

機関番号：23903
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770258
 研究課題名(和文) 葉緑体遺伝子の進化における同義コドン選択とタンパク質コード領域の翻訳速度調節
 研究課題名(英文) Preferences of synonymous codons and translational control during the chloroplast genome evolution
 研究代表者
 中邨 真之 (NAKAMURA MASAYUKI)
 名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・研究員
 研究者番号：60322145

研究成果の概要(和文)：葉緑体では同義コドンの使用頻度と翻訳効率が必ずしも一致しない。また、葉緑体 *rps2* mRNA には翻訳効率の高いコドンが、*rps16* mRNA には翻訳効率の低いコドンが多く含まれるように進化してきたと考えられる。このようなコドンの嗜好性が mRNA の翻訳効率にどのような影響を与えるのかについて、葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いて解析した。その結果、(1) *rps16* の 5'非翻訳領域はほとんど翻訳活性を持たない、(2) *rps16* mRNA のタンパク質コード領域は *rps2* よりも約3倍速く翻訳される、(3) この翻訳効率はコドン変換によりさらに高まること明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In chloroplasts, the translation efficiencies of synonymous codons are not always correlated with their codon usage. Tobacco chloroplast *rps2* mRNA contains many codons having efficient translation activity, whereas *rps16* mRNA has a lot of inefficient codons. To elucidate whether the codon preference affect the translation efficiencies of these mRNAs, I analyzed the translation efficiencies of *rps2* and *rps16* mRNAs using the *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. I found that (1) 5'UTR of *rps16* mRNA has less translation activity, (2) protein coding region of *rps16* mRNA was translated about 3-times faster than that of *rps2* mRNA, and (3) codon substitutions increased that translation efficiency of protein coding region of *rps16* mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：葉緑体、翻訳、同義コドン、進化、*in vitro* 翻訳系

1. 研究開始当初の背景

葉緑体はランソウ様の原核生物が宿主細胞に共生して生じた植物固有のオルガネラで、独自のゲノムを持つ。葉緑体遺伝子の発現調節は転写レベル以外にも翻訳レベルで

行われている。葉緑体の翻訳装置は原核生物の大腸菌と似ているが、大腸菌には無い葉緑体固有のリボソームタンパク質が数種存在し、大腸菌では翻訳に必須である Shine-Dalgarno (SD) 配列が、葉緑体では、SD 様配列を持っているのが 30%以下である。

このように、葉緑体の翻訳機構は進化の過程に伴って原核生物から変化してきたことが明らかになった。

我々の研究室では、葉緑体固有の翻訳機構を生化学的に解析するため、世界に先駆け葉緑体 *in vitro* (無細胞) 翻訳系を開発し、最近、大幅な改良を加え翻訳速度を測定できる系にまでした。

研究代表者はこの *in vitro* 翻訳系を基に、同義コドンの翻訳効率を測定する手法を開発し、葉緑体ではコドン利用頻度とコドン翻訳効率が必ずしも一致しないことを真核生物で初めて示した。

葉緑体 30S リボソームには、S2 タンパク質 (236 アミノ酸) と S16 タンパク質 (85 アミノ酸) が等モル比で存在する。これらのタンパク質をコードする mRNA (*rps2* mRNA と *rps16* mRNA) 中の同義コドンを比較すると、ランソウから高等植物の葉緑体へと進化する過程で、*rps2* mRNA は翻訳効率の高いコドンを、*rps16* mRNA は翻訳効率の低いコドンを急激に増加させていることがわかる。これは、サイズの大きい *rps2* mRNA の翻訳を早く、サイズの小さい *rps16* mRNA の翻訳を遅くすることで、大きさの異なる S2 タンパク質と S16 タンパク質が同量できるように進化してきたと考えられる。

これらのことから、葉緑体 mRNA は翻訳効率の大きく異なる同義コドンを積極的に選択することにより、タンパク質コード領域の翻訳速度を変化させ、翻訳産物量の調節を行うように進化してきたと考えるに至った。

2. 研究の目的

葉緑体遺伝子は進化の過程で、翻訳効率の異なる同義コドンを選択することによって、タンパク質コード領域の翻訳速度を大きく変化させ、タンパク質合成量の調節を行っていることを明らかにするため、葉緑体 mRNA のタンパク質コード領域の翻訳速度を実験的に測定する。

3. 研究の方法

翻訳速度の測定にはタバコ葉緑体 *in vitro* 翻訳系を、またモデル mRNA としてタバコ *rps2* mRNA および *rps16* mRNA を用いる。まず、(1) *rps2* および *rps16* の野生型 mRNA の翻訳速度の比較、(2) 野生型 mRNA のタンパク質コード領域のみの翻訳速度の比較、(3) 5' 非翻訳領域のみの翻訳効率の比較、を行い、*rps2* および *rps16* mRNA のタンパク質コード領域の翻訳速度を解析する。次いで、*rps2* と *rps16* のコドンを改変した mRNA を用いて同様の実

験を行い、同義コドン変換による翻訳速度調節について解析する。

4. 研究成果

(1) 野生型 mRNA の翻訳速度の比較

葉緑体 *in vitro* 翻訳系を用いて、タバコ葉緑体 *rps2* mRNA と *rps16* mRNA の翻訳速度を比較したところ、*rps2* mRNA は十分な翻訳活性を有したのに対し、*rps16* mRNA は全く翻訳されなかった。

(2) 野生型 mRNA のタンパク質コード領域のみの翻訳速度の比較

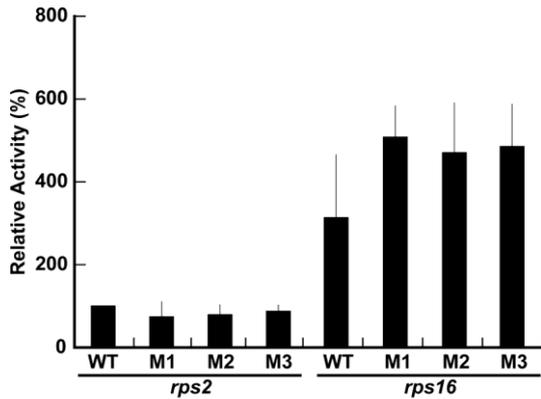
タバコ *rps2* mRNA と *rps16* mRNA のタンパク質コード領域に、*rps2*、*rps16*、*T7gene10* 由来の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) を結合したキメラ mRNA を作成し、*rps2* mRNA と *rps16* mRNA のタンパク質コード領域の翻訳速度を比較した。*rps16* 由来の 5' UTR を用いた場合、S2 および S16 タンパク質を検出するのは困難であった。一方、*rps2* および *T7gene10* 由来の 5' UTR を用いた場合には、S2 タンパク質も S16 タンパク質も検出することができ、いずれの場合においても、S16 タンパク質が S2 タンパク質より約 3 倍多く検出することができた。

(3) 5' UTR のみの翻訳速度比較

上記 (1)、(2) の結果から、*rps16* 由来の 5' UTR は、非常に低い翻訳活性がある、もしくは、ほとんど翻訳活性がないことが示唆された。そこで、*rps16* と *rps2* の 5' UTR に緑色蛍光タンパク質 (GFP) のコード領域を結合させたキメラ mRNA を作成し、*rps16* と *rps2* の 5' UTR の翻訳活性を比較した。その結果、*rps16* の 5' UTR は *rps2* より約 500 倍以上低い翻訳活性しか持たないことが明らかとなった。

(4) 同義コドン変換によるコード領域の翻訳活性の比較

上記 (3) の結果より、前年度の結果より、*rps16* mRNA の 5' UTR が非常に低い翻訳活性しか持たないことが明らかになったため、*T7gene10* 由来の 5' UTR を用いてコドン改変による翻訳速度の変化を解析した。*rps2* mRNA に含まれる翻訳効率の高いアルギニンコドンを翻訳効率の低いコドンに、*rps16* mRNA に含まれる翻訳効率の低いアルギニンコドンを翻訳効率の高いコドンに改変した。コドン改変型の *rps2* mRNA と *rps16* mRNA の翻訳速度の比較を行ったところ、*rps2* mRNA の翻訳速度がほとんど変化しなかったのに対し、*rps16* mRNA の翻訳速度は約 1.5 倍に上昇した (下図)。



(5) 今後の展望

これらの研究成果からは、当初の仮説（葉緑体 mRNA は翻訳効率の大きく異なる同義コドンを積極的に選択することにより、タンパク質コード領域の翻訳速度を変化させ、翻訳産物量の調節を行うように進化してきた）を証明するには至らなかった。しかし、本研究により、タバコ葉緑体の *rps16* mRNA がほとんど翻訳していないことが明らかとなった。また、葉緑体内には *rps16* mRNA が多く蓄積していることや、EST データベース検索により、*rps16* 遺伝子がタバコ核ゲノムにも存在することが明らかになった。これらのことは、葉緑体ゲノムに存在する *rps16* 遺伝子が偽遺伝子である可能性や本来のリボソームタンパク質としてではなく、RNA レベルでの全く新たな機能を持つ可能性が示唆され、今後これらの可能性について解析していく予定である。

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 2 件)

1. Nakamura, M. and Sugiura, M. (2011): Translation efficiencies of synonymous codons for arginine differ dramatically and are not correlated with codon usage in chloroplasts. *Gene* 472, 50-54.
(査読の有無 有)

2. Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M. Börner, T. and Schmitz-Linneweber, C. (2010): An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 3245-3250.
(査読の有無 有)

[学会発表] (計 19 件)

1. 中邨真之、杉浦昌弘「葉緑体ゲノムに存在する *rps16* 遺伝子は機能しているのか？」第 52 回日本植物生理学会年会 (2011 年 3 月 20~22 日、仙台)
2. 佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「植物の核ゲノムには ATG 開始コドンを紹介した新規プロモーターの出現メカニズムがある」第 52 回日本植物生理学会年会 (2011 年 3 月 20~22 日、仙台)
3. 本橋典子、江波和彦、小沢友希、中邨真之、田中寛、華岡光正「タバコ BY-2 細胞におけるアミロプラスト分化制御メカニズムの解析」第 52 回日本植物生理学会年会 (2011 年 3 月 20~22 日、仙台)
4. 中邨真之、杉浦昌弘「Translation efficiency of *rps16* mRNA in tobacco chloroplasts」第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 7~10 日、神戸)
5. 松尾充啓、佐藤壮一郎、工藤久幸、中邨真之、山本義治、小保方潤一「構造遺伝子の挿入によるクリプティックプロモーターの活性化機構の解明」第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 7~10 日、神戸)
6. 小保方潤一、工藤久幸、松尾充啓、佐藤壮一郎、中邨真之、山本義治、木村宏「クリプティックプロモーターの活性化メカニズムと転写領域の新生」日本遺伝学会第 82 回大会 (2010 年 9 月 20~22 日、札幌)
7. 工藤久幸、松尾充啓、佐藤壮一郎、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「植物核に挿入されたコード領域はクロマチンのリモデリングと転写領域の新生を引き起こす」日本植物学会第 74 回大会 (2010 年 9 月 9~11 日、春日井)
8. 中邨真之、杉浦昌弘「葉緑体 mRNA の同

- 義コドンと翻訳活性」日本植物学会第74回大会(2010年9月9-11日、春日井)
9. Zoschke, R., Neumann, L., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Börner, T. and Schmitz-Linneweber, C. “MatK or why keep a chloroplast-encoded splicing factor?” XIth International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (2010 Aug. 29 – Sep. 3, Tromsø)
 10. Nakamura, M. and Sugiura, M. “Translation activity of *rps16* mRNA in tobacco chloroplasts” XIth International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (2010 Aug. 29 – Sep. 3, Tromsø)
 11. Nakamura, M. and Sugiura, M. “Chloroplast- and nuclear-encoded *rps16* genes in tobacco” Gordon Research Conferences: Mitochondria and Chloroplasts (2010 Jul. 10-16, Lucca)
 12. Nakamura, M. and Sugiura, M. “Comparative analysis of the translation efficiencies between *rps2* and *rps16* mRNAs in tobacco chloroplasts” FESPB 2010 (2010 Jul. 4-9, Valencia)
 13. 工藤久幸、松尾充啓、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一「植物核に挿入されたコード領域はヌクレオソームと転写単位の再編成を引き起こす」第51回日本植物生理学会年会(2010年3月18-21日、熊本)
 14. 中邨真之、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 mRNA における同義コドンと翻訳効率」第51回日本植物生理学会年会(2010年3月18-21日、熊本)
 15. 工藤久幸、山本義治、中邨真之、小保方潤一「PolIIIの転写開始位置の決定に関わるコード領域の役割」第32回日本分子生物学会(2009年12月9-12日、横浜)
 16. 中邨真之、杉浦昌弘「タバコ葉緑体 *rps2* mRNA と *rps16* mRNA の翻訳効率の比較」第32回日本分子生物学会(2009年12月9-12日、横浜)
 17. Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Börner, T. and Schmitz-Linneweber, C. “An organellar maturase associates with multiple group II introns” LEOPOLDINA-SYMPOSIUM (2009 Sep. 20-23, Berlin)
 18. Nakamura, M. and Sugiura, M. “Translation efficiencies of chloroplast mRNAs are modulated by the selection of synonymous codons” LEOPOLDINA-SYMPOSIUM (2009 Sep. 20-23, Berlin)
 19. Nakamura, M. and Sugiura, M. “Correlation between codon usage and translation efficiencies of synonymous codons in tobacco chloroplasts” Plant Biology 2009. (2009 Jul. 18-22, Honolulu)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
中邨 真之 (NAKAMURA MASAYUKI)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・研究員
研究者番号：60322145
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし