บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นจุลชีพที่สังเคราะห์แสงให้ออกซิเจน สามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ได้ใช้เป็นเจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของยีน heterologous ต่างๆ อย่างไรก็ดี ระดับการแสดงออกของยีน heterologous ในไซยาโนแบคทีเรีย มีระดับต่ำกว่าใน *E. coli* โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะพัฒนา enhancer/ โปรโมเตอร์ (promoter) และบริเวณเริ่มถอดรหัส (translation initiation region) ให้สามารถทำงานแข็งขันในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC7942 ได้ทำการตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ของ *Synechococcus* outer membrane protein A (SomA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในที่หุ้มเซลล์ ผลการทดลองพบว่า การทำงานของโปรโมเตอร์ *somA* อยู่ระดับต่ำกว่าโปรโมเตอร์ $tRNA^{pro}$ (P_{tRNA}) ได้มีการประเมินการใช้ green fluorescent protein (GFP) เป็นโปรตีนรายงานใน *Synechococcus* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระดับฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ที่มี cytoplasmic GFP สูงกว่า เซลล์ที่มี periplasmic GFP ถึง 6 เท่า ดังนั้นจึงใช้ cytoplasmic GFP เป็นตัวรายงาน สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแสดงออกของ GFP คือการเลี้ยง *Synechococcus* หนึ่งวันภายใต้แสงที่มีความเข้ม 4000-4500 lux เพื่อตรวจหา enhancer/ โปรโมเตอร์ ที่ทำงานแข็งขันจึงได้ตรวจกรองหา GFP activity สูงจาก *Synechococcus* ที่มี synthetic libraries pLL และ pUL ซึ่งมี LysR binding sequences และ UP element/ LysR sequences (ตามลำดับ) อยู่ด้านหน้าของ P_{tRNA} พบว่าโคลนที่มี pUP-UP140, pLL-172, pLL-209 และ pUL-146 มีค่า GFP activity เป็น 1.56, 2.70, 2.37, 3.40 และ 3.15 เท่า (ตามลำดับ) สูงกว่าของ control (pKT-GFP) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า pUP-UP140 มี UP element จำนวน 3 ชุด ส่วน pLL-172, pLL-209 และ pUL-146 นั้นพบว่าส่วนของ transcription-translation terminator ที่อยู่ด้านหน้าของthe regulatory sequences หลุดหายไป ดังนั้น ค่า GFP activities ที่สูงขึ้นนั้นอาจเนื่องมาจาก read-through transcripts เพื่อตรวจหาบริเวณเริ่มถอดรหัสที่เหมาะสมที่สุด จึงได้ตรวจกรองหาค่า GFP activity สูงจาก *Synechococcus* ที่มี synthetic Shine-Dalgarno (SD)/ non-SD sequence libraries ซึ่งมีส่วนของ randomized decanucleotide อยู่ด้านหน้าของยีน *gfp* พร้อมทั้งได้ตรวจหาระดับของ *gfp* mRNA โดยวิธี real-time PCR แล้ววิเคราะห์ประสิทธิภาพการถอดรหัส (translation efficiency) ประสิทธิภาพการถอดรหัสของลำดับเบส SD-like AGGAGAAUGA, AAUGGAAAUA และ AAUUGGAUUU สูงกว่าของ control (GGUGGU) อยู่ 2.38, 3.96 และ 4.89 เท่าสูง (ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าลำดับเบส SD-like มีประสิทธิภาพการถอดรหัสสูง อย่างไรก็ดี ประสิทธิภาพการถอดรหัสของลำดับเบส non-SD AUGUCAACUU ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก control ประสิทธิภาพการถอดรหัสของลำดับเบส non-SD UUCAAUAUUU, AUUUACCUCC และ CCAAUCUAC จาก *E. coli* ต่ำกว่า control อย่างชัดเจน ดังนั้นผลการทดลองบ่งชี้ว่า ลำดับเบส non-SD สามารถทำหน้าที่เริ่ม

ถอดรหัสใน *Synechococcus* แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าลำดับเบส SD-like ประสิทธิภาพการถอดรหัสของลำดับเบส consensus-SD AAGGAGGU, AGGAGGU, AAAGGAGG และ AGGAGG สูงกว่าของ control อยู่ 12.24, 10.52, 6.36 และ 3.77 เท่า (ตามลำดับ) ดังนั้น ลำดับเบส consensus-SD มีประสิทธิภาพการถอดรหัสสูงกว่าลำดับเบส SD-like และลำดับเบส AAGGAGGU มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเริ่มถอดรหัสใน *Synechococcus* สำหรับ translation enhancer นั้น การมี BoxA ของ *E. coli rrnB* และ pyrimidine-rich enhancer ที่อยู่ด้านหน้าของบริเวณเริ่มถอดรหัส ไม่สามารถเสริมแต่กลับลดประสิทธิภาพการถอดรหัส ดังนั้น translation enhancer จาก *E. coli* ไม่สามารถทำงานได้ใน *Synechococcus* ได้ตรวจสอบบริเวณที่ทำหน้าที่ของเบสควบคุม (regulatory sequence) ของ *rrnA* จาก*Synechococcus* โดยวิธี deletion analysis พบว่าเมื่อให้บริเวณที่ทำหน้าที่ของลำดับเบสควบคุมของ *rrnA* อยู่ด้านหน้าของลำดับเบส consensus-SD จะให้ GFP activity สูงกว่า control ถึง 23.97 เท่า ได้สำรวจการทำงานของโปรโมเตอร์ σ^{70} (P_{sig70}) ของ *E. col* ใน *Synechococcus* ซึ่งอยู่ด้านหน้าของลำดับเบส consensus-SD ผลการทดลองพบว่า GFP activity ของ P_{sig70} สูงกว่า control 6.17 เท่า เพื่อสร้างลำดับเบสควบคุมที่สามารถทำงานในระดับที่สูงเกินกว่าที่พบตามธรรมชาติในไซยาโนแบคทีเรีย จึงได้สร้างพลาสมิดที่มีการผสมของ tandem enhancer/ promoter และลำดับเบส consensus-SD ผลการทดลองพบว่า GFP activity ของ *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด tandem promoters P_{rnnA}-P_{rnnA} (pRRSC), P_{sig70}- P_{rnnA} (pS70-RSC) และ P_{sig70}- P_{rnnA}-P_{rnnA} (pS70-2RSC) สูงกว่าของ control ถึง 32.33, 36.66 และ 35.88 เท่า(ตามลำดับ) เมื่อนำโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจาก *Synechococcus* ที่มีพลาสมิด pS70-2RSC และ pS70-RSC มาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Comassie brilliant blue พบว่าสามารถมองเห็นแถบโปรตีน GFP เท่าที่คณะวิจัยโครงการนี้ทราบ รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถควบคุมให้การแสดงออกของโปรตีน heterologous ใน *Synechococcus* สูงมากพอที่จะตรวจสอบได้ด้วย SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Comassie brilliant blue ดังนั้น คณะวิจัยโครงการนี้ได้ประสบความสำเร็จในการสร้างลำดับเบสควบคุม ที่สามารถทำงานในระดับที่สูงเกินกว่าที่พบตามธรรมชาติในไซยาโนแบคทีเรีย

Abstract

Cyanobacteria, oxygenic photosynthetic prokaryotes, have simple growth requirements and inexpensive to maintain. They have been used as hosts to express several heterologous genes. However, the level of heterologous gene expression in cyanobacteria is low when compared with that in *E. coli*. This project is aimed to develop highly active enhancer/ promoter and translation initiation region including translation initiator and translation enhancer in cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. The promoter of *Synechococcus* outer membrane protein A (SomA), one of the most abundant proteins of the cyanobacterial total envelope, was investigated. Results indicated that the activity of *somA* promoter was dramatically lower than that of $tRNA^{pro}$ promoter (P_{tRNA}).The use of green fluorescent protein (GFP) as a reporter in *Synechococcus* was evaluated. Results showed that the fluorescence intensity of cells with cytoplasmic GFP was approximately 6-fold higher than that of cells with periplasmic GFP. Therefore, cytoplasmic GFP was used as a reporter. The optimal conditions for GFP expression in *Synechococcus* were 1-day cultures grown under light intensity of 4000-4500 lux. For highly active enhancer/ promoter, *Synechococcus* harboring synthetic libraries pLL and pUL containing LysR binding sequences and UP element/ LysR sequences upstream of P_{tRNA} , respectively, were screened for high GFP activities. The GFP activities of selected clones harboring pUP-UP140, pLL-172, pLL-209 and pUL-146 were 1.56-, 2.70-, 2.37-, 3.40- and 3.15- fold, respectively, higher than that of control (pKT-GFP). DNA sequence analysis revealed that there are three copies of UP element in pUP-UP140. In plasmids pLL-172, pLL-209 and pUL-146, the transcription-translation terminator upstream of the regulatory sequences was deleted. Therefore, the high GFP activities might be due to the read-through transcripts. For optimal translation initiators, *Synechococcus* harboring the synthetic Shine-Dalgarno (SD)/ non-SD sequence libraries containing randomized decanucleotide region upstream of the *gfp* gene were screened for high GFP activities. The level of *gfp* mRNA of the selected clones was determined using real-time PCR and the translation efficiency was analyzed. The translation efficiencies of SD-like sequences: AGGAGAAUGA, AAUGGAAAUA and AAUUGGAUUU were 2.38-, 3.96- and 4.89-fold, respectively, higher than that of control (GGUGGU), indicating that the SD-like sequences were highly efficient for translation initiation. However, the translation efficiency of non-SD sequence, AUGUCAACUU, was

not significantly different from that of control. The translation efficiencies of *E. coli* non-SD sequences UUCAAUAUUU, AUUUACCUCC and CCAAUCUAC were apparently lower than that of control. Therefore, the results indicated that the non-SD sequences could be translation initiator in *Synechococcus*, but were less efficient than SD-like sequences. The translation efficiencies of consensus-SD sequences AAGGAGGU, AGGAGGU, AAAGGAGG and AGGAGG were 12.24-, 10.52-, 6.36- and 3.77-fold, respectively, higher than that of control. Thus, the consensus-SD sequences were more efficient for translation initiation than the SD-like sequence and AAGGAGGU was the optimal translation initiator in *Synechococcus*. For translation enhancer, the present of BoxA of *E. coli rrnB* and pyrimidine-rich enhancer upstream of translation initiators did not enhance but decreased the translation efficiency. Therefore, the *E. coli* translation enhancer did not function in *Synechococcus*. The active region of *rrnA* regulatory sequence of *Synechococcus* was identified using deletion analysis. The GFP activity of active *rrnA* regulatory sequence upstream of the consensus-SD sequence was 23.97-fold higher than that of control. The activity of *E. coli* σ^{70} promoter (P_{sig70}) upstream of the consensus-SD sequence in *Synechococcus* was also investigated. Results showed that the GFP activity of the P_{sig70} was 6.17-fold higher than that of control. In order to construct regulatory sequences which are highly active exceeding the natural cyanobacterial regulatory sequences, plasmids harboring combination of tandem enhancer/ promoter and consensus-SD sequence were constructed. Results showed that the GFP activities of *Synechococcus* harboring plasmids with tandem promoters P_{rnnA} -P_{rnnA} (pRRSC), P_{sig70}- P_{rnnA} (pS70-RSC) and P_{sig70}- P_{rnnA}- P_{rnnA} (pS70-2RSC) were 32.33-, 36.66- and 35.88- fold, respectively, higher than that of control. When the total protein extracted from *Synechococcus* harboring plasmids pS70-2RSC and pS70-RSC were subjected to SDS-PAGE and stained with Comassie brilliant blue, the GFP band was visualized. To our knowledge, this is the first report that the expression of heterologous protein in *Synechococcus* is high enough to be detected by SDS-PAGE stained with Comassie brilliant blue. Thus, we have successfully constructed the synthetic regulatory sequences which are highly active exceeding the natural cyanobacterial regulatory sequences.