

名古屋大学大学院理学研究科博士課程学位論文 主論文

大腸菌 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの
機能構造解析

分子生物学専攻第一講座

安倍裕順

①

報告番号 甲第 4259 号

名古屋大学大学院理学研究科博士課程学位論文 主論文

大腸菌 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの
機能構造解析

分子生物学専攻第一講座

安倍裕順

平成11年2月8日

目次

第1章 序章	6
1.1 概論	7
1.1.1 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの発見	7
1.1.2 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの共通配列	8
1.1.3 古典的転写終結機構モデル:TwoStep モデル	9
1.1.4 Sliding Clamp 転写伸長モデルと転写終結	11
1.1.5 mRNA3' 末端形成と ρ 因子非依存性転写終結シグナル	13
1.1.6 大腸菌 <i>crp</i> 遺伝子の ρ 因子非依存性転写終結シグナル	14
1.1.7 問題点と本研究の目的	14
1.2 材料と実験方法	16
1.2.1 strains	16
1.2.2 plasmids	16
1.2.3 大腸菌の培養条件	18
1.2.4 DNA mutagenesis	19
1.2.5 RNA analysis	19
1.2.6 Protein analysis	22
1.2.7 others	23
第2章 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結機能と RNA 安定化機能を規定する element の解析	25
2.1 要旨	26
2.2 序論	27

2.3	結果	29
2.3.1	変異 <i>crp</i> ρ 因子非依存性転写終結シグナルの作製	29
2.3.2	シグナル下流のレポーター遺伝子の発現に対する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異の影響	30
2.3.3	上流遺伝子の発現に対する転写終結シグナルの変異の影響	31
2.3.4	mRNA 安定性に対する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異の影響	33
2.3.5	ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA を安定化させる機能を一般的機能として保持している。	34
2.4	考察	36
2.4.1	ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結活性に必要なエレメント	36
2.4.2	ρ 因子非依存性転写終結シグナルの mRNA 安定化機能に必要なエレメント	38
第3章 遺伝子末端領域における転写終結機構の解析		41
3.1	要旨	42
3.2	序論	44
3.3	結果	46
3.3.1	大腸菌構造遺伝子末端と ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置関係	46
3.3.2	上流構造遺伝子が存在する時、 <i>crp</i> 転写終結シグナルの転写終結効率は低下する？	46
3.3.3	<i>crp</i> mRNA の 3' 末端は <i>crp</i> 転写終結シグナルにマッピングされる。	47
3.3.4	遺伝子末端領域では転写終結シグナル転写後も転写は続行する。	48
3.3.5	<i>crp</i> 転写終結シグナルを転写後も伸長を続けた転写は徐々に終結する。	50
3.3.6	上流 <i>crp</i> 構造遺伝子の翻訳が <i>crp</i> 転写終結シグナル位置での転写の終結に影響する。	51
3.3.7	上流構造遺伝子の翻訳は <i>crp</i> 転写終結シグナル以外の転写終結シグナルにも影響する。	53
3.4	考察	54
3.4.1	生きた大腸菌内における遺伝子末端領域の転写終結と mRNA 3' 末端形成	54

3.4.2	ρ 因子非依存性転写終結機構に対する上流の構造遺伝子の翻訳の影響 . . .	56
3.4.3	上流構造遺伝子の影響を受ける ρ 因子非依存性転写終結シグナル	57
3.4.4	大腸菌オペロン構造と ρ 因子非依存性転写終結シグナル	58
第4章 終章		59
4.1	まとめと展望	60
4.2	副論文	67
4.3	謝辞	68

概要

染色体上の遺伝子、遺伝子群は個別の単位として転写される。この転写単位は転写開始シグナルと転写終結シグナルによって決定されている。大腸菌 mRNA 3' 領域に観察される GC 塩基に富んだ逆方向反復配列とそれに続く U クラスタは ρ 因子非依存性転写終結シグナルと呼ばれ、少なくとも *in vitro* では、RNA polymerase 以外のタンパク質因子を転写終結に必要としない。しかし、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの解析は、主にこのシグナル領域だけを取り出して進められてきたこともあって、実際の細胞内で、遺伝子末端領域における転写終結がどのように行なわれているのかは未解明の問題である。また、このシグナルは mRNA の安定化などにも重要な役割を果たしていると予想されるものの、その解析は遅れている。

本研究において私は以上の問題の解明を目標にして、大腸菌の cAMP 受容タンパク質 (CRP) をコードしている *crp* 遺伝子下流の ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*crp t*) をモデル材料にして以下のような研究を行なった。

第一章においては、転写終結シグナルの構造的特徴に部位特異的変異を導入した 8 種類の変異シグナルを作製し、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結機能と mRNA 安定化機能の二つの機能を規定するエレメントを明らかにした。転写終結シグナル下流に配置したレポーター遺伝子 *galK* の発現量を比較した結果から、転写終結機能には GC ステムループ構造と U クラスタの両方が必要であることが確認された。一方、転写終結シグナルを含む *crp* mRNA 量の定量化を行ない、mRNA 安定化機能に寄与しているのは GC ステムループ構造だけであることが判明した。さらに、他の遺伝子由来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルも mRNA 安定化機能をもつことが明らかとなった。

第二章においては、転写と翻訳がカップルしている実際の細胞内における遺伝子末端領域での転写終結がどのようにおこなわれているのかを明らかにするために、mRNA 3' 末端が形成される機構を正確な決定を行なった。RNA プロセッシングを阻害するようなステム構造を遺伝子末端領域の ρ 因子非依存性転写終結シグナル下流に配置した。mRNA 3' 末端の解析から、遺伝子末端領域では、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置で転写が終結しないこと、シグナルを越えて転写は伸長するが徐々に終結することが明らかにされた。そこで、転写終結シグナル上流域での翻訳に注目し、オーカー変異を導入した *crp* 遺伝子を作製した。オーカー変異を導入

した遺伝子末端領域では、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置で転写が終結し、転写終結シグナルを越えて転写は伸長しなかった。さらに、上流構造遺伝子の翻訳位置は他の ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結に対しても影響した。

以上の結果から、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルのもつ二つの機能を規定する RNA エレメントは同一ではないこと、mRNA 安定化機能は ρ 因子非依存性転写終結シグナルの一般的機能であることが明らかになった。また、遺伝子末端領域での転写終結は転写終結シグナル上流の構造遺伝子の翻訳位置の影響を受けること、mRNA 3' 末端は転写終結シグナルを越えて転写伸長した転写産物のプロセシングによって形成されていることが明らかになった。

本研究を通して、今まで未解明だった遺伝子末端領域における転写終結の実像に迫ることができた。また、本研究の成果は転写後制御の理解を促すばかりでなく、多様な RNA 機能を知るための手がかりとなる重要な知見と考えられる。

第1章 序章

1.1 概論

1.1.1 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの発見

1960年代、アミノ酸生合成オペロンの発現はアミノ酸あるいはアミノアシル tRNA 合成酵素の酵素活性に影響を受けることが知られていた。例えば、ヒスチジンアナログの α -メチルヒスチジンを *S.typhimurium* の培養液に添加するとヒスチジン生合成オペロンの発現が上昇した [1]。アミノ酸生合成オペロンは主に、アミノ酸が特異的リプレッサーを活性化し、それがアミノ酸生合成オペロンのオペレーターに結合することによって、転写開始段階の負の制御を受けているのだろうと考えられていた。

1968年、培地中のトリプトファンを制限しトリプトファンオペロンの脱抑制を行なった後、L-トリプトファンを添加して再び抑制すると、生合成に必要な構造遺伝子を含まない未成熟な短い転写産物が合成されていることが Imamoto によって報告された [2]。この報告は、アミノ酸生合成オペロンの発現制御がリプレッサーによる転写開始段階の制御だけでなく、転写終結段階で制御されていることを意味していた。転写開始点から 140 塩基の長さをもつこの未成熟な RNA の解析がすすめられ、リーダー領域と呼ばれるこの領域を欠失させた場合、mRNA の不安定化を引き起こすことなく生合成オペロンの mRNA の発現が増加すること、さらに、この領域における転写終結を通して未成熟な RNA が合成されていることが 1970 年代になって明らかにされた [3, 4]。この領域はリーダー領域と呼ばれ、それによる転写制御は転写減衰 (あるいはアテニュエーション) と呼ばれ、スレオニンやヒスチジンなどの他のアミノ酸生合成オペロンにも発見された [5, 6]。

一方、 λ ファージの転写産物の 3' 領域には共通して UUUUUUA 配列が観察されることや [7, 8]、T7 ファージの初期遺伝子を *in vitro* で転写させた転写産物の 3' 末端が U 塩基を持つことが報告された [9]。さらに、細菌やファージの転写産物の 3' 領域の配列分析から二つの特性が見い出された。第一は GC 塩基に富んだ逆方向反復配列があること、第二はそれに続く連続した U クラスターがあるという性質である。1978年、Rosenberg らは λ ファージに存在するこの配列の鋳型となる DNA に RNAPolymerase, 基質 NTPs を加えた *in vitro* 転写実験を行なった。その結果、この配列を 3' 領域にもつ転写産物が合成されることを示した [10]。同様にスレオニン生合成オペロンのリーダー領域の deletion 変異の解析から未成熟な RNA の合成には、RNA 3' 末端

の上流、5 から 55 塩基に位置する上記の特性をもつ配列が重要であることが Cossart らによって報告された [11]。すなわち、この特性をもつ配列は転写を終結させるシグナルであることが明らかになった。同じころ、Stauffer らはトリプトファン生合成オペロンのリーダー領域にも見られる同様の配列 (転写開始点から 114 塩基から 143 塩基までの領域)(Figure 1-1) にさまざまな 1 塩基置換を導入し、この領域を鋳型 DNA に用いた *in vitro* 転写実験を行なった。その結果、逆方向反復配列によって形成される GC ステムループ構造が転写終結に重要であることを示した。(Figure 1-1) [12]。

一方、この配列による転写終結は 1969 年に Roberts によって発見された転写を終結させる働きをもつ ρ タンパク質 [13] による転写終結と異なる特徴を持っていた。*in vitro* 転写系において、この配列は RNA polymerase, 基質 NTPs 以外の因子を転写終結に必要としなかった。以上の解析からアミノ酸生合成オペロンのリーダー領域及び、mRNA 3' 領域にみられる転写終結能のある配列は ρ 因子非依存性転写終結シグナルと呼ばれ、その後の解析がすすめられた。

1.1.2 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの共通配列

アミノ酸生合成オペロンのリーダー領域や RNA 3' 領域に観察される ρ 因子非依存性転写終結シグナルは GC 塩基に富んだ逆方向反復配列とそれにつづく U クラスタという構造的特徴をもっている (Figure 1-1)[14]。現在までに 100 以上の ρ 因子非依存性転写終結シグナルの配列が報告されている。しかしながら、それらの配列を同一条件下でかつ系統的に解析をした例は少なかった。報告されている配列の中には転写終結機能をもたないが、良く似た構造的特徴をもつ配列も含まれていた [15]。そのために単純な統計によって ρ 因子転写終結シグナルの共通配列を見つけることはできなかった [16, 17, 18, 19]。

Brendel らは DNA 配列中から転写終結シグナルを同定する統計アルゴリズムを構築し、得られたシグナルと思われる配列には二つの共通配列 CGGG(C/G) と TCTG 配列が存在することを報告した [18]。しかし、実際に機能解析のされた ρ 因子非依存性転写終結シグナルにはこれらの共通配列は見られないと Carafa らによって指摘されている。

一方、1990 年に Carafa らはステムループ構造形成可能な配列と連続した U 塩基という構造を ρ 因子非依存性転写終結シグナルを同定するための共通構造とし、その安定性を統計のパラメー

ターに加えるべきであると提案した [20]。Carafa らはこの考えを確かめる目的で、 1021×10^3 bp の *E. coli* DNA 配列 (GenBank Release5) から 148 の ρ 因子非依存性転写終結シグナルをリストアップし、その統計を行なった。その結果、次のような二つの特性を見出した。第一は、得られた配列のループ領域の 55% は 4nt からできており、もっとも多かったループ領域の配列は UUCG と GAAA であったこと、第二は、またループ領域もランダムな配列ではなく、ほとんどのループ領域は C で始まり G で終る配列になっていたことである [20]。このような構造のループ構造は原核、真核の RNA を問わずよく見られるもので、RNA のステムループ (ヘアピン) 構造の安定性をエンハンスすることが報告されている [21]。しかし、彼らの解析ではステム構造の自由エネルギーの低い (安定なステム構造を形成できない)、あるいは連続した U 塩基をもたない ρ 因子非依存性転写終結シグナルを安定な共通構造をもたないシグナルとして統計から意識的に除外していた。そのため、統計から除外されてしまったが転写終結シグナルのループ領域に以上のような共通配列を見出すことができなかつた問題点があることも指摘されている。

一方、Raynolds と Chamberlin らは ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結効率を生化学的解析を行なう際のイオン濃度や基質濃度、*in vitro* 転写実験に用いる鋳型 DNA の状態 (線状 DNA または環状 DNA) などの反応条件に影響されること、さらにシグナルによって反応条件の影響も異なることを示した [16, 17]。この結果は ρ 因子非依存性転写終結シグナルを生化学的な性質によってクラス分けし、各クラスに属するシグナルの系統的な解析および、その統計的な解析が ρ 因子非依存性転写終結機構の解明に必要であることを示している。また、Cheng らは λ ファージの λ tR 転写終結シグナルのステム構造中の特定の配列が転写終結機能に重要であることも報告している [22]。

以上のことから GC 塩基に富んだステムループ構造とそれに続く U クラスタという構造的特徴以外の共通配列あるいは共通構造の完全な同定はなされていないのが現状である。

1.1.3 古典的転写終結機構モデル: TwoStep モデル

ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結機構のモデルはいくつか提案されているが、この節では教科書に掲載されている古典的なモデルを、次節では最近の報告をもとにして構築されたモデルについて紹介する。

Ryan と Chamberlin は鋳型 DNA 鎖への変異導入によってトリプトファンアテニューエーター (*trp A*) による *in vitro* 転写終結効率が低下したことを報告した [23]。この結果は ρ 因子非依存性転写終結シグナルが DNA シグナルとしてではなく RNA シグナルとして機能することを意味している。

また、ステムループ構造形成可能な逆方向反復配列中への点変異導入によって *trp, his, thr* などのアミノ酸生合成オペロンのアテニューエーションが低下することが報告された [24, 25, 26, 27]。1977 年、Lee らは転写終結シグナル中の RNA-RNA 塩基対の安定性を変化させる基質 NTP のアナログを用いた転写実験の結果を報告した [28]。その結果、RNA-RNA 塩基対が安定なほど転写終結効率は上がることを、逆に RNA-RNA 塩基対が不安定なほど転写終結効率は下がることが示された。同時期、Neff らによっても同様の報告がなされた [29]。転写産物のステム構造形成に関する以上の結果は ρ 因子非依存性転写終結シグナルの RNA-RNA 塩基対の安定性が、すなわち、GC 塩基に富んだステムループ構造形成が転写終結に重要な役割を担っていると考えられる。

一方、Farnham と Platt らは転写複合体中の RNA-DNA 塩基対の安定性を変化させる基質 NTP のアナログを用いて *in vitro* 転写実験の結果を報告した [30]。その結果、転写複合体中の RNA-DNA 塩基対の安定性が低いほど転写終結効率は上がることを、逆に RNA-DNA 塩基対の安定性が高いほど転写終結効率は下がることが示された。また、ステムループ構造は転写を一時的に停止させる働きがあることが示された。以上の結果を基にして Platt は次のような ρ 因子非依存性転写終結機構の提案した [30]。以下にその機構の過程を簡条書で示した。

1. RNAPolymerase が GC 塩基に富んだ逆方向反復配列と U クラスタを転写する。
2. 転写産物は GC ステムループ構造を形成し、RNAPolymerase の転写を停止させる。
3. GC ステムループ構造形成は転写複合体中の DNA-RNA 塩基対領域で起きるために転写複合体中の DNA-RNA 塩基対領域が縮小する。その結果、DNA 開鎖領域が縮小する。
4. 転写複合体中の DNA-RNA 塩基対の領域は dA-U の領域だけになり、この塩基対の相互作用は不安定であるため、RNA の解離が起こる。

転写複合体の転写伸長停止、転写複合体から RNA の解離という二段階の過程を経る以上のような転写終結機構のモデルは TwoStep 転写終結モデルと呼ばれている。(Figure 1-2)

しかし、Chamberlin らは ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結効率は *in vitro* 転写中のイオン濃度に影響されること、さらにシグナルによって影響も異なることを報告した。さらに、RNA-RNA や RNA-DNA, DNA-DNA などの塩基対の安定性に影響しない程度の反応液中のイオン濃度の影響を受けて転写終結効率は変化することを報告した。彼らは RNAPolymerase と RNA もしくは DNA の相互作用が転写終結に関わっているのではないかと提案している [16]。また、短いステム構造をもつ、あるいは連続した U 塩基をもたないが高い転写終結効率を示す ρ 因子非依存性転写終結シグナルが数多く報告されている [17]。Platt による TwoStep モデルではこのような ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結を説明できないのが現状である。

1.1.4 Sliding Clamp 転写伸長モデルと転写終結

伸長中の転写複合体が転写終結シグナルを含む領域を転写すると転写終結が起こる。1990 年代、伸長中の転写複合体の生化学的な解析がすすみ、1997 年になって Nudler らは転写終結シグナル転写後の転写複合体の RNAPolymerase, RNA, DNA の相互作用の変化によって転写終結機構の説明を試みている [31, 32]。

転写複合体中の転写産物は RNAPolymerase に付随する因子の一つである GreB によって切断されることが報告された [33]。さらに転写複合体中の転写産物は GreB による切断に対して感受性な領域と耐性の領域にわかれることが報告された [34, 35]。以上の報告から、転写複合体の中の転写産物は RNAPolymerase の GreB による切断に耐性な強く結合している領域 (Tight Binding Site(TBS) もしくは RNA binding site(RBS)) と切断に感受性の弱く結合している領域 (Loose Binding Site(LBS) もしくは RNA-DNA 塩基対形成領域) の二つの領域に分けられると考えられた。

Markovtsov らは転写休止した転写複合体は RNA を解離させることなく転写伸長を再開する活性を徐々に失うことを示した [36]。Nudler らは aromatic bis(2-iodoethyl)amino 基をもつ UTP のアナログを用いて RNA-DNA クロスリンクを行ない、転写複合体中の RNA-DNA 塩基対の長さが 8-9bp であることを明らかにした [31]。また、アナログ基質を用いて転写休止中の転写複合体中の RNA-DNA 塩基対形成領域の RNA 3' 末端近傍の塩基対形成を安定化させると Markovtsov らの示した転写伸長を再開する活性が失われにくくなることを示した。さらに、こ

の RNA-DNA 塩基対領域の Backward sliding(RNAPolymerase の NTP を付加する活性部位が転写産物に沿って1ないし数nt後退し、NTP が付加する効率が低下する。後退した分だけ DNA 開鎖領域は閉じる現象) が起こることを示した。以上の結果から、転写複合体中の RNA-DNA 塩基対領域は RNAPolymerase の NTP 付加する活性部位を RNA3' 末端の位置に維持しておくのに必要であると考えられた。

以上の結果を基にして転写伸長は基本的に monotonic に進行し、pausing 部位を転写したり間違った基質を取り込んでしまった時に Backward sliding が起こし、転写を休止するが、再び転写を再開して転写伸長を続行するような転写伸長の SlidingClamp モデルが提案された [31]。(Figure1-3) Figure 1-3 中の RBS は上記の TBS を表しており、RNA-DNA 塩基対領域は上記の LBS を表している。また、DBS は転写伸長に必要な RNAPolymerase の DNA 結合領域を表している。Mg は NTP を付加する活性部位を表している。

一方、連続した U 塩基は転写伸長休止を誘導するシグナルであることが示された [37]。この転写伸長休止は U-dA の塩基対の安定性は低いために起こると考えられ、上記の転写伸長モデルと併せて次のような転写終結モデルが Nudler らによって提案されている。[31]。以下にその機構を簡条書きで示した。

1. RNAPolymerase が GC 塩基に富んだ逆方向反復配列と U クラスタを転写する。
2. U クラスタによる不安定な RNA-DNA 塩基対領域は Backward sliding を誘導し、転写伸長休止を引き起こす。
3. 転写複合体中の RNA がステムループ構造を形成し、TBS(RBS) から RNA の解離が起こる。
4. その結果、転写複合体中の RNA の相互作用は RNA-DNA 塩基対だけとなる。
5. U-dA の塩基対の安定性は低いので転写複合体から RNA は解離する。

RNA-RNA 塩基対, RNA-DNA 塩基対, RNA と RNAPolymerase の結合の三つの相互作用はお互いに影響しあうと考えられている。

1.1.5 mRNA 3' 末端形成と ρ 因子非依存性転写終結シグナル

エンドリボヌクレアーゼ RNaseE, RNaseIII、エキソリボヌクレアーゼ RNaseII, PNPase の四つのリボヌクレアーゼが大腸菌の mRNA 分解に関わっていると報告されている。RNaseIII, RNaseE は RNA 二次構造を認識して切断し、RNaseII, PNPase は 3'-5' エキソリボヌクレアーゼの活性をもち RNA の 3' 末端から 5' の方向へ RNA を分解する。RNA 上の逆方向反復配列はステムループ構造を形成し、mRNA 安定性に影響することが報告されている [38, 39]。このようなステムループ構造は次の二つの機構によって mRNA の安定性に影響している。1) RNaseIII や RNaseE に切断される標的となり、切断後の mRNA の安定性を低下させる。2) RNaseII や PNPase による 3' から 5' 方向への分解を阻害し、上流 mRNA を安定化する [40, 41, 42]。

E. coli trp オペロン末端領域に位置する *trp t* ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA 安定化の機能をもつことが報告された [43]。*trp* オペロンの mRNA の 3' 領域は *trp* オペロンの最下流の構造遺伝子 *trp A* から 36 塩基下流に位置する特異的な配列であることが配列解析から示された。さらに、この 3' 領域の配列は ρ 因子非依存性転写終結シグナルの構造的特徴をもち、*in vitro* 転写実験から 25% 程度の弱い転写終結効率を示すことが報告された。*in vitro* 転写や RNaseII による分解などの生化学的解析そして遺伝学的解析により、この配列よりもさらに下流に位置する *trp t'* と呼ばれる ρ 因子依存性転写終結シグナルによって転写が終結し、転写産物はその後プロセッシングを受け、*trp t* を 3' 領域にもつ mRNA になることが示された。また、この *trp t* を欠失させると上流 mRNA の発現量は 1/3 に低下することも同時に示された [43]。他にも ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる mRNA 安定化はバクテリオファージ ϕ X174、*B. thuringiensis cry* 遺伝子、*E. coli crp* 遺伝子の解析によって示されている [44, 45, 46]。

しかし、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの mRNA の安定化機能を解析された例は以上のように少なく、その機能に寄与するエレメントも正確に決定されていなかった。つまり ρ 因子非依存性転写終結シグナルのもつ mRNA 安定化機能は報告されている多くの転写終結シグナルが一般的にもつ性質なのかどうかという問題が残っている。さらに、mRNA 安定化機能と転写終結機能の相互関係について解析した例は少ないという問題も残っている。

1.1.6 大腸菌 *crp* 遺伝子の ρ 因子非依存性転写終結シグナル

E. coli cAMP 受容タンパク質 (CRP) は cAMP 結合活性と DNA 結合活性をもち、プロモーター DNA 近傍の特異的な配列に結合して転写を正に制御している [47, 48]。CRP をコードしている *crp* 構造遺伝子の終止コドンから 12 塩基下流に GC 塩基に富んだステムループ構造形成可能な逆方向反復配列と 7 塩基の U クラスタが存在する。また、*crp* mRNA の 3' 末端はこの U クラスタにマッピングされる (Figure 2-1)[46]。Melton らはこの *crp* 3' 領域の逆方向反復配列への 1 塩基挿入や 4 塩基欠失によって上流構造遺伝子産物である CRP の活性が cAMP 非依存型になることを報告した [49, 50]。しかし、Aiba らはステム領域に 4 塩基欠失の導入によって Melton らの報告したような cAMP 依存型である CRP の cAMP 非依存型 CRP への変化が起こらないことを示し、この変異の導入は *crp* の発現に影響し、発現量を低下させることを報告した [46]。さらに、この発現量低下は *crp* mRNA の安定性の低下によるものであることを証明した。同時に Aiba らは *crp* 遺伝子の 3' 領域の GC 塩基に富んだステムループ構造形成可能な逆方向反復配列と 7 塩基の U クラスタが *in vivo, in vitro* において ρ 因子非依存性転写終結シグナルとして転写を終結する機能があることを明らかにした。

以上のように、*crp* 遺伝子下流にある ρ 因子非依存性転写終結シグナルは *in vivo, in vitro* において転写終結機能を持つこと、及び mRNA 安定化機能を持つことが報告されている遺伝子末端領域の転写終結シグナルである。報告されている ρ 因子非依存性転写終結シグナルの中で、このような解析の進んでいるシグナルは少ない。

1.1.7 問題点と本研究の目的

遺伝子末端領域に存在する配列は、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルと呼ばれ、GC 塩基に富んだ逆方向反復配列とそれに続く連続した 8 塩基程度の U クラスタという構造的特徴をもっている。

しかし、この構造的特徴が転写終結にどのように寄与しているかは正確に明らかになっていない。例えば、U クラスタの長さを変化させても転写終結の単純な相関が見られない [16, 17]、*rrnBT1, T7Te* などの ρ 因子非依存性転写終結シグナルはどれも高い転写終結効率を示すにもかかわらず、その U クラスタは 4 塩基程度の長さしかない [51, 52]。また、ステム領域の配列が

重要であるという λ tR シグナルの報告もされているが、そのような配列は他のシグナルではみられない。一方、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA 3' 領域に見られるにも関わらず、転写終結機構の解析はシグナル領域だけを取り出して進められることが多かった。そのため、実際の遺伝子末端領域の転写終結がどのように行なわれているのか、mRNA 3' 末端がどのように決定されるのかなど明らかにされていないなどの問題が残っている。

一部の遺伝子において、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA を安定化する機能もあることが報告されている。二次構造を形成する RNA は細胞内部で安定であることが示されているが、mRNA の安定化機能について解析された ρ 因子非依存性転写終結シグナルの数は少なく、その機能に寄与するエレメントも正確に決定されていなかった。また、mRNA 安定化機能と転写終結機能の相互関係に関しても未解明な問題である。さらに、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルのもつ mRNA 安定化機能は一般的性質なのかどうかという問題も残されている。

以上のように遺伝子末端領域の ρ 因子非依存性転写終結シグナルに関する未解明な問題は多く残されている。

ρ 因子非依存性転写終結シグナルのもつ機能を規定するエレメントを明らかにすることは転写終結機構の理解を進めるために重要である。染色体上の遺伝子、遺伝子群は個別の単位として転写され、この転写単位は転写開始シグナルと転写終結シグナルによって決定されている。遺伝子末端領域の転写終結を明らかにすることは転写開始制御の理解が先行していた遺伝子発現制御の理解を転写単位で理解する糸口になると考えられる。また、*crp* 遺伝子下流には発現も機能も未知の遺伝子 *yhfK* が存在する。この遺伝子は K12 株のみならず、病原性大腸菌 O157 のような大腸菌野生株においても保存されており、何らかの重要な機能をもつことが考えられる。*crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結機構の解析はこの遺伝子の発現制御を解明する手がかりになるかもしれない。

本研究においては、*crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの機能構造を解明することを目的として、第一章では転写終結機能と mRNA 安定化機能を規定するエレメントの決定とそれらの関係について、第二章では遺伝子末端領域における転写終結がどのように行なわれているのかという問題について解析を行なった。

1.2 材料と実験方法

1.2.1 strains

本研究に用いた大腸菌株は次の通りである。

W3110(wild type <i>E.coli</i> K-12)	laboratory stock
pp47(<i>crp</i> ⁻)	laboratory stock
R594(<i>gal-1 gal-2 lac rpsL sup0</i>)	[53]
TP2339(<i>F</i> ⁻ <i>xyl ilvA argHI ΔlacX74 Δcya Δcrp</i>)	[54]

1.2.2 plasmids

本研究に用いたプラスミドは次の通りである。

pHA7	[55]
------	------

pHA7はベクタープラスミド pBR322 の *Hind*III 部位に大腸菌由来の *crp* 遺伝子と転写終結シグナルを含む DNA 断片を挿入したプラスミドである [55]。 *crp* 遺伝子はプラスミド上の *bla* プロモーターによって発現する。 *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造を形成する配列の中に *Bss*HII 部位がある。

pHA7M0	本研究
--------	-----

pHA7M0はプラスミド pHA7 上の *crp* 転写終結シグナルをシグナル上流に *Sp*II 制限酵素部位をシグナル下流に *Sma*I 制限酵素部位を導入した転写終結シグナル M0 に置換したプラスミドである。この制限酵素部位導入は PCR mutagenesis によって行なった。様々な変異シグナルをもつプラスミドはこのプラスミド上の *Sp*II, *Bss*HII, *Sma*I 部位を利用して oligonucleotide 断片による mutagenesis によって構築した。

pKG100	[56]
--------	------

pKG100 は *gal* プロモーターと galactokinase 遺伝子 (*galK*) をもつプラスミドである [56]。 *gal* プロモーターと *galK* の間に *Hind*III, *Sma*I 部位がある。 *in vivo* における転写終結シグナルの転写終結効率を計測するのに用いた。 pHA7M0 およびその derivatives の *Hae*III DNA 断片もしくは *Hind*III-*Eco*RV DNA 断片を pKG100 の *Sma*I 部位もしくは *Hind*III-*Sma*I 部位に挿入し、 *galK* assay の測定結果から転写終結シグナルの転写終結効率を計算した。

以下のプラスミドはいずれも上記のプラスミド又はベクタープラスミド pBR322 の derivative であり、個々のプラスミドについての詳細な説明は結果の項で行なう。

pHA7M1	本研究
pHA7M2	本研究
pHA7M3	本研究
pHA7M4	本研究
pHA7M5	本研究
pHA7M6	本研究
pHA7M7	本研究
pHA7M8	本研究
pHA7 <i>trp</i>	本研究
pHA7 <i>rrnBT1</i>	本研究
pHA7T7Te	本研究
pKGM0	本研究
pKGM5	本研究
pKGM8	本研究
pHG209M0	本研究
pHG209M5	本研究
pHG209M8	本研究
pHG192M0	本研究
pHG192M8	本研究

pHG170M0	本研究
pHG170M8	本研究
prrn322	本研究
pM0-RI	本研究
pM8-RI	本研究
pM0-RV	本研究
pM8-RV	本研究
pM0-RI Δ 37	本研究
pM0-RI Δ 60	本研究
pM0-RI Δ 68	本研究
pM0-RI Δ 80	本研究
pM0-RI Δ 129	本研究
pM0-RI Δ 167	本研究
pM0-RI Δ 184	本研究
pM0-RI Δ 209	本研究
pM0-170RI	本研究
pM0-170RV	本研究
<i>ptrp</i> -RV	本研究
<i>prrnBT1</i> -RV	本研究
pT7Te-RV	本研究

1.2.3 大腸菌の培養条件

本研究における大腸菌培養はLB培地を用いて37℃で振とうすることによって行なった。プラスミド脱落を防ぐため、必要に応じてAmpicillin 50 μ g/mlを培地に添加した。また、菌体の生育状態は分光光度計を用いて主に600nmの波長でモニターした。*galK* assayの場合のみMillerらの方法[57]に従い650nmの波長で生育状態をモニターした。

1.2.4 DNA mutagenesis

本研究で用いた DNA mutagenesis の方法は次の二種である。

- PCR mutagenesis

pHA7M0 の制限酵素部位導入は合成 DNA プライマーを用いて PCR 法によって行なった。また、*crp* 構造遺伝子の翻訳終止コドンと転写終結シグナルの間の塩基数を多くするため、*crp* 構造遺伝子中に翻訳終止コドン (TAA) を導入した CO170 (*crp* ochor mutant at codon 170) を構築した。用いたプライマーは以下の 4 種類である。

- *Eco*RI primer 5'GCGTATCACGAGGCCCTTTC3' (20mer)
- *Hind*III primer 5'GCAATTTAACTGTGATAAAC3' (20mer)
- CO170-1 primer 5'TTACCCGTCAGTAAATTGGTCAG3' (23mer)
- CO170-2 primer 5'GACCAATTTACTGACGGGTAATTTTG3'(26mer)

まず、*Hind*III primer と CO170-2 primer、*Eco*RI primer と CO170-1 primer のそれぞれの組み合わせで pHA7-M0 を鋳型にして 1st PCR を行なった。スピンカラムで精製した 1st PCR 産物を鋳型にし *Hind*III primer と *Eco*RI primer を用いて 2nd PCR を行なった。1st PCR、2nd PCR とも (94 °C- 1 分間、37 °C- 1 分間、72 °C- 1 分間) × 25 サイクルで反応を行なった。

- oligonucleotide 断片による mutagenesis

塩基対形成によって二本鎖になった場合、両端が制限酵素部位になるようにデザインし、さらに目的の変異を導入した DNA とその相補 DNA を合成した。これらの合成 DNA を混合し 94 °C で 1 分間解離させたあと、37 °C まで徐冷し、相補 DNA 鎖とした。この相補 DNA 鎖を T4 polynucleotide kinase と ATP によって 5' 末端をリン酸化し、pHA7M0 の制限酵素部位にクローニングした。

1.2.5 RNA analysis

- RNA sampling

RNAの抽出方法はAibaらの方法[58]にしたがい、次のように行なった。LB培地(含抗生物質)で目的の菌株を培養した。この培養液の濁度(OD_{600})が0.8になった時点で培養液中に氷を加え急冷した。その後、遠心分離(3000rpm x 5min at 4 °C)を行ない菌体を回収した。回収した菌体にRNA extraction bufferとphenol(pH5.5)を等量加え懸濁し、65 °Cで5分間振とうし、細胞を破碎した。その後、遠心分離によって細胞素抽出液を調製した。エタノール沈澱を3回行なうことで核酸成分の精製を行なった。最終的にRNA extraction bufferに懸濁し、1/50に希釈調製した試料の A_{260} を測定し、核酸濃度を計算した。濃度計算は $A_{260} = 1$ の時 $40\mu\text{g/ml}$ として行なった。

RNA extraction buffer 0.5% SDS,1mM EDTA,20mM NaOAc pH5.5

- DNA 標識

S1 assay用に*crp* mRNAの転写開始点を含むDNA断片(*HpaII-HpaII*)断片 $5\mu\text{g}$ をalkaline phosphataseで処理して5'末端を脱リン酸化した。その後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とT4 polynucleotide kinaseで5'末端を標識した。標識したDNA断片をエタノール沈澱を繰り返すことによって精製し、 $100\mu\text{l}$ の泳動用バッファー(30% DMSO,1mM EDTA)に溶かし、90 °Cで5分間加熱し変性させた。これを10%PAGEで電気泳動した後、*crp* mRNAに相補的な1本鎖DNAを抽出し、精製してS1 assay用のプローブとして用いた。

また、S1 mapping用のプローブDNAとしてに*crp* mRNAの3'領域を含むDNA断片をKlenow fragment(宝酒造)と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を用いてDNA断片の3'末端を標識した。

- S1 nuclease assay

S1 nuclease assayの方法はMoriらの方法に従って行なった[59]。RNA $20\mu\text{g}$ とDNAプローブをエタノール沈澱した後、 $50\mu\text{l}$ のhybridization bufferに溶解し、75 °Cで10分間加熱した。その後、37 °Cまで自然冷却しRNAとDNAプローブのハイブリダイゼーションを行った。ここに $220\mu\text{l}$ の精製水と $30\mu\text{l}$ の $10\times$ S1 bufferを加え混合した後150UのS1ヌクレアーゼを加え、37 °Cで20分間反応させた。その後、フェノール処理、エタノール沈澱を行いペレットを $30\mu\text{l}$ のホルムアミド-色素混合液に懸濁しサンプルとした。この

サンプルを 8M 尿素 6% ポリアクリルアミドゲルによって電気泳動し S1 ヌクレアーゼによって分解されなかったプローブ DNA をオートラジオグラフィーによって解析した。また、得られたオートラジオグラムのバンドの定量はスキャナーを用いて TIFF 画像としてコンピューターに取り込み、画像解析ソフト NIH Image によって定量する方法と Fujix Bioimage Analyzer BAS1000 によるバンドの定量方法の二種類の方法を用いた。

hybridization buffer 80% formamide, 20mM HEPES, 0.4M NaCl, pH6.5

10 × S1buffer 0.3M sodium acetate, 10mM ZnSO₄, 0.5M NaCl, 50% glycerol, pH4.6

- S1 mapping

3' 末端を標識した DNA 断片をプローブに用いて S1 nuclease assay を行ない、上記と同じ方法でサンプルを調製した。標識した DNA 断片を Maxam-Gilbert 法によって分解したサンプルと S1 nuclease assay のサンプルと同時に 8M 尿素 6% ポリアクリルアミドゲルによって電気泳動した。S1 ヌクレアーゼによって分解されなかったプローブ DNA をオートラジオグラフィーによって検出し、Maxam-Gilbert sequence と比べることで RNA の 3' 末端を決定した。

- Northern hybridization

mRNA の 3' 末端、転写終結効率、及び安定性を解析するために northern hybridization を Sambrook らの方法 [60] に従って行なった。抽出した RNA 試料 10 μ g を RNA sample buffer に懸濁し 65 °C で 5 分間加熱した。その後、氷上で静置した RNA 試料をホルムアルデヒド MOPS アガロースゲルで泳動した。EtBr 染色して 16 S、23 S rRNA のバンドを確認後、アガロースゲル中の RNA をメンブレン (Hybond N⁺) (Amersham) に転写した。転写した後のゲルを EtBr で染色して RNA が残っていないことを確認後、メンブレンを 0.05M NaOH に浸した 3MM paper の上に置き RNA を固定した。2 × SSC で静かにリンスした後、ハイブリパックを用いてメンブレンを hybridization solution と共にパッキングし、ハイブリダイゼーションは 65 °C で 1 2 時間行なった。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは wash buffer1, wash buffer2, wash buffer3 で洗い 3MM の上に置きラップをかけた。オートラジオグラフィーに入れバンドを検出した。また、probe DNA は宝

酒造のランダムラベルキットを使用して調製した。

RNA sample buffer	50% formamide[deionized], 0.02M 3-[N-Morpholino]-propane sulphonic acid(MOPS), 0.005M NaOAc,0.001M,EDTA,6% formaldehyde, 5%[v/v] glycerol,containing 0.1mg/ml B.P.B
10 x MOPSbuffer	0.2M 3-[N-Morpholino]-propane sulphonic acid, 0.05M NaOAc,0.01M EDTA
blotting buffer(20 x SSC)	3M NaCl,0.3M クエン酸ナトリウム
hybridization solution	0.75M NaCl,0.075M クエン酸ナトリウム, 5 x Denhardt's solution,0.005% SDS 20mg/ml Salmon Testis DNA 5 μ l/25ml internal labeled probe DNA
wash buffer1	2 x SSC、0.1% SDS
wash buffer2	0.1 x SSC、0.1% SDS
wash buffer3	0.1 x SSC

1.2.6 Protein analysis

- *galK* assay

assay 方法は Adhya らに従った [57]。 *galK* にコードされる galactokinase はラクトースの一成分であるガラクトースがグルコース代謝系に入る最初の反応を触媒する酵素である。この反応の結果、ATP を加水分解し、ガラクトース-1 リン酸が生成される。中性であるガラクトースはリン酸化されると負の電荷を帯びるようになる。反応液中に ^{14}C でラベルされたガラクトースが添加し、リン酸化されたガラクトースを陰イオン交換フィルターを通し液体シンチレーションカウンターでカウントを測定することによって galactokinase の酵素活性を定量することができる。これを利用してプロモーターと *gal K* の構造遺伝子の間に転写終結シグナルを含む DNA 断片を組み込み、転写終結シグナルの転写終結効率を比較するのに用いた。 実際の反応では 10ml LB 培地 (含抗生物質) 中で $\text{OD}_{650}=0.8$ まで培養した目的の菌体を 1ml サンプルングし、Adhya と Miller のアッセイ法に従って酵

素活性を測定し、その値を Gal K units で示した。酵素活性を計算する式を以下に示す。

$$\text{Gal K units} = (\text{CPM}_{\text{sample}} - \text{CPM}_{\text{background}}) \times 5200 \times 4 / (\text{Total RI} \times \text{反応時間} \times \text{OD}_{650})$$

- SDS PAGE

目的の菌株を 10ml LB 培地 (含抗生物質) で培養し、濁度 (OD_{600}) が 0.8 になった時点で培養液 1ml を遠心分離 (12000rpm x 5min at 4 °C) し、菌体を回収した。回収した菌体は 5OD_{600} になるように protein sample buffer に懸濁し、これを SDS 試料とした。タンパク質の定量的検出としてスタッキングゲルを用いた SDS-PAGE を行ない、Coomassie Brilliant Blue solution にて染色による方法を行なった。

protein sample buffer 62.5mM Tris-HCl(pH6.8),4%SDS,20%glycerol,
10% β -mercaptoethanol,0.2% B.P.B

1.2.7 others

- *in vitro* 転写翻訳反応

Promega corporation から購入した *E.coli* S30 Extract System for Circular DNA kit を用いて以下の反応条件で行なった。

DNA template(plasmid DNA)	3 μ g
Amino Acid Mixture Minus Methionine(1mM)	5 μ l
S30 Premix Without Amino Acids	20 μ l
L-Metionine(1mM)	5 μ l
S30-Extract	15 μ l
total	50 μ l

エッペンドルフチューブに上記の反応液を入れ 37 °C で 2 時間インキュベーションしたあと、50 μ l の phenol(pH5.5) によって反応を停止させた。5 μ l の 3M NaOAc と 100 μ l の RNA extraction buffer をさらに加え RNA 抽出の方法にしたがって RNA を抽出した。得られた RNA を 55 μ l の RNA loading buffer に溶かし、サンプルとした。

- 試薬など

本論文でを使用した試薬類は一般に市販されているものを使用した。

第2章 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの 転写終結機能と RNA 安定化機能を 規定する element の解析

2.1 要旨

大腸菌 ρ 因子非依存性転写終結シグナルは GC 塩基に富んだ逆方向反復配列に U 塩基が続くという構造的特徴をもつ RNA シグナルである。転写終結機能にはこれらの構造的特徴の両方もが必須であることが報告されている [6, 14]。また、転写終結機能以外に ρ 因子非依存性転写終結シグナルの中には、RNA を安定化させることによって上流遺伝子の発現を正に制御しているものがあることも報告されている [46, 43, 61]。しかし、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルのもつ転写終結以外の機能を詳細に解析した例は少なく不明な点が多かった。

転写終結と mRNA 安定化におけるこれらの構造的特徴の役割を明らかにする目的で、私は、大腸菌 cAMP 受容タンパク質 (CRP) をコードしている *crp* 遺伝子下流にある *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*crp t*) の変異シグナルを作成し、上記の二つの機能に寄与するエレメントの決定を行なった。転写終結機能に対する変異の影響を明らかにするために、転写終結シグナル下流に配置したレポーター遺伝子 *galK* の発現量を測定した。その結果、GC 塩基に富んだ逆方向反復配列が欠失した場合、野生型の転写終結シグナルの構造的特徴を全く欠いた場合と同じ程度の *galK* の発現量を示し、転写終結機能はほぼ完全に失われていた。一方、連続した U 塩基を欠失した場合、転写終結機能の低下はみられたが完全に失われていなかった。以上の結果は、転写終結に対する二つの構造的特徴の寄与は GC 塩基に富んだ逆方向反復配列の寄与の方が連続した T 塩基にくらべて大きいことを表している。さらに、GC 塩基に富んだ逆方向反復配列の欠失した場合、mRNA 分解速度が上昇し、上流 *crp* 遺伝子の発現量は減少することを *crp* mRNA の S1 nuclease assay によって示した。一方、連続した T 塩基の欠失した場合、*crp* mRNA の安定性に影響は見られなかった。以上の結果は連続した U 塩基は mRNA の安定化に寄与していないということを表している。すなわち、二つの機能を規定するエレメントは同一でないことが明らかとなった。*crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルを他遺伝子由来のシグナルに置換した場合、野生型の転写終結シグナルの構造的特徴を全く欠いた場合と比較して *crp* mRNA 量の著しい増加が見られた。この結果から mRNA 安定化機能は ρ 因子非依存性転写終結シグナルの一般的性質であることが明らかとなった。

2.2 序論

大腸菌 ρ 因子非依存性転写終結シグナルはアミノ酸生合成オペロンのリーダー領域や mRNA の 3' 領域によく観察され、転写開始シグナルとともに転写単位を決定し、遺伝子発現制御に働いている [62, 63]。この ρ 因子非依存性転写終結シグナルは GC 塩基に富んだ逆方向反復配列とそれに続く T クラスタからなる二つの構造的特徴をもっている。これらの配列は転写されると GC 塩基に富んだステムループ構造と連続した U クラスタという構造を形成する [20]。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異の解析から、二つの構造特徴は両方とも転写終結に必須であること、RNA-RNA 塩基対の安定性を変化させる基質アナログを用いた *in vitro* 転写実験や鋳型 DNA 鎖のみに変異を導入した DNA 鎖を用いた *in vitro* 転写実験から DNA としてではなく RNA として機能していることが明らかになっている [64, 22, 65]。

Platt らによる古典的な Two-Step モデルでは ρ 因子非依存性転写終結を次のように説明している。1) 転写産物が GC 塩基に富んだステムループ構造を形成すると転写複合体中の転写複合体の転写伸長休止が起こる。2) 転写複合体中の DNA-RNA 塩基対 (dA-rU) が不安定なために、この複合体から RNA の解離が起こる [30, 66]。一方、U クラスタの長さを変化させても転写終結に単純な相関が見られないという報告や [16, 17]、高い転写終結効率を示す *rrnBT1*, *T7Te* などの ρ 因子非依存性転写終結シグナルは 4 塩基程度の連続した U クラスタしかもっていないが、*trpA* の場合 U クラスタが 4 塩基程度になると転写終結効率が大きく低下するという報告がされている。言い替えると転写終結における dA-rU 塩基対の役割ははっきりしていない [51, 52]。また、ステム構造やループ領域の大きさや配列と転写終結の関係を系統的に明らかにした報告は少ない [22]。つまり、これらの構造的特徴がどのように転写終結に関わっているかという問題は完全に明らかにされていない。

また、*E. coli trp* オペロン、*crp* 遺伝子などの遺伝子末端に位置する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの一部は上流 mRNA を安定化させることで遺伝子発現を正に制御することが報告されている [46, 43]。しかしながら、mRNA の安定化機能について解析された ρ 因子非依存性転写終結シグナルの数は少ない。言い替えれば、mRNA 安定化機能は他の ρ 因子非依存性転写終結シグナルももっている一般的性質なのかどうかは明らかになっていない。さらに、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの mRNA 安定化機能を規定する構造的要素も明らかにされていない。

E. coli cAMP 受容タンパク質 (CRP) をコードしている *crp* 遺伝子の末端領域にみられる配列は ρ 因子非依存性転写終結シグナルの構造的特徴もっていることが報告されている [55]。以前に本研究室の Aiba らは *crp* 遺伝子末端領域に見られるこの配列が *in vivo*、*in vitro* で転写終結機能を持っていることを示した。つまり、この配列は ρ 因子非依存性転写終結シグナルであることを明らかにした [46]。同時に *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルは *crp* mRNA を安定化させることによって *crp* の発現を増加させる機能をもっていることも明らかにした [46]。しかし、これら二つの機能を規定するエレメントを決定する系統的な解析はまだなされていなかった。

本章において私は ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結機能と mRNA 安定化機能を規定するエレメントを明らかにする目的で *crp* 遺伝子をモデル系として次のような解析を行なった。

構造的特徴に変異をもつ 8 種類の *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルを作成した。各シグナル下流のレポーター遺伝子の発現量から転写終結効率を求め、その比較から、転写終結機能に対する GC ステムループ構造の寄与は U クラスターの寄与よりも大きいこと、しかし、これらの構造がそろわないと効率良く転写終結できないことが判明した。

さらに、変異転写終結シグナルをもつ *crp* mRNA の安定性を S1 assay によって定量化した。その結果、U クラスターは mRNA 安定化には全く関与していない、GC ステムループ構造だけあれば mRNA 安定化機能には十分であることを明らかにした。また、私は *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルを他遺伝子由来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルと置換した場合でも、mRNA は安定化されることも示した。

2.3 結果

2.3.1 変異 *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの作製

制限酵素部位をもつ野生型 *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの作製

crp 遺伝子下流に位置する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの DNA 配列を Figure 2-1 に示した。このシグナルは *crp* 構造遺伝子の終止コドンから 12 塩基下流に位置し、ステム構造形成可能な片側 12 塩基の逆方向反復配列と、それに続く 7 塩基の U クラスタから構成されている。GC 塩基に富んだステム構造内部に *Bss*HII 制限酵素部位がある。構造的特徴に変異を導入した *crp* 転写終結シグナルを効率良く作製するために、上記の転写終結シグナルの配列の上流、下流に PCR mutagenesis 法による塩基置換を行ない二つの制限酵素部位 (*Sp*II 部位, *Sma*I 部位) をもつ変異シグナル M0 を作製した。(Figure 2-2) 転写終結シグナル M0 は野生型の *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの配列を保持している。これらの塩基置換は転写終結にも mRNA 安定化機能にも影響を及ぼさないことを確認した。(Figure 2-4, Figure 2-6)

U クラスタ変異及びステム構造変異 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの作製

*Bss*HII, *Sma*I 部位を用いて 5 種類の U クラスタ変異シグナル M1-M5 を作製した。変異転写終結シグナル M1, M2, M3 は U クラスタに変異をもち、U クラスタ末端からそれぞれ一つ、二つ、三つの T 塩基を C 塩基に置換した。(Figure 2-2) 変異転写終結シグナル M4, M5 は完全に U クラスタを欠失させた変異転写終結シグナルである。M4 は U クラスタをランダムな配列に置換を、M5 ではすべて A 塩基への置換を行なった。

*Sp*II, *Bss*HII, *Sma*I 部位を用いて GC ステムループ構造形成のできない変異転写終結シグナル M6, M7 を作製した。M6, M7 は逆方向反復配列の上流部位を塩基置換することで GC ステムループ構造形成ができない変異転写終結シグナルである。M6 は上流側の逆方向反復配列部位の塩基置換によってステムループ構造形成が妨げられる。行なった塩基置換によって新たなステムループ構造が形成されないことを日立製 DNA 解析ソフト DNASIS を用いて 2 次構造予測を行ない確認した。M7 は塩基置換によって GC ステムループ構造ではなく AT ステムループ構造が形成される。

変異転写終結シグナル M8 はステムループ構造と U クラスターの変異転写終結シグナルである。M6 と同じ塩基置換によって GC ステムループ構造形成が妨げられ、M5 と同じ塩基置換によって U クラスターが完全に欠失している。

2.3.2 シグナル下流のレポーター遺伝子の発現に対する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異の影響

galK assay 系による転写終結シグナルの変異の影響の解析

転写終結における GC ステムループ構造と U クラスターの役割を明らかにする目的で私は *galK* plasmid assay 系を用いて変異転写終結シグナルの転写終結効率の測定を行なった。*galK* plasmid assay 系は *in vivo* における転写終結効率を測定する最も一般的な測定方法の一つである [43, 22]。転写終結シグナルを含む DNA 断片をプロモーターとレポーター遺伝子 (*galK*) の間に挿入したプラスミドを構築し、DNA 断片を挿入しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を終結効率 0% とし、DNA 断片を挿入した場合のレポーター遺伝子の発現量と比較することによって終結効率を計算する。

本章の解析のために pHA7 系プラスミドから切り出した転写終結シグナルを含む *HaeIII-HaeIII* DNA 断片を、プラスミド pKG100 の *gal* プロモーターとレポーター遺伝子 *galK* の間の *SmaI* 制限酵素部位に挿入したプラスミドを構築した。(Figure 2-3) 挿入した転写終結シグナルの転写終結効率を測定するために構築したプラスミドを *gal⁻* の宿主に導入し、*galK* 遺伝子の発現量を *galK* assay によって計測した。測定した結果から計算した終結効率を Figure 2-4 に示した。

M8 転写終結シグナルは ρ 因子非依存性転写終結シグナルの二つの構造的特徴が完全に欠失している。この M8 DNA 断片を挿入したときの発現量は何も挿入しないベクタープラスミド pKG100 の galactokinase の発現量と比べると 235units から 119 units までおよそ 50% 低下していた。この発現量の低下は RNA polymerase が挿入した DNA 断片を転写する際に ρ 因子依存的転写終結が起きた、もしくは非特異的に転写終結が起きたことなどが原因として考えられる。変異転写終結シグナルの転写終結効率を計算し変異の影響をみるために、本研究では M8 DNA 断片を挿入した pKG-M8 を転写終結能のないコントロールとして扱った。すなわち、このプラスミドの転写終結効率を 0% とした。

以上のコントロールを用いて野生型の転写終結シグナルと制限酵素部位をもつ野生型転写終結シグナルの転写終結効率を計算するとそれぞれ 87.2%, 86.7% と高い転写終結効率になった。前述したように転写終結シグナル M0 は野生型の *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの配列を保持しており、制限酵素部位作製のための塩基置換は転写終結に影響を及ぼさないことがわかった。

塩基置換によってステムループ構造を全く形成できないようにした変異転写終結シグナル M6 では転写終結効率が 9% とほぼ完全に転写終結機能が失われていた。また GC ステムループ構造を AT ステムループ構造にした変異転写終結シグナル M7 でも転写終結効率は 8.8% となり、この変異によっても転写終結機能が失われていた。以上の結果から、GC ステムループ構造は転写終結に大きく寄与していることが明らかとなった。

一方、U クラスタの末端の U 塩基を C 塩基に置換した変異転写終結シグナル M1 の場合、転写終結効率は 56% まで低下した。さらに、T 塩基を C 塩基に置換した M2, M3 の場合では M1 よりもわずかに転写終結効率が低下するだけであり、その転写終結効率はそれぞれ、50.9%, 56.4% であった。M2 よりも M3 の方が転写終結効率が若干高くなっているのは誤差と思われる。また、U クラスタを完全に欠失させるように塩基置換をした変異転写終結シグナル M4, M5 でも M1 よりもわずかに転写終結効率が低下するだけであった。U クラスタの変異による転写終結効率への影響についてまとめると、その変異の影響は野生型の転写終結効率をおよそ半分程度に低下させる程度であった。この結果は言い替えると、U クラスタがなくても GC ステムループ構造だけでも転写終結機能を保持していることを表している。以上の結果から私は *crp* 転写終結シグナルの U クラスタは転写終結機能に寄与はしているが、その寄与は GC ステムループに比べると小さい、そして GC ステムループ構造が転写終結に大きく寄与していると結論した。

2.3.3 上流遺伝子の発現に対する転写終結シグナルの変異の影響

SDS PAGE による転写終結シグナルの変異の影響の解析

次に変異転写終結シグナルの上流遺伝子の発現への影響を調べるために、変異転写終結シグナルをもつ pHA7 系プラスミドを pp47(*crp*⁻) の宿主に導入し、プラスミド由来の *crp* の発現量を SDS PAGE によって解析した。CRP タンパク質は CBB 染色によって容易に検出される。そ

の結果を Figure 2-5 に示した。lane 1 は精製した CRP である。lane 2 はベクタープラスミド pBR322 を導入した大腸菌株から抽出したタンパク質である。(コントロール) lane 3 と 4 は野生型の転写終結シグナルをもつ *crp* と制限酵素部位をもつ野生型転写終結シグナル M0 をもつ *crp* 遺伝子から発現したタンパク質である。lane 2 と比較して lane 3,4 に特異的に見られるバンドがある。このバンドの位置と lane 1 のバンドの位置が一致していることから、このバンドが CRP であることがわかる。また、lane 3 と lane 4 を比較するとバンドの大きさに全く差がないことから、M0 に導入した制限酵素部位作製のための塩基置換は mRNA 安定化機能に影響を及ぼさないことがわかった。

上流遺伝子の発現に対する変異の影響について注目すると、U クラスターに変異をもつ転写終結シグナルを *crp* 遺伝子下流に持つ場合、CRP の量は野生型と変わらないことが観察された。(Figure 2-5 lane 3 と lane 5,6,7 の比較) 一方、GC ステムループ構造に変異をもつ転写終結シグナルを *crp* 遺伝子下流に持つ場合、CRP の発現量は野生型の 4 倍程度まで減少していることが観察された。(Figure 2-5 lane 3 と lane 8,9,10 の比較) さらに Figure 2-5 lane 9 から AT ステムループ構造形成可能な配列でも発現量は同じく 4 倍程度まで減少していたことが観察された。

S1 assay による転写終結シグナルの変異の影響の解析

Aiba らによって *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルが mRNA の安定性を通して *crp* 遺伝子の発現を正に制御していることが報告されている [46]。本章で作製した変異転写終結シグナルが mRNA レベルで *crp* の発現へ影響しているのかどうかを調べる目的で S1 assay によって *crp* mRNA の定量化を行なった。(Figure 2-6) プラスミド pHA7 由来の 488bp の *HpaII-HpaII* DNA 断片の 5' 末端を [α - 32 P]ATP によって標識したものを S1 assay のプローブとして用いた。この DNA 断片をプローブとして用いた場合、*crp* mRNA に対応する 380nt の S1 nuclease に耐性な標識 DNA 断片がバンドとしてオートラジオグラムによって検出される。(Figure 2-6 panel A)

S1 assay の結果を Figure 2-6 panel B に示した。GC ステムループ構造に変異がある場合、*crp* mRNA の量は著しく低下していることが観察された。(Figure 2-6 panel B lane 3 と lane 7,8,9 の比較) 低下の割合は SDS PAGE による CRP タンパク質の減少量と同じおよそ 4 倍程度であった。他方、U クラスターに変異がある場合はいずれの場合においても、*crp* mRNA の量に影響

は観察されなかった。(Figure 2-6 panel B lane 3 と lane 4-6 の比較) つまり、各変異転写終結シグナルを持つ場合の *crp* mRNA の量比は SDS PAGE による解析から得られた各々の CRP タンパク質の発現量比に合致していた。

以上の結果から ρ 因子非依存性転写終結シグナルの構造的特徴である GC ステムループ構造が上流構造遺伝子の発現量増大に寄与しており、もう一つの構造的特徴である U クラスタはこの発現量増大に寄与していないことが明らかとなった。

2.3.4 mRNA 安定性に対する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異の影響

抗生物質リファンピシンを用いた mRNA 分解速度の測定

GC ステムループ構造が *crp* mRNA の発現量増大にどのように影響しているのかを調べる目的で、*crp* 変異転写終結シグナルをもつ *crp* mRNA の分解速度を測定した。分解速度を測定するために次のような方法で RNA をサンプリングし、得られた RNA 試料から S1 assay によって *crp* mRNA の定量化を行なった。Figure 2-7 panel A で示したように変異転写終結シグナルを含む pHA7 系プラスミドを持つ菌株を LB 培地で培養し、対数増殖期 ($OD_{600}=0.8$) に抗生物質リファンピシンを培養液に添加した。リファンピシンは RNA polymerase による転写開始を阻害する抗生物質であり、添加後の大腸菌株では新しい転写が行なわれない。添加前に合成され、その後、分解されずに残っている RNA を添加後の時間経過とともに抽出し、S1 assay によって *crp* mRNA の定量化を行なうことで mRNA の分解速度を決定することができる。前節と同様にプラスミド pHA7 由来の 488bp の *HpaII-HpaII* DNA 断片の 5' 末端を [α - ^{32}P]ATP で標識したものを S1 assay のプローブとする S1 assay を行なった。(Figure 2-7 panel B,C) mRNA の分解速度を決定するために各レーンの DNA バンドの放射活性の定量を行った結果、Figure 2-7 panel B で示したように野生型の mRNA の半減期はおよそ 3 分と計算された。U クラスタ変異をもつ転写終結シグナル M5 *crp* mRNA はほぼ同じ半減期 (3 分) であった。一方、GC ステムループ構造の形成できない変異転写終結シグナル M6,M8 を持つ場合、*crp* mRNA の分解速度の上昇が観察された。放射活性の定量の結果、M6,M8 をもつ *crp* mRNA の半減期はおよそ 1 分であり、野生型のおよそ 3 倍程度の低下が見られた。(Figure 2-7 panel C)

以上の結果から、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの GC ステムループ構造は上流遺伝子の

mRNA 安定化機能に必要なエレメントであることが明らかとなった。また、前節の結果も併せて私はU クラスターは ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結には必要であるが ρ 因子非依存性転写終結シグナルの持つ上流遺伝子の mRNA 安定化機能に対する寄与はないと結論づけた。

2.3.5 ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA を安定化させる機能を一般的機能として保持している。

crp 転写終結シグナルを他の転写終結シグナルと置換した場合の mRNA 安定性に対する影響の解析

mRNA 安定化機能が ρ 因子非依存性転写終結シグナルの一般的性質であるのかというのはまだ未解明な問題であった。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの持つ mRNA 安定化機能の一般性を調べるために、私は *crp* 転写終結シグナルを他の転写終結シグナルに置換した変異 *crp* 遺伝子をプラスミド上に作製した。転写終結についての解析の進んだ三つの ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*trpA*, T7Te, *rrnBT1*) を *crp t* と置換する転写終結シグナルとして用いた。これらのシグナルを含む DNA 断片を DNA 合成し、*crp* 遺伝子の終止コドンの位置に *MluI* 制限酵素部位を構築した pHA7M02 の *MluI-SmaI* 領域に挿入した。(Figure 2-8) 作製したプラスミド由来の *crp* mRNA を S1 assay によって定量した。Figure 2-9 panel A に示したように三つの ρ 因子非依存性転写終結シグナルは *crp* 転写終結シグナル M8 をもつ場合と比べると *crp* mRNA の発現量は著しく高くなることがわかった。(Figure 2-9 panel A lane 3,4-6) 発現量の上昇は野生型 *crp* 転写終結シグナルを持つ場合に比べるとおよそ2倍程度、M8 に比べると8倍程度であった。

以上の結果はこれらの ρ 因子非依存性転写終結シグナルが *crp* 転写終結シグナルと同様に上流 mRNA を安定化できることを示している。野生型 *crp* 転写終結シグナルよりも高い mRNA 安定化機能をもつ理由としてこれらの転写終結シグナルの GC ステムループ構造の自由エネルギーが野生型の *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造の自由エネルギーよりも低い可能性が考えられる。転写終結シグナルの二次構造の自由エネルギー (ΔG) を Zuker らの方法で計算した [67]。結果を Figure 2-9 panel B に示した。他遺伝子由来の三つの ρ 因子非依存性転写終結シグナルは同程度の発現量の *crp* mRNA が観察されたが、各シグナルの ΔG はそれぞれ

れ、 $\Delta G = -14.8 \text{ kcal/mol}$ (*trpA*), $\Delta G = -29.5 \text{ kcal/mol}$ (*rrnBT1*), $\Delta G = -18.8 \text{ kcal/mol}$ (T7Te) であった。また、これらのシグナルと比較すると発現量の劣る野生型 *crp* 転写終結シグナルの ΔG は -21.1 kcal/mol であり、RNA の二次構造の自由エネルギー (ΔG) と上流遺伝子の発現増加の程度の間には単純な相関は見られなかった。(Figure 2-9 panel B)

以上の結果から私は ρ 因子非依存性転写終結シグナルは一般的に上流 mRNA 安定化機能を持っていると結論した。

2.4 考察

*in vivo*における大腸菌 mRNA の3'領域やアミノ酸生合成オペロンのリーダー領域によくみられる配列は GC に富んだステムループ構造形成可能な逆方向反復配列とそれに続く U クラスタという二つの構造的特徴をもっている。この配列は少なくとも次の二つの機能を持っていることが明らかになっている。1) 他の因子に依存しなくても RNAPolymerase と鋳型 DNA 及び転写産物のみによって転写を終結させる。この機能によって転写単位の3'末端が形成されると考えられている。また、アミノ酸生合成オペロンにおいては転写を減衰させることによって下流遺伝子の転写量を調節することで遺伝子発現制御に働いていることが報告されている。2) シグナル上流の mRNA を安定化させる。これは解析のあまり進んでいない ρ 因子非依存性転写終結シグナルの機能である。一部の ρ 因子非依存性転写終結シグナルは上流 mRNA を安定化させることにより、遺伝子発現を正に制御している。

これらの ρ 因子非依存性転写終結シグナルの機能と二つの構造的特徴の関係を明らかにする目的で本章の解析を行なった。塩基置換によって8種類の *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの変異シグナルを作製し、転写終結機能及び mRNA 安定化機能に関する影響について解析を行なった。

本章の解析結果をまとめると以下の三つになる。

1. *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの構造的特徴である GC 塩基対に富んだステム構造と U クラスタは転写終結機能にとって重要なエレメントである。しかし、転写終結機能に大きく寄与しているのは GC ステムループ構造である。
2. mRNA の安定化機能に寄与しているのは GC ステム構造であり、U クラスタは寄与していない。
3. ρ 因子非依存性転写終結シグナルは一般的性質として mRNA 安定化機能をもっている。

2.4.1 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結活性に必須なエレメント

crp 転写終結シグナルの GC ステムループ構造を形成を妨げると *in vivo* 転写終結効率の劇的な低下が観察された。(Figure 2-4) この結果はこれまで報告されている ρ 因子転写終結シグナ

ルの転写終結機構の解析結果に合致している [24, 25, 26, 27, 28, 29]。また、*crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造を AT ステムループ構造にしても転写終結効率の劇的な低下が観察されたことからステムループ構造を形成する塩基は GC でなければならないことが明らかにされた。

一方、U クラスターの部分的および完全な欠失でも転写終結機能は完全にはなくならなかった。これは *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造は U クラスターよりも転写終結に大きく寄与していることを示している。

これは ρ 因子非依存性転写終結シグナルがさまざまな大きさ、及び配列の GC ステムループ構造と U クラスターをもつことをふまえると興味深い結果である。例えばいくつかの ρ 因子非依存性転写終結シグナルでは U クラスターを僅かに減少させることで劇的な転写終結効率の低下が引き起こされ、また僅かな U クラスターしかなくても高い転写終結効率を示すものも報告されている [17]。他方、*in vitro* においては転写終結シグナルとして連続した A 塩基だけで機能するという報告もある。

転写終結機構は Platt による TwoStep モデルによって説明されている [30]。1) RNA polymerase が GC 塩基に富んだ逆方向反復配列を転写と U クラスターを転写するとステムループ構造が形成され DNA 開鎖領域中の RNA-DNA 塩基対数が減少し、転写伸長の休止が引き起こされる。2) 残った U 塩基と dA 塩基の塩基対の相互作用は非常に不安定なために転写産物の解離が促進される。二つの過程を経て転写は終結すると考えられている。このモデルでは上記のような *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造は U クラスターよりも転写終結に大きく寄与していることを説明することはできない。

しかし、最近の研究によれば、U クラスターの転写による U-dA 塩基対は不安定であるために転写複合体の転写休止を誘導することが報告されている [37]。そして RNA と RNA polymerase の間の相互作用の低下が転写終結に重要な役割を果たしており、RNA-DNA 塩基対と RNA-RNA polymerase の相互作用はお互いに影響しあっていると考えられている [32]。以上のモデルをもとに上記の結果を考えると U クラスターによる RNA-DNA 塩基対形成の不安定化が *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルでは比較的起きにくいのもかもしれない。つまり、*crp* 転写終結シグナルによる転写終結は RNA-RNA polymerase の相互作用に大きく依存していることを意味しているのもかもしれない。

転写終結に対する GC ステムループ構造と U クラスターの寄与の違いという視点で ρ 因子非依存性転写終結シグナルのさらに詳細なクラス分けが可能かもしれない。残念ながら、これまでの転写終結シグナルの研究は系統的解析、及び同一条件下での転写終結効率の測定などがされていないため、このクラス分けをすることができない。今後、多種類の転写終結シグナルを用いて正確な比較のできるようにすることができれば、転写終結についての新たな知見が得られると思われる。

2.4.2 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの mRNA 安定化機能に必須なエレメント

GC ステムループ構造を欠失させると上流 *crp* 遺伝子の著しい発現低下が見られた。しかし、U クラスターを C 塩基に置換しても発現低下は見られなかった。(Figure 2-5) この発現低下量は mRNA 量低下に相当するものであった。また、GC ステムループ構造変異シグナルによる mRNA 量減少は上流 mRNA の安定性低下が原因であった。(Figure 2-7 panel A) 一方、U クラスターを C 塩基に置換しても上流 RNA の安定性に影響は見られなかった。(Figure 2-7 panel B) 以上の結果から私は *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの上流 mRNA 安定化機能に寄与しているのは GC ステムループ構造のみであり、U クラスターは寄与していないと結論した。前節で考察したように *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの構造的特徴である U クラスターは GC ステムループ構造と比べると寄与は劣るものの転写終結機能にとって重要なエレメントである。前節の結果をあわせると *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの二つの構造的特徴は転写終結機能と上流 mRNA 安定化機能に対して異なる寄与をしていることを表している。

転写終結機能と mRNA の安定化機能が分離されたことは転写終結シグナルの生理的意義を考える上で興味深い。転写終結シグナル下流に遺伝子のないモノシストロニックな mRNA の場合、転写終結が余分な転写をするのを防ぐことで効率良い転写を制御していると考えられる。同時に mRNA を安定化することによって積極的に上流の構造遺伝子の発現を正に制御していると考えられる。以上の結果は *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルはこれら二つの制御を行なっていることを意味している。

また、Washio らは大腸菌ゲノム配列中の遺伝子末端領域の自由エネルギーを計算し、それ

が末端領域で局所的に低下していることを示した。オペロンが同方向や逆方向を示す形の場合と比較して、隣接するオペロンが互いに向き合う形の場合、この自由エネルギーの低下が顕著に観察された [68]。このような二つのオペロンの転写が終結せずに進行した場合、転写された mRNA はお互いに相補な配列をもつことになり、発現の低下が予想される。つまり、遺伝子末端領域の転写終結はオペロンの発現が互いに干渉しあわないように制御しているのかもしれない。

一方、ステムループ構造形成可能な逆方向反復配列が mRNA を安定化させることで上流遺伝子の発現を促進させている例が報告されている。もっとも詳しく解析されている例はオペロン間や遺伝子間にみられる繰り返し反復配列 (repetitive extragenic palindromic sequences (REP 配列)) の解析である [69]。この REP 配列は PNPase や RNAaseII などの 3'-5' エキソヌクレアーゼによる mRNA 分解の活性を阻害することによって上流 mRNA を安定化することが知られている [69]。REP 配列以外のステムループ構造も 3'-5' エキソヌクレアーゼの活性を阻害させることで上流 mRNA を安定化することが報告されている。転写終結シグナルのステム構造も同様にエキソヌクレアーゼの進行を阻害することによって mRNA を安定化している、と考えられる。しかしながら、実際に上流 mRNA を安定化させる機能の解析をされた ρ 因子非依存性転写終結シグナルはごく僅かであった。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルが上流構造遺伝子を安定化させることが報告されているものとしては λ ファージの *int* 遺伝子の発現制御や *E. coli trp* オペロン、*Bacillus thuringiensis cry* 遺伝子、 ϕ X174 ファージや *E. coli crp* 遺伝子などである [61, 46, 43, 45, 44]。*int* 遺伝子の場合、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルで転写終結した mRNA から発現されるが、わずかに転写終結しなかった転写産物からの発現は次のように制御されている。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルのステムループ構造は RNAaseIII によって切断される。そのためエキソヌクレアーゼによる mRNA の急速な分解が起こり、この転写産物からは僅かな発現しか見られない。その結果、転写終結シグナル下流の遺伝子発現を抑制している。*E. coli trp* オペロンでは *trp t* ρ 因子非依存性転写終結シグナルをもつことによって RNaseII による分解に対して抵抗性を示すことが報告されている。その結果、シグナルがない場合と比較してシグナル上流の mRNA の発現量は 3 倍程度増加することが示されている。

私は三つの異なる ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*trpA*, *rrnBT1*, T7Te) を *crp* 遺伝子下流の *crp* 転写終結シグナルと置き換えた場合でも、*crp* mRNA を安定化できることを示した。(Figure

2-9) これらの転写終結シグナルはすべてオペロン上流にありシグナル下流の遺伝子の転写を制御している。これらの転写終結シグナルが遺伝子末端領域に位置する転写終結シグナルと同様に上流 mRNA 安定化機能を保持していることは本章の解析で初めて明らかにしたことである。すなわち、この結果は mRNA の安定化機能が ρ 因子非依存性転写終結シグナルの一般的性質であることを強く支持している。

また、本章で用いた ρ 因子非依存性転写終結シグナルのステムループ構造の自由エネルギー (ΔG) と mRNA 安定化効果に単純な相関がみられなかった。(Figure 2-9) 最近、このようなステムループ構造を ATP 加水分解依存的にほぐす ATP dependent helicase, RhlB が報告されている。この RhlB は PNPase と複合体を形成し、degradosome として mRNA 分解に働いていると考えられている。[70] さらに、ステムループ構造をもつ RNA に働き PNPase の活性を阻害する因子が最近報告されている。GC スタムループによる上流 mRNA 安定化機構をより理解するためには、今後このような RNA 分解機構をからめた系統的な解析が必要であると思われる。

第3章 遺伝子末端領域における転写終結機 構の解析

3.1 要旨

ρ 因子非依存性転写終結シグナルは多くの大腸菌 mRNA の 3' 領域に観察される。また、このシグナルを含む DNA 鎖を鋳型とした時の *in vitro* 転写産物は転写終結シグナルの U クラスターを 3' 末端にもつ。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの解析は、このシグナル領域だけを取り出して進められたため、この生きた大腸菌内における実際の遺伝子末端領域における転写終結がどのように行なわれているのか明らかになっていなかった。つまり、*in vivo* で観察される mRNA 3' 末端が ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置で転写終結することによって形成されているのか、シグナルを越えて伸長した RNA のプロセッシングなのかという問題を実際に生きた大腸菌内で厳密に解析した例は少なかった。

私は遺伝子末端領域における転写終結がどのようにおこなわれているのかを明らかにする目的で、RNA プロセッシングを阻害するような ρ 因子非依存性転写終結シグナルを *crp* 遺伝子末端領域の ρ 因子非依存性転写終結シグナル下流に配置したプラスミドを作製した。解析の結果、*crp* 遺伝子から合成される *crp* mRNA のほとんどは野生型の *crp* 遺伝子由来の mRNA よりも長くなっていた。通常の *crp* mRNA の 3' 末端は *crp t* の T クラスター領域にマッピングされるが、この長い mRNA の 3' 末端は下流に配置した第二の転写終結シグナルの位置にマッピングされた。しかし、大腸菌培養液中へのクロラムフェニコールの添加や *crp* 構造遺伝子中のオーカー変異導入などによって *crp* mRNA の翻訳が阻害されるとこのような長い mRNA は観察されなくなった。さらに、二つの転写終結シグナルの間の塩基数を段階的に増やした場合にもこのような長い mRNA は観察されなくなった。以上の結果から、生きた大腸菌内における遺伝子末端領域の転写終結について次の三つのことが明らかとなった。

1. 遺伝子末端領域での転写は転写終結シグナルの位置で終結せず、シグナルを越えて伸長したあとに終結する。
2. 転写終結シグナルの位置まで RNA プロセッシングが起こり、その結果、mRNA 3' 末端が形成される。
3. シグナル上流の構造遺伝子の翻訳位置が ρ 因子非依存性転写終結機能に影響する。

同様に他の遺伝子由来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルの下流に第二の ρ 因子非依存性転写

終結シグナルを配置した場合、程度の差がみられるものの長い mRNA が観察された。つまり、上流構造遺伝子翻訳の影響は他の ρ 因子非依存性転写終結シグナルでも起きることが示された。構造遺伝子の終止コドンとその下流に位置する ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置関係について集計したので併せて論じる。

3.2 序論

染色体上の遺伝子、遺伝子群は個別の単位として転写される。転写単位は転写開始シグナルと転写終結シグナルによって決定され、遺伝子末端領域の転写終結機構を明らかにすることは転写単位で遺伝子発現制御を理解する上で重要であると考えられる。

大腸菌の転写終結シグナルは少なくとも二つに分類される。一つはRNAPolymeraseとDNA鋳型しか含まない最小限の*in vitro*転写系で転写終結活性をもつもので、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルもしくは、構成的転写終結シグナルと呼ばれるものである。もう一つは、*in vitro*で転写終結活性をもつために他の因子を必要とするもので、因子依存的ないしは ρ 因子依存的転写終結シグナルと呼ばれるものである[13]。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルはmRNAの3'領域に観察されることが多く、また、遺伝子間の制御領域にも見受けられる。 ρ 因子非依存性転写終結シグナルは転写減衰を通して下流遺伝子の転写発現制御に、また、転写されたmRNAの安定性を通して遺伝子発現制御に関わっている。(前章)

大腸菌 mRNA 3' 領域に観察される GC 塩基に富んだ逆方向反復配列とそれに続く U クラスターから特徴をもつ配列として ρ 因子非依存性転写終結シグナルは同定された [63, 62]。この配列を含む DNA 鎖を鋳型にした *in vitro* 転写実験をすると U クラスターを 3' 末端にもつ転写産物が合成されることが報告されている [10]。数多くの変異シグナル、及び基質アナログを用いた *in vitro* 転写実験の解析結果から転写終結機構を説明するための次のようなモデルが提案されている [30]。

1. RNAPolymerase が GC 塩基に富んだ逆方向反復配列と U クラスターを転写する。
2. 転写産物は GC ステムループ構造を形成し、RNAPolymerase の転写を停止させる。
3. GC ステムループ構造形成は転写複合体中の DNA-RNA 塩基対領域で起きるために転写複合体中の DNA-RNA 塩基対領域が縮小する。その結果、DNA 開鎖領域が縮小する。
4. 転写複合体中の DNA-RNA 塩基対の領域は dA-U の領域だけになり、この塩基対の相互作用は不安定であるため、RNA の解離が起こる。

転写複合体の転写伸長停止、転写複合体から RNA の解離という二段階の過程を経る以上のような転写終結機構のモデルは TwoStep 転写終結モデルと呼ばれている。(Figure 1-2) このモデ

ルと上記の報告から、遺伝子末端領域における転写終結は転写終結シグナルのUクラスターの位置で転写終結することによって行なわれ、その結果としてmRNA3'末端が形成されていると考えられてきた。

しかしながら、mRNA3'末端が ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置で起きた転写終結によって形成されているのか、シグナル下流まで転写された転写産物のプロセッシングによって形成されているのかという実際に生きた大腸菌内における遺伝子末端領域の転写終結の問題を解析した例は少なかった[43, 71]。言い替えると、生きた細胞内での遺伝子末端領域の転写終結はどのように行なわれているのかという問題が未解明な問題として残されていた。

私はcAMP受容タンパク質(CRP)をコードする*crp*遺伝子を生きた細胞内での遺伝子末端領域の転写終結を解析するためのモデル系として用いた。*crp*遺伝子末端領域に位置する ρ 因子非依存性転写終結シグナルは*crp* mRNA3'領域に観察され、シグナル単独での高い転写終結機能をもつことが報告されており、以上の問題を解明するためのモデル系として適している。

*crp*転写終結シグナルを通り過ぎて転写伸長した一次転写産物のプロセッシング中間体を同定することを目的として*crp*転写終結シグナルの下流に第二の ρ 因子非依存性転写終結シグナルを配置したタンデム転写終結シグナル系を構築した。この系を用いて一次転写産物のプロセッシング中間体を野生型*crp* mRNAよりも長いmRNAとして観察した。また、*crp*転写終結シグナルの下流250塩基までの間に転写は徐々に終結していることが示された。一方、シグナル上流に位置する構造遺伝子が翻訳されていることに注目し、mRNA3'末端形成に対する翻訳の阻害の影響を解析した。大腸菌の培養液中へのクロラムフェニコールの添加や、上流構造遺伝子内へのオーカー変異の導入などによって転写伸長中の*crp* mRNAの翻訳を阻害させた場合、長い*crp* mRNAは観察されなかった。以上の結果はシグナル上流に位置する構造遺伝子の翻訳が遺伝子末端領域の転写終結に影響していることを示している。さらに、私は以上のような影響は他の遺伝子由来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルを遺伝子末端領域にもつ場合でも起こることを示した。

以上の結果から遺伝子末端領域における転写終結は上流構造遺伝子の翻訳位置の影響を受け、 ρ 因子非依存性転写終結シグナル転写後も転写伸長を続けた後に徐々に起きること、mRNA3'末端は転写終結シグナルを越えて転写伸長した転写産物のプロセッシングによって形成されていることが明らかとなった。

3.3 結果

3.3.1 大腸菌構造遺伝子末端と ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置関係

ρ 因子非依存性転写終結シグナルは mRNA3' 領域に特異的な配列として同定されたため、mRNA3' 末端形成と転写終結は coupling していると考えられてきた。しかし、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの解析は、主にこのシグナル領域だけを取り出して進められてきたこともあって、実際の細胞内で、遺伝子末端領域における転写終結がどのように行なわれているのかは未解明の問題である。

一方、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結機構は *in vivo* において NusA, NusG, λ ファージ Q タンパク質、などのさまざまな因子の影響を受ける場合があることが報告されている [6]。(Figure 3-1)

遺伝子末端領域の ρ 因子非依存性転写終結シグナルの特徴を見出すために、私は大腸菌オペロンの構造遺伝子と末端領域の ρ 因子非依存性転写終結シグナルの位置関係について調べた。Carafa らによる 148 の ρ 因子非依存性転写終結シグナルのコレクション [20] から構造遺伝子下流領域にある 101 のシグナルを選出し次のような解析を行なった。シグナル上流の構造遺伝子終止コドンの塩基からシグナルの GC ステム領域を構成する塩基までの塩基数を見積もった。(Figure 3-2) その結果、67%のシグナルが構造遺伝子の終止コドンの塩基から 30 塩基以内に転写終結シグナルが位置していることがわかった。この結果は大腸菌の遺伝子末端の自由エネルギーは局所的に低下するという Washio らの最近の報告とも一致する [68]。遺伝子末端領域における転写終結を明らかにする目的で、次節においてまず私は上流構造遺伝子領域を含む状態での転写終結効率の測定を試みた。

3.3.2 上流構造遺伝子が存在する時、*crp* 転写終結シグナルの転写終結効率は低下する？

より生理的条件下に近い状態における ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結効率を計測するために、私は上流構造遺伝子領域と転写終結シグナルを含む pHA7 系プラスミド由来の *HindIII-EcoRV* DNA 断片をプラスミド pKG100 の *SmaI* 部位にクローニングした。(Figure 3-3)

挿入した転写終結シグナルの転写終結効率を測定するために構築したプラスミドを *galK*⁻ の宿主に導入し、*galK* 遺伝子の発現量を *galK* assay によって計測した。*galK* plasmid assay 系を用いた転写終結効率の測定結果を Figure 3-4 に示した。M8 転写終結シグナルは ρ 因子非依存性転写終結シグナルの二つの構造的特徴が完全に欠失している。前章で示したように転写終結効率の計算はこの変異転写終結シグナル M8 に対する相対値として計算した。上流構造遺伝子を含まない野生型の *crp* 転写終結シグナルの転写終結効率は前章で示したように 86.7% (%Readthrough = 13.3%) である。(Figure 3-4 pKG-M0) 一方、上流構造遺伝子領域を含む場合、野生型の転写終結シグナルは 33% (%Readthrough = 67%) まで低下している。(Figure 3-4 pHG209M0) また U クラスターの U 塩基を A 塩基に置換した変異転写終結シグナル M5 の場合、転写終結効率は 7% まで大きく低下した。(Figure 3-4 pHG209M5)

以上の結果から、上流構造遺伝子が存在する時には *crp* 転写終結シグナルの転写終結機能は著しく低下し、また、このような条件下でも U クラスターは転写終結機能に寄与していると考えられる。

3.3.3 *crp* mRNA の 3' 末端は *crp* 転写終結シグナルにマッピングされる。

前節で示したように *galK* assay 系を用いて転写終結効率を測定すると上流 *crp* 構造遺伝子が存在する時、*crp* 転写終結シグナルの転写終結効率は著しく低下した。

crp mRNA の正確な 3' 末端を決定するために [α -³²P]dCTP で 3' 末端を標識した pHA7 由来の *Sau3AI*-*EcoRI* DNA 断片をプローブに用いて Mori らの方法に従って S1 マッピングを行なった [59]。pHA7M0 由来の *crp* mRNA の主要な 3' 末端は *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの U クラスターにマッピングされた。(Figure 3-5) この結果は以前に Aiba らによって示された *crp* mRNA 3' 末端の位置と一致している [46]。

ここで本節までの結果をまとめると次のようになる。

- *crp* 転写終結シグナルは単独で高い転写終結効率を示すが、上流 *crp* 構造遺伝子が存在する時、下流レポーター遺伝子の発現がみられ、転写終結効率が下がったように見える。
- *crp* mRNA の 3' 末端は *crp* 転写終結シグナルの U クラスターにマッピングされる。

一般的な転写終結効率を測定する方法である *galK* assay 系の場合は、 ρ 因子非依存性転写終結シグナル下流にレポーター遺伝子を配置する。しかし、この配置ではオペロン内部の遺伝子間の転写終結を解析することも意味し、下流レポーター遺伝子の配置の影響も考慮しなければならない。つまり、上記の結果は遺伝子末端領域における転写終結を一般的な転写終結効率を測定する方法で正確に解析することが難しいことを意味している。遺伝子末端領域における転写終結を解析するためには、転写終結シグナルが遺伝子末端に位置することを変更せずに解析する方法が必要であると考えられる。

3.3.4 遺伝子末端領域では転写終結シグナル転写後も転写は続行する。

転写終結シグナルが遺伝子末端に位置することを変更せずに解析するために、mRNA 3' 末端形成機構から遺伝子末端領域の転写終結の解析を行なった。転写終結シグナルを 3' 領域にもつ mRNA が形成されるためには少なくとも次の三つの機構が考えられる。

1. 転写が転写終結シグナルの位置で転写終結することによって形成される。
2. 転写終結シグナルを越えて転写伸長した転写産物が PNPase や RNaseII などの exonuclease によるプロセッシングを受けて形成される。
3. 転写終結シグナルを越えて転写伸長した転写産物が RNaseE, RNaseIII などの endonuclease によるプロセッシングを受けて形成される。

しかし、*crp* 転写終結シグナル下流に RNaseE や RNaseIII によって認識され切断されるような二次構造形成可能な配列はみられない。そこで、上記の 2) の可能性を検討するために、*crp* 転写終結シグナル下流にステム構造形成可能な配列 (第二の ρ 因子非依存性転写終結シグナル) を挿入したプラスミドを構築した。一般にステムループ構造形成可能な配列は 3'-5' exonuclease によるプロセッシングを阻害することが報告されている。すなわち、転写終結シグナルを越えて転写伸長を続けて下流の第二の転写終結シグナルまで転写された転写産物があるならば、その転写産物に含まれる第二の転写終結シグナルのステムループ構造によって exonuclease によるプロセッシングは阻害されることが予想される。ノザンプロットで解析することによって、転写継続し、プロセッシングを途中で阻害された転写産物を野生型の *crp* mRNA よりも長い mRNA

のバンドとして検出することができると考えられる。(Figure 3-6) 第二の ρ 因子非依存性転写終結シグナルとして私は *rrnB* 転写終結シグナルを含む DNA 断片を合成して用いた。このシグナルは高い転写終結効率をもつと報告がされており、*crp* 転写終結シグナルと同じ 12 塩基対のステム構造を形成可能な配列をもっている。

はじめに pHA7M0 と転写終結シグナルを欠失した pHA7M8 の *EcoRI* 部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入したプラスミド pM0-RI, pM8-RI を構築した。(Figure 3-7 panel A) *EcoRI* 領域は *crp* 転写終結シグナル領域からおよそ 250bp 下流に位置している。このプラスミド由来の *crp* mRNA をノザンブロットイングで解析した結果を Figure 3-7 panel B に示した。なおプローブ DNA としてプラスミド pHA7 由来の *HindIII-EcoRV* DNA 断片を [α - 32 P] dCTP によってランダム標識したものをを用いた。

野生型 *crp* 転写終結シグナルをもつ pHA7M0 由来の主要な *crp* mRNA の長さは約 700 塩基であった。*crp* 転写終結シグナルの 250bp 下流に *rrnB* 転写終結シグナルが配置された pM0-RI からも同じ長さの mRNA が観察された。この mRNA が主に検出されたが、同時により長い mRNA (約 900 塩基) のバンドもわずかに観察された。このバンドの長さは転写が *crp* 転写終結シグナルの位置で終結せず転写継続し *rrnB* 転写終結シグナルまで到達した場合 mRNA の長さに相当する。この結果は *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルで転写終結せず転写継続した mRNA をプロセシングの中間体という形で検出できたということを表している。この長い RNA は全体の約 10% に相当すると見積られる。この値は *galK* プラスミドシステムによって前章で得られた *crp* 転写終結シグナルの転写終結効率 (約 90%) という値と一致している。*crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造と U クラスタを塩基置換によって欠失させた M8 の場合にはこの長い mRNA に相当する長さのバンドのみが検出された。

次に、私は *crp* 転写終結シグナルの U クラスタから約 36 塩基下流に位置する pHA7M0 の *EcoRV* 領域に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入したプラスミド pM0-RV を構築した。

pM0-RV をもつ菌体から抽出した mRNA をノザンブロットイングによって解析した。その結果、*EcoRV* 領域に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入した場合、700 塩基の *crp* mRNA は全く観察されなかった。代わりに *crp* 転写終結シグナルを乗り越えて転写を継続したものに相当する長い mRNA (約 780 塩基数) が観察された。(Figure 3-7 panel C) 観察されたバンドの強度は野生型 *crp* 転写終結シグナルをもつ pHA7M0 由来の主要な *crp* mRNA と同程度であった。この長

いRNAのS1マッピングを行なった結果、3'末端は *rrnB* 転写終結シグナルに位置していることが示された。(Figure 3-8 panel B) *crp* 転写終結シグナルを変異転写終結シグナル M8 に置換してもノザンプロッティングで検出される *crp* mRNA のパターンに変化は見られなかった。

以上の結果は下流 36 塩基の位置に第二の ρ 因子非依存性転写終結シグナルがある場合、上流の ρ 因子非依存性転写終結シグナルを越えて RNA polymerase が転写を継続していることを、転写終結は転写終結シグナルの位置よりも下流の *EcoRV* 部位から *EcoRI* 部位の間で起きていることを表している。また、野生型 *crp* mRNA は転写終結シグナルを3'領域にもつことを併せて考えると、*crp* mRNA 3'末端は転写終結シグナルを越えて転写を続けた転写産物のプロセッシングによって形成されていると考えられる。

3.3.5 *crp* 転写終結シグナルを転写後も伸長を続けた転写は徐々に終結する。

crp 転写終結シグナルを越えて転写が進行していることが前節で示された。次に転写終結シグナルを越えた転写が終結する位置を明らかにする目的で pM0-RI の *crp* 転写終結シグナルから *rrnB* 転写終結シグナルまでの塩基数を段階的に変化させたプラスミドを構築し、転写産物をノザンハイブリダイゼーションによって解析した。シグナル間の塩基数の段階的な欠失はプラスミド pHA7M0 を制限酵素 *EcoRI* によって切断、ExonucleaseIII と S1nuclease によって処理した後、*rrnB* 転写終結シグナルの挿入によって行なった。構築したプラスミドの構成を Figure 3-9 panel A に示した。プラスミド名 pM0-RI Δ n の n は *EcoRI* 部位から減少させた塩基数を表している。構築したプラスミドを pp47(*crp*⁻) 株に導入し、抽出した mRNA をノザンプロッティングによって解析した結果を Figure 3-9 panel B に示した。なおプローブ DNA としてプラスミド pHA7 由来の *HindIII-EcoRV* DNA 断片を [α -³²P] dCTP によってランダム標識したものをを用いた。

Figure 3-9 panel B から二つの転写終結シグナルの間の塩基数が減少するに従って *rrnB* 転写終結シグナルを3'領域にもつ長い mRNA が増加していることがわかる。lane 10 の pM0-RI Δ 209 由来のバンドと lane 11 の pM0-RV 由来のバンドでは両方とも完全に *rrnB* 転写終結シグナルを3'領域にもつ mRNA だけが観察された。このオートラジオグラムをスキャナーで TIFF 画像ファイルとして取り込み NIH Image のゲルプロッティングマクロを用いて定量化した結果

を Figure 3-10 panel A に示した。また、横軸に二つの転写終結シグナルの間の塩基数、縦軸に各レーンのバンド全体に対する *rrnB* 転写終結シグナルを mRNA 3' 領域にもつバンドの比をプロットしたグラフを示した。(Figure 3-10 panel B) その結果、二つの転写終結シグナル間の塩基数の減少に比例して *rrnB* 転写終結シグナルを 3' 領域にもつ mRNA が増加していることがわかった。つまり、*crp* 転写終結シグナル下流 250 塩基の間に 90% の転写が終結していること、シグナル下流に特定の転写終結の高い領域を持たないことがわかった。

以上の結果から、私は遺伝子末端領域では転写終結シグナルを転写後も転写は伸長を続けるが、伸長が進むにしたがって徐々に転写を終結すると結論した。

3.3.6 上流 *crp* 構造遺伝子の翻訳が *crp* 転写終結シグナル位置での転写の終結に影響する。

原核生物である大腸菌は核膜がないために、転写と翻訳は同時に進行している。遺伝子末端領域に位置することが、どのように *crp* 転写終結シグナルに影響するのかを明らかにするために、私は転写終結シグナル上流領域の *crp* 遺伝子の翻訳に注目して次のような解析を行なった。

上流構造遺伝子領域に PCR mutagenesis 法によってオーカー変異を導入し、構造遺伝子の終止コドン-転写終結シグナル間を 129 塩基にした遺伝子をもつプラスミド pHA7M0-170 を構築した。このオーカー変異を導入した *crp* 遺伝子下流の *EcoRI*, *EcoRV* 制限酵素部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入したプラスミドを構築した。(Figure 3-11 panel A) このプラスミドを pp47(*crp*⁻) 株に導入し、抽出した mRNA をノザンプロッティングによって解析した結果を Figure 3-11 panel B に示した。pHA7M0 と pHA7M0-170 の mRNA の長さは同一である。(data not shown) すなわち、pHA7M0-170 の mRNA 3' 領域も *crp* 転写終結シグナルの U クラスタにマッピングされると考えられる。オーカー変異を導入した *crp* 遺伝子下流の *EcoRI* 制限酵素部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入した場合、検出された mRNA の長さは第二の転写終結シグナルを持たない pHA7M0-170 と同一であった。(Figure 3-11 panel B pM0-170RI) これは野生型 *crp* 遺伝子下流の *EcoRI* 制限酵素部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入した場合と同一の結果である。(Figure 3-7 panel B pM0-RI) 一方、上流構造遺伝子にオーカー変異を導入した結果、野生型 *crp* 遺伝子下流の *EcoRV* 制限酵素部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入した場合に見られたような

mRNA 3' 末端の *rrnB* 転写終結シグナルへのシフトは観察されなくなった。(Figure 3-11 panel B pM0-170RV)

以上の結果は転写終結シグナル上流の *crp* 遺伝子の終止コドンと転写終結シグナルの間の塩基数が 129 塩基の場合、 ρ 因子非依存性転写終結シグナルを越えて転写が継続していないことを表している。

転写終結機構に対する翻訳の影響を直接阻害するために、プラスミド pM0-RV を導入した菌体の培養液に翻訳を阻害する抗生物質クロラムフェニコールを添加してから時間経過とともに RNA を抽出した。抽出した RNA をノザンハイブリダイゼーションによって解析した結果を Figure 3-12 に示した。クロラムフェニコール添加後、2 分の段階で二つの長さ (780 塩基の mRNA と 700 残基の mRNA) の *crp* mRNA が観察された。時間経過に伴い、短い 700 塩基の mRNA の量が増加し、10 分後には二つの長さの mRNA はほぼ 1:1 の量比になった。しかし、20 分経過後抽出した mRNA でもこの量比に変化はみられなかった。また、抗生物質の量を増やした場合、添加後のサンプリング時間経過をさらに 90 分まで延長させた場合のどちらの場合においてもこの量比は 1:1 以上になることはなかった。(data not shown)

さらに、転写終結機構に対する翻訳の影響を *in vitro* において再構成する目的で、プラスミド pM0-RV を鋳型 DNA に用い、*in vitro* 転写翻訳反応を行なった。Promega corporation の *E. coli* S30 Extract system for Circular DNA kit を用いて、*in vitro* 転写翻訳反応を行なった。反応後 RNA を抽出し、ノザンハイブリダイゼーションによって解析した。(Figure 3-13 panel B) S30 Extract を用いた転写翻訳反応においてもプラスミド pM0-RV 由来の 780 残基数の *crp* mRNA が観察された。また、*crp* 遺伝子にオーカー変異を導入した場合、短い 700 塩基数の mRNA のみ観察された。

以上の結果から *crp* 転写終結シグナルの上流 12 塩基の位置まで *crp* 構造遺伝子が翻訳されている時、転写は *crp* 転写終結シグナルを越えて伸長するが、終結シグナルと上流遺伝子の終止コドンの間の残基数が大きくなると転写は *crp* 転写終結シグナルを越えて伸長しないことがわかった。これは、上流構造遺伝子の翻訳が *crp* 転写終結シグナルによる転写終結に影響していることを示している。以上の結果から、私は転写終結シグナルの上流側近傍で構造遺伝子が翻訳されている時、*crp* 転写終結シグナルを転写後も転写は続行されると結論した。

3.3.7 上流構造遺伝子の翻訳は *crp* 転写終結シグナル以外の転写終結シグナルにも影響する。

上流構造遺伝子が翻訳される時の転写終結に対する影響が、他の遺伝子由来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルでも起きるのかどうかを明らかにする目的で私は *crp* 転写終結シグナルを他の転写終結シグナルを置換し、その下流の *EcoRV* 制限酵素部位に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入したプラスミドを構築した。(Figure 3-14 panel A) 転写終結についての解析の進んだ三つの ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*trpA*, T7Te, *rrnBT1*) を置換する転写終結シグナルとして用いた。上流 *crp* 遺伝子の終止コドンからこれらの転写終結シグナルまでの塩基数は *crp* 転写終結シグナルの場合と同様に 12 塩基になるように配置した。作製したプラスミド由来の *crp* mRNA をノザンハイブリダイゼーションによって解析した。結果を Figure 3-14 panel B に示した。

rrnB 転写終結シグナルと T7Te 転写終結シグナルに置換した場合、pM0-RV の場合と同様にほとんどの mRNA の長さは *crp* 転写終結シグナルを mRNA 3' 領域にもつ場合 (約 700 塩基) よりも長い 780 から 800 塩基であった。また、*trp A* 転写終結シグナルに置換した場合、700 塩基と 780 塩基の二つの長さのバンドが等量観察された。以上の結果から、一般的にシグナル上流側近傍の翻訳によって ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる遺伝子末端領域の転写終結は影響を受け、シグナル転写後も転写を続行していることが強く示唆された。

3.4 考察

大腸菌 mRNA 3' 領域に特異的な配列として同定された ρ 因子非依存性転写終結シグナルは転写減衰を通じたシグナル下流遺伝子の転写制御、mRNA 3' 末端形成による、転写単位の決定、上流 mRNA 安定化などの機構を通して遺伝子発現に重要な働きを担っている。転写終結シグナルの解析の中心となったのは *trpA*, *thr* アテニュエーター, *rrnBT1* などを代表とする構造遺伝子上流に存在する転写終結シグナルであった。また、転写終結の機構の解析は *in vivo* においても *in vitro* においてもシグナル領域を切り出した解析を中心にすすめられてきた。そのため、実際の生きた細胞内における遺伝子末端領域の転写終結がどのように行なわれているのか明らかでなかった。

本章では生きた大腸菌内における遺伝子末端領域の転写終結を明らかにすることを目標にして、大腸菌の cAMP 受容タンパク質 (CRP) をコードしている *crp* 遺伝子下流の ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*crp t*) をモデル材料にして解析を行なった。特に、転写と翻訳がカップルしている実際の細胞内における遺伝子末端領域での転写終結がどのようにおこなわれているのかを明らかにするために、mRNA 3' 末端が形成される機構を正確な決定を行なった。本章の解析結果をまとめると以下の五つになる。

1. 上流 *crp* 構造遺伝子が存在する時、*crp* 転写終結シグナルを転写後も転写は続行される。
2. *crp* mRNA の 3' 末端はプロセッシングによって形成される。
3. *crp* 転写終結シグナルを転写後も転写は伸長続けるが徐々に転写を終結する。
4. 上流構造遺伝子の翻訳が *crp* 転写終結シグナル位置での転写終結効率を低下させる。
5. 上流構造遺伝子の翻訳は *crp* 転写終結シグナル以外の転写終結シグナルにも影響する。

3.4.1 生きた大腸菌内における遺伝子末端領域の転写終結と mRNA 3' 末端形成

一般に、RNA 分子の合成は前駆体として長い転写産物が合成され、その後様々なプロセッシングを受けて機能する成熟型の RNA 分子になるという合成過程を経ることが多い。rRNA、tRNA、ssRNA (small stable RNA) などの RNA 分子は、このようなプロセッシングによって機能する RNA

分子になることが報告されている [72, 73, 6]。また、mRNA も同様のプロセッシングを受けて成熟型の mRNA になる例が報告されている [43]。真核生物の mRNA 3' 末端形成は構造遺伝子末端よりも下流の非翻訳領域 (3'UTR) と呼ばれる領域に poly(A) 付加シグナルを越えて伸長した転写産物がこのシグナルの下流で切断され、poly(A) の付加によって完成する。この poly(A) 付加は mRNA の安定性を規定しており、また、上流域の翻訳効率にも影響している。

大腸菌における mRNA 3' 領域には特異的な配列として GC に富んだステムループ構造形成可能な逆方向反復配列とそれに続く 8 塩基程度の連続した U 塩基が認められていた。しかし、その mRNA 3' 末端形成機構を詳細に解析した例は少なかった。上記の配列は、少なくとも *in vitro* で他の因子を必要とせずに RNA polymerase による転写を終結させる働きがあることが報告されていたため、大腸菌 mRNA 3' 末端はこの配列の位置で転写産物の解離が起こるために形成されていると広く信じられていた [74]。

crp mRNA の 3' 末端は *crp* 転写終結シグナルの U クラスタにマッピングされた。(Figure 3-5) また、*crp* 転写終結シグナル下流 36 塩基の位置に *rrnB* 転写終結シグナルを挿入すると mRNA 3' 末端は下流の *rrnB* 転写終結シグナルの U クラスタにマッピングされた。(Figure 3-6, 3-7, 3-8) この結果は遺伝子末端領域で転写は転写終結シグナルを越えて伸長していることを表している。

ρ 因子非依存性転写終結シグナルを mRNA 3' 領域にもち、mRNA 3' 末端形成が ρ 因子非依存性転写終結機構とカップリングしていない例が大腸菌 *trp* オペロンの構造遺伝子の下流にある ρ 因子非依存性転写終結シグナル *trp t* の解析から報告されている。*trp* オペロンの下流には転写終結効率の低い ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*trp t*) と終結効率の高い ρ 因子依存性転写終結シグナル (*trp t'*) がならんでおり、転写は *trp t* で終結せずに伸長し、*trp t'* で ρ 因子依存的に終結する。終結した転写産物は 3'-5' エキソヌクレアーゼである RNaseII によるプロセッシングを受ける。その結果、mRNA 3' 末端は *trp t* の U クラスタにマッピングされる [43]。*crp* mRNA 3' 末端形成と *trp* mRNA 3' 末端形成の大きな違いは *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルは単独でも高い転写終結効率をもつことである [46]。また、*trp t'* のような特定の解離領域をもたず、伸長を続けた転写は *crp* 転写終結シグナル下流 250 塩基以内において特定の領域ではなく徐々に転写を終結している点も異なっている。

3.4.2 ρ 因子非依存性転写終結機構に対する上流の構造遺伝子の翻訳の影響

シグナル上流の構造遺伝子を含む場合、転写は転写終結シグナルを転写後も伸長を続けた。一方、オーカー変異の導入によって上流域の *crp* 構造遺伝子の終止コドンと転写終結シグナルの間の塩基数を増やすことによって、この転写の伸長は阻害され、mRNA 3' 末端の下流へのシフトは観察されなくなった。以上の結果は、転写終結シグナルを転写の近傍で行なわれている翻訳が遺伝子末端領域の転写終結に影響することを表している。この影響の原因として、翻訳中のリボソームによって *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造形成の阻害が起きているために転写終結機能が低下することが考えられる。

ρ 因子依存性転写終結の場合、転写終結シグナルの下流まで翻訳が行なわれていると転写終結が妨げられることが以前から報告されていた。これは ρ 因子依存性転写終結が起きるためには翻訳されていない領域にシグナルがあることが必要であることを意味している。その機構は、翻訳中のリボソームによって RNA シグナルが隠されてしまうため ρ 因子がシグナルを認識できないためであると考えられている。

ρ 因子非依存性転写終結シグナルの GC ステムループ領域を転写すると転写複合体は転写伸長速度の低下が起こる。この伸長速度の低下は転写終結に必須の過程であると考えられている。*crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルは *crp* 構造遺伝子の終止コドンから 12 塩基下流に位置している。Steitz らの報告によれば大腸菌の 70S リボソームサブユニットは SD 配列を認識して翻訳開始領域に結合した状態では開始コドンから下流 15 塩基までをマスクしている [75]。また、翻訳中のリボソームはコドンから下流 8-10 塩基程度をマスクしていると Platt らによって報告されている [76]。*trp* オペロンのアテニューエーター部位上流で転写伸長が休止している転写複合体にリーダー領域を翻訳しているリボソームが追い付くと転写の再開が行なわれることが報告されている [77]。また、大腸菌 *pyrB1* オペロンのように構造遺伝子内部に転写終結シグナルが存在する場合、その構造遺伝子の翻訳速度が転写終結に影響することが示されている [6]。しかし、前章の解析によって、私は *crp* mRNA は *crp* 転写終結シグナルのステム構造によって mRNA が安定化されていることを示した [46, 78]。もしもこのような二次構造形成の阻害が起きているのならば mRNA の安定化が起きないと考えられる。また、この mRNA 安定化は *crp* 遺伝子へのオーカー変異の導入に影響されなかった。(data not shown) 以上のことから翻訳中

のリボソームによって *crp* 転写終結シグナルの GC ステムループ構造形成の阻害が起きているとは考えにくい。

一方、私は伸長を続けた転写は *crp* 転写終結シグナル下流 250 塩基以内において特定の領域ではなく徐々に転写終結していることを示した。(Figure 3-9) このシグナル下流域での転写終結も上流構造遺伝子へのオーカー変異の導入や、クロラムフェニコールによる翻訳阻害によって観察されなくなった。(Figure 3-11,3-12,3-13) これらの結果を併せて考えると、mRNA 上のリボソームあるいはリボソームに付随する因子が転写終結シグナルを転写している RNAPolymerase と相互作用しているのかもしれない。相互作用の結果、転写の終結が転写終結シグナルよりも下流にシフトしたのではないかと考えられる。

3.4.3 上流構造遺伝子の影響を受ける ρ 因子非依存性転写終結シグナル

私は三つの ρ 因子非依存性転写終結シグナル (*trpA*, T7Te, *rrnBT1*) も遺伝子末端領域にある時、上流 *crp* 構造遺伝子の影響を受けることを示した。(Figure 3-14 panel B) この影響は *trp A* 転写終結シグナルでは中間的で *rrnB* 転写終結シグナルと T7Te 転写終結シグナルに置換した場合、*crp* 転写終結シグナルと同様に強く影響された。

この結果は次の意味で興味深い。解析した 4 つの ρ 因子非依存性転写終結シグナルを比較すると、どれも 8 塩基対以上の長さのステム構造を形成するが、完全に連続した U 塩基をもつのは *trpA* 転写終結シグナルだけである。

上記のような影響の違いを従来の Two-Step モデルのような ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結機構の考え方では説明できない。Raynolds らは様々な ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結効率を *in vitro* における反応条件を変化させて計測し、RNA-DNA、DNA-DNA のような核酸同士の相互作用では説明できない濃度のイオンが転写終結効率に影響することを報告している [16]。彼らは Two-Step モデルのような核酸-核酸相互作用だけでなく、転写終結シグナルが RNAPolymerase に不可逆的な変化を引き起こさせ、転写終結に向かわせているというモデルを提出している。さらに、最近の研究によれば、RNA-DNA 塩基対や RNA と RNAPolymerase の間の相互作用の低下が転写終結に重要な役割を果たしており、この RNA-DNA 塩基対と RNA-RNAPolymerase の相互作用はお互いに影響しあっていると考えられてい

る [32]。つまり、上流構造遺伝子の影響を受けやすいシグナルとは不完全な U クラスターをもつ転写終結シグナルであり、影響を受けやすいのは転写終結にステムループ構造の寄与の大きい転写終結シグナルなのではないだろうか？転写終結に対する GC ステムループ構造による寄与分が上流構造遺伝子によって抑制されるために、転写終結シグナル転写後も転写が続行してしまうのかもしれない。最近の SlidingClamp 転写伸長モデルと併せて考えると、転写伸長中の RNAPolymerase の TBS から RNA が解離する機構を上流構造遺伝子の翻訳が阻害しているのかもしれない。もし上記の可能性が正しいならば、上流構造遺伝子が存在する時、U クラスターによる寄与分の転写終結しか見られないと考えられる。Figure 3-4 の結果は U クラスターを欠失させると転写終結効率は 7% と大きく低下しており、この考えを支持しているように見える。

3.4.4 大腸菌オペロン構造と ρ 因子非依存性転写終結シグナル

私は Carafa らによる 148 の ρ 因子非依存性転写終結シグナルのコレクション [20] から構造遺伝子下流領域にある 101 のシグナルと上流構造遺伝子との塩基数を見積もった。(Figure 3-2) その結果、67% のシグナルが上流構造遺伝子の終止コドンの塩基から 30 塩基以内に転写終結シグナルが位置していた。すなわち、多くの遺伝子の末端 (30 塩基以内) にはステム構造を備えた ρ 因子非依存性転写終結シグナル様の構造形成可能な配列が保存されていた。このような位置関係にどのような意味があるのだろうか？

crp 遺伝子にオーカー変異を導入すると転写終結シグナルまで転写した mRNA の安定性に変化は見られなかったが、発現量の低下が観察された。(data not shown) 一般にオペロンを形成している遺伝子にナンセンス変異が起こると変異よりも下流の遺伝子の発現が低下する極性効果という現象が知られている。これは変異によって mRNA 上にリボソームに覆われない領域ができたためにそれまでシグナルとして認識されなかった ρ 因子依存性転写終結シグナルが ρ 因子によって認識されるようになったと考えられている。その結果、変異から下流遺伝子までの間に転写終結が起こるためではないかと考えられている。実際、このような極性効果は ρ^- 株によって抑制される [79]。転写中の極性効果が起きないように、また、mRNA の安定化を通して転写産物の発現を最大限に行なえるように、このような位置関係になっているのかもしれない。

第4章 終章

4.1 まとめと展望

発現制御の研究は転写開始制御を中心に進められてきたが、転写後の RNA 中のシグナルによる mRNA の安定性、翻訳効率の制御の重要性が認識されてきている。本研究で扱った ρ 因子非依存性転写終結シグナルは少なくとも転写終結と mRNA 安定化の二つの機能をもち、転写開始シグナルとともに転写単位を決定している。これらの機能を規定するエレメントを決定すること、転写単位を決定する遺伝子末端領域における転写終結機構と mRNA3' 末端の形成機構の関係を明らかにすることは現在まで未解明な問題であった。私は大腸菌 *crp* 遺伝子 3' 領域に位置する ρ 非依存性転写終結シグナル (*crp t*) を材料にして以下のことを明らかにした。

1. ρ 因子非依存性転写終結にはシグナルの GC ステムループ構造と U クラスタの両方が必要である。
2. mRNA 安定化機能には GC ステムループ構造だけが寄与している。
3. *rrnBT1*, *trpA*, T7Te などの ρ 非依存性転写終結シグナルも mRNA 安定化機能をもっている [78]。
4. 遺伝子末端領域での転写は転写終結シグナルの位置で終結せず、シグナルを越えて伸長したあとに終結する。
5. プロセシングによって mRNA3' 末端は形成される。
6. 上流 *crp* の翻訳位置に依存して ρ 因子非依存性転写終結機能の変化が引き起こされている [80]。

以上のように本研究を通して、今まで未解明だった遺伝子末端領域における転写終結の実像に迫ることができた。しかし、なお遺伝子末端領域における転写終結の詳細な分子機構は不明であるし、その役割を理解するための情報も不足している。例えば、本研究によって次のような問題も提起される。

1. 他の遺伝子末端領域においても転写終結シグナルを転写後も転写が続行され、プロセシングによって mRNA3' 末端形成がおこなわれているのだろうか？
2. 上流構造遺伝子の翻訳の中のどのような因子が転写終結に影響するのだろうか？
3. 上流構造遺伝子の翻訳の影響を受ける転写終結シグナルに共通の特徴があるのだろうか？

4. 転写終結は下流の構造遺伝子の翻訳の影響をうけるのだろうか？

現在、本研究室でこれらの解析が進められている。これらの研究を通して遺伝子発現末端領域における転写終結の全体像の解明につながることを期待される。そして、転写開始制御を中心に進められてきた遺伝子発現制御の流れの中で、さらに、転写終結の全体像が解明されることは遺伝子単位で発現制御を理解するための枠組が整うことを意味しており、さらに深い理解へとつながることが期待される。

参考文献リスト

- [1] S.Schlesinger and B.Magasanik. *J.Mol.Biol.*, 9:670-682, 1964.
- [2] F.Imamoto. *Nature*, 220:31-34, 1968.
- [3] K.Bertrand, C.Squires, and C.Yanofsky. *J.Mol.Biol.*, 102:319-337, 1976.
- [4] E.N.Jacson and C.Yanofsky. *J.Mol.Biol.*, 76:89-101, 1973.
- [5] T.Kasai. *Nature*, 249:523-527, 1974.
- [6] R.Landick, C.L.Turnbough, and C.Yanofsky. Transcription and attenuation. *Escherichia coli and Slamonella typhimurium:Cellular and Molecular Biology*, 1:1263-1286, 1996.
- [7] P.Lebowitz, S.Weissman, and C.Radding. *J.Biol.Chem.*, 246:5120-, 1971.
- [8] F.Blattner and J.Dahlberg. *Nature New Biol.*, 237:227-, 1972.
- [9] R.Millette, C.Trotter, P.Herrlich, and M.Schweiger. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 35:135-, 1970.
- [10] M.Rosenberg, D.Court, H.Shimatake, C.Brady, and D.L.Wulff. *Nature*, 272:414-423, 1978.
- [11] C.Parsot, I.Saint-Girons, and P.Cossart. *Mol.Gen.Genet.*, 188:455-458, 1982.
- [12] G.V.Stauffer, G. Zurawski, and C.Yanofsky. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 75:4833-4837, 1978.
- [13] J.W.Roberts. *Nature*, 224:1168-1174, 1969.
- [14] T.D.Yager and P.H.von Hippel. Transcript elongation and termination in escherichia coli. *Escherichia coli and Slamonella typhimurium:Cellular and Molecular Biology*, 2:1241, 1987.

- [15] M.Rosenberg and D.Court. *Annu.Rev.Gen.*, 13:319-353, 1979.
- [16] R.Reynolds, R.M.Bermudez-Cruz, and M.J.Chamberlin. *J.Mol.Biol*, 224:31-51, 1992.
- [17] R.Reynolds and M.J.Chamberlin. *J.Mol.Biol*, 224:53-63, 1992.
- [18] K.J.Breslauer, R.Frank, H.Blocker, and L.A.Marky. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 83:3746-3750, 1986.
- [19] T.Platt and D.G.Baer. *Role of RNA polymerase, factor, and ribosomes in transcription termination*, 1:123-161, 1983.
- [20] Y.Carafa, E.Brody, and C.Thermes. *J.Mol.Biol.*, 216:835-858, 1990.
- [21] A.Jacquier and F.Michel. *Cell*, 50:17-29, 1987.
- [22] S-W.Cheng, E.Lynch, K.Leason, D.Court, B.Shapiro, and D.Friedman. *Science*, 254:1205-1207, 1991.
- [23] T.Ryan and M.J.Chamberlin. *J.Biol.Chem.*, 258:4690-4693, 1983.
- [24] H.M.Johnston and J.R.Roth. *J.Mol.Biol.*, 145:713-734, 1981.
- [25] H.M.Johnston and J.R.Roth. *J.Mol.Biol.*, 145:735-756, 1981.
- [26] S.P.Lynn, C.E.Bauer, K.Chapman, and J.F.Gardner. *J.Mol.Biol.*, 183:529-541, 1985.
- [27] C.Yanofsky. *Nature*, 289:751-758, 1981.
- [28] F.Lee and C.Yanofsky. *Proc.Natl.Acad.Sci*, 74:4365-4369, 1977.
- [29] N.Neff and M.J.Chamberlin. *J.Biol.Chem.*, 253:2455-2460, 1978.
- [30] P.J.Farnham and T.Platt. *Cell*, 20:739-748, 1980.
- [31] E.Nudler, A.Mustaev, E.Lukhtanov, and A.Goldfarb. *Cell*, 89:33-41, 1997.
- [32] R.Landick. *Cell*, 88:741-744, 1997.

- [33] C.K.Surratt, S.C.Milan, and M.J.Chamberlin. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 88:7983–, 1991.
- [34] E.Nudler, A.Goldfarb, and M.Kashlev. *Science*, 265:793–796, 1994.
- [35] S.Borukhov, V.Sagitov, and A.Goldfarb. *Cell*, 72:459–466, 1993.
- [36] V.Markovtsov, A.Mustaev, and A.Goldfarb. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 93:3221–3226, 1996.
- [37] D.Wang, T.Meier, C.Chan, G.Feng, D.Lee, and R.Landick. *Cell*, 81:341–350, 1995.
- [38] C-Y.A.Cheng, J.T.Beatty, S.N.Cohen, and J.G.Berasco. *Cell*, 52:609–619, 1988.
- [39] M.D.Plamann and G.V.Stauffer. *Mol.Gen.Genet.*, 220:301–306, 1990.
- [40] C.P.Ehretsmann, A.J.Carpousis, and H.M.Krisch. *Genes.Dev.*, 6:149–159, 1992.
- [41] L.Krinke and D.L.Wulff. *Nucl.Acad.Res.*, 18:4809–4815, 1990.
- [42] E.A.Mudd, P.Prentki, D.Belin, and H.M.Krisch. *EMBO.J*, 7:3601–3607, 1988.
- [43] J.E.Mott, J.L.Galloway, and T.Platt. *EMBO Journal*, 4(7):1887–1891, 1985.
- [44] M.Hayashi and M.Hayashi. *Nucl.Acids.Res.*, 13:5937–5948, 1985.
- [45] H.Wong and M.Hayashi. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83:3233–3237, 1986.
- [46] H.Aiba, A Hanamura, and H.Yamano. *J.Biol.Chem*, 266:1721–1727, 1991.
- [47] B.de Crombrughe, S.Busby, and H.Buc. *Science*, 224:831–838, 1984.
- [48] A.Ullmann and A.Danchin. *Adv.Cyclic Nucleotides Res.*, 15:1–53, 1983.
- [49] S.E.George and T.Melton. *J.Bacteriol.*, 166:533–540, 1986.
- [50] J.W.Barton and T.Melton. *J.Bacteriol.*, 169:654–659, 1987.
- [51] B.Krummel and M.J.Chamberlin. *J.Mol.Biol*, 225:221–237, 1992.
- [52] B.Krummel and M.J.Chamberlin. *J.Mol.Biol*, 225:239–250, 1992.

- [53] A.Campbell. *Virology*, 14:22–32, 1961.
- [54] A.Roy, C.Haziza, and A.Danchin. *EMBO.J*, 2:791–797, 1983.
- [55] H.Aiba, S.Fujimoto, and N.Ozaki. *Nucl.Acids.Res.*, 10:1345–1361, 1982.
- [56] K.Mckenny, H.Schimatake, D.Court, U.Schmeissner, and M.Rosenberg. *Gene Amplification and Analysis*, 2:383–415, 1981.
- [57] S.Adhya and W.Miller. *Nature*, 279:492–494, 1979.
- [58] H.Aiba and J.S.Krakow. *Biochemistry*, 20:4774–4780, 1981.
- [59] K.Mori and H.Aiba. *J.Biol.Chem*, 260:14838–14843, 1985.
- [60] J.Sambrook, E.F.Fritsch, and T.Maniatis. *Molecular Cloning:a laboratory manual,second edition*.
- [61] G.Guarnerous, C.Montanez, T.Hernandez, and D.Court. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 79:238–242, 1982.
- [62] M.J.Chamberlin. *Annu.Rev.Biochem.*, 43:721–775, 1974.
- [63] R.R.Burgess. *Annu.Rev.Biochem.*, 40:711–740, 1971.
- [64] M.Yang, H.II Scott, and J.Gardner. *J.Biol.Chem.*, 270:23330–23336, 1995.
- [65] K.Wilson and P.von Hippel. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 92:8793–8797, 1995.
- [66] K.S.Wilson and P.H.von Hippel. *J.Mol.Biol*, 244:36–51, 1994.
- [67] M.Zuker and P.Stiegler. *Nucl.Acids.Res.*, 9:133–148, 1981.
- [68] T.Washio, J.Sasayama, and M.Tomita. *Nucl.Acids.Res.*, 26:5456–5463, 1998.
- [69] C.Higgins, H.Gauston, G.Dance, and E.Mudd. *Control of Messenger RNA Stability*, pages 13–, 1993.

- [70] B.Py, C.F.Higgins, H.M.Krisch, and A.J.Carpousis. *Nature*, 381:169–172, 1996.
- [71] A.M.Wu, G.E.Christie, and T.Platt. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78:2913–2917, 1981.
- [72] Z.Li, S.Pandit, and M.P.Deutscher. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95:2856–2861, 1998.
- [73] Z.Li and M.P.Deutscher. *Cell*, 86:503–512, 1996.
- [74] T.Platt and J.P.Richardson. *In Transcriptional regulation (ed. S.L.McKnight, K.R.Yamamoto) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*, 85:365–388, 1992.
- [75] J.A.Steitz. *Nature*, 224:957–964, 1969.
- [76] T.Platt, C.Squires, and C.Yanofsky. *J.Mol.Biol.*, 103:411–420, 1976.
- [77] A.Orosz, I.Boros, and P.Venetianer. *Eur.J.Biochem.*, 201:653–659, 1991.
- [78] H.Abe and H.Aiba. *Biochimie*, 78:1035–1042, 1996.
- [79] S.Adhya and M.Gottesman. *Ann.Rev.Biochem.*, 47:967–996, 1978.
- [80] H.Abe, T.Abo, and H.Aiba. *Genes to Cells in press*.
- [81] J.D.Watson, N.H.Hopkins, J.W.Roberts, J.A Steitz, and A.M.Weiner. *Molecular Biology of the GENE 4th Edition*.

4.2 副論文

Biochemie(1996)78 1035-1042

Differential contribution of two elements of rho-independent terminator to transcription termination and mRNA stabilization

H.Abe and H.Aiba

Genes to Cells(1999) in press

Regulation of intrinsic terminator by translocation in *Escherichia coli*: transcription termination at a distance downstream

H.Abe, T.Abo and H.Aiba

4.3 謝辞

- 饗場弘二教授

6年間+ α 、常に忍耐強く丁寧に指導して頂きありがとうございました。先生に教わったことを基礎にして今後も努力していきたいと思います。

- 稲田利文先生

実験結果の捉え方、研究の進め方、研究者としての姿勢、論文の書き方など大事なことをたくさん教えて頂きました。本当にありがとうございました。先生に少しでも近付けるようにこれからも努力したいと思います。

- 阿保達彦先生

最後の詰めの実験を手伝って頂きありがとうございました。先生のおかげで論文を完成させることができました。大変感謝します。また、先生の解析によって本研究の今後の展開が楽しみなものであることを実感できました。これについても大変感謝します。

- 柳沢達男様

深夜の生化学の講義は大変勉強になりました。また、私の研究の議論につき合って頂きありがとうございました。大変感謝します。理学部的思考に凝り固まっていた自分に病原性細菌や抗生物質の研究など、常に新鮮な感動を与えてもらいました。大変ためになりました。感謝します。

- 高橋英之様

研究に関する議論、研究室の掃除の監督、公私ともに私の面倒をみてくれてどうもありがとうございました。大変感謝しています。研究をする上で自分にどうしても足りない部分を教えてもらいました。これからはそれを補うべく、努力していきたいと思います。これからも、よろしく願います。

- 稲垣さえ様

修士二年生のときから3年間、二人三脚で一緒に頑張った思い出は忘れません。後輩として私のつたない指導についてきてくれて大変感謝しています。貴女のおかげで研究の議論

が楽しくできました。いただいたポチと言う名前とゴジラマウスパッドを大切に致します。本当にありがとうございました。

- 大井いずみ様

私の学生生活最後の一年間、二人目の後輩として私の指導についてきてくれて大変感謝しています。また、貴女の実験結果のおかげで本研究の今後の展開が楽しみなものであることを実感できました。今後の研究の発展とともに、貴女のこれからの活躍も期待しております。がんばってください。本当にありがとうございました。

- 第一講座の皆さん

宮崎正澄先生、小川和子先生、田上英明先生、石塚仁様、Ruhul Abid 様、村橋保昭様、植田康次様、野沢紀子様、関豊和様、原田浩様、木全恵子様、河崎宗万様、田中裕也様、白石寛樹様、稲田敦子様、6年間、快適な実験環境を提供して頂き、ありがとうございました。皆さんのおかげで研究を続けることができました。大変感謝します。

- 今田宏司様

本論文の文書作成は自作 AT 互換機 OS FreeBSD2.2.7R 上で Mule2.3 と L^AT_EX 2_ε によって行ないました。FreeUNIX による文書作成環境の構築及び数学的視点から見た分子生物学を教えてくれた名古屋大学大学院人間情報学研究科 物質 生命情報学専攻情報基礎論の故 今田 宏司君に深く感謝します。

最後に、長い学生生活を支援してくれた私の両親に深く感謝します。

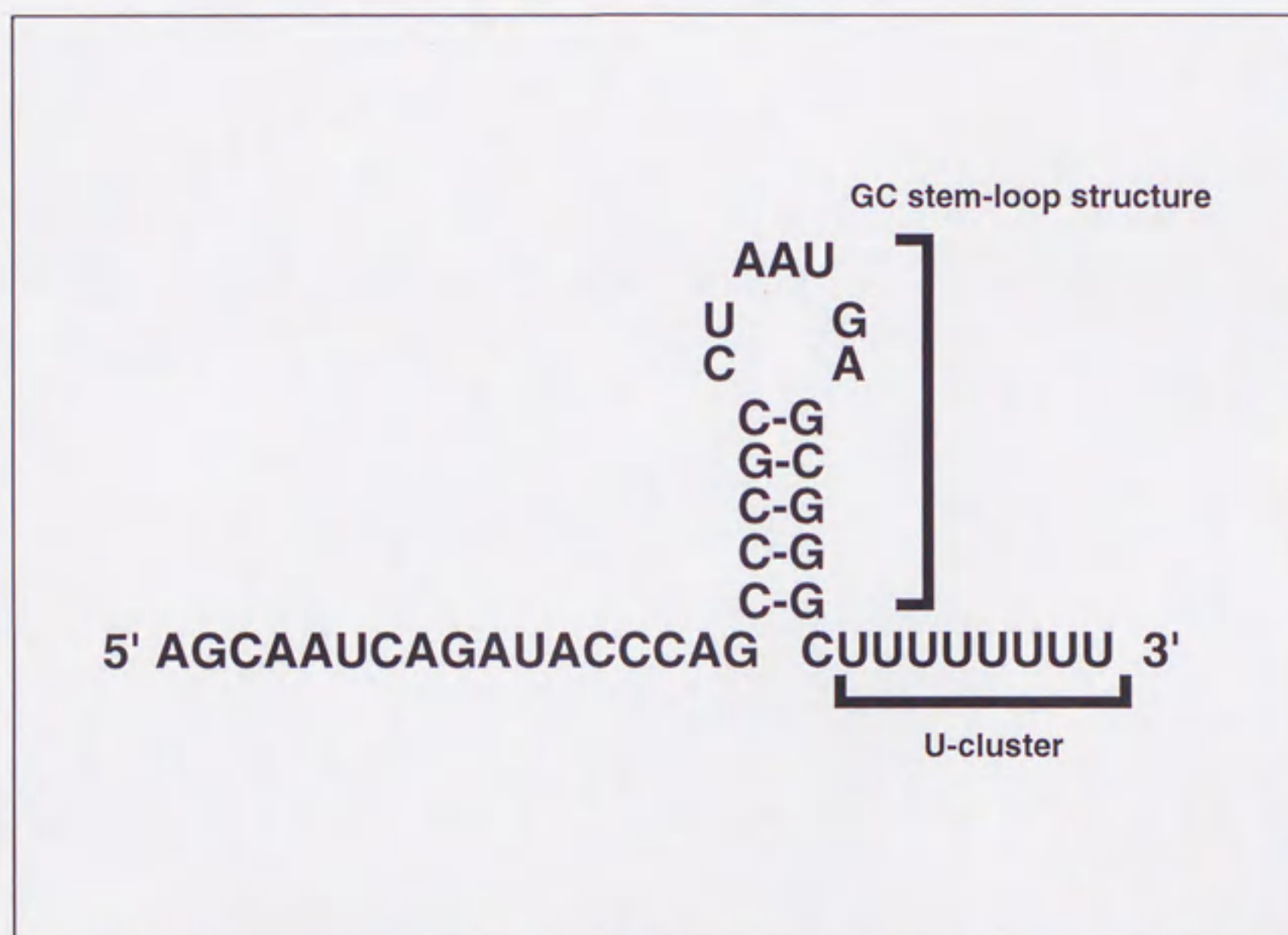


Figure 1-1 *trp* オペロンリーダー領域の *trpA* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの配列と構造

参考文献16から引用した図を改変して示した。大腸菌 *trp* オペロンのリーダー領域中の転写減衰部位に位置する転写終結シグナル *trpA* (*trp* attenuator) は最も解析の進んでいる ρ 因子非依存性転写終結シグナルである。このシグナルはGCに富んだ6塩基対のステムループ構造とそれに続く8塩基のUクラスターから構成されている。

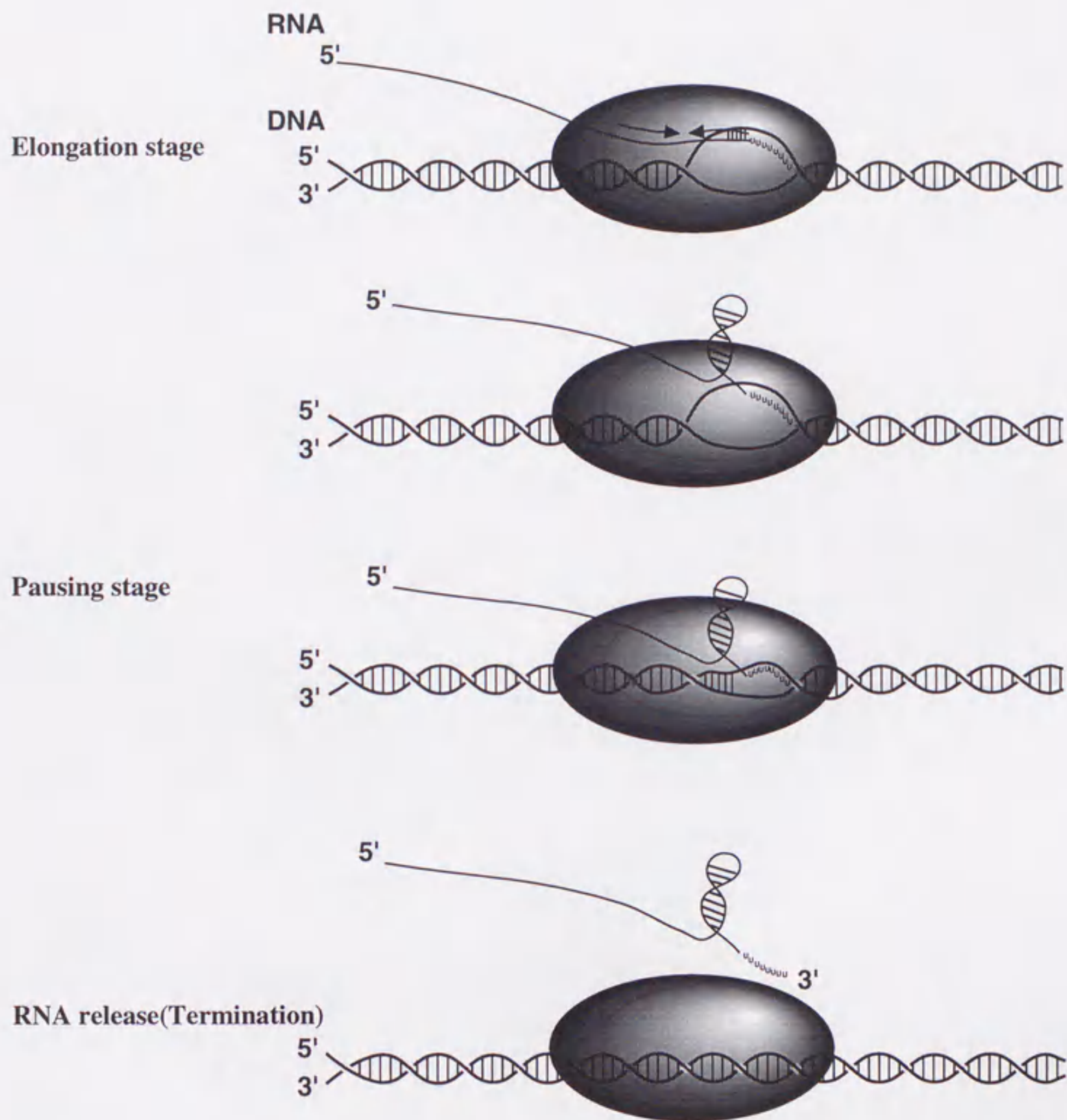


Figure1-2 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの転写終結機構モデル(TwoStep Model)

参考文献81から引用したした図を改変して示した。転写伸長から転写終結する転写複合体のモデルを表している。転写産物がステムループ構造を形成することによって転写複合体がelongation stageからpausing stageに移行する。それに伴い転写複合体中のDNA開鎖領域の縮小が起こり、RNA-DNA塩基対がdA-rUのみとなる。dA-rUの相互作用が弱いため転写複合体はRNA-DNA塩基対を維持することができなくなり、複合体からRNAの解離が起こる。詳細は本文を参照されたい。

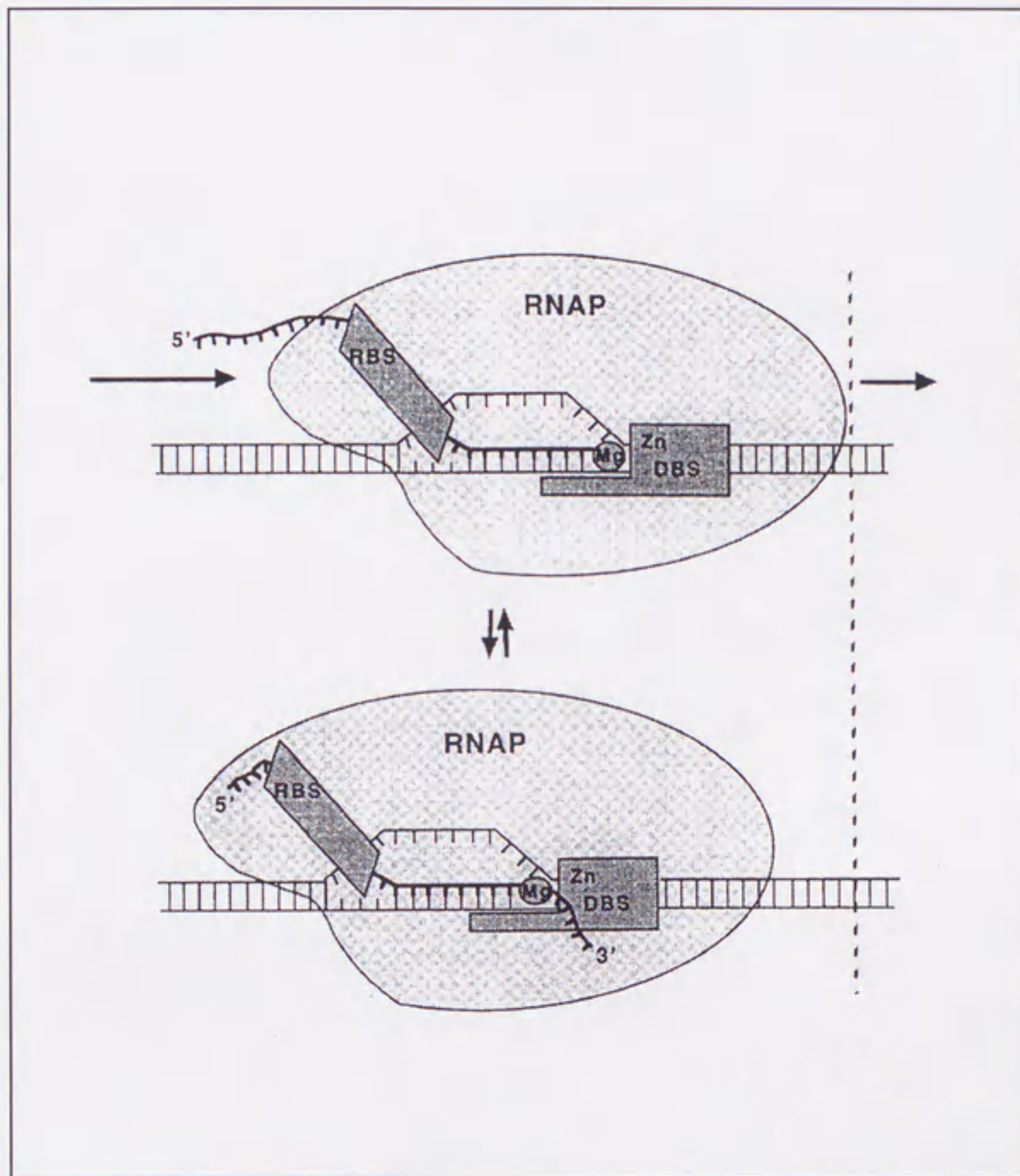


Figure 1-3 転写伸長複合体のSliping Clamp model

参考文献31の図より改変して示した。RBSはRNA結合部位(本文中ではTBS)、RNA-DNA塩基対領域は本文中でのLBSを表している。また、DBSは転写伸長に必要なRNAPolymeraseのDNA結合領域を表している。また、MgはNTPを付加する活性部位を表している。右向きの矢印は転写の伸長方向を示している。詳細は本文を参照されたい。

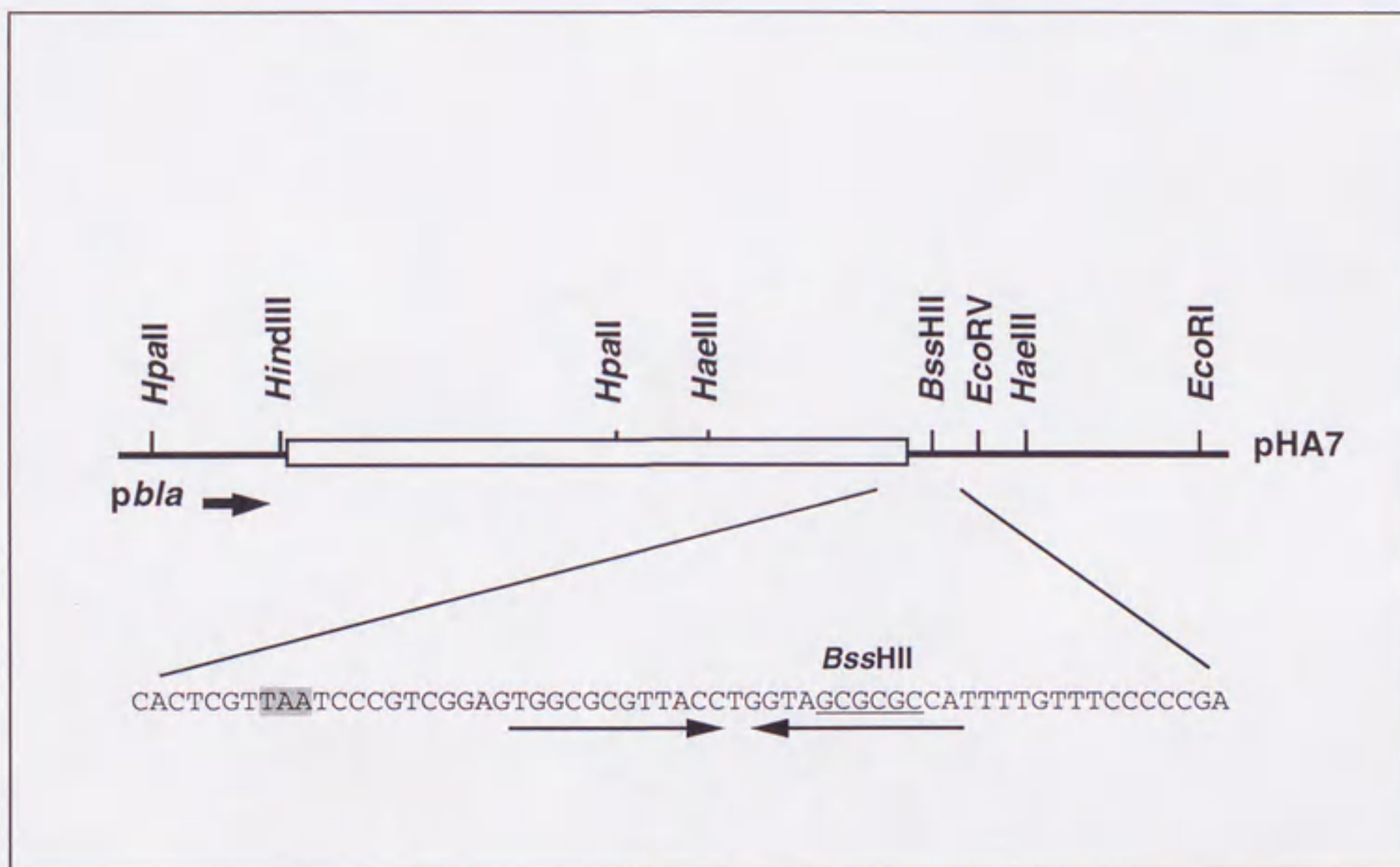


Figure 2-1 *crp*遺伝子領域の制限酵素地図と *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルの配列

pHA7はベクタープラスミドpBR322の *Hind*III部位に大腸菌由来の *crp*遺伝子と転写終結シグナルを含むDNA断片を挿入したプラスミドである。*Hind*III部位から *Eco*RI部位までが大腸菌ゲノム上の野生型 *crp*遺伝子由来の領域である。それ以外の領域はベクタープラスミドpBR322由来の領域である。*crp*遺伝子はプラスミド上の *bla*プロモーターによって発現する。*crp*構造遺伝子を白抜きの四角で示した。互いに向き合った矢印は *crp*転写終結シグナルのGCステムループ構造を形成する配列を示す。網かけの四角は *crp*構造遺伝子の終止コドンを示しており、*crp*転写終結シグナルのGCステムループ構造は終止コドンから11塩基下流から始まっている。

WT	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCATTTGTTTCCCCCGA
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"><i>Bss</i>HII</div> <div style="text-align: center;">←→</div> </div>
M0	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCATTTGTTT CCC GGGA
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"><i>Sp</i>I</div> <div style="text-align: center;">←→</div> <div style="text-align: center;"><i>Sma</i>I</div> </div>
M1	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCATTTGTT CCCC GGGA
M2	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCATTTGTT CCCC GGGA
M3	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCATTTG CCCC GGGA
M4	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCC GAGAG CCCCGGGA
M5	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCC AAAAAAAA CCCCGGGA
M6	CACTCGT TAA TCCCGT ACG -AGT TTATATGGA AATGGTAGCGCGCCATTTGTTT CCC GGGA
M7	CACTCGT TAA TCCCGT ACG GAGT TTATATTTAA TTTAG ATATAA ATTTGTTT CCC GGGA
M8	CACTCGT TAA TCCCGT ACG -AGT TTATATGGA AATGGTAGCGCGCC AAAAAAAA CCCCGGGA

Figure 2-2 変異 *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルのDNA配列

互いに向き合った矢印は *crp* 転写終結シグナルのGCステムループ構造を示し、網かけの四角は *crp* 構造遺伝子の終止コドンを示す。制限酵素部位は下線によって示す。M0は終止コドン下流5塩基の位置に制限酵素 *Sp*I 部位、Uクラスター下流3塩基の位置に *Sma*I 制限酵素部位を導入した。 *crp* 転写終結シグナルの変異箇所は太字で示す。変異の詳細は本文を参照されたい。

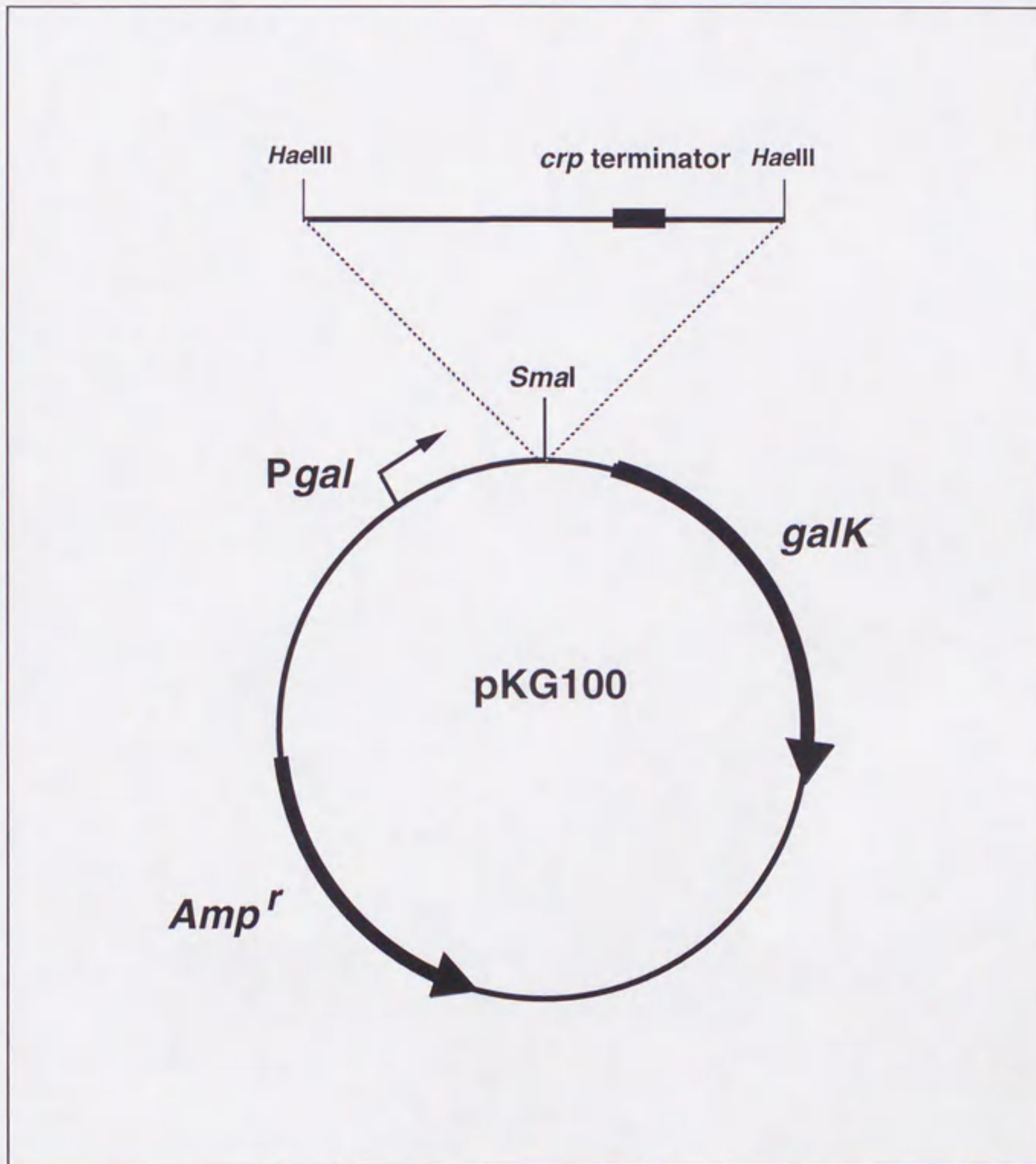


Figure 2-3 ρ 因子非依存性転写終結シグナルを含むDNA断片をpKG100にクローニング

クローニングベクターpKG100は大腸菌 *gal* オペロン由来の *gal* プロモーターと *galK* (ガラクトキナーゼ) 遺伝子をもつ。 *galK* 上流の *SmaI* 制限酵素部位に転写終結シグナルを含むDNA断片を挿入することで *gal* プロモーターからの転写が減衰される。 *galK* の酵素活性を測定することで転写終結シグナル及びその塩基置換変異体による転写の減衰程度を見積もることができる。

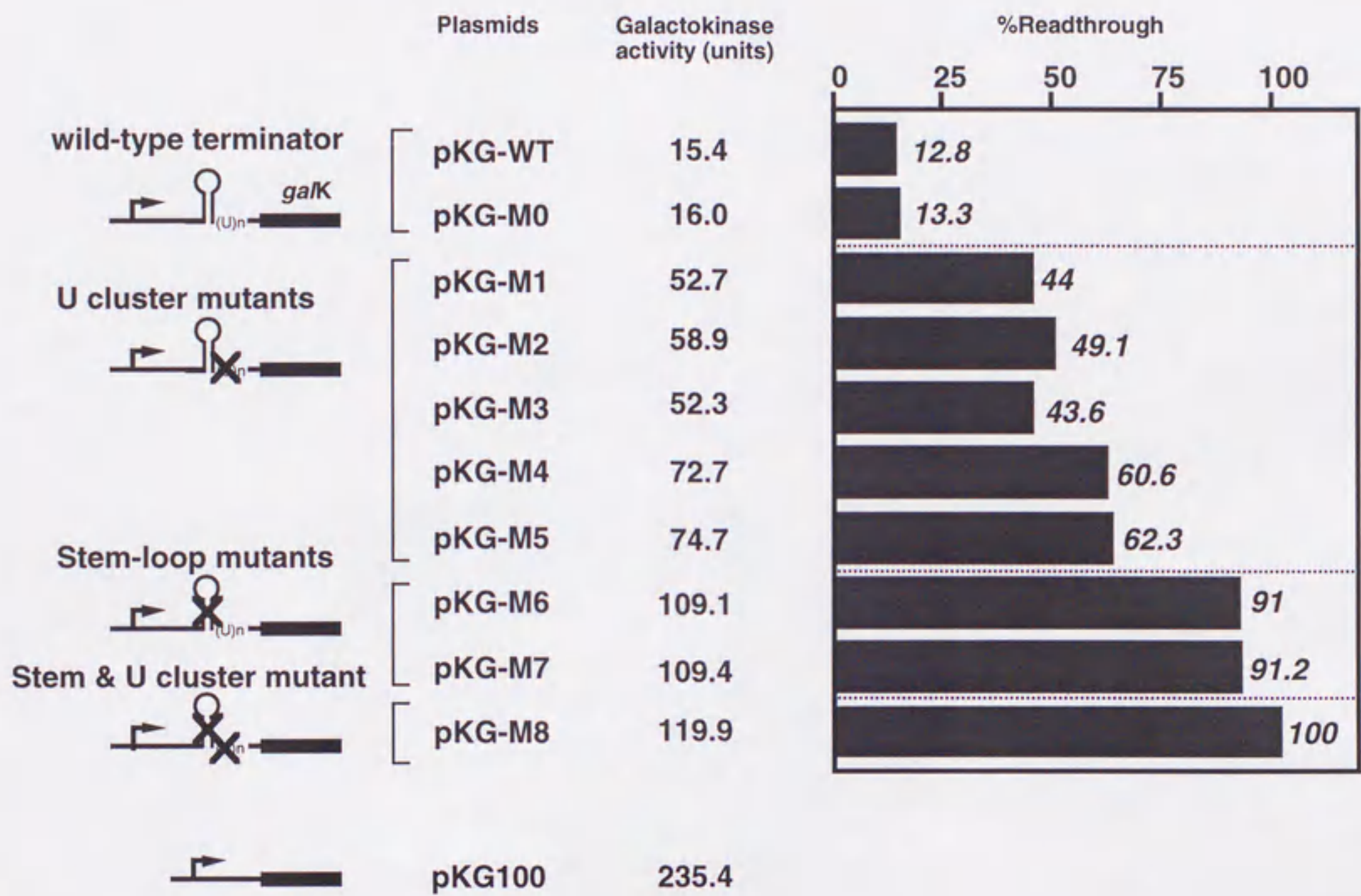


Figure 2-4 シグナル下流のレポーター遺伝子の発現に対する変異転写終結シグナルの影響

クローニングベクターpKG100に転写終結シグナルを含むDNA断片をクローニングしたプラスミドをR594株に導入し、プラスミド由来のガラクトキナーゼ活性をAdhyaとMillerのアッセイ法に従って測定した。各プラスミドの%Readthrough値はpKGM8由来のガラクトキナーゼ活性を転写終結効率0%(% Readthrough = 100%)としたときの相対値で表している。



Figure 2-5 上流 crp 遺伝子の発現に対する変異転写終結シグナルの影響

プラスミドpHA7 derivativesをTP2339株に導入した菌株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD_{600})が0.8になった時点のSDS試料を調製した。この試料を15% SDS PAGEによって泳動しCoomassie Brilliant Blue solutionにて染色した。矢印はCRPのバンドの位置を示す。

lane 1は0.5 μ gの精製したCRP、lane 2はベクタープラスミドpBR322をもつ菌株由来のSDS試料である。lane 3、4は野生型 crp 転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 5-7はUクラスターに変異をもつ転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 8,9はGCステムループ構造に変異をもつ転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 10は転写終結シグナルを完全に欠失させた場合である。



Figure 2-6 *crp* mRNAに対する変異転写終結シグナルの影響

panel AにS1 nuclease assay に使用したDNAプローブのデザインを示す。panel BにS1 nuclease assayの結果得られたオートラジオグラムを示す。プラスミドpHA7 derivativesをTP2339株に導入した菌株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD_{600})が0.8になった時点のRNA試料を調製した。30 μ gのRNA試料を用いてS1 nuclease assayを行なった。lane 1は未反応のDNAプローブ、lane 2,3は野生型*crp*転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 4-6はUクラスターに変異をもつ転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 7,8はGCステムループ構造に変異をもつ転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 9は転写終結シグナルを完全に欠失させた場合である。S1 nuclease assayの方法はMoriらの方法に従って行なった。

A.

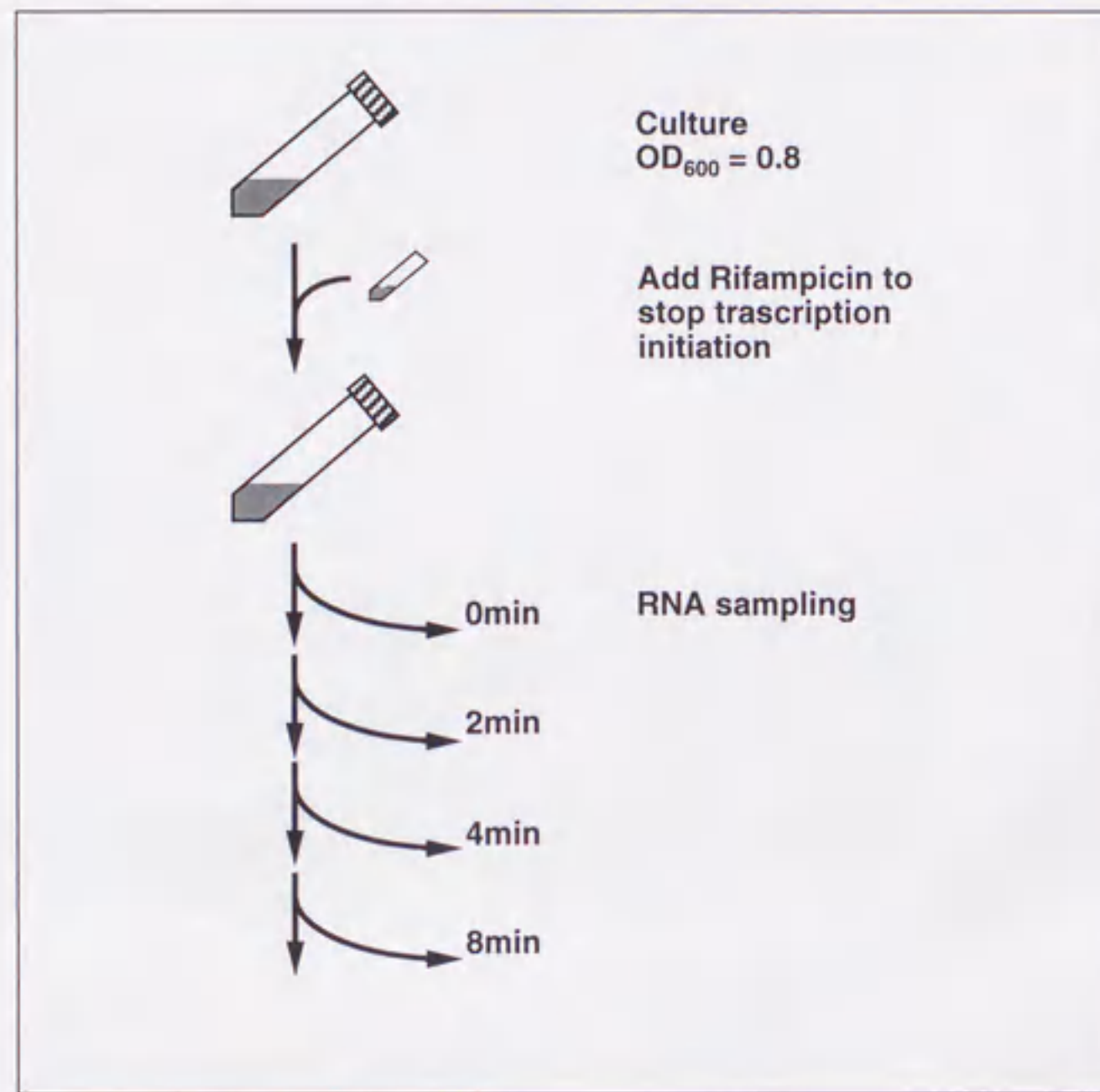
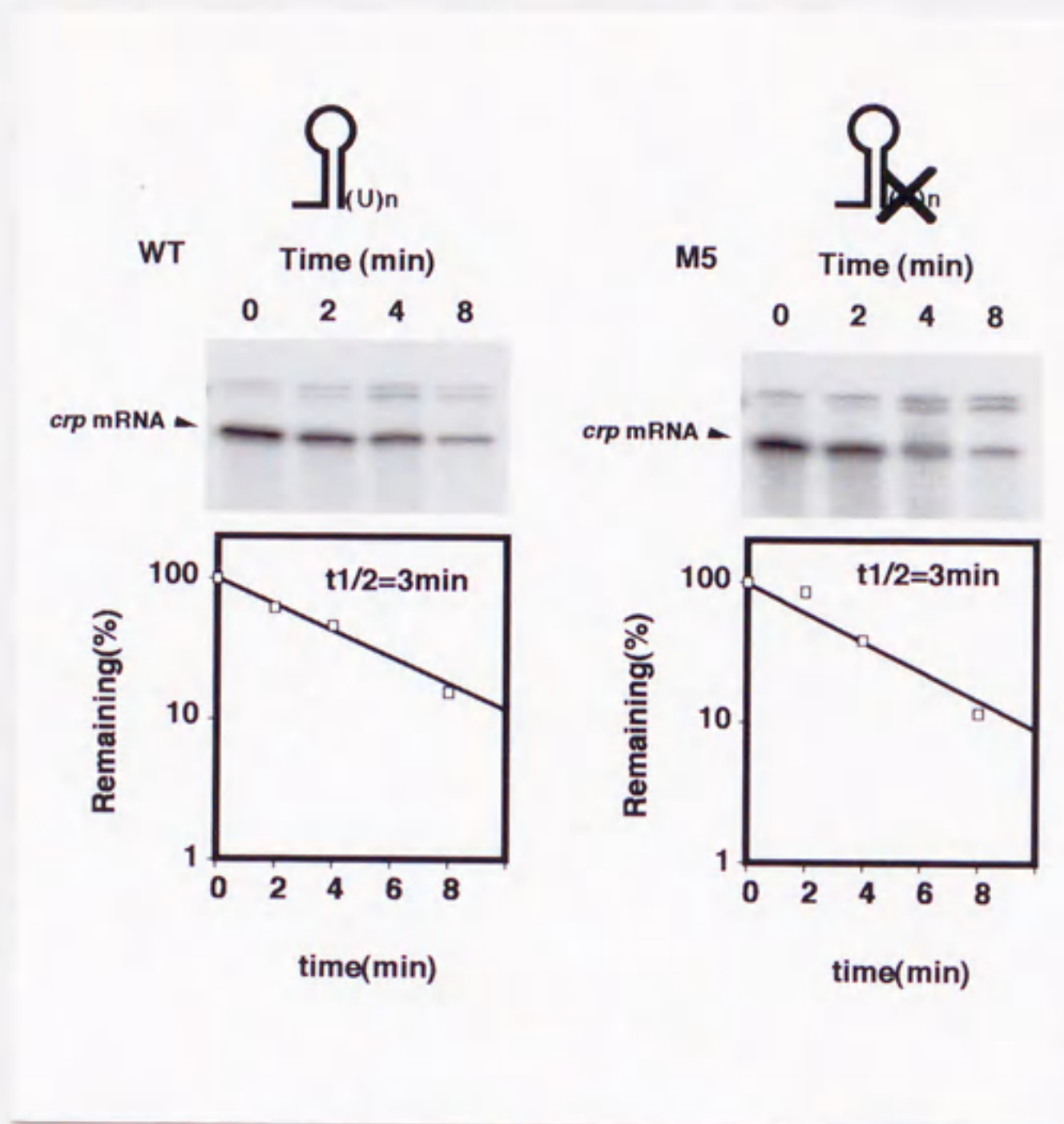


Figure 2-7 *crp* mRNAの安定性に対する変異転写終結シグナルの影響

mRNAの安定性を測定するためのRNAのサンプリングの方法をpanel Aに示す。抗生物質リファンピシンによって新規の転写を阻害すると抗生物質添加以前に合成された転写産物は時間経過とともに徐々に分解されていく。抗生物質添加後の菌体からRNAを抽出し残ったmRNA量を定量し時間経過と比較することでmRNAの安定性を見積もることができる。panel Bに野生型*crp*転写終結シグナルをもつ*crp* mRNAとUクラスター変異のM5変異転写終結シグナルをもつ*crp* mRNAのS1 nuclease assayの結果を示す。panel CにはGC ステムループ構造欠失変異シグナルM6、および転写終結シグナル欠失変異M8をもつ*crp* mRNAのS1 nuclease assayの結果を示す。panel B,Cの矢印は*crp*構造遺伝子を含む*HpaII*-*HpaII* DNA断片をプローブにしたときのS1 nuclease耐性のバンドを表している。今回の解析で得られた各変異*crp* mRNAの半減期 $t_{1/2}$ をグラフ中に示した。

B.



C.

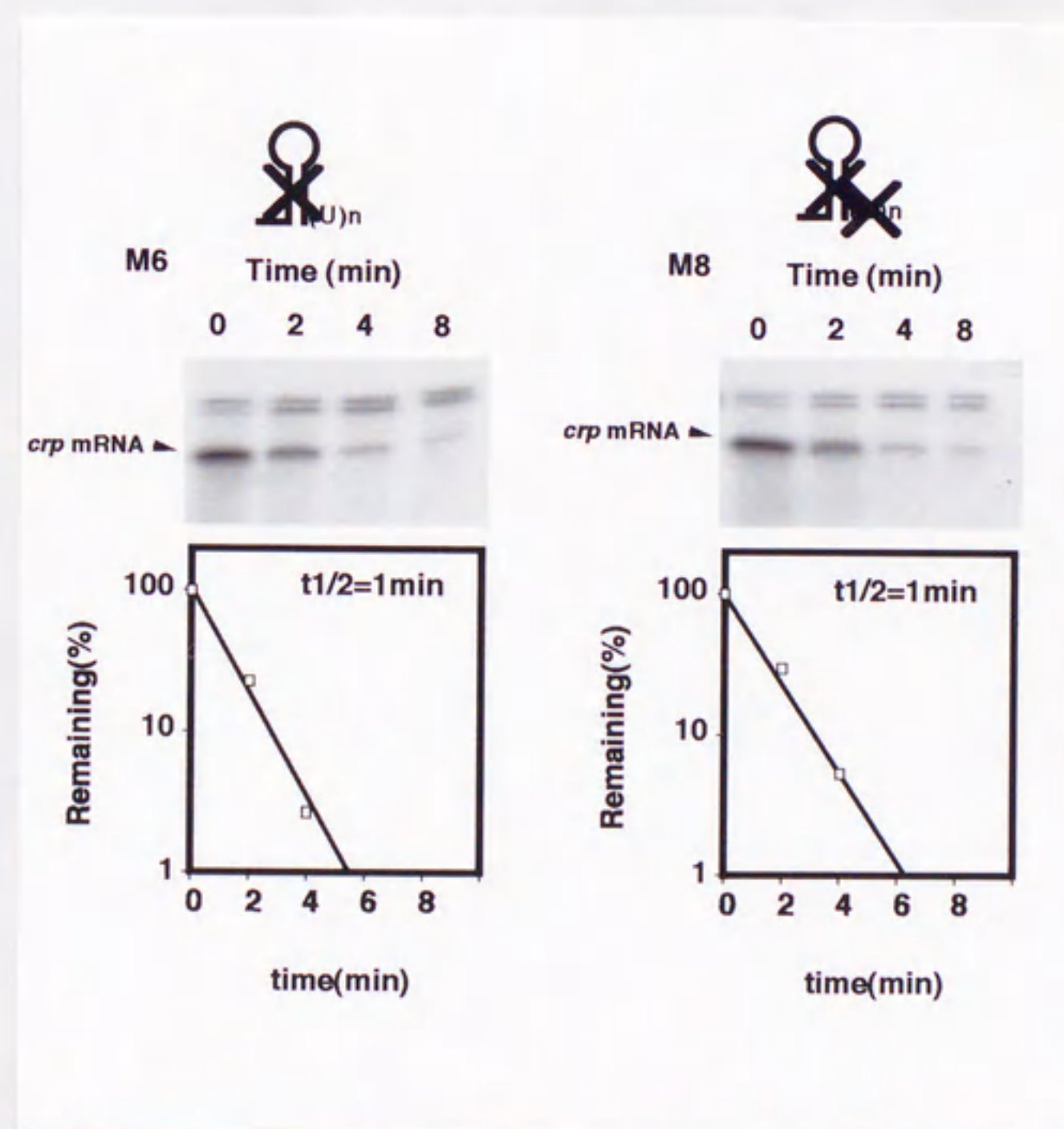


Figure 2-7 Stability of the *w.t* and mutant *crp* mRNA

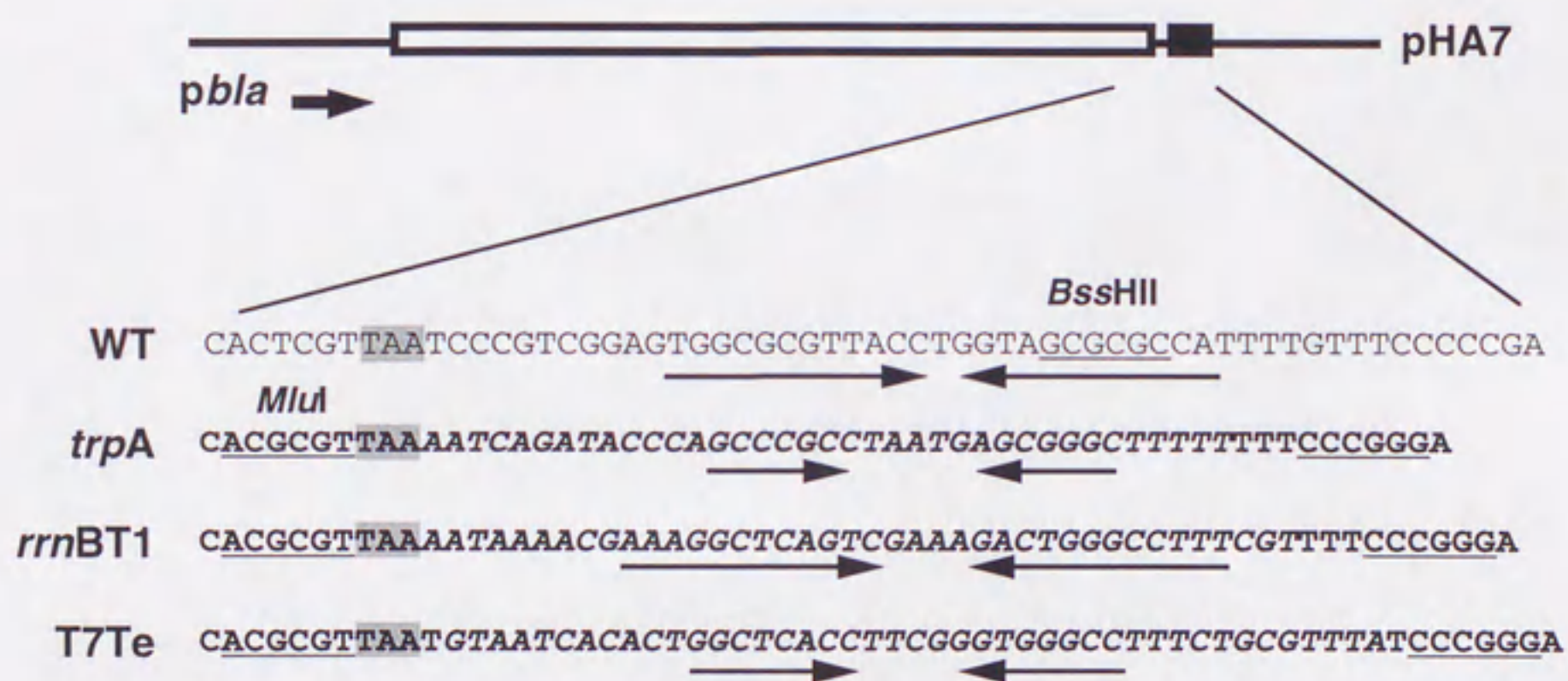


Figure 2-8 *trpA*, *rrnBT1*, T7Te ρ 因子非依存性転写終結シグナルのDNA配列

プラスミド pHA7 の説明は Figure 2-1 及び材料と実験方法を参照されたい。 *crp* 構造遺伝子を白抜きの四角で制限酵素部位を下線で示す。また、互いに向き合った矢印は転写終結シグナルの GC ステムループ構造形成可能な逆方向反復配列を示す。斜体字は *trpA*, *rrnBT1*, T7Te 由来の配列を示す。

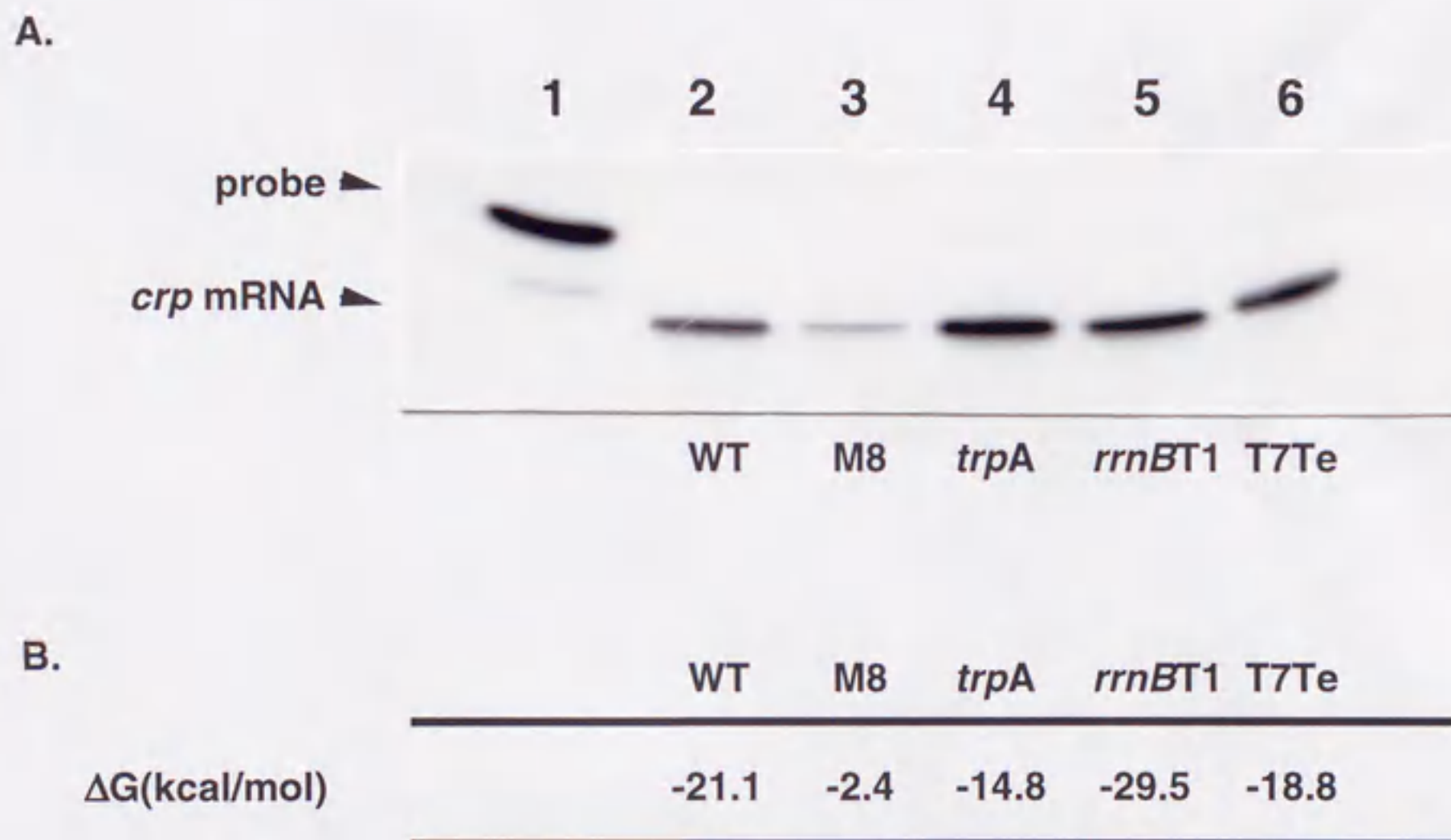


Figure 2-9 *crp* mRNAに対する*trpA*,*rrnBT1*,T7Te ρ 因子非依存性転写終結シグナルの影響

プラスミド pHA7 derivatives を TP2339 株に導入した菌株を 10ml LB 培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD_{600})が 0.8 になった時点の RNA 試料を調製した。30 μ g の RNA 試料を用いて S1 nuclease assay を行なった。lane 1 は未反応の DNA プローブ、lane 2 は野生型 *crp* 転写終結シグナルをもつプラスミドを導入した場合、lane 3 は GC ステムループ構造と U クラスターに変異をもち転写終結シグナルを欠失させたプラスミドを導入した場合、lane 4 は *crp* 転写終結シグナルを *trpA* 転写終結シグナルと置換させた場合、lane 5 は *crp* 転写終結シグナルを *rrnBT1* 転写終結シグナルと置換させた場合、lane 6 は *crp* 転写終結シグナルを T7Te 転写終結シグナルと置換させた場合の結果である。S1 nuclease assay の方法は Mori らの方法に従って行なった。また、GC ステムループ構造の自由エネルギーを Zuker らの方法に従い計算し、panel B に示す。

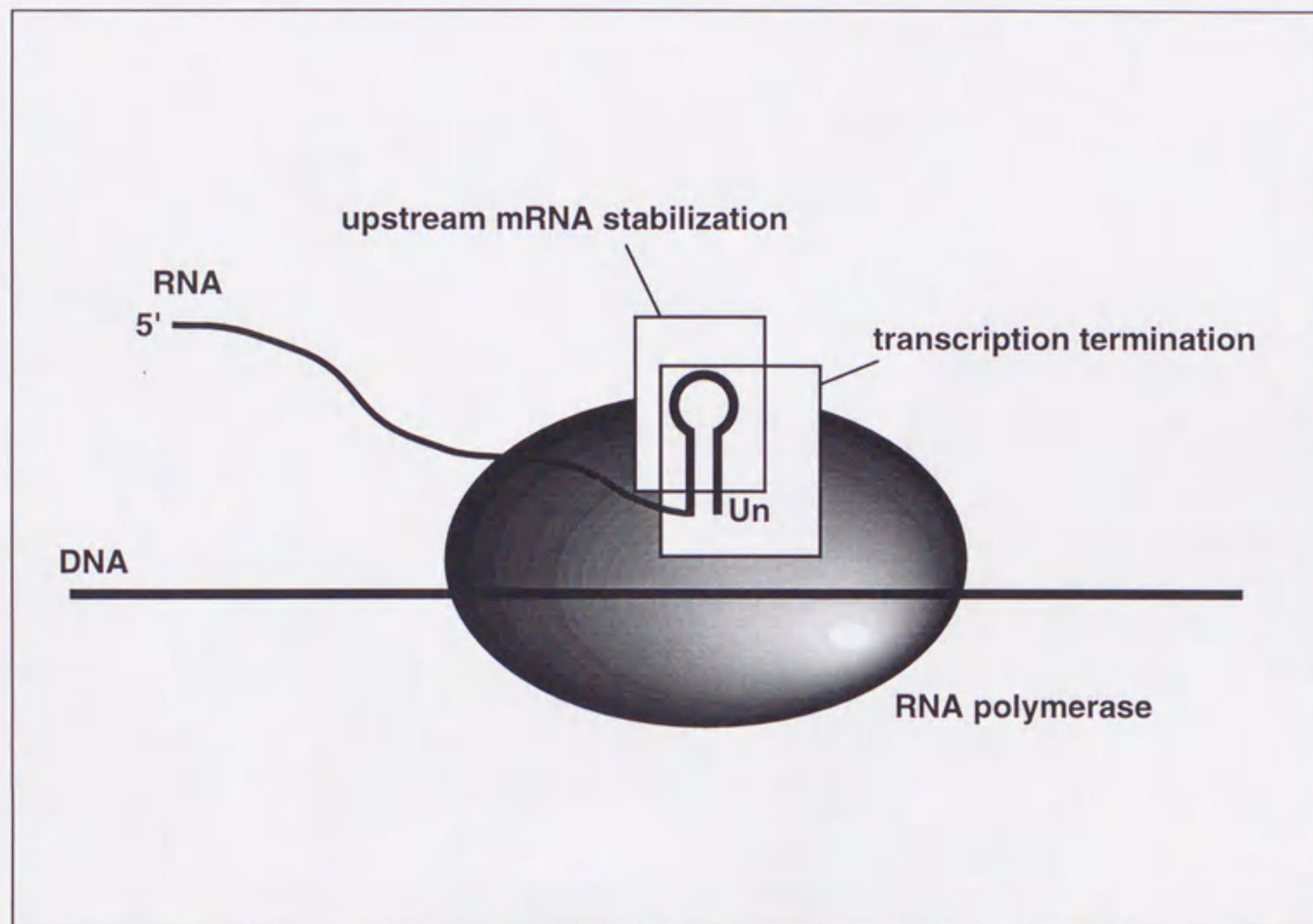


Figure 2-10 ρ 因子非依存性転写終結シグナルの二つの機能を規定するエレメントは異なっている。

ρ 因子非依存性転写終結シグナルはGCステムループ構造とUクラスターという構造的特徴をもち、転写終結機能に加えて、一般的性質として、mRNA安定化機能も保持している。機能に必要なエレメントとして転写終結にはGCステムループ構造とUクラスターの両方が必要であり、mRNA安定化機能にはGCステムループ構造だけが必要である。すなわち、二つの機能を規定する ρ 因子非依存性転写終結シグナルのエレメントは同一ではない。

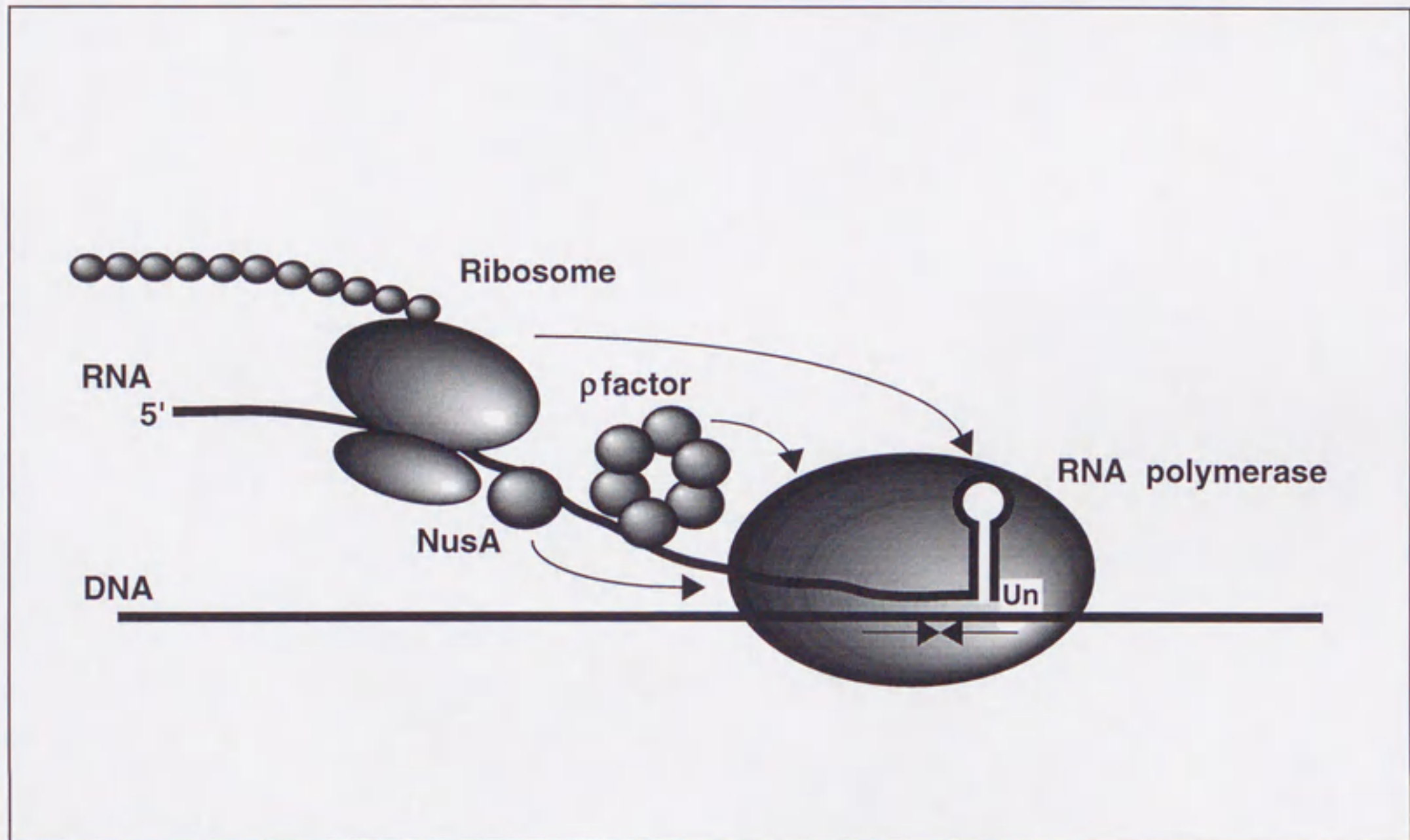
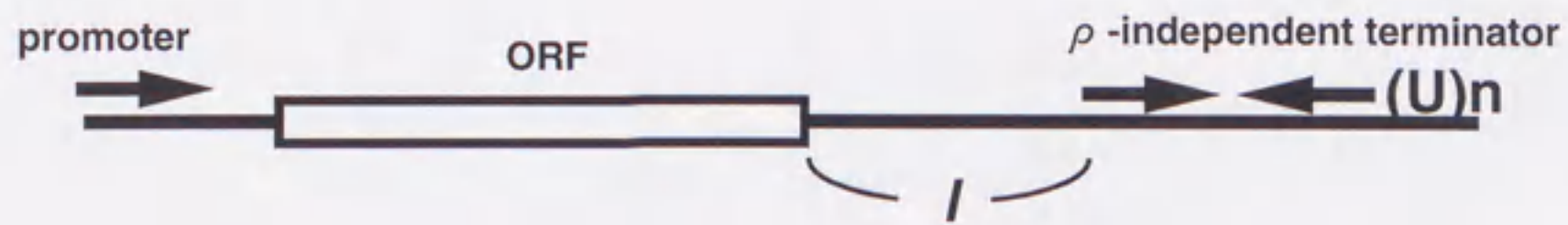


Figure 3-1 転写伸長中の転写複合体には様々な因子が作用する。

大腸菌では、転写伸長中の転写複合体にリボソームをはじめ様々な因子が作用することが知られている。遺伝子末端領域の転写終結はどのように行なわれているのか明らかになっていない。

A.



B.

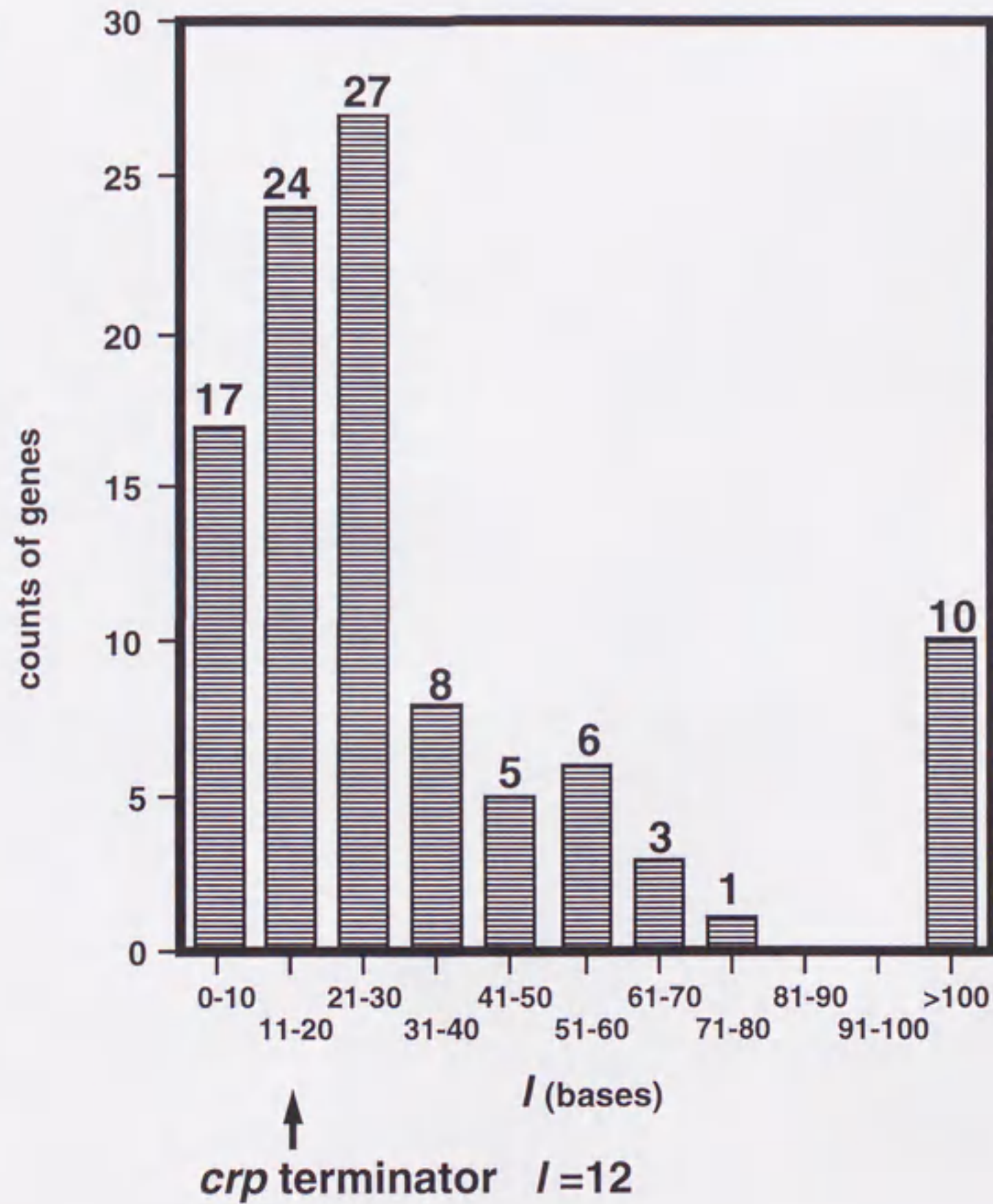


Figure 3-2 ρ 因子非依存性転写終結シグナルと上流構造遺伝子終止コドン間の塩基数

panel A;黒い直線はDNA二本鎖を表す。黒抜きの四角は構造遺伝子(ORF)を互いに向かいあった矢印は転写終結シグナルの逆方向反復配列を示す。文字 l は構造遺伝子と転写終結シグナルの間の塩基数を表す。

panel B;横軸は構造遺伝子と転写終結シグナルの間の塩基数を表す。縦軸は構造遺伝子間と転写終結シグナルの間の塩基数の条件に当てはまる遺伝子数を表す。

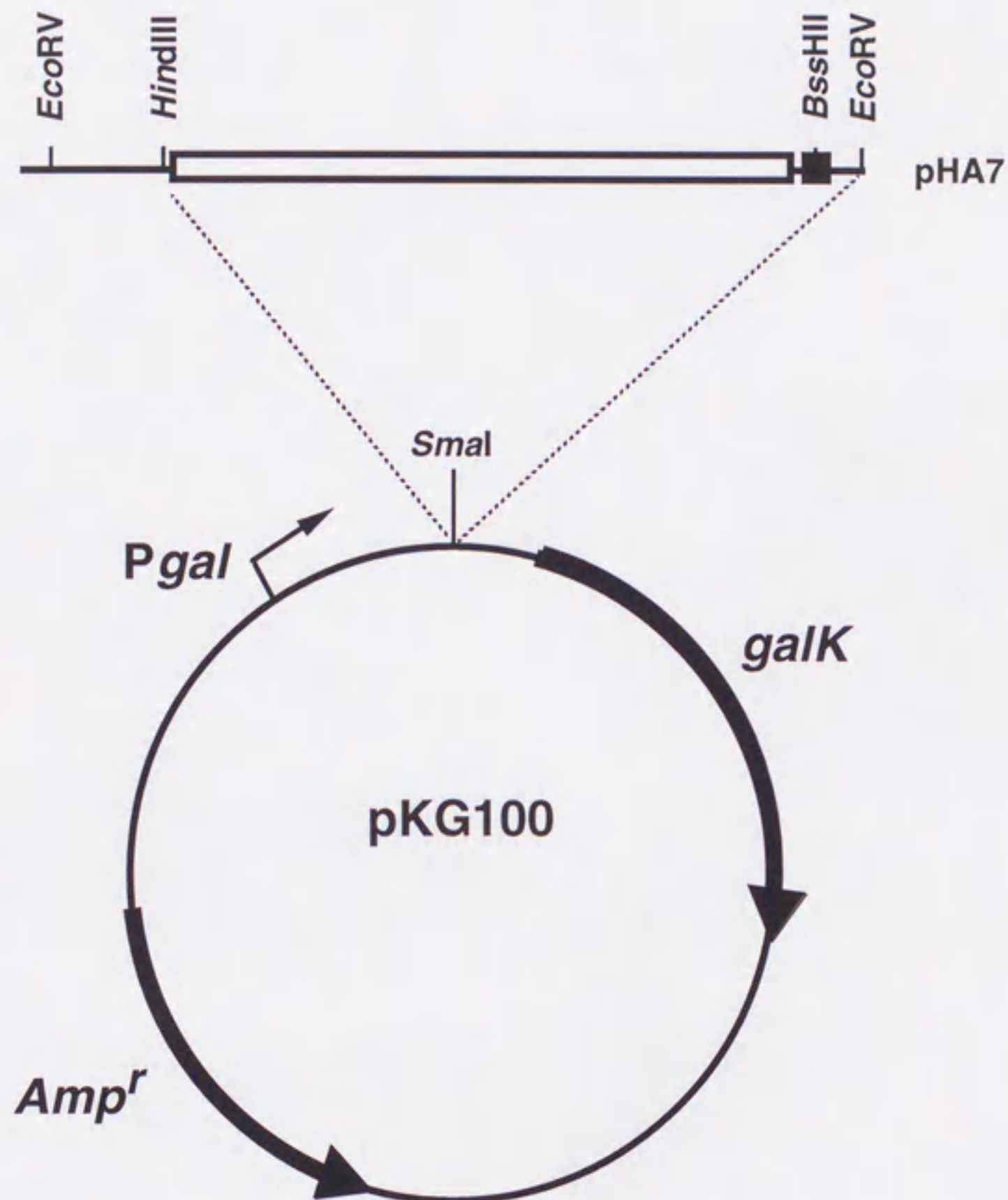


Figure 3-3 上流構造遺伝子と転写終結シグナルを含むDNA断片をpKG100にクローニング

クローニングベクターpKG100は*gal*オペロン由来の*gal*プロモーターと*galK*(ガラクトキナーゼ)遺伝子をもつ。*galK*上流の*SmaI*制限酵素部位に*crp*構造遺伝子と*crp*転写終結シグナルを含むDNA断片を挿入することで*gal*プロモーターからの転写が減衰される。*galK*の酵素活性を測定することで転写終結シグナル(含む変異転写終結シグナル)による転写の終結効率を見積もることができる。白抜きの四角は*crp*構造遺伝子を、黒抜きの四角は*crp*転写終結シグナルを示す。

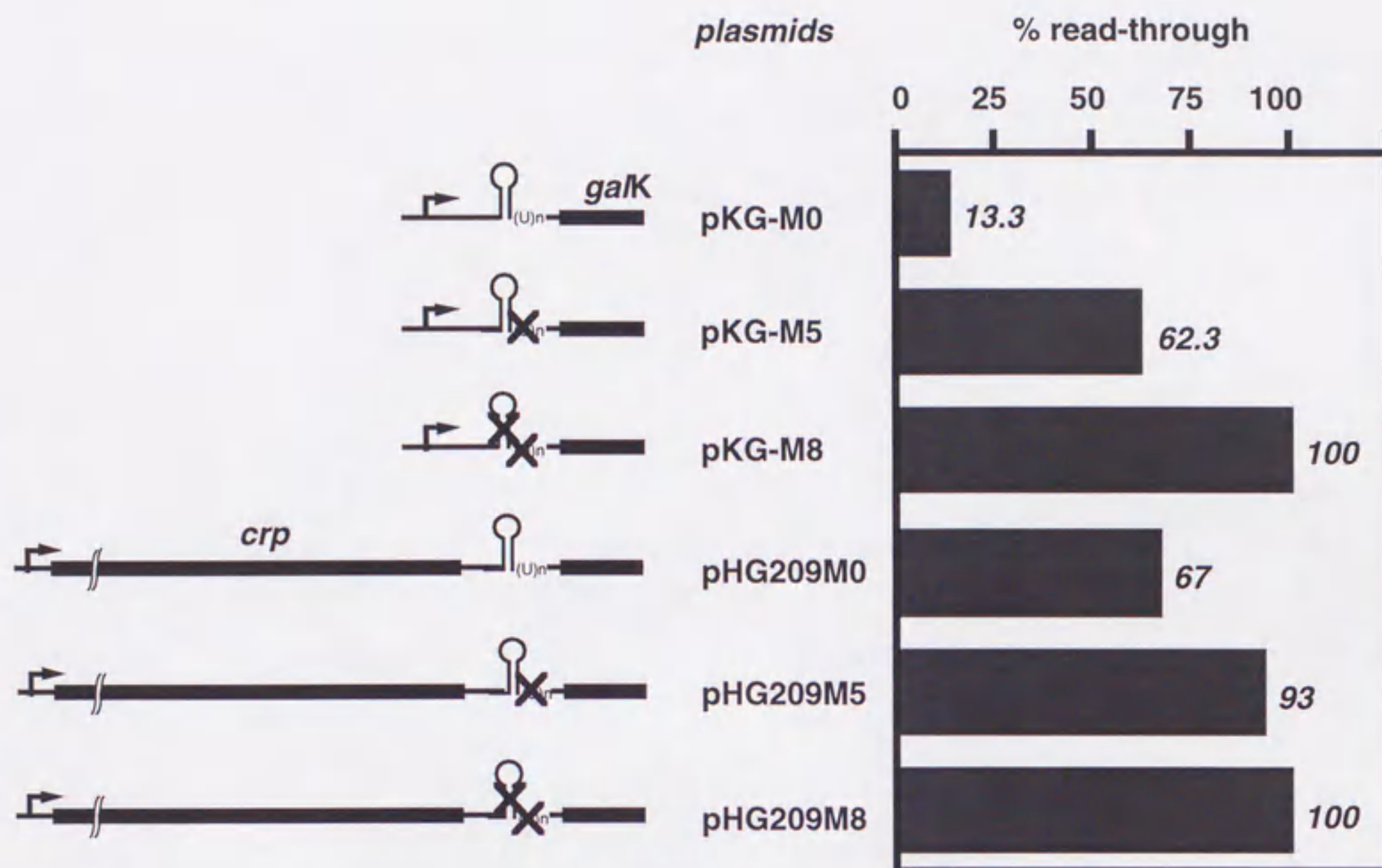


Figure 3-4 シグナル下流のレポーター遺伝子の発現に対する上流構造遺伝子の影響

クローニングベクターpKG100に転写終結シグナルを含むDNA断片をクローニングしたプラスミドをR594株に導入し、プラスミド由来のガラクトキナーゼ活性をAdhyaとMillerのアッセイ法に従って測定した。pKGM0,pKGM5の値はpKGM8由来のガラクトキナーゼ活性を転写終結効率0%(%Readthrough = 100%)としたときの相対値で各プラスミドの%Readthrough値を表している。

pHG209M8は野生型の*crp*構造遺伝子と*crp*転写終結シグナルを含むDNA断片をpKG100にクローニングしたプラスミドである。pHG209M0,pHG209M5の値はpHG209M8由来のガラクトキナーゼ活性を転写終結効率0%(%Readthrough = 100%)としたときの相対値で各プラスミドの%Readthrough値を表している。

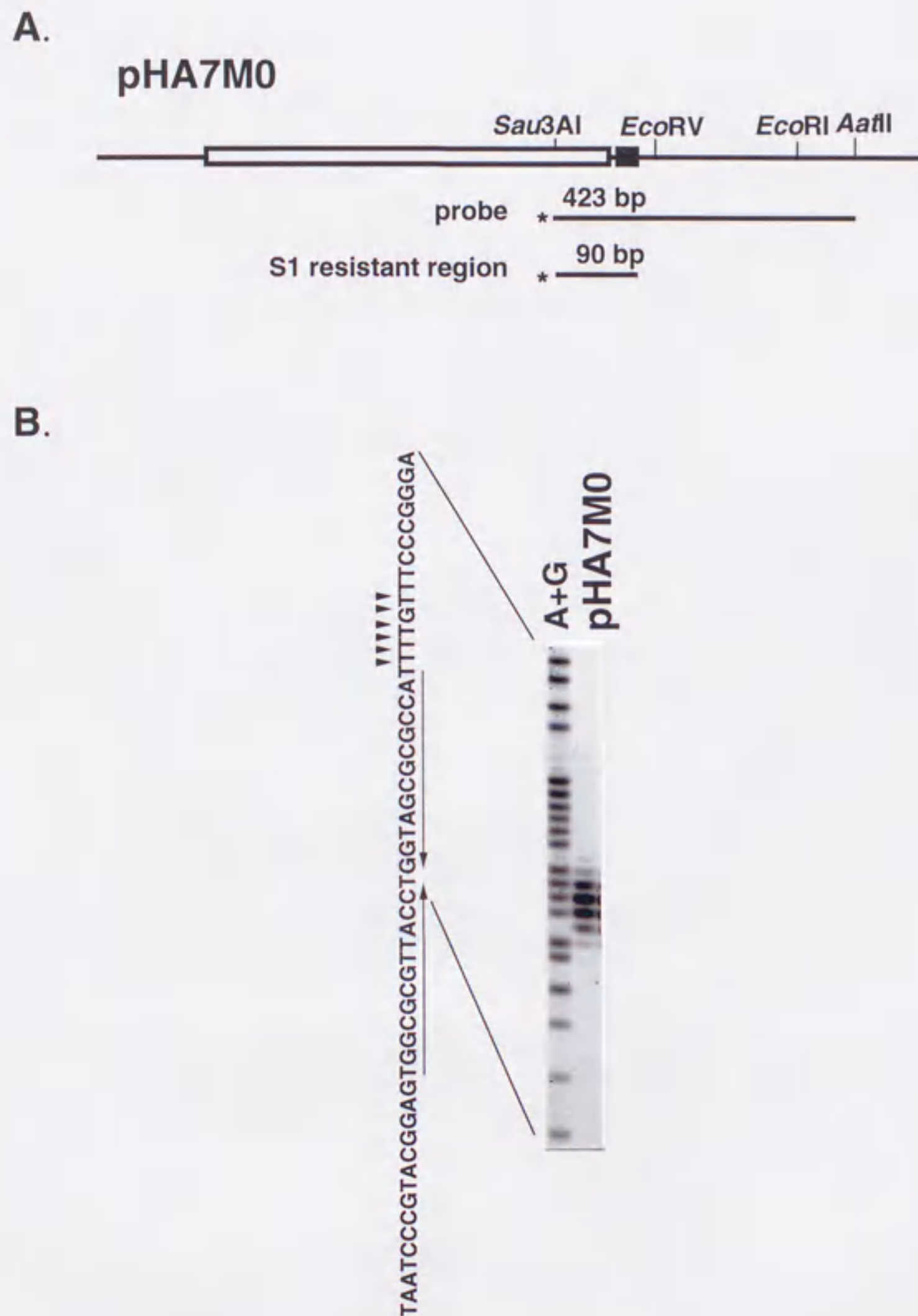


Figure 3-5 pHA7M0由来の*crp* mRNA 3'末端の決定

panel A; プラスミド pHA7M0 については Figure 2-1, 2-2 を参照。黒い直線は DNA 二本鎖を表す。白抜きの四角は *crp* 構造遺伝子を黒抜きの四角は *crp* 転写終結シグナルを網かけの部分は *rrnBT1* 転写終結シグナルを示す。

panel B; panel A のプラスミドによって形質転換した pp47 株を 10 ml LB 培地 (含抗生物質) で培養し、濁度 (OD_{600}) が 0.8 になった時点の RNA 試料を調製した。Mori らの方法に従って 30 μ g の RNA 試料を用いて S1 nuclease assay を行なった。プローブ DNA は Sau3AI-AatII 断片を切り出し抽出したものを [α - 32 P]dCTP で 3' 末端標識して使用した。文字列の左側の黒抜きの矢印は S1 nuclease assay によって検出されたバンドの位置を示す。末端リン酸基の有無の影響によって A+G と S1 nuclease assay によって検出されたバンドの位置はゲル上で 1 塩基分ずれる。

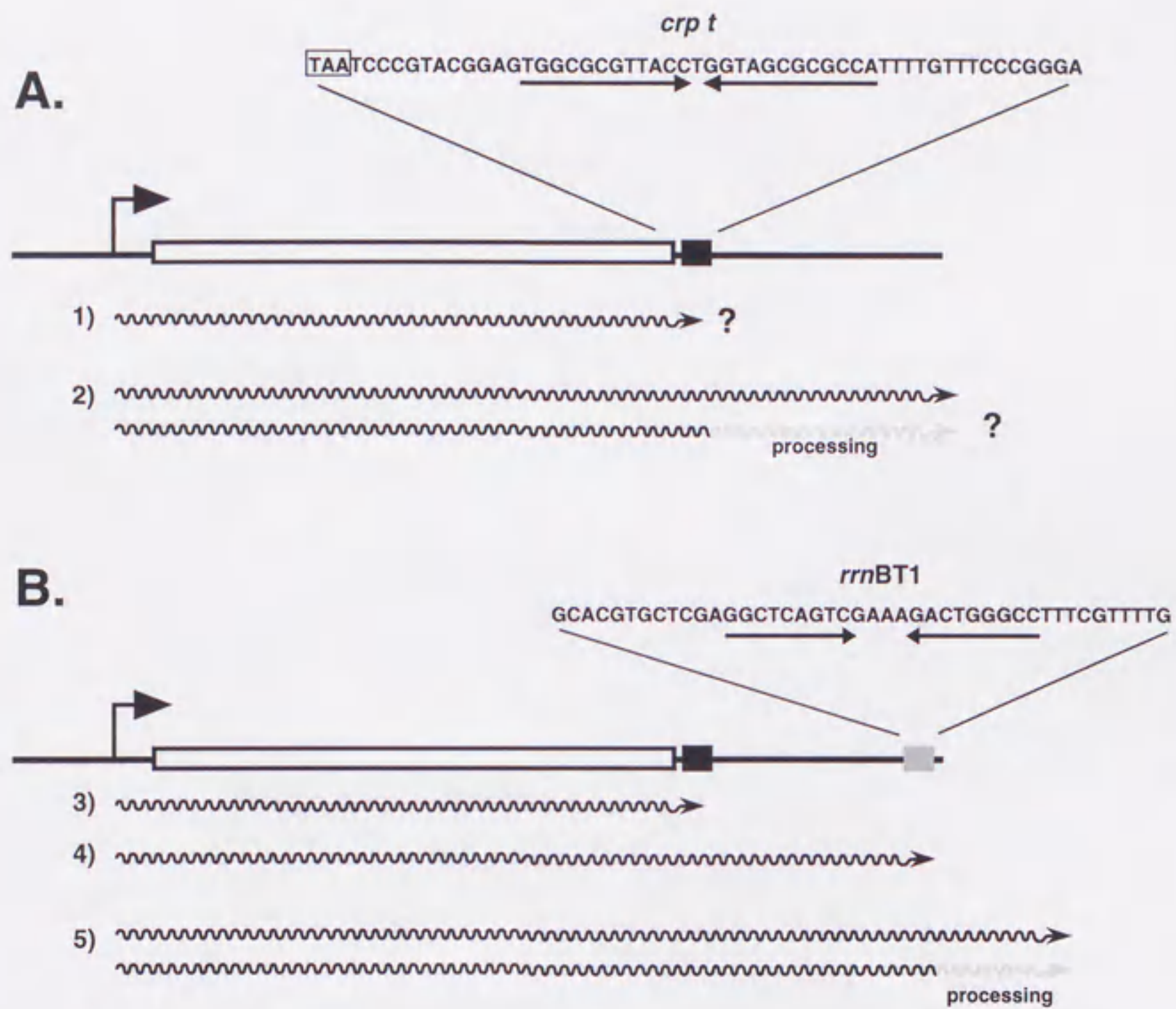


Figure 3-6 mRNA3'末端プロセッシング中間体を検出する。

白抜きの四角は *crp* 構造遺伝子を、黒抜きの四角は *crp* 転写終結シグナルを示す。網かけの四角は *rrnBT1* 転写終結シグナルを示す。波線は転写産物(RNA)を表している。panel Aの1), Bの3)は *crp* 転写終結シグナルの位置で転写産物の解離が起こり *crp* mRNA3'末端が形成していることを表している。また、panel Aの2), Bの5)は転写終結シグナル下流まで転写した後に起きたプロセッシングによって *crp* mRNA3'末端が形成していることを表している。panel Bの4)は *rrnBT1* 転写終結シグナルの位置で転写終結している場合を表している。

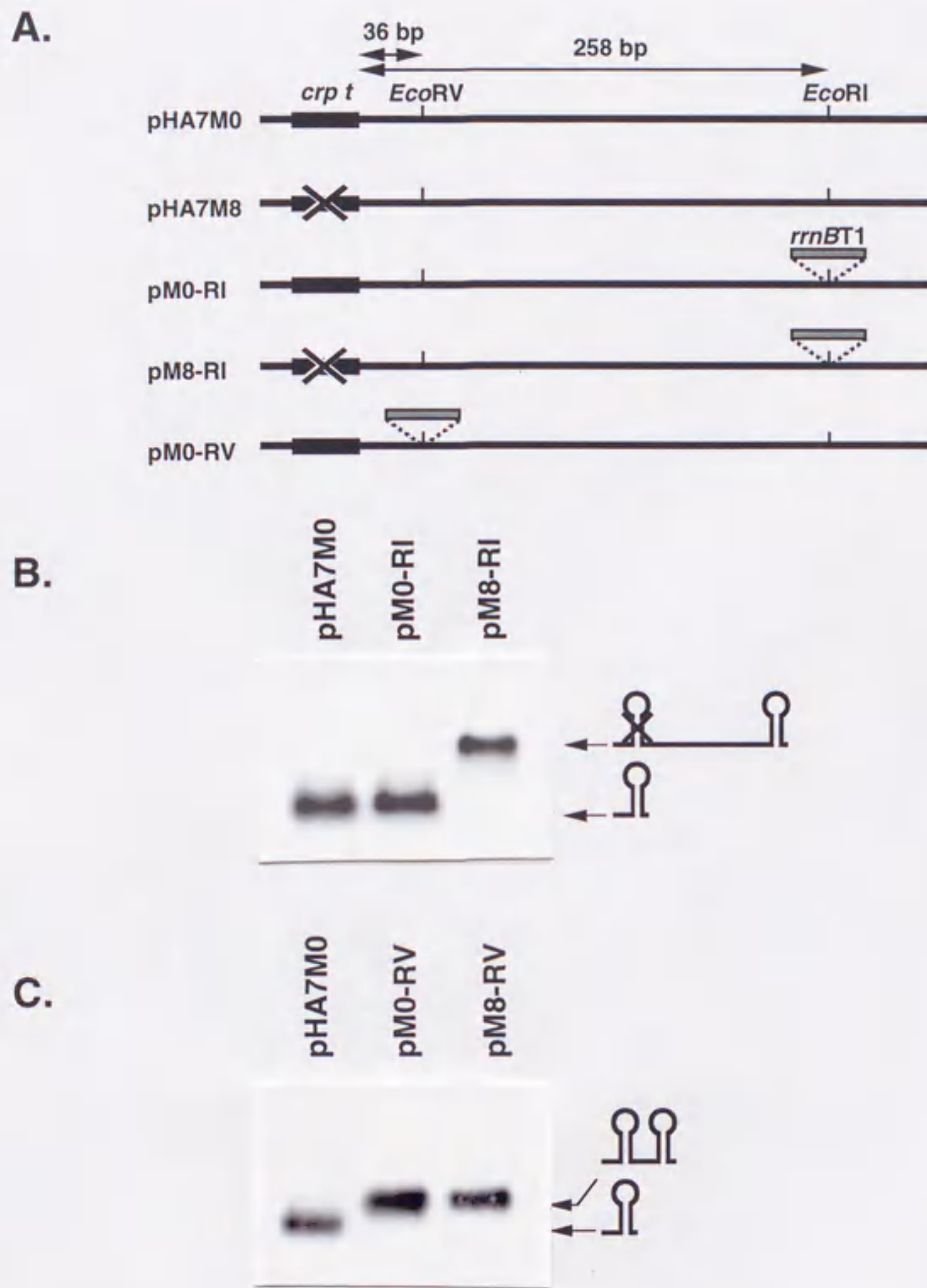


Figure 3-7 ノザンハイブリダイゼーションによる *crp* mRNA の解析

panel A; pM0RIはプラスミドpHA7上の*crp*転写終結シグナルの下流に258bpのEcoRI部位に*rrnBT1*転写終結シグナルを挿入したプラスミドである。pM0RVは下流36bpのEcoRV部位に挿入したプラスミドである。黒い直線はDNA二本鎖を表す。黒抜きの四角は*crp*転写終結シグナルを網かけの部分は*rrnBT1*転写終結シグナルを示す。塩基置換によって転写終結シグナルを欠失した変異*crp*転写終結シグナルM8は×印によって示す。

panel B,C; panel Aのプラスミドによって形質転換したpp47株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD_{600})が0.8になった時点のRNA試料を調製した。10 μ gのRNA試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行なった。ノザンハイブリダイゼーションの方法はSambrookらの方法に従って行なった。プローブDNAはpHA7からHindIII-EcoRV断片を切り出し抽出したものを使用した。

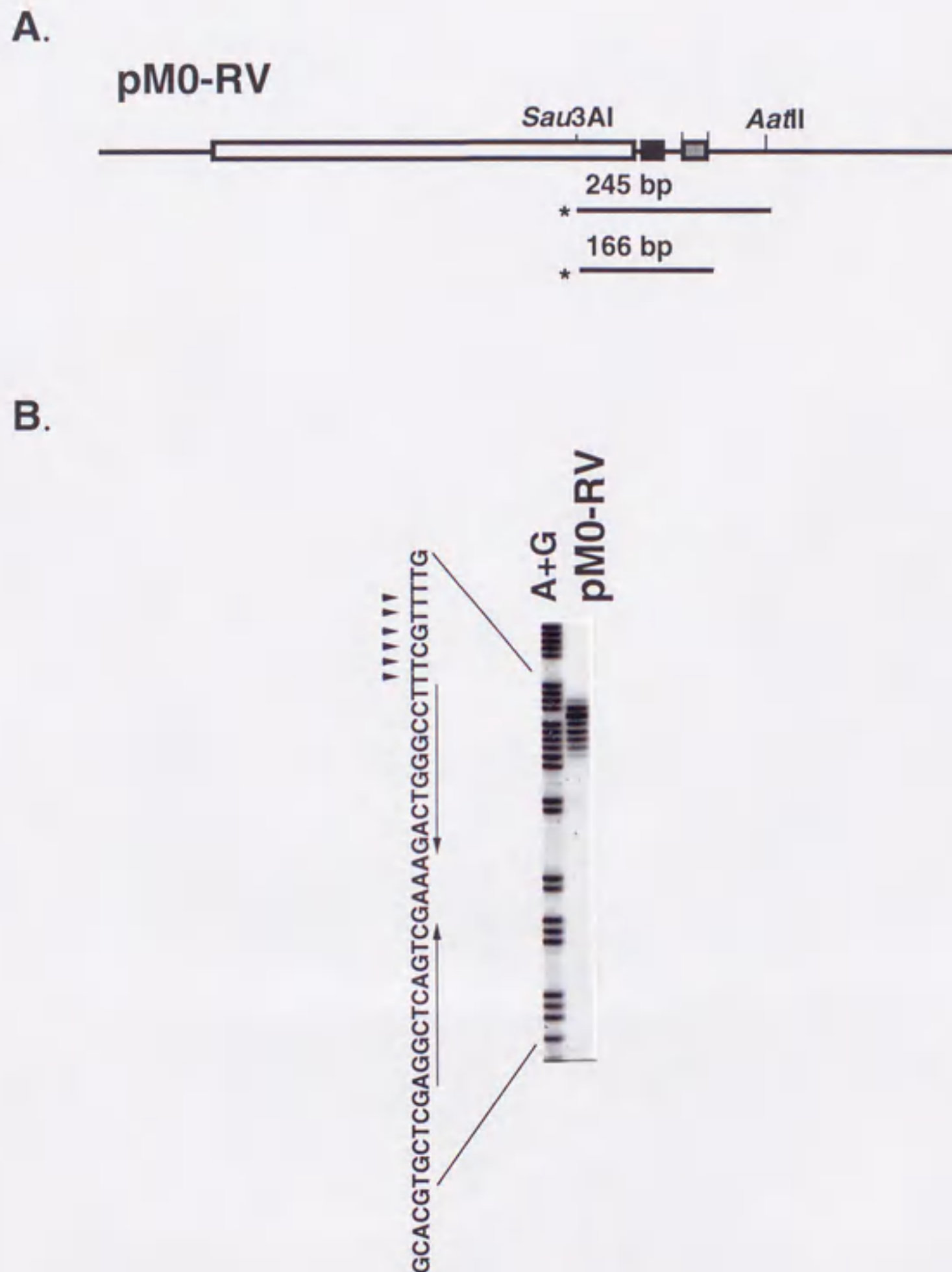
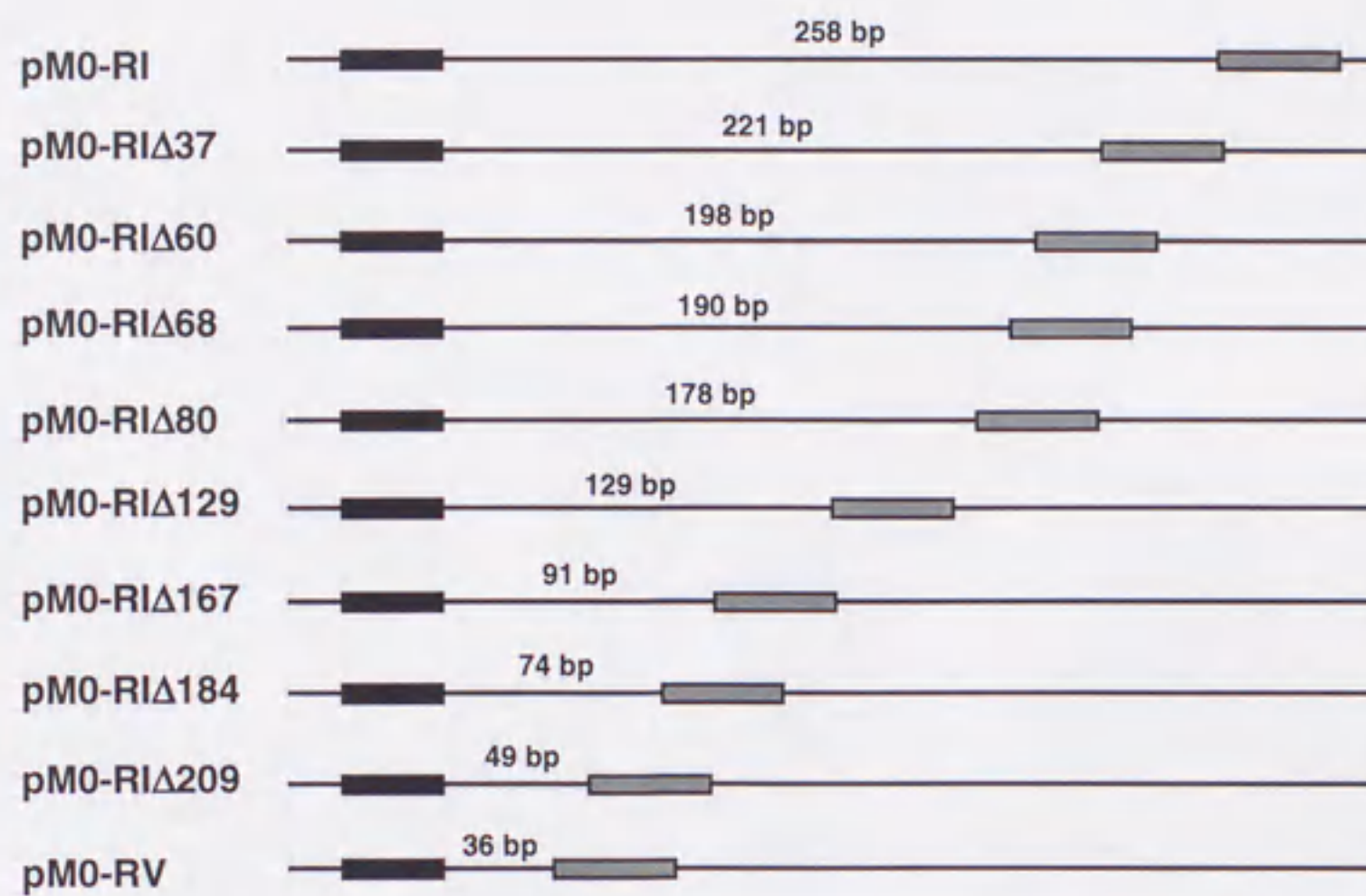


Figure 3-8 pM0-RV由来の*crp* mRNA 3'末端の決定

panel A; プラスミド pM0RV については Figure 3-7 を参照。黒い直線は DNA 二本鎖を表す。白抜きの四角は *crp* 構造遺伝子を黒抜きの四角は *crp* 転写終結シグナルを網かけの部分は *rrnBT1* 転写終結シグナルを示す。

panel B; panel A のプラスミドによって形質転換した pp47 株を 10ml LB 培地 (含抗生物質) で培養し、濁度 (OD_{600}) が 0.8 になった時点の RNA 試料を調製した。Mori らの方法に従って $30 \mu\text{g}$ の RNA 試料を用いて S1 nuclease assay を行なった。プローブ DNA は *Sau3AI*-*AatII* 断片を切り出し抽出したものを [α - ^{32}P]dCTP で 3' 末端標識して使用した。DNA 配列の左側の黒抜きの矢印は S1 nuclease assay によって検出されたバンドの位置を示す。

A.



B.

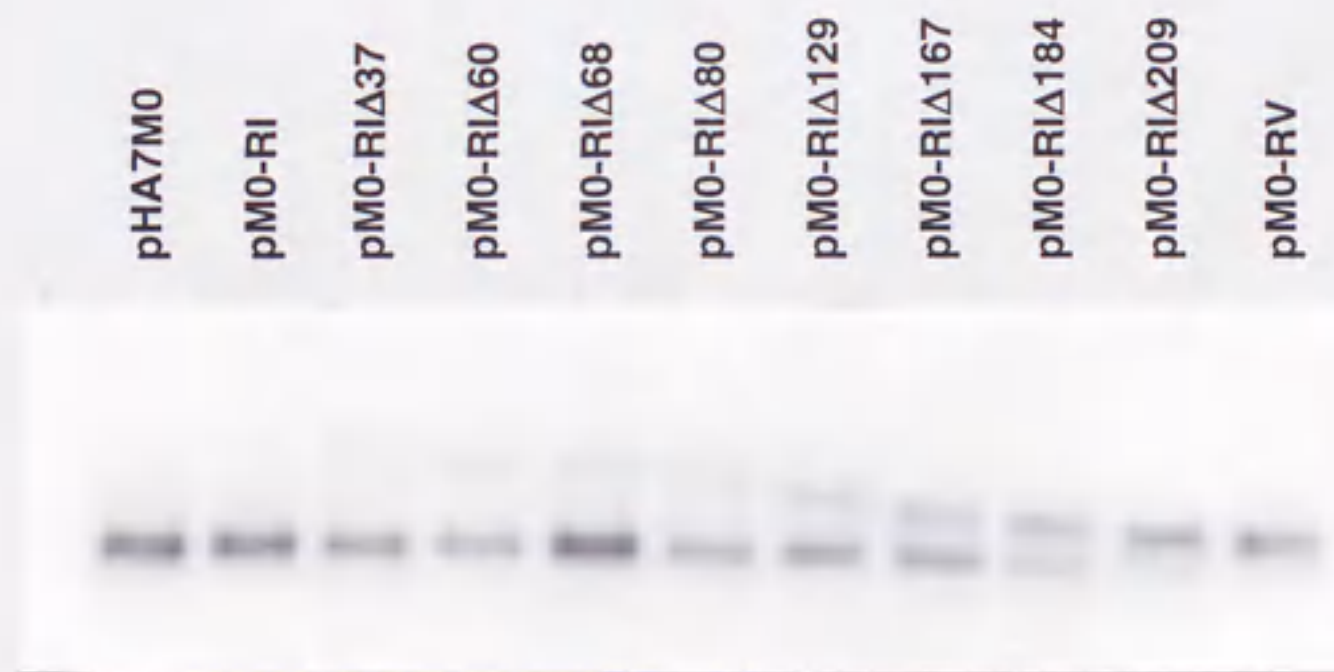
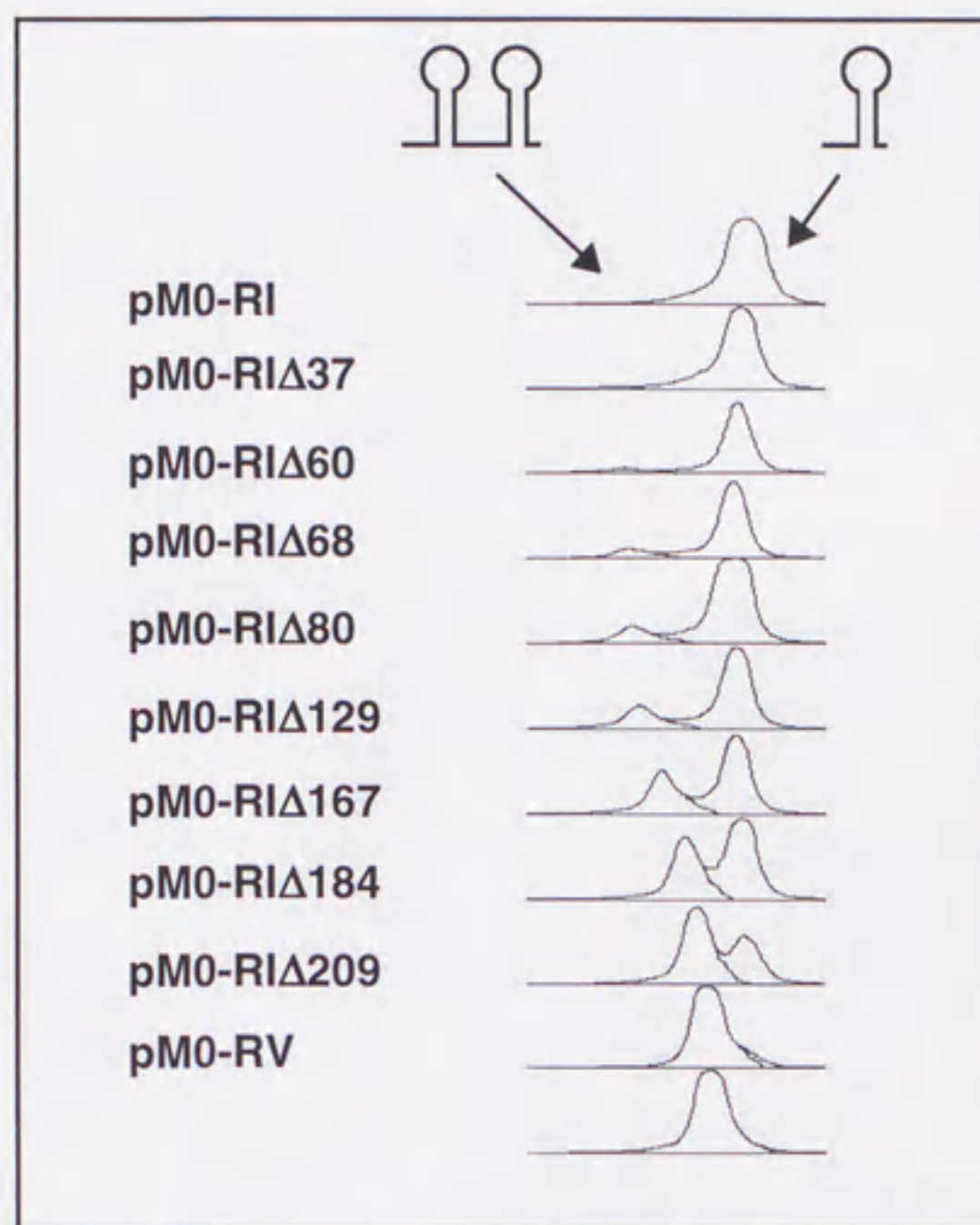


Figure 3-9 pM0-RI Δ 系プラスミド由来の*crp* mRNAのノザンハイブリダイゼーションによる解析

panel A; 黒い直線はプラスミド上のDNA二本鎖を表す。黒抜きの四角は*crp*転写終結シグナルを網かけの部分は*rrnBT1*転写終結シグナルを示す。直線の上の数字は*crp*転写終結シグナルと*rrnBT1*転写終結シグナルの間の塩基数を表す。

panel B; panel Aのプラスミドによって形質転換したpp47株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD₆₀₀)が0.8になった時点のRNA試料を調製した。10 μ gのRNA試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行ない、プローブDNAはpHA7からHindIII-EcoRV断片を切り出し抽出したものを使用した。

A.



B.

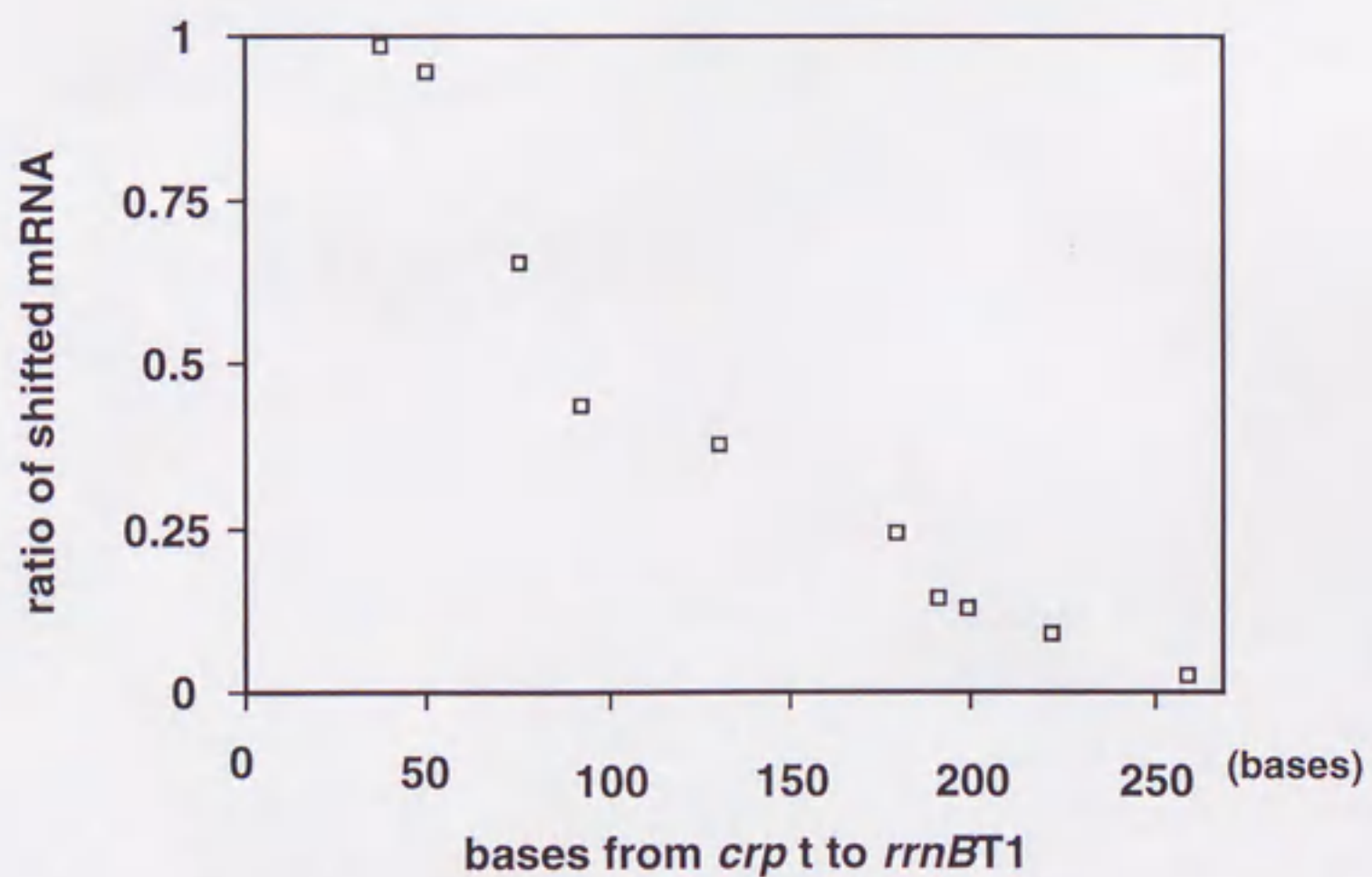


Figure 3-10 *crp* ρ 因子非依存性転写終結シグナルを転写後、転写産物は徐々に解離する。

panel A; Figure 3-9で得られたオートラジオグラムをスキャナーで取り込みNIH Imageによってバンド強度を計測して視覚化した。山の部分はバンド強度が高いことを示す。

panel B; panel Aの結果をプロットした。横軸はpHA7上における *crp* 転写終結シグナルから *rrnBT1* 転写終結シグナルまでの塩基数を示す。縦軸は1レーンのバンド全体に対する *rrnBT1* 転写終結シグナルをmRNA3'末端にもつバンド強度の比率を表す。

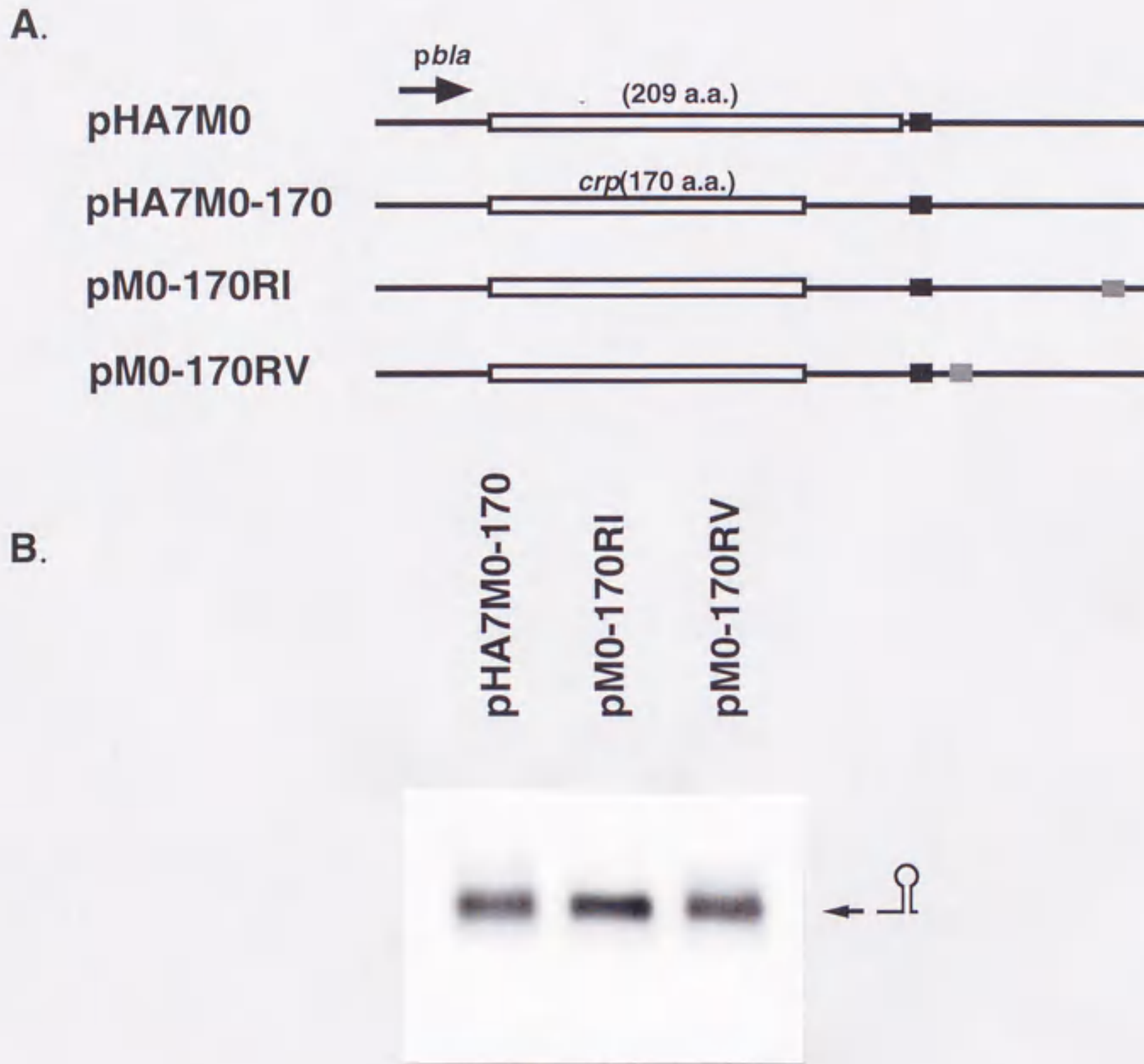


Figure 3-11 *crp* mRNAに対する*crp*遺伝子のオーカー変異の影響

panel A; プラスミド pM0RV については Figure 3-7 を参照。黒い直線は DNA 二本鎖を表す。白抜き四角は *crp* 構造遺伝子を黒抜き四角は *crp* 転写終結シグナルを網かけの部分は *rmBT1* 転写終結シグナルを示す。*crp* 構造遺伝子内部に構築したオーカー変異の位置を黒丸で示す。

panel B; panel A のプラスミドによって形質転換した pp47 株を 10 ml LB 培地 (含抗生物質) で培養し、濁度 (OD_{600}) が 0.8 になった時点の RNA 試料を調製した。10 μ g の RNA 試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行なった。ノザンハイブリダイゼーションの方法は Sambrook らの方法に従って行なった。プローブ DNA は pHA7 から *Hind*III-*Eco*RV 断片を切り出し抽出したものを使用した。

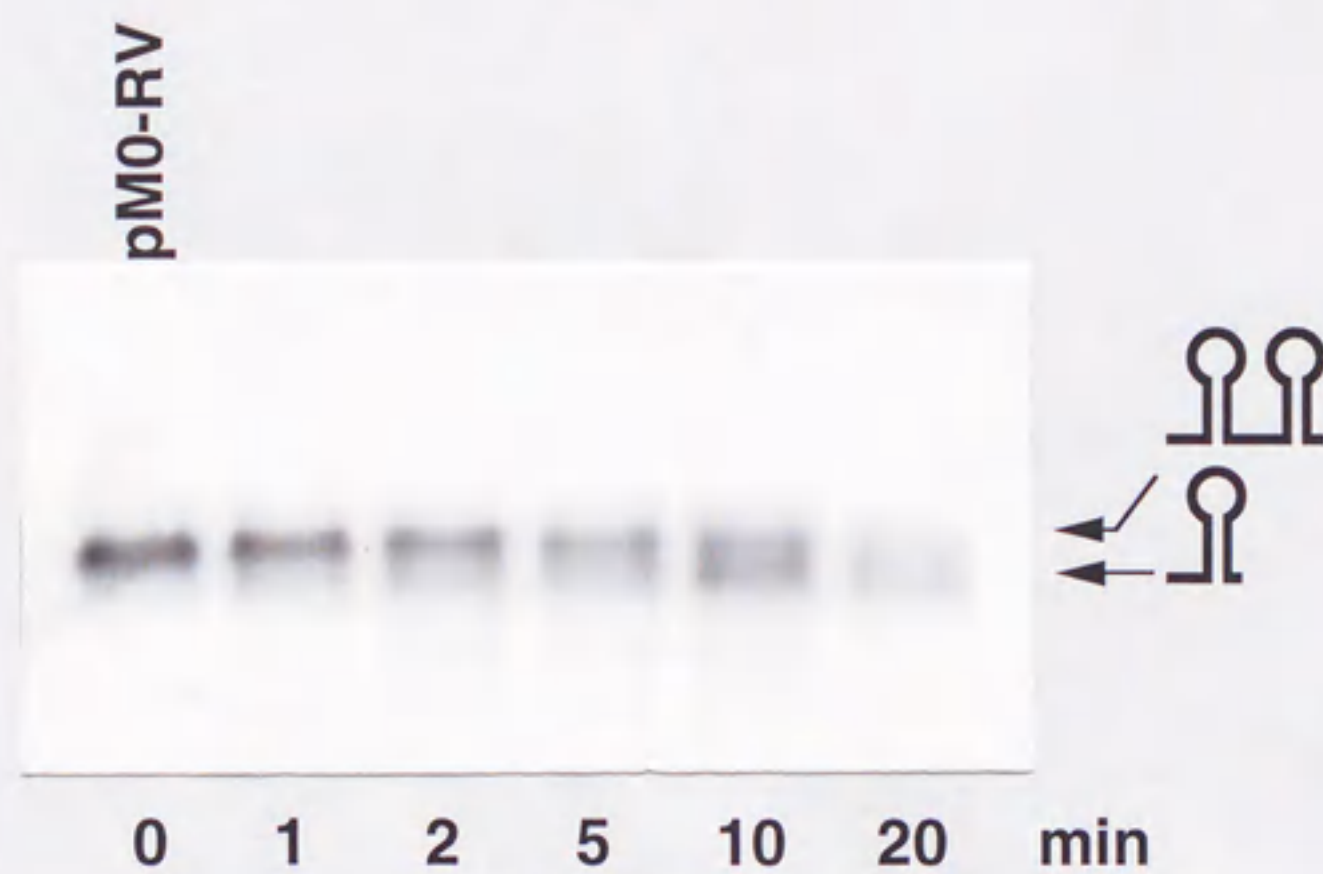


Figure 3-12 *crp* mRNAに対するクロラムフェニコールによる翻訳阻害の影響

プラスミドpM0RVによって形質転換したpp47株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD_{600})が0.8になった時点で最終濃度1mg/mlになるように抗生物質クロラムフェニコールを培養液中に添加した。

添加後の時間経過とともにサンプリングを行い、各時間のRNA試料を調製した。得られたRNA試料のうち10 μ gを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。ノザンハイブリダイゼーションの方法はSambrookらの方法に従って行なった。プローブDNAはpHA7から *Hind*III-*Eco*RV断片を切り出し抽出したものを使用した。



Figure 3-13 *in vitro* 転写翻訳反応によって合成された *crp* mRNA

Promega corporationから購入した *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA kitを用いて *in vitro* 転写翻訳反応を行なった。エッペンドルフチューブに50 μ lの反応液を調製し、37°Cで2時間インキュベーションしたあと、50 μ lのphenol(pH5.5)によって反応を停止させた。5 μ lの3M NaOAcと100 μ lのRNA extraction bufferをさらに加え、RNA抽出の方法にしたがってRNAを抽出した。得られたRNAを55 μ lのRNA loading bufferに溶かし、RNA試料とした。ノザンハイブリダイゼーションの方法はSambrookらの方法に従って行なった。panel A,BともにプローブDNAはプラスミドpHA7から *Hind*III-*Eco*RV断片を切り出し抽出したものを使用した。panel A;プラスミドによって形質転換したpp47株を10ml LB培地(含抗生物質)で培養し、濁度(OD₆₀₀)が0.8になった時点のRNA試料を調製した。10 μ gのRNA試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行なった。panel B;*in vitro* 転写翻訳反応によって得られたRNA試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行なった。

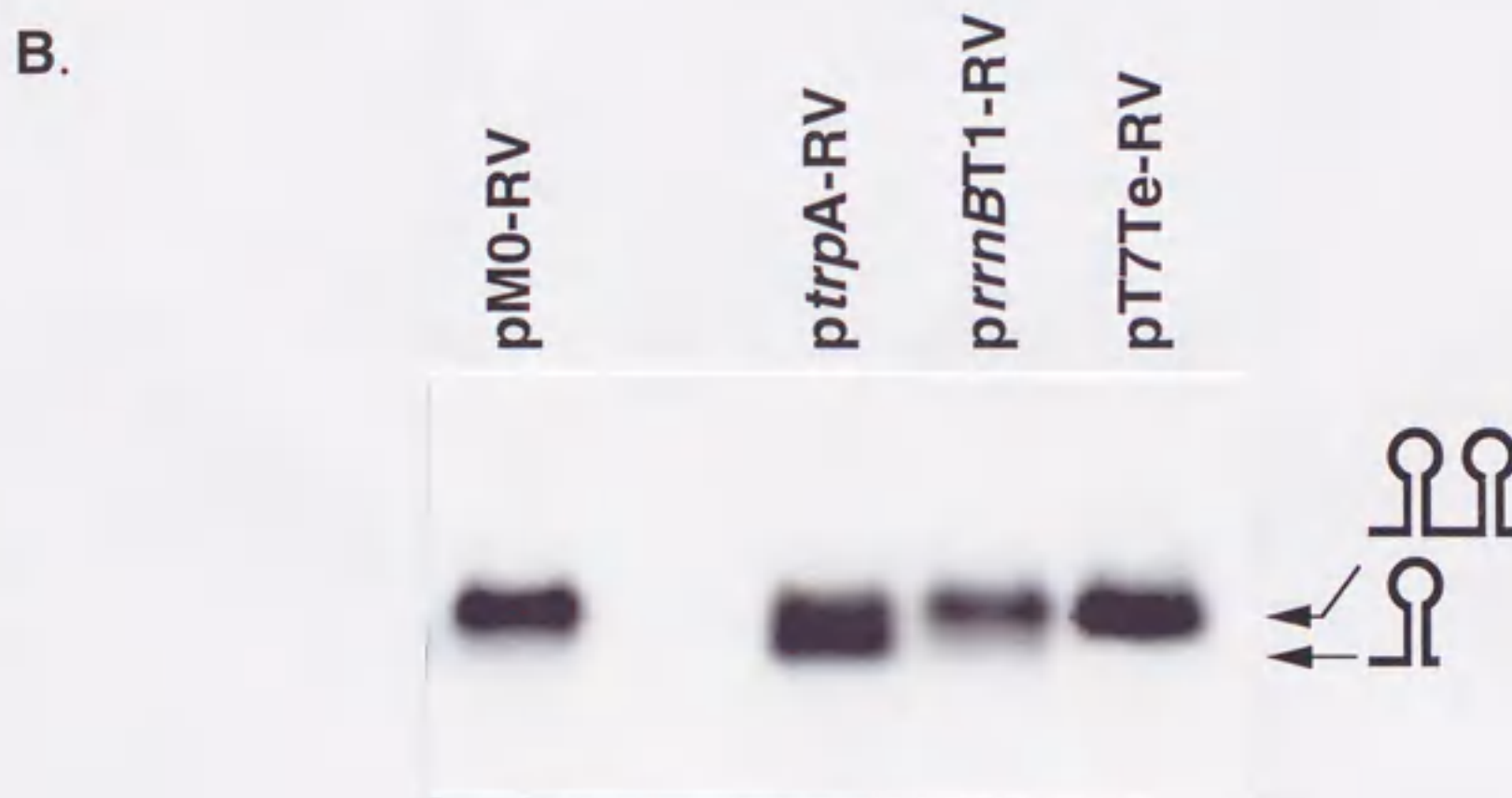
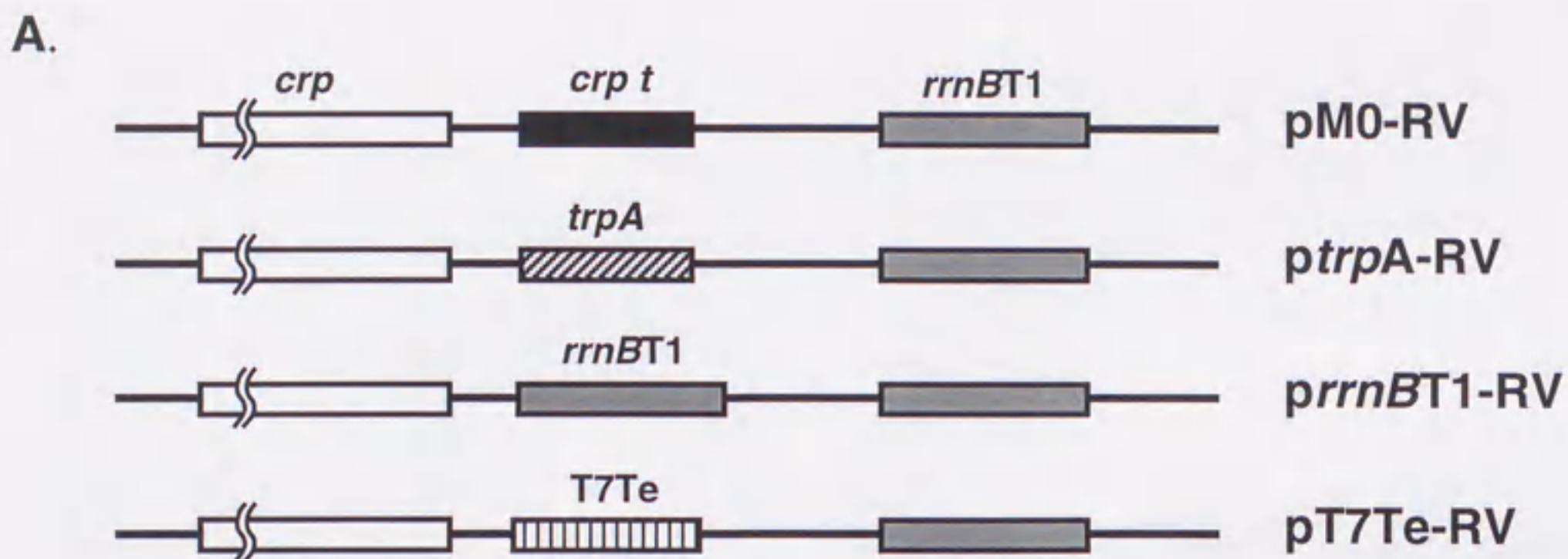


Figure 3-14 *trpA*, *rrnBT1*, T7Te ρ 因子非依存性転写終結シグナルをもつ *crp* mRNA

panel A; プラスミド pM0RV の *crp* 転写終結シグナルを他の転写終結シグナルに置換した構成図を示す。白抜きの四角は *crp* 構造遺伝子を黒い直線はプラスミド上の DNA 二本鎖を表す。黒抜きの四角は *crp* 転写終結シグナルを網かけの四角は *rrnBT1* 転写終結シグナルを示す。斜線の四角は *trpA* 転写終結シグナルを縦線の四角は T7Te の転写終結シグナルを示す。

panel B; panel A に示されたプラスミドによって形質転換した pp47 株を 10ml LB 培地 (含抗生物質) にて培養し、濁度 (OD_{600}) が 0.8 になった時点の RNA 試料を調製した。10 μ g の RNA 試料を用いてノザンハイブリダイゼーションを行なった。ノザンハイブリダイゼーションの方法は Sambrook らの方法に従って行なった。プローブ DNA は pHA7 から HindIII-EcoRV 断片を切り出し抽出したものを使用した。

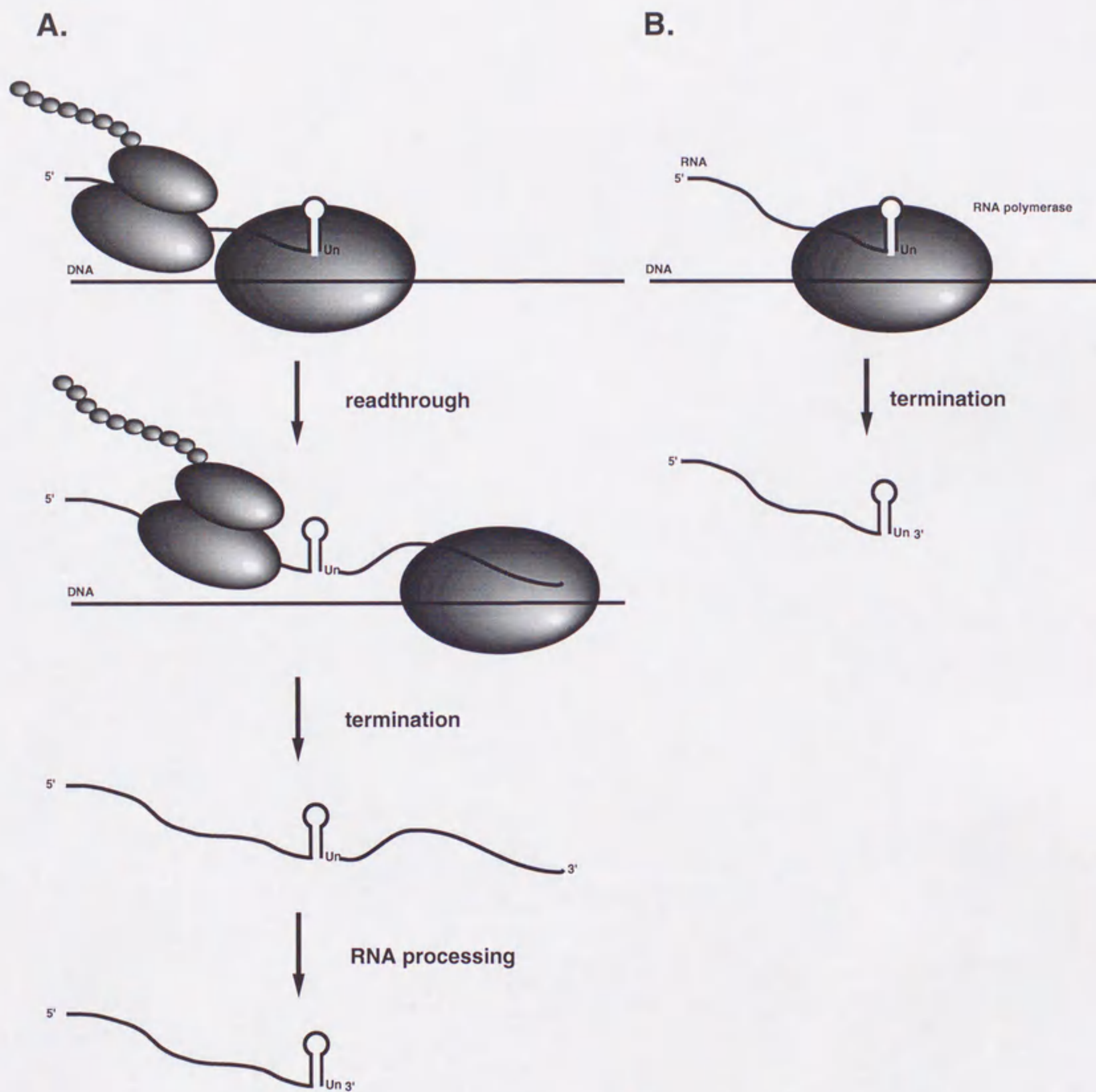
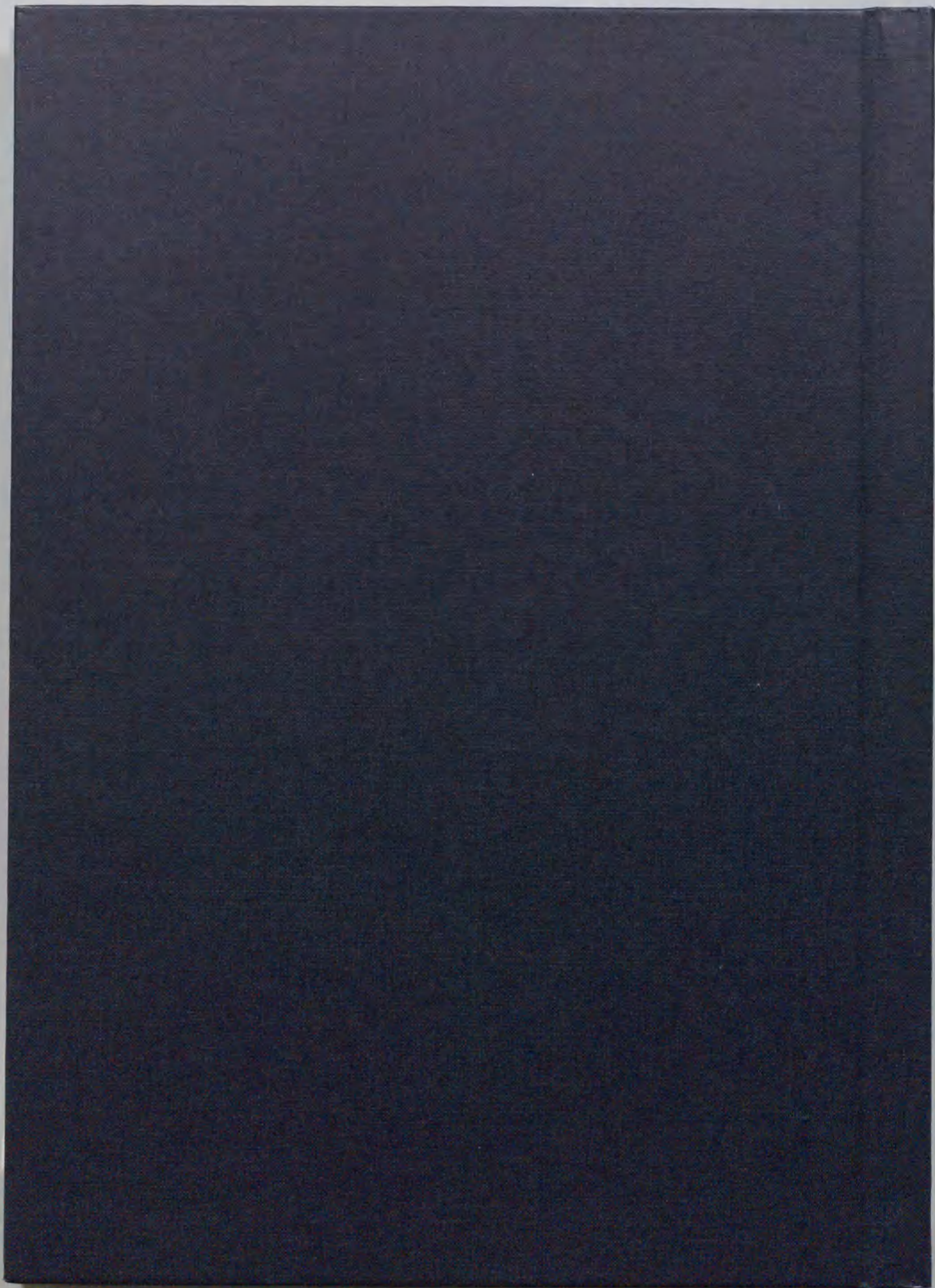


Figure 3-15 ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる遺伝子末端領域の転写終結

遺伝子末端領域では上流構造遺伝子の翻訳の影響を受けて ρ 因子非依存性転写終結シグナルを超えても転写は伸長を続ける。シグナル下流で解離した転写産物はRNAプロセッシングを受けmRNA3'末端が形成される。panel Bは従来の ρ 因子非依存性転写終結シグナルによる転写終結を示した。



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

