

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14746

研究課題名(和文) 機能的リボソーム-オミクス(リボソモミクス)の創成：翻訳停止機能からのアプローチ

研究課題名(英文) Starting up the functional ribosome-omics (ribosomomics): an approach from the translation arrest

研究代表者

内藤 哲 (NAITO, Satoshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20164105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナにおいて、リボソームタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれに2-4個のパラログ遺伝子が見いだされており、ほとんどの場合、コードするアミノ酸配列には1-数%の違いが見られる。植物のもつリボソームの多様性が、細胞内環境に应答する方策である可能性を、特定の条件に应答した翻訳停止の解析と、既報の網羅的解析データより探った。既報のトランスクリプトームデータの解析の結果、ストレス処理によりパラログ遺伝子の発現レベルが変化していることが見出された。リボソーム粒子においてパラログが変化しているかどうかは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：In Arabidopsis, ribosomal protein genes are consisted of two to four paralogs, and, in most of the cases, the difference in the encoded amino acid sequences is one to several percent from each other. The possibility that these differences are plants' strategy to cope with the changing environmental conditions was explored by analyzing ribosome stalling under specific condition as well as analysis of published transcriptome data. The latter analysis showed that expression levels of paralogous genes change depending on the stress conditions. Whether the paralogous subunit proteins are functioning in the ribosome particles is yet to be studied.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム 多様性 ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

かつて、リボソームは mRNA に書き込まれた遺伝情報を忠実にタンパク質のアミノ酸配列に翻訳するためだけの装置であると考えられてきた。しかしながら、近年の研究により、リボソームは細胞内の状態を機敏に感知して、特定の mRNA の翻訳を止めたり、さらには、その mRNA を分解に導く、情報処理装置であることがわかってきた(解説:「止まって働くリボソーム: 新生ペプチドが司る植物の細胞内恒常性維持機構」, 化学と生物, 54: 191-197, 2016)。

リボソーム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過してリボソームの外に出る。出口トンネルは約 100 Å の長さがあり、新生ペプチドの最後の 30-40 アミノ酸残基が入る。出口トンネルの内壁は大部分が rRNA で覆われているが、リボソームタンパク質の RPlL4 と RPlL22 がトンネル内に突き出した「狭窄部位」がある。大腸菌では新生ペプチドの特異的なアミノ酸配列が狭窄部位と相互作用して翻訳停止の誘導に関与することが、*tnaC* と *secM* 遺伝子で報告されている (Mol. Cell, 40: 138-146, 2010)。

高等植物のメチオニン生合成の鍵段階を触媒するシスタチオニン-シンターゼ (CGS) をコードするシロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子の発現は、翻訳停止と共役した mRNA 分解によって制御される (Science, 286: 1371-1374, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 10225-10230, 2003)。*CGS1* の N 末端近傍にコードされる「MTO1 領域」と名付けた十数アミノ酸残基の領域のアミノ酸配列がシスに機能し、メチオニンの直接の代謝産物である S-アデノシルメチオニンに反応して、*CGS1* mRNA を翻訳中のリボソームは MTO1 領域直後のセリン-94 のコドンで翻訳を一時停止し (Genes Dev., 19: 1799-1810, 2005)、ペプチド転移反応が強く抑えられる (J. Biol. Chem., 289: 12693-12704, 2014)。

リボソーム出口トンネルには 30-40 アミノ酸残基が収容されることから、このとき MTO1 領域を含む *CGS1* 新生ペプチドは出口トンネル内に存在することになる。翻訳停止したリボソームにおいて MTO1 領域を含む *CGS1* 新生ペプチドは、出口トンネル内で縮んだコンフォメーションを取る。一方、大サブユニットの 26S rRNA にも、出口トンネル狭窄部位近傍、およびペプチド転移反応の活性中心の近傍でコンフォメーション変化が観察される (J. Biol. Chem., 286: 14903-14912, 2011)。このようなリボソームと *CGS1* 新生ペプチ

ドの複合体において、*CGS1* mRNA は停止したリボソームの 5'末端近くで分解を受ける (J. Biol. Chem., 289: 12693-12704, 2014)。

## 2. 研究の目的

真核生物のリボソームは、大サブユニットに約 49 種類、小サブユニットに約 34 種類のリボソームタンパク質を持つ。大腸菌においては、リボソームタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれに 1 個ずつ存在しており、したがって、細胞内のリボソームは、リボソームタンパク質から見る限り 1 種類である。これに対して、パン酵母では、およそ 75% のリボソームタンパク質について 2 個のパラログ遺伝子が存在し、植物では、ほとんどのリボソームタンパク質について、それぞれ 2 個から数個のパラログ遺伝子の存在が知られている。一方、ヒトを含めた脊椎動物では、複数のパラログ遺伝子を持つサブユニットはごく少数であり、ほとんどのリボソームタンパク質について 1 個ずつの遺伝子がコードしている (Ribosomal Protein Gene Database; <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp>)。

シロイヌナズナにおいては、リボソームタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれに 2-4 個が見いだされており、ほとんどの場合、コードするアミノ酸配列には 1-数% の違いが見られる。単純計算すると、リボソーム粒子の分子種は、 $2 \times 10^{33}$  種類という、天文学的な数字になる。一方、真核生物の細胞内のリボソーム粒子は、生物種、組織、細胞により、様々な数字が見積もられているが、概して、数百万個から数十億個と見積もられている。したがって、植物細胞内のリボソーム粒子は全てが、異なる遺伝子に由来するタンパク質からなる可能性すら考えられる。

それでは、脊椎動物と異なり、植物が多様なリボソームを持つことを、どう考えたらよいのだろうか? 動くことのできない植物は、環境変化に対して機敏に反応する必要がある。リボソームによる翻訳段階での遺伝子発現制御は、転写段階での制御に比べて、より機敏に反応することができるだろう。さらに、翻訳の場は細胞質内であり、*CGS1* 遺伝子で明らかになったように、リボソームは細胞質の状態を検知して反応することが可能である。こうした考察から、植物が持つリボソームの多様性は、様々な細胞内環境に反応するためにあらかじめ用意しているのではないかと考えた。

なお、ヒトをはじめとした脊椎動物に比べて、植物におけるリボソームの研究は遅れていると言わざるを得ず、植物で複数のパラロ

グ遺伝子が存在するというのは、実は、偽遺伝子（シュードジーン）を数えているのではないかという疑念は拭えない。しかしながら、少なくとも、シロイヌナズナのいくつかのリボソームタンパク質のパラログ遺伝子について調べたところ、いずれもパラログ遺伝子が発現していることを確認している。

### 3. 研究の方法

上記の仮説を検証する具体的な方策を考えると、雲をつかむような話である。そこで、本研究では、この仮説を検証する第一歩として、我々がこれまでに行ってきたシロイヌナズナにおけるリボソームの翻訳停止からのアプローチ、およびバイオフィーマティクスによるアプローチを行うこととした。

出口トンネルの狭窄部位を形成するリボソームタンパク質の RPuL4 と RPuL22 には、シロイヌナズナでそれぞれ 2 つのパラログ遺伝子が存在する。RPuL4 タンパク質には、RPuL4A と RPuL4D の 2 つのパラログ遺伝子が存在し、407 アミノ酸残基のうちの 19 アミノ酸残基が異なっている。RPL4A のノックアウト株は致死であり、一方、RPL4D のノックアウト株は生育可能である。また、RPuL22 タンパク質には、RPuL22A と RPuL22B の 2 つのパラログ遺伝子が存在し、175 アミノ酸残基のうちの 6 アミノ酸残基が異なっている。

我々は、シロイヌナズナの芽生えから誘導した液体カルス培養を出発材料とした、シロイヌナズナ試験管内翻訳系を開発している（*Plant Cell Physiol.*, 52: 1443-1453, 2011）。一般に、植物の細胞は、様々な分解酵素を多量に含む液胞が発達しており、そのまま抽出液を調製したのでは、試験管内翻訳系として使用できない。植物における試験管内翻訳系としては、液胞が未発達なコムギ胚芽抽出液が用いられる所以である。我々の開発したシロイヌナズナ試験管内翻訳系では、カルスをプロトプラスト化したのち、パーコール密度勾配遠心により液胞を除去した脱液胞化プロトプラストの破砕液を用いることで、この問題を回避しており、トランスジェニック・シロイヌナズナや変異株を用いて、試験管内翻訳系での解析を行うことが可能である。この実験系を用いて、*S*-アデノシルメチオニンに応答した *CGSI* mRNA の翻訳停止にターゲットを絞った解析を行う。

RPuL4D のノックアウト株に、タグをつけた *RPL4D* 遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナ株、および RPuL22A のノックアウト株に、タグをつけた RPuL22B 遺伝子を導入したトランスジェニック・シロ

イヌナズナ株を用いた試験管内翻訳系での解析を行う。*CGSI* mRNA の翻訳における *S*-アデノシルメチオニンに応答した翻訳停止効率を比較することで、パラログの違いによる翻訳停止に対する効果を評価する。

これと並行して、バイオフィーマティクスによる解析を行う。既存のトランスクリプトーム解析データについて、リボソームタンパク質遺伝子のデータを抽出し、各トランスクリプトーム解析データにおける処理の違いによるパラログ遺伝子の mRNA 発現量の変化を調べる。リボソーム粒子の半減期は数日のオーダーであると見積もられているので、長時間の処理による変化に注目する。

### 4. 研究成果

#### (1) 翻訳停止の解析

RPuL4D のノックアウト株に、タグをつけた RPuL4D 遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナ株、RPuL22A のノックアウト株に、タグをつけた RPuL22B 遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナ株、および野生型株から調製したシロイヌナズナ試験管内翻訳系を用いて、*CGSI* mRNA の翻訳における *S*-アデノシルメチオニンに応答した翻訳停止効率の測定を行なった。前者のトランスジェニック株は、野生型の RPuL4A 遺伝子とタグ付きの RPuL4D 遺伝子を発現しており、後者のトランスジェニック株は、野生型の RPuL22B 遺伝子とタグ付きの RPuL22B 遺伝子を発現している。前者はタグをつけたことによるタグの付加によるアーティファクトの有無の評価のためのものであり、野生型株と違いが見られないことを期待し、後者では違いが見られることを期待した。

いずれのトランスジェニック・シロイヌナズナ株でも、野生型株と有意差水準 1% でも翻訳停止効率に違いは検出されなかった。タグによる免疫沈降を行い、それぞれ、RPuL4D および RPuL22B をもつリボソームを濃縮した後に翻訳停止効率を測定したが、いずれのトランスジェニック・シロイヌナズナ株でも野生型シロイヌナズナ株との間で統計的に有意な違いは検出されなかった。

本解析では、*CGSI* mRNA の翻訳における *S*-アデノシルメチオニンに応答した翻訳停止に関して、RPuL22A と RPuL22B でのパラログ間での違いは検出できなかった。翻訳停止を引き起こす遺伝子は *CGSI* の他にもすでにいくつか報告があり、解析対象とする遺伝子を増やした解析が必要であろう。また、本研

究ではパラログのうちの1つにタグをつけた遺伝子を持つシロイヌナズナ株を用いたが、各パラログに個別にタグをつけた株、さらには、本研究で着目した翻訳停止に限らず、リボソームの翻訳機能自体に着目した解析も有効であろう。

翻訳停止効率による評価に代わり、ターゲット遺伝子を絞ったリボソームフットプリント法による翻訳停止の解析を行うための方法論の検討を行なった。イルミナなどの次世代シーケンサーは、短い配列を平行して大量に解析するのが得意としており、グローバルな発現解析には適している。しかしながら、特定の遺伝子を対象とした解析では、1回の次世代シーケンサーによる解析で得られるギガ・オーダーのデータは必要としない。1つの遺伝子について、1万~10万個のデータが得られれば、実験区/対照区間の十分な比較ができると考えられるので大きな無駄が生じる。次世代シーケンサーでも、「バーコード」配列で区別することにより、複数のサンプルを同時に解析することは可能であるが、10万個で十分なデータをギガ・オーダーで同時に解析するためには、1万種類以上のバーコード配列で区別しない限りは無駄が生じることになる。

そこで、第3世代シーケンサーとも呼ばれるミナイオンを用いた解析の手法を探った。これは、次世代シーケンサーよりリード数のパフォーマンスは、はるかに少ないが、10 kb以上の長い配列情報を取得するのに優れている。20~100塩基の配列をバーコードをはさんでつなぐことで、最適なパフォーマンスを得る条件を探った。連結部位の制限酵素類の認識塩基配列の検討、ならびに環状化を防いで10 bp以上の長い配列につなぐためのライゲーションの条件検討を行なった。後者については、3~5 kbの長さで中央値をもつライゲーションの条件を得ることが出来た。前者については、長くつなげることと両立する条件の取得には至っていないが、ターゲット遺伝子を絞った解析において、次世代シーケンサーと同程度のパフォーマンスを得る条件を見いだすことができたと考えられる。

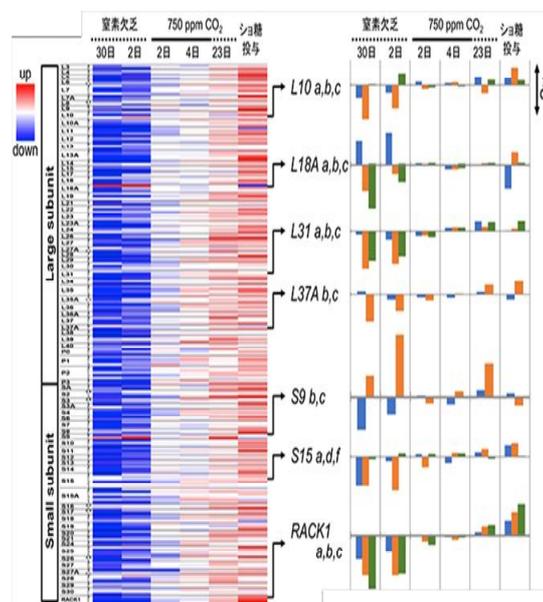
## (2) バイオインフォマティクスによる解析

広く、シロイヌナズナのリボソームタンパク質遺伝子のパラログについて調べるため、既報のトランスクリプトーム解析データについて、リボソームタンパク質遺伝子のデータを抽出し、各解析における処理によるパラログ遺伝子のmRNA発現量の変化を調べた。

まず、我々が行ったものを含めていくつかのトランスクリプトーム解析結果を調べて、実際に発現している遺伝子であることを確認した。その上で、リボソームの半減期が数日以上と考えられていることに鑑み、1週間以上の処理を行った解析データについて調べた。

その結果、多くのリボソームタンパク質遺伝子において、特定のパラログ遺伝子の発現量が多い傾向が見られた。また、様々なストレス処理により、パラログ間で発現量の増加や減少が見られた。

窒素欠乏処理を行った解析データでは、例えば、RPL18Aの3個のパラログのうちの一つの発現が上昇するのに対して、残りの2つの発現は減少する。同様の変化は、RPL10, PRL31, RPL37A, PLS9, RPS15, RACK1(最近になってRACK1は小サブユニットの構成サブユニットと認識された)などでも観察され、2倍以上の変化が観察されたパラログも存在した。



植物において、根から吸収する窒素と、光合成により獲得する炭素の栄養バランスは発生・分化・成長を制御する重要なファクターであり、例えば、芽生えに高濃度のグルコースを投与すると成長が著しく阻害されるが、窒素栄養を過剰に与えることで、その効果は緩和される。そこで、上記の窒素欠乏に対する各パラログ遺伝子の応答を、高濃度の二酸化炭素処理での解析結果と比較した。

高濃度(750 ppm)CO<sub>2</sub>処理を行ったデータでは、窒素欠乏処理に比べると変化量は小さいものの、RPL31, RPL37A, RACK1などで、いずれのパラログ遺伝子もその発現が、窒素欠乏処理とは逆転しており、RPL10, RPS9,

RPS15 などでは、一部のパラログの発現が逆転していた。また、短期間の処理ではあるが、ショ糖投与の実験では、一部のパラログ遺伝子で、さらに大きな変化が見られた。これらのことは、炭素・窒素の栄養バランスの重要性を考えると興味深い。また、全般的に、処理時間が長くなるにつれて変化も大きくなる傾向が見られ、実際にリボソームタンパク質を構成するパラログを変化させていることを想起させた。

様々な処理によりパラログの発現量が変化するリボソームタンパク質サブユニットには、共通しているものがいくつか見出されたが、リボソーム粒子における位置関係、あるいは既知の機能等との関係は見出されなかった。ただし、大サブユニットと、小サブユニット別に各サブユニットを比較すると、大サブユニットの方が変化が大きい傾向があった。

本研究では、各サブユニットのパラログ遺伝子について、mRNA レベルでの発現の変化を調べたが、ストレス処理等によりパラログ間で発現が異なった変化をすることが見えてきた。この違いが、リボソームタンパク質の蓄積量の違いに反映されているか否か、さらには、実際にリボソーム粒子のレベルでパラログの構成が変化しているか否かは、今後の課題である。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

- (1) Takamatsu, S., Ohashi Y., Onoue, N., Onouchi, Y., Yamashita, Y., Naito, S.: Arabidopsis ribosomal protein uL4 modulates translation activity of ribosomes via interactions with growing nascent polypeptides. 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月28日-30日, 日札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- (2) Takamatsu, S., Miura, Y., Ohashi Y., Onoue, N., Yamashita, Y., Onouchi, Y., Naito, S.: Ribosomal exit tunnel regulates gene expression via ribosome stalling upon translation in Arabidopsis. 第58回日本植物生理学会年会, 2017年3月16日-18日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)  
取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ  
<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/arabi/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
内藤 哲 (NAITO Satoshi)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 20164105

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

高松 世大 (TAKAMATSU Seidai)  
三浦 弓佳 (MIURA Yuka)