

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450075

研究課題名(和文) リボソームRNA複合体による無機栄養感知機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of sensing mechanisms of mineral nutrient through ribosome-RNA complex

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(農学部)・特任助教

研究者番号：80546292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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のリボソーム mRNA複合体を介したホウ素濃度感知機構を明らかにすることを目的とした。まず、ホウ素に応答したリボソーム停滞やそれに伴うmRNA分解を制御する因子を同定するため、変異株のスクリーニングを行い、4つの変異株を取得した。さらに次世代シーケンサーとdCapsマーカによる解析からこれらの変異株の原因遺伝子を特定した。また、NIP5;1で停滞しているリボソーム mRNA複合体の構造を低温電子顕微鏡を用いて取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is to understand the boron sensing mechanisms of ribosome-mRNA complex stalled at the minimum open reading frame, AUGUAA. First, in order to identify genes involved in B-dependent ribosome stalling at AUGUAA accompanied by mRNA degradation, I screened mutant plants from a methanesulfonate-mutagenized population by GFP fluorescence as an indicator and performed next generation sequencer and dCaps marker analysis. Then, I identified causal genes of these mutants plants. Second, I successfully obtained 3D structures of ribosome-mRNA complex by Cryo-electron microscopy.

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 リボソーム 輸送体 uORF

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ラン 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、ホウ素濃度が低い条件において、土壌表面からホウ酸を吸収するのに必須な遺伝子である。NIP5;1 はシロイヌナズナの根において、低ホウ素条件で mRNA が蓄積する。このホウ素に応答した 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。この mRNA 分解は、5'-UTR に存在する最小上流オープンリーディングフレーム (uORF)、AUGUAA 上において、ホウ素依存的なリボソーム停止と共役し制御されている。遺伝子の中には uORF と呼ばれる短い ORF が 5' UTR 上に存在し、この uORF が下流のメイン ORF の発現を制御する可能性があるが、最小 uORF、AUGUAA が条件依存的に遺伝子の発現を制御していることは、NIP5;1 の発現制御解析により、生物を通して初めて明らかとなった。これらの結果は、リボソーム mRNA 複合体がホウ素濃度を感知しその発現を制御している可能性を示唆する重要な発見であった。AUGUAA を介したホウ素依存的な制御はシロイヌナズナの NIP5;1 遺伝子以外の 2 つの遺伝子、NIP5;1 と相同なイネやトウモロコシの遺伝子でも起こること、さらに、ヒト由来の細胞を用いても NIP5;1 のホウ素応答が見られたことから、AUGUAA に依存したホウ素による発現制御機構は普遍的に存在すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、リボソームのホウ素濃度感知機構を解明するため、(1)ホウ素に応答したリボソーム停滞やそれに伴う分解を制御する新たな因子を同定すること、また、(2)AUGUAA 上でどのようにリボソームが停滞しているのかを明らかにするため、低温電子顕微鏡 (Cryo-EM)を用いた、リボソーム-RNA 複合体の立体構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホウ素に応答したリボソーム停滞やそれに伴う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、*nip5;1-1* ノックダウン変異株を導入した。この形質転換植物では、*nip5;1-1* ノックダウン変異株と比較して、ホウ素欠乏条件において、生育が一部回復する。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 μ M ホウ酸)の培地で生育した時に、親株と比較して、GFP 蛍光が回復している株を選抜することにした。この実験系によってホウ素に応答したリボソーム停滞や NIP5;1 の mRNA 分解を制御する因子の同定を目指した。

(2) リボソームが AUGUAA 上でどのようにホウ素依存的に停滞反応を引き起こしているのかを解明するためには AUGUAA 上で停滞しているリボソームの立体構造の解析が必要である。そこで本研究では AUGUAA 上で停滞しているリボソーム mRNA 複合体を精製するための実験系の確立すること、さらには低温電子顕微鏡 (Cryo-EM)を用い、ホウ素濃度依存的なリボソーム-RNA 複合体の立体構造の解析を目指した。

4. 研究成果

(1) 変異原処理した植物の GFP 蛍光を指標とし、変異原処理する前の親株と比較して、ホウ素通常条件で GFP 蛍光が観察される植物の選抜を行った。約 3 万株の M1 種子から 1 次選抜、2 次選抜を経て、最終的に 4 株の有望な候補株が得られた。これらの候補株と親株を掛け合わせ、F2 個体でホウ素十分条件における GFP 蛍光の分離比を確認した結果、これら 4 つの変異株はすべて一遺伝子座における劣勢変異をもつ可能性が高いことが示唆された。次に、F2 個体で蛍光が観察された植物の F3 個体を作成し、これら、F3 植物において、ホウ素十分条件で、分離が見られず、撒いた植物全てにおいて、蛍光が観察された

ラインを用い、それら F3 個体をバルクにし、次世代シーケンサーによって候補領域の範囲を絞った。その後、F2 個体を用いて dCaps マーカーによるマッピングを行い、候補領域をさらに絞り、候補遺伝子の特定を行った。その結果、4 つの変異株の内、3 つの変異株において、同じ遺伝子に変異が挿入されていることが確認された。残り 1 つの変異株では、他の変異株とは異なる別の遺伝子に変異が挿入されていることが確認された。これらの内、それぞれ原因遺伝子が異なると推定される 2 つの変異株に関して、*NIP5;1* の mRNA 蓄積を確認した。#5-7-8 (他の変異株とは異なる遺伝子に変異が挿入されている株) では、野生型 (WT) と比較して、ホウ素の応答性や発現量に違いが見られなかった。一方、#15-7-8 (他に 2 つのアリルがあると思われる株) では、ホウ素応答性が見られなくなっており、野生型に比べてその発現量も高い傾向を示した (図 1)

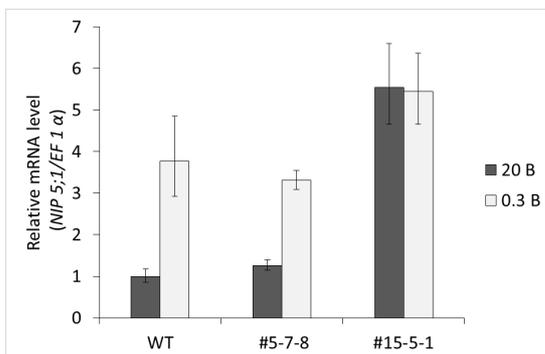


図 1 変異株の相対的な *NIP5;1* の mRNA 蓄積。ホウ酸を $0.3 \mu\text{M}$ (0.3B) および、 $20 \mu\text{M}$ (20B) を与えて 10 日間育てた時の根の相対的な *NIP5;1* の蓄積を示している。WT は親株。

これらの遺伝子の内、#15-5-1 を含む 3 つの変異株では、mRNA 分解に関わると推定される遺伝子が原因遺伝子である可能性が高く、*NIP5;1* の mRNA 蓄積のホウ素応答が失われた結果と一致する。一方、#5-7-8 は翻訳に関わると推定される遺伝子が原因遺伝子である可能性が高く、*NIP5;1* の mRNA 分解以降の翻訳の過程に関わる因子が特定されたと考えられる。つまり、今回得られた変異株は、*NIP5;1* のホウ素依存的なリボソーム停滞及

び、それに伴った mRNA 分解に関する因子に変異を持つ遺伝子である可能性が高い。

今回、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に変異を導入し、ホウ素依存的な GFP 蛍光を指標とした変異株の選抜を行った。本研究の結果から、この方法は、*NIP5;1* の発現制御に関わる遺伝子を選抜する方法として、有効な手段であったと考えられる。

(2) AUGUAA 上で停滞しているリボソーム mRNA 複合体を精製するための実験系の確立を目指した。*NIP5;1* 5' UTR の AUGUAA を含む 60 塩基の mRNA を *in vitro* 転写によって作製した。次に 3' 末端にビオチンを付加させた DNA オリゴヌクレオチドを作製した。DNA スプリント法を用いて、これら mRNA と DNA をライゲーションし、キメラ mRNA-DNA-ビオチンを作製した。その後、小麦胚芽抽出液にキメラ mRNA-DNA-ビオチンを加え、*in vitro* 翻訳を行った。翻訳後、ストレプトアビジンビーズによって、キメラ mRNA-DNA-ビオチンを回収し、洗浄を行った。つまりこの洗浄のステップを経ることによって、mRNA-DNA-ビオチンの AUGUAA 配列上で停滞しているリボソームのみを回収することが可能となる。その後、DNaseI によって DNA を分解し、目的のリボソーム mRNA 複合体を精製することに成功した。次に、リボソーム mRNA 複合体が精製されているか、mRNA-DNA-ビオチンの AUGUAA 配列上で停滞しているリボソーム以外のリボソームを含んでいないかを確認するため、洗浄前的小麦胚芽抽出液の上清、洗浄後の上清、リボソーム mRNA 複合体を用いて、RNA を抽出し、変性ポリアクリルアミドゲルを用いて確認した (図 2)。その結果、洗浄前の上清 (W0) では、rRNA (5.8S および 5S) のシグナルが確認されたが、洗浄後の上清 (W3) ではシグナルが確認されなかった。一方で、リボソーム mRNA 複合体 (E) からは、rRNA の他に *NIP5;1* 5' UTR の AUGUAA を含む 60 塩基の mRNA と同じ位置にシグナルが確認されたことから、リボソーム mRNA 複合体が精製されていると考えられた。

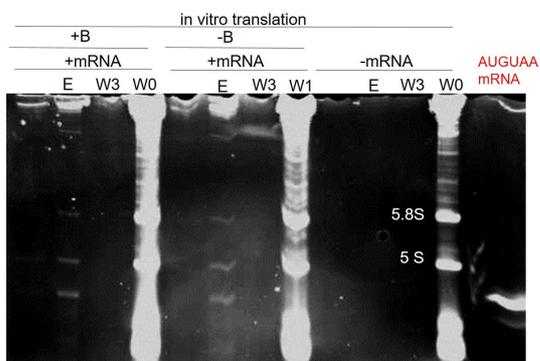


図2 ポリアクリルアミドゲルによる
リボソーム mRNA 複合体精製の確認

ホウ酸を加えない(-B)処理区と、1mM のホウ酸を加えた(+B)処理区を設け、小麦胚芽抽出液にキメラ mRNA-DNA-ビオチンを加え、in vitro 翻訳を行った。-mRNA は mRNA-DNA-ビオチンを加えず、ホウ酸も与えないで in vitro 翻訳を行っている。右端のレーンは、60 塩基の *NIP5;1*mRNA をロードした。5.8S 及び 5S は rRNA を示す。W0 は洗浄前の小麦胚芽抽出液の上清、W3 は洗浄後の上清、E は精製したリボソーム mRNA 複合体を表す。

そこで、理化学研究所のタンパク質機能・構造研究チームとの共同研究により、負染色法によるリボソーム mRNA 複合体の観察を行った。その結果、リボソーム-mRNA 複合体(80S)と思われるサイズの粒子を確認した。それ以外に 80S が解離したと想定される、スモールサブユニット(40S)と思われる粒子もわずかに確認できたが、80S と推定される粒子のみを選別し、低温電子顕微鏡(Cryo-EM)を用いた、リボソーム-mRNA 複合体の立体構造解析を試みた。その結果、高ホウ酸存在下で精製したリボソーム、14,967 の粒子のデータから 7.7Å の構造を取得し、低ホウ酸存在下で精製したリボソーム、21,252 の粒子のデータから 6.57Å の構造を取得することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

田中真幸 他、最小上流 ORF「AUGUAA」を介したリボソームの停止による栄養感知機構、植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、2016 年 11 月 16- 2016 年 11 月 18 日、北海道大学(北海道・札幌市)

Mayuki Tanaka et al., Boron-dependent ribosome stalling at AUGUAA, a minimum

uORF, downregulates *NIP5;1* expression in *Arabidopsis thaliana*. RNA 2016, 06. 28 -2016, 07.02. 国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔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：
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・特任助教
研究者番号：80546292

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

白水 美香子(Shirouzu Mikako)
理化学研究所・タンパク質機能・構造研究チーム・チームリーダー
研究者番号：70280732

横山 武司(Yokoyama Takeshi)
理化学研究所・タンパク質機能・構造研究チーム・研究員