

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440122

研究課題名(和文) uORFにコードされるペプチドによる翻訳制御の植物における多様な役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological roles of translational regulation mediated by upstream open reading frame-encoded peptides in plants

研究代表者

尾之内 均 (ONOUCHI, Hitoshi)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50322839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：mRNAの5'非翻訳領域に上流ORF(uORF)と呼ばれる小さなORFが存在し、そこにコードされる新生ペプチド鎖(uORFペプチド)が自身を翻訳したりリボソームに作用して翻訳を制御する例が知られているが、そのような翻訳制御はごく一部の遺伝子にのみ見られる例外的な遺伝子発現制御であると考えられていた。本研究は、uORFペプチドによる翻訳制御の植物における未知の役割と機構を明らかにするために、アミノ酸配列依存的にタンパク質発現を抑制するuORFの生理的役割を解析し、発生分化や細胞増殖に関連した遺伝子発現制御に関与するuORFを見出した。さらに、新規の機構で翻訳を制御するuORFを見出した。

研究成果の概要(英文)：Upstream open reading frames (uORFs) are small ORFs present in the 5' untranslated regions of many eukaryotic mRNAs. Some uORFs encode regulatory peptides that repress translation of the main ORF. Such translational regulation mediated by a uORF-encoded peptide was considered to be an exceptional regulatory mechanism. However, we recently identified a variety of genes whose expression is regulated by a uORF-encoded peptide, suggesting that uORF peptide-mediated translational regulation plays a wider physiological role than previously thought. In this study, we investigated physiological roles of the regulatory uORF peptides that we identified, and found a uORF involved in developmental regulation and a uORF that specifically represses main ORF expression in actively proliferating cells. Furthermore, this study revealed a novel mechanism of translational regulation, which involves two uORF-encoded peptides that have opposite regulatory roles.

研究分野：分子生物学

キーワード：uORF 翻訳制御 リボソーム 新生ペプチド シロイヌナズナ ポプラ

1. 研究開始当初の背景

(1) uORF ペプチドによる翻訳制御

真核生物の mRNA の約 30% は、5' 非翻訳領域に上流 ORF (uORF) と呼ばれる小さな ORF を持つ。その中で、uORF にコードされるペプチド (uORF ペプチド) が自身を翻訳したりリボソームの内部に作用してリボソームを停滞させ、それによって主要 ORF の翻訳を抑制する例が報告されている。そのような uORF ペプチドによる翻訳抑制を受ける遺伝子のなかで、これまでにその翻訳制御の生理的役割が明らかにされているものの多くは、代謝酵素などをコードする代謝関連遺伝子であり、それらの遺伝子の翻訳制御ではエフェクター分子である代謝産物に反応して uORF ペプチドがリボソームの停滞を引き起こす。すなわち、uORF ペプチドによる翻訳抑制が代謝産物に反応したフィードバック制御として機能している。

(2) 翻訳抑制を起こす uORF ペプチドの探索

翻訳制御に関与する uORF ペプチドの網羅的同定に向けたアプローチとして、アミノ酸配列が進化的に保存されている uORF (conserved peptide uORF: CPuORF) の探索が比較ゲノム解析によって行われてきた。従来の比較ゲノム解析によるアプローチでは特定の生物種間で uORF ペプチド配列の比較が行われたが、より網羅的に CPuORF を同定するために、BLAST を用いて不特定生物種間で uORF ペプチド配列を比較して CPuORF を抽出する方法 (BAIUCAS 法) を千葉大学の高橋広夫博士との共同研究により開発した^[1]。BAIUCAS 法を用いることによって、シロイヌナズナから 39 種類 CPuORF を同定した^[1]。それらの CPuORF の中から新規に同定したものを中心に、下流の主要 ORF の翻訳への影響を解析し、アミノ酸配列依存的に主要 ORF の翻訳を抑制する CPuORF を 10 個同定した。

2. 研究の目的

前述のように、以前に同定されて解析が進められている uORF ペプチドによる制御は、代謝酵素遺伝子のフィードバック制御に関与するものが多い。一方、上述の解析により同定した CPuORF により翻訳が抑制される遺伝子の中には、代謝に関与する遺伝子は含まれず、発生分化、細胞増殖制御、ストレス応答に関与する遺伝子などが見いだされた。このことから、uORF ペプチドはこれまでに考えられていたよりも幅広い遺伝子の発現制御に関与し、多様な役割を担っていることが予想された。本研究は、uORF ペプチドによる翻訳制御の未知の役割を明らかにするために、uORF ペプチドが条件依存的あるいは細胞・組織特異的な発現制御に関与する可能性を検討した。また、uORF ペプチドが関与する未知の翻訳制御機構を解明するために、複数の uORF が関与すると考えられる翻訳制御機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 形質転換植物を用いた解析

uORF ペプチドが条件依存的な発現制御に関与する可能性の検討

これまでに同定した uORF ペプチドにより翻訳が抑制される遺伝子の中で、ある生理的条件下に依存して発現が制御されることが予想される遺伝子については、uORF の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを導入した形質転換植物を用いて、uORF ペプチドが条件依存的な発現制御に関与する可能性を検討した。そのために、各 uORF について野生型 uORF を持つコンストラクトと翻訳抑制能を欠く変異型 uORF を持つコンストラクトを導入した形質転換植物をそれぞれ作出した。

それぞれの uORF が発現制御に関与する可能性が予想される生理的条件下と通常条件下において、野生型 uORF を持つ植物と変異型 uORF を持つ植物の間で、ルシフェラーゼ活性とルシフェラーゼ mRNA 量を比較することにより、それらの uORF にコードされるペプチドが条件依存的な翻訳制御あるいは mRNA 分解制御に関与する可能性を検討した。

uORF ペプチドが細胞・組織特異的な発現制御に関与する可能性の検討

これまでに同定した uORF ペプチドにより翻訳が抑制される遺伝子の中で、細胞・組織特異的に発現する遺伝子については、uORF ペプチドが細胞・組織特異的な発現制御に関与する可能性を検討した。そのために、各 uORF の下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) と -グルクロニダーゼ (GUS) の融合タンパク質遺伝子をつないだコンストラクトを作製し、各 uORF について野生型 uORF または翻訳抑制能を欠く変異型 uORF を持つコンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナをそれぞれ作出した。それぞれの植物の GFP と GUS の発現パターンを蛍光顕微鏡と組織化学的染色により観察し、uORF ペプチド配列に依存した発現パターンの違いが見られるかを解析することにより、各 uORF ペプチドが細胞・組織特異的な発現制御に関与する可能性を検討した。

(2) 一過的発現解析

これまでに同定した uORF ペプチドにより翻訳が抑制される遺伝子の中で、5' 非翻訳領域に複数の uORF が存在する遺伝子については、発現制御におけるそれぞれの uORF の役割と、リニシエーション機構が翻訳制御に関与する可能性を一過的発現系を用いて解析した。そのために、各遺伝子の 5' 非翻訳領域を構成的発現プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入したコンストラクトを作製した。複数の uORF の役割を調べる場合は、それぞれの uORF の開始コドンあるいは uORF 配列に変異を導入した。一方、リニシエーション機構が関与する可能性を検証する場合は、リニシエーション効率は

ORF 間の距離に依存することが知られているため、塩基の挿入あるいは欠失により uORF と主要 ORF (あるいは下流の uORF) の距離を変化させた変異型を作製した。

シロイヌナズナの培養細胞から調製したプロトプラストに、各遺伝子の野生型または変異型の 5' 非翻訳領域を含むプラスミド DNA をポリエチレングリコール処理により導入し、一定時間後に細胞を破碎してルシフェラーゼ活性を測定した。野生型と変異型のコンストラクト間でルシフェラーゼ活性を比較することにより、各 uORF の役割とリニシエーション機構が関与する可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 発生分化の制御に関与する uORF ペプチドの発見

uORF ペプチドが条件依存的な発現制御に関与する可能性を検討した解析では、シロイヌナズナの維管束形成を制御する *LONSOME HIGHWAY (LHW)* 遺伝子の発現が、ポリアミンの一種であるサーモスペルミンに反応して uORF ペプチドを介して負に制御されることを見出した。LHW 遺伝子は、維管束細胞の増殖と木部細胞の分化を促進する bHLH 型転写因子をコードする。一方で、LHW は木部分化の抑制因子であるサーモスペルミンの合成を促進することにより、過剰な木部分化を防いでいる。LHW 遺伝子はペプチド配列依存的に主要 ORF の発現を抑制する uORF を持っており、uORF ペプチドがサーモスペルミンに反応して LHW の発現を抑制する可能性を考えた。この可能性を検証するために、LHW の野生型または変異型 uORF の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを持つ形質転換シロイヌナズナをそれぞれ作出し、液体培養中にサーモスペルミンを添加してルシフェラーゼ遺伝子の発現への影響を調べた。その結果、野生型 uORF を持つ植物において、サーモスペルミン添加に反応して導入遺伝子の mRNA 分解が強く促進されることを見出した。さらに、サーモスペルミンに反応して LHW の uORF の翻訳開始が促進されることを見出した。これらのことから、サーモスペルミン存在下では LHW の uORF の翻訳開始が促進され、uORF が翻訳されたことが引き金となって、おそらく nonsense-mediated mRNA decay 機構により mRNA 分解が誘導されると考えられる。

(2) 増殖が盛んな細胞で翻訳を強く抑制する uORF ペプチドの発見

uORF ペプチドが細胞・組織特異的な発現制御に関与する可能性を検討した解析では、シロイヌナズナの F ボックスタンパク質をコードする遺伝子において、uORF のアミノ酸配列に依存した細胞・組織特異的な発現抑制がみられた。この遺伝子は根端において強く発現するが、野生型 uORF の下流に GFP と GUS の

融合タンパク質遺伝子を持つ植物では、根端の中でも根端分裂組織では周辺の細胞と比べて GFP や GUS の発現が弱かった。それに対して、翻訳抑制能を欠く変異型 uORF の下流に GFP と GUS の融合タンパク質遺伝子を持つ植物では、根端分裂組織において根端の他の細胞と同程度の GFP や GUS の発現が見られた。このことから、この遺伝子では、増殖が盛んな細胞で特異的に uORF ペプチドが主要 ORF の翻訳を強く抑制することが示唆された。さらに、uORF の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを導入した形質転換タバコ培養細胞を用いた解析からも、細胞増殖が盛んな条件において uORF ペプチドによる翻訳抑制が強くなることを支持する結果を得た。

(3) 複数の uORF が関与する遺伝子発現制御機構

上記の(2)の解析とは別の F ボックスタンパク質をコードするポプラの遺伝子(この遺伝子のシロイヌナズナオルソログは uORF 配列の保存性が低いため、より保存性の高い uORF 配列を持つポプラオルソログを解析に用いた。)において、2つの uORF のアミノ酸配列が主要 ORF の翻訳制御に関与することを見出した。上流側の uORF 配列は主要 ORF の翻訳を促進し、下流側の uORF 配列は主要 ORF の翻訳を抑制する働きがあるが、上流側の uORF による翻訳促進効果は下流側の uORF に依存した。これらのことから、上流側の uORF 配列は下流側の uORF 配列による翻訳抑制を緩和する働きをしていることが示唆された。1つの遺伝子の発現制御に2つの uORF のアミノ酸配列が関与する例はこれまでに知られておらず、新たな発現制御機構であると考えられる。また、uORF 間の距離を変化させた解析から、リボソームが上流側の uORF を翻訳した後にリニシエーションが起こり、その機構によって下流側の uORF が読み飛ばされることが示唆された。

また、シロイヌナズナの塩ストレス応答に関与する遺伝子においても、リニシエーション機構が翻訳制御に関与することが示唆された。この遺伝子は異なる読み枠で部分的に重複する2つの uORF を持ち、下流側の uORF 配列は主要 ORF の翻訳を抑制し、上流側の uORF はその翻訳抑制を緩和する働きがある。この遺伝子についても、uORF と主要 ORF の距離を変化させた解析から、上流側の uORF が翻訳された後にリニシエーションが起こり、それによって下流側の uORF が読み飛ばされることが示唆された。

< 引用文献 >

Takahashi H., Takahashi, A., Naito S., Onouchi H. (2012) BAIUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences, and its application to the *Arabidopsis*

thaliana genome. *Bioinformatics*, 28: 2231-2241.

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4件)

山下由衣、尾之内均、内藤哲(2016)「止まって働くリボソーム 新生ペプチドが司る植物の細胞内恒常性維持機構」**化学と生物** 54: 191-197. 査読無
DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.54.191

Noh A.L., Watanabe S., Takahashi H., Naito S., Onouchi H. (2015) An upstream open reading frame represses expression of a tomato homologue of Arabidopsis ANAC096, a NAC domain transcription factor gene, in a peptide sequence-dependent manner. *Plant Biotechnol.*, 32: 157-163. 査読有
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0519a

Ebina I., Takemoto-Tsutsumi M., Watanabe S., Koyama H., Endo Y., Kimata K., Igarashi T., Murakami K., Kudo R., Osumi A., Noh A.L., Takahashi H., Naito S., Onouchi H. (2015) Identification of novel *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence-dependent manner. *Nucleic Acids Res.*, 43: 1562-1576. 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkv018

Uchiyama-Kadokura N., Murakami K., Takemoto M., Koyanagi N., Murota K., Naito S., Onouchi H. (2014) Polyamine-responsive ribosomal arrest at the stop codon of an upstream open reading frame of the *AdoMetDC1* gene triggers nonsense-mediated mRNA decay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 55: 1556-1567. 査読有
DOI: 10.1093/pcp/pcu086

[学会発表](計12件)

林憲哉, 高橋広夫, 内藤哲, 尾之内均 「リボソームアレートを引き起こす被子植物 uORF の探索」第 57 回植物生理学学会年会, 岩手大学(岩手県・盛岡市), 2016 年 3 月 18-20 日

大角有里沙, 木俣薫織, 梅原俊一, 戸田智美, 遠洞弥生, 蝦名績, 内藤哲, 尾之内均 「維管束形成を制御する *LONESOME HIGHWAY* 遺伝子の uORF ペプチドが介する翻訳制御機構」第 57 回植物生理学学会年会, 岩手大学(岩手県・盛岡市), 2016 年 3 月 18-20 日

Takahashi H., Takahashi A., Hayashi N., Satoshi N., Onouchi H., Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for potential functional non-coding molecules on genomes, International Symposium on Non-coding DNA and Chromosomal Integrity -toward the finding of Intermerses-, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市), 2015 年 8 月 7-8 日

林憲哉, 高橋広夫, 内藤哲, 尾之内均 「リボソームアレートを引き起こす被子植物の CPuORF の探索と機能解析」第 17 回 RNA 学会年会, ホテルライフオー ト札幌(北海道・札幌市), 2015 年 7 月 15-17 日

工藤凜, 小山博彰, 大谷美紗都, 高橋広夫, 内藤哲, 尾之内均 「制御ペプチドをコードする二つの uORF が関与する翻訳制御機構」第 17 回 RNA 学会年会, ホテルライフオー ト札幌(北海道・札幌市), 2015 年 7 月 15-17 日

高橋広夫, 高橋アンナ, 林憲哉, 内藤哲, 尾之内均 「翻訳制御に関わる種間保存性 uORF ペプチドの網羅的探索・進化保存性評価手法の開発と動植物ゲノムへの応用」第 17 回 RNA 学会年会, ホテルライフオー ト札幌(北海道・札幌市), 2015 年 7 月 15-17 日

Takahashi H., Takahashi A., Takemoto M., Ebina I., Kimata K., Igarashi T., Kudo R., Osumi A., Satoshi N., Onouchi H., Bioinformatic identification method of evolutionary ranges for potential functional molecules on genomes, International Conference “The Problem of the Origin of Life”, Moscow, Russia, 2014 年 9 月 22-26 日

高橋広夫, 高橋アンナ, 竹本まり子, 蝦名績, 木俣薫織, 五十嵐卓哉, 工藤凜, 大角有里沙, 内藤哲, 尾之内均 「5' 非翻訳領域にコードされた種間保存性ペプチドの網羅的探索・進化保存性評価手法の開発と様々な種への応用」第 66 回日本生物工学会大会, 北海道大学(北海道・札幌市), 2014 年 9 月 9-11 日

村上佳鈴, 工藤凜, 小山博彰, 木俣薫織, 五十嵐卓哉, 竹本まり子, 大谷美紗都, 高橋広夫, 内藤哲, 尾之内均 「複数の uORF が関与する uORF ペプチド配列依存的な翻訳制御機構」第 55 回日本植物生理学学会年会, 富山大学(富山県・富山市), 2014 年 3 月 18-20 日

工藤凜，小山博彰，渡部峻，大谷美沙都，高橋広夫，今西俊介，内藤哲，尾之内均，「uORF にコードされるペプチドによる翻訳制御の植物種間における多様性」第55回日本植物生理学会年会，富山大学（富山県・富山市），2014年3月18-20日

村上佳鈴，竹本まり子，渡部峻，蝦名績，小山博彰，工藤凜，木俣薫織，五十嵐卓哉，高橋広夫，高橋アンナ，大谷美沙都，内藤哲，尾之内均「uORF にコードされるペプチドにより翻訳が制御される植物遺伝子の探索」日本植物学会第77回大会，北海道大学（北海道・札幌市），2013年9月13-15日

村上佳鈴，竹本まり子，渡部峻，蝦名績，小山博彰，木俣薫織，五十嵐卓哉，工藤凜，高橋広夫，高橋アンナ，内藤哲，尾之内均「uORF にコードされるペプチドにより翻訳が制御される植物遺伝子の探索」第31回日本植物細胞分子生物学会（札幌）大会・シンポジウム，北海道大学（北海道・札幌市），2013年9月10-12日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/arabi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾之内 均（ONOUCHI, Hitoshi）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50322839