

単細胞紅藻葉緑体ゲノムにおける転写調節ネットワークの解明

●田中 寛

東京大学分子細胞生物学研究所

〈研究の目的と進め方〉

葉緑体はシアノバクテリア様の光合成細菌の共生に由来すると考えられており、現存する全ての葉緑体は固有のゲノムを維持し続けている。しかし、長い共生の間に多くの共生細菌由来の遺伝子は失われ、或は核ゲノムに移動することで、葉緑体ゲノムは少数の遺伝子のみを残すまでに退化してしまった。緑色植物の葉緑体ゲノムには、光合成遺伝子や、ゲノム上の遺伝子の発現に関与する100種程度の遺伝子のみがコードされており、もともとの細胞としての自律性は殆ど失われたように見える。これに対して、紅藻系統の葉緑体ゲノムには200以上の遺伝子がコードされ、その中には転写因子なども含まれることから、緑色植物に比べて、自律性の高いゲノムが維持されてきたと考えることができる。

Cyanidioschyzon merolaeは単細胞性の紅藻であり、培養が容易であることや、核ゲノムが小型である（約16-Mbp）ことなどから、紅藻類の研究に理想的なモデル系であると考えられる。本研究ではこの生物の葉緑体ゲノムに注目し、細胞共生からの葉緑体の進化や昨日について理解することを目的とした。

C. merolaeの葉緑体ゲノムには4種のシアノバクテリア由来と考えられる転写因子がコードされている。葉緑体ゲノムの遺伝子発現調節系について、本研究ではこれら4種転写因子（Ycf27-30）による転写調節ネットワークの解明を目標として研究を進めた。

〈研究開始時の研究計画〉

葉緑体ゲノム配列をもとに、全蛋白質遺伝子に対するマイクロアレイを作成し、様々な環境変化に対応した遺伝子発現の変化のモニター系を構築する。また、4種の転写因子について大腸菌を用いて組換え蛋白質を調製し、葉緑体ゲノム上における結合部位について解析することで、それぞれの転写因子がどのようなシグナルに対応しているかについて明らかにする。また、これら4種の転写因子については、祖先となるシアノバクテリアにもホモログが存在する。これらの機能解析について、シアノバクテリア遺伝子を用いた研究も並行して進める。

〈研究期間の成果〉

本研究では、C. merolaeの葉緑体ゲノム配列に基づき、推定される214個のORF、核コードの2種のシグマ因子、およびアクチン遺伝子についてprimer setを設計し、PCR増幅後、スライドガラス上に配置してマイクロアレイを作成した。明条件で培養した細胞について、12時間暗処理後に明条件に移し、1時間後および6時間後の遺伝子発現の変化について、マイクロアレイを用いた解析を行った。その結果、全ての遺伝子について転写産物量の増加が観察されたが、一旦1時間後に増加した転写産物がさらに6時間後に増加するパターン（パターン1）と、一旦1時間後で増加した後に再び減少するパターン（パターン2）に大きく分類することができた。パターン1にはフィコビリゾーム遺伝子や光合成活性中心遺伝子、

パターン2にはRubisCO遺伝子やABC transporter遺伝子などが含まれた。

4種の転写因子のうち、Ycf30については大腸菌で組換え蛋白質を調製し、これがRubisCOをコードするrbcLSオペロンのプロモーターに結合することを示すことができた。さらにマイクロアレイ解析により、外界のCO₂濃度に応答して転写調節を受ける遺伝子がこのオペロンだけであったことから、Ycf30はrbcLSオペロンの調節因子であると考えられた。この他にも、Ycf27蛋白質は光合成系IIの活性中心蛋白質をコードするpsbA、psbD遺伝子上流領域に結合することが明らかになった。これら遺伝子では強光ストレス時における転写誘導が明らかになっていることから、Ycf27はこのようなストレスに応答して活性化されるものと考えられた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

C. merolaeに関する研究では、本公募研究の後、計画研究として全ゲノム配列が決定されている。これは藻類としては初めてのゲノム解析であり、極めてインパクトは高い。葉緑体転写調節系の解析についても、類似の研究は国内外とも殆どなされておらず、シアノバクテリア、緑色植物分野を通じて重要な成果として認められている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

4種の転写因子について、大腸菌における発現が極めて困難であり、また発現しても殆ど可溶性蛋白質としての回収が不可能であったことから研究が遅延した。また、葉緑体遺伝子の破壊系の構築についても、まだ成功していない。

〈今後の課題〉

各種の発現系を検討することで、転写因子の蛋白標品を十分に得ることが必要である。また、葉緑体を単離した上でのrun-on転写解析系やin vitro転写系の構築も検討する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. 0303201936

Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda, S., Omata, T., Tanaka, K., and Takahashi, H., Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(7), 4251-4255 (2002).

2. 0404071812

Minoda, A., Sakagami, R., Yagisawa, F., Kuroiwa, T., and Tanaka, K., Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D, Plant Cell Physiol., 45(6), 667-671 (2004).

3. 0404071821

Nakazato, E., Fukuzawa, H., Tabata, S., Takahashi, H.,

and Tanaka, K., Identification and expression analysis of cDNA encoding a chloroplast recombination protein REC1, the chloroplast RecA homologue in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(12), 2608-2613 (2003).