{P1}* と *recA_P* が最低を示し、他のプロモーターを検討しても関係はないようである。逆に -35 領域と複合体形成レベル、-10 領域と複合体形成速度の相関を見ても、塩基配列とパラメーター順位との間には相関が認められない。ここで調べてきた限りのデータでは、-35 領域、-10 領域の塩基配列と 2 つのパラメーターとを一義的に正の相関関係があると結びつけるのは困難である。もっとも、プロモーターの種類を増やし、データが蓄積すれば塩基配列とパラメーターとの間に何らかの相関関係が出現してくるかもしれないという可能性は否定できない。

転写開始の素反応とプロモーター領域の塩基配列とを関連づけた研究として、前述した abortive initiation を利用した (τ) プロット解析があげられる。⁽¹⁰⁰⁾ この方法は、abortive initiation の転写量の経時変化を

RNAポリメラーゼの濃度変化と関連づけて 酵素反応速度論的に解析するものである。これにより、closed complex 形成の平衡定数と closed complex から open complex への状態変化の速度定数を求めることができる。λファージの P_R , P_{RM} プロモーターにおいて 各種突然変異と2つの定数との相関が解析されているが、これらの場合には -10 領域が速度定数に、-35 領域が平衡定数に 主に影響を与えることが示されている。^(101,102,103,104) この系ではプロモーターが1種類で、その塩基配列変化と定数変化を追っているため 相関がはきり出たものと考えられる。

なお、abortive initiation を利用した プロット解析は、特定基質を欠除して RNAポリメラーゼを アイドリングさせ、オリゴヌクレオチドを産生させるという特殊な条件下を利用している。これに対して 当 *in vitro* 混合転写系では truncate させてはいるが、機能的な RNA を合成させて、実際に RNA 合成をした複合体を定量している。当系が、転写反応の実態により近いと言える。

また、これまで述べてきた パラメーターは 単に特定領域の特殊な塩基一次配列から機械的に定義されるという性質のものではないと思う。パラメーターを決めつける要因は -10 領域と -35 領域の塩基配列保存度に加えて、両者間の スペーサー領域の間隔、さらには それらを含むプロモ-

ター領域全体の立体構造や二本鎖の熱力学的安定度等々がからみあった複雑な関数であると考えられる。

第8節 プロモーター強度の比較

近年、遺伝子工学技術が「学術分野のみならず」産業分野にもまろこまれ、有用物質を生物体を利用して生産せよというバイオテクノロジーが盛えている。この分野では特定遺伝子をクローニングするのも一大難問であるが、その後のいかに効率よくその遺伝情報を発現させるかということも大きな課題となる。遺伝情報発現の水平伝達の各段階でその反転の効率を向上させるため開発研究が進められているが、その中でも、いかに転写量を増大させるか、すなわちプロモーターとして最も強いものを用いるということが注目されている。このため、プロモーター強度を決定し比較検討を行ったという報告が、雑誌や学会で発表されることが多い。それらのほとんどが、ある特定遺伝子のプロモーター領域と他のプロモーターとを交換し、その時の遺伝子発現量の変動をみるという手法をとって

(たとえば^(105,106,107) 同時にではなく、プロモーターごとにはいる。しかし、この方法で測定しているものは、⁽¹⁰⁵⁾複数回 (multiple round) の転写反転に由来する mRNA を複数回翻訳した最終産物の量で^(106,107)あり、正確には文字どおりのプロモーターの強度の比較をし

ているとは言えない。ここで、そのようにして報告されたプロモーター強度と *in vitro* 混合転写系で測定された2つのプロモーター強度に関するパラメーターとを比較してみる。*in vivo* の発現量では、 $trpP > lacP$ ⁽¹⁰⁶⁾ あるいは *in vitro* 転写系で $trpP \approx lacP$ ⁽¹⁰⁵⁾ であるのに対し、*in vitro* 混合転写系では2つのパラメーターとも $lacP > trpP$ であった。また、*in vivo* では $recAp > lacP$ であるのに対し、*in vitro* 混合転写系では複合体形成のレベルが $lacP \gg recAp$ ⁽¹⁰⁷⁾ であった。この相違は相入れないものではない。*in vitro* 混合転写系が転写開始の素反応のパラメーターからプロモーター強度を論じているのに対し、*in vivo* のシステムでは遺伝情報の水平伝達の各段階における効率を全て含んだ結果としての総発現量からプロモーター強度を論じているという立場の相違に起因するものであると言える。さらに、ここで留意しておかなければならないことがある。それは、*in vitro* 転写系では truncated templates という線状DNA分子を鋳型として用いているのに対し、*in vivo* での鋳型は超らせん構造をとっているDNAとして存在しているという点である。ある種のプロモーターによっては、そのらせん構造の度合により転写頻度が変わることが知られており、^(108,109) そのような場合 *in vitro* でのプロモーター強度と *in vivo* でのそれとが違ってくることは否定できない。

第5章 結果と考察 3 …… ppGpp による転写特異性の変換

第1節 緊縮プロモーター

in vitro 混合転写系は既に述べてきたように、RNAポリメラーゼと共精製 (co-purify) されてくる転写因子 (transcription factors) 候補の特性を解析するために開発したシステムである。そして、まず RNAポリメラーゼとプロモーターのみ存在する系で複合体形成の特性解析を行ってきた。最終的には、この系にさらに転写因子候補を添加し、その効果を調べるのだが、それに先立ち、*in vitro* 混合転写系の有効性を示し、同時に新たな知見を得るため、第1章で述べた緊縮制御 (stringent control) 系の仲介因子と言われるマジックスポット ppGpp (グアノシン-5'ニリン酸-3'ニリン酸) を添加してみた。

今回解析に用いているオペロンのうち、緊縮制御が作動した際、第一次の抑制を受けるものは stable RNA である *rrnE* オペロンと リボソーム蛋白質の *rpsA*, *rplJ* 両オペロンの3つである。これらのオペロンのプロモーターは緊縮制御を受けるプロモーターということで、緊縮プロモーター (stringent promoters) と呼ばれている。これに対し *lacP*, *trpP*, *recAp* は緊縮プロモーターではない。

緊縮プロモーターの中でも、*rrn* オペロンや tRNA オペロンのプロモ-

ターについては、すでに *in vitro* で解析が行われていた。これらの知見をまとめると、ppGpp により緊縮プロモーターのみが特異的に転写抑制を受けることが再現され、また ppGpp が RNA ホリメラーゼに結合することも確かめられ、おそらく ppGpp が結合した RNA ホリメラーゼは緊縮プロモーターを選択的に転写しなくなるという考えになる。^(33, 34)

第2節 ppGpp 添加の影響

in vitro 混合転写系で ppGpp のそのような作用を実際に再現してみることにした。ppGpp が転写のどの段階で作用するかということは未解明のため、まず RNA ホリメラーゼ・プロモーター複合体形成時から存在させて転写を行わせてみた。その結果を 図 21 および 22 に示す。図から明らかなように、緊縮制御を受けるオペロンの *rpsAp1*, *rplJp*, *rrnEp1* は特異的に転写抑制を受け、転写を行なった複合体のレベルが減少している。一方、緊縮プロモーターではない *lacP*, *trpP* は影響がなく、高濃度の ppGpp 存在下で非特異的なレベル減少を示している。しかし、ここで注目すべき結果が2つある。ひとつは、緊縮制御を受けるオペロンのプロモーターである *rpsAp3*, *rrnEp2* は ppGpp によるレベル減少が見られない点である。これは予想外のことであり、後でさう一度触れる。もうひとつは、*recAp* が ppGpp 添加でレベル増加を見せる点である。*in vivo* において緊縮制御と *recA* 遺伝子発現との関係説明が



図21. リボソーム蛋白質遺伝子の転写におけるppGppの影響

全型DNAとして *recAp*, *trpP*, *rplJp*, *rpsAp* (1S), および *rpsAp* (3S) 各DNA断片を用いた。反応条件は、0.3 pmol ずつの DNA断片と 15 pmol のRNAポリメラーゼを含む標準条件で。反応の全過程を通じ以下に示す濃度のppGppを存在させた：レーン1, 0 mM ; 2, 0.05 mM ; 3, 0.10 mM ; 4, 0.25 mM ; および 5, 0.50 mM。RNA断片は 10% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離した。

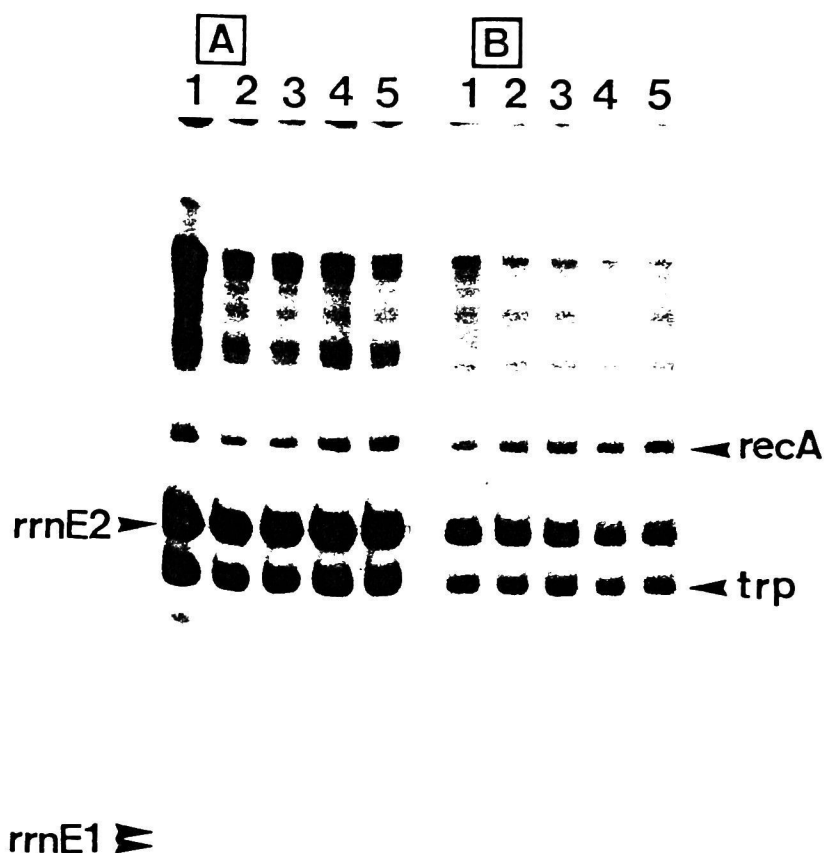


図 22. リボソーム RNA 遺伝子の転写に対する ppGpp の影響

鋳型 DNA として *recAp*, *trpP*, *rrnEp* (1) および *rrnEp* (2) 各 DNA 断片を用いた。0.3 pmol ずつの各 DNA 断片と 12 pmol の RNA ポリメラーゼを含む反応系で: A は 50 mM, B は 100 mM の NaCl 存在下 その他の条件は標準条件である。反応の全過程を通して以下に示す ppGpp を存在させた: レーン 1, 0 mM; 2, 0.05 mM; 3, 0.10 mM; 4, 0.25 mM; および 5, 0.50 mM。RNA 産物は 10% ホリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

興味あるところである。本論文では報告し⁽¹¹⁰⁾ないが、大腸菌 ϕ スファエリルヒールビン酸カルレボキシラーゼ (ppc) の転写も 当系で ppGpp により転写促進傾向が認められた。
これらの結果は、ppGpp による正の制御の存在を示唆していると言える。

ところで、以前から一部の緊縮プロモーターについて *in vitro* の転写⁽¹¹¹⁾
(たとえば: 35, 110, 113, 124)
系において ppGpp による転写抑制が効く、効かないという議論があった。これ
に対し、解決の手がかりを与えたものとして Mizushima⁽¹¹¹⁾ の研究があげられ

る。彼等らは *in vitro* 転写系の反応条件、特に塩濃度によって ppGpp に
よる特異的転写抑制が起きたり起こらなかったりすることと報告している。^{すなわち} 一部

の混乱した議論は、反応条件によるものと考えられる。したがって、*in vitro*

混合転写系において、緊縮プロモーターではないかと思われた *rpsAp3*, *rrnEp2*

に転写抑制が認められなかったのも、プロモーター固有の性質ではなく条件が不

適当であったことに起因する可能性が残る。この点を明らかにするため、*in*

vitro 混合転写系の標準条件の一部を他の報告^(82, 111 など)に基づいて改変し、ppGpp の影

響を改めて検討してみた。結果を図 23 に示す。前章で示したように

反応条件の変化により複合体形成のレベルが変化することが図 22 でも認

められる。しかし、これらの条件下においても標準条件下と同様に、

rpsAp1, *rrnEp1*, *rplJp* は特異的転写抑制が認められ、*rpsAp3*, *rrnEp2*

は抑制されていない。したがって、ppGpp による転写抑制が認められない

2つのプロモーターは、反応条件に起因するのではなくプロモーター本来の性

質として緊縮プロモーターではないと言える。

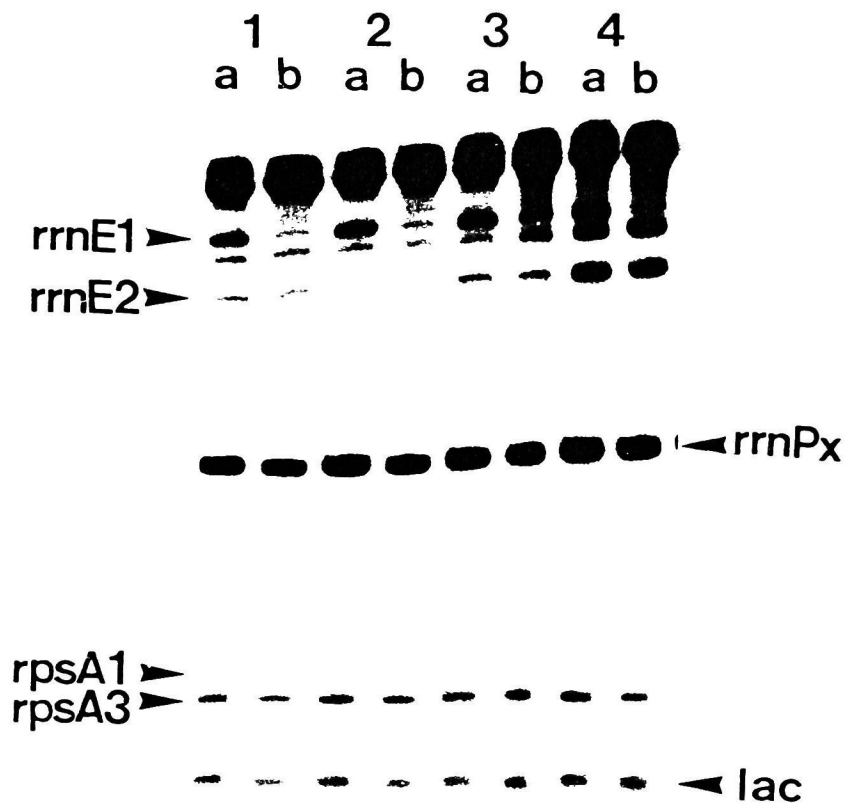


図23. 反応条件の一部改変とppGppの影響

鋳型DNAとして *lacP*, *rrnEp* (L), *rpsAp* (1L) および *rpsAp* (3S) 各DNA断片を用いた。反応条件は、ppGppの効果を見た *in vitro* 転写系の報告を参考にして当系の標準条件に次に述べる改変を加えている：レーン1, 標準条件；2, NaClをKClと置換；3, Mg^{2+} 濃度を3mMから10mMに増加；および4, グリセロールを最終濃度10%で添加。また、各レーンともaはppGpp不在下, bは0.2mM ppGpp存在下である。4種のDNA断片を0.1pmolずつとRNAポリメラーゼを8.0pmol (enzyme/DNA = 20, enzyme/promoter = 10) 用いた。RNA産物は5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。*rrnPx* RNAは約800bpの*rrnEp* (L) DNA断片にある未知遺伝子のプロモーターに由来するRNAである (約150ないし160bp)。

このように *in vitro* 混合転写系では ppGpp による プロモーター特異的転写抑制現象を再現することができ、転写因子解析のためのシステムとして有効な系であることを示している。

第3節 ppGpp の作用する段階

次に、ppGpp が作用する転写の段階がどこかを明らかにするため、以下の実験を組んだ⁽¹¹²⁾。ppGpp を複合体形成時から存在させる系と、複合体形成後基質と同時に添加する系とで、その効果を比較した。結果を 図 24, 25, 26, および 27 に示す。ppGpp の添加時の違いによる効果の差異は認められない。したがって、ppGpp は RNA ポリメラーゼ・プロモーター複合体形成後の段階でその作用を発揮するということになる。

一先、Chamberlin のグループは ppGpp が “ホーズイング” (pausing: 転写延長反応途中のアイドリング) を促進するため、その総合した結果として転写抑制が起きる⁽¹¹²⁾。あるいは 緊縮制御を受けるオペロン内部に ppGpp による転写減衰を促進する調節領域⁽¹¹³⁾ があるために転写抑制が起きるとする説を提出している。いずれの説も、ppGpp が作用する段階は転写の開始段階ではなく 延長反応の段階であるとしている。この指摘に対し、

当 *in vitro* 混合転写系では 転写反応を一回きり (single round) で完全に行うよう

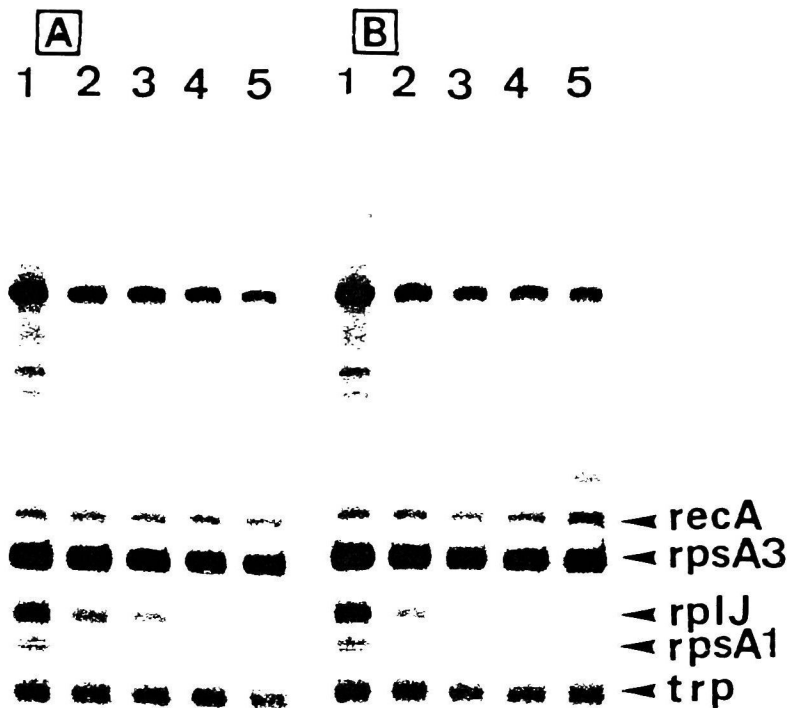


図 24. ppGpp 添加の時機とその影響 (その1)

リボリム蛋白遺伝子に対する影響をみた。鋳型DNAとして *recAp*, *trpP*, *rplJp*, *rpsAp* (1S) および *rpsAp* (3S) 各DNA断片を用いた。各々の反応は、0.1 pmol ずつの各DNA断片と 7.0 pmol のRNAポリメラーゼを用いている (enzyme/DNA = 4, enzyme/promoter = 10)。ppGpp を A では open complex 形成時から存在させ、B では open complex 形成後、基質と同時に添加した。ppGpp 濃度は以下のとおりである：レーン1, 0 mM；2, 0.05 mM；3, 0.10 mM；4, 0.25 mM；および5, 0.50 mM。RNA産物は10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

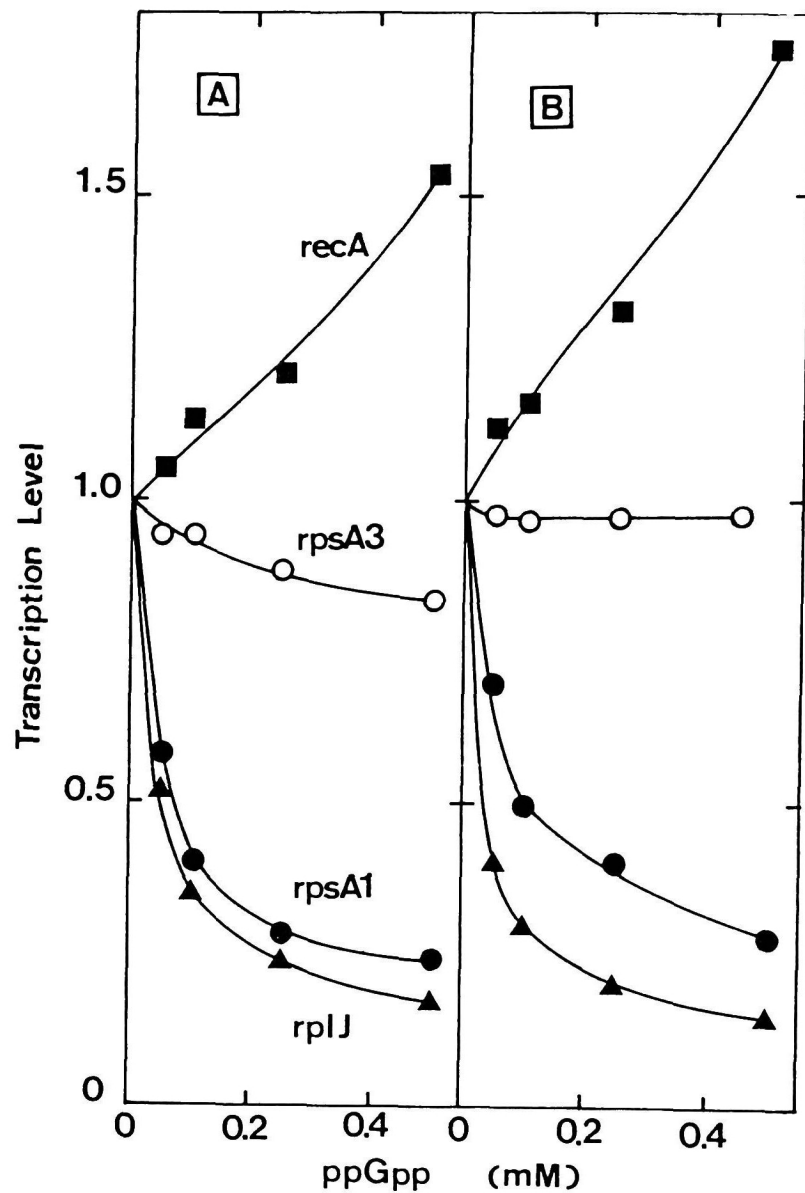


図25. ppGpp 添加の時機とその影響 (その2)

リボソーム蛋白質遺伝子の転写に対する ppGpp の影響をみた 図24 の実験結果を定量・数値化して表わした。詳細は 図24 の説明を参照のこと。各 RNA のレベルは、変化の小さかった *trp* RNA に対する相対値で示した。図中の記号は以下のとおり：■—■, *recA* RNA；▲—▲, *rplJ* RNA；●—●, *rpsA*(1) RNA；および ○—○, *rpsA*(3) RNA。

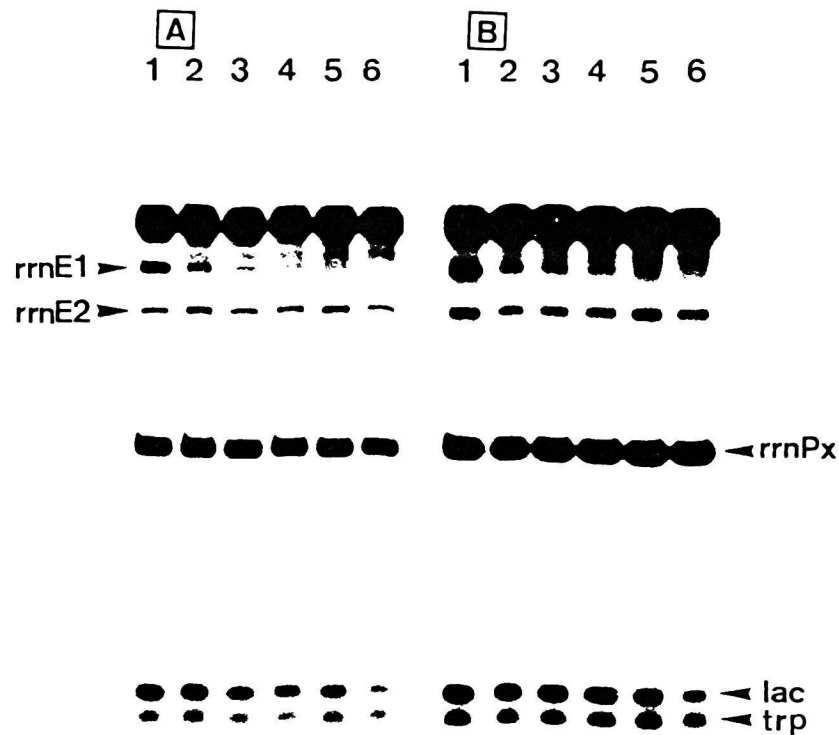


図26. ppGpp添加の時機とその影響 (その3)

リボソームRNA遺伝子の転写に対するppGppの影響をみた。鋳型DNAとして、*lacP*, *trpP*, および *rrnEp* (L) 各DNA断片を用いた。各々の反応は、0.3 pmol ずつのDNA断片と 15 pmol のRNAポリメラーゼを含んでいる (enzyme/DNA = 16.7, enzyme/promoter = 10)。また、リファンピシンの代わりにヘパリンを用いた。これにより非特異的な転写がかなり抑制され、バックグラウンドがきれいになった。ppGppをAでは open complex 形成時から存在させ、Bでは open complex 形成後 基質と同時に添加した。ppGpp 濃度は以下のとおりである：レーン1, 0 mM；2, 0.05 mM；3, 0.10 mM；4, 0.25 mM；および 5, 0.50 mM。RNA産物は5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

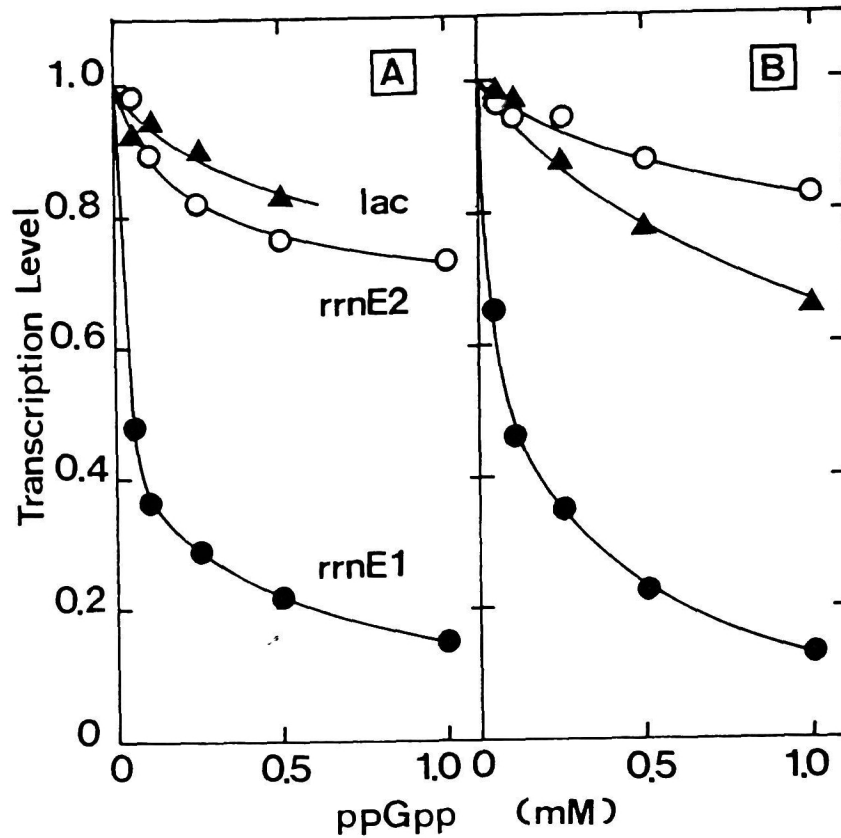


図27. ppGpp添加の時機とその影響 (その4)

リボソームRNA遺伝子の転写に対するppGppの影響をみた図26の実験結果を定量的に表わした。詳細は図26の説明を参照のこと。各RNAのレベルは変化の小さかった *trp* RNAを基準とした相対値で示した。図中の記号は以下のとおり；
 ▲—▲, *lac* RNA； ●—●, *rrnE*(1) RNA； および ○—○, *rrnE*(2) RNA。

$t_1=0$ および
 設定してあり) (図 6 中で $t_3 = 5$ 分間). 延長反応速度の変化を判定する
 ことはできない。 したがって、ポーズイングが促進されたかどうかについては
 は不明である。 一方、仮に 緊縮プロモーターに ppGpp 感受性転写減衰
 調節領域があるとすれば、転写減衰産物である短い RNA が検出されるは
 ずだが、それに相当するものは認められなかった。 いずれにしても、最終
 的には ppGpp により プロモーター特異的な転写減衰は認められているの
 で、ppGpp の主要作用点は 延長反応以前の段階にあると考えられる。

以上をまとめると ppGpp は RNA ポリメラーゼ・プロモーター複合体形
 成後、RNA 合成開始までの段階に作用すると考えるのが妥当であろう。

第4節 ppGpp の作用機構

Travers は 緊縮制御を受ける オペロンと そうでないオペロンのプロ
 モーター塩基配列を比較検討した結果、緊縮プロモーターに共通する特性を
 見出した。⁽¹¹⁴⁾ それは、緊縮プロモーターの -10 領域から転写開始点直後
 の狭い領域に G-C 塩基対が 高い割合で存在している点で、配列の保存
 度も高いことから 緊縮配列 (stringent sequence) と呼んでいる。

GC 含量の多さが重要であることは、ポリ d(A-T) 二本鎖と ポリ d(I-C)

二本鎖を鋳型とした時の RNA 合成においても ppGpp が後者に転写抑制

をもたらし。⁽¹¹⁵⁾ また人工的に緊縮配列を改変したプロモーターでは転写抑制が弱くなつたことから論証している。⁽¹¹⁶⁾

このほか、緊縮プロモーターの下流に別な構造遺伝子をつなぎ、その遺伝子の発現調節が緊縮制御下にはいったことを示す報告もある。⁽¹¹⁷⁾ すなわち、緊縮制御においてはプロモーター領域に緊縮プロモーターとしての制御領域が存在していることになる。

これらの結果と *in vitro* 混合転写系を用いた解析から得られた結果から考えると、ppGpp の作用機構について以下のような仮説が立てられる。プロモーター領域で複合体を形成している RNA ポリメラーゼの安定度は、プロモーターによって異なっている。特に、緊縮プロモーターではその転写開始点付近が GC 塩基対豊富なために DNA 二本鎖が安定で複合体の安定度が低い。ppGpp はこのような状態にある RNA ポリメラーゼに作用してその複合体を崩壊させる。その結果、*in vitro* 混合転写系で測定される転写開始可能な複合体のレベルが減少する。

今回 ppGpp による転写抑制を受けることが確認された緊縮プロモーター 3 種、*rplJp*, *rpsAp1*, *rrnEp1* はいずれもプロモーター強度を表わす 2 つのパラメーターのうち複合体形成の平衡レベルが低く、不安定さを表づけているものと考えられる。一六、緊縮プロモーターではなかつた *rpsAp3*, *rrnEp2*

は前より高いレベルを示している。

不安定な複合体の転写が抑制される現象は RNAポリメラーゼ阻害剤ヘパリンでも認められる。転写を single-round で行うため、反対義にリファンピシンまたはヘパリンを添加する。リファンピシンは RNAポリメラーゼの RNA合成座位に作用して RNA合成を阻害し、ヘパリンは RNAポリメラーゼに結合して DNAへの結合を防いで RNA合成を阻害する。両者を使いわけると、リファンピシンでは予想されるプロモーターからの正規の転写産物以外にも弱い転写産物のバンドが認められる。いわゆるバックグラウンドが高い。これに対しヘパリンではそのようなバックグラウンドが低い。おそらく形成された複合体のうち不安定なものがヘパリンの結合で離れたものと思われる。このようなヘパリンの差別的な作用については、他のグループの研究においても認められる。(111, 117a)

ppGpp の効果もヘパリンと似ていると考えられる。体系的な比較検討が興味もたれる。生体内では、ppGpp が複合体形成後の RNAポリメラーゼに結合して作用するのか、ppGpp を結合した RNAポリメラーゼが緊縮プロモーターでは複合体を形成してもすぐ崩壊していくのか。その点はわからない。しかし、いずれの場合にも不安定さが ppGpp の効果を考える上で重要と思われる。

なお、Travers の指摘した緊縮配列では $rrnE_2$ も緊縮プロモ-

ターとしてとりあげられている。しかし、*in vitro* 混合転写系でプロモーター

を個別に解析した結果、*rrnE_{p2}* は緊縮プロモーターではないことがわかった。
また、最近他の *rrn* オペロンでも同様の報告がなされている。^(118, 119, 120)

したがって、緊縮配列は緊縮プロモーターであるための必要条件ではある

が十分条件とは言えない。何か別な要因がからんでいることを示唆して

いる。

第6章 考察……複数プロモーター系の転写

第1節 複数プロモーター系

一般に、1つのオペロンには1つのプロモーターがあり、転写産物も1種類である。しかし、例外的にプロモーターを複数持つ multiple-promoter system (複数プロモーター系) オペロンが知られている。

最も有名な複数プロモーター系オペロンは リボソーム RNA オペロンである。リボソーム RNA は細胞中に大量に存在している。細胞が生きていくためには まず 転写・翻訳系の 諸装置の 存在が必須であることを考えれば、大量の リボソームが 存在していることもうなづける。翻訳されないリボソーム RNA が大量に産生される機構として 古くから (1) オペロンが複数存在する、(2) プロモーターが複数存在し、見かけ上 オペロンが複数存在する、あるいは (3) リボソーム RNA オペロンの転写を特異的に促進する因子が存在する という3つの可能性が挙げられていた。遺伝的解析および遺伝子クローニングと塩基配列決定により、(1) と (2) の可能性の正しさ、すなわち その実在が証明された。大腸菌染色体上には *rrnA* から *rrnH* まで^(121, 122) (*rrnF* は欠) 7つの リボソーム RNA オペロンが存在し、各々のオペロンが2つずつプロモーターを持っていることが示された。^(123, 124, 125, 126) 7つのオペロンの塩基配列保存度も非常に高いことが示されている。可能性(3)の転

(たとえば表2参照)

写促進因子に関しては報告^人が多いにもかかわらず、いまだにその実体が解明されていない。

ガラクトース (*gal*) オペロンも 2つのプロモーターを持っている。^(127, 128)

gal オペロンは 高等哺乳類の糖分解酵素群であるカタボライト遺伝子^群の一種である。カタボライト遺伝子は 環状AMP (cAMP) と 環状AMP受容蛋白質 (CRP) とにより、転写が制御されている。すなわち、cAMP-CRP複合体により転写が促進されるが、炭素源分解に基づくcAMPの細胞内存在量の低下によりcAMPがCRPから離れ、この結果転写は減少する。後者の状態をカタボライト抑制とか、グルコース効果と言う。このようなカタボライト遺伝子^群の一群において *gal* オペロンが注目されているのは、cAMP-CRP複合体の有無によりプロモーターを使い分けている点にある。*gal* オペロンには 5塩基対 ずれて 2つのプロモーターが存在し、正の制御を受けている時は下流側の、グルコース効果を受けている時は上流側のプロモーターを利用している。*gal* オペロンがなぜ 2つのプロモーターを使い分けるようになったのか、興味あるところである。

in vitro 混合転写系を用いた一連の研究において、リボソーム蛋白質S1サブユニット遺伝子も複数プロモーター系を持つオペロンであることがわかった。その解明過程の詳細は省略するが、約180塩基対の狭い領域内に4つのプロモ-

ターが存在している。Pedersen らのグループによっても、*rpsA* 遺伝子をクローニングしたプラスミドを徐々に欠失させていき、*in vivo* でその発現量を見ることにより 4つのプロモーターの存在を示している。⁽⁸⁷⁾ これら 4つのプロモーターのうち P2とP4は弱いプロモーターであり、*in vitro* 混合転写系で条件をいろいろと変化させても調べた範囲内でほとんど"の転写は P1とP3から始まっていた。P1とP3は約130塩基対へたっている。

一連の *in vitro* 混合転写系を用いた解析において、このような複数プロモーター系オペロンの truncated templates も用いた。リボソーム RNAオペロンの1つ、*rrnEp1* と *rrnEp2*。およびリボソーム蛋白質 S1サブユニット遺伝子の *rpsAp1* と *rpsAp3* である。これら2つのオペロンの4つのプロモーターに関する特性を改めてまとめてみたのが表6である。この表は上流のプロモーターと下流のプロモーターとで性格づけができるのではないかと考えてまとめたものであるが、ここにとりあげた特性をそのような基準で統一することはできなかった。やはり、同一のオペロンに属していても個々のプロモーターが個性を持っており、独立に制御されていることがうかがえる。そこで、オペロンごとにその複数プロモーターの特性と生理的意義とを考察してみたい。

表 6. 複数プロモーター系の特性

プロモーター	パラメーター I (速 度)	パラメーター II (レベル)	至適塩濃度 (37℃)	至適温度 (50mM NaCl)	ppGpp感受性
上流側プロモーター					
<i>rpsAp1</i>	遅い	低い	中塩濃度	高温	感受性
<i>rrnEp1</i>	速い	低い	低塩濃度	中温	感受性
下流側プロモーター					
<i>rpsAp3</i>	速い	高い	低塩濃度	高温	非感受性
<i>rrnEp2</i>	遅い	高い	中塩濃度	中温	非感受性

複数プロモーター系の *rpsA* および *rrnE* 両オペロンの各プロモーター群について、個々のプロモーター特性をまとめた。パラメーター I および II については 図 8, 9, 10, 11, および 12 と表 5 を参照。至適塩濃度については 図 15 および 16 を参照。至適温度は 図 17, 18 および 19 を参照。ppGpp 感受性は 図 21 および 22 を参照。

第2節 *rrnE* オペロン

*rrnE*₂ の RNAポリメラーゼ・プロモーター複合体形成速度が極端に遅いことから考えて、複数プロモーター系といえども もっぱら *rrnE*₁ が使われているものと考えられる。他のグループからも 細胞内の存在量比も プロモーター 1 由来の RNA が多いことが示されている。^(129,130) また、緊急制御を受け、その制御の速効性から考えても *rrnE*₁ が主要プロモーターであることと示していると言えよう。*rrnE*₂ は 生命維持に必要な最低限の転写を供給するのに 主要な意義があるものとする。これらの議論は、*in vitro* 混合転写系において single-round の転写ではなく multiple-round の転写を行う系で 経時変化を追っていけば、特性づけがさらにほゞきりしたものとなると思う。

第3節 *rpsA* オペロン

*rpsA*₁、*rpsA*₃ とともに 同程度の プロモーター強度を示すパラメーター値を示すが、2つのパラメーターともに *rpsA*₃ が 強い傾向を示す。この点では *rpsA*₃ が主要プロモーターであると言える。他方、リボソーム蛋白質の緊急制御という観点からみると、ppGpp 感受性の *rpsA*₁ が主要プロモーターではないかという考えが浮かんでくる。たしかに 多くのリボソ

ーム蛋白質の緊縮制御を受けるが、しかし、S1サブユニットに関してはこの傾向をばきり示したデータが見当たらない。 並に、当 *in vitro* 混合転写系の結果を基にすれば、*rpsA* 遺伝子は緊縮制御作動時に急激な転写抑制を示さず、 $ppGpp$ 感受性の *rpsAp1* の分だけ、すなわち約50%の転写減少を示すのではないかと推量することができる。 もし、*rpsA* オペロン全体としても $ppGpp$ 感受性であるとするれば、 $ppGpp$ 作用時に *rpsAp1* が *rpsAp2* をリモートして転写を抑制する可能性が考えられる。 しかし、 $ppGpp$ の作用は RNAポリメラーゼ-プロモーター複合体の崩壊を促進させることにあるとする考えに基づくならば、両プロモーター間の距離からしてリモートしているとは考えにくい。 今回見てきたのは、複合体形成の平衡レベルだけであるから、 $ppGpp$ が作用した RNAポリメラーゼは複合体形成速度に変化を生じているのかどうかはわからない。 この点も解析すればおもしろいと思う。 いずれにしても、*rpsA* オペロンは *rrnE* オペロンと異なり翻訳される遺伝子であるから、mRNA合成・蛋白質合成の両方をよく検討していかなければなるまい。

第4節 複合転写調節系

rrnE および *rpsA* 両オペロンは、ここまで述べてきたように

独立で 各々に個性を持つ複数のプロモーターをオペロン先端にもつ構造をとっていた。このような巧妙な複数プロモーター系は今までに報告がほとんどない。

しかし、遺伝子がクローニングされ、その構造解析がなされる例が増加するにつれ、オペロン先端には限定されないがオペロン内部に複数のプロモーターが存在していることが明らかになる例も散見されるようになってきている。今回解析を行ったプロモーターの中にも該当する例がある。

$trpP$ は trp オペロン ($trpL EDCBA$) の先端のプロモーターであるが、オペロン内部の $trpD - trpC$ 間に $trpP_2$ の存在が知られている。^(130b)

その機能は長い trp オペロンの下流の転写量を維持するための補助的なプロモーターであると考えられている。また、 $rplJp$ は $rplJL - rpo$

BC オペロンのプロモーターであるが、*in vivo* では上流の $rplKA$

オペロンのプロモーター、 $rplKp$ からの転写が通過転写 (read-through)

にて $rplJL - rpoBC$ オペロン内に達しているという報告もある。⁽¹³¹⁾ この場合

$rplJp$ は $rplKAJL - rpoBC$ オペロン内部のプロモーターということになる。

今後も詳細な遺伝子構造解析が続けられていくと、1オペロン

1プロモーター という概念はくずれ、1オペロン複数プロモーター という概念が一般化してくるかもしれない。もしそうなった時には、同一オペロンに属するプロモーターの生理的意義がどのように分担されているのか、興味ある問題として浮上してくる。1つのオペロンに複数のプロモーター、複数のオペレーター、転写減衰域等が存在する大きな複合した転写調節領域を持つオペロンも登場してくるかもしれない。

終章 *in vitro* 混合転写系の将来

第1節 *in vitro* 混合転写系の有効性

in vitro 混合転写系の特徴は 複数のプロモーターからの転写を全く同一の反応条件下で個別に定量できる点にある。これにより、標識基質の総取り込量を追うだけでは検出することのできなかった各プロモーターごとの転写様相の変動を検出することが可能となり、また ハイブリダイゼーションを利用した定量系のように ある転写量を測定するために何点かの測定を重ねることも不要であるから短時間で結果を定量できるようになった。

この *in vitro* 混合転写系を用いた解析により、プロモーター強度に関する2つのパラメーター、すなわち プロモーター・RNAポリメラーゼ複合体形成の速度と平衡レベルの2つの特性を定量化することができた。また反応条件を塩濃度や反応温度に関して変化させることにより、各々のプロモーターのパラメーターがどのように変化するかということも知ることができた。ppGpp を添加した系では感受性と非感受性のプロモーターを分類できた。さらには、複数プロモーター系の発見、そしてその系における別々の個性を持つプロモーターの存在を明らかにすることができた。このように *in vitro* 混合転写系は 有力な解析系であると言える。

反応条件変化による効果は今のところ 複合体形成の平衡レベルに

関してのみ解析を重ねてきた。これは、プロモーター選択性の変化を明らかにしようとすることを優先したためであるが、複合体形成速度の解析も行えば興味ある結論がさらに引き出せるものと思う。

第2節 転写因子の解析

in vitro 混合転写系の開発の目的は、転写因子が RNAポリメラーゼに作用してその転写活性、特にプロモーター特異性がどう変化するかを解析するのに有効な検出系を確立することであった。そしてこの目的は、本論文で述べてきたように達成され、基礎的データの蓄積とともに興味ある新事実をも明らかにすることができた。この動きと併行して、RNAポリメラーゼと共精製されてくる転写因子候補の分離・精製も進展している。いよいよ転写因子解析の時期が到来したと言える。*in vitro* 混合転写系の今後に期待したい。

第3節 応用

RNAポリメラーゼの転写活性の変化は転写因子の作用によってのみ起きるとは限らない。RNAポリメラーゼ自身の変化によっても生じると考えられる。

RNAポリメラーゼは生命にとって必要不可欠な構成要素であるが

ゆえに、その遺伝的変異の多くは温度感受性変異株として分離される。これらの変異株 RNA ポリメラーゼは *in vitro* 再構成実験でサブユニット機能の解析等に用いられている。多数報告されている変異 RNA ポリメラーゼの中で転写特異性の変化を解析されているものはほとんどなく、*rhoC92* (β' サブユニットの変異株) において stable RNA 合成が低下しているという報告があるのみである。^(131a) *in vitro* 混合転写系で今後、各サブユニットの変異株 RNA ポリメラーゼを体系的に解析することにより、サブユニットがプロモーター強度の2つのパラメーターにどう関係しているのか、塩濃度・反応温度や ppGpp 添加等の反応条件変動に対する RNA ポリメラーゼの対応にどう関係しているかが明らかにされていくものと思う。実際、石浜研究室の野村らにより、プロモーター認識に β のサブユニットだけでなく他のサブユニットも関係していることを示唆する等の興味ある報告がなされている。⁽¹³²⁾

また、大腸菌 RNA ポリメラーゼは *in vivo* においてリン酸化されることが報告されているが、このような化学的修飾がもたらす酵素機能の変化の解析にも、*in vitro* 混合転写系は有用である。

第4節 将来

本論文の冒頭で述べたように大腸菌における遺伝情報発現制御は転写の制御が主要な段階である。そしてその機構は、遺伝子 DNA 側の

調節によるものとするオペロン説が広く認められている。この説によると脇役であるところの RNA ポリメラーゼ"にも重要な制御機構があるとする考えが近年 改めて注目され 研究が続けられている。本論文 に示した私の研究もこの動きの中のひとつである。私は 修士論文の最終章でこの動きについて、大腸菌 RNA ポリメラーゼ"は単に転写するだけの均一の集団ではなく、転写活性が異なる異質酵素の 集団とみる考えが"主流となる時がくるだろう"と語っている。in vitro 混合転写系による転写因子の解析が、そのような時代の到来を 一歩でも早くすることに貢献してくれるものと確信している。

謝辞

本論文で報告した研究内容は長年 RNA ポリメラーゼの研究を続けていられた石浜明先生のもとに在籍したからこそできたものである。先生のご指導および先生と石浜研究室を構成してこられた方々の研究の蓄積なくしてはこの研究は語れない。このことを最初に明記し、深く感謝の意を表わす。

私が在籍していた当時の石浜研究室は石浜先生のほかに福田龍二先生、川上潔博士、長沢治子博士、榎並正芳氏、野村照明氏、および矢野良治氏から構成されていた。以上の方々には実験の現場で手伝っていただいたり、ディスカッションを通じ貴重な意見を与えていただく等々、いろいろな領域でご協力いただいた。また、ウイルス研究所遺伝部門教授 由良隆先生、浅野純子さん、橋本佳宏君、三原真理子さんほか遺伝部門、化学部門の皆さんにもお世話になった。この場を借りて感謝の意を表わす。

in vitro 混合転写系の開発にあたって貴重な意見を寄せて下さった養場弘二先生（京都大学医学部）、ゲルからの DNA 断片抽出に貴重な意見を下さった大森治夫先生（京都大学ウイルス研究所）、転写因子精製時 グラティエント・ゲルの技法を導入して下さい下さった上野明道博士（当時、大阪大学微生物病研究所）、公表に先立ち *lpsA* 遺伝子に関する情報を提供して下さい下さった Steen Pedersen 先生（Denmark）、またプラスミドを分与していただいた大森先生、福田先

生 武藤 昱先生 (当時 広島大学), 小川 英行先生 (大阪大学), T. Atlung 博士 (Denmark), W. Tacon 博士 (England), S. Pedersen 博士 (Denmark), さらに共同研究時のディスカッションを通じ貴重な意見をいただくとともに激励して下さった 高橋 徳也 先生 (新潟大学 歯学部), 泉井 桂先生 (京都大学 理学部) 中田 直樹氏 (当時 静岡大学 理学部) 以上の各氏 にも感謝の意を表わす。

最後に、京都大学 在学中の5年間 お世話になった下宿の久次米 千恵さん (京都市左京区吉田本町五), 財政的な援助をして下さった日本育英会、および両親 梶谷 貴・タツ子 に感謝する。

参考文献

1. Crick FHC (1958) Symp. Soc. Exp. Biol. 12 : 138.
2. Losick R, & Chamberlin M, eds. (1976) "RNA Polymerase", Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
3. Osawa S. et al. eds.(1980) "Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes", University of Tokyo Press, Tokyo.
4. Yura T, & Ishihama A (1979) Annu. Rev. Genet. 13 : 59.
- 4a. Lupski JR, Smiley BL, & Godson GN (1983) Mol. Gen. Genet. 189 : 48.
5. Jacob F, & Monod J (1961) J. Mol. Biol. 3 : 318.
6. 細胞工学臨時増刊「DNAの構造と発現... DNA研究30年の歩みと将来...」⁽¹⁹⁸³⁾ 矢野潤社(東京)
7. Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, & Bautz EKF (1969) Nature 221 : 443.
- 7a. Seifert W, Rabussay D, & Zillig W (1971) FEBS Lett. 16 : 175.
- 7b. Zillig W, Fujiki H, Blum W, Janekovic D, Schweiger M , Rahmsdorf J-J, Ponta H, & Hirsch-Kauffmann M (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 2506.
- 7c. Losick R, & Pero J (1981) Cell 25 : 582.
8. Ishihama A (1980) Adv. Biophys. 14 : 1.
9. Ishihama A, & Fukuda R (1980) Mol. Cell. Biol. 31 : 177.
10. Ishihama A, Taketo M, Saitoh T, & Fukuda R (1976) in RNA Polymerase (Losick R, & Chamberlin M, eds.) : 485.
11. Bachmann BJ (1983) Microbiol. Rev. 47 :180.
12. Lindahl L, Post L, Zengel J, Golbert SF, Strycharz WA, & Nomura M (1977) J. Biol. Chem. 252 : 7365.
13. Post LE, & Nomura M (1979) J.Biol. Chem. 254 :10604.
14. Jaskunas SR, Burgess RR, Lindahl L, & Nomura M (1976) in RNA Polymerase (losick R, & Chamberlin M, eds.) : 539.
15. Post LE, Strycharz GD, Nomura M, Lewis H, & Dennis PP (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 :1697.
- 15a. Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Guryev SO, Chertov OY, Modyanov NN, Grinkevich VA, Makarova IA, Marchenko TV, PolovikovaIN, Lipkin VM, & Sverdlov ED (1981) Eur.J. Biochem. 116 : 621.
16. Squires C, Krainer A, Barry G, Shen W-F, & Squires CL (1981) Nuc. Acids

- Res. 9 :6827.
- 16a. Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Guryev SO, Salomatina IS, Shuvaeva TM, Lipkin VM, & Sverdlov ED (1982) *Nuc. Acids Res.* 10 : 4035.
18. Burton Z, Burgess RR, Lin J, Moore D, Holder S, & Gross CA (1981) *Nuc. Acids Res.* 9 : 2889.
17. Nakamura Y, Osawa T, & Yura T (1977) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 74 : 1831.
19. Saitoh T, & Ishihama A (1979) *Biochemistry* 18 :979.
20. Gilbert W (1976) in RNA Polymerase (Losick R, & Chamberlin M, eds.) : 193.
21. Rosenberg M, & Court D (1979) *Annu. Rev. Genet.* 13 : 319.
22. Siebenlist U, Simpson RB, & Gilbert W (1980) *Cell* 20 : 269.
23. Pribnow D (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 : 784.
24. Stefano JE, & Gralla JD (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 :1069.
25. Russell DR, & Bennett GN (1982) *Gene* 20 : 231.
26. Adhya S, & Gottesman M (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 47 : 967.
- 26a. Yanofsky C (1981) *Nature* 289 :751.
27. Seeberg PH, Nüsslein C, & Shaller H (1977) *Eur. J. Biochem.* 74 : 107.
28. Marquat LE, & Reznikoff WS (1978) *J. Mo.;. Biol.* 125 : 467.
- 28a. Stefano JE, & Gralla JD (1980) *J. Biol. Chem.* 255 :10423.
- 28b. Reznikff WS, & Abelson JN (1978) in " *The Operon* " (Miller JH, & Reznikoff WS, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York : 221.
- 28c. Platt T (1978) in The Operon (Miller JH, & Reznikoff WS, eds.) : 263.
29. Ishihama A, Fukuda R, Kawakami K, Kajitani M, & Enami M (1980) in Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes (Osawa S et al., eds.) : 105.
30. Ishihama A, Kajitani M, Enami M, Nagasawa-Fujimori H, & Fukuda R (1983) *Microbiology* : 4.
31. Travers A (1970) *Nature* 263 : 641.
32. Cashel M, & Gallant J (1969) *Nature* 221 : 838.
33. Gallant JC (1979) *Annu. Rev. Genet.* 13 : 393.
34. Maaloe O (1979) in "Biological Regulation and Development" (Goldberger RF,

- eds.), Plenum Press, New York, 1 : 487.
35. Travers A (1976) Mol. Gen. Genet. 147 :225.
 36. Pongs O, & Ulbrich N (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 :3064.
 37. Debenham PG, Pongs O, & Travers AA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 870.
 38. Travers AA, Kamen RI, & Schleif RF (1970) Nature 228 : 748.
 39. Travers AA (1973) Nature 244 :15.
 40. Travers AA, Debenham PG, & Pongs O (1980) Biochemistry 19 :1651.
 41. Davison J, Pilarski LM, & Echols H (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63 : 168.
 42. Ramakrishna T, & Echols H (1973) J. Mol. Biol. 78 : 675.
 43. Kung H, Spears C, & Weissbach H (1975) J. Biol. Chem. 250 : 1556.
 44. Greenblatt J, Li J, Adhya S, Friedman DI, Baron LS, Redfield B, Kung H, & Weissbach H (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 :1991.
 45. Fukuda R, Iwakura Y, & Ishihama A (1974) J. Mol. Biol. 83 : 353.
 46. Iwakura Y, Fukuda R, & Ishihama A (1974) J. Mol. Biol. 83 : 369.
 47. Darlix J-P, Sentenac A, & Fromageot P (1971) FEBS Lett. 13 : 615.
 48. Travers AA, Kamen RI, & Schleif RF (1970) Nature New Biol. 228 : 748.
 49. Biebricher CK, & Druminski M (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 866.
 50. Ishihama A, & Saitoh T (1979) J. Mol. Biol. 129 : 517.
 51. Burgess RR (1969) J. Biol. Chem. 244 : 6168.
 52. Lathe R, Lecocq J-P, & Resibois A (1977) Mol. Gen. Genet. 154 : 43.
 53. Lathe R (1978) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 83 : 37.
 54. Lathe R, Buc H, Lecocq J-P, & Bautz EKF (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 3548.
 55. Friedman DI, Baumann M, & Baron LS (1976) Virology 73 : 119.
 56. Isaksson LA, & Takata R (1978) Mol. Gen. Genet. 161 : 9.
 57. Takata R, & Isaksson LA (1978) Mol. Gen. Genet. 161 : 15.
 58. Friedman DI, & Baron L (1974) Virology 58 : 141.
 59. Friedman DI, Schauer AT, Baumann MR, Baron LS, & Adhya S (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 1115.

60. Chakrabarti SL, Gorni L (1975) J. Bacteriol. 121 : 670.
61. Chakrabarti SL, & Gorni L (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 2084.
62. Chakrabarti SL, & Gorni L (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 : 1157.
63. Bagdasarian MM, Izakowska M, & Bagdasarian M (1977) J. Bacteriol. 130 ; 577.
64. Guarente LP, & Beckwith J (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 294.
65. Guterman SK, & Howitt C (1979) Mol. Gen. Genet. 169 : 27.
66. Georopoulos CP, & Hohn B (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 131.
67. Hendrix RW, Tsui L (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 136.
68. Enami M, & Ishihama A (1984) J. Biol. Chem. 259 : 526.
69. Gonzalez N, Wiggs J, & Chamberlin M (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182 : 404.
70. 梶谷正行, 榎並正芳, & 石浜明 (1980) 第3回 日本分子生物学会年会講演 : 要旨集 p73.
71. 梶谷正行, 長沢治子, 榎並正芳, 橋田龍二, & 石浜明 (1981) 第4回 日本分子生物学会年会講演 : 39.
72. Ishihama A, Ikeuchi T, & Yura T (1976) J. Biochem. 79 : 917.
73. Ishihama A, Ikeuchi T, Matsumoto A, & Yamamoto S (1976) J. Biochem. 79 : 927.
- 73a. 蛋白質・核酸・酵素 臨時増刊「遺伝子操作」(1981) 共立出版(東京)
- 73b. 蛋白質・核酸・酵素 臨時増刊「組換え遺伝子の細胞への導入と発現」(1983) 共立出版(東京)
74. Kajitani M, & Ishihama A (1983) Nuc. Acids Res. 11 : 671.
75. Kajitani M, & Ishihama A (1983) Nuc. Acids Res. 11 : 3873.
76. Kajitani M, & Ishihama A (1984) J. Biol. Chem. 259 : 1951.
77. Backman I, Ptashne M, & Gilbert W (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 : 4174.
78. Dr. T. Atlung 私信.
79. Tacon W, Carey N, & Emtage S (1980) Mol. Gen. Genet. 177 : 427.
80. Dr. R. Fukuda 私信.
81. Dr. S. Pedersen 私信.
82. Dr. A. Muto 私信.
83. Horii T, Ogawa T, & Ogawa H (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 313.
84. Bolivar F, & Backman K (1979) Meth. Enzymol. 68 : 245.
85. Dickson RC, Abelson J, Barnes WM, & Reznikoff WS (1975) Science 187 : 27.
86. Yanofsky C, Platt T, Crawford IP, Nichols BP, Christie GE, Horowitz H,
van Cleemput M, & Wu AM (1981) Nuc. Acids Res. 9 : 6647.

87. Pedersen S, Skov J, Christensen T, Johnsen M, & Fiil N (1982) in "Translational and Transcriptional Regulation of Gene Expression" (Sager B, & Grunberg-Manago M, eds.), Elsevier/North Holland Inc., New York : 119.
88. de Boer HA, Gilbert SF, & Nomura M (1972) Cell 17 : 201.
89. Maniatis T, Fritsch EF, & Sambrook (1982) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
90. Schnier J, & Isono K (1982) Nuc. Acids Res. 10 : 1857.
91. Dr.S.Pedersen との共同研究 (投稿中)
92. von Hippel PH, Bear DG, Winter RB, & Berg OG (1982) in "Promoters" (Rodriguez RL, & Chamberlin MJ, eds.), Praeger Publishing, San Francisco : 3.
93. Chamberlin MJ, Rosenberg S, & Kadesch T (1982) in Promoters : 34.
94. Johnston DE, & McClure WR (1976) in RNA Polymerase : 413.
- 94a. Carpousis AJ, & Gralla JD (1980) Biochemistry 19 : 3245.
- 94b. Gralla JD, Carpousis AJ, & Stefana JE (1980) Biochemistry 19 : 5864.
95. Naito S, & Ishihama A (1975) Biochem. Biophys. Acta 402 : 88.
96. Kawakami K, Saitoh T, & Ishihama A (1979) Mol. Gen. Genet. 174 : 107.
97. Enami M, & Ishihama A (1982) Mol. Gen. Genet. 185 : 373.
98. Yamamori T, Ito K, Nakamura Y, & Yura T (1978) J. Bacteriol. 134 : 1133.
99. Lemaux PG, Herendeen SL, Bloch PL, & Neidhardt FC (1978) Cell 13 : 427.
100. McClure WR (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 5634.
101. Hawley DK, & McClure WR (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 6381.
102. Hawley DK, & McClure WR (1982) J. Mol. Biol. 157 : 493.
103. Shih M-C, & Gussin GN (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 496.
104. Shih M-C, & Gussin GN (1983) Cell 34 : 941.
105. Horowitz H, & Platt T (1982) Nuc. Acids Res. 10 : 5447.
106. de Boer HA, Comstock L, & Vasser M (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 21.
107. 白川昌広, 鈴木敏雄, & 松原謙一 (1983) 第6回日本分子生物学会年会 講演 : 要旨集 p.45.
108. Sanzay B (1979) J. Bacteriol. 138 : 40.
109. Kubo M, Kano Y, Nakamura H, Nagata A, & Imamoto F (1979) Gene 7 : 153.
110. 泉井 雄 博士 (京都大学理学部) との共同研究 (投稿予定)

- 110a. van Ooyen AJ, de Boer HA, AB G, & Gruber M (1975) *Nature* 254 : 530.
111. Mizushima-Sugano J, Miyajima A, & Kaziro Y (1983) *Mol. Gen. Genet.* 189 : 185.
112. Kingston RE, Nierman WC, & Chamberlin MJ (1981) *J. Biol. Chem.* 254 : 2787.
113. Kingston RE, & Chamberlin MJ (1981) *Cell* 27 : 523.
114. Travers AA (1980) *J. Bacteriol.* 141 : 973.
115. Cashel M, Hamel E, Shapshak P, & Boquet (1976) in "Control of Ribosome Synthesis" (Kjeldgaard NO, & Maaloe O, eds.), Munksgaard, Copenhagen : 279.
116. Travers AA (1980) *J. Mol. Biol.* 141 : 91.
117. Ota Y, Kikuchi A, & Cashel M (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 5799.
- 117a. Hamming J, AB G, & Gruber M (1980) *Nuc. Acids Res.* 8 : 3947.
118. Glser G, Sarmientos P, Cashel M (1983) *Nature* 302 : 74.
119. Sarmientos P, Sylvester JE, Costente S, & Cashel M (1983) *Cell* 32 : 1337.
120. Gourse RL, Stark MJ, & Dahlberg AE (1983) *Cell* 32 : 1347.
121. Kenerley ME, Morgan EA, Post LE, Lindahl L, & Nomura M (1977) *J. Bacteriol.* 132 : 931.
122. Kiss A, Sain B, & Venetianer P (1977) *FEBS Lett.* 79 : 77.
123. Glaser G, & Cashel M (1979) *Cell* 16 : 111.
124. Gilbert SF, de Boer HA, & Nomura M (1979) *Cell* 17 : 211.
125. Young RA, & Steiz JA (1979) *Cell* 17 : 225.
126. Shen W-F, Squires C, & Squires CL (1982) *Nuc. Acids Res.* 10 : 3303.
127. Musso R, DiLauro R, Rosenberg M, & DeCrombrugge B (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 106.
128. Aiba H, Adhya S, & de Crombrugghe B (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 11905.
129. Lund E, & Dahlberg JE (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 5480.
130. de Boer H, & Nomura M (1979) *J. Biol. Chem.* 254 : 5609.
131. Barry G, Squires CL, & Squires C (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4922.
- 131a. Yoshinaga K, & Sugiura M (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 479 : 172.
132. Nomura T, Ishihama A, Kajitani M, Takahashi T, Nakada N, & Yoshinaga K (1984) *Mol. Gen. Genet.* 193 : 8.