

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380197

研究課題名 (和文) 高速・高密度遺伝子同定法によるキャップ非依存性翻訳制御因子群の探索

研究課題名 (英文) Search for factors involved in cap-independent translation by the rapid and high-density mutant identification method.

研究代表者

平塚 和之 (HIRATSUKA KAZUYUKI)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：30202279

研究分野：応用分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：シロイヌナズナ、レポーター遺伝子、遺伝子発現制御、翻訳制御、ハイスループットスクリーニング

1. 研究計画の概要

目的：真核生物の細胞内では核遺伝子の転写産物はエディティング、ポリ(A)配列付加とキャップ構造の形成が行われ、成熟 mRNA となって細胞質に至り翻訳される。通常は翻訳因子群がキャップ構造を認識してリボソームと会合し、開始コドンから翻訳が始まり、終止コドンでリボソームが離脱して翻訳が終了するので、単独の mRNA からはひとつのタンパク質の合成が行われるだけである (キャップ依存的翻訳開始機構)。これに対して、ウイルス RNA などでは RNA 配列中の Internal Ribosome Entry Site (IRES) という高次構造をリボソームが認識して翻訳開始が起こる場合があり、それはキャップ非依存的な翻訳開始を可能にする。本研究ではこの IRES による翻訳制御機構に関与する因子群 (タンパク質あるいは non-coding RNA) を、独自の高速・高密度な遺伝子同定法を用いて探索し、高効率な導入遺伝子発現系の構築に寄与する知見を得ることを目的とする。

2. 研究の進捗状況

発光レポーターを用いた *in vivo* スクリーニングにより、IRES 活性が上昇したシロイヌナズナ変異体の単離に成功し、染色体マッピングにより、その原因遺伝子変異を同定した。現在、その遺伝子産物の機能解析と、遺伝子変異の相補性検定等を実施し、それらの課題が解決され次第、論文発表を同時に進める予定である。また、IRES 活性が低下するシロイヌナズナ変異体の単離にも成功し、染色体マッピングの結果、変異遺伝子の染色体領域

の絞り込みには成功しているが、原因遺伝子の決定には至っていない。

一方、通常のホテルルシフェラーゼレポーターを用いた方法では、変異体候補の単離後も、繰り返し組織片を用いたデュアルルシフェラーゼ法による検定が必要で、そのプロセスが煩雑であることが問題となった。そこで、新たに開発した、多色発光レポーターを用いることで、それらの問題を解決することが可能であると考え、新たな形質転換シロイヌナズナの優良ラインの作成を行った。このシロイヌナズナを用いた、多色発光レポーターによるスクリーニング系は、イメージング解析のみで二次スクリーニング以降のプロセスにも対応可能であるため、実験効率は大きく向上した。

さらに、多色発光レポーターを用いたシロイヌナズナに化合物ライブラリーを処理することで、キャップ非依存性翻訳を阻害あるいは促進する化合物のハイスループットスクリーニングが可能となった。スクリーニングは開始したばかりであるが、すでに翻訳効率に影響する化合物の同定には成功しており、今後の展開に大いに期待が持たれる。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

理由：変異体の単離と、その特徴付けを終えるには予想以上の手間と時間がかかり、論文発表等は遅れている。一方で、化合物ライブラリーから翻訳制御因子を見いだすことに成功するなどの予想以上に進展している面もあるため、おおむね順調であると判断した。

[その他]

4. 今後の研究の推進方策

変異体の単離と、原因遺伝子の同定、機能解析等に関しては、これまでの方針通りに進める。一方で、化合物ライブラリースクリーニングによる、網羅的な翻訳制御因子の探索は新たな研究分野としても興味深く、産業応用等への展開も大いに期待できるので、当初の計画には無かったが、今年度は重点的に研究を実施したい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Asada, M., Bayarmaa, G., Morohashi, K., and Hiratsuka, K. Expression and subcellular localization of pre-rRNA processing factor homologues in higher plants. *Plant Biotechnol.* 24, 301-306. 2007 査読あり
- ② Tanaka, T., Ono, S., Watakabe, Y., and Hiratsuka, K. Bioluminescence reporter assay system to monitor Arabidopsis MPK3 gene expression in response to infection by *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72, 1-5. 2006 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小倉里江子、松尾直子、平塚和之
高等植物におけるキャップ非依存的翻訳に
関与する因子群の探索について
・第 26 回 日本植物細胞分子生物学会大会
(2008 年 9 月 大阪)

[図書] (計 4 件)

- ① 平塚和之, 抵抗性誘導微生物の評価 ②)
ハイスループットシステムを用いた評価,
微生物と植物の相互作用を利用した病害
防除, 百町満朗編, ソフトサイエンス社,
pp.115-120, 2009
- ② 平塚和之, 微生物の病原性と植物の防御応
答, 上田一郎編, 北海道大学出版会,
pp.67-74, 2007

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)