

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780057

研究課題名(和文)植物ホウ酸輸送体のホウ素に応答したmRNA蓄積の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of boron-dependent regulatory mechanism of NIP5;1 mRNA degradation in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

田中 真幸 (Tanaka, Mayuki)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80546292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシロイヌナズナのホウ素輸送体、NIP5;1のホウ素依存的なmRNA分解の制御機構の解明を目的とした。

ホウ素に応答したNIP5;1 mRNA分解に関わる分子の単離するため、変異株のスクリーニングを行った結果、有望な変異株5株取得した。また、ホウ素依存的mRNA分解の制御には、NIP5;1 5'非翻訳領域に存在する最小上流ORF、AUGUAA、が必須であることを明らかにした。さらに、その制御には、ホウ素依存的にリボソームがAUGUAA配列上で停滞し、それが引き金となってmRNAの分解が引き起こされていることを明らかにした。この制御は真核生物で共通に保存されたシステムであると推察された。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is to understand the regulatory mechanisms of Boron-dependent mRNA degradation of NIP5;1, a boric acid channelin *Arabidopsis thaliana*.

First, in order to identify genes involved in B-dependent NIP5;1 mRNA degradation, I screened M1 plants from an ethyl methanesulphonate-mutagenized population by GFP fluorescence as an indicator. After screening of M2 plants, five individual mutants were obtained. Second, I revealed that ribosomes stall at the minimum upstream ORF, AUGUAA, in the 5'-untranslated region of NIP5;1, in a boron-dependent manner, and this stalling is accompanied by mRNA degradation. It is possibly that this regulation of gene expression through ribosome stalling at AUGUAA is a general system in eukaryote.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：シロイヌナズナ ホウ素 RNAの安定性 リボソーム 輸送体 5'-非翻訳領域

### 1. 研究開始当初の背景

植物にとって必須元素であるホウ素は主に細胞壁中でラムノガラクトソナン II と呼ばれるペクチン質多糖の一種を架橋することで、細胞壁の構造維持に重要な役割を果たしている。架橋に必要なホウ素の供給は土壌のホウ素濃度が低いと効率的な吸収に依存する。NIP5;1 はシロイヌナズナのホウ酸輸送チャネルであり、低ホウ素条件において、土壌表面からのホウ酸を吸収するのに必須な遺伝子である。NIP5;1 は主に根の表皮、皮層および内皮で発現し、細胞膜中の遠心側(細胞の外側)に極性を持って局在している。NIP5;1 はシロイヌナズナの根において低ホウ素条件に应答し、mRNA レベルで発現誘導を受ける。このホウ素に应答した NIP5;1 mRNA の蓄積は 5' 非翻訳領域(5'-UTR)を介した mRNA 分解によって制御されている。mRNA の安定性が 3'-UTR を介して制御されていることは植物でもよく知られているが、mRNA の安定性が 5'-UTR を介して制御されている例はあまりなく、NIP5;1 の制御機構は栄養応答機構という面だけでなく、遺伝子発現制御機構一般としても興味深い研究であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究ではホウ素に应答した NIP5;1 mRNA 蓄積の mRNA 分解を介した制御機構を解明するため、ホウ素に应答した mRNA 分解を制御する因子を同定すること、および、NIP5;1 5'-UTR を介した発現制御機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ホウ素に应答した NIP5;1 mRNA 分解に関わる分子を単離するため、分子遺伝学手法による NIP5;1 のホウ素応答性変異株の単離を行った。レポーター遺伝子、GFP 下流に NIP5;1 を接続し 5'-UTR を含んだ NIP5;1 プロモーター制御下で発現させた形質転換シロイヌナズナを作製した。この形質転換植物の根では、低ホウ素条件下で GFP 蛍光が見られるが、ホウ素十分条件では見られない。そこで、この植物に塩基置換を誘発する変異誘起剤処理を行い、ホウ酸通常条件(25 μM ホウ酸)の培地で生育した時でも、GFP 蛍光が観察されるものを選抜することにした。この実験系によってホウ素に应答した NIP5;1 の mRNA 分解を制御する因子の同定を目指した。

(2) NIP5;1 5'-UTR 内の mRNA 分解領域の同定のため、植物の培養細胞を用いた、一過発現系による実験を行った。様々な変異を施した 5'-UTR の下流にレポーター遺伝子、luciferase (LUC)をつなぎ、シロイヌナズナ培養細胞に導入し、低ホウ素条件と高ホウ素条件によるレポーター活性を比較することでホウ素に应答する NIP5;1 5'-UTR 領域を特定した。また、小麦胚芽抽出液を用いた *in*

*vitro* system を用いてプライマー伸長法、toeprint 法、*in vitro* 翻訳によるレポーター活性などを測定し、ホウ素依存的な mRNA 分解の制御メカニズムを明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) GFP を指標として、3 万株の M1 種子から 1 次選抜、2 次選抜を経て 5 株の有望な候補株が得られた。これらの変異株の原因遺伝子を特定するまでには至らなかったが、この得られた 5 株の候補遺伝子に関して、遺伝子同定のためのポジショナルクローニングを進めており、現在、原因遺伝子の特定を目指している。

(2) NIP5;1 5'-UTR に存在する最小 uORF、AUGUAA がホウ素依存的な NIP5;1 の発現制御に必須であることを一過発現系により明らかにした。さらに、*in vitro* system を用いたプライマー伸長法により NIP5;1 mRNA 分解中間体を発見した。その分解中間体は AUGUAA 配列の約 15 ベース上流で検出された。そこで、AUGUAA 上にリボソームが停滞し、それが引き金となって分解が誘導されたのではないかと推察し、toeprint 法により、リボソーム停滞位置を確認したところ、そのシグナルは AUGUAA の 15 ベース下流で検出された(図 1)。つまり、AUGUAA を介した制御には、ホウ素依存的にリボソームが AUGUAA 配列上で停滞し、そのリボソームの 5' 末端側において mRNA が分解されることが重要であることが明らかとなった。

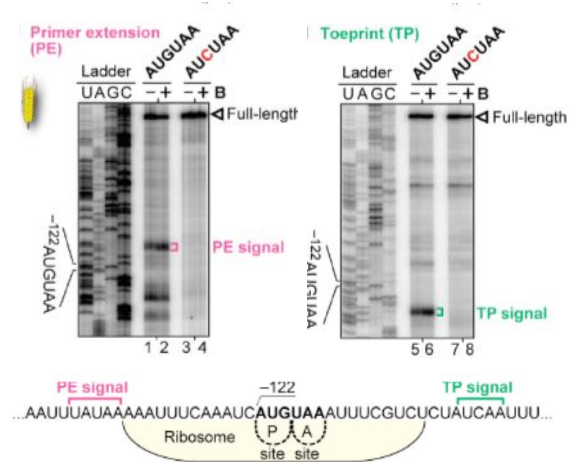


図 1 primer 伸長法による NIP5;1 mRNA 分解中間産物の検出 (左のパネル) および、Toeprint 法によるリボソームの停滞位置の検出 (右パネル)。AUGUAA 周辺配列 (下パネル)

左パネル: Primer 伸長法。Primer 伸長法は mRNA の転写開始点や分解中間産物を決定する方法で、シーケン斯拉ダーと並べて泳動することによって、一塩基単位で RNA の 5'末端が ゲノム DNA のどこにあたるかを

決めることができる。UAGC はシーケンスラダーを示す。Full-length は転写開始点の位置、<sup>-122</sup>AUGUAA は AUGUAA 配列の位置を示す。-B および+B はホウ素欠乏条件あるいはホウ素十分条件。NIP5;1 5'-UTR に AUGUAA を持つものと、変異を導入したものを(AUCUAA)を作製し、小麦胚芽抽出液を用いて実験を行った。AUGUAA を野生型に持つことにより mRNA 分解中間体はホウ素依存的に観察される(PE signal)。

右パネル：Toeprint 法。Toeprint 法はリボソームが停滞している末端を決定する方法で、シーケンスラダーと並べて泳動することによって、リボソームが停滞している 5'末端が ゲノム DNA のどこにあたるかを決定することができる。AUGUAA を野生型に持つことにより Toeprint シグナルがホウ素依存的に観察される(TP signal)。

下パネル：PE および TP シグナルの位置を示す。P-site：ペプチドを結合した tRNA が結合できる箇所、A-site：アミノ酸を結合した tRNA が結合できる箇所。リボソームが AUGUAA 上で停滞している上流で mRNA の分解中間体が観察される。

さらにシロイヌナズナ遺伝子の網羅的な解析により、この AUGUAA を介したホウ素依存的な発現制御は NIP5;1 特異的な制御ではなく、NIP5;1 以外の 2 つの遺伝子を特定した。また *in vitro* 翻訳実験においてウサギの網状赤血球ライセートを用いて実験を行ったところ、小麦胚芽抽出液を用いた実験と同じく、AUGUAA 配列がホウ素依存的な NIP5;1 の発現制御に必須であることが明らかとなった(図 2)。このことは植物だけではなく、動物においても共通の制御機構を持つ可能性を示唆している。

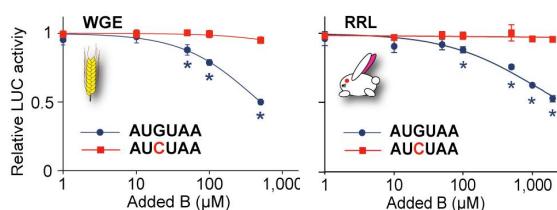


図 2 相対的な LUC 活性

NIP5;1 5'-UTR に AUGUAA を持つものと、変異を導入したものを(AUCUAA)作製し、その下流に LUC レポーター遺伝子を結合した。ホウ素濃度を変化させ、*in vitro* 翻訳を行い、LUC assay を行った。WGE は小麦胚芽抽出液、RRL はウサギの網状赤血球ライセートを示す。AUGUAA を野生型に持つことによりホウ素濃度が上昇するにつれて、レポーター活性が低下する。

真核生物において、5'-UTR に存在する最小 uORF、AUGUAA が生物学上の機能を持つ

ていること本研究で初めて示した。また、この AUGUAA を介したホウ素依存的な制御は生物界で一般的な機構である可能性を示した。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 12 件)

田中真幸 他、シロイヌナズナにおける最小 uORF を介したホウ素依存的なリボソーム停滞による mRNA 分解・翻訳効率の制御機構、第 56 回植物生理学会、2015 年 03 月 16 日-2015 年 03 月 18 日、東京農業大学

田中真幸 他、最小 uORF でのホウ素依存的なリボソーム停滞を介した遺伝子発現制御。第 16 回日本 RNA 学会年会、2014 年 07 月 23 日-2014 年 07 月 25 日、ウインクあいち(名古屋市)

田中真幸 他、ホウ素にตอบสนองしてリボソームは最小 uORF、AUGUAA で停止する。第 55 回植物生理学会、2014 年 03 月 18 日-2014 年 03 月 20 日、富山大学

Mayuki Tanaka et al., Analysis of boron-dependent regulatory mechanism of NIP5;1 mRNA degradation in *Arabidopsis thaliana*. International Workshop on Plant Membrane Biology 2013, 03. 23 -2013, 03.31. Kurashiki, Okayama

田中真幸 他、シロイヌナズナのホウ素輸送体 NIP5;1 遺伝子のホウ素にตอบสนองした mRNA 分解・翻訳効率の制御機構 第 54 回植物生理学会、2013 年 03 月 21 日-2013 年 03 月 23 日、岡山大学

Mayuki Tanaka et al., Boron-dependent mRNA degradation of NIP5;1, boric acid channel, through 5'-UTR in *Arabidopsis thaliana* roots. *Frontiers in Plant RNA Research*, 2012, 10. 16 -2012, 10 .17. Hokkaido University

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 真幸 (Tanaka Mayuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80546292

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：