

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年3月31日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19370021
 研究課題名（和文）： 葉緑体翻訳系に於ける5'非翻訳領域とコード領域の適合性を決める要因の探索
 研究課題名（英文）： Search for mRNA elements involved in the compatibility between 5' untranslated regions and coding regions in chloroplast translation
 研究代表者
 杉浦 昌弘 (SUGIURA MASAHIRO)
 名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・名誉教授
 研究者番号： 80027044

研究成果の概要：

植物細胞の中で光合成を行う葉緑体は盛んにタンパク質も作っている。そこで、葉緑体で有用タンパク質を生産する試みがなされたが、必ずしも成功しなかった。このことは、葉緑体のタンパク質合成の機構が動・植物の細胞質や細菌の機構とは違うことを意味する。本研究で、葉緑体でのタンパク質合成にはメッセンジャーRNAの上流部分のみならずタンパク質のアミノ酸配列を規定する部分の一部も必要なことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

年度	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学・オルガネラ

キーワード： 葉緑体、翻訳、タバコ、mRNA、*in vitro*系、コード領域、5'UTR

1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体は植物固有のオルガネラで独自のゲノムを持つ。葉緑体の遺伝子発現は分化過程、組織別、光条件などによって大きく変わるが、その制御は転写レベルよりも翻訳レベルで強く行われる。葉緑体形質転換法で外来遺伝子を導入すると、mRNA まで合成されるがタンパク質は合成されない

例が多いのは翻訳制御によるもので、核-細胞質系の遺伝子発現とは大きく異なる。

葉緑体の翻訳装置は大腸菌と似ていると昔は思われていた。しかし、全コドンを読むのに必要な tRNA 遺伝子を持っていない(タバコでは4種不足)、大腸菌には無い葉緑体固有のリボソームタンパクが数種存在し、立体構造も異なる。大腸菌などでは翻訳開始コドン上流数ヌクレオチドに存在す

る Shine-Dalgarno (SD)配列が翻訳開始に必須であるが、葉緑体では 30%以下の mRNA にしか SD 様配列を持っていないし、さらにこの SD 様配列が翻訳を阻害する例もある。従って、葉緑体の翻訳開始機構は大腸菌などとは異なることが明らかになってきた。

- (2) 我々は、葉緑体固有の翻訳機構を生化学的に解析するため、世界に先駆け 1996 年に葉緑体 *in vitro* (無細胞)翻訳系を開発し、最近大幅な改良を加え翻訳速度を測定できる系までにした。

これまでに *in vitro* 系を用いて、葉緑体 mRNA 固有の翻訳開始機構を明らかにして来た。数年前に、葉緑体で全く翻訳しなかった異種遺伝子を翻訳開始点下流に人工配列を挿入することで翻訳可能とすることに成功した。翻訳過程の律速段階は開始過程で、これまで翻訳開始は 5'非翻訳領域(5'UTR)のみが関与すると考えられていたが、この成果を基に 5'UTR とコード領域の適合性 (compatibility) が翻訳開始に重要であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

- (1) 葉緑体 mRNA の大部分を占める SD 様配列を持たない mRNA の翻訳開始に、5'UTR と共にタンパク質コード領域も関与するという「5'UTR とコード領域の適合性」の仮説を、我々の高活性 *in vitro* 翻訳系を用いて検証する。次いで、コード領域の関与が示されれば、関与するコード領域部分(5'UTR との「適合配列」と呼ぶ)を、一連のコード領域欠失 mRNA を使って特定する。
- (2) 上記の適合配列に対応すると考えられる mRNA 上の 5'UTR の翻訳シス配列の同定と、対応するトランス因子の同定を進める。
- (3) 葉緑体に比較的多く見られるコード領域が重複している mRNA の翻訳機構を解析する。*ndhC-ndhK* mRNA の両コード領域はオーバーラップしており、一本の mRNA から翻訳される。この特異な mRNA を適合説の検証に用いる。

3. 研究の方法

我々のタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系は、鋳型 mRNA 量が不飽和条件下(変異 mRNA を用いる場合の必須条件)で翻訳反応が 2 時間以上直線的に進行するので、翻訳速度を正確に定量で

きる。この系を用いて以下のように実験を進める。

- (1) *psbA* mRNA を用いて適合性に関与する配列の探索

① 光化学系 II の D1 タンパク質をコードするタバコ *psbA* mRNA の 5'UTR は、D1 コード領域は当然適合性があるが、リジンを全く含まない。

② ウイルスの TAT タンパク質コード領域を *psbA* 5'UTR に結合しても全く *in vitro* 系で翻訳されない。従って TAT コード領域は不適合である。しかし、5'UTR と TAT の間に 100 ヌクレオチドの人工配列を挿入すると翻訳する。TAT は 9 個のリジンを含む。

③ *psbA* mRNA (5'端は転写開始点)の D1 コード領域 (適合性を持つ) の下流に TAT コード領域 (不適合) を結合する。市販の蛍光リジン tRNA を含む *in vitro* 系で反応させると、リジンは TAT だけに取り込まれるので、不適合な TAT コード領域の翻訳のみを検出できる。

④ D1 コード領域を種々欠失させた mRNA を作製する。これらの欠失 mRNA の翻訳速度を測定し、TAT を翻訳可能とさせる D1 コード領域内の範囲(5'UTR との「適合配列」)を特定する。

- (2) *psbA* mRNA や *psbN* mRNA などの翻訳のトランス因子の同定

① シス配列に作用するトランス因子の存在はゲルレターゼーション法で明らかにする。

② *in vitro* 翻訳系に ³²P 標識 mRNA を加えて、UV クロスリンクしてトランス因子を同定する。

③ トランス因子の単離と解析をする。

- (3) *ndhC-ndhK* mRNA の翻訳機構

① NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット C と K の mRNA の 1 本で、両者のコード領域の一部は重複している。従って、後方の *ndhK* mRNA の 5'UTR に相当する配列は *ndhC* mRNA のコード領域内である。このような場合、リボソームがどのように翻訳開始点を認識するか。

② *ndhCK* mRNA の K コード領域に GFP コード領域を結合させたキメラ mRNA を作製し、これを鋳型として *in vitro* 翻訳して GFP の蛍光で K の翻訳速度を測定する。

③ このキメラ mRNA に種々の変更を入れて K の翻訳に必要な mRNA 上の配列を同定する。

4. 研究成果

(1) *psbA* mRNA を用いて適合性に関与する配列の探索

まず、D1 コード領域(353 コドン)を 3'末端より 50 コドンずつ欠失したものに TAT (86 コドン)を結合して、各々の mRNA の翻訳を調べたところ、5'末端より 50 コドンにしても TAT 部分が合成された。さらに、段階的に欠失していき、10 コドンでも TAT を合成する。さらに細かく欠失させ、最も効率よく TAT を合成するのは 30 コドンであることを見出した(図 1)。1 コドン多くても少なくとも活性が低下することから、1 次配列よりは高次構造が関与していると考えられる。

この結果は、我々の適合説を支持するものであるが、その詳細な分子機構はこれからの研究を待たねばならない。ただ、葉緑体で外来の有用タンパク質を生産する面からいえば、*psbA* mRNA のコード領域の 30 コドン目の後に、発現したいタンパク質コード領域を付加すれば発現できることが明らかになったので、葉緑体工学の基盤技術として有用な成果である。

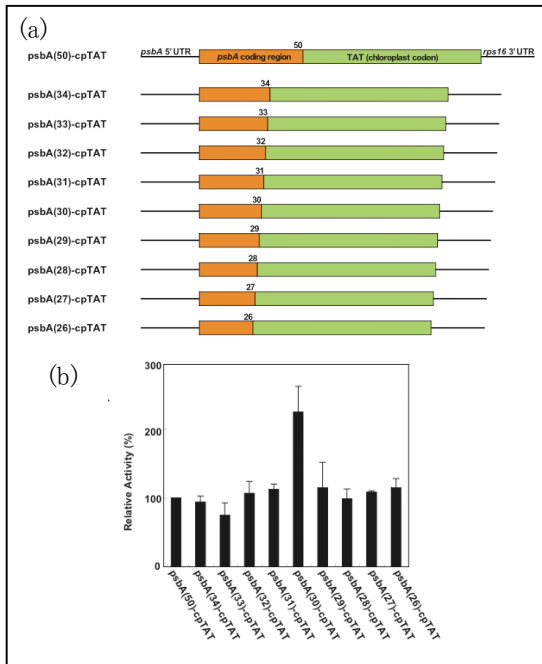


図 1 : 葉緑体 *psbA* mRNA のコード領域内の適合配列。(a) 鋳型 mRNA の模式図。*psbA* のコード領域(26-34 残基)を TAT の上流に結合した。

(b) *psbA*(50)-cpTAT の翻訳活性を 100%とした時の相対翻訳活性。

(2) *psbA* mRNA や *psbN* mRNA などの翻訳のトランス因子の同定

光化学系 II のサブユニットをコードする *psbA* と *psbN* およびリボソームタンパク質をコードする *rps2* の 5'UTR 内のシス配列に作用するトランス因子をタバコ葉緑体より RNA カラムで精製した。得られたタンパク質群のアミノ酸配列分析から、*rps2* mRNA のトランス因子はリボソームタンパク質 S1 であることを明らかにした。*psbN* mRNA は 60-70 kDa のタンパク質がトランス因子と同定されたが、アミノ酸分析の結果からは確定的なことがまだ言えない。他の解析は完了していない。

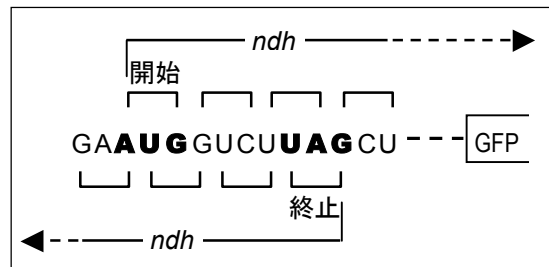


図 2 : *ndhC* と *ndhK* のオーバーラップ部分。*ndhC* 終止コドン UAG の 4nt 上流にフレームがずれた AUG が *ndhK* の開始コドンである。

(3) *ndhC*-*ndhK* mRNA の翻訳機構

NADH デヒドロゲナーゼの C と K サブユニットをコードする *ndhC* と *ndhK* は重複しており、C と K は一本の mRNA から翻訳される。後方の *ndhK* の開始コドン AUG の後ろに前の *ndhC* の終止コドンがあり(図 2)、このコドンが *ndhK* の翻訳に必須のことを発見した。これは、上流の *ndhC* を翻訳したリボソームが終止コドンから戻って *ndhK* も翻訳することを意味する。次に、この *ndhCK* mRNA の 5' UTR を欠失させても *ndhK* がかなり翻訳されることを発見した。このことは、*ndhK* の翻訳が 2 種の異なる経路で翻訳されるという全く新しいもので(図 3)、国際学会と論文で発表した。

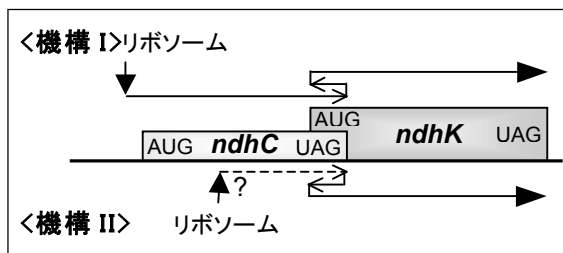


図3: *ndhC* と *ndhK* の翻訳のモデル。第1の機構は、リボソームが5'UTRに入り *ndhC* を翻訳して UAG 終止コドンに着くと、一部のリボソームは戻って *ndhK* を翻訳する(図の上部、翻訳カブリング)。第2の機構は、リボソームが *ndhC* のどこかに入りスキャンして UAG 終止コドンに着き、一部が戻って *ndhK* を翻訳する(図の下部、新しい機構)。

5. 主な発表論文等

(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 5 件)

- ① Nakamura, M. and M. Sugiura: Selection of synonymous codons for better expression of recombinant proteins in tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology*, in press (2009) 査読有り
- ② Yukawa, M. and M. Sugiura: Termination codon-dependent translation of partially overlapping *ndhC-ndhK* transcripts in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19550-19554 (2008) 査読有り
- ③ Kuroda, H., H. Suzuki, T. Kusumegi, T. Hirose, Y. Yukawa and M. Sugiura: Translation of *psbC* mRNAs starts from the downstream GUG, not the upstream AUG, and requires the extended Shine-Dalgarno sequence in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 48: 1374-1378 (2007) 査読有り
- ④ Yukawa M., H. Kuroda and M. Sugiura: A new *in vitro* translation system for non-radioactive assay from tobacco chloroplasts: effect of pre-mRNA processing on translation *in vitro*. *Plant J.*, 49: 367-376 (2007) 査読有り
- ⑤ Nakamura, M. and M. Sugiura: Translation efficiencies of synonymous codons are not always correlated with codon usage in tobacco chloroplasts. *Plant J.*, 49: 128-134 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 28 件)

- ① 黒田洋詩、足達由佳、湯川泰、杉浦昌弘: 葉緑体 mRNA の 5'非翻訳領域の切断と翻訳効率。第 50 回日本植物生理学会年会、名古屋、2009 年 3 月 21-24 日。

- ② 黒田洋詩、杉浦昌弘: 葉緑体翻訳開始に関与するトランス因子。同上。
- ③ 中邨真之、杉浦昌弘: 同義コドンの選択によるコード領域の翻訳効率の変化について。同上。
- ④ 湯川真希、杉浦昌弘: タバコ葉緑体 *ndhC-K* mRNA における終止コドンに依存した翻訳開始機構。同上。
- ⑤ 大羽祐衣、湯川真希、杉浦昌弘、湯川泰: タバコ葉緑体翻訳反応における 5'非翻訳領域とコード領域の適合性検証。同上。
- ⑥ 黒田洋詩、杉浦昌弘: 葉緑体 mRNA の翻訳開始に必要なシス配列とトランス因子(口頭発表)。第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日。
- ⑦ 足達由佳、黒田洋詩、杉浦昌弘、湯川泰: 葉緑体 *psbD-psbC* 翻訳機構の解析。同上。
- ⑧ 湯川真希、杉浦昌弘: タバコ葉緑体 *ndhC-ndhK* mRNA にみられる翻訳終結に依存した翻訳開始機構。同上。
- ⑨ 中邨真之、杉浦昌弘: 葉緑体 mRNA のタンパク質コード領域に存在する翻訳調節領域の解析。同上。
- ⑩ 杉浦昌弘、黒田洋詩: 葉緑体 *rps2* mRNA の翻訳に必要なシス配列。同上。
- ⑪ Kuroda, H., M. Yukawa, H. Suzuki, Y. Yukawa and M. Sugiura: An active *in vitro* translation system from chloroplasts: a powerful tool to study mechanism of translation in chloroplasts. International Symposium "The Ins and Outs of Chloroplasts", Osaka, October 14-15, 2008
- ⑫ 杉浦昌弘、中邨真之: 葉緑体の特異な翻訳機構:コード領域内の必須配列。日本植物学会第 72 回大会、高知、2008 年 9 月 25-27 日。
- ⑬ 杉浦昌弘、湯川真希: 葉緑体 *ndhK* 遺伝子の翻訳開始点(口頭発表)。日本遺伝学会第 80 回大会、名古屋、2008 年 9 月 3-5 日。
- ⑭ Sugiura, M., M. Yukawa, H. Kuroda and M. Nakamura: Unique mechanisms of translation in higher plant chloroplasts. The XVI Congress of the Federation of European

Societies of Plant Biology, Tampere, Finland, August 17-22, 2008. (Selected speaker)

- ⑮ 杉浦昌弘、中邨真之：タバコ葉緑体の同義コドン間の翻訳効率の測定。第49回日本植物生理学会年会、札幌、2008年3月20-22日。
- ⑯ 中邨真之、杉浦昌弘：葉緑体 mRNA の翻訳調節におけるタンパク質コード領域の影響。同上。
- ⑰ 黒田洋詩、鈴木晴香、湯川泰、杉浦昌弘：葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いた *atpE* mRNA 翻訳開始機構の解析。同上。
- ⑱ 湯川真希、杉浦昌弘：タバコ葉緑体 *ndhC-K* mRNA における翻訳開始機構に関する研究(口頭発表)。同上。
- ⑲ 黒田洋詩、鈴木晴香、久寿米木幸寛、廣瀬哲郎、湯川泰、杉浦昌弘：葉緑体の *psbC* mRNA の翻訳は上流の AUG ではなく下流の GUG から始まる。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、2007年12月11-15日。
- ⑳ 中邨真之、杉浦昌弘：葉緑体 mRNA のタンパク質コード領域に存在する翻訳調節領域の探索。同上。
- ㉑ 黒田洋詩、杉浦昌弘：SD 様配列を持たない葉緑体 mRNA の翻訳開始機構の解析。同上。
- ㉒ 鈴木晴香、黒田洋詩、杉浦昌弘、湯川泰：葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いた *atpE* 遺伝子の翻訳機構の解析。同上。
- ㉓ 杉浦昌弘、中邨真之：葉緑体同義コドン間の翻訳効率。日本遺伝学会第79回大会、岡山、2007年9月19-21日。
- ㉔ Sugiura, M.: Mechanisms of protein synthesis in higher plant chloroplasts. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Gmunden, Austria, September 10-13, 2007. (invited lecture)
- ㉕ Nakamura, M. and M. Sugiura: Analysis of translation efficiencies between synonymous codons in tobacco chloroplasts with the aid of *in vitro* translation system. As above.
- ㉖ 黒田洋詩、鈴木晴香、久寿米木幸寛、廣瀬

哲郎、湯川泰、杉浦昌弘：光化学系 II サブユニット CP43 をコードするタバコ葉緑体 *psbC* の翻訳開始点は GUG である。日本光合成研究会・公開シンポジウム、岡山、2007年5月25-26日。

㉗ 中邨真之、杉浦昌弘：葉緑体ゲノムにおけるコドン使用頻度と翻訳効率は必ずしも一致しない。第71回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、名古屋、2007年5月19日。

㉘ 黒田洋詩、杉浦昌弘：タバコ葉緑体の SD 様配列のない mRNA の翻訳開始に必要なシス領域とトランス因子の解析。同上。

[図書] (計1件)

- ① Sugiura, M.: RNA editing in chloroplasts. In "RNA Editing" (H.U. Goring, ed), Springer, pp.125-144 (2008) 査読有り

[その他]

ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~sugiura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 昌弘 (SUGIURA MASAHIRO)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・名誉教授
研究者番号： 80027044

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

黒田 洋詩 (KURODA HIROSHI)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員
研究者番号： 80381903

中邨 真之 (NAKAMURA MASAYUKI)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員
研究者番号： 60322145

湯川 真希 (YUKAWA MAKI)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員
研究者番号： 00448705