

別紙 1

【研究題目】 植物における高温域での翻訳に関する研究

【氏名】 團迫 智子

【要旨】

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。

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、 β -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(*Arabidopsis thaliana*, 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°Cで9時間培養し、さらに33°C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°C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 (*Nicotiana Tabacum* 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°Cで培養した継代後 3 日目の形質転換 BY-2 を 37°Cの処理温度に移し、20 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* 遺伝子の
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°C で 20 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°C 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 20 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°C 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°C での活性値
の約半分にまで低下し、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°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。
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°C または 33°C 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。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 團 迫 智 子

熱ショックタンパク質 (HSP) は生物界に広く存在し、生育温度より約 10°C 高温に曝されると、*HSP* 遺伝子が発現することがよく知られている。シロイヌナズナの *HSP18.2* 遺伝子のもその一つであり、その機構を解析する過程で、CaMV35S プロモーターに連結する GUS レポーター遺伝子の直前に *HSP18.2* の 5'UTR、45bp を置くと、高温での翻訳活性が増大することを見だし、その詳細について解析した。

1) CaMV35S-GUS(1), CaMV35S -*HSP18.2* 5'UTR- GUS(2)をシロイヌナズナ培養細胞のプロトプラストに導入した一過性発現において、(1)では 33°Cで GUS 活性は大きく低下したが、(2)では 35°Cでも高い GUS 活性を示した。mRNA 蓄積量はほとんど変わらないことから、*HSP18.2* の 5'UTR が高温域での翻訳活性維持に効果があると結論している。この現象はタバコ培養細胞のプロトプラストでも見られ、植物種を越えて保存されている現象であることを示している。

2) 上記の構築物をタバコ培養細胞の染色体に導入し、形質転換細胞を作成した。(1)は培養温度を 37°Cにすると GUS 活性は 25°Cの培養の 60%に低下したが、(2)では両温度で変わらなかった。シクロヘキシイミド存在下では GUS 活性は上昇しないことから、高温での高い GUS 活性は新規タンパク質合成によるものであり、ここにおいても *HSP18.2* の 5'UTR が高温における翻訳に効いていることを示している。

3) 5'UTR の部分的に 2 本鎖を形成すると予想される、連続する 4 塩基を他の塩基に置換し、シロイヌナズナの一過性発現を行ったが、変異を導入しても高温での翻訳活性は維持されていた。45 塩基の 5'UTR、変異 5'UTR をインビトロ転写で作成し、22°C、33°Cでメチル化試薬で処理し、プライマー伸長法で比較したが、伸長バンドに差はなかった。以上の結果から 2 次構造が高温での翻訳に機能しているのではないと結論している。

4) 5'UTR を 3'側から 7 塩基まで欠失させると高温での翻訳活性は消滅した。したがって有効配列は約 38bp に限定され、ここに高温での翻訳に必要なシス配列が存在する。シロイヌナズナの他の 3 種の *HSP* 遺伝子の 5'UTR も同様の効果を示した。これらに保存された共通のシス配列はないが、rRNA と槽補する配列が所々にあり、リボソームとの結合能力が高いことに起因する可能性を指摘している。

5) *HSP18.2* の 5'UTR はタバコ細胞の常温での翻訳を約 20 倍上昇させることも述べている。これは遺伝子組換え植物で外来遺伝子を高発現させる際、少ない mRNA から大量のタンパク質を得る重要なツールである。高発現プロモーターはしばしば器官、組織特異性とも連動しているが、この 5'UTR はどの組織、器官においても高発現できるという大きな特徴を持ち、これは応用面でも重要な発見である。

以上のように、本論文はシロイヌナズナの熱ショックタンパク質遺伝子の 5'UTR の高温、常温での翻訳促進機能を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。