

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 16 年度博士課程 入学

氏 名 関 麻子

指導教員 田中 寛

論文題目

シアノバクテリアにおけるグループ 1/2 シグマ因子群による環境応答機構に関する研究

序章

バクテリアの転写装置、RNA ポリメラーゼのプロモーター認識特異性を決定するサブユニットはシグマ因子である。バクテリアは様々な環境変化やストレスに応じて遺伝子発現をダイナミックに変化させるが、この際にはシグマ因子の置換による RNA ポリメラーゼ特異性の変化が大きな役割を果たすことが知られている。その構造から、シグマ因子はシグマ 70 型及びシグマ 54 型に大別される。前者に含まれるグループ 1 シグマ因子は一つの細胞内に一種類しか存在せず、生育に必須なハウスキーピングな役割を果たしている。当研究室において、グループ 1 と相同性の高いグループ 2 シグマ因子群が、様々なバクテリアに普遍的に存在することが見出されてきた。中でもシアノバクテリア群は 4-5 種類と、特に多くのグループ 2 シグマ因子群をそのゲノムにコードしている。シアノバクテリアは太古から存続している生物であり、現在も海、湖、緑地、砂漠に至るあらゆる環境下に生存している。本研究は、シアノバクテリアにおけるグループ 2 シグマ因子の解析を中心に、シアノバクテリアのもつ優れた環境適応能力を明らかにすることを目的として行ったものである。

第一章 シアノバクテリアにおけるグループ 1/2 シグマ因子群の *in vitro* 転写特異性

シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 (以下 *Synechococcus*) は、グループ 1 シグマ因子 (RpoD1) と 5 種のグループ 2 シグマ因子群 (RpoD2、RpoD3、RpoD4、RpoD5 (SigC)、RpoD6) を持つ。これらグループ 1/2 シグマ因子は、特にプロモーター認識ドメインにおいて相同性が高い。本研究では *Synechococcus* 細胞から精製した RNA ポリメラーゼコア酵素、および大腸菌を用いて過剰発現させた RpoD1、RpoD3 及び RpoD4 により RNA ポリメラーゼホロ酵素を再構成し、*in vitro* 転写系を用いてプロモーター認識特異性を調べた。その結果、RpoD1、RpoD3 及び RpoD4 は共に *tac*、*rrnA* 等のコンセンサス型-プロモーターから転写を開始することができた。しかし、シグマ因子の違いによる転写活性の強弱が見られることから、これらシグマ因子の認識特異性は類似しているが同一ではない。アミノ酸配列を用いた系統解析の結果は、シアノバクテリアのそれぞれのグループ 1/2 シグマ因子が多様なシアノバクテリアの間で広く保存されていることを示す。従って、それぞれのグループ 1/2 シグマ因子は互いにプロモーター認識において重複性を持ちつつ、保存性の高い機能を分担していると考えられた (1)。

第二章 シアノバクテリアにおけるグループ 2 シグマ因子の環境応答機構

シアノバクテリアのグループ 1/2 シグマ因子群はどの様に機能を分担しているのだろうか。実験室培養条件 (30°C、2%CO₂、30 µE⁻¹s⁻²) で培養した *Synechococcus* 細胞を、塩 (0.5 M 塩化ナトリウム)、浸透圧 (0.5 M ソルビトール)、強光 (1,500 µE⁻¹s⁻²)、暗、高温 (42°C) 及び低温 (22°C) で 30 分間処理した後、グループ 1/2 シグマ因子群の発現を mRNA レベルで調べた。その結果、6 種のシグマ因子は各刺激に应答して異なる発現パターンを示し、特に RpoD3 は強光処理によって特異的に発現誘導されることが明らかになった。この際のシグマ因子群の発現を蛋白質レベルで解析した結果、RpoD1、RpoD2 及び RpoD4 が一定の発現量を示すのに対し、RpoD3 蛋白質の顕著な増加が見られた。また、*rpoD3* 破壊株は光高感受性を示すことが明らかになったことから、RpoD3 は強光ストレスへの環境適応に関与することが示唆された。

第三章 シアノバクテリアにおける *rpoD3* 光発現誘導に関わるシグナル伝達因子

第二章で述べた、RpoD3 の光発現誘導機構を調べるため、*rpoD3* 遺伝子の転写開始点を決定してその周辺領域の構造を解析した。その結果、*rpoD3* は単一の転写開始点及びシグマ 70 型

-10 配列を有するプロモーターを持ち、その近傍に光応答性エレメント (HLR1) 様配列が存在することが明らかになった。HLR1 は、光応答シグナル伝達に寄与する二成分制御系センサーキナーゼである NblS 依存的に発現誘導される遺伝子群、*hliABC*、*psbAI*、*nblA*、*cpcB* のプロモーター領域に見出されたコンセンサス配列 ((G/T)TTACA(TT/AA)nn(T/G)TACA(TT/AA)) である (Kappell ら, *Arch. Microbiol.* **186**: 403-413 (2006))。従って *rpoD3* は、光に応答して NblS 依存的に発現誘導される可能性が強く示唆された。NblS は、シアノバクテリアにおいて生育に必須なセンサーキナーゼの一つであるが、対応するレスポンスレギュレーターはこれまで知られていない。現在、*RpoD3* の過剰発現株におけるマイクロアレイ解析により、*RpoD3* 支配下にある遺伝子群の特定を進めている。また、*rpoD3* プロモーターの転写活性化に直接に関わると考えられるレスポンスレギュレーターを特定するため、候補となるレスポンスレギュレーター蛋白質抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析を行っている。

第四章 シアノバクテリアにおける Fe-S クラスターの生合成に関わる *sufBCDS* オペロンの光応答性転写制御

sufBCDS 遺伝子群は、広くバクテリアに保存されている Fe-S クラスター生合成システムの一つをコードしており、酸化ストレスや鉄欠乏により発現誘導される。強光 ($1,500 \mu\text{E}^{-1}\text{s}^{-2}$) 照射 4 時間後における *sufBCDS* オペロンの発現を調べた結果、二つのプロモーターのうち、P2 からの転写産物は一定であったが、P1 からの転写産物が著しく増加していた。強光による *sufBCDS* オペロンの発現誘導は *Synechococcus* の *rpoD3* 欠損株でも消失しないことから、別の転写因子による制御機構が考えられた。*sufBCDS* オペロン上流域には、逆向きに ORF*sll0088* が存在する。*sll0088* は転写因子様ドメインを持ち、その欠損株では *sufBCDS* オペロンの発現が著しく上昇することから、同オペロンの負の制御因子であろうと報告されている (Wang ら, *J. Bacteriol.* **186**: 956-967 (2004))。 *Synechocystis* の P1 及び P2 について *in vitro* 転写解析した結果、共にグループ 1 シグマ因子 (SigA) によって認識された。また、大腸菌過剰発現系により調製された Sll0088 を同反応系に加えたところ、*in vivo* 解析と同様に P2 には影響を及ぼさなかったが、P1 からの転写を濃度依存的に抑制した (2)。

第五章 シアノバクテリアにおける RNA ポリメラーゼ結合蛋白質

RNA ポリメラーゼの特異性調節は、シグマ因子以外にも RNA ポリメラーゼに結合する調節因子群によってもなされることが多い。このような観点から、本研究ではシアノバクテリア RNA ポリメラーゼに結合している蛋白質因子について検討した。RNA ポリメラーゼコア酵素を構成するサブユニットのうち、 β' の C 末端にヒスチジンタグを付与した *Synechocystis* 変異株を用い、この株からニッケルアフィニティーカラムとグリセロール密度勾配を用いて RNA ポリメラーゼを精製した。その結果、同画分に数種の低分子量蛋白質を見出した。これらの蛋白質は質量分析により、リボソーム蛋白質 (Rps2, Rps3, Rps11)、集光アンテナサブユニット (CpcC1, CpcC2) 及びヒスチジン合成酵素 (HisB) と同定された。リボソーム蛋白質及び集光アンテナサブユニットとの相互作用は、各々転写と翻訳のカップリング、及び光依存的な転写装置の制御機構を示唆している可能性が考えられる。

総括

本研究では、バクテリアの中でも特に多様性に富んだシアノバクテリアの環境適応機構を転写レベルで解明する目的で、RNA ポリメラーゼのシグマ因子群に注目した。*In vitro* 転写の結果から、グループ 1/2 シグマ因子におけるプロモーター認識特異性の重複を示したが、各シグマ因子は、塩、浸透圧、強光、暗、高温及び低温の刺激に応答して、異なる発現パターンを示した。中でも、RpoD3 は強光特異的に発現誘導され、*rpoD3* 欠損株は光高感受性を示した。また、*rpoD3* のプロモーター領域には HLR1 様エレメントが存在し、NblS シグナル伝達系の制御下にあることが強く示唆された。一方で、同様に強光によって発現誘導される *sufBCDS* オペロンは、RpoD3 ではなくグループ 1 シグマ因子及び負の転写因子 SII0088 依存的な転写制御を受けていた。これらの結果から、シアノバクテリアはあらゆる光環境に適応するため、グループ 1/2 シグマ因子や他の転写因子及びシグナル伝達因子を含む、複数システムによる転写レベルの制御機構を持つことが示された。

(1) Goto-Seki, A. et al. *Mol Microbiol* **34**: 473-484 (1999)

(2) Seki, A. et al. *FEBS Lett* **580**: 5044-5048 (2006)