

3.

遺伝子発現ヒエラルキーの決定機構： 発現遺伝子はこうして選ばれる

石浜 明

国立遺伝学研究所分子遺伝研究系

共同研究者：和田 明（大阪医大・物理） 田中 寛（東大・分生研）
嶋本 伸雄（遺伝研・構造遺伝研究セ） 禾 泰寿（埼玉医大・生化学）

多くの生物でゲノム全シーケンスが決定され、ゲノムに存在する遺伝子の全貌が推定できる時代になった。次の時代の攻究課題は、ゲノム全遺伝子のなかから、どれが選ばれ、どの程度に発現するかは、どのようにして決まるのかを解明することである。ゲノム全遺伝子の転写包括制御機構の解明を目指し、(1) ゲノムに推定された全遺伝子のなかで蛋白質にまで発現されている遺伝子を同定し、またその発現制御の実態を知ることと、(2) そうした遺伝子発現の順列（ヒエラルキー）が決定される仕組みを分子のレベルで解き明かすことを目指した研究を、並行して実施した。全遺伝子を分析対象とした包括的研究に利用できる素材は、蓄積された全遺伝子についての情報量と、現在の技術水準から、微生物に限られる。そのために、原核生物の代表として大腸菌 (*Escherichia coli*) を解析し、その結果を真核生物と比較する目的で、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を解析した。

大腸菌で発現している全遺伝子を同定する

大腸菌ゲノムには約4,000の遺伝子の存在が推定されている。しかし、最も良く研究されてきたモデル生物の大腸菌でも、遺伝解析で遺伝子として同定されているのは凡そ半分、二次元電気泳動で、同定された蛋白質は約1,000に過ぎない。しかも、分画された蛋白質の実体が分かっていたのは、凡そ200にしか過ぎなかった。従来広く利用されて来た、O'Farrell法の二次元電気泳動では、細胞破碎後の蛋白質の変性に由来するスポットが多く、発現遺伝子の全容を正確に知る目的では、十分ではなかった。そこで、新たに、RFHR (radical-free highly reducing) 法二次元電気泳動法を開発し、大腸

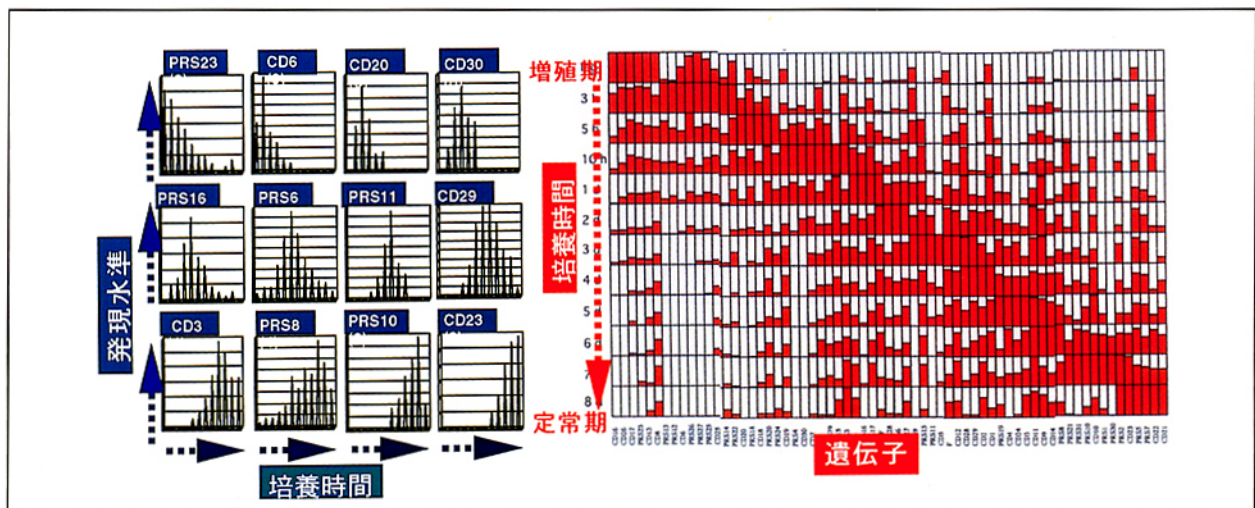


図1 大腸菌定常期特異的遺伝子発現ヒエラルキー

菌全蛋白質の同定を最初からやり直した [RFHR法二次元電気泳動装置は市販製品として普及させた]。その結果、現在までに、合計470蛋白を同定した (京大・和田千恵子博士との共同研究)。なお、各種細菌のプロテオームで同定された成分は300にも到達しない。

RFHR法の有用性が確認できたので、各種培養条件でも発現遺伝子の変化の観測を開始した。手始めに、定常期大腸菌のプロテオーム解析を行い、65の定常期に特異的に発現する遺伝子を同定した。培養1週間の変化を解析したところ、これら蛋白質発現時期がずれていることが判明し (図1)、大腸菌分化の遺伝子発現カスケードの存在を予想させた。新規方法による大腸菌プロテオーム解析と並行して、遺伝子発現一次産物RNAの全種類を同定するトランスクリプトーム解析を開始した。培養条件を変えた大腸菌全転写産物の分析に加えて、大腸菌全4,000遺伝子候補のそれぞれを破壊した菌株のmRNA解析による遺伝子機能予測研究に協力した (九大・三木健良博士、奈良先端大・森 浩禎博士との共同研究)。

分化段階の違う大腸菌細胞集団を分画する

大腸菌の定常期移行期に、多くの遺伝子が逐次発現していることが判明した。定常期特異的遺伝子の生理機能を知るためには、分化段階を揃えて、均一細胞集団を解析に利用する必要がある。細胞集団を物理的に分画する多くの試みを行った結果、Percoll 密度勾配遠心で、分化時期の異なる細胞集団を分画することに成功した (図2)。大腸菌加齢または分化の進行に伴って、細胞密度が不連続に増加した。これは予想もしなかった発見である。細胞密度の増加が何に起因するかは、まだ明らかでない。しかし、今後は、均一細胞集団を用いて、遺伝子発現包括制御の解析が可能となった。

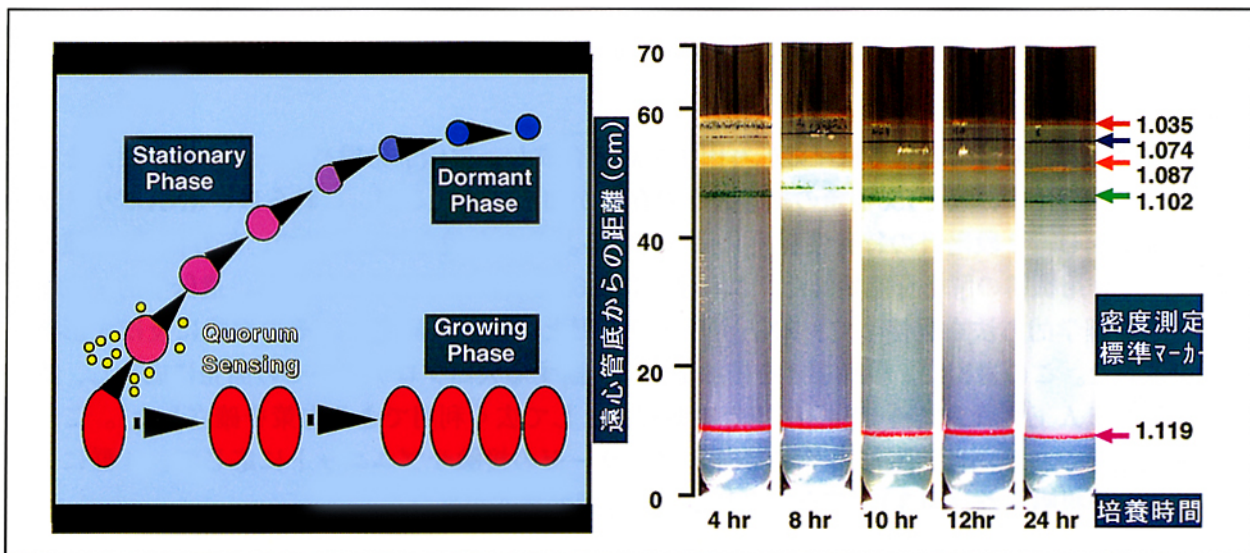


図2 分化段階の異なる大腸菌の密度勾配遠心による分画

大腸菌遺伝子発現パターンを変化させる転写装置の機能分化を知る

大腸菌ゲノムには約4,000の遺伝子があるが、転写装置は2,000分子しかない。転写装置が、発現し利用する遺伝子を選択していると我々は提唱して来た。もしこの仮説が正しければ、細胞内には約2,000分子の転写装置の遺伝子間での分配は、細胞培養環境の変動に伴って、刻々と変化している筈である。RNAポリメラーゼ・コア酵素は、2段階の調節蛋白群との相互作用で、遺伝子選択の特異性が変化する。1段階目では、7種類のシグマ因子のどれかを結合してホロ酵素に変換し、2段階目

では、約150種類の転写因子のどれかと相互作用をしてさらに特異性が変化する（図3）。シグマ因子7種類の全てについて、細胞内濃度、RNAポリメラーゼ・コア酵素への結合強度の測定に成功し、この機能分化の全貌が明らかに出来た。各種の細胞培養条件でシグマ因子濃度を測定した結果から、確かに各シグマ因子の細胞内存在量が、遺伝子発現ヒエラルキー決定要因のひとつになっていることが判明した。しかし、シグマ因子存在量と、支配下遺伝子の発現量の比較から、シグマ因子は存在しても働いていない状況が存在することが予測できた。シグマ因子の活性調節要因を探索し、アンチシグマ因子を発見した。その結果、細菌では、シグマ因子の量の変化と活性調節の両面で、遺伝子転写制御を行っていることが予測されるに至った。

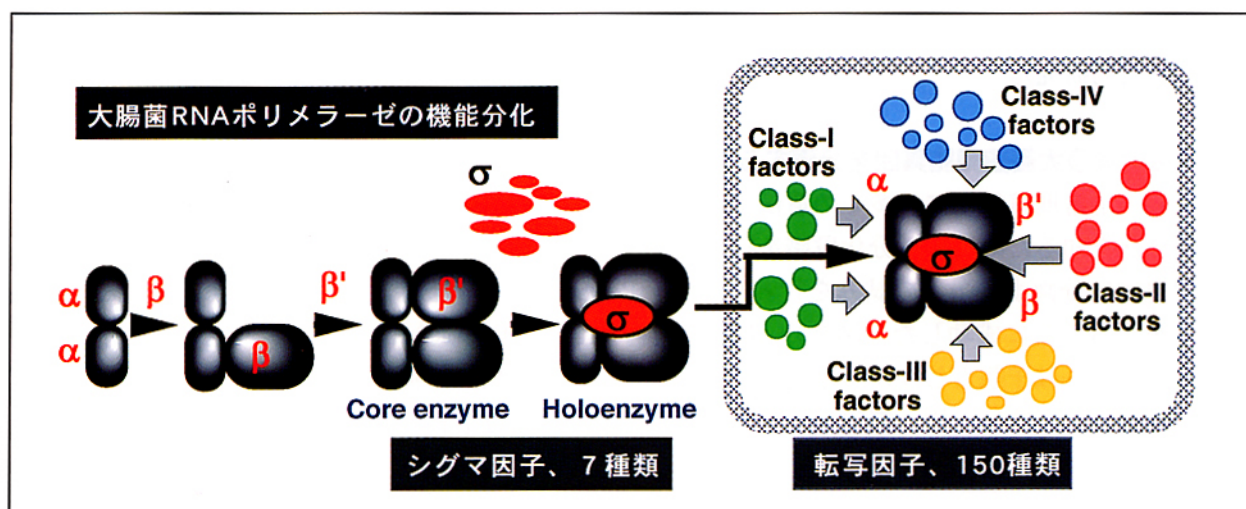


図3 RNAポリメラーゼの機能変換による遺伝子発現パターン変化

大腸菌は、成育環境に応じて様々の転写因子を誘導合成し、遺伝子発現パターンの切り換えを行っている。大腸菌には、凡そ150種類の転写因子の存在が知られているが、これらは、RNAポリメラーゼに直接接触し、2段階目の特異性変換に係っている。その全貌を知る目的で、転写因子150種の全てについて作用機構の解析を開始した。これまでに約60種類の転写因子を純化し、遺伝学的・生化学的・生物物理学的方法を駆使して、RNAポリメラーゼとの接点の同定と、その機能に及ぼす影響の分析を進めた。この過程で、接触相手を接触部位で切断する人口プロテアーゼの開発に成功し、威力を発揮した [人工プロテアーゼFeBABEを市販製品として広く利用できる方策を確立した]。これまでの研究結果から我々は、転写因子がRNAポリメラーゼの接触サブユニットに応じて、4群に分類できることを提唱した（図3）。接点に応じて、転写調節様式が異なる。

分裂酵母の転写装置の機能制御を探る

真核生物の遺伝子発現機構の研究は、多くの個別遺伝子を対象として、転写調節に関する蛋白因子の探索が盛んであるが、ゲノム全体の遺伝子発現ヒエラルキーの解明を目指した研究はまだ殆どなされていない。転写酵素RNAポリメラーゼの分子の実体不明であることに依っていた。我々は、分裂酵母を素材として、RNAポリメラーゼの実体解明を先ず目標として研究を開始した。その結果、今日までに、RNAポリメラーゼII（mRNA合成酵素）については、12種類のサブユニット全部の遺伝子を同定単離し、構造決定を行った。また、RNAポリメラーゼI（rRNA合成酵素）についても、ほぼ14種サブユニット全ての遺伝子を単離した。

RNAポリメラーゼII全サブユニットの細胞内濃度を測定したところ、サブユニット間で、10倍以上の差があり、それぞれの生理的役割の差が示唆された。サブユニット間の接触地図を作成し、サブユニット集合機構を推定した(図4)。最小濃度のサブユニット3(Rpb3)を規準とすると、細胞内のRNAポリメラーゼIIの分子数は、原核生物同様、ゲノム遺伝子総数より少ない。従って、原核生物と同じ包括転写制御がはたらいっていると推定された。この結果から、遺伝子発現ヒエラルキーの決定には、RNAポリメラーゼと直接相互作用をする転写因子の同定が重要と判断し、各サブユニットと相互作用をする転写因子の組織的探索を開始した。分裂酵母RNAポリメラーゼの特異性変換に作用する転写因子を検索する目的で、ふたつのアプローチを採択した。ひとつは、各サブユニット遺伝子に変異を導入し、変異形質を解析し、さらに抑圧変異を単離して、相互作用蛋白を同定する遺伝学的方法である。一方、各サブユニットにタグを付加し、生体から蛋白複合体を単離し、結合因子を同定する生化学的方法である。これらの実験から、すでに各サブユニットと相互作用をする転写因子が多数分離され始めた。

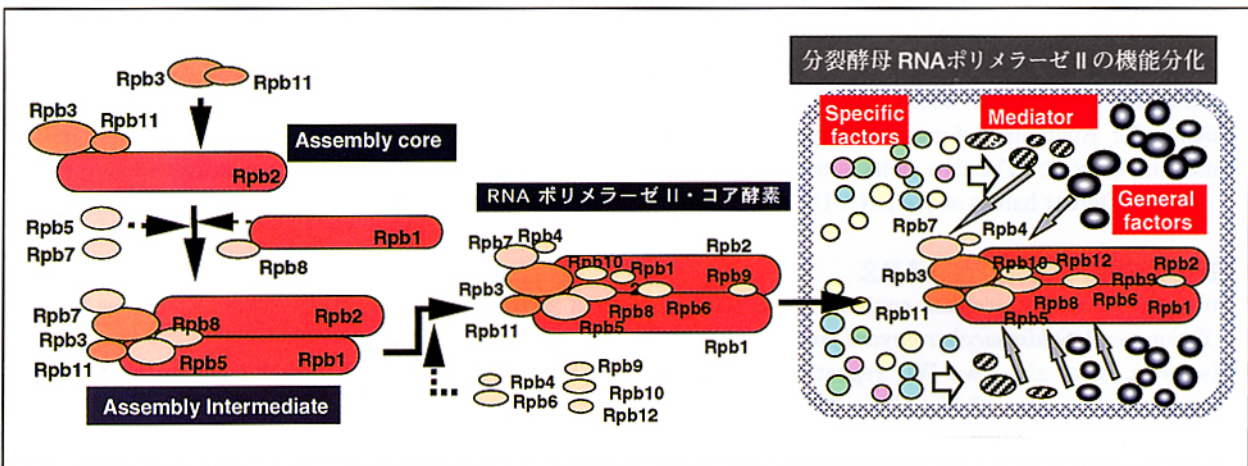


図4 RNAポリメラーゼIIのサブユニット集合機構と機能制御

研究成果から見た展望

細菌や酵母では、ゲノム全遺伝子の転写パターンは、限られた数量の転写装置の分配で決定されることが明らかとなった。転写装置の分配は、転写因子との相互作用によるRNAポリメラーゼの遺伝子選択認識の特異性変化で支配される。転写装置の中核を形成するRNAポリメラーゼを起点として、転写因子のネットワークの全体像を解明することが、差し迫った課題である。蛋白質相互作用の効率的で精度の高い検出法の開発と利用が、課題追及の鍵である。

研究成果の公表 (主要発表論文)

大腸菌RNAポリメラーゼ関連論文

- Makinoshima, H. *et al.*: Discontinuous transition of *E. coli* phenotype during growth transition from exponential to stationary phase. *Mol. Microbiol.*, in press (2001)
- Yamamoto, K. *et al.*: Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Mol. Microbiol.* **41**, 1187-1198 (2001)
- Fujita, N. *et al.*: Structural requirements for the interdomain linker of α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry* **39**, 6243-6249 (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. *et al.*: Mapping of subunit-subunit contact surfaces on the β' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **275**, 3583-3592 (2000)
- Ohnuma, M. *et al.*: 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)
- Colland, F. *et al.*: Positioning of σ^S , the stationary phase σ factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. *EMBO J.* **18**, 4049-4059 (1999)
- Ishihama, A.: Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* **3**, 135-143 (1999)
- Maki, Y. *et al.*: Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. *Genes Cells* **5**, 965-974 (2000)
- 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)
- Talukder A.Z. *et al.*: Growth phase-dependent variation in protein composition of *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**, 6361-6370 (1999)
- 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)
- Owens, J.T. *et al.*: 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)
- Ishihama, A.: Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Genet. Devel.* **7**, 582-588 (1997)
- Murakami, K. *et al.*: The two alpha subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact different halves of the DNA UP element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1709-1714 (1997)

分裂酵母RNAポリメラーゼ関連論文

- Kimura, M. *et al.*: 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)
- Mitsuzawa, H. *et al.*: Two WD repeat-containing TAFs in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 17117-17124 (2001)
- Imazawa, Y. *et al.*: 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.* **164**, 852-859 (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**, 13-24 (2001)
- Ishiguro, A. *et al.*: Ppb6 subunit of the fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIIS. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1263-1270 (2000)
- Imai, K. *et al.*: The fission yeast *rpb17* encodes a functional homolog of AC19, a subunit of RNA polymerases I and III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 364-373 (1999)
- Sakurai, H. *et al.*: Rpb4 subunit of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II is essential for cell viability and similar in structure to the corresponding subunits of higher eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7511-7518 (1999)
- Wlassoff, W.A. *et al.*: 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)
- Ishiguro, A. *et al.*: 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. *et al.*: Subunits of yeast RNA polymerases in structure and function. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 190-195 (1998)
- Kimura, M. *et al.*: RNA polymerase II subunits 2, 3 and 11 form a core subassembly with DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 25851-25855 (1997)

ウイルスRNAポリメラーゼ関連論文

- Honda, A. *et al.*: Differential roles of vRNA and cRNA in functional modulation of the Influenza virus RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **276**, 31179-31185 (2001)

