

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25年 3月31日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570050

研究課題名（和文） 葉緑体で見出された新しい翻訳様式の分子機構の解析

研究課題名（英文） Novel translation mechanism in chloroplasts

研究代表者 杉浦 昌弘

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（和文）：葉緑体の NADH 脱水素酵素の 2 種のサブユニットをコードするタバコ葉緑体の ndhC と ndhK のシストロンは、一部重複しており共転写される。ndhC/ndhK mRNA の翻訳を *in vitro* 系で解析したところ、ndhC の翻訳を止めても、ndhK がかなり翻訳されることから、ndhK シストロンの翻訳には ndhC の 5' UTR からの翻訳に加えて、新たな翻訳開始の機構があると考えられる。本研究では、上流の ndhC シストロンの中央部に存在する AUG コドンから始まる ndhK シストロンの翻訳機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) C (ndhC) and ndhK genes partially overlap and are cotranscribed. We previously reported that the tobacco ndhC/K genes are translationally coupled but produce NdhC and NdhK subunits in similar amounts. This finding suggested that the ndhK cistron is translated not only from the ndhC 5' UTR but also by an additional pathway. Using an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts, we found that free ribosomes enter at an internal AUG start codon located in the middle of the upstream ndhC cistron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：葉緑体、翻訳、mRNA、タバコ、重複遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体遺伝子の発現は分化過程や光条件によって大きく変わり、翻訳レベルでの制御が重要である。葉緑体の翻訳装置は大腸菌と似ている部分もあるが、リボソームの構成と立体構造は異なっており、70%の mRNA の 5'UTR は Shine-Dalgarno (SD) 配列を持たず、その代わりに mRNA 固有のトランス因子を持つなど、翻訳開始機構は大腸菌とは異なっている。

(2) タバコ葉緑体は 79 種のタンパク質コード遺伝子を持つが、約 85% は共転写され、プロセスされて一部はモノシストロニック mRNA となるが、残りはポリシストロニック mRNA として翻訳装置に入る。リボソームやチラコイド膜の各種複合体のサブユニットの多くは、ポリシストロニック mRNA から合成されるが、各シストロンが複合体形成に必要な十分なモル数を合成するよう、シストロンごとに制御しなければならない。しかし、

葉緑体でシストロンごとの翻訳制御に注目した研究は皆無である。

(3) 翻訳機構の解析には、*in vitro* (無細胞)系が必須なので、我々は世界に先駆けタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系を開発し、最近大幅に改良し翻訳速度を測定できる系を確立した。この系を用いて葉緑体固有の翻訳機構のいくつかを解明して来た。

(4) NADH 脱水素酵素の2種のサブユニットをコードするタバコの *ndhC* と *ndhK* は、次頁の図のように一部重複している。一般的には下流のシストロンの翻訳は上流シストロンに比べ極めて低いので、*ndhK* の翻訳が低いと想定される。

(5) *ndhC/ndhK* mRNA を *in vitro* 系で翻訳したところ、意外にも *NdhC* サブユニットと *NdhK* サブユニットが等量合成された。上流の *ndhC* の終止コドンを除くと下流の *ndhK* の翻訳は起きないこと、更に、上流の 5'UTR とそれに続く AUG 開始コドンを除いて *ndhC* の翻訳を止めても、*ndhK* がかなり翻訳されることを最近発見した。

(6) この知見から、*ndhK* シストロンは二つの機構で翻訳されるとする『1シストロン2翻訳機構』仮説を立てた。

2. 研究の目的

mRNA 上の一つのタンパク質コード領域(シストロン)の翻訳は、一つの開始機構によって進むと考えられて来た。最近、我々は葉緑体の一つのシストロンが、2種の異なる翻訳開始機構を使って、必要量のタンパク質を合成することを発見した。このような翻訳様式は今まで原核・真核生物ともに報告例が無いので、この分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

タバコ葉緑体の *ndhC* と *ndhK* のコード領域は一部重複しており、上流の *ndhC* からのみ翻訳されると下流の *ndhK* の翻訳は低くなる。しかし、*ndhK* には別の機構も働いて各々が等量翻訳される。我々のタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系は、翻訳速度を正確に定量できるので、この系を用いて、葉緑体で発見された新しい *ndhC* 5'UTR に依存しない *ndhK* の翻訳様式を解析する。

4. 研究成果

タバコ葉緑体の *ndhK* の翻訳は、*ndhK* フレームに緑色蛍光タンパク質コード領域 (GFP)

を付けて蛍光で測定し、以下の解析を進めた。

(1) *ndhC* シストロン (360nt) を体系的に欠失実験して、第2の機構の必須領域として、*ndhC* シストロンの中央部と *ndhK* シストロン直前部の各々40ヌクレオチドを同定した。*ndhC* シストロン (360nt) の中央部の更なる欠失実験から、リボソームの入口の配列をおよそ20ヌクレオチドに絞り込むことに成功した。

(2) *ndhC* の UAG 終止コドンを除くと、この *ndhK* 翻訳は起きないので、リボソームは *ndhC* フレームを認識して入ると考えられる。*ndhC* シストロン内に同じフレームの AUG が3個あるので、各 AUG の変異実験で *ndhK* 翻訳を調べたところ、第2番目の AUG を変化させると *ndhK* 翻訳が止まることを見出した。上記(1)の結果と合わせ、*ndhC* シストロンと同じフレームの AUG がリボソームの第2の入口であることが明らかとなった。

(3) 第2の入口である AUG から *ndhC* シストロンの終止コドンまでは、57コドンあり、この ORF が翻訳されるかどうかについて、蛍光リジル tRNA および蛍光開始メチオニル tRNA を使って調べたところ、約 6.5kDa の翻訳産物を検出することができた。従って、第2の入口から入ったリボソームも *ndhC* シストロンを翻訳しながら進んでいくと考えられる。

(4) *ndhK* 開始コドン直前の必須領域に存在する Shine-Dalgarno (SD) 様配列に変異を導入すると *ndhK* の翻訳が影響を受けることから、Shine-Dalgarno (SD) 様配列が翻訳終結に依存した翻訳再開のシス配列である可能性がある。

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8件)

1. Yukawa, M. and M. Sugiura (2013) An additional pathway to translate the downstream *ndhK* cistron in partially overlapping *ndhC-ndhK* mRNAs in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 5701-5706. (査読有り)
DOI:10.1073/pnas.1219914110.
2. Yukawa, Y., K. Akama, K. Noguchi, M. Komiyama and M. Sugiura (2013) The context of transcription start site regions is crucial for transcription of a plant tRNA^{Lys}(UUU) gene group both *in vitro* and *in vivo*. *Gene* 512,

- 286-293. (査読有り)
DOI:10.1016/j.gene.2012.10.022.
3. Wu, J., T. Okada, T. Fukushima, T. Tsudzuki, M. Sugiura and Y. Yukawa (2012) A novel hypoxic stress-responsive long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase III in Arabidopsis. *RNA Biology* 9, 320-313. (査読有り)
DOI:10.4161/rna.9.3.19101
 4. Adachi, Y., H. Kuroda, Y. Yukawa and M. Sugiura (2011) Translation of partially overlapping psbD-psbC mRNAs in chloroplasts: the role of 5' -processing and translational coupling. *Nucl. Acids. Res.* 40, 3152-3158. (査読有り)
DOI:10.1093/nar/gkr1185
 5. Suzuki, H., H. Kuroda, Y. Yukawa and M. Sugiura (2011) The downstream atpE cistron is efficiently translated via its own cis-element in partially overlapping atpB-atpE dicistronic mRNAs in chloroplasts. *Nucl. Acids. Res.* 39, 9405-9412. (査読有り)
DOI:10.1093/nar/gkr644
 6. Yukawa, Y., G. Dieci, M. Alzapiedi, A. Hiraga, K. Hirai, Y. Yamamoto and M. Sugiura (2011) A common sequence motif involved in selectoin of transcription start sites of Arabidopsis and budding yeast tRNA genes. *Genomics*, 97, 166-172 (査読有り)
DOI:10.1016/j.ygeno.2010.12.001
 7. Nakamura, M. and M. Sugiura (2011) Translation efficiencies of synonymous codons for arginine differ widely and are not correlated with codon usage in chloroplasts. *Gene*, 472, 50-54. (査読有り)
DOI:10.1016/j.gene.2010.09.008
 8. Zoschke, R., M. Nakamura, K. Liere, M. Sugiura, T. Borner and C. Schmitz-Linneweber (2010) An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 3245-3250 (査読有り)
DOI:10.1073/pnas.0909400107
- [学会発表] (計26件)
1. Yukawa, Y., J. Wu, T. Okada, T. Fukushima and M. Sugiura 「An Arabidopsis long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase III responds to hypoxic stress」第54回日本植物生理学会年会 (2013年3月21-23日、岡山)
 2. Yukawa, M. and M. Sugiura 「Analysis of the translational control mechanism on Arabidopsis rbcS mRNAs」第54回日本植物生理学会年会 (2013年3月21-23日、岡山)
 3. 中邨真之、杉浦昌弘 「タバコ葉緑体 rps16 mRNA の翻訳抑制因子の探索」第54回日本植物生理学会年会 (2013年3月21-23日、岡山)
 4. 湯川真希、杉浦昌弘 「タバコ葉緑体 ndhC-ndhK mRNA に見られるオルタナティブイニシエーションと終止コドンに依存した翻訳開始」第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月11-14日、福岡)
 5. 中邨真之、杉浦昌弘 「タバコ葉緑体 rps16 mRNA の翻訳抑制機構の解析」第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月11-14日、福岡)
 6. Nakamura, M. and M. Sugiura 「Translation inhibition of rps16 mRNA in tobacco chloroplasts is caused by 5' untranslated region」Godon Research Conference Mitochondria & Chloroplasts. (2012年7月29日-8月3日、スミスフィールド・アメリカ)
 7. 中邨真之、杉浦昌弘 「タバコ葉緑体 rps16 mRNA の翻訳抑制の in vitro 解析」第53回日本植物生理学会年会 (2012年3月16-18日、京都)
 8. Juan Wu、岡田敏浩、福島徹、續伯彦、杉浦昌弘、湯川泰 「Characterization of a novel long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase III in Arabidopsis」第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月13-16日、横浜)
 9. Nakamura, M. and M. Sugiura 「Analysis of the gene for chloroplast 30S ribosomal protein S16 in tobacco」第34回日本分子生物学会年会 (2011年12

- 月 13-16 日、横浜)
10. 湯川眞希、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 ndhC-K mRNA に見られる新しい終止コドン依存型翻訳」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 11. Xin He, 山本裕子、湯川眞希、杉浦昌弘、湯川 泰「植物培養細胞からの細胞質 in vitro 翻訳解析法の開発」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 12. 黒田恵、黒田洋詩、湯川泰、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 in vitro 翻訳系を用いた rbcL 翻訳開始機構の解析」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 13. 足達由佳、黒田洋詩、湯川泰、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 psbD-psbC 発現における翻訳開始機構の解析」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 14. 宮崎綾香、岩田真也、杉浦昌弘、湯川泰「顕花植物光合成遺伝子の光依存転写制御の in vitro 解析」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 15. 山本恵子、杉浦昌弘、湯川泰「In vitro 転写系による GST およびノンコーディング RNA 遺伝子転写の相互作用」第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13-16 日、横浜)
 16. Nakamura, M. and M. Sugiura 「rps16 gene in tobacco chloroplasts is well transcribed and its transcripts is correctly spliced, but mRNA is not translated」 The EMBO Meeting 2011 (2011 年 9 月 10-13 日、ウィーン・オーストリア)
 17. Kuroda, H., Y. Adachi, S. Ozawa, Y. Takahashi, Y. Yukawa, and M. Sugiura 「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 回日本生化学会合同大会 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
 18. 町田瑠璃子、柴田恵利、大谷美沙都、杉山宗隆、杉浦昌弘、湯川泰「シロイヌナズナにおける USE 結合タンパク質複合体の単離解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
 19. Wu J., T. Okata M. Sugiura and Y. Yukawa 「Functional analysis of novel small RNA in Arabidopsis thaliana」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
 20. 宮崎綾香、岩田真也、杉浦昌弘、湯川泰「シロイヌナズナ光合成遺伝子の光依存転写制御の解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
 21. 中邨真之、杉浦昌弘「Translation efficiency of rps16 mRNA in tobacco chloroplasts」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
 22. 中邨真之、杉浦昌弘「葉緑体 mRNA の同義コドンと翻訳活性」日本植物学会第 74 回大会 (2010 年 9 月 9-11 日、春日井)
 23. Nakamura, M. and M. Sugiura 「Translation activity of rps16 mRNA in tobacco chloroplasts」 11th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (2010 年 8 月 29 日-9 月 2 日、トロムソ・ノルウェー)
 24. Nakamura, M. and M. Sugiura 「Chloroplast- and Nuclear-encoded rps16 genes in tobacco」 Gordon Research Conference "Mitochondria & Chloroplasts" (2010 年 7 月 11-16 日、ルッカ・イタリア)
 25. Nakamura, M. and M. Sugiura 「Comparative analysis of the translation efficiencies between rps2 and rps16 mRNAs in tobacco chloroplasts」 FESPB 2010 (2010 年 7 月 4-9 日、バレンシア・スペイン)
 26. Sugiura, M. and M. Yukawa 「Termination-dependent translation of chloroplast ndhK mRNA」 FESPB 2010 (2010 年 7 月 4-9 日、バレンシア・スペイン)

[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

<http://www.gene.nagya-u.ac.jp/~sugiura-g/>

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

湯川 眞希 (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

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