

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22375

研究課題名(和文) 上流ORFによる新規の時間依存的な翻訳制御

研究課題名(英文) uORF-mediated translational regulation for diel-expressed genes

研究代表者

千葉 由佳子 (CHIBA, Yukako)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70509546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：地球上の多くの生物は24時間周期で変動する様々な環境変化に適応して生きている。その根幹を担うのは概日時計であり、ほとんどすべての生物種が持っている。光合成を行なう植物にとっては概日時計のしくみは重要で、転写因子による複数のフィードバックループが組み合わされた複雑な機構となっている。私たちは時計遺伝子のひとつで転写レベルの制御に加えて、翻訳レベルの調整が行われている可能性を見出し、その分子メカニズムと生理学的意義の解明を目指している。本研究では、その翻訳制御には光が重要な役割を持つことを明らかにし、さらに同様の制御が周期変動する他の多くの遺伝子群にも存在する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計の研究の多くは転写制御に着目して行われてきた。そのため、転写後制御がどのように関わっているのかについての知見はいまだ限定的である。そのような中、本研究では翻訳量の網羅解析をシロイヌナズナで経時的に行うことで、周期的に発現する多くの遺伝子が翻訳制御を利用していることを示した。さらに翻訳制御を受けている主要な時計遺伝子の一つを詳細に解析することで、上流ORFを介した制御が存在する可能性を示した。このように本研究は、翻訳制御研究と概日時計研究の両分野にインパクトを与える内容となっている。

研究成果の概要(英文)：Many organisms on Earth have adapted to various environmental changes that fluctuate on a 24-hour cycle. The fundamental mechanism underlying these adaptations is the circadian clock, which almost all species possess. The circadian clock is crucial for plants and it consists of a complex system of multiple feedback loops involving transcription factors. We found that the circadian clock may also be regulated at the translation level. We aim to elucidate the molecular mechanism and physiological significance of this regulation. In this study, we revealed the importance of light in this translation control and discovered that similar regulation exists in many other diel-expressed genes in Arabidopsis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：上流ORF 概日時計 シロイヌナズナ 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

概日時計は昼夜間での環境変化や季節の変化に適応する機能をもつ環境応答システムであり、固着性の生物である植物にとって非常に重要な意義をもつ。概日時計に関する研究は転写レベルの解析が精力的に進められており、時計遺伝子と呼ばれる転写因子群のフィードバック制御について多くのことが明らかになっている。一方、近年の研究により mRNA 分解制御や翻訳制御、タンパク質分解制御といった転写後制御の重要性が示されているものの (Romanowski et al., *Front. Plant Sci.*, 2015)、いまだ不明な点が多い。とくに翻訳制御に関しては、ポリソーム分画による大まかな翻訳効率の測定によって、一部の時計遺伝子の翻訳効率が日周期的に変化することが示されているのみで (Missra et al., *Plant Cell*, 2015)、具体的な制御機構に関しては未解明である。

翻訳制御の研究は Ribo-seq (Hsu et al., *PNAS*, 2016) という翻訳効率を網羅的に測定する方法が確立したことにより、大きく進展した。この手法の利点は RNA-seq とあわせて行うことで精度よく翻訳効率が測定できるだけでなく、翻訳中の mRNA 上のリボソームの位置情報も同時に得られることにある。そこで我々は 12 時間明暗条件で育てたシロイヌナズナの明条件開始時点から 3 時間後 (ZT3) および 22 時間後 (ZT22) のサンプルを用いて Ribo-seq と RNA-seq を行った。その結果、主要な時計遺伝子のひとつである *LHY* では上流 ORF (uORF) において時間に依存的なシグナルが観測され、それに伴い下流の主要 ORF (mORF) の翻訳抑制が起きている可能が示された。

2. 研究の目的

本研究では *LHY* uORF による時間依存的な翻訳制御機構を分子レベルで解明し、その生理学的意義を理解することと、同様の制御の普遍性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

LHY 翻訳制御における uORF の役割の解明

LHY mRNA の 5'-UTR には 5 つの uORF が存在する。複数の uORF をもつ場合、相乗的に mORF の翻訳を制御する例が多い (Wethmar, *WIRES*, 2014)。まず、5 つの uORF すべての開始コドンに変異を入れた 5' UTR を作成し、恒常的プロモーターの制御下でレポーター遺伝子に融合したコンストラクトを用いて、uORF 全体の機能をプロトプラストを用いた一過的発現系で調べる。コントロールには野生型 5' UTR を用いる。抑制機能が検出された場合は、各 uORF に変異を導入したシロイヌナズナ形質転換植物体を用いて、各 uORF の役割を検証する。さらに、*LHY* プロモーターの制御下でそれぞれの変異を持った uORF が *LHY* の発現にどのような影響を与えるかを調べることで、転写と翻訳段階の協調制御を理解したい。

LHY 翻訳制御の生理学的意義の解明

すべてあるいは制御に重要と考えられる *LHY* uORF の開始コドンに変異を導入した uORF 変異株の作出を行う。コントロールとして野生型 uORF 株も作成する。それらの uORF 変異株を用いて、葉の運動の解析による概日時計の周期の解析や、*LHY* mRNA や *LHY* タンパク質の発現パターンの比較解析を行うことにより、*LHY* uORF による

翻訳制御の生理学的な役割を明らかにする。

uORF による時間依存的な翻訳制御の普遍性の検証

シロイヌナズナではおよそ 40% の遺伝子に uORF が存在する (von Arnim et al., *Plant Sci.* 2014)。また、*LHY* 以外の時計遺伝子やそれらの下流の遺伝子など周期的な発現をする遺伝子は数多くある。ゆえに、*LHY* 遺伝子にみられたような uORF による時間依存的な翻訳制御が他の遺伝子でも活用されている可能性は高い。よって、さらにタイムポイントを増やして Ribo-seq と RNA-seq を行うことで、どのような遺伝子群がこのような翻訳制御を受けているのかを明らかにする。

4. 研究成果

シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現実験によって、すべての uORF の開始コドンに変異を導入した場合に著しい翻訳脱抑制が起こることを明らかにした。しかし同時に、一過的発現系では発現の時間変動を調べることは難しいことがわかった。そこで、すべての uORF の開始コドンに変異を導入した uORF をもつ形質転換体の作成を優先して進めた。35S プロモーターと *LHY* プロモーターを持つ形質転換体を用いてレポーターアッセイを時系列で行ったところ、いずれのプロモーターを持つ形質転換体でもレポーター 活性の周期的な発現パターンに uORF への変異の有無に依存した違いがあることがわかった。さらに、*LHY* プロモーターを持つ形質転換体におけるパターンの違いは恒明条件では観察されず、明暗条件下でのみ観察された。この結果は、uORF による翻訳制御には光の変化が必要であることを示唆する。また、どちらのプロモーターを持つ形質転換体でも、すべての uORF に変異を導入した場合、一過的発現実験のときと同様に著しい翻訳の脱抑制が起こるため、Ribo-seq で観察された時間依存的な翻訳制御の影響がマスクされていた可能性がある。これらの結果を踏まえて、今後は各 uORF に変異を入れた形質転換体を用いた解析を進めることで、各 uORF の役割を明らかにする。

LHY 翻訳制御の生理学的意義の解明にむけては、すべての uORF の開始コドンに変異を導入した変異型 uORF を持つ *LHY* ゲノミッククローンを *lhy* 変異体に形質転換した株はすでに完成しており、今後、発現解析や表現型解析を行う。一方で、各 uORF の機能解析の結果によっては、さらに別の変異型 uORF を持った形質転換体が必要となる可能性があるため適宜対応する。

uORF による時間依存的な翻訳制御の普遍性の検証として、タイムポイント増やした網羅解析を行った。その結果、周期的な発現をする遺伝子群のおよそ 68% に何らかの形で、翻訳制御が関わっていることが明らかとなった。その中で、uORF が関わっている可能性を持つ遺伝子が 600 遺伝子ほど見つかった。また、翻訳レベルの制御を受けている遺伝子群は、夜に発現のピークを持つものが多いことも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sotta Naoyuki, Chiba Yukako, Aoyama Haruka, Takamatsu Seidai, Suzuki Takamasa, Miwa Kyoko, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Fujiwara Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Translational Landscape of a C4 Plant, Sorghum bicolor, Under Normal and Sulfur-Deficient Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac023	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 Sotta Naoyuki, Chiba Yukako, Miwa Kyoko, Takamatsu Seidai, Tanaka Mayuki, Yamashita Yui, Naito Satoshi, Fujiwara Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Global analysis of boron induced ribosome stalling reveals its effects on translation termination and unique regulation by AUG stops in Arabidopsis shoots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15248	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Haruka Aoyama, Yuma Ise, Akinori Takahashi, Tadashi Yamamoto, Yukako Chiba
2. 発表標題 Multiple uORFs-mediated Translational Repression in the Arabidopsis Clock Gene LHY
3. 学会等名 The 22nd annual meeting of the RNA society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruka Aoyama, Yuma Ise, Akinori Takahashi, Tadashi Yamamoto, Yukako Chiba
2. 発表標題 Multiple uORFs are involved in translational repression in the Arabidopsis clock gene LHY.
3. 学会等名 The 63th Annual Meeting of JSPP
4. 発表年 2022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
---------	---------