

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 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580413

研究課題名（和文） イネで機能する翻訳エンハンサーのゲノムスケールでの探索

研究課題名（英文） Search on the genome scale of a translation enhancer functioning in rice

研究代表者

加藤 晃（KATO KO）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80283935

研究成果の概要（和文）：単子葉のモデル植物であるイネで機能する翻訳エンハンサーをゲノムスケールで探索し、これまでにイネ型翻訳エンハンサーとして既に報告されている 5' UTR（通常の 5' UTR の約 10 倍の翻訳活性）と比較して 2 倍以上の翻訳活性を持つ 5' UTR を複数取得することに成功した。また、これら 5' UTR は、他の単子葉植物（ライムギ等）でも高い翻訳エンハンサー活性を持つことから、単子葉型翻訳エンハンサーとしての利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：I searched for the translation enhancer functioned in the rice which was a monocotyledonous model plant on a genome scale and succeeded in isolating plural 5' UTR which had translation enhancer activity of the double in comparison with 5' UTR which had been already reported as a rice type translation enhancer. In addition, because these 5' UTR showed translation enhancer activity in other monocotyledonous plants, the use as the monocotyledonous type translation enhancer is expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：生物・生体工学、植物、発現制御、ポリソーム、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物への外来遺伝子導入技術が確立され、有用物質生産の試みが精力的に行われているが、その成功例は限られている。近年多くの総説で取り上げられるように、これは、導入した遺伝子の発現レベルの低さが原因の一つとして考えられ、高発現プロモーターや翻訳エンハンサーを活用した新規発現ベク

ターの開発が強く望まれている。

(2) 翻訳効率は mRNA の 5' 末端にある非翻訳領域（5' UTR）に強く依存している。タバコモザイクウイルス由来の Ω 配列は、植物で広く知られた翻訳エンハンサーであるが、研究代表者は、これまでにタバコやシロイヌナズナ由来のアルコールデヒドロゲナーゼ（Nt/AtADH）遺伝子の 5' UTR が翻訳エンハンサーとして双子葉植物で機能すること、そ

して、その効果がΩ配列と同等であることを明らかにしている。また、NtADH 5' UTR は、Ω配列が機能しないキクでも翻訳エンハンサーとして機能する。しかし、ADH 翻訳エンハンサーは、Ω配列と同様に単子葉植物であるイネでは有効でなく、イネで強力に機能する翻訳エンハンサーの報告は国内外ともない。

(3) リボソームの結合数に応じて mRNA をシヨ糖密度勾配により分離するポリソームプロファイル解析から、翻訳エンハンサーを持つ *AtADH* mRNA は、ハウスキープ遺伝子 (リボソームタンパク質 S18) と比較して、より重いポリソーム画分に存在する。重いポリソーム画分に存在する mRNA は活発に翻訳されていることが予想されるが、実際、これら mRNA の 5' UTR を連結したレポーター mRNA を *in vitro* にて合成し、シロイヌナズナ培養細胞に導入したところ、両者で翻訳量に非常に大きな差が認められた。このことは、翻訳エンハンサーを持つ mRNA (効率良く翻訳されている) を全 mRNA の中からポリソームプロファイルにより、分画できることを意味している。

(4) そこで、シロイヌナズナ培養細胞での知見に基づいて、イネで機能する翻訳エンハンサーを、ポリソームプロファイル/DNA マイクロアレイ解析を用いてゲノムスケールで探索すると着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子工学的手法により有用組換え植物を作出する試みは、食糧問題や環境問題を解決する手段として重要な研究分野である。有用組換え植物作出の鍵は、どのような遺伝子を導入するかという点に加え、導入した遺伝子が機能を発揮するタンパク質として十分に発現するかという点にある。しかし、残念ながら導入した遺伝子の発現レベルは低いのが現状であった。

(2) これまでに、双子葉植物で機能する翻訳エンハンサーは複数報告され、実際に有用遺伝子を高発現させるための発現ベクターに組み込まれ、広く利用されている。一方で単子葉植物において効率よく機能する翻訳エンハンサーは未だ報告されておらず、本研究では、農業分野で重要な単子葉植物のモデルであるイネを用いて、単子葉植物で機能する翻訳エンハンサーの探索を行った。ここで探索・単離する新規単子葉型翻訳エンハンサーは、今後重要な発現ツールとして期待される。

3. 研究の方法

(1) ゲノムスケールでの探索は、ポリソームプロファイル解析と DNA マイクロアレイ解析

により行った (図 1)。細胞内の翻訳状態を解析する手法として、リボソームの結合数によって mRNA を分画できるポリソーム解析がある。超遠心後のシヨ糖密度勾配液を 8 画分に分画し、リボソームが複数結合する mRNA が存在していると予想される重い側の 3 画分をポリソーム画分、そのうち最も重い第 1 画分をラージポリソーム画分とした。それぞれの画分に含まれる RNA を精製後、赤と緑の蛍光色素でラベルし (Large polysome [Cy3], polysome [Cy5])、Agilent oligoarray を用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供し、ポリソーム画分に対するラージポリソーム画分の存在比率 (Large Polysome Ratio; LPR=Large polysome [Cy3] / polysome [Cy5]) を各種 mRNA について求めた。

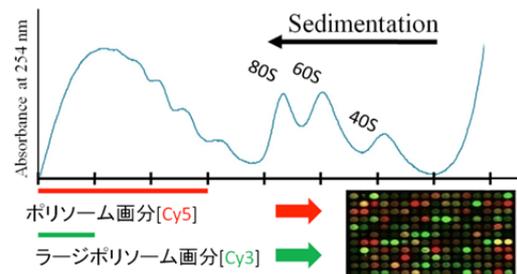


図 1. ポリソーム/マイクロアレイ解析

(2) ポリソームマイクロアレイ解析の結果を踏まえ、翻訳エンハンサーを持つ候補遺伝子を選択した。候補遺伝子の 5' UTR を単離し、共通のレポーター遺伝子に連結させた mRNA を合成し、イネプロトプラストを用いた一過性発現実験によって 5' UTR が持っている翻訳活性を評価した。

(3) また、翻訳活性の高かった 5' UTR については、別の単子葉植物であるライムギのプロトプラストを用いた一過性発現実験によっても評価した。

4. 研究成果

(1) 通常条件 (28°C) で培養したイネ培養細胞から調製した細胞抽出液を、シヨ糖密度勾配遠心 (15-60%) により分画した (8 画分)。重い側の 3 画分をポリソーム画分、最も重い第 1 画分をラージポリソーム画分とし、それぞれの画分に含まれる RNA を精製後、赤と緑の蛍光色素でラベルし (Large polysome [Cy3], polysome [Cy5])、Agilent oligoarray を用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供し、ポリソーム画分に対するラージポリソーム画分の存在比率 (Large Polysome Ratio; LPR=Large polysome [Cy3] / polysome [Cy5]) を各種 mRNA について求めた (図 2)。各 mRNA の LPR 値は幅広い値を示し、LPR 値が 0.25 付近の mRNA が最も多いという結果になった。LPR 値が 0.25 となる mRNA はポリソーム画分

に存在する mRNA の 1/4 程度がラージポリソーム画分に存在していると考えられる。中には、1 近くの LPR 値を持つ mRNA も存在した。これら mRNA はほぼすべてがラージポリソーム画分に存在しており、より多くのリボソームと結合していると考えられることから、効率良く翻訳されている mRNA と考えられた。

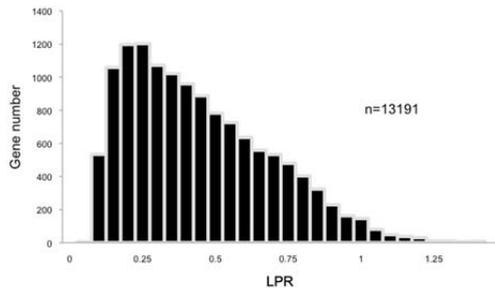


図 2. LPR 値ごとの mRNA の分布

(2) ポリソームマイクロアレイ解析の結果を踏まえ、翻訳エンハンサーを持つ候補遺伝子を 89 種類選択した。これら候補遺伝子から Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia (KOME) の配列情報に基づいて 5' UTR を単離し、共通のレポーター *Firefly Luciferase* 遺伝子 (*FLUC*) とポリ A 配列上流に連結させた mRNA を合成し、イネプロトプラストを用いた一過性発現実験によって 5' UTR が持っている翻訳活性を評価した。この一過性発現実験ではコントロールとして *in vitro* で合成した同じ *Renilla luciferase* 遺伝子 (*RLUC*) の mRNA を共導入した (図 3)。

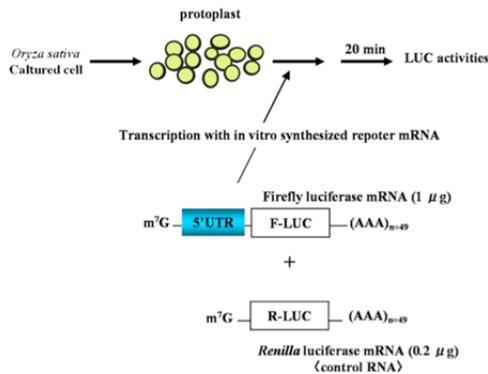


図 3. RNA 一過性発現実験の概要

(3) 回収したイネプロトプラストから粗酵素液を調製し、FLUC 活性値を測定するとともに、RLUC 活性値によってサンプル間の導入効率の差を補正し、翻訳活性の指標として FLUC/RLUC 値を算出した。既に報告されている翻訳エンハンサー *OsADH-5'* UTR の FLUC/RLUC 値を 1 とした時の相対活性値 (翻訳活性値) を図 4 に示した。試験した 89 種類の 5' UTR の中には、*OsADH-5'* UTR よりも高い翻訳エンハンサー活性を持つものが複

数あった。そこで、特に翻訳活性値が高かったものについて、再検証を行った結果、確かに高い翻訳エンハンサー活性を示した。一方で、LPR 値と翻訳活性値との関連性を調べたが相関は見られなかった ($r=0.15$)。

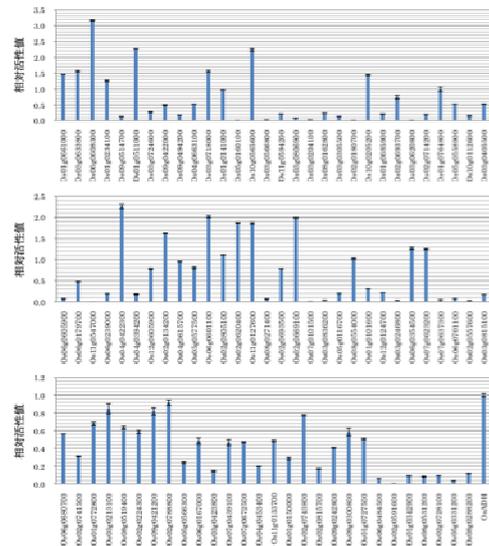


図 4. 各候補 5' UTR の翻訳活性値

(4) イネの一過性発現実験によって既存の翻訳エンハンサーである *OsADH-5'* UTR を上回る翻訳エンハンサー活性が得られた 5' UTR の中で 3 種類の 5' UTR について、イネ以外の植物においても翻訳エンハンサー活性を有するかの検証を行った。双子葉植物であるシロイヌナズナを用いた実験では、*Os06g0601100-5'* UTR および *Os07g0623200-5'* UTR が高い翻訳活性を示し、*Os08g0554000-5'* UTR については *OsADH-5'* UTR との相対的な FLUC/RLUC 活性値に極端な減少が見られ、双子葉/単子葉間での翻訳機構の差異をうかがわせる結果となった (図 5)。

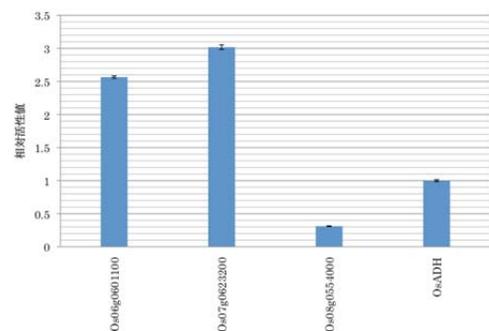


図 5. シロイヌナズナでの翻訳エンハンサー活性

(5) 一方、イネと同じく単子葉植物のライムギにおいては *OsADH-5'* UTR と同等またはそれ以上の能力を示し、その傾向はイネと同じであった (図 6)。この中で *Os06g0601100-5'* UTR がイネ同様最も翻訳活性が高く、新規の単子葉型翻訳エンハンサーとして期待され

た。

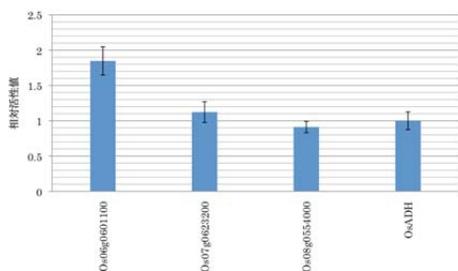


図 6. ライムギでの翻訳エンハンサー活性

(6)今回 LPR 値を指標として翻訳エンハンサーの候補 mRNA を選択したが、LPR 値と 5' UTR の翻訳活性値との間には相関が認められなかった。その理由として 1 つ目に、ラージポリソームとして第 1 画分を用いた問題点が挙げられる。LPR 値はリボソーム-mRNA 複合体の重さを基に数値化されている。今回ポリソーム解析に用いた細胞抽出液は弱い界面活性剤で可溶化し、遠心分離により細胞残さを取り除いたものを使用した。しかし、これら操作が十分でない場合、超遠心後のショ糖密度勾配液の第 1 画分に RNA を含む非常に重い複合体が混入することになる。例えば、小胞体膜に結合しているリボソームについては、この解離が不完全な場合、膜成分を含む重いリボソーム-mRNA 複合体として沈降することになる。そのため、ラージポリソーム画分の範囲の限定やリボソーム-mRNA 複合体を取得する際の条件をさらに検討する必要があると考えられる。また、今回はポリソーム画分中のラージポリソーム画分に存在する mRNA の量比として LPR 値を算出しており、非ポリソーム画分に存在する mRNA 量は考慮しなかった。細胞内に存在する mRNA 全体を対象として LPR 値を算出したほうがより実際を反映したものになったかもしれない。2 つ目に、5' UTR の情報の不確実性が原因として挙げられる。本研究では、Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia (KOME) データベース上に登録されている完全長 cDNA の情報に基づいて 5' UTR を単離した。しかし、複数の 5' UTR を持つ遺伝子の存在や、細胞内外の環境に応じて転写開始点が変わり、結果として 5' UTR が変化することが報告されており、それらの情報は正確にデータベースに反映されているとは言えない。そのため、マイクロアレイ解析を行った mRNA の 5' UTR と、一過性発現実験によって解析した 5' UTR が必ずしも一致しなかったかもしれない。このような不確実性が LPR 値と一過性発現実験による翻訳活性値が相関しなかった一因となったと考えられる。

(7)今回取得した単子葉型翻訳エンハンサーは、ライムギでも機能することから、他の単子葉植物においても有用性は十分にあると

考えられる。また、既存の単子葉型翻訳エンハンサーである *OsADH*-5' UTR は、双子葉においても翻訳効率を 50 倍程度向上させる能力を持っており、シロイヌナズナプロトプラストを用いた一過性発現実験において、翻訳活性値が *OsADH*-5' UTR を上回った *Os06g0601100*-5' UTR や *Os07g0623200*-5' UTR については、双子葉植物においても翻訳エンハンサーとしての機能が見込まれ、種間を超えて利用できる汎用性の高い翻訳エンハンサーとして期待できる。特に、イネとライムギで最も高い翻訳活性値を示した *Os06g0601100*-5' UTR は、*OsADH*-5' UTR と比較して 2.5 倍程度の翻訳活性を持ち、最も強力な単子葉型翻訳エンハンサーとしての活用が期待される。

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 4 件)

- ①Matsui, T., Matsuura, H., Sawada, K., Takita, E., Kinjo, S., Takenami, S., Ueda, K., Nishigaki, N., Yamasaki, S., Hata, K., Yamaguchi, M., Demura, T. and Kato, K.: High level expression of transgenes by use of 5' -untranslated region of the *Arabidopsis thaliana arabinogalactan-protein 21* gene in dicotyledons. *Plant Biotechnology*, in press (2012) 査読有
- ②Matsuura, H., Kiyotaka, U., Ishibashi, Y., Kubo, Y., Yamaguchi, M., Hirata, K., Demura, T. and Kato, K.: Short Period of Mannitol but not LiCl Stress Leads to Global Translational Repression in Plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (10), 2110-2112 (2010) 査読有
- ③Matsuura, H., Ishibashi, Y., Shinmyo, A., Kanaya S. and Kato, K.: Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell physiol.*, 51 (3), 448-462 (2010) 査読有
- ④Sugio, T., Matsuura, H., Matsui, T., Matsunaga, M., Noshio, T., Kanaya, S., Shinmyo, A. and Kato, K.: Effect of the Sequence Context of the AUG Initiation Codon on the Rate of Translation in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plant Cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 109 (2), 170-173 (2010) 査読有

〔学会発表〕（計4件）

- ①矢村寿啓、単子葉イネからの翻訳エンハンサーの探索、2012年度日本農芸化学会大会、2012.3.23、京都
- ②矢村寿啓、単子葉型新規翻訳エンハンサーの探索、2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会、2011.10.2、京都
- ③矢村寿啓、単子葉で機能する翻訳エンハンサーのゲノムスケールでの探索、第29回日本植物細胞分子生物学会、2011.9.7、福岡
- ④上田清貴、イネを対象とした熱ストレスによる翻訳状態の変化のゲノムワイド解析、第28回日本植物分子細胞生物学会、2010.9.3、仙台

〔図書〕（計1件）

- ①上田清貴、加藤晃；植物におけるタンパク質翻訳の効率化、バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発（山口照英監修）、シーエムシー出版、125-130（2012）4月2日

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 晃 (KATO KO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80283935