

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06304

研究課題名(和文)植物の光応答時の翻訳効率および翻訳開始点の変化についての解析

研究課題名(英文) Analysis of translation efficiency and translation initiation site in plant light response

研究代表者

栗原 志夫 (Kurihara, Yukio)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60455342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物は発芽後、光を受容することで遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させる。青色光は発芽後の胚軸伸長を制御する重要な光である。本研究では、シロイヌナズナ幼苗を暗所から青色光へ露光させた時に起こる翻訳効率と翻訳開始点の変化をゲノムワイドに明らかにすることを目的とした。そのために、翻訳を調べる方法であるリボソームプロファイリング解析を行った。その結果、3万5千個を超える翻訳されるORFを同定し、それらのうち約18%の翻訳効率が青色光への露光によって有意に変化することがわかった。さらに、転写開始点依存的に翻訳開始点が変わると考えられる複数の遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの学術研究においては、mRNAの蓄積の高低が遺伝子の発現量の指標として用いられることが多かった。本研究は、遺伝子発現を単にmRNAの量ではなく、翻訳に向けたmRNAの質という概念を加えて発展的に探るものである。したがって、本研究で得られる成果は、これからの遺伝子発現から生命現象を理解する研究全体に対して一石を投じるものとなるはずである。また本研究は、植物の環境応答に応じた遺伝子発現の調節機構の新たな一面を明らかにするものでもある。

研究成果の概要(英文)：After germination, plants perceive light and dramatically change their gene expression profile. Blue light is required for regulation of hypocotyl elongation. This research aimed to reveal changes of translation efficiency and translation initiation site, which occur when dark-grown young Arabidopsis seedlings are exposed to blue light. For the purpose, ribosome profiling analysis was performed. The results showed that more than 35,000 ORFs were translated in the light response and translation efficiency of 18% of them was significantly altered by blue light exposure. In addition, the results identified some genes in which translation initiation sites changed accompanied with change of transcription start sites.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：光応答 翻訳効率 翻訳開始点 シロイヌナズナ 転写開始点 リボソームプロファイリング

1. 研究開始当初の背景

植物は発芽した後、さまざまな波長の光を受容し、遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させながら、形態形成を進めていく。これまで、主に遺伝学的な変異体の解析から光応答反応において重要な役割を果たす遺伝子群が同定・解析され、大まかな光応答反応の分子メカニズムがわかってきた。しかしながら、光応答反応について、現在のモデルでは説明できない点が多々残されているのが現状である。

さまざまな波長の光の中で、青色光は発芽後の胚軸伸長を制御する重要な光である。これまでに私は、暗所で育成したシロイヌナズナ幼苗を青色光下へ移した前後のトランスクリプトームや転写開始点の位置情報をゲノムワイドに明らかとしてきた。その中で、多くの光応答遺伝子において、青色光に反応して主要な転写開始点の位置が変化することがわかってきた。そのような位置の変化において、転写される mRNA の翻訳に関係する二つの注目すべき点が見えてきた。

その一つは、暗所では 5'非翻訳領域 (5'UTR) に upstream ORF (uORF) をもつ mRNA が転写されるが、青色光に移したときは転写開始点が下流にシフトし、uORF 配列が転写されず uORF をもたない mRNA が転写される現象である (図 2 参照)。シロイヌナズナにおいて、およそ半数の遺伝子の 5'UTR に短い uORF が見られる。uORF は、mRNA 上のリボソームの停滞や放出を促し、mRNA の翻訳を阻害する代表的な制御因子である。しかしながら、青色光への露光の前後で mRNA 上の uORF の有無が、どの程度、翻訳効率に影響するのかはわかっていない。

注目すべきもう一つは、通常の翻訳開始点よりも下流に転写開始点がシフトしてしまう現象である。この場合、翻訳開始点も下流にシフトし、短いタンパク質が合成されることが予想される。これまでに、植物において翻訳開始点の違いによって、予測される短縮タンパク質の局在や機能が変化する事例が報告されている。しかしながら、実際に *in vivo* においてそのような短縮タンパク質が翻訳されているかどうかは謎である。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナ幼苗を暗所から青色光へ露光させた時に起こる翻訳効率と翻訳開始点の変化をゲノムワイドに明らかにすることを目的とした。そして、転写開始点と翻訳開始点の関係が光応答反応に与える影響を知ることを目指した。

3. 研究の方法

暗所で発芽から 3 日間生育させたシロイヌナズナ幼苗を青色光へ露光させた前後の各要素 (転写開始点、RNA 蓄積量、翻訳効率、翻訳開始点) を図 1 に示すオミックス解析によってゲノムワイドに取得した。そこでは青色光への露光開始から 1 時間後を調べた。さらに、一部の解析について栄養成長期のデータも取得した。

Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法により、転写開始点を同定した。リボソームプロファイリング法は RNA 上のリボソームフットプリントを同定することによって翻訳を調べる方法である。リボソームプロファイリング法のうち、Ribo-seq によって、翻訳されている ORF の同定および各 ORF (遺伝子) の翻訳量を明らかにした。翻訳量を RNA-seq による RNA の蓄積量で割ることによって、翻訳効率の変化を調べた。さらに、翻訳開始点上のリボソームフットプリントを得る Translation Initiation-seq (TI-seq) によって、翻訳開始点の同定を行った。

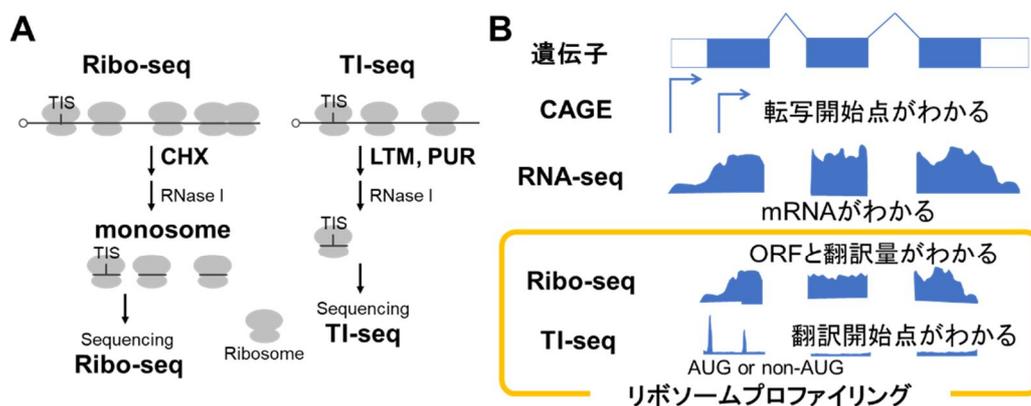


図 1. 本研究で用いるリボソームプロファイリングとその他の解析手法

A. 2種類のリボソームプロファイリングの模式図. B. 各オミックス解析で得られる結果の例.

TI=Translation Initiation, CHX=Cycloheximide, LTM=Lactimidomycin, PUR=Puromycin, TIS=Translation Initiation Site.

4. 研究成果

(1) 青色光への露光時における uORF 前後の転写開始点の位置変化と遺伝子発現についての成果

220 個の遺伝子において、暗所では 5'非翻訳領域 (5'UTR) に upstream ORF (uORF) をもつ mRNA が転写されるが、青色光に露光したときは転写開始点が下流にシフトし、uORF 配列が読まれず mORF をもたない mRNA が転写されることがわかった。Ribo-seq を用いて、それらの遺伝子の翻訳効率を調べたところ、検出できた遺伝子の約 7 割において青色光への露光によって翻訳効率が上昇することがわかった (図 2)。したがって、この結果は、転写開始点の変化によって uORF による翻訳阻害を回避することで遺伝子発現を微調整する機構が存在することを示したといえる。本研究成果は、(Kurihara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018) で発表した。

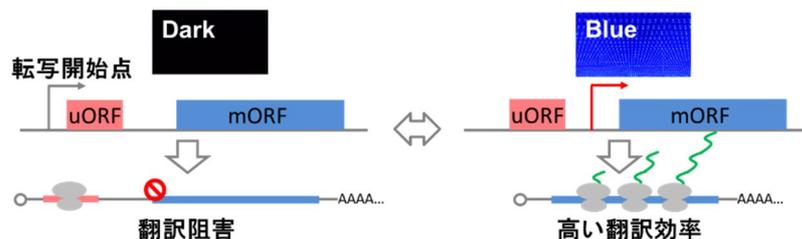


図2. uORFは下流のmORFの翻訳を阻害する。暗所では、転写開始点がuORFの上流にあり、uORFをもつmRNAが転写され、翻訳が阻害される。一方、幼苗を暗所から青色光下に露光させることによって、転写開始点の位置がuORFの下流にシフトし、uORFをもたないmRNAが転写され翻訳効率が上昇する。

(2) 青色光への露光時における翻訳される ORF の同定および翻訳効率についての成果

Ribo-seq のデータを RiboTaper (1) と呼ばれるプログラムで処理することにより、暗所から青色光への露光時において翻訳される ORF の同定を行った。その結果、35,208 個の ORF を同定した (Table 1)。それらは、タンパク質をコードする ORF だけではなく、非コード RNA 上の短い ORF (sORF) と uORF を含む。

	protein-coding ORF	sORF	uORF	Total
Number of ORFs	33627	203	1378	35208
Number of genes	20089	161	1195	21445

青色光への露光によって、6,027 個のタンパク質をコードする ORF、40 個の sORF、164 個の uORF の翻訳効率が変化することがわかった。例として図 3A にタンパク質をコードする ORF の翻訳効率の変化を示す。翻訳効率が上昇した遺伝子の中には、多数の葉緑体に関連する遺伝子群と microRNA 生合成遺伝子である *Dicer-like 1 (DCL1)* および *Hyponastic Leaves 1 (HYL1)* が含まれていた。例えば、図 3B に示すように、*DCL1* と *HYL1* の mRNA 量は光照射の前後でほとんど変化しないが、翻訳効率は有意に上昇したことがわかる。つまり、葉緑体の機能や microRNA 生合成が翻訳レベルで制御されているといえる。

本研究成果は、(Kurihara *et al.*, *Plant and Cell Physiology*, 2020) で発表した。合わせて、露光する光の波長の違いによって、遺伝子発現が異なることを示した研究成果を (Kurihara *et al.*,

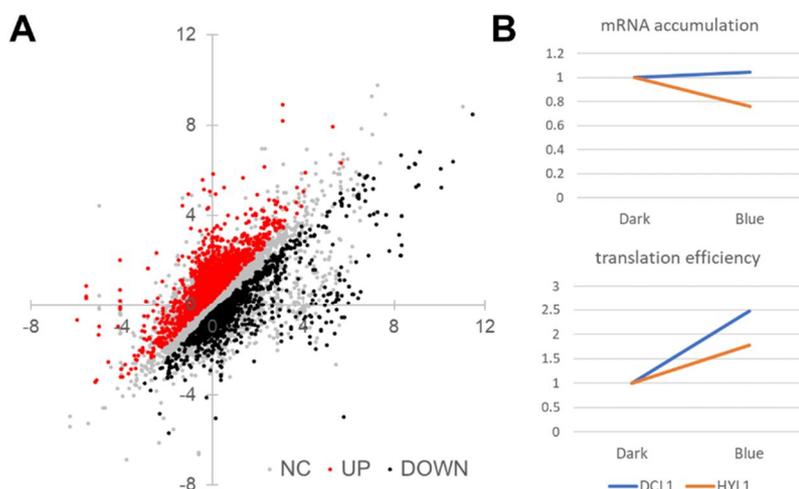


図3. A. 暗所から青色光への露光時におけるタンパク質をコードする各 ORF の翻訳効率の変化. B. microRNA 生合成遺伝子である *DCL1* と *HYL1* の mRNA 量(上)と翻訳効率(下)の変化.

(3) 転写開始点の変化に伴う翻訳開始点の変化について

翻訳開始点を同定するために TI-seq 解析を行った。植物を対象とした TI-seq の実験系は、本研究課題の中で独自に確立を行った。暗所条件の幼苗と栄養成長期の植物を比較した。その結果、少なくとも 3 つの遺伝子で転写開始点の変化によって考えられる翻訳開始点の変化を検出できた。転写開始点依存的な翻訳開始点の変化の一例を図 4 に示す。例の遺伝子の場合、暗所では通常の翻訳開始点よりも下流から転写が起こり、さらに下流の代替翻訳開始点を選択され、hidden ORF (hORF) が翻訳される。その結果、9 アミノ酸からなる短鎖ポリペプチドが生成されるとみられる。しかし、栄養成長期になると、転写開始点が通常の翻訳開始点よりも上流にシフトし、通常のタンパク質が生成されるようになるとみられる。

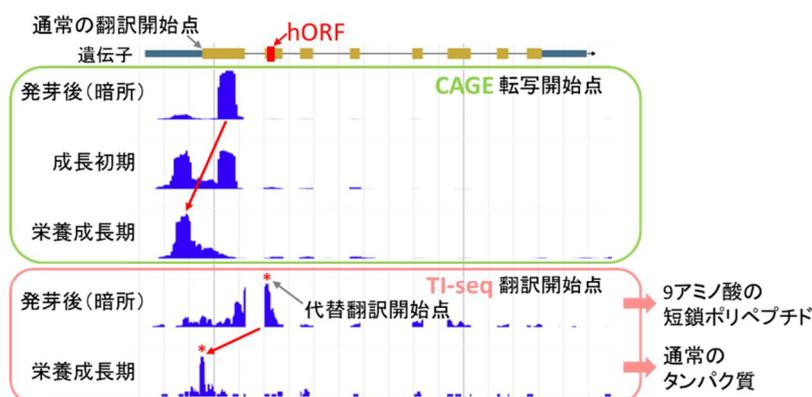


図4. 成長に伴い転写開始点に依存して翻訳開始点に変化する遺伝子の例。例の遺伝子の場合、暗所では hidden ORF (hORF) が翻訳され、9アミノ酸からなる短鎖ポリペプチドが生成されるとみられる。しかし、栄養成長期になると、通常のタンパク質が生成されるようになるとみられる。

さらに多くの同様の変化が起こると推測されるため、最適な解析法の構築を今後の課題とする。そのため、RibORF (2) というスクリプトを用いて千を超える内部 ORF の予測結果を得た。今後、翻訳開始点データとの適切な照合が必要となる。

また、uORF の存在によって、翻訳開始点が飛ばされ、下流の代替翻訳開始点から翻訳が始まる遺伝子が複数みられた。今後、uORF を潰した場合の検証実験が必要となる。

< 引用文献 >

1. Calviello *et al.*, *Nat. Methods* 13: 165-170, 2016.
2. Ji, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 124: e67.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurihara Yukio, Makita Yuko, Shimohira Haruka, Matsui Minami	4. 巻 21
2. 論文標題 Time-Course Transcriptome Study Reveals Mode of bZIP Transcription Factors on Light Exposure in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1993 ~ 1993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21061993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurihara Yukio, Makita Yuko, Shimohira Haruka, Fujita Tomoya, Iwasaki Shintaro, Matsui Minami	4. 巻 61
2. 論文標題 Translational Landscape of Protein-Coding and Non-Protein-Coding RNAs upon Light Exposure in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 536 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohtani Misato, Kurihara Yukio, Seki Motoaki, Crespi Martin	4. 巻 60
2. 論文標題 RNA-Mediated Plant Behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1893 ~ 1896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Tomoya, Kurihara Yukio, Iwasaki Shintaro	4. 巻 60
2. 論文標題 The Plant Translatome Surveyed by Ribosome Profiling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1917 ~ 1926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurihara Yukio, Makita Yuko, Kawashima Mika, Fujita Tomoya, Iwasaki Shintaro, Matsui Minami	4. 巻 115
2. 論文標題 Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences USA	6. 最初と最後の頁 7831 ~ 7836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1804971115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Tomoya, Kurihara Yukio, Iwasaki Shintaro	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The plant translome surveyed by ribosome profiling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗原志夫、蒔田由布子、下平春花、藤田智也、岩崎信太郎、松井南
2. 発表標題 シロイヌナズナ幼苗の青色光への応答時におけるORFの翻訳変化の解明
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原志夫、蒔田由布子、下平春花、藤田智也、岩崎信太郎、松井南
2. 発表標題 シロイヌナズナの青光応答時におけるリボソームプロファイリング解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 志夫、蒔田由布子、川島美香、藤田智也、岩崎信太郎、松井南
2. 発表標題 植物は光照射が起こす転写開始点の位置変化によってuORF による遺伝子発現抑制を免れる
3. 学会等名 第21回日本RNA 学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurihara Y, Makita Y, Kawashima M, Fujita T, Iwasaki S, Matsui M
2. 発表標題 Transcription start site-dependent fine-tuning of gene expression during light exposure in Arabidopsis.
3. 学会等名 Post-transcriptional Gene Regulation in Plants 2019 NARA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原志夫、蒔田由布子、下平春花、藤田智也、岩崎信太郎、松井南
2. 発表標題 シロイヌナズナの光応答時におけるタンパク質をコードしないuORFの翻訳変化の解明
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原志夫、蒔田由布子、川島美香、藤田智也、岩崎信太郎、松井南
2. 発表標題 植物は光受容によって起こる転写開始点の位置変化によってuORFによる遺伝子発現抑制を免れる
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岩崎 信太郎 (Iwasaki Shintaro) (80611441)	国立研究開発法人理化学研究所・岩崎RNAシステム生化学研究室・主任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------