複合ゲノム系における基本遺伝システムの解析

(2001 年度日本農芸化学会功績賞受賞)

高橋 秀 夫

(東京大学分子細胞生物学研究所)

Key words: *tab*; chaperonin; sigma factor bacteriophage T4; *rpoS*; chloroplast; PEP

1. 緒 論

微生物、特にバクテリアと酵母を中心とした分子遺伝学的な研究によって複製・転写・翻訳などの生物の基本的遺伝システムが明らかにされ、今日のバイオテクノロジー隆盛の基礎となったことはよく知られている。しかしながら、さまざまな生物のゲノム情報は、現在の細胞の核あるいはそれに相当する主要なゲノム DNA の塩基配列だけに配置されているわけではなく、一つの細胞の中に二つ以上のゲノムが競合、あるいは共存する複合ゲノムを構成している場合がほとんどである。例えば、ウイルス（バクテリオファージ）やプラスミドなどの寄生性の副ゲノムにあつては、細胞の主要なゲノム情報を有効に利用あるいは抑制しており、ミトコンドリアや葉緑体 (chloroplast) のような細胞小器官 (organelle) のゲノムは、細胞核の主ゲノムの遺伝情報と協調しつつ自身の維持・発現を行っている。バクテリオファージやプラスミドあるいはオルガネラゲノムは、数キロベースから 100 数十キロベース程度の遺伝子セットを構成しており、それらの多くは 1980 年代に全ゲノム塩基配列が決定されている。ちなみに、 λ ファージの全塩基配列 (48,502 bp) は、1983 年、F. Sanger によって決定され、ゼニゴケとタバコの葉緑体ゲノムの全塩基配列は、1986 年、日本の二つの研究グループによって決定されている。これらの塩基配列情報は 1 個の細胞を構成する核ゲノムの全塩基配列に先行すること約 10 年前、それぞれ当時の分子生物学に大きなインパクトを与えた。

はじめに、ここで扱う T4 ファージ、真正細菌、葉緑体について転写装置を中心とした概略を述べる。T4 ファージは大型の非溶原性ファージであり、構造的には頭部、尾部、尾部繊維の三つの部分に分けられ、それぞれ独立に形成される。頭部には 156 kb の DNA (156 kb) がパッケージされて

おり、150 ほどの遺伝子が知られている。T4 ファージの最も特徴的なことの一つは、その DNA のすべてのデオキシシトシン (dC) 残基がハイドロキシメチルデオキシシトシン (HMdC, 5-hydroxymethyl-deoxycytosine) 残基に置き換わっていることである。感染後、ファージコードの酵素群の働きによって HMdCMP が合成され、さらに DNA 合成の基質として、HMdCTP が作られる。T4 の DNA は、この HMdC 残基が α, β 位のグルコシル化を受けているために、制限酵素の作用を受けにくくなっている。T4 の感染によって宿主細胞の基本遺伝システムはさまざまなレベルで修飾、改変を受ける。その一つは、T4 ファージの感染に伴って起こる宿主ゲノムにおける複製、転写などの機能のシャットオフである。これらはいくつかのステップで重層して起こることが知られている。T4 の感染過程についてざっと述べておく。ファージ DNA が細胞に入ると、T4 ゲノム由来の RNA の転写が始まる。ファージ特異的な RNA 分子は、30°C の感染でいつ盛んな合成が開始されるかの時間をベースとして 4 つのクラスに分けられる。前初期 (immediate early, 30 秒)、後初期 (delayed early, 2 分)、中期 (middle) (6 分)、それから後期 (late) (9 分) である。予想されるように、初期転写産物は感染の確立に、また後期転写産物は子ウイルス粒子の形成に必要である。特に、通常の後期転写の開始には、ファージ DNA の複製が必須であり、DNA 合成が欠損した突然変異体 (D0, DNA0) の感染では、後期転写が起こらない。DNA 複製は起こるが後期転写の起こらない遺伝子 55 と遺伝子 33 の変異体は成熟欠損 (MD, Maturation-Defective) と呼ばれている。転写を複製前転写と複製後転写に分けることもできる。

T4 の感染後の RNA ポリメラーゼの必須コンポーネントは、少なくとも大腸菌ポリメラーゼの複数のサブユニットを含んでいる。宿主菌酵素の最少構造は、タンパク質複合体 ($\alpha_2\beta\beta'-\sigma$) からなり、分子量 480,000 である。シグマ因子と残りの複合体 (コア酵素, E) とは転写のステップに応じて、機能的に解離・会合する。特異的なプロモーター認識による転写の開始は、ホロ酵素 $E\sigma$ によって行われる。これらは、それぞれ *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD* 遺伝子によってコードされ

Molecular genetic study on hybrid complexes in multigenomic systems

Hideo TAKAHASHI (Institute of Molecular and Cellular Bioscience, The University of Tokyo)

ている。シグマ・サブユニットは、主要シグマ因子と置換型シグマ因子の二つのタイプに大きく分けられる。大腸菌では7つのシグマ因子が知られているが、この中で σ^{70} (*rpoD* 遺伝子産物)がハウスキープ遺伝子の転写に関与する主要シグマ因子である。

植物の葉緑体(色素体)は、環状の二本鎖DNAからなるオルガネラ自身のゲノムをもつ。葉緑体のゲノムは、90~290 kb ほどのサイズであるが、高等植物では120~160 kb 程度と比較的類似したサイズである。高等植物の色素体ゲノムDNA上には、約120個の遺伝子が存在し、それらは色素体における遺伝情報の発現、光合成系、および代謝・生合成系の遺伝子群の三つに大きく分けることができる。これらの遺伝子は、いずれも酸素発生型の光合成を行う細菌、すなわちラン藻の対応する遺伝子と近縁である。特に、ラン藻のRNAポリメラーゼのコア酵素サブユニットに対応する遺伝子群やrRNA, tRNA, およびタンパク質の一部が含まれている。その構造と構成、転写・翻訳などの遺伝子発現系は核ゲノムのものと大きく異なり、真正細菌、特にラン藻のものと類似性が高い。植物細胞の色素体が原始ラン藻の細胞内共生に由来するとする細胞内共生説の有力な根拠となっている。

ここでは、ウイルス(バクテリオファージT4)とその宿主細胞(大腸菌)とのゲノム間、および植物細胞における葉緑体(プラスチド)と核ゲノムとからなる複合ゲノム系における基本遺伝システムとゲノム間相互作用の解析とそれに関連

した事項を中心に述べる(図1)。特に、異なるゲノムに由来する二つ以上の生体分子間の特異的な相互作用による“ハイブリッド複合体”^{1)~3)}をベースとする基本遺伝システムの解析について、その普遍的な構造、機能、発現、発現制御の実体を中心にまとめた。

2. 宿主機能 TabB と T4 gp31 の相互作用

最初に、宿主菌への吸着とDNAの注入は正常であるが、その後の感染プロセスのどこかが異常になったために正常なウイルス増殖が阻害されるような宿主菌の変異体 *tabB* とその解析について述べる。この研究は、まず最初の介助タンパク質(シャペロン)の発見として、その概念の確立と研究の展開に重要な役割を果たしたのみならず、さらに次項で取り上げるように異なるゲノムに由来する二つ以上の生体分子間の特異的な相互作用による“ハイブリッド複合体”研究の端緒となった^{1)~3)}。

特定の条件下に野生型のT4感染が不成功に終わるような新しいクラスの大腸菌の条件変異体は、*tab* (achronym, T4 abortive infection) と呼ばれる^{1), 4)}。T4 (あるいはT6) フェージの生産が温度感受性であるような大腸菌 K12 (株) の二つの突然変異体 (*tabB*-212 と *tabB*-217) は、いずれも *purA* に連鎖しており、一つの新バクテリア遺伝子 *tabB* と同定された。非感染菌は、30℃、42℃ のいずれにおいても野生型株と区別ができない。T4 野生型株を感染した *tabB* 株細胞の標識した抽出物の SDS-PAGE による解析によって、ウイルス

図1 ウイルス感染とオルガネラにおけるゲノム間相互作用

A. ウイルス感染とゲノム間相互作用。PV, PB はそれぞれウイルスと宿主遺伝子産物を示す

B. 細胞内共生体とゲノム間相互作用。左側は、かつて起こった細胞内共生を、右側は、現在の植物細胞を表す。cp-DNA、葉緑体DNA。

図2 T4 感染細胞におけるゲノム間相互作用の概念図

頭部タンパク質前駆体⁵⁾のプロセッシング(切断)が起っていないことが明らかにされ、頭殻形成がブロックされていることがわかった。このような欠損表現タイプは、遺伝子31のamber変異体を su^- 株に感染させた場合と酷似していた。

tabB 変異体に対して二つのタイプのT4ファージ変異体を得られた。一つは*tabB*株で増殖できるようになったT4 *com^B* (compensate) 変異体で、もう一つはT4野生株の増殖できる許容温度(30°C)でも*tabB*変異体で増殖できないような*k^B* (kill) 変異体である。T4 *com^B*, *k^B*のいずれの変異もともに遺伝子31にマップされたことから、宿主*tabB*遺伝子産物とT4遺伝子31産物との間の特異的な相互作用が示唆された。また、T4 *com^B* 変異体の増殖を許さないような*tabB*変異体も得られた。T4, *k^B*, *com^B*のいずれも非許容条件では、T4遺伝子31欠損株の(非許容条件における)感染の際に見られる頭殻前駆体タンパク質(gp23, gp24など)のランダムな凝集(lumps)が認められた^{1), 4)}。これらの結果は、宿主遺伝子*tabB*の産物は、秩序だった頭殻タンパク質の構造形成(集合)に必須であることを示している。

ほぼ、時を同じくして、別の複数の研究グループによって、 λ あるいはT4の増殖を許さなくなった宿主大腸菌の突然変異体(*mop*, *groE-1*)が分離されている^{6)~9)}。*tabB*, *mop*, *groE-1*は、いずれも*purA*とリンクしており、同じ遺伝子の変異であると考えられるに至る。*groE*変異体はもともと λ ファージの増殖を許さない宿主株として取得されたもので、この変異体でプラークを形成できるようになった λ 変異体は、 λ の主要頭殻タンパク質の遺伝子*E*, あるいは頭殻形態形成に関与する遺伝子*B*にマップされている。*tabB*は、*groEL*と同一の遺伝子であるが、 λ ファージとT4ファージの頭殻形成における大きな相違点は、 λ ファージではGroEL-GroESの複合体が主要頭殻タンパク質の秩序だった構造形成に関与するのに対し、T4ではGroESではなくて、TabB(=GroEL)とT4ファージの遺伝子31産物(gp31)からなる複

合体が関与していることである^{1), 4), 10), 11)}。このように、*tabB*や*groE*は、T4や λ の頭殻形成に関与する宿主遺伝子として同定されたが、他のタンパク質のフォールディングや、集合、安定性、分解などで広範な働きをしている介助タンパク質(シャペロン)の最初の発見であり、シャペロンの概念の確立にも重要な役割を果たした。

現在、シャペロニン60(CPN60あるいはGroEL=TabB)とその機能的パートナーであるCo-シャペロニン10(CPN10あるいはGroES, T4 gp31)は、共同して他のタンパク質のフォールディングや集合を介助することが明らかにされている^{12)~15)}。これらの必須タンパク質¹⁶⁾は、真正細菌の細胞質内やミトコンドリア、クロロプラストのマトリックス内にも見いだされている。GroEL (TabB)は、コア構造をもつ特徴的な二重の円筒状構造をしており14量体の60 kDサブユニットで、ATPase活性をもつ。

3. “ハイブリッド複合体”と宿主RNAポリメラーゼ

a. モデルシステムとしてのTabB-gp31ハイブリッド複合体

感染後に発現するウイルスゲノムの遺伝子産物と宿主ゲノム遺伝子の産物とはウイルス感染のさまざまな段階で特異的な相互作用を行っていることを推察することができる。例えば、宿主の酵素あるいは他のタンパク質のウイルス遺伝子産物による修飾は、特異的なウイルスタンパク質(modifier)と宿主タンパク質(酵素あるいはオルガネラコンポーネント)の間の物理的な相互作用を仮定することによって無理なく説明できる。このような相互作用をベースとするハイブリッド複合体は、TabB-gp31の系で典型的に見られたような遺伝的、生化学的な特徴をもつことが期待される。

ハイブリッド複合体は、次のように一般化して表すことができる。

$$PV + PB \rightleftharpoons PV/PB$$

ここでPBはバクテリアのタンパク質サブユニットをPVは、ウイルスのタンパク質サブユニットである。非感染菌におけるPBの機能は、宿主特異的で、PVと会合することによってウイルス特異的に変化する。PBとPVとの会合は、ウイルスの増殖に必要である。筆者らは、特異的なハイブリッド複合体が、複合体のヘテロロガスなサブユニット間における相互作用(あるいは、集合)に影響するような宿主あるいはウイルスのミスセンス突然変異の分離によってこの関係を遺伝的に追跡することができると考えた。このような宿主およびウイルス相互作用変異体は特異的な性質をもつものと考えられる。

二つの突然変異体タンパク質サブユニットの間の相補は、一方の変異体タンパク質におけるミスフォールディングが相互作用によってもう一方のミスフォールディングを解消するか、あるいはもし各々の突然変異体タンパク質において正常

にフォールドした領域がもう一方のミスフォールドした領域を訂正するとすると、ポジティブとなる(タイプ I, II). これに対し、二つの異なる突然変異をもつ対立遺伝子からのタンパク質サブユニットのそれぞれ無害なミスフォールドが相互増強によって致死性の組合せ(*tab/k*)となるような相互作用を生じることがある. ネガティブ・コンプリメンテーションは、T4 感染細胞において形成されるハイブリッド複合体において容易に検出することができる(タイプ III). タイプ III に相当する宿主変異体は、特定の T4 ミスセンス変異体(例えば温度感受性株)の増殖を許容温度でも許さないような宿主の変異体として取得することができると期待される.

b. *tabD* 変異体とシグマ置換

遺伝子 55 の温度感受性変異体(*ts553* および *tsA81*)をハイブリッド複合体の *k* 変異体として用いることにより、本来の許容温度である 30°C において増殖を許さないような宿主変異株(*tabD*)を取得した^{2), 3)}. すなわち、*ts553* と *tsA81* は、*tabD* 変異体に対して *k^D* として挙動し、他の遺伝子の温度感受性変異体(例えば、遺伝子 42 の *tsLB1* や遺伝子 23 の *tsN37*)は、T4 の野生株と同じように増殖できる. *tabD* 変異は大腸菌の *rif^R* 遺伝子にリンクしており、RNA ポリメラーゼのコアサブユニットの遺伝子(*rpoB*)の変異であると考えられた. *tabD* 変異体の非許容条件では、後期タンパク質の合成抑制と Gp32 の過剰生産、後期転写の抑制、mRNA 拮抗阻害実験においても後期遺伝子発現の異常になっていることが確認された. 遺伝子 55 の温度感受性変異体の 30°C におけるプラーク形成能の欠如は、非許容温度における遺伝子 55 の温度感受性の性質と全く同じであった. *tabD* 変異体では、遺伝子 45 の変異体(*tsCB53*)の増殖も抑制されることがわかった. 遺伝子 45 は、DNA 合成欠損の変異(D0)として分類されているが、同時に後期転写にも必須の役割を果たしていることが示唆される.

後期転写と複製のコントロールを行っている T4 遺伝子 45 の温度感受性変異の一つ(*tsCB53*)も、潜在的な *k* の性質をもっている. これで大腸菌を選択すると T4 野生型は正常に増殖するが、30°C で *tsCB53* あるいは *ts553* が増殖できない. *ts553* で選択した場合に得られるものとよく似た変異体を得られた. 後期転写はブロックされていたが、複製はブロックされていなかった. *tab* によって生じた欠損は、*tab⁺* を遺伝子 45 の amber 変異体で感染したときに見られる. 後期転写と複製のブロックとは異なっていた. T4 遺伝子 55 の産物、45 の産物、それから *tabD* 変異体によって同定された宿主タンパク質は、複合体を形成し、後期転写に関連すると思われる. なお、遺伝子 33 のミスセンス変異体も潜在的な *k* として働くことが予想される.

tabD 株では、コアサブユニットに変異をもつ宿主 RNA ポリメラーゼコア酵素が T4 の遺伝子 55 あるいは遺伝子 45 のミスセンス変異によってネガティブ・コンプリメンテーシ

ョンを受けて機能を失ったと考えられる. このことは、T4 遺伝子 55 の産物(gp55)が後期転写のシグマ因子として宿主の RNA ポリメラーゼコア酵素とあらたなホロ酵素を形成するとするシグマ置換の考え方を支持する^{2), 3), 17)~20)}.

c. シグマ置換による転写調節

初期転写は、基本的に宿主プロモーターに類似しており、宿主の σ^{70} を含む RNA ポリメラーゼホロ酵素によって認識されるプロモーターから起こる. 複製と組み換えの際に、無数のニックやギャップが生じ、このような構造が後期転写の“エンハンサー部位”として働く. T4 ファージゲノムからの真の後期転写には、 σ^{gp55} がコア RNA ポリメラーゼに結合することによって後期プロモーターを認識するホロ酵素の形成が形成されること、ならびにエンハンサー部位への DNA 複製に必要な特有のタンパク質の結合が必要である. これら二つの前提条件が満たされないと、後期 mRNA は低レベルか、あるいは全く作られない. gp55 は、非修飾の非感染大腸菌から調製した RNA ポリメラーゼコア酵素に T4 後期プロモーターからの選択的な転写能を与える¹⁹⁾. しかし、*in vivo* における真の後期転写には、gp55 のほかに gp33, gp44, gp45, gp62 などの遺伝子産物と一本鎖 DNA 構造を含むエンハンサー部位の存在が必要である^{2), 3), 21)}. 筆者らは、*cat* あるいは *lacZ* をリポーターを用いて T4 の調節領域を解析する系を構築し、シス、すなわち T4 ゲノム中およびトランス、すなわちプラスミド上における初期、後期プロモーターの構造と機能の検証を行った^{22), 23)}. T4 後期遺伝子のプロモーターのコンセンサス配列は、-10 領域の TATAATA 配列であることが明らかにされている²⁴⁾.

後期転写に関与する gp44, gp62, gp45 の三つタンパク質は、プロモーターの開鎖複合体(open promoter complex)の形成を容易にするような複合体を形成する²¹⁾. これらのサイトの各々が gp44/62 からなるクランプ装填(clamp loader)複合体による仲介によって gp45 (スライド式クランプ, sliding clamp) との 3 量体に対する装填サイトとして働くと考えられている. スライド式クランプは、鋳型 DNA に転写あるいは複製装置を固定し、DNA に沿って移動するための仕組みで、DNA 上を長距離移動しても容易に脱落しないようにしている^{21), 25)}.

d. その他の *tab* 変異体

詳細は述べないが、*tabC* 変異体と *com^C* 変異体が取得解析されており、大腸菌の転写終結因子であるロー(ρ 因子)に変異があることが明らかにされている^{26)~29)}.

4. 宿主機能シャットオフと T4dC ファージ

a. 宿主機能のシャットオフ

T4 ファージ感染後に見られるウイルスと宿主の間の機能

的複合体、ハイブリッド複合体形成の典型的な二つの例について述べたが、それ以外のさまざまな段階で宿主機能とウイルスの相互作用が見られる。その一つが T4 感染後に見られる宿主機能のシャットオフで T4 の *ndd*, *unf*, *alc*, *motA*, *asiA* などの遺伝子がさまざまな段階で関与している。

T4 の感染によって宿主細胞の基本遺伝システムはさまざまなレベルで修飾、改変を受ける。その一つは、T4 ファージの感染に伴って起こる宿主ゲノムにおける複製、転写などの機能のシャットオフである。これらはいくつかのステップで重層して起こることが知られている。ファージ DNA の注入に伴って最初に見られる現象の一つが T4 *ndd* (nuclear disruption defective) 遺伝子によって起こる宿主のヌクレオイド(核様体)構造の変化と複製の停止である^{30)~33)}。初期のファージ特異的なタンパク質の一つが Ndd で、これは宿主の核様体の破壊をひき起こす。破壊は核様体構造の破壊であって、宿主 DNA に直接的なダメージを与えるものではない。このことは DNA 修復システムの誘導が見られないことからわかる。クローン化して見ると、*ndd* 遺伝子は温度感受性変異をもたせないと宿主細胞にとって致死的である^{32), 34)}。

一方、T4 ファージ感染後には、宿主の核様体がコンパクトな状態から解けたルーズな状態に変化する現象が知られており、核様体のアンフォールディング(unfolding)と呼ばれている。このような核様体のアンフォールディングにかかわる遺伝子として同定されたのが、*unf* 遺伝子で宿主転写のシャットオフに直接かかわっている^{35)~38)}。また、T4 は感染後、dC を含む DNA からの転写を特異的に阻害することが知られていたが、このような阻害を克服する T4 の変異体から同定されたのが、*alc* 遺伝子である³⁹⁾。その後、*unf* と *alc* は同一の遺伝子であることが判明した。Alc/Unf 遺伝子産物は、19 kD の比較的小さなタンパク質である^{40)~42)}。Alc タンパク質は、*in vitro* で T4 感染後の RNA ポリメラーゼの転写開始ではなく、伸長反応に影響することが報告されていたが⁴²⁾、RNA ポリメラーゼのコア酵素と結合し、シトシンを含む DNA ストレッチ (Alc ボックス) を感知して転写を止める働きをもつ一種の転写終結因子と考えられている^{43), 44)}。

中期プロモーターは、-10 領域と-30 塩基を中心とする MotA ボックス配列 (-34 から-26 のコンセンサス配列は 5'TTGCTTA3') からなり、転写の開始には、ここに MotA タンパク質が結合することが必要である。MotA はシグマ因子そのものではなく、 σ^{70} に直接結合する。また、中期プロモーターからの転写開始には MotA 以外にコアクチベーターとして AsiA タンパク質が必要である。AsiA はフリーの σ^{70} と素早く結合する性質をもつことから、初期プロモーターからの転写を阻害するが、MotA の働きを助けるコアクチベーターである^{45)~47)}。MotA/AsiA 結合体が中期プロモーターを活性化の様式は、*lac* プロモーターへの CRP の結合と類似しており、さらにプロモーターのスイッチングを仲介する真核細胞の TAFs (TATA 結合タンパク質会合因子群) の相

当物ではないかと考えられる⁴⁸⁾。

このように、宿主の複製あるいは転写装置に特異的に結合することによってそれらの活性阻害、機能特異性の変換などをひき起こす T4 の遺伝子産物である Ndd, Alc (=Unf), AsiA, MotA などは、いわゆるハイブリッド複合体を形成していると考えられる。

b. T4dC ファージ

T4DNA 中の HMdC 残基は、ウイルス感染によって細胞内代謝系が改変され、dCTP の代わりに HMdCTP が造られることによってもたらされる(図 3)。dCTPase-dUTPase をコードする T4 の遺伝子 56 と dCMP hydroxymethylase をコードする遺伝子 42 に欠損変異(いずれも amber 変異)をもたせ、さらにシトシン含有の DNA の分解にかかわる T4 のエンドヌクレアーゼ IV (*denB* 遺伝子産物)を欠損させると HMC (HMC-DNA) ではなくて、通常のシトシンを含んだ T4DNA (dC-DNA) が合成される³⁹⁾。ところがこのような変異体では、DNA は合成されるが成熟型ファージはできてこない。

T4 の多重変異体 (gene 42⁻, gene 56⁻, *denB*, *alc*) は、非許容条件(遺伝子 42 と 56 には、amber 変異を用いているので *su⁻* 株でかつ制限系の欠損した宿主大腸菌株)でプラーク形成能を示す³⁹⁾。筆者らは、*denB* 遺伝子に点突然変異 (*denB*-s19)を導入した、プラーク形成能のある dC-DNA 含有 T4 ファージ (T4dC(+)) を造成した。野生型の T4DNA は、すべてのシトシン残基が HMdC ヌクレオチドで置換され、さらに HMdC 残基がグルコシル化されているために、*in vivo*, *in vitro* で制限酵素に非感受性であるのに対し、T4dC (+) ファージは、*in vivo* および *in vitro* で宿主の制限系に感受性となる^{49)~51)}。このファージは、*su⁺* の宿主菌では、野生型と同じ HMdC 型の DNA となり、*su⁻* 株ではほぼ 100% が dC 型の DNA となっている。T4dC(+) ファージは、*rII*-*denB* 領域に大きな欠失をもたないことから、T4 の制限酵素地図の作成に大きく貢献した。

T4dC ファージの造成によって、制限酵素で切断することが困難であった T4 ファージの DNA を塩基配列特異的に切断することができるようになり、従来は困難であった T4 ファージに関連するさまざまな現象の解析が進展した。T4dC (+) ファージの DNA のサイズは λ DNA のほぼ 3 倍あることから、制限酵素のアッセイの際の DNA 基質として有用である。StuI, ScaI などの放線菌由来の新規制限酵素は T4dC-DNA を用いて行われた^{51)~54), 58)}。また、T4dC ファージでは、宿主やプラスミドの DNA をファージ頭殻に包み込んだ形質導入ファージの形成が高頻度で起こる^{55)~57)}。特に、pBR322 などのプラスミド、あるいはその誘導体では、形質導入ファージの溶菌液を作製する際に T4 ファージの複製・組換え系によるプラスミドの複製によって head-to-tail のタンドム型のプラスミド DNA ができる^{56), 57)}。T4 ファージに

図3 T4 HmdC-DNA 生合成系

DNA断片を組み込むことも容易に行えるようになった^{59)~61)}ばかりでなく、T4の制御領域の評価系やT4のプロテアーゼ阻害タンパク質PinAを利用した発現・生産系の造成が試みられた^{62)~65)}。

5. 真正細菌における主要型シグマ因子

ここでは、筆者らが見いだした真正細菌群における主要型シグマ因子について述べる。主要型シグマ因子は、構造的に大腸菌の σ^{70} に代表される主要シグマ因子に極めて類似しており、機能的にも近いと考えられる。いずれも主要シグマ因子とコアRNAポリメラーゼを共有して、ハイブリッド複合体類似の構造体として機能していると考えられる。

a. 真正細菌における主要型シグマ因子群

シグマ因子は、共通のコアRNAポリメラーゼ複合体(E)と結合してプロモーター選択性、転写開始能をもつホロ酵素(E σ)を形成する。大腸菌では7つのシグマ因子が知られているが、この中で σ^{70} (*rpoD*遺伝子産物)がハウスキーピング遺伝子の転写に関与する主要 σ 因子である。ここでは、真正細菌における主要シグマ因子と主要型シグマ因子群(グループIIシグマ因子)、さらに大腸菌における主要型シグマ因子 σ^{38} (*rpoS*遺伝子産物)について述べる。

筆者らは大腸菌と枯草菌の主要シグマ因子タンパク質の間で保存されている*rpoD*ボックス領域^{66), 67)}をもとに設計・合成したDNAプローブ(*rpoD*プローブ)を用いて放線菌、大腸菌、ラン藻類など多くの真正細菌のゲノム上に複数の*rpoD*相同遺伝子が存在することを発見・報告した^{68)~77)}。このことは従来より知られているハウスキーピング遺伝子の転写用の主要シグマ因子以外にこれらと基本骨格構造を共通に

もつ主要型シグマ因子(遺伝子)群が広範な真正細菌に存在することを示している。主要型シグマ因子群はグループIIシグマ因子とも呼ばれている⁷⁸⁾。また、*Bacillus*属や*Clostridium*属、*Lactococcus*属などでは、むしろ例外的に主要シグマ因子のみで主要型シグマ因子はもっていない⁷⁶⁾。これらの多くが内生孢子を形成するが、主要型シグマ因子の存在しないことと関係があるかもしれない。

主要型シグマ因子の働きについては、次に述べる σ^{38} 以外では、らん藻(*Synechococcus* sp. 7942)の主要型シグマ因子遺伝子*rpoD2*の欠損によって概日性リズムの増幅が弱まることが認められている⁷⁹⁾。また同じ株の4つの主要型シグマ因子遺伝子の産物が*in vitro*において主要シグマ因子と一部共通したプロモーター選択活性をもつことを確認している⁸⁰⁾。

b. 定常期特異的転写開始因子 σ^{38}

大腸菌が定常期に入ると細胞が小振りになり、薬剤などに対する抵抗性の増大など形態的・生理的に大きな変化が起こる。これらの変化は、定常期に発現している遺伝子の質と量を反映している。このような定常期に特異的な遺伝子の発現に関与する調節遺伝子として見いだされたのが*rpoS*である^{81), 82)}。この遺伝子は、もともとは定常期特異的なHPHIIカタラーゼの遺伝子、*katE*の発現を正に制御する遺伝子、*katF*として発見・研究されてきた^{81), 83), 84)}。また、別の定常期特異的な発現を行う遺伝子の調節遺伝子としても同定されていた。その後、遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質のアミノ酸配列⁸⁴⁾から、定常期特異的なRNAポリメラーゼの転写開始因子(シグマ因子)の遺伝子であることが予想され、*rpoS*(sigma of stationary phase)と呼ばれることとなった⁸⁵⁾。現在、定常期あるいは高浸透圧誘導性の遺伝子群の転写調節に中心的な役割を果たしているグローバルレギュレーターと考えられている^{82), 86)~88)}。

筆者らは、精製したRpoSタンパク質とRNAポリメラーゼコア酵素(Eで表示)から再構成したホロ酵素を用いた*in vitro*の転写実験によって、RpoSタンパク質が特異的な転写開始活性をもつこと、すなわちシグマ因子であることを確認するとともに、その分子サイズが38 kDであることから、これを σ^{38} と命名した⁸⁹⁾。E σ^{38} は、主要シグマ因子、E σ^{70} と一部共通したプロモーターを認識する。すなわち、E σ^{70} によって認識されるプロモーターの中でもよく知られている*lacUV5*や*trp*など一群のものは同時にE σ^{38} によっても認識される。一方、*alaS*や*rplJ*などのグループは、E σ^{70} のみによって認識され、E σ^{38} によっては認識されない。さらに、*fic*プロモーターなどはE σ^{38} による認識が効率よく行われるが、E σ^{70} によってはあまり良く認識されないものも存在することがわかった^{89), 90)}。このように大腸菌のプロモーターは、E σ^{70} とE σ^{38} の両方によって効率よく認識される種類(タイプI)、E σ^{70} によってのみ認識されるもの(タイプII)、および

$E\sigma^{38}$ によってのみ認識されるもの (タイプ III) の三つのグループに大きく分けられる。タイプ I として分類されたプロモーターは、大腸菌の栄養状態や増殖の時期とは関係なく発現する、いわゆるハウスキーパー型遺伝子のプロモーターに対応している。これに対し、タイプ II の $E\sigma^{70}$ によってのみ認識されるプロモーターは、活発に増殖している大腸菌細胞では強く発現しているが、栄養源が枯渇した条件や定常期に入った細胞ではほとんど発現が停止してしまうストリンジェント (stringent promoter) 遺伝子群に対応している。

このように大腸菌細胞には二つのシグマ因子 (主要型シグマ因子) が存在し、増殖条件に応じた遺伝子発現のグローバルな調節を行っているものと考えられる。プロモーターや転写調節にかかわる DNA 上のエレメントは、個々の遺伝子の発現とその制御に重要であるが、転写装置そのものの特異性を変換するような遺伝子発現の調節は、比較的限られた条件における一過的な系、例えば熱ショック応答時における熱ショック σ (σ^{32}) の出現と特定のプロモーターの認識、あるいは枯草菌における孢子形成過程に典型的に見られるマイナー型シグマ因子の逐次的な発現、すなわち σ カスケードなどで知られてきた。しかしながら、定常期や増殖停止期の細胞という必ずしも一過的ではない生理的条件下で働くこと、さらに σ^{38} やらん藻の主要型シグマ因子で見られる⁸⁰⁾ ように、主要シグマ因子と構造的・機能的に共通性が高いことから、 σ^{38} の解析によってシグマ因子の転写開始機構の解明につながるものが期待される。

定常期には、 $rpoS$ 依存の発現を示す遺伝子群からの発現が増大する。また、タンパク質のレベルでみると σ^{70} の量が対数増殖期、定常期を通じて細胞当たりの量がほとんど変化しないのに対し、 σ^{38} は対数期にはほとんど認められず、高浸透圧細胞や定常期細胞にはその量が著しく増大している⁸⁹⁾。 $rpoS$ 遺伝子の上流域の遺伝子構造やプロモーターの解析を行った結果から、定常期特異的な σ^{38} タンパク質量の増加は、転写レベルの変化によっては部分的にしか説明できない^{91), 92)}。 $rpoS$ 遺伝子の発現には、ヒストン様タンパク質 H-NS (大腸菌のヒストン様タンパク質) による抑制の解除⁹³⁾、 $rpoS$ mRNA からの翻訳を促進する HF-1 因子の誘導合成⁹⁴⁾、ならびに σ^{38} の安定化が関与している。H-NS はむしろ非特異的に定常期、高浸透圧時の転写を抑えているように見える。*In vivo* では多数の遺伝子の発現が $rpoS$ 依存性を示す^{91), 95), 96)} が、H-NS タンパク質の遺伝子 (*hns*) が欠損するとこの依存性は消失する^{97), 98)}。これとは別に緊縮制御のエフェクターである ppGpp も $rpoS$ の発現を促進する働きをもつとされている⁹⁹⁾。

このように RpoS 遺伝子の定常期・高浸透圧誘導は、さまざまなレベルにおける調節があることが示されてきているが、これらの中で特に σ^{38} の安定化が最も重要であると考えられる。 σ^{38} は対数期には急速に、定常期にはよりゆっくりと分解される¹⁰⁰⁾。 σ^{38} の分解は、RssB (= SprE, MviA) と

ClpXP プロテアーゼに依存している^{101), 102)}。RssB タンパク質は、タンパク質分解活性を調節する一種のレスポンスレギュレーター (orphan) であると考えられている。リン酸化によって活性化を受け、 σ^{38} に特異的に結合することによって、ClpX/ClpP による分解へと導くサイクルを形成する^{103)~107)}。

σ^{38} と σ^{70} とは、領域 1, 2, 3, 4 の全域で高いアミノ酸同一性を示すが、特に領域 2 から 4 の 230 アミノ酸残基については部分的な違いを除けば、極めて保存性が高い (図 4)。したがって、 σ^{38} はコア酵素との相互作用、アクチベーターによる活性化、転写開始などの点で主要シグマ因子 σ^{70} と共通の機構をもっていると考えられる。領域 2.4 の直ぐ下流の“Turnover エレメント”と呼ばれる領域 (Lys-173 が最重要) にリン酸化された RssB が結合することが σ^{38} によって分解が促進される^{104), 107)}。RssB は分解されずに再び σ^{38} と結合することから、触媒的に作用する。領域 2.4 は、プロモーターの認識にかかわる機能領域であるが、Turnover エレメントもプロモーター認識にかかわっている可能性がある¹⁰⁷⁾。一方、 σ^{38} ファミリー間で特異性の高い C-末端側の 16-アミノ酸領域 (aa. 315~330) (“C 末端エレメント”) を除いても、コア酵素との結合は維持される。*In vitro* での転写解析から、C-末端エレメントを除いた σ^{38} は、高濃度の K-glutamate に対して感受性となり、 σ^{38} 転写活性が著しく低下する¹⁰⁸⁾。

6. 植物細胞における色素体とハイブリッド複合体

a. 色素体とハイブリッド複合体

高等植物の色素体ゲノム DNA 上には、約 120 個の遺伝子が存在し、それらは色素体における遺伝情報の発現にかかわる遺伝子群、光合成系にかかわる遺伝子群、代謝・生合成系の遺伝子群の三つに大きく分けることができる。これらの遺伝子は、いずれも酸素発生型の光合成を行う細菌、すなわちラン藻の対応する遺伝子と近縁であり、植物細胞の色素体が原始ラン藻の細胞内共生に由来するとする細胞内共生説の有力な根拠となっている。しかしながら、植物色素体ゲノムにコードされている約 100~200 個の遺伝子は、ゲノムの全塩基配列の決定されている *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノムによってコードされる遺伝子の数 (約 3300)¹⁰⁹⁾ と比較して 3~6% と非常に少ない。大部分の共生原始ラン藻に由来する遺伝子は共生後失われたか、核ゲノムへ移行したものと考えられている。葉緑体やさまざまな色素体の形成や分化、構造や機能にどの程度の遺伝子が必要であるかは現在のところと推定の域をでないが、核ゲノム上に 1000 個から最大 5000 個程度の色素体タンパク質をコードする遺伝子が存在するとされている^{110), 111)}。

プラスチドゲノム上の遺伝子では、色素体の機能と構造をまかなうには明らかに不足しており、その多くを核へと移行

図4 大腸菌の σ^{70} と σ^{38} の機能領域と構成

大腸菌の主要 σ 因子(σ^{70})と主要型シグマ因子(σ^{38})間の保存配列の構成を示す。領域1~4は主要シグマ因子の機能領域を示す(P. Stragier *et al.*, 1985; T. Shiina *et al.*, 1991; K. Tanaka *et al.*, 1991)。 σ^{70} は、領域1と2の間の間が短い。括弧内に両シグマ因子タンパク質のアミノ酸残基数を示してある。

した遺伝子に依存している。核コードの色素体関連遺伝子群は、転写翻訳の後に色素体内に輸送されて、本来の機能を果たしていると考えられる。実際に、オルガネラと核との間の信号伝達系や色素体に局在する多くの構造体や酵素系がオルガネラゲノム由来と核ゲノム由来の遺伝子産物の間におけるハイブリッド複合体を形成していることが指摘されている^{112)~114)}。ミトコンドリアと色素体の二つのオルガネラと核にゲノムをもつ複合ゲノム系としての植物細胞は、ハイブリッド複合体の存在なしには考えられない。

b. 色素体の転写装置と核コードシグマ因子

色素体の転写装置について考察する。色素体では、少なくとも2種類の転写装置が働いていると考えられている。一つは、NEPと呼ばれる核コードの色素体RNAポリメラーゼ(nuclear-encoded RNA polymerase)であり、もう一つはPEP(plastid-encoded RNA polymerase)である^{115)~117)}。前者は、T7ファージ様のシングルポリペプチドからなるRNAポリメラーゼであり、後者は真正細菌様のコア酵素と転写開始因子(シグマ因子)とからなる複合酵素である。葉緑体のゲノムには、大腸菌のRNAポリメラーゼ、より正確にはラン藻のRNAポリメラーゼのコア酵素サブユニット α , β , β' , γ に対応する $rpoA$, $rpoB$, $rpoC1$, $rpoC2$ 遺伝子が存在する。ところが、色素体ゲノム上には、コア酵素サブユニットの遺伝子は存在するが、プロモーター配列を認識して転写を開始する能力を付与するシグマ因子(転写開始因子)の遺伝子は存在しない。

PEPの σ 因子をコードする核遺伝子のクローン化は、単細胞紅藻で最初に報告された。筆者らは、抗酸性単細胞紅藻、*Cyanidium caldarium* RK-1株より、ラン藻の主要シグマ因子の保存領域のアミノ酸配列(ref)を利用して、PEPのシグマ因子の遺伝子($sigA$, $sigB$, $sigC$)をクローン化し

図5 核ゲノムコードの葉緑体タンパク質

た^{118), 119)}。 $sigA$ について見ると、556 アミノ酸のポリペプチドをコードし、N-末端領域には、葉緑体への輸送に必要なトランジットペプチドに特徴的な Ser/Thr に富む配列を含んでいた。また、真正細菌の主要シグマ因子間で保存されている機能領域 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 3, 4.1, 4.2 と相同性の高いドメインをもっている。組換え体として発現、精製した SigA タンパク質(トランジットペプチドを除く)は、精製した大腸菌コア酵素とプロモーター選択性をもつホロ酵素を形成し、 tac , RNA I などのプロモーターを正しく認識し、転写を開始することがわかった。また、この抗体を用いることにより、SigA タンパク質が *Cyanidium* の葉緑体に局在化していることが示された。これらの結果は、PEP はコア酵素部分がプラスチドゲノムの遺伝子に由来し、シグマ因子部分が核ゲノムの遺伝子に由来するハイブリッド複合体となっていることを示している。ほぼ時を同じくして、別の単細胞紅藻の一種 *Galdieria sulphuraria* (筆者らは *Cyanidium caldarium* と呼んでいる) から PEP のシグマ因子と想定される遺伝子がクローン化された¹²⁰⁾。この遺伝子は、609 アミノ酸のタンパク質をコードしており、ラン藻の主要シグマ因子の保存領域と相同性の高い領域をもっていた。大腸菌で発現・精製したタンパク質の抗体は、部分精製した RNA ポリメラーゼ中の 55 kD のポリペプチドと交差した。

一方、高等植物のプラスチドの PEP に対するシグマ因子についても、シロイヌナズナ、イネなどで相次いでクローン化と解析が行われた^{121)~125)}。シロイヌナズナの三つの sig 遺伝子の cDNA から予想されるタンパク質の配列は、いずれも単細胞紅藻の PEP シグマ因子と同様に、真正細菌の RNA ポリメラーゼの主要シグマ因子と機能領域全般にわたって相同性を示した。プラスチドへのトランジットペプチドの存在と光誘導発現が認められた。筆者らはシロイヌナズナにおいては現在 6 種のシグマ因子遺伝子($sig1 \sim sig6$)を見いだし、それらの遺伝子産物の σ 因子活性や葉緑体への移行

などを明らかにした^{121), 126), 129)}. *sig2* については, T-DNA 挿入による遺伝子破壊株が葉緑体の形成に異常があることを見いだすとともに, 発生・分化過程における発現と機能の解析を行っている^{126), 127), 129)}. これらの核コードの色素体シグマ因子が植物細胞の発生や分化過程にどのように関与しているかは植物生理学のみならず, 応用上も極めて興味深い.

また, 植物核ゲノムの移動・分配にかかわると考えられるキネシン様モータータンパク質遺伝子 (*kat* 遺伝子群)^{130)~132)} やプラスチドの分裂・分配に関与する細菌型遺伝子 *minD* の単離・解析を行ってきた¹³⁵⁾. また, テロメラーゼの触媒サブユニット遺伝子 (*AtTERT*) の単離に植物で初めて成功するとともに, 植物の核ゲノムの維持・再編・発現に関与するシステムの解析を進めている^{133), 134)}.

7. 結 論

多くの生物が二つ以上のゲノムからの遺伝情報によって生命活動をしていることを述べてきた. ウイルスとその宿主ゲノム, 細胞内共生体としてのオルガネラと核のゲノムとの相互作用を, ハイブリッド複合体からとらえることができる. 生物はそれぞれ特殊な存在であり, 特殊な生命現象の解明を通じてのみそこに働いている一般的な原理を掘り起こすことができる.

本小論は, 複合ゲノム系におけるハイブリッド複合体を念頭にまとめたが, 紙面の制約もあり, 枯草菌, 放線菌関連の研究にはほとんど触れていないことをお許しいただきたい. なお, 本研究の流れは, 留学先のイタリア科学技術省 (CNR) の LIGB (国際遺伝生物物理研究所) で開始され, 東京大学応用微生物研究所の第二研究部 (平成 5 年改組により現分子細胞生物学研究所/分子遺伝・育種研究分野に名称変更) において展開されたものである. 研究推進にあたりご指導ご鞭撻をいただきました東京大学名誉教授池田庸之助先生, 同僚藤日向先生に心より感謝致します. また, 研究の方向づけを与えていただきましたナポリ大学教授 John F. Pulitzer 先生に深謝致します. 本研究は, 国内外の多くの共同研究者の方々, ならびに東京大学分子細胞生物学研究所分子遺伝・育種研究分野の田中 寛, 田村勝徳, 金丸研吾の各博士, 技術専門職員の大橋幸男氏, 小澤 (旧姓大久保) 節子さんをはじめ, 当研究分野に在籍された多くの方々の協力によって遂行されたもので, ここに深甚なる謝意を表します.

- 1) H. Takahashi, A. Coppo, A. Manzi, G. Martire, and J. F. Pulitzer: *J. Mol. Biol.*, **96**, 563-578 (1975).
- 2) A. Coppo, A. Manzi, J. F. Pulitzer, and H. Takahashi: *J. Mol. Biol.*, **96**, 579-600 (1975).
- 3) A. Coppo, J. F. Pulitzer, and H. Takahashi: *J. Mol. Biol.*, **96**, 601-624 (1975).
- 4) A. Coppo, A. Manzi, J. F. Pulitzer, and H. Takahashi: *J. Mol. Biol.*, **76**, 61-87 (1973).
- 5) U. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 681 (1970).
- 6) T. Takano and T. Kakefuda: *Nature New Biol.*, **239**, 34 (1972).

- 7) N. Sternberg: *J. Mol. Biol.*, **76**, 1-24 (1973a).
- 8) N. Sternberg: *J. Mol. Biol.*, **76**, 25-33 (1973b).
- 9) C. P. Georgopoulos, R. W. Hendric, S. R. Casjens, and A. D. Kaiser: *J. Mol. Biol.*, **76**, 45-60 (1973).
- 10) R. Niviskas and L. W. Black: *Gene*, **73**, 251-257 (1988).
- 11) S. M. van der Vies, A. A. Gatenby, and C. P. Georgopoulos: *Nature*, **368**, 654-656 (1994).
- 12) S. M. Hemmingsen, C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix, and R. J. Ellis: *Nature*, **333**, 330-334 (1988).
- 13) R. J. Ellis: *Curr. Biol.*, **4**, 633-635 (1994).
- 14) F. U. Hartl: *Nature*, **381**, 571-579 (1996).
- 15) J. F. Hunt, S. M. van der Vies, I. Henry, and J. Deisenhofer: *Cell*, **90**, 361-371 (1997).
- 16) O. Fayet, T. Ziegelhoffer, and C. P. Georgopoulos: *J. Bacteriol.*, **171**, 1379-1385 (1989).
- 17) A. Bolle, R. H. Epstein, W. Salser, and E. P. Geidushek: *J. Mol. Biol.*, **31**, 325-348 (1968).
- 18) J. F. Pulitzer and E. P. Geidushek: *J. Mol. Biol.*, **49**, 489-507 (1970).
- 19) G. A. Kassavetis and E. P. Geidushek: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5101-5105 (1984).
- 20) J. P. Leonetti, K. Wong, and E. P. Geidushek: *EMBO J.*, **17**, 1467-75 (1998).
- 21) K. Wong and E. P. Geidushek: *J. Mol. Biol.*, **284**, 195-203 (1998).
- 22) T. Noguchi, H. Takahashi, and H. Saito: *Gene*, **44**, 133-138 (1986).
- 23) T. Noguchi and H. Takahashi: *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 319-321 (1992).
- 24) T. Elliot and E. P. Geidushek: *Cell*, **36**, 211-219 (1984).
- 25) G. M. Sanders, G. A. Kassavetis, and E. P. Geidushek: *EMBO J.*, **16**, 3124-3130 (1997).
- 26) H. Takahashi: *Virology*, **87**, 256-265 (1978).
- 27) H. Takahashi and H. Yoshikawa: *Virology*, **95**, 215-217 (1979).
- 28) M. Caruso, A. Coppo, A. Manzi, and J. F. Pulitzer: *J. Mol. Biol.*, **135**, 959-977 (1979).
- 29) J. F. Pulitzer, A. Coppo, and M. Caruso: *J. Mol. Biol.*, **135**, 979-997 (1979).
- 30) D. P. Snustad and L. M. Conroy: *J. Mol. Biol.*, **89**, 663-673 (1974).
- 31) K. A. Parson and D. P. Snustad: *J. Virol.*, **15**, 221-224 (1975).
- 32) J. Y. Bouet, N. J. Campo, H. M. Krisch, and J. M. Louarn: *Mol. Microbiol.*, **20**, 519-528 (1996).
- 33) J. Y. Bouet, H. M. Krisch, and J. M. Louarn: *J. Bacteriol.*, **180**, 5227-5230 (1998).
- 34) D. P. Snustad, A. C. Casey, and R. E. Herman: *J. Bacteriol.*, **163**, 1290-1292 (1985).
- 35) D. P. Snustad, M. A. Tigges, K. A. Parson, C. J. H. Bursch, F. M. Caron, J. F. Koerner, and D. J. Tutas: *J. Virol.*, **17**, 622-641 (1976).
- 36) K. Sirotkin, J. Wei, and L. Snyder: *Nature*, **265**, 28-32 (1977).
- 37) M. Tigges, C. J. H. Bursch, and D. P. Snustad: *J. Virol.*, **24**, 775-785 (1977).
- 38) R. E. Herman, N. Haas, and D. P. Snustad: *Genetics*, **108**, 305-317 (1984).
- 39) L. Snyder, L. Gold, and E. Kutter: *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A., **73**, 3098-3102 (1976).
- 40) L. Snyder and L. Jorissen: *J. Bacteriol.*, **168**, 833-838 (1986).
 - 41) E. Kutter, R. Drivdahl, and K. Rank: *Genetics*, **108**, 291-304 (1984).
 - 42) R. H. Drivdahl and E. M. Kutter: *J. Bacteriol.*, **172**, 2716-2727 (1990).
 - 43) M. Kashlev, E. Nudler, A. Goldfarb, T. White, and E. Kutter: *Cell*, **75**, 147-154 (1993).
 - 44) K. Severinov, M. Kashlev, E. Severinova, I. Bass, K. McWilliams, E. Kutter, V. Nikiforov, L. Snyder, and A. Goldfarb: *J. Biol. Chem.*, **269**, 14254-14259 (1994).
 - 45) K. Adelman, E. N. Brody, and M. Buckle: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15247-15252 (1998).
 - 46) M. Sharma, P. Marshall, and D. M. Hinton: *J. Mol. Biol.*, **285**, 931-944 (1999).
 - 47) D. M. Hinton and S. M. Vuthoor: *J. Mol. Biol.*, **304**, 731-739 (2000).
 - 48) P. Marshall, M. Sharma, and D. M. Hinton: *J. Mol. Biol.*, **285**, 931-944 (1999).
 - 49) H. Takahashi, H. Saito, and Y. Ikeda: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **24**, 297-306 (1978).
 - 50) H. Takahashi, M. Shimizu, H. Saito, and Y. Ikeda: *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 49-53 (1979a).
 - 51) H. Takahashi, H. Saito, and Y. Ikeda: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 841-846 (1979b).
 - 52) H. Shimotsu, H. Takahashi, and H. Saito: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1665-1667 (1980).
 - 53) H. Shimotsu, H. Takahashi, and H. Saito: *Gene*, **11**, 219-225 (1980).
 - 54) T. Khosaka, T. Sakurai, H. Takahashi, and H. Saito: *Gene*, **17**, 117-122 (1982).
 - 55) K. K. Young, G. and J. Edlin, and G. G. Wilson: *J. Virol.*, **41**, 345-347 (1982).
 - 56) H. Takahashi and H. Saito: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 497-500 (1982a).
 - 57) H. Takahashi and H. Saito: *Plasmid*, **8**, 29-35 (1982b).
 - 58) H. Takahashi, H. Kojima, and H. Saito: *Biochem. J.*, **231**, 229-231 (1985).
 - 59) H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Noguchi, and H. Saito: *Virology*, **147**, 349-353 (1985).
 - 60) T. Yonesaki, T. Minagawa, and H. Takahashi: *Eur. J. Biochem.*, **148**, 127-134 (1985).
 - 61) H. Takahashi, M. Kobayashi, and H. Saito: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 7729 (1988).
 - 62) T. Noguchi and H. Takahashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 620-627 (1991a).
 - 63) T. Noguchi and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2497-2506 (1991b).
 - 64) T. Noguchi and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2507-2513 (1991c).
 - 65) T. Noguchi and H. Takahashi: *Mol. Gen. Genet.*, **239**, 393-399 (1993).
 - 66) P. Stragier, C. Parsot, and J. Bouvier: *FEBS Lett.*, **187**, 11, 15 (1985).
 - 67) J. D. Helmann and M. J. Chamberlin: *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 839-872 (1988).
 - 68) H. Takahashi, K. Tanaka, and T. Shiina: *Biol. Actinomycetes*, **7**, 58-63 (1988).
 - 69) K. Tanaka, T. Shiina, and H. Takahashi: *Science*, **242**, 1040-1042 (1988).
 - 70) H. Takahashi, K. Tanaka, and T. Shiina: *J. Cell. Biochem.*, **14A** (Suppl.), 97 (1990).
 - 71) K. Tanaka, T. Shiina, and H. Takahashi: *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 334-340 (1991).
 - 72) T. Shiina, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Gene*, **107**, 145-148 (1991).
 - 73) K. Tanaka, S. Masuda, and H. Takahashi: *Biochim. Biophys. Acta*, **1132**, 94-96 (1992a).
 - 74) K. Tanaka, S. Masuda, and H. Takahashi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 113-117 (1992).
 - 75) T. Sakamoto, M. Shirai, M. Asayama, T. Aida, A. Sato, K. Tanaka, H. Takahashi, and M. Nakano: *Int. J. System. Bacteriol.*, **43**, 844-847 (1993).
 - 76) T. Araya, N. Ishibashi, S. Shimamura, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 88-92 (1993).
 - 77) K. Tanaka and H. Takahashi: *Gene*, **150**, 81-85 (1994).
 - 78) M. Lonetto, M. Griboskov, and C. A. Gross: *J. Bacteriol.*, **174**, 3843-3849 (1992).
 - 79) N. F. Tsinoremas, M. Ishiura, T. Kondo, C. R. Anderson, K. Tanaka, H. Takahashi, C. H. Johnson, and S. S. Golden: *EMBO J.*, **15**, 2488-2495 (1996).
 - 80) A. Goto-Seki, M. Shirokane, S. Masuda, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Mol. Microbiol.*, **34**, 473-484 (1999).
 - 81) P. C. Loewen and B. L. Triggs: *J. Bacteriol.*, **160**, 668-675 (1984).
 - 82) P. C. Loewen and R. Hengge-Aronis: *Ann. Rev. Microbiol.*, **160**, 668-675 (1994).
 - 83) M. R. Mulvey, P. A. Sorby, B. L. Triggs-Raine, and P. C. Loewen: *Gene*, **73**, 337-345 (1988).
 - 84) M. R. Mulvey and P. C. Loewen: *Nucl. Acids Res.*, **17**, 9979-9991 (1989).
 - 85) R. Lange and R. Hengge-Aronis: *J. Bacteriol.*, **173**, 4474-4481 (1991).
 - 86) R. Kolter, D. A. Siegele, and A. Tormo: *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 855-874 (1993).
 - 87) R. Hengge-Aronis: *Cell*, **72**, 165-168 (1993).
 - 88) R. Hengge-Aronis: *Mol. Microbiol.*, **21**, 887-893 (1996).
 - 89) K. Tanaka, Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3511-3515 (1993).
 - 90) K. Tanaka, S. Kusano, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi: *Nucl. Acids Res.*, **23**, 827-834 (1995).
 - 91) Y. Takayanagi, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 525-531 (1994).
 - 92) K. Tanaka, K. Handel, P. C. Loewen, and H. Takahashi: *Biochim. Biophys. Acta*, **1352**, 161-166 (1997).
 - 93) M. Barth, C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer, and R. Hengge-Aronis: *J. Bacteriol.*, **177**, 3455-3464 (1995).
 - 94) A. Muffler, D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz, and R. Hengge-Aronis: *EMBO J.*, **15**: 1333-1339 (1996a).
 - 95) A. Abe, H. Matsui, H. Danbara, K. Tanaka, H. Takahashi, and K. Kawahara: *Mol. Microbiol.*, **12**, 779-788 (1994).
 - 96) R. Utsumi, S. Kusafuka, T. Nakayama, K. Tanaka, Y. Takayanagi, H. Takahashi, M. Noda, and M. Kawamukai: *FEMS Microbiol. Lett.*, **113**, 273-278 (1993).
 - 97) A. Olsen, A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, and S. Normark: *Mol. Microbiol.*, **7**, 523-536 (1998).
 - 98) A. Arnqvist, A. Olsen and S. Normark: *Mol. Microbiol.*, **13**, 1021-1032 (1994).

- 99) D. R. Gentry, V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen, and M. Cashel: *J. Bacteriol.*, **75**, 7982-7989 (1993).
- 100) T. Schweder, K. H. Lee, O. Lomovskaya, and A. Matin: *J. Bacteriol.*, **178**, 470-476 (1996).
- 101) A. Pratt and T. J. Silhavy: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 2488-2492 (1996).
- 102) A. Muffler, D. Fischer, and R. Hengge-Aronis: *Genes & Dev.*, **10**, 1143-1151 (1996b).
- 103) Y. Zhou and S. Gottesman: *J. Bacteriol.*, **180**, 1154-1158 (1998).
- 104) G. Becker, E. Klauck, and R. Hengge-Aronis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6439-6444 (1999).
- 105) K. E. Gibson and T. J. Silhavy: *J. Bacteriol.*, **182**, 4117-4120 (2000).
- 106) Y. Zhou, S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi, and S. Wickner: *Genes and Dev.*, **15**, 627-637 (2001).
- 107) E. Klauck, M. Lingnau, and R. Hengge-Aronis: *Mol. Microbiol.*, **40**, 1381-1390 (2001).
- 108) M. Ohnuma, F. Fujita, A. Ishihama, K. Tanaka, and H. Takahashi: *J. Bacteriol.*, **182**, 4628-4631 (2000).
- 109) T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, and M. Yamada: *DNA Res.*, **3**, 109-136 (1996).
- 110) W. Martin and R. G. Herrmann: *Plant Physiol.*, **118**, 9-17 (1998).
- 111) G. I. McFadden: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 513-519 (1999).
- 112) M. Surpin and J. Chory: *Essays Biochem.*, **32**, 113-1125 (1997).
- 113) A. Somanchi and S. P. Mayfield: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 404-409 (1999).
- 114) A. Barkan and M. Goldschmidt-Clement: *Biochimie*, **82**, 559-572 (2000).
- 115) W. R. Hess, A. Rombona, B. Fieder, A. R. Subramanian, and T. Borner: *EMBO J.*, **12**, 563-571 (1993).
- 116) L. A. Allison, L. D. Simon, and P. Maliga: *EMBO J.*, **15**, 2802-2809 (1996).
- 117) W. R. Hess and T. Borner: *Int. Rev. Cytol.*, **190**, 1-59 (1999).
- 118) K. Tanaka, K. Oikawa, N. Ohta, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, and H. Takahashi: *Science*, **272**, 1932-1935 (1996).
- 119) K. Oikawa, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Gene*, **210**, 277-285 (1998).
- 120) B. Liu and R. F. Troxler: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 3313-3318 (1996).
- 121) K. Tanaka, Y. Tozawa, N. Mochizuki, K. Shinozaki, A. Nagatani, K. Wakasa, and H. Takahashi: *FEBS Lett.*, **413**, 309-313 (1997).
- 122) K. Isono, M. Shimizu, K. Yoshimoto, Y. Niwa, K. Satoh, A. Yokota, and H. Kobayashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14948-14953 (1997).
- 123) Y. Tozawa, K. Wakasa, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 415-419 (1998).
- 124) M. Kestermann, S. Neukirchen, K. Kloppstech, and G. Link: *Nucl. Acids Res.*, **26**, 2747-2753 (1998).
- 125) K. Oikawa, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Gene*, **210**, 277-285 (1998).
- 126) K. Kanamaru, M. Fujiwara, M. Seki, T. Katagiri, M. Nakamura, N. Motizuki, A. Nagatani, K. Shinozaki, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Plant Cell Physiol.*, **40**, 832-842 (1999).
- 127) Y. Shirano, H. Shimada, K. Kanamaru, M. Fujiwara, K. Tanaka, and H. Takahashi: *FEBS Lett.*, **485**, 178-182 (2000).
- 128) M. Fujiwara, A. Nagashima, K. Kanamaru, K. Tanaka, and H. Takahashi: *FEBS Lett.*, **141**, 47-52 (2000).
- 129) K. Kanamaru, A. Nagashima, M. Fujiwara, H. Shimada, Y. Shirano, K. Nakabayashi, D. Shibata, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1034-1043 (2001).
- 130) H. Mitsui, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Nishikawa, and H. Takahashi: *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 362-368 (1993).
- 131) H. Mitsui, K. Nakatani, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Nishikawa, and H. Takahashi: *Plant Mol. Biol.*, **25**, 865-867 (1994).
- 132) K. Tamura, K. Nakatani, H. Mitsui, Y. Ohashi, and H. Takahashi: *Gene*, **230**, 23-32 (1999).
- 133) K. Tamura, H. Liu, and H. Takahashi: *J. Biol. Chem.*, **274**, 20997-21002 (1999).
- 134) K. Oguchi, H. Liu, K. Tamura, and H. Takahashi: *FEBS Lett.*, **457**, 465-469 (1999).
- 135) K. Kanamaru, M. Fujiwara, M. Kim, A. Nagashima, E. Nakazato, K. Tanaka, and H. Takahashi: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1119-1128 (2000).

プロフィール

高橋秀夫 たかはし・ひでお

東京大学教授 東京大学分子細胞生物学研究所

分子遺伝研究分野

昭和 16 年 12 月 26 日生まれ

〈略歴〉 昭和 44 年 3 月東京大学大学院農学系研究科博士課程修了

昭和 44 年 4 月東京大学応用微生物研究所助手

昭和 45 年 9 月～昭和 48 年 8 月国際遺伝生物物理学研究所（イタリア
CNR）研究員

昭和 54 年 6 月東京大学助教授，応用微生物研究所

平成 2 年 8 月東京大学教授，応用微生物研究所遺伝・育種研究部

平成 5 年 4 月東京大学分子細胞生物学研究所（名称変更）