

平成22年5月25日現在

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 CAP-independent translational regulators by the rapid and high-density gene identification methods.
 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

研究成果の概要（和文）：新規な発光レポーター系を開発し、高速・高密度な遺伝子発現モニタリング系を確立し、それらを導入したシロイヌナズナに変異導入を行い、キャップ非依存的な翻訳活性に変動が見られる変異体を単離して、その原因遺伝子の同定を試みた。また、マルチウェルプレート中のシロイヌナズナ芽生えに対して化合物を処理する方法で、新規化合物を選抜する手法を開発し、化合物ライブラリー等のスクリーニングに応用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：A rapid and high-density gene expression monitoring system was established by developing a novel bioluminescence reporter system. We identified mutated genes responsible for altered translation activity by isolating mutants from Arabidopsis plants harboring the reporter gene system. To identify novel compounds that regulate CAP-independent gene expression, we also developed a method applicable for screening of chemical libraries by using Arabidopsis seedlings grown in multi-well plates

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

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、転写、ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

レポーター遺伝子としての発光レポーターは広く活用され、高等植物においても転写制御研究等に応用されてきた。しかし、発光レポーターの技術的な改良は 1980 年代から大きな進展は無く、GFP 等の蛍光タンパクレポーターと比較して活用範囲が限定されてきた。一方、高等植物細胞において外来遺伝子を高発現させる試みは、遺伝子組換え植物の応用において最も重要な技術的改良点であるが、導入遺伝子の不活性化の問題等があり、計画的に複数の外来遺伝子を発現させる技術は確立されていなかった。その原因は遺伝子発現制御に関する学術的基盤の不足にあり、遺伝子の共抑制、mRNA の分解、翻訳制御等に関しては不明な点が多く残されていた。特に CAP 非依存的翻訳を司る RNA 構造である Internal ribosome entry site (IRES) を用いる方法は、複数の外来遺伝子を導入発現させる方法として期待が持たれるが、その機能制御に関与する因子に関しては未詳であった。

2. 研究の目的

遺伝子発現制御研究の有力な高速・高密度な手法としての発光レポーター遺伝子を見直し、その高性能化を図る。そのシステムを植物体に導入して *in vivo* の IRES 依存的翻訳効率のモニタリング系を確立し、変異遺伝子の探索等に応用する。

3. 研究の方法

(1) 高等植物細胞における新規発光レポーター系の開発

哺乳動物用に開発された緑色発光タンパク質 (CBG) と赤色発光タンパク質 (CBR) を用いて、それらが植物組織において機能するか検討し、アッセイ条件の最適化等により、植物個体を用いた *in vivo* アッセイへの応用を図る。

(2) 遺伝子銃を用いた一過性発現系による解析

連続観察可能な発光レポーター系と、簡便な遺伝子導入実験が実施可能な一過性発現系を用いて、転写・翻訳あるいは RNA の安定性に関与する因子群の特徴付けを試みる。

(3) シロイヌナズナを用いたハイスループット系による大規模スクリーニング手法の開発

シロイヌナズナに導入した発光レポーター

系を用いた遺伝子発現モニタリングにより、ターゲットとする遺伝子発現量を連続的に定量する手法で、転写・翻訳活性を評価することが可能となる。その実験系を最適化し、変異体の単離や、生理活性物質の同定に活用可能なシステムを構築する。

4. 研究成果

(1) 新規な発光レポーター系の開発

多色発光レポーターを用いたデュアルカラーアッセイ法を確立し、植物細胞および植物個体において非破壊的に 2 種類の遺伝子発現を同時にモニタリングする系を開発することができた。さらに、遺伝子銃を用いた一過性発現実験においては、多色ルシフェラーゼに加えて、ウミシイタケルシフェラーゼを併用することで、3 種類の遺伝子発現を同時に定量することが可能な実験系を確立することができた。3 種類の遺伝子発現を同時に定量可能な新規アッセイ系が確立されたので、IRES 活性評価をより厳密に実施可能となった。具体的には、これまでのデュアルアッセイでは相対活性として IRES 活性を評価していたが、3 レポーターの同時測定によって、キャップ依存的な翻訳活性と、IRES 依存的なそれとを定量的に比較可能となり、遺伝子発現活性を詳細に検討することが出来るようになった。

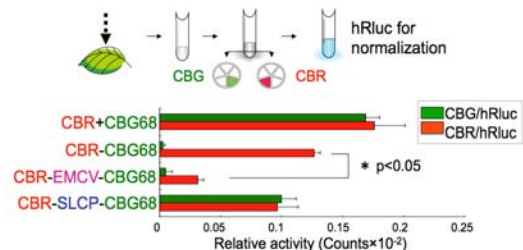


図 1. 多色ルシフェラーゼアッセイとデュアルルシフェラーゼアッセイを組み合わせた 3 レポーター同時定量系による IRES 活性評価の例

(2) 遺伝子銃を用いた一過性発現系による解析

タバコ BY-2 細胞あるいは葉への遺伝子銃による共発現により、RNA サイレncing サプレッサー (RSS) などの特徴付けが可能であることが示された。キュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質と Peanut clump virus 由来の p15 タンパク質では、変異を導入したものを共導入した場合との比較で、明瞭な活性の差異が観察できたことから、この実験系

が期待通りに RSS の活性モニタリングに活用できることが示された (図 2)。アミノ酸置換を有する病原性変異株の 2b との活性比較から、病原性と RSS 活性との関係が示唆される結果も得られた (図 3)。

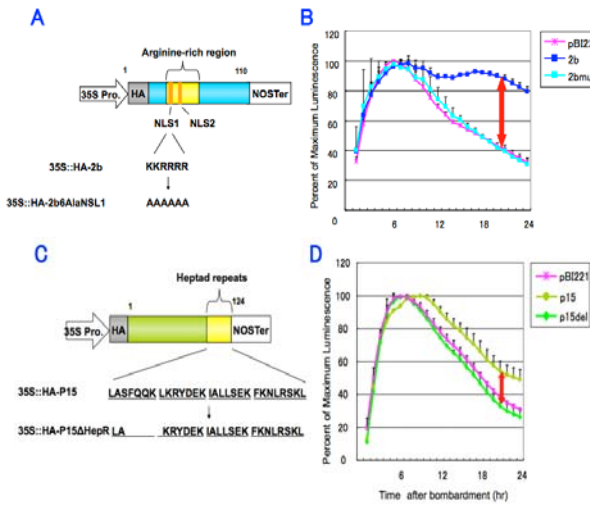


図 2. 変異導入したキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質 (A, B) および Peanut clump virus P15 (C, D) の RSS 活性を一過性発現系で野生型と比較した結果

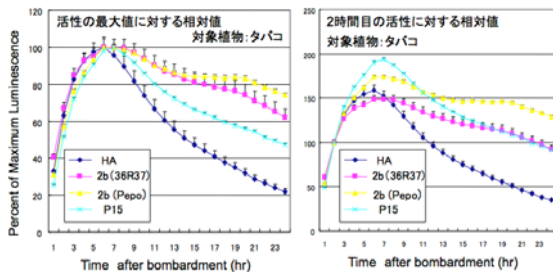


図 3. 病原性が異なるキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質の RSS 活性を一過性発現系で比較した結果

さらに、IRES 配列と相互作用することが予想されるタンパク質として、翻訳開始因子が想定されるが、それらの共発現が IRES 活性に及ぼす影響を観察する目的で、一過性発現系を用いた実験を行った。その結果、シロイヌナズナ由来の eIF4E または eIF(iso)4E の共発現で、BY-2 細胞における crTMV-CP 由来の IRES 活性が有意に上昇することが明らかとなった (図 4)。

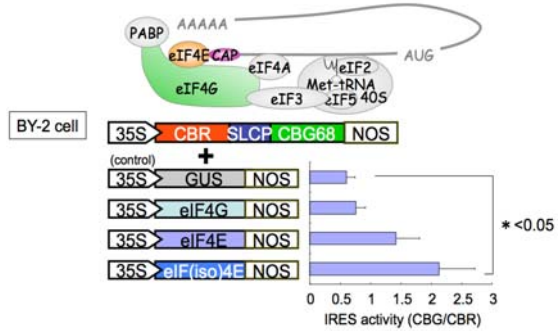


図 4. シロイヌナズナ翻訳開始因子の共発現が IRES 活性に及ぼす影響

(3) シロイヌナズナを用いたハイスループット系による大規模スクリーニング手法の開発

多色ルシフェラーゼを導入したシロイヌナズナを用いて *in planta* アッセイの実施可能性について検討した。具体的には、CBG と CBR を導入したトランスジェニックシロイヌナズナを作成して、それらの発光波長帯について調べ、発光検出に分光フィルターを用いることによって同時に検出定量可能であることを確認した。さらに、crTMV-IRES で連結した CBR と CBG を有するコンストラクトを導入し、IRES 活性のモニタリングが可能であることを示した (図 5)。この系を用いることにより、変異源としてエチルメタンサルホン酸 (EMS) を処理して得られた M2 世代のシロイヌナズナ種子の芽生えをスクリーニングして、IRES 活性変異体候補を得ることが出来た。今後は他の IRES を挿入した植物も利用することにより、この系を用いて CAP 非依存的翻訳に関与する多くの遺伝子変異が同定可能になることが期待される。また、IRES 活性が低下した変異体は、CAP 非依存的翻訳を行う RNA ウイルスの遺伝子発現にも影響を与える可能性が考えられるので、この方法で得られる変異体の原因遺伝子からウイルス感受性に関連する変異遺伝子が得られる可能性も考えられる。

多色ルシフェラーゼによるスクリーニング方法

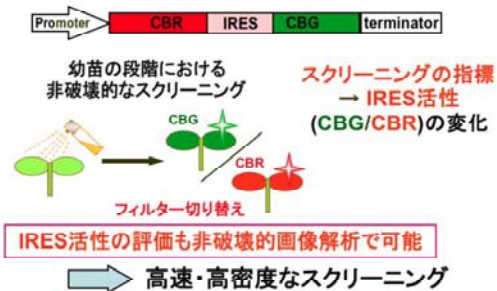


図 5. 多色ルシフェラーゼによる *in planta*

スクリーニングの概念図

一方、マルチウェルプレートを用いた実験系についても検討を加え、白色 96 穴プレートのウェル中で上記のシロイヌナズナ種子を発芽させ、それに化合物を添加することによって、IRES 活性に影響を与える化合物を探索可能なスクリーニング系を確立することが出来た (図 6)。今後は、化合物ライブラリーを用いて探索を実施することにより、興味深い活性を示す化合物が多く得られることが期待される。また、384 穴プレートを用いることなどにより、一層のハイスループット化を実施できる余地も残されており、これまでにない大規模な化合物ライブラリースクリーニングにより、CAP 非依存的翻訳に関与する、多くの新規化合物が見出される可能性がある。

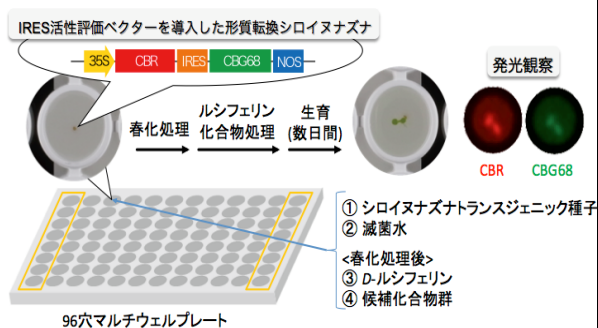


図 6. 多色ルシフェラーゼレポーター導入シロイヌナズナを用いた化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングシステム

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Ishikawa, K., Sasaki, J., Hiratsuka, K., and Taniguchi, K. Overall linkage map of the nonstructural proteins of Aichi virus. *Virus Res.* 147, 77-84. 2010 査読有り
- ② 草間勝浩, 小倉里江子, 平塚和之, 発光レポーターを用いた抵抗性誘導剤探索と評価について -多色発光遺伝子の活用による高性能化- 日本農薬学会誌, 34(4), 316-349, 2009 査読無し
- ③ Netsu, O., Hiratsuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M., and Suzuki, M. Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Arch. Virol.* 153, 1731-1735. 2008 査読有り
- ④ Seo, S., Maeda, T., and Hiratsuka, K.

Tissue-specific and DNA damage-responsive expression of the AtRAD51 gene promoter in transgenic Arabidopsis and tobacco. *Plant Biotechnol.* 24, 321-329. 2007 査読有り

- ⑤ 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 査読有り
- ⑥ Albert, P., Miya, A., Hiratsuka, K., Kawakami, N., and Shibuya, N. A high-throughput evaluation system for Arabidopsis mutants for defense signaling. *Plant Biotechnol.* 23, 459-466. 2006 査読有り
- ⑦ 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 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小倉里江子, 松尾直子, 平塚和之, Dual-color レポーター遺伝子を用いたウイルス由来 IRES 活性の種及び組織特異性評価について, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010 年 4 月 20 日, 京都市
- ② 稲本敦, 小倉里江子, 平塚和之, *Arabidopsis mosaic virus* の 5'非翻訳領域 (5'UTR) に由来する Internal ribosome entry site (IRES) 翻訳エンハンサー活性の分子解剖について, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010 年 4 月 20 日, 京都市
- ③ 緒方裕一, 林原千恵子, 井原幸太郎, 小倉里江子, 松尾直子, 平塚和之 遺伝子銃を用いた植物ウイルス由来サイレンシングサプレッサーの活性評価について 日本植物病理学会関東部会 (2008 年 9 月 13 日, 藤沢市)
- ④ 小倉里江子, 中浜克彦, 林原千恵子, 松尾直子, 平塚和之, 外来遺伝子発現効率向上に寄与する因子の探索について, 第 26 回日本植物細胞分子生物学会大会, 2008 年 9 月 2 日, 大阪市
- ⑤ R. Ogura, N. Matsuo, K. Hiratsuka, The Search for Factors that Regulate the Cap-Independent Translation of Virus Gene Expression, 9th International Congress of Plant Pathology, 2008 年 8 月 27 日, トリノ市 (イタリア)
- ⑥ 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 25 回日本植物細胞分子生物学会, 2007 年 8 月 8 日, 千葉市
- ⑦ 小倉里江子, 松尾直子, 石川球美子, 平塚和之, Crucifer-infecting tobamovirus 由来

IRES 活性の組織特異性について、第 24 回
日本植物細胞分子生物学会、2006 年 7 月
29 日、つくば市

〔図書〕（計 3 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 1 件）

名称：外来遺伝子発現要素およびその利用
発明者：平塚和之、稲本敦、小倉里江子
権利者：横浜国立大学
種類：特許
番号：特願 2010-033763
出願年月日：平成 22 年 02 月 18 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 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