

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2009
 課題番号： 19580078
 研究課題名 (和文) 藍藻グループ3型シグマ因子により認識されるプロモーター新規配列の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of the novel promoter sequences recognized by the group 3 sigma factor in cyanobacteria
 研究代表者
 朝山 宗彦 (ASAYAMA MUNEHIKO)
 茨城大学・農学部・准教授
 研究者番号： 50231907

研究成果の概要 (和文) : ゲノム全塩基配列が解読されたモデル光合成生物シアノバクテリア (藍藻) の一種 *Synechocystis* sp. PCC6803 株の転写装置 (RNA polymerase, RNAP) におけるシグマ因子 (σ factor) SigF に着目し、グループ3型シグマ因子のこれまで全く知られていなかったプロモーター認識能について検証した。その結果、SigF シグマ因子のみが厳密に認識することのできる共通コア配列が (転写開始点を+1 として) -32 (TAGGC) と -12 (GGTAA) 領域に発見された。これをもとに藍藻 PCC6803 におけるシグマ因子群のプロモーター認識能を分類整理した。

研究成果の概要 (英文) : This project focused on SigF belonging to the type 3 sigma factor for RNA polymerase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 as a model photosynthesizing organism and promoter-recognition ability of SigF was verified. The results revealed a novel and common core promoter-sequence with TAGGC (-32 region) and GGTAA (-12 region) as important for transcription. We discuss a model case of stringent promoter recognition by SigF and promoter types of PCC6803 genes are also summarized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：光合成微生物, シアノバクテリア (藍藻), 転写制御, RNA ポリメラーゼ, シグマ因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の生物の営みは、太陽光と光合成生物によって生産される酸素や有機物に依存している。シアノバクテリア (藍藻) の祖先は、

地球上に酸素をもたらした最初の光合成生物とされ、また高等植物葉緑体の起源とも考えられている。原核生物である藍藻は培養も容易であり、遺伝学的・生化学的な解析も行え

る事から、遺伝子発現調節機構を解明する為の優れたモデル生物になっている。実際に藍藻は、光誘導性や窒素・炭素代謝関連はもとより、形態形成や光走性にかかわるような遺伝子も含め、それらの発現・機能解析が世界中で活発に行われている。一方、藍藻は窒素源やリン酸源の過多による富栄養化した湖沼の表面に繁殖するアオコ（青粉）の主原因菌である。アオコの中にはマイクロキスチンと呼ばれる環状ポリペプチド構造を持つ発癌誘導物質（二次代謝産物）を生産するものもあって、しばしば環境問題として世界規模で話題になっている。更に藍藻は、数千種類からなり地球上のほぼ全地域に生息することから進化・多様性の面からも研究対象となったり、水素生産や窒素固定能を有する種を用いた資源活用の研究からも興味深い生物である。こうした背景から、研究代表者らはゲノム全塩基配列が決定されている単細胞性藍藻の一種 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 株に注目し、遺伝子発現の転写に関わるトランス因子とシスエレメントの機能とそのネットワークについて研究を進めている。

(2) 遺伝子の発現は、細胞の染色体 DNA 上に記された遺伝情報を転写装置である RNA ポリメラーゼ (RNAP) 酵素によって RNA に書き出すプロセス (転写) から始まるが、藍藻の場合、RNAP の本体はコア酵素 (α , β , β' , γ) に遺伝子のプロモーター認識能を有するシグマ (σ) 因子が合わさりホロ酵素となって機能すると考えられている。藍藻 PCC6803 株では、9 種類のシグマ因子遺伝子 (グループ 1: SigA; グループ 2: SigB, SigC, SigD, SigE; グループ 3: SigF, SigG, SigH, SigI) が同定されている (図 1)。グループ 1 型シグマ因

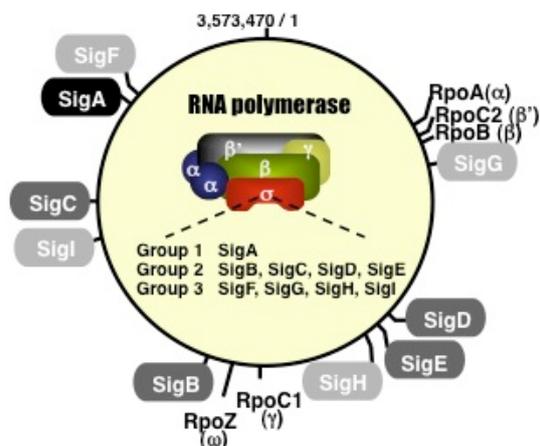


図 1 モデル藍藻 PCC6803 ゲノムとシグマ因子

子は、増殖に必須であり House keeping 遺伝子のプロモーターを認識している。グループ 2 型シグマ因子は、グループ 1 型シグマ因子と構造的に類似しているが増殖に必須ではな

いので、遺伝子破壊株取得を利用した機能解析が可能である。転写制御の要であるシグマ因子の機能を最終的に結論するには、どのシグマ因子がどのような環境条件下で、どのような遺伝子のプロモーター配列を認識しているかを明らかにする事が求められる。また、プロモーター配列の分子構造そのものを解析することは、シグマ因子とプロモーター配列の相互作用を考察する上で必須である。シグマ因子のプロモーター認識能を検証する一般的な方法としては、まず各シグマ因子遺伝子破壊株内で目的遺伝子からの転写が減少する事を確認した後、*in vitro* の RNAP 再構成実験 (コア酵素+シグマ因子=再構成ホロ酵素) により、シグマ因子のプロモーター認識能を直接的に証明する事が大切である。しかしこれまで藍藻では、細胞から RNAP のコア酵素やシグマ因子そのものを精製することが難しかった。

(3) そこで研究代表者らは、最近、藍藻 PCC6803 株のコア酵素を構成する 4 種類のサブユニット全てを大腸菌の中で大量発現・精製し、recombinant な藍藻コア酵素と精製全 9 種類のシグマ因子による再構成 RNAP を用いた *in vitro* mRNA 合成系の確立に光合成生物で初めて成功した (Imamura et al 2004 Genes to Cells 9:1175-1187)。加えて PCC6803 株の *sigA* を除く 8 種類のシグマ因子遺伝子破壊株の取得にも成功している (Asayama 2006 BBB review 70:565-573, 論文投稿中)。研究代表者は、これら先端的な手法とゲノム情報を最大限に生かし、光応答性シグマ因子 (Imamura et al 2004 FEBS Lett. 554:357-362)、熱ショックシグマ因子 (Imamura 2003 JMB 325:857-872)、窒素・炭素代謝関連シグマ因子 (Asayama 2006 BBB review 70:565-573; Imamura et al 2006 JBC 281:2668-2675; Osanai et al 2005 JBC 280:30653-30659; Imamura et al 2004 Genes to Cells 9:1175-1187) を発見し、それらシグマ因子の機能と合わせ、シグマ因子の標的となるプロモーター配列の解析を行っている。特に、光応答性 *psbA* 遺伝子のプロモーター周辺における分子構造の解析に関しては多くの新知見が得られている (Asayama 2006 BBB review 70:565-573; Asayama & Ohyama 2005 Landies Biosci. & Springer Sci. pp.37-51; Imamura et al 2004 Genes to Cells 9:1175-1187; Asayama et al 2004 BBB 68:477-487; 朝山宗彦 20004 日本農芸化学奨励賞受賞総説_日本農芸化学会誌 78:730-737; Imamura et al 2004 FEBS Lett. 554:357-362; Agrawal et al 2003 BBB 67:1817-1821; Ito et al 2003 BBB 67:1382-1390; Imamura 2003 JMB 325:857-872; Asayama et al 2002 NAR 30:4658-4666; Shibato et al 2002 MGG

267:684-694)。このように研究代表者らは *in vitro* と *in vivo* 解析系を駆使し、藍藻シグマ因子のプロモーター認識能について解析を行っている。藍藻 RNAP のグループ 1 型ならびに 2 型の各シグマ因子の機能に関しては、共通の分子構造を有した 5 種類のシグマ因子群が共存・協調/拮抗し合いながらそれぞれの機能を分担していると思われる。一方、グループ 3 型シグマ因子は 1 型と 2 型シグマ因子とは構造が異なり、遺伝子破壊株取得は可能であるが、その機能に関しては、SigF が細胞の運動性 (motility) に関与することだけが知られていた (Bhaya et al 1999) が、グループ 3 型シグマ因子の標的プロモーター配列とその構造については全く不明であった。

2. 研究の目的

モデル光合成微生物である藍藻 RNAP 全シグマ因子の機能解析の一環として、これまで全く解析が行われていなかったグループ 3 型シグマ因子が認識するプロモーター新規配列を同定し、グループ 3 型シグマ因子のプロモーター認識の特徴付けを行う。具体的には、2007 年度はグループ 3 型シグマ因子である SigF に注目し、SigF シグマ因子が特異的に認識すると予想される *pilA* 遺伝子 (motility 遺伝子) のプロモーターコア配列を詳細に解析する。また、2008 年度から 2009 年度にかけてはグループ 3 型シグマ因子により認識されるプロモーター塩基配列の共通性と多様性を検証する為に、PCC6803 株ゲノム全塩基配列を対象として SigF で認識される *pilA* 以外のプロモーターを同定し、予想されるコア配列を比較解析する。更に、最終年度は研究代表者らによりこれまで明らかにされているグループ 1 型・2 型シグマ因子により認識されるプロモーター配列と、本研究より初めて明らかにされるグループ 3 型シグマ因子プロモーターの配列における分子構造の特徴についてまとめ、光合成微生物におけるシグマ因子のプロモータークラス分けのモデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) 藍藻 PCC6803 野生株より全 RNA を抽出し、*pilA* 遺伝子 mRNA の 5' 末端近傍に特異的に結合するプライマーを用いてプライマー伸長法により転写開始点を決定する。あわせて *sigF* 以外の (*sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigG*, *sigH*, *sigI*) 遺伝子破壊株では、*pilA* 遺伝子転写開始点のシグナルが消失しないことを確認し、生体内では SigF シグマ因子のみが *pilA* 遺伝子プロモーターを認識していることを確認する。また予備的な実験結果より SigF シグマ因子が自身の遺伝子プロモーターを認識している可能性もある (論文投稿中) ので、*sigF* 遺伝子プロモーターも解析

の対象とする。

(2) SigF シグマ因子が *pilA* 遺伝子プロモーター配列を特異的に認識するという直接的な証拠を得るために試験管内 (*in vitro*) 再構成実験を行う。具体的には RNAP コア酵素と精製 SigF を混合し、RNAP ホロ酵素 (SigF-RNAP) を再構成させた後、*pilA* 遺伝子プロモーター領域を含んだ DNA 断片を鋳型にして *pilA* mRNA を合成させる。合成 mRNA の 5' 末端 (転写開始点) をプライマー伸長法で解析し、*in vitro* 系で合成させた mRNA の 5' 末端の位置と、生体内 (*in vivo*) で観察された転写開始点 (+1) が一致していることを確認する。更に SigF 以外の、SigA, SigB, SigC, SigD, SigE, SigG, SigH, SigI の 8 種類の精製シグマ因子を用い、それらシグマ因子は *pilA* 遺伝子プロモーターを認識しないことを確認し、SigF シグマ因子のみによる *pilA* 遺伝子プロモーター認識能の「厳密さ」を証明する。

(3) *pilA* 遺伝子プロモーター配列を *in vitro* mRNA 合成系で詳細に解析する。*pilA* プロモーター活性を示す最小領域領域と思われる 64 塩基対を野生型 DNA 断片 (鋳型 DNA) とし、これを基に鋳型変異 DNA 断片を作製する。変異は最初に 64 塩基対のプロモーター領域全体をカバーする様に 7 塩基ごとに置換変異を人工的に入れながら一連の 10 検体を準備する。これら鋳型 DNA を 1 検体ずつ SigF-RNAP ホロ酵素と共存させ、正確な転写開始点からの mRNA の合成の有無をプライマー伸長法で検証する。プロモーター配列のコア部分に変異が導入されると mRNA 合成は大幅に減少するか或いは停止するので、その場合、プライマー伸長法でシグナル強度が減少するか或いは消失することを確認する。7 塩基置換で転写が見られなくなった領域に対して、次に 3 塩基対の置換を施し、プロモーターのコア配列を絞り込む。最終的にはコア配列部位に、1 塩基置換の変異を導入し、*pilA* 遺伝子プロモーターのコア配列を決定する。

(4) 前述した (1) から (3) までの研究により得られる *pil* 遺伝子プロモーターのコア配列と *sigF* 遺伝子プロモーター付近の塩基配列を比較し、共通コア配列を同定する。得られた共通コア配列を 6803 株の全ゲノム塩基配列データベースと照合し、SigF シグマ因子により認識される *pilA* や *sigF* 遺伝子以外の候補遺伝子プロモーター群を検索する。SigF シグマ因子がそれら候補遺伝子群プロモーターを実際に認識しているか SigF 破壊株を用いた実験で実証する。最終的に SigF シグマ因子で認識される PCC6803 株の遺伝子プロ

モーター群の配列を比較し、新規共通コア配列を決定する。

(5) 以上により得られる成果を踏まえ、既に全ゲノム配列が公開されている他種藍藻 (*Synechococcus*, *Anabaena*, *Nostoc* など) の *pilA* 遺伝子を含むグループ3型シグマ因子により認識される遺伝子群 5' 上流領域の配列を比較し、グループ3型シグマ因子プロモーターのコア配列の普遍性 (共通コア配列) や多様性 (類似性の中に見られる相違的な部分) を検証する。それら解析結果とあわせ、研究代表者グループがこれまで得てきたモデル藍藻 PCC6803 株におけるグループ1型・2型のシグマ因子のプロモーター認識能と3型シグマ因子 SigF のプロモーター認識能の違いをまとめ、この生物の転写制御におけるシグマ因子の機能分類 (プロモーター認識能のクラス分け) を行う。

4. 研究成果

(1) 初年度にあたる 2007年度は、繊毛形成や運動性に関与する *pilA* 遺伝子のプロモーターをシグマ因子 SigF が特異的に認識している事を、細胞内ならびに試験管内で明らかにした。*pilA* 遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法により決定したところ、予想されるプロモーターは1カ所であることが判明し、これを PpilA1-54 (翻訳開始点から54塩基上流に転写開始点を有する *pilA1* 遺伝子プロモーター) と命名した。再構成 RNAP-SigF 酵素と鋳型 *pilA1* プロモーターを混合し、転写反応させた後、高解像度の転写産物解析を行った。その結果、*pilA* 遺伝子の転写開始点からそれぞれ 12 塩基、32 塩基上流にコア配列を有する新規プロモーターと推測される構造を発見するに至った。更に興味深い事に、PCC6803細胞内では、PpilA1-54からの転写は SigFでのみ認識され、他のグループ1ならびに2や3型シグマ因子によっては認識されなかった。以上は、SigFグループ3型シグマ因子のプロモーター認識能は極めて厳密である事を示している (図2)。

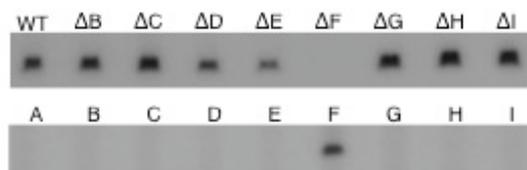


図2 SigFシグマ因子による *pilA* プロモーターの厳密な認識能 (上)シグマ因子破壊株での *pilA* 転写産物 (下) 試験管内 *pilA* mRNA 合成 (*)いずれの場合も SigFシグマ因子のみが *pilA* プロモーターを認識することが可能

(2) 二年目にあたる 2008年度も研究計画書に基づき実験を遂行し、多くの新しい知見を

得た。特に、繊毛形成や運動性に関与する *pilA* 遺伝子プロモーター PpilA1-54 の配列に7塩基対ならびに3塩基対の変異を導入し、これを鋳型 DNAとする *in vitro* 転写系に精製RNAP-SigFを添加することによって、プロモーター認識能を検証することに成功した。その結果より、3型シグマ因子 SigF が認識する重要なコア配列が (転写開始点を+1として) -32 (TAGCC) と -12 (GGTAA) 領域であることを突き止めた。更に、SigF シグマ因子の標的プロモーターを全ゲノム配列から相同性検索で絞り込み、*sigF*、*pixJ1* (光受容体ファイトクロム様遺伝子)、*slr0837* (ペリプラズム蛋白質様遺伝子) を候補として同定し、実際これら遺伝子プロモーターが SigF により認識されていることを証明した。またそれら遺伝子プロモーター群においても、保存された共通のプロモーター配列が存在することを示した。前年度の解析結果も含め、SigFによるプロモーター新規配列の厳密な認識能についてまとめ、それら成果の一部を学会発表やホームページで公表した。さらに英語論文として、英国の学術雑誌 *Nucleic Acids Research* に投稿し、採択・公開された (Asayama & Imamura 2008 NAR 16:5297-5305)。

(3) 最終年度にあたる 2009年度は、研究計画に基づき実証して得られた成果をまとめ、英文総説の一部として公表した (Asayama & Imamura 2009 GRSB 3:65-87)。6803株においては、9種類ある全シグマ因子を3つのグループに分類し、機能を体系的に整理した。図3に示すように Type 1プロモーターは、単一プロモーターを有し、通常の培養条件下ではグループ1型 SigAにより認識されているが、ストレス条件下 (明・暗、熱ショックなど) では他のグループ2型シグマ因子と置き換わり発現が誘導される。Type 2プロモーターは複数のプロモーターを有し、グループ1と2で読み分けられている。この場合、環境変化にともないグループ2型シグマ因子で認識されるプロモーターからの転写が誘導され標的遺伝子からの転写量が増加する。このようにグループ1型・2型シグマ因子は、互いに共存・協調/拮抗しあいバランスを保ちながら標的遺伝子プロモーターを認識し合う。これに対し、Type 3プロモーターは、生体内で極微量に存在するグループ3型シグマ因子により厳密に認識されていると思われる (図3)。本研究では、グループ3型シグマ因子の1つ SigF のプロモーターのコア配列を初めて明らかにし、SigFの機能が細胞表層における繊毛形成や運動性ならびに光走性遺伝子のプロモーター認識に普遍的に関わっている可能性を示唆した。更に、SigFの厳密なプロモーター認識能を利用した藻発現ベクター構築や自然界から新たな藍藻の分離を試みたり、SigF

タイプのシグマ因子遺伝子の構造と機能の多様性について今後の研究を展開する上で有用な手がかりを得た。以上、三カ年の研究期間で、総説を含む学術論文2編、学会等発表5回を数え、十分な成果をあげる事ができた。また、茨城大学学術ホームページにおいても本研究成果の一部を公開している。

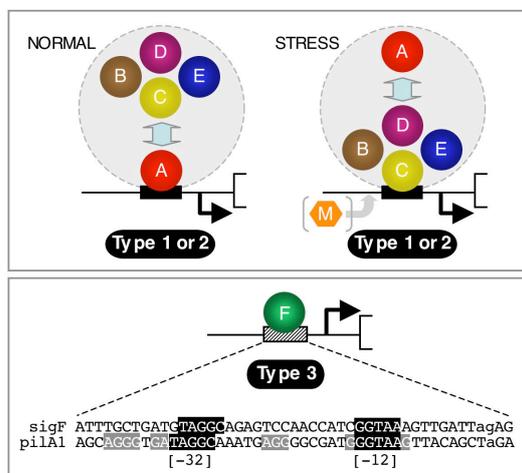


図3 藍藻シグマ因子のプロモーター認識能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Asayama M and Imamura S, Stringent promoter recognition and autoregulation by the group 3 σ -factor SigF in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Nucleic Acids Research*, 16:5297-5305 (2008) 査読有
- ② Imamura S and Asayama M, Sigma Factors for Cyanobacterial Transcription, *Gene Regulation and Systems Biology*, 3:65-87 (2009) <総説> 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① ASAYAMA Munehiko, HIRANO Eriko, HANAMI Tomoyo, HORIE Yoshinao, NISHIZAWA Tomoyasu, SHIRAI Makoto, Construction and Utilization of Cyanobacterial Expression Vector, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年(2009年)12月10日, パシフィコ横浜
- ② 朝山宗彦, 平野恵理子, 花見知世, 堀江良尚, 西澤智康, 白井誠, 高効率プロモーターを有する藻発現ベクターの構築と利用, ラン藻の分子生物学 2009 (CYANO 2009), 平成21年(2009年)12月5日, かずさアカデミアホール
- ③ 朝山宗彦, シグマ因子と RNaseE 相互作用因子: 転写・転写後調節のこれまでのまとめと今後, ラン藻ゲノム交流会, 平成21年(2009年)7月4日, 東京大学駒場キャンパス 16号館

- ④ 朝山宗彦, Stringent promoter recognition and autoregulation by the group 3 sigma-factor SigF in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, 第31回日本分子生物学会(2008年度)年会・第81回日本生化学会合同大会, 平成20年12月9日, 神戸ポートアイランド

- ⑤ 朝山宗彦, Interference Expression at Levels of the Transcript and Protein among Group 1, 2, and 3 Sigma Factor Genes in a Cyanobacterium, 第30回日本分子生物学会(2007年度)年会・第80回日本生化学会合同大会, 平成19年12月12日, パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ

<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/websearch/index.htm>

<http://asam.agr.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝山 宗彦 (ASAYAMA MUNEHICO)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号: 50231907

(2) 研究分担者なし