

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07387

研究課題名(和文) uORFペプチドによる翻訳制御の新たな役割と機構の解明

研究課題名(英文) New roles and mechanisms of translational regulation mediated by upstream open reading frame-encoded peptides

研究代表者

尾之内 均 (ONOUCHI, HITOSHI)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50322839

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)： mRNAの5'非翻訳領域に上流ORF(uORF)と呼ばれる小さなORFが存在し、そこにコードされるペプチド(uORFペプチド)が下流の主要ORFの翻訳を制御する例が知られている。本研究では、uORFペプチドによる翻訳制御の未知の役割と機構を明らかにするために、進化的に保存されたアミノ酸配列を持つ被子植物のuORFの中から翻訳を制御するペプチドをコードするものを探索し、新規に8個のuORFを同定した。さらに、翻訳制御に関与するペプチドをコードするuORFの中から、マグネシウム濃度に応答した翻訳抑制に関与するものや、核小体ストレスに応答した翻訳促進に関与するものを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マグネシウムに応答してリボソームの停滞を引き起こし、それにより主要ORFの翻訳を抑制するuORFペプチドを見出した。これまでに代謝産物に応答してリボソームを停滞させるuORFペプチドは知られていたが、無機イオンに応答してリボソームを停滞させるuORFペプチドとしては、これが初めての発見である。また、核小体ストレスに応答して誘導される選択的スプライシングにより、uORFが除去されたmRNAが生産され、それによって主要ORFの翻訳が促進されるという、ストレスに応答した新たな翻訳制御機構を見出した。

研究成果の概要(英文)： Upstream open reading frames (uORFs) are small ORFs located in the 5' untranslated regions (5' UTRs) of many eukaryotic mRNAs. Some uORFs encode regulatory peptides that repress translation of the downstream main ORF. Most of the previously characterized uORFs encoding regulatory peptides play a role in feedback regulation in response to a metabolite. To identify new physiological roles of uORF-encoded regulatory peptides, we searched for uORFs encoding regulatory peptides among angiosperm uORFs with evolutionarily conserved amino acid sequences, and identified nine novel regulatory uORFs. We investigated physiological roles and mechanisms of the translational regulation mediated by these uORFs. We identified a uORF encoding a peptide that causes ribosome stalling in response to magnesium and thereby represses main ORF translation under high magnesium conditions. In addition, we identified a uORF involved in translational regulation in response to nucleolar stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：uORF リボソーム 翻訳制御 翻訳アレスト 新生ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) uORF ペプチドによる翻訳制御

真核生物の mRNA の約 30% は、5' 非翻訳領域に上流 ORF (uORF) と呼ばれる小さな ORF を持つ。その中で、uORF にコードされる新生ペプチド (uORF ペプチド) が自身を翻訳中のリボソームの内部に作用してリボソームの停滞 (翻訳アレスト) を引き起こし、それによって主要 ORF の翻訳を抑制する例が報告されている。そのような uORF ペプチドによる翻訳抑制を受ける遺伝子の中で、これまでにその翻訳制御の生理的役割が明らかにされているものの多くは代謝酵素などをコードする代謝関連遺伝子であり、それらの遺伝子の翻訳制御ではエフェクター分子である代謝産物にตอบสนองして uORF ペプチドがリボソームの停滞を引き起こす。すなわち、uORF ペプチドによる翻訳抑制が代謝産物にตอบสนองしたフィードバック制御として機能している。

(2) 翻訳抑制を起こす uORF ペプチドの探索

翻訳制御に関与する uORF ペプチドの網羅的同定に向けたアプローチとして、アミノ酸配列が進化的に保存されている uORF (conserved peptide uORF: CPuORF) の探索が比較ゲノム解析によって行われてきた。従来の比較ゲノム解析によるアプローチでは特定の生物種間で uORF ペプチド配列の比較が行われたが、より網羅的に CPuORF を同定するために、BLAST を用いて不特定生物種間で uORF ペプチド配列を比較して CPuORF を抽出する方法 (BAIUCAS 法および ESUCA 法) を金沢大学の高橋広夫博士との共同研究により開発した。これらの方法を用いることによって、被子植物から 100 種類以上の CPuORF を同定した。それらの CPuORF の中から新規に同定したものを中心に、下流の主要 ORF の翻訳への影響を解析し、アミノ酸配列依存的に主要 ORF の翻訳を抑制する CPuORF を 10 個同定した。また、そのうちのいくつかの CPuORF について、それらが関与する翻訳制御の生理的役割を解析し、発生分化の制御に関与するものを見出した。

2. 研究の目的

上述のように、uORF ペプチドによる翻訳制御の生理的役割として、これまではきわめて限られた役割しか明らかにされていなかった。一方、我々は多様な遺伝子の 5' 非翻訳領域 (5' -UTR) に CPuORF を見出しており、uORF ペプチドによる翻訳制御は幅広い遺伝子の発現制御に関与し、様々な生理的役割を担っている可能性が考えられた。本研究では、これまでに被子植物から同定された CPuORF の中から、翻訳アレストを起こすことにより主要 ORF の翻訳を抑制する uORF ペプチドをゲノムワイドに探索する。さらに、それらが関与する翻訳制御の生理的役割と機構を解析することにより、uORF ペプチドによる翻訳制御の未知の役割と機構を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 試験管内翻訳系を用いた解析

CPuORF にコードされるペプチドが翻訳アレストを起こすかを調べるために、タグ配列を付加した CPuORF を小麦胚芽抽出液から調製した試験管内翻訳系を用いて翻訳し、タグの抗体を用いたイムノプロット法により翻訳産物を解析した。uORF ペプチドによって翻訳アレストが引き起こされる場合は、翻訳が正常に完了せずにペプチドと tRNA が解離しないと考えられるため、CPuORF のペプチド配列依存的にペプチジル tRNA の蓄積が検出されることが期待される。

また、翻訳アレストを起こしたリボソームを検出するために、トープリント解析を行った。この解析では、CPuORF を含む mRNA を試験管内翻訳した後、リボソームが結合した状態の mRNA に対してプライマー伸長反応を行った。翻訳アレストを起こしたリボソームが mRNA 上に存在する場合には、プライマー伸長反応の進行がそのリボソームに妨げられて停止する。プライマー伸長反応産物をシーケンシングを用いて解析し、リボソームの停滞を示すバンドの位置を 1 塩基レベルで調べることより、翻訳アレストが起きた位置を決定した。

(2) 一過的発現解析

これまでに同定した CPuORF の主要 ORF の翻訳への影響を調べるために、野生型または変異型 CPuORF 配列を含む 5' 非翻訳領域を構成的発現プロモーターとレポーター (ルシフェラーゼ)

遺伝子の中に挿入したコンストラクトを作製した。シロイヌナズナの培養細胞から調製したプロトプラストに、作製したコンストラクトを含むプラスミド DNA をポリエチレングリコール処理により導入し、一定時間後に細胞を破碎してルシフェラーゼ活性を測定した。この解析により、各 CPuORF のペプチド配列依存的な翻訳抑制効果を検討した。

(3)形質転換植物を用いた解析

ペプチド配列依存的に主要 ORF の翻訳を抑制することを示した CPuORF の中で、ある生理的条件下に依存した翻訳制御に関与する可能性が予想される CPuORF について、その可能性を検証するために、野生型または変異型 CPuORF 配列を含む 5' 非翻訳領域につないだレポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナを作出した。それぞれの CPuORF による制御に影響を与えることが予想される生理的条件下において、野生型 CPuORF を持つ植物と変異型 CPuORF を持つ植物の間で、ルシフェラーゼ活性とルシフェラーゼ mRNA 量を比較することにより、それらの CPuORF にコードされるペプチドが条件依存的な翻訳制御に関与する可能性を検討した。

4. 研究成果

(1)翻訳制御に関与する uORF ペプチドの探索

翻訳制御に関与する新規の uORF ペプチドを同定する目的で、これまでに同定されたシロイヌナズナの CPuORF のうちの 22 個について、試験管内翻訳系においてペプチド配列依存的に翻訳アレストを起こすかを調べた。それらの CPuORF の試験管内翻訳産物をイムノプロット法を用いて解析したところ、3 つの CPuORF においてペプチド配列依存的にペプチジル tRNA の蓄積がみられた。さらにトープリント解析により、これらの 3 つの CPuORF においてペプチド配列依存的に翻訳アレストが起こることが明らかになった。CPuORF の終止コドンの位置を変えた変異体を用いたイムノプロット解析およびトープリント解析により、それらの 3 つの CPuORF のうちの 2 つは翻訳伸長過程で翻訳アレストを起こし、他の 1 つは翻訳終結過程で翻訳アレストを起こすことが示された。また、シロイヌナズナ培養細胞から調製したプロトプラストを用いた一過的発現解析により、それらの CPuORF がペプチド配列依存的に下流の主要 ORF の翻訳を抑制することを見出した。

被子植物において翻訳制御に関与する uORF ペプチドをさらに同定するために、これまでに同定したポプラとトマトの 12 個の CPuORF について、ペプチド配列依存的に下流の主要 ORF の翻訳に影響を与えるかを一過的発現解析を用いて調べた。その結果、ペプチド配列依存的に主要 ORF の翻訳を抑制する 6 個の CPuORF を新たに同定した。

(2)マグネシウムに応答した翻訳制御機構の解析

前述の試験管内翻訳系を用いた解析において翻訳終結過程で翻訳アレストを起こすことが示された CPuORF は、下流の主要 ORF にマグネシウム(Mg)輸送に関与するタンパク質をコードする。このことから細胞内 Mg 濃度に応じた翻訳制御に uORF ペプチドが関与する可能性を考え、一過的発現系と形質転換植物を用いてその可能性を検証した。その結果、一過的発現系と形質転換シロイヌナズナを用いたいずれの解析においても、野生型 CPuORF を含む 5' 非翻訳領域の下流にレポーター遺伝子をつないだ場合には、Mg 濃度に比例してレポーター遺伝子の翻訳抑制が強くなった。一方、変異型 CPuORF を用いた場合には、そのような Mg に応答した翻訳抑制はみられなかった。これらの結果から、この CPuORF にコードされるペプチドは Mg に応答して主要 ORF の翻訳を抑制することが示された。

uORF ペプチドが Mg に応答して主要 ORF の翻訳を抑制する機構としては、細胞内 Mg 濃度が高い場合に uORF の翻訳開始効率が上昇するという可能性と、Mg に応答して uORF ペプチドが翻訳アレストを起こすという可能性が考えられる。一過的発現系と試験管内翻訳系を用いた解析によりこれらの可能性を検証したところ、Mg 濃度は uORF の翻訳開始効率ではなく、翻訳アレスト効率に影響を与えることが明らかになった。

また、Mg 濃度は翻訳終結効率に影響を与えることが知られていることから、Mg 濃度が高いと uORF の終止コドンにおける翻訳終結効率が低下し、uORF ペプチドとの協働的な効果によりリボソームが停滞する可能性が考えられた。そこで、この翻訳制御が uORF の終止コドンに依存する

かを調べたところ、終止コドンを削除しても Mg に応答した翻訳制御が見られたことから、Mg 濃度の翻訳終結効率への影響はこの翻訳制御には関与しないことが明らかとなった。

(3)核小体ストレスに応答した翻訳制御機構の解析

これまでにペプチド配列依存的に主要 ORF の翻訳を抑制することを示した CPuORF の一つに、シロイヌナズナの *ANAC082* 遺伝子の CPuORF がある。最近、*ANAC082* 遺伝子の主要 ORF にコードされる転写制御因子は、リボソーム生合成の異常によって核小体ストレスが生じた際のストレス応答に関与することが報告された。そこで、*ANAC082* 遺伝子の CPuORF が核小体ストレスに応答した翻訳制御に関与する可能性を、*ANAC082* の 5' 非翻訳領域の下流につないだレポーター遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナを用いて検討した。その結果、核小体ストレスを誘導する薬剤でシロイヌナズナの幼植物を処理した場合には、CPuORF のペプチド配列依存的にレポーター遺伝子の翻訳が促進された。このことから、*ANAC082* の CPuORF は核小体ストレスに応答した主要 ORF の翻訳促進に関与することが示された。

ANAC082 mRNA のスプライスバリエーションには 5' 非翻訳領域に CPuORF を含まないスプライスバリエーションが存在し、5' 非翻訳領域のイントロンが植物種間で保存されていることから、核小体ストレス条件では選択的スプライシングにより *ANAC082* の CPuORF が除去されるという可能性が考えられた。この可能性を検証するために、シロイヌナズナの幼植物を核小体ストレスを誘導する薬剤で処理し、逆転写 PCR 解析により *ANAC082* のスプライスバリエーションの蓄積量の変化を調べた。その結果、核小体ストレスを誘導した場合には、5' 非翻訳領域に CPuORF を含まないスプライスバリエーションの蓄積量が増加することを見出した。このことから、核小体ストレス条件では、選択的スプライシングによって CPuORF が除去された *ANAC082* mRNA が生産され、それにより主要 ORF からの *ANAC082* 転写制御因子の発現が誘導されることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Aibara I., Hirai T., Kasai K., Takano J., Onouchi H., Naito S., Fujiwara T., and Miwa K. (2018)

Boron- dependent translational suppression of the borate exporter BOR1 contributes to the avoidance of boron. *Plant Physiol.* 177:759-777. DOI: 10.1104/pp.18.00119 査読有

Hayashi N., Sasaki S., Takahashi H., Naito S., and Onouchi H. (2017) Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest.

Nucleic Acids Res., 45:8844-8858. DOI: 10.1093/nar/gkx528 査読有

Tanaka M., Sotta N., Yamazumi Y., Yamashita Y., Miwa K., Murota K., Chiba Y., Hirai M.Y.,

Akiyama T., Onouchi H., Naito S., and Fujiwara T. (2016) The minimum open reading frame,

AUG-stop, induces boron-dependent ribosome stalling and mRNA degradation. *Plant Cell*,

28:2830-2849. DOI: 10.1105/tpc.16.00481 査読有

〔学会発表〕(計16件)

Shun Sasaki, Rin Kudo, Daiki Sasahara, Hiro Takahashi, Shun Watanabe, Iwai Ohbayashi, Munataka Sugiyama, Satoshi Naito, Hitoshi Onouchi “Nucleolar stress promotes expression of *Arabidopsis ANAC082*, a nucleolar stress response mediator, by inducing alternative splicing that removes an inhibitory upstream open reading frame” Post-transcriptional Gene Regulation in Plants (PGRP) 2019, 2019

Noriya Hayashi, Shun Sasaki, Yuta Hiragori, Zhihang Feng, Toru Fujiwara, Hiro Takahashi, Yui Yamashita, Satoshi Naito, Hitoshi Onouchi “Translation complexes containing a uORF-encoded nascent peptide sense cellular magnesium concentration to regulate translation” Post-transcriptional Gene Regulation in Plants (PGRP) 2019, 2019

佐々木駿, 工藤凜, 笹原大暉, 高橋広夫, 渡部俊, 大林祝, 杉山宗隆, 内藤哲, 尾之内均
「選択的スプライシングと上流ORFによる翻訳制御を介した植物の核小体ストレス応答機構」第60回日本植物生理学会年会, 2019年

Hiro Takahashi, Noriya Hayashi, Anna Takahashi, Hitoshi Onouchi, Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for functional small peptides on genomes, The 2nd edition of Biotech France 2018, International Conference and Exhibition -Biotech France 2018-, 2018

佐々木駿、工藤凜、渡部俊、大林祝、杉山宗隆、刑部祐里子、刑部敬史、内藤哲, 尾之内均
「核小体ストレスにตอบสนองして翻訳を制御するシロイヌナズナ *ANAC082* 遺伝子の上流ORF」第59回日本植物生理学会年会, 2018年

梅原俊一、木俣薫織、戸田智美、遠洞弥生、大角有里沙、蝦名績、内藤哲, 尾之内均「維管束形成を司る *LONESOME HIGHWAY* 遺伝子の上流ORFが介する翻訳制御とmRNA分解制御」第59回日本植物生理学会年会, 2018年

垣内俊哉、伊藤正樹、高橋広夫、刑部祐里子、刑部敬史、内藤哲, 尾之内均「シロイヌナズナ *AtTTM3* 遺伝子の上流ORFは後期促進複合体の構成因子をコードする」第59回日本植物生理学会年会, 2018年

Iwai Ohbayashi, Shun Sasaki, Chung-Yi Lin, Naoki Shinohara, Yoko Matsumura, Yasunori Machida, Gorou Horiguchi, Hirokazu, Tsukaya, Masahiko Furutani, Hitoshi Onouchi, and Munetaka Sugiyama
“A Critical Role of the NAC transcription Factor ANAC082 in Ribosomal Stress Signaling of Plant Cells” 第59回日本植物生理学会年会シンポジウム, 2018年

佐々木駿, 工藤凜, 渡部俊, 杉山宗隆, 刑部祐里子, 刑部敬史, 内藤哲, 尾之内均「核小体ストレスにตอบสนองして翻訳を制御するシロイヌナズナ *ANAC082* 遺伝子の上流ORF」第40回日本分子生物学会年会, 2017年

高橋広夫, 井手迫伸夫, 林憲哉, 尾之内均, 伊藤素行「配列データベース横断解析に基づくタンパク質の翻訳制御配列の網羅同定法開発」化学工学会第49回秋季大会シンポジウム, 2017年

林憲哉, 佐々木駿, Zhihang Feng, 藤原徹, 内藤哲, 尾之内均「リボソームの停滞を引き起こす新規被子植物 uORF の同定」, 第58回植物生理学会年会, 2017年

高橋広夫, 林憲哉, 内藤哲, 尾之内均「網羅的に観測された転写産物の横断解析に基づく機能性 ncRNA 領域の同定法開発」第48回化学工学会秋季大会シンポジウム, 2016年
尾之内均, 林憲哉, 梅原俊一, 木俣薫織, 高橋広夫, 内藤哲「ペプチド配列依存的に遺伝子発現を制御するシロイヌナズナの上流 ORF の探索と制御機構の解析」日本遺伝学会第88回大会ワークショップ, 2016年

高橋広夫, 林憲哉・尾之内均「種間で保存された上流 ORF 同定のための配列データベース横断解析法の開発と動植物ゲノムへの応用」日本遺伝学会第88回大会ワークショップ, 2016年

Noriya Hayashi, Hiro Takahashi, Satoshi Naito, Hitoshi Onouchi "Identification of Arabidopsis thaliana upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest.", The 2016 Joint Annual Meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/arabi/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：林 憲哉
ローマ字氏名：(HAYASHI, noriya)

研究協力者氏名：梅原 俊一
ローマ字氏名：(UMEHARA shun-ichi)

研究協力者氏名：佐々木 駿
ローマ字氏名：(SASAKI, shun)

研究協力者氏名：笹原 大暉
ローマ字氏名：(SASAHARA, daiki)

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。