

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570213

研究課題名(和文)植物葉緑体の新しい翻訳開始機構

研究課題名(英文)A new translational start mechanism in chloroplasts

研究代表者

湯川 眞希 (Yukawa, Maki)

名古屋市立大学・システム自然科学研究科・研究員

研究者番号：00448705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：一般的に、一つのタンパク質コード領域(シストロン)の翻訳は一つの翻訳開始機構によって進み下流側シストロンの翻訳は上流に比べ極めて低い。タバコ葉緑体のndhC/ndhK mRNAでは両シストロンの翻訳が同等であることから、『1シストロン2翻訳開始機構』という新仮説を立てた。

本研究では、通常の翻訳共役機構とは別の第二の分子機構について、(1)上流シストロン中央部に存在するndhCと同様の上流から2番目のAUGがリボソームの入り口であり、(2)このリボソームは翻訳しながら進み下流シストロンの翻訳再開に利用され、(3)翻訳再開に葉緑体固有のトランス因子は必要ではないこと、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Generally, translation of one protein-coding region (cistron) starts by only one mechanism, and translation of the downstream cistron in overlapping mRNA is extremely low in comparison with upstream cistron's activity. In partially overlapping ndhC/ndhK mRNA of the tobacco chloroplast, translation of both cistrons is almost equal, so we formed a new hypothesis 'Two translational start mechanisms in one cistron'.

In this study, we revealed that (1) some ribosomes enter at an internal in-frame AUG codon that is located in the middle of upper ndhC cistron, (2) ribosomes translate the 3'half of the ndhC cistron and some ribosomes resume downstream ndhK translation, (3) chloroplast specific trans-acting factor is not necessary in the additional molecular mechanism to translate the downstream cistron which was different from the normal translational coupling mechanism.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：葉緑体 翻訳開始 重複遺伝子 in vitro系

1. 研究開始当初の背景

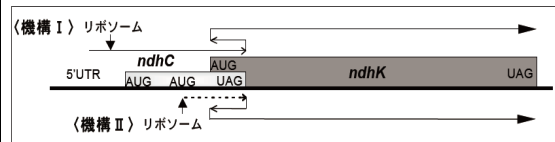
植物の光合成器官である葉緑体は小型ゲノムを持つ。葉緑体遺伝子の発現は、主として翻訳レベルで制御されている。葉緑体の翻訳系は大腸菌と似ているが、80%の mRNA は Shine-Dalgarno (SD) 配列を持たず、その代わりに mRNA 固有のトランス因子を持つなど、翻訳開始機構は大腸菌とは異なっている。

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、多くは共転写され、RNA 編集、スプライシングや切断を受けて一部はモノシストロニックの、残りはポリシストロニックの成熟 mRNA として翻訳系に入る。従って、転写と翻訳はカップルしていない。

葉緑体の翻訳機構の分子レベルでの研究は技術的困難さのため皆無であった。翻訳機構の解析には、*in vitro* (無細胞)系が必須なので、我々のグループは世界に先駆けタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系を開発し、最近申請者らが大幅に改良し当初の数百倍の活性を持つ系を確立した。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。

葉緑体の光化学反応を担う NADH 脱水素酵素複合体は15種以上のサブユニットから成り、11種は葉緑体ゲノムにコードされている (*ndhA*~*K*)。そのうちの2種のサブユニットをコードするタバコの *ndhC* と *ndhK* は、右上図のように一部重複している。この場合、下流のシストロンの翻訳には上流のシストロンの翻訳が必要であり、一般的に下流のシストロンの翻訳は上流シストロンに比べ低いので(translational coupling)、*ndhK* の翻訳が低いと想定される。

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(同複合体内の両者のモル比は1 : 1)。さらに、上流の *ndhC* 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発見した(2008年に PNAS に発表)。これらの知見から、*ndhK* シストロンは二つの機構で翻訳開始されるとする『1シストロン2翻訳開始機構』仮説を立てた。



上にこの仮説を示す。<機構 I>は、リボソームが 5' UTR に入り *ndhC* を翻訳して UAG 終止コドンに着くと、一部のリボソームは戻って *ndhK* を翻訳する。<機構 II>は、リボソームが *ndhC* コード領域内のどこかに入り、移動して UAG 終止コドンに着き、一部が戻って *ndhK* を翻訳する(新しい機構)。

2. 研究の目的

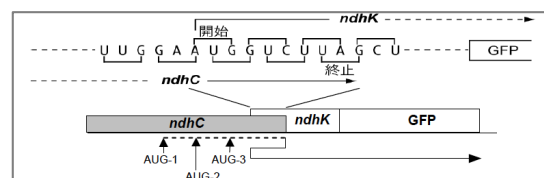
この『1シストロン2翻訳開始機構』仮説に基づき、上流シストロンである *ndhC* の 5' UTR を必要としない翻訳開始機構である機構の分子機構について、(1)リボソームは何処に入るか、(2)リボソームは内部配列を翻訳しながら進むのか、(3)固有のトランス因子が必要か、の3点を申請者の葉緑体 *in vitro* 翻訳系および大腸菌再構成 *in vitro* 翻訳系を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

申請者が確立したタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系と大腸菌再構成 *in vitro* 翻訳系を組み合わせて実験を進める。機構の分子機構に焦点を合わせるため、5' UTR を除いて *ndhC* の翻訳を止めた mRNA とその各種変異体を鋳型として用いる。

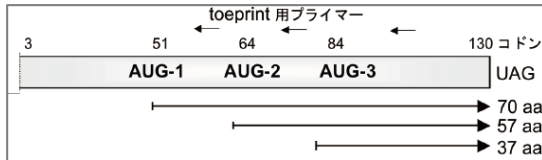
(1) リボソームは何処に入るか(何処を識別するか)

ndhK の翻訳のみ検出するため、*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する(下に示す)。(前方の *ndhC* の翻訳はフレームが異なり検出されない)



ndhC シストロン(360nt)の予備的な欠失実験から、<機構 I>には中央部の~40nt と *ndhK* 開始コドン直前の~40nt が必要なことを明

らかにした。さらに、*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*フレームを識別していると考えられる。*ndhC*シストロン内に同じフレームのAUGが3個あり(下図)、リボソームの入口らしい。



*ndhC*の翻訳を止めるため5'UTRとそれに続くAUGを除いたmRNAを用いて、3個の内部AUG-1, -2, -3をそれぞれ体系的に変異させ、葉緑体*in vitro*系で*ndhK*の翻訳の有無を調べる。

必要に応じて、蛍光標識 fmet-tRNA を用い、蛍光による検出も試みる。

(2) リボソームは内部配列を翻訳しながら進むか

リボソームが内部AUGのどれかと結合していれば、RIあるいは蛍光標識アミノ酸を用いて翻訳産物の検出を試みる(上図の下部)。翻訳産物は高濃度PEGEで分離する。

上記で明瞭な結果が得られない場合は、リボソーム(又は30S)はスキャンして*ndhC*のUAG終止コドンに進む可能性がある。タバコ葉緑体の既知のSDを含むAUGを*ndhC*シストロンの非必須領域に挿入してスキャンの可能性を調べる。

(3) 固有のトランス因子が必要か

葉緑体 mRNA はスプライシングや RNA 編集を受けたり SD 配列が無いこともあるが、キャップやポリ(A)は無く、5'UTRを大腸菌のものに置き換えれば大腸菌*in vitro*系で翻訳される。

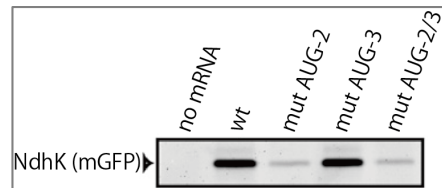
大腸菌粗抽出液(S30画分)を用いて、葉緑体*ndhC/ndhK* mRNAが翻訳されるか調べる。必要に応じ大腸菌由来の5'UTRに置換する。

*ndhK*の翻訳が見られない場合は、リボソームを精製タバコ葉緑体リボソームと置換する。さらに、葉緑体S100画分を加えて*ndhK*が翻訳されればトランス因子が必要と考えられる。

4. 研究成果

タバコ葉緑体*ndhK*シストロンの翻訳開始機構において、

(1)下図に示すように、*ndhC*シストロン中央部に存在する*ndhC*と同じフレームのAUG-2(上流から2番目のAUG)を変異させると*ndhK*の翻訳が見られなくなることから、AUG-2がリボソームの入り口となっていること。



(2)蛍光標識アミノ酸を用いた解析で、57 a.a.にあたる約6.5 kDaの翻訳産物を検出したことから、AUG-2からのリボソームは翻訳をしながら進み下流シストロンの翻訳再開に利用されること。

(3)大腸菌粗抽出液(S30画分)を用いて*ndhK*の翻訳が検出されたことから、この翻訳機構には葉緑体固有のトランス因子は特に必要ではないこと。

以上3点を明らかにした。

本研究において、従来の手法では見過ごされていた新しい翻訳開始点を見つけ出した。このように、誰もが見出せていない翻訳機構はまだ存在していると考えられる。我々独自の*In vitro*翻訳系を用いた詳細な解析により、真の葉緑体翻訳機構に一步近づくことができた。

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 1 件)

1. Maki Yukawa and Masahiro Sugiura. (2013) Additional pathway to translate the downstream *ndhK* cistron in partially overlapping *ndhC-ndhK* mRNAs in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 110 (14), 5701-5706 査読あり(doi: 10.1073/pnas.1219914110)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 湯川 眞希、長谷川桂子、杉浦 昌弘：タバコ葉緑体 *in vitro* スプライシング系の改良、第55回日本植物生理学会年会、富山、2014年3月18-19日
2. Yukawa, M. and Sugiura, M. : Translation of Overlapping Genes in Chloroplasts - Novel Pathway to Translate the Downstream Cistron. Plant and Animal Genome XXII, San Diego, CA, USA, January 11-15, 2014 (poster, P1163)
3. Yukawa, M. and Sugiura, M. : Translation of Overlapping Genes in Chloroplasts - Novel Pathway to Translate the Downstream Cistron. Plant and Animal Genome XXII, San Diego, CA, USA, January 11-15, 2014 (Sugiura, invited speaker)
4. Yukawa, M. and Sugiura, M. : Analysis of the translational control mechanism on *Arabidopsis rbcS* mRNAs, 第54回日本植物生理学会年会、岡山、2013年3月23日
5. 夏目大輔、Xin He、湯川 眞希、湯川 泰：タバコ細胞質由来の *in vitro* 翻訳解析法の改良、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月14日
6. 湯川 眞希、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、福岡、2012年12月13日
7. 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、横浜、2011年12月15日

8. 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、横浜、2011年12月15日

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~yyuk/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

湯川 眞希 (Maki Yukawa)
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

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

杉浦 昌弘 (Masahiro Sugiura)
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