

論文内容の要旨

Analysis of gene expression in response to low temperature in cyanobacteria *Anabaena*

シアノバクテリア *Anabaena* における低温応答遺伝子の発現調節解析

氏名 得平 茂樹

<序論>

生物は生育温度の低下に応答し、適応する能力を持っている。その過程で、低温への適応に必要な様々な遺伝子の発現が誘導され、低温への耐性を獲得する。生育温度の低下に伴い、RNA 結合タンパク質や脂肪酸不飽和化酵素などをコードする遺伝子の発現が増加することが知られている。これらの遺伝子の発現の調節には、温度の低下をシグナルとして感知し、そのシグナルを発現を調節する因子まで伝達する機構が必要となる。しかし、このようなシグナル伝達系の全容は未だ明らかとなっていない。

シアノバクテリアは、酸素発生型の光合成を行う原核生物であり、葉緑体の起源となった生物であると考えられている。植物におけるストレス応答の分子機構の研究において、シアノバクテリアは、その遺伝子操作の容易さとゲノム情報の多様さから、有用なモデル生物となっている。*Anabaena variabilis* M3 は、以前から低温への応答に関する研究に用いられてきたシアノバクテリアである。現在までに、生育温度の脂質組成への影響、低温で発現する遺伝子の同定など多くの知見が得られている。また、近縁種である *Anabaena* sp. PCC 7120 の全ゲノム塩基配列が 2001 年に決定され、DNA マイクロアレイが共同プロジェクトとして作製された。マイクロアレイは、ストレスに応答する遺伝子を網羅的に解析することができ、ストレスへの適応に重要な遺伝子の同定やストレスへの応答機構の解明において、有力な手段となる。本研究では、これら 2 種の *Anabaena* の情報を統合し、低温応答遺伝子の発現調節機構を解明することを目的とした。本研究では、まず *Anabaena* DNA マイクロアレイの有効性を評価した。次に、低温において転写産物量が増加する遺伝子の同定を行い、その発現調節の解析を行った。

<結果と考察>

I. *Anabaena* DNA microarray を用いた窒素欠乏による遺伝子発現の変化の解析

本研究で用いた *Anabaena* DNA マイクロアレイは、各スポットが約 3 kb のゲノム DNA セグメントからなり、それぞれに 1 から 8 個の ORF が含まれている。1 枚のスライドガラスに、全ゲノム配列の約 90% をカバーする 2,407 個のセグメントが 2 セットずつスポットされている。まず、このような DNA セグメントからなるマイクロアレイにより、転写産物レベルの変化を検出することが可能であるかを評価した。マイクロアレイの評価は、*Anabaena* PCC 7120 において最も研究が進んでいる窒素欠乏への応答を解析することで行った。*Anabaena* PCC 7120 は、培地中の窒素源が不足するとヘテロシストと呼ばれる細胞を分化させ、窒素固定を行うことができる。アンモニアを窒素源として含む培地から、窒素源を含まない培地に細胞を移し、転写産物レベルの変化を検討した。3 回の独立した実験を行い、1% の有意水準で *t* 検定を行った。窒素欠乏 24 時間目において、126 個の DNA セグメントにおける発現量が増加し、44 個における発現量が減少した。発現量が増加した DNA セグメントにおいて、そこに含まれる ORF の発現をノザンプロットにより確認すると、それぞれ少なくとも 1 個の ORF の発現量が増加していた (図 1)。従って、誘導される遺伝子を網羅的に検出できるという意味で、このマイクロアレイが発現解析にきわめて有効であることが示された。さらに、各 DNA セグメントのゲノム上での位置と発現変化の関係について解析を行った (図 2)。その結果、20 個前後の ORF を含む 30 kb 近い領域全体で発現量が増加していることが示された。ヘテロシスト分化の過程で、個々の遺伝子やオペロンをこえて、30 kb 近い大きな領域の発現を一括して調節する機構が存在していることが示唆された。

以上のように、*Anabaena* DNA microarray が遺伝子発現の変化の検出に有効であり、また、遺伝子発現の調節機構の解析にも有用であることが示された。そこで、この *Anabaena* DNA microarray を用いて、低温シフトによる遺伝子発現の変化を検討し、低温に応答する遺伝子の発現調節の解析を行った。

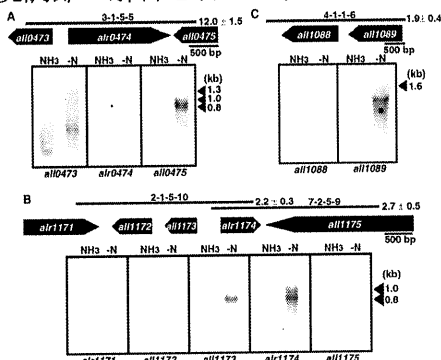


図1. 発現量が増加した DNA セグメントに含まれる ORF のノザンプロット解析。一番上の横線が DNA セグメントを表し、その右に窒素欠乏 24 時間目における増加の割合を示す。各セグメントに含まれる ORF を矢印で示してある。1.2% のアガロースゲルで RNA を分離し、ナイロンメンブレンに固定した。各図の下に示す遺伝子特異的プローブを用いて mRNA を検出した。RNA は図 1 と同じバッチのものを用いた。NH₃: 窒素欠乏前 (窒素源としてアンモニアを含む)、-N: 窒素欠乏 24 時間目。

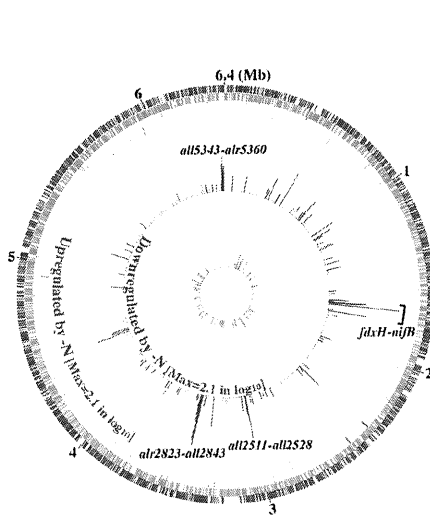


図2. 各 DNA セグメントのゲノム上での位置と発現変化。各 DNA セグメントの窒素欠乏 24 時間目における発現量の変化の割合をゲノム上の位置に応じて示した。一番外側の 2 個の円はそれぞれ、右向き (赤) と左向き (青) の ORF を表している。その内側の 2 個の円は、同様に RNA 遺伝子を表す。中の太い円が変化の割合を示し、外側が増加 (赤)、内側が減少 (青) の割合である。4ヶ所の expressed island とそこに含まれる ORF を示してある。

II. 低温において転写産物量が増加する遺伝子の同定

Anabaena sp. PCC 7120 における低温応答遺伝子を同定するため、培養温度の低下に伴う転写産物レベルの変化をマイクロアレイにより解析した。32°C で培養していた細胞を光強度を変えずに 22°C に移し、30 分後と 2 時間後における変化を検討した。2 時間後までに 165 個の DNA セグメントにおける発現量が増加し、199 個における発現量が減少した。発現量が増加した DNA セグメントには、低温で発現量が増加することが知られている *rbpA1*, *rbpA2*, *desB*, *desA*, *desC*, *crhB*, *crhC*, *lti2* 等の遺伝子が含まれていた。一方、発現の減少がみられた DNA セグメントには、光で発現が抑制される *lriA* や暗所でのクロロフィル合成に関わる *chlN*, *chlL*、フィコビリソ-

ム成分をコードする *pec*, *cpc* などが含まれていた。 *Synechocystis* PCC 6803 において行われたアレイ解析の結果は、培養温度の低下と照射光強度の増加が転写産物レベルに及ぼす影響が互いによく似ていることを示している。本研究の結果も、培養温度の低下が相対的な光強度の増加として働いていることを示唆している。そこで、光の影響を除くため、暗所での温度シフト実験を行った。まず、暗所への移行による転写産物レベルの変化を検討し、次に暗所に移すと同時に培養温度を下げ、その転写産物レベルへの影響を検討した。その結果、光照射下での低温シフトにより発現量が変化する遺伝子は、大きく 4 グループに分けられた。(1) いずれの環境変化にも応答するもの、(2) 光の有無に関わらず、低温に応答するもの、(3) 光照射下でのみ低温に応答するもの、そして (4) 光照射下で低温にすることで発現量が変化するが、温度に関わらず暗所への移行においてその逆の変化を示すものである。光の有無に関わらず、低温に応答する DNA セグメントは少なく、発現量が増加したものが 12 個、減少したものが 16 個であった。これらのセグメントに含まれる ORF に関して、ノザンプロットを行い、これまでに低温において転写産物量が増加する遺伝子を 15 個同定した (表 1)。これらの 15 個の遺伝子は低温への適応に重要な役割を果たしていると考えられるが、その生理的機能は分かっていない。また、*rbpA1*, *rbpA2* の遺伝子破壊株を作製したが、低温での生育に大きな影響はなかった。これは、*Anabaena* PCC 7120 には *rbp* 遺伝子が多数存在するためと考えられる。

大腸菌では、リボソームに結合し翻訳を阻害する抗生物質が、遺伝子発現に対して温度シフトと同様の影響を与えることが知られており、リボソームが温度センサーとして働く可能性が示唆されている。*Anabaena* PCC 7120 においても、32°C で tetracycline により *rbpA1*, *A2* 等の転写産物量が増加した (図 3)。生育に影響が無い濃度でもこの増加が起こり、streptomycin では増加が起こらないため、単に翻訳の阻害により増加しているのではないことが分かる。これらの遺伝子は、リボソームの状態の変化により転写産物量の増加が起こると考えられる。

表1 光の有無に関わらず低温シフトにより転写産物量が増加するORF

ORF	Product
<i>alr0169</i>	cyclomaltodextrin glucanotransferase
<i>alr0483</i> <i>engA</i>	GTP binding protein
<i>alr0484</i>	hypothetical protein
<i>alr0741</i> <i>rbpA1</i>	RNA-binding protein
<i>alr0803</i>	hypothetical protein
<i>alr0804</i>	unknown protein
<i>all0875</i> <i>lti2</i>	probable alpha-glucanotransferase
<i>all0878</i>	probable acetyltransferase
<i>asr1532</i>	unknown protein
<i>alr1533</i> <i>rca</i>	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
<i>alr1819</i>	hypothetical protein
<i>alr2087</i> <i>rbpA2</i>	RNA-binding protein
<i>all2883</i>	two-component hybrid sensor & regulator
<i>all4051</i> <i>anaKc</i>	homolog of akinete marker protein
<i>all4052</i>	transketolase

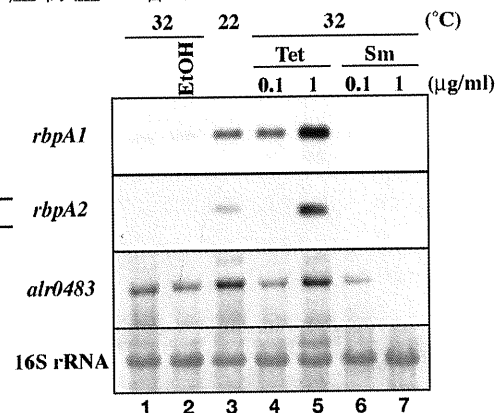


図3. tetracyclineによる転写産物量の増加。32°Cで培養した細胞(レーン1)を8個の培養試験管に分け、以下の処理を行い、2時間後に集菌した。tetracyclineを溶かすのに用いたエタノールを最終濃度0.01%で加えた(レーン2)。22°Cに移した(レーン3)。それぞれ示された濃度のtetracyclineを加えた(レーン4, 5)。それぞれ示された濃度のstreptomycinを加えた(レーン6, 7)。mRNAの検出に用いたプローブをそれぞれ図の左に示す。

III. *rbpA1* 発現調節の解析

rbpA1 の発現調節機構を明らかにするため、*lacZ* 遺伝子をレポーターとして用い、発現調節に働く *cis* 配列の検索を行った。このために、primer extension により *rbpA1* の転写開始点を決定し直した。*rbpA1* 転写産物は、120 塩基の 5'非翻訳領域 (5'UTR) を持っていた。転写開始点の上流 209 塩基から下流 211 塩基までの配列を *lacZ* の上流に挿入すると、*lacZ* の発現は温度依存的となり、22°C での転写産物量は 38°C と比べ約 20 倍に増加した (図 4)。これは、この領域に温度依存的な発現を調節する配列が存在することを示している。まず、転写開始点の上流側の配列の解析を行った。上流配列を 177 塩基まで短くすると 22°C での転写産物量は半減したが、低温での蓄積は維持された。さらに上流配列を短くしたが、上流 35 塩基までを含めば、低温での蓄積が起こった。上流 8 塩基のみでは、転写産物は全く検出されなくなったが、

これはプロモーターとして機能しなくなったためと考えられる。従って、転写開始点の上流には転写を活性化させる配列が存在するが、低温での転写産物の蓄積に必要な配列は他にあると考えられた。そこで、5'UTR が低温での転写産物の蓄積に及ぼす影響を検討した (図 5)。5'UTR を 103 塩基まで持てば、22°C における転写産物量は 38°C での約 20 倍であった。しかし、46 塩基まで短くすると 22°C での転写産物量は激減し、さらに 4 塩基のみではほとんど検出されなかった。このことは、5'UTR が 22°C での転写産物の蓄積に必要であることを示している。低温で転写産物量が増加する 6 個の *rbp* 遺伝子の 5'UTR 配列は保存されているが、その中でもよく保存されている配列 BOX I, BOX II および BOX III がある。これらの配列に変異を導入すると、22°C での転写産物量が減少した。

次に、*rbpA1* の発現調節におけるリボソームの役割を検討した。リボソームの結合状態が mRNA の安定性等に影響を与え、発現量を調節することが知られており、本研究においても低温における *rbpA1* 転写産物量の増加にリボソームが関与している可能性が示唆された。リボソーム結合部位 (RBS) に変異を導入したコンストラクト pMR では、22°C における転写産物の蓄積が起こらなかった (図 6)。また、RBS に変異を導入したことにより、転写産物の安定性が 30%に減少していた。このことはリボソームの結合により、低温において転写産物が安定化されることを示している。しかし、図 5 において 5'UTR を 103 塩基持つコンストラクト pD103 では、RBS は存在しないが 22°C で転写産物の蓄積が起こった。pMR と pD103 の違いは、RBS の下流のコード領域の配列の有無である。そこで、pMR のコード領域にさらに変異を導入した pMR-M を作製した。pMR-M では 22°C での転写産物の蓄積が回復し、安定性も上がっていた。以上の結果から、コード領域内に転写産物を不安定化する配列が存在するが、リボソームが結合している状態ではその機能は阻害され、転写産物は安定化されて、蓄積すると推定された。

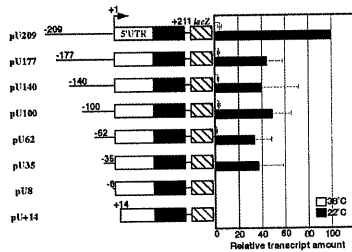


図4. *rbpA1-lacZ* 融合遺伝子の発現調節に働く *cis* 配列の解析。*lacZ* 遺伝子の 5'UTR の上流に、*rbpA1* の転写開始点の上流からコード領域の途中までの配列を挿入したプラスミドを作製した。転写開始点を +1 としたときの 5' 末、3' 末の位置を示してある。白い四角は 5'UTR を、黒い四角はコード領域を、斜線の四角は *lacZ* 遺伝子を表す。各プラスミドを *A. variabilis* M3 に形質転換し、38°C で培養した細胞 (白い棒グラフ) と 22°C に移してから 2 時間後の細胞 (黒い棒グラフ) から RNA を抽出し、ノザンブロットにより *lacZ* mRNA を測定した。

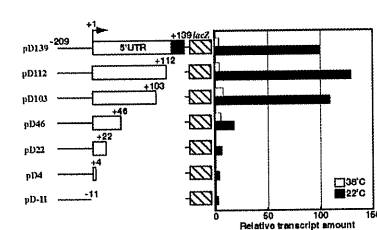


図5. *rbpA1-lacZ* 融合遺伝子の発現に及ぼす 5'UTR の影響。様々な長さの 5'UTR を含むコンストラクトを作製し、*lacZ* 遺伝子の発現をノザンブロットにより解析した。

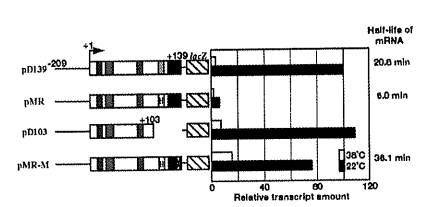


図6. リボソームによる転写産物の安定化。リボソーム結合部位 (RBS) を *Hind* III 認識配列 (H) に変えたコンストラクト pMR とさらにそのコード領域内の配列 CGTAGG を AGTCTA に変えたコンストラクト pMR-M を作製した。mRNA の半減期は、以下のように求めた。22°C で 2 時間培養した細胞に Rifampicin を終濃度 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ で加え、加えた直後、5 分後、10 分後、20 分後、40 分後に集菌し、RNA を抽出した。primer extension により、各時間における mRNA 量を測定し、半減期を算出した。

<まとめ>

本研究により、DNA セグメントからなる *Anabaena* DNA microarray により転写産物レベルの変化を検出できることが示された。そこで、このマイクロアレイを用い、低温シフトによる転写産物レベルの変化を光照射下と暗所の 2 条件で解析した。遺伝子発現に及ぼす低温の影響を光の影響と区別することで、光の有無に関わらず低温において転写産物量が増加する遺伝子を同定した。これらの遺伝子の発現は、リボソームを介して調節されている可能性が示唆された。また、*rbpA1* の発現調節においては、5'UTR が低温での転写産物の蓄積に必要であり、低温での転写産物の安定化には、リボソームの結合が関与していることが示唆された。