

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850247

研究課題名(和文)植物の低温ストレス応答における翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文)Translational regulatory mechanism in during cold stress response in plants

研究代表者

中南 健太郎(Nakaminami, Kentaro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40513403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：越冬性の植物は、秋の温度低下とともに「低温馴化」と呼ばれる過程を経て耐凍性を獲得して越冬の準備をし、越冬後は気温の上昇を感知して「脱馴化」と呼ばれる過程を経て耐凍性を解除し生長を再開させる。本研究では、低温馴化と脱馴化の分子メカニズムを解明するため、モデル植物であり越冬性のシロイヌナズナを使用して遺伝子とタンパク質それぞれの網羅的な発現解析を行った。その結果、越冬の準備期間である低温馴化時に遺伝子を発現し、気温の上昇を感知するまで保存して、越冬後にタンパク質発現を行うという特別な転写後制御が機能しており、植物が低温ストレス時に通常とは異なる発現メカニズムにより応答していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Overwintering plants exhibits high levels of cold tolerance, which is acquired through the process of cold acclimation (CA). This acquired cold tolerance is rapidly reduced during cold de-acclimation (DA) and plants resume growth after sensing warm temperatures. In order to better understand plant growth and development, it is important to decipher the functional mechanisms of the CA and DA process.

In this study, it is demonstrated that many cold-inducible genes were transcribed and translated, however a similar number of cold-inducible genes were not translated during the CA and were translated at a later stage, DA. Due to the disjunction between the up-regulation of specific genes and the lack of corresponding protein accumulation during CA, it is likely that the translation of proteins during DA was primed with stored mRNA. This data imply that these are likely regulated by translational regulation, which alters protein expression patterns in response to environmental alterations.

研究分野：農学

キーワード：シロイヌナズナ 低温馴化・脱馴化 RNA制御 翻訳制御

### 1. 研究開始当初の背景

移動手段を持たない植物は日々様々なストレスに曝されている。乾燥、高塩、高温、低温ストレスは植物の生育や生産に大きな影響を与える要因であり、環境ストレスと呼ばれる。世界的な食糧問題の解決には、植物の環境ストレス応答機構の理解が必須であり、その応答機構の解明は、作物の生育範囲の広がりや生育時期の改善につながる重要な研究である。

越冬性植物は凍らない程度の低温に曝されることにより耐凍性を獲得し越冬可能となり、この過程は低温馴化と呼ばれる。一方、越冬後は春の温度上昇を感知し、脱馴化と呼ばれる過程を経て成長を再開させる(図1)。

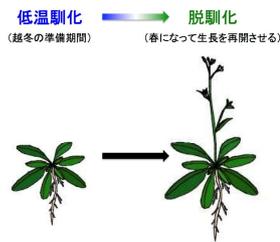


図1 越冬性植物の成長と低温馴化・脱馴化

この低温馴化、脱馴化過程の研究は、植物の低温耐性機構を解明する上で非常に重要である。近年の研究では網羅的な遺伝子発現解析により低温馴化過程における低温誘導性遺伝子の発現制御メカニズムが明らかになってきている<sup>1)</sup>。さらに、植物のストレス応答機構には、遺伝子発現制御だけでなく、スプライシング制御、small RNAによる制御、mRNAの分解や安定化に關与する制御など様々なRNA制御機構が機能しており、新たなメカニズムとして注目されている<sup>2)</sup>。

本研究は、mRNAの転写後・翻訳制御に着目し、その機構を解明することにより、植物のストレス応答制御の新たなメカニズムを明らかにすることを目的としている。

#### <引用文献>

- 1) Matsui A, et al., (2008) *Plant Cell Physiol* 49: 1135-49
- 2) **Nakaminami K**, et al., (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 149-53

### 2. 研究の目的

mRNA発現とタンパク質発現が一致しないという現象は、ストレス応答時だけでなく様々な状況で非常によく見られる現象であり、非常に重要な機構であると考えられる。それにも関わらず、詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。トランスクリプトーム解析は網羅的な解析として有用な方法であり、ゲノム解析の進んだ現在では非常に多くの情報が得られ、様々な研究で実施されている。一方プロテオーム解析やメタボローム解析は、解析が難しく情報が有効に活用できないのが現状であるが、最近の研究ではこれらオーム解析の比較が行われ、多角的に統合解析することで新たな知見が得られてきている。本研究は、トランスクリプトームとプ

ロテオームの統合解析を基に、植物の環境ストレス応答時の転写後・翻訳制御メカニズムを明らかにするものである。また、転写後・翻訳制御に關与するタンパク質の機能を解析することで、植物の環境ストレス応答のメカニズム解明を目指す。この研究は、植物のストレス応答にとどまらず生物共通の転写後・翻訳制御機構の解明に貢献する研究である。

### 3. 研究の方法

本研究では、植物のストレス処理を施したサンプルを用いて mRNAの安定化に關与する翻訳制御タンパク質の機能を明らかにするために、以下の研究を行った。

#### (1) 低温ストレス時に特別な転写後・翻訳制御を受ける遺伝子・タンパク質の解析

材料には、越冬性植物のシロイヌナズナを用い、無処理(22℃で2週間生育)、低温馴化处理(22℃で生育後2℃で7日間低温処理)、及び脱馴化处理(低温馴化处理した植物を22℃で1日間生育)した3種類の植物における遺伝子とタンパク質の網羅的解析と、その遺伝子・タンパク質の発現パターンを比較解析することで、どのような制御により遺伝子・タンパク質が発現しているか調べた(図2)。網羅的遺伝子解析にはマイクロアレイ解析を、網羅的タンパク質解析にはショットガンプロテオミクス法をそれぞれ用いた。遺伝子とタンパク質の低温ストレス時の発現パターンの相関解析から、遺伝子発現とタンパク質発現の一致するものと一致しないものに大別することで、ストレス時に一時保存されるRNAの同定を行い、転写後・翻訳制御を受ける遺伝子・タンパク質を同定することを目指した。



図2 遺伝子とタンパク質の網羅的解析と比較  
網羅的遺伝子発現解析にはマイクロアレイ解析を、網羅的タンパク質発現解析にはショットガンプロテオミクスをそれぞれ用い、両者を比較解析した。

網羅的タンパク質の機能解析  
さらに、RNAの一時保存に關与するタンパク質の機能解析を行うことで、ストレス時における転写後・翻訳制御メカニズムの解明を試みた。ストレス時における細胞内局在解析、標的遺伝子解析、及び、標的遺伝子の発現パターンとストレス応答時の mRNA 一時保存・安定化について解析を行った。

#### (2) 転写後・翻訳制御タンパク質の機能解析

さらに、RNAの一時保存に關与するタンパク質の機能解析を行うことで、ストレス時における転写後・翻訳制御メカニズムの解明を試みた。ストレス時における細胞内局在解析、標的遺伝子解析、及び、標的遺伝子の発現パターンとストレス応答時の mRNA 一時保存・安定化について解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 低温ストレス時に特別な転写後・翻訳制御を受ける遺伝子・タンパク質の解析

無処理、低温馴化处理、及び脱馴化处理した3種類のシロイヌナズナの耐凍性(凍結に対する耐性)を調べたところ、本実験条件においては、無処理植物は-10℃で大きなダメ

ージを受け生存できないが、低温馴化処理植物は-16 という低温でも生存可能であった。

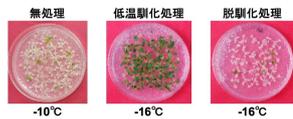


図3 低温馴化・脱馴化における耐凍性無処理、低温馴化処理、脱馴化処理植物の、それぞれの凍結に対する耐性(-10°C、-16°C)を調べた。写真はそれぞれの温度で凍結し、その後22°Cで2週間生育させ結果を示している。

これに対し脱馴化処理植物では、低温馴化で獲得した耐凍性をわずか1日間で失った(図3)。

そこで、これらの3種類の無処理、低温馴化処理、脱馴化処理植物を用いて、網羅的な遺伝子の発現解析とタンパク質の発現解析を行い、その両者を比較して、どのようなタイミングで遺伝子およびタンパク質が発現するかを解析した。その結果、(a)低温馴化時に耐凍性を獲得するために発現する遺伝子群(199 遺伝子)、(b)低温馴化時に遺伝子が発現させて脱馴化時の準備をし、脱馴化時にタンパク質発現を上昇させる、生長再開の初期に必要な遺伝子群(226 遺伝子)、(c)脱馴化時に発現が上昇する遺伝子群(286 遺伝子)、の大きく3種類のタイプの遺伝子群が存在することが明らかとなった(図4)。

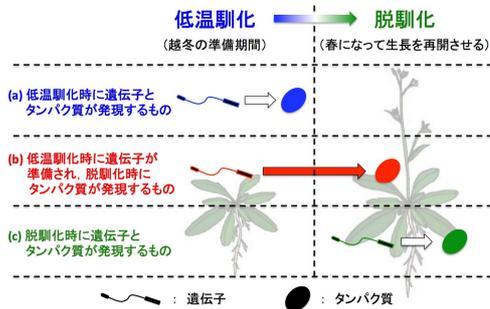


図4 低温馴化・脱馴化時における遺伝子とタンパク質の発現

これまでの研究では、(a)と(b)の遺伝子群はともに低温馴化時に遺伝子が発現し、同時にタンパク質も発現していると考えられていた。しかし、今回の解析で、脱馴化時に発現が上昇するタンパク質があることが明らかとなった。つまり、(b)の遺伝子群は低温馴化時に遺伝子は発現しているが、次の脱馴化のステップまで保存され、脱馴化時に特異的にタンパク質を発現するという、特別な転写後制御を受けている可能性が示された。

また、(b)の特別な転写後制御を受ける遺伝子群の中には、新しいタンパク質合成に関わる、翻訳開始因子(EIF4A-2, EIF3C)やリボソームタンパク質をコードする遺伝子だけでなく、エネルギー生成に関わるような遺伝子(リンゴ酸脱水素酵素, MDH1)が含まれていた。これは、越冬後に気温の上昇を感知した植物が、すぐに生長を再開させるようにプログラムされた遺伝子発現、タンパク質発現を制御するメカニズムを持つ可能性を示している。この成果は、米国の科学雑誌『Molecular & Cellular Proteomics』に掲載された(5. 主な論文発表, 雑誌論文)。

(2) 転写後・翻訳制御タンパク質の機能解析  
これまでの研究で、植物のストレス応答時に特別な転写後・翻訳制御を受ける遺伝子の同定に成功した。現在、それら遺伝子を用いた転写後・翻訳制御に関与するタンパク質の単離・同定を進めている。

これと並行して、植物のストレス応答時に mRNA の一時保存に関与すると考えられている RNA 結合タンパク質である UBP1b (oligoUridylate Binding Protein 1b) の解析を行った。

UBP1b タンパク質を GFP 蛍光タンパク質と

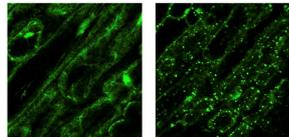


図5 UBP1bタンパク質の局在無処理(左)と40°Cで処理(右)した植物のUBP1bタンパク質の局在解析。高温処理によって顆粒状のシグナルが観察された。

融合させ、細胞内局在を確認したところ、高温ストレスに 応答して GFP シグナルが細胞質に顆粒状に観察された(図5)。

そこで、UBP1b タンパク質を過剰発現させた植物を用いて高温ストレス耐性試験を行った結果、UBP1b を過剰発現させている植物ではコントロール植物と比較して高い耐性を示すことが明らかとなった(図6)。



図6 高温ストレス耐性試験コントロール(左)と比較してUBP1b過剰発現植物(右)は高温ストレス耐性を示す。

さらに、UBP1b によって制御され、高温耐性に関与していると

考えられる遺伝子を同定するために、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析を行った。その結果、高温ショックタンパク質のひとつをコードする mRNA が UBP1b 過剰発現植物で高い発現を示し、UBP1b の標的遺伝子である可能性が示された。そこで、この高温ショックタンパク質遺伝子の安定性を調べるため、mRNA の分解速度を調べた結果、コントロールと比較して UBP1b 過剰発現植物では、

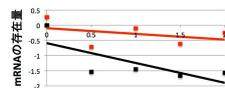


図7 標的遺伝子の分解速度コントロール(黒)と比較して、UBP1b過剰発現植物(赤)では、高温ショックタンパク質の分解速度が遅く、mRNAの減少が緩やかであった。

この mRNA の分解速度が遅くなっており、UBP1b 過剰発現植物において安定していることが示された(図7)。

この成果は、現在論文投稿中である。

以上の結果から、低温ストレス応答時には季節の変化に対応するようなプログラムされた遺伝子とタンパク質の発現制御を機能させ、短時間の高温ストレス時には一時的に mRNA を保存することで応答していることが明らかとなった。このように、植物は RNA 制御を介して環境ストレスに 応答・適応しており、転写後・翻訳制御機構の重要性が示された。また、これまでの研究では、マイクロアレイや次世代シーケンサーによる網羅的

な遺伝子発現解析が主流であったが、遺伝子だけでなく遺伝子から合成されるタンパク質の発現解析も重要な研究であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等)

〔雑誌論文〕(計4件)

Nguyen, A. H., A. Matsui, M. Tanaka, K. Mizunashi, **K. Nakaminami**, M. Hayashi, K. Iida, T. Toyoda, D. V. Nguyen and M. Seki, Loss of Arabidopsis 5'-3' Exoribonuclease AtXRN4 Function Enhances Heat Stress Tolerance of Plants Subjected to Severe Heat Stress, **Plant Cell Physiol**, 査読有, 2015, 56(9): 1762-1772, DOI: 10.1093/pcp/pcv096

**Nakaminami, K.**, A. Matsui, H. Nakagami, A. Minami, Y. Nomura, M. Tanaka, T. Morosawa, J. Ishida, S. Takahashi, M. Uemura, K. Shirasu and M. Seki, Analysis of Differential Expression Patterns of mRNA and Protein During Cold-acclimation and De-acclimation in Arabidopsis, **Mol Cell Proteomics**, 査読有, 2014, 13(12): 3602-3611, DOI: 10.1074/mcp.M114.039081

Matsui, A., A. H. Nguyen, **K. Nakaminami** and M. Seki, Arabidopsis non-coding RNA regulation in abiotic stress responses, **Int J Mol Sci**, 査読有, 2013, 14(11): 22642-22654, DOI: 10.3390/ijms141122642

Hanada, K., M. Higuchi-Takeuchi, M. Okamoto, T. Yoshizumi, M. Shimizu, **K. Nakaminami**, R. Nishi, C. Ohashi, K. Iida, M. Tanaka, Y. Horii, M. Kawashima, K. Matsui, T. Toyoda, K. Shinozaki, M. Seki and M. Matsui, Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes, **Proc Natl Acad Sci USA**, 査読有, 2013, 110(6): 2395-2400, DOI: 10.1073/pnas.1213958110

〔学会発表〕(計8件)

**Kentaro Nakaminami**, Chihiro Ohashi, Maho Tanaka, Kousuke Hanada and Motoaki Seki, Characterization of functional small peptides related to salinity stress tolerance, 第57回日本植物生理学会年会, 岩手大学(岩手), 2016年3月18日~20日

Hai Anh Nguyen, Akihiro Matsui, Maho Tanaka, Kayoko Mizunashi, **Kentaro Nakaminami**, Makoto Hayashi, Kei Iida, Tetsuo Toyoda, Van Dong Nguyen, Motoaki Seki, Loss of Arabidopsis 5'-3'

exoribonuclease AtXRN4 function enhances heat stress tolerance under short-time heat stress treatments, 第56回日本植物生理学会年会, 東京農業大学(東京), 2015年3月16日~18日

**中南 健太郎**, 環境ストレス応答に機能するペプチドホルモンの発見を目指して, 植物グローバル教育プロジェクト 平成26年度シンポジウム, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良), 2014年11月18日

**Kentaro Nakaminami**, Akihiro Matsui, Hirofumi Nakagami, Anzu Minami, Yuko Nomura, Maho Tanaka, Taeko Morosawa, Junko Ishida, Satoshi Takahashi, Mutsuo Uemura, Ken Shirasu, and Motoaki Seki, RNA masking system during cold deacclimation of Arabidopsis plants, Plant Biology 2014, Portland (USA), 2014年7月12日~14日

**中南 健太郎**, 樋口 美栄子, 吉積 毅, 岡本 昌憲, Bashir Khurram, 清水 みなみ, 大橋 千広, 田中 真帆, 松井 南, 篠崎 一雄, 関 原明, 花田 耕介, 環境ストレス耐性に関与するペプチドの同定と機能解析, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山), 2014年3月18日~20日

Cam Chau Nguyen, **Kentaro Nakaminami**, Shuhei Kobayashi, Yukio Kurihara, Motoaki Seki, UBP1b is related to heat stress responses in plants, 第55回日本植物生理学会年会, 富山大学(富山), 2014年3月18日~20日

**中南 健太郎**, 松井 章浩, 南 杏鶴, 中神 弘史, 野村 有子, 田中 真帆, 諸澤 妙子, 石田 順子, 白須 賢, 上村 松生, 関 原明, シロイヌナズナの低温応答に関与する翻訳制御機構の研究, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学(岡山), 2013年3月21日~23日

Cam Chau Nguyen, **Kentaro Nakaminami**, Shuhei Kobayashi, Yukio Kurihara, Motoaki Seki, UBP1b is Related to Heat Stress Responses in Plants, 第54回日本植物生理学会年会, 岡山大学(岡山), 2013年3月21日~23日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中南 健太郎 (NAKAMINAMI, Kentaro)  
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員  
研究者番号: 40513403