

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19168

研究課題名（和文）sUTRを介した新規遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of the gene expression using sUTR

研究代表者

山次 康幸（Yamaji, Yasuyuki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：40345187

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では植物ウイルスを利用してリーキースキャニングを介した遺伝子発現機構の解析を行った。Potexvirus属、Lolavirus属、Carlavirus属のウイルスがコードするsgRNAの5'非翻訳領域（5'UTR）が有意に短いことを明らかにし、short UTR（sUTR）と名づけた。sUTRの機能を解析した結果、5'UTRの長さが既知のKozak配列と同様にリーキースキャニングのレギュレーターとしての働きを持つことを明らかにし、sUTRの長さは下流のウイルス遺伝子の発現量を調節してバランスを取ることによってウイルス感染に最適化されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物のmRNAの大部分はuORFを持つことが明らかにされており、その制御機構の大部分はリーキースキャニングによると考えられている。本研究ではsUTRの長さが従来のKozak配列による制御に加えて、新たなリーキースキャニング制御機構であることを明らかにした。現状uORFがコードするペプチドが機能を持つかどうかを予想する術はないが、本研究で5'UTRが長いほど発現量が上がることが明らかになったため、5'UTRが長いuORFに絞ら込むことによって機能的uORFの探索を容易にすることが可能になると予想される。このように本研究の成果はあらゆる生物学分野に幅広い波及効果がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the mechanism of gene expression through leaky scanning using plant viruses. 5' untranslated region (5'UTR) of sgRNAs encoded by viruses of the genera Potexvirus, Lolavirus and Carlavirus was found to be significantly short and we named short UTR (sUTR). Several lines of analyses on the function of the sUTR revealed that the length of the 5' UTR acts as a regulator of leaky scanning, similar to the known Kozak sequence, and that the length of the sUTR is optimized for viral infection by regulating and balancing the expression levels of downstream viral genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：リーキースキャニング uORF 植物ウイルス 翻訳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物では一般に1本の mRNA 上に1つの読み枠 (open reading frame: ORF) が存在し、1つのタンパク質が翻訳されると考えられてきた。しかし、近年のゲノム科学研究により全体の35~50%もの mRNA において実際に発現する ORF の上流に数ペプチドをコードする小さな ORF (upstream ORF: uORF) が存在し、下流の ORF の発現を制御していることが示唆されてきた。真核生物の uORF 下流遺伝子の発現はリーキースキャニングにより行われると考えられている。リーキースキャニングとは最初の ORF の開始コドンがリボソームにより読み過ぎられて2番目の ORF の翻訳が行われる現象である。その制御は ORF 開始コドン付近の配列、すなわち Kozak 配列によることが古くより知られているが、下流遺伝子の発現が Kozak 配列によらない例も多く、リーキースキャニングによる遺伝子発現制御の全容は未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究では植物 RNA ウイルスを利用して遺伝子発現制御機構の解析を行う。ポテックスウイルス属はナス科などに感染する40種程度の植物ウイルスのグループであり、これらのウイルスがもつ sgRNA1 からは複数のタンパク質が翻訳される。sgRNA1 の 5'UTR が極めて短い(1~10塩基)ことが分かっているがその原因は不明であった。この短い 5'UTR (short UTR : sUTR) がそれぞれのタンパク質翻訳効率やウイルス感染性に与える影響を解析することにより、新たなリーキースキャニングを介した翻訳制御機構を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では uORF による遺伝子発現制御機構の全容解明を目指し、sUTR を介したリーキースキャニングの制御機構に関する研究を展開する。すなわち、(1) 植物ウイルスにおける sUTR の普遍性を明らかにするため、TGBps をコードする各種植物ウイルスグループにおいて TGBps をコードする sgRNA の 5'UTR の長さをディープシンクエンシングによる網羅的 RACE 法により解析する。(2) 植物の高効率 *in vitro* 翻訳系を用い、sgRNA1 の sUTR の長さや配列を変化させて TGBp1, 2, 3 の発現効率を検出することにより、sUTR によるリーキースキャニング効率に関する解析を行う。(3) (2) で導入した sUTR への変異をウイルスゲノムに導入してウイルスの細胞間移行効率を検出することにより、sUTR による発現制御がウイルス感染性に与える影響を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) sUTR の植物ウイルス間における保存状況

TGBps をコードする植物ウイルスについて TGBps をコードする sgRNA の 5'UTR の長さを解析した。対象として *Potexvirus* 属の *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV)、*potato virus X* (PVX)、*hydrangea ringspot virus* (HdRSV)、*pepino mosaic virus* (PepMV)、*white clove mosaic virus* (WCIMV)、*Lolavirus* 属の *lolium latent virus* (LoLV)、*Carlavirus* 属の *potato virus M* (PVM) を用いた。これらの感染植物から抽出した RNA に対してディープシンクエンシングによる網羅的 RACE 法により解析した結果、最長で8塩基 (HdRSV と PVM)、最短で1塩基 (WCIMV) といずれも10塩基以下の短い配列しか保持していなかった。以上の結果より sUTR はこれらのウイルスの間で普遍的な性質であることを示した。

#### (2) sUTR の機能解析

sUTR の機能を解明するため、下流遺伝子 TGBp1, TGBp2, TGBp3 の発現量への影響を解析した。もともとの長さが7塩基である PIAMV の sgRNA の sUTR の長さを、5塩基、3塩基、1塩基と短くした変異 sgRNA を作成し、これらを翻訳させて、それぞれのタンパク質の蓄積量を western blotting により検出した。その結果、sUTR が短くなるにつれて sUTR 直下の TGBp1 の発現量が減少した。一方で TGBp1 よりさらに下流の TGBp2/TGBp3 の発現量は sUTR が短くなるにつれて増加した。Western blotting による検出の代わりに、TGBp1, TGBp2, TGBp3 をルシフェラーゼで置換したコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼ活性の検出により同様の解析を行ったが、結果は同様に sUTR が短くなるにつれて TGBp1 の発現量が上がり、TGBp2/TGBp3 の発現量が増加した。

次いで sUTR の長さを長くする解析を行った。sUTR の7塩基をタンデムに並べた14塩基の変異 sgRNA、配列のランダムな42塩基の変異 sgRNA、配列のランダムな7塩基の変異 sgRNA

を作成して、同様に western blotting とルシフェラーゼ活性を利用した解析を行ったところ、いずれのアッセイでも、14 塩基と 42 塩基の変異 sgRNA では TGBP1 の発現量に変化はなく、一方で TGBP2/TGBP3 の発現量が顕著に減少した。一方で、sUTR の長さは 7 塩基のままで配列を変化させた変異 sgRNA は TGBP1、TGBP2、TGBP3 の発現量のいずれも変化がなかった。以上の結果より、sUTR の配列自体は関係なく、その長さにより下流遺伝子の発現量が制御されることを示唆した。

これらの結果はリーキースキャニングのレギュレーターとしてこれまで知られていた Kozak 配列以外に、5'UTR の長さもリーキースキャニングのレギュレーターとしての働きを持つことを示唆するものである。

### ( 3 ) sUTR の長さがウイルス感染に及ぼす影響の解析

続いて sUTR の長さがウイルス感染に及ぼす影響について解析した。PVX の sUTR の長さを 10 塩基と長くした変異 sgRNA、4 塩基あるいは 1 塩基と短くした変異 sgRNA を作成し、sgRNA を欠損した PVX-GFP 変異体と共に植物体に接種し、ウイルスが発現する GFP 蛍光を観察した。その結果、いずれの変異 sgRNA を接種した場合でも野生型 sgRNA (sUTR が 7 塩基) を接種した場合と比較して顕著にウイルス蛍光班の広がりが低下した。同様の実験を PIAMV についても実施した。PIAMV では sUTR の長さが 1 塩基、3 塩基、5 塩基、10 塩基と 4 つの変異 sgRNA を作成し、sgRNA を欠損した PIAMV-GFP 変異体と共に植物体に接種したところ、1 塩基、3 塩基、5 塩基の変異 sgRNA を接種した場合に野生型 sgRNA (sUTR が 7 塩基) を接種した場合と比較して顕著にウイルス蛍光班の広がりが低下した一方で、sUTR が 10 塩基の変異 sgRNA を接種した場合には野生型と同等のウイルス蛍光班を示した。

さらにウイルスゲノム自体の sgRNA sUTR 領域に変異を導入し、ウイルス感染への影響を解析した。PIAMV は sgRNA の sUTR 領域が複製酵素遺伝子と重複しており変異導入が困難であったため、PVX の sgRNA sUTR 領域に変異を導入し、sUTR が 4 塩基、10 塩基となるような PVX-GFP 変異体を作成した。それらを植物体に接種し、ウイルス蛍光班の広がりを観察したところ、sUTR が 4 塩基、10 塩基の変異ウイルスは野生型ウイルスに比べて蛍光班のサイズが顕著に減少した。

以上の結果より、sUTR の長さはウイルス増殖量を最大化させるように最適化されていることが示唆され、本研究の成果より、sUTR の長さは下流のウイルス遺伝子の発現量を調節してバランスを取ることによってウイルス感染に最適化されていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Maruyama Noriko, Iwabuchi Nozomu, Nishikawa Masanobu, Nijo Takamichi, Yoshida Tetsuya, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Tea Plant Necrotic Ring Blotch Virus</i> Detected from a Tea Plant in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0032322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00323-22	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 -
1. 著者名 Suzuki Masato, Iwabuchi Nozomu, Fujimoto Yuji, Suzuki Takumi, Matsumoto Oki, Motohashi Tomohiro, Neil, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Clover Yellow Mosaic Virus Isolated from White Clover in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0032422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00324-22	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 -
1. 著者名 Yamamoto Toya, Sato Haruka, Suzuki Takumi, Miyazaki Akio, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Grapevine Red Globe Virus in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0043422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00434-22	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 -
1. 著者名 Tokuda Ryosuke, Watanabe Kiyoto, Koinuma Hiroaki, Okano Yukari, Nijo Takamichi, Yamamoto Toya, Suzuki Masato, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 168
2. 論文標題 Complete genome sequence of a novel poliovirus infecting <i>Cynanchum rotundifolium</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-022-05625-1	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本祐司・桂馬拓也・橋本将典・薦田（萩原） 優香・細江尚唯・西田萩子・二條貴通・大島研郎・ Jeanmarie Verchot・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ポテックス ウイルスの3つの移行タンパク質の翻訳機構
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------