

# 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

●小保方 潤一<sup>1) 2)</sup>

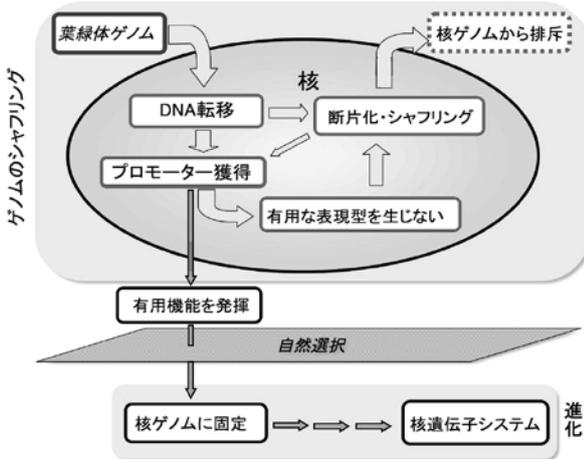
1) 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科 2) 名古屋大学遺伝子実験施設・遺伝子解析分野

比較ゲノム

## <研究の目的と進め方>

細胞内共生者が宿主細胞の一部としてオルガネラ化する過程は一般にシンビオジェネシスとよばれ、真核細胞の成立や進化、さらには地球上の生物種やゲノムの多様化に寄与してきた。シンビオジェネシスでは、一般に共生者ゲノムの縮小と、共生者ゲノムにコードされている遺伝子群の宿主ゲノムへの移動が生じる。この二つの現象をシンプルな原理で説明し、シンビオジェネシスの背後にある駆動力を解明したい、というのが、本研究の根底にある学問的興味である。そして筆者は、その駆動力の鍵が、「DNAフラックス/ゲノムシャプリングの発生」と「プロモーターの獲得・出現」にあるのではないかと考えている。(下図)。

本研究ではこのうちの「プロモーターの獲得・出現」に焦点を絞り、「核外から染色体上に転移してきた外来構造遺伝子が、どのような経路や原理で pol II プロモーターを獲得するのか」を解明する。



## <2008年度の研究の当初計画>

- [1] クリプティックプロモーター活性化機構の解析  
形質転換植物によるモデル実験によって、クリプティックプロモーターの活性化機構の基本メカニズムを解析する。
- [2] 遺伝子トラップ系統生物群による「新生プロモーター」の包括的解析  
シロイヌナズナのトラップ系統については解析を段階的に終了し、結果を整理する。また、より効率的に大規模なトラップ解析を進めるため、単細胞緑藻のクラミドモナスを用いたトラップ系の確立と解析を進める。クラミドモナスのトラップ系では、プロモーターばかりではなく、翻訳産物の葉緑体輸送に必要なトランジット配列の獲得機構についても解析を進める。
- [3] プロモーター構造の多様性と進化に関するゲノム学的・情報生物学的解析  
高密度転写開始点 (TSS) 情報のさらなる収集と植物プロモーターデータベース Ppdb の生物種横断的な拡充を進める。それを基にして、比較ゲノム的な視点から、植物プロモーター

の構造的特徴や多様性、進化などを解析する。

## <2008年度の成果>

### [1] クリプティックプロモーター活性化機構の解析

#### (1) 転写開始複合体と構造遺伝子との相互作用

シロイヌナズナの遺伝子トラップ系統を用いた昨年までの解析から、「構造遺伝子配列がゲノム DNA に挿入」されると、近傍のゲノム領域ではクリプティックプロモーターの活性化や転写開始点の誘導が生じることが強く示唆された。本年度は、この可能性を実験的に検証するため、キメラプロモーターを導入した形質転換植物を用いて、図1のようなモデル実験を行った。

まず、野生型プロモーター (図1, 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。これらの遺伝子を導入した植物について cap-trapper 法により転写開始点を解析したところ、野生型プロモーターでは調節領域の直下に出現していた転写開始点が、改変プロモーターでは最下流のコア領域に移動していることが強く示唆された。そこで、転写開始複合体の形成位置を実際にクロマチン免疫沈降法によって解析したところ、確かにコード領域の最近傍のコア領域に移動していることが示された (図1)。

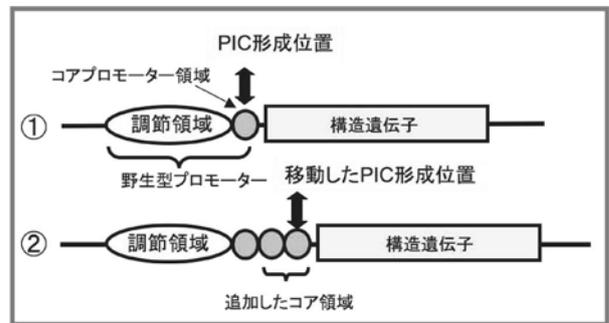


図1 転写開始複合体 (PIC)はコード領域の近傍に誘導される

#### (2) 上記の知見が意味するもの

上記の知見は、ゲノム上での転写開始位置は上流のプロモーター配列によって一義的に決定されるわけではなく、プロモーター領域とコード流域との相互作用によって決まることを意味している (図2)。言い換えると、コード領域自体がプロモーターの広義の構成要素になっている、ということである。これは真核プロモーターについての従来の見方を大きく変えるばかりではなく、「ゲノムのシャプリング」や「構造遺伝子の挿入」がどのようにして「新しいプロモーターの出現」を誘導するのか、という本研究課題の最も本源的な問いに、かなり近い答えを与えてくれる。

図1の結論は、シロイヌナズナの光合成遺伝子プロモーターをモデルとした実験から得られたものであるが、この現象の普遍性と、プロモーターの進化に対して果たしてきたであろう役割を探るためには、プロモーターや転写される配列、生物種などの多様

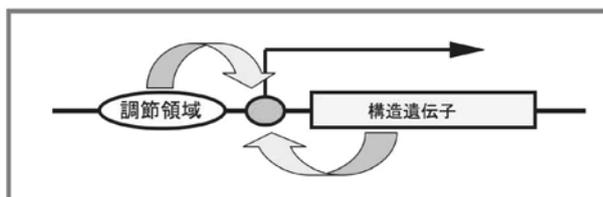


図2 調節領域とコード領域の相互作用が転写開始領域を決定する

性とこの現象との関係をさらに探っていく必要がある。また、構造遺伝子領域が上流近傍のコアプロモーター領域を活性化するための分子的なメカニズムの解明も急務である。

### [2] 遺伝子トラップシステムによる新生プロモーターの包括的解析

#### (1) シロイヌナズナのトラップシステムを用いた解析

転写開始点解析のスケールアップと、解析する cDNA ライブラリーを多様化させる計画については、次世代型シーケンサーの利用が必要であり、支援委員会の調整と指示を待っている。

#### (2) 単細胞緑藻モデルによる解析

プロモーターやトランジット配列の獲得・生成実験をハイスループットで行うため、単細胞緑藻のクラミドモナスを用いて、ルシフェラーゼの分割遺伝子を用いた新しいトラップスクリーニング系の開発を進めた。

### [3] プロモーターの多様性に関するゲノム情報学的解析

#### (1) シロイヌナズナの nupDNA (numDNA) に含まれる葉緑体 (ミトコンドリア) ゲノム由来のプロモーターは核内で機能するのか？

CT-MPSS 法による転写開始点の網羅的解析の結果、オルガネラ由来のプロモーターが核で機能している例はみられなかった。

#### (2) 新規のプロモーター予測のストラテジーを考案した

ナズナ遺伝子性プロモーターでの成績はカバー率 (検出感度) 76%、正解率 72% と高い成績であった。この新規の予測手法は既存の方法とは異なり検出感度はコアプロモーターのタイプに依存しない。また、発現量の低いプロモーターにおいても全く遜色のない検出感度が得られている。この手法を用いてナズナ、イネのゲノム配列からプロモーター領域の予測を進めている。また、この解析において算出されるパラメーターは個々のプロモーターの特徴づけにも用いることができるのではないかと考えている。

#### (3) 遺伝子構造とコアプロモータータイプとの関係を解析した

遺伝子密度の高いシロイヌナズナゲノムではコアプロモーター構造と遺伝子間距離との間に高い相関関係が見られた。イネゲノムは遺伝子密度がシロイヌナズナの 1/2 ~ 1/4 程度である。程度の違いはあるがイネにおいても同様の関係が確認された。

#### (4) ヒメツリガネゴケのプロモーター解析を行った。

ヒメツリガネゴケのプロモーター構成配列を抽出し、構造認識が行えるようになった。基生研・長谷部先生、金沢大・西山先生との共同研究。解析の過程で、ヒメツリガネゴケにおいてはトランスポゾン様 LTR の内部にプロモーターが存在しこれがプロモーターの大きな供給源となっていることが示唆された。

#### (5) 植物プロモーターデータベース ppdb の拡張

拡張版 ver 2.0 を 2008 年 5 月にリリースした。情報支援班のご協力をいただいた。主な改良点・拡張点は以下の通り。

- ・ヒメツリガネゴケへの対応 (基生研・長谷部先生、金沢大・西山先生との共同研究)
- ・異種ホモログ遺伝子間でのプロモーター比較ページ (東大・

佐藤先生との共同研究)

- ・外部 DB とのデータレベルでのリンク (ppdb)  
シロイヌナズナの最も主要な統合データベース TAIR GBrowse にデータ提供し、統合 DB の一画を担うようになった。ppdb へのアクセス数は三倍に上昇した。現在毎週 30 개국からアクセスがある。

### <国内外での成果の位置づけ>

プロモーターの多様性に関する研究は、ヒトやマウスでの研究が全体を先導しているが、植物では、筆者らのグループの他には殆ど研究が行われていない。また、ゲノムのシャフリングやシンビオジェネシスと新規プロモーターの出現メカニズムを関連づけようとする研究は、筆者の知る限り、世界的に見ても類例がない。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度は、研究代表者の転勤に伴い、過渡的に二つの大学で教育研究を進めることになった。また、研究室が年度半ばから耐震改修工事の対象となり、半年間に二度の引っ越しを余儀なくされるなどの想定していなかった事態が重なった。このため、研究の進捗が当初予定を大きく下回ったが、理由がはっきりしているため、次年度に研究の遅れを回復することは可能である。また、同様の理由で、今年度は論文公表の作業も大巾に遅れた。現在数編の論文が投稿中・投稿準備中の状態にある。

### <今後の課題>

本課題では、ゲノムのシャフリング運動とプロモーターの生々流転をつなぐといふかなり野心的な研究テーマを掲げてきたが、両者を結びつける分子の糸口が少しずつ見えてきた。今後の研究の最大の焦点は、コード領域による転写開始複合体の誘導現象の普遍性とその分子機構を解明することである。

### <成果公表リスト>

#### 1) 論文/プロシーディング

##### 1. 0801292027

Yamamoto, YY. and Obokata, J.: ppdb: a plant promoter database. *NuCLEic Acids Res* 36 (database issue) D977-981 (2008)

##### 2. 0801291848

Kobayashi, Y., Matsuo, M., Sakamoto, K., Wakasugi, T., Yamada, K. and 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* 288:311-318 (2008)

#### 2) データベース/ソフトウェア

##### 1. 0707251539

植物プロモーターデータベース ppdb を拡張した。既存の植物関係のデータベースと比較して、転写開始点やプロモーター配列に関する情報の厚みに特徴がある。

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