

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07107

研究課題名(和文) 植物の環境ストレス種特異的な翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of environmental stress-specific translational regulation in plant

研究代表者

加藤 晃(kato, ko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80283935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物は環境ストレス(熱、塩等)に曝されると細胞内の翻訳状態が劇的に変化する。熱と塩ストレスによる翻訳状態変化をゲノムスケールで比較すると非常に類似しているが、熱では維持されるが塩では抑制されるなどストレス間で翻訳状態変化が異なるmRNAも存在する。
本研究により、特異的な挙動を示すmRNAの5'UTRをレポーター遺伝子に連結した一過性発現実験および形質転換体を用いた解析から、5'UTR内のCU反復領域等が、熱抑制/塩維持というストレス種特異的な翻訳状態変化に寄与する制御配列である可能性と熱ストレスに应答した転写開始点の変化が、mRNAの熱ストレス下での翻訳活性を変化させることが示された。

研究成果の概要(英文)：When plants are exposed to environmental stress (heat, salt etc.) the translation state changes dramatically. Translation state changes due to heat and salt stress are very similar when compared on the genome wide scale, but there are also mRNAs that differ in translation state change between two stresses such as being maintained by heat but suppressed by salt.

In this study, transient expression experiments and analysis using a transformant in which the 5' UTR of mRNA showing specific behavior was fused to a reporter gene were performed. As a result, the possibility that the CU repeat region in the 5'UTR contribute to the stress state-specific translational state change (heat suppression and salt maintenance) and the change of the translational state of mRNA under heat stress by change of transcription initiation site in response to heat stress were indicated.

研究分野：植物へ導入した有用遺伝子の効率的発現

キーワード：翻訳制御 環境ストレス 植物培養細胞 ゲノムワイド解析 5'UTR

1. 研究開始当初の背景

環境ストレス(熱・塩・乾燥等)に曝されると細胞内の翻訳状態は大きく変化する。具体的には全体的な翻訳抑制と一部 mRNA からの翻訳維持である。この中で mRNA がコードするタンパク質機能に着目すると、特に抑制または維持される機能集団が存在することから、このような翻訳状態の変化は、細胞の恒常性を維持し、ストレス環境に対応するストレス応答における重要な制御の1つであると考えられる。

細胞内の翻訳状態は、リボソームの結合数に応じて mRNA をショ糖密度勾配により分離するポリソーム解析により調べることが可能である。我々はこれまでに、シロイヌナズナ培養細胞を対象に、ポリソーム画分と非ポリソーム画分に存在する mRNA の量比を、ストレスを与えたことによる変化という観点から DNA マイクロアレイを用いて数値化している。その結果、熱(37 °C 10 min)および塩(200 mM NaCl 10 min)ストレスによる翻訳状態変化を比較すると、正の相関が認められた。アメリカの研究グループがシロイヌナズナ植物体を対象に行った乾燥ストレスによる翻訳状態変化についての解析データと比較しても同様に正の相関が認められ、共通の機構によりストレス下での翻訳が制御されていることが示唆された。また、その共通制御に関わる 5'UTR の配列特徴についても明らかにしている。

一方で、熱では維持されるが塩では抑制される、逆に塩では維持されるが熱では抑制されるなどストレス間で翻訳状態変化が異なる mRNA の存在も認められた(図1)。これら mRNA はストレス種特異的に翻訳が制御されているものと考えられる。

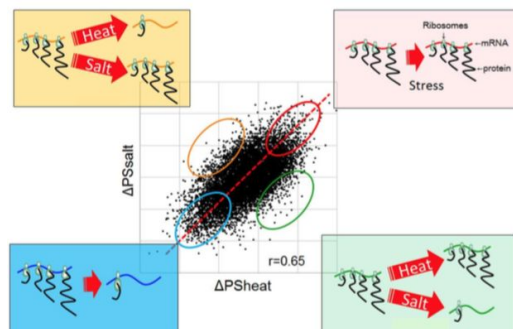


図1 熱及び塩処理による翻訳状態変化

2. 研究の目的

植物は環境ストレス(熱、塩、乾燥等)に曝されると細胞内の翻訳状態が劇的に変化し、多くの mRNA からの翻訳が抑制される中で一部 mRNA からの翻訳は維持される。我々はこれまでに、熱と塩ストレスによる翻訳状態変化をゲノムスケールで比較することで、両ストレス下での制御が非常に類似しており、また、その共通制御に関わる 5'非翻訳領域(5'UTR)の配列特徴を明らかにしているが、熱では維持されるが塩では抑制される

などストレス間で翻訳状態変化が異なる mRNA の存在も認められた。そこで、これら mRNA に着目し、特にストレスの種類に特異的な翻訳制御に関わる 5'UTR の配列特徴を明らかにすることで、未だ全体像が不明であるストレス応答における翻訳制御機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

(1) ストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する要因は 5'非翻訳領域(5'UTR)である。一般的に植物では、各遺伝子の転写開始点(5'UTRの5'末端)は均一ではなく、多くの転写開始点が存在している。また、環境ストレスにより各遺伝子の転写開始点も変化することも予想されるため、まず、通常条件、熱ストレス条件、塩ストレス条件で培養したシロイヌナズナ培養細胞から mRNA を精製し、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)ライブラリーを作製後、次世代シーケンサーにより各遺伝子の転写開始点をゲノムスケールで確定し、ストレス間で翻訳状態変化が異なる候補 mRNA の 5'UTR 配列を決定した。

(2) 候補 mRNA の 5'UTR を連結した *in vitro* 合成レポーター mRNA を、もしくは 35S プロモーターの支配下に 5'UTR/レポーター遺伝子/ターミネーターを連結したプラスミド DNA をシロイヌナズナプロトプラストへ導入する一過性発現実験を行ない、各ストレス条件下での翻訳能力をレポーター活性として評価した。

(3) 特異的な挙動を取る mRNA の 5'UTR 内の重要領域を *in silico* にて抽出し、対応する変異や欠失を導入し、上記と同様に一過性発現実験による詳細な評価を行い、ストレス種特異的な翻訳制御に関わる 5'UTR の特徴を同定した。また、5'UTR を連結したレポーター遺伝子を導入したシロイヌナズナ安定形質転換体を作成し、翻訳制御に関わる 5'UTR の特徴を *in vivo* で検証した。

4. 研究成果

(1) 植物遺伝子の転写開始点は、一般的に複数存在していることが知られている。また、この転写開始点は、環境ストレス等によって変動することも考えられる。そこで、本研究では 5'UTR の配列に着目することから、シロイヌナズナ培養細胞 T-87 の培養 3 日目コントロール(Control)、37 °C 熱ストレス条件下(37 °C, 10 min)、NaCl 200 mM 塩ストレス条件下(200 mM, 10 min)の細胞から抽出した全 RNA から CAGE ライブラリーを作製し、シーケンス解析を行うことで、全 mRNA について 5'末端の配列情報(5'UTR 配列情報)の取得を行った。その結果、熱抑制/塩維持、熱維持/塩抑制される mRNA の中で、転写開始点が収束していて転写開始点が各条件で

現する形質転換体を用いた解析を行った。ポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行った結果、CU 反復配列を持つキメラ 5' UTR を連結した FLUC mRNA は、熱抑制/塩維持である内在性 At1g09970.1 mRNA と類似した挙動を示した (図 5)。これらの結果から、5' UTR 内の CU 反復領域等が、熱抑制/塩維持というストレス種特異的な翻訳状態変化に寄与する制御配列である可能性が考えられた。

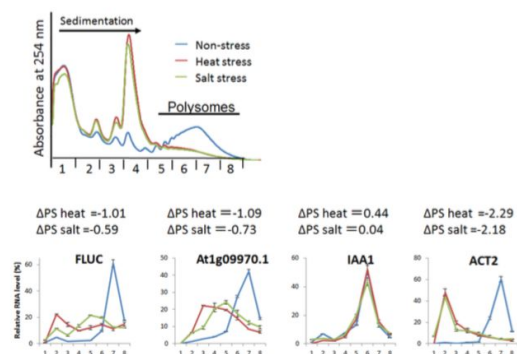


図 5 CU 反復配列を挿入した場合の挙動

(6)本研究により、特異的な挙動を示す mRNA の 5' UTR をレポーター遺伝子に連結した一過性発現実験および形質転換体を用いた解析から、5' UTR 内の CU 反復領域等が、熱抑制/塩維持というストレス種特異的な翻訳状態変化に寄与する制御配列である可能性と熱ストレスに応答した転写開始点の変化が、mRNA の熱ストレス下での翻訳活性を変化させることが示された。

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 3 件)

Yamasaki, S., Sanada, Y., Imase, R., Matsuura, H., Ueno, D., Demura, T. and Kato, K. Arabidopsis thaliana cold-regulated 47 gene 5-untranslated region enables stable high-level expression of transgenes. J. Biosci. Bioeng. 査読あり、125 巻、124-130, 2018, DOI:10.1016/j.jbiosc.2017.08.007

加藤晃、山崎将太郎、植物でのタンパク質の高効率翻訳を可能にする数理モデル、バイオサイエンスとインダストリー、査読なし、75 巻、240-241, 2017

Takeshi Matsui, Kazutoshi Sawada, Eiji Takita, Ko Kato, Compatibility of translational enhancers with various plant species, Plant Biotechnology, 査読あり、32 巻、309-316, 2015, DOI:10.5511/plantbiotechnology. 15.1103a

[学会発表](計 10 件)

Ko Kato, Transgene expression system in plants optimized translation process. The 2nd Japan-Korea-China Trilateral Joint Symposium on Plant Biotechnology, 2017

Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato, Mathematical approach to improvement of transgene expression focus on efficiency of mRNA translation. The 1st Asian Conference for Plant Made Pharmaceuticals, 2017

加藤晃、植物での有用タンパク質生産、第 5 回奈良まほろば産学官連携懇話会、2017

山崎将太郎、上野大心、出村拓、加藤晃、導入した目的遺伝子の配列に特化した翻訳エンハンサーの選抜システム、第 35 回日本植物細胞分子生物学会、2017

山崎将太郎、上野大心、松浦秀幸、出村拓、加藤晃、植物での転写開始点の網羅的な同定と遺伝子発現制御における転写開始点の重要性、NGS 現場の会第 5 回研究会、2017

Ko Kato, Transgene expression system optimizing translation process. PepTalk 2017, 2017

山崎将太郎、今瀬諒司、出村拓、加藤晃、翻訳効率を 5' UTR 配列から予測できる数式モデルの構築、第 34 回日本植物細胞分子生物学会、2016

今瀬諒司、山崎将太郎、出村拓、加藤晃、高翻訳に資する 5' UTR を用いた導入遺伝子高発現系、第 34 回日本植物細胞分子生物学会、2016

加藤晃、植物での有用遺伝子高発現系とその活用、2016 年度日本生物工学会北日本支部弘前シンポジウム、2016

山崎将太郎、出村拓、加藤晃、mRNA からの翻訳効率を改良した導入遺伝子高発現系、第 67 回日本生物工学会大会、2015

[図書](なし)

[産業財産権](なし)

出願状況(なし)

取得状況(なし)

[その他]
ホームページ等(なし)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 晃 (KATO, Ko) 奈良先端科学技術大
学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授
研究者番号：80283935

(2)研究分担者 (なし)

(3)連携研究者 (なし)

(4)研究協力者

山崎将太郎 (YAMASAKI, Shotaro)