

# 絶対光独立栄養型ラン藻シネココッカスにおける転写制御ネットワークの解明

●杉田 護<sup>1)</sup> ◆小侯 達男<sup>2)</sup> ◆岩崎 秀雄<sup>3)</sup>

1) 名古屋大学遺伝子実験施設 2) 名古屋大学大学院生命農学研究科 3) 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

## 〈研究の目的と進め方〉

ラン藻は、環境要因の変動に対して光捕集系や無機物質同化系の活性を最適化するための酵素活性制御系と遺伝子発現制御系を有している。本研究では、バクテリアの二成分シグナル伝達制御系を介した転写プロファイルの解析、無機物質同化系を制御する転写因子の同定と機能解析、概日時計遺伝子を介したゲノムワイドのグローバルな転写制御の分子機構の解析を行い、ラン藻（シアノバクテリア）に特有の転写制御ネットワークを明らかにすることを目的とする。このため、ゲノムサイズがラン藻の中でも比較的小さい *Synechococcus* sp. strain 6301 株のゲノム配列情報とDNAマイクロアレイ技術、および多数の変異株を用いた生化学的、分子生物学的な解析を行う。本研究期間前半で絶対光独立栄養型ラン藻シネココッカス (*Synechococcus*) 6301 株のゲノム解析を行い全ゲノム構造を完成させる。全研究期間（5年間）を通して、ラン藻遺伝子の機能解析を行うが、その生物材料として、形質転換が可能な近縁株であるシネココッカス 7942 株を主に用いるが、研究課題によっては光従属栄養型ラン藻のシネコシステス 6803 株 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) も用いる。

## 〈研究開始時の研究計画〉

### (1) *Synechococcus* 6301 株ゲノムの全構造の決定とゲノム配列の情報公開（2000年度からの研究計画）

①研究開始時に、*Synechococcus* 6301 株ゲノムの全域 2.7 Mb をカバーする 201 個の  $\lambda$  DNA クロンを整理化していたので、それぞれの  $\lambda$  DNA の挿入ゲノム配列を LA PCR 法で増幅した DNA 断片をショットガンシーケンスにより塩基配列を決定する。シーケンス作業は、島津製作所ゲノミックスリサーチ室で行い、得られた配列情報のアセンブリー、ギャップフィリング、遺伝子予測およびアノテーションは名古屋大学遺伝子実験施設で行う。国内外のラン藻研究者の配列検索の依頼に対しては可能な限り対応する。

②配列情報の公開は、名古屋大学遺伝子実験施設で独自に行うか、または他研究機関のインフォマテイクス研究者にデータベース化を依頼する。

③ラン藻と色素体のゲノム構造の進化的興味から、ヒメツリガネゴケの色素体ゲノムの全塩基配列を決定する。また、ラン藻の *rpoA*、*rpoD*、*yca* 遺伝子等の構造を色素体ゲノムコードおよび核ゲノムコードのものと比較検討する。

④二成分制御系遺伝子の網羅的破壊株を作製し、これらを用いた DNA マイクロアレイ解析を行う。（2003年度からの研究計画）

### (2) 窒素同化、炭酸同化系の遺伝子制御ネットワークの解明（2001年度からの研究計画）

①ラン藻の制御遺伝子群の破壊株の窒素、および炭素欠乏への応答過程で示す性質を調べることによって窒素、炭素欠乏に応答した遺伝子発現ネットワークの構造を明

らかにする。そのために、*Synechococcus* 7942 株および *Synechocystis* 6803 株のもつ *ntcA*、*glnB*、および *cbbR* ホモログの変異株を作製する。

② *Synechococcus* 6301/7942 株および *Synechocystis* 6803 株のゲノム配列の中から、窒素同化系および炭素同化系の制御因子候補遺伝子を抽出し、それらの変異株を作製・解析し、新規の制御因子を同定する。

③窒素代謝遺伝子群と炭素代謝遺伝子群のグローバルな転写制御因子を中心にその制御下にある遺伝子群を網羅的に解析する。

④上記で作製した変異株の窒素・炭素栄養条件、光条件など種々の環境条件に対する応答を解析して、ラン藻の環境応答における遺伝子発現制御ネットワークを明らかにする。

### (3) 時計遺伝子を介したグローバルな遺伝子発現制御ネットワークの解明（2003年度からの研究計画）

*Synechococcus* では多くの遺伝子のプロモーター活性に概日リズムが観察される。そこで、概日時計遺伝子群を介したゲノム全域におよぶグローバルな概日発現制御の分子機構を解析する（班外共同研究者として、近藤孝男・名大教授とも密接に連絡をとりながら研究を進める）。

①ルシフェラーゼレポーターを用いたプロモータートラップ法を用い、概日時計の発現に必須の時計遺伝子群 *kaiABC* の欠損株・過剰発現株のプロモーター活性に関する影響を調べる。

②一方、具体的に各遺伝子ごとの発現プロファイル（mRNA レベルの振動パターン）は、限定されたグループでしか解析できていない。*Synechococcus* 6301 株のゲノム情報を用いて、定量性・集積性に優れた Affymetrix 社の GeneChip DNA microarray をカスタムデザインし、概日時計による各遺伝子の発現調節プロファイルをさまざまな環境条件下で解析する。このマイクロアレイは、研究計画(1)と(2)においても勿論共通インフラとして使用することができる。

③以上のゲノム情報解析と並行して、生理学・生化学・分子遺伝学的に概日リズムの発振機構を *kai* 遺伝子の作用機構解析として探究する。

④ *KaiC* は、センサーキナーゼ *SasA* と相互作用することが知られており、*sasA* 破壊株では転写リズムが著しく不安定化する。そこで、研究計画(1)④で杉田が作製する二成分制御系遺伝子の網羅的破壊株を用いてゲノムワイドな時計による転写リズム制御に関わる *SasA* のパートナー・レスポンスレギュレーター探索を行う。

## 〈研究期間の成果〉

### (1) *Synechococcus* 6301 株のゲノム解析に関する成果 2001年度までの成果

最長 310 kb の contig を含む 1 kb 以上の contig 120 個を構築した（2002年2月28日）。全 contig の塩基配列を集計すると 2.57 Mb となり、ゲノム全体の 95% に相当する。さら

に、ギャップフィリングとアノテーション作業を進めた。(論文2)

新規の核酸結合蛋白質をコードする遺伝子 (nbp1) を発見した。(論文1)

2002, 2003年度の成果

① *Synechococcus* 6301株ゲノムの全塩基配列をほぼ完成させた。全長2,696 kbの中に、2つのrRNA遺伝子オペロン (rrnAとrrnB)、45のtRNA遺伝子 (1個はグループIイントロンをもつ) および3つの低分子RNA遺伝子を同定した。また、この中に2525個のタンパク質遺伝子をアノテートした。このうち2,254個 (89%) はラン藻を含む他の生物種のどれかに存在するが、10%の遺伝子は他の生物種のゲノムに存在しないことを明らかにした (図1にゲノムの遺伝子マップを示した)。*Synechocystis* 6803株ゲノムに99個存在するトランスポゼース相同遺伝子は *Synechococcus* 6301株ゲノムには1個も存在しないことが判明した。RNA結合タンパク質Rbp1遺伝子の低温誘導発現は転写と翻訳のレベルで制御されている予備の結果を得た。6301株ゲノム解析の結果、第3のRNA結合タンパク質Rbp3遺伝子を新たに同定した。Rbp3遺伝子の発現も低温で誘導されることを明らかにした。さらに、二成分制御系遺伝子37種を同定した。二成分制御系遺伝子は *Synechocystis* PCC 6803株に81個、*Anabaena* PCC7120株に195個、高熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* BP1株に50個存在することが知られている。(概要をその他論文2にまとめた)

② ヒメツリガネゴケの色素体ゲノムの全塩基配列 (122,890 bp) を決定した。色素体とラン藻のrpoA、rpoD、ycf等の遺伝子構造を比較およびRNA編集の有無を明らかにした。(論文6、7)

2004年度以降の成果

① *Synechococcus* PCC 6301株ゲノムの2525個のタンパク質遺伝子をアノテートした。配列情報は、京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター金久研究室のKEGGデータベースおよびCyanobacteria Gene Annotation Database (<http://cyano.genome.ad.jp/>) からリリース可能となった。

② Affymetrix社のカスタムGeneChipを作製した。全てのORFおよびtRNA、intergenic region (正鎖+逆鎖) の約7,200配列に対してそれぞれ15種類のオリゴプローブセットをデザインした (計約11万プローブ/チップ)。現在、時系列データの解析プログラムも独自に作製した。(後述、(3) ②)

③ 新規の低分子RNA遺伝子を見いだした。ラン藻種間の比較ゲノム解析により、蛋白質コード遺伝子間領域に多数non-coding RNA遺伝子が存在することを予測した。このうち、guaB (syc2263) とtrxA (syc2264) の間に65 ntのnon-coding RNAをコードする遺伝子 (sncA, *Synechococcus* non-coding RNA A) を同定した。sncA破壊株を用いたオリゴDNAアレイ解析により、sncAが鉄輸送に働いている可能性を見いだした。(第27回日本分子生物学会で発表)

*Synechococcus* 6301株ゲノム解析には、杉浦昌弘教授 (名古屋市立大学)、続伯彦教授 (愛知学院大学)、高野純博士 (島津製作所ゲノミックスサーチ室)、軸屋博之博士 (同)、緒方是嗣氏 (同)、四方正光氏 (同) らの協力と支援を受けた。また、遺伝子アノテーションとデータベース構築は、金久實教授 (京都大学化学研究所)、古道美穂氏 (同)、および国内外の多くのラン藻研究者の協力を得て行った。

## (2) 窒素同化、炭酸同化系の遺伝子制御ネットワークの解明

2002年度までの成果

① *Synechococcus* 7942株と *Synechocystis* 6803株のもつ CbbRホモログの中から、CO<sub>2</sub>欠乏にตอบสนองして炭酸水素イオン能動輸送体の遺伝子を活性化するCmpRを同定した。(論文9, 12)

② *Synechocystis* 6803 のLysR型転写制御因子NtcBが亜硝酸イオンにตอบสนองして硝酸同化系遺伝子群を活性化することを明らかにした。(論文10)

③ 窒素代謝に関わる遺伝子群のグローバルな活性化因子であるNtcAが、2-オキシグルタル酸 (2-OG) を転写活性化の必須因子として要求することをin vitroの転写系を使って証明した。(論文11)

④ 強光誘導性遺伝子として知られているpsbAIIとpsbAIIIの発現がCO<sub>2</sub>欠乏によっても活性化されることを明らかにした。

⑤ 炭酸水素能動輸送体の構造解析から、この輸送体が活性制御ドメインをもつことを推定した。(論文12)

2003年度以降の成果

① 比較ゲノム解析により硝酸還元酵素の活性発現に必要な新規遺伝子を同定した。(論文13)

② CO<sub>2</sub>欠乏下における炭酸水素イオン能動輸送体遺伝子の活性化にかかわる転写制御因子CmpRが、強光誘導性遺伝子psbAIIとpsbAIIIのエンハンサー領域に結合して発現を促進することを明らかにした (前項③の結果と合わせて論文14とした)。

③ 亜硝酸イオンを感知して硝酸同化系遺伝子群を活性化する転写制御因子NtcB (前項②) が、硝酸イオン制限条件下での遺伝子発現調節と細胞の生存に重要な役割を果たすことを明らかにした (論文15)。

④ 比較ゲノム解析と遺伝学的解析により、他のラン藻種にはなく、*Synechococcus* PCC 7942株/6301株にのみ存在する遺伝子群の中に、潜在的な硝酸輸送活性をもつ新規トランスポータの遺伝子 (syc1147) とその活性を制御する二成分シグナル伝達系の遺伝子群 (syc2277-syc2278) を同定した (小俣と杉田の共同研究、論文16)。syc2277はレスポンスレギュレーターCheYサブファミリーのひとつであり、syc2278はハイブリッド型センサー・スチジニキナーゼであるが、これらの下流にさらに2種の新規制御タンパク質の関与が明らかとなり、従来の枠組みを越えた二成分シグナル伝達系の存在が明らかになった。(論文準備中)

⑤ 2-OGセンサーであるPIIタンパク質は硝酸イオン輸送体の活性を抑制的に制御しており、窒素欠乏条件下ではリン酸化を受けることが知られているが、アミノ酸置換したPII変異株の性質の解析から、リン酸化・脱リン酸化ではなく、2-OGとの結合が硝酸イオン輸送の抑制活性を支配していることを明らかにした。(追加論文15.5) さらにPIIの欠失により、*Synechocystis* PCC 6803株の窒素同化系遺伝子群の内、アンモニア同化関連遺伝子群の発現が特異的に変化することから、PIIを介した新規な制御ネットワークの存在を推定した。(論文投稿中)

⑥ 2-OGが硝酸イオン輸送体の制御ドメインに結合することを示し、この物質の翻訳後活性制御における新たな役割を明らかにした。(論文投稿中)

⑦ マイクロアレイ解析により、NtcAの制御下で窒素欠乏にตอบสนองして発現する新規の遺伝子を多数見出した。さらにNtcA欠失株での解析から、NtcA非依存的な窒素欠乏への応答機構が存在することを見出した。(論文準備中)

⑧ CbbRホモログのひとつであるRbcRがRubisco遺伝子

を活性化することを示唆する結果を得た。

以上に述べた研究成果の概要を図2にまとめた。

### (3)概日時計遺伝子を介したゲノムワイドのグローバルな転写制御の分子機構の解析

①まず、プロモーターラップを用いた *Synechococcus* のゲノムワイドな概日発現に関して、KaiCが時計遺伝子のみでなく、ほとんどの遺伝子のプロモーターに抑制的に働くことが明らかになった。また、kaiBCオペロンの概日発現には必ずしも特異的cisエレメントが必要なものではないことを明らかにし、概日リズムの発振モデルに新たな展開をもたらした。(論文18)

②オリゴDNAアレイ解析により、全ゲノムの少なくとも30%の遺伝子mRNAに概日発現が認められ、位相は主観的夜明けの時期と主観的日没の時期の二つに分類された。また、従来KaiCはゲノム発現の普遍的抑制因子と考えられていたが、KaiCは夜明けピーク遺伝子群には促進的に働くことが明らかになり、モデルの訂正が必要となった(図3、Iwasakiら、投稿準備中)。また、KaiCの分解速度に関する速度論的研究(論文 Imai et al.)やリン酸化部位の決定(論文19)、KaiA、KaiB、KaiC三者の相互作用ダイナミックスのプロファイリング(論文17)なども同時並行で解析、報告した。

③時計関係の研究での最大の研究成果は、連続暗期中で転写・翻訳活性が極端に低下し、kai遺伝子の転写翻訳が完全に停止してもKaiC蛋白質のリン酸化振動が完全に持続するという発見であった(論文21)。これは、従来ドグマのように語られてきた転写翻訳フィードバックではなく、時計蛋白質翻訳後修飾ダイナミックスを核として基本振動を生じうることを明白に示した初めての報告であり、その後のKaiABC蛋白質の試験管内リン酸化振動発生(世界初の試験管内概日振動発生;論文22)に繋がる重要な転換点となった。これらの研究は、シアノバクテリアに限らず哺乳類、植物を含む生物時計の分子機構の常識を一変させ、大きな反響を呼んだ。この過程でも、マイクロアレイを用いて連続明、連続暗、転写阻害剤添加時など、さまざまな条件での遺伝子発現パターンの解析を行うことで、上記の観察の裏付けに利用することも出来た(Iwasakiら、投稿準備中)。

④化学振動子からどうやってゲノムワイドな発現調節が起こるか、は次の大きな課題である。二成分情報伝達系遺伝子群の網羅的な破壊株の解析から、sasAセンサーキナーゼ破壊株と極めてよく似た表現型を示すレスポンスレギュレーター破壊株を得た。今回得た原因遺伝子がコードする蛋白質は典型的なDNA結合型因子であり、SasAとのリン酸基転移も認められた。KaiCのリン酸化状態はSasAキナーゼの自己リン酸化状態を制御し、結果的にこの応答因子の活性を周期的に制御することで、転写調節リズムを引き起こす一因となっていると考えられる(Takaiら、投稿準備中)。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) *Synechococcus* 6301株の全ゲノム配列はラン藻ゲノムとしては9番目となる。近縁の*Synechococcus* 7942株のゲノムは2005年に米国で決定された。国内外で20数種ほどのラン藻ゲノム解析が終了または進行中である。*Synechococcus* 6301株とその変異株である7942株は国内外とも古くから研究に用いられてきたラン藻株であるため、本研究で得られた成果は7942株や*Synechocystis* 6803株などのラン藻種間のゲノム機能比較解析に大きく貢献した。また、*Synechococcus* オ

リゴDNAチップの作製は、ラン藻研究の発展に大きく寄与するものである。

(2) 炭素同化系遺伝子群の制御因子の探索においては、*Synechocystis* 6803株の3つのCbbRホモログの機能解析が重要である。我々はこれら3つのうちCmpRの機能を決定したが、フランスのグループが他の1つであるNdhRの機能を同定し、残るひとつ(RbcR)の機能解析が目下の最重要課題である。*Synechocystis* では作製できないrbcR遺伝子の変異株を*Synechococcus* で単離することができたので、この遺伝子の機能解析を世界の他のグループに先駆けて行うことができると考えている。

炭素欠乏と強光への応答に共通の機構が関与することを示唆する生理学的研究結果は多いが、今回、典型的な強光誘導性遺伝子として知られるpsbAII、psbAIIIの発現のエンハンサーに炭素欠乏への適応に関与するCmpRが結合することが明らかになり、炭素欠乏と強光への共通の応答機構の一端が具体的に示すことができた。一方、2-オキソグルタル酸が窒素によるグローバルな遺伝子制御のシグナルであることを解明したことは、世界に先駆ける重要な成果である。2-オキソグルタル酸は、炭素同化系と窒素同化系の接点に位置する代謝物質なので、今後、炭素栄養条件や光合成が窒素同化系遺伝子群の発現に与える影響を解析する上で、きわめて重要な基礎的知見となる。

PIIタンパク質は、*Synechococcus* PCC 7942株では窒素同化系遺伝子全般の制御に関与しているが、*Synechocystis* PCC 6803株では、アンモニア同化系の遺伝子群のみを特異的に制御することを見いだした。このことは、制御タンパク質が保存されていても、種が異なれば遺伝子制御ネットワークに違いがあることを示す例である。今後、異なる種の比較により、環境適応や進化的適応における遺伝子制御ネットワークの可塑性の意義を明らかにすることが重要であると考えられる。

従来、ラン藻種間で保存されている遺伝子だけに研究の重点が置かれてきたが、特定のラン藻種にしか存在しない遺伝子にも重要なものがあり、それが細胞の制御ネットワークに組み込まれていることを示すことが出来た。ラン藻はきわめて多様な環境に分布しており、今回の知見は、種固有の遺伝子群の獲得と環境適応、ゲノム進化との関連を考える上で重要な基礎的知見である。

(3) 概日リズム研究では、15年以上「振動発生原理」とされてきた転写翻訳フィードバックモデルを初めて覆し、蛋白質間相互作用を伴う動的化学反応によって長周期リズムを生じることを証明した。この研究成果は、生物リズム学、微生物学の新たな展開にとどまらず、新たな動的化学反応の発見を意味しており、蛋白質科学、非線形物理化学、数理生物学、応用化学などに多大なインパクトを与えうるものであり、関連分野への貢献度が極めて高いといえる。

*Synechococcus* の概日リズム制御機構に関する従来のモデルを覆し、ラン藻の概日振動は翻訳後修飾レベルの動的化学反応系(リン酸化制御に関する酵素ダイナミックス)によって引き起こされることを発見、世界で初めて体内時計の試験管内再構成に成功した。また、マイクロアレイ解析により全ゲノムの少なくとも30%の遺伝子mRNAに概日発現を認めることができ、設

定目的を達成するレベルまで研究が進展した。ゲノムワイドな転写調節を介した時計遺伝子の発現制御という新たな時計機構の方向性を示した点で大きな成果が得られたと考えている。また、定量性に優れ、詳細な解析に適したAffymetrix GeneChipを完成したのはシアノバクテリアでは初である。世界に先駆けた解析が可能になった。また、二成分情報伝達系因子としてゲノムワイドな発現調節のカギとなる因子を同定することもでき、化学振動子がいかにして転写リズムを駆動するかについて新たな展開がもたらされた。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

窒素・炭素同化系の遺伝子発現のネットワークを解明する、という当初目的に対しては、個別の重要な新知見を得たものの、全体の一部しか解明できておらず、全容解明には至らなかった。マイクロアレイを用いた各転写因子の機能の網羅的解析が遅れたのがひとつの理由ではあるが、制御遺伝子の中に安定な変異株の得られにくいもの (*rbcR*と*glnB*)があったことが本質的な問題であった。これらの変異株は作成が困難だけでなく、二次的変異によると推定される表現形質の不安定性のため解析が遅れ、*glnB* (PIIの構造遺伝子)については論文をまとめることができたが、*cbbR*ホモログの中でもっとも重要と予測される*rbcR*の機能解析にはさらなる解析が必要である。

#### 〈今後の課題〉

本研究でシネコッカスの全ゲノム配列情報が得られ、これを基盤として高密度のオリゴDNAマイクロアレイを整備することができた。今後は、網羅的な遺伝子破壊株とオリゴDNAマイクロアレイを用いた解析を徹底的に行うことにより、当初研究計画の目標である絶対光独立栄養型ラン藻における二成分制御系を介した窒素・炭素同化系の遺伝子発現のネットワークおよび概日時計遺伝子群を介したゲノム全域におよぶグローバルな概日発現制御の分子機構を解明する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文/プロシーディング

1. Sugita, C., Sugiura, M., and Sugita, M., A novel nucleic acid-binding protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC6301: a soluble 33-kDa polypeptide with high sequence similarity to ribosomal protein S1. *Mol. Gen. Genet.*, 263, 655-663 (2000).
2. 030201124  
Sugita, M., Tsudzuki, T., Sugita, C., Ishiura, M., Ogata, K., Jikuya, H., Takano, J., and Sugiura, M., Genome analysis of *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis*, CSIRO Publishing, S41-9 (2001).
3. 030201056  
Miyata, Y., Sugiura, C., Kobayashi, Y., Hagiwara, M., and Sugita, M., Chloroplast ribosomal S14 protein transcripts is edited to create a translation initiation codon in the moss *Physcomitrella patens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1576, 346-349 (2002).
4. 0303201109  
Kobayashi, Y., Dokiya, Y., Kumazawa, Y., and Sugita, M., Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in

- Nicotiana glauca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299, 57-61 (2002).
5. 310101659  
Atanassova, A., Sugita, M., Sugiura, M., Pajpanova, T., and Ivanov, I., Molecular cloning, expression and characterization of three distinctive genes encoding methionine aminopeptidases in cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch. Microbiol.*, 180, 185-193 (2003).
  6. 310101711  
Sugiura, C., Kobayashi, Y., Aoki, S., Sugita, C., and Sugita, M., Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res.*, 31, 5324-5331 (2003).
  7. 404031528  
Miyata, Y., and Sugita, M., Tissue- and stage-specific RNA editing or *rps14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. *J. Plant Physiol.*, 161, 113-115 (2004).
  8. 0303201139  
Yamaguchi, K., Mayfield, S. P., and Sugita, M., Transcriptional and translational regulation of photosystem II gene expression. In: T. Wydzynski, and K. Sato (eds.): *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, pp. 649-668, Kluwer Academic Publishers, Netherlands (2005).
  9.  
Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., and Maeda, S., Involvement of a *CbbR* homolog in low CO<sub>2</sub> induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, 183, 1891-1898 (2001).
  10. 0303201925  
Aichi, M., Takatani, N., and Omata, T., Role of *NtcB* in activation of the nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Bacteriol.*, 183, 5840-5847 (2001).
  11. 0303201936  
Taniguchi, R., Shirokane, M., Maeda, S., Omata, T., Tanaka, K., and Takahashi, H., Transcriptional activation of *NtcA*-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC7942 by 2-oxoglutarate in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 4251-4255 (2002).
  12. 0303201930  
Omata, T., Takahashi, Y., Yamaguchi, O., and Nishimura, T., Structure, function and regulation of the cyanobacterial high-affinity bicarbonate transporter *BCT1*. *Functional Plant Biol.*, 29, 151-159 (2002).
  13. 40321855  
Maeda, S., and Omata, T., A novel gene (*narM*) required for expression of nitrate reduction activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC7942. *J. Bacteriol.*, 186, 2107-2114 (2004).
  14. 0407291839  
Takahashi, Y., Yamaguchi, O., and Omata, T., Roles of *CmpR*, a *LysR* family transcriptional regulator, in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low-CO<sub>2</sub> and high-light conditions. *Mol. Microbiol.*, 52, 837-845 (2004).
  15.  
Aichi, M., Maeda, S., Ichikawa, K., and Omata, T.,

Nitrite-responsive activation of the nitrate assimilation operon in cyanobacteria plays an essential role in up-regulation of nitrate assimilation activities under nitrate-limited growth conditions. *J. Bacteriol.*, 186, 3224-3229 (2004).

15.5

Kobayashi, M., Takatani, N., and Omata, T. Posttranslational regulation of nitrate assimilation activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, 187, 498-506 (2005)

16

Maeda, S., Sugita, C., Sugita, M., and Omata, T., Latent nitrate transport activity of a novel sulfate permease-like protein of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* in press (2006).

17. 404051612

Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, M., and Kondo, T., KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial clock system. *EMBO J.*, 22, 2117-2134 (2003).

18. 404051619

Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, Y., and Kondo, T., Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 191, 881-885 (2004).

19.

Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., Kondo, T., Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:13927-13932 (2004).

20.

Imai, K., Nishiwaki, T., Kondo, T., Iwasaki, H., Circadian rhythms in the synthesis and degradation of a master clock protein KaiC in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 279, 36534-36539 (2004).

21.

Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., Iwasaki, H., No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* 307, 251-254 (2005).

22.

Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T., Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414-415 (2005).

## 2) その他

1. 404091116

岩崎秀雄 「シアノバクテリアの概日リズム制御機構の新展開」細胞工学22, 1309-1314 (2003).

2.

杉田 護, 杉田千恵子 「シアノバクテリア」、ゲノムミクス・プロテオミクスの新展開 (今中忠行監修)、エヌ・ティ・エス出版、pp.101-112 (2004).

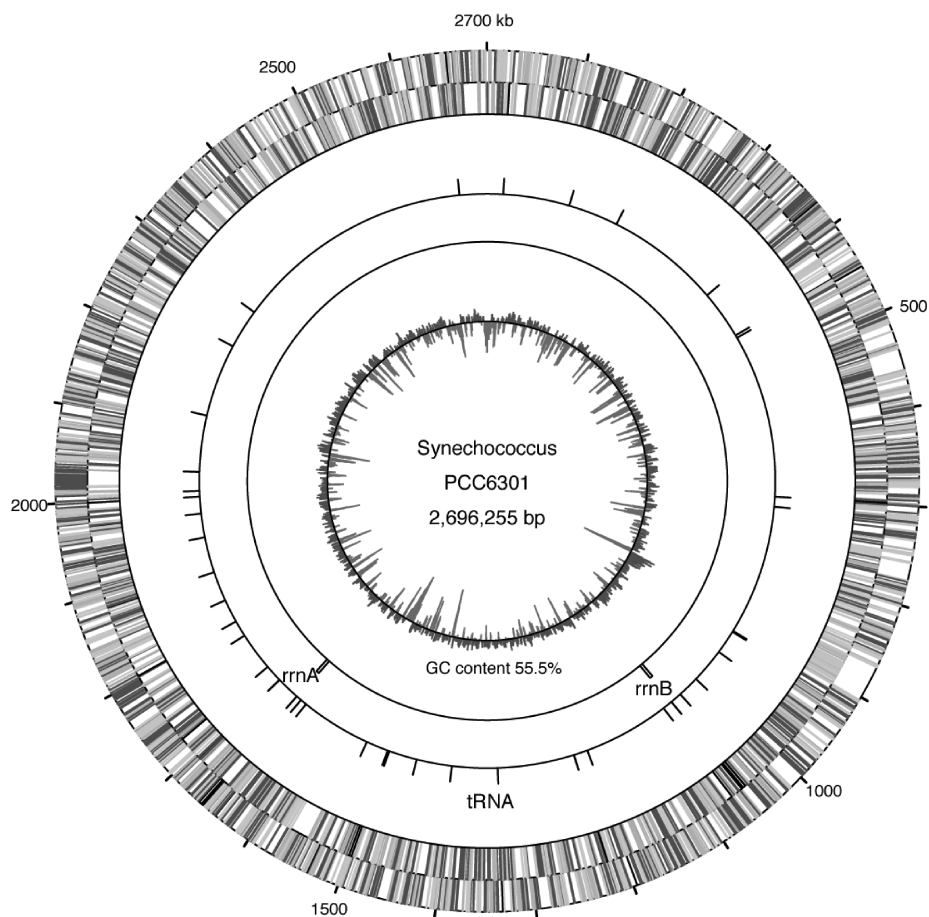


図1.シネコッカス 6301 株ゲノムの遺伝子マップ。

全長 2,696,255 bp の中に、2つの rRNA 遺伝子オペロン (*rrnA* と *rrnB*)、45 の tRNA 遺伝子 (1個はグループ I イントロンをもつ) および 3 つの低分子 RNA 遺伝子を同定した。また、タンパク質遺伝子を 2,525 個予測した。このうち 2,292 個 (91%) はラン藻を含む他の生物種のどこかに存在するが、343 個 (10%) は他の生物ゲノムに存在しないことが明らかになった。2 成分系遺伝子については 37 個同定した。ゲノムの全塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank に登録した (アクセッション番号: DDBJ: **AP008231**)。全配列情報は、京都大学化学研究所バイオインフォマテイクスセンター金久研究室の KEGG データベースおよび Cyanobacteria Gene Annotation Database で検索が可能である。

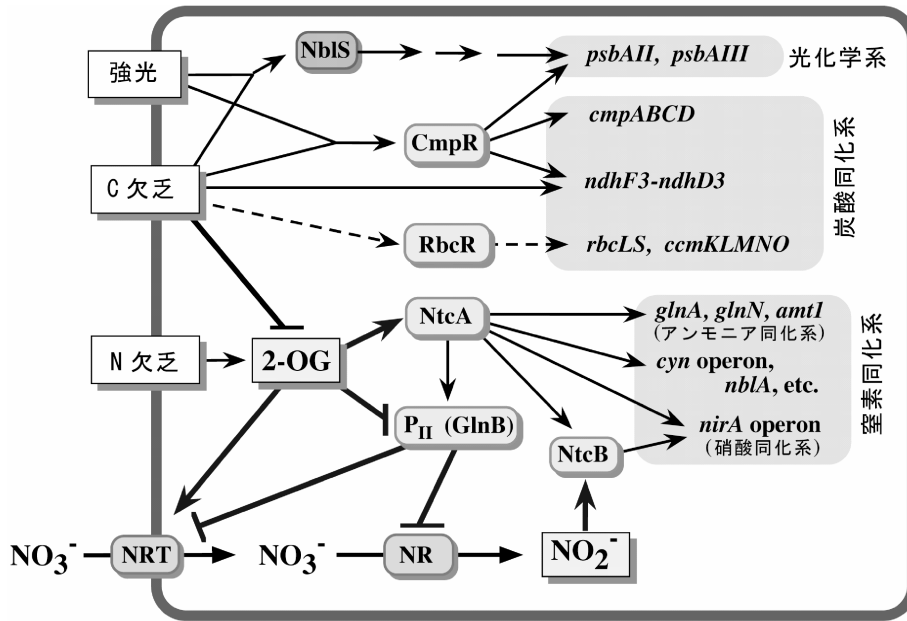


図2.シネコッカス 7942/6301 株における窒素、炭素同化系遺伝子群の制御ネットワーク。

黄色は制御タンパク質、緑色は酵素を表す。また青線はタンパク質同士あるいは代謝物質とタンパク質の相互作用を表す。本研究では、CmpRとNtcBの役割を解明した。また、NtcAの制御物質として2-オキソグルタル酸(2-OG)を、NtcBの制御物質として亜硝酸イオンを同定した。さらにPIIによる硝酸イオン輸送体(NRT)と硝酸還元酵素(NR)の阻害において2-OGとPIIの結合が中心的な役割を果たすこと、および、2-OGが硝酸イオン輸送体にも直接結合することを示して2-OGの窒素同化の制御における重要性を明らかにした。一方、炭素欠乏と強光の影響は従来別個の現象として扱われてきたが、これらが本質的には同じシグナルとして細胞に受容されることを明らかにした。シネコスチス 6803でも基本的には同様のネットワークが存在するが、NRがPIIによる阻害を受けないこと、PIIの有無がアンモニア同化系遺伝子の発現に特異的な影響を及ぼすことなどの相違点を見いだした。

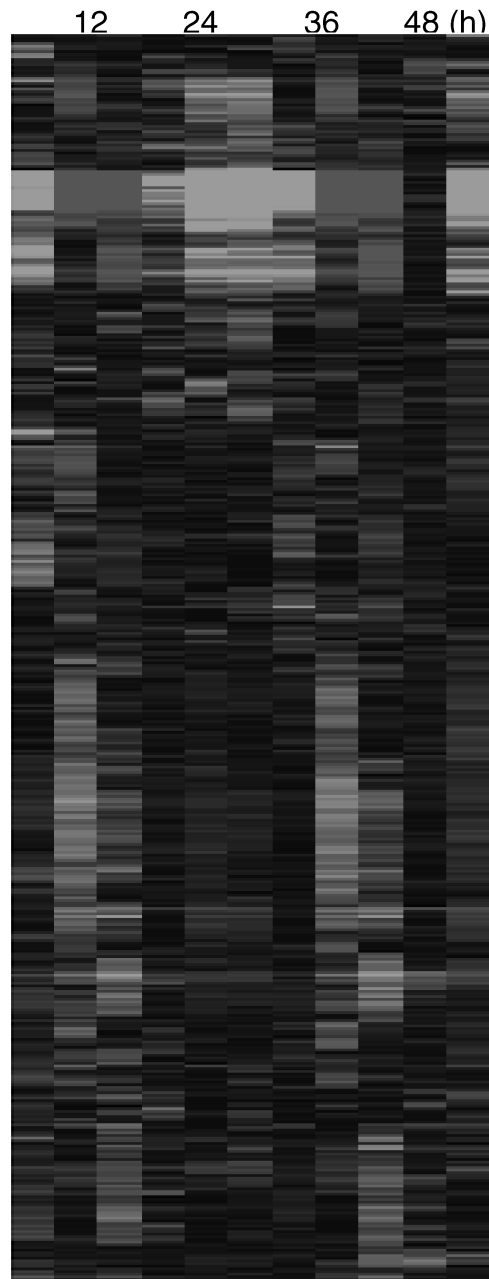


図3.シネコッカス 7942 株の全ゲノム ORF の遺伝子発現プロファイル。

配列情報をもとに、Affymetrix GeneChip (超高密度フォトリソグラフィ型オリゴ DNA マイクロアレイ) をカスタム設計し、2536 個の ORF に関して概日時計による発現制御を解析した。連続培養装置を用いてシネコッカス 7942 株 (6301 とゲノムが相同) を培養した。12 時間:12 時間の明暗サイクルを二回与えたのち、連続明に移し、4 時間後から 44 時間後まで約 2 日間にわたって 4 時間おきにサンプリングし、マイクロアレイ解析をおこなった。上の図では、4-44 時間の各遺伝子発現レベルごとの発現量の平均を 1 としたときの各時間帯での遺伝子ごとの発現量比を算出し、平均よりも高くなるほど赤く、低いほど緑が強調されるように示してある。また、図では階層的クラスタリングをおこなって、発現パターンに関するソーティングを行っており、2536ORF のパターンすべてを表示してある。個々に観られるように、シネコッカスでは連続明では非常に多くの遺伝子の mRNA の蓄積パターンに概日リズムが認められ、位相分布としては主観的夜明けと主観的黄昏時の二つの時間帯に発現ピークが存在することが明らかになった。*Kai* 遺伝子破壊株ではこのようなリズムパターンは完全に失われる。