

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570043

研究課題名(和文) 環境に応答した葉緑体 mRNA 翻訳制御機構の研究

研究課題名(英文) Study of translational regulation of chloroplast mRNAs in response to environment

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

葉緑体では光合成が行われており、光エネルギーを利用して、有機物の合成や酸素発生を行う。本研究では、その反応に必要なタンパク質合成(翻訳)がどのように行われ、どのように環境に応答した調節を受けるのかを明らかにする目的で、いくつかの遺伝子について解析を行った。その結果、翻訳に重要な mRNA 上の配列や mRNA のプロセシングの重要性を明らかにした。また、翻訳共役についても解析した。さらに、翻訳を制御する可能性のあるタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：

The chloroplast is a site of photosynthesis, which produces carbohydrates and oxygen with solar energy. We have analyzed translation of several chloroplast genes and found variable important sequences among mRNA species, significance of mRNA processing and translational coupling of several genes. We also identified possible proteins for translational regulation in chloroplasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：色素体機能、光合成、翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

光合成の場として知られる葉緑体は酸素発生や有機物の生合成など、地球環境や生命体にとって不可欠な反応を行っている。細胞内共生したラン藻を進化の起源とする葉緑体は独自の遺伝情報とその発現系をもつ。かつてラン藻ゲノムに存在していた遺伝子の多くは進化の過程で核へ移行したため、葉緑体ゲノムには約120遺伝子しか存在しない。しかし、

そこには葉緑体の機能に特に重要な遺伝子が残されている。葉緑体では、光などの環境に応答した遺伝子の発現調節が転写後、特に翻訳の段階で行われていることが知られているが、その分子機構には不明な点が多い。

葉緑体の翻訳は原核型の70Sリボソームにより行われるが、葉緑体固有の特徴がある。まず、ラン藻などの原核生物では通常、転写中の mRNA 上で翻訳が行われるのに対し、葉

緑体では mRNA は転写後に安定な状態でプールされ、それが翻訳に利用される。次に、約 2/3 の葉緑体遺伝子は、原核生物の mRNA に存在するリボソーム結合部位 (SD 様の配列) を持たない。そのため多くの葉緑体 mRNA の翻訳開始は遺伝子特異的なトランス因子により促進されると考えられている。また、光などの環境に応答した翻訳の ON/OFF 制御にもトランス因子が関与している。したがって、葉緑体の翻訳制御機構を理解するためには、このようなトランス因子の同定が不可欠である。

2. 研究の目的

高等植物の葉緑体における翻訳開始機構に焦点を絞り、タバコを材料として、光合成遺伝子の mRNA 翻訳開始に必要なトランス因子の同定する。次に、光合成電子伝達反応の駆動によるトランス因子の活性調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いた mRNA 翻訳開始機構の解析。

この方法では、タバコ葉緑体から調製した *in vitro* 翻訳系を用いて、種々の遺伝子由来の mRNA の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) のどの配列が翻訳開始に必要なかを調べることができる。そのために、PCR など配列に変異を導入したコンストラクトを作成し、その変異の影響を調べた。また、レドックス試薬などの効果を簡便に調べることができるので、それについても解析を行った。

翻訳効率を測定するレポーターとして、緑色蛍光タンパク質である EGFP、青色蛍光タンパク質である Cerulean、黄色蛍光タンパク質である Citrine を利用した。

(2) ゲル・シフト法を用いた、葉緑体 mRNA の 5'-UTR へ結合するタンパク質の解析。

葉緑体 mRNA の 5'-UTR に相当する RNA を合成し、その 5' 末端を蛍光標識した。これと葉緑体に存在するタンパク質を混合し、電気泳動で分離することにより、その RNA と特異的に結合するタンパク質の有無とそのタンパク質が結合する RNA の配列を調べた。

(3) 葉緑体 mRNA の 5'-UTR に結合するタンパク質のアフィニティ精製と質量分析によるタンパク質の同定。

この方法では、目的の RNA と結合できるタンパク質のみを回収するため、RNA をリガンドとした。そして、アフィニティ精製により回収したタンパク質を MS/MS 質量分析により

同定した。

(4) クローニング、組換えタンパク質の生産。

アフィニティ・クロマトグラフィにより得られたタンパク質をコードする遺伝子のクローニングし、大腸菌での発現ベクターへ導入した。その後、目的の組み換えタンパク質を大腸菌で大量生産し、それをクロマトグラフィにより精製した。

(5) 組換えタンパク質の解析

組み換えタンパク質を大腸菌から精製した後、種々の遺伝子由来する 5'-UTR に対しての結合実験を行った。また、葉緑体 *in vitro* 翻訳系へ添加し、翻訳効率に対する効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 葉緑体 mRNA の 5'-UTR 内の翻訳に必要なシス領域の決定。

① バクテリア型の SD 様配列のある *psbD*, *psaA* mRNAs の翻訳はその SD 様配列に大きく依存していた。一方、SD 様配列のない *psbA*, *ycf4*, *clpP1* mRNAs の場合、特定の配列よりむしろ、RNA の二次構造が翻訳開始に大きく影響していることを示唆する結果を得た。後者の場合、翻訳制御タンパク質がどの領域に結合しうるかを大まかに決定した。この結果に基づいて、今後制御タンパク質を同定する必要がある。

詳細なシス配列の解析は世界中でここでしか行われておらず、葉緑体 mRNA 翻訳制御機構を理解する上で、重要な情報を提供できたと考えている。

(2) *psbD*, *psbC*, *rps2*, *psbN* 5'-UTRs のプロセシングが翻訳開始効率に与える影響を解析した。いずれの場合にも、5'-UTR のプロセシングが翻訳効率を大幅に上昇させた。特に、タバコ葉緑体 *psbN* には、開始コドンの可能性のある AUG が 2 つ存在するが、5'-UTR のプロセシングが正確な翻訳開始を促進することを明らかにした。本研究で明らかにした 5'-UTR のプロセシングの翻訳に対する効果は、以前に報告した *atpB*, *atpH*, *psbB*, *rbcL* に続く新しい情報であり、葉緑体遺伝子発現における転写後制御機構を理解するのに、重要な情報である。

(3) 葉緑体に存在する、「コード領域がオーバーラップした」*atpB-atpE*, *psbD-psbC* mRNAs における翻訳共役を解析した。これらの遺伝子群はそれぞれコード領域が重なり合っ

いる。このような場合、バクテリアなどでは、下流のコード領域の翻訳が上流のコード領域の翻訳に依存する例が数多く報告されている。実際に、トウモロコシ *atpB-atpE* では、*atpE* の翻訳は *atpB* の翻訳に依存すると報告されている（ただし、葉緑体ではなく、大腸菌とラン藻の系を用いている）。

タバコ *atpB-atpE* の翻訳を *in vitro* 翻訳系で解析したところ、下流の *atpE* 翻訳は上流の *atpB* 翻訳にほとんど依存していないことが明らかになった。一方、*psbD-psbC* の翻訳では、下流の *psbC* 翻訳は上流の *psbD* 翻訳に大きく依存していることが明らかになった。

以上の結果は、葉緑体遺伝子発現については、*ndhC-ndhK* 翻訳共役につづく新しい情報であり、葉緑体における機能複合体の分子構築とその損傷と修復の過程を理解する上での重要な情報になると考えられる。

(4) 翻訳制御に関わる可能性のあるタンパク質の同定, cDNA クローニング。

① *psbN* の翻訳に関与する可能性のあるタンパク質の同定。

psbN 5'-UTR に主に結合するタンパク質として、亜硫酸還元酵素 (SiR) を同定した。このタンパク質は DNA とアフィニティをもち、葉緑体核様体の凝集に関与していると報告されているが、本研究で明らかになった RNA への結合能については新発見であった。このタンパク質の活性はレドックス制御を受ける。そのため、このタンパク質が葉緑体 mRNA 翻訳のレドックス制御に関わるタンパク質であるかもしれない。

本研究では、この遺伝子のクローニングと組換えタンパク質の生産を行い、それを用いた解析を行った。その RNA への結合能を確認できたが、実際に葉緑体において翻訳開始に関与しているか、また、関与しているとすればどのように翻訳制御を行うかを明らかにすることはできなかった。それについては今後に残された大きな課題である。

② *rps2* 翻訳に関与する可能性のあるタンパク質の同定。

rps2 5'-UTR に主に結合するタンパク質として、S1 リボソームタンパク質を同定した。このタンパク質はバクテリアの翻訳でも翻訳開始に置いて重要な役割を果たすが、それは葉緑体でも同様の可能性が高く、以前からその可能性は以前から指摘されていた。しかし、これまでほどの遺伝子の翻訳に関与するかは特定されていなかったが、本研究により、少なくとも *rps2* の翻訳には関与することが示唆された。

前述の SiR と同様に、本研究では、遺伝子のクローニングと組換えタンパク質の生産を行い、それを用いた解析を行った。その結果、RNA への結合を確認できたが、実際に翻訳開始に関与しているか、また、関与しているとすればどのように翻訳制御を行うかは、今後の課題である。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 黒田洋詩、足達由佳、小澤真一郎、高橋裕一郎、湯川泰、杉浦昌弘、Requirements for translation initiation of *rps2* mRNA in tobacco chloroplasts、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月9日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② Hiroshi Kuroda、Yuka Adachi、Shin-ichiro Ozawa、Yuichiro Takahashi、Yasushi Yukawa、Masahiro Sugiura、Efficient translation initiation of tobacco chloroplast *rps2* mRNA requires both processing of its 5'-untranslated region and an S1 ribosomal protein、International Symposium on Biodiversity Sciences 2010、2010年8月2日、ルブラ王山 (愛知県)
- ③ 黒田洋詩、足達由佳、湯川泰、杉浦昌弘、光合成関連遺伝子の翻訳開始に必要な mRNA 上の配列、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-19日、熊本大学 (熊本県)
- ④ 黒田洋詩、杉浦昌弘、葉緑体 *c1p1* mRNA の翻訳開始機構の解析、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑤ 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、2009年3月21-24日、名古屋大学 (愛知県)
- ⑥ 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、第50回

日本植物生理学会年会、2009年3月21
-24日、名古屋大学（愛知県）

- ⑦ 杉浦昌弘・黒田洋詩、葉緑体 *rps2* mRNA
の翻訳に必要なシス配列、第31回日本
分子生物学会年會、第81回日本生化学
会大会合同大会、2008年12月10日、
神戸ポートアイランド（兵庫県）
- ⑧ 黒田洋詩、杉浦昌弘、葉緑体 mRNA
の翻訳に必要なシス配列とトランス
因子、第31回日本分子生物学会年會、
第81回日本生化学会大会合同大会、
2008年12月10日、神戸ポートアイラン
ド（兵庫県）
- ⑨ 足達由佳、黒田洋詩、杉浦昌弘、湯
川泰、葉緑体 *psbD-psbC* 翻訳開始
機構の解析、第31回日本分子生物学
年會、第81回日本生化学会大会合同
大会、2008年12月10日、神戸ポートア
イランド（兵庫県）
- ⑩ Hiroshi Kuroda, Maki Yukawa, Haruka
Suzuki, Yasushi Yukawa, Masahiro
Sugiura, An active *in vitro*
translation system from chloroplasts:
a powerful tool to study the mechanism
of translation in chloroplasts, IPR
Seminar 2008, "The Ins and Outs of
Chloroplasts", 2008年10月14~15日、
大阪大学（大阪府）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：