

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02917

研究課題名（和文）上流ORFが関与する細胞環境感知機構の解明とゲノム育種への応用

研究課題名（英文）Elucidation of cellular environment-sensing mechanism involving upstream ORFs and its application to genome breeding

研究代表者

尾之内 均 (Onouchi, Hitoshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：50322839

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物のmRNAの5'非翻訳領域に存在する上流ORFと呼ばれる配列がタンパク質の発現制御に関与する場合がある。本研究では、植物のある遺伝子の上流ORFが翻訳された際に翻訳複合体がマグネシウム濃度を感知してタンパク質発現量を調節し、細胞内マグネシウム濃度の恒常性維持に関与することを見出した。また、植物のポリアミン合成酵素遺伝子では、通常とは異なる開始コドン（非AUG開始コドン）で始まる上流ORFがポリアミンに応答したフィードバック発現制御に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マグネシウムやポリアミンの細胞内濃度を感知して恒常性を維持するための新たな機構が発見された。マグネシウムは植物の生育に必要な多量要素の一つであり、ポリアミンは植物の環境ストレス耐性に関与することが知られている。したがって、本研究の発見は植物生理学や分子生物学の分野に学術的なインパクトを与えるだけでなく、将来的には栄養欠乏環境やストレス環境における作物の生育改善などの応用につながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Upstream open reading frames (uORFs) are elements found in the 5'-untranslated regions of eukaryotic transcripts that can affect translation of the downstream protein-coding sequences. In this study, we discovered that during translation of the uORF of an Arabidopsis gene, the translation complex containing the uORF-encoded nascent peptide directly senses magnesium to cause ribosome stalling, thereby repressing translation of the protein-coding sequence. Our results demonstrated that this magnesium-responsive translational regulation contributes to maintaining magnesium homeostasis in plant cells. Additionally, we identified a non-AUG-initiated uORF involved in the feedback regulation of the expression of a key enzyme of polyamine biosynthesis in plants.

研究分野：分子生物学

キーワード：上流ORF リボソーム ストレス応答 新生鎖

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の 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、同じ mRNA 上のタンパク質コード領域 (主要 ORF) の翻訳制御に関与する可能性がある。研究代表者のグループはこれまでに、被子植物において保存された配列を持つ uORF を探索し、その中からストレス、栄養状態、細胞分化状態など様々な細胞内環境に応答した翻訳制御に関与する uORF を見出した。しかし、それらの uORF が関与する翻訳制御において、細胞内環境がどのように感知されているかはわかっていなかった。また、AUG 以外の開始コドンで始まる uORF (非 AUG 開始型 uORF) についても被子植物間で保存された配列を持つものを探索し、その中から主要 ORF の翻訳に影響を与えるものを同定したが、それらの非 AUG 開始型 uORF がどのような細胞内環境に応答した翻訳制御に関与するかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、uORF が翻訳される際に細胞内環境がどのように感知され、それに応答してどのような機構で uORF が主要 ORF の翻訳を制御するのかを明らかにすることを目的とする。また、被子植物間で保存された配列を持つ非 AUG 開始型 uORF がどのような細胞内環境に応答した翻訳制御に関与するかを明らかにし、その翻訳制御機構を解明することも目的とする。

3. 研究の方法

(1)一過的発現系を用いた解析

uORF が介するマグネシウム(Mg)やポリアミンに応答した翻訳制御機構や、非 AUG 開始型 uORF が関与する翻訳制御機構の解析に一過的発現系を用いた。それらの解析を行うために、各 uORF 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) 遺伝子の間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または葉肉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、一定時間培養後に細胞を破碎してルシフェラーゼ活性を測定した。必要に応じて培養液の Mg 濃度を変えたり、ポリアミンを培養液に添加した。

(2)形質転換植物を用いた解析

核小体ストレス応答に関与する *ANAC082* 遺伝子の uORF が介する翻訳制御機構を解析するために、*ANAC082* 遺伝子の 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成した。その際に、導入遺伝子に野生型 uORF 含むものと開始コドンを欠く変異型 uORF を含むものをそれぞれ作成した。形質転換シロイヌナズナの幼植物を液体振盪培養し、核小体ストレスを引き起こすアクチノマイシン D あるいは小胞体ストレスを引き起こすツニカマイシンで処理した。処理後の植物の細胞抽出液を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、処理後の植物から RNA を抽出し、定量 PCR によりルシフェラーゼ mRNA 量を測定した。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、*ANAC082* 遺伝子が転写段階と翻訳段階でそれぞれのストレスに応答して制御にされる可能性を検討した。

(3)試験管内翻訳系を用いた解析

uORF が介する Mg に応答した翻訳制御において、uORF にコードされるペプチドを含む翻訳複合体が直接的に Mg を感知してリボソームを停滞させる可能性を検討するために、兵庫県立大学の今高寛晃博士と町田幸大博士より分与を受けたヒト因子由来の再構成型翻訳系を用いた。リボソームの停滞を検出するために、タグ配列を付加した uORF を再構成型翻訳系を用いて翻訳し、タグの抗体を用いたウエスタンブロット法により翻訳産物を解析した。リボソームが停滞した場合は、翻訳が完了していない状態のペプチジル tRNA が検出されることが期待される。

4. 研究成果

(1)マグネシウムに応答した翻訳制御に関する uORF

研究代表者はこれまでにシロイヌナズナにおいて、細胞内の Mg 濃度に応じて翻訳を制御する uORF を見出した。この uORF が翻訳される際に細胞内の Mg 濃度が高いと uORF でリボソームが停滞し、下流の主要 ORF の翻訳が抑制される。この Mg に応答したリボソームの停滞には、uORF の塩基配列ではなくアミノ酸配列が重要であることを以前に示した。

本研究では、この uORF にコードされるペプチドの中の Mg 応答に重要なアミノ酸残基を同定するために、様々なアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換して Mg 応答への影響を一過的発現系を用いて調べた。その結果、この uORF ペプチドの C 末端から 5 番目と 10 番目の残基が Mg に応答した翻訳制御に特に重要であることを明らかにした。一方、これらの残基に対応するコドンを同義置換した場合には Mg 応答への影響が見られなかったことから、これらのコドンの塩基配列ではなくアミノ酸残基が Mg 応答に重要であることが示された。また、uORF ペプチド配列

はシスに作用して主要 ORF の翻訳を抑制することを明らかにした。リボソームの停滞に uORF のアミノ酸配列が重要であることとこれらの結果を考えあわせると、uORF にコードされる新生ペプチド鎖がリボソームの出口トンネル内で働いて Mg に応答してリボソームを停滞させることにより主要 ORF の翻訳を制御することが示唆される。

さらに、翻訳反応に必要な因子のみを含む再構成型試験管内翻訳系を用いてその uORF を翻訳した場合にも、Mg に応答したリボソームの停滞を再現できることを明らかにした。このことから、uORF ペプチドを含む翻訳複合体が直接的に Mg を感知してリボソームを停滞させることが示唆された。また、ゲノム編集を用いてその uORF を破壊した植物の Mg 含有量を誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) 解析により測定したところ、野生型植物と比較して Mg 含有量の有意な増加がみられた。このことから、この uORF が介する Mg に応答した翻訳制御が細胞内 Mg 濃度の恒常性維持に寄与することが明らかとなった。この uORF によって翻訳が制御される主要 ORF は、液胞膜に存在する Mg 輸送体と相互作用するタンパク質をコードする。したがって、この翻訳制御において uORF ペプチドを含む翻訳複合体が細胞質の Mg 濃度を感知するセンサーとして働き、Mg 輸送体と相互作用するタンパク質の発現量を調節することによって細胞質 Mg 濃度の恒常性を維持していると考えられる。

(2)核小体ストレスに応答した翻訳制御に関与する uORF

核小体内でリボソーム生合成に異常が生じた場合に、それを感知した細胞は自身の増殖を抑制する。シロイヌナズナの *ANAC082* 遺伝子は、そのような核小体ストレス応答において重要な役割を担う転写因子をコードする。研究代表者のグループはこれまでに、核小体ストレスに応答した *ANAC082* の発現誘導に 5' 非翻訳領域に存在する uORF が関与することを見出した。一方、シロイヌナズナにおける *ANAC082* と最も相同性の高いホモログである *ANAC0103* は小胞体ストレス応答に関与しており、小胞体ストレスに応答して転写段階で発現が誘導されることが知られている。本研究では、*ANAC082* の発現は核小体ストレスに応答して誘導されるが、転写段階と翻訳段階のいずれにおいても小胞体ストレスには応答しないことが示された。また、*ANAC0103* の uORF は *ANAC082* の uORF とアミノ酸配列が部分的に似ているが、*ANAC082* uORF のようなアミノ酸配列依存的な翻訳抑制は引き起こさないことがわかった (Sasaki, Murakami, Yasumuro et al. 2023)。これらのことから、*ANAC082* と *ANAC0103* は進化の過程において別のストレス種に応答するように機能が分かれ、*ANAC0103* 遺伝子はプロモーター領域の上流に小胞体ストレスに応答して転写を活性化するシス調節配列を獲得した一方、核小体ストレスに応答して翻訳を促進するための uORF を失ったと考えられる。

(3)ポリアミンに応答した翻訳制御に関与する非 AUG 開始型 uORF

研究代表者のグループはこれまでに、進化的に保存された配列を持つシロイヌナズナの非 AUG 開始型 uORF の中から、下流の主要 ORF の翻訳に影響を与えるものを 4 つ同定した。そのうちのひとつの下流に存在する主要 ORF はポリアミン合成酵素をコードする。そこで、この非 AUG 開始型 uORF がポリアミンに応答した翻訳制御に関与する可能性を一過的発現系を用いて検討した。その結果、ポリアミンに応答した主要 ORF の翻訳抑制にこの非 AUG 開始型 uORF が関与することを明らかにした。さらに、非 AUG 開始型 uORF の開始コドンの下流に存在する RNA 二次構造がこの翻訳制御に必要であることを見出した。この非 AUG 開始型 uORF と RNA 二次構造が関与する翻訳制御は、植物細胞内でポリアミンが過剰に蓄積した場合に、ポリアミン濃度を適切な範囲内に維持する役割を担っていると考えられる。また、この翻訳制御では、特定のポリアミン分子種だけでなく様々なポリアミン分子種によってこの遺伝子の翻訳が抑制されることが示唆された。これらのことから、ポリアミンの正電荷が RNA 二次構造に影響を与えることによって翻訳効率が低下する可能性が考えられる。

(4) 他の非 AUG 開始型 uORF が関与する翻訳制御機構

これまでに同定した非 AUG 開始型 uORF のうちの 2 つでは、uORF のペプチド配列が植物間で広く保存されている。これらの 2 つの uORF のペプチド配列の中で翻訳制御に重要な アミノ酸残基の同定を行い、それぞれ C 末端側の 8 アミノ酸および 15 アミノ酸の領域が重要であることを見出した (Hiragori et al. 2023)。

もう一つの非 AUG 開始型 uORF は塩基配列は進化的に保存されているが、ペプチド配列は保存されていない。しかし、この非 AUG 開始型 uORF と主要 ORF の間には、植物間で広く保存された配列を持つ AUG 開始型 uORF が存在する。この非 AUG 開始型 uORF による翻訳促進機構を明らかにするために、この非 AUG 開始型 uORF と AUG 開始型 uORF の役割を一過的発現系を用いて解析した。その結果、AUG 開始型 uORF にコードされるペプチドは主要 ORF の翻訳を抑制し、非 AUG 開始型 uORF は AUG 開始型 uORF による翻訳抑制効果を緩和することによって主要 ORF の翻訳を促進することが明らかになった (Hiragori et al. 2023)。

References

- Sasaki S, Murakami T, Yasumuro M, Makita A, Oi Y, Hiragori Y, Watanabe S, Kudo R, Hayashi N, Ohbayashi I, Sugiyama M, Yamashita Y, Naito S, and Onouchi H. (2023) Upstream open reading frame-mediated upregulation of ANAC082 expression in response to nucleolar stress in Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, 40:21-30.
- Hiragori Y, Takahashi H, Karino T, Kaido A, Hayashi N, Sasaki S, Nakao K, Motomura T, Yamashita Y, Naito S, and Onouchi H. (2023) Genome-wide identification of Arabidopsis non-AUG-initiated upstream ORFs with evolutionarily conserved regulatory sequences that control protein expression levels. *Plant Molecular Biology*, 111:37-55.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki Shun, Murakami Toru, Yasumuro Miharuru, Makita Ayaka, Oi Yutaro, Hiragori Yuta, Watanabe Shun, Kudo Rin, Hayashi Noriya, Ohbayashi Iwai, Sugiyama Munetaka, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Onouchi Hitoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Upstream open reading frame-mediated upregulation of ANAC082 expression in response to nucleolar stress in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.1215a	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Hiragori Yuta, Takahashi Hiro, Karino Taihei, Kaido Atsushi, Hayashi Noriya, Sasaki Shun, Nakao Kodai, Motomura Taichiro, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Onouchi Hitoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Genome-wide identification of Arabidopsis non-AUG-initiated upstream ORFs with evolutionarily conserved regulatory sequences that control protein expression levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 37 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-022-01309-1	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Takahashi Hiro, Miyaki Shido, Onouchi Hitoshi, Motomura Taichiro, Idesako Nobuo, Takahashi Anna, Murase Masataka, Fukuyoshi Shuichi, Endo Toshinori, Satou Kenji, Naito Satoshi, Itoh Motoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Exhaustive identification of conserved upstream open reading frames with potential translational regulatory functions from animal genomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73307-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Hiro, Hayashi Noriya, Hiragori Yuta, Sasaki Shun, Motomura Taichiro, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Takahashi Anna, Fuse Kazuyuki, Satou Kenji, Endo Toshinori, Kojima Shoko, Onouchi Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Comprehensive genome-wide identification of angiosperm upstream ORFs with peptide sequences conserved in various taxonomic ranges using a novel pipeline, ESUCA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-020-6662-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takamatsu Seidai, Ohashi Yubun, Onoue Noriyuki, Tajima Yoko, Imamichi Tomoya, Yonezawa Shinya, Morimoto Kyoko, Onouchi Hitoshi, Yamashita Yui, Naito Satoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Reverse genetics-based biochemical studies of the ribosomal exit tunnel constriction region in eukaryotic ribosome stalling: spatial allocation of the regulatory nascent peptide at the constriction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1985 ~ 1999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平郡雄太、安室美陽、海藤篤、狩野泰平、山下由衣、内藤哲、尾之内均
2. 発表標題 非 AUG 開始型上流 ORF と RNA 二次構造による翻訳制御を介したポリアミン合成のフィードバック機構
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平郡雄太、安室美陽、林憲哉、佐々木駿、山下由衣、内藤哲、尾之内均
2. 発表標題 シロイヌナズナのポリアミン合成酵素遺伝子の非AUG開始型uORFを介した翻訳制御
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾晃大、垣内俊哉、伊藤正樹、野本友司、高橋広夫、山下由衣、内藤哲、尾之内均
2. 発表標題 シロイヌナズナの2つの機能性タンパク質をコードする核コードmRNAの翻訳制御機構
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本多悠吾, 菅原収吾, 尾之内均, 内藤哲, 山下由衣
2. 発表標題 シロイヌナズナS1bZIP遺伝子グループにおけるショ糖に応答した転写後制御の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今道朋哉, 楠本奈央, 高松世大, 本多悠吾, 村岡栞, 尾之内均, 内藤哲, 山下由衣
2. 発表標題 植物における小胞体ストレス応答を司る翻訳停滞の分子機構とその特異性
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平郡雄太, 高橋広夫, 林憲哉, 佐々木駿, 山下由衣, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 植物間で保存され翻訳調節に関与する非AUG開始型uORFのゲノムワイドな探索
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平郡雄太, 高橋広夫, 林憲哉, 佐々木駿, 山下由衣, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 植物間で保存された翻訳調節に関与する非AUG型uORFのゲノムワイド探索
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平郡雄太, 高橋広夫, 林憲哉, 佐々木駿, 山下由衣, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 植物間で保存された翻訳調節に関する非AUG型uORFのゲノムワイド探索
3. 学会等名 第61回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林憲哉, 佐々木駿, 平郡雄太, Zhihang Feng, 藤原徹, 渡部敏裕, 町田幸大, 今高寛晃, 高橋広夫, 山下由依, 内藤哲, 尾之内均
2. 発表標題 上流 ORF の新生ペプチドを含む翻訳複合体が細胞内のマグネシウム濃度を感知して翻訳を制御する
3. 学会等名 第61回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi H., Machida C., Muto M., Kojima S., Itoh M., Onouchi H., and Sasaki H
2. 発表標題 Development of bioinformatics methods and their applications: from plant to medical sciences
3. 学会等名 International Conference for Leading and Young Medical Scientists - IC-LYMS 2019 - (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マグネシウム耐性植物、マグネシウム耐性植物の製造方法、マグネシウム耐性植物の栽培方法、及び遺伝子	発明者 尾之内均、林憲哉、海藤篤	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-147788	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------