

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06208

研究課題名（和文）リボソームの翻訳制御を介した転写制御のフィードバック機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of feedback mechanism of transcriptional regulation through translational control of ribosomes

研究代表者

田中 真幸（Mayuki, Tanaka）

大阪公立大学・大学院農学研究科・特任研究員

研究者番号：80546292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ホウ素輸送体NIP5;1のAUG-UAA配列を介したホウ素濃度依存的な翻訳、mRNA分解を介した転写制御機構の全体像の解明を目的とした。本研究において、NIP5;1のmRNAを切断する因子CID7の切断機構を明らかにした。さらに、CID7によって切断されたmRNA分解中間体からsmall RNAが生成され、そのsmall RNAがAGO1と複合体を形成し、NIP5;1の転写の抑制に関わっている可能性を示した。また、NIP5;1の翻訳制御に関与する因子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、生体内で切断されたmRNAは不要で、直ちに分解されるべきものと考えられてきた。今回、申請者は切断されたmRNAが機能を持つことを明らかにした。本研究で、細胞質で翻訳開始前にmRNAがRNA分解酵素によって切断され、そのmRNA分解中間体からsmall RNAが合成され、small RNAが核へ移行し、自身の転写を抑制することを発見した。このmRNA分解産物を介した転写の負のフィードバック機構は、生物全体を通して新しい遺伝子発現の仕組みを提供するものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the overall mechanism of boron-dependent transcriptional regulation by translation and mRNA degradation of the boron transporter NIP5;1. In this study, I elucidated the cleavage mechanism of CID7, a factor that cleaves NIP5;1 mRNA. Furthermore, I showed that small RNAs are generated from the mRNA degradation intermediates cleaved by CID7, and that these small RNAs form a complex with AGO1 and may be involved in the repression of NIP5;1 transcription. I also found a factor involved in the translational regulation of NIP5;1.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム RNA分解酵素 ホウ素 small RNA 翻訳制御 転写制御 mRNA分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の調節には、多岐にわたるメカニズムが含まれる。転写の開始からタンパク質の翻訳後修飾に至るまで、各ステップで遺伝子発現が調節される。最近、各遺伝子の調節機構が独立して働くだけでなく、異なるステージの調節機構が相互作用し、効率的かつ迅速に遺伝子を制御するネットワークを形成することが報告されている。しかし、これらのステップがどのように相互作用し発現を制御しているかについては、依然として複雑で未解明な部分が多い。

植物のホウ素輸送体である *NIP5;1* は、土壌からのホウ素吸収に必須な遺伝子であり、ホウ素濃度に応じた *NIP5;1* の制御は、土壌中の不均一なホウ素条件下で効率的にホウ素を吸収するために不可欠である。申請者はこれまで、*NIP5;1* のホウ素濃度依存的な発現制御が翻訳調節と mRNA 分解の共役によって行われることを明らかにしてきた (Tanaka et al. 2011 and 2016)。*NIP5;1* の翻訳段階では、5' 非翻訳領域 (5' UTR) にある AUG-UAA 配列 (開始コドンと終結コドンのみからなる特徴的な配列) 上で、ホウ素濃度に依存してリボソームが停滞する。これにより、停滞したリボソームの末端で mRNA が切断され、mRNA 分解が起こる。最近、この切断された mRNA 分解産物から small RNA (sRNA) が生成され、転写制御のトリガーとして機能する可能性が示唆された。つまり、翻訳段階で栄養状態を感知し、翻訳を抑制しつつ、mRNA を選択的に分解し、その分解産物をシグナルとして転写を抑制することで、新たに作られる mRNA の量を制御する新しいフィードバック制御の存在が明らかになった。

2. 研究の目的

多段階の発現制御機構がネットワークを形成し、発現を調節しているという知見は少ない。なぜなら、遺伝子の発現制御ステップは多数あり、それぞれの制御ステップがどのように相互作用しているかを明らかにするには、各ステップを詳細に確認する必要があるからである。先行研究で、申請者はリボソームが「ホウ素濃度の感知」として機能し、リボソームを起点とした翻訳、mRNA 分解、転写といった複数のレベルの発現がネットワークを形成して制御していることを突き止めた。本研究では、どのような因子によってこのフィードバック制御が形成されているのかを明らかにすることを目指し、翻訳、mRNA 分解、転写の 3 つの視点から、その全体像を解明することを目指す。

3. 研究の方法

1) *NIP5;1* の mRNA 分解を介した転写制御機構の解析

NIP5;1 の mRNA 切断位置 (AUGUAA より 12bp 上流) から転写開始点までの領域で、sense/antisense sRNA の断片が蓄積していることが、公共データベースの Argonaute 1 (AGO1)-associated small RNA-seq を解析した結果から明らかになった。このことから、切断された mRNA 分解産物から二本鎖 RNA が生成され、sRNA が形成されている可能性が示唆された。生成された sRNA は、機能タンパク質である AGO タンパク質に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成し、*NIP5;1* の RNA を認識し転写の抑制を行っていると考えられた。そこで、シロイヌナズナの根を用いて、ホウ素条件を変化させ、AGO1-associated small RNA-seq を行い、*NIP5;1* の mRNA 切断位置領域で sRNA が検出できるか、ホウ素応答性はあるのかを検証した。また、sRNA の形成に関わる遺伝子や sRNA と結合する AGO1 の変異株を用いて、ホウ素濃度依存的な *NIP5;1* の転写の影響を調査した。

2) AUG-UAA 上でのリボソーム停滞により誘導される未知エンドヌクレアーゼの解析

先行研究において、*NIP5;1* に GFP を付加させた形質転換植物を用いて、変異原処理した植物の GFP 蛍光を指標に *NIP5;1* のホウ素依存的な発現制御に関わる遺伝子の選抜を行ってきた。その中で、*NIP5;1* の mRNA 分解に関わる遺伝子 *CID7* を発見した。*CID7* は RNA の分解機能を持つ SMR ドメインを持つ。この変異株では変異原処理をしていない親株と比較して *NIP5;1* mRNA のホウ素応答性が弱まることから、*CID7* は *NIP5;1* の mRNA を切断するエンドヌクレアーゼである可能性が高いと推察した。そこで *CID7* の機能や *NIP5;1* mRNA の *CID7* を介した分解機構を明らかにするため以下の実験を実施した。まず、SMR ドメインを精製し、RNA 分解活性解析を行った。次に、*CID7* が持つ 3 つのドメインやモチーフに変異を導入した植物を用い、*NIP5;1* mRNA のホウ素応答性を野生型と比較した。また、試験管内翻訳を行い、*CID7* と AUG-UAA 上で停滞しているリボソームの相互作用を解析した。さらに、*CID7* の細胞内発現や組織局在を観察した。これらの実験に加えて、mRNA 分解中間体を検出するデグラドーム解析を行い、*NIP5;1* 以外の *CID7* のターゲット遺伝子の探索を行った。

3) *NIP5;1* のホウ素依存的な翻訳制御に関わるターゲット因子の同定とその機能解析

変異原処理した植物による、*NIP5;1* のホウ素依存的な発現制御に関わる遺伝子の選抜をさらに進めた結果、*NIP5;1* の翻訳制御に関わる遺伝子として、*eIF5A-2* が発見された。*eIF5A-2* が *NIP5;1* の翻訳制御に関わる因子であるかどうかを確認するための相補実験を行った。

4. 研究成果

1) *NIP5;1* の mRNA 分解を介した転写制御機構の解析

シロイヌナズナの根を用いた AGO1 associated small RNA-seq 解析により、*NIP5;1* の mRNA 切断位置から転写開始点の領域で sense および antisense の AGO1 と結合した sRNA の蓄積が確認された。一方で、ホウ素による有意な違いは見られなかった。リード数が少ないこと、個体差が大きいため、ホウ素十分条件の方が欠乏条件と比較して small RNA の量が多い傾向が見られたが、統計的に有意な差は認められなかった。次に、RNA から二本鎖 RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (*RDR*) と *AGO1* の変異株を用いて、*NIP5;1* の pre-mRNA を測定し、ホウ素濃度依存的な転写活性を検証した。その結果、野生型 (Col-0) ではホウ素十分条件の方が欠乏条件に比べて 1.5 ~ 2 倍程度 *NIP5;1* の pre-mRNA の蓄積が減少したが、*RDR* や *AGO1* の変異株では、十分条件での *NIP5;1* の pre-mRNA の減少は見られなかった。これらの結果から、*RDR* および *AGO1* が *NIP5;1* のホウ素依存的な転写抑制に関与していることが示唆された。これらのことから、*NIP5;1* の mRNA 分解中間体から *RDR* を介して二本鎖 RNA が合成され、sRNA が生成されている可能性が高いと推察した。ただ、sRNA の量がホウ素濃度依存的に増加するかどうかは今のところ不明である。合成された sRNA は *AGO1* に取り込まれ、核へ移動し、その後、*NIP5;1* の転写のステップにおいて、新しく合成された *NIP5;1* RNA と結合し、転写活性を抑制すると考えられる。これらの研究によって、自身の mRNA 分解産物から合成された sRNA を介して転写を抑える、新しいフィードバック制御機構の一旦を明らかにした。

2) AUG-UAA 上でのリボソーム停滞により誘導される未知エンドヌクレアーゼの解析

NIP5;1 の mRNA の分解に関わると推察される *CID7* に RNA を分解する機能があるかどうかを検証するため、RNA 分解に関わることが知られている SMR ドメインを大腸菌に異所発現させ、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。シロイヌナズナから抽出したトータル RNA に SMR を加え、RNA 分解活性を測定した。その結果、SMR の濃度に依存して RNA の分解活性が高まることが示され、*CID7* の SMR には RNA 分解活性が存在することが確認された。

CID7 の N 末端側には PAM2 モチーフが存在しており、このモチーフは polyA 結合タンパク質 (PABP) と結合することが知られている。イーストツーハイブリッド法により *CID7* は PABP2 と結合することがすでに報告されている。また、*CID7* の中間領域では、CUE ドメインと呼ばれる、ユビキチン結合ドメインが存在する。そして、C 末端側には SMR が存在する。これらのドメインやモチーフの機能をアミノ酸置換により欠損させ、*CID7* T-DNA 変異株に導入し、*NIP5;1* の mRNA のホウ素応答性を検証した。その結果、*CID7* T-DNA 変異株では、野生型 (Col-0) と比較して、*NIP5;1* mRNA のホウ素応答性は弱くなったのに対し、*CID7* の野生型を *CID7* T-DNA 変異株に導入した相補株では *NIP5;1* の mRNA のホウ素応答性が Col-0 と同程度に回復した。一方、モチーフやドメインに変異を *CID7* T-DNA 変異株に導入すると、ホウ素応答性が弱くなり、*CID7* T-DNA 変異株と同程度で、*CID7* を野生型に持つ相補株のように回復しなかった。これらの結果から、SMR ドメインだけでなく、CUE および PAM2 ドメインも *NIP5;1* のホウ素依存的な mRNA 分解に重要であることが示唆された。次に、*CID7* に GFP レポーター遺伝子を導入した形質転換植物を用いて、*CID7* の細胞内局在を観察したところ、細胞質に局在していることが確認された。また、*CID7* のプロモーターに *GUS* レポーター遺伝子を導入した形質転換植物において、*CID7* が植物全体で発現していることが観察された。これにより、*NIP5;1* が強く発現している根の伸長領域で *CID7* も発現していることが明らかとなり、細胞質で発現していることから、*NIP5;1* の翻訳段階での mRNA 分解に影響している可能性が推察された。

そこで、*CID7* が直接翻訳段階のリボソームと相互作用しているかをポリソームプロファイリングと Western blotting により検証した。コムギ胚芽抽出液 (WGE) を用いて *CID7* mRNA と PABP2 mRNA をそれぞれ試験管内で翻訳した後、合成された *CID7* と PABP2 および *NIP5;1* mRNA を WGE に加え、再度試験管内翻訳を行い、ポリソームプロファイリングを実施した。その後、得られた分画を Western blotting し、*CID7* がどの分画に存在するかを確認した。*CID7*、PABP2、*NIP5;1* をさまざまな組み合わせでポリソームプロファイリングを行った結果、これら 3 つの mRNA のすべてを試験管内で翻訳した場合は、他の組み合わせ (*CID7* のみ、*CID7* と *NIP5;1*、*CID7* と PABP2) と比較して、80S 分画に *CID7* が蓄積する割合が上昇していた。このことから、*CID7* は PABP2 と結合し、AUG-UAA で停滞しているリボソームと相互作用をする可能性が高いことが示唆された。これらの結果から、*CID7* は RNA 分解酵素であり、PABP2 を介してリボソームと相互作用し、mRNA を切断している可能性が高いと推察された。

次に、*CID7* のホウ素濃度依存的な mRNA 分解機構のゲノムワイドな影響を検証するため、*CID7* の T-DNA 変異株を用いてデグラドーム解析を行った。その際、インタクトな mRNA の存在量の指標として、5' 末端の CAP を捕捉し、5' 末端の配列を決定する cap analysis gene expression (CAGE)-seq を同時に行った。その結果、野生型 (Col-0) ではホウ素濃度依存的に *NIP5;1* のインタクトな mRNA の蓄積は減少し、一方、*NIP5;1* の AUG-UAA 配列上流の mRNA 分解中間体が蓄積していることが確認されたが、*CID7* の T-DNA 変異株ではインタクトな mRNA の蓄積の減少は確認されず、*NIP5;1* の mRNA 分解中間体も蓄積していかなかった。この結果は、これまでの考察と一致することから、解析は正しく行われていることを示した。一方、*NIP5;1* と同様に、CAGE-seq でホウ素濃度依存的な減少が見られる遺伝子の中で、デグラドームによる分解中間体の上昇が

確認される遺伝子は見つからなかった。つまり、CID7 がホウ素濃度依存的に mRNA を切断するターゲット遺伝子は *NIP5;1* 以外はないことが示唆された。リボソームはさまざまな遺伝子で配列依存的に、あるいは条件依存的に停滞することが知られており、CID7 はホウ素濃度以外のリボソームが停滞する状況において、mRNA 切断に関わっている可能性があるかもしれない。

植物では、翻訳中にリボソームが停止し、それに伴って mRNA が切断される遺伝子が複数報告されているが、その切断を担う RNA エンドヌクレアーゼは見つかっていなかった。今回、申請者は植物で初めて、リボソームの停止を標的とする RNA 分解酵素を発見した。酵母や動物で知られているリボソームの停止を介したエンドヌクレアーゼも SMR、CUE ドメインを持つため、これらのドメインは生物に共通する機能を持つと考えられる。一方、PAM2 モチーフは CID7 特異的であり、CID7 のオルソログは植物以外には存在しないため、CID7 は既知のエンドヌクレアーゼとは異なるリボソームとの相互作用をしていると予想される。この結合様式を明らかにするためには低温電子顕微鏡などを用いた構造解析などがさらに必要であるが、この研究は、翻訳制御の新たな機構を示すことが期待できる。

3) *NIP5;1* のホウ素依存的な翻訳制御に関わるターゲット因子の同定とその機能解析

先行研究から引き続き、スクリーニングを行った結果、新たに変異体 2 つが見つかった。この変異体の *NIP5;1* mRNA の応答性は、親株と比較して変化はなかった。しかし、タンパクレベル (GFP 蛍光) は、親株と比較して、ホウ素十分条件下で変異体では上昇していた。これらのことから、この変異株では、*NIP5;1* の翻訳の制御に影響を及ぼす遺伝子に変異があることが示唆された。そこで、ネクストジェネレーションシーケンシングおよびマッピングを行った。その結果、*eIF5A-2* に変異があることが明らかになった。このことから、*eIF5A-2* が *NIP5;1* のホウ素濃度依存的なタンパクレベルに影響を与える可能性があると考えた。そこで、*eIF5A-2* のプロモーター領域からゲノム配列までを変異体に導入した形質転換植物を作成し、相補実験を行った。また、*eIF5A-2* の 2 つのアリルを掛け合わせ、F1 植物を作成し、その蛍光を観察した。その結果、ホウ素十分条件 (25 μ M) 下で、親株と比較して変異体では GFP 蛍光が強かったのに対し、相補株ではその蛍光が野生型と同程度に戻っていた。また、2 つのアリルを掛け合わせた F1 植物では、ホウ素十分条件下で変異体と同程度に蛍光していた。このことから、*NIP5;1* のホウ素濃度依存的な発現に *eIF5A-2* は関わっていることが示唆された。

酵母では、*eIF5A* はリボソームと結合し、翻訳開始、翻訳終結、また停滞したリボソームの翻訳伸長などを促進するために働くことが知られている。*NIP5;1* では、ホウ素十分な条件下で、リボソームが AUG-UAA 上で停滞するが、その後、ホウ素の助けにより翻訳終結が進んでいくことが明らかとなっている (Tanaka et al. 2024)。おそらく、*eIF5A-2* もホウ素とともに *NIP5;1* の翻訳終結を助ける役割があると考えられる。植物では *eIF5A* の翻訳制御の役割については明らかになっておらず、申請者の研究によって初めて、植物の *eIF5A* の翻訳制御の一端を明らかにすることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中真幸、反田直之、藤原徹
2. 発表標題 ホウ素輸送体NIP5:1のホウ素濃度依存的な翻訳制御に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 土壤肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayuki Tanaka ¹ , Takeshi Yokoyama, Hironori Saito, Madoka Nishimoto, Kengo Tsuda, Naoyuki Sotta, Hideki Shigematsu, Mikako Shirouzu, Shintaro Iwasaki, Takuhiro Ito, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Scanning of AUG by the 80S ribosome: the case of NIP5;1 having AUGUAA in the 5' untranslated region
3. 学会等名 RNA学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayuki Tanaka, Sotomayor Leyton Saul, Naoyuki Sotta, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Identification of genes involved in boron-dependent mRNA degradation of the boron transporter NIP5:1 in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mayuki Tanaka, Takeshi Yokoyama, Madoka Nishimoto, Kengo Tsuda, Naoyuki Sotta, Hironori Saito, Hideki Shigematsu, Shintaro Iwasaki, Mikako Shirouzu, Takuhiro Ito, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Structural and biochemical analysis of boron-dependent ribosome stalling on the AUGUAA sequence
3. 学会等名 EMBL Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中真幸、藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナのホウ酸輸送体、NIP5;1プロモーターのいくつかのDNA領域が、根の異なる細胞タイプでの発現に必要なである
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中真幸、藤原徹
2. 発表標題 Coordinated regulation of translational and transcriptional expression of transporter genes in response to boron concentration
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中真幸、ソトマヨール・レイトン・ソール、反田直之、藤原徹
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるホウ素輸送体NIP5:1のホウ素に応答したmRNA分解に関する遺伝子の同定
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mayuki Tanaka, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Coordinated regulation of translational and transcriptional expression in response to nutrient condition
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mayuki Tanaka, Sotomayor Leyton Saul, Naoyuki Sotta, Toru Fujiwara
2. 発表標題 Identification of genes involved in boron-dependent mRNA degradation of the boron transporter NIP5:1 in Arabidosis.
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2024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
---------	---------