

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05063

研究課題名(和文)メチオニン生合成の個体統御と種子への蓄積制御の包括的解明

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of the control of methionine biosynthesis and seed storage

研究代表者

内藤 哲(Naito, Satoshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20164105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物においてメチオニン生合成の鍵段階を触媒するシスタチオニン-シントラーゼ(CGS)は、アロステリック酵素ではなく、CGSをコードするCGS1遺伝子の発現は、メチオニンの代謝産物であるS-アデノシルメチオニンに反応した特異的な翻訳停止と、これと共役したmRNA分解によるフィードバック制御を受ける。本研究は、試験管内翻訳系を用いて明らかにした翻訳段階での制御に加えて細胞あるいは個体レベルでの制御を明らかにしようとするものである。CGSは、核にコードされるが、葉緑体に移行して機能する。葉緑体でのCGSタンパク質の安定性が、メチオニンの投与により、また、明暗条件により変化することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチオニンはタンパク質を構成する重要なアミノ酸だが、哺乳類は細胞内で合成することができず、ウシなどの反芻動物のほかは、我々ヒトを含めて食物から摂取せねばならない。従って、植物でのメチオニン生合成の制御は重要であり、古くから研究がなされた。1980年代までに、シスタチオニン-シントラーゼ(CGS)がメチオニン生合成の制御段階を触媒すること、また、メチオニン投与に反応してフィードバック制御されることがわかったが、その機構は不明であった。我々は、すでにCGSをコードするmRNAの翻訳段階でのフィードバック制御を明らかにしているが、本研究により、翻訳後の段階での制御の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Cystathionine gamma-synthase (CGS) catalyzes the first committed step of methionine biosynthesis in higher plants. CGS is not an allosteric enzyme, and its activity is feedback-regulated in response to S-adenosylmethionine during translation of CGS1 mRNA that codes for CGS. S-adenosylmethionine causes a specific translation arrest, which is coupled with CGS1 mRNA degradation. This study aims to unveil unknown regulation, other than the above-mentioned regulation during translation, governing the control of methionine accumulation plants. CGS1 is nuclear encoded and CGS acts after being transported to chloroplasts. Stability of CGS protein in chloroplasts was found to be changed in response to methionine feeding as well as light/dark conditions.

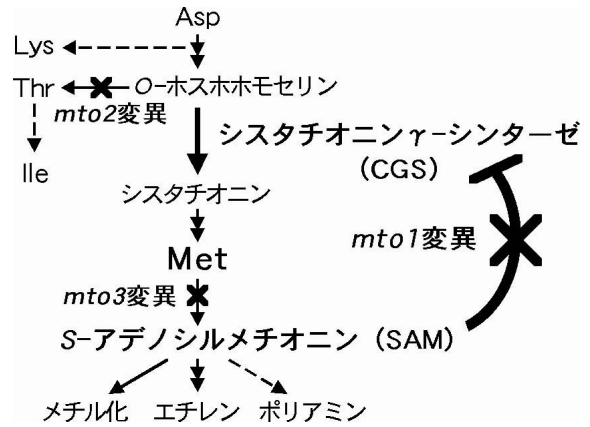
研究分野：分子生物学

キーワード：メチオニン シロイヌナズナ 成長・分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチオニン自体はタンパク質を構成するアミノ酸としての機能の他にも多くの機能を持たないと考えられているが、メチオニンと ATP から合成される S-アデノシルメチオニン (AdoMet) は、細胞内の様々なメチル基転移反応においてメチル基の供与体となるほか、ポリアミン合成、また植物においてはエチレン合成に関わる。メチオニンは、リジン、スレオニン、イソロイシンとともに、アスパラギン酸の炭素骨格から作られ、これらはアスパラギン酸族アミノ酸と呼ばれる(右図)。植物におけるアスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路とその主な制御段階は、1970-80年代に行われた研究により、その多くが明らかにされた。メチオニンについては、メチオニンの生合成経路が他のアミノ酸から分岐した最初の段階(初発段階)を触媒するシスタチオニン γ -シターゼ (CGS) の段階でフィードバック制御されることが示された。しかしながら、CGS はアロステリック酵素ではなく、そのフィードバック制御の分子機構は謎であった。



アスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路と *mto* 変異

我々は遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナの *mto* 変異株を分離した。このうち、*mto2* 変異はスレオニン合成酵素、*mto3* は AdoMet 合成酵素に欠損を持っていた。一方、*mto1* 変異を用いた解析により、CGS をコードする *CGS1* 遺伝子の発現が mRNA 分解によってフィードバック制御されており、しかもこの制御に MTO1 領域と名付けた CGS 自身のアミノ酸配列が関与していることを明らかにした (Chiba et al., *Science* 286: 1371-4, 1999; Ominato, et al., *J. Biol. Chem.* 277: 36380-6, 2002)。この制御は翻訳中に起こり (Lambein et al., *Plant Cell Physiol.* 44: 893-900, 2003)、コムギ胚芽の試験管内翻訳系で再現される。試験管内翻訳系を用いた解析により、*CGS1* mRNA の分解に先だって AdoMet に応答した翻訳停止が起きていることを見いだした。この翻訳停止は、MTO1 領域の直後の Ser-94 のコドンで起こる (Onouchi et al., *Genes Dev.* 19: 1799-810, 2005)。

1980年代に行われた研究では、メチオニンの生合成はメチオニン自身がエフェクターとなってフィードバック制御すると報告されていたが、試験管内翻訳系および *mto2* および *mto3* 変異株を用いた遺伝学的解析により、これは誤りであり、フィードバック制御のエフェクターは AdoMet であることを明らかにした (Chiba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10225-30, 2003)。なお、アスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路において、AdoMet は、スレオニン合成酵素の活性化に作用するのみならず、リジンとともにアスパラギン酸のリン酸化酵素の抑制に関わっており、植物にとって、アスパラギン酸族アミノ酸生合成経路の「最終産物」はメチオニンではなくて AdoMet であると見ることができよう。

2. 研究の目的

翻訳段階での制御によるメチオニンの生合成制御については多くの知見が蓄積してきたが、細胞、あるいは個体レベルで見たとき、翻訳段階での制御のみでメチオニンの生合成が制御されているのか否かについては未だ断片的な知見しか得られていない。本研究は、翻訳段階での制御以外で、メチオニンの生合成ならびに遊離メチオニンの蓄積を制御する機構を探ろうとす

るものである。

多くの遺伝子発現において、転写段階での制御が重要な役割を演じていることが明らかになっているが、*CGS1* 遺伝子については転写段階での制御の有無はいまだ不明である。そこで、転写段階での制御の有無を明らかにする。

アスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路の主要部分は葉緑体に存在し、メチオニンの生合成に関しても、*CGS1* 遺伝子は核にコードされるが、細胞質で合成された CGS タンパク質は葉緑体に移行して機能する。葉緑体への移行段階、もしくは、葉緑体移行後の CGS タンパク質の分解段階での制御の有無を明らかにする。

CGS1 遺伝子発現制御に関するこれまでの研究は、シロイヌナズナを用いて行ってきた。メチオニンは含硫アミノ酸であり、CGS の反応によりシステインからイオウが受け渡される。メチオニンの生合成には窒素とイオウの代謝が絡んでいる。シロイヌナズナでは、窒素栄養、イオウ栄養とも土壌から吸収せねばならないが、一方、マメ科植物ではイオウ栄養は土壌から吸収せねばならないが、窒素栄養は根粒菌により供給される。そこで、マメ科植物では窒素とイオウの代謝に関して、シロイヌナズナとは異なる制御が存在する可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 転写段階での制御

CGS1 遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子を繋いだコンストラクトを作成し、メチオニン投与に対する応答、ならびに、植物の成長・分化に応答した発現の変化を解析する。また、2 つのレポーター遺伝子をタンデムにつなぎ、その間に *CGS1* の翻訳段階での制御に必要な十分な領域を in-frame でつないだコンストラクトを作成する。興味深い制御が見出された場合には、このコンストラクトを用いて、転写段階での制御と、翻訳段階での制御を区別した実験系を構築する。

(2) 葉緑体移行もしくは移行後の制御

シロイヌナズナの CGS は典型的な葉緑体移行シグナルを持たず、N 末端の 173 アミノ酸の領域に広がっており、翻訳段階でのフィードバック制御に関わる領域 (MTO1 領域) と並んで位置する。そのみならず、MTO1 領域近傍を欠失させると、一部ミトコンドリアに移行する (Hagiwara-Komoda et al., *Plant Cell Physiol.* 55: 1779-1792, 2014)。従って、葉緑体移行のみを解析する実験系の構築は困難が予想される。そこで、まず、葉緑体移行後の CGS タンパク質の安定性をメチオニン投与の有無で解析する。

(3) ミヤコグサ変異株の単離

マメ科植物のモデルとしてミヤコグサを用いて、遊離メチオニンを過剰に蓄積する変異株の分離を試みる。候補株が得られたなら、すでに我々がシロイヌナズナで明らかにしている *mtol*, *mto2*, *mto3* 変異との異同を明らかにする。*mto* 変異を持たない場合は、遺伝解析により、原因遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 転写段階での制御

シロイヌナズナの *CGS1* 遺伝子のプロモーター領域を様々な長さで切りとり、ルシフェラーゼ (LUC) レポーター遺伝子につないだコンストラクトを作成した。Kozak の配列が変わることでの LUC レポーターの翻訳量への影響を考え、*CGS1* 遺伝子の 5'-UTR から構造遺伝子の最初の 4 アミノ酸の範囲を LUC レポーターにつないだ。トランスフェクションによる一過的発現

系を用いた解析では、作成したコンストラクトにより、レポーター活性に大きな違いが見られたことから転写量の調節に重要な領域の存在が見取れた。しかしながら、メチオニン投与によるレポーター活性の有意な違いは、いずれのコンストラクトでも見られなかった。

酵母ではメチオニン生合成は、転写段階でのフィードバック制御が報告されており、この場合、メチオニンと AdoMet の両方が協調してフィードバック制御に関わるとされている。本研究で行なった一過的発現系での解析では、メチオニンを投与した。植物細胞は、メチオニンを高効率で取り込むが、AdoMet はほとんど取り込まないとされている。一方、細胞に投与したメチオニンは、細胞内で迅速に AdoMet に転換されると考えられ、CGS1 遺伝子の翻訳段階でのフィードバック制御においては、AdoMet がエフェクターであるが、メチオニンの投与で大きな効果を示す (Chiba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10225-30, 2003)。これらのことから、CGS1 遺伝子プロモーターの活性は、メチオニンや AdoMet によるフィードバック制御を受けないと考えられる。

一方、シロイヌナズナ植物の成長にともなう CGS1 mRNA の蓄積量を調べたところ、成長のステージを追って、蓄積量が変化することが示された。CGS1 遺伝子では、翻訳段階での制御、すなわち、AdoMet に応答した翻訳の一時停止と共役した CGS1 mRNA 分解による転写後制御が行われるので、CGS1 mRNA の蓄積量の変化が転写段階での制御か否かわからない。そこで、LUC と RLUC の 2 つのレポーター遺伝子をタンデムにつなぎ、その間に CGS1 の第 1 エキソン領域を in-frame で挟んだコンストラクト(タンデムレポーター)を用いた解析を行った。この実験系では、転写量の変化では 2 つのレポーター活性が並行して増減するため、両者の活性の比は変化せず、一方、翻訳段階での制御があった場合には、活性の比が変化すると期待され、転写段階と翻訳段階の制御を同時に解析することが可能となると考えた。

タンデムレポーター株を *mtol-1* 変異株と掛け合わせ、両遺伝子をホモ接合体で持つ株を数株確立した。*mtol-1* 変異株は、CGS1 遺伝子発現の翻訳段階での制御が欠損した変異株であり (Chiba et al., *Science*, 286: 1371-1374, 1999), 転写後制御がかからないコントロール株として使うことができる。タンデムレポーターを導入したトランスジェニック株と、これに *mtol-1* 変異を導入した株における 2 つのレポーターの活性比を見ると、トランスジェニックラインによって数倍の違いがあるものの、*mtol-1* 変異を導入した株の方が活性比が大きかった。これは、予想と逆の結果であった。AdoMet に応答して CGS1 mRNA 上で翻訳が停止した時に、未知の反応が起きている可能性があり、興味深い発見につながる可能性があるが、本研究の範囲を超えるものであり、今後の検討課題とした。シロイヌナズナの成長に伴う CGS1 mRNA 蓄積量の変化と、CGS1 プロモーターとレポーターをつないだ単純なコンストラクトを持つトランスジェニック株でのレポーター活性の変化との関係から、論文をまとめる予定である。

研究計画当初考えていなかった成果として、別の研究のために作成していた、リボソーム出口トンネルに変異を持つシロイヌナズナ株において、遊離メチオニンの蓄積が有意に増加していることが見出された。翻訳段階でのフィードバック制御が、メチオニンの生合成制御で重要であることを改めて示した。

(2) 葉緑体移行後の制御

シロイヌナズナ植物体からタンパク質を抽出し、抗 CGS 抗体を用いた Immuno-blot により解析したところ、葉緑体に移行後の CGS 成熟タンパク質と考えられるバンドの他に、数本のより短いバンドが検出された。葉緑体を単離したサンプルを用いた同様の解析ではより多くのバンドが検出される。そこで、CGS の C 末端にタグをつけたコンストラクトを導入したトランスジ

エニック・シロイヌナズナ株を作出した。CGS の N 末端領域には葉緑体移行シグナルが含まれることから、N 末端へのタグの付加は行わなかった。

タグに対する抗体を用いた Immuno-blot により明確なバンドが検出された。我々は、CGS の葉緑体移行に際して切断されて生じる成熟 CGS タンパク質の N 末端位置を報告しているが (Hagiwara-Komoda et al., *Plant Cell Physiol.* 55: 1779-1792, 2014), その位置は、それ以前に報告されていた成熟 CGS タンパク質の N 末端位置とは異なっていた。本研究で検出したバンドのサイズは、我々の報告が正しいことを裏付けるものであった。

このトランスジェニック株を用いた解析により、葉緑体に移行後の CGS タンパク質が、メチオニンの投与により不安定化され、また、明暗条件によっても安定性が変化することが見出された。AdoMet に応答した *CGS1* 遺伝子の翻訳段階での制御が、メチオニンおよび AdoMet の細胞内の濃度の恒常性を維持するためのフィードバック制御であるならば、葉緑体移行時もしくは移行後の CGS タンパク質の安定性等の段階での制御が行われると期待され、そのような制御を見出したものと考えている。*mtol-1* 変異のバックグラウンドでの解析等を加えて、論文にまとめる予定である。

(3) ミヤコグサ変異株の単離

シロイヌナズナの *mtol* 変異株は、非天然アミノ酸で、メチオニンのアナログであるエチオニンに対する耐性変異株として分離された (Inaba et al., *Plant Physiol.*, 104: 881-887, 1994)。エチオニンは、メチオニンを基質とするほとんどの酵素でメチオニンと間違われて使われるため、毒性を持つ。細胞内の遊離メチオニン濃度が高ければ、外から与えた毒であるエチオニンを薄める効果があるため、遊離メチオニンを過剰に蓄積する変異株は生き残ると考えられる。

宮崎大学のナショナルバイオリソースプロジェクトから分与を受けた、エチルメタンサルホン酸で突然変異誘起処理を施したミヤコグサの M2 種子を用いて、エチオニン耐性変異株のスクリーニングを行なった。約 1 万粒の M2 種子について、いくつかの栽培条件で、発芽直後の生育状態を指標として 1 次スクリーニングを行なった。候補株について、回復培養ののち、若い本葉をサンプリングし、遊離アミノ酸含量を測定した。多数のサンプルを扱うことによるアミノ酸抽出効率のばらつきによる偽陽性を防ぐため、メチオニンと生合成経路を異にする複数の遊離アミノ酸とメチオニンとのシグナル比を指標として 2 次スクリーニングを行なった。1 次スクリーニングで計約 70 株を選抜し、数株が 2 次スクリーニングを通過した。これらの中には、他のアミノ酸との比が野生型の 10 倍を超えるものが含まれており、変異株の分離は確実に見えた。しかしながら、次世代の植物ではいずれも再現されなかった。2 次スクリーニングでのアミノ酸比の分布を見ても、単なる偽陽性とは考えられず、選抜時の何らかのストレス等で、遊離メチオニンが増加した可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 高松世大, 大橋悠文, 尾上典之, 尾之内均, 山下由衣, 内藤 哲. 申請ペプチドが司るリボソームの停滞に, リボソーム出口トンネルが関与することの生化学的証拠. 第 60 回 日本植物生理学会年会. 2019 年 3 月, 名古屋.
2. 藤田美玖, 尾之内均, 山下由衣, 内藤 哲. メチオニン生合成に関わるシロイヌナズナ CGS 酵素タンパク質発現の解析. 第 41 回 日本分子生物学会年会. 2018 年 12 月, 横浜.

3. Takamatsu, S., Imamichi, T., Yonezawa, S., Kusumoto, N., Onouchi, H., Yamashita, Y., and Naito, S. Involvement of the exit tunnel constriction region in nascent peptide-mediated ribosome stalling in Arabidopsis. International Symposium “Proteins: From the Cradle to the Grave”, Ohtsu, August, 2018.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/arabi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平井 優美

ローマ字氏名：Hirai, Masami

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。