

## 時間差解析法による転写調節因子の探索と調節機構の解明

### Kinetic search for transcription factors and their regulatory mechanisms

|       |   |       |
|-------|---|-------|
| 代表研究者 | 国立遺伝学研究所助教授<br>Assoc. Prof., National Institute of Genetics<br>Nobuo SHIMAMOTO    | 嶋本伸雄  |
| 協同研究者 | 総合大学院大学研究員<br>Associate, Graduate University for Advanced Studies<br>Miki FUJIOKA | 藤岡美輝  |
|       | 京都府立医科大学大学院<br>Student, Kyoto Prefec. Univ. of Medical College<br>Tatsumi HIRATA  | 平田たつみ |

New methods of searching for new type of transcription factors and of studying their functions were developed. Ends of a DNA fragment containing a promoter were fixed to agarose or acrylamide beads by the avidin/biotin strong binding. This fixed DNA showed little steric hindrance to restriction enzymes, *E. coli* RNA polymerase and *NusA* protein. Rapid dilution and substrate swap were the newly developed tools. Application to *E. coli* transcription revealed that productive RNA synthesis and  $\sigma$  subunit release requires  $\beta, \gamma$ -phosphodiester bond of ATP.

#### 研究目的

細胞内での最も重要な反応制御の一つは、遺伝子の発現の調節である。その最初の段階は、DNAがRNAに写し取られる転写である。転写の調整を行う蛋白質、つまり、転写調節因子が高等動物でも発見され精製されるようになってきた。現在、この分野での技術的困難は次の3点である。

1. 精製された蛋白質からなる試験管内 (*in vitro*) 再構成転写系が確立されておらず、調節因子の活性の定量的測定が不可能で、DNA上の調整に関係する部分に強固に結合する因子しか同定できない、DNAに結合と解離を繰り返している因子や、生成RNAに結合する因子は同定できない。
2. 調節因子の細胞内での含量が少なく、不純物からの分離が生化学的に困難な場合が多い。
3. 興味深い因子には、ごく微量しか存在せず、多量の高価な材料から精製を開始しな

ればならないものが多い。

この研究は、これらの困難を乗り越えて、より多くの調節因子を同定するために、外から加えたDNA上で同期した状態で転写反応を行い、調節因子の転写に伴う転写複合体への出入りを時間変化として追跡する方法を確立することが目的である。この新しい方法の原理は、注目する遺伝子のDNAの一端を担体に固定し、遠心またはろ過で短時間で反応溶液からDNAを結合している蛋白とともに分離できるようにしておく。このようなDNAを固定化オペロンと命名した。

反応は、細胞抽出液等の粗精製画分などの転写装置を含む溶液と固定化DNAを混合しておき、それに基質ヌクレオチドを混合することによって同期した転写の開始を行う。転写開始から一定の時間(秒-分)後に、大過剰希釈により反応を停止させ、固定化DNAを回収し、各時刻にDNAに結合している蛋白をゲル電気泳導などで分離定量する。転写の進行と同期して結合または解離す

る蛋白があれば、それが転写因子である可能性が大きい。

### 研究経過

この63-64年度に行われた研究の経過は三つに区分することができる。第1は、DNAを樹脂ビーズにうまく固定化して、固定化オペロンを作製する段階、第2は固定化オペロンに適応した rapid kinetics (高速反応論) の手法を開発し、大腸菌の系を用いてその有用性を実証する段階。第3は、その手法を用いて Hela 細胞核抽出液から新しいタイプの転写因子を捜し出す段階である。

研究の場は、嶋本伸雄の移動に伴って、63年8月に、広島大学総合科学部から、国立遺伝学研究所遺伝情報研究センター構造研究室に移動した。共同研究者の平田たつみは第1の段階に参加し、藤岡美輝は第2、第3に参加した。

### 研究成果

研究成果を各々の段階ごとにまとめた。

1. 蛋白質・核酸相互作用に影響しないように、DNAを樹脂ビーズに固定化する。

転写調節を動的に解析して、その機構を決定する手段として、担体固定化オペロンは次のような特色を持たなければならない。1) 同期した転写の開始が可能である。2) 転写を停止させるために、EDTA 以外にも大過剰希釈、ろ過、遠心分離があり、溶液の組成も自由に選べ、転写複合体中の調節因子がより保存される。3) 遊離の調節因子と転写複合体とが簡単に分離できる。

このような特色を持ちながら、転写の鋳型としての特性も保存できるものとして、DNAの不整末端をDNAポリメラーゼによりビオチン化ヌクレオチドで埋め、共有結合に匹敵するぐらい強固なビオチン・アビジンの結合を利用し、アビジンアガロースまたはアビジンアクリルアミドに結合させたものを作製した。ビオチン化していないDNAとアガロースの非特異的結合は高塩濃度で破壊されるが、ビオチン化したものは、プロテアーゼ/フェノール処理で初めて破壊されることなどから、ビオチン化DNAは特異的に片端または両末端で、ビオチン・アビジン結合を通じて固定化されていることが明らかになった、両端の固

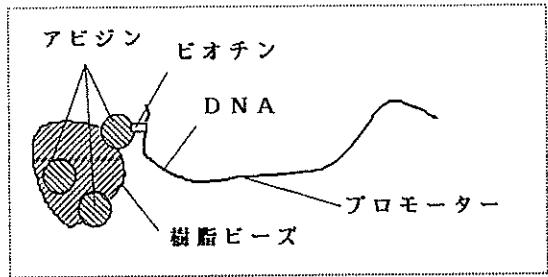


図1. 固定化オペロンの構造

定化率には差がある。24塩基対しか固定化末端から離れていない部位も制限酵素で切断され、蛋白・DNA相互作用が保存された固定化であることが明らかになった。

転写特性がどのレベルまで保存されているのか検討するために、遊離DNAとの比較を、大腸菌RNAポリメラーゼを利用して行った。また、転写産物RNAに結合する転写停止因子 *NusA* 蛋白を加えて、その影響の比較も行った。結果はいずれも、遊離DNAと固定化DNAの差は認められず、転写の鋳型として固定化オペロンは優れていることが明らかになった。

2. 固定化オペロンに適した rapid kinetics の開発と、大腸菌転写開始因子  $\sigma^{70}$  の転写複合体からの解離の機構

固定化オペロンの rapid kinetic な手法の特徴は、反応の停止法にある。DNA上に存在する転写装置とRNA産物の転写複合体がすばやく溶液から分離できることである。いくつかの可能性のうち、最も一般的と思われる大過剰希釈とろ過を試みた。RNA産物の分析に最も効率が良かったのが、ろ過 (rapid dilution) であったが、溶液中の蛋白質がろ過膜 (ニトロセルロース、ガラス) に吸着するため、蛋白質の分析には不適であった。

一方、RNA合成は基質の濃度を  $0.1 \mu\text{M}$  以下に希釈すると中断した。全体の体積が1,000倍になるので、その後の解析のために遠心して転写複合体を回収した。このため、収率が90-50%と不安定になるが、その他の要求はすべて満たすものであった。遠心分離した転写複合体に再び基質を添

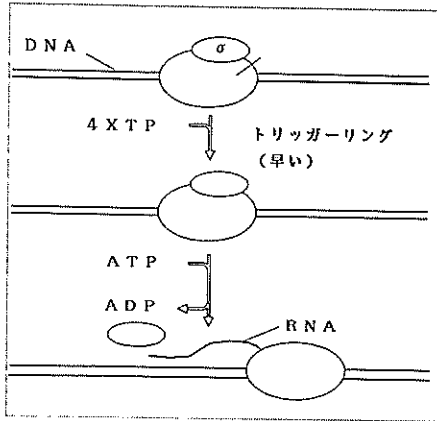


図2. 転写開始因子 $\sigma$ の転写複合体からの解離の機構。

$\lambda$ PR オペロンを固定化して、 $Mg^{2+}$  を含む緩衝液で基質を1000倍に希釈してRNA伸長反応を停止して、 $\sigma$ の解離の時間変化を測定したところ、約5秒で解離する時間経過が観測された。この結果は、既にEDTA-超遠心法で求めたT7A1オペロンと同様であった。つまり、希釈により、RNA伸長反応の停止だけでなく、 $\sigma$ の解離も凍結されたことを示す。

ところが、希釈液中にATPが存在すると $\sigma$ はすべて解離し、凍結は解除された。ATPの非水解アナログを用いて、ATPの $\beta\gamma$ 位のフォスフォジエステル結合の水解が、凍結解除に必要であることが分かった。このことは、ATPは転写の基質としてだけでなく、 $\sigma$ 解離の律速過程でも要求されることを示している。

加すると、伸長反応を再開したことは、特記すべきことである。この転写複合体の安定性のために、基質交換 (substrate swap) が可能になり、転写の開始時と、伸長時で、異なった基質を提供することができるようになった。

大腸菌RNAポリメラーゼでは転写開始因子 $\sigma$ 因子が転写の初期に転写複合体から解離することが知られているが、その機構は不明であった。バクテリオファージT7のA1プロモーターからの転写では、 $\sigma$ の解離は少なくとも2段階で起こり、1秒以内に起こる早い反応と、その後起こるRNAの長さによらない律速反応とから構成されることは、以前に我々が明らかにした。この研究ではEDTAで $\sigma$ の解離が阻害されていることを利用していた。今回、大過剰希釈による方法で

は、ATPの存在が $\sigma$ 解離の律速段階に必要であること、また、必要なのはRNA合成としての基質( $\alpha\beta$ 位の分解)としてのATPではなく、 $\beta\gamma$ 位の分解の基質としてのATPであることが明確に示された。この $\beta\gamma$ 位の分解は、転写のもっと早い時期にも長いRNAの合成には必要であることが判明した。

この結果は、適切な実験技術を欠いていたために続いてきた転写における20年来の論争に終止符を打つものである。

### 3. HeLa細胞核抽出液での新しいタイプの転写因子の探索

最初にやるべき最も簡単な実験は、 $\sigma$ 解離で得た手法をそのまま応用して、真核細胞での無細胞転写系でのATP要求性を調べることであった。しかし、コロラド大学のグループと競争の結果、残念ながら先に発表されてしまった。彼らの結果は大腸菌と全く同じく、他の基質が共存している時のみATPが機能するというものである。そこで我々は、新しいRNA結合性の転写因子の探索を開始した。

この研究のためには、転写複合体と化学量論的に等しいぐらいの感度を有する検出系が必要であり、またそのように微量の蛋白質の特異的結合を非特異的吸着と区別することが必要である。現在、前者の問題は、 $^{35}S$ -メチオニンでHeLa細胞の蛋白をラベルすることによって、 $10^{-14}$ - $10^{-13}$  molの感度を得て解決している。20Kダルトン付近にRNA結合蛋白の候補が見いだされたが、後者の問題がまだ解決の途中であり、今後の研究に賭けている次第である。

#### 今後の課題と発展

上に述べた以外での課題は、転写のスタートを基質の添加でできることを示すことである。真核生物の転写系はまだ能率が非常に悪く、鋳型DNAのうち、活性のある転写複合体を抱えるものは%オーダーしかない。このため、転写の同期した化学量論的の反応が起こっているのかどうか問題になる。この回答が必要であろう。

この研究の過程で新たに出てきた可能性は、転写装置の1分子ダイナミクスである。筋肉の研究

に用いられている蛍光顕微鏡で、蛍光ラベルした転写装置を使って1分子の動きが観察されている。固定化オペロンを利用して、特定の方向に直線上にDNAを固定化できれば、この技術が応用できる。転写にまつわる多くの問題の解決になり得る、画期的な技術であろう。現在機器をそろえつつあるところである。

#### 発表論文

- 1) N. Shimamoto, M. Fujioka and T. Hirata: Kinetic study on transcription by immobilized operons: Release of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma$  subunit requires  $\beta, \gamma$ -phosphodiester bond of nucleotide triphosphates, "Prokaryotic genetic regulations" in press (1989), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 2) M. Fujioka, N. Shimamoto, A. Kawahara, M. Amano and K. Watanabe: Purification of an autocrine growth factor in conditioned medium obtained from primary cultures of scleral fibroblasts of the chick embryo, *Exp. Cell Res.*, **181**, 400-408 (1988).
- 3) N. Shimamoto, H. Utiyama and T. Hirata: Specific and cooperative binding of *E. coli* single-stranded DNA binding protein to mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5241-5250 (1987).
- 4) 嶋本伸雄: 時間と量からみた転写と複製の調節機構, *生物物理*, **27**, 194-201 (1987).

- 5) T. Hirata, H. Kubota, N. Shimamoto and Y. Muneoka: Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus pedalis* ganglia, *Brain Research*, **422**, 374-376 (1987).
- 6) N. Shimamoto: RNA polymerase and rapid kinetic study on sigma subunit release and NusA protein uptake during transcription by *E. coli* RNA polymerase, "the regulation of transcription", pp. 409-412 (1987) (ed. by W. S. Reznikoff *et al.*, Elsevier).

#### 口頭発表

- 1) N. Shimamoto, M. Fujioka and T. Hirata: Release of  $\sigma$  subunit release from *E. coli* RNA polymerase requires  $\beta, \gamma$ -phosphodiester bond of nucleoside triphosphates, UCLA symposium "Bacterial Transcription" (Frisco, Colorado) (1989).
- 2) 藤岡美輝, 嶋本伸雄: 固定化オペロンによる転写の Rapid Kinetics III: 大腸菌 RNA ポリメラーゼの  $\sigma$  サブユニットの解離は, ATP の  $\beta\gamma$  位の分解を必要とする, 日本分子生物学会 (東京) 1988 年 12 月.
- 3) 嶋本伸雄, 藤岡美輝, 平田たつみ: 固定化オペロンによる転写の Rapid Kinetics II: 大腸菌転写開始因子  $\sigma$  の解離は ATP の分解を要求する, 日本分子生物学会 (名古屋) 1988 年 10 月.
- 4) 嶋本伸雄・平田たつみ: 固定化オペロンによる転写調節機構の動的解析 I: 大腸菌オペロンの固定化と鋳型特性, 日本生化学会 (金沢) 1987 年 10 月.