

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06278

研究課題名(和文) AUG-UAAを介したリボソーム停滞のホウ素栄養制御機構

研究課題名(英文) Boron nutrient mechanism of ribosome stalling via AUGUAA sequence

研究代表者

田中 真幸 (Tanaka, Mayuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：80546292

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)：本研究では、5'非翻訳領域に存在する開始コドン-終始コドンという、アミノ酸をコードしない配列AUG-UAA上でホウ素依存的にリボソームの翻訳停滞が起こる仕組みを明らかにすることで、これまでにないリボソームの停滞制御機構を解明することを目的とした。低温電子顕微鏡によるリボソームの構造解析と生化学実験から、ホウ素はAUG-UAAのストップコドンで翻訳終結する際にリボソームのAサイトに結合する翻訳終結因子eRF1を安定化させ、ペプチドの加水分解を促すことで、翻訳終結を促進することに働いていることが示唆された。また、スクリーニング解析により、NIP5;1の発現制御に関わる因子をみつけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、開始コドンと終止コドンしかない最小ORFはペプチドが無く、機能を持つとは考えられてこなかった。しかし、申請者の研究から、AUG-UAAを介したホウ素濃度依存的なリボソーム停滞による翻訳制御機構が明らかになった。この制御は、リボソームを停滞させ、翻訳を止める仕組みではなく、AUG-UAAでの翻訳を終結させるために、ホウ素が補助因子として関わっている、これまでにない新しい翻訳終結の仕組みであった。この発見は、タンパク質合成は実は翻訳終結の段階で様々な化合物によって制御されている可能性を示唆するものである。申請者の発見はタンパク質の翻訳制御機構に新たな分野を拓いたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to reveal the mechanism of boron-dependent ribosomes stalling on the non-amino acid coding sequence AUG-UAA, the initiation codon - stop codon in the 5' untranslated region. By combining structural analysis of ribosomes by cryo-electron microscopy with biochemical experiments, it was suggested that boron stabilizes the translation termination factor eRF1, which binds to the A site of ribosomes during translation termination step at the stop codon of AUG-UAA, and promotes peptide hydrolysis, thereby facilitating translation termination. In addition, I found factors involved in the regulation of NIP5;1 expression by screening analysis.

研究分野：農学

キーワード：リボソーム ホウ素 uORF AUGUAA mRNA分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボソームは mRNA を鋳型とし、タンパク質を合成する、「翻訳」を担う装置というだけでなく、細胞内の状態を感知し、遺伝子発現を巧みに制御する装置であることが明らかになっている。近年、低分子化合物依存的に、翻訳途上のペプチド鎖とリボソーム内部のペプチド鎖の通り道（出口トンネル）が相互作用し、遺伝子発現を制御する仕組みが様々な生物で見つっている。モデル植物、シロイヌナズナのホウ素輸送体 *NIP5;1* の発現制御は 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に存在する AUG-UAA 配列でのホウ素依存的なリボソーム停滞とそれに伴う mRNA 分解で制御されている。これは、開始コドン-終始コドンという、アミノ酸をコードしない配列を介してリボソームがホウ素濃度を感知し、その発現を制御する、ペプチド鎖を介さない新しい制御機構の発見であった(図 1)。

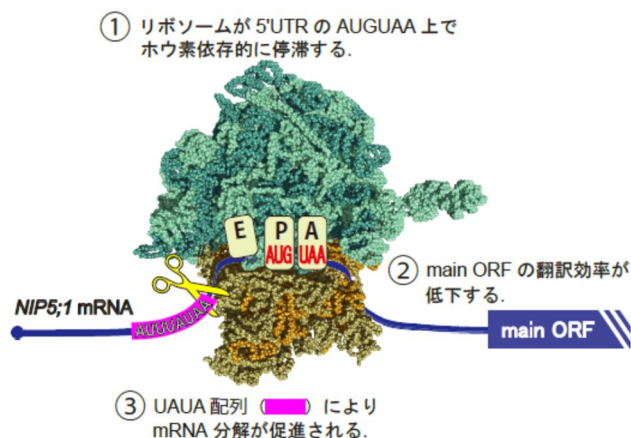


図 1 .AUG-UAA 上で停滞しているホウ素依存的なリボソーム停滞の仕組み。

リボソームが *NIP5;1* の 5' UTR の AUGU-UAA 上で停滞する。

main ORF の翻訳効率の低下が起こる。

AUG-UAA より 12-17 塩基上流の UUAU 配列により mRNA が切断される。

tRNA 結合部位：アミノアシル tRNA(A)、ペプチジル tRNA (P)、デアシル tRNA(E)

2. 研究の目的

本研究では、どのように AUG-UAA 配列を介してホウ素依存的にリボソームが停滞するのかを解明し、ペプチド鎖を介さないリボソーム停滞制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では AUG-UAA を介したホウ素依存的なリボソーム停滞が起こるメカニズム、また、それに関わる因子を同定することを目的とし、3つの項目を柱に、*NIP5;1* のホウ素依存的な制御機構の解明を目指した。

1) 低温電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた、AUG-UAA で停滞しているリボソームの構造解析。

2) 光活性化ボロン酸を用い、光反応によりボロン酸と結合しているタンパク質の特定。

3) 変異体を用いたスクリーニングによる、*NIP5;1* の翻訳及び mRNA 分解に関わるターゲット因子の同定とその機能解析。

4. 研究成果

1) リボソームの構造解析

まず、AUG-UAA 上で停滞しているリボソーム mRNA 複合体を精製するための実験系の確立を目指した。*NIP5;1* 5' UTR の AUG-UAA を含む 60 塩基の RNA の下流に DNA-ピオチンを付加した、キメラ RNA-DNA-ピオチンを合成し、小麦胚芽抽出液に加え、*in vitro* 翻訳を行った。翻訳後、ストレプトアビジンビーズによって、キメラ RNA-DNA-ピオチンを回収し、洗浄を行った。この洗浄のステップにおいて、カラム (Chroma-Spin + TE-30 columns) を使うことにより、夾雑物を効率よく取り除くことが出来るようになり、均一の 80S リボソーム複合体を得ることに成功した。その結果、Cryo-EM を用いた、リボソーム-の立体構造の分解能が上昇し 3-4Å の構造を取得することに成功した。この分解能はリボソームの構造の細部を確認するのに十分な分解能であった。

続いて、リボソームの構造を解析した結果、ホウ素存在下において、リボソームの P サイトには initiator tRNA が、A サイトには翻訳終結因子 eRF1 が結合し、翻訳終結段階の、ペプチド鎖が加水分解される段階の構造が観察された(図 2)。ホウ素非存在下においても AUGUAA 上でリボソームはホウ素存在下よりも少ないながらも停滞していることがこれまでの生化学実験で示されていることから、ホウ素非存在下でのリボソームに関しても構造解析を行った。結果、リボソームの P サイトには initiator tRNA が結合していたが、A サイトの eRF1 のクライオ密度はかなり低かった。ホウ素非存在下ではリボソームの A サイトには eRF1 がほとんどいないか、あるいは、eRF1 は A サイトに結合しているが、フレキシブルに動いて Cryo-EM では検出できなかった可能性が考えられた。そこで、ウェスタンブロットングによって eRF1 を検出したところ、ホウ素非存在下であっても、リボソームの A サイトには eRF1 が結合していることが示唆さ

れた。つまり、ホウ素非存在下の場合では、eRF1はAサイトで安定的に結合できず、ふらふらとしており、ホウ素は、AサイトにeRF1を翻訳終結段階の、ペプチド鎖が加水分解される段階で安定的に結合させ、リボソームの停滞を導いていることが示唆された。次に、AUG-UAA上で停滞しているリボソームのinitiator tRNAの加水分解速度を検証した。その結果、initiator tRNAの加水分解はホウ素存在下の方が非存在下よりも早いことが示された。これらの結果を総合すると、ホウ素は、AサイトにeRF1を翻訳終結段階の、ペプチド鎖が加水分解される段階で安定的に結合させることで、加水分解を促進させ、AUG-UAAの翻訳終結を促す働きがあると推察された。ホウ素がAサイトにeRF1を安定的に結合させることが、リボソームの一時停滞を引き起こしていたと考えられる。一方ホウ素非存在下では、加水分解が起こりにくく、翻訳終結がAUG-UAA上では起こりにくい。その後、リボソームの下流へのスキャンングが開始され、やがてmain ORFの開始コドンから翻訳が始まると考えられた。

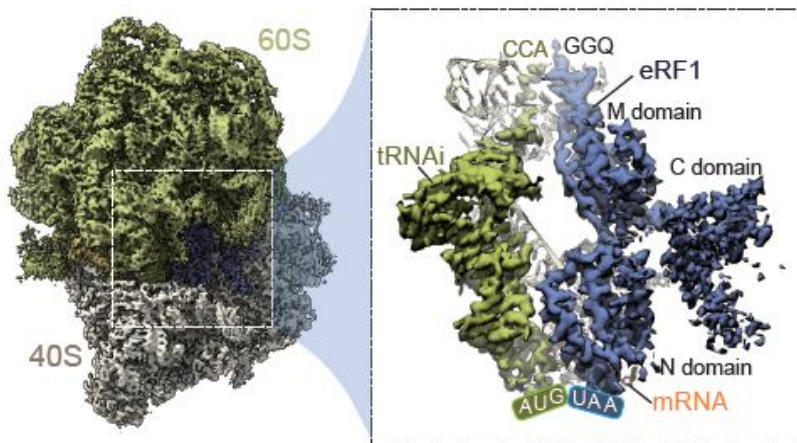


図 2. Cryo-EM によるリボソーム構造の再構築画像

左パネル: ホウ素存在下の80S リボソーム複合体の3D再構築画像

右パネル: P サイト、A サイトに結合しているinitiator tRNA と eRF1 を抽出した画像

2) 光活性化ボロン酸を用いた、ボロン酸と結合しているタンパク質の解析

Cryo-EM ではホウ酸が小さすぎるため、リボソームのどの部分と結合しているのかを確認できなかった。光活性化ボロン酸(photoaffinity boronic acid: PABA)は、光反応によってボロン酸とその結合しているタンパク質との間で共有結合を形成することができる。Click chemistry 反応により、タグを結合させることで標的タンパク質を精製することが可能となる。そこで、PABP を用いて、ホウ素と結合するタンパクの特定を目的とした。これまで数種類のボロン酸を用い、ボロン酸依存的な *NIP5;1* の発現制御の予備実験を行ってきた。結果、trans-1-heptenylboronic acid がホウ酸よりは少し応答性は弱い、ボロン酸依存的な発現制御が観察されていた。しかしながら、ボロン酸にはホウ酸がコンタミとして混じっている可能性があるため、追試実験によりホウ酸のコンタミの可能性を検討した。結果、実験回によってかなりのバラつきを生じ、結論まで至らなかった。そのため、PABA 存在下でリボソームの精製を行い、標的タンパク質の特定を行うまでを終えることが出来なかった。今後、ボロン酸でも *NIP5;1* の発現の抑制が起こることを確定する実験をする必要がある。

3) AUG-UAA 配列を介したホウ素依存的なリボソーム停滞に伴う発現制御に関する因子の同定

これまで、5' UTR を含む *NIP5;1* に GFP を付加させた形質転換植物を変異原処理し、GFP 蛍光を指標とした変異株の選抜を行ってきた。現在まで、2 つの候補遺伝子を同定し解析を進めていた。これらの変異株の原因遺伝子は、*NIP5;1* の mRNA 分解、翻訳制御にそれぞれ関与する遺伝子である可能性が次世代シーケンズとマッピングの結果から明らかとなっていた。そこで T-DNA 挿入変異株を用いた *NIP5;1* のホウ素依存的な発現制御に関する実験や、相補実験の結果、*NIP5;1* の mRNA 分解に関わる遺伝子は *CTC-INTERACTING DOMAIN 7 (CID7)*、翻訳に関わる遺伝子は、*Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF5A-2)* であることが示唆された。*CID7* は smr ドメインを持ち、DNA 及び RNA を分解する機能を持つことが知られている。この smr ドメインの中で RNA 分解に関与するモチーフに変異を導入した形質転換植物 (ProCID7-sGFP-CID7) を *cid7* の T-DNA 挿入株に導入し、*NIP5;1* の mRNA 蓄積を観察した。*cid7* の T-DNA 挿入株では、野生型 (Col-0) に比べて、ホウ素応答性が弱まり、全体的に発現がホウ素に関わらず高まる傾向を示す。一方、smr を野生型に持つ形質転換植物では、野生型と同様のホウ素応答性に回復し、発現も野生型と同じレベルまで戻っていた。しかし、smr に変異を持つ形質転換植物では、*cid7* の T-DNA 挿入株と同様にホウ素応答性は弱いままであり、また、全体的に発現が高まる傾向を示した。この結果、*CID7* の smr ドメインはホウ素依存的な *NIP5;1* の mRNA 蓄積に関わっていることを示した。これは *CID7* がホウ素依存的に AUG-UAA 上で停滞したリボソームの mRNA を切断するエンドヌクレアーゼである可能性を示唆している。一方、*eIF5A* は酵母や動物では、ポリプロリンやレアコドン上でペプチド転移がうまく行われず、翻訳が停滞している際の、ペプチド転移を促す補助因子としての役割があることが知られ

ている。また最近では、*eIF5A* は一部の遺伝子のメイン ORF の翻訳終結の促進にも関わっていることが報告されている。これらのことから、*NIP5;1* の場合、AUG-UAA 上での翻訳終結に *eIF5A-2* が補助因子として関わっている可能性がある。

また、さらなるスクリーニングにより、新しい候補遺伝子が発見され、次世代シーケンスとマッピングの結果から、*NIP5;1* の翻訳制御に関わる遺伝子である可能性が示唆された。現在 T-DNA 挿入変異株を用いた実験などから、原因遺伝子の特定を行っている。

本研究により、全ての制御が明らかになってはいないものの、*NIP5;1* の AUG-UAA を介したホウ素依存的な発現制御の、いくつかの重要な因子を発見することができた。本研究は、*NIP5;1* のホウ素依存的な発現制御の全体像を知る上での大きな前進となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsednee Munkhtsetseg, Tanaka Mayuki, Kasai Koji, Fujiwara Toru	4. 巻 37
2. 論文標題 Boron dependent regulation of translation through AUGUAA sequence in yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 638 ~ 646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/yea.3526	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 MayukiTanaka, NaoyukiSotta, ToruFujiwara
2. 発表標題 Identification of genes involved in the regulation of NIP5;1 expression in response to boron in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第61回植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中真幸、反田直之、藤原徹
2. 発表標題 AUGUAA配列を介したNIP5;1mRNAのホウ素依存的翻訳制御に関するシロイヌナズナ遺伝子の同定
3. 学会等名 土壤肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 MayukiTanaka, TakeshiYokoyama, MadokaNishimoto, KengoTsuda, NaoyukiSotta, HidekiShigematsu, MikakoShirouzu, Takuhirou, ToruFujiwara
2. 発表標題 Structural analysis of boron-dependent ribosome stalling on the AUGUAA sequence
3. 学会等名 第62回植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------