

植物の環境ストレスに応答した翻訳制御

松浦 秀幸

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)

平成20年1月28日提出

目次

緒論	5
第一章 高温ストレス下における <i>HSP81-3</i> 5'-UTR を介した翻訳機構の解析	9
I-I. 序論	9
I-II. 方法と材料	12
I-II-I. 使用植物の生育条件および高温ストレス処理	12
I-II-II. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析	12
I-II-III. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出 (15 フラクション)	12
I-II-IV. RT-PCR	13
I-II-V. プラスミド構築	13
I-II-VI. <i>In vitro</i> 転写	15
I-II-VII. シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラスト調製	15
I-II-VIII. プロトプラストへのバイシストロニックプラスミド及び mRNA の導入	16
I-II-IX. ルシフェラーゼ酵素活性測定	16
I-III. 結果	17
I-III-I. 高温域においても <i>Hsp81-3</i> mRNA はポリソームを形成している	17
I-III-II. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR はキャップ構造、ポリ A 配列を有する mRNA の高温域における効率的な翻訳に寄与する	19
I-III-III. <i>Hsp81-3</i> 3'-UTR はキャップ構造、ポリ A 配列を有する mRNA からの高温域における効率的な発現に影響しない	24
I-III-IV. 高温域におけるキャップ構造を有する mRNA からの効率的な発現への <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR の寄与はポリ A 配列の有無と無関係である	25
I-III-V. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR の 5'側領域が高温域における効率的な翻訳に重要である	27
I-III-VI. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR はキャップ構造を持たない mRNA からの翻訳を促進する	29
I-III-VII. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR のキャップ非依存的な翻訳を促進する活性は、高温域におけるキャップ構造を有する mRNA の効率的な翻訳に重要である	30
I-III-VIII. キャップ構造の存在は <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR を介した発現を著しく高める	32
I-III-IX. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR は IRES 様の活性を有している	32
I-III-X. <i>Hsp81-3</i> 5'-UTR を介した高温ストレス下における翻訳は、5'端近傍に挿入した開始コドンにより阻害される	34
I-IV. 考察	36

第二章 翻訳段階における環境ストレス応答のゲノムワイド解析	40
II-I. 序論	40
II-II. 方法と材料	42
II-II-I. 使用植物の生育条件およびストレス処理	42
II-II-II. 培養細胞の増殖曲線	42
II-II-III. <i>In vivo</i> パルスラベル実験	42
II-II-IV. <i>In vitro</i> 翻訳実験	43
II-II-V. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析	43
II-II-VI. マイクロアレイ解析用 RNA の抽出	43
II-II-VII. トータル RNA の抽出	44
II-II-VIII. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出 (8 フラクション)	44
II-II-IX. 定量 RT-PCR 法	44
II-II-X. マイクロアレイハイブリダイゼーション	45
II-II-XI. マイクロアレイデータ解析	46
II-II-XII. 遺伝子の機能分類	48
II-II-XIII. 統計解析	48
II-III. 結果	50
II-III-I. 高温ストレスによる翻訳の抑制	50
II-III-II. 高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する	52
II-III-III. 定量 RT-PCR 法によるマイクロアレイデータの検証	59
II-III-IV. 高温ストレスにより蓄積 mRNA 量が増大する遺伝子の翻訳状態	63
II-III-V. 塩ストレスによる翻訳の抑制	65
II-III-VI. 塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する	66
II-III-VII. 塩ストレスにより蓄積 mRNA 量が増大する遺伝子の翻訳状態	72
II-III-VIII. 高温及び塩ストレスによる翻訳状態変化のゲノムワイドな比較	74
II-III-IX. 類似機能を有するタンパク質をコードしている mRNA 種の集団としての挙動の解析	75
II-III-X. 高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化を機能集団に属する個々の遺伝子のレベル において比較する	94
II-IV. 考察	98
II-IV-I. 環境ストレスによる翻訳状態の変化における 5'-UTR の重要性	98
II-IV-II. 環境ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の翻訳状態変化	100
II-IV-III. 特徴的な挙動を示す機能集団の存在	100
II-IV-IV. 高温ストレス及び塩ストレス下における類似した翻訳制御機構	101
II-IV-V. Hsp ファミリーに対するストレス特異的な選択的翻訳制御	103
II-IV-VI. 植物のストレス応答における翻訳制御の重要性	103

総括	105
謝辞	107
参考文献	108

緒論

植物の生育環境には、植物の生育や発達の阻害、生産性の低下の原因となりうる、高温、低温、乾燥、高塩、栄養飢餓、強光といった様々な環境ストレスが存在している。穀物について言えば、環境ストレスにより年間収穫高の 51-82%が失われているという試算もなされている (Bray et al., 2000; Wang et al., 2003)。一方で、植物には、そうした環境ストレスに適応し、最適でない環境においても生存を維持するためのストレス応答機構が備わっている。食糧や環境に対する世界的な問題意識の高まりを背景に、植物の環境ストレス応答機構を理解することを通じて、分子育種によりあるいは遺伝子工学的に環境ストレス耐性植物を作出する試みが活発になされている (Wang et al., 2003; Vinocur and Altman, 2005; Umezawa et al., 2006)。

環境ストレスに曝された植物は、生理的なレベルあるいは代謝のレベルなど様々なレベルでの変化を示す。そうした変化の根幹をなす機構の一つが、環境ストレスに応答した遺伝子発現の制御である (Bray et al., 2000; Shinozaki and Dennis, 2003)。古くは高温ストレス下における Hsp (heat shock protein)にはじまり (Vierling, 1991)、近年では、プロテオーム解析等を通じて、環境ストレス下においてタンパク質レベルが増加あるいは減少する遺伝子が現在までに多数報告されている (Ndimba et al., 2005; Lee et al., 2007)。こうした遺伝子の機能や発現制御機構に関する研究は、植物の環境ストレス応答研究における重要なトピックの一つとなっている (Bray et al., 2000)。遺伝子発現の過程、つまり、DNA を鋳型に mRNA が転写され、mRNA を鋳型にタンパク質が翻訳される過程の中で、転写段階の制御に関する研究は特に活発に行われてきた (Bray et al., 2000)。特に近年は、DNA マイクロアレイをはじめとするゲノムワイドな解析手法の登場と相まって、環境ストレスに応答して転写が活性化される遺伝子やその活性化に寄与する DNA の制御配列 (シス配列)、転写制御因子 (トランス因子) 等が多数同定されてきている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005; Chinnusamy et al., 2007; von Koskull-Doring et al., 2007; Miller and Mittler, 2006)。

しかし、遺伝子発現の結果としてのタンパク質の量は、転写された mRNA のみで決定されるわけではない。多くの環境ストレス、例えば高温 (Key et al., 1981; Nover et al., 1989) や低酸素 (Sachs et al., 1980; Fennoy et al., 1998)、脱水 (Hsiao, 1970; Kawaguchi et al., 2003) といったストレスに曝された植物では、翻訳状態が著しく変化することが知られている (Bailey-Serres, 1999; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002)。こうした翻訳状態の変化は、既存の mRNA を利用してタンパク質を合成する効率の制御であり、mRNA の転写、プロセッシング、核外への輸送のステップを経る必要がないため、ストレス環境下など、迅速な遺伝子発現制御を必要とする状

況において特に重要であると考えられている(Holcik and Sonenberg, 2005; Mathews et al., 2007; Bailey-Serres, 1999)。環境ストレスに応答した翻訳状態の変化には、一般的に、ストレスや細胞の種類を問わず広く共通した特徴が認められる。それが、ストレス環境下における細胞全体としての翻訳活性の抑制とそうした状況においても翻訳が維持もしくは活性化される一部遺伝子の存在である(図 1)。例えば、高温や低酸素ストレスに曝された植物では、細胞全体としての新規タンパク質合成の抑制が認められる一方で、*Hsp* や *ADH* (alcohol dehydrogenase) といった一部遺伝子のタンパク質合成は維持される(Bailey-Serres, 1999)。こうした特徴は、低酸素、ウイルス感染、アポトーシス等、様々な生理条件下の動物細胞や酵母等においても認められている(Mathews et al., 2007)。様々な細胞種やストレス種において共通の特徴を示すという事実は、環境ストレスに応答した遺伝子発現制御における翻訳制御の一般性、重要性を示唆していると考えられる。多くの遺伝子が相互作用する複雑な応答である植物の環境ストレス応答を理解するためには、様々な局面から理解することが重要である。本研究では、その重要性は示唆されるものの理解が進んでいない翻訳段階の制御に着目し、ストレス環境下においても翻訳が維持される機構(第一章)、全体的な抑制及び一部遺伝子の翻訳維持も含めた翻訳制御の全体像(第二章)という二つの観点からの研究を通じて、植物の環境ストレスに応答した翻訳制御に関する理解を深めることを目指した。

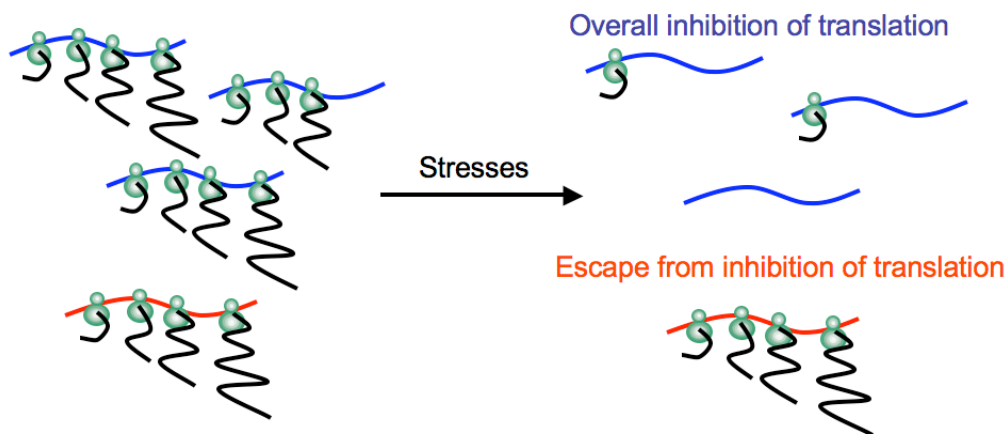


図 1 ストレス環境下における翻訳状態の変化

翻訳の律速段階はリボソームが mRNA にリクルートされる翻訳開始段階であり、従って、各 mRNA へのリボソームの結合数が翻訳の効率を示す指標として利用されている(Mathews et al., 2007; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004)。つまり、多数のリボソームが mRNA に結合しポリソームを形成している mRNA ほど効率的に翻訳されていると考えることができる。環境ストレス下においては、大部分の mRNA のポリソームからの解離(青色)と同時に、そうした状況にあってもポリソームを形成している一部遺伝子の存在が認められる(赤色)。

植物におけるストレスに応答した翻訳状態の変化の基盤をなす分子機構に関する知見は、転写段階の制御と比較しても非常に乏しく、例えば、細胞全体としての翻訳が抑制される機構もほとんど明らかとなっていない。一部遺伝子の翻訳維持機構に関しては、maize *Hsp70* や maize *ADH1* を対象とした研究を通じて、高温ストレス下や低酸素条件下における効率的な翻訳に5'非翻訳領域(5'-UTR)が重要であることが示されている(Pitto et al., 1992; Bailey-Serres and Dawe, 1996; Mardanov et al., 2007)。しかし、制御を規定するシス配列を含め、詳細な分子機構は未だ不明である。本研究第一章では、5'-UTR がストレス環境下における効率的な翻訳に寄与する分子機構に着目した。高温ストレス下における *Hsp* の発現制御機構は、ストレスに応答した遺伝子発現制御機構のモデルケースとして、古くから動物やショウジョウバエにおいて研究がなされてきた(Lindquist, 1986)。本研究では、5'-UTR を介したストレス環境下における翻訳のモデルケースとして、シロイヌナズナ *Hsp* 5'-UTR が高温ストレス下における翻訳に寄与する機構の解析を行った。

環境ストレスに応答した遺伝子発現制御における翻訳制御の意義や位置づけは曖昧ではあるものの、その重要性は様々な局面から議論され始めている。一般的には、環境ストレスに応答した翻訳の抑制には、大量のエネルギーを消費する翻訳の過程を抑制することによるエネルギーの節約及び変性タンパク質を軽減することによる細胞へのダメージの回避、一部遺伝子の翻訳の維持には、ストレス応答に重要なタンパク質の合成、といったストレス応答における意義や重要性があると考えられている。翻訳の開始に関わる翻訳開始因子の一つである eIF1A を過剰発現することにより植物の NaCl に対する耐性が増すこと (Rausell et al., 2003) や翻訳の伸長に関わる translation elongation factor 2 が低温ストレス耐性に関わること (Guo et al., 2002)、また、塩や過酸化水素ストレスにより、翻訳に関与する遺伝子の mRNA レベルが著しく増加することも報告されている (Vandenabeele et al., 2004; Sahi et al., 2006)。こうした例も植物のストレス応答における翻訳制御の重要性を示唆していると思われる。翻訳状態の変化を解析する手法として、ショ糖密度勾配遠心によりリボソームの結合数に応じて mRNA を分画するポリソーム解析が広く利用されている。翻訳はリボソームが mRNA にリクルートされる、いわゆる翻訳開始段階が律速段階であると考えられており、従って、リボソームの結合数が翻訳の効率を示す指標として利用されている (Mathews et al., 2007; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004)。つまり、多数のリボソームが mRNA に結合しポリソームを形成している mRNA ほど効率的に翻訳されていると考えることができる。ゲノムスケールで mRNA の翻訳状態の変化を知る事、つまりどの様な mRNA がポリソームから解離するあるいはポリソーム形成状態を維持しているかをゲノムワイドに知ることは、翻訳制御の重要性や意義に関する理解を深める上で有効な方

法である。近年、転写のみならず、脱水やショ糖飢餓、低酸素といった環境ストレスによる翻訳状態の変化を、マイクロアレイを用いてゲノムワイドに解析する試みもなされている(Nicolai et al., 2006; Branco-Price et al., 2005; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005)。本研究第二章では、上記の様な単一のストレス環境下における翻訳状態の変化の全体像を解析することに加え、翻訳状態の変化を異なるストレス間で比較・検証することを通じて、翻訳段階に存在する制御の様式、翻訳段階における制御の植物のストレス応答における重要性、意義に関する理解を深めることを目指した。具体的には、シロイヌナズナ培養細胞を材料に、高温及び塩の二つのストレスによる翻訳状態の変化をそれぞれ、マイクロアレイを用いてゲノムワイドに解析した。

第一章

高温ストレス下における *Hsp81-3* 5'-UTR を介した翻訳機構の解析

I-I. 序論

多くの細胞では、高温ストレスに曝されることにより大部分の mRNA からの翻訳が抑制される。しかし、細胞全体としての翻訳抑制を回避し、高温ストレス下においても効率的に翻訳される一部 mRNA 群も存在する。Heat shock protein (Hsp)がその代表的な例である。ショウジョウバエや植物など様々な生物種の Hsp の研究を通じて、5'-UTR が Hsp の高温ストレス下における効率的な翻訳に重要であることが示されている (Schneider, 2000; Panniers, 1994; Duncan, 1996)。

真核細胞の大部分の mRNA は、mRNA の 5'端に存在するキャップ構造 (m^7GpppN) に依存的な機構を介して翻訳が開始されると考えられている。このキャップ依存的な翻訳開始モデルでは、40S リボソームサブユニットがキャップ構造にリクルートされた後、開始コドン AUG を認識するまで 5'-UTR 上を 5'から 3'方向にスキヤニングし、開始コドンからタンパク質合成を開始するとされている (Kozak, 2002) (図 2)。40S リボソームサブユニットのキャップ構造へのリクルートは、キャップ結合翻訳開始複合体 eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) により仲介されている。高温ストレスに曝された細胞では、翻訳開始過程に関与する翻訳開始因子の修飾状態の変化に伴い、この eIF4F の複合体形成や活性が阻害され、結果としてキャップ依存的な翻訳が阻害されると考えられている (Schneider, 2000; Raught et al., 2000)。一方で、*Hsp* mRNA の翻訳開始機構は大部分の mRNA とは異なり、キャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しないあるいは依存してもその程度が弱いために、キャップ依存的な翻訳が阻害される高温ストレス下においても効率的に翻訳されると考えられている (Panniers, 1994; Duncan, 1996)。こうした仮説の背景には、例えば、eIF4F 複合体の構成因子の一つであるキャップ結合因子 eIF4E の発現をアンチセンス RNA により抑制すると、通常の mRNA の翻訳は抑制されるにも関わらず、*Hsp* mRNA の翻訳は抑制されないという HeLa 細胞の結果などがある (Joshi-Barve et al., 1992)。このキャップ非依存的な翻訳開始を説明するモデルとしては、5'-UTR 内に存在する IRES (internal ribosome entry site) を介した翻訳開始機構が提唱されている。IRES は、キャップ構造非依存的にリボソームを 5'-UTR の内部にリクルート可能な RNA 配列因子であり、ウイルスで初めて発見されたが、その後真核細胞の mRNA にも存在することが見出された (Elroy-Stein and Merrick, 2007) (図 2)。真核細胞の mRNA の約 3% が IRES を保持しているという報

告もある(Holcik and Sonenberg, 2005)。高温ストレスを含め、低酸素ストレス、ウイルス感染、アポトーシス時など、通常のキャップ依存的な翻訳が阻害される状況における一部遺伝子の翻訳の維持あるいは活性化に、こうした 5'-UTR 内の IRES が重要な役割を果たしていると考えられている(Elroy-Stein and Merrick, 2007; Holcik and Sonenberg, 2005)。

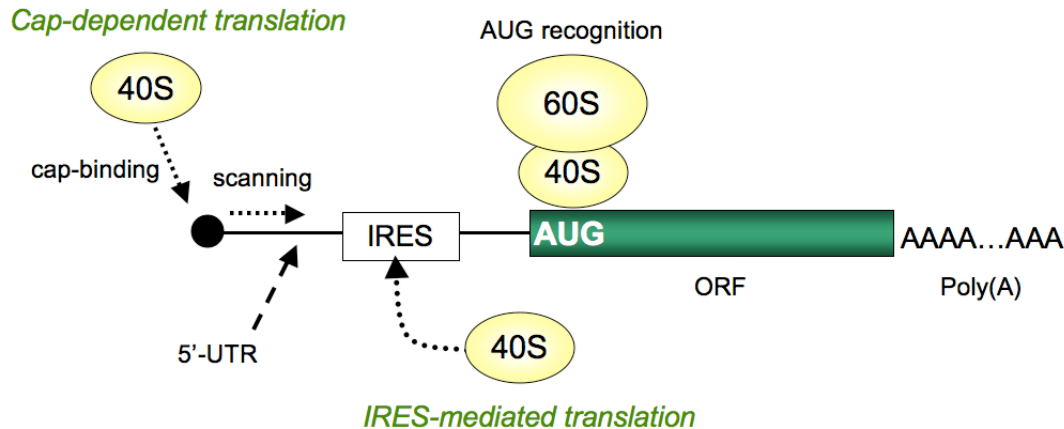


図 2 キャップ依存的な翻訳開始機構と IRES を介した翻訳開始機構

キャップ依存的な翻訳開始機構においては、40S リボソームサブユニットが mRNA の 5' 端のキャップ構造にリクルートされた後 (*cap-binding*)、5'-UTR 上を AUG コドンまでスキヤニングし (*scanning*)、AUG コドンにおける 60S リボソームサブユニットとの複合体形成を経て (*AUG recognition*)、タンパク質合成が開始される。一方、IRES を介した翻訳開始機構においては、40S リボソームサブユニットが、キャップ構造ではなく 5'-UTR 内部 (*IRES*) にリクルートされる。ORF は open reading frame の略である。Poly(A) はポリ A 配列を示す。

植物においても、高温ストレスにより細胞全体の翻訳が抑制されること、その一方で *Hsp* mRNA の翻訳は維持されることが、トマト培養細胞や大豆等で示されている (Key et al., 1981; Nover et al., 1989)。また、トウモロコシ *Hsp70* の 5'-UTR に関しては、高温ストレス下のトウモロコシやタバコプロトプラストにおけるレポーター遺伝子の翻訳抑制の回避に寄与することが報告されている (Pitto et al., 1992)。5'-UTR がストレス環境下における効率的な翻訳に寄与する分子機構に関する報告はほとんどなされていないが、トウモロコシ *Hsp101* の 5'-UTR に関しては、5'-UTR に IRES 様の活性が存在することが報告されている (Dinkova et al., 2005)。この報告においては、IRES 様の活性が *Hsp101* mRNA の高温ストレス下における翻訳に重要であると考察されている (Dinkova et al., 2005)。知る限り、このトウモロコシ *Hsp101* 5'-UTR が、ストレス環境下において機能する事が示唆されている、植物では唯一の IRES である。しかしながら、IRES 様活性を規定するシス配列は未だ同定されていない。加えて、eIF4F の形成を阻害した *in*

vitro 翻訳システムを用いて 5'-UTR における IRES 様活性の有無を評価しているため、その様な系で示された IRES 様の活性が、高温ストレス下の細胞における *Hsp101* mRNA の翻訳に寄与しているかどうかを議論することは難しいと思われる。

本研究では、*Hsp* 5'-UTR が高温ストレス下の植物における効率的な翻訳に寄与する機構に迫ることを目的に、*in vitro* 合成したレポーター mRNA のシロイヌナズナ培養細胞プロトプラストにおける翻訳を指標とした、シロイヌナズナ *Hsp* 5'-UTR の特性解析を行った。シロイヌナズナ *Hsp* としては後述する様に、高温ストレス下においてもポリソーム形成が維持される *Hsp81-3* (*Hsp90* ファミリー)に着目した(Yabe et al., 1994)。*Hsp81-3* 5'-UTR は、高温ストレス下においても効率的に 5'端にリボソームをリクルートすることにより、全体的に翻訳が抑制される状況における効率的な翻訳に寄与している可能性が、本研究の結果から示唆された。

I-II. 方法と材料

I-II-I. 使用植物の生育条件および高温ストレス処理

シロイヌナズナ懸濁培養細胞(*Arabidopsis thaliana* T87) (Axelos et al. 1992)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。培養には改変 LS 培地(Nagata, 1992)を使用した。培養は 22°C、18 時間明期/6 時間暗期、攪拌速度 120 rpm の条件で行った。一週間ごとに定常期に達した細胞 4 mL を新しい培地 95 mL に移植し継代培養を行った。後述するポリソーム解析には、8 mL を継代後、3-4 日間培養した細胞を使用した。

懸濁培養細胞の高温ストレス処理には水浴を用いた。高温ストレス処理後、吸引濾過により培地を除き、液体窒素中で凍結させ、-80°C にて保存した。未処理の細胞(以降、通常細胞と称する)は、水浴の温度が 22°C である以外は、高温ストレス処理した細胞と同様に扱った。

I-II-II. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

ショ糖密度勾配遠心を利用したポリソーム分画は、若干の変更を加えた以外は、基本的に Davies らの方法に従って行った(Davies and Abe, 1995)。通常細胞もしくは高温ストレス処理した細胞約 300 mg を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素中で細かく破碎した後、破碎粉末に 1.5 mL の buffer U (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 100 µg/mL heparin, 2% polyoxyethylene 10-tridecyl ether [PTE], and 1% sodium deoxycholate [DOC])を加え、緩やかに懸濁した。ポリソーム複合体を解離させる EDTA 実験の場合には、buffer U に 25 mM の EDTA を加えた。遠心(15,000 x g, 10 min, 4°C)により細胞残さを除いた後、buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 25 mM KCl, and 10 mM MgCl₂)により調製した 15-60% ショ糖密度勾配 4.5 mL 上に上清を重層し、超遠心を行った(SW55Ti rotor, 55,000 rpm, 50 min, 4°C, brake-off) (Beckman Coulter)。ペリスタポンプ (Minipuls 3; Gilson)に連結したマイクロピペット(40 µL Calibrated Pipet; Drummond)をショ糖密度勾配の上部から挿入し、下部からショ糖密度勾配液を約 1 mL/min の速さで吸引すると同時に、Monitor UV-1 (GE Healthcare)を用いて 254 nm の吸光度を記録した。

I-II-III. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出 (15 フラクション)

ショ糖密度勾配液約 350 µL ずつを、キャップ構造、ポリ A 配列を有する *in vitro* 合成 *Renilla luciferase* (r-luc) mRNA 5 ng および終濃度 5.1 M になるように 8M グアニジン塩酸塩を予め加えておいたチューブ 15 本に回収

した。合成 r-luc mRNA は、RNA 抽出の成否を RT-PCR 法により確認する目的に使用した。混合液と等量のエタノールを加え、-20°C にて一晩冷却した後、遠心操作を行った(20,000 x g, 45 min, 4°C)。得られたペレットは 80% エタノールにて一度洗浄した後、TE buffer にて溶解した。その後の RNA 精製には TRIzol LS (Invitrogen)を付属のプロトコールに従って用いた(多糖類を除くために high salt precipitation solution をオプションとして使用)。すべての画分の RNA をそれぞれ 30 µL の DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) 処理水にて溶解した。精製した RNA の品質は、1.5%変性ゲル電気泳動後、EtBr 染色により検定した。

I-II-IV. RT-PCR

15 の画分から抽出した RNA 溶液を、等容量ずつ用いて逆転写反応を行った。逆転写反応には、oligo dT プライマーと Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Perkin Elmer)を用い、反応系は 10-20 µL とした。PCR 反応による特異的な cDNA 産物の増幅は、10 倍希釈した逆転写反応液 2-5 µL を鋳型とし、遺伝子特異的なプライマー(表 1)及び rTaq DNA polymerase (TOYOBO)を用いて行った(反応系は 20 µL)。増幅産物は、アガロース電気泳動及び EtBr 染色により可視化した。PCR のサイクル数は PCR 産物の指数増加期内に設定した。フラクション間で、RNA の回収率及び RT-PCR 反応効率に顕著な違いが認められないことは、r-luc 特異的なプライマー(表 1)を用いた PCR 反応により確認した(data not shown)。

Target gene	Primer sequences (5' to 3')
Actin 2	ATGGCTGAGGCTGATGATAT TTAGAAACATTTTCTGTGAACGATTC
RPS18C	CAGGCAGAAGGATTACAAAGATGG CGAAAAGCGTCACACAAAAAGG
Hsp81-3	AGAAGGTTATCGTCTCTGACCGTG TAGTTCCAAAATATTAGTTCAAACG
R-LUC	GAACAAAGGAAACGGATGATAACTG GATTTGCCTGATTTGCCCATAC

表 1 標的遺伝子と使用したプライマーセットの配列

I-II-V. プラスミド構築

Firefly luciferase (f-luc)及び r-luc のコーディング領域の増幅は、pR-EI-F ベクター(Matsuo et al., 2004)を鋳型にした PCR 反応により行った。f-luc 用、r-luc 用どちらの forward プライマーも開始コドン ATG の上流に下記の制限酵素サイト及び T3 プロモーター用の配列を持つように設計した。

5' GCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGTCTAGAGGATCCATG ··· 3'

*Bss*HII T3 promoter *Xba*I *Bam*HI

f-luc 用、r-luc 用どちらの backward プライマーも終止コドンの下流に下記

の制限酵素配列を持つように設計した。

5' GCGCGCATCGATGAATTCACTAGTTTA . . . 3'

*Bss*HIII *Ban*III *Eco*RI *Spe*I

それぞれの PCR 産物を pBluescript II SK(-) (Stratagene)の *Bss*HIII/*Bss*HIII サイトに挿入し、T3 プロモーター配列を持つ *in vitro* 合成用鋳型プラスミド pT3-FL (f-luc mRNA 用)と pT3-RL (r-luc mRNA 用)を得た。3'末端にポリ A 配列を持つ mRNA を合成するためのプラスミドは、下記の合成オリゴヌクレオチド

5' AATTCAAATATTAT 3'

*Eco*RI

*Ssp*I *Ban*III

5' CGATAATATTTG 3'

*Ban*III *Ssp*I

*Eco*RI

をアニーリングさせた二本鎖断片を pT3-FL、pT3-RL の *Eco*RI/*Ban*III サイトに挿入することで作製した(それぞれ pT3-FL-pA、pT3-RL-pA)。Ribosomal protein S18C (RPS18C)の 5'-UTR の部分配列(Van Lijsebettens et al., 1994)、Crucifer-infecting tobamovirus のサブゲノム RNA の 5'-UTR (IRES^{CP}) (Ivanov et al., 1997)、*Hsp81-3* 5'-UTR (Yabe et al., 1994)、Actin2 (Act2)の 5'-UTR (An et al., 1996)、欠失や変異を導入した *Hsp81-3* 5'-UTR、upstream AUG 配列を挿入した *Hsp81-3* 5'-UTR の配列は、5'端に *Xba*I サイト、3'端に *Bam*HI サイトを持つように設計した上で、PCR 増幅断片もしくは合成オリゴヌクレオチドとして調製し、pT3-FL-pA、pT3-RL-pA あるいは pT3-FL の *Xba*I/*Bam*HI サイトに挿入した。結果として、様々な種類の 5'-UTR 配列が連結された *in vitro* 転写用モノシストロニックプラスミドを得た。

Hsp81-3 3'-UTR の配列には、真野が 3'RACE 法により決定した、シロイヌナズナ培養細胞における内在性 *Hsp81-3* mRNA のポリ A 部位のうち最も頻度が高かった部位から終止コドンまでの 124 塩基を使用した(Mano, 2006)。*Hsp81-3* 3'-UTR 断片は、シロイヌナズナ培養細胞 T87 から調製したゲノムを鋳型にした、5'端に *Spe*I サイト、3'端に *Eco*RI サイトを持つ様に設計したプライマーを用いた PCR 反応により増幅させた。増幅断片は、*Hsp81-3* 5'-UTR あるいは *RPS18C* 5'-UTR が挿入された pT3-FL-pA の *Spe*I/*Eco*RI サイトにそれぞれ挿入した。

バイシストロニックプラスミドとしては、pR-EI-F ベクター(Matsuo et al., 2004)の *Bgl*II/*Avr*II サイト間を *Xba*I/*Bam*HI サイトを含む配列で置換した pR-XB-F プラスミドを用いた。第一シストロンである r-luc と第二シストロンである f-luc の間への 5'-UTR の挿入は、*Xba*I/*Bam*HI サイトを利用して行った。

バイシストロニック mRNA *in vitro* 転写用プラスミドを作製するために、pR-XB-F ベクターを鋳型に、以下のプライマーを用いた PCR により r-luc

の開始コドンから f-luc の終止コドンまでの領域の増幅を行った。

5' GCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGATGACTTCGAAAGTTTATGA 3'
BssHII T3 promoter r-luc

5' GCGCGCATCGATGAATTCAGTTTACACGGCGATCTTTCCGC 3'
BssHII BanIII EcoRI SpeI f-luc

PCR 産物を pBluescript II SK(-) (Stratagene) の BssHII/BssHII サイトに挿入した後、XbaI/BanIII サイト間を、pT3-FL-pA あるいは Hsp81-3 5'-UTR、RPS18C 5'-UTR もしくは IRES^{CP} を持つ pT3-FL-pA の XbaI/BanIII 断片にてそれぞれ置換した(それぞれ pT3-RL-Δ-FL-pA, pT3-RL-S18-FL-pA, pT3-RL-IRES^{CP}-FL-pA, pT3-RL-Hsp-FL-pA)。

5'-UTR あるいは 3'-UTR の配列はすべてシーケンスにより正しいことを確認した。

I-II-VI. *In vitro* 転写

ポリ A 配列を持つ *in vitro* 転写用モノシストロニックプラスミド (pT3-FL-pA, pT3-RL-pA 及びこれらに UTR が付加されたプラスミド) 及び *in vitro* 転写用バイシストロニックプラスミド (pT3-RL-Δ-FL-pA など) は、*in vitro* 転写反応に先立ち、SspI によりポリ A 配列の末端部分を切断し直鎖状にした。従って、合成される mRNA の 3' 末端には 49 塩基のアデニン残基 (ポリ A 配列) に続いてチミン残基が 1 塩基付加されることになる。ポリ A 配列を持たない pT3-FL は、EcoRI にて処理することにより直鎖状にした。キャップ構造 (m⁷GpppG) を持つ mRNA の合成には、mMESSAGE mMACHINE T3 transcription kit (Ambion) を、キャップ構造を持たない mRNA の合成には、Megascript T3 transcription kit (Ambion) を用いた。それぞれキットに添付されたプロトコールに従った。合成された RNA はキットに付属の DNaseI で処理した。合成された RNA の精製は LiCl 沈殿及びエタノール沈殿により行い、付属の RNase-free 水で溶解した。RNA 濃度は分光光度計を用いて測定した。RNA の品質は 1.5% 変性アガロースゲル電気泳動により検定した。

I-II-VII. シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラスト調製

シロイヌナズナ培養細胞 T87 からのプロトプラスト調製は、佐藤らの方法に若干の変更を加えて行った (Sato et al., 2004)。培養細胞を 0.4 M マンニトールで洗浄した後、酵素液 (0.4 M Mannitol, 10% Cellulase RS [Yakult Honsha], 0.1% Pectolyase [Kikkoman], pH 5.5) を加え、25°C にて 1-2 時間緩やかに攪拌した。40 μm ナイロンメッシュ (Cell Strainer; BD Falcon) で濾過した後、遠心 (150 x g, 3 min) を行い、上清を回収した。回収した上清に 0.4 M マンニトールを加え、再度遠心 (40 x g, 5 min) することによりプロトプラストを得た。更に、0.4 M マンニトールで洗浄した後、プロトプラス

トを W5 溶液(154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM Mes-KOH, pH 5.6)に再懸濁し、水中に 30 分間静置した。細胞数の計測は血球計算版を用いて行った。再度遠心操作によりプロトプラストを回収し、細胞濃度が 1×10^4 cell/ μ L になるように MMg 溶液(0.4 M mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM Mes-KOH, pH 5.7)に懸濁した。

I-II-VIII. プロトプラストへのバイシストロニックプラスミド及び mRNA の導入

プラスミド及び mRNA のプロトプラストへの導入は、基本的に Kovtun の polyethylen glycol (PEG)を用いた方法に従った(Kovtun et al., 2000)。典型的には、導入するバイシストロニックプラスミド、あるいは mRNA(10 μ L 前後)に 1×10^4 cell/ μ L のプロトプラストを加えた後、混合液と等量の PEG 溶液(40% PEG 4000, 0.2 M Mannitol, 0.1 M Ca(NO₃)₂) (He et al., 2006)を加えてゆっくりと混和した。バイシストロニックプラスミド導入時は 20 分間、mRNA 導入時は 5 分間室温にて静置した。W5 溶液を加えてゆっくり混和した後、遠心操作により回収した細胞を protoplast-medium (Dansako et al., 2003)により再懸濁した。再懸濁した細胞は、試験温度に一定時間静置した後、超小型遠心器を用いた遠心操作を行い、上清を除いた。その後、液体窒素で凍結して-80°Cにて保存した。プロトプラストへのプラスミドあるいは mRNA 導入実験はすべて、3 回以上繰り返した。

I-II-IX. ルシフェラーゼ酵素活性測定

細胞の溶解は、 5×10^5 個のプロトプラスト当たり 50-100 μ L の passive lysis buffer (Promega)を用いて行った。溶解液中の f-luc、r-luc 活性測定には、Dual-luciferase reporter assay system (Promega)とルミノメータ (Lumat LB 9501; Berthold)を付属のプロトコールに従って使用した。r-luc 活性、f-luc 活性は、relative light unit (RLU)/ μ g protein として定義した。タンパク質濃度の定量は、bovine serum albumin (BSA)を標準とした Bradford 法により決定した(Bradford, 1976)。

I-III. 結果

I-III-1. 高温域においても *Hsp81-3* mRNA はポリソームを形成している

高温ストレスに曝された植物では、ポリソームを形成した mRNA、つまり活発に翻訳されていると考えられる mRNA が迅速に減少し、細胞の翻訳活性が全体的に減少することが、大豆の胚軸、トマト培養細胞等で報告されている (Key et al., 1981; Stuger et al., 1999; Apuya and Zimmerman, 1992)。シロイヌナズナ培養細胞 T87 においても、高温ストレス処理によるポリソームの解離が認められることを、mRNA をリボソームの結合数に応じて分離するポリソーム解析により確認した (図 3)。通常条件 (22°C) で培養した通常細胞及び高温ストレス処理した細胞から調製した細胞抽出液を、ショ糖密度勾配遠心 (15-60%) により分画したところ、32°C 10 分間のストレス処理により通常細胞の場合と比較してポリソーム画分が減少すると共に非ポリソーム画分が増大していることが、RNA 量の指標としての 254 nm の吸光度プロファイルから示された (図 3A)。37°C 10 分間の処理を行った場合には、更に顕著な傾向が観察されたが、処理時間を 30 分間と長くしてもそれ以上の効果は特に認められなかった (図 3A)。リボソーム複合体を解離させることが知られている EDTA (Calzone et al., 1982) を、通常細胞の抽出液調製時に加えた場合にも、ポリソーム画分の減少及び非ポリソーム画分が増大が認められた (図 3A)。この結果は、吸光プロファイルの分布が確かにリボソームの分布を反映していることを示している。また、リボソームの構成因子である 28S rRNA、18S rRNA のショ糖密度勾配液における分布が、吸光プロファイルの挙動を反映していることも、遠心後のショ糖密度勾配液を分画しそれぞれの画分から RNA を回収することにより確認された (図 3B)。更に、ハウスキーピング遺伝子である Actin2 (Act2) 及び 18S ribosomal protein (RPS18C) mRNA のショ糖密度勾配液における分布 (ポリソームプロファイル) を RT-PCR 法により調べたところ、吸光プロファイルの結果が示す全体の傾向と同様に、高温ストレス処理 (37°C 30 分間) により mRNA の分布がポリソーム画分から非ポリソーム画分に著しく移行していた (図 3C)。これら mRNA の通常細胞における分布の非ポリソーム画分への移行は、EDTA 処理によっても認められた (data not shown)。これらの結果は、シロイヌナズナ培養細胞においても、高温ストレスによるポリソーム形成の阻害が起こり、細胞全体としての翻訳活性が抑制されていることを示唆している。

生物種を問わず、ある種の *Hsp* mRNA の翻訳は高温ストレス下においても維持されていることに鑑みて、シロイヌナズナ *Hsp* mRNA も高温ストレス処理した細胞において翻訳が維持、つまりポリソーム形成が維持されていることが期待される。そこで本研究では、通常温度においても発現している、*Hsp90* ファミリーに属する *Hsp81-3* mRNA のポリソームプロファイルを調

べた。その結果、ポリソームが著しく解離し、*Act2*や *RPS18C* mRNA の分布が非ポリソーム側に移行する高温ストレス下(37°C/30 分)においても、大部分の *Hsp81-3* mRNA はポリソーム画分に留まっていた(図 3C)。この結果は、細胞全体としては翻訳が抑制される高温ストレス下においても、*Hsp81-3* mRNA の翻訳は維持されていることを示唆している。

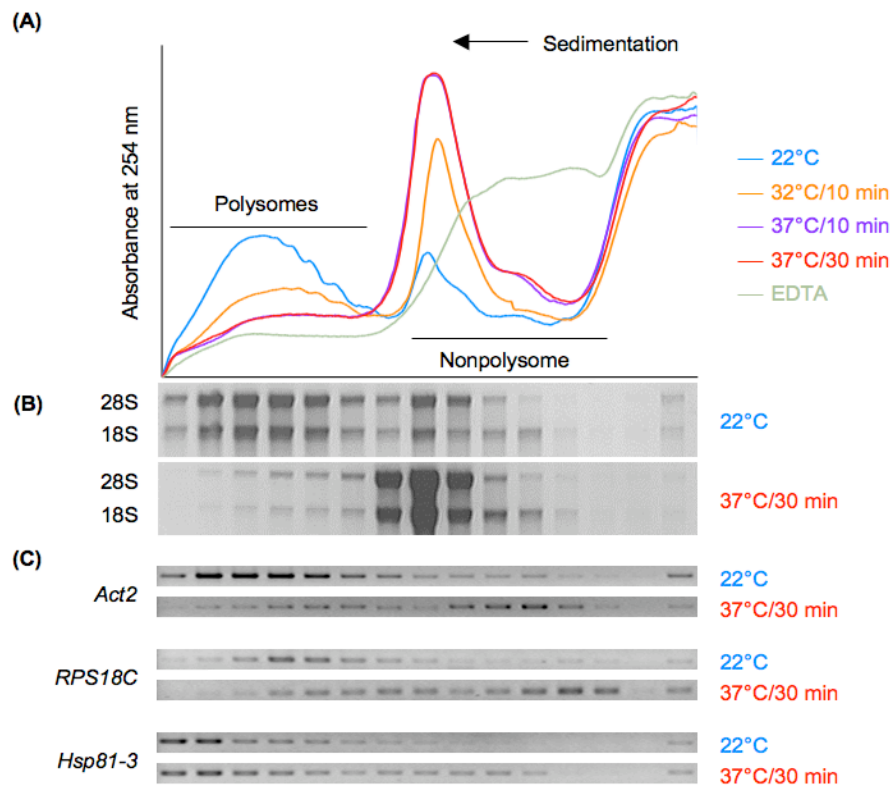


図 3 ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム分画

(A)通常細胞(22°C)及び高温ストレス処理した細胞(32°C/10 min, 37°C/10 min, 37°C/30 min)から調製した細胞抽出液、及び通常細胞から EDTA を添加して調製した細胞抽出液(EDTA)を、ショ糖密度勾配遠心法(15-60%)により分画した後、254 nm の吸光プロファイルを記録した。ポリソーム画分及び非ポリソーム画分を図中に示した。沈降方向は右から左である。(B,C)通常細胞及び 37°C/30 min の高温ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配液を 15 の画分に分けて回収し、各画分から RNA を抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。(B)抽出した RNA 溶液を等容量ずつ変性ゲル電気泳動に供し、EtBr 染色を行った。28S、18S rRNA の位置を図に示した。(C)抽出した RNA を等容量ずつ RT-PCR 解析に供し(サイクル数は各画分で同じ)、それぞれの画分に存在する *Act2*、*RPS18C*、*Hsp81-3* mRNA を検出した。

I-III-II. *Hsp81-3* 5'-UTR はキャップ構造、ポリ A 配列を有する mRNA の高温域における効率的な翻訳に寄与する

Hsp81-3 5'-UTR の高温ストレス下における翻訳への寄与を検証するため、試験する 5'-UTR を付加した *in vitro* 合成レポーター mRNA をプロトプラストに導入し、高温ストレス下における mRNA からの発現を評価する一過性発現実験を行った(図 4)。

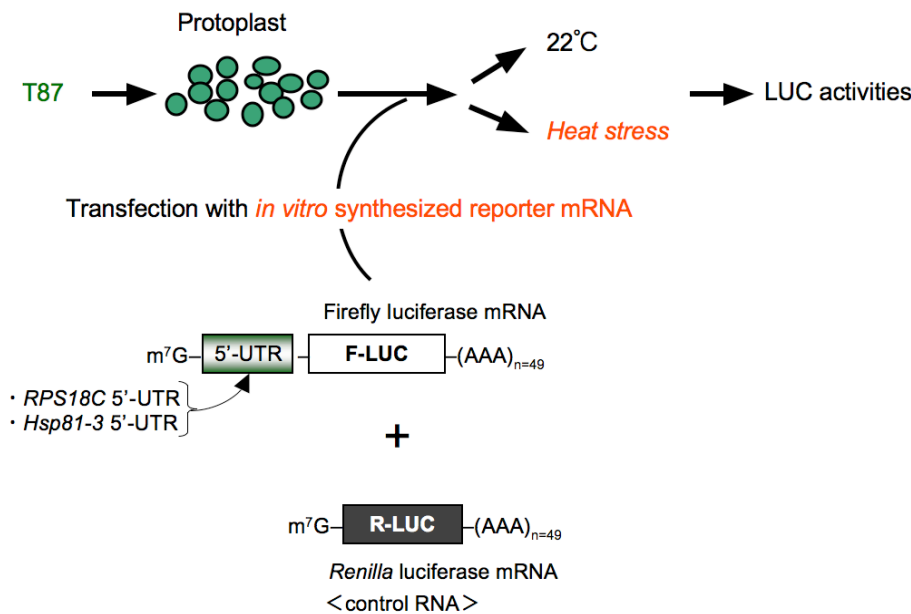


図 4 プロトプラスト一過性発現実験の枠組み

シロイヌナズナ培養細胞 T87 から調製したプロトプラストに *in vitro* 合成した firefly luciferase mRNA (f-luc mRNA) と *Renilla* luciferase mRNA (r-luc mRNA) を PEG 法により導入した後、分割したプロトプラストをそれぞれ通常温度(22°C)もしくは高温ストレス下(Heat stress)に一定時間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 及び r-luc 活性を測定した。ここで示した f-luc あるいは r-luc mRNA の構築は一例である。

Hsp81-3 5'-UTR あるいは *RPS18C* 5'-UTR の一部領域を連結した、キャップ構造、ポリ A 配列を有する合成 firefly luciferase (f-luc) mRNA (+cap_f-luc_pA mRNA) を、コントロール RNA であるキャップ構造、ポリ A 配列を有する *Renilla* luciferase (r-luc) mRNA (+cap_r-luc_pA mRNA) とプロトプラストに共導入し、通常条件及び高温ストレス条件下に 22 分間静置後、発現量の指標としてレポーター活性値を測定した(図 4 and 図 5A)。図 5B-a に示す様に、35°C、37°C にプロトプラストを静置することにより、*RPS18C* 5'-UTR を有する mRNA からの発現量(f-luc 活性値)は、22°C に比べてそれぞれ 50%、16%に減少した。*Act2* の 5'-UTR を連結した場合にも、同様の活性値の減少が認められた(data not shown)。一方で、*Hsp81-3* 5'-UTR を有する mRNA からの発現量は、35°C、37°C においても減少せず

逆に約 4 倍に増大した。+cap_r-luc_pA mRNA からの発現量(r-luc 活性値)は、共導入した+cap_f-luc_pA mRNA の種類に関わらず、高温域において同様な減少を示し、独立に処理したプロトプラスト間で高温ストレスの影響は同様であった(図 5B-b)。また、37°C に 22 分間プロトプラストを静置したことによる f-luc タンパク質の活性そのものや安定性への影響は認められなかったため、上記活性値の変化は発現量の変化を反映していると考えられる(data not shown)。以上の結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR が、高温ストレス下における合成 mRNA からの発現の抑制の回避及び効率的な発現に寄与することを示している。

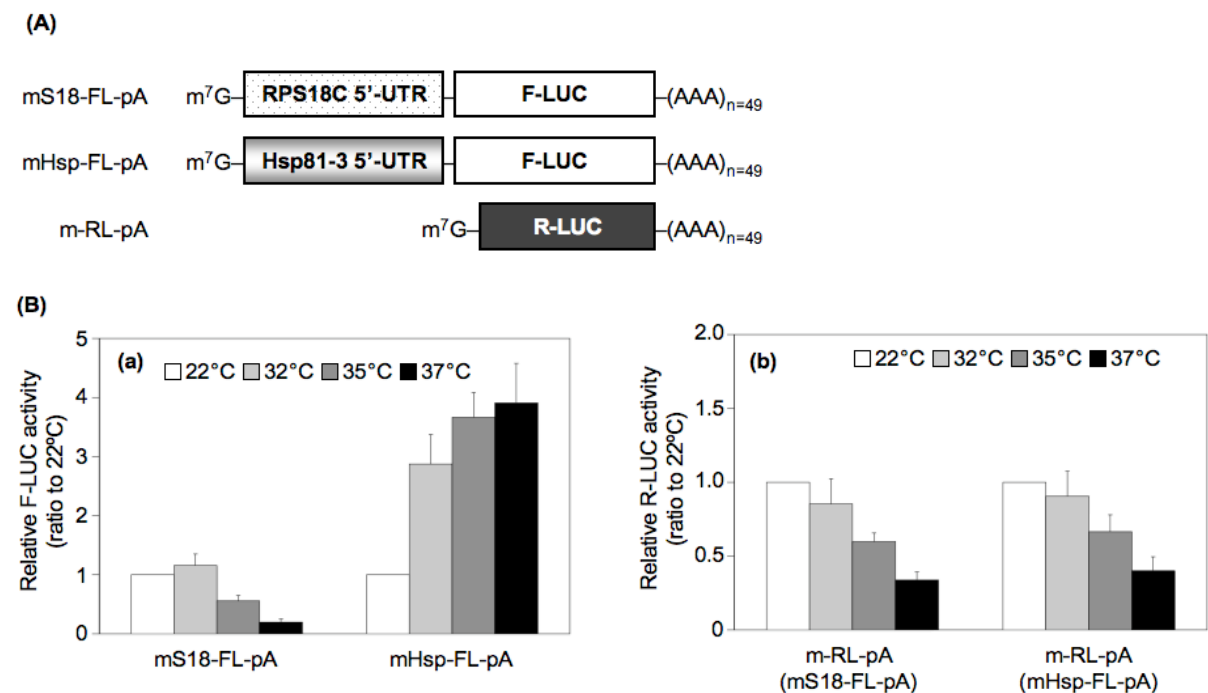


図 5 高温ストレス下のプロトプラストにおいて *Hsp81-3* 5'-UTR がキャップ構造を有する mRNA からの発現に与える影響

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す。”n=49”はポリ A 配列の長さを、m⁷G はキャップ構造を示す。それぞれの+cap_f-luc_pA mRNA (mS18-FL-pA, mHsp-FL-pA)は、コントロールである+cap_r-luc mRNA (m-RL-pA)とプロトプラストに共導入した。(B) mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを図示した各温度に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 及び r-luc 活性を測定した。各構築の 22°C における f-luc 活性値(a)、もしくは r-luc 活性値(b) (括弧内は共導入した+cap_f-luc_pA mRNA の種類を示す)を 1 とした相対活性値を示した。

上記実験からは、*Hsp81-3* 5'-UTR が、レポーター mRNA の翻訳効率、安定性あるいはその両方に影響している可能性が考えられる。そこで、5'-UTR が翻訳効率に与える影響を直接比較するために、レポーター活性の経時測定

を行った。この解析では、レポーター活性が直線的に増加する区間の増加率が翻訳効率を反映し、レポーター活性の増加が停止するまでの時間が mRNA の機能的安定性を反映すると仮定される (Gallie, 1991; Chiu et al., 2005)。合成 mRNA をプロトプラストに導入後、経時的にプロトプラストを回収し、レポーター活性を測定したところ、*RPS18C*、*Hsp81-3* 5'-UTR いずれを +cap_f-luc_pA mRNA に連結した場合にも、プロトプラスト静置後 20 分から 80 分の間は、ほぼ直線的に f-luc 活性値が増加していた (図 6A,B-a,b)。コントロールである r-luc 活性値も共導入した +cap_f-luc_pA mRNA の種類に関わらず、同様に直線的に増加していた (図 6B-c,d)。20 分から 60 分間の活性値の増加率を算出したところ、*RPS18C* 5'-UTR の場合には 37°C における減少が認められたが、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合には、減少せず逆に増加する結果となった (図 6C-a)。r-luc 活性値の増加率は、共導入した +cap_f-luc_pA mRNA の種類に関わらず同様に 37°C において減少した (図 6C-b)。これらの結果は、図 5 に示した静置後 22 分における活性測定の結果と同様であることから、活性値が直線的に増加している間の mRNA の分解の影響は小さいと考えられる。以上の結果から、*Hsp81-3* 5'-UTR がレポーター mRNA の高温ストレス下における効率的な翻訳に寄与していることが示された。

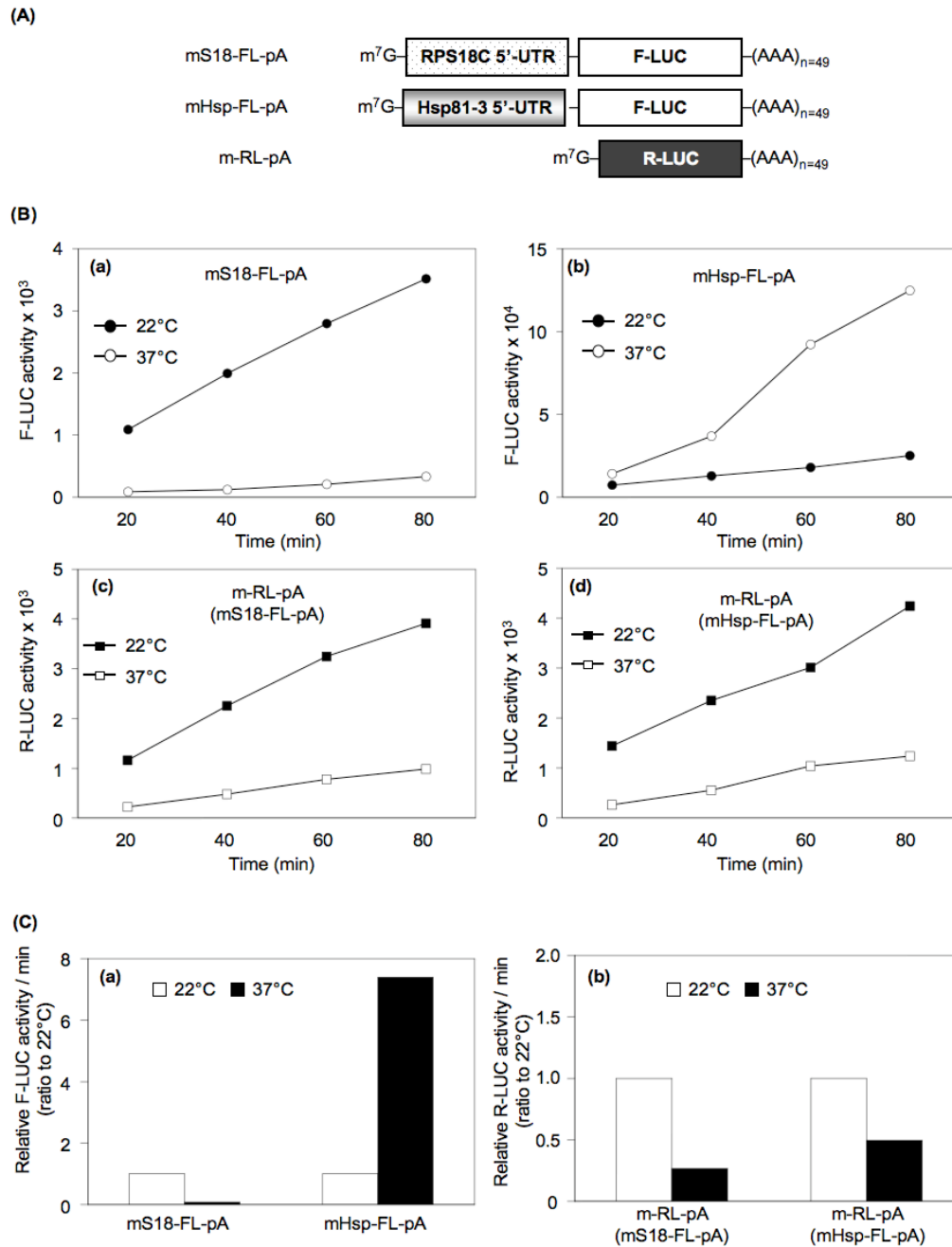


図 6 レポーター活性の経時測定

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す。“n=49”はポリ A 配列の長さを、 m^7G はキャップ構造を示す。それぞれの+cap_f-luc_pA mRNA (mS18-FL-pA, mHsp-FL-pA)は、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNA (m-RL-pA)とプロトプラストに共導入した。(B) mRNA を導入したプロトプラストを分割し、それぞれ 22°C もしくは 37°C に静置した。図示した時間ごとにプロトプラストを回収し、f-luc および r-luc 活性を測定した。(B-a,b) 20-80 分の間の f-luc 活性値の経時変化を示す。(B-c,d) 20-80 分の間の r-luc 活性値の経時変化を示す。括弧内は共導入した+cap_f-luc_pA mRNA の種類を示す。(C) 20-60 分の間の f-luc 活性値(a)、r-luc 活性値(b)の増加率を、各構築の 22°C における増加率を 1 として相対表示した。

続いて、*Hsp81-3* 5'-UTR の翻訳への効果が、f-luc 特異的な効果であるかを調べるために、レポーター遺伝子を f-luc から r-luc に取り替えて同様の一過性発現実験を行った(図 7A)。f-luc の場合と同様、*RPS18C* 5'-UTR を連結した+cap_r-luc_pA mRNA からの発現量は 37°C において減少するのに対し、*Hsp81-3* 5'-UTR を連結した場合には減少せず、逆に増加した(図 7B-a)。コントロールとして共導入した *RPS18C* 5'-UTR を連結した+cap_f-luc_pA mRNA からの発現量は、+cap_r-luc_pA mRNA の種類に関わらず 37°C において同様に減少した(図 7B-b)。これらの結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR の高温ストレス下における翻訳への寄与は、レポーター遺伝子の種類に依存しないことを示している。

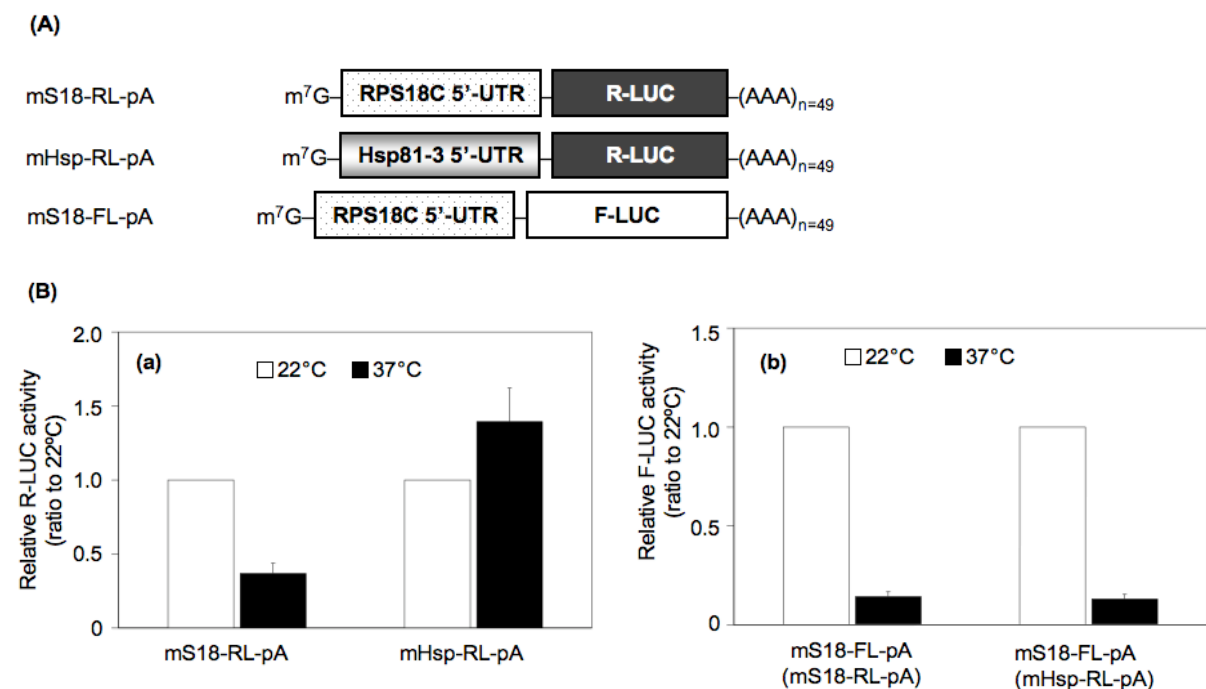


図 7 *Hsp81-3* 5'-UTR が高温域におけるキャップ構造を有する mRNA からの発現に与える影響のレポーター遺伝子依存性

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す。“n=49”はポリ A 配列の長さを、 m^7G はキャップ構造を示す。それぞれの+cap_r-luc_pA mRNA (mS18-RL-pA, mHsp-RL-pA)は、*RPS18C* 5'-UTR を連結した+cap_f-luc_pA mRNA (mS18-FL-pA)とプロトプラストに共導入した。(B) mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 及び r-luc 活性を測定した。各構築の 22°C における r-luc 活性値(a)、もしくは f-luc 活性値(b) (括弧内は共導入した+cap_r-luc_pA mRNA の種類)を 1 とした相対活性値を示した。

I-III-III. *Hsp81-3* 3'-UTR はキャップ構造、ポリ A 配列を有する mRNA からの高温域における効率的な発現に影響しない

これまで報告のある真核生物の *Hsp* mRNA の高温ストレス下における翻訳は、多くの場合、5'-UTR に依存している。一方で、例外として、単細胞の真核生物であるリーシュマニア原虫の *Hsp83* の場合には、3'-UTR に依存していることが示されている(Shapira et al., 2001; Zilka et al., 2001)。そこで、*Hsp81-3* についても、高温ストレス下において、+cap_f-luc_pA mRNA からの発現に 3'-UTR が与える影響の検証を行った。3'-UTR の決定は 3'RACE 法により行った(“材料と方法”を参照)。*RPS18C*、*Hsp81-3* 5'-UTR に加えて、*Hsp81-3* 3'-UTR を連結した合成+cap_f-luc_pA mRNA を用いて、これまでと同様に一過性発現実験を行った(図 8A)。*Hsp81-3* 3'-UTR の有無に関わらず、*RPS18C* 5'-UTR を連結した場合には、高温域における発現量の減少が認められ、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合には、減少が認められず逆に増加した(図 8B-a)。図 8B-b に示すように、コントロールである +cap_r-luc_pA mRNA からの発現量は、共導入した+cap_f-luc_pA mRNA の種類に関わらず同様に、高温域において減少した。以上の結果は、*Hsp81-3* 3'-UTR は、*Hsp81-3* 5'-UTR の有無に関わらず、高温ストレス下におけるキャップ構造、ポリ A を有する mRNA からの発現には、特に影響を及ぼさないことを示している。

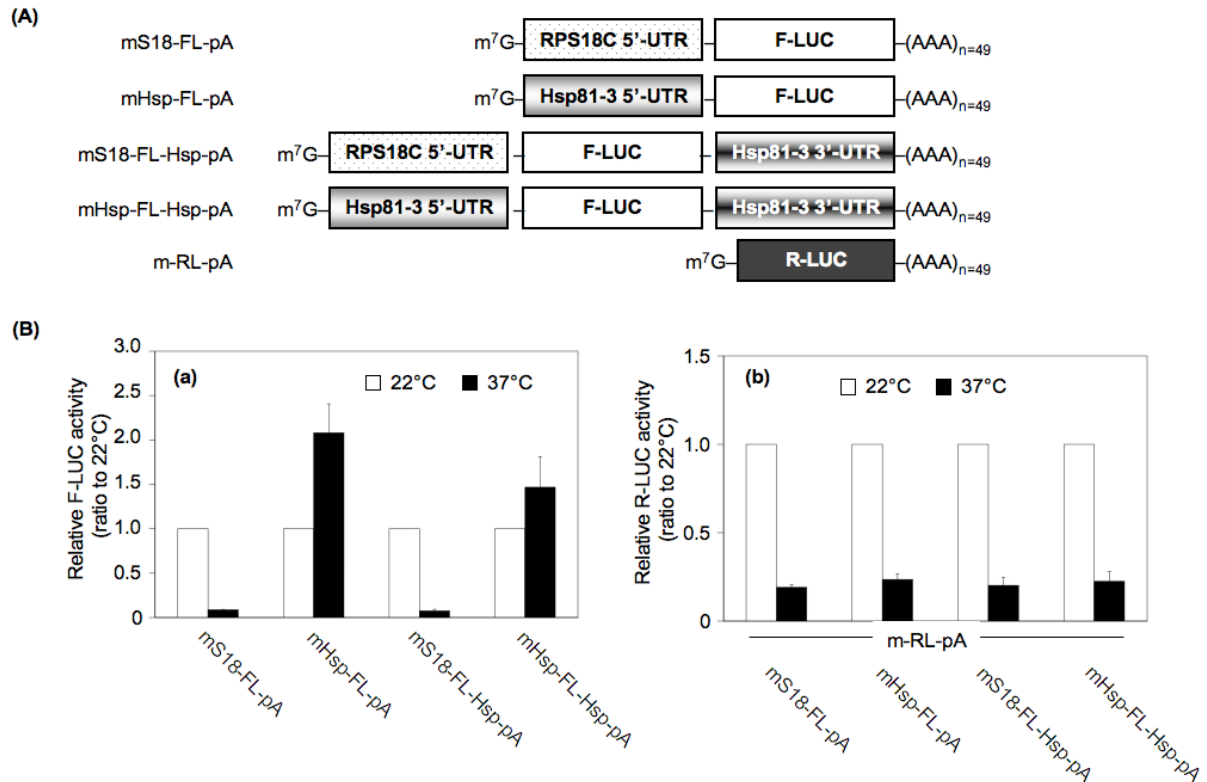


図 8 *Hsp81-3* 3'-UTR がキャップ構造を有する mRNA からの発現に与える影響

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す。"n=49" はポリ A 配列の長さを、 m^7G はキャップ構造を示す。それぞれの +cap_f-luc_pA mRNA (mS18-FL-pA, mHsp-FL-pA, mS18-FL-Hsp-pA, mHsp-FL-Hsp-pA) は、コントロールである +cap_r-luc_pA mRNA (m-RL-pA) とプロトプラストに共導入した。(B) mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 及び r-luc 活性を測定した。各構築の 22°C における f-luc 活性値(a)、もしくは r-luc 活性値(b)を 1 とした相対活性値を示した。(b) の下部には共導入した +cap_f-luc_pA mRNA の種類を示した。

I-III-IV. 高温域におけるキャップ構造を有する mRNA からの効率的な発現への *Hsp81-3* 5'-UTR の寄与はポリ A 配列の有無と無関係である

少数の例外を除いて、真核細胞の核コード mRNA は 3' 末端にポリ A 配列を有しており、翻訳の効率に大きな影響を及ぼしていることが知られている (Sachs, 2000)。5' 端のキャップ構造と 3' 末端のポリ A 配列は、いくつかのタンパク質因子を介して相互作用し、結果的に mRNA はループ上の構造になっていると考えられている (Sachs, 2000)。ポリ A 配列が翻訳に影響する機構については諸説あるが、ループを形成することによりリボソームのリサイクルが容易となり、結果として翻訳効率が增大する可能性も示唆されている (Sachs, 2000; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002)。続いて本研究では、高温域におけるキャップ構造を有する mRNA からの発現への *Hsp81-3* 5'-UTR の寄与が、ポリ A 配列の存在に依存するかを検証した。*RPS18C*、

Hsp81-3 5'-UTR を連結した、キャップ構造を有するがポリ A 配列を持たない合成 mRNA (+cap_f-luc mRNA)を用いて、これまでと同様に一過性発現実験を行った(図 9A)。これまでの結果と同様に、*RPS18C 5'*-UTR を連結した場合には、37°C における発現量の減少が認められたが、*Hsp81-3 5'*-UTR を連結した場合には、減少は認められず逆に増大した。図 9B に示すように、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNA からの発現量は、共導入した+cap_f-luc mRNA の種類に関わらず同様に、37°C において減少した。以上の結果は、高温ストレス下におけるキャップ構造を有する mRNA からの効率的な発現への *Hsp81-3 5'*-UTR の寄与は、ポリ A とは無関係な機構を介してなされていることを示唆している。

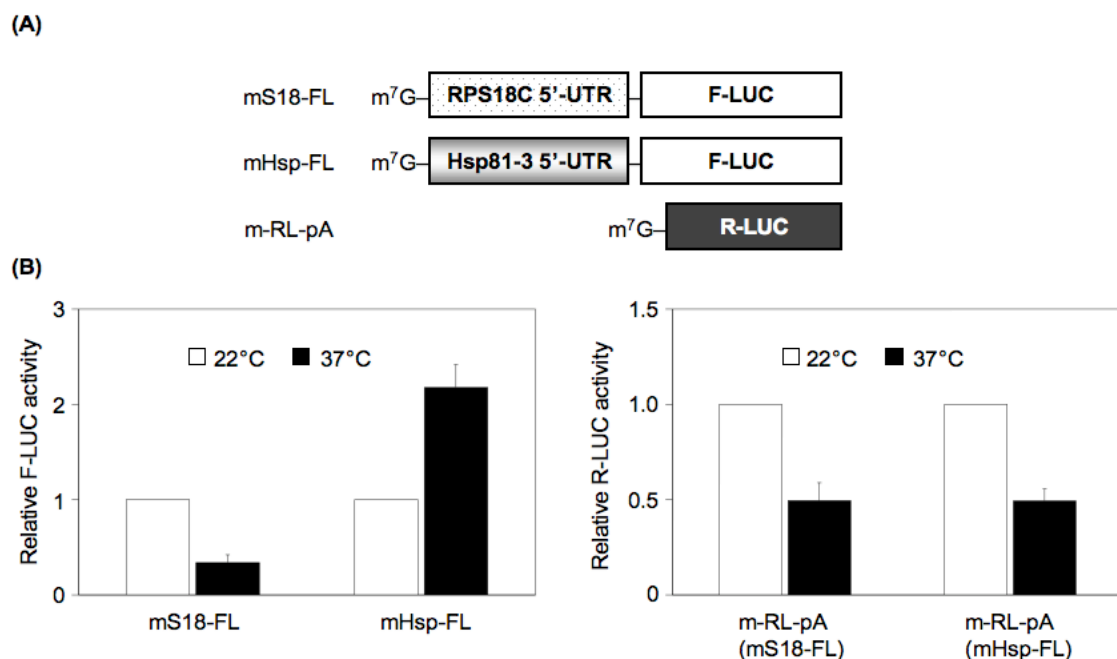


図 9 *Hsp81-3 5'*-UTR がキャップ構造を有するがポリ A 配列を持たない mRNA からの発現に与える影響

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す。それぞれの+cap_f-luc mRNA (mS18-FL, mHsp-FL)は、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNA (m-RL-pA)とプロトプラストに共導入した。(B) mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 及び r-luc 活性を測定した。各構築の 22°C における f-luc 活性値(a)、もしくは r-luc 活性値(b) (括弧内は共導入した+cap_f-luc mRNA の種類を示す)を 1 とした相対活性値を示した。

I-III-V. *Hsp81-3* 5'-UTR の 5'側領域が高温域における効率的な翻訳に重要である

Hsp81-3 5'-UTR に変異を導入する事により、どの領域が高温ストレス下におけるキャップ構造、ポリ A 配列を有するレポーター mRNA (+cap_f-luc_pA mRNA)からの効率的な発現に重要であるかを検証した。全長 113 nt の *Hsp81-3* 5'-UTR を 6 つの領域に分割し、各領域の配列を連続したシトシン配列に *XhoI* サイトが付加された配列で置換することにより、変異導入を行った。その結果、3'側領域(5'端から数えて 48-73, 74-91, 92-113 番目の塩基に相当する領域)に塩基置換を導入した場合には、37°C における発現量が 22°C と同程度となり、*RPS18C* 5'-UTR の場合に見られたような著しい活性値の減少は認められなかった一方で、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合に見られたような活性値の増大も認められなかった(図 10-d,e,f)。これに対し、5'側領域(5'端から数えて 1-11, 12-29, 30-47 番目の塩基に相当する領域)に塩基置換を導入した場合には、37°C における発現量の 22°C に対する著しい減少が認められた(図 10-a,b,c)。これらの結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR の 5'端側領域の重要性を示唆していると考えられたため、続いて、*Hsp81-3* 5'-UTR の 1-47、48-113 番目の塩基をそれぞれ欠失させた構築を用いて同様の一過性発現実験を行った。その結果、5'端側 1-47 塩基を欠失させた場合には、22°C に対する 37°C における発現量が著しく減少したのに対し、3'端側 48-113 塩基を欠失した場合には、37°C における発現量の増大が認められた(図 10-g,h)。つまり、高温域における効率的な発現という観点からすると、5'端側 1-47 番目の塩基領域のみで、全長 *Hsp81-3* 5'-UTR と同様の性質を示した。図 6 と同様にレポーター活性の経時測定を行い、f-luc 活性値が直線的に増加していることを確認した(data not shown)。以上の変異欠失解析の結果から、*Hsp81-3* 5'-UTR の 5'端側の領域が、高温域における効率的な翻訳に特に重要である可能性が示唆された。

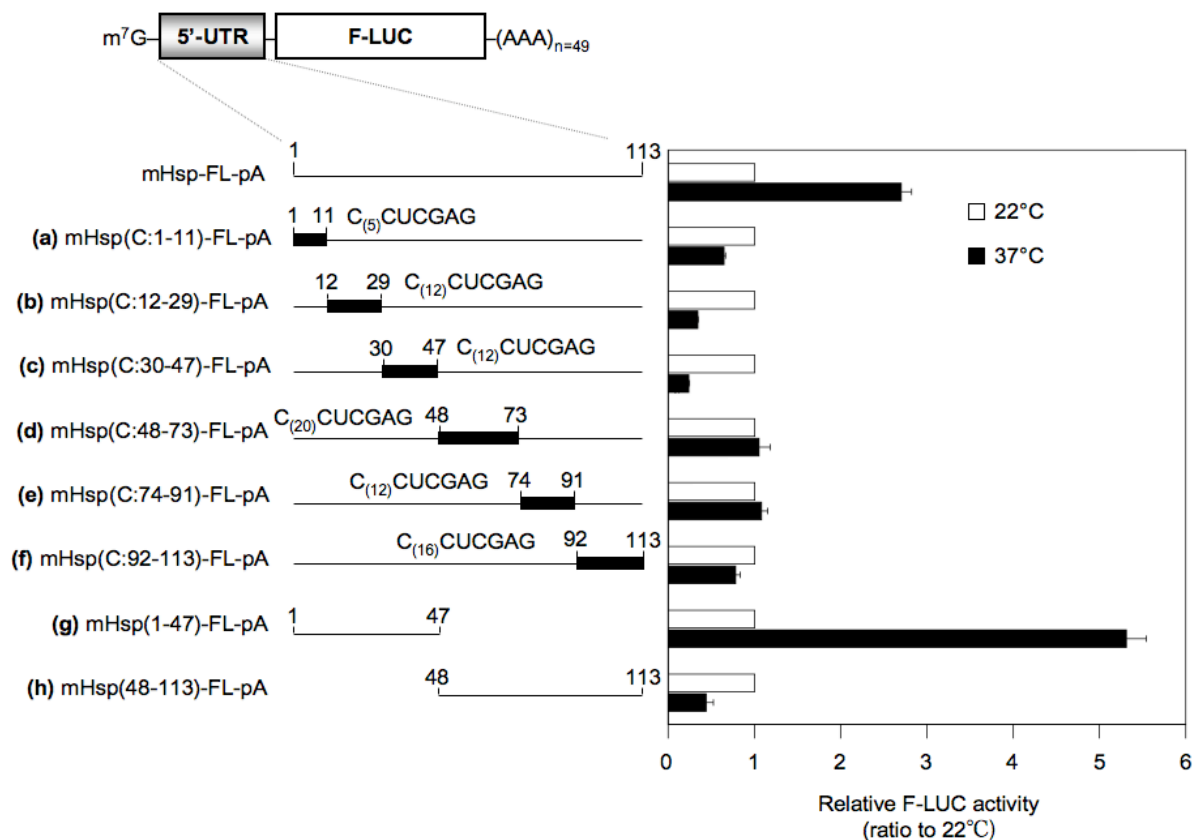


図 10 *Hsp81-3* 5'-UTR への変異導入や欠失が、高温域におけるキャップ構造、ポリ A 配列を有する mRNA からの発現に与える影響

変異・欠失を導入した様々な *Hsp81-3* 5'-UTR を連結した+cap_f-luc_pA を *in vitro* 合成した。“n=49”はポリ A 配列の長さを、m⁷G はキャップ構造を示す。(a-f)置換した領域は黒いバーで置換後の配列と共に示した。下付き括弧内は連続するシトシン残基の数を示している。(g) *Hsp81-3* 5'-UTR の 1-47 番目の塩基領域のみを持つ。(h) *Hsp81-3* 5'-UTR の 48-113 番目の塩基領域のみを持つ。(a-h)図示した各 5'-UTR を付加した+cap_f-luc_pA mRNA は、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNA (図 9 参照)とプロトプラストに共導入した。mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれ 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 活性、r-luc 活性を測定した。各構築の 22°C における f-luc 活性値を 1 とした相対活性値を示した。図 5B-b で示した結果と同様に、22°C に対する 37°C における r-luc 活性値は、共導入した+cap_f-luc_pA mRNA の種類に関わらず、同様の減少を示した(data not shown)。

I-III-VI. *Hsp81-3* 5'-UTR はキャップ構造を持たない mRNA からの翻訳を促進する

高温ストレス下など、キャップ依存的な翻訳が阻害される状況においても翻訳される一部 mRNA は、その翻訳機構がキャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しないあるいは依存してもその程度が弱いために、ストレス環境下においても効率的に翻訳されると考えられている (Panniers, 1994; Duncan, 1996)。*Hsp81-3* 5'-UTR にも同様の機構が備わっている可能性を検証するため、キャップ構造を持たない *in vitro* 合成 mRNA からの発現、つまりキャップ構造と翻訳開始因子複合体 eIF4F との相互作用を介さない発現に 5'-UTR が与える影響の検証を行った。試験する 5'-UTR を連結したキャップ構造を持たない *in vitro* 合成 f-luc mRNA (-cap_f-luc_pA mRNA; ポリ A 配列は有している) を等量ずつ、コントロールである +cap_r-luc_pA mRNA とそれぞれプロトプラストに共導入し、最終的に測定された f-luc 活性値を r-luc 活性値で規格化することにより、5'-UTR が発現量に与える影響を評価した。r-luc による規格化には導入効率や細胞生存率を構築間や実験間で補正する意味がある。試験した 5'-UTR は、*RPS18C* 5'-UTR、*Hsp81-3* 5'-UTR 及び Crucifer-infecting tobamovirus のサブゲノム RNA の 5'-UTR に存在し、シロイヌナズナにおいても機能することが報告されている IRES (IRES^{CP}) (Ivanov et al., 1997) の 3 種類である (図 11A)。IRES^{CP} は IRES 様の活性を有しているため、キャップ構造を持たない mRNA からの高発現に寄与することが期待される。通常温度 (22°C) と高温ストレス下 (37°C) の二条件において検証した。通常温度では、*RPS18C* 5'-UTR に対して、*Hsp81-3* 5'-UTR、IRES^{CP} を介した発現はそれぞれ約 80 倍、20 倍であった (図 11B)。一方、高温ストレス下においては、それぞれ約 150 倍、5 倍であった (図 11C)。図 6 と同様にレポーター活性の経時測定を行い、f-luc 活性値が直線的に増加していることを確認した (data not shown)。これらの結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR には *RPS18C* 5'-UTR や IRES^{CP} と比較して、キャップ構造を持たない mRNA からの翻訳を促進する活性、つまりキャップ非依存的な翻訳を促進する活性が存在し、その促進活性は高温ストレス下でより顕著であることを示している。

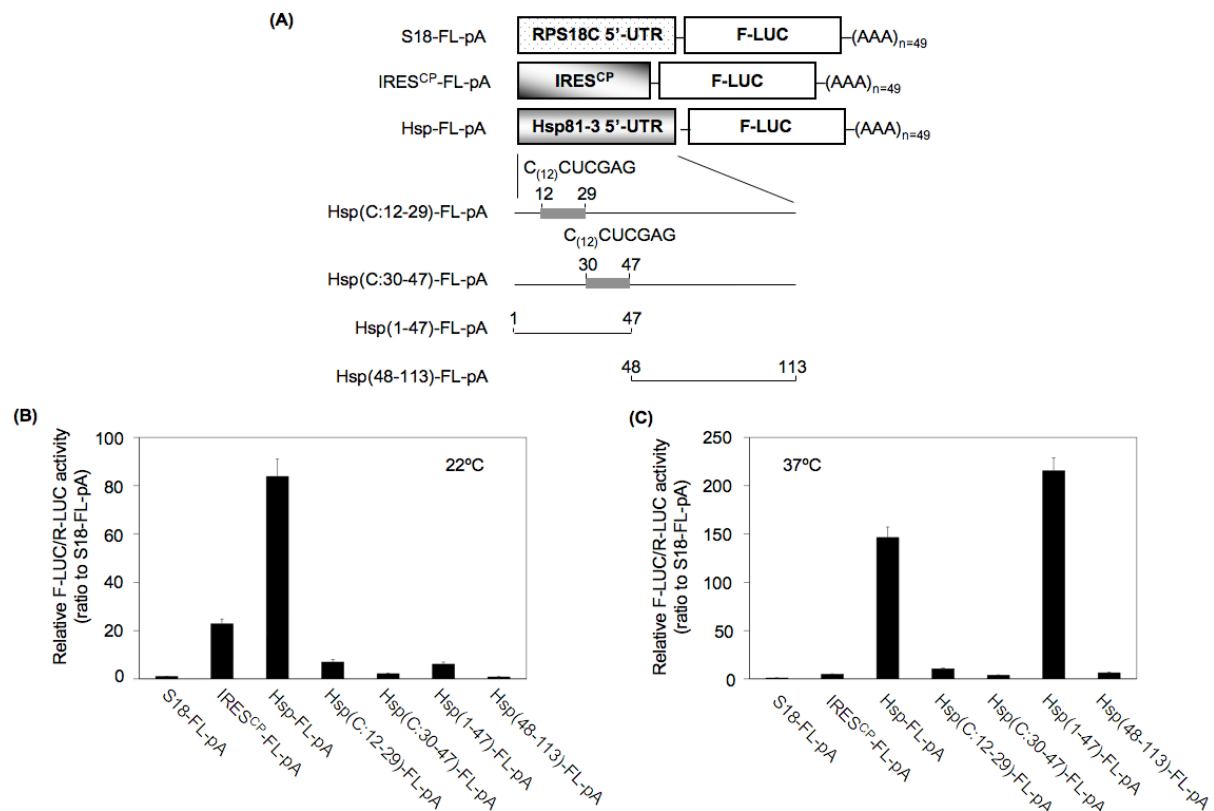


図 11 5'-UTR がキャップ構造を持たない mRNA からの発現に与える影響

(A) プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 -cap_f-luc_pA mRNA の略図を示す。"n=49" はポリ A 配列の長さを示す。変異導入された *Hsp81-3* 5'-UTR を含む(図 10 参照)、図示した 5'-UTR を連結した -cap_f-luc_pA mRNA を等量ずつ、コントロールである +cap_r-luc_pA mRNA (図 9 参照) と共にプロトプラストに導入した。(B,C) mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを 22°C (B) もしくは 37°C (C) に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc 活性、r-luc 活性を測定した。構築間での発現量を比較するために f-luc 活性値を r-luc 活性値で規格化した値を、各温度における *RPS18C* 5'-UTR の結果を 1 とした相対活性値を示した。

I-III-VII. *Hsp81-3* 5'-UTR のキャップ非依存的な翻訳を促進する活性は、高温域におけるキャップ構造を有する mRNA の効率的な翻訳に重要である

Hsp81-3 5'-UTR が示した、キャップ構造を持たない mRNA からの翻訳を促進する能力(図 11)と、キャップ構造を持つ mRNA からの高温域における効率的な翻訳に寄与する能力(図 5)との相関について検証した。そのために、変異導入により高温ストレス下における +cap_f-luc_pA mRNA からの効率的な発現に寄与する能力を失った *Hsp81-3* 5'-UTR (12-29 番目、30-47 番目の塩基に変異置換を導入した *Hsp81-3* 5'-UTR 及び 1-47 番目を欠失させた *Hsp81-3* 5'-UTR; 図 10 参照)が、-cap_f-luc_pA mRNA からの発現に与える影響を調べた。興味深い事に、いずれの 5'-UTR の場合にも、通常温度 (22°C)、高温域 (37°C) における発現量が、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合に比べて

著しく減少した(図 11B,C)。高温域における+cap_f-luc_pA mRNA からの効率的な翻訳を可能とする *Hsp81-3* 5'-UTR の 1-47 番目の領域(図 10 参照)に関しても検証したところ、通常温度においては発現量の減少が認められたが(図 11B)、高温域においては、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合よりも高い発現を示した(図 11C)。*RPS18C* 5'-UTR、*Hsp81-3* 5'-UTR、1-47 番目、48-113 番目の塩基のみの *Hsp81-3* 5'-UTR に関しては、図 6 と同様にレポーター活性の経時測定を行い、f-luc 活性値が直線的に増加していることを確認した(data not shown)。以上の結果において示された相関性は、高温域においてキャップ構造を持たない mRNA からの翻訳を高める *Hsp81-3* 5'-UTR の特性が、高温域におけるキャップ構造を持つ mRNA からの効率的な翻訳に寄与する上で重要な特性である可能性を示唆している。高温ストレス下において-cap_f-luc_pA mRNA からの発現を促進する能力が特には高くなかった IRES^{CP}(図 11C 参照)を、+cap_f-luc_pA mRNA に連結しても、*RPS18C* 5'-UTR などと同様に 22°C に対する 37°C における発現量が減少するという結果(図 12)もこの可能性を支持する。

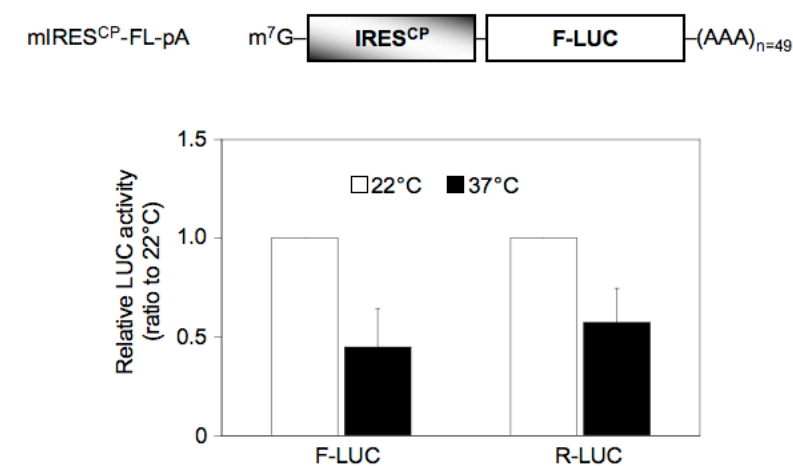


図 12 IRES^{CP}が高温域におけるキャップ構造、ポリ A 配列を持つ mRNA からの発現に与える影響

プロトプラストに導入した *in vitro* 合成 mRNA の略図を示す(上側)。“n=49”はポリ A 配列の長さを、m⁷G はキャップ構造を示す。IRES^{CP}を連結した+cap_f-luc_pA mRNA は、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNA (図 9 参照)とプロトプラストに共導入した。mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc および r-luc 活性を測定した。22°C における f-luc 活性値もしくは r-luc 活性値を 1 とした相対活性値を示す。

I-III-VIII. キャップ構造の存在は *Hsp81-3* 5'-UTR を介した発現を著しく高める

続いて、キャップの有無が *Hsp81-3* 5'-UTR を介した発現に与える影響を評価するために、*Hsp81-3* 5'-UTR を連結した +cap_f-luc_pA 及び -cap_f-luc_pA からの発現量の比較を先と同様の一過性発現実験により行った。その結果、通常温度(22°C)、高温域(37°C)いずれにおいても、キャップ構造が無いことにより、発現量が 5-10%程度に減少した(図 13)。この結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR を介したキャップ構造を持つ mRNA からの高温域における効率的な翻訳に、キャップ構造そのものは必要であることを示唆している。

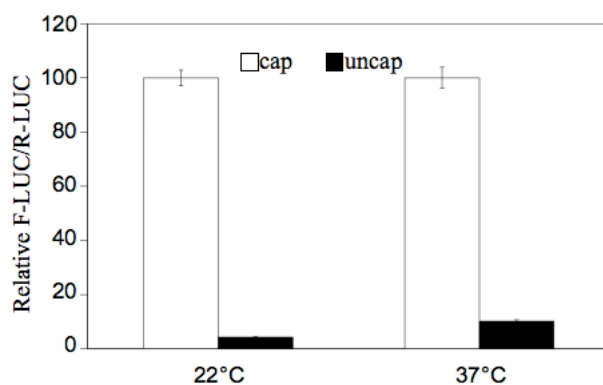


図 13 キャップ構造の有無が *Hsp81-3* 5'-UTR を介した発現に与える影響

Hsp81-3 5'-UTR を連結した +cap_f-luc_pA mRNA 及び -cap_f-luc_pA mRNA を等量ずつ、コントロールである +cap_r-luc_pA mRNA とプロトプラストに共導入した。mRNA を導入したプロトプラストを分割し、それぞれ 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後、プロトプラストを回収し、f-luc 活性及び r-luc 活性を測定した。構築間で発現量を比較するために f-luc 活性値を r-luc 活性値で規格化した値を、各温度における +cap_f-luc_pA mRNA の結果を 1 とした相対活性値を示した。

I-III-IX. *Hsp81-3* 5'-UTR は IRES 様の活性を有している

いくつかの *Hsp* の 5'-UTR には IRES 様の活性が存在し、その活性が高温ストレス下における翻訳において重要な役割を果たしていると考えられている(Dinkova et al., 2005; Hernandez et al., 2004; Macejak and Sarnow, 1991)。そこで、*Hsp81-3* 5'-UTR にも IRES 様の活性が存在するかを、IRES 活性の試験に広く利用されているバイシストロニックプラスミドを用いて一過性発現実験により検証した。バイシストロニックプラスミドでは、二種類のレポーター遺伝子がタンデムに連結されており、遺伝子間領域に試験する 5'-UTR が挿入される。転写された mRNA の第一シストロンは通常のキャップ依存的な機構を介して翻訳が開始される。一方で、第二シストロンの翻訳は、挿入した 5'-UTR が保持する、キャップ非依存的に UTR の内部か

ら翻訳を開始させる活性、つまり IRES 活性に依存する。本研究では、まず 35S プロモーター配下に第一シストロンとして r-luc、第二シストロンとして f-luc がタンデムに並んだバイシストロニックプラスミド p-RL- Δ -FL を用いた (Matsuo et al., 2004)。RPS18C 5'-UTR、IRES^{CP}、Hsp81-3 5'-UTR に関して、IRES 活性の検証を行った (図 14A)。プロトプラストを用いた一過性発現実験の結果、RPS18C 5'-UTR とは異なり、Hsp81-3 5'-UTR は IRES^{CP} と同程度の IRES 活性を示した (図 14B)。キャップ構造、ポリ A 配列を有する *in vitro* 合成バイシストロニック mRNA (図 14C) をプロトプラストに導入した場合にも同様の傾向を示した (図 14D)。これらの結果は、Hsp81-3 5'-UTR が IRES^{CP} と同程度には IRES 活性を有している可能性を示唆している。

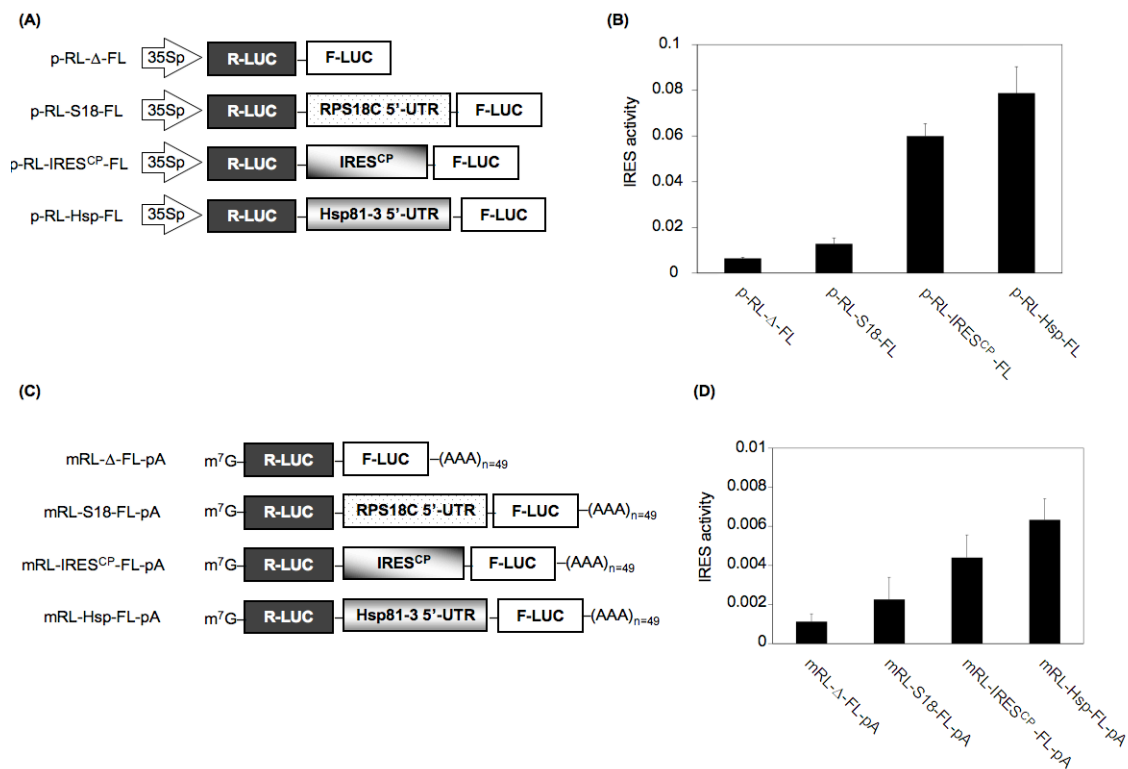


図 14 バイシストロニック mRNA を用いた IRES 活性の評価

(A)プロトプラストに導入したバイシストロニックプラスミドの模式図を示す。35Sp は 35S プロモーターを示す。r-luc と f-luc の間に試験する 5'-UTR を挿入した。(B)プラスミドを導入したプロトプラストを 22°C にて 15 時間静置した。回収後 f-luc 及び r-luc 活性を測定し、f-luc/r-luc の値を IRES 活性として定義して示した。(C)プロトプラストに導入した *in vitro* 合成バイシストロニック mRNA の模式図を示す。"n=49"はポリ A 配列の長さを、m⁷G はキャップ構造を示す。(D) mRNA をプラスミドに導入後 22°C にて 30 分間静置した。その後 f-luc 及び r-luc 活性を測定し、f-luc/r-luc を IRES 活性として定義して示した。

I-III-X. *Hsp81-3* 5'-UTR を介した高温ストレス下における翻訳は、5'端近傍に挿入した開始コドンにより阻害される

これまでの結果から、*Hsp81-3* 5'-UTR には *RPS18C* 5'-UTR などと比べて、キャップを持たない mRNA からの発現を促進する活性がある上、IRES 様の活性を保持していることが示唆された。こうした *Hsp81-3* 5'-UTR の特性は、通常の真核細胞性 mRNA と同様の形態である、キャップ構造、ポリ A 配列を有するモノシストロニックな mRNA においても、*Hsp81-3* 5'-UTR はリボソームを 5'-UTR 内部にリクルートできるため、キャップ依存的な翻訳が阻害されていると考えられる高温ストレス下における翻訳に寄与する可能性を連想させる。そこで、*Hsp81-3* 及び *RPS18C* 5'-UTR の 5'端に upstream AUG (uAUG)を挿入した+cap_f-luc_pA を用い、通常の真核細胞性 mRNA と同様の形態の mRNA におけるリボソームのリクルートポイントの検証を行った(図 15A)。AUG の代わりに ACA を挿入したものをそれぞれのコントロールとした。*Hsp81-3*、*RPS18C* 5'-UTR いずれの場合においても、uAUG を挿入することにより、upstream open reading frame (uORF) が創出される(図 15A)。一般的に、uORF の翻訳は下流に存在する開始コドンからの翻訳の開始を抑制することが知られている(Kozak, 1987; Yun, 1996; Wang and Wessler, 1998)。従って、もし 5'端からのスキヤニングを介して翻訳が開始されていれば、uORF が翻訳され下流の f-luc の発現量が減少することが考えられる。一過性発現実験の結果、*RPS18C* 5'-UTR、*Hsp81-3* 5'-UTR いずれの場合においても、また、温度に関わらず(22°C もしくは 37°C)、uAUG を挿入することにより、mRNA からの発現量が ACA コントロールの場合と比較して、35-55%程度に減少した(図 15B)。開始コドン近傍配列が翻訳効率に影響することは広く知られている(Kozak, 1991)。そこで、uAUG の近傍配列がより翻訳開始効率が高いと考えられる配列になる様に設計したところ(*good uAUG* in 図 15B)、f-luc 発現量のより顕著な減少が認められた(図 15B)。このことは、uAUG 挿入による f-luc 発現量の減少が、uORF が翻訳された効果によることを強く示唆する。高温ストレス下での+cap_f-luc_pA mRNA からの翻訳に与える効果は、*RPS18C* 5'-UTR と *Hsp81-3* 5'-UTR とで大きく異なるが(図 5)、通常温度、高温ストレス下いずれにおいても、両 5'-UTR を介した翻訳はキャップ構造が存在する 5'端側にリボソームがリクルートされスキヤニングする過程を含んでいる可能性を以上の結果は示唆している。

続いて uAUG 挿入が+cap_f-luc_pA mRNA からの発現に与える影響を調べた。その結果、先に述べたキャップを持つ mRNA の場合と同様に、uAUG の挿入による発現量の減少及び近傍配列を変化させたことによるより顕著な減少が、通常温度、高温ストレス下いずれにおいても観察された(図 15C)。これらの結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR を介した翻訳は、キャップの有無、温度

に関わらず、5'端へのリボソームのリクルート及びそこからスキヤニング過程を含んでいることを示唆している。

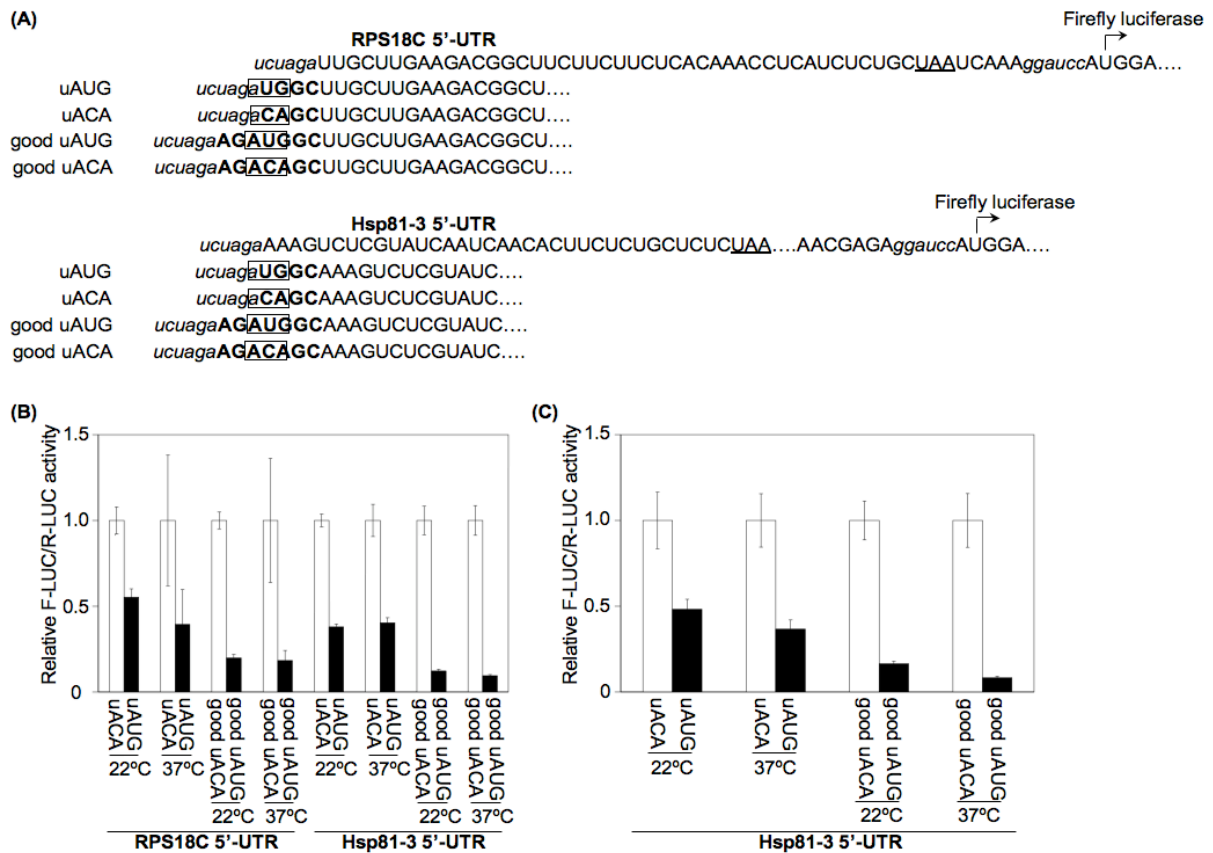


図 15 upstream AUG (uAUG)の挿入が *Hsp81-3* 5'-UTR を介した翻訳に与える影響

(A) uAUG 及び対応するコントロール配列である uACA (open boxes)は、太字で示した配列を *RPS18C*、*Hsp81-3* 5'-UTR に挿入することにより創出した。good uAUG 及び対応するコントロール配列である good uACA は、uAUG の近傍配列を、より翻訳開始効率が高いと考えられる配列になるように設計した構築である。uAUG の挿入により、*RPS18C* 5'-UTR 中に 17 コドン、*Hsp81-3* 5'-UTR 中に 14 コドンの upstream ORF (uORF)が創出される。uORF の終止コドンには下線を引いた。矢印は f-luc 遺伝子の開始コドンを示す。構築の都合上存在する *Xba*I、*Bam*HI サイトは小文字のイタリックで示した。(B,C) A において示した各 5'-UTR を持つ等量の +cap_f-luc_pA mRNA (B)、もしくは -cap_f-luc_pA mRNA (C)を、+cap_r-luc_pA mRNA とプロトプラストに共導入した後に二つに分割し、それぞれを 22°C もしくは 37°C に 22 分間静置した。その後、プロトプラストを回収し、f-luc 活性及び r-luc 活性を測定した。構築間で発現量を比較するために f-luc 活性値を r-luc 活性値で規格化した値を、各構築の各温度における ACA コントロールの値を 1 として示した。

I-IV. 考察

mRNA の 5'側 に存在する 5'-UTR は、maize *Hsp70* (Pitto et al., 1992) や ショウジョウバエ など その他生物の *Hsp* (McGarry and Lindquist, 1985; Klemenz et al., 1985; Hultmark et al., 1986) の高温ストレス下における翻訳において重要な役割を果たしている。本研究では、シロイヌナズナ *Hsp81-3* 5'-UTR もまた、高温ストレス下における mRNA の効率的な翻訳に関与していることを、シロイヌナズナ培養細胞から調製したプロトプラストを用いた一過性発現実験により示した(図 5, 図 6, and 図 7)。

Hsp mRNA の高温ストレス下における翻訳には、*Hsp* 5'-UTR を介したキャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しない翻訳機構が重要であると考えられている (Schneider, 2000; Panniers, 1994; Duncan, 1996)。こうした考えは、例えば、キャップアナログや eIF4F の構成因子の抗体を用いて eIF4F の形成を阻害しても、*Hsp* mRNA の翻訳が他の mRNA の翻訳ほどには抑制されないことなどの報告に基づいている。キャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しない翻訳を説明するほぼ唯一の機構が、5'-UTR の内部にリボソームをリクルートする IRES である。これまでに、maize *Hsp101* (Dinkova et al., 2005)、human chaperon *BAG1* (Coldwell et al., 2001)、human *Hsp70 Bip* (Macejak and Sarnow, 1991; Kim and Jang, 2002) など、いくつかの *Hsp* や シャペロン関連遺伝子の 5'-UTR に IRES が存在することが報告されている。IRES 活性の検定方法として広く利用されているバイシストロニックレポーターを利用した一過性発現実験からは、*Hsp81-3* 5'-UTR にも、植物で機能することが知られている IRES^{CP} (Yamamoto et al., 2003) と同程度の IRES 様の活性が存在することが示唆された(図 14)。この結果は、キャップ依存的な翻訳が阻害された高温ストレス下においても、*Hsp81-3* 5'-UTR の場合にはリボソームをキャップ非依存的に IRES 経由でリクルートできるために、効率的に翻訳されるという従来の考え方に矛盾しない。

一方で、モノシストロニックレポーター mRNA を用いた解析では、キャップ構造を除いた場合に著しい発現量の低下が認められた(図 13)。この発現量の低下はリボソームのリクルートの過程が阻害されたためだと考えられる。キャップとポリ A 配列の相互作用が失われたため、発現量が減少した可能性も考えられるが、*Hsp81-3* 5'-UTR の高温ストレス下における翻訳への効果はポリ A 配列がない場合にも認められることから(図 9)、その可能性は低いと思われる。この結果は、キャップ構造を有する通常の状態の mRNA においては、IRES を介した翻訳開始機構は機能していないか、もしくは非常に寄与が小さい可能性を示唆している。加えて、uAUG を *Hsp81-3* 5'-UTR の 5'端に挿入することによる、+cap_f-luc_pA mRNA からの発現の減少も認められた(図 15)。uAUG 挿入による発現量の減少は、*RPS18C* 5'-UTR の

場合にも同様に認められる上、通常温度、高温ストレス下いずれにおいても認められた(図 15)。この結果も、高温ストレス下における *Hsp81-3 5'*-UTR を介した翻訳が、5'-UTR の内部にリボソームをリクルートする特別な機構を介している可能性に対し否定的である。むしろ、*Hsp81-3 5'*-UTR を介した翻訳は、高温域においても、リボソームが5'端キャップ構造の近傍にリクルートされ、5'から3'方向にスキャニングする過程を介している可能性を示していると考えられる。詳細な機構については不明であるが、ショウジョウバエ *Hsp70* や *Hsp90* の高温ストレス下における翻訳はキャップ依存的であることが、5'-UTR の5'端にステムループを挿入した解析、あるいはキャップ構造を認識する eIF4E に結合し eIF4F 複合体の形成を阻害する 4E-BP を過剰発現させた解析を通じて、報告されている(Hess and Duncan, 1996; Ahmed and Duncan, 2004)。

これまでに IRES を有する細胞性 mRNA が数多く報告されている(Elroy-Stein and Merrick, 2007)。その一方で、IRES の存在及び全体的な翻訳が抑制された状況における一部遺伝子の翻訳への IRES の寄与に関しては、否定的な見解も示されている(Kozak, 2007; Kozak 2005; Kozak 2003; Kozak 2001)。Kozak は主に、IRES を検証する方法及び、IRES を介した翻訳が、通常のキャップ依存的な翻訳と比較して非常に弱いことを問題として挙げている。実際、IRES だと報告されていたものが、後の解析で否定される例も多い(Bert et al., 2006; Elango et al., 2006; Wang et al., 2005)。IRES 様の活性を有することが報告されているトウモロコシ *Hsp101* の5'-UTR に関しても、eIF4F の形成を阻害した *in vitro* 翻訳系においても翻訳されることをモノシストロニックやバイシストロニックなレポーター mRNA を用いて示したのみであり(Dinkova et al., 2005)、実際のキャップ構造を持つ mRNA の高温ストレス下における翻訳にその IRES 様の活性が寄与しているかどうかは不明である。こうした現状に鑑みて、*Hsp81-3 5'*-UTR が例外的なわけではなく、これまでに報告がなされている IRES にもストレス下における効率的な翻訳に直接的には寄与していない例が存在する可能性が考えられる。

Hsp81-3 5'-UTR を介した翻訳における IRES の関与に関しては否定的な結果であったが、キャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しない翻訳に特徴がある点は、これまでに報告されている *Hsp* と同様であった。キャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しない翻訳の検証には、キャップアナログや eIF4F の構成因子の抗体を用いたキャップ/eIF4F 間相互作用の阻害した *in vitro* 翻訳系(Duncan, 1996)あるいはキャップ結合サブユニットである eIF4E の発現を抑制させた細胞(Hernandez et al., 2004; Joshi-Barve et al., 1992)などが用いられている。本研究では、キャップ構造を持たない mRNA を用いた一過性発現実験により、キャップ/eIF4F 間の相互作用に依存しない翻訳の評価を行った。その結果、*Hsp81-3 5'*-UTR には、-cap_f-luc_pA mRNA か

らの翻訳を促進する活性が特に高温ストレス下において存在し、その性質が、+cap_f-luc_pA mRNA の高温ストレス下における効率的な翻訳に重要であることが示唆された(図 11)。興味深いことに、*Hsp81-3* 5'-UTR を介した -cap_f-luc_pA mRNA の翻訳においても、リボソームが 5'端側にリクルートされ、5'から 3'方向にスキヤニングする過程を介している可能性が示唆された(図 15)。これらの結果からは、キャップを持たない場合においても 5'端にリボソームをリクルートすることができる *Hsp81-3* 5'-UTR の性質が、+cap_f-luc_pA mRNA の高温ストレス下における効率的な翻訳に重要である可能性が考えられる。

先に述べた様に、ショウジョウバエ *Hsp70* や *Hsp90* の高温ストレス下における翻訳はキャップ依存的事であることが報告されている(Hess and Duncan, 1996; Ahmed and Duncan, 2004)。しかし、キャップ依存的事な翻訳が阻害されると考えられる状況(高温ストレス下)において、5'端側にリボソームをリクルート可能な機構に関しては不明である。一方で、キャップ構造を持たない mRNA の 5'端依存的事な翻訳に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* 両方においてその存在が報告されている(De Gregorio et al., 1998; Gunnery et al., 1997)。このキャップ構造を持たない mRNA からの 5'端依存的事、キャップ/eIF4F 非依存的事な翻訳には、eIF4F 複合体の構成因子の一つである eIF4G が自身の RNA 結合能を通じて関与している(De Gregorio et al., 1998; Borman et al., 1997; Prevot et al., 2003; Ali et al., 2001)。eIF4G のリクルートを促進する 5'-UTR の配列や構造は明らかとなっていない。以上の過去の知見に鑑みて、通常のカップ依存的事な翻訳が阻害されると考えられる高温ストレス下においても、eIF4G を 5'端にリクルート可能な *Hsp81-3* 5'-UTR の性質が、*Hsp81-3* mRNA の高温ストレス下における翻訳に重要である可能性が考えられる。

変異解析の結果は、*Hsp81-3* 5'-UTR の 5'端側の領域が、高温ストレス下における翻訳に重要であることを示唆するものであった(図 10)。3'端側を欠失させた場合には、全長 5'-UTR と同様の傾向を示すにも関わらず、3'端側に変異を導入した場合には 37°C における発現量の増大が認められない理由については不明であるが、UTR の長さ、導入したシトシン配列の影響等によるものではないかと考えられる。高温ストレス下における翻訳を規定するシス配列や二次構造はこれまで見出されていない。RNA 構造予測ソフト M-FOLD により *Hsp81-3* 5'-UTR の構造予測を行ったところ、特に強固な二次構造を形成しなかった(dG=-6.93)。ショウジョウバエ *hsp70* に関しては、5'-UTR が構造を持たないことが重要であると報告されているが(Hess and Duncan, 1996)、*RPS18C* 5'-UTR の場合も特に二次構造は形成しなかった(dG=-4.4)。現時点では、*Hsp81-3* 5'-UTR の一次元の情報としての配列が重要なのか、特定の構造が重要なのかどうかに関しては不明であり、今後の課題である。

本研究では、高温ストレス下における効率的な翻訳に寄与するシロイヌナズナ *Hsp81-3* 5'-UTR の特性解析を行った。今後は、次章で取りあげるマイクロアレイ解析により見出された、高温ストレス下においてもポリソームを形成している *Hsp81-3* 以外の mRNA の 5'-UTR に対しても同様の解析を行い、今回の結果の一般性について検証していく必要がある。

第二章

翻訳段階における環境ストレス応答のゲノムワイド解析

II-I. 序論

植物は環境ストレスに応答し、mRNA 発現パターンの著しい変化を示す。これまでに、環境ストレスにより転写が誘導される遺伝子が数多く見出されると共に、そうした遺伝子がコードするタンパク質が、ストレス応答において重要な機能を果たしていることが明らかにされてきた。一方で、mRNA の翻訳状態もまた、環境ストレスに曝されることにより著しく変化することが、高温ストレス下のトマト培養細胞(Nover et al., 1989)や大豆の胚軸(Key et al., 1981)、塩ストレス下のシロイヌナズナ培養細胞(Ndimba et al., 2005)、脱水ストレスに曝されたトウモロコシ(Hsiao, 1970)やシロイヌナズナ(Kawaguchi et al., 2004)、低酸素条件下のトウモロコシ(Sachs et al., 1980; Fennoy et al., 1998)など、様々な細胞において示されている(Bailey-Serres, 1999; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002)。そうした翻訳状態変化の特徴は、ストレスにより細胞全体としての翻訳活性が抑制されることに加え、そうした状況においても翻訳が維持される一部 mRNA が存在することである。例えば、環境ストレス応答において重要な役割を果たす *Hsp* や *Adh* などの mRNA の翻訳は、高温ストレス下や低酸素条件下においてもそれぞれ維持される(Bailey-Serres, 1999)。

マイクロアレイは、環境ストレスによる mRNA 発現パターンの変化、つまり蓄積転写産物量の変化をゲノムワイドに解析する手法として広く利用されてきた(Tyagi et al., 2006)。マイクロアレイ解析によりゲノムスケールで見出された誘導遺伝子は、将来的な機能解析のターゲットとして重要であるだけでなく、環境ストレス応答において重要な機能、代謝経路、シグナル伝達経路などを見出す上での重要な情報源となってきた。近年は、特に動物や酵母において、各種 mRNA の翻訳状態をゲノムワイドに定量化する目的にマイクロアレイを利用する試みもなされはじめてきた(del Prete et al., 2007; Mata et al., 2005; Pradet-Balade et al., 2001; Preiss et al., 2003; Lackner et al., 2007; Bushell et al., 2006; Arava et al., 2003)。多くの場合、各 mRNA 種の翻訳状態を示す指標として、ポリソーム画分に存在する mRNA の比率(全 RNA あるいは非ポリソーム画分に存在する RNA に対して)が利用されている。植物ではこれまでに、脱水ストレス下のシロイヌナズナの葉(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005)、低酸素条件下のシロイヌナズナの根(Branco-Price et al., 2005)やショ糖飢餓条件下のシロイヌナズナ培養細胞(Nicolai et al., 2006)における翻

訳状態の変化が、マイクロアレイを用いて解析されている。従来の知見から予想された通り、いずれのマイクロアレイデータからも、大部分の mRNA のポリソーム形成が阻害されることが認められた。一方で、そうした状況においても、ポリソーム形成の阻害を回避する、あるいは逆に極端に阻害されるという、全体的な傾向から見ると特徴的な挙動を示す mRNA 種が存在することも見いだされている。例えば、ribosomal protein のポリソーム形成は極端に阻害されることがいずれのストレスの場合にも認められている。環境ストレスによる翻訳状態の変化は mRNA 種によって様々であるという植物の環境ストレスに応答した翻訳制御の全体像が、こうしたゲノムワイドな解析を通じて徐々に明らかとなってきた。

本研究第一章あるいは甲賀(Kouga, 2007)におけるシロイヌナズナ培養細胞を用いたポリソーム解析により、house-keeping 遺伝子である *RPS18C* や *Act2* mRNA は高温及び NaCl ストレスによりポリソーム画分から非ポリソーム画分に移行するのに対し、*Hsp81-3* mRNA はポリソーム画分に留まることが示されている。このことは、ポリソーム分画及びマイクロアレイ解析を用いることにより、高温及び塩ストレス下における翻訳状態の変化をゲノムワイドに解析可能であることを期待させる。二つの異なるストレス環境下における翻訳状態の変化を比較・検証することは、翻訳段階でどのような制御がなされているのかを理解する上で、単一のストレスの場合と比較して、より効果的なアプローチであると思われる。本研究では、均質性の高い培養細胞を材料に、高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化を、マイクロアレイを用いてゲノムワイドに解析すると同時に、翻訳状態の変化を二つのストレス間で比較・検証した。こうした解析を通じて、環境ストレスに応答して翻訳段階ではどのような制御がなされているのか理解し、植物の環境ストレス応答における重要性や意義に関して考察することを目指した。

II-II. 方法と材料

II-II-I. 使用植物の生育条件およびストレス処理

シロイヌナズナ培養細胞 T87 の培養及び高温ストレス処理は、一章の方法に従った。塩ストレス処理には、培養 3-4 日目の細胞を用いた。終濃度 200 mM となるように NaCl を細胞培養液に加えた後、通常の培養条件で 10 分間震盪培養した。吸引濾過した細胞を使用培地と等張の 180 mM マンニトール溶液(Nakayama et al., 2000)で二回洗浄した後、液体窒素中で凍結させ、-80°C にて保存した。未処理の細胞(以降、通常細胞と称する)は、NaCl の代わりに等容量の水を加えた以外は、塩ストレス処理した細胞と同様に扱った。

II-II-II. 培養細胞の増殖曲線

継代後一日おきに懸濁培養液 1 mL を CellTrics Disposable Filter (20 μ m; Partec)に回収し、遠心操作(400 x g, 1 min)により培地を除いた後、細胞の新鮮重量を測定した。高温ストレス処理した細胞は、処理後 22°C に設定した水浴にて 5 分間緩やかに攪拌した後、通常の培養条件に戻した。通常細胞についても、高温ストレス処理時の水浴の温度が 22°C であった以外は、高温ストレス処理した細胞と同様に扱った。

II-II-III. *In vivo* パルスラベル実験

培養 3-5 日目の培養細胞 55 mg (液量 480 μ L)をチューブに分取した。塩ストレス処理は終濃度 200 mM になるように NaCl を加えることにより、高温ストレス処理は、NaCl の代わりに DW を加え 37°C に静置することにより行った。通常細胞は、NaCl の代わりに DW を加え、室温に静置した。ストレス処理を開始して 10 分後に、³⁵S-Met (終濃度 62.5 nCi/ μ L)を添加した。³⁵S-Met を添加して 15 分及び 50 分後に細胞を含む培養液約 230 μ L を分取し、終濃度 50 μ g/mL の翻訳阻害剤シクロヘキシミド(CHX)を加えた。遠心により細胞を回収した後、終濃度 50 μ g/mL の CHX を含む改変 LS 培地により 3 回洗浄した。洗浄培地を除いた後、細胞を液体窒素で凍結させた。細胞の破碎は、海砂(ナカライテスク)及びペッスルを用いて、100 μ L の buffer (0.1 M Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 2.5 mM PMSF)中で行った。遠心操作により細胞残さを取り除いた後、上清に 4x sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.025% BPB, pH 6.8)を 1x になる様に加え、煮沸した(95°C, 5 min)。各サンプルの放射活性の定量は、液体シンチレーションカウンター(Beckman)を用いて行った。各サンプルの

放射活性(dpm)を揃え、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した(ゲル濃度 15%)。ゲルを乾燥させた後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500 (Fujifilm)を用いて放射線画像の読み取りを行った。

II-II-IV. *In vitro* 翻訳実験

通常細胞、高温ストレス処理(37°C/10 min)した細胞及び塩ストレス処理(200 mM NaCl/10 min)した細胞から精製したトータル RNA (0.65 µg/10 µL scale)及びコントロールとして RNA の代わりに DW を、³⁵S-Met を加えた wheat germ extract *in vitro* 翻訳系に供した。基本的な手順はすべて付属のプロトコールに従い、10-20 µL の反応系で行った。25°C で 30 分間静置した後、4x sample buffer を 1x になる様に加え、煮沸した(95°C, 5 min)。各サンプル等容量を SDS-PAGE に供し(ゲル濃度 15%)、ゲルを乾燥させた後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500 (Fujifilm)を用いて放射線画像の読み取りを行った。翻訳反応が飽和していないことは、トータル RNA の濃度を振って確認した(data not shown)。

II-II-V. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

第一章の方法に従った。

II-II-VI. マイクロアレイ解析用 RNA の抽出

超遠心後のショ糖密度勾配液を 8 つの画分に分画した場合の、1-3、5-7 番目の画分(底側が 1 番)を混合したポリソーム画分、非ポリソーム画分からそれぞれポリソーム RNA、非ポリソーム RNA を抽出した。それぞれの画分約 1.95 mL は、終濃度 5.5 M になるように 8M グアニジン塩酸塩を予め加えたチューブに回収した。この時、Two-Color RNA Spike-In Kit (Agilent Technologies)に含まれる spike mix A をポリソーム画分に、spike mix B を非ポリソーム画分にそれぞれ加えた。それぞれの spike mix には、*in vitro* 合成された、ポリ A 配列を持つ 10 種類の転写産物が、200 倍のダイナミックレンジでかつ既知の量比で混合されている。また、それらの転写産物に対応するスポットが本研究で使用した Agilent oligoarray (*Arabidopsis* 3 oligo microarray 44K; Agilent Technologies)に存在する。RNA spike-in はショ糖密度勾配液を回収すると同時に加えているため、その後の RNA 精製やラベリング、ハイブリダイゼーション(後述)などの過程を経ることになる。従って、RNA spike-in に対応するスポットのシグナル値を用いた補正を行うことにより、ショ糖密度勾配における実際の RNA 比率(ポリソーム RNA vs. 非ポリソーム RNA)を試算することが可能となる(Melamed and Arava, 2007)。通常細胞の場合には 1 本のショ糖密度勾配液、高温あるいは塩ストレス処理した細胞の場合には 3 本のショ糖密度勾配液から、ポリソ-

ム画分及び非ポリソーム画分を回収し、混ぜ合わせた。ショ糖溶液及びグアニジン塩酸塩の混合液に対し等量のエタノールを加え、 -20°C にて一晩冷却した後、遠心操作($20,000 \times \text{g}$, 45 min, 4°C)を行った。得られたペレットを80%エタノールにて一度洗浄した後、RNeasy kit (Qiagen)に含まれる buffer RLTにてペレットを溶解し、以降は付属のプロトコールに従い RNeasy kit (Qiagen)を用いて RNA 精製を行った。DNaseI 処理はプロトコールに従い on-columnにて行った。RNeasy kit を用いた精製後、更に LiCl 沈殿、エタノール沈殿による精製を行った。RNA の品質は、Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)を用いたオンチップ電気泳動法により検定した。

II-II-VII. トータル RNA の抽出

通常細胞及び高温あるいは塩ストレス処理した細胞約 100 mg を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素中で細かく破碎した。TRIzol Reagent (Invitrogen)を用いた RNA 抽出に続いて RNeasy kit (Qiagen)を用いた RNA clean-up を行った。DNaseI 処理は on-columnにて行った。TRIzol Reagent、RNeasy kit 共に、付属のプロトコールに従って使用した。精製した RNA の品質は、1.5%変性ゲル電気泳動後、EtBr 染色により検定した。

II-II-VIII. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出 (8 フラクション)

ショ糖密度勾配液約 650 μL ずつを、r-luc mRNA 5 ng (第一章参照)及び終濃度 5.5 M になるように 8M グアニジン塩酸塩を予め加えておいてチューブ 8 本に回収した。混合液と等量のエタノールを加え、 -20°C にて一晩冷却した後、遠心操作を行った($20,000 \times \text{g}$, 45 min, 4°C)。得られたペレットを80%エタノールにて一度洗浄した後、RNeasy kit (Qiagen)を用いて、付属のプロトコールに従い RNA 精製を行った。DNaseI 処理は on-columnにて行った。すべての画分の RNA を等容量(通常 30-50 μL)の RNase-free water (キットに付属)にて溶出した。精製した RNA の品質は、1.5%変性ゲル電気泳動後、EtBr 染色により検定した。

II-II-IX. 定量 RT-PCR 法

8 つの画分から抽出した RNA 溶液を等容量ずつ逆転写反応に供した。トータル RNA は、1 μg を逆転写反応に供した。逆転写反応には Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science)を、付属のプロトコールに従って用いた。プライマーには anchored-oligo(dT)₁₈ を用い、反応系は 10-20 μL とした。PCR 反応は、10 倍希釈した逆転写反応液 1-2 μL を鋳型に、遺伝子特異的なプライマー(表 2)及び LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science)を用いて、10-20 μL の反応系で行った。プライマーの設計には Universal ProbeLibrary Assay Design

Center/ProbeFinder (Roche Applied Science) を、SYBR Green I の蛍光強度の経時測定には LightCycler 480 System (Roche Applied Science) を、データ解析には LightCycler Data Analysis Software (Roche Applied Science) の second derivative maximum method を用いた。各画分の RNA 回収効率、RT-PCR 反応効率の違いを補正するために、各画分における目的遺伝子の結果は、ショ糖密度勾配液の回収時に加えた補正用 r-luc mRNA の結果で補正した。トータル RNA における目的遺伝子の結果は、ACT2 の結果で補正した。PCR 産物が単一であることは、融解曲線分析もしくはアガロースゲル電気泳動により確認した。シグナルがゲノム由来でないことは逆転写反応を行っていない RNA 溶液を鋳型にした PCR 反応においては、シグナルが検出されないことにより確認した。

Target gene(AGI code)	Primer sequences (5' to 3')
AT3G18780 (ACT2)	TTCCGCTCTTTCTTTCCAAG CCATTGTCACACACGATTGG
AT4G09800 (RPS18C)	CTCCAGCGATCGTTTATTGCTT GCAACCAGAGACATTTTGATTAGC
AT5G56010 (Hsp81-3)	CAACACTTTCGGGAGCAGGATT CAGCATCGGCATCATCTTCAAGT
R-LUC	GGATTCTTTTCCAATGCTATTGTT AAGACCTTTTACTTTGACAAATTCAGT
AT5G59720 (Hsp18.2)	AAACTTCCCCTAGCTCTCTCCAC GCGGAGAGAGGAGCAAGGA
AT2G28390	GATGCGTCCATCATCTCAA TCCGCGATTGATCTTTGAA
AT4G32060	GGGAGAGAAATCCTGGTGAA TCAACATCAAAGAGCATGAAGAA
AT1G06760	TGCTGCAACTAAGAGGAAAGC CCTTGGCTGGTCTAGCCTTA
AT2G18050 (HIS3)	GCGAAAACCGAAAACCAC CAGGACCATCAAAGCCTCTT
AT5G26710	TGGATTGGGGAAATGCTATC CCAGATAAGGCAGTGACACG
AT1G07320 (RPL4)	CGTGACGGACCTGAATAACA CACCACCACGAACTTCACC
AT5G63570 (GSA1)	ATGTTTTGGGGACGATGTGT TCAACTCACTACACAAGAATTATCCA
AT4G14560 (IAA1)	AACAACAAGCGCAAGAACAA CGATTTGTGTTTTTGCAGGA

表 2 標的遺伝子とプライマーセットの配列

II-II-X. マイクロアレイハイブリダイゼーション

同一のショ糖密度勾配由来のポリソーム RNA 及び非ポリソーム RNA から、それぞれ cyanine3 (Cy3)、cyanine5 (Cy5) で蛍光標識した complementary RNA (cRNA) を調製し、Agilent oligoarray (*Arabidopsis* 3 oligo microarray 44K; Agilent Technologies) を用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供した。*Arabidopsis* 3 oligo microarray には、シロイヌ

ナズナ由来の転写産物や前述の RNA spike-in などの塩基配列から選択された、60 mer のオリゴ DNA が 44000 スポットプリントされている。RNA の増幅及び蛍光標識には、Low RNA Input Fluorescent Liner Amplification Kit (Agilent Technologies)を使用した。まず、500 ng のポリソーム RNA 及び非ポリソーム RNA を鋳型に、リンカー配列として T7 プロモーター配列を含むオリゴ dT プライマー及び MMLV-RT を用いた逆転写反応を行った。合成された cDNA を鋳型に、T7 RNA polymerase *in vitro* 転写反応により、Cy3 (ポリソーム RNA)あるいは Cy5 (非ポリソーム RNA)で標識された CTP を取り込んだ cRNA を合成した。合成された cRNA の精製は RNeasy kit (Qiagen)を用いて行った。ポリソーム RNA 及び非ポリソーム RNA 由来の cRNA をそれぞれ 750 ng ずつ混合し、65°C/17 時間のハイブリダイゼーション反応に供した。スライドを洗浄した後、Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies)を用いてスキャニングを行い、Cy3 及び Cy5 のシグナルを検出した。以上のマイクロアレイ実験は、独立に培養した二種類の培養細胞由来のポリソーム RNA 及び非ポリソーム RNA を用いて、独立に二回行った(two biological replicate)。

II-II-XI. マイクロアレイデータ解析

スキャニング画像からのデータの抽出および正規化は、Feature extraction software (Agilent Technologies)を用いて行った。Feature extraction software の設定基準に従って立てられたフラグを基に、Cy3、Cy5 いずれかについてシグナル値が飽和しているスポット(glsSaturated, rlsSaturated)、スポット内のシグナルが不均一なスポット(glsFeatNonUnifOL, rlsFeatNonUnifOL)、複数スポットされている遺伝子についてははずれ値であるスポット(glsFeatPopnOL, rlsFeatPopnOL)、シグナルとバックグラウンドに有意差がないスポット(glsPosAndSingnif, rlsPosAndSingnif)を、以降の解析から除いた。正規化には、RNA spike-in に対応するスポットを基に行う方法もしくは Feature extraction software (Agilent Technologies)における標準的な正規化方法である Linear&LOWESS 法(Locally Weighted Linear Regression)を用いた。二回の繰り返し実験間において再現性の高いスポットを選択するために、フィルタリングプログラムである PRIM (Proprocessing Implementation for Microarray) (Kadota et al., 2001)に基づいて、独立な細胞から得られた二回分のマイクロアレイデータの処理を行った。PRIM による処理は Microsoft Excel を使用して行った。PRIM は、遺伝子数を考慮しながら、再現性のある(相関係数の高い)データを抽出するプログラムである。PRIM により除かれなかったスポットに関して、以下の計算を行った。

使用した略語の説明を以下に示す。

Poly_{con}: 通常細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy3 シグナル値

Nonpoly_{con}: 通常細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy5 シグナル値

Poly_{heat}: 高温ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy3 シグナル値

Nonpoly_{heat}: 高温ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy5 シグナル値

Poly_{NaCl}: 塩ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy3 シグナル値

Nonpoly_{NaCl}: 塩ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy5 シグナル値

翻訳状態を評価するための指標として、Polysome score (ポリソーム RNA の非ポリソーム RNA に対する割合)を各スポットについて求めた。

Polysome score (通常細胞)

$$PS_{con} = \text{Log}(\text{poly}_{con} / \text{nonpoly}_{con})$$

Polysome score (高温ストレス処理した細胞)

$$PS_{heat} = \text{Log}(\text{poly}_{heat} / \text{nonpoly}_{heat})$$

Polysome score (塩ストレス処理した細胞)

$$PS_{NaCl} = \text{Log}(\text{poly}_{NaCl} / \text{nonpoly}_{NaCl})$$

ポリソーム画分に存在する mRNA の割合、Polysome ratio を各スポットについて求めた。

Polysome ratio (通常細胞)

$$PR_{con} = 100 \times PS_{con} / (1 + PS_{con}) \text{ [%]}$$

高温あるいは塩ストレス処理した細胞についても、同様の方法で、それぞれ PR_{heat}、PR_{NaCl} を算出した。

高温ストレス処理あるいは塩ストレス処理による翻訳状態の変化を評価するための指標の算出を各スポットについて行った。

$$\text{高温: } \Delta PS[\text{heat}] = PS_{heat} - PS_{con}$$

$$\text{塩: } \Delta PS[\text{NaCl}] = PS_{NaCl} - PS_{con}$$

高温ストレス処理あるいは塩ストレス処理による蓄積転写産物量の変化を示す指標を各スポットについて算出した。

Expression score (通常細胞)

$$ES_{con} = \text{Log}(\text{poly}_{con} + \text{nonpoly}_{con})$$

Expression score (高温ストレス処理した細胞)

$$ES_{\text{heat}} = \text{Log}(\text{poly}_{\text{heat}} + \text{nonpoly}_{\text{heat}})$$

Expression score (塩ストレス処理した細胞)

$$ES_{\text{NaCl}} = \text{Log}(\text{poly}_{\text{NaCl}} + \text{nonpoly}_{\text{NaCl}})$$

変化を示す指標(高温): $\Delta ES[\text{heat}] = ES_{\text{heat}} - ES_{\text{con}}$

変化を示す指標(塩): $\Delta ES[\text{NaCl}] = ES_{\text{NaCl}} - ES_{\text{con}}$

Arabidopsis 3 oligo microarray の各スポットには、gene name あるいは systematic name (e.g. AGI code[The *Arabidopsis* Genome Initiative gene code])が付与されている。基本的に一つの gene name (systematic name) には一つのスポットが対応しているが、複数のスポットが対応している gene name (systematic name) もいくつか存在する。通常細胞及びストレス処理した細胞由来の、独立に得た二回のマイクロアレイデータのいずれにおいても上記データ処理の基準を満たした gene name (systematic name) の内(高温ストレス実験; 22456 種, 塩ストレス実験; 24442 種)、AGI code を有するものについて(高温ストレス実験; 19099 種, 塩ストレス実験; 20365 種)、二回の実験及び複数スポットの平均値を Polysome score 及び Expression score について算出した。それら平均値を基に Polysome ratio、 $\Delta PS[\text{heat}]$ 、 $\Delta PS[\text{NaCl}]$ 、 $\Delta ES[\text{heat}]$ 、 $\Delta ES[\text{NaCl}]$ の算出を行った。上記計算はすべて Microsoft Excel を使用して行った。

II-II-XII. 遺伝子の機能分類

遺伝子がコードするタンパク質の機能分類には、MIPS FunCatDB (munich information center for protein sequences Functional Catalogue Database) (<http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/>) (Ruepp et al., 2004) を用いた。

ゲノム配列の解析に基づいたアノテーションに従って選択した 52 種類の Hsp 遺伝子の内(Agarwal et al., 2001; Krishna and Gloor, 2001; Lin et al., 2001; Scharf et al., 2001; Swindell et al., 2007)、マイクロアレイデータの処理過程の基準を満たした遺伝子のみを Hsp ファミリーとして解析に使用した。

II-II-XIII. 統計解析

機能集団を含む何らかの遺伝子集団の平均 ΔPS (ここでは x とする)と解析に使用した全遺伝子の平均 ΔPS (ここでは μ とする)の差の検定には、 z 検定を用いた(帰無仮説 $H_0: x = \mu$)。全遺伝子の ΔPS の標準偏差を σ 、機能集団の遺伝子数を n とした場合、検定統計量は

$$z = \frac{x - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$

である。有意水準は 1%とした。

$\Delta\text{PS}[\text{heat}]$ と $\Delta\text{PS}[\text{NaCl}]$ の相関の有ัย性の検定(帰無仮説 H_0 : 相関係数は 0 である)は、以下の検定統計量を利用して行った。データの個数を n 、ピアソンの相関係数を r とした。

$$t = r \times \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

有意水準は 1%とした。

$\Delta\text{PS}[\text{heat}]$ と $\Delta\text{PS}[\text{NaCl}]$ の相関が 0.65 であるかの検定(帰無仮説 H_0 : 相関係数は 0.65)は、Fisher の Z 変換を利用した以下の検定統計量を使用して行った。データの個数を n 、ピアソンの相関係数を r とした。

$$z = \left[\frac{1}{2} \log_e \left(\frac{1+r}{1-r} \right) - \frac{1}{2} \log_e \left(\frac{1+0.65}{1-0.65} \right) \right] \times \sqrt{n-3}$$

II-III. 結果

II-III-1. 高温ストレスによる翻訳の抑制

本研究では、均質性が高くポリソーム解析に十分な細胞量を簡便に得ることができる、シロイヌナズナ懸濁培養細胞(*Arabidopsis thaliana* T87) (Axelos et al. 1992)を実験材料に用いた。高温ストレスによる細胞への二次的な影響を回避し、迅速に起こる翻訳状態の変化を捉えるために、第一章において示したポリソーム解析の結果を基に(図 3)、短時間の処理で著しいポリソームの解離が認められた 37°C/10 分を高温ストレス処理の条件とした。温度条件によっては 10 分程度の処理によっても細胞死が引き起こされることが報告されている(McCabe and Leaver, 2000)ため、37°C/10 分の高温ストレスが、その後の細胞増殖に与える影響を評価した。培養 4 日目の培養細胞に対して高温ストレス処理を行った後、通常培養条件に戻し、細胞の増殖を観察した。その結果、37°C/10 分間の高温ストレス処理では、特に増殖に影響は認められなかった(図 16)。一方、52°C/10 分間の高温ストレス処理を行った場合には、増殖の阻害が認められ、細胞死が引き起こされていることが示唆された(図 16)。このことから 37°C/10 分の高温ストレス処理を行った細胞は、細胞死に向かっている細胞ではないことが示された。

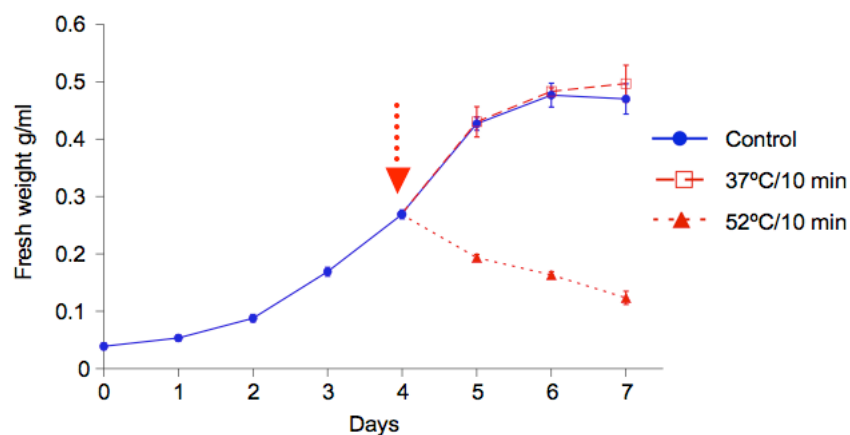


図 16 高温ストレス処理が細胞増殖に与える影響

継代後、培養液 1 mL あたりに含まれる培養細胞の新鮮重量(Fresh weight g/mL;縦軸)を一日おきに測定した。培養 4 日目(矢印)に培養液を三分割し、無処理(control)もしくは、高温ストレス処理(37°C/10 min もしくは 52°C/10 min)を行った。ストレス処理後、すべての細胞を 22°C の水浴にて 5 分間緩やかに攪拌した。その後、通常条件における培養を継続した。三回測定の平均と標準偏差を示す。実験は独立に二回行った。

第一章において、37°C、10 分間の高温ストレスによりポリソームの解離が認められることを示した(図 3)。このことは、高温ストレス処理により、細胞全体の翻訳が抑制されることを強く示唆する。³⁵S-Met を用いたパルスラベル実験による新規合成タンパク質の検出も行った。高温ストレス処理した培養細胞を 37°C に 10 分間静置した後、³⁵S-Met を培養液に加え、高温ストレス処理を続けた状態のまま 15 分間及び 50 分間静置した。通常細胞も、高温ストレス処理を行っていない以外は同様に処理した。その結果、15 分及び 50 分のいずれの場合においても、高温ストレス処理による新規合成タンパク質量の減少が認められた(図 17A)。RNA が分解されたため、あるいは何らかの要因により翻訳され得ない mRNA となったために新規合成タンパク質量が減少した可能性を検証するために、通常細胞及び 37°C、10 分間の高温ストレス処理を行った細胞から抽出したトータル RNA を、wheat germ *in vitro* 翻訳系において翻訳させた(図 17B)。その結果、通常細胞及び高温ストレス処理した細胞由来のトータル RNA から新規に合成されるタンパク質量に、*in vivo* ラベル実験(図 17A)において見られた様な顕著な差は認められなかった(図 17B)。これらの結果及び先に示したポリソーム解析の結果は、高温ストレス処理した細胞においては、確かに翻訳抑制が、恐らく翻訳の開始段階の阻害を介して、起こっていることを強く示唆している。

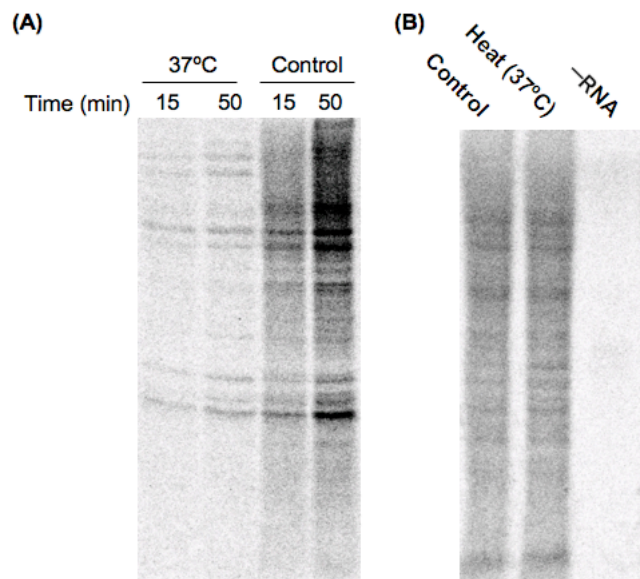


図 17 高温ストレス処理によりタンパク質合成が阻害される

(A) 培養細胞を 37°C に 10 分間静置した後、 ^{35}S -Met で 15 分間もしくは 50 分間ラベルした (37°C)。ラベルする間も 37°C に静置した。通常細胞も高温ストレス処理を行わなかった以外は、同様に処理した (Control)。回収した細胞に翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを加えた後、細胞の洗浄を行い、粗抽出液を調製した。各粗抽出液の放射活性を一定にして SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) に供した後、オートラジオグラフィーによる検出を行った。(B) 通常細胞 (Control) 及び 37°C、10 分間の高温ストレス処理を行った細胞 (Heat) から抽出したトータル RNA を、 ^{35}S -Met を加えた wheat germ *in vitro* 翻訳系にて翻訳させた。右端のレーン (-RNA) は、RNA の代わりに DW を加えたコントロールである。翻訳反応は 25°C で 30 分間行った。反応後、等容量のサンプルを SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) に供し、オートラジオグラフィーによる検出を行った。

II-III-II. 高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する

高温ストレスによる各 mRNA の翻訳状態 (ポリソーム形成状態) の変化を、ゲノムワイドに解析するための実験の枠組みを図 18 に示した。同一の培養細胞を分割して調製した通常細胞及び高温ストレス処理細胞を、それぞれシヨ糖密度勾配遠心を利用したポリソーム解析に供した。第一章図 3 と同様、高温ストレス処理によりポリソーム画分が減少すると同時に非ポリソーム画分が増大することは、吸光プロファイルにより確認した。ポリソーム画分 (8 つの画分の内の 1-3 番目の画分を混合) 及び非ポリソーム画分 (8 つの画分の内の 5-7 番目の画分を混合) からそれぞれ RNA を抽出・精製した。精製した RNA を鋳型に Cy3 (ポリソーム画分) あるいは Cy5 (非ポリソーム画分) で蛍光標識した antisense RNA (aRNA) を調製し、Agilent oligoarray (*Arabidopsis* 3 oligo microarray 44K; Agilent Technologies) 上のプローブと競合ハイブリダイゼーションさせた。得られたマイクロアレイデータをも

とに、個々の mRNA 種の翻訳状態(ポリソーム形成状態)を示す指標として、polysome score (ポリソーム画分[Cy3]/非ポリソーム画分[Cy5]の Log 比)及びポリソーム画分に存在する mRNA の割合(%)を示す polysome ratio (Cy3/[Cy3+Cy5]に相当)を算出した。以上の過程を、独立に培養した二種類の培養細胞を用いて、二回繰り返して行った(two biological replicate, つまり合計 4 回のハイブリダイゼーション実験)。四回のハイブリダイゼーション実験すべてにおいて、シグナル強度や再現性に関する設定基準を満たした 19099 種の mRNA を以降の解析に用いた(“方法と材料”を参照)。

マイクロアレイハイブリダイゼーションには、等量のポリソーム RNA 及び非ポリソーム RNA を供している。そのため、Cy3 と Cy5 のシグナル比は、シヨ糖密度勾配における実際の RNA 存在比率を反映していない。そこで、実際の RNA 存在比率を試算するために、遠心後のシヨ糖密度勾配液を回収すると同時に各画分に spike-in RNA を加え、それら RNA に対応するスポットのシグナル値を用いてマイクロアレイデータの正規化処理(ノーマライゼーション)を行った(“方法と材料”を参照)。Spike-in RNA を用いて正規化したマイクロアレイデータを基に、通常細胞及び高温ストレス処理した細胞由来の polysome score (それぞれ PS_{con} , PS_{heat})及び polysome ratio (それぞれ PR_{con} , PR_{heat})を各 mRNA 種について算出した(図 18)。 PS_{con} 、 PS_{heat} 、 PR_{con} 、 PR_{heat} は、二回の実験の平均として算出した。図 19A では、 PR_{con} 及び PR_{heat} のヒストグラムを示し、高温ストレス処理による翻訳状態の変化を検証した。通常細胞における大部分の mRNA 種の PR_{con} は 80%以上であり、全 mRNA 種の平均は 88.5%であった(図 19A)。このことは、大部分の mRNA 種がポリソーム画分に存在していることを示している。一方で、高温ストレス処理した細胞の場合、 PR_{heat} のヒストグラムの幅が広がり示すと同時に、全 mRNA 種の平均が 59.9%へと減少した(図 19A)。この polysome ratio の減少は、高温ストレスにより大部分の mRNA 種がポリソームから解離したことを示しており、254 nm の吸光度プロファイルが示す全体的な傾向(図 18)と一致する。また、個々の mRNA 種の polysome score の変化を、 PS_{con} と PS_{heat} の散布図を作成することにより検証した結果からも(図 19B)、大部分の mRNA 種が $PS_{con} > PS_{heat}$ (図 19B; 赤点線より下)の領域に存在する、つまり、ポリソーム形成が高温ストレスにより阻害されていることが示された。一方で、少数ではあるが、高温ストレス下においても翻訳状態が維持もしくは活性化される mRNA も存在していた(図 19B; 赤点線より上)。

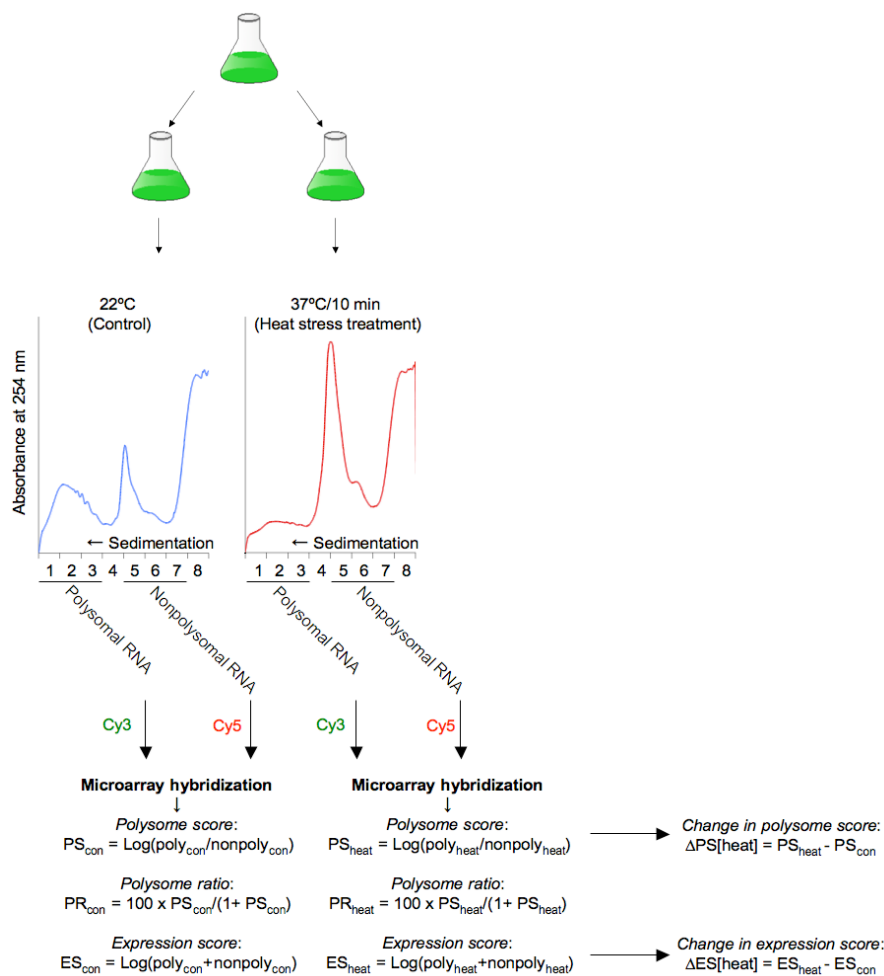


図 18 高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する方法

同一のシロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 を分割し、処理を行わない通常細胞(control)及び高温ストレス処理(37°C/10 min)した細胞(heat stress treatment)を調製した。両細胞から調製した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心(15-60%)により分画した後、RNA の分布を見積もるために 254 nm の吸光プロファイルを記録した。沈殿方向は右から左である。密度勾配液を 8 つの画分に分画した場合の 1-3 番目の画分の混合液から polysomal RNA を、5-7 番目の画分の混合液から nonpolysomal RNA を抽出・精製し、それぞれの RNA を鋳型に Cy3 あるいは Cy5 で蛍光標識した aRNA を調製後、マイクロアレイハイブリダイゼーション実験に供した(*Arabidopsis* 3 oligo microarray; Agilent Technologies)。個々の mRNA 種の、nonpolysomal RNA に対する polysomal RNA の対数比(polysome score)を、通常細胞(PS_{con})及び高温ストレス処理した細胞(PS_{heat})について算出した。 $\Delta PS[heat]$ は高温ストレス処理による polysome score の変化を示す指標である。また、polysomal RNA と nonpolysomal RNA の和に対する polysomal RNA の割合を示す指標(polysome ratio)を、通常細胞(PR_{con})及び高温ストレス処理した細胞(PR_{heat})について算出した。加えて、Cy3 シグナル値及び Cy5 シグナル値の和の対数値(expression score)を、通常細胞(ES_{con})及び高温ストレス処理した細胞(ES_{heat})について算出した。 $\Delta ES[heat]$ は高温ストレス処理による expression score の変化を示す指標である。独立に培養した二種類の培養細胞を用いて二回の繰り返し実験を行った(two biological replicate)。

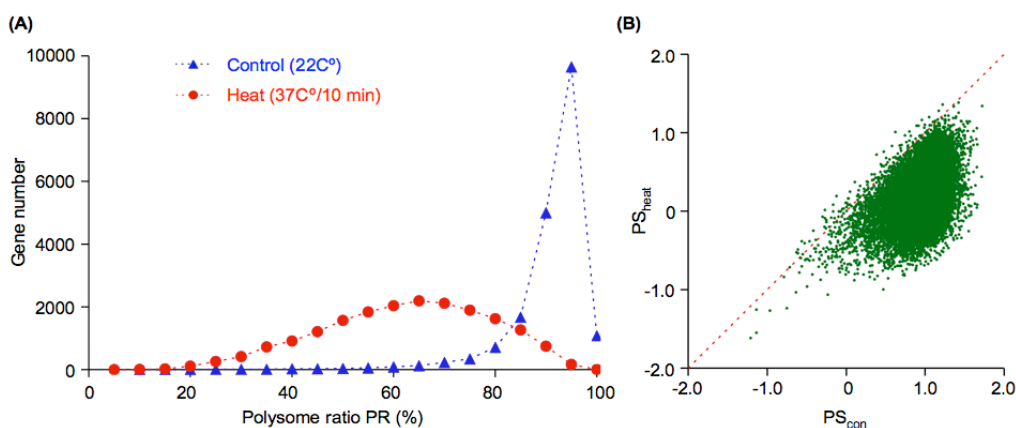


図 19 高温ストレスにより大部分の mRNA のポリソーム形成が阻害される

(A) 通常細胞(control)及び高温ストレス処理した細胞(heat)における polysome ratio (PR; 図 18 を参照)のヒストグラムを示す。Polysome ratio は polysome RNA と nonpolysome RNA の和に対する polysome RNA の割合を示す指標である。縦軸は遺伝子数を示す。(B)翻訳状態を示す指標である PS_{con} と PS_{heat} の散布図を示す。赤色の点線は PS_{con} と PS_{heat} が等しい点を示す。mRNA 種の数 は 19099 種である(A,B)。

以降の解析は、全体のシグナルを利用した Linear&LOWESS 法により正規化したマイクロアレイデータを基に行った。先述した spike-in RNA を用いて正規化した場合と同様に polysome score PS_{con} 及び PS_{heat} (図 18)を算出した。また、高温ストレス処理による蓄積転写産物量の変化を示す近似指標として、個々の mRNA 種の Cy3 シグナル値(ポリソーム RNA)と Cy5 シグナル値(非ポリソーム RNA)の和の対数値(expression score; ES)を、通常細胞(ES_{con})及び高温ストレス処理した細胞(ES_{heat})について算出した(図 18)。続いて、独立に行った二回の実験間の再現性の評価を以上の四つの指標(PS_{con} , PS_{heat} , ES_{con} , ES_{heat})について行うために、二回の実験から得られた指標値をプロットした散布図を作成した(図 20)。その結果、いずれの指標値も高い相関性(ピアソン相関係数 $r > 0.95$)を示したことから、再現性の高い結果が得られていると判断できる(図 20)。それぞれの指標値について、二回の実験の平均値を算出した後、高温ストレス処理による翻訳状態の変化を示す指標として $\Delta PS[heat]$ ($=PS_{heat} - PS_{con}$)を、蓄積転写産物量の変化を示す指標として $\Delta ES[heat]$ ($=ES_{heat} - ES_{con}$)をそれぞれ算出した(図 18)。 $\Delta ES[heat]$ については後述する。翻訳状態の変化を示す指標である $\Delta PS[heat]$ のヒストグラムは、正規様の分布を示した(図 21)。Linear&Lowess 法を用いて正規化した場合には、全体的にポリソーム形成が阻害されるという全体の傾向に関する情報は失われるため、図 21 に示す $\Delta PS[heat]$ のヒストグラムは 0 近傍を中心とする分布となる。 $\Delta PS[heat]$ の値が大きい mRNA 種ほど、高温ストレス下においてもポリソーム形成が阻害されにくいあるいは維持される傾向にあり、逆に $\Delta PS[heat]$ の値が小さい mRNA 種ほど全体の傾向以上にポリソーム形成

が阻害される傾向にあると考えることができる。つまり、 $\Delta PS[\text{heat}]$ の分布の広がり、高温ストレスによる翻訳状態の変化の方向(維持あるいは抑制)や程度が、mRNA 種により様々であることを示している。第一章図 3 において、RT-PCR 法によりポリソームプロファイルを調べた *Hsp81-3*、*RPS18C*、*Act2* は、 $\Delta PS[\text{heat}]$ のランキングを降順に付けた場合(以降、単にランキングと称す)、それぞれ 1274 (上位 6.7%)、14480 (下位 24.2%)、19057 (下位 0.2%)番目に位置した。このことは、*Hsp81-3* mRNA は高温ストレス下においてもポリソーム画分にとどまる一方、*RPS18C* 及び *Act2* mRNA は著しく非ポリソーム画分に移行するという、図 3 の結果と矛盾しない結果がマイクロアレイ解析によって得られていることを示している。

$\Delta PS[\text{heat}]$ ランキングの上位 0.4% ($\Delta PS[\text{heat}] \geq -0.87$)に位置する mRNA 種を表 3 にまとめた。これらの mRNA 種は高温ストレス下においても翻訳が維持されており、更に合成されたタンパク質が高温ストレス応答において重要な役割を果たしている可能性がある。

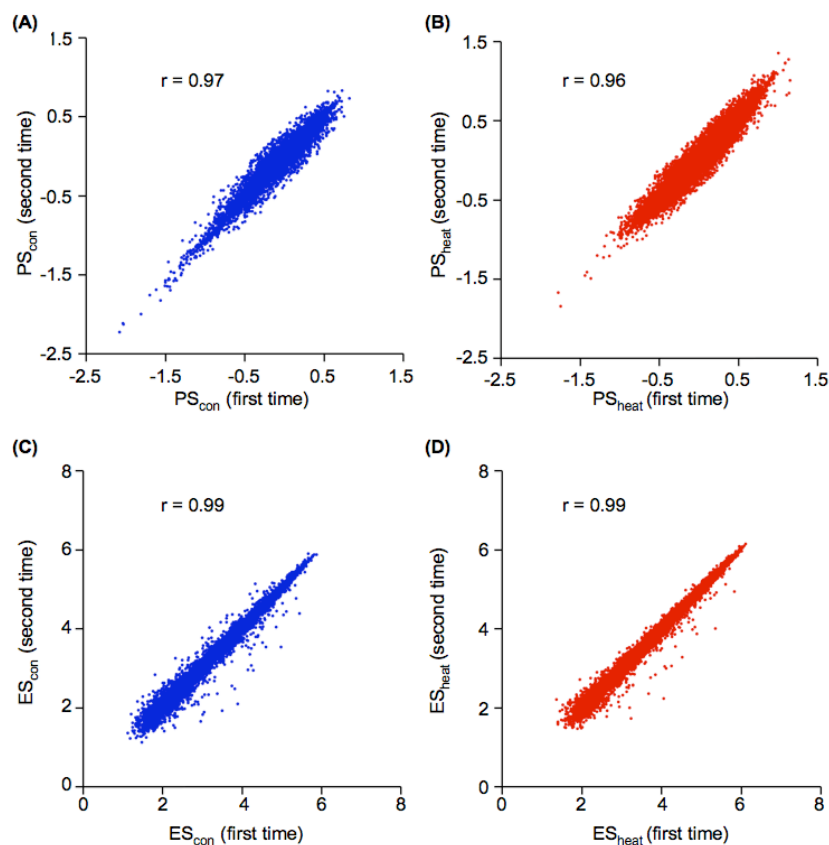


図 20 独立に行った二回のマイクロアレイ実験の再現性評価

独立に行った二回のマイクロアレイ解析から得られた polysome score (PS) (A,B)あるいは expression score (ES) (C,D)の相関図を示す。(A,C)通常細胞由来のデータ。(B,D)高温ストレス処理した細胞由来のデータ。r はピアソン相関係数を示す。いずれも mRNA 種の数 は 19099 種である。

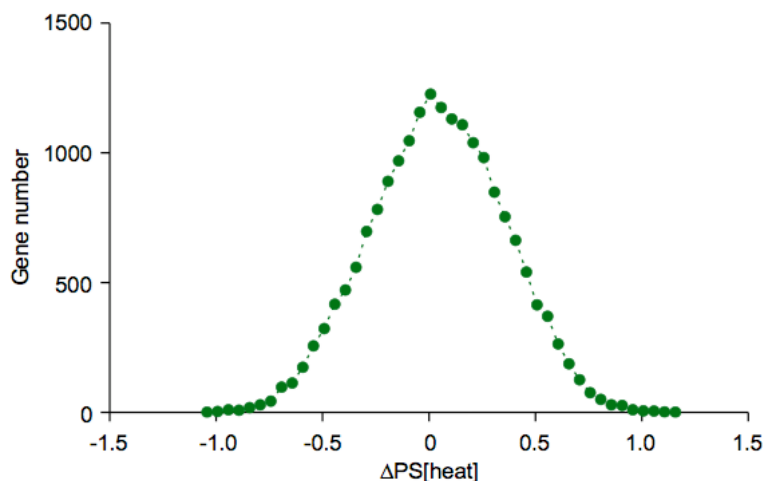


図 21 高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化

高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化を示す指標である $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムを19099種の mRNA について示した。縦軸は遺伝子数(頻度)を表す。

表 3 $\Delta PS[\text{heat}]$ のランキングを降順に付けた場合の上位 0.4%に位置する mRNA 種

AGI code (GeneName)、マイクロアレイ解析から得られた高温ストレスによる翻訳状態の変化を示す指標の値($\Delta PS[\text{heat}]$)、及びアノテーション(Description)を示した。

GeneName	$\Delta PS[\text{heat}]$	Description
At4g14560.1	1.15	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 1 (IAA1)
At4g32060.1	1.10	calcium-binding EF hand family protein
At4g21323.1	1.08	subtilase family protein
At1g22190.1	1.05	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At5g51300.1	1.04	splicing factor-related
AtMg00580	1.02	NADH dehydrogenase subunit 4
At4g10270.1	1.02	wound-responsive family protein
At5g45095.1	1.01	expressed protein
At3g01345.1	0.99	Expressed protein
At5g20150.1	0.98	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
At1g72360.1	0.98	ethylene-responsive element-binding protein, putative
At1g06760.1	0.97	histone H1, putative
At5g59650.1	0.96	leucine-rich repeat protein kinase, putative
At1g36370.1	0.96	glycine hydroxymethyltransferase, putative / serine hydroxymethyltransferase, putative / serine/threonine aldolase, putative
At2g40205.1	0.94	60S ribosomal protein L41 (RPL41C)
At1g65370.1	0.94	mepirin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein
At1g73010.1	0.93	expressed protein
At1g36060.1	0.93	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At1g78100.1	0.93	F-box family protein
At2g18050.1	0.93	histone H1-3 (HIS1-3)
At5g05720.1	0.93	RNA recognition motif (RRM)-containing protein
At4g24265.1	0.92	expressed protein
At1g77760.1	0.91	nitrate reductase 1 (NR1)

At1g70110.1	0.91	lectin protein kinase family protein
At2g02380.1	0.91	glutathione S-transferase, putative
At5g08790.1	0.90	no apical meristem (NAM) family protein
At1g65220.1	0.90	eIF4-gamma/eIF5/eIF2-epsilon domain-containing protein
At2g07777.1	0.90	expressed protein
At4g37390.1	0.90	auxin-responsive GH3 family protein
At3g18300.1	0.90	expressed protein
At2g07687.1	0.89	cytochrome c oxidase subunit 3
At2g39705.1	0.89	expressed protein
At2g18440.1	0.88	expressed protein
At1g47770.1	0.88	hypothetical protein
At5g32161.1	0.88	hypothetical protein
At1g55330.1	0.88	arabinogalactan-protein (AGP21)
At4g20690.1	0.88	hypothetical protein
At2g20670.1	0.88	expressed protein
At1g17345.1	0.87	auxin-responsive protein-related
At3g50350.1	0.87	expressed protein
At3g23170.1	0.87	expressed protein
At1g19394.1	0.87	expressed protein
At5g40090.1	0.87	disease resistance protein-related
At3g02260.1	0.87	auxin transport protein (BIG)
At3g15450.1	0.87	expressed protein
At5g15250.1	0.87	FtsH protease, putative
At1g41650.1	0.87	hypothetical protein
At4g18120.1	0.86	RNA recognition motif (RRM)-containing protein
At5g21940.1	0.86	expressed protein
At1g05040.1	0.86	hypothetical protein
At1g04820.1	0.86	tubulin alpha-2/alpha-4 chain (TUA4)
At2g07698.1	0.86	ATP synthase alpha chain, mitochondrial, putative
At4g05636.1	0.85	hypothetical protein
At2g17036.1	0.85	F-box family protein
At4g15545.1	0.85	expressed protein
At5g24660.1	0.85	expressed protein
At3g10985.1	0.85	wound-responsive protein-related
At2g07779.1	0.84	expressed protein
At4g05640.1	0.84	hypothetical protein
At5g56050.1	0.84	hypothetical protein
At5g21020.2	0.84	expressed protein
At1g35320.1	0.84	expressed protein
AtMg00285	0.84	nad2.1
At4g28240.1	0.83	wound-responsive protein-related wound-induced protein
At3g10120.1	0.83	expressed protein
At5g25560.1	0.83	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At1g22985.1	0.83	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At2g07749.1	0.83	hypothetical protein
At3g04700.1	0.83	expressed protein
At2g25590.1	0.83	agenet domain-containing protein
At4g09880.1	0.82	hypothetical protein
At5g35490.1	0.82	expressed protein (MRU1)
At4g31000.1	0.82	calmodulin-binding protein
At2g07696.1	0.82	ribosomal protein S7 family protein
At5g44930.1	0.82	exostosin family protein

II-III-III. 定量 RT-PCR 法によるマイクロアレイデータの検証

マイクロアレイデータの検証を定量 RT-PCR 法により行った。通常細胞及び高温ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配液を、8 つのフラクションとして回収し、各画分に含まれる個別遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR 法により定量した。マイクロアレイ解析から得られた $\Delta PS[\text{heat}]$ (高温ストレスによる翻訳状態変化を示す指標) を降順に並べた場合に、上位、中位、下位に位置するいくつかの mRNA 種を対照に定量 RT-PCR 解析を行った(図 22)。上位に位置する遺伝子である At4g14560 (ランキング=1), At4g32060 (ランキング=2), At1g06760 (ランキング=12), At2g18050 (ランキング=20) 及び *Hsp81-3* (ランキング=1274) は、高温ストレス下においても大部分の mRNA がポリソーム画分に留まっていた(図 22A)。一方で、下位に位置する遺伝子である At1g07320 (ランキング=19052), At5g63570 (ランキング=19082) 及び *RSP18C* (ランキング=14480) や *Act2* (ランキング=19057) の場合には、高温ストレスにより大部分の mRNA がポリソーム画分から非ポリソーム画分に移行した(図 22C)。中位に位置する遺伝子である At5g26710 (ランキング=9436), At2g28390 (ランキング=9821) の場合には、下位遺伝子ほどではないが、若干の非ポリソーム画分への移行が認められた(図 22B)。通常細胞及び高温ストレス処理した細胞の蓄積転写産物量を定量 RT-PCR 法により調べたところ、*Hsp81-3* に高温ストレス処理による若干の増加が認められた以外、いずれの遺伝子の蓄積 mRNA 量にも顕著な増減は認められなかった(図 24)。従って、高温ストレス下におけるポリソームプロファイルの違いは、蓄積 RNA 量の増減の違いに起因するわけではないと考えられる。マイクロアレイデータから PS_{con} 、 PS_{heat} 、 $\Delta PS[\text{heat}]$ を算出したのと同様に(図 18)、以上の定量 RT-PCR 解析の結果を基に、1-3 番目の画分の 5-7 番目の画分の RNA 量に対する比の対数值(PS_{con} 及び PS_{heat} に相当) 及びその差 $PS_{\text{heat}} - PS_{\text{con}}$ ($\Delta PS[\text{heat}]$ に相当) を算出した。マイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR 解析から得られた PS_{con} 、 PS_{heat} 、 $\Delta PS[\text{heat}]$ の値を表 4 にまとめると同時に、散布図を作成し相関関係の検証を行ったところ(図 23)、いずれの指標値も高い相関を示した(ピアソン相関係数 $r > 0.94$) (図 23)。以上の定量 RT-PCR 解析の結果は、マイクロアレイデータの確からしさを示すものである。

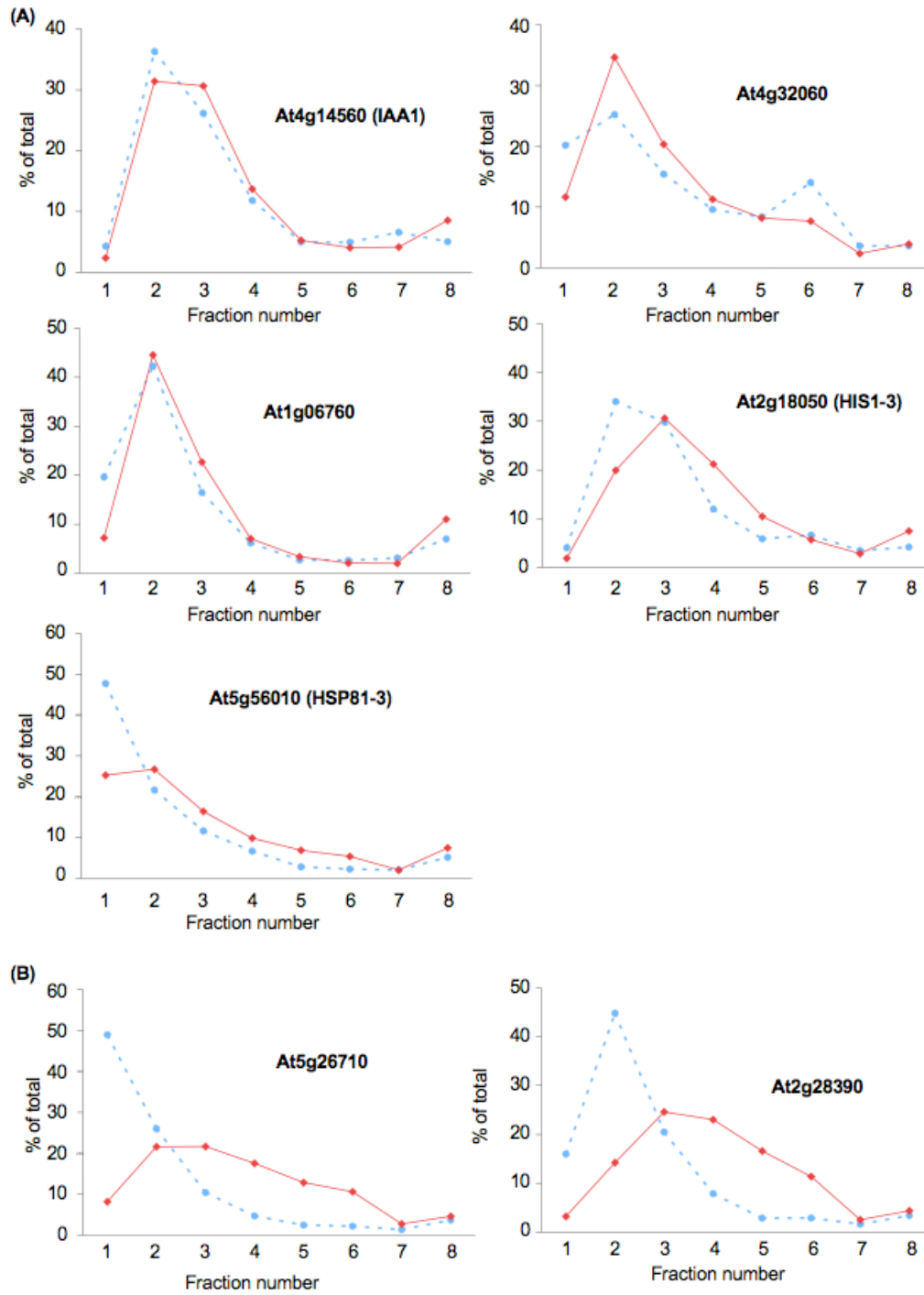


図 22 個別 mRNA のポリソームプロファイル(次ページに続く)

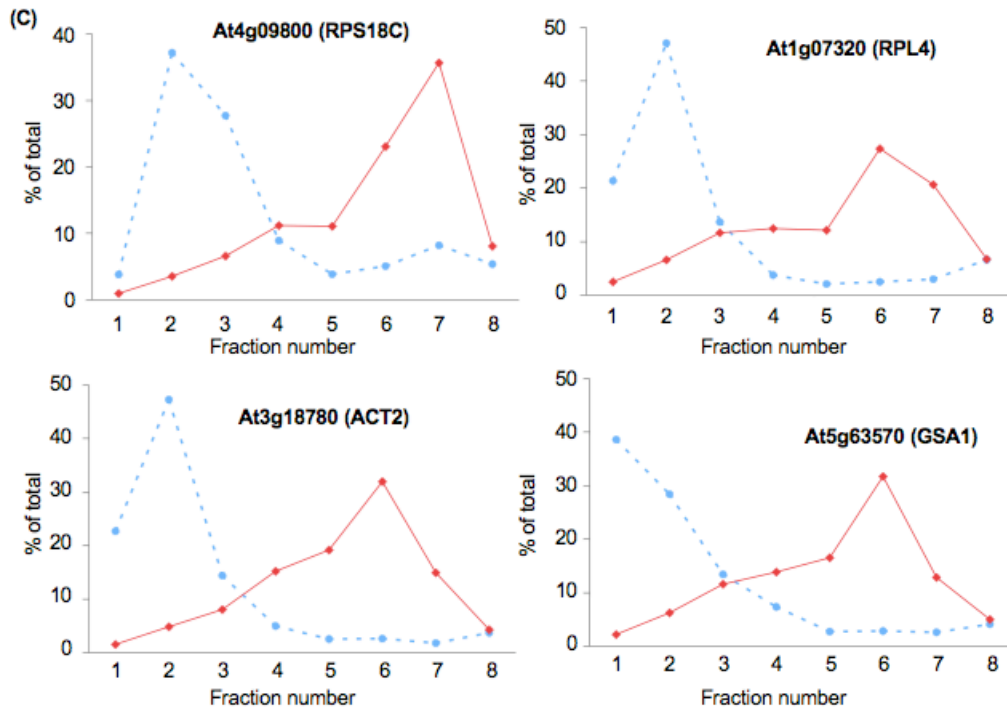


図 22 個別 mRNA のポリソームプロファイル

図 18 に示したのと同様の方法を用いて、通常細胞及び高温ストレス処理した細胞から調製した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画した後、8つの画分に分けて回収した。各画分から RNA を抽出・精製し、等容量を定量 RT-PCR 解析に供した。沈殿方向は 8 番から 1 番の画分の方向である。各画分における特定転写産物量についての結果は、密度勾配液の分画時に各画分に加えたポリ A 付き *in vitro* 合成 RNA (*Renilla luciferase* mRNA) の結果で規格化した(“方法と材料”を参照)。全体の和に対する相対比として図示しており、8つの画分の和は 100%となる。青点線が通常細胞、赤実線が高温ストレス処理した細胞におけるポリソームプロファイルを示す。19099 種の mRNA 内のランキング(降順)を、試験した遺伝子について以下に示す。(A)上位遺伝子—At4g14560 (IAA1):ランキング=1; At4g32060:ランキング=2; At1g06760:ランキング=12; At2g18050 (HIS1-3):ランキング=20; At5g56010 (Hsp81-3):ランキング=1274。(B)中位遺伝子—At5g26710:ランキング=9436; At2g28390:ランキング=9821。(C)下位遺伝子—At4g09800 (RPS18C):ランキング=14480; At1g07320 (RPL4):ランキング=19052; At3g18780 (ACT2):ランキング=19057; At5g63570 (GSA1):ランキング=19082。独立に培養した二種類の細胞を材料に、すべての過程を独立に行った二回の実験から得られた結果の平均を示す。

Gene name	$\Delta PS[\text{heat}]$ ranking out of 19099 mRNA species *	PS_{con}		PS_{heat}		$\Delta PS[\text{heat}]$	
		qRT-PCR	micorarray	qRT-PCR	micorarray	qRT-PCR	micorarray
		At4g14560	1	0.61	-0.32	0.68	0.83
At4g32060	2	0.37	-0.55	0.56	0.55	0.19	1.10
At1g06760	12	0.97	0.02	1.00	0.99	0.03	0.97
At2g18050	20	0.63	-0.26	0.44	0.66	-0.19	0.93
At5g56010 (HSP81-3)	1274	1.06	0.24	0.68	0.73	-0.38	0.49
At5g26710	9436	1.15	0.29	0.29	0.31	-0.85	0.02
At2g28390	9821	1.04	0.17	0.14	0.18	-0.90	0.01
At4g09800 (RPS18C)	14480	0.60	-0.28	-0.80	-0.49	-1.40	-0.21
At1g07320 (RPL4)	19052	1.04	0.31	-0.46	-0.51	-1.50	-0.83
At3g18780 (ACT2)	19057	1.08	0.11	-0.66	-0.73	-1.75	-0.84
At5g63570 (GSA1)	19082	0.99	0.41	-0.48	-0.51	-1.48	-0.93

表 4 マイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR 解析の結果の比較

定量 RT-PCR 解析(qRT-PCR)から得られた個別遺伝子のポリソームプロファイル(図 22)の結果を基に、各遺伝子の PS_{con} 、 PS_{heat} 、 $\Delta PS[\text{heat}]$ を算出し、マイクロアレイ解析から得られた結果とともに示した。

* マイクロアレイデータから得られた $\Delta PS[\text{heat}]$ ランキングを示す。全 mRNA 種の数 は 19099 種である。

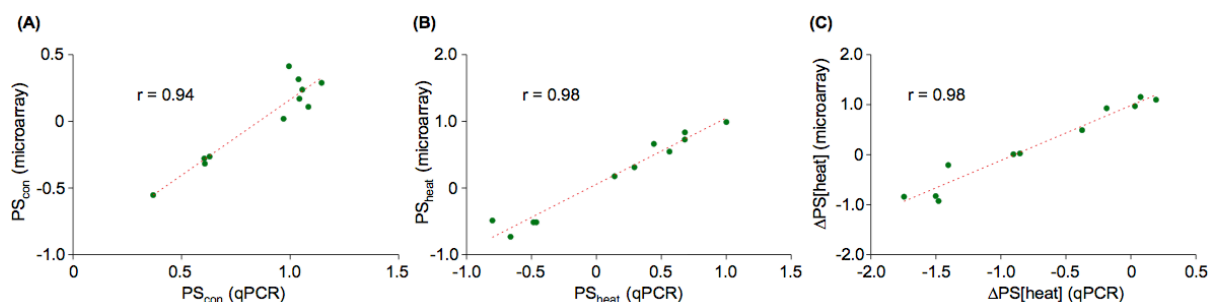


図 23 マイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR 解析の結果の相関

表 4 に示した定量 RT-PCR 解析及びマイクロアレイ解析の結果から算出された PS_{con} (A)、 PS_{heat} (B)、 $\Delta PS[\text{heat}]$ (C)の散布図を示す。横軸が定量 RT-PCR 解析、縦軸がマイクロアレイ解析由来の結果から算出された指標値を示す。r はピアソン相関係数を、赤点線はプロットに対する回帰直線を示す。

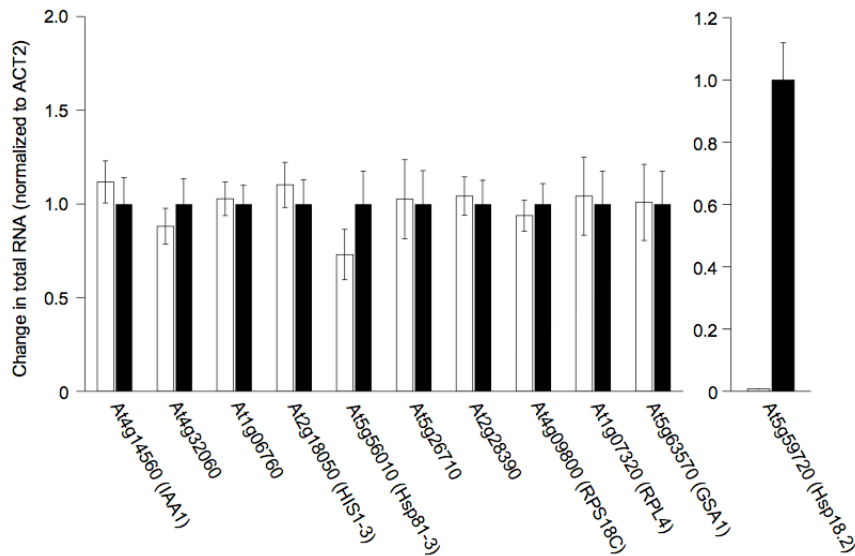


図 24 高温ストレス処理による蓄積 RNA 量の変化

通常細胞及び高温ストレス処理した細胞からトータル RNA を抽出・精製し、定量 RT-PCR 法を用いて、各 mRNA 種の蓄積 RNA 量の定量を行った。各遺伝子に対する結果は、*Act2* の結果で規格化した後、高温ストレス処理した細胞における規格値を 1 とした相対値として示した。白棒は通常細胞由来、黒棒は高温ストレス処理した細胞由来の結果を示す。独立に培養した二種類の細胞から調製した RNA を用いてそれぞれ三回測定した結果の平均値と標準偏差を示す。At5g59720 (*Hsp18.2*) は高温ストレスにより蓄積 mRNA が増大することが知られている遺伝子であり (Kodama et al., 2007)、コントロールとして使用した。

II-III-IV. 高温ストレスにより蓄積 mRNA 量が増大する遺伝子の翻訳状態

ここでは、高温ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の翻訳状態の変化の特徴を検証した。蓄積転写産物量の変化を示す指標としては、先述した $\Delta ES[\text{heat}] (=ES_{\text{heat}} - ES_{\text{con}})$ を利用した (ES: expression score)。 ES_{heat} と ES_{con} は、それぞれ高温ストレス処理した細胞と通常細胞由来のマイクロアレイデータにおける Cy3 (ポリソーム RNA) 及び Cy5 (非ポリソーム RNA) シグナルの和から得られた指標値である。従って、高温ストレスによる expression score の変化率を示す $\Delta ES[\text{heat}]$ は、通常細胞に対する高温ストレス処理した細胞における蓄積転写産物量の割合を示す近似指標と考えることができる (Melamed and Arava, 2007; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005)。図 25 には、全 mRNA 種 ($n=19099$) の $\Delta ES[\text{heat}]$ のヒストグラムを示した。その結果、大部分の mRNA 種が含まれるピークから外れた mRNA 種が少数であるが存在しており ($\Delta ES[\text{heat}] > \sim 1.0$)、これらは高温ストレス処理により蓄積転写産物量が増加した mRNA 種であると考えられる。ここでは、 $\Delta ES[\text{heat}]$ の値が 1.5 以上であった 62 種 (全体の 0.3%) の mRNA を、高温ストレス処理により蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の候補とした (以降熱誘導性 mRNA 種と称す)。これら熱誘導性 mRNA 種には、既知の熱ス

トレス誘導性遺伝子である Hsp17.4 (At3g46230)、Hsp22 (At4g10250)、Hsp17.6A (At5g12030)などの Hsp や HSFA2 (At2g26150)、HSFA7A (At3g51910)、HSFB1 (At4g36990)などの Hsf (heat shock transcription factor)、DREB2A (DRE-binding protein 2A; At5g05410)などが含まれていた。

熱誘導性 mRNA 種の、高温ストレスによるポリソーム形成状態の変化の特徴の解析は、全 mRNA 種(n=19099)及び熱誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムを比較することにより行った(図 26)。仮に熱誘導性 mRNA 種の翻訳状態が、高温ストレス下においても維持される傾向にあれば、熱誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムは、全 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムに対して正の方向に偏ることが期待される。一方、仮に特徴のない平均的な挙動を示す場合には、全 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムとほぼ同様の分布を示すことが期待される。また、顕著に翻訳状態が阻害される傾向にある場合には、全 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムに対して負の方向に偏ることが期待される。ヒストグラムを作成したところ、熱誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ は、全 mRNA の $\Delta PS[\text{heat}]$ とは異なる形状の分布を示した(図 26)。フィッティング解析を行ったところ、熱誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ の分布は、全 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ の分布と重なる分布及び正の方向に偏った分布の二つの正規分布の和として示された(図 26)。以上の解析結果は、熱誘導性 mRNA 種が、高温ストレス下において平均的な挙動を示す mRNA 種の集団と、翻訳状態が維持される傾向にある mRNA 種の集団の、少なくとも二つの集団から構成されていることを示唆している。

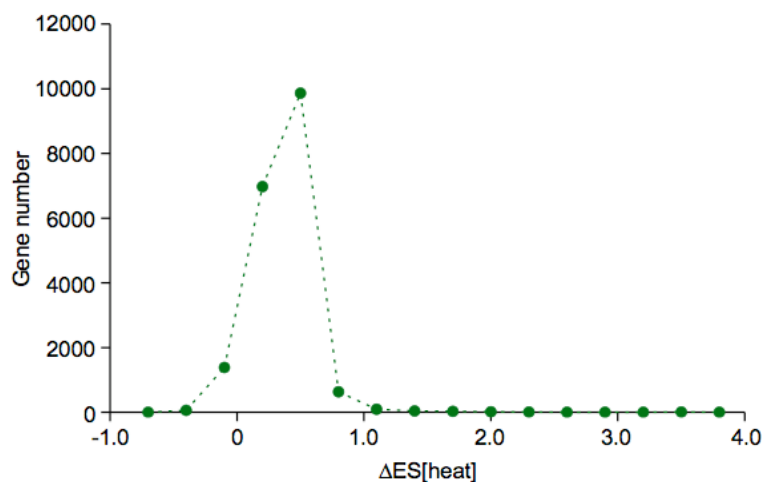


図 25 高温ストレスによる蓄積転写産物量の変化

高温ストレス処理による蓄積転写産物量の変化を示す近似指標である $\Delta ES[\text{heat}]$ のヒストグラムを示した。縦軸は、遺伝子数(頻度)を表す。19099種の mRNA を解析対象としている。

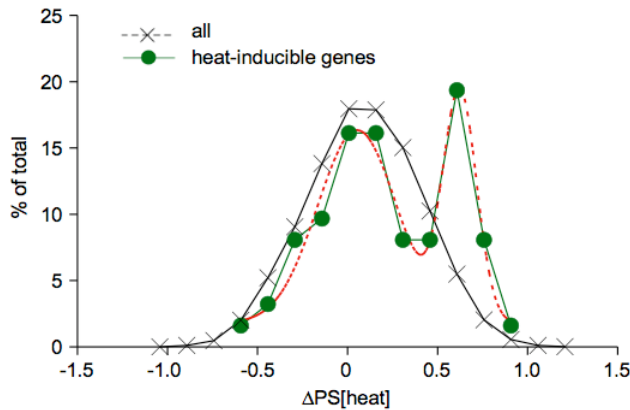


図 26 高温ストレスにより蓄積転写産物量が増加する mRNA 種のポリソーム形成状態の変化 (A) 19099 mRNA 種(all)及び高温ストレスにより蓄積 RNA 量が増加する mRNA 種(heat-inducible genes)の $\Delta PS[\text{heat}]$ のヒストグラムを示した。 $\Delta ES[\text{heat}]$ の値が 1.5 以上であった 62 種類の mRNA (図 25)を高温ストレスにより蓄積 RNA 量が増加する mRNA 種とした。縦軸は遺伝子数(頻度)をすべての点の和に対する割合として示した。heat-inducible genes の分布は二つのガウス曲線の和でフィッティングした(赤点線)。

II-III-V. 塩ストレスによる翻訳の抑制

塩(NaCl)ストレスによっても、シロイヌナズナ培養細胞における新規タンパク質合成の阻害が起こることが報告されている(Ndimba et al., 2005)。本研究においても、塩ストレス処理によりシロイヌナズナ培養細胞における新規タンパク質合成が阻害されるかどうかを、 $^{35}\text{S}\text{-Met}$ を用いたパルスラベル実験によって検証した。200 mM NaCl を含む培地中に培養細胞を 10 分間静置した後に、 $^{35}\text{S}\text{-Met}$ を培養液に添加し、そのまま 15 分間及び 50 分間静置した。NaCl の代わりに DW を加えた以外は通常細胞も塩ストレス処理した細胞と同様に処理した。その結果、15 分及び 50 分のいずれの場合においても、塩ストレス処理による新規合成タンパク質量の減少が認められた(図 27)。wheat germ *in vitro* 翻訳系において、通常細胞及び塩ストレス処理した細胞由来のトータル RNA から新規に合成されるタンパク質量に、*in vivo* ラベル実験(図 27A)において見られた様な顕著な差は認められなかった(図 27B)。また、過去の報告同様(Kouga, 2007)、200 mM NaCl で 10 分間処理することによりポリソーム画分が減少すると共に非ポリソーム画分が増大することが、ポリソーム解析から示された(図 28 の吸光プロファイル)。これらの結果は、200 mM NaCl で 10 分間処理することにより、シロイヌナズナ培養細胞における翻訳(恐らく翻訳の開始)が阻害されることを強く示唆している。200 mM NaCl で 10 分間処理することによる細胞増殖の阻害は若干認められたが、顕著な細胞死は認められなかった(Ishibashi, 2008)。

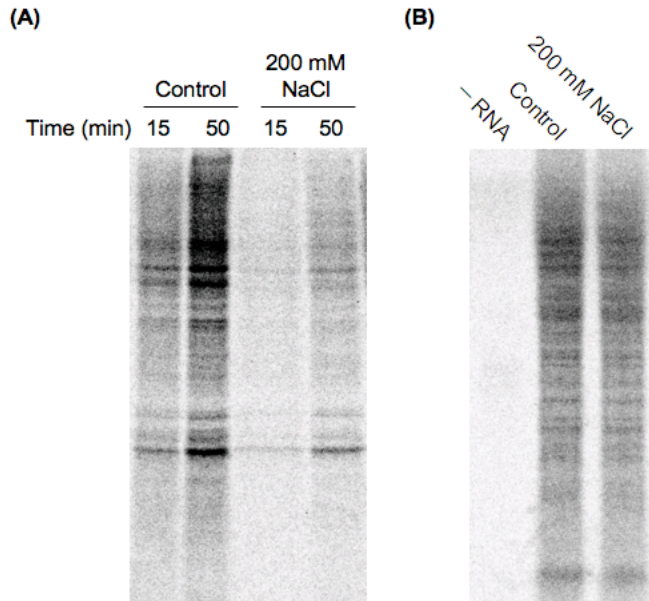


図 27 塩ストレス処理によりタンパク質合成が阻害される

(A) 培養細胞を 200 mM NaCl を含む培地中にて 10 分間静置した後、 ^{35}S -Met で 15 分間もしくは 50 分間ラベルした (200 mM NaCl)。通常細胞も塩ストレス処理を行わない以外は同様に処理した (Control)。回収した細胞に翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを加えた後、細胞の洗浄を行い、粗抽出液を調製した。各粗抽出液の放射活性を一定にして SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) に供した後、オートラジオグラフィーによる検出を行った。(B) 通常細胞 (Control) 及び 200 mM NaCl で 10 分間処理した細胞 (200 mM NaCl) から抽出したトータル RNA を、 ^{35}S -Met を加えた wheat germ *in vitro* 翻訳系にて翻訳させた。左端のレーンは、RNA の代わりに DW を加えたコントロールである (-RNA)。翻訳反応は 25°C で 30 分間行った。反応後、等容量のサンプルを SDS-PAGE (ゲル濃度 15%) に供し、オートラジオグラフィーによる検出を行った。

II-III-VI. 塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する

先述した高温ストレスに続いて、塩ストレス (200 mM NaCl/10 min) によるポリソーム形成状態の変化を、Arabidopsis 3 oligo microarray 44K (Agilent Technologies) を用いて、ゲノムワイドに解析した (図 28)。塩ストレス実験においても、独立に培養した二種類の培養細胞を用いた繰り返し実験を行った (two biological replicate)。四回のハイブリダイゼーション実験すべてにおいて、シグナル強度や再現性等に関する設定基準を満たした 20365 種の mRNA を以降の解析に用いた (“方法と材料” を参照)。

まず、spike-in RNA を用いてマイクロアレイデータを正規化し、ポリソーム画分に存在する mRNA の割合 (%) を示す polysome ratio (PR) ($\text{Cy}3/[\text{Cy}3+\text{Cy}5]$ に相当) の、塩ストレス処理による変化を検証した。通常細胞及び塩ストレス細胞における全 20365 mRNA 種の PR のヒストグラムを作成したところ、高温ストレスの場合と同様、塩ストレスにより分布の幅が

広がるのと同時に、分布が負の方向に偏ることが解った(図 29A)。通常細胞における平均 PR は 84.7%であったのに対し、塩ストレス処理した細胞における平均 PR は 72.5%であった。この結果は、37°C、10 分間の高温ストレス処理に比べると阻害の程度は低いものの(図 19)、塩ストレスによっても全体的なポリソーム形成の阻害が起きていることを示している。塩ストレス処理によりポリソーム形成が阻害されること及び阻害の程度が高温ストレスの場合と比較すると弱いことは、先述した吸光プロファイルが示す全体の傾向からも同様に認められる(図 18 and 図 28 の吸光プロファイル)。続いて、翻訳状態(Cy3/Cy5 に相当)を示す指標である polysome score PS_{con} (通常細胞)と PS_{NaCl} (塩ストレス処理した細胞)の散布図を基に、塩ストレスによる個々の mRNA 種の翻訳状態の変化を検証した(図 29B)。大部分の mRNA 種のスポットは $PS_{con} > PS_{NaCl}$ の領域に存在していたことから(図 29B; 赤点線より下)、大部分の mRNA 種のポリソーム形成が塩ストレスにより阻害されていることが明らかとなった。一方で、少数ではあるが、塩ストレス下においてもポリソーム形成状態が維持もしくは活性化される mRNA も存在していた(図 29B; 赤点線より上)。

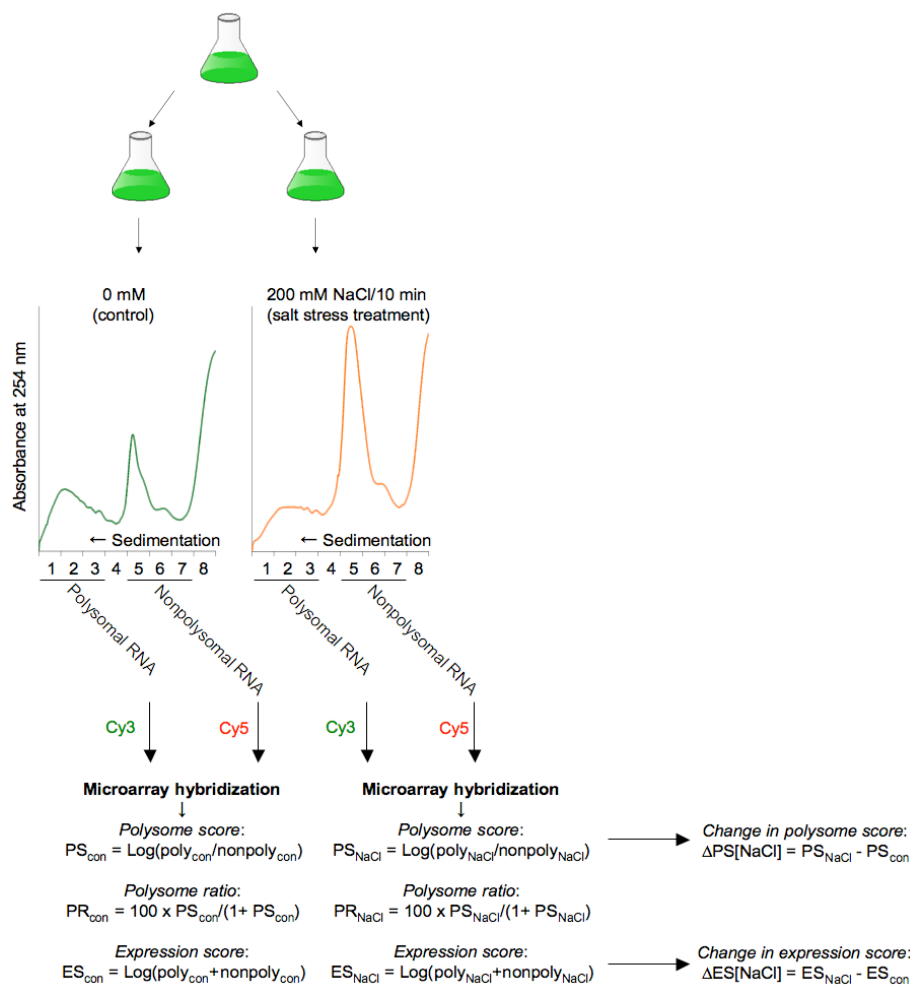


図 28 塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する方法

同一の培養細胞を分割し、ストレス処理を行わない通常細胞(control)及び 200 mM NaCl/10 分の塩ストレス処理を行った細胞(salt stress treatment)を調製した。両細胞から調製した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心(15-60%)により分画した後、RNA の分布を見積もるために 254 nm の吸光プロファイルを記録した。沈殿方向は右から左である。密度勾配を 8 つの画分に分画した場合の 1-3 番目の画分の混合液から polysomal RNA を、5-7 番目の画分の混合液から nonpolysomal RNA を抽出・精製し、それぞれの RNA を鋳型に Cy3、Cy5 で蛍光標識した aRNA を調製後、マイクロアレイハイブリダイゼーション実験に供した (*Arabidopsis* 3 oligo microarray 44K [Agilent Technologies])。個々の mRNA 種の、nonpolysomal RNA に対する polysomal RNA の対数比 (polysome score) を、通常細胞 (PS_{con}) 及び塩ストレス処理した細胞 (PS_{NaCl}) について算出した。 $\Delta PS[NaCl]$ は塩ストレス処理による polysome score の変化を示す指標である。また、polysomal RNA と nonpolysomal RNA の和に対する polysomal RNA の割合を示す指標 (polysome ratio) を、通常細胞 (PR_{con}) 及び塩ストレス処理した細胞 (PR_{NaCl}) について算出した。加えて、Cy3 シグナル値及び Cy5 シグナル値の和の対数値 (expression score) を、通常細胞 (ES_{con}) 及び塩ストレス処理した細胞 (ES_{NaCl}) について算出した。 $\Delta ES[NaCl]$ は塩ストレス処理による expression score の変化を示す指標である。独立に培養した二種類の培養細胞を用いて繰り返し実験を行った (two biological replicate)。

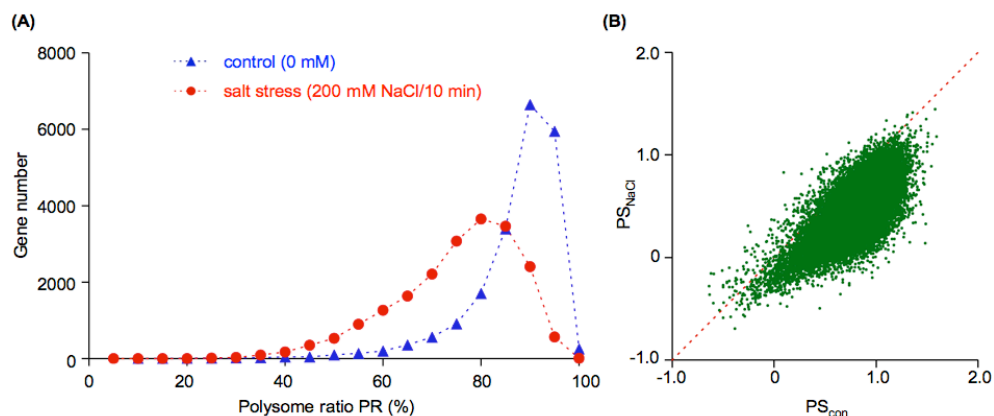


図 29 塩ストレスにより大部分の mRNA のポリソーム形成が阻害される

(A)通常細胞(control)及び塩ストレス処理した細胞(salt stress)における各 mRNA 種の polysome ratio (PR; 図 28 を参照)のヒストグラムを示す。Polysome ratio は polysome RNA と nonpolysome RNA の和に対する polysome RNA の割合を示す指標である。縦軸は遺伝子数(頻度)を示す。(B)翻訳状態を示す指標である PS_{con} と PS_{NaCl} の散布図を示す。赤色の点線は PS_{con} と PS_{NaCl} が等しい点を示す。mRNA 種の数 は 20365 種である(A,B)。

以降の解析は、全体のシグナルを利用した Linear&LOWESS 法により正規化したマイクロアレイデータを基に行った。高温ストレス実験の場合と同様の方法で、polysome score 及び expression score を算出した(図 28)。算出された指標値 PS_{con} 、 PS_{NaCl} 、 ES_{con} 、 ES_{NaCl} それぞれについて、独立に行った二回の実験から得られた指標値の散布図を作成した(図 30)。その結果、いずれの指標値も二回の実験間において高い相関性(決定係数 $R^2 > 0.89$)を示したことから、再現性の高い結果が得られていると判断した(図 30)。それぞれの指標値について、二回の実験の平均値を算出した後、塩ストレスによる翻訳状態の変化を示す指標としての $\Delta PS[NaCl]$ を、蓄積転写産物量の変化を示す指標としての $\Delta ES[NaCl]$ をそれぞれ算出した(図 28)。全 mRNA 種 ($n=20365$) の $\Delta PS[NaCl]$ のヒストグラムは、 $\Delta PS[heat]$ のヒストグラム(図 21)と比較すると分布の幅は狭いものの、 $\Delta PS[heat]$ の場合と同様に 0 近傍を中心とする正規様の分布を示した(図 31)。このことは、塩ストレス処理により大部分の mRNA 種のポリソーム形成は阻害されるものの、維持される傾向にある mRNA 種から極端に阻害される傾向にある mRNA 種まで、変化の方向や程度が、mRNA 種により様々であることを示している。つまり、ゲノムワイドに捉えた塩ストレスによる翻訳状態の変化の全体像は、高温ストレスの場合と類似していることが明らかとなった。

$\Delta PS[NaCl]$ のランキングの上位 0.4% ($\Delta PS[NaCl] \geq -0.82$) に位置する mRNA 種を表 5 にまとめた。これらの mRNA 種は塩ストレス下においても翻訳が維持されており、更に合成されたタンパク質が塩ストレス応答において重要な役割を果たしている可能性がある。

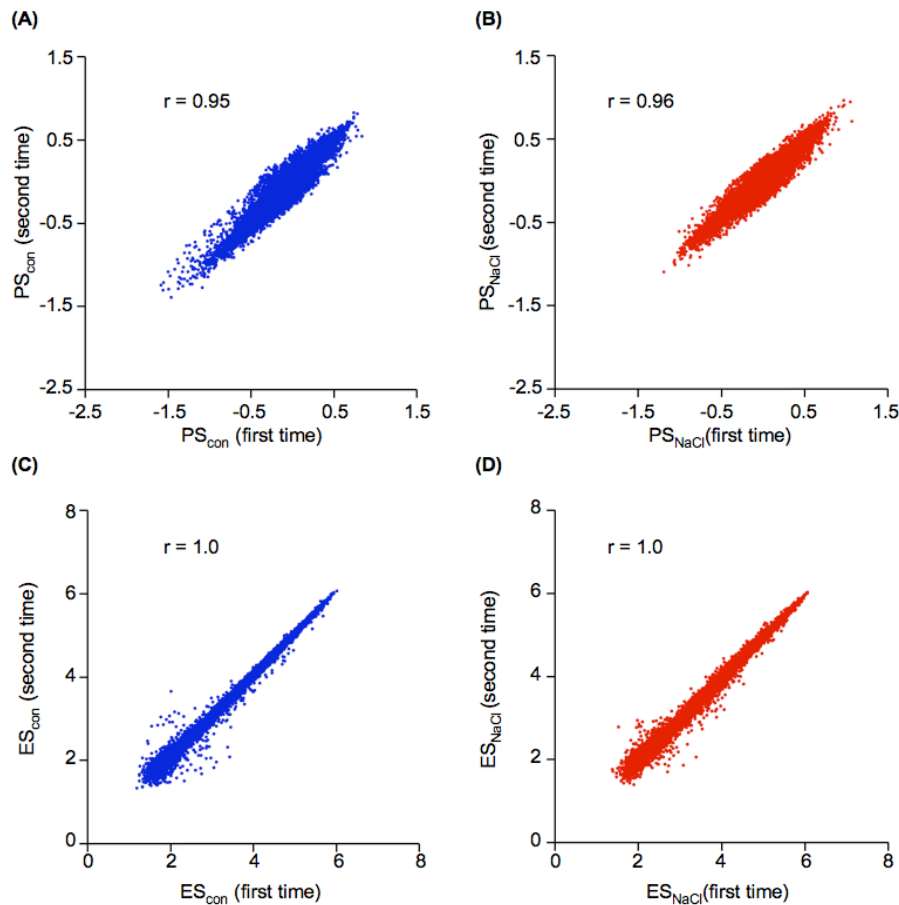


図 30 独立に行った二回のマイクロアレイ実験の再現性評価

独立に行った二回のマイクロアレイ解析から得られた polysome score (PS) (A,B)あるいは expression score (ES) (C,D)の相関図を示す。(A,C)通常細胞由来のデータ。(B,D)塩ストレス処理した細胞由来のデータ。r はピアソン相関係数を表す。いずれも mRNA 種のは数は 20365 種である。

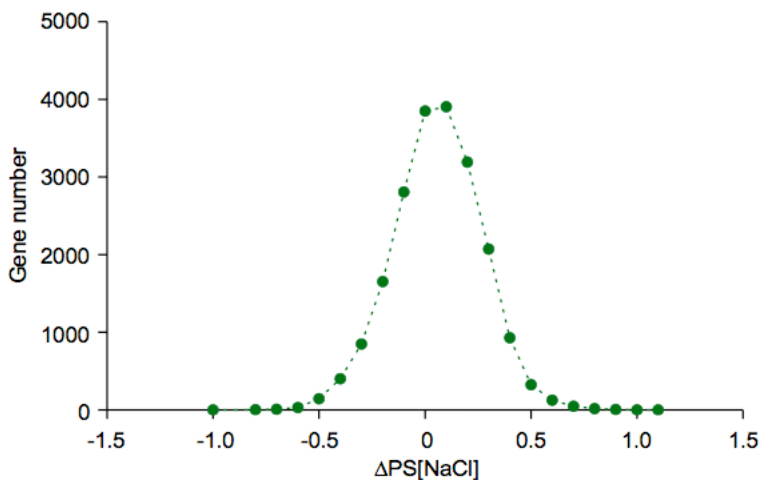


図 31 塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化

塩ストレス処理によるポリソーム形成状態の変化を示す指標である $\Delta PS[NaCl]$ のヒストグラムを 20365 種の mRNA について示した。縦軸は遺伝子数(頻度)を表す。

表 5 Δ PS[NaCl]のランキングを降順に付けた場合の上位 0.4%に位置する mRNA 種

AGI code (GeneName)、マイクロアレイ解析から得られた塩ストレスによる翻訳状態の変化を示す指標の値(Δ PS[NaCl])、及びアノテーション(Description)を示した。

GeneName	Δ PS[NaCl]	Description
At2g16260.1	1.08	glycine-rich RNA-binding protein, putative
At2g07728.1	0.91	expressed protein
At5g42750.1	0.90	expressed protein
At3g05370.1	0.84	disease resistance family protein
At3g20690.1	0.84	F-box protein-related
At3g47110.1	0.83	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At1g41650.1	0.81	hypothetical protein
At4g05636.1	0.78	hypothetical protein
AtMg00580	0.75	NADH dehydrogenase subunit 4
At1g45248.2	0.74	hypothetical protein
At1g78100.1	0.74	F-box family protein
At2g07695.1	0.73	cytochrome c oxidase subunit II, putative
At5g65790.1	0.73	myb family transcription factor (MYB68)
At4g05640.1	0.73	hypothetical protein
At1g65040.1	0.73	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
At5g43620.1	0.72	S-locus protein-related
At3g05650.1	0.72	disease resistance family protein
At5g44316.1	0.72	ATP-binding-cassette transporter, putative
At1g22190.1	0.72	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At4g39560.1	0.71	kelch repeat-containing F-box family protein
At5g21020.2	0.71	expressed protein
At5g12050.1	0.70	expressed protein
At1g30920.1	0.70	F-box family protein
At4g24690.1	0.70	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domain-containing protein
At2g26160.1	0.70	F-box family protein
At4g13820.1	0.70	disease resistance family protein / LRR family protein
At1g32700.1	0.70	zinc-binding family protein
At2g07698.1	0.70	ATP synthase alpha chain, mitochondrial, putative
At5g45095.1	0.69	expressed protein
At1g21910.1	0.69	AP2 domain-containing transcription factor family protein
At3g51740.1	0.69	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At2g07774.1	0.69	expressed protein
At1g66500.1	0.68	zinc finger (C2H2-type) family protein
At3g01345.1	0.68	Expressed protein
At1g35710.1	0.68	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At1g74940.1	0.67	senescence-associated protein-related
At5g56520.1	0.67	expressed protein
At2g07687.1	0.66	cytochrome c oxidase subunit 3
At4g02540.1	0.66	DC1 domain-containing protein
At2g02700.1	0.66	DC1 domain-containing protein
At5g20150.1	0.65	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
At2g07787.1	0.65	expressed protein
At3g19680.1	0.65	expressed protein
At2g38590.1	0.65	F-box family protein
At4g14560.1	0.65	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 1 (IAA1)
At2g07779.1	0.64	expressed protein

At1g61840.1	0.64	DCI domain-containing protein
At2g07751.1	0.64	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3, putative
At1g58602.1	0.64	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative
At2g07707.1	0.64	hypothetical protein
At5g39610.1	0.64	no apical meristem (NAM) family protein
At3g18570.1	0.64	glycine-rich protein / oleosin
At3g29340.1	0.64	zinc finger (C2H2 type) family protein
At1g76600.1	0.63	expressed protein
At4g11200.1	0.63	hypothetical protein
At4g14980.1	0.63	DCI domain-containing protein
At2g07689.1	0.63	NADH-ubiquinone oxidoreductase, putative
At5g59990.1	0.62	expressed protein
At3g13310.1	0.62	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
At2g07696.1	0.62	ribosomal protein S7 family protein
At5g51300.1	0.62	splicing factor-related
At3g47600.1	0.62	myb family transcription factor (MYB94)
At3g10120.1	0.62	expressed protein
At2g18440.1	0.61	expressed protein
At2g07675.1	0.61	ribosomal protein S12 mitochondrial family protein
At2g40095.1	0.61	expressed protein
At1g69070.1	0.61	expressed protein
At5g25190.1	0.60	ethylene-responsive element-binding protein, putative
At1g10330.1	0.60	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
At3g58810.1	0.60	zinc transporter, putative
At3g25700.1	0.60	chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related
At2g07718.1	0.60	cytochrome b, putative
At2g40200.1	0.60	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At1g06160.1	0.60	ethylene-responsive factor, putative
At2g07725.1	0.59	60S ribosomal protein L5 (RPL5)
At1g70620.1	0.59	cyclin-related
At2g07777.1	0.59	expressed protein
At2g07679.1	0.59	ribosomal protein, putative
At4g31000.1	0.59	calmodulin-binding protein
At2g07776.2	0.58	hypothetical protein
At4g00040.1	0.58	chalcone and stilbene synthase family protein

II-III-VII. 塩ストレスにより蓄積 mRNA 量が増大する遺伝子の翻訳状態

塩ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の翻訳状態の変化の特徴を検証した。高温ストレスの場合と同様、塩ストレスによる蓄積転写産物量の変化を示す指標として $\Delta ES[NaCl]$ ($=ES_{NaCl} - ES_{con}$)を使用した。図 32 には、全 20365 mRNA 種の $\Delta ES[NaCl]$ のヒストグラムを示した。高温ストレスの場合と同様、大部分の mRNA 種が含まれるピークから外れた少数の mRNA の存在が認められた。ここでは、 $\Delta ES[NaCl]$ の値が 1.1 以上であった 67 種の mRNA(全体の 0.3%)を、塩ストレス処理により蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の候補とした(以降塩誘導性 mRNA 種と称す)。これら塩誘導性 mRNA 種の、塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化の特徴の解析は、全 mRNA 種($n=20365$)及び塩誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[NaCl]$ のヒストグラムを比較することにより行った(図 33)。その結果、塩誘導性 mRNA 種の $\Delta PS[NaCl]$ の分布には二つの特徴が認められた。一つ目が、全 mRNA 種

(n=20365)の $\Delta PS[NaCl]$ の分布に対し負の方向に偏っていること、二つ目が、分布の形状が正規様の分布ではなく正の方向に裾が伸びた非対称な形状であったことである。このことは、塩誘導性 mRNA 種には、塩ストレスによりポリソーム形成が極端に阻害される傾向にある集団と、全体的な傾向と同程度に阻害されるあるいは維持される傾向にある集団が混在していることを示唆している。

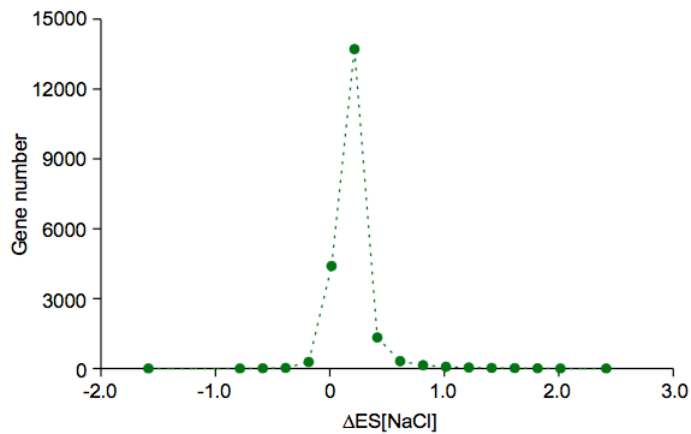


図 32 塩ストレスによる蓄積転写産物量の変化

塩ストレス処理による蓄積転写産物量の変化を示す近似指標である $\Delta ES[NaCl]$ のヒストグラムを示した。縦軸は、遺伝子数(頻度)を表す。20365 種の mRNA を解析対象としている。

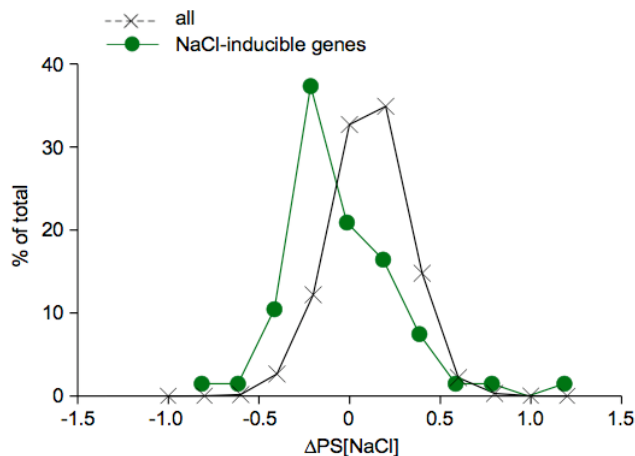


図 33 塩ストレスにより蓄積転写産物量が増加する mRNA 種のポリソーム形成状態の変化

(A) 20365 mRNA 種(all)及び塩ストレスにより蓄積転写産物量が増加する mRNA 種(NaCl-inducible genes)の $\Delta PS[NaCl]$ のヒストグラムを示す。 $\Delta ES[NaCl]$ の値が 1.1 以上であった 67 種類の mRNA (図 32)を塩ストレスにより蓄積転写産物量が増加する mRNA 種とした。縦軸は遺伝子数(頻度)をすべての点の和に対する割合として示した。

II-III-VIII. 高温及び塩ストレスによる翻訳状態変化のゲノムワイドな比較

続いては、高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化の比較を行った。まず、いずれも正規様の分布を示した $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の中身、つまり各種 mRNA の分布様式を比較するために、 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の散布図(相関図)を作成した(図 34)。比較には、高温及び塩ストレス実験のいずれにおいても解析対象となった 18692 種の mRNA を用いた。その結果、 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の間には正の相関関係が存在することが明らかとなった(ピアソン相関係数 $r=0.65$) (図 34)。高温及び塩ストレス下における翻訳状態を示す指標である PS_{heat} と PS_{NaCl} にも正の相関関係が存在することも確認した(ピアソン相関係数 $r=0.76$) (data not shown)。こうした結果は、 $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の正規様の分布の中身、つまり分布を構成している mRNA 種の分布が非常に類似していることを示している。実際、表 3 及び表 5 に示した $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ ランキングのそれぞれ上位 0.4%に位置する mRNA 種を比較した場合、約 25%と非常に高い割合の mRNA 種が一致していた。以上の結果は、高温及び塩ストレスによる個々の mRNA 種の翻訳状態の変化が、ゲノムスケールで見ると非常に類似していることを示している。

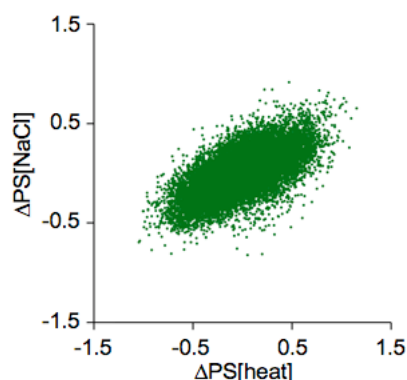


図 34 高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化の相関

高温及び塩ストレス実験由来のマイクロアレイデータのいずれにおいても解析の対象となった 18692 種の mRNA の $\Delta PS[\text{heat}]$ (横軸)と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ (縦軸)の散布図を示す。 $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ はそれぞれ高温及び塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化を示す指標である。 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ のピアソン相関係数 r は 0.65 であった。

II-III-IX. 類似機能を有するタンパク質をコードしている mRNA 種の集団としての挙動の解析

高温あるいは塩ストレスによる各 mRNA 種のポリソーム形成状態の変化を示す指標である ΔPS のヒストグラムは、正規様の分布を示すことは先に述べた(図 21 and 図 31)。平均的な挙動を示すつまりポリソーム形成が阻害される mRNA 種は、分布の中心点付近に位置する。一方で、平均的な挙動とは異なる、特徴的な挙動を示す mRNA 種、つまりポリソーム形成が極端に阻害されるあるいは維持される傾向にある mRNA 種は、分布の負の方向あるいは正の方向にそれぞれ位置すると考えられる。以上のことを踏まえた上で、高温及び塩ストレスによるポリソーム形成状態の変化の特徴を検証するために、続いて、類似した機能を有するタンパク質をコードする mRNA 群(以降、機能集団と称する)の集団としての挙動を調べた。仮に集団として特徴的な挙動を示す機能集団が存在するとすれば、その機能集団に含まれる mRNA 種の ΔPS の分布は、全 mRNA 種の分布(図 21 and 図 31)に対して、正もしくは負の方向に偏ることが予想される。一方で、特徴的な挙動を示さない機能集団の ΔPS の分布は全 mRNA 種の分布とほぼ重なると考えられる。こうした観点から、特徴的な挙動を示す機能集団、つまり特異な翻訳制御を受けている可能性のある機能集団の探索を行った。こうした機能集団の挙動は、植物のストレス応答における翻訳制御の重要性や意義を理解する上で有益な情報となることが期待される。機能集団の ΔPS の分布の、全 mRNA 種の ΔPS の分布に対する偏りの有無は、それぞれの ΔPS の平均値の有意差を検定(z 検定; $p < 0.01$ [片側])することにより検証した。

前述の 18692 種の mRNA から同一の AGI コードを持つ mRNA 種(e.x. AT5G24760.1 and AT5G24760.2)を除いた 18226 種の mRNA を、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004)に従って機能ごとに分類した。MIPS FunCat の分類項目は階層構造になっている(表 6)。少なくとも一つの mRNA 種が分類された項目は、全部で 668 存在した(表 6)。この 668 の機能集団に対して有意差検定を行ったところ、集団の平均 ΔPS が全 18226 種の mRNA の平均 ΔPS よりも有意に大きかった機能集団は、高温及び塩ストレス下のいずれにおいても 48 種存在し、その内 34 種が両ストレス下において共通に認められた(図 35A)。逆に、有意に小さかった機能集団は、高温ストレス下において 66 種、塩ストレス下において 127 種認められ、その内 34 種が両ストレス下において共通に認められた(図 35B)。高温ストレス下のみ、塩ストレス下のみ、あるいは両ストレス下において、集団の平均 ΔPS が全 18226 種の mRNA の平均 ΔPS よりも有意に大きかった機能集団をそれぞれカテゴリー I, II, III、有意に小さかった機能集団をそれぞれカテゴリー IV, V, VI とした(図 35A)。図 36A-F には例として、それぞれのカテゴリーに含まれる一つの機能集団の ΔPS のヒストグラムを、全 mRNA 種($n=18226$)の ΔPS のヒストグ

ラムと共に示した。例えば、カテゴリ-Iに含まれる機能集団 *32.07.07.03 glutathione conjugation reaction* に属する mRNA 種の Δ PS の分布(平均値)は、全 mRNA 種(n=18226)の Δ PS の分布(平均値)に対して有意に正の方向にずれていた(図 36A)。一方で、塩ストレス下においては、そうした分布のずれは認められなかった(図 36A)。図 36 に示した例以外の各カテゴリに含まれる機能集団のリストは、表 7-表 12 にまとめて示した。すべての機能集団に関する検定の結果は、表 6 にまとめて示した。

高温及び塩ストレス下のいずれにおいても、ポリソーム形成状態が維持される傾向にある機能集団(図 35 カテゴリ-III and 表 9)あるいは極端にポリソーム形成が阻害される傾向にある機能集団(図 35 カテゴリ-VI and 表 12)の存在は、翻訳状態の変化をゲノムスケールで比較した場合と同様(図 34)、両ストレス下における翻訳制御が類似していることを示唆している。機能集団の挙動の解析からは、ストレス特異的な翻訳制御が存在する可能性も示唆された。この可能性は、どちらかのストレス下においてのみ、ポリソーム形成状態が維持される傾向にある機能集団(図 35 カテゴリ-I&II, 表 7, and 表 8)あるいは極端にポリソーム形成が阻害される傾向にある機能集団(図 35 カテゴリ-VI&V, 表 10, and 表 11)の存在に裏付けされる。

高温及び/あるいは塩ストレス下において、ポリソーム形成が極端に阻害される傾向にあるカテゴリ-IV から VI には、*01 METABOLISM* 及び *02 ENERGY* の下位階層に存在する、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、二次代謝産物などの代謝や解糖系などのエネルギー代謝に関連する、つまり基本代謝に関連する機能集団が数多く含まれていた(表 10-表 12)。中でも両ストレス下においてポリソーム形成が極端に阻害されていた機能集団を含むカテゴリ-VI には、リボソームタンパク質、翻訳伸長因子をはじめとしたタンパク質の翻訳に関連する機能集団が含まれていた(e.g. *12.01.01 ribosomal protein*, *12.04.02 translation elongation*; 表 12)。タンパク質合成に関連する遺伝子の極端な翻訳抑制は、ショ糖飢餓のシロイヌナズナ培養細胞(Nicolai et al., 2006)や脱水ストレスあるいは低酸素ストレス下のシロイヌナズナ(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Branco-price et al., 2005)、アミノ酸飢餓状態の酵母(Smirnova et al., 2005)などにおいても認められている。一般的に、ribosomal protein の合成の抑制は、エネルギーを消費する翻訳を抑制することによるエネルギーの節約に寄与していると考えられている。

高温及び塩の両ストレス下においても、ポリソーム形成が維持される傾向にある機能集団(カテゴリ-III, 表 9)には、転写に関連する機能集団が含まれていた(*11 TRANSCRIPTION* 及びその下位階層)。環境ストレス応答における転写制御の重要性は広く知られている。また、環境ストレス応答において重要な役割を果たしていることが知られているオーキシンやアブシジン酸といったホルモンを介した応答に関連する機能集団も含まれていた

(36.20.18 plant hormonal regulation 及びその下位階層; 表 9)。興味深い事に、Hsp ファミリーに属する mRNA 種の平均 Δ PS も、高温及び塩ストレス下のいずれにおいても、全 18226 種の mRNA の平均 Δ PS よりも有意に大きく、カテゴリ-III に含まれた。Hsp ファミリーは、高温ストレスのみならず様々な環境ストレス下において重要な役割を果たしていることが知られている。図 37 には、 Δ PS に従って全 mRNA 種を降順に並べた場合の、Hsp ファミリー遺伝子の分布を示した。高温及び塩ストレス下のいずれにおいても正の方向に偏って分布していることが解る。

以上の様な、代謝やエネルギー、翻訳、転写、ホルモンに関連する遺伝子群や Hsp ファミリーの集団が特徴的な挙動を示したことは、植物の環境ストレス応答における翻訳制御の重要性を示唆していると考えられる。

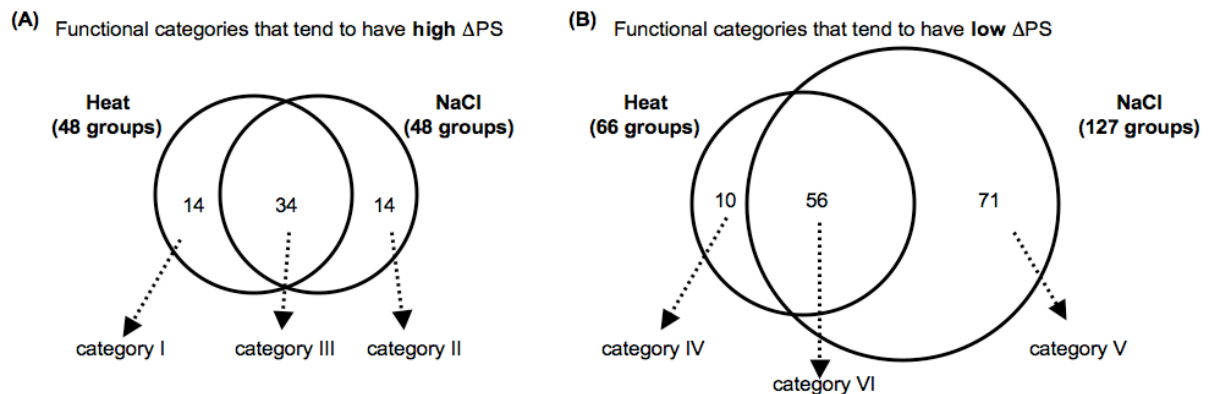


図 35 高温及び塩ストレス下において特徴的な翻訳状態変化を示す機能集団の数

ベン図は、高温あるいは塩ストレス下において、機能集団に属する mRNA 種の平均 Δ PS が、全 mRNA 種(n=18226)の平均 Δ PS よりも有意に大きい(A)もしくは小さい(B)機能集団の数を示す。有意差の検定には z 検定(片側)を用いた(p<0.01)。高温及び塩ストレス実験由来のマイクロアレイデータのいずれにおいても解析の対象となった 18226 種の mRNA を、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004)に従って機能分類したものを機能集団と定義している。18226 種の mRNA からは、同一の AGI code を持つ mRNA は除いてある(e.x. AT5G24760.1 and AT5G24760.2)。図示したベン図解析の結果に応じて、機能集団をカテゴリ-I から VI に分類した。各カテゴリに含まれる機能集団は、表 7 から表 12 にそれぞれ示した。

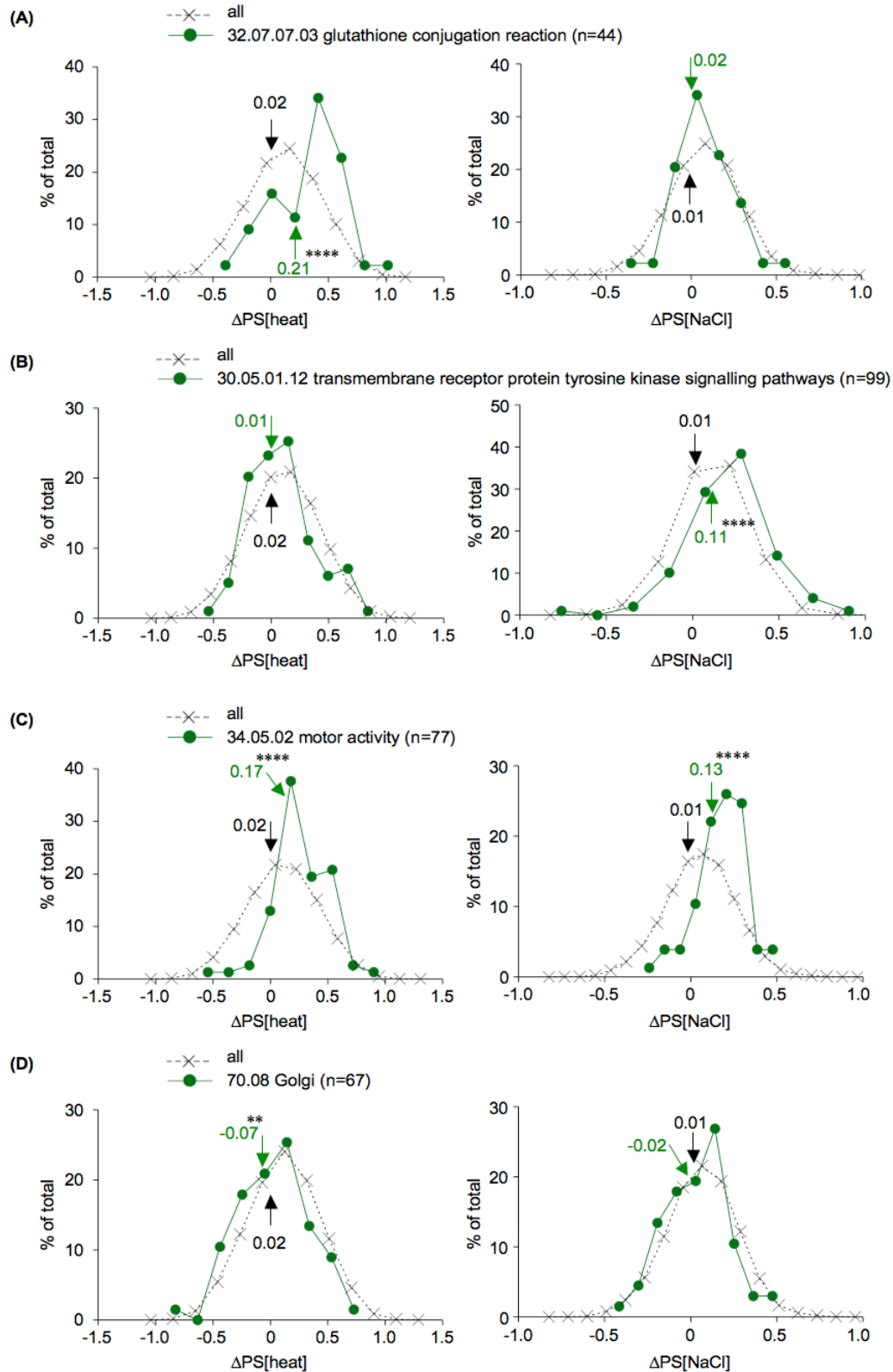


図 36 全 mRNA 種と機能集団に属する mRNA 種の ΔPS のヒストグラムの比較(次ページに続く)

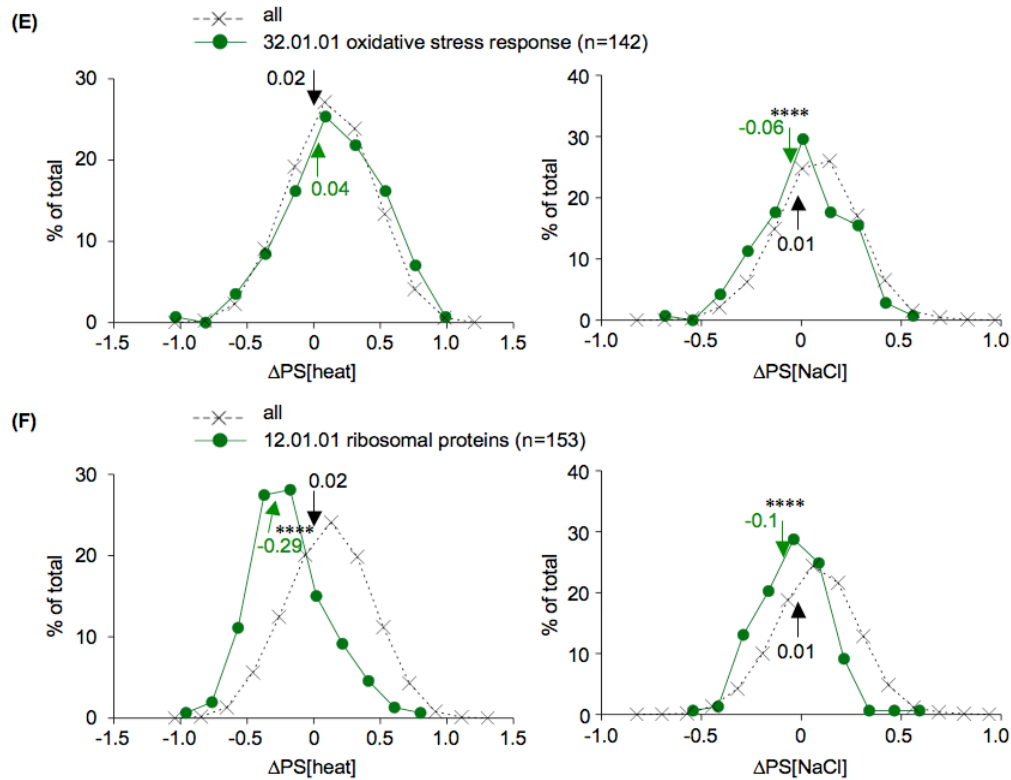


図 36 全 mRNA 種と機能集団に属する mRNA 種の Δ PS のヒストグラムの比較

全 mRNA 種 ($n=18226$) の Δ PS (all) 及び図示した機能集団に属する mRNA 種の Δ PS のヒストグラムを、高温ストレス (左側) 及び塩ストレス (右側) についてそれぞれ示した。縦軸は遺伝子数 (頻度) のすべての点の和に対する割合を示す。各図上部には、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004) に由来する機能集団の名前を、集団に属する mRNA 種の数 (n) と共に示した。全 mRNA 種 ($n=18226$) の平均 Δ PS を黒の矢印とともに、機能集団の平均 Δ PS を緑の矢印とともに示し、二つの平均 Δ PS 間の差の有意性は、 z 検定 (片側) を用いて検証した ($**p < 10^{-2}$, $****p < 10^{-4}$)。32.07.07.03 *glutathione conjugation reaction* (A) はカテゴリー-I に、30.05.01.12 *transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathways* (B) はカテゴリー-II に、34.05.02 *motor activity* (C) はカテゴリー-III に、70.08 *Golgi* (D) はカテゴリー-IV に、32.01.01 *oxidative stress response* (E) はカテゴリー-V に、12.01.01 *ribosomal proteins* (F) はカテゴリー-VI に含まれる。カテゴリーに関しては図 35 を参照。

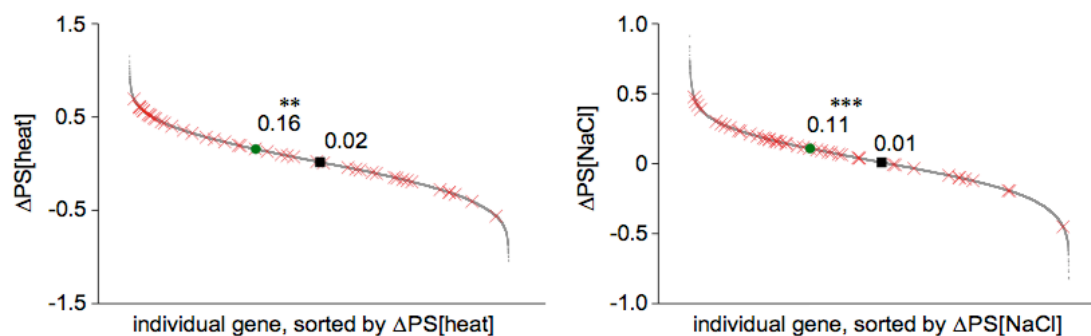


図 37 Hsp ファミリーに属する mRNA 種の ΔPS の全体における分布

全 mRNA 種(n=18226)を $\Delta PS[\text{heat}]$ (左図)あるいは $\Delta PS[\text{NaCl}]$ (右図)の値に応じて降順に並べた(横軸左側から右側方向)(黒字 \times)。縦軸は $\Delta PS[\text{heat}]$ (左図)あるいは $\Delta PS[\text{NaCl}]$ (右図)の値を表す。Hsp ファミリーに属する mRNA 種の位置は強調して示した(赤字 \times)。■は全 mRNA(n=18226)の平均 ΔPS を、●は Hsp ファミリーに属する mRNA 種(n=45)の平均 ΔPS を表し、二つの平均 ΔPS 間の差の有意性は、z 検定(片側)を用いて検証した(** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$)。ゲノム情報に基づいて選択された 52 種類の Hsp の内(“方法と材料”を参照)、本解析で使用した全 18226 種の mRNA に含まれる 45 種を Hsp ファミリーに属する mRNA 種として解析の対照とした。

表 6 同様な機能を有するタンパク質をコードする遺伝子群の高温及び塩ストレス下における集団としての翻訳状態変化

高温及び塩ストレス実験由来のマイクロアレイデータのいずれにおいても解析の対象となった 18226 種の mRNA を、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004)に従って機能ごとに分類した。18226 種の mRNA からは、同一の AGI code を持つ mRNA は除いてある(e.x. AT5G24760.1 and AT5G24760.2)。

A: MIPS FunCat において定義されている分類項目(機能集団)を示す。MIPS FunCat における各機能集団は階層構造を形成しており、二桁の数字及び階層を意味するピリオドの組み合わせにより一義的に定義されている。例えば、01 METABOLISM は最上位の階層を意味し、01 METABOLISM の一つ下の階層には 01.01 amino acid metabolism が、更に最下位の階層には 01.01.03.02.01 biosynthesis of glutamate が存在する。本解析に使用した全 18226 種の mRNA の少なくとも一つが分類される機能集団のみを示している。

B: 本解析に使用した全 18226 種の mRNA の内、A のカラムに示した各機能集団に分類される mRNA 種の数を示す。一つの mRNA 種が複数の機能集団に分類されうるため、このカラムの和は 18226 よりも大きい。

C: 各機能集団に分類された mRNA 種の平均 Δ PS[heat]を示す。本解析に使用した全 18226 種の mRNA の平均 Δ PS[heat]は 0.02 である。

D: 各機能集団に分類された mRNA 種の平均 Δ PS[heat]が全 18226 種の mRNA の平均 Δ PS[heat]よりも有意に大きい場合には *high* を、有意に小さい場合には *low* を記入した。差の有意性は z 検定(片側)を用いて検証した(** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$, **** $p < 10^{-4}$)。二つの平均 Δ PS[heat]に有意差が認められない場合($p \geq 10^{-2}$)には p 値を示した。分類された mRNA 種の数(カラム B)が 1 の場合には、“-”を記入した。

E: 各機能集団に分類された mRNA 種の平均 Δ PS[NaCl]を示す。本解析に使用した全 18226 種の mRNA の平均 Δ PS[NaCl]は 0.01 である。

F: 各機能集団に分類された mRNA 種の平均 Δ PS[NaCl]が全 18226 種の mRNA の平均 Δ PS[NaCl]よりも有意に大きい場合には *high* を、有意に小さい場合には *low* を記入した。差の有意性は z 検定(片側)を用いて行った(** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$, **** $p < 10^{-4}$)。二つの平均 Δ PS[NaCl]に有意差が認められない場合($p \geq 10^{-2}$)には p 値を示した。分類された mRNA 種の数(カラム B)が 1 の場合には、“-”を記入した。

G: 各機能集団に分類された mRNA 種の Δ PS[heat]と Δ PS[NaCl]のピアソン相関係数 r を示す。分類された mRNA 種の数(カラム B)が 2 以下の場合には、“-”を記入した。

H: 各機能集団に分類された mRNA 種の Δ PS[heat]と Δ PS[NaCl]の相関の有無を検定した。帰無仮説は、相関係数が 0 であるとした(“材料と方法”を参照)。有意水準 1%(片側)で相関が認められた場合には、 $r \neq 0$ と記入した(** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$, **** $p < 10^{-4}$)。 Δ PS[heat]と Δ PS[NaCl]に有意な相関が認められない場合($p \geq 10^{-2}$)には p 値を示した。分類された mRNA 種の数(カラム B)が 2 以下の場合には、“-”を記入した。

I: H において有意な相関が認められなかった($p \geq 10^{-2}$)機能集団に対して、 Δ PS[heat]と Δ PS[NaCl]のピアソン相関係数が、全 18226 種の mRNA の Δ PS[heat]と Δ PS[NaCl]のピアソン相関係数 0.65

と等しいかどうかの検定を行った。帰無仮説は、相関係数が 0.65 であるとした(“材料と方法”を参照)。有意水準 1%(片側)で有意に機能集団の相関係数 $r \neq 0.65$ であった場合、 $r \neq 0.65$ と記入した (** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$, **** $p < 10^{-4}$)。 $r \neq 0.65$ とは言えない場合 ($p \geq 10^{-2}$)には p 値を示した。検定を行っていない場合もしくは分類された mRNA 種の数(カラム B)が 3 以下の場合には、“-”を記入した。

A	B	C	D	E	F	G	H	I
01 METABOLISM	3235	0.00	low ***	-0.03	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.01 amino acid metabolism	283	-0.06	low ****	-0.11	low ****	0.72	r#0 ****	-
01.01.03 assimilation of ammonia, metabolism of the glutamate group	53	0.00	3.37E-01	-0.11	low ****	0.73	r#0 ****	-
01.01.03.01 metabolism of glutamine	11	0.06	3.23E-01	-0.11	3.06E-02	0.33	1.61E-01	1.14E-01
01.01.03.01.01 biosynthesis of glutamine	3	-0.19	1.26E-01	-0.11	1.48E-01	0.74	2.33E-01	-
01.01.03.01.02 degradation of glutamine	1	-0.09	-	-0.30	-	-	-	-
01.01.03.02 metabolism of glutamate	30	0.05	2.99E-01	-0.12	low ***	0.74	r#0 ****	-
01.01.03.02.01 biosynthesis of glutamate	7	0.26	2.09E-02	0.05	2.90E-01	0.74	2.86E-02	3.58E-01
01.01.03.02.02 degradation of glutamate	2	-0.41	2.83E-02	-0.35	low **	-	-	-
01.01.03.03 metabolism of proline	10	-0.03	3.23E-01	-0.14	low **	0.75	r#0 **	-
01.01.03.03.01 biosynthesis of proline	5	-0.26	2.34E-02	-0.27	low **	0.56	1.63E-01	4.24E-01
01.01.03.03.02 degradation of proline	4	0.17	1.63E-01	-0.07	2.18E-01	0.72	1.40E-01	4.46E-01
01.01.03.05 metabolism of arginine	18	0.00	4.33E-01	-0.10	1.30E-02	0.81	r#0 ****	-
01.01.03.05.01 biosynthesis of arginine	14	-0.02	3.22E-01	-0.11	1.33E-02	0.82	r#0 ***	-
01.01.03.05.02 degradation of arginine	1	-0.11	-	-0.17	-	-	-	-
01.01.05 metabolism of urea cycle, creatine and polyamines	20	-0.13	1.71E-02	-0.16	low ***	0.84	r#0 ****	-
01.01.05.01 metabolism of polyamines	12	-0.18	1.38E-02	-0.17	low **	0.82	r#0 ***	-
01.01.05.01.01 biosynthesis of polyamines	9	-0.21	1.38E-02	-0.20	low ***	0.83	r#0 **	-
01.01.05.03 metabolism of urea (urea cycle)	7	-0.12	1.27E-01	-0.17	low **	0.90	r#0 **	-
01.01.06 metabolism of the aspartate family	67	-0.09	low **	-0.13	low ****	0.78	r#0 ****	-
01.01.06.01 metabolism of aspartate	14	-0.08	1.22E-01	-0.11	1.58E-02	0.72	r#0 **	-
01.01.06.01.02 degradation of aspartate	1	0.10	-	0.29	-	-	-	-
01.01.06.02 metabolism of asparagine	13	-0.08	1.41E-01	-0.14	low **	0.64	r#0 **	-
01.01.06.02.01 biosynthesis of asparagine	2	-0.05	3.81E-01	-0.16	1.21E-01	-	-	-
01.01.06.02.02 degradation of asparagine	7	0.02	4.90E-01	-0.14	2.50E-02	0.35	2.24E-01	2.07E-01
01.01.06.04 metabolism of threonine	11	-0.11	8.35E-02	-0.15	low **	0.89	r#0 ***	-
01.01.06.04.01 biosynthesis of threonine	6	0.11	2.37E-01	0.00	4.68E-01	0.82	2.25E-02	2.49E-01
01.01.06.04.02 degradation of threonine	2	-0.27	9.52E-02	-0.25	3.87E-02	-	-	-
01.01.06.05 metabolism of methionine	30	-0.18	low ***	-0.19	low ****	0.84	r#0 ****	-
01.01.06.05.01 biosynthesis of methionine	9	-0.19	2.67E-02	-0.18	low **	0.80	r#0 **	-
01.01.06.05.01.01 biosynthesis of homocysteine	1	-0.44	-	-0.48	-	-	-	-
01.01.06.06 metabolism of lysine	17	0.02	4.51E-01	-0.06	8.38E-02	0.48	2.63E-02	1.76E-01
01.01.06.06.01 biosynthesis of lysine	15	0.05	3.14E-01	-0.06	9.48E-02	0.48	3.55E-02	1.96E-01
01.01.06.06.01.01 diaminopimelic acid pathway	11	0.03	4.27E-01	-0.06	1.46E-01	0.46	7.97E-02	2.16E-01
01.01.06.06.02 degradation of lysine	1	0.38	-	0.05	-	-	-	-
01.01.09 metabolism of the cysteine - aromatic group	113	-0.05	1.18E-02	-0.08	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.01.09.01 metabolism of glycine	22	-0.07	9.86E-02	-0.14	low ***	0.54	r#0 **	-
01.01.09.01.01 biosynthesis of glycine	1	-0.02	-	-0.19	-	-	-	-
01.01.09.01.02 degradation of glycine	10	-0.15	4.67E-02	-0.16	low **	0.47	8.77E-02	2.42E-01
01.01.09.02 metabolism of serine	22	0.00	4.06E-01	-0.07	4.30E-02	0.80	r#0 ****	-
01.01.09.02.01 biosynthesis of serine	18	0.01	4.91E-01	-0.06	7.13E-02	0.85	r#0 ****	-
01.01.09.03 metabolism of cysteine	17	-0.02	3.00E-01	-0.11	low **	0.72	r#0 ***	-
01.01.09.03.01 biosynthesis of cysteine	11	-0.09	1.28E-01	-0.14	low **	0.64	1.69E-02	4.89E-01
01.01.09.03.02 degradation of cysteine	2	-0.07	3.55E-01	-0.08	2.60E-01	-	-	-
01.01.09.04 metabolism of phenylalanine	28	-0.07	7.15E-02	-0.03	1.44E-01	0.70	r#0 ****	-
01.01.09.04.01 biosynthesis of phenylalanine	9	0.03	4.36E-01	0.04	3.53E-01	0.65	2.90E-02	4.94E-01
01.01.09.04.02 degradation of phenylalanine	3	-0.35	2.08E-02	-0.21	3.29E-02	-0.83	1.90E-01	-
01.01.09.05 metabolism of tyrosine	23	-0.13	1.55E-02	-0.08	1.48E-02	0.68	r#0 ***	-
01.01.09.05.01 biosynthesis of tyrosine	5	-0.14	1.29E-01	-0.05	2.57E-01	0.96	r#0 **	-
01.01.09.05.02 degradation of tyrosine	3	-0.35	2.08E-02	-0.21	3.29E-02	-0.83	1.90E-01	-
01.01.09.06 metabolism of tryptophan	36	-0.06	7.24E-02	-0.07	low **	0.70	r#0 ****	-
01.01.09.06.01 biosynthesis of tryptophan	19	0.00	4.33E-01	-0.09	2.21E-02	0.82	r#0 ****	-
01.01.09.06.02 degradation of tryptophan	4	-0.25	4.69E-02	-0.08	1.87E-01	0.49	2.57E-01	4.06E-01
01.01.09.07 metabolism of histidine	10	-0.20	1.38E-02	-0.12	2.36E-02	0.83	r#0 **	-
01.01.09.07.01 biosynthesis of histidine	10	-0.20	1.38E-02	-0.12	2.36E-02	0.83	r#0 **	-
01.01.11 metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine	34	-0.07	5.62E-02	-0.15	low ****	0.52	r#0 ***	-
01.01.11.01 metabolism of alanine	8	-0.06	2.60E-01	-0.15	1.24E-02	0.09	4.19E-01	6.38E-02
01.01.11.02 metabolism of isoleucine	12	-0.06	1.97E-01	-0.12	1.60E-02	0.70	r#0 **	-
01.01.11.02.01 biosynthesis of isoleucine	4	-0.31	1.94E-02	-0.15	5.86E-02	-0.24	3.78E-01	1.54E-01
01.01.11.02.02 degradation of isoleucine	5	0.12	2.34E-01	-0.11	1.02E-01	0.98	r#0 **	-
01.01.11.03 metabolism of valine	14	-0.05	2.20E-01	-0.11	1.57E-02	0.82	r#0 ***	-
01.01.11.03.01 biosynthesis of valine	3	-0.28	4.84E-02	-0.13	1.25E-01	-0.48	3.42E-01	-
01.01.11.03.02 degradation of valine	8	0.03	4.40E-01	-0.11	5.17E-02	0.95	r#0 ***	-
01.01.11.04 metabolism of leucine	18	0.02	5.00E-01	-0.16	low ***	0.78	r#0 ****	-
01.01.11.04.01 biosynthesis of leucine	6	-0.13	1.23E-01	-0.24	low **	0.47	1.76E-01	3.24E-01
01.01.11.04.02 degradation of leucine	9	0.13	1.38E-01	-0.12	2.62E-02	0.94	r#0 ****	-
01.01.13 regulation of amino acid metabolism	1	0.70	-	0.32	-	-	-	-
01.02 nitrogen, sulfur and selenium metabolism	131	-0.03	6.82E-02	-0.07	low ****	0.65	r#0 ****	-
01.02.02 nitrogen metabolism	72	-0.02	1.65E-01	-0.08	low ****	0.51	r#0 ****	-
01.02.02.01 nitrogen fixation	1	0.42	-	-0.18	-	-	-	-

01.02.02.02 nitrate assimilation	7	0.22	4.17E-02	0.03	3.82E-01	0.68	4.58E-02	4.49E-01
01.02.02.06 assimilation of ammonia	1	0.17	-	-0.19	-	-	-	-
01.02.02.07 nitric oxide biosynthesis	3	0.36	2.68E-02	0.13	1.50E-01	0.53	3.21E-01	-
01.02.02.09 catabolism of nitrogenous compounds	3	0.10	3.15E-01	-0.05	3.09E-01	0.99	4.18E-02	-
01.02.02.09.05 cyanate catabolism	2	-0.10	2.98E-01	-0.18	9.49E-02	-	-	-
01.02.03 sulfur metabolism	56	-0.05	6.08E-02	-0.07	low **	0.78	r#0 ****	-
01.02.03.01 sulfate assimilation	12	0.11	1.47E-01	0.05	2.36E-01	0.76	r#0 **	-
01.02.03.03 assimilatory reduction of sulfur	3	0.64	high ***	0.23	3.11E-02	0.82	1.93E-01	-
01.02.03.04 conjunction of sulfate	9	-0.11	1.09E-01	-0.10	5.80E-02	0.79	r#0 **	-
01.02.03.06 sulfate dissimilation, anaerobic respiration, sulfate respiration	15	-0.08	1.14E-01	-0.04	1.64E-01	0.83	r#0 ****	-
01.02.05 selenium metabolism	2	0.05	4.37E-01	-0.05	3.39E-01	-	-	-
01.02.07 regulation of nitrogen, sulfur and selenium metabolism	5	-0.04	3.48E-01	-0.07	2.04E-01	0.96	r#0 **	-
01.02.07.01 regulation of nitrogen metabolism	5	-0.04	3.48E-01	-0.07	2.04E-01	0.96	r#0 **	-
01.03 nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	413	-0.05	low ****	-0.05	low ****	0.67	r#0 ****	-
01.03.01 purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	145	-0.12	low ****	-0.11	low ****	0.71	r#0 ****	-
01.03.01.01 purine nucleotide/nucleoside/nucleobase catabolism	9	-0.16	4.38E-02	-0.15	low **	0.48	9.76E-02	2.69E-01
01.03.01.01.03 xanthine catabolism	1	-0.04	-	-0.14	-	-	-	-
01.03.01.03 purine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism	35	-0.11	low **	-0.08	low **	0.78	r#0 ****	-
01.03.04 pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	54	0.02	4.13E-01	-0.08	low **	0.64	r#0 ****	-
01.03.04.01 pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase catabolism	3	0.14	2.39E-01	-0.11	1.62E-01	0.99	4.96E-02	-
01.03.04.03 pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism	16	0.08	1.95E-01	-0.07	7.33E-02	0.73	r#0 ***	-
01.03.07 deoxyribonucleotide metabolism	10	0.12	1.57E-01	0.02	4.58E-01	0.83	r#0 **	-
01.03.10 metabolism of cyclic and unusual nucleotides	17	-0.07	1.28E-01	-0.06	7.45E-02	0.69	r#0 **	-
01.03.16 polynucleotide degradation	137	0.00	2.67E-01	0.00	2.82E-01	0.58	r#0 ****	-
01.03.16.01 RNA degradation	52	-0.05	7.26E-02	0.00	4.09E-01	0.62	r#0 ****	-
01.03.16.03 DNA degradation	5	-0.06	3.04E-01	-0.15	3.90E-02	0.70	9.33E-02	4.43E-01
01.04 phosphate metabolism	1447	0.02	4.32E-01	0.01	4.23E-01	0.67	r#0 ****	-
01.04.04 regulation of phosphate metabolism	3	-0.15	1.85E-01	-0.06	2.76E-01	-0.53	3.23E-01	-
01.05 C-compound and carbohydrate metabolism	1138	-0.02	low ****	-0.06	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.05.02 sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	602	-0.02	low **	-0.05	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.05.02.01 nucleotide-sugar metabolism	129	0.01	4.42E-01	-0.02	3.47E-02	0.60	r#0 ****	-
01.05.02.04 sugar, glucoside, polyol and carboxylate anabolism	43	0.08	1.02E-01	-0.01	2.82E-01	0.60	r#0 ****	-
01.05.02.07 sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism	85	-0.09	low ***	-0.13	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.05.03 polysaccharide metabolism	160	0.00	2.88E-01	-0.03	1.05E-02	0.53	r#0 ****	-
01.05.03.01 glycogen metabolism	3	0.04	4.51E-01	-0.03	3.79E-01	0.30	4.03E-01	-
01.05.03.01.04 glycogen anabolism	2	-0.07	3.47E-01	0.02	4.76E-01	-	-	-
01.05.03.01.07 glycogen catabolism	1	0.26	-	-0.12	-	-	-	-
01.05.03.02 peptidoglycan metabolism	3	-0.13	2.10E-01	0.04	4.00E-01	0.74	2.34E-01	-
01.05.03.02.04 peptidoglycan anabolism	2	-0.02	4.29E-01	0.05	3.89E-01	-	-	-
01.05.03.03 chitin metabolism	11	0.03	4.26E-01	-0.10	3.53E-02	0.67	1.22E-02	4.56E-01
01.05.03.03.07 chitin catabolism	11	0.03	4.26E-01	-0.10	3.53E-02	0.67	1.22E-02	4.56E-01
01.05.03.04 starch metabolism	31	0.12	2.83E-02	-0.05	4.62E-02	0.23	1.06E-01	r#0.65 **
01.05.03.04.04 starch anabolism	12	0.16	6.10E-02	-0.04	2.06E-01	0.19	2.81E-01	4.09E-02
01.05.03.04.07 starch catabolism	16	0.12	8.76E-02	-0.04	1.93E-01	0.14	3.07E-01	1.14E-02
01.05.05 C-1 compound metabolism	100	-0.04	3.90E-02	-0.11	low ****	0.72	r#0 ****	-
01.05.05.04 C-1 compound anabolism	3	0.20	1.48E-01	0.03	4.23E-01	0.96	9.21E-02	-
01.05.05.07 C-1 compound catabolism	54	0.00	3.32E-01	-0.07	low **	0.75	r#0 ****	-
01.05.06 C-2 compound and organic acid metabolism	17	-0.27	low ****	-0.22	low ****	0.77	r#0 ***	-
01.05.06.04 C-2 compound and organic acid anabolism	4	-0.10	2.23E-01	0.07	2.75E-01	0.97	1.73E-02	1.06E-01
01.05.07 C-3 compound metabolism	74	-0.08	low **	-0.13	low ****	0.57	r#0 ****	-
01.05.07.04 C-3 compound anabolism	8	0.08	2.93E-01	-0.01	3.94E-01	0.81	r#0 **	-
01.05.07.07 C-3 compound catabolism	2	0.29	1.07E-01	0.11	2.51E-01	-	-	-
01.05.08 C-4 compound metabolism	34	-0.09	2.49E-02	-0.24	low ****	0.80	r#0 ****	-
01.05.08.07 C-4 compound catabolism	1	0.04	-	-0.19	-	-	-	-
01.05.09 aminosaccharide metabolism	6	-0.19	5.49E-02	-0.21	low **	0.83	2.15E-02	2.41E-01
01.05.11 aromate metabolism	48	0.00	4.05E-01	-0.07	low **	0.77	r#0 ****	-
01.05.11.04 aromate anabolism	6	-0.08	2.38E-01	-0.10	9.58E-02	0.43	1.99E-01	2.94E-01
01.05.11.07 aromate catabolism	3	0.18	1.85E-01	-0.08	2.31E-01	0.95	9.89E-02	-
01.05.11.07.01 aerobic aromate catabolism	2	0.25	1.48E-01	-0.02	4.09E-01	-	-	-
01.05.11.07.01.01 ortho-cleavage	2	0.25	1.48E-01	-0.02	4.09E-01	-	-	-
01.05.12 autotrophic CO2-fixation	16	-0.27	low ***	-0.12	low **	0.75	r#0 ***	-
01.05.12.01 Calvin cycle	10	-0.32	low ***	-0.13	1.70E-02	0.71	1.05E-02	3.74E-01
01.05.12.03 reductive TCA cycle	2	-0.27	1.02E-01	-0.22	5.74E-02	-	-	-
01.05.13 transfer of activated C-1 groups	105	-0.04	3.90E-02	-0.08	low ****	0.75	r#0 ****	-
01.05.13.01 S-adenosyl-methionine - homocysteine cycle	50	-0.07	2.52E-02	-0.08	low **	0.81	r#0 ****	-
01.05.13.03 tetrahydrofolate-dependent C-1-transfer	19	-0.05	1.70E-01	-0.09	1.49E-02	0.67	r#0 ***	-
01.05.25 regulation of C-compound and carbohydrate metabolism	3	-0.25	7.02E-02	-0.08	2.13E-01	0.94	1.11E-01	-
01.06 lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	544	0.00	1.85E-01	-0.05	low ****	0.67	r#0 ****	-
01.06.02 membrane lipid metabolism	120	0.03	3.25E-01	-0.05	low ***	0.66	r#0 ****	-
01.06.02.01 phospholipid metabolism	104	0.06	7.85E-02	-0.04	low **	0.62	r#0 ****	-
01.06.02.02 glycolipid metabolism	14	-0.18	low **	-0.13	low **	0.65	r#0 **	-
01.06.02.03 sphingolipid metabolism	6	-0.21	3.70E-02	-0.20	low **	0.84	1.80E-02	2.15E-01

01.06.05 fatty acid metabolism	83	-0.04	5.30E-02	-0.08	low ****	0.66	r#0 ****	-
01.06.06 isoprenoid metabolism	122	-0.03	7.45E-02	-0.07	low ****	0.72	r#0 ****	-
01.06.06.03 monoterpenes metabolism	1	0.28	-	0.06	-	-	-	-
01.06.06.05 sesquiterpenes metabolism	6	0.08	3.17E-01	0.04	3.71E-01	0.70	6.01E-02	4.30E-01
01.06.06.07 diterpenes metabolism	11	0.23	1.25E-02	0.05	2.63E-01	0.32	1.67E-01	1.10E-01
01.06.06.09 triterpenes metabolism	4	0.13	2.39E-01	0.07	2.79E-01	0.92	3.96E-02	2.04E-01
01.06.06.11 tetracyclic and pentacyclic triterpenes (cholesterin, steroids and hopanoids) metabolism	36	-0.10	1.12E-02	-0.14	low ****	0.79	r#0 ****	-
01.06.06.13 tetraterpenes (carotenoids) metabolism	24	-0.07	9.57E-02	-0.08	1.67E-02	0.58	r#0 **	-
01.06.10 regulation of lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	6	0.14	1.59E-01	0.01	4.96E-01	0.71	5.79E-02	4.22E-01
01.07 metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	213	-0.08	low ****	-0.13	low ****	0.72	r#0 ****	-
01.07.01 biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	108	-0.07	low **	-0.12	low ****	0.77	r#0 ****	-
01.07.03 catabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	3	0.20	1.49E-01	-0.10	1.88E-01	1.00	2.01E-02	-
01.07.04 utilization of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	9	-0.22	1.25E-02	-0.22	low ***	0.33	1.94E-01	1.48E-01
01.07.07 regulation of the metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	1	0.10	-	0.02	-	-	-	-
01.20 secondary metabolism	296	0.01	3.73E-01	-0.05	low ****	0.67	r#0 ****	-
01.20.05 metabolism of acetic acid derivatives	16	0.19	1.46E-02	-0.04	1.92E-01	0.31	1.20E-01	5.37E-02
01.20.05.03 metabolism of alkanes, alkenes, alkanals, alkanols	1	-0.54	-	-0.31	-	-	-	-
01.20.15 metabolism of derivatives of dehydroquinic acid, shikimic acid and chorismic acid	17	-0.07	1.42E-01	-0.05	1.03E-01	0.77	r#0 ***	-
01.20.15.03 metabolism of ubiquinone	1	-0.01	-	-0.09	-	-	-	-
01.20.17 metabolism of secondary products derived from primary amino acids	33	-0.06	8.07E-02	-0.07	1.28E-02	0.64	r#0 ****	-
01.20.17.03 metabolism of amines	6	-0.05	2.98E-01	-0.11	8.42E-02	0.65	8.06E-02	4.94E-01
01.20.17.07 metabolism of glycosinolates and derivatives	5	0.00	4.63E-01	0.07	2.41E-01	0.75	7.18E-02	3.86E-01
01.20.17.09 metabolism of alkaloids	17	-0.09	8.69E-02	-0.09	2.53E-02	0.67	r#0 **	-
01.20.19 metabolism of secondary products derived from glycine, L-serine and L-alanine	53	-0.08	1.65E-02	-0.09	low ***	0.65	r#0 ****	-
01.20.19.01 metabolism of porphyrins	45	-0.09	1.33E-02	-0.09	low ***	0.61	r#0 ****	-
01.20.19.05 metabolism of cobalamins	1	0.52	-	0.14	-	-	-	-
01.20.23 metabolism of secondary products derived from L-methionine	14	0.14	7.67E-02	0.02	4.19E-01	0.77	r#0 ***	-
01.20.31 metabolism of secondary products derived from L-lysine, L-arginine and L-histidine	6	0.01	4.87E-01	0.04	3.79E-01	0.73	4.87E-02	3.87E-01
01.20.33 metabolism of secondary products derived from L-tryptophan	30	-0.09	3.14E-02	-0.07	2.05E-02	0.54	r#0 ***	-
01.20.35 metabolism of secondary products derived from L-phenylalanine and L-tyrosine	80	0.00	3.42E-01	-0.05	low **	0.75	r#0 ****	-
01.20.35.01 metabolism of phenylpropanoids	71	0.00	3.17E-01	-0.05	low **	0.76	r#0 ****	-
01.20.35.01.03 metabolism of lignins	27	-0.02	2.59E-01	-0.10	low **	0.64	r#0 ***	-
01.20.35.01.05 metabolism of stilbenes, flavonoids	26	-0.03	2.10E-01	-0.09	low **	0.78	r#0 ****	-
01.20.35.01.09 metabolism of cinnamic acids	1	0.29	-	0.21	-	-	-	-
01.20.35.03 metabolism of catecholamines	8	0.01	4.65E-01	-0.03	3.05E-01	0.87	r#0 **	-
01.20.37 metabolism of peptide derived compounds	10	-0.04	2.94E-01	-0.10	4.37E-02	0.87	r#0 ***	-
01.20.37.01 metabolism of thioredoxin, glutaredoxin, glutathion	7	-0.16	6.53E-02	-0.23	low **	0.83	1.04E-02	2.00E-01
01.20.37.05 metabolism of beta-lactams	3	0.25	9.36E-02	0.20	5.66E-02	0.97	8.00E-02	-
01.20.38 metabolism of toxins/drugs	38	0.21	high ****	0.03	3.02E-01	0.55	r#0 ***	-
02 ENERGY	373	-0.05	low ****	-0.08	low ****	0.72	r#0 ****	-
02.01 glycolysis and gluconeogenesis	66	-0.08	low **	-0.14	low ****	0.70	r#0 ****	-
02.01.01 glycolysis methylglyoxal bypass	4	-0.50	low ***	-0.29	low **	0.92	4.18E-02	2.13E-01
02.01.03 regulation of glycolysis and gluconeogenesis	6	0.12	1.99E-01	0.01	4.87E-01	0.86	1.33E-02	1.76E-01
02.04 glyoxylate cycle	9	0.03	4.47E-01	-0.10	5.12E-02	0.89	r#0 ***	-
02.07 pentose-phosphate pathway	43	-0.19	low ****	-0.14	low ****	0.71	r#0 ****	-
02.07.01 pentose-phosphate pathway oxidative branch	14	-0.07	1.46E-01	-0.12	1.05E-02	0.85	r#0 ****	-
02.07.03 pentose-phosphate pathway non oxidative branch	8	-0.26	low **	-0.10	7.18E-02	0.66	3.68E-02	4.75E-01
02.08 pyruvate dehydrogenase complex	10	-0.19	2.14E-02	-0.21	low ***	0.84	r#0 **	-
02.09 anaplerotic reactions	2	0.51	1.30E-02	0.39	high **	-	-	-
02.10 tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)	31	-0.02	2.49E-01	-0.16	low ****	0.49	r#0 **	-
02.11 electron transport and membrane-associated energy conservation	78	-0.04	4.50E-02	-0.04	2.19E-02	0.82	r#0 ****	-
02.11.05 accessory proteins of electron transport and membrane-associated energy conservation	14	0.02	4.56E-01	0.02	4.29E-01	0.87	r#0 ****	-
02.13 respiration	70	0.01	4.01E-01	-0.01	1.90E-01	0.85	r#0 ****	-
02.13.01 anaerobic respiration	16	-0.04	2.25E-01	-0.03	2.44E-01	0.84	r#0 ****	-
02.13.03 aerobic respiration	41	0.04	3.08E-01	0.02	3.65E-01	0.87	r#0 ****	-
02.16 fermentation	15	0.09	1.92E-01	0.03	3.70E-01	0.52	2.44E-02	2.47E-01
02.16.09 mixed acid and butanediol fermentation	6	0.02	4.79E-01	-0.02	3.75E-01	0.52	1.47E-01	3.67E-01
02.16.13 acetate fermentation	13	0.10	1.60E-01	0.04	3.11E-01	0.50	4.23E-02	2.39E-01
02.19 metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	42	0.10	4.85E-02	0.09	high **	0.37	r#0 **	-
02.25 oxidation of fatty acids	18	0.08	2.02E-01	-0.03	2.28E-01	0.64	r#0 **	-
02.30 photosynthesis	48	-0.09	low **	-0.15	low ****	0.82	r#0 ****	-
02.30.10 regulation of photosynthesis	8	-0.17	4.46E-02	-0.18	low **	0.89	r#0 **	-
02.45 energy conversion and regeneration	57	-0.17	low ****	-0.13	low ****	0.74	r#0 ****	-
02.45.03 light absorption	18	-0.22	low ***	-0.28	low ****	0.82	r#0 ****	-

02.45.07 heat production	3	-0.15	1.81E-01	-0.08	2.28E-01	0.96	9.16E-02	-
02.45.11 conversion to kinetic energy (e.g. movement)	2	0.27	1.24E-01	0.24	5.33E-02	-	-	-
02.45.15 energy generation (e.g. ATP synthase)	33	-0.16	low ***	-0.08	low **	0.73	r#0 ****	-
04 STORAGE PROTEIN	21	0.04	3.41E-01	-0.01	3.65E-01	0.76	r#0 ****	-
04.01 storage facilitating proteins	21	0.04	3.41E-01	-0.01	3.65E-01	0.76	r#0 ****	-
10 CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	1073	0.05	high ***	0.05	high ****	0.69	r#0 ****	-
10.01 DNA processing	932	0.05	high ***	0.05	high ****	0.69	r#0 ****	-
10.01.01 cellular DNA uptake	3	-0.12	2.23E-01	-0.04	3.50E-01	0.75	2.28E-01	-
10.01.02 DNA topology	100	0.04	2.33E-01	0.05	2.07E-02	0.75	r#0 ****	-
10.01.03 DNA synthesis and replication	63	0.13	high **	0.08	high **	0.61	r#0 ****	-
10.01.03.03 ori recognition and priming complex formation	17	0.15	3.83E-02	0.06	1.53E-01	0.65	r#0 **	-
10.01.03.05 extension/ polymerization activity	14	0.13	8.51E-02	0.14	high **	0.62	r#0 **	-
10.01.05 DNA recombination and DNA repair	200	0.06	2.96E-02	0.04	2.81E-02	0.74	r#0 ****	-
10.01.05.01 DNA repair	193	0.06	2.13E-02	0.04	2.07E-02	0.74	r#0 ****	-
10.01.05.03 DNA recombination	102	0.05	1.45E-01	0.05	2.38E-02	0.76	r#0 ****	-
10.01.05.03.01 meiotic recombination	9	0.16	8.88E-02	0.06	2.20E-01	0.57	5.49E-02	3.82E-01
10.01.05.03.05 DNA integration	1	-0.12	-	0.17	-	-	-	-
10.01.09 DNA restriction or modification	674	0.05	high **	0.06	high ****	0.69	r#0 ****	-
10.01.09.01 DNA methylation	15	-0.17	1.26E-02	-0.09	2.51E-02	0.92	r#0 ****	-
10.01.09.05 DNA conformation modification (e.g. chromatin)	648	0.05	high **	0.06	high ****	0.69	r#0 ****	-
10.01.09.07 DNA imprinting and other epigenetic effects	17	0.07	2.33E-01	0.04	2.74E-01	0.64	r#0 **	-
10.01.11 regulation of DNA processing	3	0.43	1.17E-02	0.03	4.47E-01	-0.97	8.43E-02	-
10.03 cell cycle	172	0.03	2.17E-01	0.03	6.31E-02	0.71	r#0 ****	-
10.03.01 mitotic cell cycle and cell cycle control	89	0.04	2.44E-01	0.02	2.91E-01	0.73	r#0 ****	-
10.03.01.01 mitotic cell cycle	26	0.02	4.63E-01	0.01	4.93E-01	0.68	r#0 ****	-
10.03.01.01.01 G1 phase of mitotic cell cycle	4	-0.23	6.02E-02	-0.06	2.35E-01	0.98	1.14E-02	7.21E-02
10.03.01.01.03 G1/S transition of mitotic cell cycle	3	-0.02	4.21E-01	0.10	2.27E-01	-0.98	6.28E-02	-
10.03.01.01.05 S phase of mitotic cell cycle	1	0.38	-	0.41	-	-	-	-
10.03.01.01.09 G2/M transition of mitotic cell cycle	3	0.21	1.36E-01	0.04	4.09E-01	0.88	1.59E-01	-
10.03.01.01.11 M phase	9	0.01	4.94E-01	-0.04	2.37E-01	0.72	1.47E-02	3.71E-01
10.03.01.02 cell cycle arrest	1	0.06	-	0.07	-	-	-	-
10.03.01.03 cell cycle checkpoints (checkpoints of morphogenesis, DNA-damage,-replication, mitotic phase and spindle)	9	0.03	4.35E-01	0.03	3.56E-01	0.59	4.79E-02	4.09E-01
10.03.02 meiosis	20	0.09	1.50E-01	0.09	3.37E-02	0.70	r#0 ***	-
10.03.02.01 meiosis I	2	0.15	2.76E-01	0.14	1.82E-01	-	-	-
10.03.03 cytokinesis (cell division) /septum formation and hydrolysis	39	0.02	4.88E-01	0.03	2.70E-01	0.76	r#0 ****	-
10.03.04 nuclear and chromosomal cycle	21	0.20	high **	0.15	high **	0.33	7.49E-02	3.37E-02
10.03.04.03 chromosome condensation	4	0.27	5.05E-02	0.19	4.07E-02	-0.81	9.28E-02	2.81E-02
10.03.04.05 chromosome segregation/division	16	0.21	high **	0.15	high **	0.46	3.57E-02	1.66E-01
10.03.04.07 nuclear division	2	0.05	4.35E-01	0.11	2.41E-01	-	-	-
10.03.05 cell cycle dependent cytoskeleton reorganization	10	0.06	3.33E-01	0.06	2.21E-01	0.69	1.28E-02	4.07E-01
10.03.05.01 spindle pole body/centrosome and microtubule cycle	4	0.00	4.50E-01	0.08	2.46E-01	0.70	1.52E-01	4.65E-01
10.03.05.03 cell cycle dependent actin filament reorganization	4	0.07	3.65E-01	-0.05	2.96E-01	0.93	3.34E-02	1.80E-01
11 TRANSCRIPTION	1770	0.04	high ***	0.06	high ****	0.66	r#0 ****	-
11.02 RNA synthesis	1520	0.05	high ****	0.07	high ****	0.66	r#0 ****	-
11.02.01 rRNA synthesis	3	0.07	3.88E-01	-0.01	4.47E-01	0.99	3.44E-02	-
11.02.02 tRNA synthesis	1	-0.08	-	-0.04	-	-	-	-
11.02.03 mRNA synthesis	1386	0.05	high ****	0.07	high ****	0.65	r#0 ****	-
11.02.03.01 general transcription activities	51	0.02	4.30E-01	0.01	4.72E-01	0.64	r#0 ****	-
11.02.03.01.01 transcription initiation	33	0.03	3.61E-01	0.01	4.87E-01	0.59	r#0 ***	-
11.02.03.01.04 transcription elongation	6	-0.13	1.25E-01	0.01	4.96E-01	0.65	8.21E-02	4.98E-01
11.02.03.04 transcriptional control	1360	0.05	high ****	0.07	high ****	0.65	r#0 ****	-
11.02.03.04.01 transcription activation	97	0.07	3.57E-02	0.04	4.50E-02	0.74	r#0 ****	-
11.02.03.04.03 transcription repression	50	0.00	3.93E-01	0.02	3.60E-01	0.59	r#0 ****	-
11.02.03.04.05 enhancer/silencer interaction	1	-0.16	-	0.07	-	-	-	-
11.02.03.04.07 posttranscriptional control	17	0.06	2.64E-01	0.01	4.76E-01	0.88	r#0 ****	-
11.04 RNA processing	315	-0.02	3.36E-02	0.00	3.05E-01	0.70	r#0 ****	-
11.04.01 rRNA processing	126	-0.04	2.48E-02	0.00	3.50E-01	0.71	r#0 ****	-
11.04.02 tRNA processing	34	0.07	1.67E-01	0.02	3.40E-01	0.56	r#0 ***	-
11.04.03 mRNA processing (splicing, 5'-, 3'-end processing)	158	0.01	4.42E-01	0.02	3.47E-01	0.78	r#0 ****	-
11.04.03.01 splicing	132	0.00	2.94E-01	0.01	4.40E-01	0.77	r#0 ****	-
11.04.03.01.10 regulation of splicing	1	0.47	-	0.27	-	-	-	-
11.04.03.03 5'-end processing	3	0.00	4.70E-01	-0.02	3.95E-01	0.92	1.28E-01	-
11.04.03.05 3'-end processing	5	0.05	3.98E-01	-0.10	1.23E-01	0.91	1.63E-02	1.44E-01
11.04.03.11 control of mRNA stability	3	0.20	1.58E-01	0.11	2.02E-01	0.82	1.94E-01	-
11.06 RNA modification	53	-0.05	6.26E-02	-0.04	3.91E-02	0.70	r#0 ****	-
11.06.01 rRNA modification	2	-0.25	1.17E-01	-0.10	2.16E-01	-	-	-
11.06.02 tRNA modification	19	-0.06	1.59E-01	-0.08	3.19E-02	0.75	r#0 ****	-
11.06.03 mRNA modification	7	-0.04	3.14E-01	0.04	3.30E-01	0.24	3.00E-01	1.49E-01
11.06.03.01 mRNA editing	2	-0.09	3.18E-01	0.19	1.01E-01	-	-	-
12 PROTEIN SYNTHESIS	545	-0.17	low ****	-0.07	low ****	0.65	r#0 ****	-
12.01 ribosome biogenesis	356	-0.25	low ****	-0.09	low ****	0.59	r#0 ****	-
12.01.01 ribosomal proteins	153	-0.29	low ****	-0.10	low ****	0.57	r#0 ****	-
12.04 translation	449	-0.19	low ****	-0.08	low ****	0.65	r#0 ****	-
12.04.01 translation initiation	75	-0.02	1.74E-01	0.00	3.30E-01	0.67	r#0 ****	-
12.04.02 translation elongation	40	-0.20	low ****	-0.13	low ****	0.62	r#0 ****	-
12.04.03 translation termination	15	-0.04	2.50E-01	-0.06	1.03E-01	0.84	r#0 ****	-
12.07 translational control	29	0.01	4.66E-01	0.00	3.91E-01	0.60	r#0 ***	-

12.10 aminoacyl-tRNA-synthetases	50	0.04	3.13E-01	-0.03	8.01E-02	0.80	r#0 ****	-
12.11 selenocystein biosynthesis and incorporation	2	0.05	4.37E-01	-0.05	3.39E-01	-	-	-
14 PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	2388	0.00	4.27E-02	0.00	4.29E-02	0.63	r#0 ****	-
14.01 protein folding and stabilization	219	-0.03	1.24E-02	-0.01	1.32E-01	0.60	r#0 ****	-
14.04 protein targeting, sorting and translocation	152	-0.03	4.61E-02	-0.01	1.20E-01	0.57	r#0 ****	-
14.07 protein modification	1685	0.00	4.41E-01	0.02	9.71E-02	0.63	r#0 ****	-
14.07.01 modification with fatty acids (e.g. myristylation, palmitylation, farnesylation)	345	0.00	2.45E-01	0.01	3.53E-01	0.66	r#0 ****	-
14.07.02 modification with sugar residues (e.g. glycosylation, deglycosylation)	47	-0.09	low **	-0.07	low **	0.61	r#0 ****	-
14.07.02.01 O-directed glycosylation, deglycosylation	1	0.08	-	0.01	-	-	-	-
14.07.02.02 N-directed glycosylation, deglycosylation	13	-0.04	2.53E-01	0.04	2.72E-01	0.53	3.10E-02	2.87E-01
14.07.03 modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation	952	0.03	1.50E-01	0.02	high **	0.63	r#0 ****	-
14.07.04 modification by acetylation, deacetylation	21	-0.18	low **	-0.14	low ***	0.80	r#0 ****	-
14.07.05 modification by ubiquitination, deubiquitination	287	0.03	2.78E-01	0.02	1.27E-01	0.56	r#0 ****	-
14.07.07 modification by ubiquitin-related proteins	25	0.02	4.88E-01	-0.03	1.68E-01	0.77	r#0 ****	-
14.07.09 posttranslational modification of amino acids (e.g. hydroxylation, methylation)	43	0.06	1.65E-01	0.01	4.46E-01	0.69	r#0 ****	-
14.07.11 protein processing (proteolytic)	39	-0.13	low **	-0.07	low **	0.65	r#0 ****	-
14.07.12 protein processing (non-proteolytic, e.g. iron-incorporation)	3	0.01	4.89E-01	-0.03	3.54E-01	0.97	8.32E-02	-
14.10 assembly of protein complexes	26	-0.11	2.12E-02	-0.07	2.17E-02	0.81	r#0 ****	-
14.13 protein/peptide degradation	636	0.01	2.09E-01	-0.01	low **	0.61	r#0 ****	-
14.13.01 cytoplasmic and nuclear protein degradation	322	0.01	2.93E-01	0.00	2.34E-01	0.56	r#0 ****	-
14.13.01.01 proteasomal degradation (ubiquitin/proteasomal pathway)	313	0.01	2.78E-01	0.00	2.86E-01	0.56	r#0 ****	-
16 PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	3242	0.01	9.14E-02	0.01	3.38E-01	0.65	r#0 ****	-
16.01 protein binding	2057	-0.01	low ****	0.00	1.06E-01	0.65	r#0 ****	-
16.01.01 receptor binding	10	0.17	5.68E-02	0.09	9.63E-02	0.14	3.46E-01	4.94E-02
16.02 peptide binding	22	0.01	4.49E-01	0.03	3.11E-01	0.70	r#0 ***	-
16.03 nucleic acid binding	1598	0.04	high **	0.04	high ****	0.69	r#0 ****	-
16.03.01 DNA binding	974	0.06	high ****	0.07	high ****	0.64	r#0 ****	-
16.03.03 RNA binding	358	-0.04	low ***	-0.01	2.75E-02	0.74	r#0 ****	-
16.05 polysaccharide binding	3	0.13	2.60E-01	0.04	4.10E-01	0.99	4.72E-02	-
16.09 lipid binding	74	0.06	1.02E-01	-0.04	1.34E-02	0.62	r#0 ****	-
16.11 amino acid/amino acid derivatives binding	19	-0.03	2.76E-01	-0.02	2.95E-01	0.87	r#0 ****	-
16.13 C-compound binding	55	0.05	2.11E-01	0.01	4.36E-01	0.53	r#0 ****	-
16.13.01 sugar binding	13	0.05	3.55E-01	0.00	4.47E-01	0.12	3.48E-01	2.02E-02
16.13.03 fatty acid binding (e.g. acyl-carrier protein)	6	-0.18	6.12E-02	-0.08	1.40E-01	0.47	1.76E-01	3.24E-01
16.14 selen binding	4	0.12	2.52E-01	-0.25	low **	-0.82	9.03E-02	2.72E-02
16.17 metal binding	887	0.05	high **	0.03	high ***	0.64	r#0 ****	-
16.17.01 calcium binding	127	0.09	high **	0.01	5.00E-01	0.66	r#0 ****	-
16.17.07 magnesium binding	4	0.31	3.19E-02	0.16	7.34E-02	0.70	1.49E-01	4.59E-01
16.17.09 heavy metal binding (Cu, Fe, Zn)	678	0.04	2.61E-02	0.04	high ****	0.64	r#0 ****	-
16.19 nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	1379	0.01	2.10E-01	0.02	1.45E-02	0.65	r#0 ****	-
16.19.01 cyclic nucleotide binding (cAMP, cGMP, etc.)	22	0.06	2.65E-01	-0.01	3.08E-01	0.64	r#0 ***	-
16.19.03 ATP binding	1012	0.03	7.77E-02	0.04	high ****	0.63	r#0 ****	-
16.19.05 GTP binding	214	-0.06	low ***	-0.03	low **	0.65	r#0 ****	-
16.21 complex cofactor/cosubstrate/vitamine binding	98	-0.09	low ***	-0.09	low ****	0.75	r#0 ****	-
16.21.01 heme binding	3	0.14	2.41E-01	0.09	2.39E-01	0.88	1.55E-01	-
16.21.05 FAD/FMN binding	26	-0.13	low **	-0.09	low **	0.80	r#0 ****	-
16.21.07 NAD/NADP binding	46	-0.09	1.12E-02	-0.12	low ****	0.74	r#0 ****	-
16.21.08 Fe/S binding	7	-0.01	4.30E-01	0.04	3.63E-01	0.71	3.71E-02	4.07E-01
16.21.11 thiamine pyrophosphate binding	3	-0.02	4.32E-01	0.19	6.36E-02	0.71	2.47E-01	-
16.21.15 biotin binding	1	0.26	-	-0.05	-	-	-	-
16.21.17 pyridoxal phosphate binding	11	-0.21	low **	-0.16	low **	0.90	r#0 ****	-
16.25 oxygen binding	103	0.05	1.49E-01	0.03	2.02E-01	0.35	r#0 ***	-
18 REGULATION OF METABOLISM AND PROTEIN FUNCTION	500	-0.01	4.49E-02	-0.02	low ***	0.69	r#0 ****	-
18.01 regulation by	346	0.01	3.21E-01	-0.01	2.50E-02	0.70	r#0 ****	-
18.01.01 regulation by modification	323	0.01	3.17E-01	-0.01	4.82E-02	0.69	r#0 ****	-
18.01.07 regulation by binding / dissociation	23	0.01	4.95E-01	-0.05	8.49E-02	0.85	r#0 ****	-
18.02 regulation of protein activity	495	-0.01	5.95E-02	-0.02	low ***	0.69	r#0 ****	-
18.02.01 enzymatic activity regulation / enzyme regulator	184	-0.05	low **	-0.05	low ****	0.70	r#0 ****	-
18.02.01.01 enzyme activator	81	-0.09	low **	-0.05	low **	0.85	r#0 ****	-
18.02.01.01.01 GTPase activator (GAP)	16	-0.23	low ***	-0.10	1.48E-02	0.81	r#0 ****	-
18.02.01.01.05 kinase activator	42	-0.02	2.54E-01	-0.03	9.84E-02	0.85	r#0 ****	-
18.02.01.02 enzyme inhibitor	57	0.03	3.57E-01	0.00	3.55E-01	0.55	r#0 ****	-
18.02.01.02.03 protease inhibitor	21	0.08	1.65E-01	-0.02	2.80E-01	0.45	2.13E-02	1.10E-01
18.02.01.02.05 kinase inhibitor	34	-0.02	2.71E-01	0.02	3.85E-01	0.80	r#0 ****	-
18.02.03 guanyl-nucleotide exchange factor (GEF)	18	-0.02	3.18E-01	-0.02	2.85E-01	0.33	9.38E-02	4.74E-02
18.02.05 regulator of G-protein signalling	5	-0.19	6.66E-02	-0.13	6.96E-02	0.68	1.02E-01	4.63E-01
18.02.09 regulator of transcription factor	20	0.06	2.65E-01	0.01	4.82E-01	0.71	r#0 ***	-
18.02.10 regulation of channel activity	1	-0.28	-	-0.38	-	-	-	-
20 CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES	1727	-0.02	low ****	-0.02	low ****	0.68	r#0 ****	-

20.01 transported compounds (substrates)	1296	-0.02	low ****	-0.03	low ****	0.67	r#0 ****	-
20.01.01 ion transport	321	-0.03	low **	-0.04	low ****	0.70	r#0 ****	-
20.01.01.01 cation transport (H+, Na+, K+, Ca2+, NH4+, etc.)	248	-0.01	6.77E-02	-0.03	low **	0.72	r#0 ****	-
20.01.01.01.01 heavy metal ion transport (Cu+, Fe3+, etc.)	38	-0.02	2.40E-01	-0.05	3.79E-02	0.81	r#0 ****	-
20.01.01.01.01.01 siderophore-iron transport	2	0.05	4.33E-01	-0.08	2.63E-01	-	-	-
20.01.01.01.07 anion transport	70	-0.06	2.09E-02	-0.09	low ****	0.71	r#0 ****	-
20.01.01.01.07.01 nitrate transport	5	-0.16	1.05E-01	-0.24	low **	0.82	4.29E-02	2.85E-01
20.01.01.01.07.05 sulfate/sulfite transport	9	0.08	2.66E-01	-0.12	2.74E-02	0.68	2.15E-02	4.37E-01
20.01.01.01.07.07 phosphate transport	8	-0.10	1.44E-01	0.00	4.65E-01	0.37	1.82E-01	1.99E-01
20.01.01.01.07.08 organic anion transport	17	-0.13	3.08E-02	-0.07	4.54E-02	0.62	r#0 **	-
20.01.01.01.07.09 chloride transport	7	-0.02	3.79E-01	0.00	4.26E-01	0.95	r#0 ***	-
20.01.03 C-compound and carbohydrate transport	92	-0.08	low **	-0.08	low ****	0.72	r#0 ****	-
20.01.03.01 sugar transport	75	-0.10	low **	-0.09	low ****	0.73	r#0 ****	-
20.01.03.03 C4-dicarboxylate transport (e.g. malate, succinate, fumarate)	5	0.00	4.69E-01	0.12	1.22E-01	0.78	6.18E-02	3.55E-01
20.01.07 amino acid/amino acid derivatives transport	54	-0.09	low **	-0.06	low **	0.78	r#0 ****	-
20.01.09 peptide transport	45	0.03	3.88E-01	0.02	3.41E-01	0.60	r#0 ****	-
20.01.10 protein transport	258	-0.03	1.57E-02	-0.03	low **	0.59	r#0 ****	-
20.01.11 amine / polyamine transport	17	0.01	4.77E-01	0.03	3.16E-01	0.69	r#0 ***	-
20.01.13 lipid/fatty acid transport	66	-0.06	2.76E-02	-0.04	2.04E-02	0.51	r#0 ****	-
20.01.15 electron transport	448	0.01	2.53E-01	-0.01	1.22E-02	0.67	r#0 ****	-
20.01.17 nucleotide/nucleoside/nucleobase transport	31	-0.11	1.22E-02	-0.06	3.35E-02	0.85	r#0 ****	-
20.01.21 RNA transport	7	-0.02	3.90E-01	0.02	4.65E-01	0.94	r#0 ***	-
20.01.23 allantoin and allantatoate transport	1	-0.01	-	-0.04	-	-	-	-
20.01.25 vitamine/cofactor transport	4	-0.01	4.35E-01	0.12	1.32E-01	0.94	2.94E-02	1.64E-01
20.01.27 drug/toxin transport	40	-0.06	5.44E-02	-0.06	1.11E-02	0.80	r#0 ****	-
20.01.28 hormone transport	10	-0.04	2.87E-01	0.00	4.50E-01	0.53	5.74E-02	3.18E-01
20.03 transport facilities	449	-0.02	low **	-0.04	low ****	0.70	r#0 ****	-
20.03.01 channel / pore class transport	94	0.00	3.69E-01	-0.04	low **	0.68	r#0 ****	-
20.03.01.01 ion channels	65	0.05	1.86E-01	0.00	2.98E-01	0.63	r#0 ****	-
20.03.01.05 nuclear pore forming protein	1	-0.22	-	0.03	-	-	-	-
20.03.01.07 general bacterial porin family (e.g. ompf, sugar porin, omf)	1	-0.12	-	-0.17	-	-	-	-
20.03.02 carrier (electrochemical potential-driven transport)	107	-0.07	low **	-0.08	low ****	0.75	r#0 ****	-
20.03.02.02 symporter	27	-0.11	1.74E-02	-0.08	1.19E-02	0.69	r#0 ****	-
20.03.02.02.01 proton driven symporter	18	-0.12	3.53E-02	-0.06	6.71E-02	0.69	r#0 ***	-
20.03.02.02.02 sodium driven symporter	7	-0.10	1.56E-01	-0.14	2.35E-02	0.67	5.04E-02	4.69E-01
20.03.02.03 antiporter	81	-0.05	3.78E-02	-0.08	low ****	0.79	r#0 ****	-
20.03.02.03.01 proton driven antiporter	19	-0.06	1.63E-01	-0.08	2.24E-02	0.75	r#0 ***	-
20.03.02.03.02 sodium driven antiporter	4	0.03	4.58E-01	0.09	2.29E-01	0.85	7.35E-02	3.09E-01
20.03.22 transport ATPases	59	-0.02	1.66E-01	0.01	4.93E-01	0.61	r#0 ****	-
20.03.25 ABC transporters	2	-0.12	2.73E-01	-0.29	2.02E-02	-	-	-
20.09 transport routes	377	0.00	2.07E-01	0.00	2.84E-01	0.68	r#0 ****	-
20.09.01 nuclear transport	51	-0.09	low **	-0.01	3.01E-01	0.74	r#0 ****	-
20.09.02 chloroplast transport	5	0.16	1.57E-01	0.08	2.22E-01	0.29	3.20E-01	2.51E-01
20.09.03 peroxisomal transport	3	-0.24	7.87E-02	-0.18	5.88E-02	0.97	7.59E-02	-
20.09.04 mitochondrial transport	69	-0.09	low **	-0.08	low ***	0.71	r#0 ****	-
20.09.07 vesicular transport (Golgi network, etc.)	150	0.00	2.81E-01	0.01	4.99E-01	0.55	r#0 ****	-
20.09.07.03 ER to Golgi transport	26	0.00	4.17E-01	0.00	4.32E-01	0.57	r#0 **	-
20.09.07.05 intra Golgi transport	20	0.01	4.79E-01	0.03	3.18E-01	0.66	r#0 ***	-
20.09.07.06 post Golgi transport	6	0.13	1.83E-01	0.07	2.17E-01	0.50	1.54E-01	3.55E-01
20.09.07.07 retrograde transport	11	0.12	1.36E-01	0.00	4.33E-01	0.80	r#0 **	-
20.09.07.25 vesicle formation	2	-0.28	8.82E-02	-0.29	1.89E-02	-	-	-
20.09.07.26 vesicle docking	22	0.07	1.87E-01	0.10	1.59E-02	0.39	3.55E-02	6.11E-02
20.09.07.27 vesicle fusion	42	0.05	2.38E-01	0.05	8.46E-02	0.46	r#0 **	-
20.09.13 vacuolar/lysosomal transport	7	0.13	1.57E-01	0.00	4.47E-01	0.44	1.60E-01	2.78E-01
20.09.14 cytoskeleton-dependent transport	66	0.15	high ***	0.12	high ****	0.76	r#0 ****	-
20.09.14.01 tubulin dependent transport	49	0.12	high **	0.09	high **	0.78	r#0 ****	-
20.09.14.02 actin dependent transport	17	0.24	high **	0.20	high ****	0.64	r#0 **	-
20.09.16 cellular export and secretion	48	0.04	3.06E-01	0.01	4.76E-01	0.62	r#0 ****	-
20.09.16.09 vesicular cellular export	19	0.08	1.77E-01	0.11	1.69E-02	0.38	5.55E-02	6.85E-02
20.09.16.09.03 exocytosis	19	0.08	1.77E-01	0.11	1.69E-02	0.38	5.55E-02	6.85E-02
20.09.18 cellular import	3	0.04	4.51E-01	-0.12	1.28E-01	1.00	2.95E-02	-
20.09.18.09 vesicular cellular import	2	0.23	1.63E-01	0.01	4.98E-01	-	-	-
20.09.18.09.01 endocytosis	2	0.23	1.63E-01	0.01	4.98E-01	-	-	-
30 CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM	921	0.04	1.61E-02	0.04	high ****	0.57	r#0 ****	-
30.01 cellular signalling	650	0.02	2.51E-01	0.03	1.25E-02	0.61	r#0 ****	-
30.01.05 enzyme mediated signal transduction	356	0.00	1.19E-01	0.03	3.47E-02	0.58	r#0 ****	-
30.01.05.01 protein kinase	226	0.00	2.81E-01	0.04	1.40E-02	0.57	r#0 ****	-
30.01.05.01.03 MAPKKK cascade	33	0.03	4.29E-01	0.01	4.65E-01	0.66	r#0 ****	-
30.01.05.01.05 tyrosine kinase	47	0.03	3.72E-01	-0.04	6.60E-02	0.72	r#0 ****	-
30.01.05.01.06 serine/threonine kinase	141	0.00	2.25E-01	0.08	high ****	0.56	r#0 ****	-
30.01.05.03 protease mediated signal transduction	1	-0.04	-	0.23	-	-	-	-
30.01.05.05 G-protein mediated signal transduction	119	-0.02	1.15E-01	0.00	3.26E-01	0.61	r#0 ****	-
30.01.05.05.01 small GTPase mediated signal transduction	61	-0.07	1.97E-02	0.00	3.91E-01	0.53	r#0 ****	-
30.01.05.05.03 trimeric G-protein mediated signal transduction	58	0.03	3.47E-01	0.00	3.59E-01	0.72	r#0 ****	-
30.01.05.07 two-component signal transduction system (e.g. phosphorelay)	10	0.01	4.61E-01	0.11	5.40E-02	0.82	r#0 **	-

30.01.09 second messenger mediated signal transduction	253	0.07	high **	0.03	7.55E-02	0.60	r#0 ****	-
30.01.09.03 Ca ²⁺ mediated signal transduction	33	0.05	2.94E-01	-0.03	1.52E-01	0.70	r#0 ****	-
30.01.09.07 cAMP/cGMP mediated signal transduction	2	-0.07	3.57E-01	0.09	2.98E-01	-	-	-
30.01.09.08 hormone mediated signal transduction	145	0.02	3.61E-01	0.04	2.52E-02	0.61	r#0 ****	-
30.01.09.09 fatty acid derivatives mediated signal transduction	34	0.21	high ***	0.00	3.46E-01	0.63	r#0 ****	-
30.01.09.11 polyphosphoinositol mediated signal transduction	58	0.11	1.31E-02	0.02	3.23E-01	0.71	r#0 ****	-
30.05 transmembrane signal transduction	233	0.05	6.37E-02	0.08	high ****	0.42	r#0 ****	-
30.05.01 receptor enzyme mediated signalling	194	0.04	1.36E-01	0.10	high ****	0.43	r#0 ****	-
30.05.01.12 transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathways	99	0.01	3.79E-01	0.11	high ****	0.50	r#0 ****	-
30.05.01.18 transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signalling pathways	14	0.09	1.72E-01	0.03	3.45E-01	0.36	1.03E-01	9.71E-02
30.05.02 non-enzymatic receptor mediated signalling	37	0.09	7.54E-02	-0.01	3.01E-01	0.55	r#0 ***	-
30.05.02.16 hedgehog-dependent signalling pathway	2	0.45	2.51E-02	0.38	high **	-	-	-
30.05.02.24 G-protein coupled receptor signalling pathway	35	0.07	1.56E-01	-0.03	1.27E-01	0.50	r#0 **	-
30.07 regulation of signal transduction	7	0.00	4.32E-01	0.08	1.85E-01	-0.14	3.79E-01	3.38E-02
32 CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	1013	0.06	high ****	0.01	3.72E-01	0.58	r#0 ****	-
32.01 stress response	648	0.05	high **	-0.02	low **	0.62	r#0 ****	-
32.01.01 oxidative stress response	142	0.04	2.07E-01	-0.06	low ****	0.61	r#0 ****	-
32.01.03 osmotic and salt stress response	173	0.06	1.98E-02	-0.01	1.01E-01	0.64	r#0 ****	-
32.01.05 heat shock response	76	0.08	4.67E-02	0.04	1.02E-01	0.46	r#0 ****	-
32.01.06 cold shock response	134	0.01	4.29E-01	-0.03	1.45E-02	0.64	r#0 ****	-
32.01.07 unfolded protein response (e.g. ER quality control)	3	-0.23	9.06E-02	-0.04	3.44E-01	0.79	2.08E-01	-
32.01.09 DNA damage response	44	0.00	3.70E-01	0.00	4.31E-01	0.73	r#0 ****	-
32.01.11 nutrient starvation response	21	0.02	4.59E-01	-0.01	3.07E-01	0.74	r#0 ****	-
32.01.13 electromagnetic waves stress response (e.g. UV, X-ray)	22	0.01	4.76E-01	0.00	4.35E-01	0.77	r#0 ****	-
32.05 disease, virulence and defense	266	0.09	high ****	0.09	high ****	0.46	r#0 ****	-
32.05.01 resistance proteins	4	-0.04	3.57E-01	0.00	4.82E-01	0.87	6.33E-02	2.82E-01
32.05.01.01 antibiotic resistance	1	0.42	-	0.40	-	-	-	-
32.05.01.07 electromagnetic waves resistance (e.g. UV)	3	-0.19	1.22E-01	-0.13	1.24E-01	0.52	3.25E-01	-
32.05.05 virulence, disease factors	3	-0.17	1.50E-01	0.12	1.68E-01	0.10	4.67E-01	-
32.07 detoxification	185	0.06	3.81E-02	-0.03	1.04E-02	0.63	r#0 ****	-
32.07.03 detoxification by modification	9	-0.15	6.17E-02	-0.08	9.93E-02	0.44	1.15E-01	2.38E-01
32.07.07 oxygen and radical detoxification	180	0.06	1.77E-02	-0.02	1.97E-02	0.63	r#0 ****	-
32.07.07.01 catalase reaction	3	0.00	4.66E-01	-0.20	3.94E-02	0.99	5.50E-02	-
32.07.07.03 glutathione conjugation reaction	44	0.21	high ****	0.02	4.27E-01	0.55	r#0 ****	-
32.07.07.05 peroxidase reaction	50	-0.01	2.98E-01	-0.07	low **	0.70	r#0 ****	-
32.07.07.07 superoxide metabolism	11	0.03	4.28E-01	-0.11	3.07E-02	0.88	r#0 ***	-
32.10 degradation / modification of foreign (exogenous) compounds	1	0.48	-	0.36	-	-	-	-
34 INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1130	0.07	high ****	0.03	high ***	0.64	r#0 ****	-
34.01 homeostasis	48	0.09	4.26E-02	0.01	4.56E-01	0.79	r#0 ****	-
34.01.01 homeostasis of cations	39	0.10	4.76E-02	0.01	4.82E-01	0.79	r#0 ****	-
34.01.01.01 homeostasis of metal ions (Na, K, Ca etc.)	38	0.10	4.03E-02	0.01	4.90E-01	0.79	r#0 ****	-
34.01.01.03 homeostasis of protons	1	-0.09	-	-0.08	-	-	-	-
34.01.03 homeostasis of anions	2	-0.08	3.26E-01	-0.07	2.91E-01	-	-	-
34.01.03.03 homeostasis of phosphate	2	-0.08	3.26E-01	-0.07	2.91E-01	-	-	-
34.05 cell motility	77	0.17	high ****	0.13	high ****	0.72	r#0 ****	-
34.05.02 motor activity	77	0.17	high ****	0.13	high ****	0.72	r#0 ****	-
34.07 cell adhesion	25	-0.05	1.34E-01	-0.04	1.13E-01	0.64	r#0 ***	-
34.07.01 cell-cell adhesion	2	-0.35	4.79E-02	-0.18	1.00E-01	-	-	-
34.07.02 cell-matrix adhesion	2	-0.14	2.46E-01	-0.20	7.04E-02	-	-	-
34.11 cellular sensing and response to external stimulus	1005	0.06	high ****	0.02	1.07E-02	0.63	r#0 ****	-
34.11.01 photoperception and response	205	0.03	2.48E-01	0.02	3.14E-01	0.63	r#0 ****	-
34.11.01.02 phototropism	10	0.06	3.32E-01	0.02	4.62E-01	0.70	1.16E-02	3.90E-01
34.11.03 chemoperception and response	575	0.09	high ****	0.03	high **	0.63	r#0 ****	-
34.11.03.12 water response	99	0.10	high **	-0.03	1.95E-02	0.49	r#0 ****	-
34.11.03.13 osmosensing and response	174	0.06	1.92E-02	-0.01	9.66E-02	0.64	r#0 ****	-
34.11.05 mechanical stimulus perception and response	8	0.25	1.75E-02	0.08	1.52E-01	0.33	2.16E-01	1.67E-01
34.11.07 gravity perception and response	23	-0.01	3.48E-01	0.05	1.98E-01	0.61	r#0 ***	-
34.11.07.01 gravitropism	20	0.02	5.00E-01	0.08	5.42E-02	0.45	2.30E-02	1.21E-01
34.11.09 temperature perception and response	217	0.03	2.29E-01	0.00	2.38E-01	0.54	r#0 ****	-
34.11.10 response to biotic stimulus	169	0.05	5.59E-02	0.04	2.73E-02	0.68	r#0 ****	-
34.11.11 rhythm (e.g. circadian, ultradian)	26	-0.05	1.29E-01	0.01	4.77E-01	0.75	r#0 ****	-
34.11.13 gas and metabolite distribution	2	0.38	5.06E-02	0.16	1.47E-01	-	-	-
34.11.13.01 gas exchange and distribution	2	0.38	5.06E-02	0.16	1.47E-01	-	-	-
36 SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	474	0.10	high ****	0.05	high ****	0.62	r#0 ****	-
36.20 plant / fungal specific systemic sensing and response	425	0.10	high ****	0.06	high ****	0.63	r#0 ****	-
36.20.16 plant defense response	66	0.02	4.67E-01	0.01	4.29E-01	0.58	r#0 ****	-
36.20.16.01 disease resistance (R-gene) specific	6	-0.09	2.03E-01	-0.02	3.75E-01	0.17	3.74E-01	1.50E-01
36.20.16.03 jasmonic acid/ethylene dependent systemic resistance	20	-0.03	2.59E-01	0.02	4.31E-01	0.67	r#0 ***	-
36.20.16.05 systemic acquired resistance	16	0.01	4.81E-01	-0.02	2.54E-01	0.51	2.28E-02	2.23E-01
36.20.18 plant hormonal regulation	375	0.11	high ****	0.06	high ****	0.63	r#0 ****	-

36.20.18.01 auxin response	152	0.15	high ****	0.11	high ****	0.65	r#0 ****	-
36.20.18.02 ethylen response	83	0.11	high **	0.07	high **	0.64	r#0 ****	-
36.20.18.04 cytokinin response	28	0.04	3.62E-01	0.10	high **	0.84	r#0 ****	-
36.20.18.05 abscisic acid response	125	0.11	high **	0.05	high **	0.55	r#0 ****	-
36.20.18.06 brassinosteroid response	13	0.13	8.48E-02	0.09	8.29E-02	0.57	2.15E-02	3.46E-01
36.20.18.99 other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)	122	0.13	high ****	0.07	high **	0.63	r#0 ****	-
36.25 animal specific systemic sensing and response	81	0.11	high **	0.01	4.93E-01	0.68	r#0 ****	-
36.25.07 animal hormonal regulation	5	-0.27	2.08E-02	-0.14	4.82E-02	0.84	3.67E-02	2.58E-01
36.25.16 immune response	76	0.14	high ***	0.02	3.42E-01	0.66	r#0 ****	-
36.25.16.01 innate immune response (invertebrates and vertebrates)	7	0.03	4.42E-01	-0.07	1.53E-01	0.83	1.02E-02	1.98E-01
36.25.16.01.03 phagocyte response (e.g. macrophages, dendritic cells, granulocytes)	5	0.01	4.70E-01	-0.08	1.66E-01	0.93	1.16E-02	1.09E-01
36.25.16.07 inflammatory response	4	0.11	2.78E-01	0.02	4.78E-01	0.30	3.48E-01	3.25E-01
36.25.16.08 response to wounding	59	0.14	high ***	0.02	3.12E-01	0.68	r#0 ****	-
36.25.16.09 blood coagulation	1	0.10	-	-0.03	-	-	-	-
38 TRANSPOSABLE ELEMENTS, VIRAL AND PLASMID PROTEINS	4	0.01	4.89E-01	-0.15	6.42E-02	1.00	r#0 ***	-
38.05 viral proteins	4	0.01	4.89E-01	-0.15	6.42E-02	1.00	r#0 ***	-
40 CELL FATE	285	0.01	4.48E-01	-0.01	5.28E-02	0.68	r#0 ****	-
40.01 cell growth / morphogenesis	162	0.00	2.41E-01	-0.02	5.05E-02	0.64	r#0 ****	-
40.01.01 non-directional cell growth	17	0.01	4.83E-01	0.03	3.67E-01	0.56	r#0 **	-
40.01.03 directional cell growth (morphogenesis)	97	-0.07	low **	-0.06	low ***	0.62	r#0 ****	-
40.01.03.01 regulation of directional cell growth	1	-0.52	-	-0.29	-	-	-	-
40.01.03.03 guidance of longitudinal cell extension (e.g. pollen tube guidance, axonal pathfinding)	11	-0.18	2.16E-02	-0.12	2.19E-02	0.00	4.99E-01	1.47E-02
40.01.05 growth regulators / regulation of cell size	10	0.12	1.47E-01	0.02	4.08E-01	0.65	2.12E-02	4.95E-01
40.01.05.01 interpretation of external signals that control cell growth	1	0.05	-	-0.01	-	-	-	-
40.02	26	0.03	3.85E-01	0.09	2.18E-02	0.85	r#0 ****	-
40.02.03 activity of intercellular mediators	26	0.03	3.85E-01	0.09	2.18E-02	0.85	r#0 ****	-
40.02.03.01 cytokines (interleukines, colony stimulating factors, etc.)	26	0.03	3.85E-01	0.09	2.18E-02	0.85	r#0 ****	-
40.10 cell death	68	0.01	4.06E-01	-0.04	2.12E-02	0.73	r#0 ****	-
40.10.02 apoptosis (type I programmed cell death)	44	0.01	4.49E-01	-0.03	1.05E-01	0.72	r#0 ****	-
40.10.02.01 anti-apoptosis	20	-0.03	2.45E-01	-0.06	5.29E-02	0.56	r#0 **	-
40.10.02.02 apoptotic program	6	0.03	4.58E-01	-0.08	1.38E-01	0.93	r#0 **	-
40.10.02.02.02 caspase activation	6	0.03	4.58E-01	-0.08	1.38E-01	0.93	r#0 **	-
40.10.02.03 induction of apoptosis	4	0.04	4.42E-01	0.12	1.35E-01	0.77	1.14E-01	3.99E-01
40.10.02.04 regulation of apoptosis	7	-0.11	1.40E-01	0.02	4.70E-01	0.76	2.35E-02	3.23E-01
40.10.90 other programmed cell death	3	0.12	2.86E-01	0.06	3.26E-01	0.96	8.50E-02	-
40.20 cell aging	32	0.12	3.39E-02	0.01	4.56E-01	0.77	r#0 ****	-
41 DEVELOPMENT (Systemic)	586	-0.01	1.26E-02	0.01	3.66E-01	0.62	r#0 ****	-
41.01 fungal/microorganism development	22	0.02	4.93E-01	-0.02	2.22E-01	0.65	r#0 ***	-
41.01.03 tissue pattern formation	10	0.03	4.45E-01	0.05	2.73E-01	0.69	1.36E-02	4.18E-01
41.03 plant development	468	-0.03	low **	0.00	2.19E-01	0.62	r#0 ****	-
41.03.01 gametophyte development	52	-0.06	4.30E-02	-0.03	7.85E-02	0.48	r#0 ***	-
41.03.01.01 microspore development (male gametophyte)	26	-0.02	2.68E-01	-0.03	1.94E-01	0.44	1.14E-02	8.15E-02
41.03.01.02 macrospore development (female gametophyte)	25	-0.08	7.31E-02	-0.06	4.75E-02	0.65	r#0 ***	-
41.03.02 fertilization (pollen hydration, pollen tube guidance, double fertilization of oocyte and endosperm)	17	-0.19	low **	-0.13	low **	0.36	7.89E-02	7.02E-02
41.03.03 embryonal development	231	-0.06	low ***	-0.01	6.47E-02	0.71	r#0 ****	-
41.03.04 endosperm development	10	0.04	4.03E-01	0.10	7.54E-02	0.49	7.31E-02	2.74E-01
41.03.05 germination	23	-0.06	1.20E-01	0.03	2.96E-01	0.69	r#0 ***	-
41.03.06 vegetative development	6	-0.19	5.60E-02	-0.04	2.76E-01	0.19	3.57E-01	1.60E-01
41.03.07 flower development	58	0.07	1.01E-01	0.04	9.70E-02	0.50	r#0 ****	-
41.03.08 fruit development and ripening	70	0.02	4.98E-01	0.03	1.51E-01	0.60	r#0 ****	-
41.03.10 senescence	18	0.08	1.95E-01	0.06	1.27E-01	0.06	4.01E-01	r#0.65 **
41.05 animal development	41	-0.09	1.65E-02	0.03	3.11E-01	0.59	r#0 ****	-
41.05.04 embryogenesis	19	-0.14	1.28E-02	-0.01	3.10E-01	0.68	r#0 ***	-
41.05.19 asymmetries and axis determination	19	-0.03	2.83E-01	0.08	7.77E-02	0.49	1.59E-02	1.81E-01
41.05.19.08 proximal-distal axis determination	4	-0.18	1.05E-01	0.14	1.09E-01	0.97	1.68E-02	1.03E-01
41.05.23 sex differentiation	1	-0.39	-	-0.07	-	-	-	-
41.05.25 gametogenesis	1	0.20	-	-0.05	-	-	-	-
42 BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	1038	0.05	high ***	0.04	high ****	0.69	r#0 ****	-
42.01 cell wall	136	-0.01	1.66E-01	-0.01	1.96E-01	0.62	r#0 ****	-
42.02 eukaryotic plasma membrane	4	0.30	3.45E-02	0.05	3.38E-01	0.97	1.70E-02	1.04E-01
42.04 cytoskeleton/structural proteins	124	0.03	3.52E-01	0.02	3.53E-01	0.77	r#0 ****	-
42.04.03 actin cytoskeleton	41	0.05	2.60E-01	0.03	3.11E-01	0.64	r#0 ****	-
42.04.05 microtubule cytoskeleton	37	-0.03	2.11E-01	-0.01	2.73E-01	0.81	r#0 ****	-
42.06 cell junction	1	-0.05	-	-0.14	-	-	-	-
42.06.03 cell-substrate adherens junction	1	-0.05	-	-0.14	-	-	-	-
42.08 Golgi	2	-0.20	1.60E-01	-0.18	9.92E-02	-	-	-
42.10 nucleus	707	0.07	high ****	0.07	high ****	0.67	r#0 ****	-
42.10.03 organization of chromosome structure	706	0.07	high ****	0.07	high ****	0.67	r#0 ****	-
42.10.05 nuclear membrane	1	-0.13	-	-0.34	-	-	-	-
42.16 mitochondrion	6	-0.16	8.55E-02	-0.03	3.27E-01	0.81	2.55E-02	2.68E-01
42.19 peroxisome	16	0.00	4.13E-01	-0.04	1.45E-01	0.86	r#0 ****	-
42.25 vacuole or lysosome	4	0.14	2.08E-01	-0.04	3.06E-01	0.88	6.06E-02	2.74E-01
42.26 plastid	44	-0.06	4.73E-02	-0.05	3.18E-02	0.78	r#0 ****	-
42.26.03 chloroplast	33	-0.12	low **	-0.07	1.01E-02	0.77	r#0 ****	-
42.26.05 amyloplast	3	0.45	high **	0.10	2.35E-01	0.98	6.48E-02	-
42.26.11 etioplast	2	0.25	1.43E-01	-0.01	4.58E-01	-	-	-

42.27 extracellular / secretion proteins	1	0.18	-	0.02	-	-	-	-	-
42.27.01 extracellular matrix	1	0.18	-	0.02	-	-	-	-	-
42.30 prokaryotic cytoplasmic membrane	1	0.12	-	-0.02	-	-	-	-	-
42.34 prokaryotic cell envelope structures	17	0.04	3.87E-01	-0.01	3.54E-01	0.50	2.02E-02	2.08E-01	-
42.34.01 bacterial outer membrane (only in Gram-bacteria)	3	-0.08	3.08E-01	-0.10	1.81E-01	0.85	1.74E-01	-	-
42.34.07 peptidoglycan layer or other prokaryotic cell wall	14	0.06	2.91E-01	0.01	4.97E-01	0.43	6.31E-02	1.51E-01	-
43 CELL TYPE DIFFERENTIATION	100	0.00	2.87E-01	-0.02	4.93E-02	0.53	r#0 ****	-	-
43.02 plant cell type differentiation	78	-0.01	2.13E-01	-0.02	1.29E-01	0.53	r#0 ****	-	-
43.02.01 stem cell/meristematic cell	9	-0.05	2.52E-01	0.07	1.89E-01	0.31	2.09E-01	1.36E-01	-
43.02.05 epidermal cell	46	-0.02	2.31E-01	-0.04	6.30E-02	0.64	r#0 ****	-	-
43.02.05.01 stomata/guard cell	8	0.11	1.94E-01	0.00	4.65E-01	0.29	2.43E-01	1.46E-01	-
43.02.05.02 plant hair cell (trichome e.g. cotton)	25	0.01	4.43E-01	0.01	4.87E-01	0.67	r#0 ***	-	-
43.02.05.03 root hair	9	-0.17	3.48E-02	-0.17	low **	0.81	r#0 **	-	-
43.02.09 vascular cell	3	-0.05	3.52E-01	0.01	4.95E-01	-0.39	3.73E-01	-	-
43.02.09.03 vessel element (xylem)	3	-0.05	3.52E-01	0.01	4.95E-01	-0.39	3.73E-01	-	-
43.02.17 gametophytic cell	20	0.03	4.45E-01	-0.01	3.04E-01	0.39	4.40E-02	7.12E-02	-
43.02.17.01 male gametophyte	17	0.05	3.06E-01	0.01	4.66E-01	0.26	1.61E-01	2.89E-02	-
43.02.17.01.01 generative pollen cell	9	0.11	1.92E-01	0.08	1.58E-01	-0.39	1.51E-01	r#0.65 **	-
43.02.17.02 female gametophyte	3	-0.14	1.97E-01	-0.12	1.31E-01	0.68	2.60E-01	-	-
43.03 animal cell type differentiation	30	-0.01	3.20E-01	-0.06	2.80E-02	0.67	r#0 ****	-	-
43.03.01 stem cell (toti- or pluripotent)	2	0.03	4.80E-01	0.16	1.54E-01	-	-	-	-
43.03.04 epidermal cell (e.g. keratinocytes)	1	0.26	-	0.02	-	-	-	-	-
45 TISSUE DIFFERENTIATION	60	-0.02	2.08E-01	0.03	2.25E-01	0.63	r#0 ****	-	-
45.02 plant tissue	60	-0.02	2.08E-01	0.03	2.25E-01	0.63	r#0 ****	-	-
45.02.01 meristematic tissue	44	0.04	2.83E-01	0.05	9.01E-02	0.52	r#0 ***	-	-
45.02.01.01 shoot apical meristem	11	-0.05	2.40E-01	-0.02	3.37E-01	0.49	6.29E-02	2.55E-01	-
45.02.01.02 root meristem	2	-0.29	8.12E-02	-0.02	4.10E-01	-	-	-	-
45.02.13 vascular tissue	19	-0.13	2.01E-02	-0.03	2.09E-01	0.76	r#0 ****	-	-
47 ORGAN DIFFERENTIATION	162	0.01	4.13E-01	0.03	9.16E-02	0.60	r#0 ****	-	-
47.02 plant organ	156	0.00	3.29E-01	0.03	9.22E-02	0.63	r#0 ****	-	-
47.02.01 shoot	123	0.01	4.03E-01	0.03	1.28E-01	0.59	r#0 ****	-	-
47.02.01.02 leaf	62	-0.01	2.26E-01	0.01	4.73E-01	0.71	r#0 ****	-	-
47.02.01.03 flower	51	0.03	3.80E-01	0.04	1.38E-01	0.38	r#0 **	-	-
47.02.01.03.02 petal	9	0.01	4.91E-01	0.01	4.88E-01	0.76	r#0 **	-	-
47.02.01.03.03 anther	2	0.15	2.79E-01	-0.03	3.93E-01	-	-	-	-
47.02.01.03.04 carpel	2	0.04	4.50E-01	0.02	4.83E-01	-	-	-	-
47.02.01.05 seed	10	0.00	4.27E-01	0.00	4.72E-01	0.55	5.12E-02	3.40E-01	-
47.02.02 root	44	0.00	3.68E-01	0.05	8.87E-02	0.74	r#0 ****	-	-
47.03 animal organ	6	0.07	3.34E-01	-0.02	3.43E-01	0.01	4.96E-01	9.31E-02	-
47.03.02 sensory organs	1	0.37	-	0.25	-	-	-	-	-
47.03.02.02 eye	1	0.37	-	0.25	-	-	-	-	-
47.03.15 reproductive apparatus	5	0.01	4.86E-01	-0.08	1.68E-01	-0.35	2.81E-01	5.40E-02	-
70 SUBCELLULAR LOCALIZATION	3235	-0.01	low ****	0.00	low ****	0.67	r#0 ****	-	-
70.01 cell wall	265	0.01	4.23E-01	-0.01	1.13E-01	0.70	r#0 ****	-	-
70.02 eukaryotic plasma membrane / membrane attached	395	-0.01	6.17E-02	-0.01	1.70E-02	0.55	r#0 ****	-	-
70.02.01 eukaryotic intracellular plasma membrane	2	0.07	3.98E-01	0.11	2.39E-01	-	-	-	-
70.03 cytoplasm	946	-0.10	low ****	-0.07	low ****	0.66	r#0 ****	-	-
70.04 cytoskeleton	134	0.01	4.30E-01	-0.01	1.49E-01	0.81	r#0 ****	-	-
70.04.03 actin cytoskeleton	18	0.07	2.50E-01	-0.03	1.94E-01	0.72	r#0 ***	-	-
70.04.05 microtubule cytoskeleton	97	0.03	3.74E-01	0.01	4.49E-01	0.81	r#0 ****	-	-
70.06 cell junction	3	0.01	4.81E-01	-0.03	3.64E-01	0.99	4.13E-02	-	-
70.06.04 intercellular junction (gap junction/adherens junction)	3	0.01	4.81E-01	-0.03	3.64E-01	0.99	4.13E-02	-	-
70.07 endoplasmic reticulum	172	-0.09	low ****	-0.11	low ****	0.68	r#0 ****	-	-
70.08 Golgi	67	-0.07	low **	-0.02	1.15E-01	0.62	r#0 ****	-	-
70.09 intracellular transport vesicles	61	-0.04	9.32E-02	-0.01	2.22E-01	0.56	r#0 ****	-	-
70.10 nucleus	1625	0.03	1.81E-02	0.03	high ****	0.68	r#0 ****	-	-
70.10.03 chromosome	135	0.14	high ****	0.06	high **	0.71	r#0 ****	-	-
70.10.05 nuclear membrane	38	0.01	4.77E-01	0.01	4.53E-01	0.68	r#0 ****	-	-
70.10.06 nuclear matrix	51	0.00	3.75E-01	-0.02	1.69E-01	0.63	r#0 ****	-	-
70.10.07 nucleolus	71	-0.08	low **	-0.06	low **	0.67	r#0 ****	-	-
70.10.09 nuclear speckles	13	-0.12	5.51E-02	-0.19	low **	0.82	r#0 ***	-	-
70.16 mitochondrion	2311	0.00	low **	0.00	low **	0.64	r#0 ****	-	-
70.16.01 mitochondrial outer membrane	12	-0.07	1.64E-01	-0.14	low **	0.78	r#0 **	-	-
70.16.03 mitochondrial intermembrane space	8	0.00	4.41E-01	-0.01	3.85E-01	0.67	3.33E-02	4.56E-01	-
70.16.05 mitochondrial inner membrane	114	-0.12	low ****	-0.10	low ****	0.74	r#0 ****	-	-
70.16.07 mitochondrial matrix	29	-0.17	low ***	-0.13	low ***	0.65	r#0 ****	-	-
70.19 peroxisome	52	-0.04	9.03E-02	-0.11	low ****	0.79	r#0 ****	-	-
70.22 endosome	33	-0.04	1.60E-01	0.06	8.87E-02	0.61	r#0 ****	-	-
70.25 vacuole or lysosome	31	-0.09	3.30E-02	-0.09	low **	0.67	r#0 ****	-	-
70.26 plastid	2704	0.00	3.30E-02	0.02	4.83E-02	0.67	r#0 ****	-	-
70.26.03 chloroplast	2682	0.01	5.53E-02	0.02	3.46E-02	0.68	r#0 ****	-	-
70.26.05 amyloplast	1	-0.29	-	-0.22	-	-	-	-	-
70.26.07 chromoplast	24	-0.13	1.28E-02	-0.07	2.28E-02	0.54	r#0 **	-	-
70.26.11 etioplast	3	0.01	4.87E-01	0.00	4.57E-01	0.98	5.59E-02	-	-
70.27 extracellular / secretion proteins	47	-0.01	2.89E-01	-0.04	5.19E-02	0.70	r#0 ****	-	-
70.27.01 extracellular matrix component	43	0.00	3.61E-01	-0.02	1.44E-01	0.70	r#0 ****	-	-
70.28 periplasmic space	1	0.05	-	0.18	-	-	-	-	-
73 CELL TYPE LOCALIZATION	18	-0.04	2.46E-01	-0.02	2.42E-01	0.36	7.25E-02	6.31E-02	-
73.02 plant cell type	18	-0.04	2.46E-01	-0.02	2.42E-01	0.36	7.25E-02	6.31E-02	-
73.02.05 specialized epidermal cell	18	-0.04	2.46E-01	-0.02	2.42E-01	0.36	7.25E-02	6.31E-02	-
73.02.05.01 stomata/guard cell	5	0.01	4.86E-01	-0.08	1.68E-01	-0.35	2.81E-01	5.40E-02	-
73.02.05.02 plant hair cell (trichome e.g. cotton)	13	-0.05	2.15E-01	0.00	4.10E-01	0.60	1.45E-02	4.11E-01	-

75 TISSUE LOCALIZATION	15	-0.11	5.64E-02	-0.02	2.74E-01	0.78	r#0 ***	-
75.02 plant tissue	15	-0.11	5.64E-02	-0.02	2.74E-01	0.78	r#0 ***	-
75.02.13 vascular tissue	15	-0.11	5.64E-02	-0.02	2.74E-01	0.78	r#0 ***	-
77 ORGAN LOCALIZATION	29	-0.08	5.05E-02	-0.04	9.30E-02	0.70	r#0 ****	-
77.02 plant organ	28	-0.10	2.99E-02	-0.05	5.87E-02	0.67	r#0 ****	-
77.02.01 shoot	28	-0.10	2.99E-02	-0.05	5.87E-02	0.67	r#0 ****	-
77.02.01.01 stem	1	-0.66	-	-0.24	-	-	-	-
77.02.01.02 leaf	9	-0.07	2.09E-01	-0.02	3.55E-01	0.74	1.09E-02	3.23E-01
77.02.01.05 seed	18	-0.08	1.02E-01	-0.06	8.06E-02	0.61	r#0 **	-
77.03 animal organ	1	0.37	-	0.25	-	-	-	-
77.03.02 sensory organs	1	0.37	-	0.25	-	-	-	-
77.03.02.02 eye	1	0.37	-	0.25	-	-	-	-
99 UNCLASSIFIED PROTEINS	3241	0.04	high ****	0.03	high ****	0.63	r#0 ****	-

表 7 カテゴリー-I に含まれる機能集団

高温ストレス下においてのみ、ポリソーム形成状態が維持される傾向にある機能集団のリスト。

機能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

01.02.03.03 assimilatory reduction of sulfur
01.20.38 metabolism of toxins/drugs
16.17.01 calcium binding
30.01.09 second messenger mediated signal transduction
30.01.09.09 fatty acid derivatives mediated signal transduction
32 CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE
32.01 stress response
32.07.07.03 glutathione conjugation reaction
34.11 cellular sensing and response to external stimulus
34.11.03.12 water response
36.25 animal specific systemic sensing and response
36.25.16 immune response
36.25.16.08 response to wounding
42.26.05 amyloplast

表 8 カテゴリー-II に属する機能集団

塩ストレス下においてのみ、ポリソーム形成状態が維持される傾向にある機能集団のリスト。機

能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

02.09 anaplerotic reactions
02.19 metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)
10.01.03.05 extension/ polymerization activity
14.07.03 modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation
16.17.09 heavy metal binding (Cu, Fe, Zn)
16.19.03 ATP binding
30 CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM
30.01.05.01.06 serine/threonine kinase
30.05 transmembrane signal transduction
30.05.01 receptor enzyme mediated signalling
30.05.01.12 transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathways
30.05.02.16 hedgehog-dependent signalling pathway
36.20.18.04 cytokinin response
70.10 nucleus

表 9 カテゴリー-III に含まれる機能集団

高温及び塩の両ストレス下において、ポリソーム形成状態が維持される傾向にある機能集団のリス

ト。機能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

10 CELL CYCLE AND DNA PROCESSING
10.01 DNA processing
10.01.03 DNA synthesis and replication
10.01.09 DNA restriction or modification
10.01.09.05 DNA conformation modification (e.g. chromatin)
10.03.04 nuclear and chromosomal cycle
10.03.04.05 chromosome segregation/division
11 TRANSCRIPTION
11.02 RNA synthesis
11.02.03 mRNA synthesis

11.02.03.04 transcriptional control
 16.03 nucleic acid binding
 16.03.01 DNA binding
 16.17 metal binding
 20.09.14 cytoskeleton-dependent transport
 20.09.14.01 tubulin dependent transport
 20.09.14.02 actin dependent transport
 32.05 disease, virulence and defense
 34 INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT
 34.05 cell motility
 34.05.02 motor activity
 34.11.03 chemoperception and response
 36 SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT
 36.20 plant / fungal specific systemic sensing and response
 36.20.18 plant hormonal regulation
 36.20.18.01 auxin response
 36.20.18.02 ethylen response
 36.20.18.05 abscisic acid response
 36.20.18.99 other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)
 42 BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS
 42.10 nucleus
 42.10.03 organization of chromosome structure
 70.10.03 chromosome
 99 UNCLASSIFIED PROTEINS

表 10 カテゴリーIVに含まれる機能集団

高温ストレス下においてのみ、ポリソーム形成状態が極端に阻害される傾向にある機能集団のリスト。機能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

01.05.12.01 Calvin cycle
 02.07.03 pentose-phosphate pathway non oxidative branch
 16.01 protein binding
 16.03.03 RNA binding
 18.02.01.01.01 GTPase activator (GAP)
 20.09.01 nuclear transport
 41.03 plant development
 41.03.03 embryonal development
 42.26.03 chloroplast
 70.08 Golgi

表 11 カテゴリーVに含まれる機能集団

塩ストレス下においてのみ、ポリソーム形成状態が極端に阻害される傾向にある機能集団のリスト。機能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

01.01.03 assimilation of ammonia, metabolism of the glutamate group
 01.01.03.02 metabolism of glutamate
 01.01.03.02.02 degradation of glutamate
 01.01.03.03 metabolism of proline
 01.01.03.03.01 biosynthesis of proline
 01.01.05 metabolism of urea cycle, creatine and polyamines
 01.01.05.01 metabolism of polyamines
 01.01.05.01.01 biosynthesis of polyamines
 01.01.05.03 metabolism of urea (urea cycle)
 01.01.06.02 metabolism of asparagine
 01.01.06.04 metabolism of threonine
 01.01.06.05.01 biosynthesis of methionine
 01.01.09 metabolism of the cysteine - aromatic group
 01.01.09.01 metabolism of glycine
 01.01.09.01.02 degradation of glycine
 01.01.09.03 metabolism of cysteine
 01.01.09.03.01 biosynthesis of cysteine
 01.01.09.06 metabolism of tryptophan
 01.01.11 metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine
 01.01.11.04 metabolism of leucine
 01.01.11.04.01 biosynthesis of leucine
 01.02 nitrogen, sulfur and selenium metabolism
 01.02.02 nitrogen metabolism
 01.02.03 sulfur metabolism
 01.03.01.01 purine nucleotide /nucleoside/nucleobase catabolism
 01.03.04 pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism

01.05.05 C-1 compound metabolism
 01.05.05.07 C-1 compound catabolism
 01.05.08 C-4 compound metabolism
 01.05.09 aminosaccharide metabolism
 01.05.11 aromate metabolism
 01.05.13 transfer of activated C-1 groups
 01.05.13.01 S-adenosyl-methionine - homocysteine cycle
 01.06 lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
 01.06.02 membrane lipid metabolism
 01.06.02.01 phospholipid metabolism
 01.06.02.03 sphingolipid metabolism
 01.06.05 fatty acid metabolism
 01.06.06 isoprenoid metabolism
 01.06.06.11 tetracyclic and pentacyclic triterpenes (cholesterin, steroids and hopanoids) metabolism
 01.07.04 utilization of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
 01.20 secondary metabolism
 01.20.19 metabolism of secondary products derived from glycine, L-serine and L-alanine
 01.20.19.01 metabolism of porphyrins
 01.20.35 metabolism of secondary products derived from L-phenylalanine and L-tyrosine
 01.20.35.01 metabolism of phenylpropanoids
 01.20.35.01.03 metabolism of lignins
 01.20.35.01.05 metabolism of stilbenes, flavonoids
 01.20.37.01 metabolism of thioredoxin, glutaredoxin, glutathion
 02.08 pyruvate dehydrogenase complex
 02.10 tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
 02.30.10 regulation of photosynthesis
 14.13 protein/peptide degradation
 16.14 selen binding
 16.21.07 NAD/NADP binding
 18 REGULATION OF METABOLISM AND PROTEIN FUNCTION
 18.02 regulation of protein activity
 20.01.01.01 cation transport (H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, NH₄⁺, etc.)
 20.01.01.07 anion transport
 20.01.01.07.01 nitrate transport
 20.01.10 protein transport
 20.03.01 channel / pore class transport
 20.03.02.03 antiporter
 32.01 stress response
 32.01.01 oxidative stress response
 32.07.07.05 peroxidase reaction
 43.02.05.03 root hair
 70.10.09 nuclear speckles
 70.16.01 mitochondrial outer membrane
 70.19 peroxisome
 70.25 vacuole or lysosome

表 12 カテゴリーVIに含まれる機能集団

高温及び塩の両ストレス下において、ポリソーム形成状態が極端に阻害される傾向にある機能集団のリスト。機能集団の名称は MIPS FunCat に従って付けられている (Ruepp et al., 2004)。

01 METABOLISM
 01.01 amino acid metabolism
 01.01.06 metabolism of the aspartate family
 01.01.06.05 metabolism of methionine
 01.03 nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
 01.03.01 purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
 01.03.01.03 purine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism
 01.05 C-compound and carbohydrate metabolism
 01.05.02 sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism
 01.05.02.07 sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism
 01.05.06 C-2 compound and organic acid metabolism
 01.05.07 C-3 compound metabolism
 01.05.12 autotrophic CO₂-fixation
 01.06.02.02 glycolipid metabolism
 01.07 metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
 01.07.01 biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
 02 ENERGY
 02.01 glycolysis and gluconeogenesis
 02.01.01 glycolysis methylglyoxal bypass
 02.07 pentose-phosphate pathway
 02.30 photosynthesis
 02.45 energy conversion and regeneration

02.45.03 light absorption
 02.45.15 energy generation (e.g. ATP synthase)
 12 PROTEIN SYNTHESIS
 12.01 ribosome biogenesis
 12.01.01 ribosomal proteins
 12.04 translation
 12.04.02 translation elongation
 14.07.02 modification with sugar residues (e.g. glycosylation, deglycosylation)
 14.07.04 modification by acetylation, deacetylation
 14.07.11 protein processing (proteolytic)
 16.19.05 GTP binding
 16.21 complex cofactor/cosubstrate/vitamine binding
 16.21.05 FAD/FMN binding
 16.21.17 pyridoxal phosphate binding
 18.02.01 enzymatic activity regulation / enzyme regulator
 18.02.01.01 enzyme activator
 20 CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES
 20.01 transported compounds (substrates)
 20.01.01 ion transport
 20.01.03 C-compound and carbohydrate transport
 20.01.03.01 sugar transport
 20.01.07 amino acid/amino acid derivatives transport
 20.03 transport facilities
 20.03.02 carrier (electrochemical potential-driven transport)
 20.09.04 mitochondrial transport
 40.01.03 directional cell growth (morphogenesis)
 41.03.02 fertilization (pollen hydration, pollen tube guidance, double fertilization of oocyte and endosperm)
 70 SUBCELLULAR LOCALIZATION
 70.03 cytoplasm
 70.07 endoplasmic reticulum
 70.10.07 nucleolus
 70.16 mitochondrion
 70.16.05 mitochondrial inner membrane
 70.16.07 mitochondrial matrix

II-III-X. 高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化を機能集団に属する個々の遺伝子のレベルにおいて比較する

高温及び塩の二つの異なるストレスによる翻訳状態の変化は、ゲノムスケール(図 34)、あるいは機能集団のレベル(図 35)において類似性を示すことをここまで述べた。続いては、機能集団に属する個々の mRNA 種のレベルにおける比較を行った。つまり、高温及び塩ストレス下では、同一の機能集団に属する mRNA 種の中でポリソーム形成が維持される傾向にある mRNA 種あるいは、極端に阻害される mRNA 種が、類似しているかどうかを検証した。検証は、機能集団に属する mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の相関係数を基に、相関の有無を検定することにより行った ($p < 0.01$ [片側])。その結果、試験した 668 の機能集団の内の 403 の機能集団において有意な相関が認められた。図 38 には例として、図 36 において例示した機能集団に属する mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の散布図を示した。異なるカテゴリーに属するいずれの機能集団においても、 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ が高い相関を示していることが解る(相関係数 $r = 0.5 - 0.72$)。これらの結果は、機能集団として挙動の差異に関わらず、機能集団に属する個々の mRNA 種の挙動の相互関係は、高温と塩ストレス下で類似していることを示している。つまり、例えば、高温ストレス下において、機能集団に属する他の mRNA 種と比較してポリソーム形成が維持される傾向にある mRNA 種は、塩ストレス下においても同様であることを示している。

有意な相関が認められなかった、つまり無相関であった 265 の機能集団には、属する mRNA 種の数が少ないために、そうした検定結果となっている集団が含まれると考えられる。そこで、これら 265 の機能集団については更に、全 18692 mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ のピアソン相関係数 0.65 と機能集団の相関係数の有意差の検定を行った ($p < 0.01$ [片側]) (“方法と材料”を参照)。以上の検定基準に基づいて、 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ に相関が認められない三つの機能集団 (*01.05.03.04 starch metabolism*、*41.03.10 senescence*、*43.02.17.01.01 generative pollen cell*) の存在を見出した。図 39A には、例として *01.05.03.04 starch metabolism* に属する mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の散布図を示したが、相関係数が低いことが解る (ピアソン相関係数 $r = 0.23$)。興味深いことに、Hsp ファミリー (Scharf et al., 2001; Lin et al., 2001; Krishna and Gloor, 2001; Agarwal et al., 2001) に属する mRNA 種の $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ の相関係数 r は 0.18 と低く、先の三つの機能集団と同様、相関は認められなかった (図 39B)。無相関であるということは、Hsp ファミリーを例として挙げると、機能集団としては高温及び塩いずれのストレス下においてもポリソーム形成が維持される傾向にあるが、個々の mRNA 種のレベルで見ると、維持される傾向にある mRNA 種が異なっていることを意味する。つまり、これらの結果は、先に挙げた三つの機能集団や Hsp ファミリーに対しては、個々の mRNA 種のレベルでのストレス特異的な選択的制御が、翻訳段階でなされている可能性を示唆するものである。

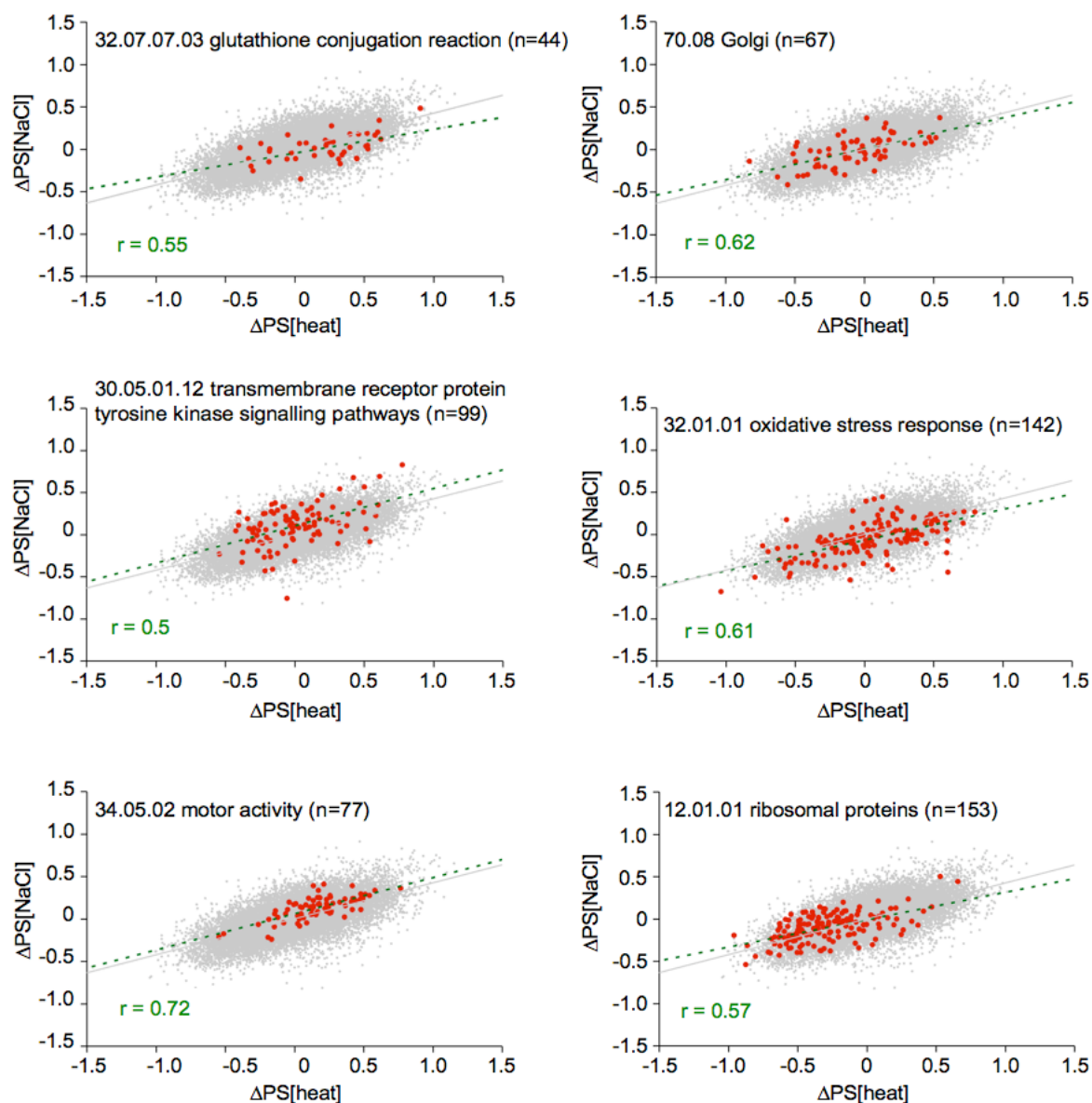


図 38 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ に相関が認められる集団

全 mRNA(グレーの点; $n=18226$)及び各図左上に名前を示した機能集団に属する mRNA 種(赤い丸)の $\Delta PS[\text{heat}]$ (横軸)と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ (縦軸)の散布図を示した。 $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ はそれぞれ高温及び塩ストレスによるポリソーム形成状態変化を示す指標である。各図左上には、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004)に由来する機能集団の名前を、集団に属する mRNA 種の数(n)と共に示した。緑色の点線は、各機能集団あるいは遺伝子ファミリーに属する mRNA 種のプロット(赤い丸)に対する回帰直線を、 r はピアソンの相関係数を表す。グレーの実線は、全 mRNA 種のプロット(グレーの点; $n=18226$)に対する回帰直線を表す。*32.07.07.03 glutathione conjugation reaction* はカテゴリー I に、*30.05.01.12 transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathways* はカテゴリー II に、*34.05.02 motor activity* はカテゴリー III に、*70.08 Golgi* はカテゴリー IV に、*32.01.01 oxidative stress response* はカテゴリー V に、*12.01.01 ribosomal proteins* はカテゴリー VI に含まれる。カテゴリーに関しては図 35 を参照。

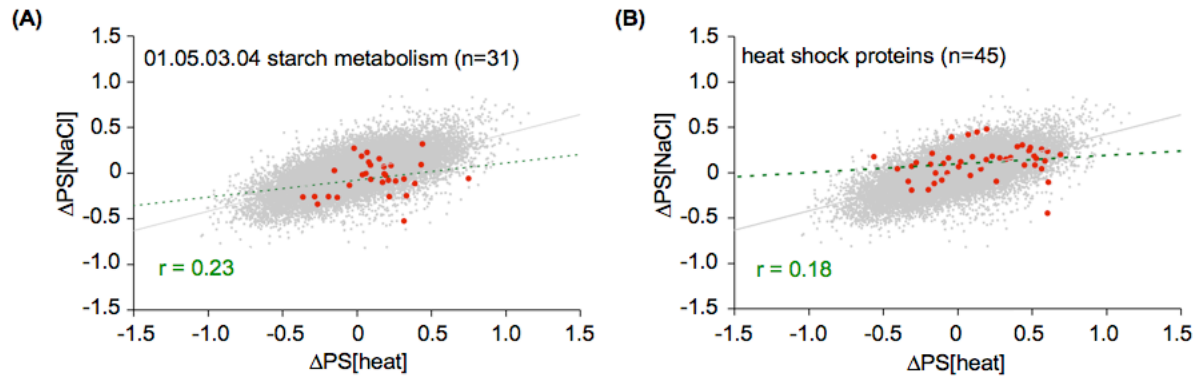


図 39 $\Delta PS[\text{heat}]$ と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ に相関が認められない集団

全 mRNA(グレーの点; $n=18226$)及び各図左上に名前を示した集団に属する mRNA 種(赤い丸)の $\Delta PS[\text{heat}]$ (横軸)と $\Delta PS[\text{NaCl}]$ (縦軸)の散布図を示した。 $\Delta PS[\text{heat}]$ 及び $\Delta PS[\text{NaCl}]$ はそれぞれ高温及び塩ストレスによるポリソーム形成状態変化を示す指標である。各図左上には、MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004)に由来する機能集団の名前(A)もしくは遺伝子ファミリーの名前(B)を、集団に属する mRNA 種の数(n)と共に示した。ゲノム情報に基づいて選択された 52 種類の heat shock protein の内(“方法と材料”を参照)、本解析で使用した全 18226 種の mRNA に含まれる 45 種を、heat shock proteins (B)として採用した。緑色の点線は、各機能集団あるいは遺伝子ファミリーに属する mRNA 種のプロット(赤い丸)に対する回帰直線を、 r はピアソン相関係数を表す。グレーの実線は、全 mRNA 種のプロット(グレーの点; $n=18226$)に対する回帰直線を表す。

II-IV. 考察

本研究では、マイクロアレイ解析を用いたポリソーム形成状態の定量化を通じて、植物における高温及び塩ストレスによる翻訳状態変化をゲノムワイドに評価することを試みた。翻訳段階に存在する環境ストレス応答機構に関する基本的な理解を深めることが本研究の目的であったため、均質性の高いシロイヌナズナ培養細胞を実験材料として用いた。高温及び塩という二つの異なる環境ストレスによる翻訳状態の変化を比較評価すると共に、全体的な傾向からはずれ顕著な挙動を示す遺伝子にのみ着目するのではなく、マイクロアレイ解析から得られた全遺伝子の翻訳状態変化に関する情報を利用した所に本研究の特徴がある。こうした解析を通じて、植物のストレスに応答した翻訳制御の特徴として、高温及び塩ストレス下により全体的にはポリソーム形成が阻害されるものの、ポリソーム形成状態が維持される mRNA から極端にポリソーム形成が阻害される mRNA まで、mRNA 種によりストレスによる翻訳状態への影響が様々であることが明らかとなった(図 21 and 図 31)。また、特徴的な挙動を示す機能集団が存在することを見出した(図 35 and 表 6-表 12)。この事は、ストレス応答における翻訳制御の重要性を示唆するものである。高温及び塩ストレス下における翻訳状態の変化は基本的には類似しているが(図 34 and 図 35)、蓄積転写産物量が増大する mRNA 種や Hsp ファミリー等に対しては、ストレス特異的な翻訳制御が存在していることも見出された。本研究を通じて、ダイナミックな翻訳段階の制御が、植物の環境ストレスに応答した遺伝子発現制御過程において重要な役割を有している可能性が見えてきた。

II-IV-1. 環境ストレスによる翻訳状態の変化における 5'-UTR の重要性

これまでに、脱水ストレスに曝されたシロイヌナズナ(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005)、ポリオウイルス感染した HeLa 細胞(Johannes et al., 1999)、ラパマイシン処理や熱処理した酵母(Preiss et al., 2003)、低酸素状態の哺乳類細胞(Thomas and Johannes, 2007)など、大部分の mRNA からの翻訳が抑制される様々な生理条件下の細胞に対して、その翻訳状態をゲノムワイドに捉える試みがなされてきた。ゲノムワイドに解析することで、全体的に翻訳が抑制される状況にあっても、ポリソーム形成状態が維持される mRNA から平均的な mRNA 以上にポリソーム形成が阻害される mRNA まで、ストレスの影響の受け方は mRNA により様々であることが明らかになってきた。本研究により明らかにされた高温及び塩ストレスによるシロイヌナズナ培養細胞における翻訳状態の変化もまた同様であった(図 21 and 図 31)。

こうした翻訳状態の変化における 5'-UTR の重要性は広く知られている(Mathews et al., 2007)。第一章では、*RPS18C* や *Act2* の 5'-UTR を付加し

た *in vitro* 合成 mRNA からの発現は、高温ストレス下のプロトプラストにおいて抑制される一方、*Hsp81-3* 5'-UTR を付加した場合にはそうした抑制が認められないことを示した。今回のマイクロアレイ解析の結果からも、*Hsp81-3* mRNA は高温ストレス下においてもポリソーム形成状態が維持されるのに対し、*RPS18C* や *Act2* mRNA は阻害される傾向にあることが示された(図 22)。予備的な結果であるが、マイクロアレイ解析の結果から $\Delta PS[heat]$ を降順に並べた場合の上位に位置した *ADH1* (ランキング 164) の 5'-UTR も、*Hsp81-3* 5'-UTR と同様に、高温ストレス下における合成 mRNA からの発現の抑制の回避に寄与した。今後、他の 5'-UTR についても検証を行う必要はあるが、こうした結果は、少なくとも高温ストレス下における翻訳状態の制御に 5'-UTR が決定的に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。塩ストレス下における翻訳状態の変化と 5'-UTR の関連については不明であるが、後述する様に、高温及び塩ストレス下における翻訳状態の変化が類似していることに鑑みて、5'-UTR が塩ストレス下における翻訳を規定する主たる要因の一つである可能性は高いと思われる。

マイクロアレイ解析を通じて、大部分の mRNA のポリソーム形成が阻害される状況においてもポリソーム形成が維持される mRNA の候補を取得し、それらの 5'-UTR の特性、特徴を解析した例がいくつか報告されている。例えば、アポトーシス時の HeLa 細胞(Bushell et al., 2006)、有糸分裂時の哺乳類細胞(Qin and Sarnow, 2004)、ポリオウイルス感染した HeLa 細胞(Johannes et al., 1999)においては、5'-UTR に存在する IRES の重要性が示唆されている。しかし、第一章において述べた様に IRES を介した翻訳の機構に関しては不明な部分も多く残されている。また、低酸素条件下あるいは脱水ストレス下のシロイヌナズナを材料に、翻訳抑制を回避する傾向にある mRNA 種の 5'-UTR の特徴を解析(e.g. 長さ、GC 含量)した例もあるが、明確なシス配列は見出されていない(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Branco-Price et al., 2005)。これらの報告では、主として極端な挙動を示す mRNA 種に着目した解析がなされている。しかし、環境ストレスにより全体的に翻訳が抑制され、かつ翻訳状態の変化に幅があることを考慮すると、マイクロアレイから得られた全 mRNA 種の翻訳状態変化に関する情報を利用することが重要ではないかと思われる。つまり、全 mRNA 種を用いて、5'-UTR の特徴と翻訳状態の関係性を統計学的に検証する事により、5'-UTR 内に存在すると考えられるストレス環境下における翻訳制御を規定する未知の因子を同定することが可能ではないかと考え、現在検証を進めている。

II-IV-II. 環境ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の翻訳状態変化

Preiss らは、ラパマイシン処理した酵母における蓄積転写産物量の変化と翻訳状態の変化をマイクロアレイによりゲノムワイドに解析し、大部分の mRNA からの翻訳が抑制される中で、転写誘導される遺伝子の mRNA は効率的に翻訳される傾向にあることを示した(Preiss et al., 2003)。こうした、転写段階と翻訳段階の協調的な制御は、脱水ストレス下のシロイヌナズナの葉やアミノ酸飢餓状態の酵母においても観察されている(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004; Smirnova et al., 2005)。一方、低酸素ストレスに曝されたシロイヌナズナの芽生えやブタノールストレス下の酵母においては、転写と翻訳の協調的な制御は特に認められない(Branco-Price et al., 2005; Smirnova et al., 2005)。本研究におけるマイクロアレイ解析では、ポリソーム画分及び非ポリソーム画分由来のシグナル和を利用して、蓄積転写産物量のストレスによる変化を見積もり(Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004)、ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の翻訳状態の変化の特徴を評価した。高温ストレス下において蓄積転写産物量が増大する mRNA 種には、全体的な傾向(ポリソーム形成の阻害)と同様の挙動を示す集団と同時に、翻訳が維持される傾向にある集団も存在することが示唆された(図 26)。一方で、塩ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の場合、集団としては極端にポリソーム形成が阻害される傾向を示したが、蓄積転写産物量が増大する mRNA 種の $\Delta PS[NaCl]$ のヒストグラムの裾が正の方向にのびていることから、特別な機構を介して翻訳が維持される mRNA 種も混在しているかもしれない。これらの結果は、まず、高温と塩ストレス下とでは、蓄積転写産物量が増大した mRNA 種に対する翻訳制御様式が異なることを示唆している。本研究では、同一の方法論を用いて比較しているため、方法論の違いに起因するものではないと考えられるが、ストレス強度の違いが及ぼす影響は否定できないため、今後、異なるストレス強度や時間スケールにおける解析も必要であろう。先に述べた転写と翻訳の協調的制御に関する報告(Preiss et al., 2003; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2004; Branco-Price et al., 2005; Smirnova et al., 2005)、及び今回の結果に鑑みて、ストレスにより蓄積転写産物量が増大する mRNA と翻訳段階の制御の関係性は、ストレスや細胞種によって、異なるのではないかと考えられる。

II-IV-III. 特徴的な挙動を示す機能集団の存在

今回得られた翻訳状態に関するマイクロアレイデータを基に、翻訳制御のストレス応答における意義等に関する理解を深めるための方法の一つとして、全体の挙動(平均的な挙動)に対して極端な挙動を示す mRNA 種に着目することが考えられる。しかし、その場合、大部分の mRNA 種の翻訳状態が

変化していることに加えて翻訳状態の変化に幅が存在するにも関わらず、マイクロアレイ解析から得られた情報の大部分が無視されることになる。本研究では、全遺伝子の翻訳状態変化に関する情報を用いて、機能集団としての挙動に着目した解析を行った。その結果、特徴的な挙動を示す様々な機能集団の存在が見出された(図 35 and 表 6-表 12)。こうした機能集団の存在は、環境ストレスに応答した機能的な面での選択が、翻訳段階においてなされている可能性を示すものである。リボソームタンパク質や転写に関連する機能集団、Hsp ファミリーなどの挙動は、そうした選択的な機能と環境ストレス応答との関連を強く示唆するものである。つまり、特徴的な挙動を示す機能集団の存在は、翻訳制御が植物の環境ストレス応答において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

一方で、これまでの知見に鑑みて、環境ストレス応答との関連があると考えられていないが、特徴的な挙動を示す機能集団もいくつか認められた。例えば、高温及び塩の両ストレス下において、ポリソーム形成が維持される傾向にあった(カテゴリー-III)、*20.09.14 cytoskeleton-dependent transport* が挙げられる。この機能集団には、キネシンやミオシンといったモータータンパク質が属しているが、知る限りではこうしたモータータンパク質と植物の環境ストレス応答との関連は報告されていない。あるいは、Histone H3 や HIS1-3 といったヒストン関連遺伝子から構成される *70.10.03 chromosome* も同様にカテゴリー-III に含まれていた。こうした今回見出された機能集団の情報は、環境ストレス応答に重要な機能や代謝経路、シグナル伝達経路に関する理解を今後深める上で重要な情報となりうると思われる。

II-IV-IV. 高温ストレス及び塩ストレス下における類似した翻訳制御機構

これまでに、異なる環境ストレス下における植物の翻訳状態の変化をゲノムスケールで比較した報告例はない。今回、高温及び塩という二つの異なるストレス下における翻訳状態の変化を比較することにより、全遺伝子の大局的なレベルの挙動(図 34)、あるいは機能集団のレベルの挙動(図 35)において類似性を示すことが明らかとなった。このことから、高温及び塩ストレス下における大部分の mRNA に対する制御機構は類似のものである可能性が考えられる。ストレス環境下に限らず、翻訳段階の制御は、翻訳開始因子の修飾状態、特にリン酸化状態の変化と関連づけて研究されてきた。動物や酵母における翻訳制御の主要なターゲット一つが、eIF4F を介したりボソームの mRNA へのリクルートの過程である(Sonenberg and Hinnebusch, 2007; Holcik and Sonenberg, 2005)。eIF4F のキャップ結合サブユニットである eIF4E や、eIF4F の複合体形成の障害に働く 4E-BP (4E-binding protein) のリン酸化状態がストレスにより変化することが報告されている(Raught and

Gingras, 2007)。もう一つの翻訳制御における重要なターゲットが、Met-tRNA_i^{Met}の40Sリボソームへの供給に関与するeIF2の α サブユニットのリン酸化である(Sonenberg and Hinnebusch, 2007; Holcik and Sonenberg, 2005)。しかし、植物においては、4E-BP isoformが未だに同定されていない(Browning, 2004; Gallie, 2007)。加えて、低酸素ストレス下においてはeIF4Eのリン酸化状態の変化が認められるものの(Manjunath et al., 1999)、高温ストレス下においては認められない(Gallie et al., 1997)。更に、高温ストレスによるeIF2 α のリン酸化状態の変化も認められないなどeIF2 α と翻訳制御との関連も見出されていない(Gallie et al., 1997)。こうした動物や酵母との違いに加えて、植物の翻訳開始因子には、二つのeIF4F isoformが存在するなど、動物や酵母にはない特徴が認められる。動物や酵母と比べて、試験されているストレスや細胞の種類が少ないため、今後の研究の進展が待たれるが、植物における翻訳段階の制御機構は動物や酵母とは異なっている可能性も十分に考えられる。動物や酵母なども含め、異なるストレスに曝された細胞における翻訳状態の変化をゲノムスケールで比較した例はほとんどないが、酵母において、同一の翻訳開始因子をターゲットするアミノ酸飢餓とブタノールストレスでは、翻訳状態の変化がmRNA種によって著しく異なることが報告されている(Smirnova et al., 2005)。少なくとも、高温及び塩ストレス下における翻訳制御は類似性を示すことから、植物には、酵母や動物とは異なる特徴的な翻訳制御機構が存在する可能性が示唆される。

植物における種々のストレスに対するシグナル伝達経路には、互いに複雑に交わった、いわゆるクロストークが存在していることを示唆する多くの証拠が示されている(Chinnusamy et al., 2004; Fujita et al., 2006; Mittler, 2006)。異なるストレスであってもある程度共通した遺伝子の転写誘導が認められるトランスクリプトーム解析の結果は、クロストークが存在する可能性を示す例の一つである。高温及び塩ストレス下における翻訳状態変化が類似性を示すことから、大部分のmRNAの翻訳制御に関与する因子が、こうした環境ストレス応答シグナル伝達経路に存在するクロストークの収束点に含まれている可能性が考えられる。こうした複数のストレス応答シグナル伝達経路のクロストークでは、ホルモンやROSにより制御されたシグナル伝達経路やキナーゼが重要な役割を果たしていると考えられているが(Fujita et al., 2006)、これらの因子もしくは未知のクロストークポイントから派生したシグナル伝達経路から、大部分のmRNAの翻訳制御に関与する因子、恐らく翻訳開始因子への制御へとつながるシグナル伝達経路が存在している可能性も考えられる。

II-IV-V. Hsp ファミリーに対するストレス特異的な選択的翻訳制御

多くの場合、機能集団に属する個々の mRNA 種の翻訳状態変化の相対性は、機能集団としての挙動に関わらず、高温及び塩ストレス下において維持される傾向にあった(図 38, 表 6)。しかしながら、興味深いことに、相対的な関係が維持されていない機能集団も少数であるが存在した(図 39 and 表 6)。相対的な関係が維持されないということは、高温及び塩ストレス下では、機能集団に属する個々の mRNA 種に対する、翻訳段階における優先順位が維持されないということの意味している。これらの結果及び一方のストレス下においてのみ特徴的な挙動を示す機能集団の存在は(図 35)、植物の環境ストレスに応答した翻訳制御には、ストレスの種類に関わらず共通なグローバルな制御と共に一部遺伝子群に対するストレス特異的な制御が存在している可能性を示すものである。

興味深いことに、集団に属する個々の mRNA 種の翻訳状態変化の相対性が高温及び塩ストレス下では異なる機能集団には、Hsp ファミリーが含まれていた(図 39)。Hsp ファミリーは、通常の様々な細胞プロセスのみならず、高温、塩、水、低温、活性酸素などの様々なストレスに対する植物の応答プロセスにおいても、主にその分子シャペロン活性を通じて重要な役割を果たしていると考えられている(Wang et al., 2004)。Hsp ファミリーに属する各サブファミリーあるいは個々の遺伝子は、異なるストレス環境応答反応においてそれぞれ特異的な役割を果たしていると考えられている(Kotak et al., 2007)。実際、環境ストレスの種類により、転写誘導されるサブファミリーや個々の遺伝子のパターンが異なることが報告されている(Swindell et al., 2007)。つまり、転写段階には、Hsp ファミリーに属する個々の遺伝子に対する、ストレスに応じた選択的な制御が存在していると考えられている。本研究の結果は、翻訳段階にも、Hsp ファミリーに属する個々の遺伝子に対する選択的な制御が存在している可能性を示すものである。こうした転写及び翻訳段階における選択的な発現制御を介して、異なるそれぞれのストレス環境に適応するための Hsp のネットワーク(Wang et al., 2004)が形成されているのではないかと考えられる。

II-IV-VI. 植物のストレス応答における翻訳制御の重要性

環境ストレス応答における転写制御の重要性は論をまたない。本研究では、ポリソーム形成状態の観点から、高温及び塩ストレスによる翻訳状態の変化をゲノムワイドに解析し、環境ストレスに応答した様々な制御が翻訳段階においてなされている可能性を見出した。翻訳制御及び転写制御がそれぞれ遺伝子発現に与える影響の程度は明らかではないが、本研究で見出したダイナミックな翻訳制御の存在に鑑みて、これまで考えられている以上に翻訳制御が植物のストレス応答において重要な役割を果たしている可能性がある

思われる。近年、翻訳に関与する因子(e.g. 基本翻訳開始因子の一つ eIF1A)とストレス応答との関連が、現時点では直接的な証拠はないが、遺伝子学的な解析やトランスクリプトーム解析から示唆されている(Rausell et al., 2003; Guo et al., 2002; Owttrim, 2006 Vashisht, 2006; Sanan-Mishra et al., 2005; Vandenabeele et al., 2004; Sahi et al., 2006)。今後、どういった翻訳開始因子やその他トランス因子が、環境ストレスに応答した翻訳制御に関与しているのか、また mRNA の 5'-UTR 内に存在するであろう制御因子は何なのかを検証することが、植物の環境ストレス応答における翻訳制御の位置づけ、分子機構に関する理解を深める上での重要な課題となるであろう。

総括

本研究第一章では、シロイヌナズナ *Hsp81-3* 5'-UTR には IRES 様の活性が存在するものの、*Hsp81-3* 5'-UTR を介した高温ストレス下における効率的な翻訳が、5'-UTR 内部ではなく 5'端領域にリボソームをリクルートする過程を介してなされている可能性を示した。また、この過程には、5'-UTR の 5'端にキャップ構造がない場合にも 5'端領域にリボソームをリクルートする *Hsp81-3* 5'-UTR の能力が重要であることが示唆された。以上の結果は、二つの観点から興味深い。まず、IRES 様の活性を示すからといって、通常のキャップ構造を有するモノシストロニックな mRNA からの翻訳に直接的には寄与しているわけではなさそうであるという点である。二つ目は、キャップ非依存的な翻訳活性(e.g. キャップを持たない mRNA からの翻訳活性)が高いということが、必ずしも IRES の存在に起因するわけではないということである。そういった意味では、IRES 様の活性を有し、eIF4F の形成を阻害した状況における効率的な翻訳に寄与する *Hsp101* 5'-UTR も (Dinkova et al., 2005)、必ずしも IRES を介して高温ストレス下における *Hsp101* mRNA の翻訳に寄与しているわけではないかもしれない。第二章で行ったマイクロアレイ解析から得られたストレスによる各 mRNA 種の翻訳状態の変化に関する情報を利用した 5'-UTR の解析を通じて、5'-UTR が環境ストレス下における翻訳に寄与する機構に関する理解が深まることが期待される。

第二章では、植物における高温及び塩ストレスに応答した翻訳制御の全体像に、マイクロアレイを用いたゲノムスケールの解析を通じて迫った。高温及び塩のいずれのストレス下においても、全体的にはポリソーム形成が阻害されるが、維持される mRNA 種から極端に阻害される mRNA 種まで、ストレスによる翻訳状態の変化は mRNA 種によって様々であった。また、極端に翻訳が阻害されるあるいは維持される傾向にある機能集団の存在から、翻訳段階の制御が、植物のストレスに応答した遺伝子発現制御過程において重要な意味を持って存在している可能性が示唆された。加えて、植物のストレスに応答した翻訳制御には、ストレス間で共通した大部分の mRNA に対する制御とストレス特異的な制御が存在している可能性が示された。プロテオーム解析等を含むゲノムスケールの解析から、転写産物量が必ずしもタンパク質量を反映しない例が多く見出されている (Gygi et al., 1999; Jiang et al., 2007; Holcik and Sonenberg, 2005)。本研究の結果は、こうした量的な相違に、翻訳段階の制御が関与している可能性を示すものであろう。植物が環境ストレスに応答して遺伝子発現を制御する過程の中で、翻訳段階においても幅広い mRNA に対するダイナミックな制御がなされており、そうした制御は、これまで考えられてきた以上に、植物のストレス応答において重要な役割を担っているのかもしれない。

高温や塩ストレスは、作物の生育阻害や収量の低下を引き起こす要因となっている。地球温暖化や環境問題、食糧問題などを背景に、遺伝子工学的な手法あるいは分子育種を通じてストレス耐性植物を作出することの重要性は増している。ストレス耐性植物を作出する上で、植物が環境ストレスにตอบสนองする機構を理解することは非常に重要であり、これまでに様々な側面からの研究がなされてきた。特に、環境ストレスにより転写誘導される遺伝子の機能解析は盛んに行われ、そうした遺伝子がコードするタンパク質が植物のストレス耐性において重要な役割を果たしている例が数多く明らかとなっている。高温あるいは塩ストレス下において極端な翻訳状態の変化を示した遺伝子(表 3 and 表 5)も、ストレス応答において重要な機能を有している可能性があり、今後の機能解析の対象となりうるのではないと思われる。ただし、TMV 感染時の cytosolic ascorbate peroxidase などと同様(Mittler et al., 1998)、翻訳の伸長段階における阻害の結果としてポリソームを形成している可能性は否定できないため、今後は各 mRNA 種からの新規タンパク質合成を評価する必要がある。また、モータータンパク質など、集団として見た場合に特徴的な翻訳状態の変化を示した機能集団は、環境ストレス応答において一定の役割を担っている可能性が考えられる。今後、従来の単一の遺伝子の機能解析とは異なる方法論による検証が必要であろう。植物のストレス応答は、異なる環境ストレス由来のシグナル伝達経路が複雑に交わった、つまりクロストークが存在する、ネットワークで構成されていることが明らかとなってきた。本研究のマイクロアレイ解析の結果からは、高温及び塩ストレスに対する応答シグナルが、共に大部分の mRNA の翻訳制御に関わる因子へと伝達される経路が存在する可能性が示された。例えば、この翻訳制御に至るシグナル伝達経路及びその経路の末端に存在するターゲット(恐らく翻訳開始因子)と 5'-UTR の相互作用機構は、今後、植物の環境ストレスにตอบสนองした遺伝子発現制御機構の理解を深める上で、重要なトピックとなりうるのではないかと考えている。本研究を通じてストレス応答における重要性が示唆された翻訳段階の制御過程を遺伝子工学的に改変することにより、環境ストレス耐性植物を作出する上での重要な基盤技術を提供することも将来的には可能であるかもしれない。ストレス環境下における翻訳制御機構の理解を通じた、例えば、環境ストレス下における効率的な翻訳に寄与する 5'-UTR の利用(Mardanov et al., 2007)、あるいは翻訳の制御に関わる因子の発現を制御することによる環境ストレス耐性形質の付与(Rausell et al., 2003)といったことが考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました新名惇彦教授に厚く御礼申し上げます。自由な発想のもとに研究を遂行する場を与えて頂いたことに深く感謝致します。加藤晃助教には、直接の懇切なる御指導ならびに格別なる御高配を賜りました。ここに深甚なる感謝の意を表します。吉田和哉準教授には、貴重な御助言ならびに多大なる御配慮を賜りました。心から御礼申し上げます。仲山英樹助教ならびに石川県立大学の関根政実準教授には、折折に適切かつ有益な御助言を頂きました。深く感謝致します。

横浜国立大学の平塚和之教授には、pR-EI-F ベクター並びに CP^{IRE5} を分与して頂きました。慎んで感謝申し上げます。本学情報科学研究科システム細胞学講座の大島拓助教、比較ゲノム学講座の小林寛和氏ならびに伊藤遼佑氏には、マイクロアレイ解析に関する御助言を頂きました。心から感謝致します。本学植物代謝調節学講座の石橋融氏には、マイクロアレイ実験に使用する RNA の調製を含め、様々な面で研究の遂行に協力して頂きました。厚く御礼申し上げます。

植物代謝調節学講座の皆様には、研究のみならず多岐に渡り大変お世話になりました。佐藤淳子博士、児玉悠一博士、市川雄彦氏、平野博人氏には、実験手法の直接的な御指導を賜りました。ここにすべての方のお名前を挙げることはできませんが、長屋進吾博士、河村和恵博士、松井健史博士をはじめとして多くの方々から有益かつ適切な御助言を頂きました。また、津田貴子氏、播川幸亮氏、甲賀康之氏、武波慎也氏には、私自身の力量不足のために迷惑をかけることも多かったかと思いますが、研究テーマを遂行するにあたり様々な面でご協力いただきました。田中雅恵氏には、事務的な面で何かとお世話になりました。植物代謝調節学講座の皆様の御指導、御助言、御協力等に対し、心から御礼申し上げます。

様々な面でお力添えを頂いた植物横の会の皆様に深く感謝致します。皆様からの励ましなくしてこの論文の完成はありえませんでした。

最後に、精神的な支えとなり常に叱咤激励してくれた両親、妻ならびに家族にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D.R., and Grover, A. (2001). Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones* 3, 219-224.
- Ahmed, R., and Duncan, R.F. (2004). Translational regulation of Hsp90 mRNA. AUG-proximal 5'-untranslated region elements essential for preferential heat shock translation. *J. Biol. Chem.* 48, 49919-49930.
- Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J., and Jackson, R.J. (2001). Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation. *EMBO J.* 15, 4233-4242.
- An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S., and Meagher, R.B. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 1, 107-121.
- Apuya, N.R., and Zimmerman, J.L. (1992). Heat shock gene expression is controlled primarily at the translational level in carrot cells and somatic embryos. *Plant Cell* 6, 657-665.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 7, 3889-3894.
- Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C., and Lescure, B. (1992). A protocol for transient gene expression in Arabidopsis thaliana protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 30, 123-128.
- Bailey-Serres, J. (1999). Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci.* 4, 142-148.
- Bailey-Serres, J., and Dawe, R.K. (1996). Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* 2, 685-695.
- Bert, A.G., Grepin, R., Vadas, M.A., and Goodall, G.J. (2006). Assessing IRES activity in the HIF-1alpha and other cellular 5' UTRs. *RNA* 6, 1074-1083.

- Borman, A.M., Kirchweger, R., Ziegler, E., Rhoads, R.E., Skern, T., and Kean, K.M. (1997). eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* 2, 186-196.
- Bradford, M.M. (1976). 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.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R.B., and Bailey-Serres, J. (2005). Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann. Bot. (Lond)* 4, 647-660.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, and R. Jones, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 1158–1249.
- Browning, K.S. (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans. Pt 4*, 589-591.
- Bushell, M., Stoneley, M., Kong, Y.W., Hamilton, T.L., Spriggs, K.A., Dobbyn, H.C., Qin, X., Sarnow, P., and Willis, A.E. (2006). Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol. Cell* 3, 401-412.
- Calzone, F.J., Angerer, R.C., and Gorovsky, M.A. (1982). Regulation of protein synthesis in *Tetrahymena*: isolation and characterization of polysomes by gel filtration and precipitation at pH 5.3. *Nucleic Acids Res.* 6, 2145-2161.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., and Zhu, J.K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 395, 225-236.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 444-451.
- Chiu, W.W., Kinney, R.M., and Dreher, T.W. (2005). Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J. Virol.* 13, 8303-8315.
- Coldwell, M.J., deSchoolmeester, M.L., Fraser, G.A., Pickering, B.M.,

- Packham, G., and Willis, A.E. (2001). The p36 isoform of BAG-1 is translated by internal ribosome entry following heat shock. *Oncogene* 30, 4095-4100.
- Dansako, T., Kato, K., Satoh, J., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A. (2003). 5' Untranslated region of the HSP18.2 gene contributes to efficient translation in plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 52-58.
- Davies, E., and Abe, S. (1995). Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol.* 50, 209-222.
- De Gregorio, E., Preiss, T., and Hentze, M.W. (1998). Translational activation of uncapped mRNAs by the central part of human eIF4G is 5' end-dependent. *RNA* 7, 828-836.
- del Prete, M.J., Vernal, R., Dolznig, H., Mullner, E.W., and Garcia-Sanz, J.A. (2007). Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA* 3, 414-421.
- Dinkova, T.D., Zepeda, H., Martinez-Salas, E., Martinez, L.M., Nieto-Sotelo, J., and de Jimenez, E.S. (2005). Cap-independent translation of maize Hsp101. *Plant J.* 5, 722-731.
- Duncan, R.F. (1996). Translational control during heat shock. In *Translational control*, J.W.B. Hershey, M.B. Mathews, N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 271-293.
- Elango, N., Li, Y., Shivshankar, P., and Katz, M.S. (2006). Expression of RUNX2 isoforms: involvement of cap-dependent and cap-independent mechanisms of translation. *J. Cell. Biochem.* 4, 1108-1121.
- Elroy-Stein, O., and Merrick, W.C. (2007). Translation initiation via cellular internal ribosome entry sites. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 155-172.
- Fennoy, S., Nong, T., and Bailey-Serres J. (1998). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *The Plant Journal.* 15, 727-735.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between

abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* *4*, 436-442.

Gallie, D.R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* *11*, 2108-2116.

Gallie, D.R. (2007). Translational control in plants and chloroplasts. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 747-774.

Gallie, D.R., Le, H., Caldwell, C., Tanguay, R.L., Hoang, N.X., and Browning, K.S. (1997). The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *J. Biol. Chem.* *272*, 1046-1053.

Gunnery, S., Maivali, U., and Mathews, M.B. (1997). Translation of an uncapped mRNA involves scanning. *J. Biol. Chem.* *272*, 21642-21646.

Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2002). An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7786-7791.

Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., and Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1720-1730.

Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Sierra, J.M., and Rivera-Pomar, R. (2004). Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* *10*, 1783-1797.

Hess, M.A., and Duncan, R.F. (1996). 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.

Hsiao, T.C. (1970). Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiol.* *45*, 281-285.

Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress

and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 318-327.

Hua, X.J., Van de Cotte, B., Van Montagu, M., and Verbruggen, N. (2001). The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.* *2*, 157-169.

Hultmark, D., Klemenz, R., and Gehring, W.J. (1986). Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene hsp22. *Cell* *3*, 429-438.

Ishibashi, Y. (2008). 塩ストレス下において翻訳が維持される遺伝子の網羅的探索と解析. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.

Ivanov, P.A., Karpova, O.V., Skulachev, M.V., Tomashevskaya, O.L., Rodionova, N.P., Dorokhov, Y., and Atabekov, J.G. (1997). A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro. *Virology* *1*, 32-43.

Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S., and Deyholos, M.K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *J. Exp. Bot.* *13*, 3591-3607.

Johannes, G., Carter, M.S., Eisen, M.B., Brown, P.O., and Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *23*, 13118-13123.

Joshi-Barve, S., De Benedetti, A., and Rhoads, R.E. (1992). Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factors eIF-4E and eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* *29*, 21038-21043.

Kadota, K., Miki, R., Bono, H., Shimizu, K., Okazaki, Y., and Hayashizaki, Y. (2001). Preprocessing implementation for microarray (PRIM): an efficient method for processing cDNA microarray data. *Physiol. Genomics* *3*, 183-188.

Kawaguchi, R., and Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* *3*, 955-965.

Kawaguchi, R., and Bailey-Serres, J. (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 460-465.

- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A., and Bailey-Serres, J. (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *5*, 823-839.
- Kawaguchi, R., Williams, A.J., Bray, E.A. and Bailey-Serres, J. (2003). Translational regulation in response to water deficit stress in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Environ.* *26*, 221-229.
- Key, J.L., Lin, C.Y., and Chen, Y.M. (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *6*, 3526-3530.
- Kim, Y.K., and Jang, S.K. (2002). Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *2*, 224-231.
- Klemenz, R., Hultmark, D., and Gehring, W.J. (1985). Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. *EMBO J.* *8*, 2053-2060.
- Kodama, Y., Nagaya, S., Shinmyo, A., and Kato, K. (2007). Mapping and characterization of DNase I hypersensitive sites in *Arabidopsis* chromatin. *Plant Cell Physiol.* *3*, 459-470.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., and Scharf, K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *3*, 310-316.
- Kouga Y, (2007). 飢餓・塩ストレス条件下での翻訳制御. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., and Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *6*, 2940-2945.
- Kozak, M. (2007). Lessons (not) learned from mistakes about translation. *Gene* *1-2*, 194-203.
- Kozak, M. (2005). A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.* *20*, 6593-6602.
- Kozak, M. (2003). Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene*

318, 1-23.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene 1-2*, 1-34.

Kozak, M. (2001). New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol. Cell. Biol.* 6, 1899-1907.

Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 30, 19867-19870.

Kozak, M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3438-3445.

Krishna, P., and Gloor, G. (2001). The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 3, 238-246.

Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T., and Bahler, J. (2007). A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol. Cell* 1, 145-155.

Lee, D.G., Ahsan, N., Lee, S.H., Kang, K.Y., Bahk, J.D., Lee, I.J., Lee, B.H. (2007). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* 7, 3369-3383.

Lin, B.L., Wang, J.S., Liu, H.C., Chen, R.W., Meyer, Y., Barakat, A., and Delseny, M. (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 3, 201-208.

Lindquist, S. (1986). The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.

Macejak, D.G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 6339, 90-94.

Manjunath, S., Williams, A.J., and Bailey-Serres, J. (1999). Oxygen deprivation stimulates Ca²⁺-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J.* 1, 21-30.

Mano, Y. (2006). 転写終結領域が導入遺伝子発現に与える影響について. 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.

Mardanov, E.S., Zamchuk, L.A., and Ravin, N.V. (2007). The 5' -untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene provides

efficient translation of mRNA in plants under stress conditions. *Molecular Biology*. *41*, 914-919.

Mata, J., Marguerat, S., and Bahler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem. Sci.* *9*, 506-514.

Mathews, M.B., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (2007). Origins and Principles of Translational Control. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-40.

Matsuo, N., Gilmartin, P.M., and Hiratsuka, K. (2004). Characterization of the EMCV-IRES mediated bicistronic translation in plant cells. *Plant Biotechnol.* *21*, 119-126.

McCabe, P.F., and Leaver, C.J. (2000). Programmed cell death in cell cultures. *Plant Mol. Biol.* *3*, 359-368.

McGarry, T.J., and Lindquist, S. (1985). The preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell* *3*, 903-911.

Melamed, D., and Arava, Y. (2007). Genome-wide analysis of mRNA polysomal profiles with spotted DNA microarrays. *Methods Enzymol.* *431*, 177-201.

Miller, G., and Mittler, R. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot. (Lond)* *2*, 279-288.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* *1*, 15-19.

Mittler, R., Feng, X., and Cohen, M. (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* *3*, 461-473.

Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* *132*, 1-30.

- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., and Shinmyo, A. (2000). Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* *4*, 1239-1247.
- Nicolai, M., Roncato, M.A., Canoy, A.S., Rouquie, D., Sarda, X., Freyssinet, G., and Robaglia, C. (2006). Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol.* *2*, 663-673.
- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Simon, W.J., and Slabas, A.R. (2005). Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* *16*, 4185-4196.
- Nover, L., Scharf, K.D., and Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* *3*, 1298-1308.
- Owttrim, G.W. (2006). RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic Acids Res.* *11*, 3220-3230.
- Panniers, R. (1994). Translational control during heat shock. *Biochimie* *76*, 737-747.
- Pitto, L., Gallie, D.R., and Walbot, V. (1992). Role of the leader sequence during thermal repression of translation in maize, tobacco, and carrot protoplasts. *Plant Physiol.* *4*, 1827-1833.
- Pradet-Balade, B., Boulme, F., Beug, H., Mullner, E.W., and Garcia-Sanz, J.A. (2001). Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem. Sci.* *4*, 225-229.
- Preiss, T., Baron-Benhamou, J., Ansorge, W., and Hentze, M.W. (2003). Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat. Struct. Biol.* *12*, 1039-1047.
- Prevot, D., Decimo, D., Herbreteau, C.H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. (2003). Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO J.* *8*, 1909-1921.
- Qin, X., and Sarnow, P. (2004). Preferential translation of internal

ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *14*, 13721-13728.

Rausell, A., Kanhonou, R., Yenush, L., Serrano, R., and Ros, R. (2003). The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *Plant J.* *3*, 257-267.

Raught, B., Gingras, A.-C., and Sonenberg, N. (2000). Regulation of ribosome recruitment in eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression*, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 245-293.

Raught, B., and Gingras, A.-C. (2007). Signalling to translation initiation. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 369-400.

Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M., and Mewes, H.W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* *18*, 5539-5545.

Sachs, A. (2000). Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. In *Translational Control of Gene Expression*, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 447-465.

Sachs, M.M., Freeling, M., and Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell* *3*, 761-767.

Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E., and Grover, A. (2006). Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data, *Physiol. Plant.* *127*, 1-9.

Sanan-Mishra, N., Pham, X.H., Sopory, S.K., and Tuteja, N. (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *2*, 509-514.

Satoh, J., Kato, K., and Shinmyo, A. (2004). The 5'-untranslated region

of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. *J. Biosci. Bioeng.* *1*, 1-8.

Scharf, K.D., Siddique, M., and Vierling, E. (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* *3*, 225-237.

Schneider, R.J. (2000). Translational control during heat shock. In *Translational Control of Gene Expression*, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 581-593.

Shapira, M., Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Dahan, I., and Yavesky, V. (2001). Post transcriptional control of gene expression in *Leishmania*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* *1-2*, 23-26.

Shinozaki, K., and Dennis, E.S. (2003). Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 405-409.

Smirnova, J.B., Selley, J.N., Sanchez-Cabo, F., Carroll, K., Eddy, A.A., McCarthy, J.E., Hubbard, S.J., Pavitt, G.D., Grant, C.M., and Ashe, M.P. (2005). Global gene expression profiling reveals widespread yet distinctive translational responses to different eukaryotic translation initiation factor 2B-targeting stress pathways. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 9340-9349.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2007). New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol. Cell* *5*, 721-729.

Stankovic, B. and Davies, E. (2003) The wound response in tomato involves rapid growth and electrical responses, systemically up-regulated transcription of proteinase inhibitor and calmodulin and down-regulated translation. *Plant and Cell Physiology.* *39*, 268-274.

Stuger, R., Ranostaj, S., Materna, T., and Forreiter, C. (1999). Messenger RNA-binding properties of nonpolysomal ribonucleoproteins from heat-stressed tomato cells. *Plant Physiol.* *1*, 23-32.

Swindell, W.R., Huebner, M., and Weber, A.P. (2007). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors

reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* 8, 125.

Thomas, J.D., and Johannes, G.J. (2007). Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA* 7, 1116-1131.

Tyagi, A.K., Vij, S., and Saini, N. (2006). Functional genomics of stress tolerance. In *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, K.V.M. Rao, A.S. Gaghavendra, and K.J. Reddy, eds. (Dordrecht, Netherlands: Springer), pp. 301-334.

Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 113-122.

Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., and Van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the Arabidopsis PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J.* 14, 3378-3388.

Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 1, 45-58.

Vashisht, A.A., and Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2, 150-160.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* 42, 579-620.

Vinocur, B., and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 123-132.

von Koskull-Doring, P., Scharf, K.D., and Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.* 10, 452-457.

Wang, L., and Wessler, S.R. (1998). Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of

the maize R gene. *Plant Cell* 10, 1733-1746.

Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 1, 1-14.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 5, 244-252.

Wang, Z., Weaver, M., and Magnuson, N.S. (2005). Cryptic promoter activity in the DNA sequence corresponding to the pim-1 5'-UTR. *Nucleic Acids Res.* 7, 2248-2258.

Yabe, N., Takahashi, T., and Komeda, Y. (1994). Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol.* 8, 1207-1219.

Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 2, 88-94.

Yamamoto, Y.Y., Tsuchida, Y., Gohda, K., Suzuki, K., and Matsui, M. (2003). Gene trapping of the *Arabidopsis* genome with a firefly luciferase reporter. *Plant J.* 2, 273-283.

Yun, D.F., Laz, T.M., Clements, J.M., and Sherman, F. (1996). mRNA sequences influencing translation and the selection of AUG initiator codons in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6, 1225-1239.

Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V., and Shapira, M. (2001). Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 51, 47922-47929.