

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570032

研究課題名（和文） 植物における翻訳アレストにより誘導される mRNA 分解機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of mRNA degradation induced by translation arrest in plants

研究代表者

尾之内 均 (HITOSHI ONOUCHI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50322839

研究成果の概要（和文）：植物では、mRNA 上でリボソームが停滞した場合に mRNA 品質管理機構による mRNA 分解が誘導されるかどうかは不明であった。本研究では、上流 ORF にコードされるペプチドによってリボソームの停滞が引き起こされると考えられる 3 つの遺伝子を用いて解析を行い、3 つのうち 2 つの uORF でペプチド配列依存的な翻訳抑制と共役して nonsense-mediated mRNA decay NMD による mRNA 分解が起こることを示した。

研究成果の概要（英文）：In plants, it has not been known whether mRNAs with stalled ribosomes are subject to mRNA surveillance. In this study, using *Arabidopsis* upstream open reading frames, we found that ribosome stalling caused by the uORF-encoded peptides promotes mRNA degradation by the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Arabidopsis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：翻訳制御、mRNA 分解制御、上流 ORF

## 1. 研究開始当初の背景

我々のグループはこれまでに、シロイヌナズナの 2 つの代謝酵素遺伝子の転写後制御において、代謝産物に応答して翻訳の途中段階でリボソームが停止して mRNA 上で停滞し、

それに伴って mRNA 分解が誘導されることを見いだした。

その一つは、シロイヌナズナのメチオニン生合成の鍵段階を触媒する酵素をコードする *CGSI* 遺伝子である。*CGSI* mRNA が翻訳され

る際に、メチオニンの代謝産物であるS-アデノシルメチオニン(SAM)に反応して、新生ポリペプチド鎖の特定の領域が自身を翻訳したリボソームに作用して翻訳伸長を停止させる。この翻訳伸長アレストが起きた後、それに引き続いてmRNAの分解が誘導される。

もう一つは、ポリアミン生合成に関わるSAM脱炭酸酵素をコードする*SAMDC1*遺伝子である。*SAMDC1*遺伝子の5'非翻訳領域には51アミノ酸の短いペプチドをコードする上流ORF(uORF)が存在し、細胞内ポリアミン濃度が高い場合にはこのuORFにコードされる新生ペプチドの働きによって、翻訳終結段階においてリボソームが解離せずにmRNA上で停滞する。停滞したリボソームによって他のリボソームの主要なORFへの到達が妨げられ、その結果、主要なORFの翻訳が抑制されると考えられる。*SAMDC1*遺伝子においても、リボソームの停滞に伴ってmRNA分解が促進されることを見いだした。

## 2. 研究の目的

上述の2つの遺伝子において翻訳アレストと共役してmRNA分解の誘導がみられたことから、植物細胞にはリボソームがmRNA上で停滞した場合に、そのようなmRNAを分解するための機構が存在するのではないかと考えた。酵母では、リボソームが停滞したmRNAの分解にmRNA品質管理機構が関与することが知られている。その一つは nonsense-mediated mRNA decay (NMD) 機構であり、uORFにコードされる新生ペプチドによってuORFの終止コドンにおいてリボソームが停滞した場合にNMDによるmRNA分解が促進される。もう一つは no-go decay (NGD) 機構であり、翻訳伸長中のリボソームがmRNAの2次構造などによって停止した場合にNGDによるmRNA分解が誘導される。一方、植物では、リボソームが停滞したmRNAを分解するためのmRNA品質管理機構の存在は知られていない。本研究では、シロイヌナズナにおいてそのようなmRNA品質管理機構の存在を検証し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) mRNA 分解速度の測定

カルス培養した形質転換植物細胞を転写阻害剤であるアクチノマイシン D で処理し、経時的に抽出した RNA に対してノーザン解析を行った。ノーザン解析によって検出されたレポーター遺伝子の mRNA のバンドを定量し、その経時変化を調べることによって mRNA 分解速度を測定した。

### (2) 形質転換植物のレポーター遺伝子の発現解析

uORF をつないだ  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を導入した形質転換植物の GUS 活性は、4-MUG を用いた GUS アッセイにより測定した。また、GUS レポーター遺伝子の mRNA 量は定量 PCR 解析によって定量した。

### (3) 一過的発現解析

NMD 因子の変異株における uORF 遺伝子の発現解析は、葉肉プロトプラストを用いた一過的発現解析によって行った。

## 4. 研究成果

### (1) *SAMDC1* uORF ペプチドが介する mRNA 分解に NMD 経路が関与する可能性の検討

以前の解析により、*SAMDC1* uORF の下流に GUS レポーター遺伝子をつないで導入した形質転換シロイヌナズナにおいて、ポリアミンに反応して mRNA 分解が促進されることを見いだした。この mRNA 分解の促進は *SAMDC1* uORF のペプチド配列に依存するため、uORF ペプチドによる翻訳抑制と共役して mRNA 分解が誘導されたと考えられる。また、*SAMDC1* では uORF にコードされるペプチドの作用によって uORF の終止コドンにおいてリボソームが停滞することが示されているため、uORF ペプチド配列依存的な mRNA 分解に NMD 経路が関与する可能性が考えられた。その可能性を検証するために、*SAMDC1* uORF の下流につないだ GUS レポーター遺伝子を、交配により NMD 因子の欠損変異株に導入した。この植物から調整したカルスをポリアミン存在下お

よび非存在下でそれぞれ液体培養し、mRNA 分解速度を解析したところ、NMD 因子の欠損変異株では野生型株でみられたようなポリアミンに応答した mRNA 分解の強い促進は観察されなかった。このことから、SAMDC1 遺伝子の uORF のペプチド配列依存的なポリアミンに応答した mRNA 分解の促進に NMD 経路が関与することが示唆された。

この研究成果は、終止コドンにおけるリボソームの停滞が NMD 経路による mRNA 分解を促進することを、植物において初めて示したものである。

## (2) 新たに同定した uORF によるペプチド配列依存的な翻訳抑制

我々はこれまでに、ペプチド配列依存的に遺伝子発現抑制を起こす uORF をシロイヌナズナから新たに 5 つ同定した。植物における翻訳アレストと mRNA 分解の共役の普遍性について検討する目的で、まずこのうちの 2 つの uORF について、遺伝子発現抑制が翻訳段階で起きているどうかを検討した。そのために、それらの uORF について、野生型 uORF 配列と機能欠損変異型 uORF 配列の下流にそれぞれ GUS レポーター遺伝子をつなぎ、それらを導入した形質転換シロイヌナズナを作出した。これらの植物の GUS レポーター遺伝子の mRNA 量と GUS 活性をそれぞれ解析した。その結果、いずれの uORF も通常条件で栽培した場合に、変異型 uORF 配列を導入した植物と比較して野生型 uORF 配列を導入した植物において、GUS mRNA 量に対する GUS 活性の比が相対的に低い値となった。この結果から、それらの uORF のペプチド配列は、通常の栽培条件において翻訳段階で遺伝子発現抑制を引き起こすことが示された。

## (3) 新たに同定した uORF ペプチドが介す発現制御に NMD 経路が関与する可能性の検討

上述の 2 つの uORF についても、uORF ペプチドによる翻訳抑制と共役して NMD 経路による mRNA 分解が誘導されるか否かを検討した。そのために、各 uORF をつないだレポ-

ーター遺伝子を NMD 因子の欠損変異株に導入した。その結果、2 つの uORF のうちの 1 つでは、uORF ペプチド配列依存的なレポーター遺伝子の発現抑制が、NMD 因子の欠損変異によって緩和された。一方、もう 1 つの uORF では、NMD 因子の欠損変異によるレポーター遺伝子の発現への影響はみられなかった。これらの結果から、uORF の種類によって、uORF ペプチド配列依存的な翻訳抑制と共役して NMD 経路による mRNA 分解が誘導される場合とされない場合があることが示唆された。

## 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 2 件)

1. Noriyuki Onoue, Yui Yamashita, Nobuhiro Nagao, Derek B. Goto, Hitoshi Onouchi, and Satoshi Naito, "S-adenosyl-L-methionine induces compaction of nascent peptide chain inside the ribosomal exit tunnel upon translation arrest in the *Arabidopsis CGS1* gene" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, No. 17, pp.14903-14912, 2011 (DOI: 10.1074/jbc.M110.211656) 査読有
2. Katsunori Murota K, Yuka Hagiwara-Komoda, Keisuke Komoda, Hitoshi Onouchi, Masayuki Ishikawa, and Satoshi Naito, "*Arabidopsis* cell-free extract, ACE, a new in vitro translation system derived from *Arabidopsis* callus cultures" *Plant & Cell Physiology*, vol. 52, No. 8, pp.1443-1453. 2011 (DOI: 10.1093/pcp/pcr080) 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

1. 戸田智美、渡部峻、竹本まり子、蝦名績、遠洞弥生、小山博彰、瀬戸隆太、高橋広夫、高橋アンナ、内藤哲、尾之内均、「uORF にコードされるペプチドが関与する遺伝子発現制御機構」、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学 (京都市)、2012 年 3 月 17 日
2. 竹本まり子、渡部峻、蝦名績、遠洞弥生、小山博彰、瀬戸隆太、戸田智美、高橋広夫、高橋アンナ、内藤哲、尾之内均、「uORF

- がコードするペプチドにより発現が制御されるシロイヌナズナ遺伝子の探索」、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学（京都市）、2012 年 3 月 17 日
3. 竹本まり子、蝦名績、渡部峻、遠洞弥生、小山博彰、高橋広夫、内藤哲、尾之内均、「シロイヌナズナにおけるペプチド配列依存的に翻訳を制御する uORF の探索と解析」第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2011 年 12 月 15 日
  4. Hitoshi Onouchi, Isao Ebina, Mariko Takemoto, Shun Watanabe, Noriyuki Onoue, Yui Yamashita, Yayoi Endo, Hiroaki Koyama, Yoko Yamashita-Nagami, Hiro Takahashi, Satoshi Naito, “Nascent peptide-mediated control of gene expression in Arabidopsis: Feedback regulation of methionine biosynthesis and beyond”, 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Protein (招待講演), Beijing, China, 2011. 8. 4
  5. Isao Ebina, Shun Watanabe, Mariko Takemoto, Yayoi Endo, Hiroaki Koyama, Hiro Takahashi, Satoshi Naito, and Hitoshi Onouchi, “Identification of Regulatory Upstream Open Reading Frames in Arabidopsis that Control Translation of the Main Coding Sequence in an Amino Acid Sequence-Dependent Manner”, The 16th Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto International Conference Center (Kyoto), 2011. 6. 17
  6. 小山博彰、遠洞弥生、竹本まり子、渡部峻、蝦名績、高橋広夫、内藤哲、尾之内均、「植物の uORF にコードされる新生ペプチドによる翻訳制御機構の探索と解析」、第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学（仙台市）、2011 年 3 月 11 日
  7. 竹本まり子、渡部峻、小山博彰、遠洞弥生、蝦名績、高橋広夫、内藤哲、尾之内均、「uORF がコードするペプチドにより制御されるシロイヌナズナ遺伝子の探索」、第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学（仙台市）、2011 年 3 月 11 日
  8. 尾之内均、「uORF がコードするペプチドにより翻訳が制御されるシロイヌナズナ遺伝子の探索と解析」、日本植物学会第 74 回大会シンポジウム（招待講演）、中部大学（春日井）、2010 年 9 月 10 日
  9. 渡部峻、竹本まり子、蝦名績、遠洞弥生、小山博彰、高橋広夫、内藤哲、尾之内均、「シロイヌナズナにおけるペプチド配列依存的に制御を行う新規 uORF のゲノムワイドな探索」、第 12 回日本 RNA 学会年会、学術総合センター 一ツ橋記念講堂（東京）、2010 年 7 月 28 日
  10. 竹本まり子、内山尚子、蝦名績、渡部峻、内藤哲、尾之内均、「シロイヌナズナの uORF にコードされるペプチドが関与する転写後制御機構の解析」、第 12 回日本 RNA 学会年会、学術総合センター 一ツ橋記念講堂（東京）、2010 年 7 月 28 日
  11. 渡部峻、蝦名績、高野順平、内藤哲、尾之内均、「シロイヌナズナにおけるペプチド依存的な uORF 制御機構の解析」、第 51 回日本植物生理学会年会、熊本大学（熊本市）、2010 年 3 月 20-21 日
  12. 蝦名績、渡部峻、内藤哲、尾之内均、「シロイヌナズナにおける uORF にコードされるペプチドによる翻訳制御の探索」、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2009 年 12 月 11 日
- 〔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

研究室ホームページ URL:

<http://arabi4.agr.hokudai.ac.jp/arabi.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾之内 均 (HITOSHI ONOUCHI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50322839

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：