

植物における高温域での翻訳に関する研究

團迫 智子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座

(新名 惇彦教授)

所属 (主指導教官)	植物代謝調節学講座 (新名 惇彦教授)		
氏名	團迫 智子	提出	平成 15年 1月 7日
題目	植物における高温域での翻訳に関する研究		
要旨	<p>細胞が高温にさらされると、通常のタンパク質の合成は抑制され、熱ストレスタンパク質 (Heat Stress Protein; HSP)の合成が強く誘導される。この変化は次の二つの過程によってもたらされる。1) 熱ストレス遺伝子の転写が急激に増大する。2) 熱ストレス遺伝子の mRNA は翻訳されるが、他の mRNA の翻訳は停止する。この HSP の優先的な翻訳は酵母、ショウジョウバエ、HeLa 細胞などで報告されており、熱ストレス遺伝子 mRNA の 5'-UTR がその機構に深く関係することが示唆されている。1992 年、Pitto らによってトウモロコシの HSP70 の 5'-UTR が熱ストレス中の翻訳抑制の回避に寄与していることが示された。しかし、植物において熱ストレス下での翻訳抑制回避と 5'-UTR を関連づける知見は非常に少なく、その制御機構に至ってはわずかに熱ショック顆粒の関与を示唆するデータがあるだけでほとんど未知である。本研究は熱ストレス応答における翻訳制御機構と熱ストレス遺伝子 mRNA の 5'-UTR の関係を解明することを目的にシロイヌナズナの熱ストレス遺伝子を用いた解析を行った。</p> <p>実験材料としてシロイヌナズナ由来低分子量 HSP 遺伝子 HSP18.2 および HSP17.4、高分子量 HSP 遺伝子 HSP81-1、HSP81-2、HSP81-3 の全長 5'-UTR を用いた。カリフラワーモザイクウイルス 35SRNA (CaMV35S)プロモーターの支配下に各 HSP 由来 5'-UTR をそれぞれ挿入し、<math>\beta</math>-glucuronidase (GUS) 遺伝子を連結し、キメラ遺伝子を構築した。これらをシロイヌナズナ培養細胞(<i>Arabidopsis thaliana</i>, T87)のプロトプラストにエレクトロポレーションで導入し、一過性発現実験を行った。導入後、22℃で9時間培養し、さらに33℃の熱処理温度に移して15時間培養した細胞の GUS 活性を測定したところ、すべての HSP 5'-UTR を持つ発現系において熱処理後も常温で培養したものとほぼ同程度の GUS 活性を示した。一方、対照とした pBI221 は 22℃での値の 50%に GUS 活性が低下した。GUS mRNA の蓄積量を調べたところ、HSP 5'-UTR を挿入した発現系を導入した細胞も、pBI221 を導入したのも同程度の蓄積量を示した。以上より、本研究で供試した HSP 遺伝子の 5'-UTR はすべて熱ストレス条件下での翻訳抑制を回避するのに寄与することが示された。また、タバコ培養細胞 (<i>Nicotiana Tabacum</i> L. cv. BY-2) のプロトプラストを用いて同様の実験を行ったところ、BY-2 においてもすべての HSP 5'-UTR で熱ストレスによる翻訳抑制の回避が</p>		

認められた。

次に同様の実験を形質転換 BY-2 においても行った。25℃で培養した継代後 3 日目の形質転換 BY-2 を 37℃の処理温度に移し、12 時間熱処理を行った後、GUS 活性を測定した。その結果、CaMV35S プロモーターの支配下にある GUS 遺伝子上流に HSP18.2 5'-UTR を挿入したキメラ遺伝子を導入した BY-2 細胞 (18.2UTR-45) は 25℃で 12 時間処理したものと同程度の GUS 活性を示したが、pBI121 を導入した BY-2 細胞は 25℃で培養した細胞の 60%に GUS 活性が低下した。翻訳を阻害するシクロヘキシミドを添加して 12 時間経過した細胞の GUS 活性を同様に測定したところ、薬剤を加えない細胞の 40%程度に低下しており、18.2UTR-45 が示した 25℃での GUS 活性と遜色のない GUS 活性値は処理温度に移行後も GUS タンパク質の新規合成が行われたためであると考えられる。

次に、HSP18.2 5'-UTR 領域を 3'末端側から段階的に欠失させて GUS 遺伝子に連結した発現系を構築し、BY-2 を形質転換した。HSP18.2 5'-UTR 領域を 7 塩基まで欠失させた発現系を導入した BY-2 の熱処理後の GUS 活性値は 25℃での活性値の約半分まで低下し、熱ストレス下での翻訳抑制回避能を喪失していた。この結果は HSP18.2 5'-UTR が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与することを支持するものである。

熱ストレス下での翻訳制御機構として、タンパク性の因子または 5'-UTR の二次構造が翻訳の開始、伸長に何らかの影響を及ぼすということが考えられる。しかし、HSP18.2 5'-UTR がどのような機構によって高温下で翻訳を継続しているのか不明である。シロイヌナズナにおける高温下での翻訳制御機構に関する知見を得るため、HSP18.2 遺伝子の 5'-UTR の二次構造に塩基置換によって変異を導入し、高温域での翻訳にどのような変化が起こるかを見た。T87 のプロトプラストを用いて一過性発現実験を行ったところ、この発現系は二次構造が変化しているにも関わらず、熱処理を加えても 22℃で培養したプロトプラストと同程度の GUS 活性値を示した。また、T3 プロモーターの支配下に HSP18.2 5'-UTR を上流に連結した GUS 遺伝子を置き、*in vitro* 転写を行った。mRNA の 22℃または 33℃における二次構造を決定したところ、熱処理によって二次構造は変化しないことが示された。これは対照である pBI221、変異を入れた HSP18.2 5'-UTR についても同様であった。よって、HSP18.2 5'-UTR の二次構造単独で高温域での翻訳抑制回避に寄与するのは不十分であると考えられる。

上述の研究を進める過程で、HSP 5'-UTR を挿入した発現系の GUS 活性値が対照に用いた pBI221 に比べて著しく高いという結果を得た。よって、植物を用いた有用物質の高生産系の構築においても HSP 5'-UTR は有効であると考え、応用面からの検討も行った。T87 または BY-2 のプロトプラストを用いて一過性発現実験を行ったところ、18.2UTR-45 はシロイヌナズナにおいて pBI221 の約 20 倍、タバコにおいても 10 倍近い GUS 活性値を示した。形質転換 BY-2 においても同様の結果であった。このことから、有用物質の高生産系を確立する上で、強い転写活性を持つプロモーターを選択するのに加え、高い翻訳効率を持つ 5'-UTR を利用することも有効であることが示された。

# 目 次

略 語 表.....	4
緒 論.....	5
熱ストレス遺伝子の発現機構.....	5
植物における熱ストレス応答と翻訳制御.....	6
本研究の目的.....	8
第 1 章 高温域におけるシロイヌナズナ <i>HSP18.2</i> 5'-UTR の翻訳抑制回避への寄与	9
1.1 序論.....	9
1.2 実験材料と方法.....	10
1.2.1 遺伝子操作技術.....	10
1.2.2 タバコおよびシロイヌナズナ培養細胞の培養.....	10
1.2.3 培養細胞を用いた一過性発現解析.....	10
1.2.4 タンパク質の新規合成の検出.....	11
1.2.5 酵素活性測定法.....	12
1.2.6 全 RNA の調製.....	13
1.2.7 ノザン解析.....	13
1.2.8 形質転換体 BY-2 細胞の作出.....	14
1.3 結果.....	14
1.3.1 熱ストレス下におけるシロイヌナズナ <i>HSP18.2</i> 5'-UTR の翻訳抑制回避..	14
1.3.2 熱ストレス下におけるシロイヌナズナ各 <i>HSP</i> 5'-UTR の翻訳抑制回避.....	18
1.3.3 <i>HSP18.2</i> の 5'-UTR の種を超えて保存された熱ストレス下での翻訳抑制回避.....	19
1.4 考察.....	22
第 2 章 高温域での優先的翻訳機構.....	25
2.1 序論.....	25
2.2 実験材料と方法.....	25
2.2.1 5'-UTR の二次構造解析.....	25
2.2.2 培養細胞を用いた一過性発現解析.....	27
2.3 結果.....	27
2.3.1 <i>HSP18.2</i> 5'-UTR の二次構造解析および変異導入.....	27
2.3.2 導入熱ストレス下での <i>HSP18.2</i> 5'-UTR 二次構造の変化.....	30
2.3.3 <i>HSP18.2</i> 5'-UTR の欠失解析.....	32
2.4 考察.....	33
第 3 章 通常培養温度における <i>HSP18.2</i> 5'-UTR の翻訳効率への寄与.....	41
3.1 序論.....	41
3.2 実験材料と方法.....	42
3.2.1 培養細胞を用いた一過性発現解析.....	42
3.2.2 酵素活性測定法.....	42

3.2.3 全RNAの調製.....	42
3.2.4 ノザン解析.....	42
3.2.5 形質転換体BY-2細胞の作出.....	42
3.3 結果.....	42
3.3.1 シロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストを用いた一過性発現実験とノザン解析.....	42
3.3.2 タバコ培養細胞のプロトプラストを用いた一過性発現実験とノザン解析.....	44
3.3.3 形質転換BY-2を用いたGUS比活性測定.....	45
3.3.4 他の分子量HSP 5'-UTRを用いた検討.....	46
3.4 考察.....	47
総括.....	50
高温域での翻訳抑制回避機構の植物種を超えた共通点と相違点.....	50
HSP 5'-UTRのIRES様機能と今後の研究.....	50
応用における5'-UTR選択の重要性およびHSP 5'-UTR利用の有効性.....	52
参考文献.....	53
謝辞.....	60
論文目録.....	61
学位論文の主たる部分を公表した論文.....	61

## 略語表

### Units

°C:	degree Celcius
Da:	dalton (s)
g:	gram (s)
g:	gravitational acceleration
hr:	hour (s)
l (in; ml, $\mu$ l, etc):	liter (s)
min:	minute (s)
M:	Molar (mole [s] liter <sup>-1</sup> )
s:	second (s)

### Prefixes to the names of units

k:	kilo (10 <sup>3</sup> )
m:	milli (10 <sup>-3</sup> )
$\mu$ :	micro (10 <sup>-6</sup> )
n:	nano (10 <sup>-9</sup> )
p:	pico (10 <sup>-12</sup> )

### Others

bp:	base pair (s)
DNA:	deoxyribonucleic acid
cDNA:	complementary DNA
PCR:	polymerase chain reaction
RNA:	ribonucleic acid
mRNA:	messenger RNA
rRNA:	ribosomal RNA
tRNA:	transfer RNA
SDS:	sodium dodecyl sulfate
Tris:	tris (hydroxymethyl) aminomethane
v/v:	volume per volume
w/v:	weight per volume

## 緒 論

### 熱ストレス遺伝子の発現機構

生物の細胞や組織、個体が一時的に通常成育温度よりも 10℃程度高温にさらされると、熱ストレスに対する応答として熱ストレスタンパク質 (Heat Shock Protein; HSP) が合成される。この応答は熱ストレス応答とよばれ、生物に広く保存された遺伝子発現機構である (1, 2)。

細胞が高温にさらされると、通常のタンパク質の合成は抑制され、HSP の合成が強く誘導される (3)。この変化は次の二つの過程によってもたらされる。1) HSP 遺伝子の転写が急激に増大する (4-7)。2) HSP mRNA は翻訳されるが、他の mRNA の翻訳は停止する。

真核生物において、HSP 遺伝子の転写は熱ストレス転写因子 (Heat Shock transcription Factor; HSF) (8-13) が、熱ストレスエレメント (Heat Shock Element; HSE) (14-18) と呼ばれる種を超えて保存された共通のシス配列に結合することにより開始されると考えられている。

HSP 遺伝子の転写制御機構が種を超えて広く保存されているのに対し、翻訳制御機構は生物種によっていくつかの異なる戦略があると考えられている。酵母では高温下でも HSP 遺伝子も非 HSP 遺伝子も共に転写されるが (19, 20)、HSP mRNA が優先的に翻訳される。1996年、Saavedra らによって酵母の HSP70 mRNA 内部配列の 5' 末端側 1600 塩基と 3' 末端側 500 塩基があると細胞が熱ストレスにさらされていても効率的に核外に輸送されることが示された (21)。一方、この領域を欠くと HSP70 mRNA は核外に輸送されなくなる。このことから、酵母において HSP 遺伝子 mRNA が優先的に翻訳されるのは、熱ストレス条件下でも HSP mRNA は核外へ輸送されるのに対して、他の mRNA は核内に保持され、結果的に細胞質内の HSP mRNA の比率が高まるからであると考えられている (22)。

ほ乳類においても熱ストレスによる非 HSP 遺伝子 mRNA の翻訳抑制が見られる。HeLa 細胞では高温にさらされると非 HSP 遺伝子 mRNA の翻訳効率は低下するが、HSP70 mRNA は高い効率で翻訳されることが報告されている (23, 24)。ここで非 HSP 遺伝子 mRNA は分解されるわけではなく、通常培養温度に戻れば翻訳効率も回復する (23)。1994年に Bommer らによってマウスの線維芽細胞とエールリッヒ腹水癌細胞において熱ストレスによって翻訳開始因子 (eukaryotic Initiation Factor; eIF) の一つである eIF4E の脱リン酸化が起こることが示された (25)。eIF4E は細胞質で mRNA の 5' 末端に位置するキャップ構造に結合するという翻訳における重要なステップを担う因子である。一連の報告から、ほ乳類における熱ストレス下での翻訳制御は eIF4E の脱リン酸化によってキャップ構造との結合能が低下し、翻訳効率の低下が引き起こされ、一方、mRNA の 5'-UTR 内に存在する特定配列に直接 40S リボソームサブユニットをリクルートするキャップ非依存性の翻訳開始機構による翻訳のみが行われるため、5'-UTR 内に存在する特定配列である IRES (Internal Ribosome Entry Site) を持つ遺伝子のみが翻訳されるという可能性が示唆された。2001年、Subkhankulova らによ

て、ヒトの GM00637 細胞を EMS で処理すると、タンパク質の新規合成が阻害されるが c-Myc タンパク質の合成は継続され、EMS の濃度および処理時間に比例して eIF4E のリン酸化の度合いが低下することが報告されている (26)。c-myc は細胞がアポトーシスを起こした時や DNA 損傷を受けた時に発現し、5'-UTR に IRES を持つことで知られている。この報告は熱ストレス同様タンパク質の新規合成が抑制される状況下においては eIF4E が脱リン酸化されるが、IRES を持つ mRNA は翻訳抑制を受けることなく、そこからタンパク質が新規合成されることを示している。さらに 2002 年、Kim らによって、HeLa 細胞において、HSP70 ファミリーの一つである BiP が熱ストレス下でも翻訳され、その 5'-UTR が IRES として機能することが示された (27)。以上の報告より、ほ乳類では熱ストレス下での翻訳抑制回避において、IRES が重要な役割を果たしていると考えられる。

シヨウジョウバエでは、高温下においても HSP70 mRNA はそのほとんどがポリソームを形成するのに対して、非 HSP 遺伝子 mRNA は通常温度下に比べてポリソームを形成する mRNA が 30~50%に低下する。しかし、単位 mRNA あたりに結合するリボソームの数は非 HSP 遺伝子 mRNA であっても通常温度での場合と同程度である (28)。非 HSP 遺伝子の翻訳産物量はポリソーム形成の減少以上に低下しているため、熱ストレス下において非 HSP 遺伝子 mRNA の翻訳開始およびペプチド鎖の伸長反応速度は HSP70 mRNA に比べて劇的に減少すると考えられている。高温下における非 HSP 遺伝子 mRNA の核から細胞質への輸送阻害については示されていない。1985 年、Klemenz らはシヨウジョウバエの HSP70 mRNA の 5'-UTR を *Adh* 遺伝子の開始コドン上流につなぐと高温域でも翻訳されることを示し (29)、同年、McGarry らによって、HSP70 mRNA の 5'-UTR を欠失させると高温域で翻訳されなくなることが報告された (30)。また、HSP70 の 5'-UTR 内にステム-ループ構造をとるような変異を導入すると常温では翻訳されても高温での翻訳が起こらなくなる (31)。これらの報告から、HSP 5'-UTR が高温域での翻訳を可能にするのに寄与していることが示された。さらに 1995 年、Duncan らによってシヨウジョウバエにおいても熱ストレスによって eIF4E の脱リン酸化が起こることが示された (32)。しかし、熱ストレス下で IRES をもつ mRNA が翻訳抑制を受けずタンパク質が合成されるかどうかについての報告はまだない。

### 植物における熱ストレス応答と翻訳制御

直射日光にさらされた植物は全熱輻射の 44~88%を表面で吸収するため、植物体の温度は外気温よりも 10~20℃高くなる (33)。このように動物と違って、移動することのできない植物は、常に変化する温度環境にさらされている。

植物の特徴的な熱ストレス応答に熱ストレス顆粒 (Heat Shock Granules; HSGs) の形成がある。HSGs は直径約 40 nm 程度の顆粒で、細胞が長時間の熱ストレスにさらされた際、低分子量 HSP によって構成された巨大なシャペロン複合体が凝集し、細胞質内に形成される (34)。HSGs の機能は長い間未知であったが、現在では、HSGs は一種の隔離機構であり、長期間の熱ストレスによって HSP70/HSP40 のシャペロン

機能の能力を超えて蓄積した変性タンパク質が低分子量 HSP オリゴマーと結合し (35)、変性タンパク質-低分子量 HSP オリゴマー複合体として一時的に HSGs に貯蔵され、熱ストレスからの回復期に入って、HSP70 シャペロンシステムによって再び折り畳まれるまで隔離されるというモデルが提唱されている。一方、植物においては細胞が高温にさらされると、非 HSP 遺伝子 mRNA はポリソームから解離し、一時的に細胞質の別の場所へ貯蔵されること、非 HSP 遺伝子 mRNA の安定性が上昇することが報告されている (34, 36, 37)。この機構に関していくつかのモデルが提唱されているが、この機構および関連するタンパク質は未知である。熱ストレスを受けたトマトの細胞に RNA を含む巨大な粒子が見られるという報告 (38) と植物に特徴的な HSGs の存在から mRNA は HSGs に貯蔵されるという仮定が立てられた (34)。この仮定は低分子量 HSP に分子シャペロンとしての機能のほかに新しい役割を暗示している。実際、低分子量 HSP が豊富な画分には mRNA が含まれており、この mRNA を *in vitro* で翻訳したところ、ストレスを与えなかった細胞から調製されたポリソーム画分の mRNA にコードされているタンパク質と類似のタンパク質であった。一方、ストレスを与えた細胞から調製されたポリソーム画分の mRNA から翻訳されたタンパク質は大部分が HSP であった (34)。しかし、熱ストレスによる翻訳の抑制が急激に起きるのに対し、HSGs が細胞質に現れるのは長時間ストレスがかかった後のことである。1996 年の Gallie らの報告によると、ニンジンのプロトプラストにおいて、熱ストレスを与える直前に転写阻害剤を加えることで低分子量 HSP の新規合成を阻害した際の翻訳抑制と mRNA の安定性について調べたところ、低分子量 HSP の蓄積がないにも関わらず、非 HSP 遺伝子 mRNA の翻訳は抑制され、その mRNA の安定性は上昇した。この mRNA の安定性の上昇は低分子量 HSP によって構成される HSGs がストレスにさらされた時の非 HSP 遺伝子 mRNA の貯蔵先であるとする上述の仮定と矛盾するものである。

HSGs の他に熱ストレスを受けている間の一時的な mRNA の貯蔵先の候補として、mRNA-タンパク質複合体 (messenger ribonucleoprotein particles; mRNPs) が挙げられる。細胞内では mRNA は裸の状態では存在せず、翻訳も mRNPs の形で行われると考えられている。mRNP を構成する主要なタンパク質はポリ (A) 結合タンパク質と分子量 50~60 kDa の mRNP コアタンパク質である (39, 40)。アフリカツメガエルの卵母細胞では活発に転写が行われるが、多くの mRNA は細胞質に運ばれた後、翻訳は行われず、貯蔵 mRNP の状態で蓄えられている。これは mRNA マスキングと呼ばれる翻訳抑制機構で、貯蔵 mRNP には特定の mRNA を翻訳させずに安定に貯蔵するという機能がある (41, 42)。しかし、卵母細胞中ではすべての mRNA が貯蔵されるわけではなく、一部の mRNA は活発に翻訳されている。植物でこの mRNP コアタンパク質に相当するタンパク質はいまだ単離されておらず、貯蔵 mRNP による翻訳抑制機構が存在するかどうかは明らかでない。熱ストレス下での非 HSP 遺伝子 mRNA の貯蔵場所を解明するにはさらなる研究を待たねばならない。

植物では、トウモロコシ、ニンジンのプロトプラストを用いた一過性発現によって、トウモロコシ HSP70 の 5'-UTR が熱ストレス時の翻訳の抑制を回避することが示さ

れている (43)。また、mRNA をプロトプラストに導入した場合も、高温域での翻訳抑制および回避が起きることが示されており、植物の戦略は酵母とは異なるものと考えられる。Pitto らの報告によって、ほ乳類やショウジョウバエなどと同様に熱ストレス時の翻訳抑制の回避に 5'-UTR が関わることを示されたが、その機構についてはいまだ解明されていない。

## 本研究の目的

植物における高温域での翻訳制御については熱ストレス直後におきる非 *HSP* 遺伝子 mRNA の翻訳抑制と長期の熱ストレスによる HSGs もしくは貯蔵 mRNP の形成の二つの状態があると考えられるが、その移行過程についての理解はほとんど進んでいない。また、多くの生物種における熱ストレス応答の研究で、翻訳抑制回避に *HSP* 遺伝子 mRNA の 5'-UTR が寄与することが報告されているが、植物においては 2 例のみである。

本研究は植物における高温域での翻訳制御全体の理解を最終的な目的とし、熱ストレス応答の初期段階である翻訳抑制についての理解を深めるために、高温域での翻訳抑制回避と *HSP* mRNA の 5'-UTR の関係に着目し、シロイヌナズナの *HSP* 遺伝子を用いた解析を行った。

第 1 章ではシロイヌナズナから単離した低分子量 *HSP* 遺伝子 *HSP18.2* および *HSP17.4*、高分子量 *HSP* 遺伝子 *HSP81-1*、*HSP81-2*、*HSP81-3* の全長 5'-UTR が高温域での熱ストレスによる翻訳抑制の回避に寄与することを示した。

第 2 章では翻訳抑制回避の機構に迫る知見を得るため、*HSP18.2* の 5'-UTR について詳細な検討を行った。塩基置換によって *HSP18.2* の 5'-UTR の二次構造を変化させても、高温域での翻訳能は失われないこと、高温下でも 5'-UTR の二次構造は変化しないことを示した。また、5'-UTR の欠失解析を行い、7 塩基まで 5'-UTR を欠失させることで高温域での翻訳能が失われることを示した。

第 1 章において、*HSP18.2* の 5'-UTR は高温下での翻訳反応の継続に寄与するだけでなく、単位 mRNA あたりの翻訳量が多いことが示された。このことより、第 3 章では第 2 章までとは視点を変えて、「植物細胞における有用物質の高発現系の確立」の観点から、常温においても *HSP18.2* の 5'-UTR が高い翻訳効率を持ち、単位 mRNA あたりのタンパク質生産量を上げるのに有効であることを示した。

# 第1章 高温域におけるシロイヌナズナ *HSP18.2* 5'-UTR の翻訳抑制回避への寄与

## 1.1 序論

細胞が熱ストレスにさらされた際、mRNA の翻訳抑制が回避されるか否かはその mRNA の 5'-UTR と深い関わりがあることが多くの生物種において報告されている。ショウジョウバエにおける高温下での *HSP* mRNA の選択的翻訳については 1980 年代から報告されており、mRNA の選別は *HSP* 5'-UTR に含まれるシグナル配列に基づいていると示唆されていた (44)。1985 年、Klemenz ら、McGarry らが相次いで、*HSP70* mRNA の 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与することを示す論文を発表した (29, 30)。またショウジョウバエの低分子量 *HSP* である *HSP22* mRNA においても熱ストレスによる翻訳の抑制を免れて翻訳されるためには、その 5'-UTR が必須であることが示された (45)。

植物でも *HSP* 遺伝子の高温域での翻訳抑制回避、その他の遺伝子の mRNA の翻訳抑制に関していくつもの報告がなされているが、*HSP* の 5'-UTR が翻訳抑制回避に寄与することを示した報告は 2 例のみである。1989 年に Schöffl らによってダイズの *Gmhspl7.3-B* の 5'-UTR の欠失解析が行われ、*Gmhspl7.3-B* の 5'-UTR が高温域での効率の良い翻訳に必要であることが示された (46)。また 1992 年、Pitto らによって、トウモロコシ、タバコ、ニンジンのプロトプラストを用いた一過性発現によって、トウモロコシの *HSP70* の 5'-UTR が熱ストレス時の翻訳の抑制を回避することが報告された (43)。Pitto らによって mRNA をプロトプラストに一過的に導入した場合でも、高温域での翻訳抑制が起きることが示されことから、植物における翻訳抑制および回避の戦略は、酵母のように非 *HSP* 遺伝子 mRNA を核内に留めることによって翻訳を抑制するのではなく、ほ乳類やショウジョウバエなどと同様に細胞質において熱ストレス時の翻訳抑制機構が働き、その抑制回避に 5'-UTR が関わると考えられる。

第 1 章ではシロイヌナズナを実験材料に *HSP* 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与するかどうかを調べた。シロイヌナズナからは数種の *HSP* 遺伝子が単離され、またそれらの *HSP* 遺伝子の転写開始点も決定されているため、複数の *HSP* 遺伝子から完全長の 5'-UTR を単離することが可能である。実験材料として、低分子量 *HSP* 遺伝子である *HSP18.2* および *HSP17.4*、高分子量 *HSP* 遺伝子である *HSP81-1*、*HSP81-2*、*HSP81-3* の合計 5 種類の 5'-UTR を選んだ。

*HSP18.2* および *HSP17.4* はそれぞれ 18.2 kDa、17.4 kDa の低分子量 *HSP* をコードしており、1989 年に Takahashi らによって単離された (47)。プロモーター解析の結果から、常温では転写物、タンパク質ともに検出されず、熱ストレスによって速やかに誘導されること (47, 48)、低分子量 *HSP* は熱ストレス下で細胞質に形成される HSGs の主な構成分子であることなどから、その 5'-UTR が翻訳抑制の回避に寄与する可能性が高いと考えられる。*HSP81-1*、*HSP81-2*、*HSP81-3* はそれぞれ 81 kDa の高分子量 *HSP* をコードしており、*HSP81-1*、*HSP81-2* は、1992 年に Takahashi らによ

て、*HSP81-3* は 1994 年に Yabe らによって単離された (49, 50)。3 つの遺伝子とも熱ストレスによって転写が誘導されるが、*HSP81-1* は常温ではまったく転写物が検出されず、*HSP81-2*、*HSP81-3* は常温でも転写物の蓄積が認められる。*HSP81-1* と *HSP81-2*、*HSP81-2* と *HSP81-3* は 5'-UTR の塩基配列にそれぞれ 40%、67%の相同性があるが、*HSP81-1* と *HSP81-3* 間の 5'-UTR の相同性は 28%と低い。また 5'-UTR の長さは *HSP81-1* と *HSP81-2* がそれぞれ 91 塩基、92 塩基とほぼ同じ長さなのに対して、*HSP81-3* は 113 塩基と若干長く、翻訳抑制回避能と 5'-UTR の長さ、塩基配列の関係を検討するのに有利であると考えられる。

本章では、植物における熱ストレス温度を詳細に検討し、タバコとシロイヌナズナのプロトプラストにおいて、*HSP* 5'-UTR が高温域での翻訳抑制の回避に寄与することを示した。また、形質転換タバコ植物体においても、同様の現象が得られた。

## 1.2 実験材料と方法

### 1.2.1 遺伝子操作技術

大腸菌を用いた遺伝子操作については、特に断りの無い限り、Molecular Cloning (51)に従った。

### 1.2.2 タバコおよびシロイヌナズナ培養細胞の培養

タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2) は、300 ml のマイヤーフラスコに改変 LS 培地 (52) を 95 ml 入れ、27°C で、130 rpm の攪拌速度、暗所下にて培養した (BR-3000; TAITEC, Saitama)。細胞の継代培養は 7 日ごとに定常期に達した細胞を新しい培地へ 2 ml 植え継いだ (53)。

シロイヌナズナ培養細胞 (*Arabidopsis thaliana* T87) は理化学研究所ジーンバンク室植物細胞開発銀行より分与していただいた。300 ml のマイヤーフラスコに改変 LS 培地を 95 ml 入れ、22°C で、140 rpm の攪拌速度、18 時間明期、6 時間暗期の光条件下にて培養した (Innova 2300; New Brunswick Scientific, NJ, USA)。細胞の継代培養は 14 日ごとに定常期に達した細胞を新しい培地へ 5 ml 植え継いだ。

### 1.2.3 培養細胞を用いた一過性発現解析

#### 導入プラスミドの構築

カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA (CaMV35S) プロモーターの転写開始点より 7 塩基上流の 6 塩基を *Cla*I 配列 (ATCGAT) に置換するために pBI221 (54) を鋳型に 35SNco と 35SCla (Table 1-1) をプライマーに用いて PCR を行った。増幅された DNA 断片を pUC19 の *Hinc*II 部位にクローニングし、塩基配列を確かめ、これを p35SNcoCla と名付けた。p35SNcoCla に含まれる CaMV35S プロモーター内に位置する *Nco*I 部位とプラスミド由来の *Bam*HI 部位で切断して得られた約 500 塩基対の断片を pBI221 の *Nco*I-*Bam*HI 領域に挿入し、得られたプラスミドを pBI221Cla (Fig. 1-1) と名付けた。

*HSP18.2* 遺伝子 (48) の完全長 (45 bp) の 5'-UTR 領域を含み、5'末端側に *Cla*I、3'末端側に *Bam*HI の切断部位ができるようにデザインした 2 種のオリゴヌクレオチド、

18.2UTR-45-for と 18.2UTR-45-rev (Table 1-2) をアニーリングさせた後、pBI221Cla の *ClaI-BamHI* 領域に挿入し、得られたプラスミドを 18.2UTR-45 と名付けた。

PCR またはオリゴヌクレオチドのアニーリング (Table 1-1, 1-2) によって得られたその他のシロイヌナズナ由来 *HSP* 遺伝子 *HSP17.4*, *HSP81-1*, *HSP81-2* および *HSP81-3* (47, 49, 50) の 5'-UTR 断片を pBI221Cla の *ClaI-BamHI* 領域に挿入し、得られたプラスミドはそれぞれ 17.4UTR、81-1UTR、81-2UTR および 81-3UTR と名付けた (Fig. 1-1)。

これらの転写開始点はすべて CaMV35S プロモーターのものと一致するようにデザインした。

プロトプラストの調製およびエレクトロポレーションによる DNA の導入

改変 LS 培地で 3 日間培養した BY-2 細胞または 10 日間培養した T87 細胞を酵素液 (0.1% Pectolyase Y23 [Kikkoman, Chiba], 1% [BY-2 細胞] または 10% [T87 細胞] Cellulase RS [Yakult Honsha, Tokyo], 0.4 M Mannitol, pH 5.5) で 25°C、2 時間処理後、0.4 M Mannitol で 2 回、エレクトロポレーションバッファー (5 mM MES, 70 mM KCl, 0.3 M Mannitol, pH 5.8) で 1 回洗浄し、酵素を除いた。1.5×10<sup>6</sup> 個の細胞 (BY-2 細胞) または 5×10<sup>6</sup> 個の細胞 (T87 細胞) を 0.5 ml のエレクトロポレーションバッファーに懸濁し、200 V、100 ms、400 μF (BY-2 細胞) または 300 V、100 ms、400 μF (T87 細胞) の条件でエレクトロポレーションシステム (Gene Pulser; Bio-Rad Laboratories, CA, USA) により供試するプラスミド DNA 10 μg と内部標準に用いる pBI221-luc+ (55) 1 μg を導入した。10 ml のプロトプラスト培地 (改変 LS 培地 [Sucrose 濃度 10 g/l], 0.4 M Mannitol) を加え 2 分割して、60-mm のシャーレに移して以下の条件で培養した。BY-2 細胞においては 26°C、暗黒下で 6 時間静置培養した後、一方を処理温度に移動し、12 時間後活性測定を行った。T87 細胞においては 2 分割後 22°C、暗黒下で 9 時間静置培養した後、一方を処理温度に移動し、15 時間後に活性測定を行った。キュベットは 0.4 cm 幅 (Gene Pulser Cuvette; Bio-Rad Laboratories) のものを使用した。

BY-2 細胞、T87 細胞ともに、導入 DNA 量を 1 から 20 μg まで増加した場合の GUS 比活性の増加には直線性が見られた。

#### 1.2.4 タンパク質の新規合成の検出

タンパク質の *in vivo* RI 標識

プラスミド DNA 導入後、22°C で 9 時間静置培養した T87 プロトプラストを回収し、1.5 ml あたり 1×10<sup>7</sup> 個の細胞数になるようプロトプラスト培地に懸濁して、12 穴のタイタープレートに 1.5 ml ずつ分注した。22°C および 33°C に設定した人工気象器 (NC-350S; Nippon Medical & Chemical Instruments, Osaka) の中に設置した振盪器 (MMS-200; Tokyo Rikakikai, Tokyo) にタイタープレートを置いて 70 rpm で振盪培養した。プロトプラストの回収直後 (DNA 導入後 9 時間) および処理温度移行 2 時間後 (DNA 導入後 11 時間) に 10 μCi の Na<sub>2</sub>[<sup>35</sup>S]SO<sub>4</sub> (Amersham Biosciences, NJ, USA) を添加した。さらに 1 時間および 2 時間各温度で培養した後、全細胞を回収し、プロトプ

ラスト培地で1回洗浄後、液体窒素で凍結し、-80℃で凍結保存した。

#### 全タンパク質粗抽出液の調製

200  $\mu$ l の GUS/LUC バッファー (0.1 M  $KPO_4$ , 2 mM EDTA, 5% Glycerol, 2 mM DTT, pH 7.8) を加え、氷水中で超音波発生器 (UR-20P; Tomy Seiko, Tokyo) を用いて、出力 7 から 8 で 15 秒破碎、15 秒氷冷を 4 回繰り返し、細胞を破碎した。遠心分離 (12,000  $\times g$ , 10 min, 4°C) し、得られた上清を粗抽出液とした。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 用試料の調製および SDS-PAGE は、Laemmli (56) の方法に従った。7.5% ポリアクリルアミドゲルに試料をアプライし、恒温式ミニゲルスラブ電気泳動装置 (NA-1012; Nihon Eido, Tokyo) を用いて、10 mA の定電流で電気泳動を行った。分子量マーカには Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (Bio-Rad Laboratories) を使用した。泳動終了後、ゲルを染色溶液 (0.25% CBB R-250, 10% Acetic acid, 50% Methanol) で振盪しながら 15 分間染色し、さらに脱色溶液 (10% Acetic acid, 30% Methanol) 中で 1 時間振盪し、脱色を行った。脱色ゲルはゲル乾燥機 (HydroTech Gel Drying Systems; Bio-Rad Laboratories) を用いて 80°C で 30 分間乾燥後、X 線フィルムに 1 晩接触させ、現像した。

### 1.2.5 酵素活性測定法

#### 粗酵素液の抽出

回収したプロトプラストに 0.5 ml の GUS/LUC バッファーを加え、氷水中で超音波発生器 (UR-20P; Tomy Seiko) を用いて、出力 7 から 8 で 15 秒破碎、15 秒氷冷を 4 回繰り返し、細胞を破碎した。遠心分離 (12,000  $\times g$ , 10 min, 4°C) し、得られた上清を粗酵素液とした。

形質転換 BY-2 細胞を用いた場合、約 100  $\mu$ l の BY-2 細胞を 0.5 ml の改変 GUS lysis バッファー (50 mM  $NaH_2PO_4$ , pH 7.0, 10 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) に懸濁し、同様にして粗酵素液を抽出した。

#### 全タンパク質量の定量

Bradford の方法に従った (57)。既知濃度の BSA を用いて作成した検量線からタンパク質濃度を決定した。

#### GUS 活性の測定

Jefferson らの方法により行った (54)。蛍光/吸光マルチプレートリーダー (SPECTRAFluor; Tecan, Salzburg, Austria) を用いて、励起波長 365 nm、蛍光波長 455 nm で反応生成物 4-Methyl-Umbelliferone (4MU) の蛍光強度を 1 分ごとに 30 分間測定した。得られた蛍光強度の増加曲線と既知濃度の標準物質 4MU を用いて作成した検量線から、1 分あたりの 4MU 平均増加量を決定した。GUS 比活性はプロトプラスト

細胞を用いた GUS 活性測定においては pmol 4MU/min/mg protein、形質転換 BY-2 を用いた場合は nmol 4MU/min/mg protein とした。

#### ルシフェラーゼ (Luc) 活性の測定

Luc 活性はルシフェラーゼアッセイシステム (Picagene; Toyo Ink, Tokyo) を用いて測定した。Photon の検出にはルミノメーター (Lumat LB 9501; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いた。粗酵素液中のルシフェラーゼ濃度はキットに付属の精製ルシフェラーゼの photon の測定値を基に検量線を作成し、決定した。Luc 比活性は pmol Luc/mg protein とした。

#### GUS/Luc 相対活性の定義

GUS/Luc 相対活性は上記の測定によって得られた GUS 比活性および Luc 比活性より算出し、pmol 4MU/min/pmol Luc と定義した。

#### 1.2.6 全 RNA の調製

BY-2 プロトプラストおよび T87 プロトプラストからの全 RNA は RNA 精製キット (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて調製した。キットに付属のプロトコルに従った。導入されたプラスミド DNA の混入を防ぐため、得られた全 RNA を 20 units の DNase I (RNase free, Roche Diagnostics, Tokyo) と 50 units の Ribonuclease Inhibitor (Takara Shuzo, Otsu) を含む 100  $\mu$ l の DNase バッファー (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) 中で 37°C、30 分間インキュベートし、DNA を消化した。DNase 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を乾燥させてから 5  $\mu$ l の DEPC 水に溶解した。

#### 1.2.7 ノザン解析

1 g のアガロース HS (Nippongene, Toyama) を 79 ml の蒸留水で溶解し 16 ml のホルムアルデヒドと 5 ml の 20×MOPS バッファー (0.4 M MOPS, pH 7.0, 100 mM Sodium Acetate, 20 mM EDTA) を加えてサブマリン型電気泳動ゲルを作製した。RNA サンプル (20  $\mu$ g total RNA, 1×MOPS, 15% Formaldehyde, 50% Formamide, 500 ng Ethidium Bromide) を、70°C で 10 分間加熱、氷冷した後にアプライした。一定電圧 (100 V)、1×MOPS バッファー中で電気泳動を行った。

Hybond N+ ナイロンメンブレン (Amersham Biosciences) に電気泳動により分離した RNA をキャピラリー法で 12 時間以上トランスファーした (51)。トランスファーには、20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate) を用いた。トランスファー終了後、GS GENE LINKER™ (Bio-Rad Laboratories) のプログラム 3 で UV クロスリンクした。

メンブレンとハイブリダイゼーションバッファー (0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 1 mM EDTA, 7% SDS) をハイブリバックに入れ、65°C で 1 時間以上、プレハイブリダイゼーションを行った (58)。BcaBest™ Labeling Kit (Takara Shuzo, Otsu) を用いて 1800 塩基対の完全長 GUS 遺伝子を含む BamHI-SacI 断片を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham

Biosciences) で標識後、95°Cで 10 分間加熱、氷冷しハイブリダイゼーションに用いた。16 時間以上、65°C でハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 65°C で一次洗浄液中 (2×SSC, 0.1% SDS) 10 分間、振盪させながら洗浄した。順に二次洗浄液 (1×SSC, 0.1% SDS)、三次洗浄液 (0.5×SSC, 0.1% SDS) に変更し、同様に洗浄した。X 線フィルムに 2 日間接触させた後、現像した。

## 1.2.8 形質転換体 BY-2 細胞の作出

### バイナリープラスミドの構築

1.2.3 で作成した一過性発現導入用のプラスミドの *Hind*III-*Bam*HI 断片を pBI121 (54) の *Hind*III-*Bam*HI 領域に挿入した。

BY-2 細胞の形質転換はアグロバクテリウム感染法により行った (59)。

## 1.3 結果

### 1.3.1 熱ストレス下におけるシロイヌナズナ *HSP18.2* 5'-UTR の翻訳抑制回避

*HSP* 遺伝子の発現は主に転写レベルで制御されており、そのプロモーターは熱ストレスによって転写が活性化されるため、通常培養温度では一部の *HSP* 遺伝子を除き、転写は抑制されていると考えられている。熱ストレス下での翻訳抑制回避に *HSP* 5'-UTR が寄与するかどうかを調べるために、構成的に発現する *CaMV35S* プロモーターの支配下にシロイヌナズナ *HSP18.2* の 5'-UTR を挿入し、*GUS* 遺伝子を連結し、キメラ遺伝子 18.2UTR-45 を構築した (Tables 1-1, 1-2, Fig. 1-1)。

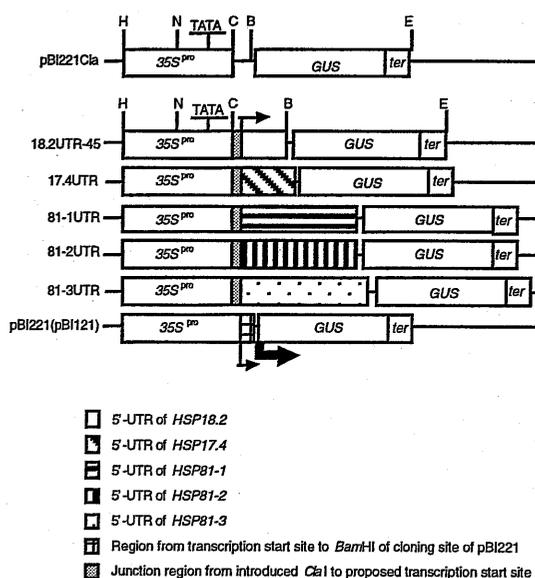


FIG. 1-1. Structure of the promoter/5'-UTR/*GUS* chimeric gene constructs. Thin arrow indicates the proposed transcription start site and thick arrow indicates the translation start site. Translation of all constructs starts from the AUG initiation codon of the *GUS* gene. A *Cla*I site was created 7 bp upstream of the proposed transcription site for the introduced 5'-UTR. H, *Hind*III; N, *Nco*I; C, *Cla*I; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI.

TABLE 1-1. Primer sets for PCR used in this work

	Oligo:	Sequence <sup>a, b</sup>	Template	Linker	Plasmid	
	35SNco	AGGCCATGGAGTCAAAGATTCAA	pBI221	<u>NcoI</u>	p35SNcoCla	
	35SCla	CCATCGATAATGAACCTCCTTATA		<u>ClaI</u>		
5'-UTR	Oligo:	Sequence <sup>a, b</sup>	Template	Linker	Plasmid	Ref.
<i>HSP81-1</i>	81-1UTR-for	TTATCGATAAAACAATCACAAATC	pTT102	<u>ClaI</u>	81-1UTR	(49)
	81-1UTR-rev	AAGGATCCCGCAACGAACCTTGTAT		<u>BamHI</u>		(49)
<i>HSP81-2</i>	81-2UTR-for	TTATCGATTAAATGCCGCATCAGT	pTT110	<u>ClaI</u>	81-2UTR	(49)
	81-2UTR-rev	AAGGATCCTGTCTGTAGATCGGGAA		<u>BamHI</u>		(49)

<sup>a</sup> The oligonucleotides used as PCR primers are listed in 5'-3' orientation.

<sup>b</sup> The restriction sites in linkers are underlined.

TABLE 1-2. Oligonucleotides for annealing used in this work

5'-UTR	Oligo:	Sequence <sup>a, b</sup>	Plasmid	Ref.
<i>HSP18.2</i>	18.2UTR-45-for	<u>CGATTCAAATCAGCAGGAAAATCAAGAACCAAAAGTCTCCC</u> GAAAAGCAACGAACAG	18.2UTR-45	(47)
	18.2UTR-45-rev	<u>GATCCTGTTCGTTGCTTTTCGGGAGACTTTTGGTTCCTGATTT</u> TCCTGCTGATTTGAAT		(47)
<i>HSP17.4</i>	17.4UTR-for	<u>CGATTTGCATTGGAAGAGAGTTCTAGCAAAAACAAAACAAAAC</u> AGAGCAAACAGAGTAAGCGAAACGG	17.4UTR	(47)
	17.4UTR-rev	<u>GATCCCGTTTCGCTTACTCTGTTTGCTCTGTTTTGTTTTGTTTTG</u> CTAGAACTCTCTCGAATGCAAAT		(47)
<i>HSP81-3</i>	81-3UTR-for	<u>CGATCTTCCCCAAAGTCTCGTATCAATCAACACTTCTCTGCTCT</u> CTAAAGAAAATTTTGCTCTCTTTATC TCTCGATTTGATTCATAA ACCCTAGCTCTTAGATTTTTTTTTCCGATCAACGAGAG	81-3UTR	(50)
	81-3UTR-rev	<u>GATCCTCTCGTTGATCGGAAAAAAATCTAAGAGCTAGGGTTTA</u> TGAATCAAATCGAGAGATAAAGAG AGCAAATTTTCTTTAGAG AGCAGAGAAGTGTTGATTGATACGAGACTTTGGGGAAGAT		(50)

<sup>a</sup> The oligonucleotides used for annealing are listed in 5'-3' orientation.

<sup>b</sup> The restriction sites in linkers are underlined.

18.2UTR-45 と対照である pBI221 を T87 のプロトプラストにエレクトロポレーションで導入し、27℃から 37℃までの様々な強度の熱ストレスを与え、GUS 比活性の経時変化をみた (Fig. 1-2)。一過性発現実験は処理温度ごとに行い、1 回の一過性発現実験には同一のプロトプラストを用いた。エレクトロポレーションでプラスミドを導入後、2 分割して培養しているため、同一の系においては、22℃と試験温度で培養した細胞に導入効率による差はないものとした。同一の一過性発現実験を 3 回以上繰り返し、再現性を得た。その結果、pBI221 を導入したプロトプラスト細胞は 27℃の熱ストレス条件下では、通常培養温度である 22℃での GUS 活性値と同程度の値を示した (Fig. 1-2)。しかし 29℃の熱ストレスにさらされると GUS 比活性は低下をはじめ、33℃の熱ストレス下においては、22℃での GUS 活性値の 50%、35℃においては 30%にまで低下した。また、18.2UTR-45 は pBI221 に比べて高い GUS 比活性を示した。

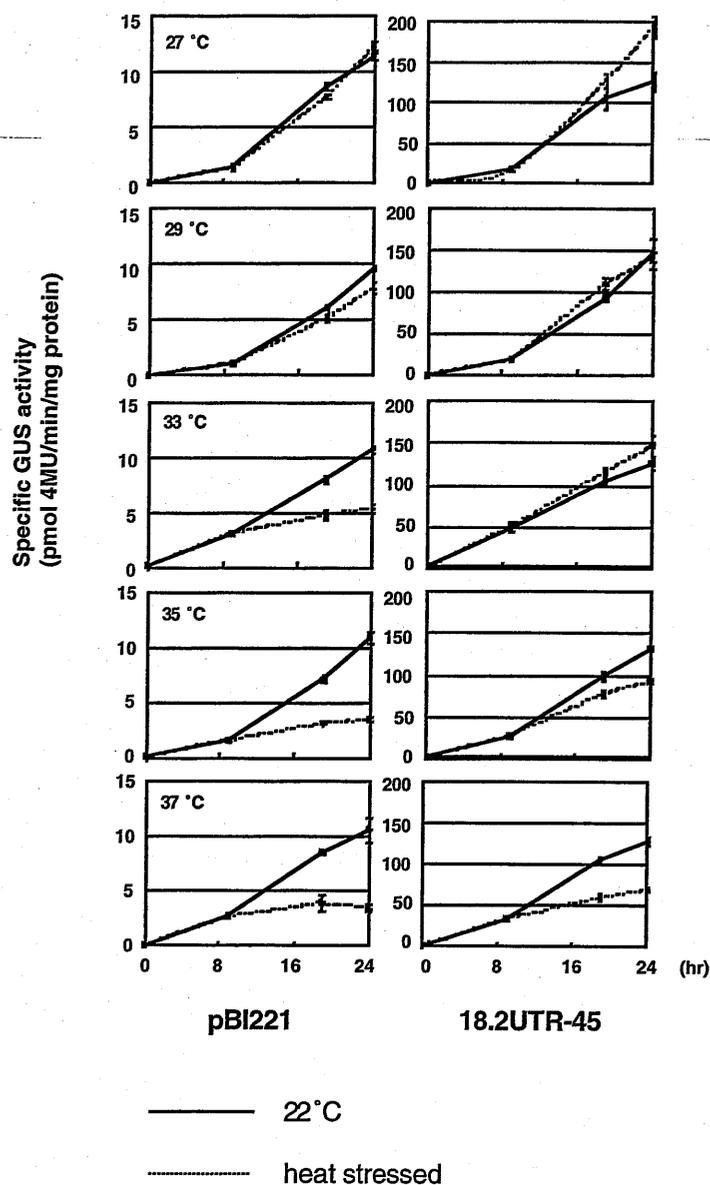


FIG. 1-2. Effect of the 5'-UTR of *HSP18.2* on translation during heat stress in electroporated *Arabidopsis* T87 protoplasts. The indicated specific GUS activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments.

多くの生物種において、高温下では通常のタンパク質の合成は抑制され、HSPの合成が強く誘導されることが知られており、植物においても同様の現象が見られると考えられている。この33°CにおけるGUS活性の低下は熱ストレスによる翻訳抑制と考えられる。シロイヌナズナにおいても熱ストレス(33°C)がかかった際にタンパク質の新規合成が抑制されるかどうかを調べた(Fig. 1-3)。プロトプラスト化後、22°Cで9時間静置培養し、33°Cの熱処理温度に細胞を移行した。処理温度移行直後に $\text{Na}_2[^{35}\text{S}]\text{SO}_4$ を添加し、1時間、および2時間、RI標識を行った細胞、33°Cで2時間前培養した後、 $\text{Na}_2[^{35}\text{S}]\text{SO}_4$ を添加し、1時間、および2時間、RI標識を行った細胞

から全タンパク質粗抽出液を調製し、SDS-PAGE を行った。その結果、T87 プロトプラストにおいて 33°C の処理温度移行後 2 時間以内に、ほぼ主要なタンパク質の新規合成は抑制されることが明らかになった (Fig. 1-3)。

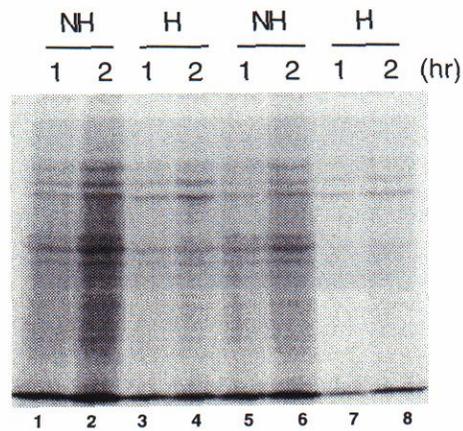


FIG. 1-3. Thermal inhibition of *de novo* synthesis of protein in *Arabidopsis* T87 protoplasts. Lane 3 and 4, immediately after shifting from 22°C to 33°C, protoplasts were labeled with  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{SO}_4$  for 1 hour and 2 hours, respectively; Lanes 1 and 2, control for lanes 3 and 4. protoplasts were labeled with  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{SO}_4$  for 1 hour and 2 hours at 22°C, respectively; lanes 7 and 8, 2 hours after shifting to 33°C, protoplasts were labeled with  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{SO}_4$  for 1 hour and 2 hours, respectively; Lanes 5 and 6, control for lanes 7 and 8. protoplasts were labeled for 1 and 2 hours at 22°C, respectively. NH; non heat stressed, H; heat stressed at 33°C.

一方、18.2UTR-45 を導入したプロトプラスト細胞は 33°C の熱ストレス条件下でも通常培養温度である 22°C での GUS 活性値と同程度の値を示し、35°C でも、約 80% の比活性があった (Fig. 1-2)。

33°C における GUS 活性値の違いが mRNA の安定化に起因する可能性も考えられるので、18.2UTR-45 および pBI221 を導入したプロトプラストにおける GUS mRNA の蓄積量を調べるために、22°C および 33°C の処理温度で培養したそれぞれのプロトプラストから調製した全 RNA を用いてノザン解析を行った (Fig. 1-4)。22°C と 33°C での GUS mRNA の蓄積量は、18.2UTR-45、pBI221 のどちらを導入した細胞においても同程度であり、33°C の熱処理による転写活性の減少や分解速度の上昇などに影響される GUS mRNA 蓄積量の減少は認められなかった。また、非特異的なシグナルは検出されず、導入されたプラスミド DNA は DNaseI 処理によって完全に消化されたと考えられる (data not shown)。このことから、18.2UTR-45 または pBI221 における GUS mRNA の安定性に顕著な差はなく、pBI221 の 5'-UTR は高温ストレス条件下で翻訳抑制を受ける一方、HSP18.2 の 5'-UTR は高温ストレス条件下での翻訳抑制の回避に寄与することが示された。

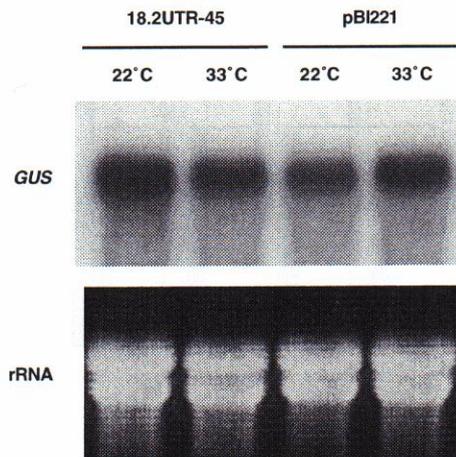


FIG. 1-4. Comparison of *GUS* mRNA accumulation during heat stress in electroporated *Arabidopsis* T87 protoplasts. Total RNA was prepared from  $1.5 \times 10^6$  electroporated protoplasts recovered simultaneously with the electroporation experiment at 19 hr after electroporation in Fig. 1-2. Each lane was loaded with 20  $\mu$ g total RNA. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is shown as a loading control.

### 1.3.2 熱ストレス下におけるシロイヌナズナ各 *HSP* 5'-UTR の翻訳抑制回避

生物は分子量の異なる多数の *HSP* を持つことが知られている。シロイヌナズナにおいても同様であり、*HSP* 遺伝子も数多く単離されている。18.2UTR-45 同様に *HSP17.4*、*HSP81-1*、*HSP81-2* および *HSP81-3* 遺伝子の全長 5'-UTR 断片を CaMV35S プロモーターの支配下に置いた発現系を構築し (Tables 1-1, 1-2, Fig. 1-1)、得られたプラスミド、17.4UTR、81-1UTR、81-2UTR および 81-3UTR を T87 プロトプラストにそれぞれ一過的に導入し、熱ストレスによる発現の変化をみた (Fig. 1-5)。1.3.1 の結果から、33°C をシロイヌナズナにおける熱処理温度とした。DNA 導入後 22°C で 9 時間培養し、33°C の処理温度に移してさらに 15 時間培養した後、細胞を回収し、*GUS* 比活性を測定した。同一の一過性発現実験を 3 回以上繰り返し、再現性を得た。その結果、すべての *HSP* 5'-UTR を持つ発現系において熱処理後も 22°C で培養したもののほぼ 80% 程度の *GUS* 比活性を示し、*HSP18.2* の 5'-UTR だけでなく、他の分子量 *HSP* 5'-UTR もまた熱ストレス条件下での翻訳抑制回避に寄与することが示された。

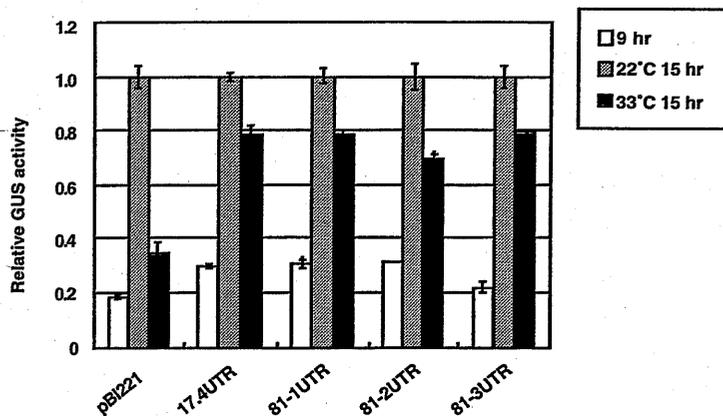


FIG. 1-5. Effect of the 5'-UTR of *HSP* on translation during heat stress in electroporated *Arabidopsis* T87 protoplasts. The indicated relative GUS activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments. The relative GUS activities to the level obtained from each aliquot of protoplasts incubated for 15 hr at 22°C are shown.

### 1.3.3 *HSP18.2* の 5'-UTR の種を超えて保存された熱ストレス下での翻訳抑制回避

次に単離された植物体とは異なるヘテロな系においても *HSP18.2* の 5'-UTR が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与するかどうかを調べた。18.2UTR-45 を BY-2 プロトプラストにエレクトロポレーションで一過的に導入し、様々な強度の熱ストレスを与え、GUS 比活性の経時変化をみた (Fig. 1-6)。対照には pBI221 を用いた。DNA 導入後 25°C で 6 時間培養し、処理温度に移してさらに 12 時間培養した後、細胞を回収し、GUS 比活性を測定した。同一の一過性発現実験を 3 回以上繰り返し、再現性を得た。その結果、pBI221 を導入したプロトプラスト細胞は 30°C および 35°C の熱ストレス条件下では、通常培養温度である 25°C での GUS 活性値と同程度の値を示した。しかし、37°C の熱ストレスにさらされると GUS 比活性は劇的に低下し、25°C での GUS 活性値の 50%、39°C 以上では 30% にまで低下した。一方、18.2UTR-45 を導入したプロトプラスト細胞は 37°C の熱ストレス条件下でも通常培養温度である 22°C での GUS 活性値と同程度の値を示し、39°C でも、約 80% の比活性があった。以上の結果から、*HSP18.2* の 5'-UTR による熱ストレス下での翻訳抑制回避がタバコにおいても機能することが示され、5'-UTR を介した翻訳制御は植物種を超えて保存されていることを示している。また、37°C を以後の実験でのタバコにおける熱処理温度とした。

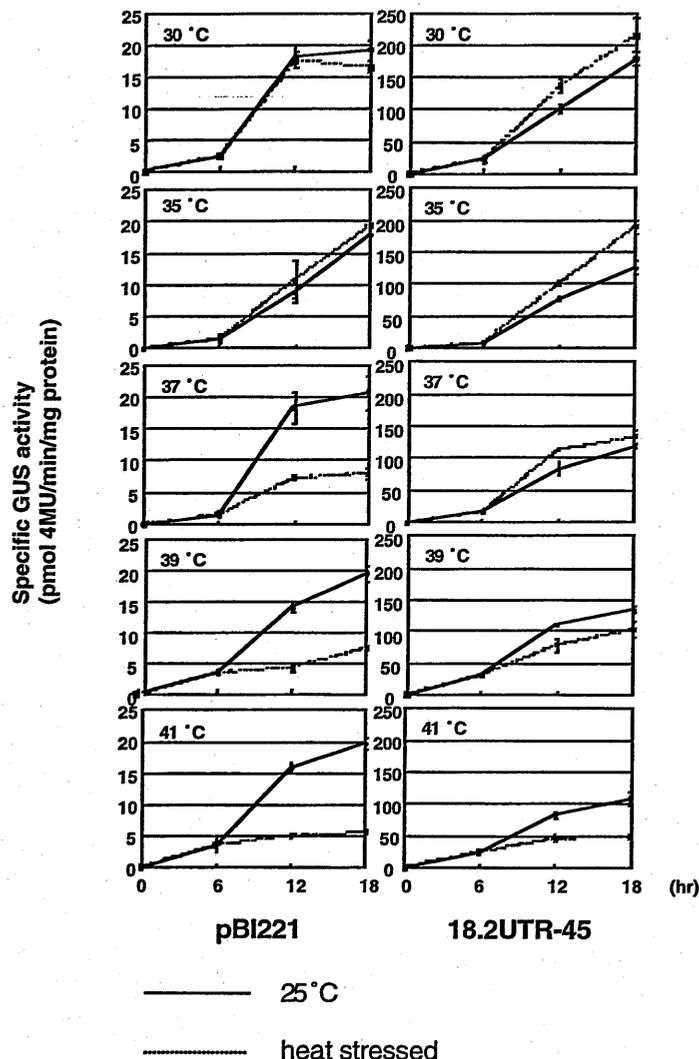


FIG. 1-6. Effect of the 5'-UTR of *HSP18.2* on translation during heat stress in electroporated tobacco BY-2 protoplasts. The indicated specific GUS activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments.

次に、形質転換 BY-2 においても *HSP18.2* の 5'-UTR は熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与するかどうかを検討した。18.2UTR-45 の *HindIII-BamHI* 領域をバイナリーベクターである pBI121 に乗せかえ、アグロバクテリウム感染法によって BY-2 を形質転換した。同様に対照である pBI121 を用いて BY-2 の形質転換を行った。カナマイシンによる選抜を繰り返した後、得られた形質転換候補カルスから 3 クローンを選択し、液体培地で数回、継代培養を繰り返した後、実験に用いた。25°C で継代後 3 日目の 18.2UTR-45 および pBI121 を 2 分割し、一方は 37°C の処理温度に、もう一方は引き続き 25°C で 20 時間培養後、細胞を回収して GUS 比活性を測定した (Fig. 1-7A)。その結果、18.2UTR-45 を導入した BY-2 細胞は 25°C と 37°C で GUS 比活性にまったく差は見られなかったが、pBI121 においては 25°C で培養した細胞の GUS 比活性に対し、約 60% に活性値が低下した。

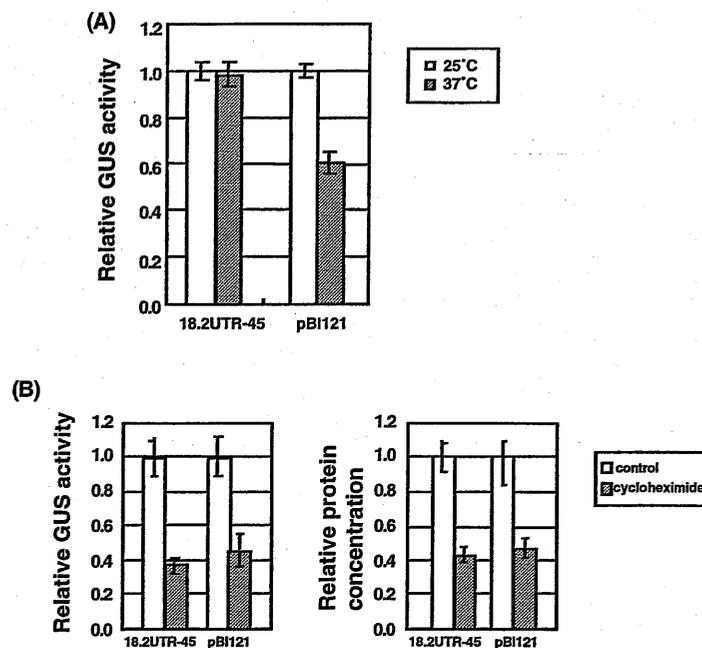


FIG. 1-7. Effect of the 5'-UTR of *HSP18.2* on translation during heat stress in transgenic BY-2 cells. The indicated relative GUS activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments. (A) The GUS activities are shown relative to the level of obtained from each aliquot of transgenic BY-2 cells incubated at 25°C. (B) The GUS activities and protein concentrations are shown relative to the level of obtained from each aliquot of transgenic BY-2 cells incubated without cycloheximide as a control.

また、シクロヘキシミド添加による翻訳阻害実験を行った (Fig. 1-7B)。継代後3日目の 18.2UTR-45 および pBI121 を 2 分割し、一方に終濃度 10  $\mu$ g/ml になるようにシクロヘキシミドを添加した。引き続き 25°C で 20 時間培養した後、細胞を回収して GUS 活性を測定した。その結果、シクロヘキシミドを添加した 18.2UTR-45、pBI121 における GUS 活性値はともに薬剤を加えなかった細胞の 40% 程度に低下していた。また、それぞれの全タンパク質量も薬剤を加えなかった細胞の 40% 程度に低下していた。薬剤によって翻訳が阻害され、新しい GUS タンパク質の供給がされなくなった場合、細胞内の蓄積 GUS タンパク質量は 20 時間で 40% に減少することが示された。以上より 18.2TR-45 において 37°C の熱ストレス下でも GUS 比活性が低下しなかったのは、処理温度に移行後も GUS タンパク質の新規合成が行われたためであると考えられる。18.2UTR-45、pBI121、それぞれ 3 つのクローンを用いて同じ実験を行ったところ、同様の結果を得たため、代表的なデータを示した。

GUS タンパク質自体の熱に対する安定性を調べるために継代後 3 日目の 18.2UTR-45 細胞を回収し、抽出した粗酵素液を種々の温度で 1 時間インキュベートした後、GUS 比活性を測定した。その結果、粗酵素液中の GUS タンパク質は 45°C で処理されても活性が低下しなかった (Fig. 1-8)。この結果から、高温での GUS 比活性の低下は GUS タンパク質の失活、分解によるものではないと考えられる。

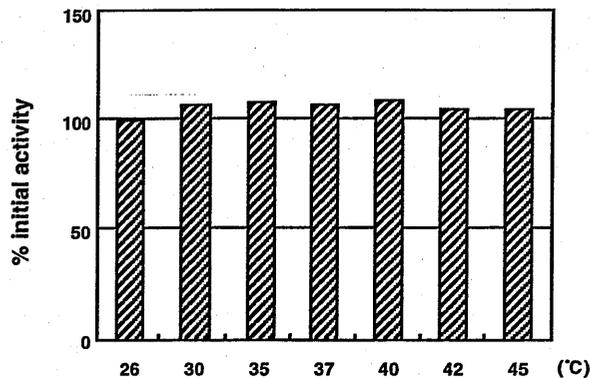


FIG. 1-8. The stability of GUS protein. Samples extracted from transgenic BY-2 cells introduced 18.2UTR-45 were incubated for 1 hour at indicated temperatures. Relative values of the specific GUS activity at each temperature compared to the GUS activity of the corresponding initial point were calculated.

#### 1.4 考察

細胞が熱ストレスにさらされると、*HSP* mRNA は翻訳されるが、他の遺伝子の mRNA の翻訳は抑制される。T87 プロトプラストを用いた一過性発現実験において pBI221 を導入した細胞の GUS 比活性が 33°C の培養温度では 22°C でのほぼ半分まで低下することを示した (Fig. 1-2)。22°C および 33°C での mRNA の蓄積量を比較したところ (Fig. 1-4)、pBI221 を導入した細胞における高温域での GUS 比活性の低下を説明しうるような mRNA 蓄積量の減少は見られず、pBI221 由来の 5'-UTR を持つ mRNA が高温域で非常に安定性が低くなるという可能性を除外した。一過性発現実験で pBI221 を導入した細胞における高温域での GUS 比活性の低下は翻訳が抑制された結果を反映するものであると考えられる。

一方、熱ストレス下でのシロイヌナズナ細胞における全体的なタンパク質新規合成の挙動を調べるために、パルスラベルを用いて、単位時間に合成されるタンパク質の検出を行った。その結果、シロイヌナズナのタンパク質新規合成は熱ストレス下で抑制されることが明らかになった (Fig. 1-3)。

1989年、Schöfflらはダイズの *Gmhsp17.3-B* 遺伝子プロモーターの下流に *CAT* 遺伝子を連結した発現系を用いて *Gmhsp17.3-B* 5'-UTR の熱ストレスに対する応答を調べたところ、5'-UTR の大部分を失うと翻訳が起こらなくなることから、*HSP* 遺伝子の翻訳制御に 5'-UTR が関与する可能性を示した (46)。しかし、この実験系では *CAT* mRNA の蓄積量自体が激減しており、*CAT* 活性の消失が 5'-UTR に存在する高温域での翻訳に寄与する領域を失ったために *CAT* mRNA の翻訳が起こらなくなったためなのか、転写物蓄積量の劇的な減少によって翻訳されるタンパク質量が検出限界以下

に減少しただけなのかを区別することが不可能である。一方、1992年の Pitto らはトウモロコシの *HSP70* 5'-UTR が高温域における翻訳抑制回避に寄与することを報告している。Pitto らは *in vitro* で転写した mRNA を用いることによって、*HSP70* 5'-UTR-*GUS* 融合遺伝子と対照となる合成 5'-UTR-*GUS* 融合遺伝子の導入 mRNA 量をそろえているため、得られた *GUS* 活性値はそれぞれ通常培養温度および熱ストレス温度での翻訳を反映している。また、異なる 5'-UTR でも mRNA の安定性に差がないことも示している (43)。よって、現在までのところ、植物で高温域における翻訳抑制回避に寄与することを明確に示したのはトウモロコシ *HSP70* の 5'-UTR だけである。

本研究において *HSP18.2* 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与することが示された。*HSP* 遺伝子の発現は主に転写レベルで制御されており、そのプロモーターは熱ストレスによって活性化される。熱ストレス下での翻訳抑制回避に *HSP* 5'-UTR が寄与するかどうか、転写の活性化という過程を介さず翻訳だけを検討するために、構成的に発現する *CaMV35S* プロモーターの支配下にシロイヌナズナ *HSP* の 5'-UTR を挿入したキメラ遺伝子を構築した (Fig. 1-1)。

T87 および BY-2 プロトプラストを用いた一過性発現実験において、18.2UTR-45 を導入した細胞に様々な温度の熱ストレスを与え、*GUS* 比活性の経時変化を詳細に調べたところ、シロイヌナズナで 33°C、タバコでは 37°C の熱ストレスを与えても、細胞は通常培養温度で得られる *GUS* 比活性をほぼ 100% 維持した (Figs. 1-2, 1-6)。18.2UTR-45 を導入した細胞における処理温度での *GUS* mRNA の蓄積量は 22°C における蓄積量とほぼ同程度であった (Fig. 1-4)。さらに形質転換 BY-2 においても *HSP18.2* 5'-UTR は熱ストレスによる翻訳抑制を回避することを示した (Fig. 1-7)。これは *in vivo* で *HSP18.2* 5'-UTR による熱ストレス下での翻訳抑制の回避を示した初めての例である。またヘテロな発現系であるにも関わらず、BY-2 プロトプラストにおいてもシロイヌナズナの *HSP18.2* 5'-UTR は熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与し (Figs. 1-6, 1-7A)、5'-UTR を介した翻訳制御が植物種を超えて保存されていることを明らかにした。

また、シクロヘキシミドを用いて翻訳を阻害した場合、pBI121 を導入した形質転換 BY-2 と同様に 18.2UTR-45 を導入した BY-2 においても、細胞内の蓄積 *GUS* タンパク質量が 40% に減少することが示された (Fig. 1-7B)。18.2UTR-45 を導入した細胞の高温域での高い *GUS* 比活性は新規に合成された *GUS* タンパク質量を反映しているためと考えられる (Fig. 1-7A)。*GUS* タンパク質自体は熱に対して非常に安定であるため、40°C 付近の高温域においてすべての発現系で見られた *GUS* 比活性の低下が *GUS* タンパク質の失活である可能性は除外した (Fig. 1-8)。

さらに、*HSP18.2* 遺伝子のみならず、4 種類のシロイヌナズナ *HSP* 5'-UTR が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与することを示した (Fig. 1-5)。パルスラベルの結果からも熱ストレス下において一部のタンパク質が引き続き合成されることが示されたが (Fig. 1-3)、それらがすべて *HSP* であるかどうかはまだ不明である。これまでの研究の問題点は既知の遺伝子の 5'-UTR を用いて、それが高温域での翻訳抑制回避に寄与するかどうかを調べるという手法であるため、単離された 5'-UTR しか検討できな

い点である。今後の研究課題として高温域で翻訳されるタンパク質を単離同定し、その 5'-UTR の塩基配列、長さなどを詳細に調べるとい手法が考えられる。今までとは逆の方向からの取り組みはバイアスのかからない広範な 5'-UTR の単離が可能であるため、高温域で翻訳されるタンパク質の特徴付けや高温域で翻訳される 5'-UTR とはどのようなものなのかについて網羅的な知見を得られるだろう。

本章において、新たにシロイヌナズナの 5 種類の *HSP* 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与することが示された。高温域での翻訳抑制回避機構の解明を目指し、これらの 5'-UTR の二次構造や塩基配列などの検討を第 2 章での研究課題とした。また、*HSP18.2* 5'-UTR が pBI221 に比べ高い GUS 比活性を持つことが示された (Figs. 1-2 and 1-6)。このことから、*HSP* 5'-UTR を用いた有用物質高発現系の確立といった応用面からの検討を第 3 章での課題とした。

## 第2章 高温域での優先的翻訳機構

### 2.1 序論

植物において、現在わかっている高温下での遺伝子発現様式は 1) *HSP* 遺伝子 mRNA は熱ストレス下でも翻訳が行われるが、他の遺伝子 mRNA の翻訳は抑制される。2) 翻訳が抑制された遺伝子の mRNA はポリソームから遊離し、細胞質内のどこかに隔離される。の 2 点であり、1) に関しては *HSP* 5'-UTR 領域があると翻訳抑制が回避されること、2) に関しては HSGs あるいは mRNPs が関わっている可能性があることが報告されている (34, 38, 43)。しかし、*HSP* 遺伝子 mRNA の 5'-UTR がどのような機構で高温域でもポリソームにとどまるのか、解離した mRNA の隔離場所は HSGs あるいは mRNPs なのか、または未知のファクターあるいは未知の機構が存在するのか不明である。

1992 年、Hess らによってショウジョウバエの *HSP70* の 5'-UTR に対する詳細な解析がなされ、5'末端から 17 塩基の所に -11 kcal/mol の自由エネルギーを持つステム-ループ構造をとるような変異を導入すると常温では翻訳されても高温での翻訳が起こらなくなり、5'末端から 60 塩基の所に -22 kcal/mol の自由エネルギーを持つステム-ループ構造を導入した場合、常温においても翻訳が阻害されることが報告された (31)。

前章において、シロイヌナズナの *HSP* 5'-UTR が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与することが示された。本章では翻訳抑制回避の機構に迫る知見を得るため、*HSP18.2* の 5'-UTR について詳細な検討を行った。*HSP18.2* の 5'-UTR の欠失解析を行い、7 塩基まで 5'-UTR を失うと高温での翻訳が起こらなくなることを示した。*HSP18.2* の 5'-UTR の二次構造を決定し、その二次構造を変えるような塩基置換を行ったが、二次構造が違っていても熱ストレス下での翻訳抑制回避能は失われなかった。また、*in vitro* で *HSP18.2* の 5'-UTR の二次構造が熱処理によって変化しないことを示した。

### 2.2 実験材料と方法

#### 2.2.1 5'-UTR の二次構造解析

##### *in vitro* 転写用プラスミドの構築

5'末端側から、*Hind*III の切断部位、T3 プロモーター配列、*HSP18.2* 遺伝子の完全長 (45bp) 5'-UTR 領域、*Bam*HI の切断部位、という順に並んだ DNA 断片ができるようにデザインしたオリゴヌクレオチド、18.2-*invitro*-for と 18.2-*invitro*-rev (Table 2-1) をアニーリングさせた後、pBI221 の *Hind*III-*Bam*HI 領域に挿入し、得られたプラスミドを 18.2-*invitro* と名付けた (Fig. 2-1A)。*HSP18.2* の 5'-UTR に塩基置換を導入した発現系の構築についても、2 種のオリゴヌクレオチド、18.2mt-*invitro*-for と 18.2mt-*invitro*-rev (Table 2-1) を用いて同様に行った。得られたプラスミドは 18.2mt-*invitro* と名付けた (Fig. 2-1A)。

また pBI221 の 5'-UTR も同様に 5'末端側から、*Hind*III の切断部位、T3 プロモータ

一配列、5'-UTR 領域、*Bam*HI の切断部位、という順に並んだ DNA 断片ができるように2種のオリゴヌクレオチド、221-*in vitro*-for と 221-*in vitro*-rev (Table 2-1) をデザインし、アニーリング後、同様に pBI221 の *Hind*III-*Bam*HI 領域に挿入、得られたプラスミドを 221-*in vitro* と名付けた (Fig. 2-1A)。

#### Dimethyl Sulfate (DMS) 処理

*in vitro* 転写用キット (mMESSAGE mMACHINE™; Ambion, TX, USA) を用いて、キットに付属のプロトコルに従い、mRNA を合成した。*in vitro* DMS 処理は Higgs らの方法 (60) を改変して行った。*in vitro* 転写によって得られた mRNA 75 µg を 200 µl の DMS バッファー (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) 中で 22°C および 33°C で 20 分間プレインキュベートし、終濃度 40 mM になるようにそれぞれの試料に DMS を加えて mRNA のメチル化を行った。引き続き各試料を 22°C および 33°C で 5 分間インキュベートした後、終濃度 70 mM の β-mercaptoethanol を加えてメチル化反応を停止し、エタノール沈殿によって DMS を除去した。沈殿した mRNA は乾燥させてエタノールを除去した後、キットに付属の RNase-free water に溶解し、逆転写反応に用いた。

#### プライマー伸長法およびダイデオキシ法

DNA 5'末端標識キット (MEGALABEL™, Takara Shuzo) を用いて、キットに付属のプロトコルに従い、オリゴヌクレオチド (GUS120-*rev*; Table 2-1) を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Biosciences) で標識した。

DMS 処理された mRNA 50 ng を鋳型に、RI で 5'末端標識したオリゴヌクレオチド (GUS120-*rev*; Table 2-1) をプライマーに用いて、キットに付属のプロトコルに従い、逆転写反応 (Omniscrypt RT Kit, Qiagen) を行った。反応後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を乾燥させてから 3 µl の 1×サンプルバッファー (80% [v/v] Formamide, 1×TBE [90 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA (pH 8.0)], 0.05% [v/v] BPB, 0.05% [v/v] XC) に溶解し、93°C で 5 分加熱変性後氷冷し、電気泳動に用いた。

また、同時に泳動するシーケンスラダーをダイデオキシシーケンシングキット (T7 Sequencing Kit, USB, OH, USA) を用いて作製した。RI 取り込みには [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences) を使用し、キットに付属のプロトコルに従った。3 µl を電気泳動に用いた。

#### 変性アクリルアミドゲル電気泳動

6% 変性アクリルアミドゲル (7 M Urea, 1×TBE, 5.7% Acrylamide, 0.3% *N*, *N*'-Methylenebisacrylamide, 0.05% Ammonium Persulfate, 0.05% *N*, *N*, *N*', *N*'-Tetramethylethylenediamine) に試料をアプライし、水恒温式塩基配列決定用電気泳動装置 (NB-1300; Nihon Eido) を用いて、900 V の定電圧、1×TBE バッファー中で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲル乾燥機 (HydroTech Gel Drying Systems; Bio-Rad Laboratories) を用いて 80°C で 20 分間乾燥後、X 線フィルムに 1 晩接触させ、現像し

た。

## 2.2.2 培養細胞を用いた一過性発現解析

### 導入プラスミドの構築

1.2.3 で構築した 18.2UTR-45 を鋳型に 2 組のプライマーセット (Table 2-2 ; 35SNco/HSP18.2-24 および HSP18.2-7) を用いて、3'末端側から段階的に欠失させた HSP18.2 の 5'-UTR を PCR によって増幅した。pBI221 の *NcoI*-*Bam*HI 領域に、2 種の増幅断片をそれぞれ挿入し、得られたプラスミドを 18.2UTR-24、18.2UTR-7 と名付けた (Fig. 2-1B)。

2.2.1 で構築した塩基置換を導入した発現系と同じ塩基配列をもち、5'末端側に *Cla*I、3'末端側に *Bam*HI の切断部位ができるようにデザインした 2 種のオリゴヌクレオチド、18.2mt-for と 18.2mt-rev (Table 2-1) をアニーリングさせた後、1.2.3 で構築した pBI221*Cla* の *Cla*I-*Bam*HI 領域に挿入し、得られたプラスミドを 18.2mt と名付けた (Fig. 2-1B)。

プロトプラストの調製およびエレクトロポレーションによる DNA の導入  
1.2.3 と同様に行った。

### 酵素活性測定法

1.2.5 と同様に行った。

## 2.3 結果

### 2.3.1 HSP18.2 5'-UTR の二次構造解析および変異導入

第 1 章において HSP18.2 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与することが示された。HSP18.2 5'-UTR がどのような機構によって高温下で翻訳を継続しているのかわからないが、HSP18.2 5'-UTR に特異的に結合するタンパク質性の因子または HSP18.2 5'-UTR の二次構造、あるいはその両方が熱ストレス下での翻訳の開始、あるいはペプチド鎖の伸長に影響を及ぼしている可能性が考えられる。HSP18.2 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に働く機構に対する知見を得るために、HSP18.2 5'-UTR の二次構造を決定した (Fig. 2-2)。T3 プロモーターの支配下に HSP18.2 5'-UTR -*GUS* を連結した発現系 (18.2-*invitro*) と pBI221 の転写開始点から下流のクローニングサイト由来の 5'-UTR を含む *GUS* 遺伝子を同じく T3 プロモーターの下流に連結した発現系 (221-*invitro*) を構築した (Fig. 2-1A)。

TABLE 2-1. Oligonucleotides for annealing used in this work

5'-UTR	Oligo:	Sequence <sup>a,b</sup>	Plasmid	Ref.
<i>HSP18.2</i>	18.2- <i>in vitro</i> -for	<u>AGCTTAATTAACCC</u> CTACTAAAGGAGCAGGAAAATCAAGA ACCAAAAGTCTCCCGAAAAGCAACGAACAG	18.2- <i>in vitro</i>	(47)
	18.2- <i>in vitro</i> -rev	<u>GATCCTGTTTCGTTGCTTTTC</u> GGGAGACTTTTGGTTCTTGATT TTCCTGCTCCTTTAGTGAGGGTTAATTA		
<i>HSP18.2</i>	18.2mt- <i>in vitro</i> -for	<u>AGCTTAATTAACCC</u> CTACTAAAGGAGCAGGAAAATCAAGA ACCAAAAGTAGAAAGAAAAGCAACGAACAG	18.2mt- <i>in vitro</i>	(47)
	18.2mt- <i>in vitro</i> -rev	<u>GATCCTGTTTCGTTGCTTTTC</u> TCTACTTTTGGTTCTTGATT TTCCTGCTCCTTTAGTGAGGGTTAATTA		
<i>pBI221</i>	221- <i>in vitro</i> -for	<u>AGCTTAATTAACCC</u> CTACTAAAGGACACGGGGGACTCTAGAG	221- <i>in vitro</i>	(93)
	221- <i>in vitro</i> -rev	<u>GATCCTCTAGAGTCC</u> CCCGTGTCTTTAGTGAGGGTTAATTA		
<i>HSP18.2</i>	18.2mt-for	<u>CGATTCAAATCAGCAGG</u> AAAATCAAGAACCAAAAGTAGAA AGAAAAGCAACGAACAG	18.2mt	(47)
	18.2mt-rev	<u>GATCCTGTTTCGTTGCTTTTC</u> TCTACTTTTGGTTCTTGATT TTCCTGCTGATTTGAAT		
	Oligo:	Sequence <sup>a,b</sup>		Ref.
	GUS120-rev	CAATTGCCCGGCTTTCTTGTA		(94)

<sup>a</sup>The oligonucleotides used for annealing are listed in 5'-3' orientation.

<sup>b</sup>The restriction sites in linkers are underlined.

18.2-*in vitro* および 221-*in vitro* を用いて *in vitro* 転写を行い、得られた mRNA を DMS 処理によってメチル化した。DMS はアデニン (A) とシトシン (C) をメチル化するが、ステムを形成している領域またはタンパク質が結合している領域の A と C はメチル化しない。本研究において DMS 処理を行った mRNA は *in vitro* 転写後、フェノール・クロロホルム抽出によってタンパク質は除去されている。このことから、メチル化されなかった A と C を含む領域はステムを形成している部分であると考えられる。DMS 処理を行った mRNA を用いて、逆転写を行った結果、*Bam*HI 部位までの塩基配列において 18.2-*in vitro* の 18、19、26 番目、28~30 番目および 40 番目の C がメチル化されることが示された (Fig. 2-2)。同様に 221-*in vitro* においては 11 番目の C と 13 番目の C のみがメチル化されなかった (Fig. 2-3)。また、両者とも *Bam*HI 部位より下流では同じバンドパターンであった (Fig. 2-5A, B)。実験に用いた *HSP18.2* 5'-UTR も、*pBI221* のクローニングサイト由来の 5'-UTR も、*Bam*HI 部位より下流は同じ塩基配列をもつ。今回の結果から、*Bam*HI 部位以降の二次構造は同じであることが示され、*HSP18.2* 5'-UTR も *pBI221* 5'-UTR も転写開始点から *Bam*HI 部位までの領域内にある塩基同士で二次構造を形成していると考えられる。また、18.2-*in vitro* において 26 番目から 30 番目の CUCCC の他にメチル化されない A および C が長く連続する領域はなく、また、双方とも安定な二次構造を形成しうる塩基配列上の長い逆方向反復配列も存在しなかった。以上より、*HSP18.2* 5'-UTR も、*pBI221* の 5'-UTR も *Bam*HI 部位までの領域で短いステム構造を形成しているが、高度な二次構造は形成していないと考えられる。

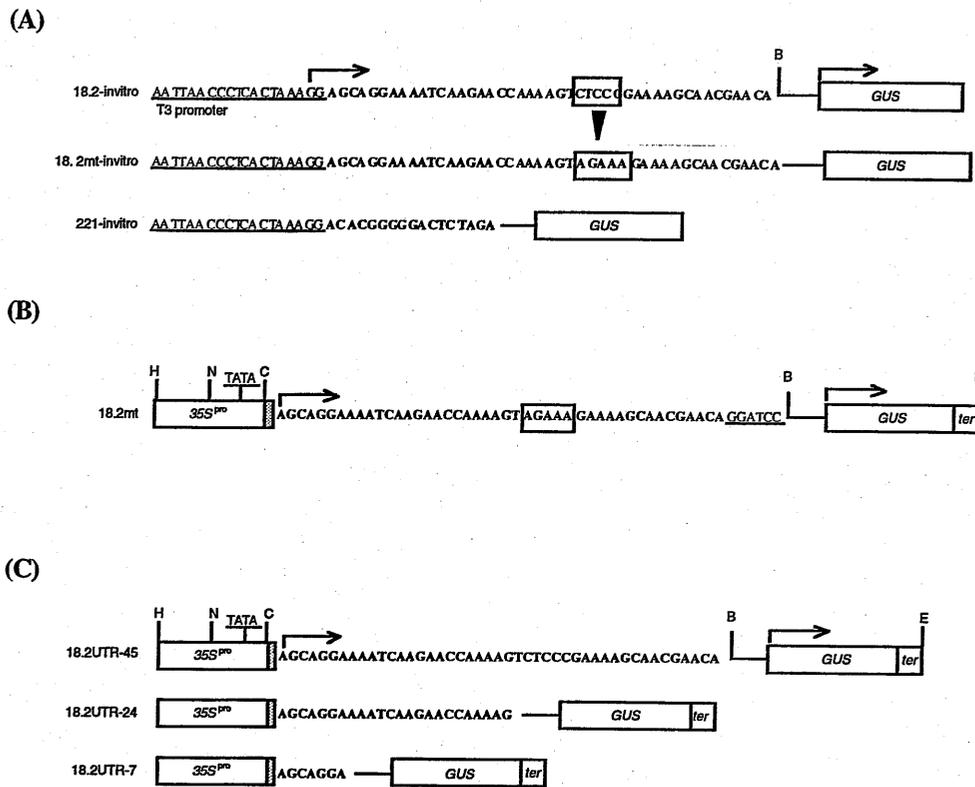


FIG. 2-1. Structure of the promoter/5'-UTR/*GUS* chimeric gene constructs for *in vitro* transcription (A), mutation analysis (B) and deletion analysis (C). Thin arrow indicates the transcription start site and thick arrow indicates the translation start site. Translation of all constructs starts from the AUG initiation codon of the *GUS* gene. Bold letters indicate nucleotides of 5'-UTR derived from *HSP18.2* or 5'-UTR including cloning site of pBI221. Substituted bases are boxed. H, *Hind*III; N, *Nco*I; C, *Cla*I; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI.

次に *HSP18.2* の 5'-UTR において、ステム構造をとると予想される領域である 26 番目から 30 番目の CUC<sub>3</sub> に AGAAA となるよう塩基置換によって変異を導入し (Fig. 2-5B, C)、高温域での翻訳にどのような変化が起こるかを調べた (Fig. 2-4)。変異を導入した *HSP18.2* 5'-UTR を *GUS* 遺伝子の 5' 側に挿入し、CaMV35S プロモーターの支配下に置いた発現系を構築した (Fig. 2-1B)。18.2mt を T87 のプロトプラストにエレクトロポレーションで導入し、一過性発現実験を行った。DNA 導入後 22°C で 9 時間培養し、33°C の処理温度に移してさらに 15 時間培養した後、細胞を回収し、*GUS* 比活性を測定した (Fig. 2-4)。その結果、この発現系は二次構造が変化しているにもかかわらず (Fig. 2-5B, C)、熱処理を加えても 22°C で培養したプロトプラストと同程度の *GUS* 活性値を示した。

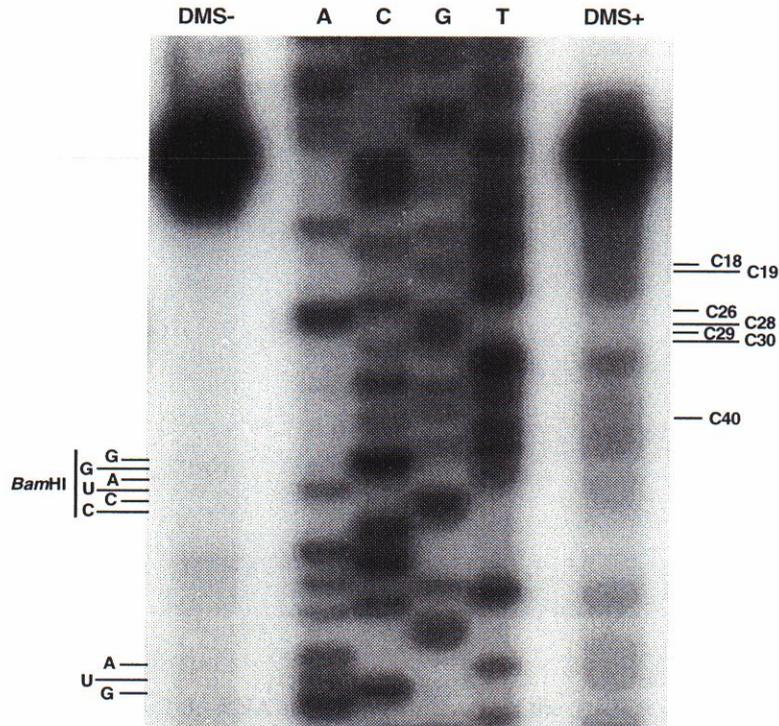


FIG. 2-2. RNA secondary structure of the 5'-UTR of *HSP18.2*. DMS-treated RNA (DMS+) was analyzed by primer extension with primer GUS120-Rev and compared to untreated RNA (DMS-). Unmethylated nucleotides are shown at the right, along with the indicated bases. *Bam*HI site and translation initiation site (AUG) are shown at the left.

その結果、*HSP18.2* 5'-UTR が形成する二次構造が高温域での翻訳抑制回避に寄与するのではないことが考えられる。

### 2.3.2 導入熱ストレス下での *HSP18.2* 5'-UTR 二次構造の変化

2.3.1 において *HSP18.2* 5'-UTR の二次構造を変化させても、高温域での翻訳抑制回避能を喪失しないことが示された (Fig. 2-4)。しかし、高温域においても *HSP18.2* 5'-UTR が 2.3.1 で決定した二次構造をとっているかどうかは不明である。熱ストレス下で *HSP* 5'-UTR の二次構造が変化するかどうかを知るために、5'-UTR の 33°C における二次構造を決定した (Fig. 2-5)。T3 プロモーターの支配下に変異を導入した *HSP18.2* 5'-UTR と *GUS* 遺伝子を挿入した発現系 (18.2mt-*invitro*) を構築した (Fig. 2-1A)。18.2-*invitro*、221-*invitro* および 18.2mt-*invitro* を用いて *in vitro* 転写を行った。得られた 3 種類の mRNA を 22°C および 33°C の温度条件で DMS 処理し、それぞれの二次構造を決定したところ、どの 5'-UTR も熱処理では二次構造が変化しないことが示された。このことから、熱ストレスによって *HSP18.2* 5'-UTR の二次構造が変化することが高温域での翻訳抑制の回避に重要なのではないと考えられる。

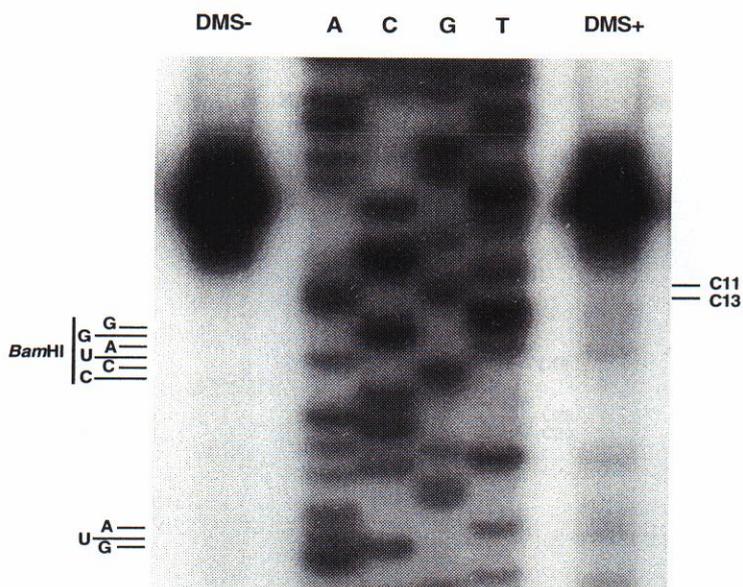


FIG. 2-3. RNA secondary structure of the 5'-UTR of pBI221. DMS-treated RNA (DMS+) was analyzed by primer extension with primer GUS120-Rev and compared to untreated RNA (DMS-). Unmethylated nucleotides are shown at the right, along with the indicated bases. *Bam*HI site and translation initiation site (AUG) are shown at the left.

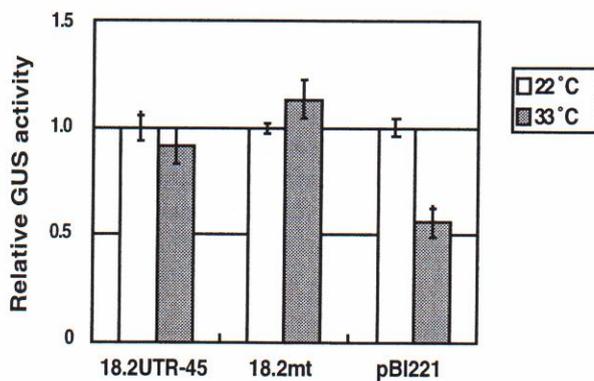


FIG. 2-4. Effect of base substitution in 5'-UTR of *HSP18.2* on translation during heat stress in electroporated *Arabidopsis* T87 protoplasts. The GUS activities are shown relative to the level of obtained from each aliquot of protoplasts incubated at 22°C. The indicated relative GUS activities are means ±SD of three independent electroporation experiments.

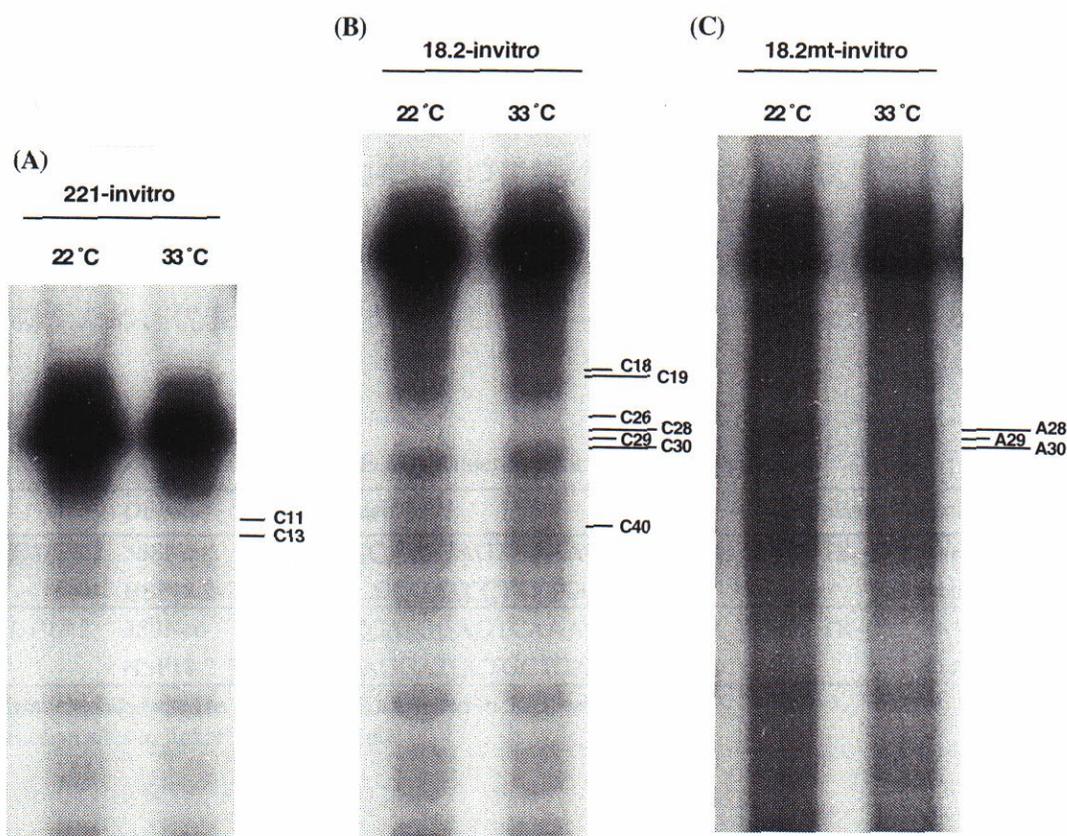


FIG. 2-5. Comparison of RNA secondary structure of the 5'-UTR between normal condition and stress condition. Fifty ng of DMS-treated RNA incubated at 22°C was analyzed by primer extension with primer GUS120-Rev and compared to pattern of RNA incubated with DMA at 33°C. (A, B) Unmethylated nucleotides are shown at the right, along with the indicated bases. (C) To compare with (B), methylated nucleotides are shown at the right, along with the indicated bases. These nucleotides are methylated by DMS.

### 2.3.3 *HSP18.2* 5'-UTR の欠失解析

2.3.1 および 2.3.2 の実験結果から、*HSP18.2* 5'-UTR が特異的な二次構造を形成することが高温域での翻訳に必要なのではないことが示された。次に *HSP18.2* 5'-UTR 内部の塩基配列が高温域での翻訳に影響を与えるかどうかを調べるために、*HSP18.2* 5'-UTR を 3'末端側から段階的に欠失させた、18.2UTR-24 と 18.2UTR-7 の 2 種類の発現系を構築し、欠失解析を行った (Fig. 2-1C)。18.2UTR-24 および 18.2UTR-7 はそれぞれ 24 塩基、7 塩基の *HSP18.2* 由来 5'-UTR を持っている。これらの発現系を、アグロバクテリウム感染法によって BY-2 に導入した。カナマイシンによる選抜を繰り返した後、得られた形質転換 BY-2 カルスからそれぞれ 3 クローンを選択し、液体培地で何回か継代培養を繰り返した後、実験に用いた。25°C で継代後 3 日目の形質転換 BY-2 を 2 分割し、一方は 37°C の処理温度に、もう一方は引き続き 25°C で 20 時間培養後、

細胞を回収して GUS 比活性を測定した (Fig. 2-6)。その結果、18.2UTR-24 では熱ストレスをかけた細胞でも 25°Cでの GUS 比活性とほぼ同程度の GUS 比活性が得られたが、18.2UTR-7 においては 37°Cの熱処理によって、pBI121 と同じく 25°Cで培養した細胞の 60%まで GUS 比活性が低下した。以上の結果から、高温域での翻訳には *HSP18.2* 5'-UTR の 5'末端から 24 塩基の領域が重要であると考えられる。1 クローンにつき、3 回同じ実験を行い、標準偏差をとった。それぞれの形質転換 BY-2 における 3 つのクローンを用いて実験を繰り返したところ、どのクローンにおいても同様の結果を得たため、代表的なデータを示した。

TABLE 2-2. Primer sets for PCR used in this work

5'-UTR	Oligo:	Sequence <sup>a,b</sup>	Template	Linker	Plasmid	Ref.
24 bp of <i>HSP18.2</i>	35SNco	AGGCC <u>ATGGAGTCAAAGATTCAA</u> A	18.2UTR-45	<u>NcoI</u>	18.2UTR-24	
	HSP18.2-24	TTTTCGGGATCCTTTTGGTTCTTG		<u>BamHI</u>		(47)
7 bp of <i>HSP18.2</i>	35SNco	AGGCC <u>ATGGAGTCAAAGATTCAA</u> A	18.2UTR-45	<u>NcoI</u>	18.2UTR-7	
	HSP18.2-7	CTTGAGGATCCTGCTGATTTGATC		<u>BamHI</u>		(47)

<sup>a</sup> The oligonucleotides used as PCR primers are listed in 5'-3' orientation.

<sup>b</sup> The restriction sites in linkers are underlined.

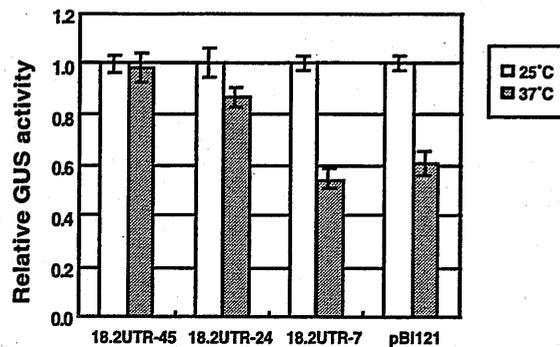


FIG. 2-6. Effect of the 5'-UTR of *HSP18.2* on translation during heat stress in transgenic BY-2 cells. The GUS activities are shown relative to the level of obtained from each aliquot of transgenic BY-2 cells incubated at 25°C. The indicated relative GUS activities are means  $\pm$ SD of three independent experiments.

## 2.4 考察

第 1 章において、高温域での翻訳抑制回避には *HSP* 5'-UTR が関与することが示された。しかし、この翻訳抑制回避には、抑制回避を可能にするようなタンパク質性の因子が結合する一次配列が存在するのか、5'-UTR のある二次構造を形成することが重要なのか、もしくは両者が複合的に関わっているのか不明である。本章では、5'-UTR

による熱ストレス下での遺伝子発現制御に関する知見を得るために *HSP18.2* 5'-UTR についての詳細な解析を行った。

高温域での翻訳制御に 5'-UTR の二次構造が関与する場合、1) 高温下でも 5'-UTR が安定な二次構造をとり続けることが必要、2) 高温下で 5'-UTR の二次構造が変化することが重要、の 2 通りが考えられる。第 1 章で求められた熱ストレス温度において、5'-UTR の二次構造が変化するかどうかを調べたところ、22°C から 33°C に移行するために与えられる熱エネルギーは 18.2-*in vitro* の 5'-UTR の二次構造を変化させ得なかった (Fig. 2-4)。このことから、2) の可能性を除外した。*HSP18.2* 5'-UTR の二次構造に予め変異を加えた 18.2mt-*in vitro* を作製し、熱ストレスによって GUS 比活性が低下するかどうかを調べた。18.2mt-*in vitro* において、塩基置換による二次構造の変化は認められたが (Fig. 2-5B, C)、33°C の熱ストレス下においてもその二次構造を維持し、GUS 比活性も低下しなかった (Fig. 2-4, 2-5C)。また、pBI221 の 5'-UTR の二次構造も調べたが、高温域で GUS 活性は低下するにも関わらず、熱処理による二次構造の変化は見られなかった (Fig. 2-5A)。これにより、高温域での翻訳に必要なのは二次構造を維持することでも、二次構造が変化することでもなく、別の機構が存在するものと考えられる。以上より、熱ストレス下での翻訳抑制回避機構に mRNA 5'-UTR の二次構造が関与するという可能性を除外し、その他にどのような可能性が考えられるかについての検証を行った。

*HSP18.2* 5'-UTR を 3'末端側から、段階的に欠失させた変異体を用いて熱ストレス下での翻訳抑制回避能について調べたところ、*HSP18.2* 5'-UTR 領域を 24 塩基保持した 18.2UTR-24 では 18.2UTR-45 と変わらぬ回避能を示したのに対し、18.2UTR-7 においてはその回避能は失われた (Fig. 2-6)。以上の結果から、*HSP18.2* 5'-UTR の 5'末端側から 24 塩基の部分にタンパク質性の因子が結合するシス領域が存在する可能性が考えられる。1998 年に、Wells らによって、タバコおよびコムギ由来の HSP101 がタバコモザイクウイルス 35S RNA の 5'-UTR に存在する  $\Omega$  配列に結合することが報告された (61)。 $\Omega$  配列はその配列を 5'-UTR に挿入すると翻訳効率が上昇することが以前に報告されており (62, 63)、この翻訳促進機能に HSP101 が関与している可能性が示唆された。HSP101 が高温域でも  $\Omega$  配列に結合するかどうかに関する報告はまだなく、本研究で用いられた *HSP* 5'-UTR に HSP101 が結合するのか、あるいは *HSP* 5'-UTR に特異的に結合する新規のタンパク質が存在するかどうかについても今後、検討する必要がある。

真核生物における翻訳は通常、キャップ依存性翻訳開始機構によって行われる (Fig. 2-7)。キャップ依存性の翻訳は翻訳開始因子複合体 eIF4F の構成因子である eIF4E が、mRNA の 5'-末端にあるキャップ構造に結合することで開始される。eIF4E とキャップ構造の結合を足がかりにもう一つの eIF4F の構成因子である eIF4G が mRNA と結合し、eIF4A および eIF4B が協調して 5'-UTR の二次構造を解き、40S リボソームサブユニットを mRNA 上へリクルートする。40S リボソームサブユニットは mRNA 上を開始コドンまで走査して、開始コドン上で 60S サブユニットと結合し、80S 開始複合体を形成することによってペプチド鎖の延長が開始される。mRNA 上に多数の 80S

開始複合体が形成された状態をポリソームと呼ぶ。40S リボソームサブユニットの mRNA へのリクルートはポリソームを形成するうえで重要な過程である。これらの翻訳開始反応には mRNA 5'-UTR が大きく関わっている。高温域での翻訳抑制回避にもまた 5'UTR の一次配列が重要であることが予想されるが、*HSP* 5'-UTR の塩基配列を比較したところ、すべてに共通する配列は存在しなかった。また、植物においては高温域では通常の mRNA はポリソームから解離することが知られている。これらのことから、高温域での翻訳が可能にするのは特異的な配列ではなく、翻訳開始に関わる因子群との親和性が総和として高い 5'-UTR であるとも考えられる。*HSP* 5'-UTR の塩基配列は翻訳開始因子群との親和性が高く、高温域においてもポリソームの解離が起きないのかも知れない。*HSP* 5'-UTR だけでなく、多くの遺伝子から 5'-UTR を単離し、高温域での翻訳抑制能を調べ、翻訳開始因子群との結合強度の変化を定量的に測定し、それらの結果と塩基配列上の情報と組み合わせた考察を行うことで、高温域での翻訳を可能にする 5'-UTR の塩基配列上の特徴について言及できると考えられる。

また、別の可能性として、*HSP18.2* 5'-UTR の 5'末端 24 塩基の領域における特異的な塩基配列が翻訳に関わる可能性を考えた際、IRES が存在することも考えられる。IRES は翻訳開始反応において、eIF4E の mRNA のキャップ構造への結合を介さず、

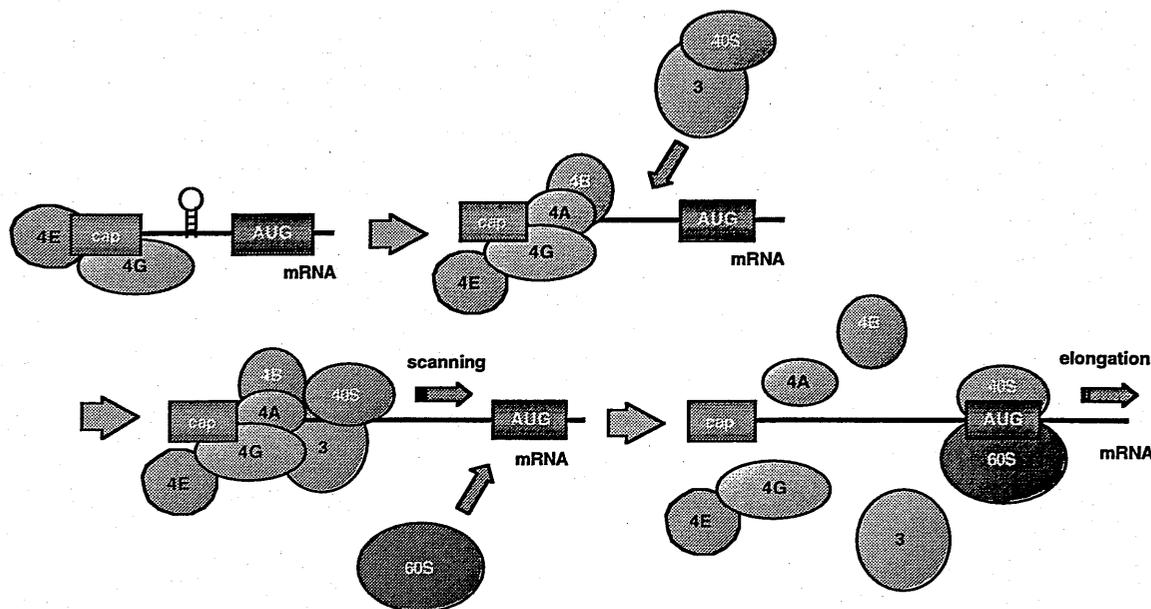


FIG. 2-7. Schematic diagram of 5' cap-dependent translation. cap, 5' cap structure; 4E, eIF4E; 4G, eIF4G; 4A, eIF4A; 4B, eIF4B; 3, eIF3; 40S, 40S ribosomal subunit/eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>; ternary complex; 60S, 60S ribosomal subunit; AUG, translation initiation codon.

直接 40S リボソームサブユニットを mRNA にリクルートする機構である (Fig. 2-8A, B)。40S リボソームサブユニットのリクルートに必要な 5'-UTR 上のシス配列を IRES と呼ぶ。IRES によるキャップ非依存性の翻訳開始はウイルス感染や細胞分裂などキャップ依存性の翻訳が阻害される状況において用いられることが報告されているが、近年、HeLa 細胞において Bip 遺伝子の IRES が熱ストレス下で機能することが示された (27)。IRES はウイルス由来の mRNA 5'-UTR において最初に見つけられた。IRES には EMCV 型 (64, 65) と HCV 型 (66-73) の 2 種類が存在するが、どちらも 300 塩基以上の長い塩基配列が高度な二次構造を形成する (Fig. 2-8A, B)。今回実験に用いた HSP 5'-UTR はそれぞれ異なった長さを持っている (Table 2-3)。HSP18.2 および HSP17.4 は 50 塩基前後の短い 5'-UTR を有するが、HSP81-1、HSP81-2 および HSP81-3 は 100 塩基前後の比較的長い 5'-UTR を持っている。しかし、そのいずれも IRES に見られる高度な二次構造を形成するには短い。さらに、HSP18.2 5'-UTR においては、二次構造解析の結果からも高度な二次構造を形成しないことが示されており、他の HSP 5'-UTR も RNA 二次構造予測プログラム (DNASIS program-Mac version 3.0) による二次構造予測から安定な二次構造をとらないと考えられる (data not shown)。

TABLE 2-3. Comparison of 5'-UTR

	length <sup>a</sup>	GC contents (%)
HSP18.2	69	51
HSP17.4	80	48
HSP81-1	115	46
HSP81-2	116	44
HSP81-3	137	40
Nt108	40	58
pBI221	41	63

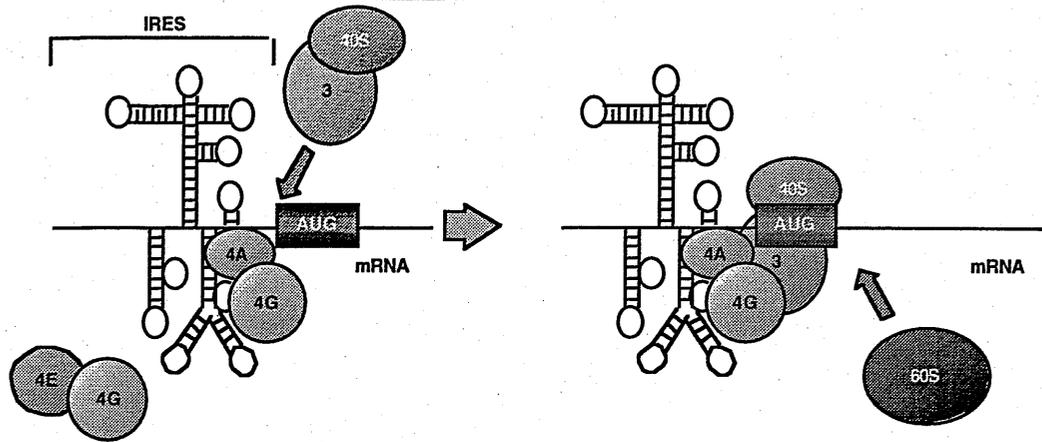
<sup>a</sup> The length of the 5'-UTRs includes 24 bases of polylinker region derived from pBI221.

2000 年に Chappell らの報告によって、マウスの Gtx ホメオドメインタンパク質遺伝子 mRNA 5'-UTR における 9 塩基の短い配列が IRES 様の機能を持つことが報告された (Fig. 2-8C; 74)。高度な二次構造をとらない HSP 5'-UTR において IRES が存在すると仮定するならば、この短い配列からなる IRES である可能性が高い。Chappell らによって報告された 9 塩基の IRES は 1999 年に Hu らによって 18S rRNA の 1132 番目から 1124 番目までの塩基配列と塩基対を形成することが報告されている (75)。各種 HSP 5'-UTR について、全長 1902 塩基からなるシロイヌナズナの 18S rRNA の後半約 900 塩基と相補する領域の有無を調べたところ、HSP18.2 5'-UTR の 9 番目から 17 番目の塩基配列が 18S rRNA の 1338 番目から 1346 番目の塩基配列と、また 34 番目から 40 番目が 1138 番目から 1144 番目の塩基配列と 100% 相補した (Fig. 2-9A)。高温域での翻訳が行われなくなった 18.2UTR-7 では、HSP18.2 5'-UTR の 3' 末端側 35 塩基の欠失によって、18S rRNA の 3' 末端側 900 塩基と相補する領域は失われていた。

他の *HSP* 5'-UTR では *HSP18.2* 5'-UTR のように 9 塩基連続で相補するものは存在しないものの、6~8 塩基連続で相補する領域が存在した (Fig. 2-9B, C, D, E)。 *HSP81* 5'-UTR はどれも、18S rRNA の塩基配列と相補する領域が 5'-UTR 内に複数に渡って認められた (Fig. 2-9C, D, E)。 *c-myc*、 *Bip* 遺伝子における IRES はその 5'-UTR 内に IRES 活性を示す複数の領域が存在し、IRES モジュールという概念が提唱されている (76, 77)。この *c-myc* や *Bip*、 *Gtx* の IRES モジュールと考えられる領域は、それぞれが 18S rRNA の異なった領域と相補した。また、 *Gtx* 遺伝子 mRNA 5'-UTR における IRES モジュールはその最小単位が 9 塩基である。この *Gtx* 遺伝子の IRES モジュールを複数個並列に連結すると、IRES モジュールの数に比例して IRES 活性が上昇することが示されている (74)。 *HSP* 5'-UTR においても 18S rRNA の 3'末端側の塩基配列と相補する複数の領域が IRES モジュールとして機能するのかもしれない。一方、 *pBI221* の 5'-UTR には 2ヶ所、18S rRNA の 3'末端側の塩基配列と 100%相補する領域があったが (Fig. 2-9F)、 *pBI221* は高温域では翻訳抑制を受けた。 *pBI221* において見られる 18S rRNA と相補する領域はどちらも *Bam*HI 部位よりも下流に位置しており、すべての発現系に存在する。これらの領域はどちらも開始コドンまでの距離が近く、離れている方でも 15 塩基、もう一方においては開始コドンまでの距離がわずか 1 塩基しかない。5'-UTR を走査中のリボソームは 5'-UTR が短すぎると最初の AUG を認識できずに通過してしまう (78)。このことから、40S リボソームのスキャニングによる開始コドンの認識にはある程度の 5'-UTR の長さが必要であるとされている。 *pBI221* において見つかった 18S rRNA と相補する領域は、たとえ 40S リボソームが mRNA にリクルートされても開始コドンの認識が困難な可能性が考えられ、IRES であっても機能的でないと考えられる。一方、 *HSP* 5'-UTR においては最も 5'-UTR が短い *HSP18.2* 5'-UTR でも最初の 18S rRNA と相補する領域から開始コドンまで 28 塩基ある。また、今回の実験に用いた発現系はすべて *pBI221* 由来の 24 塩基の 5'-UTR を持っているため、それも含めると開始コドンの位置は 52 塩基下流になる。 *Gtx* 遺伝子の 5'-UTR の IRES 領域は 196 塩基の中の 133 番目から 141 番目に位置する。18S rRNA と相補する領域が IRES として機能するためには開始コドンからある程度距離があることも重要な要素なのかもしれない。 *HSP18.2* 5'-UTR に塩基置換による変異導入を行ったが、この変異 5'-UTR を含む発現系は高温域での翻訳抑制回避能を失わなかった。この系において変異を導入した領域は 26~30 番目の塩基配列であり、18S rRNA と相補する領域とは重複していなかった。そのため、 *18.2mt* は高温域での翻訳能を失わなかったのかもしれない。

今後、2 種のレポーター遺伝子の間に目的 5'-UTR を挿入したバイシストロニックな発現系を利用した直接的な *HSP* 5'-UTR の IRES としての機能の実証は必要である。しかし、18S rRNA と相補する領域がそれぞれの 5'-UTR に存在すること、 *pBI221* または相補する領域を失った *18.2UTR-7* は高温域での翻訳能が失われること、IRES が熱ストレス下でも機能するという報告などから、 *HSP* 遺伝子に見られる高温域での翻訳抑制回避は *HSP* 5'-UTR が IRES として機能するためである可能性が高いと考えられる。

(A) EMCV



(B) HCV

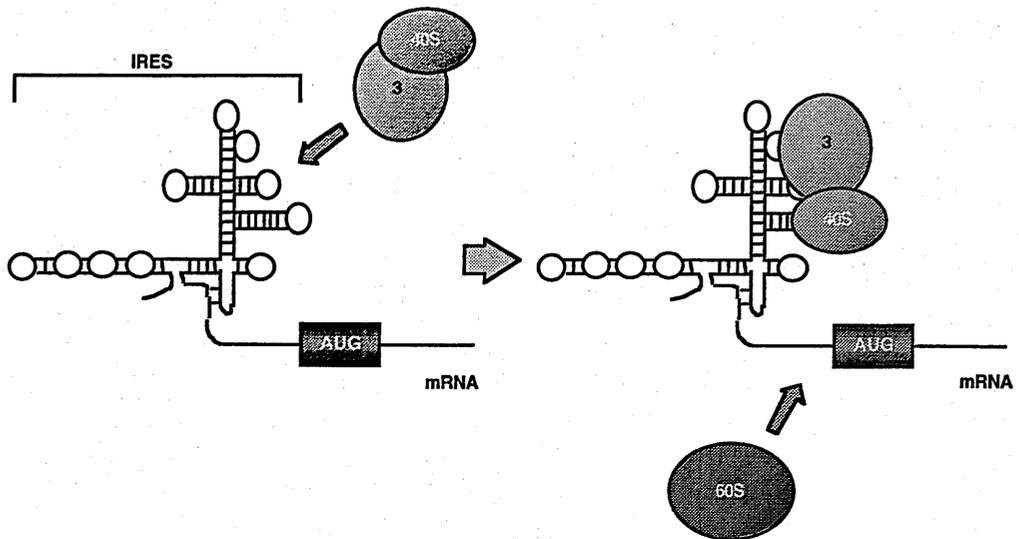
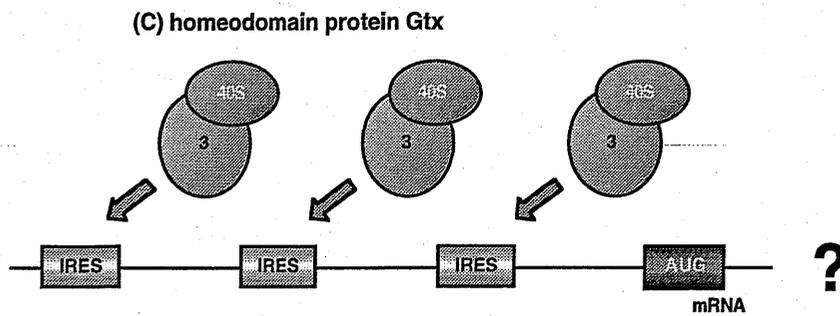


FIG. 2-8.



**FIG. 2-8. Schematic diagram of 5' cap independent translation.**

(A) Typical IRES structure of *Picornaviridae* such as encephalomyocarditis virus (EMCV) and presumable translation initiation. EMCV initiation codon are located at the 3' border of the IRES, and ribosomes bind directly to them without scanning. (B) Typical IRES structure of *Flaviviridae* such as Hepatitis C Virus (HCV) and translation initiation. The most remarkable aspect of initiation on HCV type IRES is that they bind 40S subunits specifically and stably, in the absence of initiation factors. 40S ribosomal subunit/eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> ternary complex is sufficient for the bound 40S subunit to lock onto the initiation codon. (C) IRES module of homeodomain protein Gtx and presumable translation initiation. 40S ribosomal subunit/eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> ternary complex is recruited directly into 5'-UTR via base-pairing between 18S rRNA and IRES module. 4E, eIF4E; 4G, eIF4G; 4A, eIF4A; 3, eIF3; 40S, 40S ribosomal subunit/eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> ternary complex; 60S, 60S ribosomal subunit; AUG, translation initiation codon; IRES, internal ribosomal entry site.

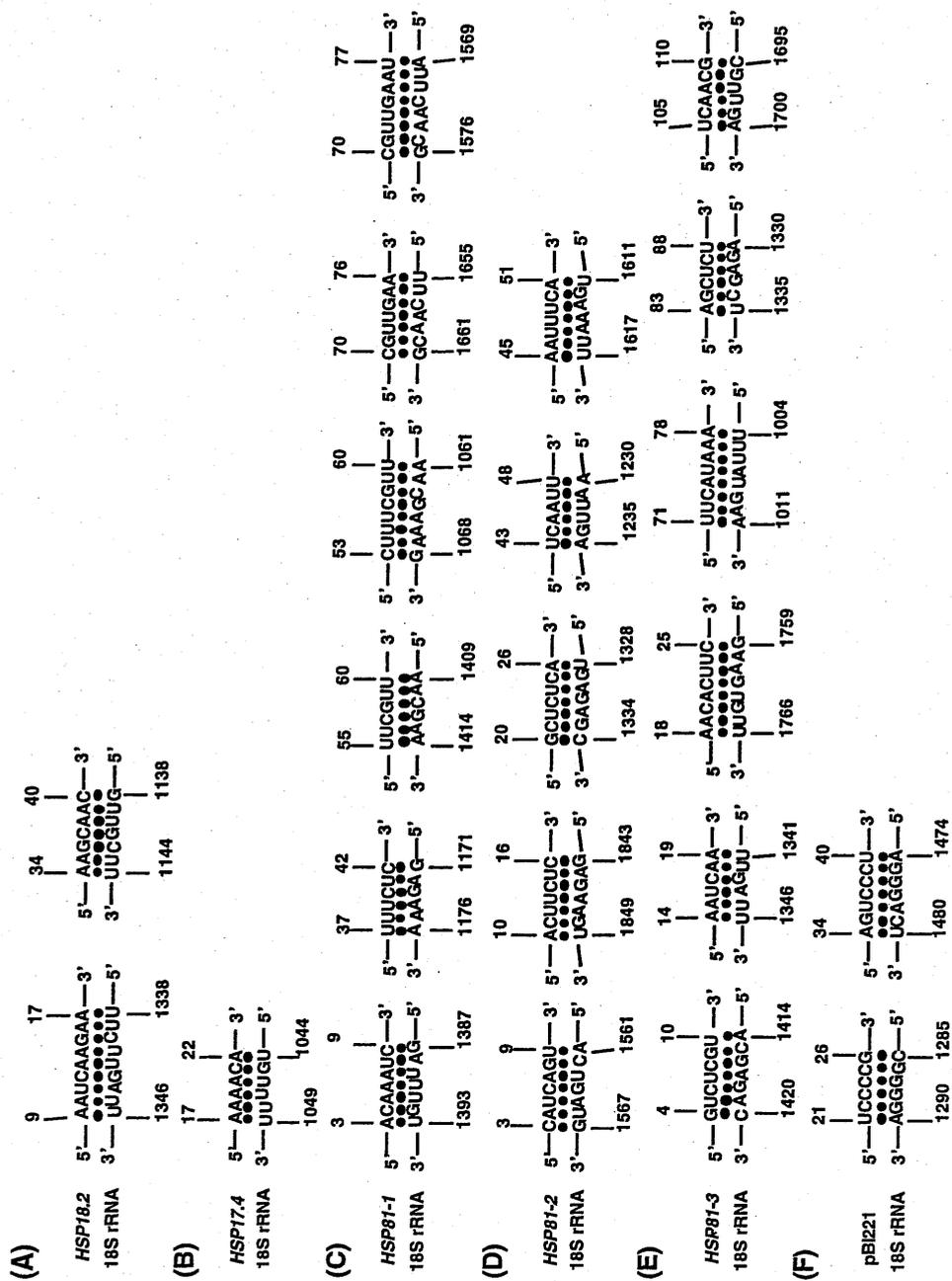


FIG. 2-9. Schematic diagram of basepairing between 18S rRNA and 5'-UTR of various mRNAs. The possible basepair are denoted by dots.

### 第3章 通常培養温度における *HSP18.2* 5'-UTR の翻訳効率への寄与

#### 3.1 序論

第1章において、*HSP18.2* の 5'-UTR は高温下での翻訳反応の継続に寄与するだけでなく、単位 mRNA あたりの翻訳量が多いことが示された。このことより、第3章では第2章までとは視点を変えて、「植物細胞における有用物質の高発現系の確立」の観点からの検討を行うことを試みた。

この20年間に植物遺伝子工学は著しく進歩し、外来遺伝子を培養細胞および植物体に導入した物質生産を可能にした。植物を用いたファインケミカル、医薬品、農薬、化粧品などに利用される組換えタンパク質あるいは二次代謝産物の生産は多くの物質が研究室レベルにおいて生産に成功しており、いくつかの物質についてはすでに商業レベルでの生産がなされている (79-82)。

現在、高発現プロモーターやシス配列の支配下に外来遺伝子を導入することは外来タンパク質生産量を増やすための基本戦略であるが(59, 83, 84)、転写物量を増やすのに加えて、mRNA 1分子あたりのタンパク質の翻訳量を増加することもまた重要である。現在までに翻訳開始コドン (AUG) の近傍配列、mRNA の 5'-UTR の長さ、二次構造および GC 含量が mRNA の翻訳効率を決定するのに重要な役割を担っていることが示されており(85, 86, 87)、mRNA 1分子あたりのタンパク質生産量を増やすためには高い翻訳効率を持つ 5'-UTR を単離することが重要であると考えられる。

本章では 5'-UTR が翻訳効率に与える影響を評価するために *Arabidopsis thaliana* *HSP18.2* 遺伝子に加え、*Nicotiana tabacum* (タバコ) *Nt108* (*Arabidopsis thaliana* 108C1T7 遺伝子ホモログ) 遺伝子を選んだ。*HSP18.2* 遺伝子は誘導性、*Nt108* 遺伝子は構成的であるなど、その発現様式は異なっているが両プロモーターは共に高い転写効率を持つことがすでに報告されている (59)。*Nt108* 遺伝子は BY-2 から単離され、*Nt108* プロモーターの支配下に *GUS* レポーター遺伝子を連結した発現系を導入した BY-2 における *GUS* タンパク質の蓄積量は CaMV35S プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子を連結した発現系を導入した BY-2 の *GUS* タンパク質蓄積量よりも多い (59)。*Nt108* プロモーターを用いた実験において構築した発現系はその遺伝子由来する 5'-UTR 領域を含んでいる。

本章では、タバコとシロイヌナズナにおいて、*HSP18.2* の 5'-UTR が通常培養温度においても効率の良い翻訳に寄与することを示した。

## 3.2 実験材料と方法

### 3.2.1 培養細胞を用いた一過性発現解析

#### 導入プラスミドの構築

オリゴヌクレオチドのアニーリング (Table 3-1) によって得られたタバコ由来 *Nt108* 遺伝子 (59) の 5'-UTR 断片を 1.2.3 で構築した pBI221Cla の *ClaI*-*Bam*HI 領域に挿入し、得られたプラスミドを Nt108UTR と名付けた (Fig. 3-1)。

#### プロトプラストの調製およびエレクトロポレーションによる DNA の導入

プロトプラストの調製および DNA の導入は 1.2.3 と同様に行ったが、DNA 導入後の培養条件を若干変更した。5 ml のプロトプラスト培地を加え、60-mm のシャーレに移して暗黒下で 15 時間静置培養した後、活性測定を行った。BY-2 細胞は 25°C、T87 細胞は 22°C で培養した。

### 3.2.2 酵素活性測定法

1.2.5 と同様に行った。

### 3.2.3 全 RNA の調製

1.2.6 と同様に行った。

### 3.2.4 ノザン解析

1.2.7 と同様に行った。

### 3.2.5 形質転換体 BY-2 細胞の作出

#### バイナリープラスミドの構築

3.2.1 で作成した一過性発現導入用のプラスミドの *Hind*III-*Bam*HI 断片を pBI121 の *Hind*III-*Bam*HI 領域に挿入した。

BY-2 細胞の形質転換はアグロバクテリウム感染法により行った。

## 3.3 結果

### 3.3.1 シロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストを用いた一過性発現実験とノザン解析

GUS タンパク質生産が mRNA の 5'-UTR の塩基配列によって影響されるかどうかを調べるために、第 1 章で用いた *HSP18.2* 遺伝子の完全長 5'-UTR を含む 18.2UTR-45 に加え、新たに Nt108UTR を構築し、それぞれの 5'-UTR が GUS タンパク質の翻訳量に影響を与えるか調べた (Fig. 3-1)。対照には pBI221 を用いた。これらのプラスミドを *Luc* レポーター遺伝子 (pBI221-*luc*+) と同時に T87 プロトプラストにエレクトロポレーションで一過的に導入し、GUS 比活性および *Luc* 比活性を測定した (Fig. 3-2A)

TABLE 3-1. Oligonucleotides for annealing used in this work

5'-UTR	Oligo:	Sequence <sup>a</sup> , <sup>b</sup> Plasmid	Ref.
Nt108	Nt108UTR-for	<u>CGATTTT</u> GCCCTAAGAGACAGAGCTAGG	Nt108UTR (59)
	Nt108UTR-rev	GATCCCTAGCTCTGTCTCTTAGGGCAAAT	(59)

<sup>a</sup> The oligonucleotides used for annealing are listed in 5'-3' orientation.

<sup>b</sup> The restriction sites in linkers are underlined.

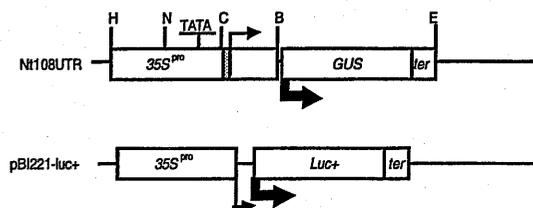


FIG. 3-1. Structure of the promoter/5'-UTR/*GUS* chimeric gene constructs.

Thin arrow indicates the proposed transcription start site and thick arrow indicates the translation start site. Translation of all constructs starts from the AUG initiation codon of the *GUS* gene. A *Cla*I site was created 7 bp upstream of the proposed transcription site for the introduced 5'-UTR. H, *Hind*III; N, *Nco*I; C, *Cla*I; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI.

Luc 比活性はエレクトロポレーションによるプラスミド導入効率を知るための内部標準として測定した。GUS 比活性 (pmol 4MU/min/mg protein) を Luc 比活性 (pmol Luc/mg protein) で補正し、GUS/Luc 相対活性 (pmol 4MU/min/pmol Luc) を得た。同一の一過性発現実験は 3 回以上繰り返して行い、再現性を得た。18.2UTR-45 と Nt108UTR を導入したプロトプラストを 22°C で 15 時間培養後、GUS/Luc 相対活性を測定したところ、pBI221 の GUS/Luc 相対活性に対してそれぞれ 24 倍と 6 倍の活性値であった。24 倍という高い GUS/Luc 相対活性が *HSP18.2* の 5'-UTR に依存するかどうかを知るために、2 章で用いた *HSP18.2* の 5'-UTR を 3' 末端側から欠失させた 18.2UTR-24 と 18.2UTR-7 の 2 種類の発現系を T87 プロトプラストに導入した。22°C で 15 時間培養後、GUS/Luc 相対活性を測定したところ、5'-UTR の長さが短くなるにつれて、GUS/Luc 相対活性も減少した。さらに、18.2UTR-7 においても、pBI221 を導入した場合の GUS/Luc 相対活性よりも高い値を示した (Fig. 3-2A)。

すべての発現系は CaMV35S プロモーターの支配下であり、プロモーターの転写活性に差はないと考えられる。さらにそれぞれの発現系を導入したプロトプラストから全 RNA を調製し、ノザン解析を行って *GUS* mRNA の蓄積量をみた (Fig. 3-2B)。その結果、転写物の蓄積量はどの発現系を導入したプロトプラストでも同程度であり、18.2UTR-45 を導入した T87 プロトプラストにおける高い GUS タンパク質蓄積量が転写物量の増加に起因するという可能性を除外した。これらの結果は 25°C の非熱ストレス温度において *HSP18.2* の 5'-UTR が翻訳を促進すること、また、もっとも高い翻

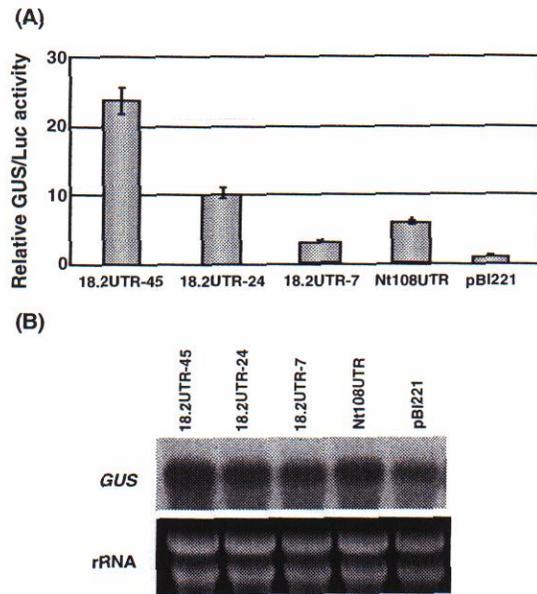


FIG. 3-2. Effect of the 5'-UTR of *HSP 18.2* on translation efficiency in electroporated *Arabidopsis* T87 protoplasts. (A) The indicated relative GUS/Luc activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments. (B) Total RNA was prepared from  $5.0 \times 10^6$  electroporated protoplasts recovered simultaneously with the electroporation experiment in (A). Each lane was loaded with 20  $\mu$ g total RNA. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is shown as a loading control.

訳効率を得るためには完全長の 5'-UTR が必要であることを示唆するものである。*Nt108* プロモーターとその 5'-UTR は *GUS* mRNA および *GUS* タンパク質の蓄積量を上昇させることが報告されているが (59)、本研究によって、少なくとも一過性発現実験では *Nt108* 5'-UTR が劇的というほどには翻訳効率を上昇させないことが示された。*Nt108* 遺伝子は BY-2 から単離されたものであり、高い翻訳効率を与える 5'-UTR の条件がシロイヌナズナとタバコで若干異なるためにヘテロな植物由来の *Nt108UTR* の *GUS/Luc* 相対活は低い値を示したのかも知れない。それらの可能性もふまえて次の実験を行った。

### 3.3.2 タバコ培養細胞のプロトプラストを用いた一過性発現実験とノザン解析

単離された植物体とは異なるヘテロな系においても *HSP18.2* の 5'-UTR が翻訳促進に寄与するかどうかを知るために、BY-2 プロトプラストを用いて一過性発現実験を行った。3.3.1 で用いた 18.2UTR-45、18.2UTR-24、18.2UTR-7 および *Nt108UTR* を BY-2 プロトプラストにエレクトロポレーションで一過的に導入し、25°C で 15 時間培養後、*GUS/Luc* 相対活性を測定した (Fig. 3-3A)。また、対照として pBI221 を用いた。同一の一過性発現実験を 3 回以上繰り返し、再現性を得た。その結果、pBI221 の *GUS/Luc* 相対活性に対して 18.2UTR-45 は 10 倍の活性値であった。また、T87 プロトプラストで見られたように BY-2 プロトプラストにおいても *HSP18.2* 5'-UTR の長さが短くな

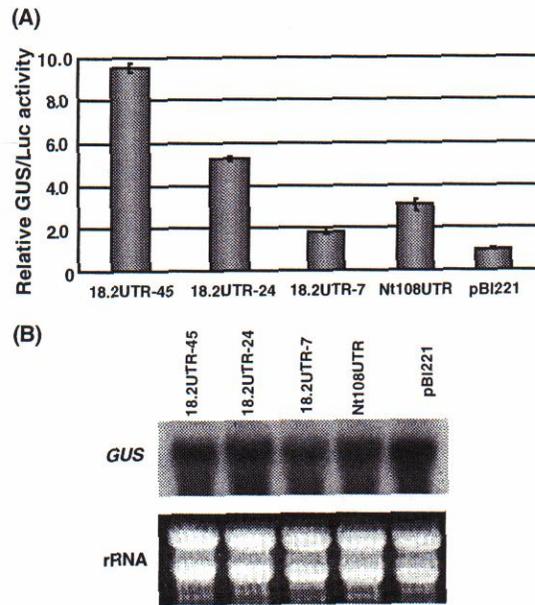


FIG. 3-3. Effect of the 5'-UTR of *HSP18.2* on translation efficiency in electroporated tobacco BY-2 protoplasts. (A) The indicated relative GUS/Luc activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments. (B) Total RNA was prepared from  $1.5 \times 10^6$  electroporated protoplasts recovered simultaneously with the electroporation experiment in (A). Each lane was loaded with 20  $\mu$ g total RNA. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is shown as a loading control.

るにつれて、GUS/Luc 相対活性も減少した。一番短い 5'-UTR を持つ 18.2UTR-7 においても、pBI221 を導入した場合の GUS/Luc 相対活性よりも高い値を示した (Fig. 3-3A)。導入プロトプラストから調製された全 RNA を用いてノザン解析を行ったところ、シロイヌナズナでの結果同様、転写物の蓄積量はどの発現系を導入した BY-2 プロトプラストでも同程度であった (Fig. 3-3B)。これらの結果から *HSP18.2* の 5'-UTR が BY-2 プロトプラストにおいても翻訳を促進することが示された。一方、Nt108UTR は pBI221 の GUS/Luc 相対活性に対して約 3 倍、18.2UTR-45 の活性値に対して約 3 分の 1 であり、T87 プロトプラストにおける結果と同様の結果であった。Nagaya らの報告における高い GUS タンパク質の蓄積は *Nt108* プロモーターが持つ、高いプロモーター活性による転写物量の増加によるものであり、*Nt108* 5'-UTR はあまり翻訳効率に影響を与えないのだろう。

### 3.3.3 形質転換 BY-2 を用いた GUS 比活性測定

*HSP18.2* の 5'-UTR による翻訳効率の上昇がヘテロな系である BY-2 プロトプラストを用いた一過性発現実験によっても示された (Fig. 3-3)。さらに、形質転換 BY-2 においても効率のよい翻訳に寄与するかどうかを検討した。実験には第 1 章において作成した 18.2UTR-45、18.2UTR-24、18.2UTR-7 および pBI221、さらに本章において作成した Nt108UTR を導入した形質転換 BY-2 のカルスを用いた。それぞれの形質転換

BY-2 における GUS 比活性は染色体上の *GUS* 遺伝子のコピー数や position effect によってばらつきが生じるので、カナマイシン選択培地上で得られた独立した形質転換 BY-2 カルス 50 個ずつを用いて GUS 活性測定を行い、それぞれの系統ごとに GUS 活性値の度数分布を調べた (Fig. 3-4)。対照には pBI121 を導入した形質転換 BY-2 カルスを用いた。その結果、50 nmol 4MU/min/mg protein より高い GUS 比活性を持つ個体は 18.2UTR-45 を発現している系統で最も多かった。高い GUS 比活性を持つ個体数は *HSP18.2* の 5'-UTR が短くなるにつれて減少した。この傾向は一過性発現実験の結果と一致するものである (Fig. 3-3)。Nt108UTR を導入した形質転換 BY-2 において高い GUS 比活性を示す個体数は pBI121 を導入した形質転換 BY-2 における数よりも多く、18.2UTR-7 における度数分布とほぼ同じであった。pBI121 を導入した形質転換 BY-2 では、50 nmol 4MU/min/mg protein より高い GUS 比活性を示したクローンは 50 個体中にひとつもなかった。これらの結果は *HSP18.2* の 5'-UTR が形質転換タバコ培養細胞においても翻訳を促進することを示すものである。

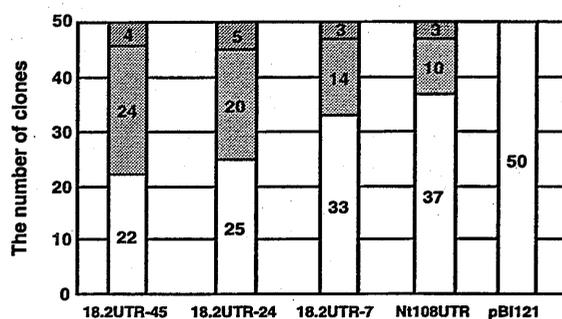


FIG. 3-4. Frequency distribution of the specific GUS activity values in each transgenic BY-2 cell line. A unit of specific GUS activity was defined as nmol 4MU/min/mg protein. The clones were classified into 3 groups. The first group (white bars) exhibited 50 or less nmol 4MU/min/mg protein, the second group (light gray bars) exhibited more than 50 to 200 or less nmol 4MU/min/mg protein, the last group (dark gray bars) exhibited more than 200 nmol 4MU/min/mg protein. The number of clones in each bin is indicated on the histogram.

### 3.3.4 他の分子量 *HSP* 5'-UTR を用いた検討

本研究において、*HSP18.2* の 5'-UTR が *Nt108* の 5'-UTR よりも翻訳促進に効果的であることを示した (Figs. 3-2, 3-3, 3-4)。この結果より、他の *HSP* 5'-UTR もまた BY-2 プロトプラストにおける翻訳の促進に有効であるかどうかを試した。第 1 章で用いた *HSP17.4*、*HSP81-1*、*HSP81-2* および *HSP81-3* 遺伝子の完全長 5'UTR 断片を挿入した発現系、17.4UTR、81-1UTR、81-2UTR および 81-3UTR を用いて 3.3.1 と同様に一過性発現実験とノザン解析を行った (Fig. 3-5)。対照には pBI221 を用い、実験は 3 回以上繰り返して再現性を得た。その結果、すべての発現系において、GUS/Luc 相対

活性が pBI221 の 10 倍以上高く、17.4UTR では 20 倍近い活性値だった。GUS mRNA の蓄積量には一過性発現実験で得られた GUS/Luc 相対活性における大きな差を説明しうるほどの違いは認められなかった。本研究において調べた HSP 5'-UTR はすべて pBI221 よりも高い GUS 比活性を示したことから、HSP 5'-UTR の翻訳効率はその他の 5'-UTR よりも高いということが考えられる。

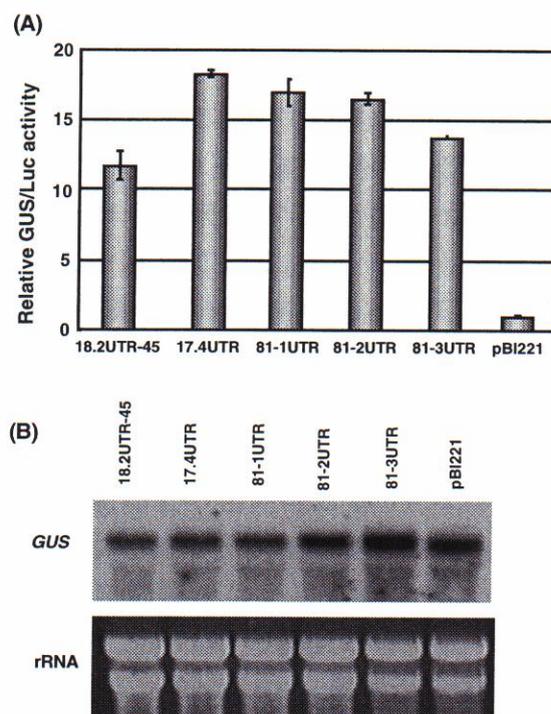


FIG. 3-5. Effect of the 5'-UTRs of other HSP genes on translation efficiency in electroporated tobacco BY-2 protoplasts. (A) The indicated relative GUS/Luc activities are means  $\pm$ SD of three independent electroporation experiments. (B) Total RNA was prepared from  $1.5 \times 10^6$  electroporated protoplasts recovered simultaneously with the electroporation experiments in (A). Each lane was loaded with 20  $\mu$ g total RNA. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is shown as a loading control.

### 3.4 考察

本章において、HSP18.2の5'-UTRをGUS遺伝子の開始コドン上流に付加するとGUSタンパク質の蓄積量が上昇することを示した。それぞれの発現系における mRNA の転写効率および分解速度を決定していないため、HSP18.2 5'-UTR に相当する DNA 上に転写効率を上昇させるようなシス配列が存在する (88)か、あるいは mRNA の安定性を高めるような RNA 上のシス配列が存在する (89) という可能性はある。しかし、ノザン解析によって、GUS mRNA 蓄積量を比較したところ、それぞれの発現系において転写効率の上昇や安定性の向上などに起因する mRNA 蓄積量の差は認められず、本章で見られた GUS/Luc 相対活性の上昇は HSP18.2 の 5'-UTR が翻訳効率に影響を

与えたためと考えられる (Figs. 3-2, 3-4, 3-5)。

本研究において実験に用いたシロイヌナズナの *HSP* 5'-UTR はすべて効率のよい翻訳に寄与することが示された。そもそも *HSP* は細胞内で熱ストレスを含むさまざまな種類のストレスに抵抗して細胞を守るために機能するシャペロンであることが知られている。*HSP* 生産の制御は細胞の生存にとって非常に重要なことであり、ストレス条件下における *HSP* の総量は強力な転写の誘導だけでなく、高効率な翻訳によってさらに上昇するのだろう。

18.2UTR-45 の GUS/Luc 相対活性が pBI221 に比べて、T87 プロトプラストにおいては約 24 倍、BY-2 プロトプラストにおいては約 10 倍であったのに比べ、Nt108UTR の GUS/Luc 相対活性は pBI221 のそれぞれ約 6 倍および約 3 倍であった (Fig. 3-2A, 3-3A)。これは強力なプロモーター由来の 5'-UTR (59) が必ずしも高い翻訳効率を持っているのではないということを示している。

*HSP* 5'-UTR がすべて高い翻訳効率を示す理由として、5'-UTR に結合する共通のトランス因子が存在する可能性が考えられる。2章において述べたタバコおよびコムギ由来の *HSP101* のように 5'-UTR に存在する特異的な配列に結合し、翻訳促進に関与するトランス因子が存在する可能性も報告されている。しかし、*HSP* 5'-UTR には共通するシス配列のような塩基配列上の相同性はなかった。

特異的なモチーフが存在しなくても、5'-UTR の GC 含量、長さ、二次構造、開始コドン近傍の配列が翻訳効率に影響を与えることは報告されている (87)。これらは不可分の要素であり、全体的な 5'-UTR の翻訳効率はこれらの要素の複合的な影響によって決定されると考えられる。mRNA の 5'末端から 12 塩基以内に -30 kcal/mol 以上の自由エネルギーを持つ二次構造が存在すると、40S リボソームサブユニットの 5'-UTR への結合が阻害され、翻訳効率は低下する (90)。GC 結合がステム構造に多く存在するとその二次構造の安定性は上昇するため、GC 含量も翻訳効率を考えるうえで重要な要素である。*HSP18.2* 5'-UTR の GC 含量は約 50% で (Table 2-3)、調べられた植物の 5'-UTR の 70% 以上が 40% 以下の GC 含量であることと比べるとむしろ高い方である (91, 92)。しかし、第 2 章において、*HSP18.2* 5'-UTR は 5'末端付近に翻訳を阻害するような高度な二次構造は形成しないことが示された (Fig. 2-2)。さらに他の *HSP* 5'-UTR は GC 含量も 50% 以下であり、二次構造予測においても翻訳を阻害しうる安定な二次構造をとらないことが予測された (data not shown)。このように *HSP* 5'-UTR は安定な二次構造をとらず、本質的に高い翻訳効率を持つ 5'-UTR であると考えられる。

また、5'-UTR を走査中のリボソームは 5'-UTR が短すぎると最初の AUG を認識できずに通過してしまうので、適切な 5'-UTR の長さが効率の良い翻訳には必要とされる (78)。ニンジンのプロトプラストでは、GUS の発現は 5'-UTR の長さを 14 から 29 塩基に伸ばしても顕著な違いは認められないが、5'-UTR の長さを 44 塩基から 79 塩基に伸ばした場合、GUS 活性は 2 倍に増加した (63)。18.2UTR-45 の 5'-UTR は pBI221 由来の 24 塩基のポリリンカー領域を含んでいるので 18.2UTR-45 と pBI221 の 5'-UTR の長さはそれぞれ 69 塩基と 41 塩基である (Table 1-3)。T87 プロトプラストにおける

18.2UTR-45 の GUS/Luc 相対活性は pBI221 に比べて、約 24 倍高く (Fig. 3-2A)、この活性の上昇には pBI221 よりも 5'-UTR が長くなったことも影響を与えているものと考えられる。しかし、*Bam*HI 以降も含む Nt108UTR 5'-UTR の全長は 40 塩基、pBI221 においては 41 塩基とほぼ同じ長さの 5'-UTR であるにも関わらず Nt108UTR の GUS/Luc 相対活性はシロイヌナズナにおいて pBI221 の約 6 倍、タバコにおいて約 3 倍であった。このことから、pBI221 の 5'-UTR の塩基配列が本質的に低い翻訳効率を持つ配列である可能性も考えられる。Nt108UTR を基準に考えた場合、18.2UTR-24 および 18.2UTR-45 の GUS/Luc 相対活性はシロイヌナズナにおいてそれぞれ 1.7 倍と 4.0 倍、タバコにおいて 1.7 倍と 3.1 倍である。また、5'-UTR 長は 1.2 倍と 1.7 倍である。これらは 5'-UTR の長さと GUS/Luc 相対活性の上昇がおおむね相関傾向にあり、Gallie らの報告と一致している。一方、17.4UTR、81-1UTR、81-2 UTR、81-3UTR は 18.2UTR-45 に比べて、5'-UTR 長はそれぞれ 1.2~2.0 倍で、タバコにおける GUS/Luc 相対活性は 18.2UTR-45 の 1.2~1.5 倍である。この中では最も 5'-UTR の長さが短い 17.4UTR の GUS/Luc 相対活性が最も高く、最も 5'-UTR が長い 81-3UTR が最も活性値が低い。このように 5'-UTR の長さが 100 塩基前後になるとあまり長さと翻訳効率の間に相関が見られなくなってくる。しかし、GUS/Luc 相対活性はほぼ一定して高い値である。効率の良い翻訳には適切な長さの 5'-UTR が必要だが、それ以上になると、長さが翻訳効率に与える影響はあまり変らないのだろう。18.2UTR-45 の GUS/Luc 相対活性は 18.2UTR-7 に比べてシロイヌナズナにおいて 7.4 倍、タバコにおいて 5.1 倍である。18.2UTR-7 の 5'-UTR 長は 31 塩基と短く、そのために翻訳効率下がっているのかもしれない。

GenBank と EMBL データベースから集められた 5'-UTR の統計的解析の結果から、開始コドンの近傍配列はそれぞれの生物種ごとにコンセンサス配列があると考えられている (91, 92)。このコンセンサス配列は単子葉植物においては (A/C)(A/G)(A/C)CAUG、双子葉植物においては AA(A/C)AAUG であることが提唱されている (93)。Kozak は動物細胞においてこの近傍配列をその動物に最適な配列に替えることで翻訳効率を 20 倍以上高めることが可能であることを示した (94)。本研究において、5'-UTR を置換するだけで、レポータータンパク質の蓄積量が 20 倍近く上昇することが示された (Fig. 3-5)。これらの 5'-UTR はポリリンカー領域の *Bam*HI 部位で *GUS* 遺伝子と連結されているため、開始コドン近傍の塩基配列はすべて CCUUAUG である。この近傍配列を双子葉植物に最適な上記の配列に置換すれば、さらに mRNA 1 分子あたりのタンパク質生産量を上げることが可能である。

いずれにせよ、本研究において 5'-UTR を置換することでタンパク質の生産量の向上が可能であることが示された。高い翻訳効率を持つ 5'-UTR を単離することは外来タンパク質生産の最適化のために有効な戦略と考えられる。高い翻訳効率を持つ 5'-UTR と強力なプロモーターおよびシス配列と組み合わせる利用は応用的にも有効である。データベース検索などによって網羅的に集められた種々の 5'-UTR の特徴付けを行うとともに高翻訳効率を持つ 5'-UTR の単離を目指すことは植物における翻訳を理解し、有用物質高生産系を確立することを可能にするだろう。

### 高温域での翻訳抑制回避機構の植物種を超えた共通点と相違点

植物において、現在わかっている高温下での遺伝子発現様式は 1) *HSP* 遺伝子 mRNA は熱ストレス下でも翻訳が行われるが、他の遺伝子 mRNA の翻訳は抑制される。2) 翻訳が抑制された遺伝子の mRNA はポリソームから分離し、細胞質内のどこかに隔離されると考えられている。しかし、全体的な理解は進んでおらず、*HSP* 5'-UTR 領域があると翻訳抑制が回避されること、熱ストレス下では HSGs を形成することが知られているのみで、この2つの現象に関連はあるのかどうかはまだ不明である。本研究は、植物細胞における熱ストレス下での翻訳抑制およびその回避に関わる機構の理解に至る知見の蓄積を目的に行った。

第1章において、シロイヌナズナの *HSP* 遺伝子である *HSP18.2*、*HSP17.4*、*HSP81-1*、*HSP81-2* および *HSP81-3* の 5'-UTR が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与することを示した。また、シロイヌナズナ由来の *HSP* 5'-UTR が BY-2 プロトプラストにおいても高温域での翻訳抑制を回避することを示した。さらに形質転換 BY-2 においても、*HSP18.2* の 5'-UTR が高温域での翻訳抑制回避に寄与することを示した。ヘテロな発現系であるにも関わらず、BY-2 プロトプラストにおいてもシロイヌナズナの *HSP18.2* 5'-UTR は熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与し (Figs. 1-6, 1-7)、5'-UTR を介した翻訳制御が植物種を超えて保存されていることを明らかにした。このことから、タバコとシロイヌナズナでは高温域での翻訳抑制に類似の機構を用いているものと考えられる。また、Pitto らはトウモロコシの *HSP70* 5'-UTR がトウモロコシのみならず、タバコやニンジン<sup>43)</sup>の培養細胞においても、高温域での翻訳抑制回避に寄与し、双子葉植物、単子葉植物の別なく機能することを示した(43)。シロイヌナズナ由来の *HSP18.2* 5'-UTR においても、トウモロコシ由来の *HSP70* 5'-UTR においても種を超えて機能することが示され、高温域での翻訳抑制回避機構は植物全体に保存されたものであると考えられる。

また、T87 および BY-2 プロトプラストを用いた一過性発現実験において、18.2UTR-45 を導入した細胞に様々な温度の熱ストレスを与えたところ、シロイヌナズナで 33°C、タバコでは 37°C の熱ストレスを与えても、細胞は通常培養温度で得られる GUS 比活性をほぼ 100%維持した。用いた発現系が同一であるにも関わらず、タバコとシロイヌナズナにおける熱ストレス温度は異なっており、Pitto らの報告においても、トウモロコシ (40°C) とニンジン (37°C) とで翻訳が維持される温度は異なっていた。植物は同様の機構を用いて翻訳抑制および回避を行っているが、翻訳開始因子群などの安定性などは植物種によって異なっていることが考えられる。

### *HSP* 5'-UTR の IRES 様機能と今後の研究

第2章では、植物細胞における熱ストレス下での翻訳抑制回避の機構として、抑制回避を可能にするようなタンパク質性の因子が結合する一次配列が存在するのか、5'-UTR のある二次構造を形成することが重要なのか、もしくは両者が複合的に関わ

っているのかについての知見を得るために *HSP18.2* 5'-UTR についての詳細な解析を行った。その結果、翻訳抑制を受ける受けないに関わらず、高温下での 5'-UTR の二次構造は変化しないことが明らかになった。また、*HSP18.2* の 5'-UTR 内の二次構造を塩基置換によって変化させても、熱ストレス下での翻訳抑制回避能に影響はなかった。次に、*HSP18.2* 5'-UTR を 3'末端側から段階的に欠失させた発現系を用いて熱ストレス下での翻訳について調べたところ、5'-UTR の 5'末端側から 7塩基まで欠失させることによって、高温域での翻訳能が失われた。このことから、*HSP18.2* 5'-UTR の 5'末端部分にタンパク質性の因子が結合するシス領域が存在する可能性、翻訳開始因子群と 5'-UTR 全体の親和性の高さが高温域での翻訳抑制回避に寄与する可能性、あるいは 40S リボソームサブユニットがリクルートされる IRES 様の領域が存在する可能性が示された。5'-UTR に結合するタンパク質の検索、5'-UTR の網羅的な解析、IRES の存在の検討など今後の進展が待たれる。

今回すべての *HSP* 5'-UTR に 18S rRNA と相補する領域が存在することが明らかになった。また、*HSP18.2* 5'-UTR に変異を導入しても高温域での翻訳能を失わなかったこと、導入した変異が 18S rRNA と相補する領域と重複していなかったことから、高温域での翻訳開始において、18S rRNA との塩基対形成が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。高温域での 18S rRNA と *HSP* 5'-UTR の塩基対形成に対する報告はまだなく、今後、高温域での翻訳機構を理解する戦略を立てるうえで一つの切り口となるだろう。

一方、植物や酵母、ほ乳類などでは基本となる翻訳開始因子 eIF4F に 2種類の isoform が単離されている。植物において、それらは eIF4F (eIF4E と eIF4G の複合体) と eIFiso4F (eIFiso4E と eIFiso4G の複合体) と呼ばれている。コムギの eIF4G および eIFiso4G はそれぞれ 165 kDa と 86 kDa の分子量を持っており、そのアミノ酸配列の相同性は 30% である。2001 年、Gallie らによって、*in vitro* 翻訳系においてコムギ由来 eIF4G はキャップ依存性の翻訳のみならず、キャップ構造の無い mRNA やダイシストロニックな mRNA の翻訳においても、eIFiso4G より高い翻訳能があることが示された (95)。mRNA の 5'-UTR に結合した eIF4G は eIF4E、eIF3、eIF2A などが結合する土台となる因子であり (Fig. 2-7)、ウイルス由来のプロテアーゼによって切断された C 末端側 eIF4G は IRES を用いたキャップ非依存性翻訳に利用されるなど (Fig. 2-8A)、キャップ依存性、非依存性にかかわらず、翻訳開始において重要な役割を果たすタンパク質である。IRES モジュールによる 40S リボソームサブユニットの直接的なリクルートにおいても、補助的な役割を果たしているのかも知れない。

また、植物における熱ストレス応答の全体的な理解のためには、高温域で翻訳されずポリソームから解離した mRNA がどのような機構で隔離場所まで運ばれ貯蔵されるかを解明することも必須の検討課題だと考えられる。5'-UTR の網羅的な解析を行い高温域で翻訳される 5'-UTR、翻訳されない 5'-UTR、双方の特徴付けを行うことも高温域での翻訳制御機構についての理解を助ける重要な知見となるだろう。

## 応用における 5'-UTR 選択の重要性および HSP 5'-UTR 利用の有効性

これまでの研究を通して、HSP 5'-UTR が通常培養温度でも効率の良い翻訳に寄与することが示唆され、3 章においては応用面から、HSP 5'-UTR の翻訳効率についての評価を行った。その結果、HSP18.2 5'-UTR に置換することによって、シロイヌナズナにおいて約 24 倍、タバコにおいて約 10 倍、タンパク質蓄積量が増加した。第 2 章において HSP 5'-UTR が IRES として機能する可能性を考察したが、この常温での HSP 5'-UTR の高い翻訳効率はキャップ依存性の翻訳と IRES を用いた翻訳による複合的な効果によるものかもしれない。

生産量の向上を考える際、高い転写効率を持つプロモーターの選択だけでなく、翻訳効率の高い 5'-UTR を選ぶことも重要であることを示した。さらに HSP18.2 5'-UTR は植物種を超えて高い翻訳効率を持つことを示した。シロイヌナズナとタバコはともに双子葉植物であり、今後イネやコムギなど単子葉の実験植物においても高い翻訳効率を与えるかどうか、その有用性を検討する必要がある。単子葉植物においても同様の機能を持つならば、有用遺伝子発現系の確立を目指した場合、汎用性の高い系であると考えられる。また、求める効果がなくとも、双子葉と単子葉における異なる翻訳機構についての知見が得られるだろう。第 1 章で示されたように HSP 5'-UTR は高温域においても翻訳抑制を受けないため、分子育種の観点から砂漠などの温度条件の厳しい環境でも生育可能な植物の作出に対する利用も有効であると考えられる。また本研究において、80 塩基を超える 5'-UTR はいずれも高い翻訳効率を示した。長い 5'-UTR がすべて高い翻訳効率を持つかどうかは今後の検討が必要だが、応用を目的とした高い翻訳効率を持つ 5'-UTR の探索を行う場合、5'-UTR の長さを選択基準にするのも一つの手段だろう。応用面からも 5'-UTR についての今後の研究が期待される。

## 参 考 文 献

1. **Lindquist, S.:** The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, **55**, 1151-1191 (1986).
2. **Schoffl, F., Prandl, R. and Reindl, A.:** Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol*, **117**, 1135-1141. (1998).
3. **Ashburner, M. and Bonner, J. J.:** The induction of gene activity in drosophila by heat shock. *Cell*, **17**, 241-254. (1979).
4. **Ashburner, M.:** Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma*, **31**, 356-376 (1970).
5. **Tissieres, A., Mitchell, H. K. and Tracy, U. M.:** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, **85**, 389-398. (1974).
6. **Spradling, A., Penman, S. and Pardue, M. L.:** Analysis of drosophila mRNA by in situ hybridization: sequences transcribed in normal and heat shocked cultured cells. *Cell*, **4**, 395-404. (1975).
7. **McKenzie, S. L. and Meselson, M.:** Translation in vitro of *Drosophila* heat-shock messages. *J Mol Biol*, **117**, 279-283. (1977).
8. **Scharf, K. D., Rose, S., Zott, W., Schoffl, F., Nover, L. and Schoff, F.:** Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *Embo J*, **9**, 4495-4501. (1990).
9. **Hubel, A. and Schoffl, F.:** Arabidopsis heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Mol Biol*, **26**, 353-362. (1994).
10. **Gagliardi, D., Breton, C., Chaboud, A., Vergne, P. and Dumas, C.:** Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. *Plant Mol Biol*, **29**, 841-856. (1995).
11. **Czarnecka-Verner, E., Yuan, C. X., Fox, P. C. and Gurley, W. B.:** Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean. *Plant Mol Biol*, **29**, 37-51. (1995).
12. **Prandl, R., Hinderhofer, K., Eggers-Schumacher, G. and Schoffl, F.:** HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, **258**, 269-278. (1998).
13. **Shoji, T., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K. and Shinmyo, A.:** Two types of heat shock factors in cultured tobacco cells. *Plant Cell Report*, **19**, 414-420 (2000).
14. **Livak, K. J., Freund, R., Schweber, M., Wensink, P. C. and Meselson, M.:** Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5613-5617. (1978).

15. **Pelham, H. R.:** A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, **30**, 517-528. (1982).
16. **Amin, J., Ananthan, J. and Voellmy, R.:** Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol*, **8**, 3761-3769. (1988).
17. **Xiao, H. and Lis, J. T.:** Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science*, **239**, 1139-1142. (1988).
18. **Barros, M. D., Czarnecka, E. and Gurley, W. B.:** Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol Biol*, **19**, 665-675. (1992).
19. **Bienz, M.:** The heat-shock response in *Xenopus* oocytes and somatic cells: differences in phenomena and control., p. 177-181. *In* Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A (ed.), *Heat Shock from Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982).
20. **Lindquist, S., DiDomenico, B., Bugaisky, G., Kurtz, S., Petko, L. and Sonoda, S.:** Regulation of the heat-shock response in *Drosophila* and yeast., p. 167-175. *In* Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A (ed.), *Heat Shock from Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982).
21. **Saavedra, C., Tung, K. S., Amberg, D. C., Hopper, A. K. and Cole, C. N.:** Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **10**, 1608-1620. (1996).
22. **Saavedra, C. A., Hammell, C. M., Heath, C. V. and Cole, C. N.:** Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev*, **11**, 2845-2856. (1997).
23. **Hickey, E. D. and Weber, L. A.:** Modulation of heat-shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery. *Biochemistry*, **21**, 1513-1521. (1982).
24. **Duncan, R. and Hershey, J. W.:** Heat shock-induced translational alterations in HeLa cells. Initiation factor modifications and the inhibition of translation. *J Biol Chem*, **259**, 11882-11889. (1984).
25. **Bommer, U. A., Lazaris-Karatzas, A., De Benedetti, A., Nurnberg, P., Benndorf, R., Bielka, H. and Sonenberg, N.:** Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23: involvement of eIF-4E. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 633-641. (1994).
26. **Subkhankulova, T., Mitchell, S. A. and Willis, A. E.:** Internal ribosome entry segment-mediated initiation of c-Myc protein synthesis following genotoxic stress. *Biochem J*, **359**, 183-192. (2001).
27. **Kim, Y. K. and Jang, S. K.:** Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 224-231. (2002).
28. **Ballinger, D. G. and Pardue, M. L.:** The control of protein synthesis during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates. *Cell*, **33**, 103-113. (1983).

29. **Klemenz, R., Hultmark, D. and Gehring, W. J.:** Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. *Embo J*, **4**, 2053-2060. (1985).
30. **McGarry, T. J. and Lindquist, S.:** The preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell*, **42**, 903-911. (1985).
31. **Hess, M. A. and Duncan, R. F.:** Sequence and structure determinants of *Drosophila* Hsp70 mRNA translation: 5'UTR secondary structure specifically inhibits heat shock protein mRNA translation. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2441-2449. (1996).
32. **Duncan, R. F., Cavener, D. R. and Qu, S.:** Heat shock effects on phosphorylation of protein synthesis initiation factor proteins eIF-4E and eIF-2 alpha in *Drosophila*. *Biochemistry*, **34**, 2985-2997. (1995).
33. **Levitt, J.:** Responses of plants to environmental stresses., p. 229-321. Academic Press, New York and London (1972).
34. **Nover, L., Scharf, K. D. and Neumann, D.:** Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol*, **9**, 1298-1308. (1989).
35. **Low, D., Brandle, K., Nover, L. and Forreiter, C.:** Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta*, **211**, 575-582. (2000).
36. **Apuya, N. R. and Zimmerman, J. L.:** Heat Shock Gene Expression Is Controlled Primarily at the Translational Level in Carrot Cells and Somatic Embryos. *Plant Cell*, **4**, 657-665. (1992).
37. **Gallie, D. R., Caldwell, C. and Pitto, L.:** Heat Shock Disrupts Cap and Poly(A) Tail Function during Translation and Increases mRNA Stability of Introduced Reporter mRNA. *Plant Physiol*, **108**, 1703-1713. (1995).
38. **Neumann, D., Scharf, K. D. and Nover, L.:** Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur J Cell Biol*, **34**, 254-264. (1984).
39. **Richter, J. D. and Smith, L. D.:** Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. *Nature*, **309**, 378-380. (1984).
40. **Dearsly, A. L., Johnson, R. M., Barrett, P. and Sommerville, J.:** Identification of a 60-kDa phosphoprotein that binds stored messenger RNA of *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem*, **150**, 95-103. (1985).
41. **Evdokimova, V. M., Wei, C. L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., Ustinov, V. A., Hershey, J. W. and Ovchinnikov, L. P.:** The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J Biol Chem*, **270**, 3186-3192. (1995).
42. **Yurkova, M. S. and Murray, M. T.:** A translation regulatory particle containing the *Xenopus* oocyte Y box protein mRNP3+4. *J Biol Chem*, **272**, 10870-10876. (1997).

43. **Pitto, L., Gallie, D. R. and Walbot, V.:** Role of the leader sequence during thermal repression of translation in Maize, Tobacco, and Carrot protoplasts. *Plant Physiol.*, **100**, 1827-1833 (1992).
44. **Ingolia, T. D. and Craig, E. A.:** Primary sequence of the 5' flanking regions of the *Drosophila* heat shock genes in chromosome subdivision 67B. *Nucleic Acids Res*, **9**, 1627-1642. (1981).
45. **Hultmark, D., Klemenz, R. and Gehring, W. J.:** Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene hsp22. *Cell*, **44**, 429-438. (1986).
46. **Schoffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M. and Angermuller, S.:** The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet*, **217**, 246-253. (1989).
47. **Takahashi, T. and Komeda, Y.:** Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, **219**, 365-372. (1989).
48. **Takahashi, T., Naito, S. and Komeda, Y.:** The *Arabidopsis HSP18.2* promoter/ *GUS* gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock response. *Plant J.*, **2**, 751-761 (1992).
49. **Takahashi, T., Naito, S. and Komeda, Y.:** Isolation and Analysis of the Expression of Two Genes for the 81-Kilodalton Heat-Shock Proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **99**, 383-390 (1992).
50. **Yabe, N., Takahashi, T. and Komeda, Y.:** Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90- family gene HSP81. *Plant Cell Physiol*, **35**, 1207-1219. (1994).
51. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.:** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
52. **Linsmaier, E. M. and Skoog, F.:** Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, **18**, 100-127 (1965).
53. **Nagata, T.:** Interaction of plant protoplast and liposome. *Meth. Enzymol.*, **148**, 34-39 (1987).
54. **Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W.:** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907 (1987).
55. **Matsuo, N., Minami, M., Maeda, T. and Hiratsuka, K.:** Dual luciferase assay for monitoring gene expression in higher plants. *Plant Biotechnol.*, **17**, 71-75. (2001).
56. **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. (1970).
57. **Bradford, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254 (1976).

58. **Church, G. M. and Gilbert, W.:** Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **81**, 1991-1995. (1984).
59. **Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K. and Shinmyo, A.:** Isolation of Growth-Phase-Specific Promoters from Cultured Tobacco Cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 231-235. (2000).
60. **Higgs, D. C., Shapiro, R. S., Kindle, K. L. and Stern, D. B.:** Small cis-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation. *Mol Cell Biol*, **19**, 8479-8491. (1999).
61. **Wells, D. R., Tanguay, R. L., Le, H. and Gallie, D. R.:** HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev*, **12**, 3236-3251. (1998).
62. **Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. and Wilson, T. M.:** The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, **15**, 3257-3273. (1987).
63. **Gallie, D. R. and Walbot, V.:** Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4631-4638. (1992).
64. **Pestova, T. V., Hellen, C. U. and Wimmer, E.:** Translation of poliovirus RNA: role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5' nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein. *J Virol*, **65**, 6194-6204. (1991).
65. **Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I. and Hellen, C. U.:** Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7029-7036. (2001).
66. **Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S. and Spaan, W.:** Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett*, **365**, 115-119. (1995).
67. **Rijnbrand, R. C., Abbink, T. E., Haasnoot, P. C., Spaan, W. J. and Bredenbeek, P. J.:** The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology*, **226**, 47-56. (1996).
68. **Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J. and Bredenbeek, P. J.:** Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol*, **71**, 451-457. (1997).
69. **Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. and Jackson, R. J.:** Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J*, **14**, 6010-6020. (1995).
70. **Reynolds, J. E., Kaminski, A., Carroll, A. R., Clarke, B. E., Rowlands, D. J. and Jackson, R. J.:** Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome

- entry site is at the authentic initiation codon. *Rna*, **2**, 867-878. (1996).
71. **Wang, C., Le, S. Y., Ali, N. and Siddiqui, A.:** An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *Rna*, **1**, 526-537. (1995).
  72. **Lu, H. H. and Wimmer, E.:** Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1412-1417. (1996).
  73. **Honda, M., Brown, E. A. and Lemon, S. M.:** Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*, **2**, 955-968. (1996).
  74. **Chappell, S. A., Edelman, G. M. and Mauro, V. P.:** A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1536-1541. (2000).
  75. **Hu, M. C., Tranque, P., Edelman, G. M. and Mauro, V. P.:** rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1339-1344. (1999).
  76. **Yang, Q. and Sarnow, P.:** Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA: evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2800-2807. (1997).
  77. **Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A. and Willis, A. E.:** C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, **16**, 423-428. (1998).
  78. **Slusher, L. B., Gillman, E. C., Martin, N. C. and Hopper, A. K.:** mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9789-9793. (1991).
  79. **Daniell, H., Streatfield, S. J. and Wycoff, K.:** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, **6**, 219-226. (2001).
  80. **Fischer, R., Drossard, J., Commandeur, U., Schillberg, S. and Emans, N.:** Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 101-108 (1999).
  81. **Gleba, D., Borisjuk, N. V., Borisjuk, L. G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba, Y. Y. and Raskin, I.:** Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5973-5977. (1999).

82. **Wilke, D.:** Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**, 135-145. (1999).
83. **Sanders, P. R., Winter, J. A., Barnason, A. R., Rogers, S. G. and Fraley, R. T.:** Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1543-1558. (1987).
84. **Yoshida, K., Kasai, T., Garcia, M. R., Sawada, S., Shoji, T., Shimizu, S., Yamazaki, K., Komeda, Y. and Shinmyo, A.:** Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **44**, 466-472. (1995).
85. **Gallie, D. R.:** The Role of Post-Transcriptional Control in Transgenic Gene Design, p. 49-74. *In* Owen MRL, Pen J (ed.), *Transgenic plants: A production system for industrial and pharmaceutical proteins*. John Wiley & Sons, West Sussex, UK (1996).
86. **Kozak, M.:** Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr*, **1**, 117-125. (1991).
87. **Kozak, M.:** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, **266**, 19867-19870. (1991).
88. **Blackwood, E. M. and Kadonaga, J. T.:** Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, **281**, 61-63. (1998).
89. **Hulzink, R. J., de Groot, P. F., Croes, A. F., Quaedvlieg, W., Twell, D., Wullems, G. J. and Van Herpen, M. M.:** The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiol*, **129**, 342-353. (2002).
90. **Kozak, M.:** Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol*, **9**, 5134-5142. (1989).
91. **Joshi, C. P. and Nguyen, H. T.:** 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 541-549. (1995).
92. **Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G. and Saccone, C.:** Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Gene*, **205**, 95-102. (1997).
93. **Joshi, C. P., Zhou, H., Huang, X. and Chiang, V. L.:** Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol*, **35**, 993-1001. (1997).
94. **Kozak, M.:** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292. (1986).
95. **Gallie, D. R. and Browning, K. S.:** eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem*, **276**, 36951-36960. (2001).

## 謝 辞

本研究を行うにあたり終始御指導、御鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科新名惇彦教授に深く感謝いたします。本研究に際し直接懇切なるご指導を賜わり、さらに本論文の作成にあたり終始適切な助言を頂いた加藤晃先生に厚く御礼申し上げます。実験を遂行するにあたり適切な助言、ご配慮を頂きました吉田和哉先生、関根政実先生に厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、快くプラスミドを供与して下さった高橋卓助手 (北海道大学)、米田好文教授 (東京大学) に深く感謝いたします。本研究を進めるにあたり、終始適切な助言を頂きました、佐藤淳子博士に厚くお礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、励ましあい、時に叱咤激励して下さった Pulla Kaothien 博士、堀江智明博士、與那嶺育子氏、河村和恵氏に心より感謝いたします。また、本研究を始めるにあたりご指導を頂きました庄司猛氏に厚く御礼申し上げます。博士課程の期間中、常にあたたかい態度で見守って下さった、奈倉 (堀江) 理恵氏、山中美和子氏、吉村智美博士、植物代謝調節学講座の皆様心より感謝いたします。

最後に博士課程の期間中、精神的また経済的に惜しみない援助を与えて下さった両親に深く感謝いたします。

## 論文目録

### 学位論文の主たる部分を公表した論文

Tomoko Dansako, Ko Kato, Junko Satoh, Masami Sekine, Kazuya Yoshida, and Atsuhiko Shinmyo 5' Untranslated Region of the *HSP18.2* Gene Contributes to Efficient Translation in Plant Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **95** (1) 52-58 (2003).

Tomoko Dansako, Ko Kato, Junko Satoh, Masami Sekine, Kazuya Yoshida, and Atsuhiko Shinmyo The 5' Untranslated Region of *Arabidopsis thaliana* *HSP18.2* gene contributes to preferential translation under heat stress condition. *In preparation*.