

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570276

研究課題名(和文) 葉緑体遺伝子の偽遺伝子化プロセスにおける翻訳不活性化の検証

研究課題名(英文) The translation inactivation in the pseudogenization process of chloroplast genes

研究代表者

中邨 真之 (NAKAMURA, Masayuki)

名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員

研究者番号：60322145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：植物は葉緑体遺伝子を減少させる方向で進化してきたが、葉緑体ゲノムに存在する遺伝子が偽遺伝子化・消失していくプロセスについては不明のままである。葉緑体リボソームのS16タンパク質をコードするrps16遺伝子は、多くの高等植物では核と葉緑体の両ゲノムに存在しているため、葉緑体rps16遺伝子が偽遺伝子化している可能性が高い。本研究では、タバコ葉緑体rps16遺伝子が転写、スプライシングされているにもかかわらず翻訳が不活性化されていることを明らかにし、さらに翻訳不活性化に関与するシス配列を同定した。これらの結果より、葉緑体遺伝子の偽遺伝子化プロセスには、翻訳不活性化が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plants have evolved in the direction of decreasing chloroplast genes. It remains unclear the pseudogenization process of chloroplast genes. In many higher plants, the gene for chloroplast ribosomal protein S16, rps16, is encoded not only by the nuclear genome but also by the chloroplast genome. Thus, it is possible that the pseudogenization of chloroplast rps16 gene is in progress. In this study, we found that the rps16 gene in tobacco chloroplasts is well transcribed and its transcript is correctly spliced, but mRNA is not translated. Furthermore, we determined the cis-regulatory element for translation inactivation of rps16 mRNA in tobacco chloroplasts. From these results, the translation inactivation may be one of the triggers to become the pseudogenes in the chloroplast genome.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：葉緑体 翻訳 共生 リボソームタンパク質 in vitro翻訳系

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体はランソウ様の光合成原核生物が宿主細胞に共生して生じた。ランソウには約 3000 の遺伝子が存在するが、高等植物の葉緑体には 130 個程度の遺伝子しか存在しない。これは、植物が葉緑体遺伝子を減少させる方向で進化してきたためである。

(2) これまでに、核ゲノム中に葉緑体ゲノムの断片が多数発見された例や、葉緑体遺伝子の核ゲノム移行を実験的に行った例があり、現在でも葉緑体遺伝子がかなりの頻度で核ゲノムに移行していることは明白である。しかし、現存の植物では核ゲノムと葉緑体ゲノムの双方に存在する相同遺伝子が同時に機能する例は知られていない。葉緑体に遺伝子が残った原因については、いくつかの説が唱えられているが、葉緑体から遺伝子が消失した原因を説明するものはない。

(3) 葉緑体の翻訳装置は原核生物の大腸菌と似ているが、大腸菌にはない葉緑体固有のリボソームタンパク質が数種存在し、大腸菌 mRNA では Shine-Dalgarno (SD) 配列が翻訳開始に必須であるが、葉緑体 mRNA で、SD 配列を持っているのは、30%以下である。このように葉緑体の翻訳機構は進化の過程に伴って原核生物から大きく変化してきたと考えられる。

(4) 葉緑体 30S リボソームサブユニットの S16 タンパク質をコードする *rps16* 遺伝子は、多くの高等植物では核ゲノムと葉緑体ゲノムの双方に存在し、シロイヌナズナ、イネ、トマトでは、核ゲノム由来の S16 タンパク質が葉緑体に輸送されている。さらに、ポプラの葉緑体ゲノムから *rps16* 遺伝子は消失している。これらのことより、高等植物では、核ゲノム由来の S16 タンパク質が葉緑体内で機能し、葉緑体ゲノムに存在する *rps16* 遺伝子が偽遺伝子化へのプロセスを歩み始めていることは容易に想像できる。

(5) 葉緑体ゲノムに存在する *rps16* 遺伝子は転写・スプライシングされているが、そのタンパク質コード領域内には翻訳活性の低いコドンが数多く存在し、また、5'非翻訳領域(5'UTR)にも開始コドンとなりうる AUG 配列が多数存在するなど、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳活性が著しく低下している可能性が非常に高い。

(6) これらのことから、葉緑体ゲノムの進化過程では、葉緑体遺伝子の偽遺伝子化プロセスの一つとして翻訳活性が著しく低下するのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

葉緑体ゲノム進化の中間段階では、葉緑体ゲノムと核ゲノムの両方に存在する相同遺伝子が同時に機能する。その後、葉緑体ゲノムに存在する遺伝子が偽遺伝子化し、消失していくが、この偽遺伝子化プロセスについては不明のままである。本研究では、偽遺伝子化プロセスの一つとして葉緑体 mRNA の翻訳活性が著しく低下していることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

葉緑体 mRNA の翻訳機構の解析が最も進んでいるタバコをモデルとして用いる。タバコには、核ゲノムに少なくとも 4 種の *rps16* 遺伝子が、葉緑体ゲノムに 1 つの *rps16* 遺伝子が存在する。

(1) タバコ葉緑体よりリボソームタンパク質を抽出し、S16 タンパク質抗体を用いて、核ゲノム由来の S16 タンパク質だけが含まれていることを確認する。

(2) 葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いて、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳活性を測定し、翻訳活性が著しく低下していることを確認する。

(3) この翻訳不活性化にかかわるシス配列の同定を目指す。

## 4. 研究成果

(1) 葉緑体リボソームタンパク質の解析  
タバコ葉緑体よりリボソームタンパク質を抽出し、核由来の S16 タンパク質に対するペプチド抗体を用いてウェスタン解析を行ったところ、葉緑体リボソームには核由来の S16 タンパク質が含まれていることが確認できた。

### (2) 葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳活性測定

葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳活性測定  
葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いて、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳活性を測定したが、検出することは不可能であった。従って、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳が不活性化されていることが明らかとなった。

### 葉緑体 *rps16* mRNA のタンパク質コード領域の翻訳活性測定

タバコ葉緑体 *rps16* mRNA のタンパク質コード領域には翻訳活性の低いコドンが数多く含まれているので、上記で得られた結果が、タンパク質コード領域に依存したものであるかどうかを解析した。

葉緑体 *rps16* mRNA のタンパク質コード領域に、葉緑体 *rps16* 5'UTR、葉緑体 *rps2* 5'UTR、T7 ファージ gene10 5'UTR を結合させたキメラ mRNA を作成し、葉緑体 *in vitro* 翻訳

系を用いて、各 mRNA の翻訳活性を測定した。葉緑体 *rps2* 5'UTR と T7 フェージ *gene10* 5'UTR は葉緑体 *in vitro* 翻訳系で高い翻訳活性を持つことが知られており、これらの 5'UTR を用いた場合には、葉緑体 *rps16* mRNA のタンパク質コード領域が翻訳されることが明らかとなった。

#### 葉緑体 *rps16* 5'UTR の翻訳活性測定

上記の結果より、タバコ葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳不活性には 5'UTR が関与していると考えられる。そこで、葉緑体 *rps16* mRNA の 5'UTR に緑色蛍光タンパク質 (GFP) のタンパク質コード領域を結合させたキメラ mRNA を作製し、葉緑体 *rps16* 5'UTR の翻訳活性を測定した。その結果、葉緑体 *rps16* 5'UTR の翻訳活性は T7 *gene10* 5'UTR の約 1/1000 以下であり、翻訳活性を持たないことが明らかとなった。

#### (3) 葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳不活性機構の解析

##### 翻訳不活性化シス配列の解析

上記の結果により、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳不活性化には 5'UTR が重要であることが明らかとなった。そこで、葉緑体 *rps16* 5'UTR の翻訳不活性化にかかわるシス配列の同定を行った。まず、葉緑体 *rps16* 5'UTR の二次構造予測を行ったところ、葉緑体 *rps16* 5'UTR には、5'末端 (翻訳開始点上流 -106~-69) および開始コドンを含む領域 (-27~+4) の 2ヶ所に大きなステムループ構造を持つことが予測された。また、-58~-47 と -46~-30 の 2ヶ所に小さなステムループ構造を持つことが予測された。

これらの二次構造に着目し、葉緑体 *rps16* 5'UTR の 4ヶ所の領域 (-106~-69, -59~-12, -59~-30, -59~-47) を欠失させた変異型 5'UTR を作製し、葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いて翻訳活性を測定した。その結果、-106~-69 を欠失させた 5'UTR は翻訳活性を持たなかったが、残りの 3つの領域を欠失させた 5'UTR では翻訳活性を有していた。これらの結果から、葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳不活性化にかかわるシス配列が -59~-47 の 13塩基の領域であることが明らかとなった。

#### 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)

Enami, K., Ozawa, T., Motohashi, N., Nakamura, M., Tanaka, K. and Hanaoka, M. (2011): Plastid-to-nucleus retrograde signals are essential for expression of nuclear starch biosynthesis genes during amyloplast

differentiation in tobacco BY-2 cultured cells. *Plant Physiol.* 157(1), 518-530. (査読有)  
DOI:10.1104/pp.111.178897

##### [学会発表](計16件)

中邨真之、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳抑制にかかわるシス配列の同定」第 55 回日本植物生理学会年会 (2014 年 3 月 18~20 日、富山)

中邨真之、杉浦昌弘「葉緑体リボソーム S16 タンパク質をコードする *rps16* mRNA の翻訳抑制にかかわるシス配列の同定」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3~6 日、神戸)

中邨真之、杉浦昌弘「葉緑体リボソーム S16 タンパク質をコードする *rps16* 遺伝子の翻訳抑制」日本植物学会第 77 回大会 (2013 年 9 月 13~15 日、札幌)

Nakamura, M. "Chloroplast-encoded *rps16* mRNA is translationally repressed in tobacco." 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (2013 Aug. 18-22, Halifax)

Nakamura, M. and Sugiura, M. "The expression of the gene for chloroplast ribosomal protein S16 is translationally repressed in tobacco." FEBS Congress 2013 (2013 Jul. 6-11, St. Petersburg)

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 21~24 日、岡山)

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)

Nakamura, M. and Sugiura, M. "Translation inhibition of *rps16* mRNA in tobacco chloroplasts is caused by the 5' untranslated region." Gordon Research Conferences; Mitochondria and Chloroplasts (2012 Jul. 29 - Aug. 3, Smithfield)

佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「遺伝子重複領域内の ATG 開始コドンが転写状態に与える影響について」第 53 回

日本植物生理学会年会 (2012年3月16日～18日、京都)

松尾充啓、佐藤壮一郎、工藤久幸、安井孝彰、中邨真之、木村宏、山本義治、小保方潤一「高等植物において遺伝子コード領域の存在は転写型ジーンサイレンシングを抑制する」第53回日本植物生理学会年会(2012年3月16日～18日、京都)

中邨真之、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 rps16 mRNA の翻訳抑制の invitro 解析」第53回日本植物生理学会年会(2012年3月16日～18日、京都)

佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「遺伝子重複領域内の ATG 開始コドンの保存性が転写状態の持続性に及ぼす影響について」第34回日本分子生物学会年会(2011年12月13～16日、横浜)

中邨真之、杉浦昌弘「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)

松尾充啓、佐藤壮一郎、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「植物の核ゲノムには ATG 開始コドンを介したプロモーター機能領域の出現メカニズムがある」日本遺伝学会 83 回大会(2011年9月20～22日、京都)

佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「植物ゲノム上でのプロモーター機能領域の出現に対する ATG 開始コドンの役割」日本植物学会第75回大会(2011年9月17～19日、東京)

Nakamura, M. and Sugiura, M. “ rps16 gene in tobacco chloroplasts is well transcribed and its transcript is correctly spliced, but mRNA is not translated” The EMBO Meeting 2011 (2011 Sep. 10-13, Vienna)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中邨 真之 (NAKAMURA, Masayuki)  
名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員  
研究者番号：60322145