

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850069

研究課題名(和文) 転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of a relationship between transcription start sites and translational control under heat stress conditions.

研究代表者

松浦 秀幸 (Matsuura, Hideyuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10596232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シロイヌナズナ培養細胞を用いて、転写開始点のゆらぎ(mRNA 5'末端配列)と環境ストレスに応答した翻訳制御(mRNAの翻訳状態変化)との関係性を網羅的に解析した。転写開始点の網羅的な同定は、CAGE (cap analysis of gene expression)法を用いて行った。本研究を通じて、遺伝子の転写開始点のゆらぎが、環境ストレスに応答した翻訳制御の堅牢性や柔軟性の基盤となっているという、新たな遺伝子発現制御システムの存在を示唆する重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, transcription initiation landscape shows diversity among genes; one gene show dispersed (heterogeneous) transcription start sites (TSS) and the others show focused (homogeneous) TSS. We investigated genome-wide relationship between transcription initiation landscape and translational control in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*, and found a potential important relationship between the differential transcription initiation landscape and robustness and flexibility of mRNA translational control for stress response.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：翻訳制御 転写開始点 CAGE シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物細胞における mRNA のタンパク質への翻訳効率は、様々な環境刺激に応答してグローバルかつダイナミックに変化し、ストレス応答や細胞分化、形態形成といった高次機能の重要な分子基盤となっていることが明らかにされつつある。高温や乾燥といった多くの環境ストレス条件下では、大部分の mRNA の翻訳が抑制される一方、一部 mRNA の翻訳は維持もしくは活性化される (図 1)。こうした選択的な翻訳制御においては、mRNA の 5' 端側に存在する 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) が極めて重要な役割を担っている。また筆者らは近年、5'-UTR の 5' 近傍配列が高温ストレスに応答した翻訳制御を規定する重要な因子であることを示した (Matsuura et al., *Plant Cell Physiol.*, 2013)。

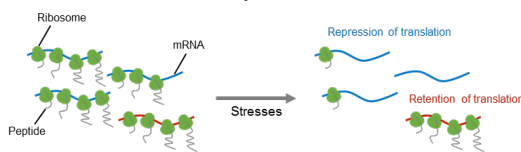


図 1 環境ストレスによる mRNA 翻訳状態の変化

一方で近年、RNA 転写開始点を一塩基レベルでかつ網羅的に解析する手法が開発され、転写開始点の同定が著しく進展した。これらの解析を通じて、後生動物や酵母、高等植物の多くの遺伝子において、ゲノム上の異なる複数の位置から転写が開始されている、すなわち最小で数塩基単位の転写開始点のゆらぎが存在することが明らかとなってきた。こうした「転写開始点のゆらぎ」と呼ばれる現象は、複数の真核生物間において観察されているため重要な役割を果たしていると考えられるが、その生物学的意義に関する知見は極めて乏しいのが現状である。

筆者らは、転写開始点が 5'-UTR の 5' 端位置を規定する、すなわち転写開始点のゆらぎの存在は 5'-UTR 配列の異なる多様な mRNA 種の存在を示唆すること等から、高温等の環境ストレスに応答した翻訳制御と転写開始点のゆらぎに密接な関係性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物の一つであるシロイヌナズナの培養細胞において、転写開始点のゆらぎと翻訳制御の関係性を網羅的に解析し、植物の環境ストレスに応答した遺伝子発現制御システムにおける転写開始点のゆらぎの意義・役割に関する基礎的知見を獲得することを目指した。具体的には、以下の研究項目を実施した。

(1) 次世代シーケンサーとの組み合わせにより mRNA の転写開始点とその使用頻度を一塩基レベルで解析する手法である Cap analysis of gene expression (CAGE)法を用いた転写開始点の網羅的解析

(2) CAGE データに基づいて各遺伝子の転写開始点のゆらぎの程度を指標値化し、ゆらぎの程度と遺伝子機能の関係性を解析

(3) 転写開始点のゆらぎの程度と高温や高塩ストレスによる mRNA 翻訳状態変化との関係性をゲノムワイドに解析

3. 研究の方法

(1) CAGE 法を用いた転写開始点の網羅的同定

通常培養条件下、もしくは高温ストレス条件下 (37°C、10 分) において培養したシロイヌナズナ培養細胞 (*Arabidopsis thaliana* T87) を、ショ糖密度勾配遠心を用いたポリソーム分画に供し、ポリソーム画分に含まれる RNA (polysome RNA) および未分画細胞抽出液に含まれる RNA (input RNA) を精製した。これら RNA から作製した CAGE ライブラリーを Illumina HiSeq 2500 を用いたシーケンス解析に供し、シロイヌナズナゲノム上にマッピングすることにより、転写開始点の同定を行った。

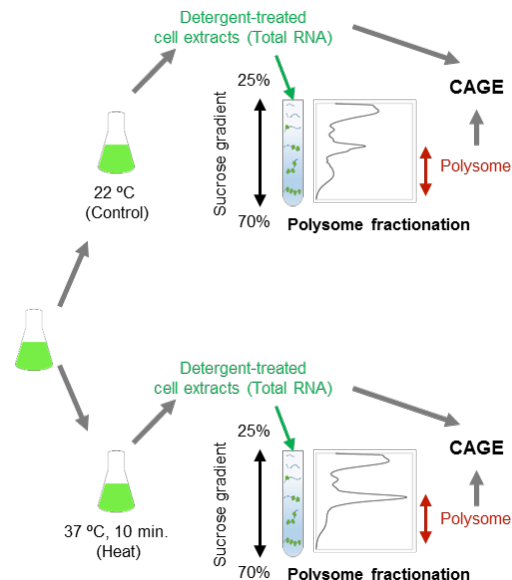


図 2 ポリソーム分画から CAGE 解析に至るまでの実験の流れ

(2) Shape index の算出

mRNA の転写開始点のゆらぎを表す指標として、shape index (Hoskins et al., 2011) を算出した。

$$\text{Shape index} = \sum_{i=1}^L p_i \log_2 p_i$$

p_i は塩基位置 i にマッピングされた CAGE タグの割合を、 L は各遺伝子において計算対象とする CAGE タグセットを表す。

(3) Shape index と高温ストレスによる mRNA 翻訳状態変化の連関解析

各遺伝子の転写開始点のゆらぎの程度を示す shape index と、環境ストレスに応答し

た mRNA の翻訳状態変化の関係性についてゲノムスケールで解析した。環境ストレスに応答した mRNA の翻訳状態の変化に関する情報としては、筆者らが行った先行研究 (Matsuura et al., Plant Cell Physiol., 2010) において、mRNA をリボソームの結合数に応じて分離するポリソーム分画法と DNA マイクロアレイを活用して算出した、高温あるいは高塩ストレスによる mRNA の翻訳状態の変化を示す指標値である ΔPS_{HS} および ΔPS_{SS} を利用した。

4. 研究成果

(1) CAGE 法を用いた転写開始点の網羅的同定

本研究では、CAGE 法を用いて、細胞内 (input RNA) 及びポリソーム画分 (polysome RNA) に含まれる mRNA の転写開始点、すなわち mRNA 5' 末端位置を一塩基レベルで網羅的に同定した。CAGE 法では、mRNA の 5' 末端に存在するキャップ構造を目印に、5' 末端近傍領域と相補的な配列をもつ CAGE タグを作製し、次世代シーケンサーを用いてシーケンシングする。続いて、リファレンスゲノム上にマッピングすることで、転写開始点の同定と存在比率の算出が可能となる。本研究では、通常培養条件及び高温ストレス条件で培養した細胞より、input RNA 及び polysome RNA を抽出・精製した (n=2)。計 8 種の RNA に由来する CAGE ライブラリーを次世代シーケンサーに供したところ、合計約 1 億 2600 万リードの塩基配列データが得られ、各 RNA 試料あたり 600 万以上の CAGE タグがシロイヌナズナゲノム配列にマッピングされた。マッピングデータから CAGE タグの 5' 末端に位置する塩基を転写開始点として抽出したところ、全ての条件で高い再現性をとっていることが確認され、一塩基レベルで高精度な転写開始点データが得られた。

(2) 転写開始点のゆらぎの評価

CAGE 法により同定された転写開始点データに基づいて、タンパク質をコードしている遺伝子について、転写開始点のゆらぎの程度を表す指標値である Shape index を算出した。Shape index は転写開始点が完全に 1 点に収束するとき最大値の 0 をとり、転写開始点がゲノム上の複数の塩基位置にばらつく (= ゆらぎが大きくなる) に従って小さい値となる。ストレス処理の有無、input RNA か polysome RNA に関わらず、いずれの RNA 試料に関しても、Shape index は約 -3.5 を中央値とし、約 -6.5 から 0 までの範囲に幅広く分布した。これらのことから、シロイヌナズナ培養細胞においても、転写開始点にはゆらぎが存在し、ゆらぎの程度は遺伝子ごとに著

しく異なることが示唆された。

(3) Shape index と遺伝子機能の関係性

遺伝子ごとに転写開始点のゆらぎの程度は大きく異なるため、転写開始点のゆらぎの生理学的意義に関する基礎的知見を得ることを目的に、遺伝子機能と shape index の関係性を調べた。以降の解析では通常細胞の input RNA に由来する shape index データを解析に使用した。本解析では、遺伝子機能に関するデータベース Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) (Thomas et al., 2003) を用いた遺伝子機能分類を利用した。その結果、解析対象とした全遺伝子の shape index の分布と異なる傾向を示す遺伝子機能集団が複数見出された。例えば、shape index が小さい、つまり転写開始点のゆらぎが大きいグループには、キナーゼ関連や細胞内輸送等のシグナル伝達関連遺伝子が多く含まれていた。一方、shape index が大きい、つまり転写開始点のゆらぎが小さいグループには、タンパク質合成関連遺伝子やヒストン関連遺伝子が多く含まれていた。これらの事実は、転写開始点のゆらぎに遺伝子機能と関連する重要な生理学的意義が存在している可能性を強く示唆するものである。

(4) 転写開始点のゆらぎと環境ストレスに応答した翻訳状態変化の関係性

各遺伝子の転写開始点のゆらぎと環境ストレスによる翻訳状態変化の関係性をゲノムスケールで調べた。具体的には、通常細胞の input RNA に由来する shape index と先行研究より得られた高温あるいは高塩ストレスによる mRNA の翻訳状態の変化を示す指標値である ΔPS_{HS} および ΔPS_{SS} の関係性を詳細に解析した。 ΔPS_{HS} および ΔPS_{SS} は、ストレス処理により大部分の mRNA の翻訳が抑制される中で、どの程度翻訳抑制されるかを表す指標である。翻訳抑制を回避する mRNA の場合は 0 付近の値をとり、顕著に抑制されるほど小さな値となる。 ΔPS_{HS} を基準に遺伝子を 6 等分し、 ΔPS_{HS} の値が大きいものから順にグループ A-F としたところ、グループ A および F に含まれる遺伝子群の shape index は、他のグループの遺伝子群よりも大きい傾向がある、すなわち両グループには転写開始点のゆらぎが小さい遺伝子が含まれる傾向があることが見出された。また、shape index を基準に遺伝子を 6 等分し、shape index 値が小さいものから順にグループ 1-6 としたところ、shape index の値が大きくなるにつれて (グループ番号が大きくなるにつれて) ΔPS_{HS} 値の分布が広がることも見出された。 ΔPS_{SS} についても同様の傾向が認められた。

これらの結果から、shape index が小さい

(転写開始点のゆらぎが大きい)遺伝子の mRNA は、高温や高塩ストレスにより、全体的な傾向に従う類似した翻訳状態変化を示す一方で、shape index が大きい(転写開始点のゆらぎが小さい)遺伝子は、極端な翻訳抑制や翻訳維持といった多様な翻訳状態変化を示す傾向があることが分かった。

以上の結果は、転写開始点のゆらぎが植物の多様な環境変動に応答しうる堅牢かつ柔軟な翻訳制御システムの基盤となっているという、新たな遺伝子発現制御システムの存在を強く示唆する。つまり植物細胞は、特定の機能をもつ遺伝子の転写開始点のばらつきを調節することにより、ストレス種に応じた翻訳状態変化やストレス種に依らない翻訳効率の担保を可能にしていると考えられる。本研究の成果は遺伝子発現制御を基盤とする様々な生物高次機能の解明に向けた研究に、「転写開始点のゆらぎ」という新たな視点を提供するという点で重要である。

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)

〔学会発表〕(計7件)

- ① 松浦秀幸、転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明，ゲノム支援拡大班会議，(2013)，神戸ポートピアホテル。
- ② 松浦秀幸、植物の翻訳制御機構研究～個別遺伝子解析から次世代シーケンサーを用いた網羅的解析へ，NGS 現場の会，(2013)，神戸国際会議場。
- ③ 岸田百世，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正，松浦秀幸、高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析，RNA 学会，(2014)，名古屋ウイックあいち。
- ④ 松浦秀幸、転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明，ゲノム支援拡大班会議，(2014)，神戸ポートピアホテル。
- ⑤ 松浦秀幸、CAGE 解析を用いて植物におけるストレス環境下での翻訳制御メカニズムに迫る，理研公開シンポジウム「遺伝子発現解析から転写産物解析へ」，(2014)，理化学研究所横浜キャンパス。

⑥ 岸田百世，松浦秀幸，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正、CAGE 法を用いた植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析，植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム，(2015)，京都大学理学部セミナーハウス。

⑦ 岸田百世，松浦秀幸，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正、高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析，日本分子生物学会，(2015)，神戸ポートアイランド。

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 秀幸 (MATSUURA HIDEYUKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：10596232