

氏 名 須 佐 太 樹

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第600号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Generality of the branched pathway in transcription initiation by *E.coli* RNA polymerase

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 徳永 万喜洋
教授 荒木 弘之
教授 石濱 明
助教授 白木原 康雄
教授 饗場 弘二 (名古屋大学)

論文内容の要旨

Transcription initiation has long been assumed to be a sequence composed of four steps: binding of RNA polymerase to a promoter, isomerization of the resulting binary complex accompanied by strand opening, iterative synthesis and release of abortive transcripts, and escape of the enzyme from the promoter. These steps are either chemical step essential to synthesize long RNA or explain a phenomenon that is observed for all RNA polymerases examined. Although additional steps could exist, the sequence has been considered as the complete mechanism, mainly because of the lack of evidence for further complications. In fact, the sequential pathway explained the results previously obtained in particular for the initiation at the T7A1 promoter.

However, the existence of branched reaction pathway was recently discovered in the initiation at the $\lambda P_{R}AL$, *lacUV5* and *malT* promoters, where a part of the enzyme-promoter complex is arrested at the promoter. This finding raises a new question which mechanism is more general and which is an exceptional case. From kinetic viewpoint, the sequential pathway is a special case of the branched pathway proposed. In a test of the generality of the pathway, one of the key criteria is whether or not initiation at the T7A1 promoter actually follows the branched pathway. I addressed this question by using several kinetic and biochemical techniques.

In the most sensitive kinetic assay, moribund complex, which synthesize only abortive transcripts as branched reaction, was detected and its amount increased in a low salt condition. In the gel mobility-shift assay and DNA footprinting with exonuclease III, a small amount of the complex arrested at the promoter was detected and its level was significantly raised in the low salt condition. The results of the DNA footprinting as well as that by Fe^{2+} cheleted at the active site of the enzyme demonstrated the existence of a fraction of binary complex that dislocates from its position of productive subspecies, suggesting that moribund subspecies is forward tracked compared with productive subspecies. This also suggests the existence of a branching point in the stage of binary complex that has been proposed for the initiation at the $\lambda P_{R}AL$. These results prove that the initiation at the T7A1 promoter also follows the common branched pathway.

The amount of arrested complex formed at the T7A1 promoter is less than 3% of that of binary complex that initially exist before adding NTPs. This explains the

reason why the behaviors of the initiation at the promoter apparently follow the sequential pathway. The small fraction could be due to the rapid conversion between moribund and productive subspecies. The rapid conversion was confirmed by measuring the rates of their dissociation and the rates were 7 times faster than those for the $\lambda P_{R}AL$ promoter. In conclusion, the branched pathway is more general mechanism and the case of T7A1 promoter is a particular one due to the rapid conversion.

I next addressed the question whether or not the branched pathway has physiological significance in *E. coli* cell. The clue is the effect of the transcription factors GreA and GreB on promoter arrest, which was previously shown to relieve the arrest in the initiation at the $\lambda P_{R}AL$ promoter by introducing reversibility in the conversion of moribund subspecies into productive one.

An *E. coli* strain with disrupted *greA* and *greB* grew well in LB medium at 37 °C, but showed growth deficiency at 25 °C, or in Mn^{2+} or Zn^{2+} -containing LB medium. By using genomic DNA array, the candidate genes whose expressions are changed in the strain with disrupted *greA* and *greB* was previously selected. By using Northern blotting, I confirmed that mRNA levels of at least 3 genes, *cspA*, *rpsA* and *atpC*, are decreased by the disruption of *greA* and *greB*. Full-length transcription from their promoters was observed to be enhanced in the presence of GreA or GreB in a purified reconstitution system. The addition of the factors reduced abortive transcripts, suggesting that the factors increased the yield of full-length transcript by mitigating the promoter arrest. Among the promoters tested, *atp* promoter, the major promoter of *atp* operon, was examined most detail. Primer extension analysis confirmed that the transcript transcribed from the *atp* promoter was indeed reduced by the disruption of *greA* and *greB*. The formation of moribund complex at the *atp* promoter was confirmed by the most sensitive kinetic assay. In conclusion, the branched pathway is working not only in vitro but also in *E. coli*, and the GreA and GreB regulate transcription of various genes by the mechanism. This finding also claims that the Gre factors are bonafide initiation factors, although they were discovered as elongation factors that mitigate elongation arrest in vitro.

論文の審査結果の要旨

須佐太樹君は、転写開始機構に関し、分岐経路モデルの一般性、ならびに生理的な意義について研究した。

転写開始の分子機構に関しては、現在直列経路モデルと分岐経路モデルとがある。直列経路モデルは、1) RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合、2) DNA 二重らせんの部分的開裂、3) 短鎖転写産物の繰り返し合成、4) プロモーターからの RNA ポリメラーゼの脱出、の4ステップが直列な経路をなしているとするものである。長い間、この直列経路モデルが転写開始機構として考えられ、実際、T7A1 プロモーターでの転写開始は直列経路モデルとよく一致していた。しかし最近、IPRAL, lacUV5, malT プロモーターでの開始経路が実際には分岐しており、binary complex の段階で完全長転写産物の合成を行う複合体 (productive complex) と短鎖転写産物の繰り返し合成のみを行う複合体 (productive complex) に分かれ、moribund complex はプロモーター上で dead-end complex に変換されることが明らかになった。この機構は分岐経路モデルと呼ばれている。

どちらの転写開始機構が一般的でどちらが特殊かのテーマに関し、須佐君は、分岐が可逆的なら2つの機構は等価になる点に注目し、T7A1 プロモーターでの転写開始が実際には分岐している可能性を考えた。高感度の速度論的手法を用いた結果、T7A1 プロモーターで moribund complex を検出、低塩濃度条件下ではその量が増加した。さらに、ゲルシフトアッセイ、Exonuclease III を用いた DNA フットプリンティングを行った結果、低塩濃度条件下で dead-end complex が少量検出された。また、活性中心近傍特異的 DNA 切断を行った結果、productive な binary complex とは DNA 上の活性中心の位置が異なる binary complex を低塩濃度条件下で観測した。低塩濃度条件下では moribund complex が増加するため、このとき観測された binary complex は moribund 状態の binary complex であることが示唆された。以上の結果から、T7A1 プロモーターでの転写開始は分岐経路だが、分岐が可逆的である結果 dead-end complex が少量しか形成されないため、実際には直列経路と等価になっていると考えられた。従って、分岐経路が一般的で T7A1 の場合が特殊解であると結論した。

次に、分岐経路が大腸菌内に存在し、生理的意義を持つか調べるために、IPRAL プロモーターでの分岐を可逆にする GreA, GreB の遺伝子欠失の影響を調べた。大腸菌 greA, greB 欠失株は、低温 (25°C) 下、または Mn²⁺, Zn²⁺を含む培地上で野生株と比べて生育が阻害された。さらに、greA, greB 欠失の転写における影響を DNA アレイと Northern 法で解析した。その結果、greA, greB 欠失株では、少なくとも cspA, rpsA, atpC 遺伝子の転写量が減少していた。in vitro 転写実験を行って GreA, GreB の作用点を調べた結果、GreA, GreB は開始段階にのみ作用し、完全長転写産物の量を増大させることがわかった。in vivo において GreA, GreB が atp プロモーターからの転写量をを増加させることをプライマー伸長法で確認、さらに、高感度の速度論的手法を用いて、atp プロモーターでの転写開始が分岐

していることを明らかにした。以上の結果から、分岐経路は大腸菌内に存在し、GreA, GreB による複数の遺伝子の転写調節に使われていると考えた。また、greA, greB 欠失株がいくつかの環境下で生育が阻害されることから、分岐経路が生理的役割を持つと結論した。さらに、この結果をもとに、これまで伸長因子と考えられてきた GreA, GreB が、実は開始因子であるという新しい考えを提唱するに至った。

須佐君は、転写開始機構に関し、以上の新しい重要な知見を得ており、この分野への寄与も大きい。従って、審査委員会は、本研究が学位授与の要件を十分に満たすものと判断した。