

令和元年6月14日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06485

研究課題名(和文) 転写因子の翻訳制御によるショ糖センシングの分子機構

研究課題名(英文) Sucrose-sensing through translation regulation of a transcription factor

研究代表者

山下 由衣 (Yamashita, Yui)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：40803383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のmRNAには5'非翻訳領域(5'UTR)に小さなORF(上流ORF; uORF)が存在する場合があります。uORFの翻訳は下流に存在する主要ORFの翻訳を阻害する。本研究ではシロイヌナズナのbZIP11 uORF2で起こるショ糖による翻訳の停滞機構を解明した。uORF新生ペプチドがリボソーム出口トンネル内で機能することや、ショ糖によるuORF2での翻訳停滞がmRNAの切断を引き起こすことを明らかにした。また、uORF2のショ糖応答性には動植物で保存されたりリボソームの機能が関与していることが示された。ただし、植物特有の因子の関与については今後の研究で検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショ糖は植物において最も重要な代謝産物の一つである。本研究では植物の細胞内におけるショ糖感知が、bZIP11 uORF2を翻訳中のリボソームによって担われることが示された。植物においては、直接のショ糖センサーの存在は細胞膜上に存在するものが一つ報告されている。本研究は細胞質におけるショ糖センサーの唯一の発見例であり、植物栄養学的研究としての意義も大きい。また、その分子基盤を明らかにしたことは、広く遺伝子発現制御研究に資するものである。

研究成果の概要(英文)：In the 5' untranslated region, upstream ORFs (uORFs) are identified on 30-40% of the eukaryotic cytosolic mRNA. Translation of uORFs generally repress translation of the main ORFs. Arabidopsis bZIP11 is a transcription factor that regulates amino acid metabolism in response to sucrose. On bZIP11 mRNA, sucrose induces ribosome stalling at the stop codon of the uORF2. This sucrose-induced ribosome stalling is responsible for translation repression of the bZIP11 mainORF, which encodes bZIP11 protein. In this research, nascent uORF2 polypeptide was shown to function inside the ribosome exit tunnel to induce ribosome stalling. Involvement of the ribosome protein protruding into the ribosome exit tunnel was also revealed by using cell-free translation system of Arabidopsis. Analysis in rabbit reticulocyte lysate suggested conserved feature of ribosome among plant and animal enables sucrose-induced ribosome stalling of the bZIP11 uORF2.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ショ糖 uORF リボソーム 転写因子

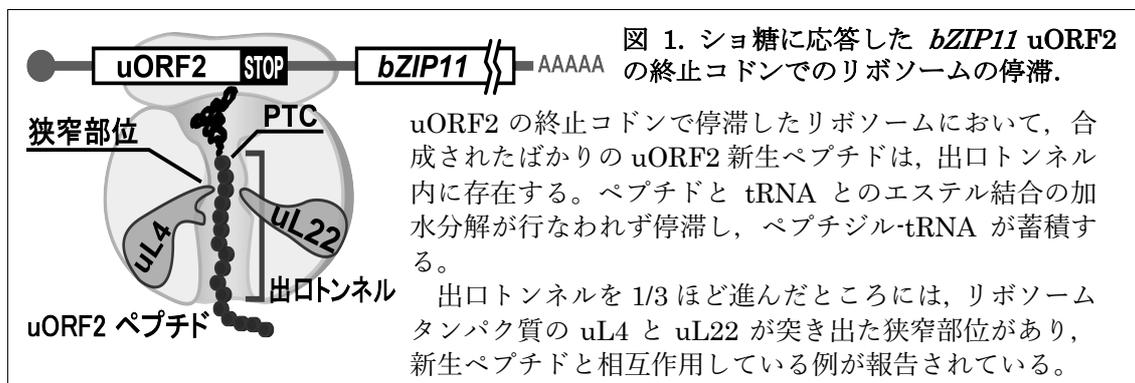
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、翻訳段階での遺伝子発現制御が重要な役割を担っていることが認識されつつある。これまでに我々は、シロイヌナズナにおいてメチオニン生合成をフィードバック調節する翻訳伸長段階での制御機構を解明 (*J. Biol. Chem.*, 289: 12693-12704, 2014) するとともに、*bZIP11* mRNA の uORF2 (2 番目の uORF) の終止コドンで、シヨ糖に応答してリボソームが停滞することを見いだした (*FEBS Lett.*, 591: 1266-1277, 2017)。終止コドンでの翻訳終結反応が阻害されており、直前のコドンまでを翻訳したペプチドに tRNA が結合したペプチジル-tRNA が蓄積する。

シロイヌナズナの *bZIP11* はシヨ糖や光に応答してアミノ酸代謝を調節する重要な転写因子であり、その発現はシヨ糖により抑制される (*Plant Physiol.*, 150: 1356-67, 2009)。研究代表者は、植物由来の試験管内翻訳系を用いた解析により、*bZIP11* mRNA の uORF2 の終止コドンで、リボソームがシヨ糖に応答して停滞し、これにより、下流の *bZIP11* ORF の翻訳が抑制されることを明らかにした (図 1)。一般に、uORF の存在は下流のメイン ORF の翻訳を抑制するが、uORF におけるリボソームの状態により、その程度が変化する。uORF でリボソームが停滞すると、後続のリボソームの進行を阻止するため、メイン ORF の翻訳は強く抑制される。

リボソームのペプチド転移反応の活性中心 (ペプチジルトランスフェラーゼセンター; PTC) で合成された新生ペプチドは、大サブユニットを貫く「出口トンネル」を通して出てくる (図 1)。出口トンネルには新生ペプチドの 30-40 アミノ酸残基が収容され、42 アミノ酸残基からなる uORF2 ペプチドの後半部分がこの制御に重要であることから、uORF2 ペプチドの作用部位は、リボソーム出口トンネル内であり、シヨ糖のセンサーとなると考えられる。



2. 研究の目的

真核生物の mRNA は、1 つの遺伝子のみをコードすると考えられていたが、「本体」遺伝子の 5' 非翻訳領域 (5'UTR) に存在する小さな ORF (上流 ORF; uORF) が翻訳されることで、下流の本体遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。シロイヌナズナの転写因子である *bZIP11* は、細胞内のシヨ糖に応答して、アミノ酸代謝の調節に関与する。*bZIP11* 遺伝子発現のシヨ糖応答性は、*bZIP11* 遺伝子の uORF2 におけるシヨ糖に応答したリボソームの停滞によってもたらされる。本研究は、*bZIP11* mRNA の uORF2 におけるシヨ糖に応答したリボソームの停滞の分子機構を明らかにすることを目的とする。*bZIP11* uORF2 におけるリボソームの停滞は細胞内のシヨ糖センサーとして唯一の生化学的同定例であり、シヨ糖センシングの分子機構を明らかにする価値がある。

3. 研究の方法

ショ糖のセンサーとしての uORF2 の作用機構を明らかにするため、試験管内翻訳系を用いた解析を行う。

(1) 出口トンネル狭窄部位の関与：uORF2 は合成された直後にリボソーム出口トンネル内で作用することが期待される。出口トンネルの内部には、2つのリボソームタンパク質 uL4 と uL22 の突出によって形成される狭窄部位がある。狭窄部位は、新生ペプチドと相互作用し、リボソームの停滞において重要であることが示唆されている。すでに作成済みである、リボソーム出口トンネルを構成するリボソームタンパク質の変異株に由来するシロイヌナズナ試験管内翻訳系を用いて、出口トンネルの関与を検証する。出口トンネルの変異株では、ショ糖に応答した翻訳の停滞が弱まると期待される。狭窄部位の関与が明確でない場合は、出口トンネルを構成する rRNA のコンフォメーション変化を UV クロスリンク法で解析する。

(2) ショ糖の高度な特異性の検証：試験管内翻訳系において、ショ糖の関連代謝産物やアナログが uORF2 による翻訳停滞を引き起こすかどうかを検証する。

(3) 植物特有の因子の関与の検討：ショ糖に応答した uORF2 の翻訳停滞に植物特有の因子が関与するかどうかを検証するために、ウサギ網状赤血球ライセートの試験管内翻訳系での解析を行う。植物の試験管内翻訳系で同定された、翻訳停滞が強まる、もしくは弱まる、1アミノ酸置換をもつ uORF2 の挙動を、ウサギ網状赤血球ライセートに置いて観察する。

(4) リボソームタンパク質 RACK1 の関与：ショ糖に応答してシロイヌナズナのリボソームを構成するタンパク質のパラログ種が変化することが示唆されている。このうち、真核生物に特有のリボソームタンパク質である RACK1 のパラログのひとつは、ショ糖に応答してリボソームへの取り込み量が増える。また、出芽酵母の RACK1 は、新生ペプチドによるリボソームの停滞と、それに共役した mRNA 分解に関与するという報告がある。

(5) mRNA 分解の可能性：mRNA は、リボソームの停滞により、mRNA 品質管理機構による分解の標的となりうる。したがって、細胞内ではリボソームの停滞をきっかけにした mRNA 分解によって、*bZIP11* mRNA の発現がさらに制御されている可能性が高い。そこで、芽生えの液体培養系において、*bZIP11* mRNA の半減期を測定する系を立ち上げた。また、*bZIP11* のホモログ遺伝子や、変異型の *bZIP11* uORF2 をもつトランスジェニックシロイヌナズナを用いることで、リボソームの停滞の mRNA 分解への寄与を議論する。ショ糖に依存して、*bZIP11* mRNA の分解が起こる場合は、mRNA 品質管理機構のひとつである Nonsense-Mediated mRNA Decay の関与を検証する。

4. 研究成果

(1) 出口トンネル狭窄部位の関与：本研究では、出口トンネルに露出し、狭窄部位を構成する RPuL4 のβループ構造に変異を導入した2つ変異株由来の試験管内翻訳系を用いた。1つ目の変異株は、βループ構造の頂点のアルギニンをアラニンに置換した R77A 変異株である。もう一つの変異株は、βループ構造の両方の根元に位置するスレオニンとバリンを欠失したΔTV 株であり、βループ構造が短くなる変異株である。ΔTV 株ではコントロールとなる野生型株に比べて、有意に翻訳停滞効率が低下した。一方、R77A 株では翻訳停滞効率の有意な低下は観察されなかった。これらのことから、uORF2 によるショ糖に応答した翻訳停滞には RPuL4 のβループ構造の長さが重要であることが示された。

(2) ショ糖の高度な特異性の検証: ショ糖の関連代謝産物であるフルクトースとグルコース, およびショ糖のアナログであるパラチノースの翻訳停滞に与える影響を解析した。ショ糖とパラチノースはフルクトースとグルコースが結合したものであるが, 結合の様式が異なる。また, フルクトースとグルコースを同時に添加しコムギ胚芽由来の試験管内翻訳を行った。その結果, 翻訳停滞を誘発したのはショ糖のみであった。よって, uORF2 による翻訳停滞はフルクトースとグルコースの結合様式を認識する高度なショ糖センサーであることが強く示唆された。

(3) 植物特有の因子の関与の検討: ウサギ網状赤血球由来の試験管内翻訳系を用い, ショ糖添加条件で uORF2 の試験管内翻訳を行った。野生型の *bZIP11* uORF2 の翻訳停滞はコムギ由来の試験管内翻訳系と, ウサギ網状赤血球由来の試験管内翻訳系の両方で起こることが明らかになった。しかしながら, 両翻訳系は翻訳反応の温度や反応液の組成の違いから, 翻訳反応の効率が容易には比較できない。そこで, uORF2 の翻訳停滞が強まる R[21-23]A 変異と, 翻訳停滞が起これなくなる S31A の挙動を両翻訳系で比較した。その結果, 各変異株の挙動には両翻訳系間で相関がみられた。以上の結果より, 動物と植物の翻訳システムに共通する要素が関与して, uORF2 のショ糖応答性が獲得されていることが示された。ただし, 植物特異的な因子のショ糖応答した翻訳停滞への関与は否定されない。

(4) リボソームタンパク質 RACK1 の関与: RACK1 の関与を検証するために, RACK1 の欠損変異株のスクリーニングを行った。スクリーニングで得られた RACK1 欠損株に, RACK1 の C 末端に FLAG タグを付加した人口遺伝子を導入したトランスジェニックシロイヌナズナの作出を完了した。また, 導入した RACK1 遺伝子には, 翻訳停滞に影響を与えることが出芽酵母において示されている, アミノ酸置換を導入した。今後に行う, 同トランスジェニックシロイヌナズナを用いた mRNA 分解の解析および, 試験管内翻訳系の調製に資する研究材料となる。

(5) mRNA 分解の可能性: *bZIP11* mRNA の分解を測定する実験系の立ち上げを行った。液体培地におけるショ糖処理に持ちこむシロイヌナズナの芽生えは, 寒天培地に加えるショ糖の濃度を通常より下げて培養した。その後, 液体培地でのショ糖処理を 24 時間までの範囲で検討した。どのタイムポイントにおいても mRNA 分解の中間体が検出され, 芽生えの液体培養系が *bZIP11* mRNA の分解解析に適していると判断された。mRNA 分解解析に用いる, 転写阻害剤を検討し, アクチノマイシン D とコルディセピンの両方が芽生えの液体培養系で使用可能であることが示された。また, 変異型の *bZIP11* uORF2 をもつトランスジェニックシロイヌナズナの作出を終えた。今後は, 同トランスジェニックシロイヌナズナを用いて, リボソームの停滞の mRNA 分解への寄与を検証する。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)
研究代表者に下線

- ① Yamashita, Y., Takamatsu, S., Sugawara, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S., and Beckmann, R., Conserved sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling in Arabidopsis S1 bZIP family uORFs, *Proteins; from the Cradle to the Grave*,

2018

- ② Yamashita, Y., Takamatsu, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S., and Beckmann, R.,
Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling in Arabidopsis
bZIP11 uORF2, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 (招待講演)
- ③ Yamashita, Y., Takamatsu, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S., and Beckmann, R.,
翻訳アレストによる植物栄養センシングの分子機構, 北海道植物学会大会 (シンポジウム),
2017 年(招待講演)
- ④ Yamashita, Y., Takamatsu, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S., and Beckmann, R.,
Sucrose-induced ribosome stalling of Arabidopsis *bZIP11* uORF, EMBO Conference on
Protein Synthesis and Translational Control, 2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：平井 優美
ローマ字氏名：Hirai, Masami Y.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。