

固定化 DNA を用いた転写複合体の動的反応機構

久堀智子

総合研究大学院大学
生命科学研究科
遺伝学専攻

平成 5 年度
(1993)

目次

	Page
略語一覧	1
要旨	2
英文要旨	4
第1章 序論	7
第2章 材料と方法	12
第3章 転写初期反応の速度論的解析	
3-1 方策	20
3-2 結果	22
3-3 考察	29
第4章 タンデムな転写が初期反応に及ぼす作用	
3-1 方策	33
3-2 結果	35
3-3 考察	42
第5章 終論	45
引用文献	47
謝辞	52

略語一覽

ATP	: Adenosine 5'-triphosphate
ATP- α -S	: Adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
ATP- γ -S	: Adenosine-5'-O-(1-thiotriphosphate)
AMPPCP	: β,γ -Methyleneadenosine 5'-triphosphate
AMPPNP	: β,γ -Imidoadenosine 5'-triphosphate
AMPCPP	: α,β -Methyleneadenosine 5'-triphosphate
BCA	: Bicinchoninic acid
BPB	: Bromophenol blue
BSA	: Bovine serum albumin
CTP	: Cytidine 5'-triphosphate
3'-dATP	: 3'-deoxyadenosine-5'-triphosphate
DMS	: Dimethyl sulfate
dNTP	: deoxynucleoside triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
dUTP	: deoxyuridine 5'-triphosphate
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
GTP	: Guanosine 5'-triphosphate
NaOAc	: Sodium Acetate
NH ₄ OAc	: Ammonium Acetate
NTP	: Nucleoside triphosphate
nt	: nucleotide
PCR	: Polymerase chain reaction
RNase	: Ribonuclease
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
UTP	: Uridine 5'-triphosphate
XC	: Xylene Cyanol

要旨

要旨

転写伸長反応は直列に並んだ単純な反応の繰り返しではない。転写初期には RNA 伸長反応を継続する以外に、合成した短鎖 RNA の解離 (abortive synthesis) 等の経路を取り得る。Abortive synthesis では RNA ポリメラーゼは DNA から解離することなく、およそ 9nt に至る短鎖 RNA を合成しては放出し、再び転写開始点にもどることを多数回繰り返す (abortive cycling)。従来のモデルでは、RNA ポリメラーゼは abortive cycling を経た後、RNA の解離に抵抗性のある“伸長”モードに移行すると仮定されてきた。しかし、abortive synthesis を含め、転写初期反応の機構の動的解析による検討は殆どなされていなかった。そこで、RNA ポリメラーゼが processivity を獲得する機構を解明するため、転写初期におこる現象を動的に解析した。

大腸菌 RNA ポリメラーゼと λP_R プロモーターを有する固定化 DNA を用いた *in vitro* 転写系で一連の解析を行った。固定化 DNA を用いることにより、転写複合体から解離する転写産物や RNA ポリメラーゼを簡便に分離することができる。RNA 合成の時間経過を解析した結果、9nt に代表される短鎖 RNA の大部分は転写複合体から解離しており、その合成量は長鎖 RNA の合成量が飽和した後も増加を続けた。反応時間を通じて、長鎖 RNA の大部分は転写複合体に結合していた。

このことから、RNA ポリメラーゼが abortive cycle を経てから長鎖 RNA を合成する、という従来提唱されてきた順次的な反応経路を示すモデルが、成り立たないことが明らかとなり、分岐した反応経路が示唆された。つまり、長鎖 RNA を合成する転写複合体とは別の、abortive synthesis を担う新たな転写複合体の存在が示唆された。

新たな転写複合体が RNA を解離し易い特性を有していることを利用して、この複合体を直接検出することを試みた。固定化 DNA と RNA ポリメラーゼの複合体を微小カラムに詰め、反応基質であるヌクレオチドをパルス的に注入することによりカラム中で一定時間の転写反応を行った。反応後、転写バッファーとともに解離した RNA が認められたことから、目的の複合体が直接検出された。この不安定な転写複合体は、長鎖

RNA を合成する複合体が転写反応の過程で変換して生成したものであることが示唆された。また、転写反応後に非放射性的のヌクレオチドを注入し、RNA が伸長するかどうかを調べることにより、この複合体は、基質存在下でも RNA を伸長しない dead-end complex に変換することが示された。このように溶出パターンを解析することにより、変換しうる様々な転写複合体が検出できる実験系を確立した。同定した新たな複合体を、その特性から“瀕死の”という意味の moribund complex と名付けた。

転写初期の反応機構を解明するためにとったもうひとつのアプローチは、転写開始直後の RNA ポリメラーゼの進行を物理的に阻害することである。大腸菌 RNA ポリメラーゼと λP_R プロモーターを用いた同様の転写系において、特定のヌクレオチドを反応系から除くことにより、転写開始点を基準に +32 の位置で反応が停止する鋳型 DNA を作製した。DNA に対し過剰の RNA ポリメラーゼを反応させると、1つのオペロンに複数の RNA ポリメラーゼ分子が作用しタンデムな転写が起こることが、RNA の解析と footprinting により示された。先行する RNA ポリメラーゼの反応を +32 で止めると、後続のポリメラーゼは進行を阻止され +5 の位置で misincorporation を起こすことが判明した。Misincorporate された RNA は、伸長することができず 6nt の鎖長で転写複合体から解離した。

また、タンデムな転写により abortive synthesis が促進された。6nt より短い RNA は、先行のポリメラーゼの停止によりさらに解離が促進されることもわかった。Misincorporate された RNA と abortive transcripts は転写複合体からの解離という点で挙動をともにすることから、同一の転写複合体により合成された可能性が高いと考えられる。これらの結果は、RNA ポリメラーゼが転写の初期に物理的に進行を阻止されたため abortive cycle を回り続けるモードに保持されたことを示唆する。おそらく物理的障害が上述の moribund complex への変換を促進すると考察した。

Kinetic analysis of transcription process by using immobilized DNA

Reaction pathway of transcription is not a monotonous process. At the early stage of transcription, RNA polymerase synthesizes transcripts up to about 9nt, releases them, and returns to the initiation site on DNA without dissociation from the promoter. It has been called "abortive initiation". This process can be repeated several times. It has been proposed by another group that after the many rounds of the abortive cycling, RNA polymerase can escape from the abortive mode into the elongation mode, in which the enzyme produces the full-length transcript. However details of the abortive initiation were not characterised well.

I have characterised the abortive initiation by using kinetic methods. For this purpose, I have designed a new *in vitro* transcription system by using *E. coli* RNA polymerase and immobilized DNA containing λP_R promoter. One of the advantages of this system is that it is easy to separate transcripts which are released from transcription complexes.

I here emphasize two major points in my conclusions: (1) There is a transcription complex which can not escape from the abortive mode to the elongation mode, and the abortive initiation is achieved through the complex which is newly reported here. I name the new complex "the moribund complex". (2) I argue that the moribund complex is converted from a normal "processive complex", and that the conversion is enhanced by physical interferences between RNA polymerase molecules at early stages of transcription.

In the first part of my study, I have found that short abortive transcripts are produced even after the synthesis of full length transcript is accomplished. It is therefore concluded that there is a transcription complex which cannot escape from the abortive mode. The moribund complex has the nature to release transcripts easily.

I have identified the new complex by transcription experiments achieved in a mini-column. Short abortive transcripts were eluted during the transcription reaction. Transcripts in similar length were still eluted with the transcription buffer even after the reaction ceased. On the other hand,

there were longer transcripts which do not eluted throughout. Therefore two heterogeneous transcription complexes are found in the column. One of the two, which bind to the shorter transcripts only weakly is considered to be the one involved in the abortive process. Therefore the complex is identified as the moribund one.

Since a homogeneity of RNA polymerase was suggested, it is concluded that the moribund complex is originated from the processive complex. The elution profiles show that the moribund complex, which keeps producing short transcripts, stops the synthesis at some stage and is converted further to the "dead-end" complex which can not elongate transcripts further even with substrates.

In the second part of my study, I have designed a transcription system in which the first molecule of RNA polymerase is stopped at a particular position on DNA, which creates a physical obstacle for the second molecule of RNA polymerase running on the same DNA following the first molecule. The DNA used contains 32bp A-less sequence which does not have A residue in the non-template strand. The first molecule transcribes the DNA upto the +32 site in the absence of ATP and stops at the point. The second molecule of RNA polymerase cannot synthesizes the full-length transcript, because of the first molecule is stopping on the DNA. The second molecule mis-incorporates the G residue instead of U at the 5th step and releases the transcript of 6nt in length. When large excess number of polymerase molecules were added to the transcription system, in which situation many RNA polymerase molecules rush onto the same DNA, the abortive transcripts were increased. It is therefore suggested that physical contacts between the polymerase molecules cause the abortive process by converting the molecules into the moribund complex.

My experiments have suggested that the structure of RNA polymerase can adopt at least two different conformations in the early stage of transcription, and is therefore more flexible than was thought before. *In vitro* the abortive mode does not create any normal product but proceeds only towards the dead end but *in vivo* activation of the abortive complex by, for example, a transcription factor might shift RNA polymerase into the processive mode. And thus the flexibility

of RNA polymerase might be physiologically important.

第 1 章 序論

第1章 序論

転写は、DNA にコードされた遺伝情報を発現する一連の生命現象の最初のステップである。情報を伝える中間体として、RNA は鋳型 DNA の情報を十分に反映していなければならない。転写反応は、単純な反応の順次的な繰り返しではなく、特に転写初期は複雑な多段階に反応から成り立っている。私は、初期反応の中でも、反応開始期を脱してどのように RNA ポリメラーゼが processivity を獲得するかに着目し、その機構を解明しようとした。基本的反応機構を知る上では、構造が比較的単純で機構を解析し易く、かつ、得られている知見の多い系を選択することが適当であると考えた。このような考えから基本転写系の初期反応機構を大腸菌 RNA ポリメラーゼを用いて解析し解明することを研究課題とした。

1-1. 大腸菌 RNA ポリメラーゼの転写初期反応の概要

転写反応は RNA ポリメラーゼが DNA 上のプロモーター部位を探索し、それに結合することから始まる (reviewed by von Hippel *et al.*, 1984; McClure, 1985)。図 1-1 に転写初期過程を模式的に示した。プロモーターの認識は、大腸菌 RNA ポリメラーゼではコア酵素に結合する σ 因子によって担われている (Helmann & Chamberlin, 1988)。RNA ポリメラーゼとプロモーターとの結合による closed complex の形成 (Chamberlin *et al.*, 1982; Hawley *et al.*, 1982) に引き続き、2 本鎖 DNA の部分的開裂を伴って closed complex は転写活性を持つ open complex に変換する (Chamberlin, 1974; Chamberlin, 1976)。転写開始に引き続く RNA 伸長反応は、RNA ポリメラーゼが DNA 上を移動しながら新生ポリヌクレオチド鎖の 3' 末端にヌクレオチドをひとつづつ付加していくサイクルと理解することができる (reviewed by Erie *et al.*, 1992)。

1-2. Abortive initiation

しかし、上の記述は転写反応を非常に単純化した模式であって、例えば RNA 伸長反

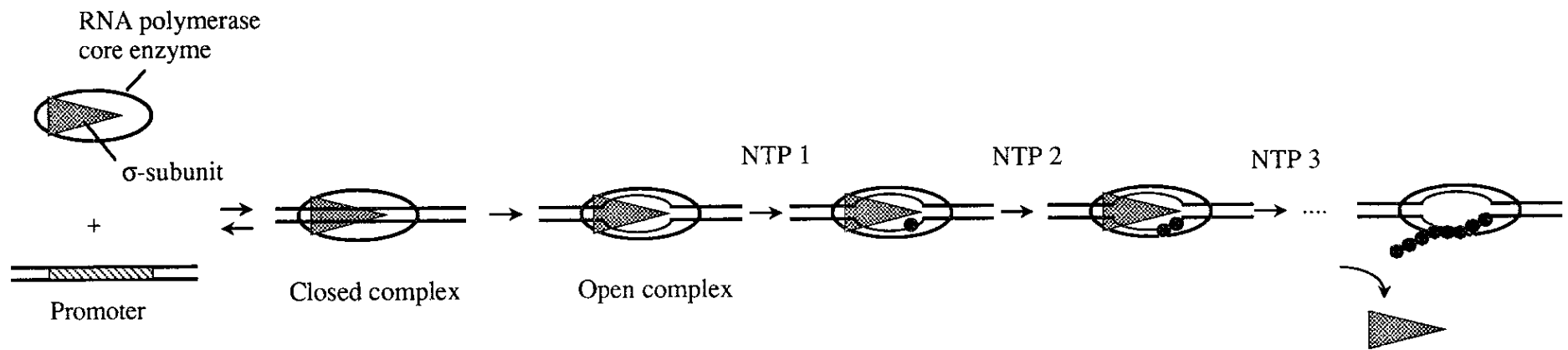


図 1-1 大腸菌 RNA ポリメラーゼによる転写初期過程の模式図

転写反応は RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合して closed complex を形成することから始まる。プロモーターの認識は σ 因子によって担われる。Closed complex の形成に続き、isomerization (open complex への変換) が起こる。最初の phosphodiester bond の形成に続き、ヌクレオチドを次々と取り込んで RNA が伸長する。ある段階で σ 因子は転写複合体から解離する。(McClure, 1985 より改変)

応は単に RNA ポリメラーゼが DNA に沿って、ひとつづつ前進して RNA を合成していくとは限らない。プロモーターによっては、配列に依存した転写の停止が反応初期にみられ (Dahlberg & Blattner, 1973; Grayhack *et al.*, 1985)、特定のクレオチドを除去することにより形成された stalled complex (Levin *et al.*, 1987) はヌクレオチドを加えても RNA を伸長しない dead-end complex に一部変換する (Krummel & Chamberlin, 1992)。

特に注目すべきことは、RNA 伸長反応の初期には、RNA ポリメラーゼが DNA から解離することなく (Carpousis & Gralla, 1980) 短鎖 RNA を合成しては放出するサイクル (abortive cycling) が存在する (Johnston & McClure, 1976) ことである。Abortive initiation は過去調べられた総てのプロモーターに認められ (McClure *et al.*, 1983)、転写反応の基質であるヌクレオチドの濃度を高めても解消しない (Carpousis & Gralla, 1980; Munson & Reznikoff, 1981)。また、RNA 合成を開始した安定な ternary complex は rifampicin の転写反応阻害に対して抵抗性を獲得する (Mangel & Chamberlin, 1974) が、それは RNA が 9-16nt に伸長してから後であり (Carpousis *et al.*, 1982)、abortive synthesis は rifampicin に対してある程度感受性である (Carpousis & Gralla, 1980; McClure & Cech, 1978) ことから、abortive synthesis を担っている転写複合体が伸長複合体と構造上異なることが示唆された。

Abortive initiation の定量的解析は主に *lacUV5* と Tn5 プロモーターについてなされ、短鎖 RNA が十分伸長した RNA に対し、数倍から数十倍のモル比合成されたことから、多数回の反応サイクルが存在する事が示された (Munson & Reznikoff, 1981)。*lacUV5* プロモーターの場合、abortive synthesis が *in vitro* で長鎖 RNA の合成頻度に寄与することが示唆された (Stefano & Gralla, 1979a)。合成される RNA の量は鋳型 DNA から予想される量よりもずっと多く (Chamberlin *et al.*, 1979; Stefano & Gralla, 1979b)、*lacUV5* プロモーターにおける各鎖長の短鎖 RNA の定量的解析から、Carpousis と Gralla (1980) は RNA ポリメラーゼが abortive cycle を多数回まわってから長鎖 RNA を合成するモードに移行するモデルを提唱し (図 1-2)、現在まで反証は出されていない。

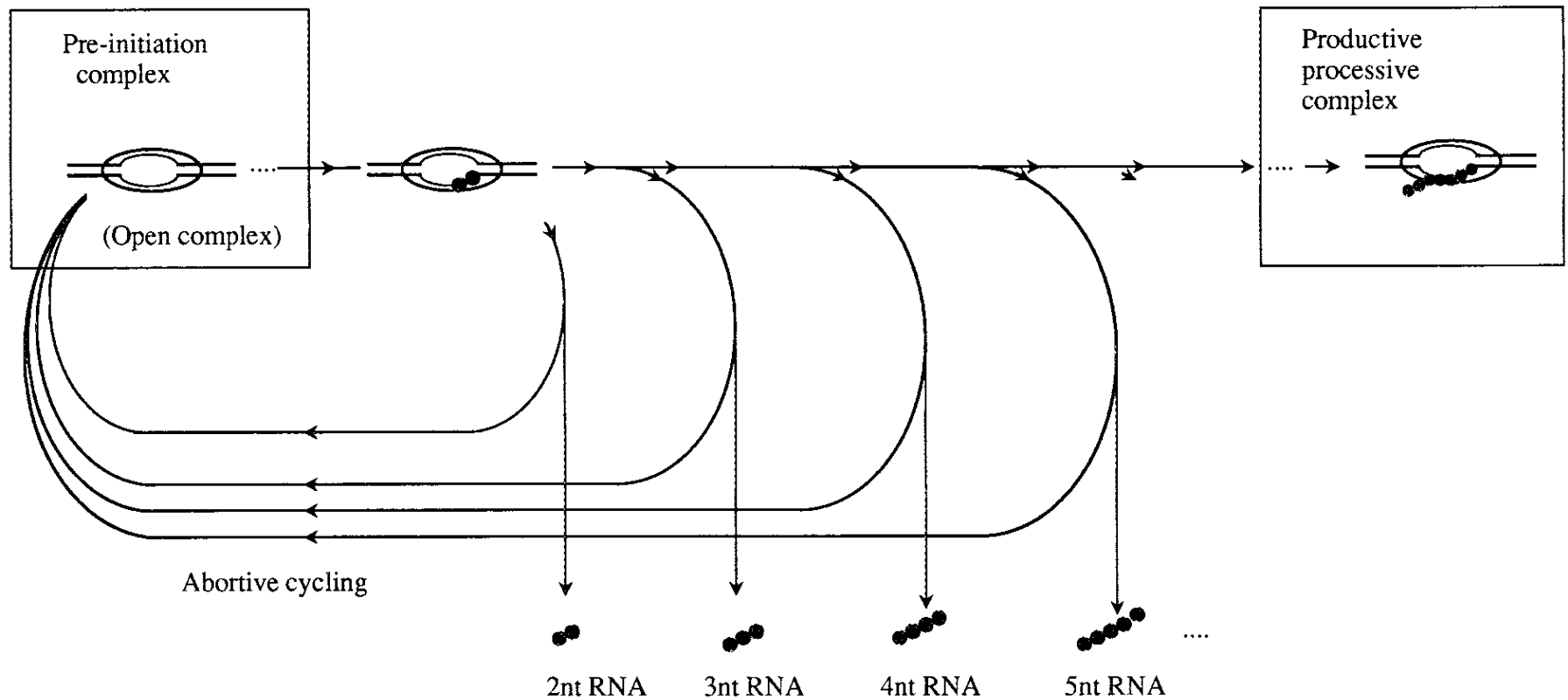


図 1-2 Abortive cycling と productive complex 形成の従来モデル

転写初期に多量の短鎖 RNA を合成するサイクル (abortive cycling) が存在する。RNA ポリメラーゼは短鎖 RNA を放出後、DNA から解離することなく開始前複合体 (pre-initiation complex) に戻る。Full-length の RNA を合成する伸長複合体 (productive complex) への変換は、abortive cycling からの脱出によって達成される。(Carpousis & Gralla, 1980 より改変)

1-3. 転写開始モードから伸長モードへの遷移

Abortive transcript は鋳型 DNA の種類や反応条件によって鎖長分布を異にするが、多くの DNA で 6 - 9nt の長さまで合成される (Carpousis & Gralla, 1980; Hanson & McClure, 1980; Munson & Reznikoff, 1981)。このことから一般に信じられている abortive initiation のスキームは、RNA ポリメラーゼが、プロモーターと特有の結合を保持している間 6 - 9nt に至る RNA を合成し、それを放出し、再び binary complex に戻るサイクルを繰り返すことである (図 1-2)。

プロモーターの認識とそれへの結合を担っているのは σ 因子である (Gilbert, 1976; Hawley & MacClure, 1983) が、 σ 因子の発見直後、 σ 因子は転写初期に複合体から解離し、別の RNA ポリメラーゼコア酵素と結合することによって再利用されることが証明された (Travers & Burgess, 1969)。 σ 因子解離の時期を決定する要因の探索に多くの努力が向けられ、poly d(A-T) や *lac UV5* プロモーターを鋳型とすると、8 - 9nt までの RNA の合成量と解離した σ 因子の量が相関することが示された (Hansen & McClure, 1980; Straney & Crothers, 1985)。

Abortive transcript の鎖長上限と σ 因子解離時期に合成されている新生 RNA の鎖長がほぼ一致することから、abortive initiation の終結は、おそらく σ 因子の解離を伴う RNA ポリメラーゼのプロモーターからの脱出に一致するという概念が一般に信じられている。この概念が正しければ、abortive initiation の終結とプロモーターからの脱出は、転写の“開始”モードから“伸長”モードへの遷移点に対応すると考えられる。しかしこれらの議論は、 σ 因子の解離の律速段階は RNA 伸長に関与しないという、 σ 因子の解離の時間的経過を考慮した観察 (Shimamoto *et al.*, 1986) とは一致しない。

1-4. 転写初期の調節に働く因子

近年、RNA ポリメラーゼは常に進行方向に向かって前進するだけでなく、後退もしうるといふ新たな例が示された。RNA ポリメラーゼの付加的タンパク因子が転写休止状態を解除し、一旦 RNA ポリメラーゼを後退させることが見つかった。この際、合

成された RNA の 3' 末端が切除され、少し戻った位置から新たに合成が再開することから、この因子は転写中におこる不備を解消し RNA 伸長を促進することに寄与していると考えられる。RNA の切断と伸長再開を担う因子は生物種を問わず普遍に存在すると考えられている。ヒト、ショウジョウバエ、酵母、ワクシニアウイルス等で転写因子 TFIIIS がこの機能を担っていることが示された (Reines *et al.*, 1989; Sluder *et al.*, 1989; Kerpolla & Kane, 1990; SivaRaman *et al.*, 1990; Bengal *et al.*, 1991)。大腸菌 RNA ポリメラーゼによる転写複合体も RNA の切断と伸長再開を行うことが見付き (Surratt *et al.*, 1991)、GreA, GreB という因子がこの反応を担っていることが示された (Borukhov *et al.*, 1992; Borukhov *et al.*, 1993)。このような RNA ポリメラーゼの反応を促進する因子の存在から、転写初期での伸長過程の生理的重要性が示された。しかし、調節因子が転写複合体の状態を認識する機構は知られていない。

1-5. 本研究の目的

転写初期に見られるいくつかの現象、abortive initiation、RNA ポリメラーゼのプロモーターからの脱出、 σ 因子の解離、転写伸長因子の寄与等の関連性についてはまだ不明な点が多く残されている。本研究では、精製された成分による基本転写系の反応機構を解析することにより、主に 2 つの点に焦点を当てて研究をすすめた。ひとつは、abortive cycle からの脱出が processivity の獲得をもたらすという概念が正しいか否かを検証することである。もうひとつは、転写初期に化学反応の休止ではなく物理的な RNA ポリメラーゼの進行停止を導入することで初期反応の特性を見いだすことである。これらの視点から解析を進めていくと、転写初期に機能的あるいは構造的に変化し易い柔軟な RNA ポリメラーゼの像が浮かび上がった。

転写初期反応を動的に解析することは RNA ポリメラーゼの時間的変化を追うことでもある。構造変化を伴った転写反応の機構を時間を横軸に解析するといっても、RNA ポリメラーゼ自体の構造変化を時間的、空間的に高分解能で解析するのは容易なことではない。しかしながら転写の産物である RNA は、高濃度アクリルアミドゲルを用いる

ことによりオングストロームに対応する分解能で解析できる。RNA ポリメラーゼの振る舞いを転写産物を覗き窓にして見てみようということが本研究の基本姿勢である。

第2章 材料と方法

第2章 材料と方法

2-1. タンパク質

大腸菌 RNA ポリメラーゼは Burgess と Jendrisak (1975)、及び Gonzalezら (1977) の方法に従って調製した。σ 因子は Igarashi & Ishihama (1991) の方法に従い調製したものを使用し、RNA ポリメラーゼコア酵素に対して飽和量を加えて転写反応を行った。

カゼイン (Merk) は、NaOH により部分分解を行い RNase 活性を除いた。カゼイン 3 g を 100 ml の 1 N NaOH に溶解し、100 μl のパイロット実験で 60 °C での熱処理時間を決定した。³²P でラベルされた RNA にこのカゼインを 1 mg/ml の濃度に加え、1 時間、37 °C に保ち、RNA 鎖長の変化を变成ポリアクリルアミドゲル電気泳動で観察し、RNase 活性が除去できたことを確認した。カゼインは、塩酸で中和した後、蒸留水に対して透析し、最終的な濃度は BCA 法 (Pierce) で決定した。

2-2. A-less 配列を持つ鋳型 DNA の作製と固定化

1) 鋳型 DNA の作製

バクテリオファージラムダ DNA の *Hind* III - *Bgl* II 断片 (nucleotide 37584 から 38814) を pBR322 の *Hind* III - *Bam* HI サイトに挿入したプラスミド pλPR1 (Fujioka, et al 1991) より以下のようにして A-less 配列を持つプラスミドを作製した。

pλPR1 を *Nsp* (7524) I で部分消化し、1つの *Nsp* (7524) I サイトのみが切断された DNA 断片をアガロースゲルから切り出した。*Nsp* (7524) I サイトを T4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造) を用いて平滑化し、*Bgl* II で完全消化して pλPR1 に含まれる P_R プロモーターの下流、転写開始点から 729bp を除いた DNA 断片をアガロースゲルから切り出して得た (図 2-1) 。34mer と 38mer の oligo DNA を合成し (DNA シンセサイザー、モデル 380B; ABI)、アニールすることにより、図 2-1 に示すように P_R プロモーターの下流、転写開始点から 32bp を non-template strand に A を含まない配列に置換した DNA 断片を得た。この2つの DNA 断片を連結することにより (DNA ライゲーションキット; 宝酒

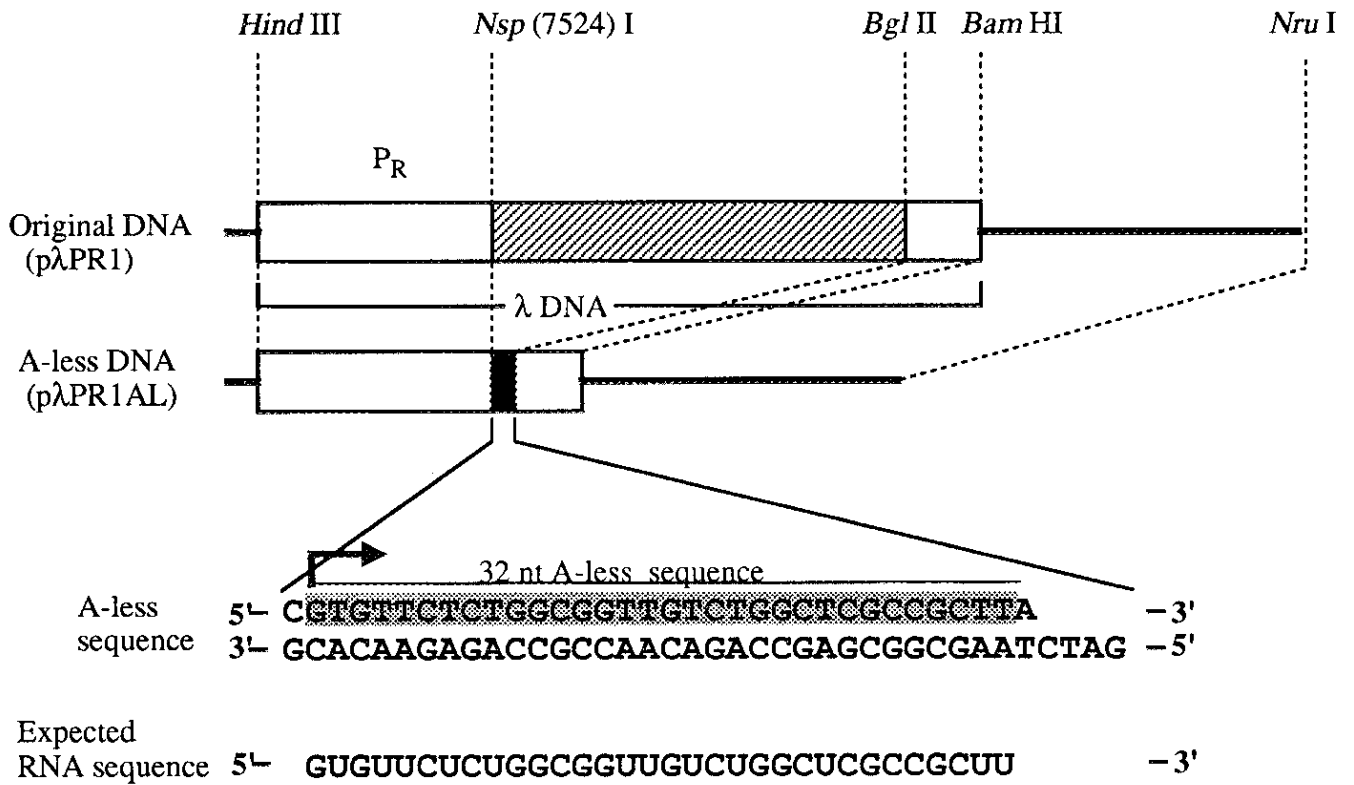


図 2-1 転写反応の鋳型DNAの作製

λファージのPRプロモーターとその下流を含むプラスミドの、転写開始点から下流の一部を除き、代わりに non-template strand に A を含まない 32bp の合成 DNA を挿入した。得られたプラスミドを *Hind* III, *Nru* I で切断することにより、692bp の転写領域を持つ 1130bp の鋳型 DNA を作製した（本文参照）。矢印は転写開始点を示す。

造) 目的のプラスミド pλPR1AL を得た。

pλPR1AL を *Hind* III で切断し、片方の末端に、以下のようにして固定化のための biotin 基を導入した。4 mM dGTP, 1 mM biotin-dUTP (Sigma) 存在下で T4 DNA ポリメラーゼを 37 °C、30 分反応させて 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性により coding strand を G サイトの手前まで 5nt 削った。dATP, dCTP, dGTP を加えてさらに 30 分反応させることにより同鎖の 3' 末端を埋めた。その後、*Nru* I サイトを切断し、目的の DNA をアガロースゲルから切り出すことにより転写開始点の上流の DNA 末端のみに biotin 基が導入された DNA を得た。得られた DNA は 1130bp の鎖長で、692bp の転写領域を持つ。この DNA を通常の転写反応の鋳型として用いた。固定化していない DNA の濃度は 260 nm の紫外吸収から吸光係数を 50 µg/ml/A₂₆₀ として決定した。

2) 固定化 DNA の調製

Hen Egg avidin (和光純薬) 10 mg を蒸留水で 2 時間透析した後、20 mM bicine, 20 mM NaCl バッファー (pH 8) に対し一晩透析した。3 ml の avidin 溶液に 0.6 g のオキシラン-アクリルビーズ (Eupergit C-1Z; Rhöm) を加え、室温で 1 晩置くことにより avidin をビーズに固定化した。Avidin - biotin の結合を介して、1) で得られた DNA をビーズに固定化した。この際、一定量の DNA に対して、ビーズの量を変えて反応させ、反応溶液を遠心し、上清に存在するビーズに結合しない DNA 量を電気泳動で検出することにより、あらかじめ結合当量を求めておいた。固定化の際、塩濃度を 0.4 M にすることにより、DNA の非特異的なビーズへの吸着を防止した。フェノール抽出により DNA をビーズから解離させアガロース電気泳動で対照 DNA のバンドと比較することにより、固定化した DNA の濃度を決定した。

2-3. 固定化していない DNA を用いた転写反応

標準の転写反応の条件を以下に示す。反応は 0.1 mg/ml カゼインまたは BSA (生化学工業) を含む転写バッファー (50 mM Tris-Cl pH 7.9, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 中で、8 µl の体積で行った。6 nM または 60 nM の RNA ポリメラーゼホロ酵素を

15 nM の鋳型 DNA と混ぜ 37 °C で 10 分置くことにより、open complex を形成させた。その後、200 - 400 Ci/mmol の最終濃度 5 μM の [γ - 32 P] GTP (ICN) と最終濃度各 100 μM の ATP, UTP, CTP (ヤマサ醤油) を加え、37 °C で 20 分反応させた。EDTA を最終濃度 30 mM になるよう加え反応を停止した。反応溶液をフェノール、クロロホルムで処理し、等量の loading buffer (80 % ホルムアミド, 89 mM Tris pH 8.0, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, 0.002 % BPB, 0.002 % XC) を加え、20 % ポリアクリルアミド-7 M 尿素ゲルにロードし、1500V で 3.5 時間電気泳動した。ゲルは乾燥した後、イメージアナライザー (BAS2000、フジ写真フィルム) で解析した。NTP を加える際、特に述べた場合 ATP を除いた。あるいは ATP 濃度を変えた。あるいは ATP を AMPPCP, AMPPNP, AMPCPP (Sigma), 3'-dATP (PL-Biochemicals), ATP- γ -S, ATP- α -S (Boehringer Mannheim) に置換した。特に述べた場合は最終濃度 40 ng/μl のヘパリンを加えた。

2-4. 固定化 DNA を用いた転写反応

標準転写反応の条件で固定化 DNA と RNA ポリメラーゼの open complex を形成した後、必要があれば 0.1 mg/ml カゼインを含む転写バッファーを加えて 15,000 rpm (トミー精工、MXR-150, TMA-2 ローター) で 3 分間遠心する操作を 2 度繰り返し、余剰の酵素を洗い落とした。必要があればヘパリンを加えて転写反応を行った。転写複合体に結合した RNA と解離した RNA を分離する実験では、反応溶液を 15,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を注意して取り、沈殿と分離した。沈殿は EDTA を含む転写バッファーで 2 度洗浄して、上清成分を除いた。但し定量的解析を行う場合は、上清の半量と残りの溶液とを分離した。反応溶液をフェノールで処理した。このとき、ビーズの比重がフェノール/クロロホルム溶液より小さいため、ビーズが水層に混入する危険性があるため、クロロホルムは加えなかった。他は標準転写反応の方法に従った。

2-5. RNA 合成 kinetics の測定法

固定化 DNA を用いた反応条件で RNA ポリメラーゼとの open complex 形成した後、

0.1 mg/ml カゼインを含む転写バッファーで余剰の酵素を洗い落とした。ATP を除く基質のセットにヘパリンを加えて転写反応を行い、一定時間の反応後 EDTA により反応を停止した。反応溶液を遠心し、上清の半量を静かに取り、残りの溶液と分離した。各々をフェノールで処理した後、電気泳動により分析した。

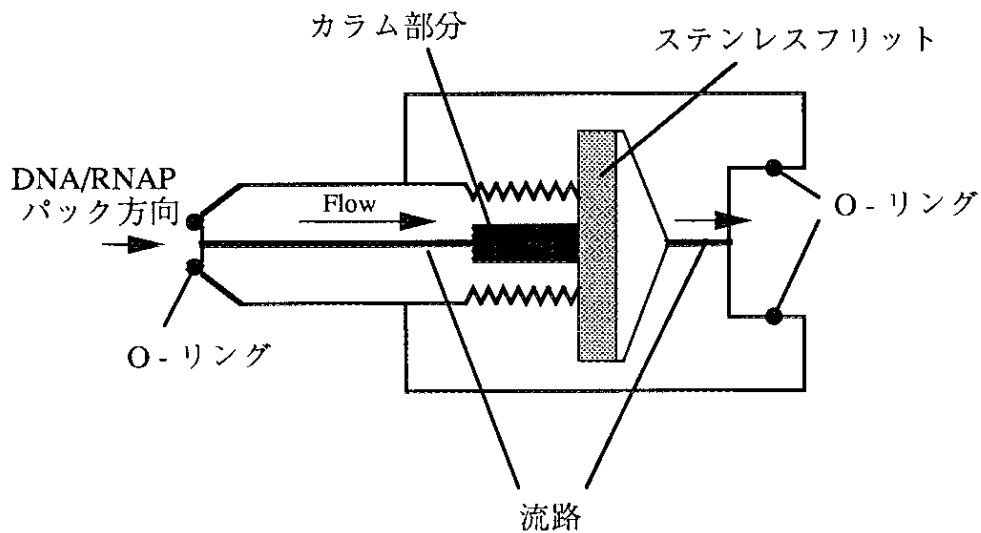
2-6. 残存する RNA 合成開始活性の解析法

固定化 DNA と RNA ポリメラーゼとの open complex 形成した後、0.1 mg/ml カゼインを含む転写バッファーで余剰の酵素を洗い落とした。ATP を除く非放射性的基質のセットにヘパリンを加えて転写反応を行い、一定時間の反応後、少量の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP (350 Ci/mmol) を加え最終濃度 $5\mu\text{M}$ に合わせ、さらに 5 分間転写反応を行い、EDTA で反応を停止した。フェノールで処理した後、電気泳動により分析した。

2-7. Column transcription

カラムクロマトグラフィーは SMART System (Pharmacia) で行った。専用プレフィルターユニットに直径 2 mm、深さ 3 mm の穴をあけ、約 10 μl 容量のミニカラムを製作した (図 2-2)。酵素や RNA がビーズに吸着することを防止するために、固定化 DNA はあらかじめカゼイン溶液に浸しておいた。0.37 pmol の固定化 DNA と 1.0 pmol の RNA ポリメラーゼを 0.1 mg/ml カゼインを含む転写バッファー中で $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で置き、open complex を形成させた。溶液を 1 ml 容量のシリンジに吸い上げ、2 mm 径の O-リングをミニカラムの穴口にあてシリンジを密着させて溶液を注入し、ミニカラムにパックした。フィルターがカラム部分の下流側にくる向き (通常のプレフィルターとしての使用と逆向き) でカラムを取り付けた。

転写反応を行う前に、20 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 2-3 分転写バッファー流して余剰の酵素を洗い流した。分離ユニット内を $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保ち、一連のカラムクロマトグラフィーを行った。溶出は 280 nm の紫外吸収でモニターした。転写反応は、標準転写条件に基づき、350 Ci/mmol の $5\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP、各 $100\mu\text{M}$ の UTP, CTP、40 ng/ μl のヘパリンを含む転



専用プレフィルターユニット

図 2-2 Column transcription に用いたミニカラム

SMART System (Pharmacia) 専用プレフィルターユニットを用いて、ミニカラムを製作した。プレフィルターユニットに、直径 2 mm、深さ 3 mm の穴を開けてカラム部分とした。図中矢印で示した方向から固定化 DNA と RNA ポリメラーゼの複合体を注入し、カラム部にパックした。フィルターであるステンレスフリットをカラム部分の下流にくる方向でミニカラムをシステムに取り付けた。

写バッファー約 10 μ l を注入することにより開始した。注入後 30 μ l/min の流速で溶出を行うと、基質溶液がカラムを通過する時間すなわち転写反応時間は約 30 秒と見積もれた。注入後溶出を続け 30 秒の反応を行うものと、注入後基質溶液がカラムに満たされている時に溶出を止め、30 分反応を行うものと 2 種類のプログラムを作成した。反応後は 20 μ l/min に流速を保ち転写バッファーを流し、溶出される溶液を 40 μ l 毎に分画した。反応直後に非放射性的の反応基質（各 200 μ M の 4NTP、40 ng/ μ l のヘパリンを含む転写バッファー約 20 μ l）を注入する chase 実験も行った。30 分の溶出後、100 % ホルムアミドを注入し、5 分間流れを止めることにより、固定化 DNA に結合している大部分の RNA を溶出し最終 fraction に分画した。

溶出された各画分は、0.3 M NaOAc, 20 μ g/ml グリコーゲン (Boehringer Mannheim) 存在下でエタノール沈殿し、5 μ l の loading buffer (80 % ホルムアミド, 89 mM Tris pH 8.0, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, BPB, XC) に溶解し、60 $^{\circ}$ C で 5 分加熱し電気泳動により分析した。

2-8. RNA ポリメラーゼの均一性の解析法

平滑末端を持つ鋳型 DNA は、前述の方法でビオチン化した 1130bp の鋳型 DNA を P_R プロモーターの下流にある *Hae* III サイトで切断することによって得た。得られた DNA は 557bp で 119bp の転写領域を持つ。切断後、ビーズに固定化し、biotin 化されていない断片を TE バッファー (10mM Tris-Cl pH 7.9, 1mM EDTA) で洗い落とす。

得られた固定化 DNA 3 pmol と RNA ポリメラーゼ 10 pmol で open complex を形成した後、0.1 mg/ml カゼインを含む転写バッファーで余剰の酵素を洗い落とす。ATP を除くあるいは ATP を含む非放射性的の基質のセットにヘパリンは加えずに 30 秒または 30 分転写反応を行い、EDTA により反応を停止した。反応溶液は遠心し、沈殿と上清に分けた。上清に 1.5 pmol の 557bp の固定化 DNA と 20 pmol の σ 因子を加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分置いた。30 mM EDTA を含む転写バッファーで 2 度、転写バッファーでさらに 2 度洗い、37 $^{\circ}$ C に 5 分置いた。ATP を含まない標識された基質のセットを加えて 2 次反応を

30分行った。対照として、解離したRNAポリメラーゼを加えない2次反応も行った。

2-9. RNA塩基配列の決定法

RNA塩基配列の決定はRNA Sequencing Kit (Pharmacia) を用いて行い、添付のプロトコールに改変を加えた。

ATPを除く転写反応によって得られたゲル(20%ポリアクリルアミドゲル)から、末端標識された異常RNAと32ntの停止複合体によるRNAを切り出し、溶出バッファ(0.5 M NH₄OAc, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA)に浸し、37℃で一晩置いて溶出させた。RNAをフェノール、クロロホルムで抽出し、エーテル抽出後、遠心濃縮機により乾燥した。短鎖RNAであるため回収効率の低いエタノール沈殿は行わなかった。乾かしたRNAを、sequencing反応1回(1 μl)あたり、200 cpmを保持するように蒸留水で溶かした。

塩基配列の決定は、4種類のRNase, T₁(G特異的), U₂(A特異的), *Phy M*(A+U特異的), *B.cereus*(U+C特異的)を用い、RNAを部分消化することにより行った。RNase T₁と*Phy M*を用いる反応には、バッファ-I(100 mM sodium citrate pH 5.0, 2 mM EDTA, 7 M Urea), RNase U₂を用いる反応には、バッファ-II(100 mM sodium citrate pH 3.5, 2 mM EDTA, 7 M Urea), RNase *B.cereus*を用いる反応には、バッファ-III(100 mM sodium citrate pH 5.0, 2 mM EDTA)を用いた。これらのバッファは-20℃で凍結保存した。切り出したRNA溶液1 μlとcarrierとしてtRNA 1 μgを上記バッファ3 μlと混ぜておき、RNaseを加えて総量6 μlとした。RNaseは10 U/μlに調製しておき、32nt RNAに対し、RNase T₁とU₂は3 U、RNase *Phy M*は12 U、RNase *B.cereus*は6 U各々反応させ、異常RNAに対し、各半量を反応させた。総て55℃で20分反応後、氷水で急冷した。RNase未反応の対照はバッファ-Iを用いて同様に行った。アルカリ分解による非特異的切断反応には50 mM Na-HCO₃⁻バッファを用いた。切り出したRNA溶液1 μlとcarrierとしてtRNA 1 μgをNa-HCO₃⁻バッファ6 μlと混ぜ、90℃で60分反応後、氷水で急冷した。総ての反応溶液は、各々5 μlのloading bufferと混ぜ、電気泳動して解

析した。

2-10. Hydroxyl radical footprinting による RNA ポリメラーゼの多分子反応の解析

1) 末端ラベルした鋳型 DNA の調製

転写反応の鋳型 DNA のプロモーターと転写領域 107bp を含む 240bp の DNA を PCR により合成した。以下に示す 21 mer の oligo DNA を合成し (ベックス社)、Primer として用い、PCR を行った。

Primer 1 5'- CCG TGC GTC CTC AAG CTG CTC -3'

Primer 2 5'- GGG CGT AGA GGA TCT GCG CCC -3'

Primer 1 を [γ - 32 P] ATP (ICN) と T4 キナーゼ (宝酒造) により末端標識し、PCR を行うことで合成する DNA の非転写鎖を 5' 末端標識した。反応の鋳型として、転写反応の鋳型に使用する 1130bp の DNA を用いた。PCR は 200 μ l 容量の反応につき、0.12 pmol の鋳型 DNA と 100 pmol の各 Primer、各 200 μ M の 4dNTP (Pharmacia)、5 U の Taq DNA ポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 9.0), 3 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100 存在下で行った。反応サイクルは 94 °C で 1 分の前反応の後、94 °C 1 分で denaturation、55 °C 1 分で annealing、72 °C 1 分で extension のサイクルを 25 回行い、最後に 72 °C で 3 分置いた。PCR 産物は 8% のポリアクリルアミド非変性ゲルに流して、目的の産物を切り出すことにより精製した。Hydroxyl radical reaction 1 回 (1 pmol DNA) あたり 20,000 cpm 以上のカウントを得るように DNA を標識した。

2) Footprinting

Hydroxyl radical footprinting の方法は Tullius & Dombroski (1986) に従い、以下のように変更した。RNA ポリメラーゼの保存用バッファーには 50% のグリセロールが含まれているが、1% を越えるグリセロールの混入は hydroxyl radical による切断反応を阻害する (Heumann, 私信) ため、使用直前に透析により、RNA ポリメラーゼ溶液のグリセロール濃度を 5% に下げた。透析には、group dialysis 用フィルター (0.025 μ m pore, VS; Millipore) を使用し、1 mM DTT, 5% グリセロール を含んだ転写バッファーに対して室

温で1時間行った。

1 pmol の DNA に対し、1 pmol, 5 pmol, 10 pmol の RNA ポリメラーゼを標準転写バッファー中で混ぜた溶液各 100 μ l を 2 セット用意し、37 $^{\circ}$ C で 10 分置いた後、一方に最終濃度各 100 μ M の UTP, CTP, 5 μ M の GTP を加えた。もう一方のセットには、同量の転写バッファーを加え、いずれのセットも 200 μ l に合わせた。37 $^{\circ}$ C で 5 分転写反応を行った後、hydroxyl radical による切断反応を行った。

各々の溶液に carrier として 2 μ g の仔牛胸腺 DNA を加え、20 mM sodium ascorbate, 0.6 % hydrogen peroxide, 直前に等量ずつ混ぜた 2 mM ammonium iron (II) sulfate hexahydrate と 4 mM EDTA の混合溶液を各々 45 μ l ずつ加え、チューブ内で同時に混ぜた。37 $^{\circ}$ C で 5 分反応を行い、0.1 M Thiourea, 20mM EDTA (pH 8.0) を 90 μ l 加えて反応を停止した。切断反応を行わない対照には反応溶液と同量の蒸留水を加えた。0.3 M NaOAc, 20 μ g/ml グリコーゲン存在下でエタノール沈殿し、5 μ l の loading buffer (80 %ホルムアミド, 89 mM Tris pH 8.0, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, BPB, XC) に溶解し、60 $^{\circ}$ C で 5 分加熱した。個々のサンプルのカウントを約 10,000 cpm に統一するよう量を調整して、6 % ポリアクリルアミド-9 M 尿素ゲルにロードし、1000V で 2.5 時間電気泳動した。用いた DNA は二次構造によると思われる泳動異常を室温で示したため、電気泳動は 60 $^{\circ}$ C で行った。Maxam - Gilbert の方法に基づく G 特異的化学反应によるシーケンシングは Current Protocols in Molecular Biology Unit 7.5 (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) に従った。但し、DMS による塩基特異的修飾反応の時間を 2 分に変更した。

第3章 転写初期反応の速度論的解析

第3章 転写初期反応の速度論的解析

3-1. 方策

転写反応の初期に起こる現象を解析するため、まず、合成される RNA 量の時間変化を調べた。伸長途中にある RNA は転写複合体に結合しているが、一部の RNA は転写複合体から解離し abortive な産物となる。第1章で述べたように、従来、abortive な転写産物は、RNA ポリメラーゼが DNA から解離することなく短鎖 RNA を合成しては放出するサイクル (abortive cycling) を繰り返す結果であると説明されており、RNA ポリメラーゼは何回かの abortive cycling を回った後 processivity を獲得し、長鎖 RNA を合成すると考えられていた。つまり、同一の転写複合体が abortive synthesis と長鎖 RNA の合成の両方を順次的に担うという考えであった。しかしこのスキームは、短鎖 RNA と長鎖 RNA の合成量の差に基づくモデルにすぎず、RNA の解離量を測定した速度論的解析に基づいて順次的反応を示す実験的根拠はなかった。

そこで、本研究では、

- (1) 固定化 DNA の手法を用いることにより、合成された RNA のうち転写複合体に結合している RNA と解離した RNA を遠心操作により分離した。
- (2) 各々の合成量の時間変化を調べ、反応速度論的解析を行った。
- (3) 32bp の A-less 配列を含んだ鋳型 DNA を用いることにより、反応基質から ATP を除くと、十分に伸長した RNA は電気泳動で 32nt のバンドとして検出され、伸長不十分な RNA はより短いバンドとして検出されるシステムを作った。
- (4) 20% ポリアクリルアミドゲルを用いることにより数nt からの短鎖 RNA を検出可能にした。但し、過剰の未反応のヌクレオチドの混入により、2, 3nt のバンドの定量は困難であるため、4nt 以上の RNA を定量した。
- (5) 十分に伸長した RNA と短鎖 RNA の合成量の時間変化を解析することにより、従来の abortive cycling のモデルを再検討した。

(6) 一定時間の反応の後、どのような長さの RNA を合成する活性がどの程度残っているかを調べることにより、abortive cycling が起こる時間スケールを解析した。

この実験により abortive synthesis を担う新しい転写複合体の存在が示唆された。新しい転写複合体は、不安定で RNA を解離し易い。そこで、本研究では、

(7) 独自に開発した column transcription という手法を用い、この複合体を直接検出した。

(8) 複数の転写複合体は転写反応の過程で生成するのか、それとも不均質な RNA ポリメラーゼによるのかを次に調べた。

3-2. 結果

3-2-1. RNA 合成の時間経過

固定化 DNA を用い、以下に述べる方法で RNA 合成の時間経過を調べた。転写複合体から解離した RNA ポリメラーゼがプロモーターに再結合することにより 2 ラウンド目以降の転写を行うことを防止するため、基質とともにヘパリンを反応溶液に加えた。RNA は末端標識して、鎖長による補正なしに定量できるようにした。ATP を除いた基質のセットで反応を開始した後、10 秒から 20 分の反応時間で EDTA を加えることにより反応を停止し、反応溶液を遠心して沈殿と上清に分離した。沈殿の一部が上清に混入することによっておこる誤差を防ぐため、反応溶液からその半量の上清をとり、残りの溶液と分離した。各画分には解離した RNA の半量、及び転写複合体に含まれる RNA の全量と解離した RNA の半量の和が各々存在することになる（図 3-1）。

各画分に含まれる RNA の電気泳動パターンを図 3-1 に示す。基質から ATP を除いたため 32bp の A-less 配列の末端で転写反応が停止することを反映し、32nt の RNA が時間とともに蓄積した。この 32nt の RNA は上清成分中（図 3-1, パネル B）にはほとんど存在しないため、大部分は転写複合体に結合したままであることがわかった。また、32nt の RNA 以外にかなりの量の短鎖 RNA が合成され、その合成量は時間とともに増加していた。これらの RNA は 9nt あるいは 10nt の鎖長を中心に分布していた。これら短鎖 RNA は上清に多量に存在する（図 3-1, パネル B）ことから、大部分が転写複合体から解離したものであることがわかった。

図 3-1 の RNA のバンドを定量した結果を図 3-2 に示す。十分伸長した RNA として 32nt の RNA を、短鎖 RNA の代表として 9nt の RNA を定量した。Released RNA は転写複合体から解離した RNA を意味する。Total RNA は転写複合体に保持されている RNA と解離した RNA との合計を意味する。Total RNA の時間変化から、32nt の RNA 合成量は 5 分でほぼ飽和することがわかった。一方、9nt の RNA は 5 分以降も増加を続け、20 分経過した時点で 32nt RNA の約 10 倍量合成された。Released RNA の時間変化から、

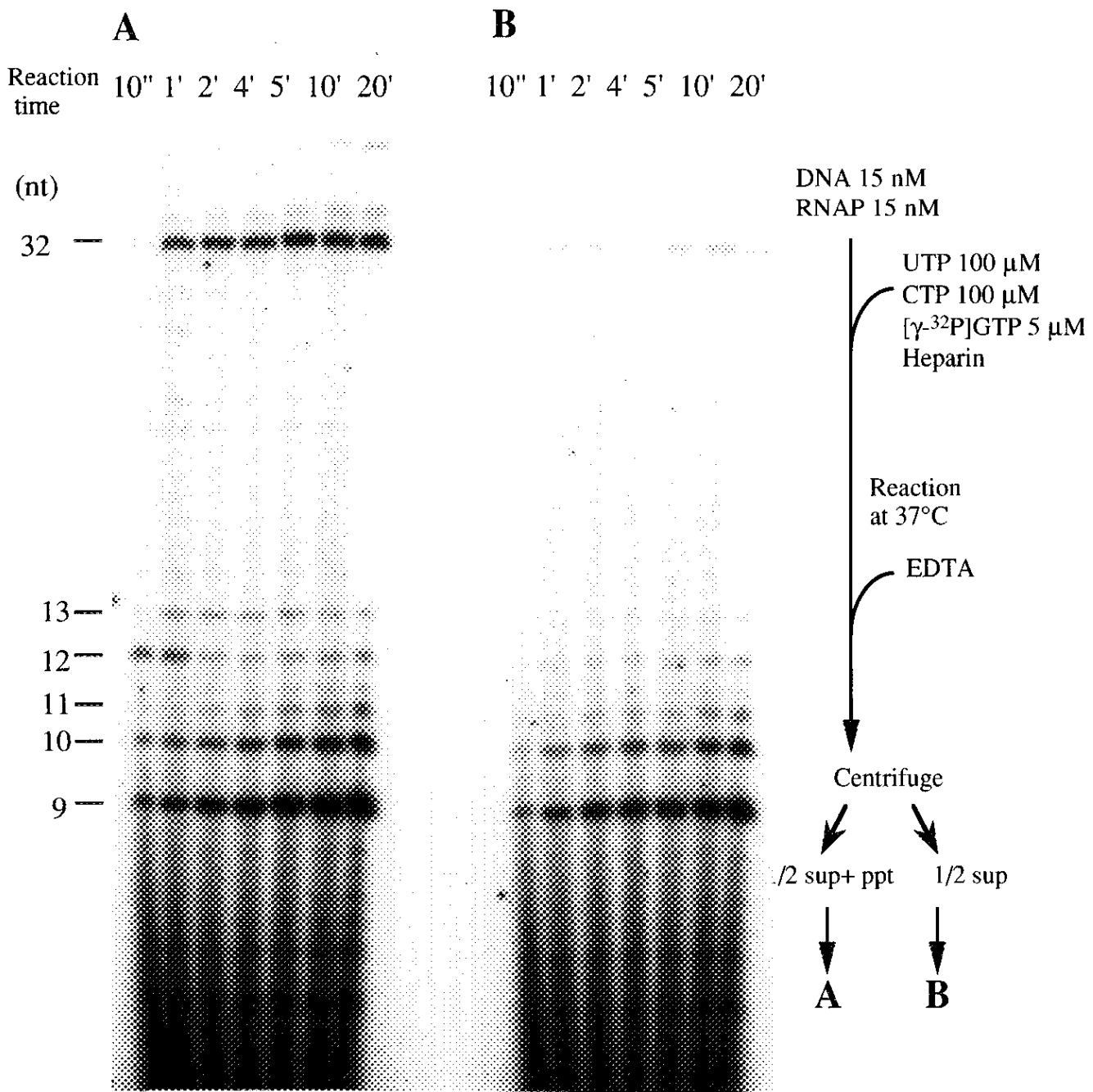


図 3-1 RNA 合成の時間変化

15 nM の DNA と 15 nM の RNA ポリメラーゼを用い、ATP を除いた基質とヘパリンのセットで転写反応を行い、一定時間の反応後 EDTA の添加により反応を停止する。反応生成物を遠心により分離し、各々の分画に含まれる RNA を検出した。

(A) 遠心後、半量の上清を除いた残りの溶液。転写複合体に含まれる RNA の全量と解離した RNA の半量が溶液中に含まれる。

(B) 遠心後分離した半量の上清。転写複合体から解離した RNA の半量が溶液中に含まれる。

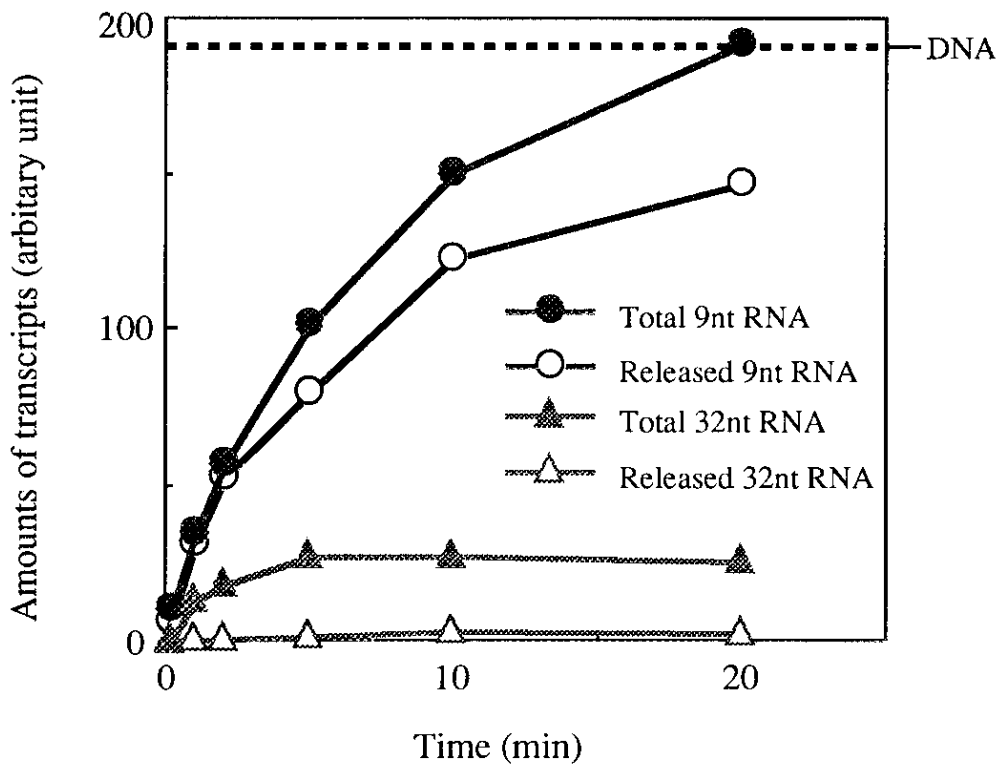


図 3-2 RNA 合成の時間経過の定量結果

図 3-1 の 9nt と 32nt の RNA バンドを定量した結果を示す。図 3-1 の (A), (B) の定量値の和から合成された RNA の全量 (total RNA) を求め、(B) の定量値を 2 倍して転写複合体から解離した RNA の量 (released RNA) を求めた。長鎖 RNA として 32nt RNA、主たる短鎖 RNA として 9nt RNA を定量した。図中破線は反応に用いた DNA の相対量を示す。

測定した反応時間を通じて 32nt の RNA は大部分が転写複合体に結合しているのに対し、9nt の RNA は大部分が解離していることがわかった。鋳型 DNA とのモル比を計算すると、20 分の反応で 9nt の RNA は DNA とほぼ等量合成されたことになる（図 3-2 中に DNA 量を破線で示す）ので、解離する様々な長さの RNA 量の総和は DNA 量よりかなり多いと見積もられる。一方、32nt の RNA は合成量が飽和に達しても DNA の約 1/10 量しか合成されておらず、DNA に結合した総ての RNA ポリメラーゼが最終的に長い RNA を合成することはあり得ない。むしろ、一部の RNA ポリメラーゼのみが長鎖 RNA の合成を担うと考えられる。

反応溶液にヘパリンを加えることにより、1 ラウンドの反応だけを検出していることを考慮に入れると、DNA 量より多い短鎖 RNA の合成は、RNA ポリメラーゼが DNA から解離することなく転写開始点から繰り返し転写を行い、多量の短鎖 RNA を合成するという従来提唱されてきた abortive cycling の存在を示すことになる。しかし、32nt の RNA 合成がほぼ完了した後も 9nt の RNA が合成され続けているという結果は、abortive cycling を脱出した後 RNA ポリメラーゼが processivity を獲得し長鎖 RNA を合成するという従来のモデルでは説明できない。長鎖 RNA を合成する転写複合体とは別の性質を持った転写複合体が abortive transcripts の合成を担っていると考えざるをえない。

3-2-2. 一定時間反応後の残存 RNA 合成活性

3-2-1. で得られた結論を、異なる実験により確認した。図 3-3 に示したように、非放射性的の基質で転写反応を行い（前反応）、一定時間経過後ラベルされた基質を添加することにより、その反応時間後、転写複合体が RNA 合成活性をどの程度残存させているかを調べた。反応溶液にはヘパリンを加えてあるため、一旦 DNA から解離した RNA ポリメラーゼは再び RNA を合成することはできない。また、RNA の 5' 末端にラベルが入るため、この時点以後に転写が開始された RNA のみが検出される。

前反応の時間を 0 分から 20 分まで変化させ、続く 5 分の反応で RNA 合成能を調べた。図 3-1 と同様基質から ATP を除いてあるため、十分伸長した RNA は 32nt の RNA とし

Pre-reaction time 0" 10" 1' 2' 5' 10' 20'

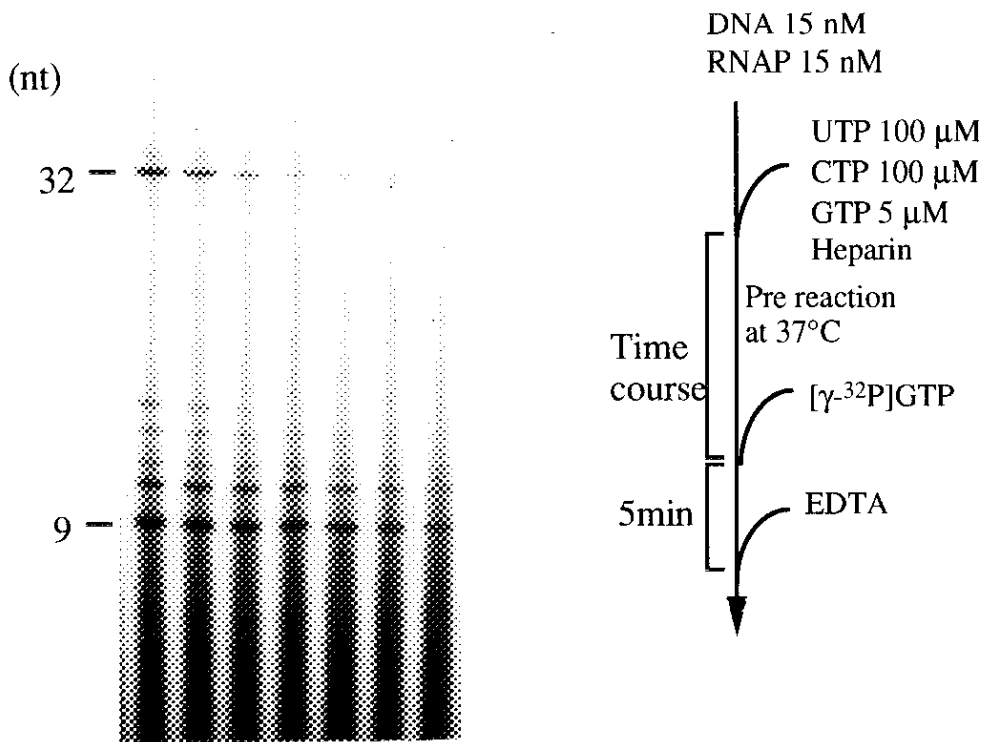


図 3-3 一定時間の反応後に残存する反応開始活性

15 nM の DNA と 15 nM の RNA ポリメラーゼを用い、ATP を除く基質とヘパリンのセットで一定時間転写反応を行った後 (Pre-reaction)、ラベルされた基質を加え 5 分間転写を行い、残存する活性を検出した。Pre-reaction にはヘパリンを加えてあるため、DNA から解離した RNA ポリメラーゼの 2 サイクル目以降の反応は検出されない。また、RNA の 5' 末端を標識するため転写開始反応のみが検出される。

て検出される。32nt の RNA を合成する活性は僅か 10 秒で半減し、5 分で殆ど検出できない程度まで減少した。この結果は、32nt RNA の合成が反応開始後 5 分で飽和した図 3-2 の結果と一致する。一方、主たる短鎖 RNA である 9nt の RNA を合成する活性は 20 分の前反応の後も検出された。前反応を行わない場合の活性を 100 % とすると、20 分後の残存活性は 9nt RNA が 40 % 程度あるのに対し、32nt RNA は 10 % 以下であった。

長鎖 RNA の合成反応は転写のごく初期に完了し、その後はほとんど合成されないのに対して、短鎖 RNA を合成する活性はその後もかなり残存しているという結果は、図 3-2 に示された結果と同様、abortive な RNA を合成する転写複合体と長鎖 RNA を合成する転写複合体とは別のものである、という考え方を支持する。

3-2-3. 新しい転写複合体

以上の結果から、転写反応途上にある転写複合体は総て長鎖 RNA を合成する活性を有する訳ではなく、一部の転写複合体は短鎖 RNA を繰り返し合成し続けることがわかった。おそらく転写反応の過程で、長鎖 RNA を合成する複合体とは別の性質を有する転写複合体が存在し、後者が abortive synthesis を担うと考えられる。

Terada & Shimamoto (submitted) によるファージ RNA ポリメラーゼを用いた同様の解析でもやはり長鎖 RNA の合成完了後に短鎖 RNA の合成が継続して行われるという結果が得られており、abortive synthesis を担う新しい転写中間体の存在が示唆された。大腸菌 RNA ポリメラーゼとファージ RNA ポリメラーゼに共通して見られるこの現象は、新しい転写中間体が生物種によらず普遍的に存在するものであることを示唆する。後に明らかになるが、この転写複合体は時間とともに基質存在下でも RNA を伸長しない dead-end complex に変換する。瀕死の中間体という意味でこの複合体を moribund complex と名付けた。RNA 伸長能を持つ転写複合体 (processive complex) が dead-end complex に変換するスキームのモデルを図 3-4 に示す。調べた一連の反応で、32nt RNA の合成量が時間を経た後増加するという結果は得られなかったので、少なくとも 1 ラウンドの反応では一旦 moribund complex に変換した複合体が再び processive complex へ変換

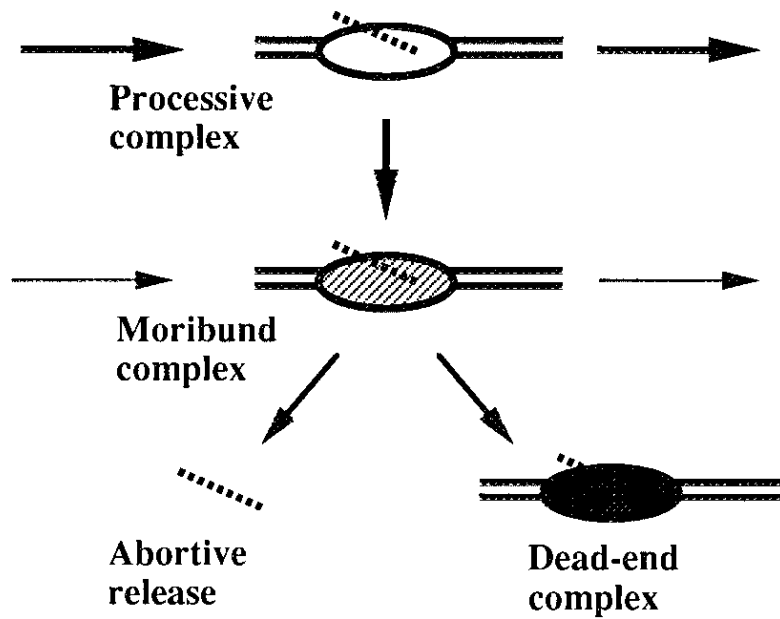


図 3-4 新しい転写複合体のモデル

転写初期反応の速度論的解析によって得られた新しい転写複合体のモデルを示す。転写伸長複合体 (processive complex) は、転写反応の過程で別の複合体に変換する。この複合体 (moribund complex) は、RNA を解離し易く abortive synthesis を担う。また、最終的に dead-end complex に変換する。Moribund complex から processive complex への変換は起こりにくいと考えられる。

することは殆ど無いと考えられる。

3-2-4. Column transcription による moribund complex の検出

Column transcription とは、図 3-5 に示したように、固定化 DNA とそれに結合した RNA ポリメラーゼをカラムにパックし、溶離液としてラベルした基質とヘパリンを含んだ転写バッファーを用い、カラム中で転写反応を行わせる方法である。溶離液の流速を制御することにより反応時間をコントロールし、一定時間の反応の後、転写バッファーのみを流した。転写複合体に保持されている RNA は固定化 DNA とともにカラム中に保持され、解離した RNA のみが溶出する。反応停止後、ラベルしていない基質を一定時間加える chase 実験を別に行い、転写複合体の RNA 伸長能を調べた。各画分をゲルに流し、どのような鎖長の RNA がいつ溶出したかを調べた。

図 3-6 に column transcription の結果の一例を示す。Fraction 1 は転写反応中溶出された画分で、abortive cycle の間に解離した RNA を含む。Fraction 2 から fraction 9 は反応後バッファーを 30 分間流した間に時間順に溶出された画分である。Fraction 10 はその後ホルムアミドを注入することによりカラムに保持されていた RNA を総て溶出させた画分である。転写反応は 37 °C で 30 秒間行った。この実験では、未反応のヌクレオチドを除くことによって短鎖 RNA を明瞭に検出するためエタノール沈殿を行っている。エタノール沈殿の効率上、鎖長が短い RNA ほど実際より少なめに検出される。Fraction 1 に 9nt を中心とした短鎖 RNA が多量に溶出していた。一方、32nt を含むより長い RNA はこの分画には少なく、大部分最後までカラムに保持されて fraction 10 に溶出していることがわかった。この結果は、短鎖 RNA は複合体から解離して abortive な転写産物となり、長鎖 RNA は複合体に保持されることを示し、3-2-1 で示した結果と一致する。

Fraction 2 から fraction 9 にも短鎖 RNA は減少しながら溶出されており、基質非存在下でも徐々に RNA を解離する複合体の存在が確認できた。解離した RNA の分布は、abortive cycle の間に解離した RNA (fraction 1) の分布とほぼ一致を示した。

また、反応中に解離する RNA の分布は可変であり、基質濃度を下げたり、反応温度

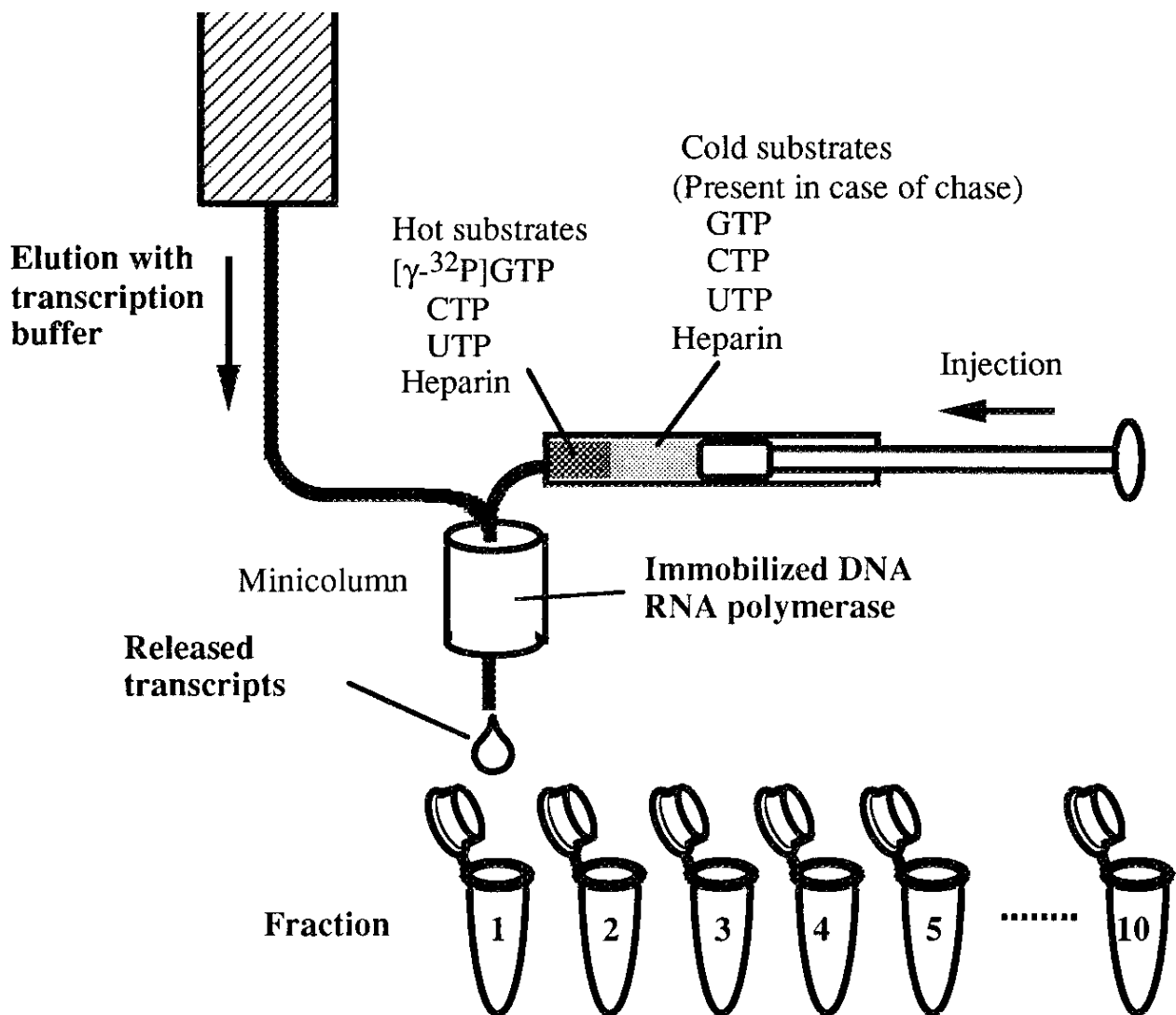


図 3-5 Column transcription による転写複合体からの RNA の溶出

固定化 DNA と RNA ポリメラーゼをカラムに詰め、ラベルしたヌクレオチドを注入することによりカラム内で転写反応を行う。反応後、転写バッファーを用いて溶出を行うことにより、転写複合体から徐々に解離する RNA を検出する。Chase 実験の場合は、反応直後に非放射性的のヌクレオチドを再び注入した。

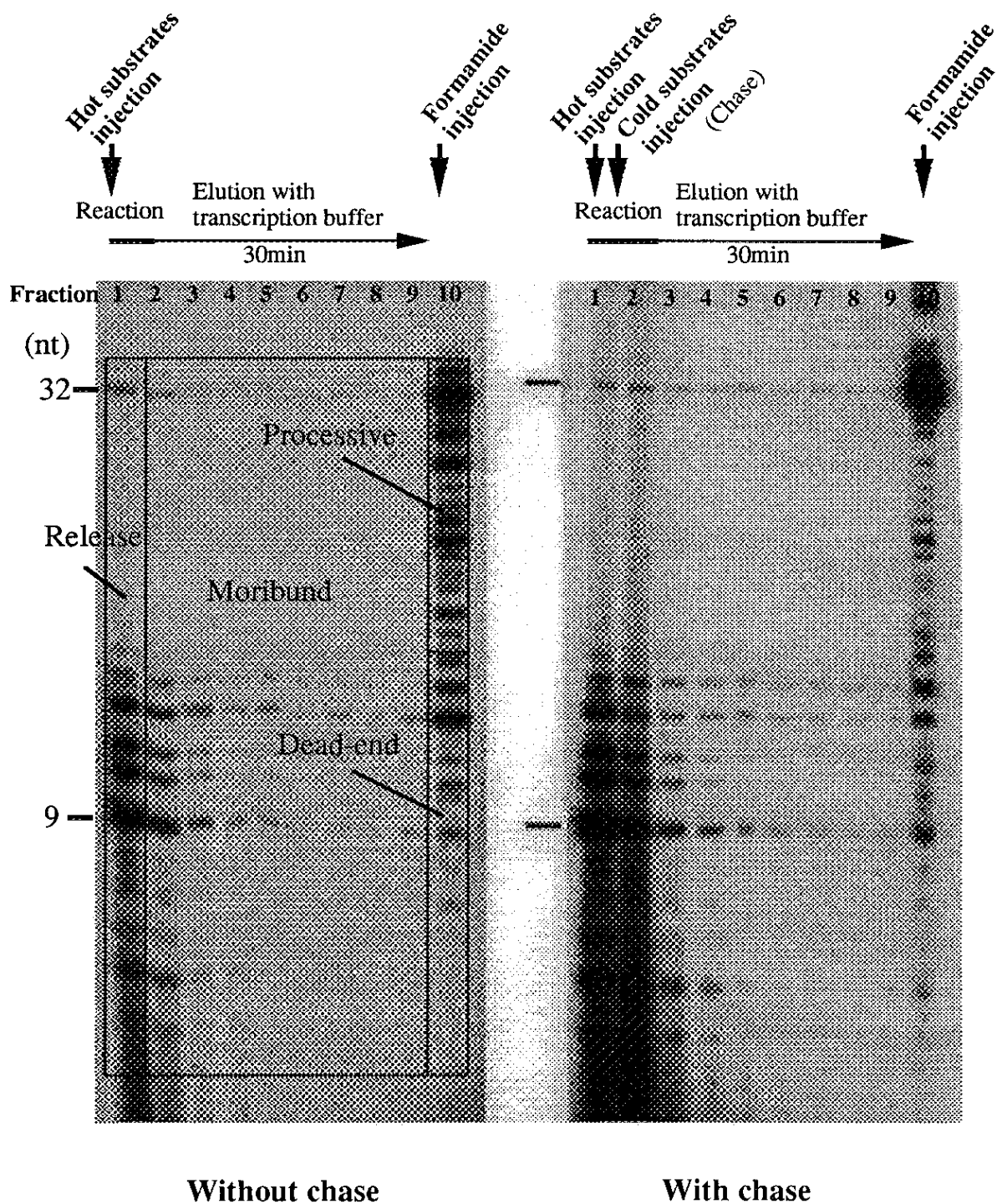


図 3-6 Column transcription を用いた転写複合体の検出

RNA のパターンから、溶出された RNA がどの複合体に含まれていたものを次のように同定した。(詳しくは本文参照)

Release : 転写反応中に解離した RNA

Moribund : 転写終了後に moribund complex から解離した RNA

Processive : Chase reaction によって伸長可能な processive complex に保持されていた RNA

Dead-end : Dead-end complex に保持されていた RNA

を下げたりすることによって RNA 伸長速度を下げると abortive cycle の間に解離した RNA の分布も moribund complex から解離する RNA の分布もともに鎖長の短い方に移動した (data not shown)。これらの結果は、fraction 1 に RNA を解離する abortive synthesis を担う転写複合体と、fraction 2 から fraction 9 に RNA を解離する複合体が同一のものであるという考えを支持する。以上の結果から直接検出された不安定な複合体が 3-2-3. で想定した abortive synthesis を担う moribund complex であると結論した。

Chase 実験を行うと fraction 10 に溶出される RNA の鎖長が長くなり、32nt に分布が集中した (図 3-6)。これは、Chase によって伸長する能力のある processive complex がかなり残っていたことを示す。それにもかかわらず、chase を行っても短い鎖長でとどまっている RNA が Fraction 10 に検出された。つまり基質存在下でも RNA を伸長できない複合体、dead-end complex に変換して、最後までカラムに保持された複合体が存在することがわかった。Dead-end complex は 13nt 程度までの比較的短い RNA を保持している (図 3-6) ことから、moribund complex が時間とともに dead-end complex に変換する考えると、いくらかの短鎖 RNA が解離せずに複合体に保持されるという結果を矛盾無く説明できる。

以上の結果から 3 種類の転写複合体、processive complex, moribund complex, dead-end complex から解離されたと考えられる RNA を模式的に図 3-6 に示した。Fraction 1 はおそらく大部分が moribund complex によって合成された abortive product で、fraction 2 から fraction 9 は転写終了時に moribund complex に結合していた RNA が時間とともに解離したものの、fraction 10 は最後まで転写複合体に結合していた RNA で、chase により 32nt に伸びた鎖長の RNA は processive complex に保持されている RNA、32nt まで伸びない鎖長の RNA は dead-end complex に保持されている RNA と同定できる。

3-2-5. 反応条件が moribund complex の形成に及ぼす影響

Column transcription を異なる反応条件で行った結果を図 3-7 に示す。この手法はクロマトグラフィーであるので、物質の分離は連続的であり、完全な分離は不可能である。

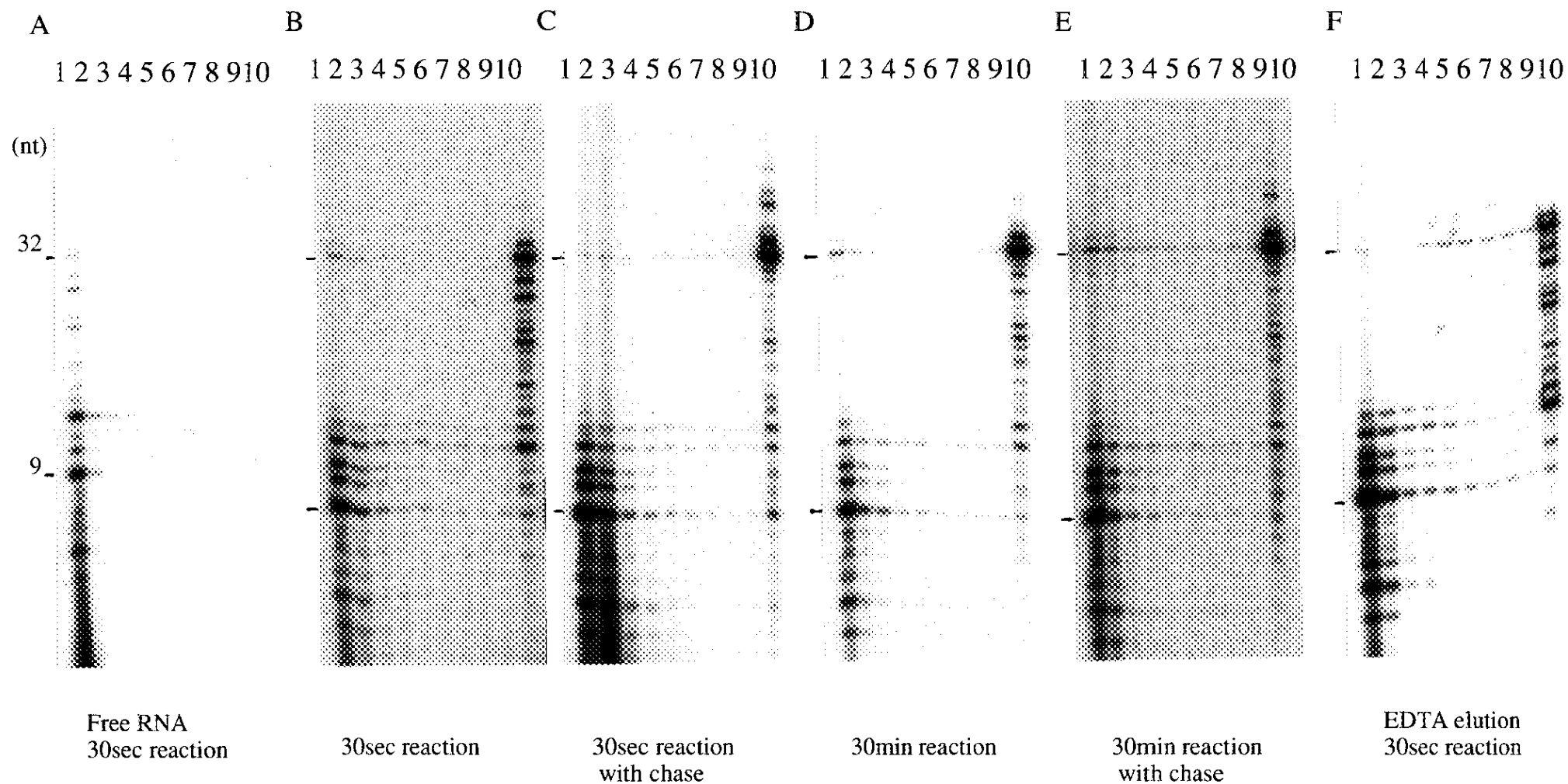


図 3-7 Column transcription による RNA の溶出パターン

(A) 遊離の RNA のみを流す対照実験。(B, C) 30 秒の転写反応の後溶出した。(D, E) 30 分の転写反応の後溶出した。(F) (B) と同条件で溶出時に転写バッファに EDTA を加えた。(C, E) 転写反応直後に Chase を行って RNA の伸長を調べた。

そこで、バッファの溶出に伴って解離する RNA が、転写複合体から解離したものであり、すでに解離していた RNA が樹脂その他に吸着し徐々に遊離してくるものではないことを示すため、遊離状態の RNA を流す対照実験を行った (図 3-7, パネル A)。RNA は fraction 1 にほとんど溶出され、fraction 2 以降の溶出量はパネル B からパネル F と比べ無視できる程度に少なかった。この結果は、他の総てのパネルに見られる fraction 2 以降の溶出が転写複合体からの RNA の解離を主として現したものであることを示している。

転写反応の時間を 30 秒と 30 分に設定し、chase の有無で比較した結果をパネル B からパネル E に示す。4 つのパネルで fraction 10 のパターンを比較すると、30 秒の反応では 32nt に到達しない大半の RNA (パネル B) が chase により 32nt まで伸長したことがわかる (パネル C)。一方、30 分の反応ではかなりの RNA がすでに 32nt に伸長しているが (パネル D)、32nt に至らない RNA は残存しており、chase によるパターンの変動はさほど大きくはない (パネル E)。つまり、30 秒の反応で 32nt に達しない RNA を保持している複合体の大半が processive であるのに対し、30 分の反応で大半の複合体が dead-end 化していた。

転写反応に要する Mg^{2+} が転写複合体の安定性に寄与するかどうかを調べるため、反応後の溶出に用いる転写バッファに、 Mg^{2+} のキレート剤である EDTA を加えた溶液を用いて、30 秒 no chase の条件で溶出をおこなった (パネル F)。同条件のパネル B の結果と比べ、保持される RNA (fraction 10) に対し、解離する RNA (fraction 2 から fraction 9) が相対的に増加した。また、短鎖 RNA のみならず、32nt RNA の解離も促進した。この結果は、 Mg^{2+} が転写複合体の安定性に寄与していることを示唆する。

3-2-6. RNA ポリメラーゼの均質性

もし、長鎖 RNA を合成できない活性の低い RNA ポリメラーゼによって短鎖 RNA が多量に合成されるならば、run off したポリメラーゼを集めて再び転写反応を行えば、殆ど短鎖 RNA は合成されず殆どの RNA は長鎖となるはずである。このような発想で、

run off を効率良く行う平滑末端の DNA を作成し実験を行った。実験の概要を図 3-8 に示す。30 秒、30 分の 2 種類の反応時間でそれぞれ基質に ATP を含む条件と含まない条件の計 4 通りの条件で 1 次反応を行った。基質に ATP を含まない場合は、+32 で反応が停止するので RNA ポリメラーゼは run off しない。ATP を含む場合は反応時間が 30 分の場合、30 秒に比べより多く run off することを確認した (data not shown)。それぞれの条件で解離した RNA ポリメラーゼを含む溶液に新しい固定化 DNA と σ 因子を加え、open complex を形成させた後、余剰の酵素や 1 次反応の基質を洗い落として、2 次反応を行い合成された RNA の分布を比較した。

結果を図 3-9 に示す。30 秒 (A, B)、あるいは ATP を含まない基質 (A, C) で 1 次反応を行った場合も 2 次反応で RNA が合成されたことから +32 の停止複合体や moribund complex からも RNA ポリメラーゼが解離していると判断した。しかし、いずれの条件でも 2 次反応で合成される RNA は 32nt RNA と短鎖 RNA の両方を含み、分布は殆ど変わらなかった。Run off RNA ポリメラーゼを多く含むと考えられる条件 (D) でも、+32 の停止複合体や moribund complex から解離した RNA ポリメラーゼを多く含むと考えられる他の条件でも RNA の分布がほぼ同一であったことから、解離した RNA ポリメラーゼは均一であったと結論した。RNA ポリメラーゼを含まない対照実験では RNA が合成されなかったことから (E)、加えた σ 因子の溶液に RNA ポリメラーゼが混在しており 2 次反応で RNA が合成された可能性は排除できた。

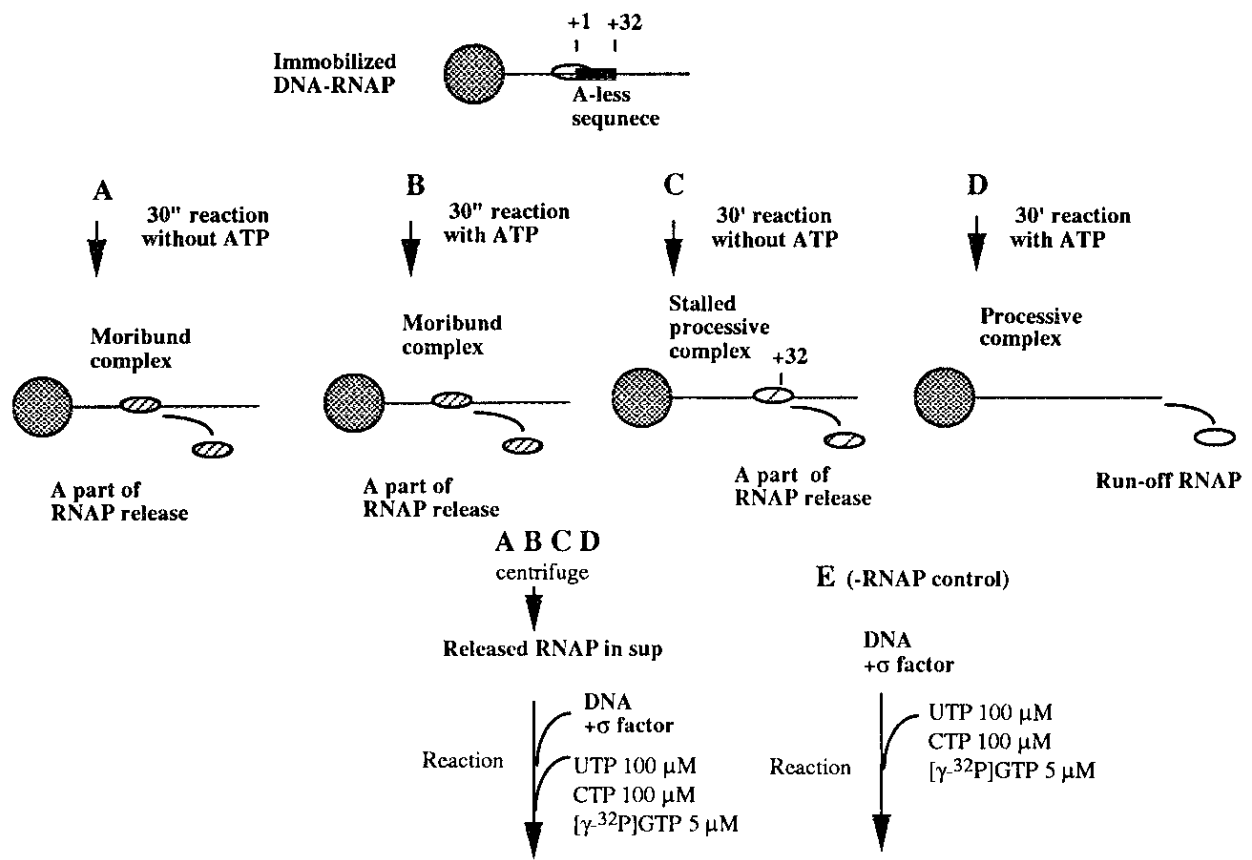


図 3-8 RNA ポリメラーゼが不均質であることを否定するための実験方法

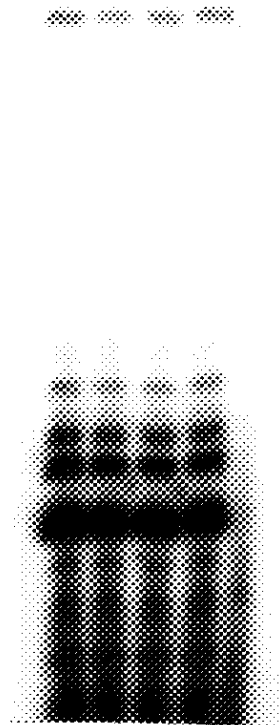
いろいろな条件下 (A, B, C, D) で転写複合体から解離した RNA ポリメラーゼが、新たに反応を行う際どのような分布の RNA を合成するかを調べた。解離した RNA ポリメラーゼに DNA と σ 因子を加え、2 次反応を行った。(E) σ 因子に RNA ポリメラーゼポリメラーゼの混在が無いことを示す対照。RNA ポリメラーゼに不均質性があるならば、(A, B, C, D) で異なる分布の RNA が合成されると予想される。

1st reaction time	30"		30'		PNAP
	-	+	-	+	
ATP	-	+	-	+	-

(nt)

32 -

9 -



A B C D E

図 3-9 いろいろな条件で転写複合体から解離した RNA ポリメラーゼを用いた転写反応

(A) ATP を含まない基質で 30 秒、(B) ATP を含む基質で 30 秒、(C) ATP を含まない基質で 30 分、(D) ATP を含む基質で 30 分転写反応を行い解離した RNA ポリメラーゼを固定化 DNA から分離して用いた。解離した RNA ポリメラーゼに新たな DNA と σ 因子を加えて 30 分転写反応を行った。(E) RNA ポリメラーゼを加えない対照。

3-3. 考察

3-3-1. Abortive synthesis を担う新しい転写複合体

転写初期反応の速度論的解析により abortive synthesis を担う新しい転写複合体が存在することが示唆され、この複合体を moribund complex と名付けた。Abortive な産物となる短鎖 RNA は反応開始後 20 分たっても合成され続けるが、長鎖 RNA は、反応開始後僅か 1 分で飽和量の約半分が合成される (図 3-2) ことから、長鎖 RNA を合成する転写複合体の大半は abortive cycling を経ないと考えられる。つまり、転写初期に 2 種類の複合体、processive complex と moribund complex が存在し、前者が長鎖 RNA の大部分を合成し、後者が、abortive synthesis の大部分を担うと考えられる。反応開始前の RNA ポリメラーゼが均一であることが示唆された (図 3-9) ので、考えられることは、(1) 転写反応の過程で、processive complex が moribund complex に変換したか、(2) DNA に結合する以前に溶液中で 2 状態の平衡が成り立っていたか、(3) 総て始めは moribund complex で転写反応のごく初期に一部のみが processive complex に変換したということである。いずれにしろ反応は順次的ではなく、一部の転写複合体は反応の過程で dead-end complex に向かう経路に分岐し、長鎖 RNA の合成が早期に完了した (図 3-2) ことから、反応を行った条件下では 2 つの経路が再び合流することは無いと判断された。Erie ら (1993) は misincorporation を起こす反応系を導入し、同様の dead-end complex に至る反応経路の存在を提唱し、kinetic trap model と呼んだ。

3-3-2. Moribund complex の検出

新しく見いだされた転写複合体である moribund complex が RNA を解離し易いという不安定性を有することを利用して、moribund complex を検出する方法を開発した。検出に成功したことから、moribund complex の存在が確かめられた。結果で述べた様に、この手法を用いることにより moribund complex のみならず、processive 及び dead-end complex も同時に検出できた。

Chase 実験によって示唆されることは、基質存在下で moribund 化が促進されるという可能性である。図 3-7 のパネル B, C, D, E を比較すると 30 秒の反応の場合も 30 分の反応の場合も、chase によって fraction 1 の RNA 量も fraction 2 の RNA 量もともに増加していた。Chase を転写バッファを流す直前に行ったため、chase reaction 中に解離した RNA は fraction 1 と 2 に溶出され、その後解離した RNA は fraction 3 から fraction 9 に溶出される。上記の結果は chase によって RNA の解離が促進され、複合体の不安定性が増したことを意味する。つまり moribund complex は本質的な不安定性を持っているが、基質存在下で次のヌクレオチドの取り込みを可能にすると、反応を進めるか RNA を解離するかの経路を選択する結果、RNA を保持する確率が減少すると解釈できる。

3-3-3. Moribund complex の転写調節における役割

用いた総ての反応条件で、moribund complex から徐々に解離する短鎖 RNA が検出されたが、+32 の停止複合体からも少量の RNA の解離が見られた (図 3-1, 図 3-7)。このことから、32nt RNA を持つ複合体も RNA を解離し易い構造に変換していることが示された。この結果は、+32 の停止複合体の一部が moribund complex と同質の複合体に変換した可能性を示唆する。32nt RNA は EDTA によっても解離されやすくなり (図 3-7, パネル F)、停止複合体が安定性の点で moribund complex と似通っていることから、この可能性が高いと考察した。

このことは、moribund complex は abortive synthesis を担うが、必ずしも abortive cycle 領域内でのみ存在する複合体ではないということを意味する。この考えを支持するもうひとつの結果は、DNA 上のあらゆる部位で dead-end complex が形成されているということである。解離した RNA の分布 (図 3-1) から abortive cycle は用いた系でほぼ 10nt より短い RNA を合成する領域でおこることがわかった。Column transcription の結果 (図 3-7) から、30 秒の反応では 10nt 以上の RNA は chase によりほぼ伸長するが、30 分の反応の間に 10nt 以上の RNA でも chase により伸長しないものが現れた。

つまり、abortive cycle を脱しても不安定でゆっくりとしか RNA を伸長しない複合体

が存在し、それらは、dead-end 化することを示す。最も単純な説明は、moribund complex は abortive cycle を回り続けるだけでなく、一部はのろのろと伸長反応を継続するが十分な伸長を果たせないまま dead-end complex に変換するということである。同様の現象が T3, T7 ファージの RNA ポリメラーゼでも見いだされ、ゆっくりした伸長反応は、ATP の添加によって加速されることが見いだされた (Terada & Shimamoto, submitted)。

Moribund complex という構造は、これまで述べたように、転写のスムーズな進行を妨げるものであるといえる。このことから、moribund complex は転写調節因子の働く標的として機能し得ると考えられる。Moribund complex を標的に転写因子が働くとすれば、moribund complex を解消し、processive complex への変換を促進することで、生体内での転写調節が行われていることは十分考えられる。実際に序論で述べたように、停止複合体を認識して RNA 伸長反応を促進する因子が見つっている。大腸菌で見いだされた転写伸長因子、GreA, GreB が abortive synthesis を大きく減少する働きを持つことがわかった (Eric *et al.*, 1993) ことはこの可能性を強く示唆する。

転写の初期に遊離の蛋白因子が転写複合体を認識して結合するためには、より長い時間同じ位置にとどまり短鎖 RNA を保持している複合体が標的として適する。Moribund complex は転写の "transient receptor" として働くと想像できる。また、すでに述べたように、moribund complex が abortive cycle 領域内に限らず、転写のあらゆるステージで存在し得るならば、転写初期に限らず、moribund complex は様々な状況で調節に関与し得、一連の転写反応を統一的に理解することも可能である。

3-3-4. RNA ポリメラーゼの均質性

これまでの議論が成立するためには、数種の転写複合体が相互に、あるいは一方向に変換し得ることが重要な前提であった。RNA ポリメラーゼの均質性を厳密に証明することは困難であり、示唆的な結果が得られたにとどまったが、moribund complex の存在が大腸菌のみに限定されないこと、abortive transcript の存在は過去調べられた総ての *in*

vitro 転写系で確認されていること、RNA ポリメラーゼの調製は標準的方法に基づいており、これまで不均一性を示す結果は報告されていないこと、等から判断すると、本研究で得られた結果が RNA ポリメラーゼの不均質に由来する可能性は、非常に考えにくいと考察した。

第4章 タンデムな転写が初期反応に及ぼす作用

第4章 タンデムな転写が初期反応に及ぼす作用

4-1. 方策

本研究を手掛けた当初、転写初期の反応機構に及ぼす ATP の効果を調べることをひとつの目的としていた。転写における ATP の効果を調べることを困難にしている要因のひとつは、ATP が転写反応の基質として使われることにある。そこで、転写産物の初期配列に A が入らないように配列を工夫した鋳型 DNA を作製した。第2章で詳しく述べたように、鋳型 DNA の λP_R プロモーターの下流、転写開始点から 32bp を non-template strand に A を含まない配列にし (図 2-1)、反応産物である RNA が 32nt まで ATP を取り込まないようにした。

ATP の効果についての知見は後述する (4-3-1) が、この鋳型 DNA を用いた転写産物を解析することにより予想外の結果が得られた。反応溶液中の ATP 濃度を低下させていくと RNA ポリメラーゼは 32nt の RNA を合成して反応を停止する。この反応停止に伴ってゲル上で異常な移動度を示す RNA の合成と abortive transcript の増加が見られた。この異常 RNA が合成される原因を調べるため、その配列を決定した。

用いた実験条件から、上記の現象は 1 分子の DNA に対し多分子の RNA ポリメラーゼが作用するタンデムな転写に起因することが示唆されたため、これを検証する実験を行った。

- (1) タンデムな転写が反応に影響を及ぼすならば、RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依存して、合成される RNA の分布が変化するはずである。RNA ポリメラーゼを DNA に対して過少量反応させた場合と過剰量反応させた場合の転写産物を比較した。
- (2) 転写産物が転写複合体から解離したものであるか否かを知るために、鋳型 DNA を固定化して複合体に結合している RNA と解離した RNA を分離した。
- (3) 固定化 DNA の手法を用いて、RNA 合成反応を開始する前に非特異的に DNA に結

合した、あるいは DNA に結合していないポリメラーゼ分子を除くことによって、プロモーターあたり 1 つの RNA ポリメラーゼが作用する状況を作り、異常 RNA の合成や abortive synthesis の促進が起こるかどうかを調べた。

- (4) タンデムな転写が起こっていることを検証するために、RNA ポリメラーゼと DNA のモル比を変え、ATP を除いて転写反応を行い、hydroxyl radical による footprinting を行った。

4-2. 結果

4-2-1. RNA ポリメラーゼの停止と abortive な転写の相関

15 nM の A-less 配列を持つ DNA に対し、過剰の 60 nM の RNA ポリメラーゼを加え、ATP の濃度を変化させて *in vitro* 転写反応を行った。基質として、100 μ M の UTP, CTP、5 μ M の [γ - 32 P] GTP、及び 0 μ M から 100 μ M の ATP を用い、37 $^{\circ}$ C 20 分で反応を行った (図 4-1)。ATP を全く加えないと転写反応は A-less 配列の末端で停止し、その結果 32nt の RNA が蓄積した (lane1)。このとき、32nt 以外に多量の短鎖 RNA が合成され、その中には電気泳動上で 6nt と 7nt の中間の移動度を示すバンドが現れた (図 4-1 中に *で示す)。このバンドは ATP 濃度が増加するに従って消滅していった (lane 2 - lane 6)。つまり、ATP の存在により転写反応が +32 を越えて進むことに伴って上記の異常 RNA の合成量は減少することを示す。

上記の反応条件で、32nt 以上の鎖長の RNA 以外に異常 RNA を含む多量の短鎖 RNA の合成が見られた (図 4-1)。このことは、abortive cycling の存在を示唆する。実際に、これらの短鎖 RNA の大部分が転写複合体から解離していることは、固定化 DNA を用いた実験で後に示される。

図 4-1 のゲルから RNA 合成量を定量し、ATP 濃度に対してプロットしたグラフを図 4-2 に示す。短鎖 RNA の内、4nt RNA, 9nt RNA, 異常 RNA を定量した。ATP 濃度の増加に伴って、異常 RNA の合成阻害が見られた。100 μ M ATP 存在下でもかなりの量合成されているためゲル上 (図 4-1) では明瞭さを欠くが、4nt の RNA 合成量を定量してみると、図 4-2 に示すように ATP によって異常 RNA の合成阻害同様の阻害効果があることがわかった。一方、9nt の RNA は、ATP 濃度の上昇に伴って合成量はむしろ増加することがわかった。

異常 RNA 及び 4nt RNA の合成における阻害物質 ATP の平衡解離定数は 0.5 μ M 以下と見積もられた。一般に ATP と蛋白質との結合定数は数 10 μ M かそれ以上であることを考えると、ATP の親和性は異常に強く、ATP の結合そのものを直接反映した結果では

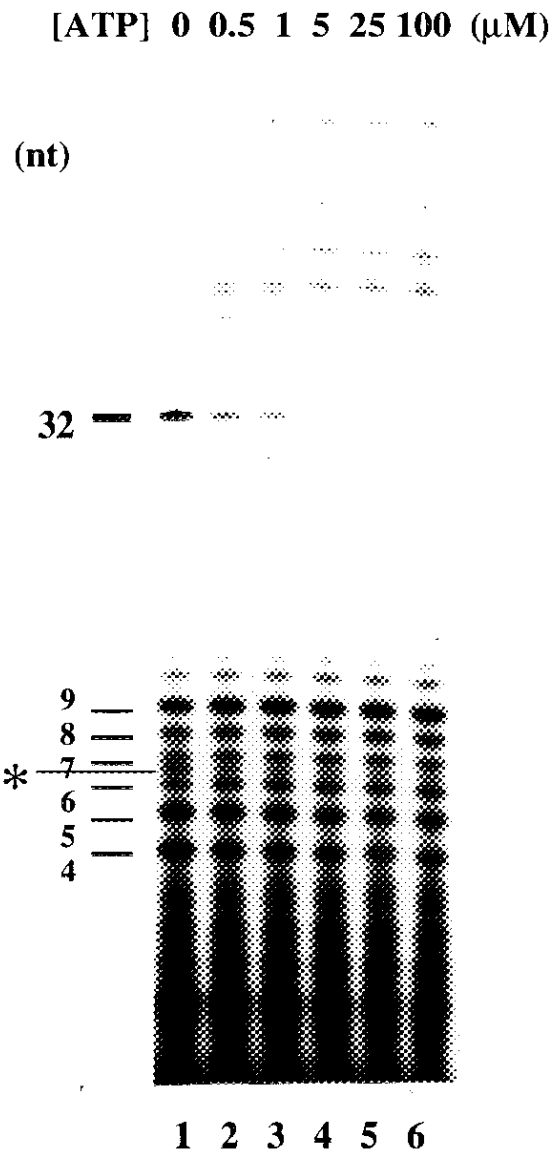


図 4-1 A-less 配列を持つ鋳型 DNA の転写に対する ATP の効果

15 nM の鋳型 DNA に対し、60 nM の RNA ポリメラーゼを加え、転写反応を行った。反応基質として 100 μM の UTP, CTP、5 μM の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ 、及び 0 から 100 μM の ATP を用い、37 $^{\circ}\text{C}$ 20 分で反応を行った。異常 RNA を * で示す。

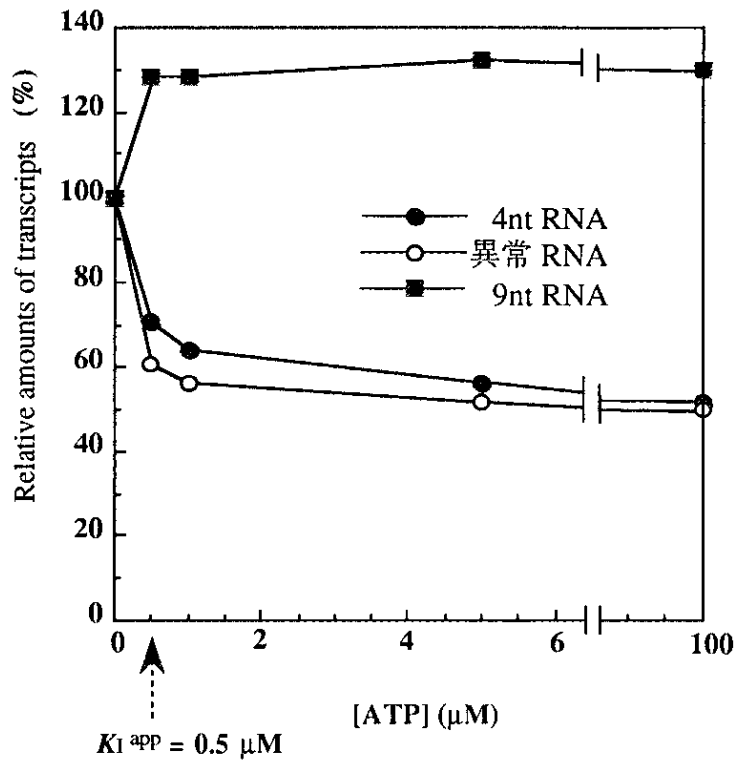


図 4-2 鎖長の異なる 3 つの転写産物の合成に対する ATP の効果

図 4-1 に示した電気泳動の 4nt RNA, 9nt RNA, 異常 RNA バンドを定量し、ATP 濃度に対してプロットした。ATP 濃度が $0 \mu\text{M}$ の時の各々の RNA 合成量を 100% として相対表記した。変化の midpoint に対応する ATP 濃度から、 K_i^{app} 値は異常 RNA、4nt RNA とも多くとも $0.5 \mu\text{M}$ と見積もられる。

ないと考えられる。むしろ、転写反応の停止解除といった ATP の存在により引き起こされる二次的なもので、kinetic な見かけの平衡定数と考えたほうが理解し易い。

転写反応の停止と異常 RNA の合成の相関関係をよりはっきりさせるため、ATP の代わりにいろいろな ATP アナログを用いて同様の実験を行った (図 4-3)。用いた ATP アナログのうち、あるものは基質として ATP の代わりに転写産物に取り込まれるがあるものは取り込まれない。基質として取り込まれるアナログを用いると 32nt を越えて RNA が合成されるが、取り込まれないアナログを用いた場合は 32nt で合成が停止する。32nt を越えて転写反応が進むアナログ (elongation +) を用いると、いずれの場合も ATP を加えた場合同様異常 RNA の合成が阻害された (inhibition +、異常 RNA を * で示す)。32nt で転写反応が停止するアナログ (elongation -) を用いると、ATP を加えない場合同様異常 RNA の合成は阻害されなかった (inhibition -、異常 RNA を * で示す)。この結果は +32 における転写反応の停止と異常 RNA の合成が何らかの原因によりカップルして起こることを強く示唆する。

4nt, 5nt, 9nt RNA の合成阻害と促進に関して、ATP アナログを用いた実験でも異常 RNA と同様の結果を得た (図 4-3)。これらの結果は、転写反応の停止に伴って、異常 RNA を含めほぼ 6-7nt 以下の RNA の abortive synthesis が促進され、9nt 以上の RNA の合成は阻害されることを示唆する。

4-2-2. 異常転写産物の配列の決定

RNA 塩基配列の決定法として RNase による塩基特異的切断を利用した。末端標識した RNA をゲルから切り出し、各種 RNase で穏やかに処理することにより部分切断された断片が得られる。得られた RNA 断片をゲルに流すことにより配列を決定した。

ATP 非存在下の反応で得られた異常 RNA の配列は GUGUGX と決定された (パネル A)。鎖長は 6nt であり、DNA 配列から予測される配列 GUGUUX と比較すると、5 番目の U が G に変わっていることがわかった。同じ転写条件で蓄積した 32nt の RNA の配列を調べてみると、DNA 配列から予測される配列 GUGUU... であることがわかった (パ

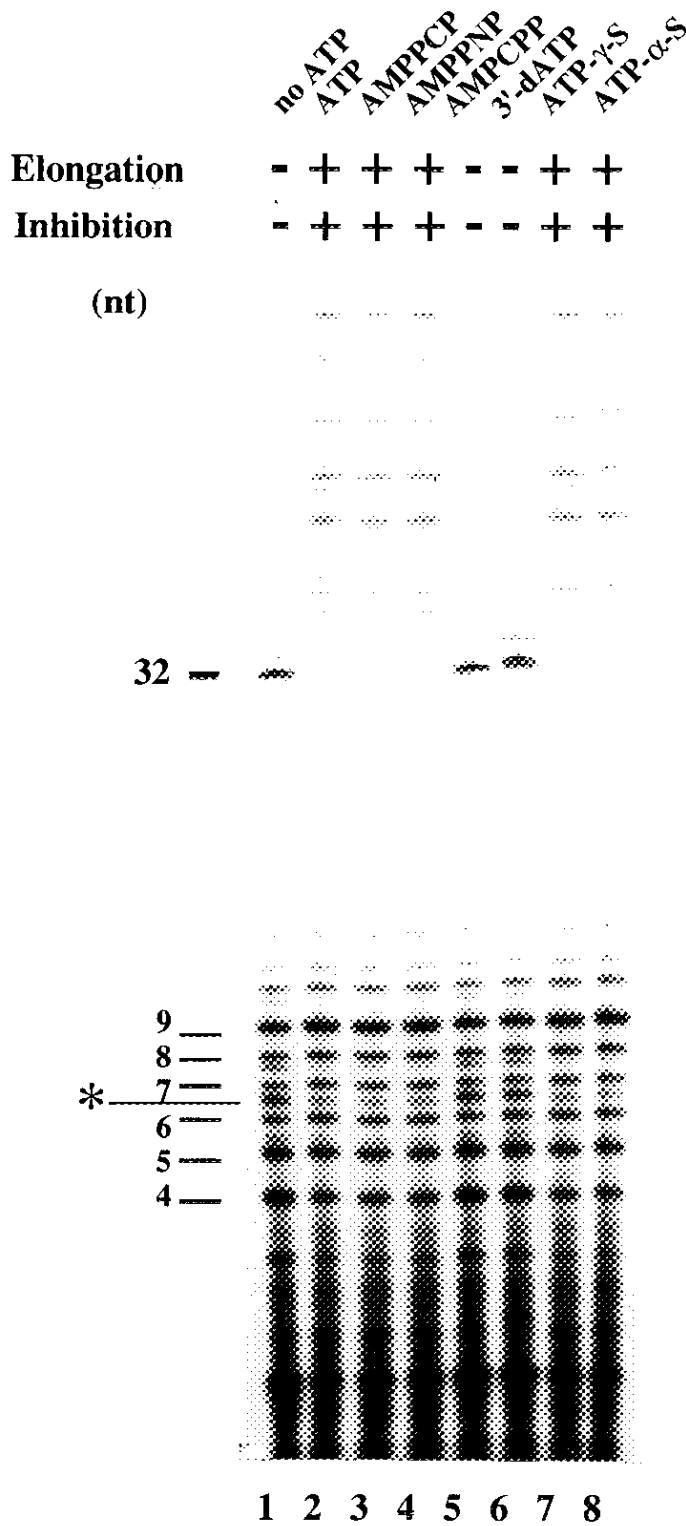


図 4-3 A-less 配列を持つ鋳型 DNA の転写に対する ATP アナログの効果

15 nM の鋳型 DNA に対し、60 nM の RNA ポリメラーゼを用い、転写反応を行った。反応基質として 100 μ M の UTP, CTP、5 μ M の $[\gamma$ - 32 P] GTP、及び 100 μ M の様々な ATP アナログ (ゲル上部に表記) を用い、37 $^{\circ}$ C 20 分で反応を行った。異常 RNA を * で示す。結果として得られた各 ATP アナログの効果、32nt を越える RNA 伸長の有無 (Elongation)、異常 RNA の合成阻害の有無 (Inhibition) をゲル上部に示す。

A 異常RNA

B 32nt RNA

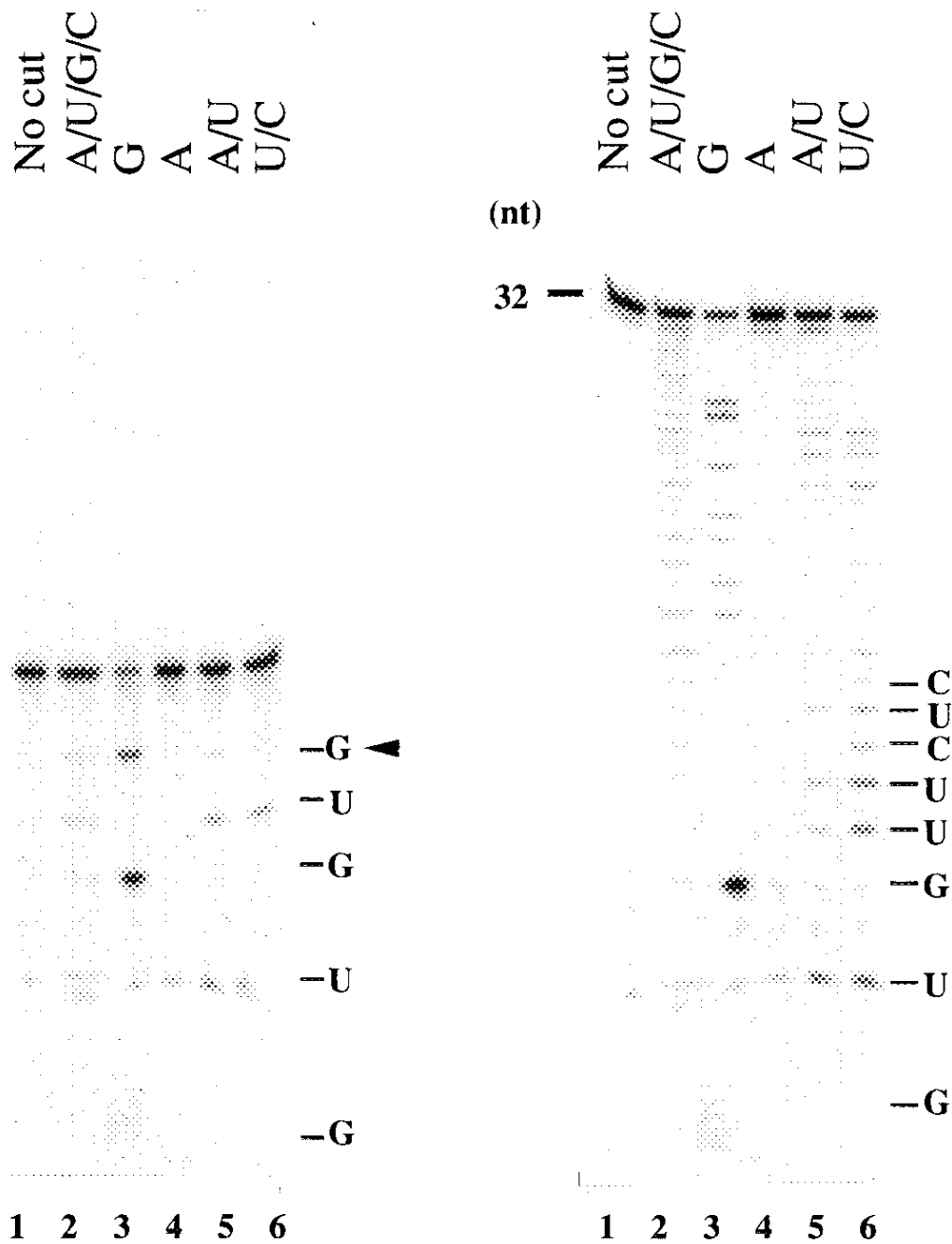


図 4-4 ATP 非存在下で合成された RNA の塩基配列決定

第 2 章で述べた方法に従い、RNase による塩基特異的切断を利用した RNA 配列決定を行った。ATP 非存在下で転写反応を行い、末端標識した RNA をゲルから切り出し、各種 RNase で部分消化した。lane 1: RNase 未反応の対照 (No cut)、lane 2: アルカリ分解による非特異的切断、lane 3-6: RNase による塩基特異的切断 (用いた RNase の塩基特異性を各レーンの上部に示す)。(A) 異常 RNA、(B) RNA ポリメラーゼの停止によって蓄積する 32nt RNA の塩基配列。得られた塩基配列を各ゲルの右に示す。矢じりは DNA 配列から予想される RNA 配列と異なっていた塩基を示す。

ネル B)。

可能な解釈のひとつは、鋳型 DNA 上の他のプロモーターから転写が開始されたということであるが、少なくとも GTP で末端標識をした以上転写は G から開始していなければならない、GUGUGX を合成する DNA 配列は用いた DNA 上には両鎖とも存在しなかった。配列決定に用いた RNA に他のプロモーターから転写が開始された RNA が混在していたと考え、鋳型 DNA 上に存在する類似の配列で候補にあげられる唯一の配列は GTTTG であった。用いた鋳型 DNA の一部を PCR で増幅することによって GTTTG を含まない 240bp の DNA を合成し（第 2 章参照）、この DNA を鋳型にして転写を行っても異常 RNA は合成された。このことから、他のプロモーターからの転写の可能性は排除できた。

以上の結果から、異常 RNA は誤ったヌクレオチドの取り込みの結果であり、配列が変わったことにより電気泳動上で移動度が小さくなったことが明らかとなった。また、32nt の配列は正常であったことから、misincorporate された RNA は 32nt まで伸長しないで 6nt で反応が停止することが示唆された。

4-2-3. RNAポリメラーゼの多分子反応

転写反応の停止と異常 RNA の合成とは相関があるが、1 分子でおこる反応を前提に考えると、RNA ポリメラーゼは将来 +32 で反応を停止することを予測した上で、短鎖 RNA を合成する際間違った取り込みを起こすといった非常に不自然なモデルを想定しなければならない。あるいは、+32 で停止した RNA ポリメラーゼが DNA からいったん解離し、2 回目以降の反応を行う際間違った取り込みを起こすことも不可能ではないが、ヘパリンを加えた反応でも異常 RNA は合成されたため、この可能性は排除された。

この章では、ここまで総て RNA ポリメラーゼを DNA に対してやや過剰量加えていることを考慮に入れると、考えられるもっとも単純な説明は、1 分子の DNA に対し多分子の RNA ポリメラーゼが作用し、互いに干渉しているということである。つまり、1 分子の RNA ポリメラーゼによって占拠されていたプロモーターが転写反応の進行によ

り解放されると、別の RNA ポリメラーゼ分子が同じプロモーターにエントリーできる。図 4-5 に示すように、先行する RNA ポリメラーゼが +32 の位置で反応を停止すると、物理的障壁のために後続の RNA ポリメラーゼ分子は転写開始点近傍で進行を阻害される。このようにタンデムな転写反応が起こった結果、進行を阻害された後続ポリメラーゼは読み誤りを起こしたというモデルである。Misincorporate された RNA はおそらく RNA ポリメラーゼの物理的進行阻害によりそれ以上伸長できない。さらに、RNA ポリメラーゼが進行できないため abortive cycle を回り続ける結果、6 - 7nt 以下の鎖長の RNA が増産されると考えられる。

4-2-4. RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依存しておこる転写反応

RNA ポリメラーゼを DNA に対し過少に反応させた場合、32nt 以上の RNA は殆ど合成されず、9nt の RNA が主たる産物となった（図 4-6, パネル A, lane 1, 2）。異常 RNA は殆ど合成されず、ATP の有無で RNA のパターンに顕著な差は見られなかった。一方、RNA ポリメラーゼを過剰に反応させると、過少の場合に比べ 4nt から 8nt RNA の分布が増えた（図 4-6, パネル A, lane 3, 4）。またこのとき、ATP 非存在下で異常 RNA が合成され（図 4-6, パネル A, lane 3）、ATP を加えるとその合成は押さえられ、4nt, 5nt RNA の合成量も減少した（図 4-6, パネル A, lane 4）。

これら結果は、RNA ポリメラーゼの停止の有無に関わらず、RNA ポリメラーゼが過剰に存在すると、タンデムな転写が起こり、その結果 abortive synthesis が促進されることを示す。また RNA ポリメラーゼ過剰下で、ATP を除くことによって RNA ポリメラーゼを停止させると、abortive synthesis の促進のみならず、misincorporation を引き起こした。このことから、タンデムな転写により RNA ポリメラーゼは軋轢を受けるが、その状況下で反応が停止すると、後続の RNA ポリメラーゼはさらに強い軋轢を受け、その結果 misincorporation を引き起こしたと説明できる。このとき、後続ポリメラーゼは小さい領域で abortive cycle を回り、その合成限界にあたる 4nt, 5nt の RNA が増産されるのであろう。

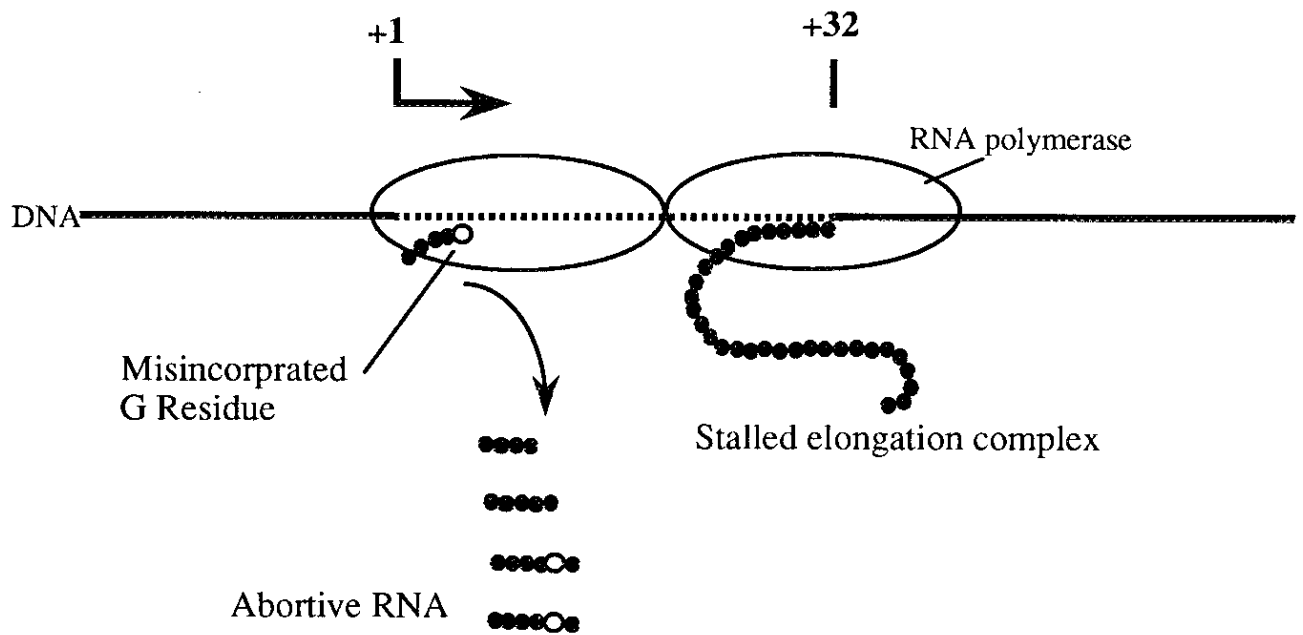


図 4-5 タンデムな転写反応のモデル

32bp の A-less 配列を持つ DNA 上でタンデムな転写が起こると、先行する RNA ポリメラーゼは +32 で進行を停止する。後続の RNA ポリメラーゼは物理的障害のため進行を阻害され、読み誤りを起こす。進行を阻害された RNA ポリメラーゼは abortive cycle を回り続け、その結果 abortive transcript が増産される。

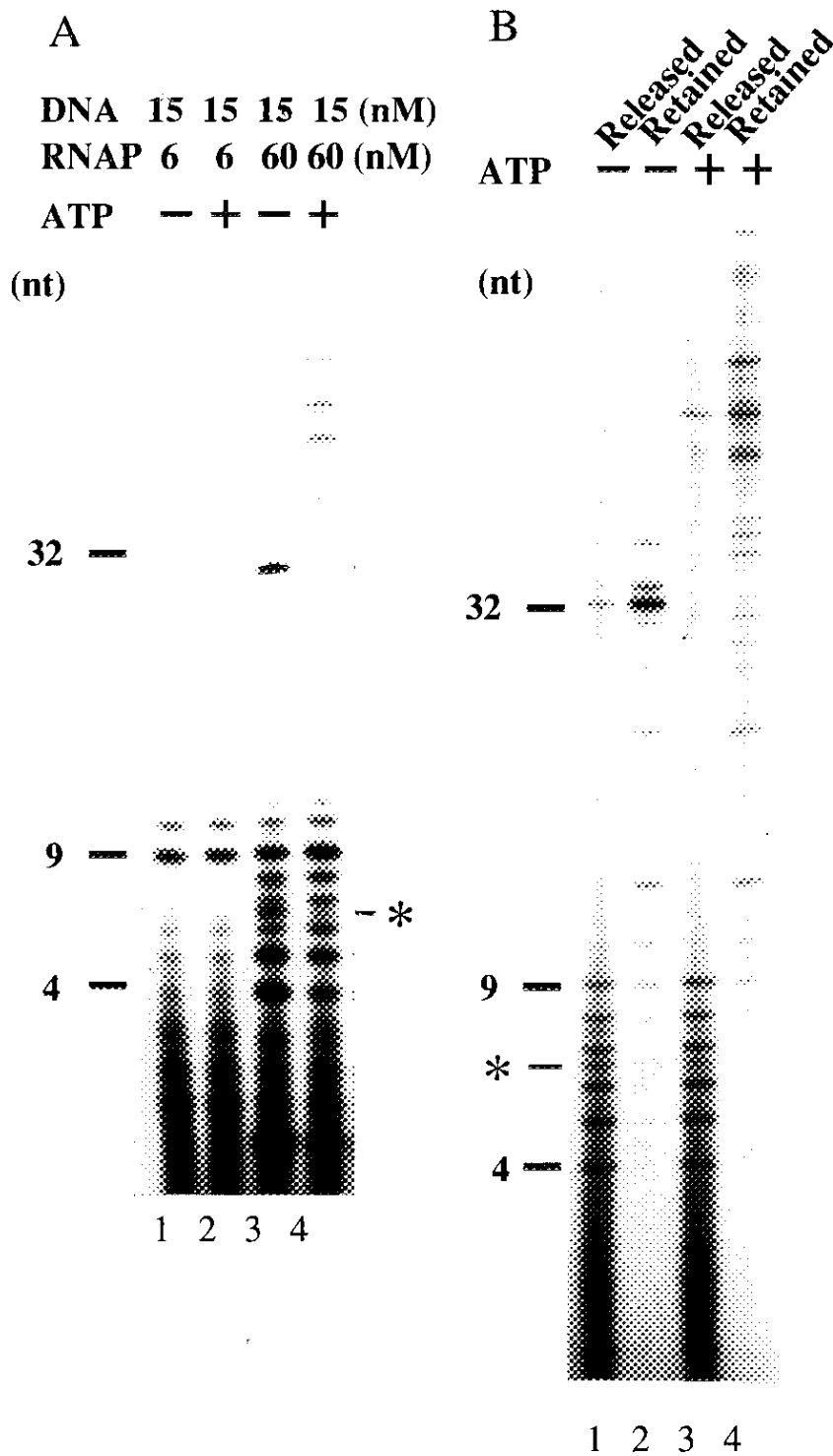


図 4-6 RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依存した RNA 合成

(A) 6 nM または 60 nM の RNA ポリメラーゼと 15 nM の DNA を用い、転写反応を行った。基質として 100 μ M の UTP, CTP、5 μ M の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP、及び 0 μ M または 10 μ M の ATP を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 20 分で反応を行った。(B) 60 nM の RNA ポリメラーゼと 15 nM の固定化 DNA を用いて (A) と同じ条件で反応を行い、合成された RNA を遠心により転写複合体に結合しているものと解離したものに分離した。異常 RNA を * で示す。

4-2-5. 異常RNAは abortive product である

RNA ポリメラーゼを DNA に対し過剰に反応させることによって増産される短鎖 RNA が本当に転写複合体から解離したものであるかどうか固定化 DNA を用いて調べた (図 4-6, パネル B)。図 4-6 パネル A の RNA ポリメラーゼ過剰の条件下 (lane 3,4) で合成した RNA を転写複合体に結合したものと解離したものに分離した。ATP 存在下、非存在下とも合成された短鎖 RNA は、異常 RNA も含めて大半が解離していた。このことから、異常 RNA は abortive product であり、過剰 RNA ポリメラーゼは abortive synthesis を促進することが明らかとなった。

4-2-6. 固定化 DNA を用いたタンデムな転写反応の検証

RNA ポリメラーゼを DNA に対し過少あるいは過剰に加え、pre-incubate して open complex を形成させる (図 4-7, a, c)。過剰に加えた場合、反応溶液を遠心により洗浄することによって DNA に結合していない、あるいは非特異的に結合している RNA ポリメラーゼ分子を除く (pre-wash) と、1つのプロモーターに対し1分子のポリメラーゼが結合する状態が実現できる (図 4-7, b)。この操作により、DNA 1分子に対し、(a) 1分子以下、(b) 1分子、(c) 多分子の RNA ポリメラーゼが作用する状態が作り出せる。転写反応中の複合体の状態を模式的に図 4-7 の右パネルに示す。

ATP 有無各々の条件で転写反応を行った結果合成された RNA のパターンを図 4-7 左パネルに示す。(a), (c) はフリーの DNA を鋳型にした場合とほぼ同一の結果を与えた (図 4-6 パネル A と比較)。このことは固定化 DNA を用いたことによる影響が殆ど無いことを示す。RNA ポリメラーゼ 1分子が DNA 1分子に作用している状態での転写 (b) は、9nt RNA を主産物とし、ATP の有無でパターンに違いは殆ど見られなかった。つまり、RNA の分布は (c) よりもむしろ (a) に近かった。

過剰 RNA ポリメラーゼが存在したときに見られた、転写停止に伴う misincorporation や abortive synthesis の促進が、過剰ポリメラーゼの除去により解消したことを示すこの

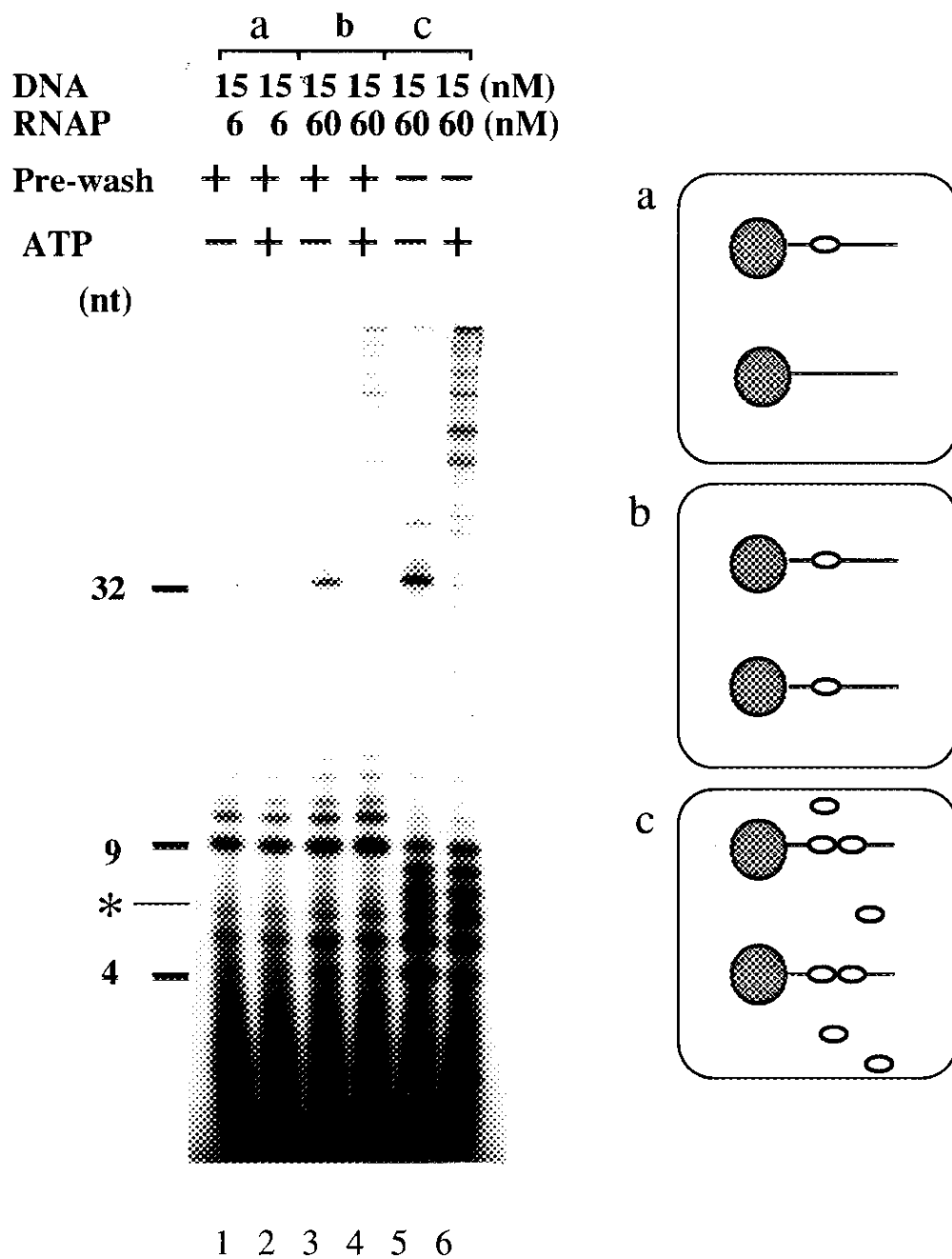


図 4-7 固定化 DNA を用いたタンデムな転写反応の検証

固定化 DNA を用いて RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依存した RNA 合成を調べた。15 nM の DNA に対し、6 nM (a) または 60 nM (b, c) の RNA ポリメラーゼを加え、Pre-incubate した後、(a, b) では余剰の RNA ポリメラーゼを洗浄した (Pre-wash)。(a), (b), (c) 各々の条件で形成される反応中の転写複合体の状態を模式的にゲルの右に示す。基質として 100 μ M の UTP, CTP、5 μ M の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP、及び 0 μ M または 100 μ M の ATP を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 20 分で反応を行った。異常 RNA を * で示す。

結果は、これらの現象が RNA ポリメラーゼのタンデムな転写反応に起因していたことを意味する。

4-2-7. Footprinting による DNA 上の多分子の RNA ポリメラーゼの存在の検証

転写開始点から下流 107bp までを含む 240bp の領域を PCR により増幅して鋳型 DNA を得た (第 2 章参照)。PCR プライマーの 1 つを 5' ラベルすることにより、DNA を末端標識した。転写反応の基質を加えない条件で RNA ポリメラーゼと DNA のみの binary complex (open complex) を同時に形成し、RNA 合成中の複合体 (ternary complex) と footprinting のパターンを比較した。

図 4-8 に footprinting の結果を示す。Binary complex では hydroxyl radical の反応に対し、転写開始点を基準に -40 より上流から +20 付近に及ぶ領域が保護された (lane 3-5)。この結果は、近年報告された footprinting のデータと一致し (Metzger *et al.*, 1989)、open complex 形成時に RNA ポリメラーゼが DNA 上のかなり広範な領域を覆っていることを示す。RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依存せず、この領域は一定で複合体を形成していない DNA によるバックグラウンドのみが変化した。

一方、ternary complex では、RNA ポリメラーゼと DNA のモル比を 10 にすると binary complex と比較して、保護される領域がさらに下流に広がった (lane 8)。このことは、ATP を反応溶液から除いた結果 +32 で反応が停止することを反映しており、下流は +40 近辺まで保護された。しかし上流のプロモーター領域も、依然保護されたままであった。

上記の結果は 2 通りに解釈できる。ひとつの可能な説明は、RNA ポリメラーゼと DNA のモル比に依らず 1 分子の RNA ポリメラーゼが 1 分子の DNA に作用し、転写反応が進むとプロモーターに RNA ポリメラーゼが結合したまま反応中心が下流に移動する結果、保護領域が下流に広がるという説明である。DNA は結果として湾曲せざるを得ないと考えられる。第 2 の可能性はタンデムな転写が起こっているという可能性である。第 1 の可能性が成り立つとすると、RNA ポリメラーゼは +32 まで移動してもなお

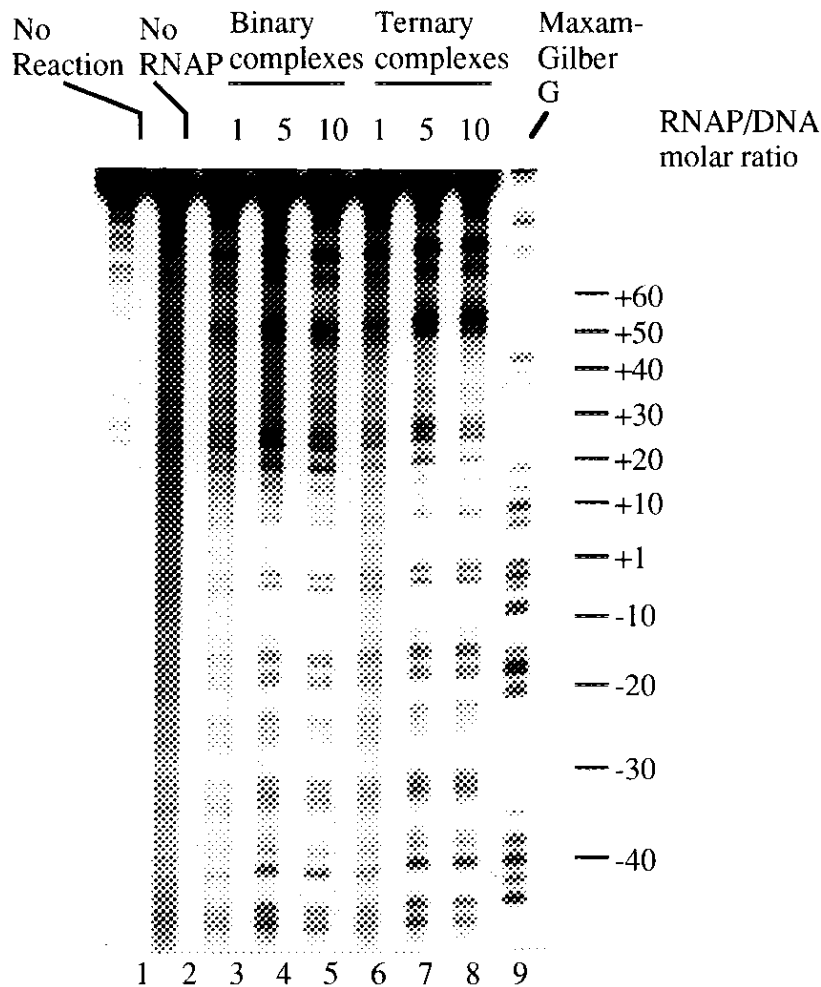


図 4-8 転写複合体の Hydroxyl radical footprinting による解析

Non-template strand を 5' 末端標識した 240bp の DNA を PCR により合成し、これを鋳型に転写をおこなった。基質を加えないで形成した DNA と RNA ポリメラーゼの Binary complex (Open complex) (lane 3-5) と、ATP を除いた基質で反応を途中まで行わせて形成した DNA と RNA ポリメラーゼと RNA の Ternary complex (lane 6-8) を、第 2 章に述べた方法で解析した。2 pmol の鋳型 DNA に対し、2 pmol (lane 3, 6), 10 pmol (lane 4, 7), 20 pmol (lane 5, 8) の RNA ポリメラーゼを反応させた。lane 1: hydroxyl radical 反応を行わない対照。lane 2: RNA ポリメラーゼを加えないで hydroxyl radical 反応を行った対照。lane 3-8: 転写複合体の hydroxyl radical 反応。lane 9: 対照のための Maxam-Gilbert の G 特異的反応によるシーケンシングラダー。転写開始点を +1 とした相対位置をゲルの右に示す。

かつプロモーターから解除されていないことになる。第3章で示したように 32nt RNA は abortive transcript ではない (図 3-1) ので、RNA ポリメラーゼがプロモーター領域に捕捉されていることと abortive cycle を回ることの従来信じられてきた対応関係 (序論参照) は崩れてしまう。むしろタンデムな転写反応が実際に起こっているという第2の可能性のほうが信じやすい。

RNA ポリメラーゼと DNA のモル比を下げると DNA 1 分子に対し 1 分子の RNA ポリメラーゼが作用する確率が高まると考えられる。この場合、転写が進むとプロモーター領域が解放される結果、プロモーター領域が切断反応に感受性になると予想される。予想に反して、RNA ポリメラーゼと DNA のモル比を下げた ternary complex では、binary complex の保護領域と同じ領域が、弱まってはいるものの保護された (lane 6, 7)。

この見かけ上の矛盾は、次のように説明できる。第3章で示したように、用いたシステムでは一部の RNA ポリメラーゼのみが長鎖 RNA を合成するが、大部分の RNA ポリメラーゼは反応中に別の複合体に変換し、最終的に転写開始点近傍で dead-end complex に変換する。つまり、モル比に依らず、転写開始点近傍に反応中心が存在するかたちで DNA を保護する RNA ポリメラーゼが存在することになる。また、あらかじめ単離された 10nt 以上の RNA を保持する productive complex を footprinting で解析した例では、プロモーター部は露出していた (Metzger, *et al.*, 1989; Schicker *et al.*, 1990)。つまり、得られた footprinting のパターンは、単離操作によりはずれる不安定な moribund complex の存在を反映している結果であると解釈できる。以上の考察から、完全な証明ではないが、タンデムな転写が起こり得ることを結論した。

4-3. 考察

4-3-1. 転写初期反応に及ぼす ATP の効果について

当初、計画していた転写初期反応に及ぼす ATP の効果について考察する。ATP 非存在下で A-less 配列を転写できることから、少なくとも ATP は転写開始、あるいは伸長初期反応に必須ではないことが確かめられた。32bp の A-less 配列を持つ鋳型 DNA を用いた場合、今まで述べてきたように、ATP の有無による転写産物の違いは RNA ポリメラーゼの停止による影響を反映したものであることがわかった。そこで、非水解の ATP アナログを含む各種 ATP アナログを ATP の代用として用いたところ、+32 で反応停止を起こさないアナログでは ATP 存在下の反応と比較して有為な差は見いだせなかった (図 4-3)。この結果は転写開始、あるいは伸長初期反応における ATP の正の効果を示唆しない。

但し、A を含んだ配列を用いた場合、ATP の代わり非水解の ATP アナログを用いると顕著に RNA 伸長能の低下が見られた (data not shown)。ファージ T3、T7 RNA ポリメラーゼで A を含んだ配列を転写した場合、ATP を非水解の ATP アナログに置換すると転写初期に反応の停止が促された (Terada & Shimamoto, submitted)。反応停止部位が A site に一致しないことから、単に、ATP アナログが ATP に比べて基質として RNA に取り込まれる効率が低いだけのためだけの理由で反応停止を起こしている可能性は否定できる。また ATP の添加により伸長反応が一部再開したことから、ATP が何らかの形で転写初期反応の促進に寄与していると考えられる。

A-less 配列で ATP の効果が認められなかったことから、ATP は RNA ポリメラーゼに対し、アロステリックな効果ではなく、A site に依存したアイソステリックというべき効果をもたらして反応の促進に寄与しているということが現在のところ考え得る可能性である。おそらく RNA ポリメラーゼの構造を介して ATP は転写複合体を転写初期に停止しにくい状態に維持していると考えられる。

4-3-2. タンデムな転写の効果とタンデムな転写における RNA ポリメラーゼ停止の効果

結果で示したように、タンデムな転写はそれ自体で abortive synthesis を促進するが、そこに RNA ポリメラーゼの停止が起こると、misincorporation という新たな現象が起こる。これは、先行する RNA ポリメラーゼの存在自体が後続のポリメラーゼにとって RNA 伸長の障害であり、abortive cycle にとどまる確率を上げることになるが、先行する RNA ポリメラーゼが停止するとさらに大きな軋轢を受けることになるかと解釈できる。

RNA ポリメラーゼの停止に伴う misincorporation の分子機構としては、5 番目の位置で U を G と読み誤る可能性以外に、別の可能性が挙げられる。それは、RNA ポリメラーゼが鋳型 DNA の同じ箇所を重複して転写する (slippage) 可能性である。近年、いくつかのプロモーターで slippage の起こった例が報告されている (Machida *et al.*, 1984; Harley *et al.*, 1990; Guo & Roberts, 1990; Jacques & Susskind, 1990; Xiong & Reznikoff, 1993)。この系では、合成された RNA 配列 GUGUGX が G と U の繰り返しであることから slippage の起こった可能性が高いと考えられる。Slippage とは RNA ポリメラーゼの反応中心が DNA に沿って前後するという意味で、RNA の解離を伴わない abortive synthesis とみることも可能である。読み誤りの可能性も排除できないが、物理的障害の結果起こる abortive synthesis の促進と同等に slippage が促進されたものと考察できる。

4-3-3. RNA ポリメラーゼ同士の接触

この章で示したタンデムな転写では、+32 の位置で先行ポリメラーゼが停止し、増産された abortive transcripts の上限は 6-7nt であった。このことから、RNA ポリメラーゼ 2 分子の反応中心間の距離は およそ 25-26bp と計算できる。この値は転写伸長複合体の footprinting の結果得られた DNA を覆う転写伸長中の RNA ポリメラーゼ 1 分子の大きさ (Metzger *et al.*, 1989) と一致した。先行 RNA ポリメラーゼの停止によって受ける後続ポリメラーゼの物理的障害は、必ずしも、タンパク分子同士の衝突を意味しない。先行ポリメラーゼの存在により変形した DNA のトポロジーの影響を後続ポリメラーゼが受けた間接的な影響とも考えられるが、上記の結果は、少なくとも 2 分子の RNA ポリ

メラーゼが直接接触しているモデルに有利である。

4-3-4. 物理的進行阻害による転写複合体の構造変化

第3章で述べたように、転写反応の初期に転写複合体の一部は何らかの構造変化を起こす。変化した複合体 (moribund complex) は、abortive synthesis を担う。この章では RNA ポリメラーゼの進行を阻害すると abortive synthesis が促進され、さらに読み誤りが起こることを見いだした。Misincorporate された RNA は、abortive transcripts と挙動をともにしたことから、両者は同種の転写複合体から解離したと考えられる。第3章の結果とあわせて考えると、解離した RNA 量の増加やその分布から判断し、これらの現象は転写複合体が moribund 化したことに起因すると解釈できる。この場合、RNA ポリメラーゼを強制停止することによって moribund 化が促されたと考察した。

第 5 章 終論

第5章 終論

転写は遺伝子発現の最初のステップであり、総ての生物にとって最も重要な生命現象のひとつである。いかに生物が遺伝子発現を調節するかを知る上で、調節因子の働く対象としての基本転写系の反応機構を正しく理解することが重要であると考えた。そこで、調節因子を伴わない転写反応を解析することで、RNAポリメラーゼ自身が持つ基本的な動作、特に転写初期反応の機構を解明することを目的として本研究を行った。

大腸菌 RNAポリメラーゼを用いて、従来提唱されている abortive initiation の機構を反応速度論的に再検討すること、また転写開始直後に物理的障壁を導入することによって初期反応が持つ特性を見いだすこと、の2点から解析を行った。得られた成果のひとつは、転写の初期に RNA を解離し易い不安定な転写複合体、moribund complex が形成されることを見いだしたことである。

Moribund complex は、この実験に用いた条件下では伸長複合体に再変換することなく、abortive な産物を合成するにとどまることが明らかとなった。提起した問題のひとつは、abortive cycling からの脱出が processivity の獲得を意味するか否かということであったが、少なくとも基本転写系では否定的結果が得られた。

RNAポリメラーゼに課せられた役割は、鋳型 DNA に沿って、その情報を高い忠実度をもって適切な速度で転写することであると考えられる。ところが、本研究で基本転写系を用いて得られた知見は、上述のように必ずしも RNAポリメラーゼが洗練された転写装置であることを示さなかった。むしろ、その実体は、無駄な働きを多くし、間違いを犯しやすい低効率の装置ともいえるべきものであった。

生体内で様々な因子の参画する実際の転写系では、完成されたシステムのレベルを付加的因子により落とすことによって制御が行われている場合と、むしろ基礎となる反応レベルは低く保っておき、そのレベルを持ち上げることで調節がなされている場合とがある。後者の場合に、moribund complex は転写調節因子の認識の標的として適した性質を有する。もしそうなら、調節因子はおそらく転写複合体の構造変化を認識するはず

である。生体内では、RNA ポリメラーゼは moribund の形態に永久に保持されるのでなく、このような調節機構によって processive な形態に再変換することが十分考えられる。Moribund complex の実体は何であるか、また付加的な調節因子により RNA ポリメラーゼが abortive cycling から脱出し、processivity を獲得する分子機構の解明は興味ある問題である。

転写初期の物理的障壁の導入によって形成された転写複合体はその特性から moribund complex であることが示唆された。これが正しければ、RNA ポリメラーゼが進行を阻害されることによって moribund complex の形成が促進される、または processive complex への変換が阻害されることになり、転写複合体が反応途上で形態を変換し得るという考えが支持される。2つの視点から見た RNA ポリメラーゼの像は少なくとも転写の初期において変換しやすい構造体であり、その自由度が調節機構にも寄与していると考えられる。

引用文献

- Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991) Role of mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1195-1206.
- Borukhov, S., Polyakov, A., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (1992) GreA protein: A transcription elongation factor from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8899-8902.
- Borukhov, S., Sagitov, V., and Goldfarb, A. (1993) Transcript cleavage factors from *E. coli*. *Cell* 72: 459-466.
- Burgess, R. R., and Jendrisak, J. J. (1975) A procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-Dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry* 14: 4634-4639.
- Carpousis, A. J., and Gralla, J. D. (1980) Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation *in vitro* at the *lac* UV5 promoter. *Biochemistry* 19: 3245-3253.
- Carpousis, A. J., Stefano, J. E., and Gralla, J. D. (1982) 5' Nucleotide heterogeneity and altered initiation of transcription at mutant *lac* promoters. *J. Mol. Biol.* 157: 619-633.
- Chamberlin, M. J. (1974) The selectivity of transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 721-775.
- Chamberlin, M. J. (1976) Interaction of RNA polymerase with the DNA template. *RNA polymerase*. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp. 159-192.
- Chamberlin, M. J., Nierman, W. C., Wiggs, J., and Neff, N. (1979) A quantitative assay for bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 254: 10061-10069.
- Chamberlin, M. J., Rodenberg, S., and Kadesch, T. (1982) Studies of the interaction of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme with bacteriophage T7 promoter A1; Analysis of kinetics and equilibria of template selection and open-promoter complex formation. *Promoters: Structure and Function*. New York: Praeger. pp. 34-53
- Dahlberg, J. E., and Blattner, F. R. (1973) *In vitro* transcription products of lambda DNA : nucleotide sequences and regulatory sites. *ICN-UCLA Symp. Mol. Biol.* 2: 533-544.
- Erie, A. D., Yager, D. T., and von Hippel, P. H. (1992) The single-nucleotide addition cycle in

transcription: a biophysical and biochemical perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 379-415.

Erie, A. D., Hajiseyedjavadi, O., Young, M. C., and von Hippel, P. H. (1993) Multiple RNA polymerase conformations and GreA: Control of the fidelity of transcription. *Science* 262: 867-873.

Fujioka, M., Hirata, T., and Shimamoto, N. (1991) Requirement for the β,γ -pyrophosphate bond of ATP in a stage between transcription initiation and elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry* 30: 1801-1807.

Gilbert, W. (1976) Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. *RNA polymerase* New York: Cold Spring Harbor Lab. pp.193-206.

Gonzalez, N., Wiggs, J., and Chamberlin, M. J. (1977) A simple procedure for resolution of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 404-408.

Grayback, E. J., Yang, X., Lau, L. F., and Robert, J. W. (1985) Phage lambda gene Q antiterminator recognizes RNA polymerase near the promoter and accelerates it through a pause site. *Cell* 30: 637-648.

Guo, H. C., and Roberts, J. F. (1990) Heterogeneous initiation due to slippage at the bacteriophage 82 late gene promoter *in vitro*. *Biochemistry* 29: 10702-10709.

Hansen, U. M., and McClure, W. R. (1980) Role of the σ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in initiation. *J. Biol. Chem.* 225: 9564-9570.

Harley, C. B., Lawrie, J., Boyer, H. W., and Hedgpeth, J. (1990) Reiterative copying by *E. coli* RNA polymerase during transcription initiation of mutant pBR322 *tet* promoters. *Nucl. Acids Res.* 18: 547-552.

Hawley, D. K., Malan, T. P., Mulligan, M. E., and McClure, W. R. (1982) Intermediates on the pathway to open-complex formation. *Promoters: Structure and Function*. New York: Praeger. pp. 54-68.

Hawley, D. K., and McClure, W. R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 11: 2237-2255.

Helmann, J. D., and Chamberlin, M. J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factor.

Annu. Rev. Biochem. 57: 839-872.

Igarashi, K., and Ishihama, A. (1991) Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase α subunit : Involvement of C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell* 65: 1015-1022.

Jacques, J. P., and Susskind, M. M. (1990) Pseudo-templated transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase at a mutant promoter. *Genes Develop.* 4: 1801-1810.

Johnston, D. E., and McClure, W. R. (1976) Abortive initiation of in vitro RNA synthesis on bacteriophage λ DNA. *RNA polymerase*. New York: Cold Spring Harbor Lab. pp. 413-428.

Kerpolla, T. K., and Kane, C. M. (1990) Analysis for the signals for transcription termination by purified RNA polymerase II. *Biochemistry* 29: 269-278.

Krummel, B., and Chamberlin, M. J. (1992) Structure analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase. Individual complexes biochemical properties. *J. Mol. Biol.* 225: 221-237.

Levin, J. R., Krummel, B., and Chamberlin, M. J. (1987) Isolation and properties of transcribing ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase positioned at a single template base. *J. Mol. Biol.* 196: 85-100.

Machida, C., Machida, Y., and Ohtsubo, E. (1984) Both inverted repeat sequences located at the ends of IS1 provided promoter functions. *J. Mol. Biol.* 177: 247-267.

Mangel, W. F., and Chamberlin, M. J. (1974) Studies of ribonucleic acid chain initiation by *Escherichia coli* Ribonucleic acid polymerase bound to T7 deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 249: 2995-3001.

McClure, W. R., and Cech, C. L. (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 253: 8949-8956.

McClure, W. R., Hawley, D. K., Youderian, P., and Susskind, M. M. (1982) DNA determinants of promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 477-81.

McClure, W. R. (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 171-204.

Metzger, W., Schickor, P., and Heumann, H. (1989) A cinematographic view of *Escherichia coli* RNA polymerase translocation. *EMBO J.* 8:2745-2754.

Munson, L. M., and Reznikoff, W. S. (1981) Abortive initiation and long ribonucleic acid synthesis. *Biochemistry* 20: 2081-2085.

Reines, D., Chamberlin, M. J., and Kane, C. M. (1989) Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264: 10799-10809.

Schickor, P., Metzger, W., Werel, W., Lederer, H., and Heumann, H. (1990) Topology of intermediates in transcription initiation of *E.coli*. *EMBO J.* 9: 2215-2220.

Shimamoto, N., Kamigouchi, T., and Utiyama, H. (1986) Release of the σ subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase depends mainly on time elapsed after the start of initiation, not length of product RNA. *J. Biol. Chem.* 261: 11859-11865.

SivaRaman, L., Reines, D., and Kane, C. M. (1990) Purified elongation factor SII is sufficient to promote read-through by purified RNA polymerase II at specific termination sites in the human histone H3.3 gene. *J. Biol. Chem.* 265: 14554-14560.

Sluder, A. E., Greenleaf, A. L., and Price, D. H. (1989) Properties of a *Drosophila* RNA polymerase II elongation factor. *J. Biol. Chem.* 264: 8963-8969.

Stefano, J. E., and Gralla, J. (1979a) Kinetic investigation of the mechanism of RNA polymerase binding to mutant *lac* promoters. *J. Biol. Chem.* 255: 10423-10430.

Stefano, J. E., and Gralla, J. (1979b) *Lac* UV5 transcription *in vitro*. Rate limitation subsequent to formation of an RNA polymerase-DNA complex. *Biochemistry* 18: 1063-1067.

Straney, D. C., and Crothers, D. M. (1985) Intermediates in transcription initiation from the *E. coli lac* UV5 promoter. *Cell* 43: 449-459.

Surratt, C. K., Milan, S. C., and Chamberlin, M. J. (1991) Spontaneous cleavage of RNA in ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase and its significance for the mechanism of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7983-7987.

Terada, H., and Shimamoto, N. Kinetic evidence for a new elongation complex in transcription by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerase.

Travers, A. A., and Burgess, R. R. (1969) Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* 222: 537-540.

Tullius, T. D., and Dombroski, B. A. (1986) Hydroxyl radical "footprinting": High-resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and Cro protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5469-5473.

von Hippel, P. H., Bear, D.G., Morgan, W.D., and McSwiggen, J. A. (1984) Protein-nucleic acid interaction in transcription : A molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 389-446.

Xiong, X. F., de la Cruz, N., and Reznikoff, W. S. (1990) Downstream deletion analysis of the *lac* promoter. *J. Bacteriol.* 173: 4570-4577.

謝辞

恵まれた環境で勉強の機会を与えて下さり、御指導と暖かい励ましを下さいました国立遺伝学研究所、嶋本伸雄助教授に心から感謝いたします。

御助言並びに暖かい励ましを下さいました石浜明教授に深くお礼申し上げます。有益な御助言を下さいました桂勲教授に深く感謝いたします。御助言や励ましを下さいました分子遺伝研究部門、藤田信之博士、並びに山岸正裕博士に感謝いたします。

常に暖かい励ましを下さいました杉山勉先生に深くお礼申し上げます。常に有益な御助言を下さった微生物研究部門の東谷篤志博士、遺伝情報研究センターの永井宏樹博士に感謝いたします。日々御協力を下さった構造研究室の方々にお礼申し上げます。