

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440136

研究課題名(和文) 葉緑体に於ける翻訳の量的制御

研究課題名(英文) Regulation of the amount of translation products in chloroplasts

研究代表者

杉浦 昌弘 (SUGIURA, Masahiro)

名古屋大学・遺伝子実験施設・特別教授

研究者番号：80027044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体リボソームは59種の蛋白質を等モルずつ含むので、蛋白質の質量は大きく異なるが等モルずつ合成されなければならない。大きなS2蛋白質と小さなS16蛋白質のmRNAコード領域の翻訳伸長速度はほぼ同じであるが、5'非翻訳領域の翻訳開始速度はS16 mRNAが著しく低い。これは、葉緑体に可溶性の翻訳抑制因子が、S16 mRNAの翻訳開始を抑制することによる。mRNA特異的な翻訳制御因子群により、リボソーム蛋白質群がほぼ等モル合成されるモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast ribosomes include 59 proteins in equimolar ratios. Though their sizes vary significantly, these proteins should be synthesized as equal moles. The translation elongation rates of a large S2 mRNA and a small S16 mRNA coding regions are found to be similar. However, the translation initiation rate of S16 mRNA 5'-UTR was very low. This is due to the presence of an S16-specific translation repressor in a chloroplast soluble fraction. We propose a model that translation of ribosome protein synthesis is regulated by mRNA-specific factors.

研究分野：生物学

キーワード：葉緑体 翻訳 mRNA リボソーム in vitro系 翻訳抑制 上流ORF

1. 研究開始当初の背景

- (1) 顕花植物の葉緑体は小型ゲノムを持ち、約 80 種のタンパク質をコードしている。これらの大部分は、光化学系、NADH 脱水素酵素やリボソームなどの複合体のサブユニットである。各サブユニットの量比はほぼ決まっているので、その量比に応じて合成されなければならない。大部分の葉緑体遺伝子は、ほぼ恒常的に転写さる。従って、葉緑体遺伝子の発現制御は、転写段階でなく主として翻訳段階で行われるはずである。一つの複合体を構成するサブユニットの大きさは様々である。更に、多量に存在する光化学系のサブユニットと微量の NADH 脱水素酵素のサブユニットが同一 mRNA 鎖にコードされている例もある。mRNA から必要量のタンパク質をどのように合成するかという翻訳の定量的制御の研究は見当たらない。
- (2) 葉緑体の翻訳装置は原核生物と似ているが、リボソームの構成は少し異なっている。また、約 60% の葉緑体 mRNA は Shine-Dalgarno (SD) 配列を持たない。その代わりに、mRNA 固有のトランス因子を持つ。それぞれのトランス因子に対応して mRNA の上流域にシス因子が存在する。葉緑体の多くの mRNA について、これらの同定がまだ十分解析されていない。更に、これらの両因子が相互作用して翻訳の開始速度を決めていると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) タバコ葉緑体のリボソームは 59 種のタンパク質サブユニットからなり、そのうちの 21 種は葉緑体ゲノムにコードされている。これらは等モルずつリボソームに存在する。最も大きいタンパク質は、最も小さい

タンパク質の約 8 倍なので、大きなタンパク質は速い速度で合成されないと両者は等モルにならない。そこで、リボソームを例として、大きなサブユニットと小さなサブユニットの mRNA の翻訳を、葉緑体 *in vitro* 翻訳系を使って調べる。それらが等モルずつ合成される翻訳様式を調べる。これにより、葉緑体での翻訳の量的制御の分子機構の解明を目指す。

- (2) タバコ葉緑体 30S リボソーム粒子のうち、最も大きい S2 タンパク質をコードする rps2 mRNA のシス配列を同定し、トランス因子の有無を調べる。ついで同 mRNA の翻訳開始と翻訳伸長の速度を定量する。小さい S14 タンパク質をコードする rps14 mRNA について、同様に調べる。得られたデータをもとに、S2 タンパク質と S14 タンパク質がほぼ等モル合成される様式のモデルを提唱する

3. 研究の方法

- (1) 翻訳の分子機構の解析には、*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* 翻訳系を開発した。さらに、大幅に改良し当初の数百倍の活性を持ち、翻訳速度を測定できる系を確立した。そこで、この系を以下用いる。この葉緑体 *in vitro* 翻訳系で、反応が直線的に進行している条件下 (28 °C、1h) で、相対的翻訳速度を、ラベルしたアミノ酸の取込みで測定する。
- (2) タバコ葉緑体 30S リボソーム粒子の、最も大きな S2 タンパク質 (236 アミノ酸) の mRNA と小さい S14 タンパク質 (100 アミノ酸) の mRNA を用いて、葉緑体 *in vitro* 翻訳系で翻訳速度の解析を行う。また、他の小さな S16 タンパク質の mRNA について

も調べる。

- (3) 次に、各 mRNA の 5' -UTR の後方に同一の緑色蛍光タンパク質(GFP)の mRNA のコード領域を結合し、翻訳速度を求める。コード領域が同じなので翻訳速度の差は翻訳開始速度と考えられる。ついで、葉緑体のリブローズ 2 リン酸カルボキシラーゼの大サブユニット遺伝子 rbcL の 5' -UTR や T7 ファージ gene 10 由来の 5' -UTR も対照として用い、翻訳伸長速度を計り、前の結果と比較する。
- (4) 次に、各 mRNA 翻訳に必須のシス配列を同定し、ついでトランス因子の有無を調べる。我々の開発した Functional In Vitro Competition Assay (5' -UTR を過剰に加え翻訳を測定。もしトランス因子が存在するなら、過剰の 5' -UTR に結合してしまい、テンプレート mRNA にいかないで翻訳できなくなる)で、トランス因子が存在するかどうかを調べる。

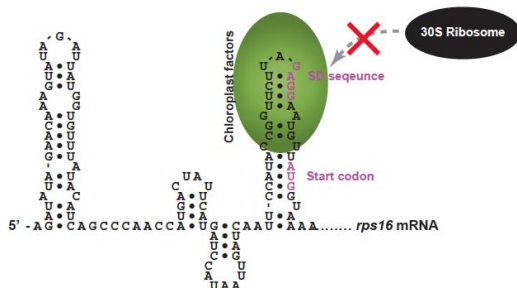
4. 研究成果

- (1) タバコリボソームタンパク質をモデルとした。最も大きな S2 236 アミノ酸, rps2) の mRNA と小さい S14 タンパク質 (100 アミノ酸) の rps14 mRNA を用いて、葉緑体 in vitro 翻訳系で翻訳速度の解析を行った。葉緑体内の正常な“ rps2 5' -UTR(5' -非翻訳領域) - S2 コード領域 - rps2 3' -UTR(3' -非翻訳領域)”を持つ mRNA を用いて翻訳速度を測定したところ、この mRNA は非常に速い翻訳速度を持つことが分かった。ついで、rps2 mRNA の翻訳開始に必要なシス配列について、5' -UTR の種々の欠失変異を作製して解析を行い、翻訳開始点上流の 33 塩基が翻訳開始に重要であることを発見した。さらに rps2 mRNA

の 5' -UTR を用いたゲルシフト解析の結果、トランス因子の存在が示唆された。次いで、S14 タンパク質の rps14 mRNA で同様の解析を行ったが、シス配列の同定には至らなかった。そこで、S14 タンパク質の代わりとして S16 タンパク質 (85 アミノ酸) の rps16 mRNA を用いて解析を行ったが、我々の in vitro 系では翻訳活性を測定することが困難であった。

- (2) 次に、翻訳伸長の速度を測定した。S2 タンパク質と S16 タンパク質のコード領域を同じ rps2 の 5' -UTR と結合して翻訳速度を測定した結果、S16 タンパク質が S2 タンパク質の約 6 倍合成された。次に T7 ファージ gene10 由来の 5' -UTR を用いて同様の解析を行ったところ、S16 タンパク質が S2 タンパク質の約 4 倍合成された。このことから、翻訳伸長速度はコード領域の長さに依存していることを明らかとなった。葉緑体内では、S2 タンパク質と S16 タンパク質はほぼ同じ量合成されるはずなので、S16 の 5' -UTR が翻訳開始を遅らせていると考えられる。
- (3) つぎに、その翻訳抑制の解析を行った。S16 の 5' -UTR に緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)を結合させたところ、GFP はほとんど合成されなかった。しかし、この mRNA を大腸菌 in vitro 翻訳系に入れると GFP が合成された。そこで、この系に葉緑体 in vitro 系を加えると GFP 合成が阻害された。さらに葉緑体 in vitro 系の上清(リボソームを沈殿させた可溶性部分)を加えても同様に GFP 合成が阻害された。従って、葉緑体の可溶性部分には S16 の 5' -UTR の翻訳抑制を行う成分が存在することを示した。
- (4) 対照として、rbcL mRNA の 5' -UTR は葉緑

体 *in vitro* 系でも大腸菌の *in vitro* 系でも同じように GFP を合成した。しかし、大腸菌の *in vitro* 系に、葉緑体 *in vitro* 系の可溶性部分を加えても GFP 合成は阻害されなかったため、この効果は S16 の mRNA 5' -UTR に特有のものである。



以上の知見をもとに、上の図のようなモデルを提唱した。すなわち、*rps16* mRNA の開始コドン AUG と前方の SD 配列を含む領域がステム構造をとり、それに葉緑体の可溶性部分に存在する抑制因子が結合して *rps16* mRNA の翻訳を抑制していると考えられる。

- (5) S16 の 5' -UTR に上流 ORF が存在し、これに GFP コード領域を結合させると GFP が少し合成されるので、この上流 ORF が翻訳抑制に関与している可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Nakamura, M. and M. Sugiura. Design of mRNAs required for stable accumulation of foreign proteins in transplastomic plants. *Endocytobiosis and Cell Res.*, 査読なし, 27, 2016, 37-40

Nakamura, M., Y. Hibi, T. Okamoto and M. Sugiura. Cooperation between the chloroplast *psbA* 5' -untranslated region and coding region is important for translational initiation: the chloroplast translation machinery

cannot read a human viral gene coding region. *Plant J.*, 査読あり, 85, 2016, 772-780

Ido, A., S. Iwata, Y. Iwata, H. Igarashi, T. Hamada, S. Sonobe, M. Sugiura and Y. Yukawa. Arabidopsis pol II-dependent *in vitro* transcription system reveals role of chromatin for light-inducible *rbcS* gene transcription. *Plant Physiol.*, 査読あり, 170, 2016, 642-652

Kuroda, H. and M. Sugiura: Processing of the 5' -UTR and existence of protein factors that regulate translation of tobacco chloroplast *psbN* mRNA. *Plant Mol. Biol.*, 査読あり, 86, 2014, 585-593

[学会発表] (計 9 件)

中邨真之 (発表者), 杉浦昌弘: 葉緑体 mRNA の翻訳開始における 5' 非翻訳領域とコード領域との適合性について、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日、鹿児島

中邨真之 (発表者), 杉浦昌弘: 葉緑体 mRNA の翻訳開始には 5' 非翻訳領域とコード領域との適合性が関与する。第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、横浜
中邨真之 (発表者), 杉浦昌弘: タバコ葉緑体 *rps16* mRNA の翻訳抑制機構における上流 ORF の役割。日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16 日、沖縄

Nakamura M. (発表者) and M. Sugiura: Coordination between the chloroplast *psbA* 5' -untranslated region and coding region activates the translation initiation. 国際細胞共生学会 (ICES 2016 KYOTO), September 12, 2016, Kyoto
中邨真之 (発表者), 杉浦昌弘: タバコ葉

緑体 rps16 mRNA の翻訳抑制は上流 ORF が
関与する。第 57 回日本植物生理学会年会、
2016 年 3 月 20 日、盛岡

中邨真之(発表者) 杉浦昌弘：上流 ORF
によるタバコ葉緑体 rps16 mRNA の翻訳抑
制。BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年
会、第 88 回日本生化学会大会合同大会)
2015 年 12 月 3 日、神戸

中邨真之(発表者) 杉浦昌弘：タバコ葉
緑体リボソーム S16 タンパク質をコード
する rps16 mRNA の翻訳抑制には上流 ORF
が関与している。第 56 回日本植物生理学
学会年会、2015 年 3 月 17 日、東京

Nakamura M. and M. Sugiura(発表者): The
gene for chloroplast ribosomal protein
S16 is located in both chloroplast and
nuclear genomes: expression of its
chloroplast gene. PInat & Animal Genome
XXIII Conference, January 12, 2015, San
Diego, USA

中邨真之(発表者) 杉浦昌弘：タバコ葉
緑体リボソーム S16 タンパク質をコード
する rps16 mRNA の翻訳抑制機構の解析。
第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11
月 27 日、横浜

Biotechnology: Methods and Protocols,
Methods in Molecular Biology, vol.1132”
(P. Maliga, ed.), 2014, pp.73-91

[その他]

2015 年 9 月 日本植物学会第 79 回大会
にて、「葉緑体ゲノムの構造と発現の分子
機構」に関して学会最高の大賞を受賞。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 昌弘 (SUGIURA, Masahiro)
名古屋大学・遺伝子実験施設・特別教授
研究者番号：8 0 0 2 7 0 4 4

(2) 連携研究者

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：6 0 3 2 2 1 4 5

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：0 0 4 4 8 7 0 5

[図書] (計 2 件)

Sugiura, M., Y. Takeda, P. Waterhouse,
I. Small, S. Curtin and T. Millar:
American Society of Plant Biologists,
Wiley Blackwell, Hoboken, USA, Chapter
6 Nucleic Acids. In “Biochemistry &
Molecular Biology of Plants, 2nd ed.”
(B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L.
Jones eds), 2015, pp.240-288

Sugiura, M.: Springer Science+Business
Media, New York, Plastid mRNA
translation. In “Chloroplast