

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

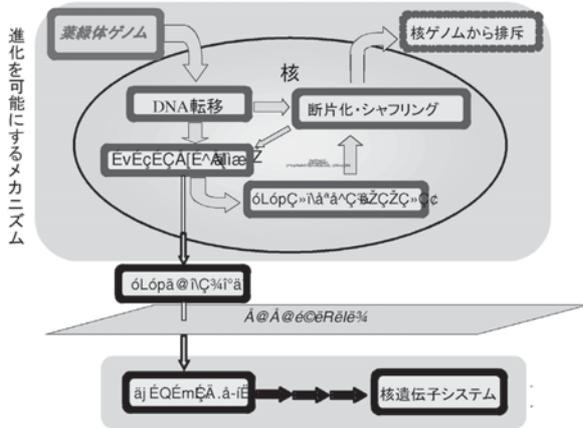
●小保方 潤一

名古屋大学遺伝子実験施設・遺伝子解析分野

＜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。



＜2007年度の研究の当初計画＞

- (1) シロイヌナズナの転写開始点タグ配列の解析数を増やし、ゲノム上でより稠密な転写開始点マッピングを行う。また、光等の外的刺激による転写開始点の変動を網羅的に解析する。
- (2) 植物プロモーターデータベースを一般公開するとともに、コンテンツを順次、拡充する。
- (3) 比較ゲノム的な視点から転写開始点やプロモーターの進化を検討できるように、解析対象をシロイヌナズナやイネ以外の植物・藻類へ拡張することを検討する。
- (4) 昨年度の解析で、「下流の構造遺伝子配列」が「ゲノムDNA上での pol II 転写開始複合体の形成 / 固定位置」を決定するシス因子として機能することが示唆された。この知見の妥当性を、異なった視点からの実験で確認・検証する。

＜2007年度の成果＞

[A] 植物ゲノム上のプロモーターに関する解析

- (1) CT-MPSS 法による高密度転写開始点マッピング

2006年度の研究で開発したCT-MPSS法を用いて、シロイヌナズナの完全長cDNAの5'末端タグ配列を約38万解析し、そのうちの約16万をゲノム上にマップした。これは植物の転写開始点(TSS)データとしては世界最大の規模であり、現在の所、定量的な解析のできる唯一のデータセットである。

(2) 植物の転写開始点/コアプロモーターの解析

上記で得られたシロイヌナズナの転写開始点(TSS)データをLDSS(=Local distribution of short sequences)法によって解析し、植物プロモーターの構成要素や特徴について解析を進めた。その結果、次のような知見が明らかになった。

- ・ 高等植物のコアプロモーター領域では、ヒトやマウスのコアプロモーターにはみられない配列要素やコンテキストが使われている。また、イニシエーターやKozak配列の様に動物・植物で共通に使われている配列要素でも、動物とは異なった塩基配列の偏りが見られる。
- ・ 動物ゲノムの転写開始領域に頻出するCpGアイランドが植物ゲノムでは見出されず、動物のCpG配列に相当するニッチを植物ではピリミジンに富んだ配列(Y Patch)が占めている。
- ・ 植物のコアプロモーター領域に出現する配列要素間の相関関係を解析したところ、植物のコアプロモーターにはTATA型とGA型という二つの排他的なグループがあることが明らかになった。
- ・ シロイヌナズナのゲノム上で、既知の遺伝子の転写には関わらない機能未知のプロモーターが多数同定された。このようなプロモーター群を示す総称として、オーファンプロモーター(orphan promoter)という用語を新たに定義・提案した。オーファンプロモーターは、ジェニックプロモーターとは明らかに異なった構造・機能的特徴を有している。
- ・ 葉緑体ゲノムに由来する核遺伝子群のプロモーターは、オーファンプロモーターと共通する特徴を持つことが示された。

(3) 植物プロモーターデータベース Ppdb の作成と公開

本研究で蓄積された植物の転写開始点とプロモーター配列に関する情報を整理して公開するためのデータベース Ppdb を作成した。現在は、シロイヌナズナとイネのデータを収録している。2007年6月末から一般公開を始めたが、この半年間で、世界49カ国から100,000件のアクセスがあった。

(4) シロイヌナズナ以外の植物での解析

ヒメツリガネゴケのTSS/プロモーターデータを解析してPpdbに収録する作業を、基生研の長谷部先生のグループと共同で進めている。また、東大の佐藤直樹先生と共同して、植物オルソログ遺伝子プロモーターの比較解析を進めている。

[B] 遺伝子トラップ生物系統の解析から

(1) シロイヌナズナのトラップ系統を用いた解析

非常に微弱な転写活性しか見られなかったゲノムの遺伝子間領域に「プロモーターの無いマーカー遺伝子」が挿入されると、その領域からの転写物レベルが大きく増大する事例が見出された。この事例は「非常に微弱なプロモーター (cryptic promoter) をト

ラップすることにより、プロモーターそのものが活性化される現象」があることを示唆している。言い換えれば、これまではっきり記載されていなかった新規のプロモータートラップ径路がある可能性を示唆している。

(2) 単細胞緑藻モデルによる解析

プロモーター配列やトランジット配列のトラップ実験をハイスループットで行うため、新たに、単細胞緑藻のクラミドモナスを用いたトラップ実験系の作成に取り組んだ。具体的には、光合成遺伝子 *rbcS* の欠損株のゲノムに *rbcS* の構造遺伝子配列をランダム挿入して、光合成復帰変異株を単離する系の作成を試みた。

[C] クリプティックプロモーター活性化機構の解析

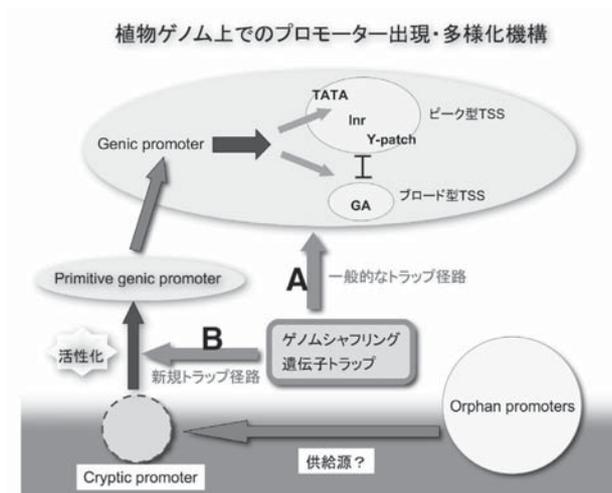
シロイヌナズナのトラッピング実験から、「構造遺伝子の挿入」が当該ゲノム領域におけるクリプティックプロモーターや転写開始点の顕在化を引き起こす可能性が示唆された。この現象のメカニズムを検討している過程で、「下流の構造遺伝子配列」が「コアプロモーター領域 = pol II 転写開始複合体 (PIC) の形成位置」を決定するシス因子として作用することを示唆する知見が得られた。この知見は、本研究課題の核心に関わる極めて重要なものであり、そのメカニズムについて、慎重に解析を進めている。具体的には、クロマチン免疫沈降法による PIC 形成位置の解析や、ヒト培養細胞を用いた現象の普遍性の解析などを進めている。

[D] オルガネラから核に転移した DNA 断片の発現解析

シロイヌナズナでは、葉緑体やミトコンドリアのゲノムに由来する多くの配列が核由来の転写物中に出現している。それらを包括的に解析した結果、それらの配列を転写したプロモーターはオルガネラ由来のものではないことを確認した。

[E] 2007 年度の成果のまとめ

以上の研究成果をまとめると、植物ゲノム上でのプロモーターの獲得・進化径路について、下図のような一般モデルを考えることが出来る。重要なのは、図に B で示した新規のプロモータートラップ径路があることであり、その径路の出現に必要な cryptic promoter は、ゲノム上に散在している orphan promoter から供給されているのではないかと推察している。



<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、プロモーターの構造・機能の多様性と、新規プロモーターの出現メカニズムやシンビオジェネシスを関連づけようとする研究は、筆者の知る限り、世界的に見ても殆ど行われていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

(1) 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、Solexa(Illumina)等の新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) クロマチン免疫沈降法やヒト培養細胞を用いた解析などの新しい実験技術の導入・確立に、予想以上の時間を要した。

(3) クラミドモナスの光合成変異株を用いたトラップ実験系については、用いた変異株が思ったよりも脆弱で扱いにくく、ハイスループットな解析は難しかった。そこで、スクリーニングに用いる株とマーカー系について、再検討を進めている。

<今後の課題>

今後の研究の焦点は、左下図に示した「プロモーターの獲得・出現機構」に関するモデル (= 作業仮説) の妥当性を一つ一つ実験的に検討していくことである。具体的には、(1) プロモーター構造の多様性と進化に関する比較解析、(2) 遺伝子トラップ生物系統群のハイスループット解析、(3) クリプティックプロモーター活性化機構の解析、がこれまで同様に解析の三つの柱となる。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 0705082119
Yamamoto, Y., Ichida, H., Matsui, M., Obokata, J., Sakurai, T., Satou, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Abe, T.: Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*, 8,67 (2007)
- 0801291757
Yamamoto, YY., Ichida, H., Abe, T., Suzuki, Y., Sugano, S. and Obokata, J.: Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Res* 35:6219-6226 (2007)
- 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* 28:311-318 (2008)
- 0801292027
Yamamoto, YY. and Obokata, J.: ppdb: a plant promoter database. *Nucleic Acids Res* 36(database issue) D977- 981 (2008)
- 0801291942
Shikanai, T. and Obokata, J.: Machinery of RNA editing in plant organelles. In *Frontiers of RNA and DNA Editing* (ed. by Harold C. Smith) Wiley Press-(2008)

2) データベース/ソフトウェア

- 0707251539
植物プロモーターデータベース ppdb 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>