

真正細菌における主要シグマ因子の多型性に関する研究

田中 寛 (東京大学分子細胞生物学研究所)

kntanaka@imcbns.iam.u-tokyo.ac.jp

真正細菌の RNA ポリメラーゼは、その特異性因子であるシグマを置換することで、様々な特異性の転写装置に機能分化している。基本的な転写には主要シグマ因子が関わるが、演者は多くの真正細菌の主要シグマ因子自体に多型性が見られ、生理的状況により使い分けられていることを発見した。細胞は環境変化に対して、ゲノム遺伝子の発現状態を変えることにより適応を図るが、遺伝子発現に関わる装置自体も環境変化に対応して作りかえられ、生存に最適な環境応答系を形成しているのである。

はじめに

細胞の環境応答や分化は、遺伝子発現の変化により支えられている。そして転写段階における調節は、多くは RNA ポリメラーゼによるプロモーター認識特異性の変化に帰結される。バクテリア細胞の場合、転写特異性の変化は、二成分制御系を始めとする転写因子群、および RNA ポリメラーゼのプロモーター認識サブユニットであるシグマ因子の置換により引き起こされる場合が多い。本研究を開始した当時は、このような基本概念が提出され、その実体の解明が開始された時期であった。

放線菌のシグマ因子多型性

転写開始におけるシグマ因子の役割が示された当初、細胞あたりのシグマ因子は唯一種類だと考えられていた。しかし 1980 年代の前半に、枯草菌や大腸菌で新規のシグマ因子が発見され、孢子形成や熱ショック応答時の転写特異性の変化が、シグマ因子の置換と結びつけられるようになった。このような置換型のシグマ因子に対して、当初から同定されていたシグマ因子は特に主要シグマ因子と呼ばれる。放線菌においては、孢子形成に必要な置換型シグマ因子遺伝子が必要であると示唆されていたほか、生化学的手法によりシグマ因子の多型性の解析が開始されていた。演者は本研究の開始以前、放線菌の二次代謝に関する研究を行い、放線菌におけるシグマ因子の多型性に強い興味を抱いた。放線菌はその他のバクテリアと比較して、格段に複雑な形態分化を行うと共に、多様な物質生産能を示す。このような生命現象の複雑さは、シグマ因子の多型性と結びつくに違いないと考えたのである。

シグマ因子による転写制御解明の手始めとして、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株から主要シグマ因子遺伝子をクローン化しようと考えた。研究開始当時、大腸菌と枯草菌の主要シグマ因子のアミノ酸一次構造配列が既に明らかにされていたので、これらの配列から完全に保存されているペプチド領域を抽出した。大腸菌はグラム陰性、枯草菌はグラム陽性バクテリアであり、両方で保存されている配列は、グラム陽性の放線菌でも保存されていると予想される。そこで、保存されているアミノ酸配列からオリゴ DNA プローブを設計した。これを用いた解析の結果、*S. coelicolor* A3(2)株のゲノムが大腸菌や枯草菌の主要シグマ因子に極めて類似した蛋白質を 4 種独立にコードすることを明らかにした¹⁾。そこで大腸菌の主要シグマ因子遺伝子が *rpoD* と呼ばれることから、放線菌の相同遺伝子群を *hrdA? D* (homolog of *rpoD*; *rpoD* 相同遺伝子) 単離に用いたアミノ酸配列を RpoD box と命名した。遺伝子破壊実験の結果、*hrdB* のみが生育に必須であることから、いわゆる主要シグマ因子には HrdB が対応すると考えられる。しかし、*hrdA, C, D* 遺伝子の欠損による表現系は不明確であり、それら機能の同定には至らなかった。

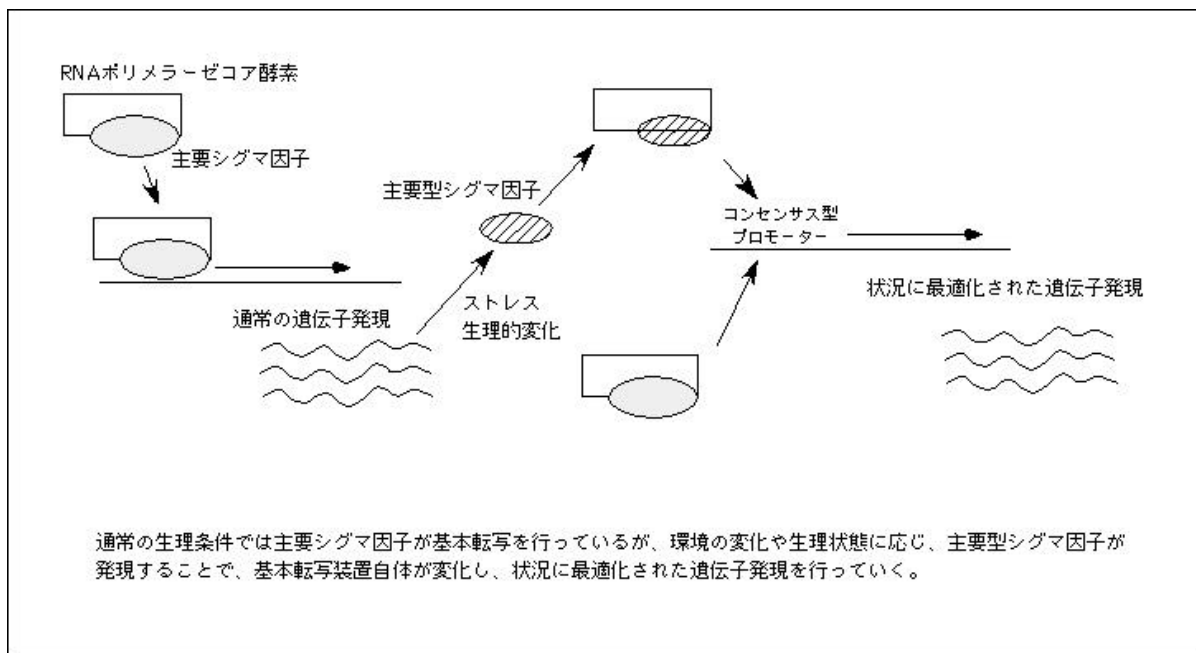
rpoD 相同遺伝子を求めて

どうして主要シグマ因子によく似た蛋白質が複数種存在するのだろうか。放線菌の解析のみからその解答に至るのは困難であると考え、他のバクテリアについても調べてみることにした。その結果、枯草菌などの低 GC グラム陽性バクテリアが主要シグマ因子のみを持つものに対して、緑膿菌が 2 種、シアノバクテリア群が 4? 5 種の *rpoD* 相同遺伝子を持っていた。これらの株においても、主要シグマ因子以外の *rpoD* 相同遺伝子の機能は不明のままであった。大腸菌については当初、データ解釈の問題から、主要シグマ因子以外の *rpoD* 相同遺伝子は存在しないと結論した。しかしその後すぐ、カナダのグループが大腸菌の第 2 の *rpoD* 相同遺伝子を *katF* と命名して報告し、演者はこの遺伝子の発見の機会は残念ながら逃してしまった。この遺伝子は増殖定常期に強く発現するカタラーゼの調節因子として単離されたが、その後、増殖定常期遺伝子発現のセントラルレギュレーター、“*rpoS*”として位置づけられることになる。大腸菌が、分子遺伝学の材料としては最も便利な生物であることから、以降はこの *rpoS* 遺伝子の解析に力を注ぐことにした。

rpoD 相同遺伝子間の役割分担

大腸菌 *rpoS* 遺伝子産物 (σ^{38}) のプロモーター認識特異性を調べるために、*in vitro* 転写系の確立を行った。*rpoS* 遺伝子産物は、大腸菌で過剰発現させ、容易に大量調製することができた。大腸菌のコア RNA ポリメラーゼを別途精製し、シグマ因子と再構成したホロ酵素を *in vitro* 転写反応に供した結果、 σ^{38} を含む RNA ポリメラーゼホロ酵素 ($E\sigma^{38}$) は、主要シグマ因子である σ^{70} を含むホロ酵素 ($E\sigma^{70}$) と極めて類似の転写特異性を示し、コンセンサス型のプロモーターを共通に認識することが明らかになった。これは、これら 2 種のシグマ因子の構造が良く似ていることと一致する。しかし、どちらかのホロ酵素にのみ認識されるプロモーターも存在する。 σ^{38} が増殖定常期に 20 倍以上増加することと併せ、 σ^{70} と σ^{38} は類似の認識特異性を持つシグマ因子であり、増殖定常期に σ^{38} が σ^{70} の機能を置換、或いは補完することで増殖相の変化に伴う全般的な転写特異性の変化を引き起こしているというモデルを提唱した²⁾。

このような大腸菌における *rpoD* 相同遺伝子間の関係は、より多くの *rpoD* 相同遺伝子を持つバクテリアでも同様なのだろうか。典型的なシアノバクテリアには 5 種の *rpoD* 相同遺伝子が存在し、これまでに調べられたバクテリアのうちで最も多くの相同遺伝子を持っている。*Synechococcus* PCC7942 株



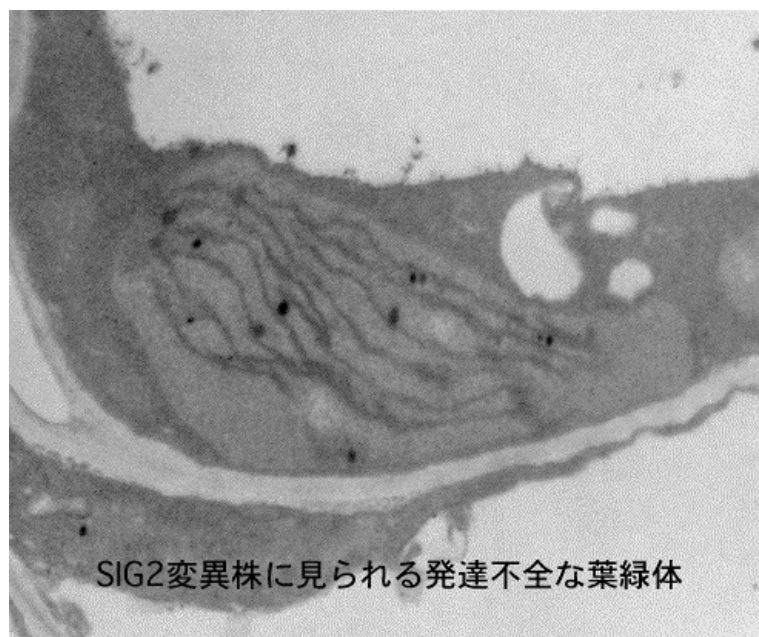
からコア RNA ポリメラーゼを精製し、さらに 3 種の *rpoD* 相同遺伝子産物を用いた再構成実験の結果、

調べた全てのシグマ因子が共通にコンセンサス型のプロモーターを認識することが明らかになった³⁾。従って、シアノバクテリアにおいても、*rpoD* 相同遺伝子群は類似の認識特異性を持つシグマ因子をコードし、増殖相や生理状態により RNA ポリメラーゼの特異性を調整していると考えられる。このような状況は、他の分類群でも共通に生じていると予想される。

植物にもシグマ因子があった！

真核細胞のオルガネラであるミトコンドリアや葉緑体は、バクテリアの内部共生により発生した。特に葉緑体は、現在でも祖先のシアノバクテリアによく似た遺伝子構造を持ち、固有のバクテリア型の装置によりゲノムの機能が果たされている。1980年代の半ばに葉緑体ゲノム配列が決定された結果、葉緑体ゲノムにはバクテリア型 RNA ポリメラーゼコア酵素サブユニット群がコードされていることが判明した。しかし、転写開始に必須なシグマ因子の遺伝子は見つからず、核ゲノムにコードされていることが予想されたものの、対応する遺伝子は未同定であった。演者らは、この核コードのシグマ因子遺伝子の検索を様々な植物種から行ったが、数年に渡る検索にも拘わらず遺伝子の同定には至らなかった。1995年になって、原始的な葉緑体を持つ単細胞紅藻 *Cyanidium caldarium* の解析が、東京大学理学部の黒岩研究室で進められていることを知り、この株を用いてシグマ因子遺伝子の検索を行った。その結果、シアノバクテリアのシグマ因子によく似た蛋白質が核ゲノムにコードされていること。対応するシグマ因子が葉緑体の中に輸送されて機能していることを証明することができた⁴⁾。さらに、同じ核ゲノムには複数の *rpoD* 相同遺伝子がコードされており、光環境により異なる制御を受けていることも示唆された。これは、シグマ因子の多型性を通じて、葉緑体遺伝子発現が調節されている証拠と考えることができる。

1996年頃からは、高等植物のモデル系であるシロイヌナズナにおいて、cDNA 配列の大規模解析やゲノム計画が開始された。その進展に伴い、全ゲノム配列の決定された現在までに計6種類の葉緑体シグマ因子を同定し、解析を進めてきた。これら遺伝子の全ては、演者らが長くバクテリアで解析してきた *rpoD* 相同遺伝子の範疇に入るものであり、類似の構造や認識特異性を持ちつつ、葉緑体転写制御に深く関わっているらしい。最近になって、6種遺伝子のうち *SIG2* の欠損植物が単離された。この株では葉緑体における



数種の tRNA の合成が低下しており⁵⁾、光合成装置の構築への影響と共に、光シグナル伝達系にも障害がみられる。これはバクテリアの持ち込んだシグマ因子が、葉緑体遺伝子の転写を介して、植物の生命活動に深く関わっていることを示すものであろう。

おわりに

バクテリアの転写装置は比較的単純であると考えられてきた。しかし、本研究で明らかにしてきた *rpoD* 相同遺伝子群の存在は、バクテリアのプロモーター構造と転写装置の関係が重層的であることを示している。*rpoD* 相同遺伝子の多型性は普遍的な現象であり、多様な環境での生存戦略として非常

に有効であるらしい。共生体と化した葉緑体にも通ずる“その理由”を明らかにすることが、これからの重要なテーマといえるだろう。

謝辞

本研究は、東京大学分子細胞生物学研究所分子遺伝研究分野（旧応用微生物研究所第二研究部）で行ったものであり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました東京大学教授高橋秀夫先生に深く感謝いたします。また共に研究をすすめ、またご協力をいただきました当研究室の皆様にご礼申し上げます。特に、急逝された大久保節子さんと高柳裕子さんのお名前はここに挙げさせていただきたいと思いません。この研究に暖かいご支援をいただきました東京大学名誉教授齋藤日向先生、当研究室の諸先生、長期にわたる共同研究をさせていただいた国立遺伝学研究所名誉教授 石浜明先生、東京大学大学院理学系研究科教授 黒岩常祥先生、諸先生に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Kan Tanaka, Tetsuo Shiina and Hideo Takahashi (1988) Multiple principal sigma factor homologs in eubacteria: Identification of the “*rpoD* Box.” *Science* **242**, 1040-1042.
- 2) Kan Tanaka, Yuko Tanayanagi, Nobuyuki Fujita, Akira Ishihama, and Hideo Takahashi (1993) Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: The *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3511-3515.
- 3) Asako Goto-Seki, Masao Shirokane, Susumu Masuda, Kan Tanaka and Hideo Takahashi (1999) Specificity crosstalk among group 1 and group 2 sigma factors in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942: *in vitro* specificity and a phylogenetic analysis. *Mol. Microbiol.* **34**, 473-484.
- 4) Kan Tanaka, Kosuke Oikawa, Niji Ohta, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa, and Hideo Takahashi (1996) Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga. *Science* **272**, 1932-1935.
- 5) Kengo Kanamaru, Akitomo Nagashima, Makoto Fujiwara, Hiroshi Shimada, Yumiko Shirano, Kazumi Nakabayashi, Daisuke Shibata, Kan Tanaka, and Hideo Takahashi (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034-1043.

Studies on Heterogeneity of Principal Sigma Factors in Eubacteria

Kan Tanaka (The University of Tokyo, Institute of Molecular and Cellular Biosciences)

kntanaka@imcbns.iam.u-tokyo.ac.jp