

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16159

研究課題名(和文)植物におけるリボソームによるショ糖感知とC/N比の代謝統御機構の解明

研究課題名(英文) Sucrose-sensing and its contribution to carbon/nitrogen metabolic regulation in plants

研究代表者

山下 由衣 (Yamashita, Yui)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：40803383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上流ORF(uORF)は真核生物の約半数のmRNAの5'非翻訳領域に存在する遺伝子発現の制御ユニットである。シロイヌナズナのS1-bZIPファミリー遺伝子がコードするmRNAは、共通のショ糖感知ユニットとして、ショ糖にตอบสนองして翻訳停滞を起こすuORF2をもつ。本研究では、遺伝子間で共通するショ糖感知ユニットとしてのuORF2の機能の横断的解析を実施した。ショ糖のみならず、窒素栄養にも着目し、ショ糖センサーとしての共通の性質と、その転写後制御の多様な分子機構の関与が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成産物として、そして植物細胞内での糖の輸送態としてのショ糖は、多くの植物生理学的応答に關与する重要な分子である。本研究によって、ショ糖感知の制御ユニットとしての上流ORFの機能の解明を通じて、遺伝子間でショ糖感知のアウトプットが異なることが示された。uORFによる転写後遺伝子発現制御の分子機構の解明に資するものである。また、ショ糖感知による遺伝子発現制御の多様性から、ショ糖の多様な生理学的意義の解明にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：Approximately half of the eukaryotic mRNAs contain upstream open reading frames (uORFs) as post-transcriptional regulation elements of gene expression. Arabidopsis S1-bZIP family transcription factor regulates sugar and amino acid metabolism in response to sucrose. All S1-bZIP family mRNA harbor uORF2, which have ability to sense intracellular sucrose concentration through ribosome stalling. In this study, sequence divergency of S1-bZIP family uORF2 was shown to be important for ribosome stalling efficiency. Ribosome stalling was shown to be critical for translational repression of the main ORF of all S1-bZIP family members in the cell. By focusing on sucrose and nitrogen availability, involvement of different types of post-transcriptional regulations to S1-bZIP family gene-expression was uncovered.

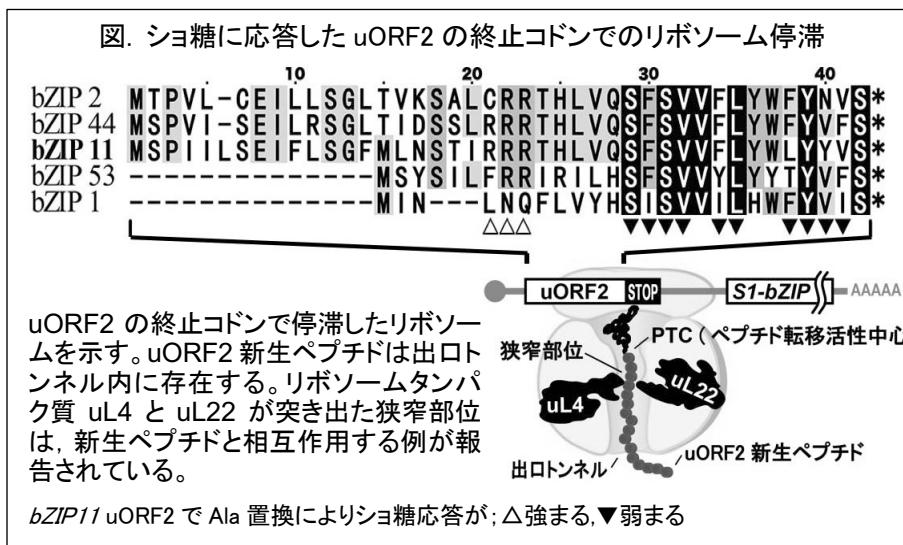
研究分野：植物分子生物学

キーワード：ショ糖 上流ORF 転写後遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

真核生物の mRNA には、5'非翻訳領域 (5'UTR) に上流 ORF を持つ場合があり、同じ mRNA 上の主要 ORF の翻訳を様々に制御する。シロイヌナズナの S₁-bZIP 転写因子ファミリーに属する bZIP11 は、ショ糖や光に応答してアミノ酸と糖代謝を調節する転写因子であり、その発現はショ糖により抑制される (*Plant Physiol.* 150: 1356, 2009)。我々は、bZIP11 mRNA の uORF2 (2番目の uORF) の終止コドンで、リボソームがショ糖に反応して停滞し、これにより下流の bZIP11 ORF の翻訳が抑制されることを明らかにした (*FEBS Lett.*, 591: 1266-1277, 2017)。

リボソームで合成されたばかりのペプチドである「新生ペプチド」はリボソーム大サブユニットを貫く出口トンネルを通して出てくる (下図)。リボソーム出口トンネルは 30-40 アミノ酸の長さの新生ペプチドを収容する。bZIP11 uORF2 のショ糖に反応した翻訳停滞は終止コドンで起こる。また、uORF2 の終止コドンの直前のアミノ酸配列(29-SFSVxFLxxLYYV-41)が特に翻訳停滞に重要である。さらに、我々がこれまでに作出している、リボソーム出口トンネル内に変異を持つトランスジェニックシロイヌナズナでは、uORF2 のショ糖に反応した翻訳停滞が起こりにくくなる。したがって、uORF2 がコードする新生ペプチドが出口トンネルの中で機能して、ショ糖に反応した翻訳停滞が起こることを示唆している。ショ糖に反応した翻訳停滞が無細胞翻訳系で再現されることから、uORF2 が翻訳と共役してショ糖センサーとしての機能を持つと考えられている。



S₁-bZIP 転写因子ファミリーには bZIP11 を含む 5 遺伝子が含まれ、uORF2 を共通の制御ユニットとして保持している。しかし、uORF2 のアミノ酸配列や長さは完全には保存されておらず、そのショ糖感知能をはじめとする機能や生理学的意義の差異は明らかになっていない。

S₁-bZIP 転写因子ファミリーはいずれもアスパラギン合成酵素 (AsnS) の発現を促進する作用を持つ。アスパラギンは窒素栄養の主要な貯蔵態・移動態であり、グルタミンより側鎖の炭素が少ない。よって、低炭素状態でアスパラギンに同化窒素を送り込むのは理にかなったことであり、S₁-bZIP の炭素と窒素のバランス (C/N バランス) 統御への関与を示唆する (*Trends Plant Sci.* 23: 422, 2018)。S₁-bZIP 転写因子が関与する C/N バランス統御は、植物の成長・分化に重要な役割を持つと考えられる。しかしながら、S₁-bZIP uORF2 によるショ糖感知によって C/N

バランスを統御することの生理学的意義は未知である。本研究は、*S1-bZIP* uORF2 によるショ糖感知の分子機構を明らかにするとともに、*S1-bZIP* uORF2 のショ糖感知による炭素と窒素の代謝統御の生理学的意義を問うものである。

2. 研究の目的

本研究では *S1-bZIP* 転写因子ファミリーに共通の転写後制御ユニットである uORF2 に着目し、そのショ糖感知能と転写後制御における機能解明を目的とした。また、*S1-bZIP* 転写因子ファミリーの窒素栄養応答との関わりに鑑み、*S1-bZIP* uORF2 によるショ糖感知によって C/N バランスを統御することの生理学的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

S1-bZIP ファミリーの uORF2 の機能を横断的に比較するために、無細胞翻訳系での翻訳停滞能の解析、およびシロイヌナズナの培養細胞系を用いた転写後遺伝子発現制御解析を実施した。無細胞翻訳系、および培養細胞系では栄養条件の変更が困難であるため、シロイヌナズナの幼植物を用いた解析系を利用し、栄養応答性を評価した。以上の解析系において、uORF2 のショ糖センサーとしての機能をショ糖・窒素栄養応答の観点から横断的に比較した。

4. 研究成果

(1) 無細胞翻訳系を用いた翻訳停滞能の解析

S1-bZIP ファミリーの uORF2 のみをコードする人工 mRNA をコムギ胚芽由来の無細胞翻訳系での翻訳反応に供し、翻訳停滞産物の蓄積量から翻訳停滞能を評価した。ほとんどの uORF2 について、bZIP11 の uORF2 と同様に 500 mM 程度のショ糖を添加した場合に翻訳停滞が起こることから、基本的には *S1-bZIP* ファミリー内で、uORF2 によるショ糖感知能は類似していると考えられた。一方で、bZIP1 uORF2 については翻訳停滞能が他の遺伝子よりも低い可能性が示唆された。また、無細胞翻訳系における翻訳停滞産物の蓄積量の数理解析から、翻訳停滞率と翻訳停滞時間に分けて、定量的に解析できる実験系を確立した。その結果、*S1-bZIP* ファミリーの uORF2 のアミノ酸配列の差異は翻訳停滞率よりも、翻訳停滞時間に寄与していることが明らかになった。

uORF2 のアミノ酸置換の影響については、C 末端側の領域の 1 アミノ酸置換が顕著に翻訳停滞を損なわせる点が共通していることが明らかになった。一方で、uORF2 の中央部分のアミノ酸については、*S1-bZIP* ファミリー間でアラニン置換の影響が異なることから、uORF2 の翻訳停滞能の多様性に寄与する領域であることが示唆された。

(2) シロイヌナズナの液体培養細胞系を用いた翻訳制御の解析

シロイヌナズナの液体培養細胞系を用いて、*S1-bZIP* ファミリーの 5'UTR をレポーター遺伝子をコードする ORF の上流につなぎ、レポーター活性の抑制を指標に翻訳抑制レベルを測定した。(1)では類似した翻訳停滞能が示されたものの、レポーター活性には 10 倍以上の差があることが明らかになった。このことから、無細胞翻訳系には含まれない植物細胞内の何らかの要因が関与

して、細胞内のショ糖応答性に差異が生じている可能性が強く示唆された。

(1)で同定した、uORF2の翻訳停滞能を損なうアミノ酸置換によって、全ての*S1-bZIP*ファミリー uORF2について、シロイヌナズナの液体培養細胞系での翻訳抑制が起こらなくなった。このことは、*S1-bZIP*ファミリー mRNAの翻訳抑制には、uORF2による翻訳停滞が大きく寄与していることを示唆している。

(3) 幼植物を用いた解析

シロイヌナズナの幼植物を用いて、mRNA分解を指標に植物体内での、*S1-bZIP*ファミリー遺伝子のショ糖応答におけるuORF2の影響を比較した。高濃度のショ糖で処理した場合に*S1-bZIP*ファミリーmRNAの分解が促進される場合があることが判明した。分解対象となるmRNA種についてはmRNA品質管理機構による分解の可能性が示された。

(4) 窒素栄養条件の関与

様々な窒素栄養条件で生育させたシロイヌナズナにおいて、mRNA分解を指標に*S1-bZIP*ファミリーmRNAのショ糖応答性を評価した。その結果、通常の窒素栄養条件で顕著なショ糖応答性が認められた。このことから、*S1-bZIP*ファミリー遺伝子発現はC/N応答統御に寄与していることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seidai Takamatsu, Yubun Ohashi, Noriyuki Onoue, Yoko Tajima, Tomoya Imamichi, Shinya Yonezawa, Kyoko Morimoto, Hitoshi Onouchi, Yui Yamashita, Satoshi Naito	4. 巻 48
2. 論文標題 Reverse genetics-based biochemical studies of the ribosomal exit tunnel constriction region in eukaryotic ribosome stalling: spatial allocation of the regulatory nascent peptide at the constriction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 1985-1999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkz1190	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 Sotta Naoyuki, Chiba Yukako, Miwa Kyoko, Takamatsu Seidai, Tanaka Mayuki, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Fujiwara Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Global analysis of boron induced ribosome stalling reveals its effects on translation termination and unique regulation by AUG stops in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15248	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 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shugo Sugawara, Tomoya Imamichi, Yugo Honda, Hitoshi Onouchi, Satoshi Naito and Yui Yamashita
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるショ糖濃度に応答した翻訳停滞とmRNA分解の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shugo Sugawara, Tomoya Imamichi, Yugo Honda, Hitoshi Onouchi, Satoshi Naito and Yui Yamashita
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるショ糖濃度に応答した翻訳停滞とmRNA分解の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seidai Takamatsu, Yubun Ohashi, Noriyuki Onoue, Yoko Tajima, Tomoya Imamichi, Kyoko Morimoto, Shinya Yonezawa, Hitoshi Onouchi, Yui Yamashita, and Satoshi Naito
2. 発表標題 Reverse genetics-based biochemical studies of the ribosomal exit tunnel constriction region on eukaryotic programmed ribosome stalling systems
3. 学会等名 EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miku Fujita, Seidai Takamatsu, Tomoya Imamichi, Yukako Chiba, Satoshi Naito and Yui Yamashita
2. 発表標題 In vivo status of S-adenosyl-L-methionine-induced translation arrest on Arabidopsis CGS1 mRNA
3. 学会等名 EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原 収吾, 尾之内 均, 内藤 哲, 山下 由衣
2. 発表標題 シロイヌナズナS1グループbZIP遺伝子のショ糖に応答した転写後発現制御
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 Tomoya Imamichi, Shugo Sugawara, Seidai Takamatsu, Hitoshi Onouchi, Yui, Yamashita and Satoshi Naito
2. 発表標題 Nascent peptide-mediated ribosome stalling in eukaryotes: What we see from pulse-chase experiments
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	平井 優美 (Hirai Masami Y.) (90415274)		
研究協力者	佐藤 長緒 (Sato Takeo) (50609724)		
研究協力者	反田 直之 (Sotta Naoyuki) (10816292)		

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
---------	---------