

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究  
 研究期間： 2008 ～ 2009  
 課題番号： 20017015  
 研究課題名（和文） シンビオジェネシスの基礎となるプロモーター獲得原理の解明  
 研究課題名（英文） Principles of promoter acquisition mechanism in symbiogenesis

研究代表者  
 小保方 潤一 (Obokata Junichi)  
 名古屋大学・遺伝子実験施設・招へい教員  
 研究者番号：50185667

## 研究成果の概要（和文）：

生物進化の過程では、しばしば、外来遺伝子が宿主の核ゲノムに取り込まれ、そこで新たなプロモーターを獲得して宿主の遺伝子制御系に組み込まれる。この現象の分子機構を、形質転換植物によるモデル実験系で解析した。その結果、新規プロモーターの獲得・出現過程には、「コード領域の 5'末端近傍でクロマチンのリモデリングが誘導される」という核ゲノムのもつエピジェネティックな性質が関与していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In endosymbiotic evolution, genes of the endosymbionts are gradually transferred to the host nucleus whereby they obtained new promoters to become functional host genes. We analyzed the molecular process of this promoter acquisition, using promoter trap lines of Arabidopsis as a model system. As a result, we found that the promoter acquisition occurs in three types; namely de novo origination type, trapping preexisting promoter type, and the combination type of the former two. Further analyses of these subtypes revealed that the de novo origination of new promoters is closely related with chromatin remodeling that occurs at the insertion sites of the coding sequences.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：ゲノム生物学

科研費の分科・細目：特定領域研究、比較ゲノム

キーワード：シンビオジェネシス、プロモーター獲得、クロマチンリモデリング、エピゲノム、H2A.Z、H3K4me3、植物ゲノム、ChIP-on-chip 解析

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内共生者が宿主細胞の一部として統合化され、やがてオルガネラ化してゆく過程は、一般にシンビオジェネシスとよばれ、地

球上の生物界の様々な場面でみることができる。シンビオジェネシスは、真核細胞の成立や進化を引き起こしただけではなく、地球上の生物の多様化にも大きく寄与してきた。

シンビオジェネシスの過程では、共生者ゲノムにコードされていた遺伝子群が次第に宿主ゲノムへ移動し、それに引き続いて、共生者ゲノムの縮小・縮退が生じる。このプロセスが進行するためには、まず、共生者ゲノム上の遺伝子が一定の頻度で宿主核へ転移し、そこで、なんらかのメカニズムで新しいプロモーターを獲得する必要がある。しかし、このプロモーター獲得の一般的なメカニズムや、その背後にある分子生物学的な原理はまだよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物の核ゲノムに転移した外来コード領域配列が、どのようなメカニズムで新しいプロモーターを獲得するのか、という問題に焦点を絞り、形質転換植物の実験系を用いて解析を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子トラップ植物系統によるプロモーター獲得過程の解析

①プロモーターを持たないルシフェラーゼレポーター遺伝子を、シロイヌナズナのゲノムにランダムに挿入し、レポーター遺伝子が発現した植物系統をスクリーニングした。

②上記の発現系統について、ゲノム中でのレポーターの挿入位置を決定し、レポーター配列がゲノム既存の遺伝子やプロモーターをトラップしていない系統を選抜した。

③こうして得られた系統を「プロモーター新生が生じた候補系統」として、それらについて、レポーター遺伝子に生じた転写開始点やプロモーター領域の塩基配列、周辺のクロマチン状態などを総合的に解析した。

### (2) クリプティックプロモーター活性化機構の解析

遺伝子の構成要素である「タンパク質の読み枠」「コアプロモーター領域の塩基配列」などに様々な改変を加えたキメラ遺伝子をシロイヌナズナに導入した。次いで、それらの改変によって導入遺伝子の転写開始点の出現位置や強度にどのような変化が生じるのかを解析した。それらの結果から、コアプロモーター領域が出現するのに必要な遺伝子の構成要素を検討した。

### (3) 植物プロモーター配列の包括的解析

シロイヌナズナの高密度転写開始点情報を基に、転写開始点の周辺配列を網羅的に解析し、植物ゲノム上のプロモーター領域塩基配列の特徴を検討した。それらの解析結果は、データベースとして公開した。

( <http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi> )

## 4. 研究成果

### (1) 転写開始領域のクロマチン構造

私たちは、これまで、植物の転写開始領域とコアプロモーター配列に関する包括的な解析を進めてきたが、その結果、①転写開始点の局所的な出現位置は、塩基配列だけから比較的簡単に予測することができるが、②コアプロモーター領域そのものを塩基配列だけから予測することは、一般にかなり難しい、と感じてきた。最近、酵母の系を中心に、転写開始点を挟み込む特殊なヌクレオソームの位置と構造が、相次いで報告された。そこで、シロイヌナズナのタイリングアレイを用いた ChIP-on-chip 解析によって、幾つかの遺伝子の転写開始点近傍のクロマチン構造を実際に解析してみた。その結果、酵母での報告例と同様に、修飾ヒストンである H3K4me3 とヒストン H2A のバリエーションである H2A.Z をもったヌクレオソームが、およそ 300塩基対程度の間隔で形成され、その間隙に転写開始点が発現する様子が観察された。

### (2) 構造遺伝子の挿入によってゲノム上に新規プロモーターが発現するケースには、少なくとも3つのタイプがある。

シロイヌナズナの遺伝子トラップ系統の中から、「構造遺伝子」の挿入によって、それまで転写物の殆ど検出されなかったゲノム領域に、新たな転写単位が発現したように見える系統を選抜した。次いで、その中の代表的な系統について、転写物が発現するメカニズムを、上述したクロマチン構造の観点から解析した。その結果、このような「みかけのプロモーター新生」には、少なくとも図1に示すような3つのタイプのあることがわかった。

①のタイプでは、構造遺伝子の挿入によって、その5'近傍領域のクロマチンがリモデリングされ、H3K4me3 と H2A.Z をもったヌクレオソームが、およそ 300塩基対程度の間隔を挟んで発現する。次いで、この両者の間隙から新規の転写が開始される。これらの系統では、プロモーター機能に対応するクロマチン構造が、「構造遺伝子」の挿入によって新規に生成されたと考えられる。

②のタイプは、挿入された「構造遺伝子」が既存のプロモーター構造を捕獲して転写物を生じたケースだが、不思議なことに、野生型植物では、転写物が検出されなかった。これは、構造遺伝子の挿入によって、それまで弱かった転写活性そのものが増強されたか、不安定だった転写物が安定化され、結果として、それまで見えなかったプロモーター活性が発現されたのではないかと考えられる。

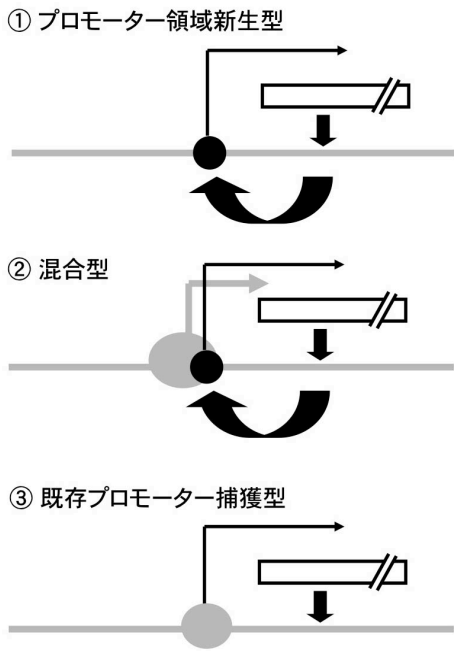


図1 見かけのプロモーター新生が生じる場合の3類型。黒が挿入配列に起因するプロモーター領域と転写物、灰色が既存のコアプロモーターと転写物を示している。

③のタイプは上記の二つの混合型で、活火山に外輪山ができるように、既存のプロモーター領域に部分的に重複して、新たなプロモーター構造が形成されていた。私たちの調べた範囲では、miRNAの転写開始領域で、このような例が見出された。私たちの解析では、播種後10日目くらいのシロイヌナズナの地上部をまるごと実験試料にしているため、様々な組織に由来する核の混合物を解析している。従って、一見重複しているように見える二つのプロモーター領域は、実際にはそれぞれが別々の細胞やDNA鎖の上に形成されているのではないかと考えている。

以上の結果から、植物の核ゲノムでは、構造遺伝子の挿入によって、「クロマチンの構造変化を伴ったプロモーター領域の新生」が実際に生じることが明らかになった。この新しい知見は、次のような疑問を導いた。

上記①のような「プロモーター領域の新生」は、ゲノム染色体上の特別な領域だけで生じる「部位特異的」な現象なのか、それとも、「構造遺伝子の挿入」というイベント自体が、一般的に「プロモーター領域の新生」を誘導する性質をもっているのか、ということである。この問題を、次の実験で検討した。

(3) コード領域配列は、転写開始複合体の形成位置を近傍に誘導する性質をもっている。

シロイヌナズナの光合成遺伝子をモデル

にして、次のような実験を行った。まず、野生型プロモーター(図2, ①)のコア領域を重複させて、②のような改変プロモーターを作成した。次に、これらのキメラ遺伝子を野生型植物の核に導入し、得られた形質転換植物系統について、転写開始点と転写開始複合体の形成位置を解析した。すると、野生型プロモーターでは調節領域の直下のコア領域に出現していた転写開始点/転写開始複合体が、予想通り、改変プロモーターでは最下流のコア領域に移動していた。この結果は、構造遺伝子領域にはプロモーター領域の形成位置をその5'末端近傍付近に誘導する性質があることを示している。

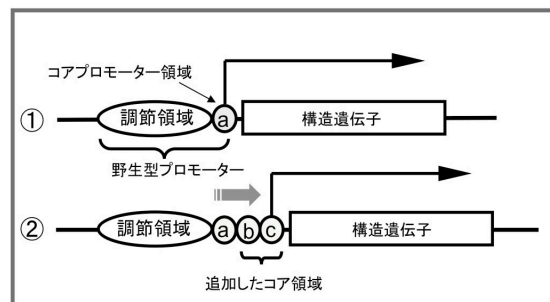


図2 転写開始複合体 (PIC)はコード領域の近傍位置に誘導される

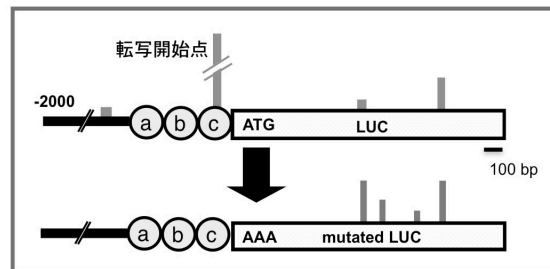


図3 読み枠を破壊すると、図2で誘導された転写開始点は消失する

(4) なにが転写開始複合体を誘導するのか？

図2の結果は、新たな疑問を生み出した。構造遺伝子領域のいったい何が、どのような機構で、プロモーター領域の誘引を引き起こすのだろうか？

この新しい疑問に答えるための解析は、まだ進行中であり、現時点では、謎を解くための部分的なヒントしか得られていない。図3に示したのは、そのような実験結果の一例である。この実験では、構造遺伝子の開始コドンを破壊すると、せっかく近傍に引き寄せられた転写開始点が消失した。このような「誘引作用/転写開始点の消失」が、どのようなメカニズムで生じるのかについて、現在ChIP-on-chip法やChIP-seq法等を用いた詳しい解析を進めている。

### (5) 植物プロモーターの包括的解析

本研究の主目的は、ゲノムの中で、新規のプロモーターが出現する分子メカニズムを明らかにすることである。しかし、プロモーターの出現や進化の道筋を明らかにするためには、ゲノム中で実際のプロモーターが、どのような特徴や多様性を持っているのかを明らかにすることも必要である。

そこで、以下の2点について、塩基配列情報の解析を行った。

#### ① バイオインフォマティクス解析によるプロモーター構成配列の抽出

理研植物科学研究センターにより公開されているシロイヌナズナ完全長cDNAの5'末端情報をもとに転写開始点を遺伝子ごと特定し、そこを基点としてLDSS (Local Distribution of Short Sequences) 法と名付けたバイオインフォマティクス手法により位置依存的に出現する8塩基配列をすべてピックアップし、プロモーター上の出現分布のパターンにより分類した。その結果転写制御配列として300配列程度、またコア配列としてTATA、GA、Y (pyrimidine)Patchという3つのグループを同定することに成功した。GAとY Patchは新規の植物コアプロモーター因子である。これら3つのコア因子グループの同定により植物プロモーターの7~8割程度についてコア因子を特定することが可能になった。平行して哺乳類のプロモーター構造も解析したところ、コアプロモーター因子として動植物に共通するもの (TATAボックス、Inr)、動物特異的なもの (CpGアイランド、Sp1)、植物特異的なもの (Y Patch、GA因子) があることがわかり、動植物のコアプロモーター構造は互いに分化していることを明らかにした。

#### ② 大規模転写開始点タグ解析によるプロモーターの実験的同定並びにコア因子と発現上の特徴との相関解析

これまで植物では、定量的に扱える転写開始点データが整備されていなかった。そこで、プロモーターの定量解析を進めるために、転写開始点タグの大規模シーケンシングを行った。完全長cDNA作成法として定評のあるCap Trapper法と“Cap Signature”というキャップ依存的な塩基付加活性によるcDNA配列上の特徴を組み合わせて、植物分野においてはこれまでで最高の精度での転写開始点タグ情報を取得した。これは16万の転写開始点タグからなり、新規の転写開始点3万点を含んでいる。およそ25,000のシロイヌナズナ遺伝子のうち9,627遺伝子をカバーしており、そのうち2,549遺伝子については新規に転写開始点を同定できた。その結果、次のような

知見が明らかになった。①ゲノム中にはどの遺伝子モデルにも対応しない転写開始点が検出されることを見出し、それらの転写を引き起こすプロモーター群を、Orphan Promoterと名付けた。Orphan Promoterは、core-less型のプロモーターが多く、また一般的に発現レベルは非常に低い。②TATA、Y Patch、Inrは一つのプロモーターに共局在する傾向があり、協調的に作用していることが示唆された。③TATA型とGA型のプロモーターは対照的な性質を持っていることが明らかになった。この両者は転写開始点の形状が異なっており、さらにTATA型は発現制御を受ける遺伝子に多く、一方GA型やcore-less型は恒常的な発現をする遺伝子に多かった。

#### (7) まとめ:プロモーターの獲得原理について

本研究がシンビオジェネシスの解析からスタートしたのは、その過程でみられるゲノム同士の極端な運動のなかには、すべてのゲノムが共通に備えている重要な性質が現れている筈だ、と考えたからである。そして、その性質とは、ゲノムレベルでの変動、つまり、DNAの組換え、切断、シャプリングなどによって生じた有用な遺伝情報の芽を、ゲノムは、いち早くトランスクリプトームに提示できるメカニズムを持っている筈だ、という予想である。

本研究の成果から、この予想のメカニズムは、どうやら実在することがわかってきた。そして、そのメカニズムの本体は、コード領域の5'末端近傍に、クロマチンの構造変換や転写開始複合体の形成を局在化させる仕組みであると考えられる。この仕組みの存在によって、ゲノム中に出現した新規のコード配列は、既存のプロモーターをトラップするだけの場合に比べて、より高い確率で転写される機会を得るのではないかと考えられる。

このように考えると、真核ゲノムが普遍的に備えているであろうエピジェネティックな性質こそが、シンビオジェネシス過程でのプロモーター獲得を可能にしている根本的なメカニズムなのかもしれない。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 〔雑誌論文〕 (計 12 件)

1. 山本義治 高等植物における pol-II 依存性プロモーター, 横浜市立大学論叢, 60 巻, 133-142 頁 (2010) 査読有
2. Yamamoto YY, Yusa Y, Yamamoto S, Hirano Y, Hirano Y, Motomura T, Tanemura

- T, Obokata J. Identification of photosynthetic sacoglossans from Japan. **Endocytobiosis Cell Res** 19, 112-119. (2009) 査読有
3. 3 Fujiwara M, Sekine K, Yamamoto YY, Abe T, Sato N, Itoh R. Live imaging of chloroplast FtsZ1 filaments, rings, spirals, and motile dot structures in the *AtMinE1* mutant and overexpressor of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol** 50,1116-1126, (2009) 査読有
  4. Yamamoto YY, Yoshitsugu T, Sakurai T, Seki M, Shinozaki K, Obokata J. Heterogeneity of *Arabidopsis* core promoters revealed by high density TSS analysis. **Plant J** 60,350-362.(2009)査読有
  5. Kobayashi Y, Matsuo M, Sakamoto K, Wakasugi T, Yamada K, Obokata J. Two RNA editing sites with *cis*-acting elements of moderate sequence identity are recognized by an identical site-recognition protein in tobacco chloroplasts. **Nucleic Acids Res** 36, 311-318.(2008)査読有
  6. Yamamoto YY, Obokata J. ppdb: a plant promoter database. **Nucleic Acids Res** 36 (2008) D977-981
  7. Takabayashi A, Ishikawa N, Obayashi T, Ishida S, Obokata J, Endo T, Sato F. Three novel subunits of *Arabidopsis* chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase identified by bioinformatic and reverse genetic approaches. **Plant J** 57, 207-219.(2008) 査読有
  8. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science** 320,1185-1190.(2008)査読有
  9. Kazama Y, Saito H, Yamamoto YY, Hayashi Y, Ichida H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T. LET-dependent effects of heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotech** 25,113-117.(2008)査読有
  10. 山本義治, 種村尚典, 遊佐陽一, 平野弥生, 平野義明, 本村泰三, 小保方潤一, 光合成をするウミウシ, うみうし通信, 60 : 10-11 査読無
  11. 長尾一生, 山本義治, 小保方潤一, タバコ形質転換法, 北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会共編, 光合成研究法, 低温科学 第 67 巻, 617-621 頁 (2008) 査読有
  12. 山本義治, 小保方潤一, タバコ, 北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会共編, 光合成研究法, 低温科学 第 67 巻, 39-41 頁 (2008) 査読有

〔学会発表〕 (計 20 件)

1. 工藤久幸, 松尾充啓, 木村宏, 中邨真之, 山本義治, 小保方潤一, 「植物核に挿入されたコード領域はヌクレオソームと転写単位の再編成を引き起こす」第51回植物生理学会年会 2010年3月18日、熊本大学
2. 工藤久幸, 山本義治, 中邨真之, 小保方潤一 「Pol IIの転写開始位置の決定に関わるコード領域の役割」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日、横浜
3. 吉岡洋平, Naznin HushnaAra, 百町満朗, 小林安文, 小山博之, 小林佑理子, 井内聖, 小林正智, 坂井優作, 山本義治 「植物プロモーター工場」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日 横浜
4. 小保方潤一 「植物ゲノムの流動性とプロモーターのダイナミズム-オルガネラから核への遺伝子移動はどのように生じるのか?」2009年度日本植物学会近畿支部会・藻類談話会合同大会, 2009年11月14日、神戸大学
5. Naznin Hushna Ara, Yohei Yoshioka, Mitsuro Hyakumachi, Yoshiharu Y. Yamamoto. "Analysis of cis-regulatory elements in the promoters of genes related with disease resistance." 日本植物病理学会関西支部会、2009年10月17日、神戸
6. 吉岡洋平, Naznin Hushna Ara, 山本義治, 百町満朗「シロイヌナズナの全身的抵抗性誘導に関するマイクロアレイデータの比較解析」日本植物病理学会関西支部会 2009年10月17日、神戸
7. 吉岡洋平, Naznin Hushna Ara, 百町満朗, 小林安文, 小山博之, 小林佑理子, 井内聖, 小林正智, 山本義治 「マイクロアレイデータを用いたシス配列予測」日本植物病理学会関西支部会 2009年10月18日、神戸
8. 山本義治, 佐藤直樹, 小保方潤一 「植物プロモーターデータベース ppdb の構築」日本育種学会秋季大会, 2009年9月26日、札幌
9. 山本義治, 松尾充啓, 小保方潤一 「シロイヌナズナ葉緑体ゲノム由来の核 DNA (nupDNA) のプロモーター獲得について」日本遺伝学会年会、2009年9月16日、松本
10. 松尾充啓, 福澤秀哉, 田畑哲之, 小保方潤一 「クラミドモナスにおけるオルガネラ間相互作用の解析 ー単細胞藻類だからみえること」第7回クラミドモナスワークショップ 2009年3月26日 名古屋大学野依学術交流館
11. 山本義治, 小保方潤一 「コアプロモーターと遺伝子の構造や機能との関係」第50回日本植物生理学会年会 2009年3月21-24日、名古屋大学

12. 小保方潤一「葉緑体から核への遺伝子移動はどのように生じるのか？」第4回「光計測技術と生物発光リアルタイム測定システムの応用」研究会 2009年3月6日 名大・野依学術交流館
13. 小保方潤一「包括的ゲノム解析が明らかにする 植物ゲノムの流動性とプロモーターのダイナミズム」第8回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー「新たなDNA解析：次世代DNA解析のすべてとDNA解析の新分野への展開」2008年12月16日、名古屋大学
14. 山本義治、小保方潤一「ppdb 2.0: 植物プロモーターデータベース」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月9-12、神戸ポートアイランド 神戸
15. 工藤久幸、山本義治、中邨真之、大谷将人、長谷川桂子、小保方潤一「コード領域の上流近傍における転写開始位置の決定機構」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月9-12、神戸
16. Yamamoto YY, Oboakata J. "Promoter prediction from genome sequence" The 55th NIBB Conference & Arabidopsis Workshop 2008 "Frontier of Plant Science in the 21st Century" September13-15, 2008, Okazaki Conference Center, Okazaki
17. 山本義治、小保方潤一「高等植物におけるコアプロモーターと遺伝子機能・構造の関係」日本遺伝学会第80回大会 2008年9月3日-5日 名古屋大学
18. 工藤久幸、山本義治、中邨真之、大谷将人、長谷川桂子、小保方潤一「プロモーター下流の転写領域による転写開始位置制御機構」日本遺伝学会第80回大会 2008年9月3日-5日、名古屋大学
19. 山本義治、種村尚典、遊佐陽一、平野弥生、平野義昭、本村泰三、小保方潤一「『盗葉緑体』によって光合成を行う囊舌目ウミウシの検索」第8回日本光合成研究会 2008年5月30日-31日 野依記念学術交流館、名古屋大学
20. 松尾充啓、小保方潤一「光合成シグナルと呼吸シグナルによる光合成装置の相補的な形成制御」第8回日本光合成研究会 2008年5月30日-31日 名大・野依記念学術交流館、名古屋大学

#### [図書] (計4件)

1. Yamamoto YY, Obokata J. Extraction of position-sensitive promoter constituents In Computational biology:new research, Russe AS (ed), (Hauppauge, NY, Nova Science

Publishers) 2009、(分担執筆, pp361-373.)、総ページ数 441

2. 小保方潤一 (2009) 尾張部克志・他編 ベーシックマスターシリーズ細胞生物学 第1章 細胞の誕生 オーム社、東京、2009 (分担執筆) 総ページ数 327
3. 小保方潤一 (分担執筆) 遺伝子が「一生を過ごす」場としてのゲノム. 生る一生命誌年刊号 vol 53-56 101-107 頁 JT生命誌研究館 2008、 総ページ数 206
4. Shikanai, T. and Obokata, J. (分担執筆) Machinery of RNA editing in plant organelles. In Frontiers of RNA and DNA Editing (ed. by Harold C. Smith) Wiley Press 2008、総ページ数 426

#### [産業財産権]

○出願状況 (計0件)

#### [その他]

ホームページ等

<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~obokata-g/Site/Top.html>

<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小保方 潤一 (Obokata Junichi)

名古屋大学・遺伝子実験施設・招へい教員  
研究者番号：50185667

##### (2) 研究分担者

山本 義治 (Yamamoto Yoshiharu)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50301784