

環境ストレスに応答した翻訳制御機構

上田 清貴

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝制御研究室

(出村 拓 教授)

平成 26 年 1 月 21 日 提出

目次

緒論	5
第 1 章 環境ストレスに応答した翻訳状態変化の生物学的意義	8
1-1. 序論	8
1-2. 方法と材料	10
1-2-1. 使用植物の生育条件	10
1-2-2. 熱ストレス処理	10
1-2-3. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析	10
1-2-4. マイクロアレイ解析用の RNA 抽出	10
1-2-5. トータル RNA の抽出	11
1-2-6. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出	11
1-2-7. 定量 RT-PCR 法	12
1-2-8. マイクロアレイハイブリダイゼーション	12
1-2-9. マイクロアレイデータ解析	13
1-2-10. 遺伝子の機能分類	14
1-3. 結果	15
1-3-1. 熱ストレスによる翻訳の抑制	17
1-3-2. 熱ストレスに応答した翻訳状態変化及び転写物量変化のゲノムワイド解析	17
1-3-3. 定量 RT-PCR 法によるマイクロアレイデータの検証	22
1-3-4. 熱ストレスにより蓄積 mRNA 量が増加する遺伝子の翻訳状態	25
1-3-5. mRNA がコードするタンパク質の機能面からの熱ストレスに応答した翻訳状態変化の解析	29
1-3-6. シロイヌナズナとイネ間における機能集団の比較	31
1-4. まとめ及び考察	35
1-4-1. 熱ストレスに応答した翻訳状態の変化	35
1-4-2. 熱ストレスに応答した翻訳状態は mRNA 種間で選択的に変化する	36
1-4-3. 翻訳状態変化と転写物量変化の関係	37
1-4-4. 特徴的な挙動を示す機能集団の存在	37
第 2 章 環境ストレス種特異的な翻訳制御の分子メカニズム	39
2-1. 序論	39
2-2. 方法と材料	42
2-2-1. マイクロアレイデータからの情報抽出	42

2-2-2. ストレス種特異的な翻訳状態変化を示す mRNA の抽出-----	42
2-2-3. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析-----	42
2-2-4. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出-----	42
2-2-5. 定量 RT-PCR 法-----	42
2-2-6. 5'RACE 法-----	43
2-2-7. 5'UTR をレポーター遺伝子に連結した mRNA を発現する形質転換体の 作出-----	43
2-2-7-1. バイナリーベクターの構築-----	43
2-2-7-2. アグロバクテリウム法による培養細胞へのバイナリーベクター導 入-----	46
2-2-8. CAGE 解析-----	46
2-2-8-1. CAGE ライブラリーの作製-----	46
2-2-8-2. シーケンス解析-----	47
2-2-8-3. マッピング-----	47
2-2-9. RNA 一過性発現実験-----	47
2-2-9-1. <i>in vitro</i> 転写用鋳型プラスミド構築-----	47
2-2-9-2. <i>in vitro</i> 転写-----	49
2-2-9-3. シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラスト調製-----	50
2-2-9-4. プロトプラストへの mRNA の導入-----	50
2-2-9-5. ルシフェラーゼ酵素活性測定-----	50
2-3. 結果-----	51
2-3-1. ストレス種特異的な翻訳状態変化を示す mRNA の抽出-----	51
2-3-2. 定量 RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性の確認-----	52
2-3-3. 候補 mRNA の 5'UTR の同定-----	54
2-3-4. 5'UTR を連結した <i>FLUC</i> mRNA を発現する形質転換体を用いた翻訳状 態変化の解析-----	57
2-3-5. ゲノムワイド解析-5'UTR に CT 反復及び CT rich 領域を有する mRNA の翻訳状態変化-----	60
2-3-6. At1g09970.1 部分 5' UTR(CT 反復領域)をレポーター遺伝子に連結し た mRNA を発現する形質転換体を用いた翻訳状態変化の解析-----	65
2-3-7. ストレスに応答した転写開始点変化の網羅的解析(CAGE 解析)-----	69
2-3-8. 転写開始点の変化前後に対応する 5'UTR の各温度条件における翻訳 活性-----	78
2-4. まとめ及び考察-----	81
2-4-1. ストレス種特異的な翻訳制御に寄与する 5' UTR 内の CT 反復及びCT rich 領域-----	81
2-4-2. ストレスに応答した転写開始点の変化が mRNA の翻訳活性に強く影	

響する	-----	82
総括	-----	84
謝辞	-----	86
参考文献	-----	87

緒論

(環境ストレス応答)

自然環境下に存在する高温、高塩、乾燥、栄養飢餓、強光等の環境ストレスは、植物の生育に強く影響する。例えば、猛暑による高温状態や渇水によって植物の成長が阻害され、穀物について言えば、環境ストレスによって年間生産高の70%が失われていると報告されている (Bray et al., 2000; Wang et al., 2003)。一方で、植物には環境変化に適応するための応答機構が備わっている。一般にストレス応答と称されるこの機構は、生理及び代謝等様々なレベルで変化を示すことが知られている。その根幹をなす制御の1つが、ストレスに応答した遺伝子発現の調節であり、環境ストレスに応答して様々な遺伝子の発現量が変わることが報告されている (Bray et al., 2000; Shinozaki et al., 2003; Ndimba et al., 2005; Kosová et al., 2011)。この発現量の変動は、セントラルドグマにおける転写、翻訳、翻訳後修飾等といった複数のステップで調節が行われた結果であり、このような遺伝子の発現調節機構は、植物のストレス応答における重要な研究トピックの1つとなっている (Urano et al., 2010)。近年ではオミクス解析を通じて、各調節ステップのストレスに応答した変動が網羅的に解析されており、特に、DNA マイクロアレイを用いた解析によって、種々のストレスに応答した蓄積転写物の変化が解析され、様々なストレスに応答して蓄積転写物量が変わる遺伝子や、そのコードするタンパク質のストレス応答への重要性が報告されている。また、網羅的解析結果を基に、ストレスに応答した転写活性化に寄与する DNA の制御配列や転写制御因子が多数同定され、ストレスに応答した転写調節機構の全体像の理解が進んでいる (Ymaguchi-Shinozaki et al., 2005; Urano et al., 2010)。

(ストレスに応答した翻訳状態の変化)

環境ストレス下では、細胞内の翻訳状態も大きく変動することが報告されている (Roy et al., 2013)。翻訳状態とは、mRNA からタンパク質が合成される活性を示す指標であり、一般的に mRNA に結合しているリボソーム数によって評価される。動物細胞を用いたオミクス解析では、ストレスに応答した翻訳状態変化は、蓄積転写物量変化以上にタンパク質量変化と相関することが示され、翻訳レベルにおける発現調節の重要性が近年注目されている (Schwanhäusser et al., 2011)。また、あらゆる生物種において、ストレスに曝された時の翻訳状態は、mRNA 種ごとに選択的に変化することが報告されている。植物を材料とした研究では、ダイズを用いた解析により、熱ストレス下では細胞全体として翻訳が抑制され、そのような条件下でも *Heat shock protein (HSP)* mRNA からの翻訳は活発に維持されていることが示されている (Key et al., 1981)。また、DNA マイクロアレイを応用し、シロイヌナズナ

T87 培養細胞を材料にストレスに曝された場合の細胞内の mRNA からの翻訳状態変化を網羅的に解析した研究より、熱及び塩ストレスに曝されると、細胞内の大部分の mRNA からの翻訳が抑制され、一方で、一部の mRNA からの翻訳は維持されることが示されている(Matsuura et al., 2010)。同様の種々のストレス条件に応答した翻訳状態を網羅的に解析した研究は近年盛んに行われており、翻訳状態の変化は、様々なストレス条件で認められる現象であることが示されている(reviewed in Bailey-Serres et al., 2009)。このようなストレスに応答した翻訳状態の変化は、転写調節等と同じくストレスに応答した遺伝子発現制御機構の重要な 1 側面であると考えられるが、未だ細胞全体で翻訳状態を変化させることの生物学的な意義について不明な点が多く残る。

(翻訳状態変化の分子メカニズム)

一方で、環境ストレスに応答した翻訳状態変化を制御する分子メカニズムに着目し、翻訳制御の解明を試みた研究も存在する。最もよく解明されているのは、哺乳類の細胞における翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 (4EBP) を介した翻訳制御モデルである。真核生物において、翻訳の開始に重要な 40S リボソームによる mRNA の認識は、mRNA の 5'末端に存在する cap 構造を介して行われる。この時、cap 構造を直接認識し、リボソームの mRNA へのリクルートに重要な役割を担うのが翻訳開始因子 4E である。非ストレス状態では、4E を介した翻訳は活発に行われているが、ストレス状態では 4EBP によって 4E の cap 構造認識が阻害され、結果として細胞全体の翻訳が抑制される(Raught et al., 2007)。また、酵母を材料とした解析では、翻訳開始因子 2 α の翻訳制御への重要性も提唱されている。この 2 α は、メチオニル tRNA のリボソームへの結合を GTP 依存的に促進する。リボソームが伸長し mRNA の情報に従ってアミノ酸を紡ぐためには、最初のメチオニル tRNA をリボソームから乖離させる必要があり、この反応は GTP の加水分解に伴って生じるため、更に翻訳を進めるためには、加水分解された 2 α の GDP を GTP へ変換し 2 α を活性型に戻すことが重要になる。しかし、ストレス下では 2 α のリン酸化状態が変化することで、2 α に結合している GDP の GTP への変換が阻害され、結果的に細胞全体の翻訳が抑制されることとなる(Holcik et al., 2005; Sonenberg et al., 2007)。一方、植物細胞における翻訳制御に関して明確なモデルは未だ示されていない。その理由の 1 つとして、他の生物種で提唱される上記翻訳制御の分子モデルが植物細胞には当てはまらないことが挙げられる。具体的には、植物では 4EBP のオルソログが存在せず、また熱ストレス条件下では 2 α のリン酸化状態は変化しないことが示されている(Browning, 2004)。このことから、ストレスで翻訳状態が大きく変化することは認められるものの、植物細胞における翻訳状態変化を引き起こす分子メカニズムは他生物種と大きく異なるのではないかと考えられている。少なく

とも、当研究室の先行研究より、熱及び塩ストレスに応答した多くの mRNA からの翻訳状態変化を規定する要因が 5'UTR 内に存在することが報告されている(Matsuura et al., 2013)。このような翻訳状態を規定する 5'UTR 内の重要領域の存在が確認されているのは植物のみであり、この点に着目した解析を行うことで、ストレスに応答した翻訳制御の分子メカニズムの解明が進捗すると考えられる。

本研究では環境ストレス移行時に認められる翻訳状態変化の生物学的意義、及び制御の分子メカニズムの解明に焦点を置くことで、環境ストレスに応答した翻訳制御の全体像について理解を深めることを目的とした。第 1 章では、ストレスに応答した翻訳状態の変化に関する研究が少ない単子葉植物を材料とした網羅的解析を行い、特にイネ細胞内で熱ストレスに応答して個別 mRNA の翻訳状態がどのように変化するかを調べた。また、この情報を基にした機能別解析を行い、翻訳状態変化と mRNA がコードするタンパク質の機能との関連を調べた結果を報告する。さらに、得られた結果を双子葉植物と材料とした結果と比較することで、植物における環境ストレスに応答した翻訳状態変化の生物学的な意義について考察した。第 2 章では、分子メカニズムの側面から環境ストレスに応答した翻訳制御機構の解明にむけたアプローチを行った。具体的には、ストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する mRNA を対象として、mRNA の配列(特に 5'UTR の配列)に着目した解析を行った。さらに、ストレスに応答した翻訳状態の変化の網羅的解析結果に加え、転写開始点(5' UTR)を網羅的に解析した情報を加えることで、ストレス種特異的な翻訳制御に関わる 5'UTR 上の特徴をゲノムワイドに調べ、一部については形質転換体及び一過性発現解析により実証した。

第 1 章

環境ストレスに応答した翻訳状態変化の生物学的意義

1-1. 序論

環境ストレスに曝されると、細胞内の翻訳状態は大きく変化する。具体的には、環境ストレスに応答して大部分の mRNA からの翻訳が迅速に抑制され、その一方で、活発に翻訳が行われる一部 mRNA の存在が示されている。例えば、ダイズ *heat shock protein (HSP)* mRNA からの翻訳は、他の多くの mRNA からの翻訳が抑制される条件下でも翻訳が維持され、同様に、*alcohol dehydrogenase (ADH)* mRNA は低酸素ストレス下で翻訳が維持されることが報告されている (Key et al., 1986; Fennoy et al., 1998)。翻訳状態の変化がタンパク質の発現量に強く影響することから、環境ストレスに応答した翻訳状態変化は、転写制御等と同じく、ストレス応答における遺伝子発現調節の重要な 1 ステップであると考えられている (Roy et al., 2013)。

近年、DNA マイクロアレイを応用した手法（ポリソーム/マイクロアレイ解析）によって、細胞内の翻訳状態を網羅的に解析する試みがなされている (reviewed in Bailey-Serres et al., 2009)。ここでいう翻訳状態とは、単位時間あたりに mRNA から合成されるタンパク質量（翻訳活性）を反映する指標である。具体的には、以下の手法が用いられている。まず、細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心にかけ、全 mRNA を 2 つ以上のリボソームが結合する画期分（ポリソーム）とそれ以外の画分（モノソーム及び遊離 mRNA）に分画する。2 つの画分からそれぞれ調製した cRNA を 2 色マイクロアレイに供し、得られたシグナルを比較することで、ある条件における個別 mRNA 種それぞれの遊離 mRNA (翻訳活性がほぼ行われていない) とポリソーム (翻訳が活発に行われている) の比を数値として示し、この値を翻訳状態の指標として用いるものである。同手法を用いたシロイヌナズナを材料とした先行研究より、環境ストレス下では大部分の mRNA は、結合するリボソーム数が減少し（翻訳が抑制される）、反対に、リボソーム結合数が減少しない（潜在的に翻訳が維持される）一部の mRNA の存在が認められている。ストレス下でもリボソーム結合数の減少しない mRNA の一例は前述の *ADH* や *HSP* であり、これらのタンパク質は、多くのタンパク質の新規合成が停止するストレス下でも活発に合成が行われていることから、リボソーム結合数の変化を解析する手法は翻訳活性の変化を調べる上で有効な手法であると考えられている (Bailey-Serres et al., 2009)。

当研究室では、双子葉類のモデル植物であるシロイヌナズナを材料にポリソーム/マイクロアレイの解析を行い、熱及び塩ストレスに応答した場合の翻訳状態変化の網羅的解析を行った (Mastuura et al., 2010)。その結果、スト

レス処理によって、細胞内の個別 mRNA からの翻訳状態は劇的に変動し、大部分の mRNA からの翻訳が抑制され、一方で一部の mRNA からの翻訳が維持されていることが示された。また、同様の解析は、乾燥、低酸素、ショ糖飢餓、カドミウム重金属ストレスに曝された場合についても行われており、同様の知見が得られている(Kawaguchi et al., 2004; Branco-Price et al., 2005; Nicolai et al., 2006; Sormani et al., 2011)。さらに、上記の熱及び塩ストレス下における翻訳状態変化の網羅的結果を基にした解析より、翻訳状態の変化と各 mRNA がコードするタンパク質の機能の間には、一定の関係が存在することが示され、ストレスに曝された細胞で認められる翻訳状態変化の生物学的意義の一端を探る上で重要な情報が提供されている。(Matsuura et al., 2010)。一方で、ストレスに応答した翻訳状態変化の網羅的解析は、シロイヌナズナを材料としたものが中心であり、双子葉と共に植物を構成する単子葉植物を材料にストレス下での翻訳状態を網羅的に解析した研究はない。

本章では、単子葉のモデル植物であるイネの培養細胞を材料として、熱ストレスに応答した場合の翻訳状態変化をゲノムワイドに解析した結果を報告する。このような網羅的解析を行うことで得られる基盤情報は、イネにおけるストレスに応答した翻訳制御機構を理解していく上で重要なものとなる。さらに、解析結果を基に、熱ストレスに応答した翻訳状態変化と mRNA がコードするタンパク質の機能との関係を解析し、ストレスに応答した翻訳状態変化の特徴について調べた。最後に、機能別解析結果をシロイヌナズナを材料とした結果と比較することで、単子葉及び双子葉植物間においてストレス下で翻訳が維持もしくは特に抑制される機能集団の類似点及び相違点を示し、植物におけるストレスに応答した翻訳状態変化の生物学的意義について理解を深めることを目的とした。

1-2. 方法と材料

1-2-1. 使用植物の生育条件

イネ懸濁培養細胞 (*Oriza sativa cv. Nipponbare*) の培養には R2S 培地を用いた。培養は 300 ml 容のフラスコを使用し、連続光、28℃、攪拌速度 160 r.p.m. の条件下で行った。一週間ごとに培養液 10 ml を新しい培地 100 ml に移植し継代培養を行った。

1-2-2. 熱ストレス処理

培養細胞の熱ストレス処理には恒温水槽を用いた。培養 3 日目の細胞をフラスコごと一定温度に温め、ゆるやかに攪拌した。熱ストレス処理後に吸引濾過で培地を除き、2 ml のチューブに細胞を回収し、チューブごと液体窒素で凍結させ-80℃で保存した。非ストレス処理の細胞は、温度が 28℃である以外は同様に扱った。

1-2-3. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

非ストレス処理もしくは熱ストレス処理細胞約 200 mg を乳鉢と乳棒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。遠心(15,000 x g, 10 min, 4℃)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)により調整した 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℃, brake-off) (Beckman Coulter, CA, USA)。ペリスタポンプ(Minipuls 3; Gilson, WI, USA)に連結したマイクロピペット(40 µl Calibrated Pipet; Drummond, AL, USA)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, WI, USA)を用いて 254 nm の吸光度を記録した。

1-2-4. マイクロアレイ解析用の RNA 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 8 M 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, CA, USA)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 (*O. sativa* cv. *Nipponbare* 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 et al., 2007)。非ストレス処理の場合には 1 本のショ糖密度勾配液、熱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、ポリソー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 x 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, Hilden, Germany)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。

1-2-5. トータル RNA の抽出

非ストレス処理及び高温処理した細胞約 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, CA, USA)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。

1-2-6. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出

ショ糖密度勾配液約 650 μ l ずつを、*in vitro* 合成した *RLUC* mRNA 5 ng (第 2 章参照)及び終濃度 5.5 M になるように 8 M 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 x 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(50 μ l)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。

1-2-7. 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, Mannheim, Germany) 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 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及び LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) を用いて、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 (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) 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 *RLUC* mRNA の結果で補正した。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 反応を行い、シグナルが検出されないことにより確認した。

1-2-8. 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 (Rice 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。Rice oligo microarray には、イネ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 2 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 2 回行った。また、同様に非ストレス処理及び熱ストレス処理した細胞から抽出されたトータル RNA を用いたマイクロアレイ解析も行った。

1-2-9. 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。得られた値を使用し、以下の計算を行った。

使用した略語の説明を以下に示す。

Poly28: 非ストレス処理細胞由来のポリソーム RNA(Cy3)シグナル値

Nonpoly28: 非ストレス処理細胞由来の非ポリソーム RNA(Cy5)シグナル値

Poly41: 熱ストレス処理した細胞由来のポリソーム RNA(Cy3)シグナル値

Nonpoly41: 熱ストレス処理した細胞由来の非ポリソーム RNA(Cy5)シグナル値

Total28: 非ストレス処理細胞由来のトータル RNA(Cy3)シグナル値

Total41: 熱ストレス処理細胞由来のトータル RNA(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 (非ストレス処理)

$PS28 = \text{Log}_{10}(\text{Poly28} / \text{Nonpoly28})$

Polysome score (熱ストレス処理した細胞)

$PS41 = \text{Log}_{10}(\text{Poly41} / \text{Nonpoly41})$

熱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。

$\Delta PS = PS41 - PS28$

熱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

$ES = \text{Log}_{10}(\text{Total41} / \text{Total28})$

O. sativa cv. *Nipponbare* oligo microarray の各スポットには、gene name(e.g. Os1g01110.1)あるいは systematic name (e.g. RAP Code [Rice annotation project 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、複数のスポットに対応している gene name (systematic name)もいくつか存在する。これらについては、スポットの通し番号である Feature Number が最も若い1つを選抜し、解析対象としている。非ストレス処理及び熱ストレス処理した細胞由来の、独立に得た2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、RAP code を有するものについて、2回の実験及び複数スポットの平均値を PS 及び ES について算出した。それら平均値を基に PS、 Δ PS、ES、の算出を行った。上記計算はすべて Microsoft Excel を用いて行った。

1-2-10. 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、MapMan (version 3.5.1) (Thim et al., 2004, Usadael et al., 2005, <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) と PageMan software (version 0.12) (Usadel et al., 2006, <http://mapman.gabipd.org/web/guest/pageman>)を用いた。各機能集団について Benjamini and Hochberg 補正を行った Wilcoxon p 値及び Δ PS の平均値を求め、結果を PageMan を用いて図表化した。MapMan/PageMan 解析における機能集団への分類は、マッピングファイル [‘Rice_japonica_manual_mapping08’ 及び “Ath_AGI_TAIR8”]を用いた。イネについて、マッピングファイル上で使用されるコードは MSU’s LOC_OS であったため、Agilent oligo microarray における RAP code は、RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)を利用して対応する MSU’s LOC_OS codes への変換を行った。この際、対応するコードを持たない遺伝子は解析対象から除外した。

1-3. 結果

1-3-1. 熱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イネ懸濁培養細胞 (*O. sativa cv. Nipponbare*) を材料に用いた。熱ストレスに曝された植物では、ポリソームを形成する 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、細胞全体として翻訳が抑制されることが、シロイヌナズナ T87 培養細胞や大豆の胚軸、トマト培養細胞等で報告されている (Key et al., 1981; Apuya et al., 1992; Stuger et al., 1999; Matsuura et al., 2010)。イネ培養細胞においても、熱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 1)。通常条件(28°C)で培養した非ストレス処理及び熱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、41°C 10 分間のストレス処理により非ストレス処理の場合と比較してポリソーム画分の RNA が減少すると共に非ポリソーム画分の RNA が増大していることが示され、さらにこの現象は温度依存的に強くなる傾向が認められた (図 1A)。また、41°C 10 分間の処理を行った場合と処理時間を 30 分まで延長した場合を比較すると、ポリソームプロファイル上における大きな違いは認められなかった (図 1B)。加えて、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示された (図 1C)。これらの結果は、シロイヌナズナを材料とした解析結果と類似するものであり、イネ培養細胞においても、熱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が示された。

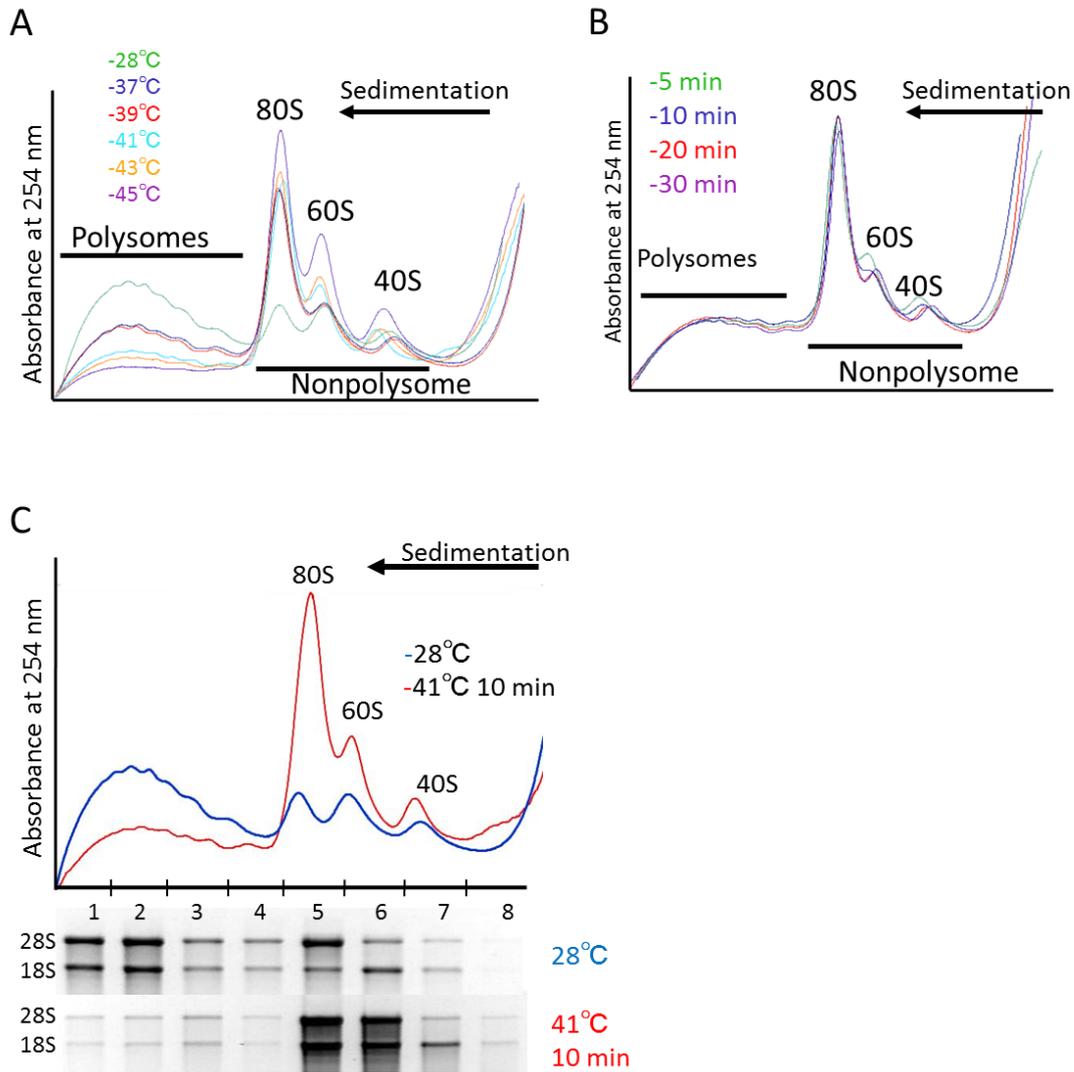


図 1 ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム分画

非ストレス処理及び熱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、非ポリソーム画分、80Sリボソーム、60Sリボソーム、40Sリボソームを図中に示した。沈降方向は右から左である。(A) 熱ストレスの強度を37°Cから2°C刻みに45°Cまで上昇した場合におけるプロファイルの変化。処理時間はいずれも10分である。(B) 41°Cの熱ストレス処理時間を、5分、10分、20分、30分としたときのプロファイル。(C) 非ストレス処理及び41°C 10分の熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液をショ糖密度勾配液により8画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。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。

1-3-2. 熱ストレスに応答した翻訳状態変化及び転写物量変化のゲノムワイド解析

ポリソーム解析結果より、41°C 10分の熱ストレス処理によって細胞内の翻訳状態が大きく変化することが示された。次に、同条件の細胞を用いた細胞内翻訳状態変化の網羅的解析（ポリソーム/マイクロアレイ解析）を行うことで、熱ストレスに応答した個別 mRNA それぞれの翻訳状態変化を調べた。ポリソームマイクロアレイの概略を示す（図2）。まず、非ストレス条件と熱ストレス処理を施した細胞から細胞抽出液を調製し、抽出液をショ糖密度勾配遠心にかけた。遠心後、ショ糖液を底部（密度高）から上部（密度低）まで連続的に回収し、8つに分画した（画分 No.1~8、No.1が最も密度が高い）。mRNA がリボソームと複合体を形成している「ポリソーム」が含まれる画分 No.1~3をポリソーム画分とし、一方、遊離の mRNA を含む画分 No.5-7を非ポリソーム画分としてそれぞれ回収を行った。回収した mRNA を鋳型に、蛍光色素 Cy3 及び Cy5 を含む相補 RNA(cRNA)を合成し、Agilent *O. sativa* cv. *Nipponbare* マイクロアレイへの競合ハイブリダイズに供した。ここで、ポリソーム及び非ポリソーム画分間の総 RNA 量が異なることや、画分毎に RNA 精製の効率が異なる等の影響を補正するため、既知量の *in vitro* 合成 RNA を回収と同時に各画分に等量ずつ加えた(Melamed et al., 2007)。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]の対数比)を算出した。また、熱ストレス処理及び非ストレス処理細胞由来のトータル RNA を用いたハイブリダイゼーションも別途行い、熱ストレス処理による蓄積転写産物量変化の指標として Expression score (熱ストレス処理細胞由来のトータル RNA[Cy5]/非ストレス処理細胞由来のトータル RNA[Cy3])を算出した。以上の過程を、独立に培養した2種類の培養細胞を用いて、2回繰り返して行った(図3)。熱ストレス処理及び非ストレス処理細胞由来のトータル RNA を用いたハイブリダイゼーションより、最終的に 14082 個の mRNA が解析対象として残り、2反復解析間で高い相関を示した(ピアソンの相関係数 $r > 0.95$)(図 3A、B)。非ストレス処理細胞由来のポリソーム及び非ポリソーム RNA を用いたハイブリダイゼーションより、最終的に 13945 個の mRNA が解析対象として残り、2反復解析間で高い相関を示した(ピアソンの相関係数 $r > 0.97$)(図 3C、D)。熱ストレス処理細胞由来のポリソーム及び非ポリソーム RNA を用いたハイブリダイゼーションより、最終的に 14075 個の mRNA が解析対象として残り、2反復解析間で高い相関を示した(ピアソンの相関係数 $r > 0.97$)(図 3E、F)。これらの結果は、mRNA のショ糖密度勾配を用いた mRNA の分画等、実験の正確性を示すものであった。また、細胞全体としてポリソームが減少する熱ストレス処理細胞由来のポリソーム RNA を使用したハイブリダイゼーション結果からも、他のハイブリダイゼーション結果と比較して、mRNA 数に大きな違いは認められな

かった。このことから、シヨ糖密度勾配による mRNA の分画を行っても、本解析は網羅的に mRNA を定量できており、同時に、熱ストレスに応答して、マイクロアレイで検出できないレベルまでポリソーム mRNA が減少する mRNA 種は非常に少ないことが示された。

マイクロアレイデータを基に、非ストレス処理及び熱ストレス処理した細胞由来の Polysome score (それぞれ PS28, PS41)を各 mRNA について算出した。算出された PS28、PS41 は、2 回の実験の平均値である(図 4A)。非ストレス処理細胞由来の数値である PS28 は、中央値が 0.46 である正規様の分布を示し、多くの mRNA 種は、非ポリソーム画分に比較してポリソーム画分に多く存在した(図 4A)。この結果は、非ストレス処理細胞では、mRNA からの翻訳は潜在的に活発に行われていることを示していた。一方、熱ストレス処理細胞由来の数値である PS41 は、中央値が-1.37 である正規様の分布を示し、多くの mRNA 種は、非ポリソーム画分に多く存在していた (図 4A)。この結果は、熱ストレス処理細胞では、ポリソームを形成する mRNA の量が少ないことを示し、前述のポリソーム解析結果から示されたストレスに応答した細胞全体としての翻訳抑制と一致する結果であった。しかし、PS41 の分布からは、高い PS を示す mRNA 種の存在も認められており、このことより、熱ストレス下でも潜在的に翻訳が活発に行われている mRNA 種の存在が示唆された。散布図を用いて、mRNA のストレス処理前後の PS の変化を解析したところ、大部分の mRNA 種は、非ストレス条件における PS の大小に関わらず、中央線から下方に分布することが示され、熱ストレス処理細胞では、多くの mRNA 種について、ポリソーム RNA が減少することが示された(図 4B)。その一方で、中央線に近い分布を示す mRNA も存在した。これらは、熱ストレス処理でも PS が大きく変化せず、翻訳が潜在的に維持されている mRNA であった。このような mRNA 種毎の熱ストレスに応答した翻訳状態の変化の違いは、PS41 から PS28 の差分である ΔPS の分布からも確認されている(図 4C)。 ΔPS は、熱ストレスに応答した翻訳状態変化の指標であり、その分布は-0.54 を中央値とする正規様を示した。また、 ΔPS は値が 0 付近ならば、熱ストレスでも結合リボソームに変化がない、一方、より大きい負の値ほど、熱ストレスで結合リボソーム数がより減少したことを意味し、 ΔPS の分布から、熱ストレスで多くの mRNA からの翻訳が抑制され、一方、一部の mRNA の翻訳は潜在的に維持されることが示された。

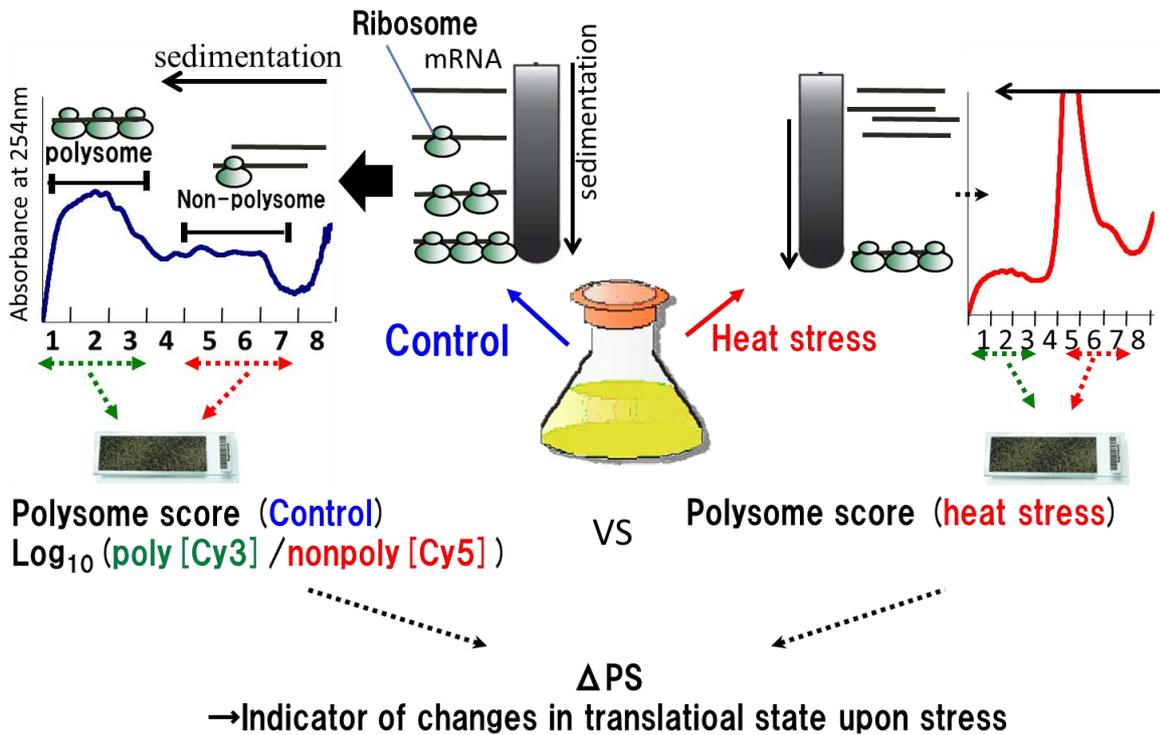


図 2 熱ストレスによるポリソーム形成状態の変化をゲノムワイドに解析する方法

同一のイネ懸濁培養細胞を分割し、処理を行わない非ストレス処理及び熱ストレス処理(41°C, 10 分)した細胞を準備した。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ポリソーム RNA を、5-7 番目の画分の混合液から非ポリソーム 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 cRNA 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 (*O. sativa cv. Nipponbare* oligo microarray; Agilent Technologies)。個々の mRNA 種の、非ポリソーム RNA に対するポリソーム RNA の対数比(Polysome score)を、非ストレス処理(PS28)及び熱ストレス処理した細胞(PS41)について算出した。さらに、熱ストレス処理による Polysome score の変化を示す指標である ΔPS を算出した。独立に培養した 2 種類の培養細胞を用いて 2 回の繰り返し実験を行った。

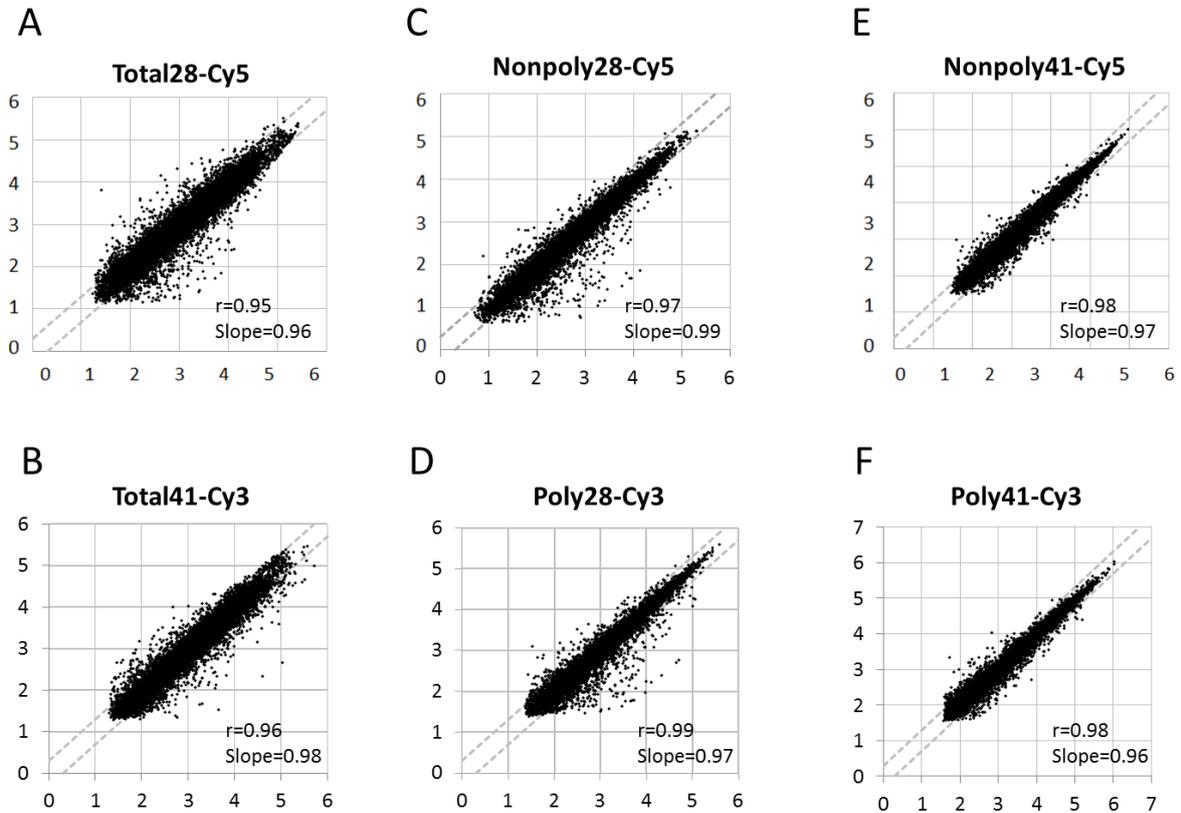


図 3 独立に行った 2 回のマイクロアレイ実験の再現性評価

独立に行った 2 回のマイクロアレイ解析から得られた Cy3 及び Cy5 シグナル値の相関図を示す(A-F)。シグナル値はすべて対数表記である。(A)非ストレス処理から抽出したトータル RNA 由来の Cy5 シグナル値 (B)熱ストレス処理細胞から抽出したトータル RNA 由来の Cy3 シグナル値。(C)非ストレス処理細胞から抽出した非ポリソーム RNA 由来の Cy5 シグナル値。(D)非ストレス処理細胞から抽出したポリソーム RNA 由来の Cy3 シグナル値。(E) 熱ストレス処理細胞から抽出した非ポリソーム RNA 由来の Cy5 シグナル値。(F)熱ストレス処理細胞から抽出したポリソーム RNA 由来の Cy3 シグナル値。プロットされた遺伝子数は、それぞれ、14082(A,B)、13945(C, D)、14075(E,F) である。各図中に、ピアソンの相関の相関係数と近似線のスロープを表示している。

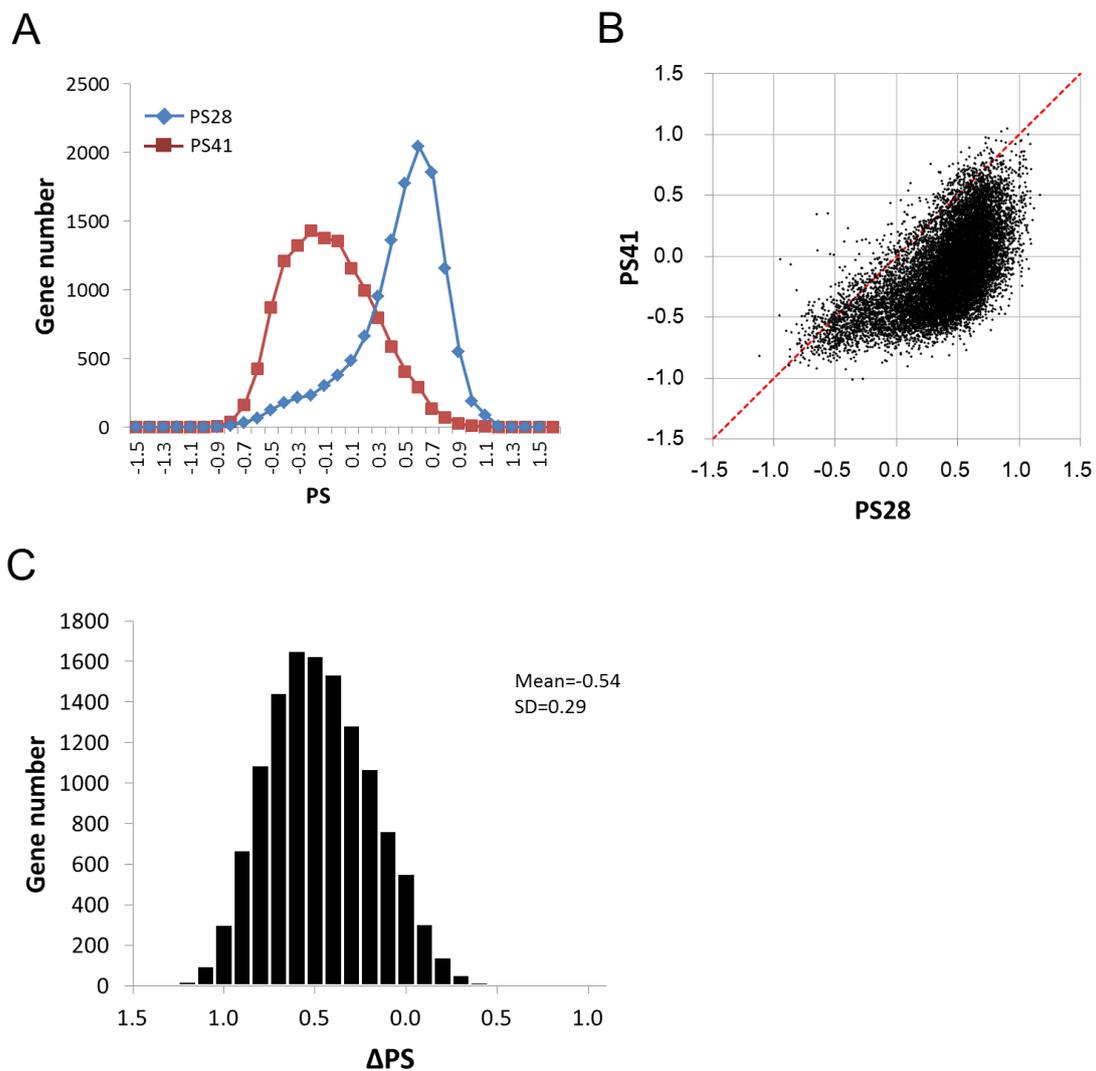


図 4 熱ストレスによるポリソーム形成状態の変化

(A)熱ストレス及び非ストレス処理におけるポリソーム形成状態の変化を示す指標である PS(Polysome score, ポリソーム RNA の非ポリソーム RNA に対する相対値)の分布。(B) PS28 と PS41 の散布図。赤線付近にプロットされる mRNA は、熱ストレス処理で翻訳状態が変化しないものを意味する。(C)熱ストレスによる翻訳状態変化の指標である $\Delta PS(PS41-PS28)$ の分布。中央値及び SD を図中に示す。

1-3-3. 定量 RT-PCR 法によるマイクロアレイデータの検証

次に、定量 RT-PCR 法によって、マイクロアレイデータの検証を行った。手法は、バイブリダイゼーション以外はマイクロアレイ解析時に使用したものと基本的に同様である。具体的には、非ストレス及び熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心により、8つの画分として回収し、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(図 5)。マイクロアレイ解析から得られた ΔPS (熱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 種を対象とし、画分 1-3 及び 5-7 それぞれの合計値から PS 及び ΔPS を算出した(図 5 及び表 1)。上位に位置する遺伝子である *E3 ubiquitin protein ligase URE-1B*, *Argonaute and dicer protein* は、熱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。一方で、下位に位置する遺伝子である *Cystenil-tRNA synthetase*, *Enolase 2* の場合には、熱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 5)。中位に位置する遺伝子である *26S proteasome subunit-like protein* の場合には、下位遺伝子ほどではないが、非ポリソーム画分への若干の移行が認められた。マイクロアレイデータから PS28、PS41、 ΔPS を算出したのと同様に(図 3)、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(PS28 及び PS41 に相当)及びその差 PS41-PS28 (ΔPS に相当)及び蓄積転写物量変化(ES 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 PS28、PS41、 ΔPS 及び ES の値を表 1 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、いずれの指標値も高い相関を示した(ピアソン相関係数 $r>0.86$) (図 6)。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った。

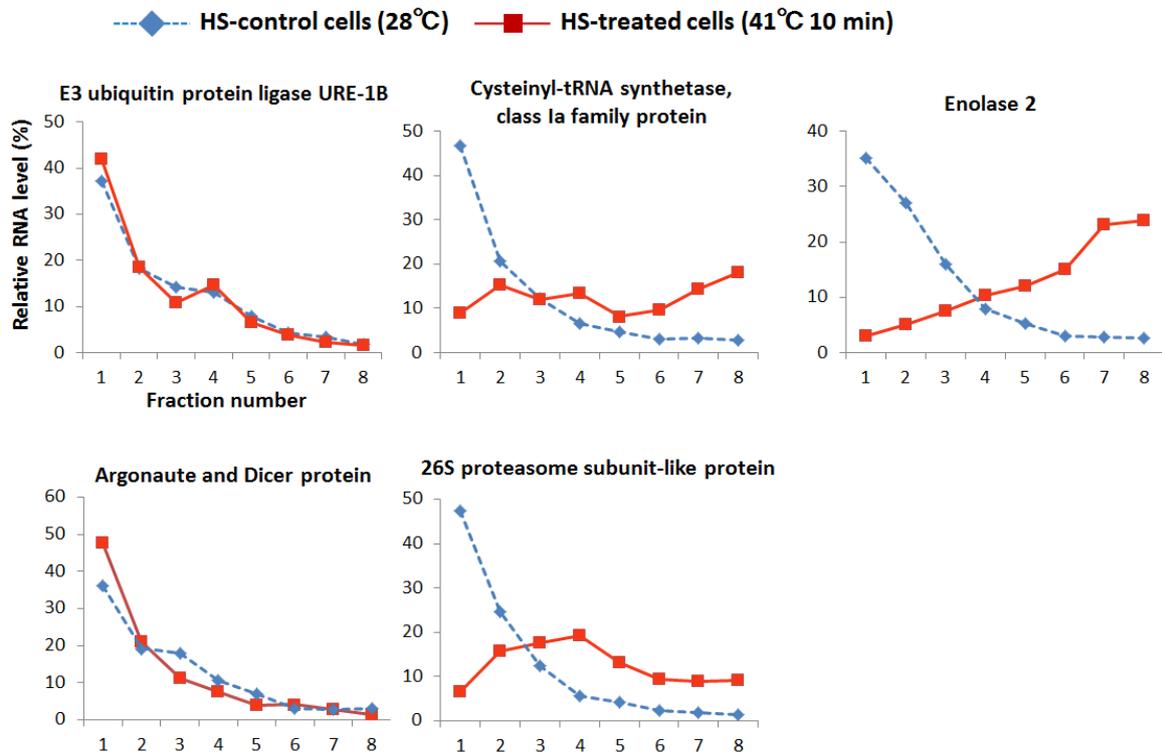


図 5 個別 mRNA のポリソームプロファイル

図 2 に示したのと同様の方法を用いて、非ストレス処理及び熱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 番の画分方向である。各画分における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*) の結果で補正した(“方法と材料”を参照)。結果は全体の和に対する相対値として図示しており、8 つの画分の和は 100%となる。青点線が非ストレス処理、赤実線が熱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。

RAP code	Discription	Microarray				qRT-PCR			
		PS28	PS41	Δ PS	ES	PS28	PS41	Δ PS	ES
Os01g0287400	Low-temperature induced protein lt101.2	0.11	-0.45	-0.57	-0.32	0.32	-0.38	-0.70	-0.55
Os01g0801500	Beta-1,3-glucanase precursor	0.50	-0.32	-0.82	-0.30	0.52	-0.21	-0.73	-0.15
Os01g0895500	Rhomboid-like protein family protein	0.42	-0.12	-0.54	0.72	0.66	-0.21	-0.87	0.27
Os02g0791500	Nucleotide sugar epimerase-like protein	0.01	-0.44	-0.44	0.45	0.24	-0.35	-0.59	0.06
Os03g0131500	Thioredoxin-related domain containing protein	0.04	0.19	0.14	0.01	-0.05	-0.08	-0.03	0.04
Os03g0143300	CysteinyI-tRNA synthetase, class Ia family protein	0.50	0.13	-0.37	0.00	0.85	0.05	-0.80	-0.09
Os03g0214600	26S proteasome subunit-like protein (26S proteasome subunit RPN9a)	0.81	0.35	-0.46	0.00	0.99	0.10	-0.89	-0.13
Os03g0218500	70kD heat shock protein	0.11	0.09	-0.02	1.26	0.14	-0.02	-0.17	0.63
Os03g0220700	Peptidase, trypsin-like serine and cysteine proteases	-0.67	-0.58	0.10	-0.36	-0.22	-0.45	-0.23	-0.13
Os03g0266200	Enolase 2 (EC 4.2.1.11) (Allergen Hev b 9)	0.65	-0.37	-1.02	-0.01	0.84	-0.51	-1.35	-0.02
Os03g0815100	OsNAC6 protein	0.50	0.60	0.09	0.75	0.62	0.56	-0.06	0.38
Os04g0555000	GRAS transcription factor family protein	0.27	-0.15	-0.43	-0.31	0.17	-0.39	-0.57	-0.53
Os04g0615700	Argonaute and Dicer protein, PAZ domain containing protein.	0.77	0.81	0.04	0.00	0.76	0.87	0.11	0.08
Os05g0407100	Four F5 protein family protein	0.20	-0.80	-1.00	0.78	0.62	-0.53	-1.15	0.58
Os06g0682900	(2R)-phospho-3-sulfolactate synthase, ComA family protein	0.73	-0.44	-1.17	1.25	0.87	-0.22	-1.09	0.86
Os07g0228400	Cyclin-like F-box domain containing protein	-0.32	0.12	0.44	-0.41	-0.69	-0.48	0.21	-0.60
Os08g0159900	DEAD box polypeptide 46	-0.54	0.02	0.56	-0.37	-0.62	-0.38	0.23	-0.32
Os09g0516300	RNA-binding region RNP-1 domain containing protein	-0.95	-0.49	0.46	-0.93	-0.63	-0.53	0.11	-0.45
Os11g0208400	Cyclin-like F-box domain containing protein	0.68	-0.01	-0.69	-0.32	0.50	-0.57	-1.07	-0.14
Os11g0546900	TaWIN1	0.53	-0.43	-0.96	-0.01	0.83	-0.41	-1.25	0.11
Os12g0428600	E3 ubiquitin protein ligase URE-B1 (EC 6.3.2.)	0.53	0.86	0.33	0.00	0.65	0.76	0.11	-0.07

表 1 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 解析から得られた個別遺伝子のポリソームプロファイル(図 5)の結果を基に、各遺伝子の P28、PS41、 Δ PS、ES を算出し、マイクロアレイ解析から得られた結果と共に示した。

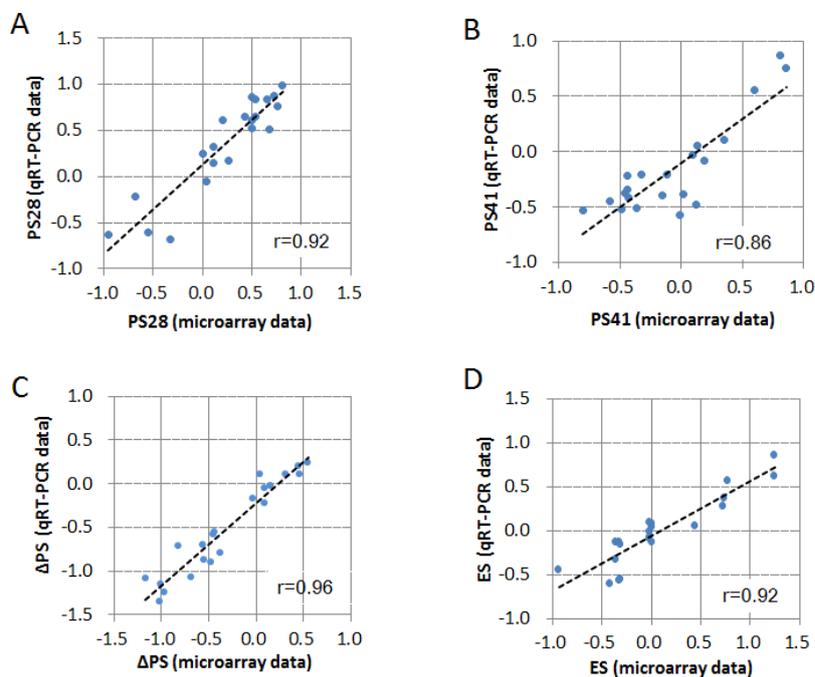


図 6 マイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR 解析の結果の相関

表 1 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した PS28 (A)、PS41 (B)、 Δ PS (C)、ES(D)の散布図を示す。縦軸が定量 RT-PCR 解析、横軸がマイクロアレイ解析由来の結果から算出した指標値を示す。r はピアソンの相関係数及び回帰直線を図中に示す。

1-3-4. 熱ストレスにより蓄積 mRNA 量が増加する遺伝子の翻訳状態

熱ストレスによる蓄積転写産物量の変化と翻訳状態の変化の関係をゲノムワイドに検証した。蓄積転写産物量の変化を示す指標としては、非ストレス及び熱ストレス処理細胞由来のトータル RNA を用いたマイクロアレイ結果から得られた ES ($=\text{Log}_{10}(\text{Total41}/\text{Total28})$) を用いた (ES: expression score)(図 7)。ES の値が得られた 14082 の mRNA について、熱ストレスによる蓄積転写産物量の変化を解析したところ、大部分の mRNA 種の ES は 0 に近い値を示す一方で、ES が 0.3 以上もしくは -0.3 以下を示す mRNA が存在していた。この結果は、熱ストレスによって大部分の mRNA の蓄積転写産物量は大きく変動しないが、一部の mRNA 種の存在量は、熱ストレス処理により約 2 倍以上に増加、もしくは 1/2 以下に減少していることを示していた。また、蓄積転写産物量が熱ストレスで 2 倍以上に増加する mRNA の中には、*HSP* が多数含まれていることから、蓄積転写産物量の変動は、熱ストレス処理の結果であると考えられた。

ES と ΔPS をゲノムワイドに比較した結果、全体として、ストレスに応答した転写物量変化と翻訳状態変化の間に相関は認められなかった(図 8A)。この結果より、 ΔPS で確認された熱ストレスに応答したリボソーム結合数の変化は、熱ストレスによる蓄積転写産物量変化に影響されたものではないことが示された。次に、熱ストレスによる蓄積転写産物量変化と翻訳状態変化の関係をより詳細に解析するため、全 mRNA から、ストレスに応答して蓄積転写物量が 2 倍以上もしくは 1/2 以下に減少するものを抽出し、これらの ΔPS の挙動と全体の挙動との比較を行った。結果、熱ストレスに応答して蓄積転写物量が 2 倍以上に増加する mRNA の ΔPS 分布は、全体と類似した挙動を示した (図 8B)。この集団に多数含まれる *HSP* は、熱ストレスで誘導され、タンパク質のミスフォールディングを抑制するシャペロンとして働き、細胞のストレスへの適応に寄与することが報告されている (Wang et al., 2004)。この *HSP* mRNA の ΔPS の分布を、全 mRNA ($n=12671$) の ΔPS の分布との比較したところ、*HSP* mRNA も全 mRNA の ΔPS とは同様の分布を示した (図 9)。この結果は、熱ストレス誘導性かつストレス応答に重要な遺伝子であっても、その多くの mRNA の翻訳は熱ストレス下で抑制されていることを示していた。

一方で、ES が -0.3 以下を示す mRNA (熱ストレス処理により蓄積転写産物量が約 1/2 以下に減少する mRNA) の ΔPS の分布は、全 mRNA に対して正の方向に偏った (図 8B)。この集団に属する mRNA のストレス処理前後のポリソームプロファイルを詳細に知るため、対象 mRNA のいくつかについてポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行った (図 10)。その結果、同グループに属する mRNA には以下 2 点の傾向が示された。①非ストレス処理細胞において、対象 mRNA 種の多くは非ポリソーム画分に存在した。この結果は、他の多くの mRNA 種と異なり、非ストレス状態において対象 mRNA の翻訳活性は

非常に低いことを示している。同様の傾向は、PS28 を用いたゲノムワイド解析からも認められた(図 11)。②10 分の熱ストレス処理を施した細胞で認められた mRNA 量の減少は、全体としてではなく、非ポリソーム画分に存在する mRNA の減少であった。翻訳状態の指標である PS は、ポリソーム画分と非ポリソーム画分に存在する mRNA の比率として算出されるため、今回のようなストレスによる特定の画分のみ減少が生じる mRNA については、PS41 と PS28 を単純に比較することはできないと考えた(見かけ上の ΔPS が高くなる)。そのため、ES が -0.3 以下を示す mRNA は以後の解析から除外した。

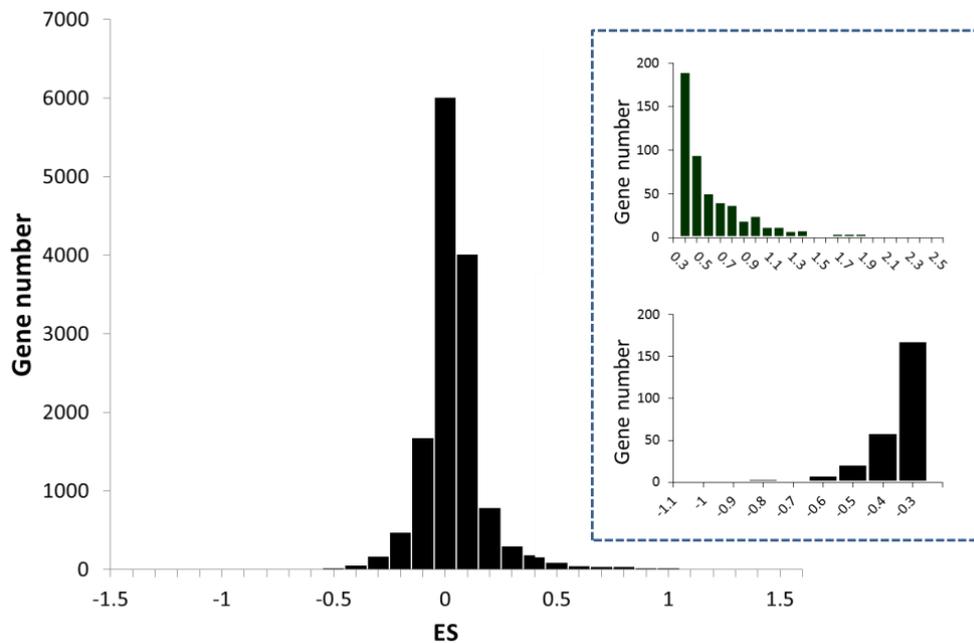


図 7 熱ストレスによる蓄積転写産物量の変化

熱ストレス処理による蓄積転写産物量の変化の指標である ES の分布を示した (n=14082)。縦軸は、遺伝子数を表す。挿入図は、ES が 0.3 以上もしくは -0.3 以下を示す遺伝子の分布を示す。

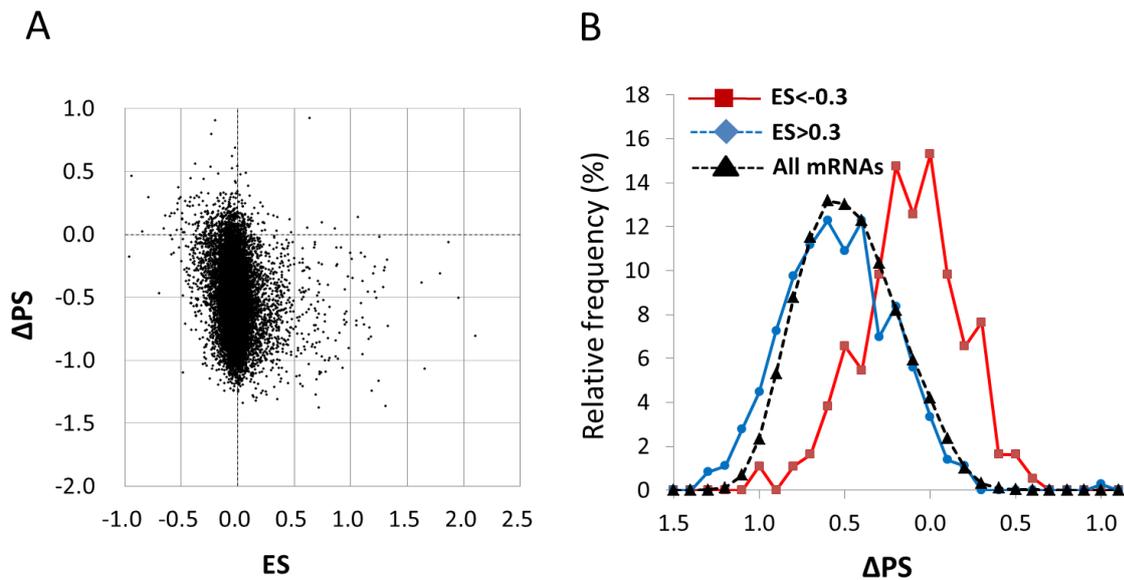


図 8 熱ストレスに応答した蓄積転写物量変化と翻訳状態変化の関係

(A) 熱ストレスに応答した翻訳状態変化(ΔPS)と蓄積転写物量変化(ES)を 11908 個の mRNA について比較し、散布図として示した。(B)熱ストレスに応答して転写物量が 2 倍以上($n=358$)(青実線)もしくは 1/2 以下に減少する mRNA ($n=183$)(赤実線)の ΔPS の分布、及び全 mRNA の ΔPS の分布(黒点線)を示す。縦軸は、各条件に含まれる総 mRNA 数に対する相対頻度を示している。

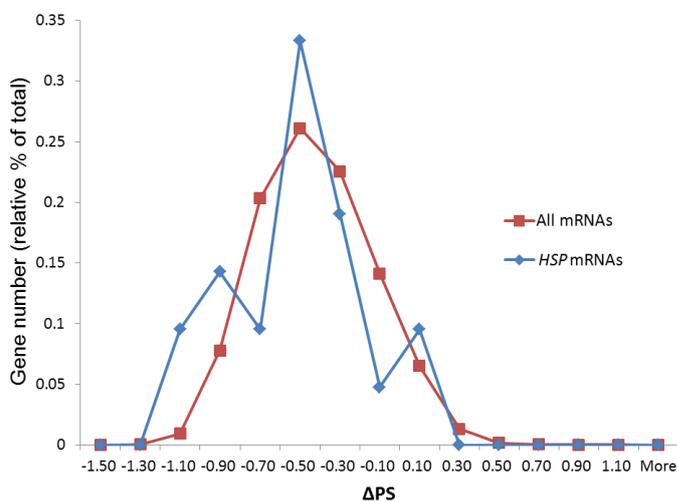


図 9 HSP mRNA の翻訳状態変化

(A) HSP mRNA($n=21$)と全 mRNA の ΔPS の分布を示す。縦軸は、各条件に含まれる総 mRNA 数に対する相対頻度を示している。

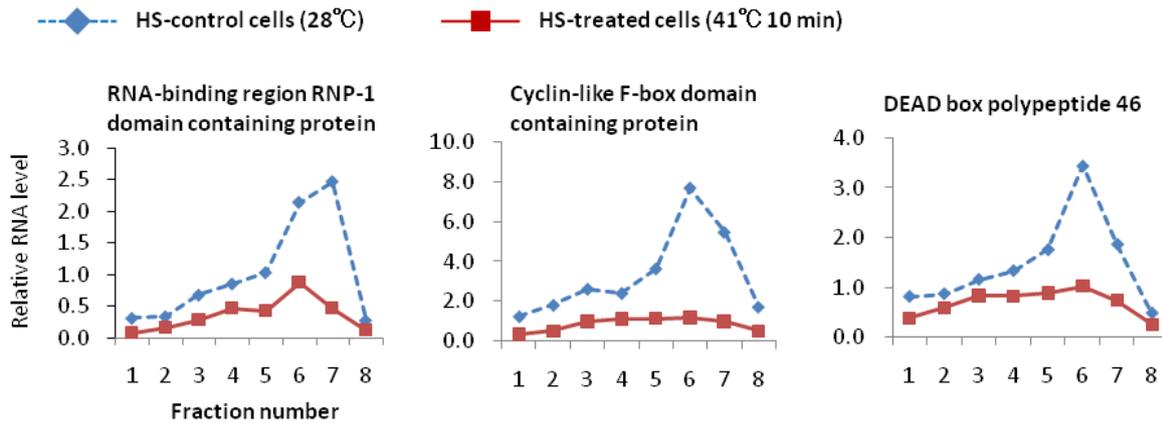


図 10 ストレスで蓄積転写物量が 1/2 以下に減少する mRNA の個別プロファイル
 ES が -0.3 以下を示した mRNA についてポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行った。横軸に示された画分番号は図 2 に対応している(1-3 ポリソーム画分, 5-7 非ポリソーム画分)。青点線は非ストレス処理サンプル、赤実線は熱ストレス処理サンプルにおける mRNA の分布を示している。縦軸の RNA 量は、ショ糖密度勾配遠心による分画後にそれぞれの画分に等量加えられた *RLUC* mRNA の定量 RT-PCR 結果を用いて補正した値であり、図 5 と異なり総量表記している。

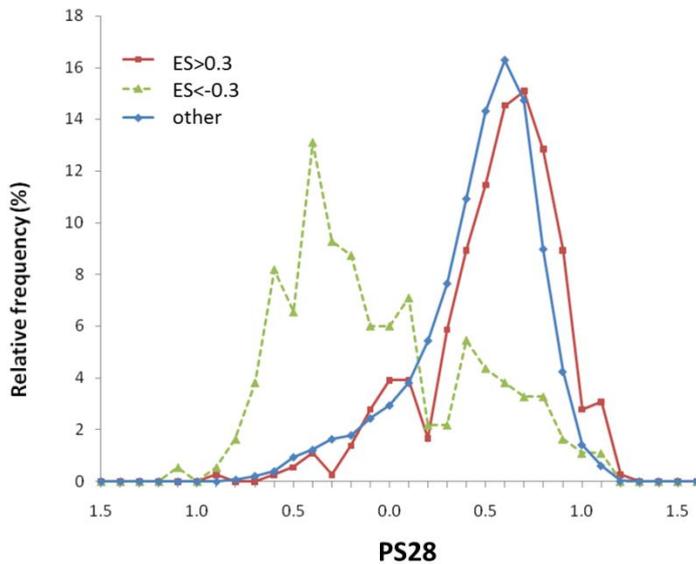


図 11 熱ストレスで蓄積転写物量が 1/2 以下に減少する mRNA の PS28 の分布
 ES が -0.3 以下を示した mRNA の非ストレス処理条件における PS(ポリソーム RNA の非ポリソーム RNA に対する比率)の分布を示す。縦軸は各条件に含まれる総 mRNA 数に対する相対頻度を示している。

1-3-5. mRNA がコードするタンパク質の機能面からの熱ストレスに応答した翻訳状態変化の解析

これまでの解析より、熱ストレスに応答して個別 mRNA の翻訳状態は様々に変化することが示された。次に、マイクロアレイ結果(ΔPS)を基にした、機能集団別解析を行うことで、mRNA がコードするタンパク質の機能面から、熱ストレスに応答した翻訳状態の解析を行った。具体的には、全 mRNA をコードするタンパク質の機能別に約 1000 個の集団に分類した後、各集団に含まれる mRNA の平均 ΔPS を算出し、各集団と全体の挙動との比較を行うことで、翻訳状態の変化と mRNA がコードするタンパク質の機能との関連の有無を解析した。

解析の結果、機能集団として捉えた場合、翻訳状態変化に統計的優位差(p 値 <0.01)が認められる集団が複数認められた。ここで抽出された機能集団は、 ΔPS が正と負のどちらかに偏る傾向を示す機能集団である。具体的には、環境ストレス下における平均的な mRNA からの翻訳状態変化は翻訳抑制 (ΔPS 中央値 $=-0.54$ 図 4C) であるため、統計的優位性を示す機能集団は、翻訳が特に抑制される傾向、もしくは翻訳が維持される傾向の 2 パターンが存在する。

ΔPS が正の方向に偏っていたものとして 13 の機能集団が抽出された。この結果は、熱ストレス処理によっても結合リボソームが大きく変化せず、潜在的に翻訳が維持される mRNA には、コードするタンパク質の機能的傾向が存在することを示していた。具体的には、carbohydrate metabolism, stress, polyamine metabolism, transcriptional regulation, ubiquitin protease 等の機能集団も抽出された。反対に、 ΔPS が負の方向に偏る 28 の機能集団が抽出された。この結果は、熱ストレスに応答して結合リボソーム数が急速に少なくなる mRNA にも、コードするタンパク質の機能的な傾向が存在することを示した。具体的には、ATP synthesis, amino acid and nucleotide metabolism, redox regulation, transport, protein and ribosomal proteins (表 2)といった機能集団が抽出された。

BIN code	BIN name	Gene number	<i>p</i> -values
2	major CHO metabolism	130	5.46E-03
2.1.2	major CHO metabolism.synthesis.starch	49	7.87E-03
2.2.1.5	major CHO metabolism.degradation.sucrose.Susy	12	1.16E-03
9.1	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH	19	8.47E-03
10	cell wall	203	2.36E-04
12.1	N-metabolism.nitrate metabolism	17	3.14E-03
13	amino acid metabolism	280	1.21E-05
13.1	amino acid metabolism.synthesis	165	1.70E-05
13.1.7	amino acid metabolism.synthesis.histidine	9	4.32E-03
13.2.6.2	amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	13	8.07E-04
20.1	stress.biotic	191	4.33E-03
21	redox.regulation	134	7.87E-03
21.2	redox.ascorbate and glutathione	46	2.48E-04
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	30	4.73E-03
22.1.2	polyamine metabolism.synthesis.SAM decarboxylase	10	9.28E-04
26	misc	614	8.53E-07
26.2	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	90	5.08E-03
27	RNA	2130	8.65E-04
27.3	RNA.regulation of transcription	1588	1.21E-05
27.3.6	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	83	1.97E-05
27.3.28	RNA.regulation of transcription.SBP,Squamosa promoter binding protein family	13	6.82E-03
27.3.40	RNA.regulation of transcription.Aux/IAA family	38	1.18E-05
29	protein	2801	2.29E-06
29.2	protein.synthesis	391	3.83E-05
29.2.1	protein.synthesis.mito/plastid ribosomal protein	70	2.36E-04
29.2.1.1	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic	60	4.92E-03
29.2.2	protein.synthesis.misc ribosomal protein	161	5.71E-08
29.3	protein.targeting	230	2.19E-05
29.3.3	protein.targeting.chloroplast	28	2.81E-05
29.3.4	protein.targeting.secretory pathway	120	5.97E-03
29.3.4.99	protein.targeting.secretory pathway.unspecified	52	2.36E-04
29.5.11.3	protein.degradation.ubiquitin.E2	55	5.88E-04
29.5.11.5	protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin protease	28	1.44E-03
31.3	cell.cycle	81	5.22E-03
31.3.1	cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	45	8.40E-05
34	transport	659	2.32E-05
34.7	transport.phosphate	14	8.65E-04
35	not assigned	6677	9.63E-14
35.1	not assigned.no ontology	2262	3.87E-03
35.1.1	not assigned.no ontology.ABC1 family protein	15	8.41E-03
35.2	not assigned.unknown	4468	0.00E+00

表 2 翻訳が維持もしくは特に抑制される機能集団

機能集団への分類を行った後、各機能集団に含まれる mRNA の ΔPS と全 mRNA の ΔPS について Wilcoxon's の補正を行った *p* 値を求め、*p* 値が 0.01 以下を示す機能集団のみを抽出した。表中には、BIN code(機能集団の階層番号)、BIN name(機能集団の階層名)、各集団に含まれる mRNA 数、及び *p* 値を示した。ある機能集団の ΔPS の分布が全体に対して高ければ *p* 値を青色で表示し、低ければピンク色で表示した。Misc, miscellaneous.

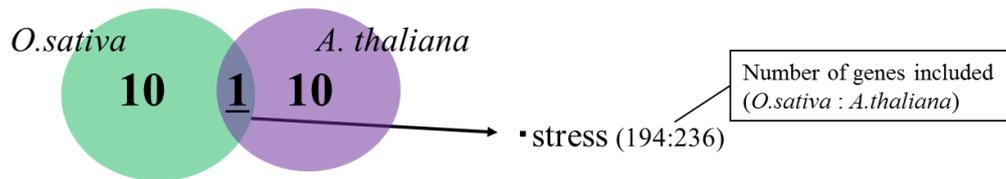
1-3-6. シロイヌナズナとイネ間における機能集団の比較

網羅的解析データを用いた機能集団別解析から、イネ細胞内において、熱ストレスに応答して翻訳状態が変化する mRNA には、コードするタンパク質に機能的な傾向が存在することが示された。次に、松浦らが行ったシロイヌナズナを材料とした熱ストレスに応答した翻訳状態変化の網羅的データを用いて同様の機能別解析を行い、イネ及びシロイヌナズナ間における機能集団レベルの比較を行った(Matsuura et al., 2010)。異種植物間において、マイクロアレイデータ等、遺伝子レベルのゲノムワイド比較は難しいが、機能集団として表すことで、2つのデータを間接的に比較することが可能となる。また、別種の植物種を材料とした、独立したデータを用いた解析を行うことで、植物における翻訳制御の生物学的意義について理解を深めることを目的とした。両植物種を材料とした機能別解析結果から、それぞれ p 値が 0.01 以下を示した機能集団のみを対象として比較解析を行った。対象となったイネの集団数は 37 個(表 2 から機能が予想されていない 4 集団を除いた)、シロイヌナズナの集団数は 35 個である。比較の結果、イネとシロイヌナズナ間で共通する機能集団が複数認められた(図 12)。具体的には、翻訳が維持される傾向を示す集団として「stress」が抽出された。また、翻訳が特に強く抑制される傾向を示す集団として「amino acid metabolism, amino acid metabolism. Synthesis, protein, protein. Synthesis. Mito/plastid ribosomal proteins, protein synthesis. ribosomal protein, protein synthesis. ribosomal protein. prokaryotic, transport」が抽出された。異なる植物種間において、熱ストレスに応答した mRNA の翻訳状態変化に共通する機能集団が認められたことは、熱ストレス下で生じる翻訳状態の変化は、特定の生理的变化を導くために制御機構が働いた結果であることを示唆するものであった。

一方で、イネのみ、又はシロイヌナズナのみから抽出された機能集団も存在した。例えば、イネ細胞を用いた機能解析から抽出された翻訳が維持される傾向にある機能集団に、炭水化物の代謝に関係する遺伝子を含む機能集団「synthesis. starch」や「degradation. sucrose」が含まれていた(表 2)。この結果より、熱ストレスに応答した翻訳状態変化には、mRNA がコードするタンパク質に、特定の植物種のみが有する機能的特徴が存在することも考えられた。しなしながら、今回のようなゲノムワイド解析(機能別集団解析)には、遺伝子のアノテーションの不完全性の影響を考慮する必要がある。そのため、さらに、転写因子という機能集団に着目することでより詳細な比較を試みた。機能集団への分類を行う上で、転写因子は機能と密接に係る特有のドメインを参考にするため、他の遺伝子よりも明確に分類が可能であると考えられた。イネ及びシロイヌナズナの機能別解析結果から、機能集団「転写因子」に限定し、各集団に含まれる mRNA の平均 Δ PS が、全体 mRNA の平均 Δ PS より高い値を示すならば青色で、低い値を示すならば赤色で p 値の表示を行った。翻訳状態変化の傾向による比較を行った結果、大機能集団「転写因子」に含

まれる 65 個の小機能集団の内、47 集団がイネとシロイヌナズナ間で共通した挙動を示した(表 3)。この大集団「転写因子」に含まれる小集団の挙動の相関を百分率で表すと 72%であり、この値はその他の大集団に含まれる小集団の百分率と比較しても非常に高い数値であった。この結果から、遺伝子のアノテーションが正確な機能集団ほど、両植物種で共通した翻訳状態変化を示す傾向にあることが示され、環境ストレスに曝された時に認められる翻訳状態の変化は、広く植物種において、共通した生理的变化を導く制御機構だと考えられた。

Maintained



Repressed

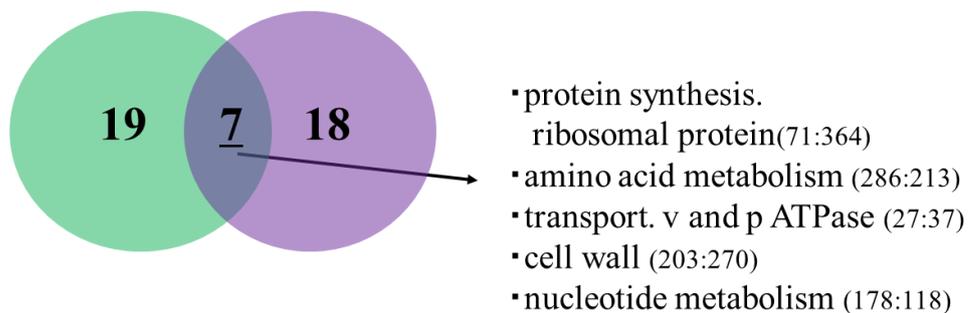


図 12 翻訳が維持もしくは特に抑制される機能集団のイネ及びシロイヌナズナ間における比較

イネ (表 2) 及びシロイヌナズナを材料とした Δ PS に基づく機能集団別解析結果から、 p 値が 0.01 以下を示した機能集団のみを抽出し、比較を行った。シロイヌナズナの結果は、松浦らによって公共データベースに公開されているものを使用した (Matsuura et al., 2010)。比較結果をベン図で示し、両植物種間で共通する機能集団を各機能集団に含まれた遺伝子数と共に示している。Not assigned (BIN code 35) は除外している。

BIN code	BIN name	<i>A. thaliana</i>		<i>O. sativa</i>	
		Gene number	<i>p</i> -values	Gene number	<i>p</i> -values
27.3.1	RNA.regulation of transcription.ABI3/VP1-related B3-domain-containing transcription	7	6.20E-01	5	7.60E-01
27.3.2	RNA.regulation of transcription.Alfin-like	7	1.20E-01	10	2.00E-02
27.3.3	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	68	1.20E-03	53	1.80E-02
27.3.4	RNA.regulation of transcription.ARF, Auxin Response Factor family	14	7.80E-01	38	8.70E-01
27.3.5	RNA.regulation of transcription.ARR	8	6.80E-01	10	7.30E-01
27.3.6	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	74	6.30E-01	83	2.00E-05
27.3.7	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	21	7.60E-01	23	3.60E-02
27.3.8	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) DOF zinc finger family	18	1.10E-01	5	5.80E-01
27.3.9	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) GATA transcription factor family	22	3.40E-01	13	9.30E-01
27.3.11	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	71	4.60E-01	49	6.60E-02
27.3.12	RNA.regulation of transcription.C3H zinc finger family	22	6.50E-01	28	1.30E-01
27.3.13	RNA.regulation of transcription.CCAAT box binding factor family, DR1	3	5.40E-01	1	9.20E-01
27.3.14	RNA.regulation of transcription.CCAAT box binding factor family, HAP2	8	8.20E-01	16	7.30E-01
27.3.15	RNA.regulation of transcription.CCAAT box binding factor family, HAP3	8	3.60E-01	10	3.50E-01
27.3.16	RNA.regulation of transcription.CCAAT box binding factor family, HAP5	10	8.10E-01	6	9.10E-01
27.3.17	RNA.regulation of transcription.CPP(Zn),CPP1-related transcription factor family	8	9.60E-01	9	4.90E-01
27.3.18	RNA.regulation of transcription.E2F/DP transcription factor family	8	8.80E-01	11	9.90E-01
27.3.19	RNA.regulation of transcription.EIN3-like(EIL) transcription factor family	3	8.70E-01	6	6.50E-01
27.3.20	RNA.regulation of transcription.G2-like transcription factor family, GARP	23	5.70E-01	17	9.90E-01
27.3.21	RNA.regulation of transcription.GRAS transcription factor family	5	6.90E-01	28	2.70E-01
27.3.22	RNA.regulation of transcription.HB,Homeobox transcription factor family	52	5.60E-01	66	6.20E-01
27.3.23	RNA.regulation of transcription.HSF,Heat-shock transcription factor family	12	7.10E-01	1	7.80E-01
27.3.24	RNA.regulation of transcription.MADS box transcription factor family	29	6.40E-01	31	1.80E-01
27.3.25	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	75	6.10E-04	52	6.30E-02
27.3.26	RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription factor family	34	9.30E-01	30	6.90E-01
27.3.27	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	12	4.20E-01	43	4.40E-01
27.3.29	RNA.regulation of transcription.TCP transcription factor family	15	7.30E-01	5	8.60E-01
27.3.30	RNA.regulation of transcription.Trihelix, Triple-Helix transcription factor family	22	5.00E-01	23	3.70E-01
27.3.32	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	44	3.60E-01	30	6.90E-01
27.3.34	RNA.regulation of transcription.Orphan family	9	6.60E-01	6	8.30E-02
27.3.35	RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	50	8.80E-01	63	4.80E-01
27.3.36	RNA.regulation of transcription.Argonaute	2	5.00E-01	18	7.80E-02
27.3.37	RNA.regulation of transcription.AS2,Lateral Organ Boundaries Gene Family	14	7.30E-03	9	1.30E-01
27.3.38	RNA.regulation of transcription.AT-rich interaction domain containing transcription fa	4	7.20E-01	4	2.50E-01
27.3.39	RNA.regulation of transcription.AtSR Transcription Factor family	6	6.40E-01	10	3.20E-01
27.3.40	RNA.regulation of transcription.Aux/IAA family	21	1.30E-01	38	1.20E-05
27.3.41	RNA.regulation of transcription.B3 transcription factor family	17	5.50E-01	4	4.20E-01
27.3.42	RNA.regulation of transcription.Bromodomain proteins	8	6.20E-01	3	6.00E-01
27.3.44	RNA.regulation of transcription.Chromatin Remodeling Factors	33	8.70E-01	49	1.10E-02
27.3.46	RNA.regulation of transcription.DNA methyltransferases	8	5.30E-01	13	1.30E-01
27.3.48	RNA.regulation of transcription.FHA transcription factor	7	8.00E-01	4	7.90E-01
27.3.49	RNA.regulation of transcription.GeBP like	11	1.00E-01	5	6.10E-01
27.3.50	RNA.regulation of transcription.General Transcription	25	8.80E-01	21	3.70E-01
27.3.51	RNA.regulation of transcription.General Transcription, TBP-binding protein	3	7.70E-01	2	1.80E-01
27.3.52	RNA.regulation of transcription.Global transcription factor group	15	9.70E-01	28	9.30E-01
27.3.53	RNA.regulation of transcription.High mobility group (HMG) family	2	6.20E-01	1	8.20E-01
27.3.54	RNA.regulation of transcription.Histone acetyltransferases	18	5.90E-01	8	8.80E-01
27.3.55	RNA.regulation of transcription.HDA	14	5.00E-01	19	6.30E-02
27.3.57	RNA.regulation of transcription.JUMONJI family	12	7.00E-01	6	3.30E-01
27.3.58	RNA.regulation of transcription.LUG	1	4.60E-01	4	8.80E-01
27.3.59	RNA.regulation of transcription.Methyl binding domain proteins	10	9.90E-01	11	2.80E-01
27.3.60	RNA.regulation of transcription.NIN-like bZIP-related family	7	8.70E-01	9	1.60E-01
27.3.62	RNA.regulation of transcription.Nucleosome/chromatin assembly factor group	12	6.30E-01	14	2.30E-01
27.3.63	RNA.regulation of transcription.PHD finger transcription factor	8	7.10E-01	6	9.30E-01
27.3.65	RNA.regulation of transcription.Polycomb Group (PcG)	8	5.60E-01	12	4.80E-01
27.3.66	RNA.regulation of transcription.Psdo ARR transcription factor family	6	8.60E-01	16	7.60E-01
27.3.67	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	142	7.20E-01	152	1.50E-01
27.3.68	RNA.regulation of transcription.PWWP domain protein	10	9.30E-01	4	1.30E-01
27.3.69	RNA.regulation of transcription.SET-domain transcriptional regulator family	34	9.40E-01	37	8.40E-01
27.3.70	RNA.regulation of transcription.Silencing Group	4	8.90E-01	1	5.50E-01
27.3.71	RNA.regulation of transcription.SNF7	13	1.00E+00	16	5.10E-01
27.3.73	RNA.regulation of transcription.Zn-finger(CCHC)	9	7.80E-01	2	2.20E-01
27.3.80	RNA.regulation of transcription.zf-HD	8	7.90E-01	4	8.70E-01
27.3.99	RNA.regulation of transcription.unclassified	242	6.10E-01	293	3.50E-01

表 3 機能集団「転写因子」の翻訳状態変化

機能集団「転写因子」について、イネ及びシロイヌナズナそれぞれについて表 2 と同様に *p* 値を求め、BIN code と BIN name と共に示した。ある集団に含まれる Δ PS の平均値が全 Δ PS の平均値より高ければ *p* 値を青で表示し、低ければピンク色で表示している。

1-4. まとめ及び考察

1-4-1. 熱ストレスに応答した翻訳状態の変化

大河原らは、シロイヌナズナ培養細胞を用いて、継代後1日毎の細胞の翻訳状態をポリソーム解析によって連続的に測定した。その結果、継代後4日目までは細胞内の翻訳状態は活発であるが、その後日数が経つにつれ細胞内の翻訳状態は徐々に抑制されていくことを示した(Okawara, 2012)。この翻訳抑制を引き起こす要因として、細胞増殖が進むことにより生じる、飢餓や低酸素ストレスといった培養ストレスが考えられる(Holland et al., 2010)。本研究では、熱ストレスに応答した細胞内の翻訳状態変化を解析するため、極力培養ストレスの影響を排除したいと考えた。そのため、ポリソームプロファイルから翻訳状態が活発である(ポリソームのピークが十分に確認できる)ことが示され、かつ、その後の解析に十分なRNA量が回収可能な継代後3日目の細胞を材料とした。

非ストレス処理及び熱ストレス処理サンプルのポリソームプロファイルの比較より、細胞内の翻訳状態は熱ストレス処理で劇的に変化し、大部分のmRNAからの翻訳が抑制されることが示された。また、37°C~43°Cまで2°C刻みに処理温度を変化させたサンプルを用いてポリソーム解析を行ったところ、熱ストレスによるポリソームピークの減少は温度依存的であり、プロファイル上で十分にポリソーム画分が減少する(翻訳が抑制される)温度条件として41°Cを選択した(図1A)。さらに、41°Cの熱ストレス条件を、5分~30分と時間を振ったサンプルをポリソーム解析に供したところ、各サンプル間でポリソームプロファイルに大きな違いは認められなかった(図1B)。これらの結果から、ストレス応答した時の翻訳抑制の強さは温度依存的であり、少なくとも5分のストレス処理で細胞内の翻訳は迅速に抑制されていることが考えられた。このような短時間で生じる細胞全体としての翻訳状態変化は、様々な植物種で認められており、環境ストレスに応答した翻訳状態変化の特徴の1つと考えられた(Reviewed in Roy et al., 2013)。

また、熱ストレス処理を施したイネ細胞をもう一度28°Cへ戻し、ポリソームプロファイルの経時変化を解析した結果、28°Cに戻してから1時間後には、減少していたポリソームピークの回復が認められた。加えて、*in vitro*解析より熱ストレス処理でリボソームが解離したmRNAは、再度リボソームのリクルートを行う能力を有することが示されている(Matsuura et al., 2010)。以上のことから、熱ストレスに応答して結合リボソーム数が減少するmRNAはすぐに分解されるわけではなく、熱ストレスに応答した翻訳状態変化は可逆的な反応であると考えられた。熱ストレス下で一時的に翻訳を抑制させるこのとの意義は不明だが、このような可逆的翻訳に基づく仮説として、ストレス状態から回復した時に、分解したmRNA量を補う新規合成を行うよりも、既に存在する非ポリソームmRNAからタンパク質合成を再開すること

で、様々な遺伝子の迅速な発現を保障しているのではないかと考えられる。

1-4-2. 熱ストレスに応答した翻訳状態は mRNA 種間で選択的に変化する

ポリソーム解析より、イネ細胞内では熱ストレスに応答して翻訳状態が大きく変化することが示された。しかし、熱ストレスに応答して個別 mRNA それぞれの翻訳状態がどのように変化するか不明であったため、次に、ポリソーム/マイクロアレイ解析を行うことで、網羅的に mRNA のストレスに応答した翻訳状態変化を解析した。マイクロアレイ結果より、ストレスに曝された時の mRNA の翻訳状態変化を示す指標である ΔPS は、 -0.54 を中央値とする正規様の分布を示すことが示された。このことは、熱ストレス処理に応答して大部分の mRNA は結合リボソームの減少を示し、翻訳が抑制されることを示していた。一方で、結合リボソーム数に変化がない mRNA の存在が示され、これらはストレス下でも潜在的に翻訳が維持される mRNA であると考えられた (図 4C)。加えて、一部の mRNA は他の多くと比較してより強く翻訳が抑制されていることが示された。これら mRNA は、ストレス下では結合しているリボソーム数が非常に少なく、新規タンパク質合成の活性は著しく低下していると考えられる。このような mRNA 種間におけるストレスに応答した翻訳状態変化の違いは、ストレスに応答した遺伝子発現調節における翻訳制御の重要性を示唆していた。また、イネ細胞で認められたゲノムワイドの翻訳状態変化は、シロイヌナズナを材料とした同様の解析結果と非常に類似するものであり、両植物種間で共通した翻訳制御機構の存在が示唆された。

近年、動物細胞を用いた解析より、翻訳制御の分子メカニズムについて新しい知見が報告され、ストレス下で認められる mRNA からの翻訳抑制には、複数のメカニズムが関与することが示された (Thoreen et al., 2012)。その 1 つめは、4EBP によって翻訳開始因子 4E の働きが阻害される結果、細胞全体として翻訳が抑制される、最もよく知られた翻訳制御のモデルである。2 つめは、ストレスに応答して 5'TOP(5'末端オリゴピリミジン)モチーフを有する mRNA だけの翻訳を選択的に抑制する経路である。5'TOP を有する mRNA は、ストレスに応答して 4EBP と 5'TOP を介した 2 つの翻訳抑制機構が働くため、他の mRNA と比較してより強く翻訳抑制されることが考えられている。一方、ポリソーム/マイクロアレイ解析より、植物細胞においてもストレスに応答して翻訳が特に抑制される mRNA が存在することから、ストレスに応答して翻訳を抑制させる制御には、複数の経路が存在する可能性が考えられた。今後、ストレス下における翻訳状態変化の程度が異なる mRNA、例えば、翻訳抑制の程度が異なる mRNA をターゲットとした解析を進めることは、分子メカニズム面からストレスに応答した翻訳状態変化について理解を深めていく端緒となると考えられる。

1-4-3. 翻訳状態変化と転写物量変化の関係

熱ストレスに曝された時の翻訳状態変化(ΔPS)に対する蓄積転写物量変化の影響(ES)も解析した。 ΔPS と ES をゲノムワイドに比較したところ、全体として相関は認められなかった(図 8)。このことから、熱誘導等による蓄積転写産物量変化と翻訳状態変化の間に関連はなく、ストレスに応答した翻訳状態の変化は独立した制御機構であると考えられた。例えば、熱ストレスにより誘導され、ストレス応答への重要性が報告されている *HSP mRNA* の翻訳状態変化は、大部分の翻訳が抑制され、ごく一部のみの翻訳が維持される挙動を示す(図 9)。この傾向は、細胞全体としての翻訳状態変化と非常に類似していた。つまり、熱ストレスで転写が誘導される *mRNA* であっても、熱ストレス下での翻訳活性は必ずしも良いとは限らないと考えられる。一方で、熱ストレスで誘導され、かつ翻訳が維持される *mRNA* も少数ながら認められていた。これら *mRNA* は、細胞全体として新規タンパク質合成が抑制される中でも、より活発にタンパク質が合成されていると考えられる。以上のように、熱ストレスによる蓄積転写産物量変化と翻訳状態変化は、多くの場合相関しない。ストレス下における遺伝子発現は、主に *mRNA* の量変化と翻訳状態変化の乗数で決定され、その内、より大きく翻訳状態が変化する *mRNA* に関して理解を深めていくことは、ストレスに応答した遺伝子発現調節を理解していく上で重用だと考えられる。

1-4-4. 特徴的な挙動を示す機能集団の存在

熱ストレスに応答した翻訳状態変化を、*mRNA* がコードするタンパク質の機能側面から解析を行った結果より、双子葉類のシロイヌナズナ及び単子葉類のイネにおいて、翻訳が維持もしくは特に抑制される *mRNA* はコードするタンパク質に共通した機能的な傾向が存在することが示された。このことより、熱ストレスに応答した翻訳状態変化に生理的な意義が存在することが考えられた。抽出された機能集団の中に、リボソームタンパク質を始めとして、タンパク質の合成機構に関与する因子をコードする *mRNA* が多く含まれていた。タンパク質の合成は、細胞内で最もエネルギーを使用する過程であることが報告されている(Proud, 2007)。また、様々なストレスに曝された細胞で生じる活性酸素種やタンパク質の変性による影響で、正常な代謝が損なわれることが示されている(Klaus et al., 2004)。そのため、リボソームタンパク質等のタンパク質合成に関連する因子をコードする *mRNA* からの翻訳を一時的に強く抑制することは、ストレス下で短期的には必要でないタンパク質の新規合成を停止させ、ストレス下における細胞内のエネルギーの効率的な利用に重要な意義をもつと考えられた。一方で、翻訳が維持される傾向にある機能集団として「ストレス応答」が抽出された。この機能集団の含まれる遺伝子は、これまでの研究よりストレス応答への重要性が報告されている。また、この集団に含まれる *mRNA* は、同じくイネから抽出された機能

集団「bHLH や IAA family」と重複するものが多い(表 2)。これら転写因子は、ストレスに応答して下流に存在する複数の遺伝子の発現を誘導し、植物のストレス耐性に寄与することが報告されている(Li et al., 2010; Wang et al., 2012)。この結果に、前述の翻訳が特に抑制される mRNA の機能的傾向を加味すると、ストレス下では、エネルギー消費が激しい代謝に関わるリボソームタンパク質をコードする mRNA 等からの翻訳を抑制し、その一方で、ストレス応答に重要なタンパク質をコードする mRNA からの翻訳を優先的に行う翻訳制御の生物学的意義の一端が示された。

イネとシロイヌナズナ間で熱ストレスに応答した翻訳状態変化には、コードするタンパク質の共通した傾向が存在することが示された。このことより、両植物種間で、ストレスに応答して翻訳状態を変化させることに共通した分子メカニズムが働いている可能性が考えられた。関連する分子メカニズムとして、シロイヌナズナを用いた解析より、ストレス下の翻訳状態を決定することに mRNA の 5'UTR の 5'末端の重要領域(AT rich)が寄与することが示されていた(Matsuura et al., 2013)。しかし、イネの mRNA の 5'UTR 内に同様の特徴は確認されない。ゲノム全体の各種塩基の存在比率を植物種間で比較した解析より、シロイヌナズナのゲノムは GC の割合が少ないが、イネのゲノムは GC rich であることが示されている(Serres-Giard et al., 2012)。加えて、熱ストレス下にあるシロイヌナズナ細胞内で翻訳維持に寄与する *ADH* mRNA の 5'UTR は、イネ細胞内においてはその翻訳維持能力を示さなかった(Nishigaki, 2013)。以上より、ストレスに応答して翻訳状態が変化する mRNA がコードするタンパク質の機能的傾向は両植物間で類似しているものの、関連する制御の分子メカニズムに関しては、植物種間で翻訳制御に関わる制御配列が異なる、もしくは制御メカニズム自体が大きく違う可能性が考えられた。

また、熱ストレスに応答した蓄積転写物量変化と翻訳状態変化を比較した結果より、熱ストレス誘導性の遺伝子であっても、その多くの翻訳はストレス下で抑制されることが示された。一方で、機能別解析結果から、ストレス下でも翻訳が維持される mRNA がコードするタンパク質はストレス応答へ重要なものであることが示された。特に、ストレス下で翻訳が維持される mRNA の中には機能が未だ不明な遺伝子やストレス応答への重要性が示されていないものも多く含まれており、今後、網羅的解析結果で示された翻訳状態変化を探索の1つの軸として捉えることで、ストレス応答に重要な新規遺伝子の同定が可能となると考えられる。

第 2 章

環境ストレス種特異的な翻訳制御の分子メカニズム

2-1. 序論

第 1 章における解析より、ストレスに曝された時に生じる mRNA の翻訳状態変化は、転写制御等と同じく、ストレスに応答した遺伝子発現調節機構の 1 側面であることが示された。この翻訳レベルにおける制御の特色は、mRNA 種ごとの翻訳状態を選択的に変化させることにあるが、関連するメカニズムについては不明な点が多い。そのため第 2 章では、環境ストレスに応答した翻訳状態変化の分子メカニズムに着目した解析を行うことで、翻訳制御の更なる理解を目指した。

植物細胞において、ストレスに応答した翻訳状態変化に関連する分子メカニズムは不明な点が多く残っている。その理由の 1 つとして、他生物種を材料とした研究で示された翻訳制御モデルが植物には該当しないことが挙げられる。例えば、他生物種における翻訳制御のモデルとして代表的なものとして、哺乳類細胞における翻訳開始因子の 1 つである 4E に結合し阻害的に働く 4E 結合タンパク質(4EBP)を介したモデルが知られている。真核生物の翻訳は、mRNA の cap 構造に結合し、mRNA の 5'末端にリボソームをリクルートする翻訳開始因子によって促進されているが、ストレス下では 4EBP によって翻訳開始因子 4E の cap 結合の能力が阻害される結果、細胞全体として mRNA からの翻訳が抑制される。しかし、このモデルにおける制御の鍵分子である 4EBP のオルソログが植物では存在せず、そのため植物独自の翻訳制御機構の存在が示唆されていた(Browning, 2004)。

当研究室における先行研究より、植物における環境ストレスに応答した翻訳制御機構の分子メカニズムに関して mRNA の 5'UTR の重要性を示すデータが示されていた。松浦らは、ポリソーム/マイクロアレイ法を用いてシロイヌナズナ培養細胞を材料とした熱ストレスに応答した翻訳状態変化を網羅的に解析した。さらに、ランダムに抽出した 39 種の 5'UTR を用いた一過性発現実験を行い、5'UTR によるストレス下での翻訳活性値と、ストレス下に移行した時の翻訳状態変化の間に正の相関(ピアソンの相関係数 $r=0.69$)が存在することを示した。この結果は、熱ストレス下に移行した場合の mRNA の翻訳状態変化を規定することに、5'UTR が重要であることを示していた(Matsuura et al., 2013)。また、一過性発現実験結果と解析に用いた 5'UTR の配列情報を基にした *in silico* 解析より、ストレス下に移行した場合の翻訳状態変化を規定する要因として、5'UTR の 5'末端の重要領域が示されていた(Matsuura et al., 2013)。

加えて、ストレスに応答した翻訳状態変化の網羅的解析は、シロイヌナズ

ナ T87 培養細胞を材料に、熱及び塩ストレスといった別種のストレスを用いても行われており、これら 2 種のストレスに応答した翻訳状態変化をゲノムワイドに比較すると、正の相関(ピアソンの相関係数 $r=0.65$)が認められる(図 13)。また、Kawaguchi らによって行われた、乾燥ストレスを用いた翻訳状態変化の網羅的解析結果と比較した場合にも、同様の相関が示された(Kawaguchi et al., 2004)。これらの結果は、環境ストレスに応答した翻訳状態変化は、全体としてストレスの種類に依存しないことを示唆するものであった。前述の松浦らが行った一過性発現実験に用いた 5'UTR、その由来である mRNA 群も異種ストレスに応答した翻訳状態変化において正に相関する mRNA であることから、5'UTR の 5'末端の重要領域は、ストレスの種類に依存しない翻訳制御(以降、共通の翻訳制御と記載する)に関わる制御配列であると考えられた。

一方、少数ではあるが正の相関から外れる mRNA が存在した(図 13)。この mRNA の翻訳状態は、特定のストレス種に応答して変化していると考えられる。例えば、図 13 において黄線で示された mRNA 群は、熱ストレス下において翻訳が抑制されるが、塩ストレス下では翻訳が維持されるという挙動を示す。反対に、緑線で示した mRNA 群は、熱ストレス下では翻訳が維持されているが、塩ストレス下では翻訳が抑制される挙動を示す。このようなストレスの種類に依存した翻訳制御(以降、ストレス種特異的翻訳制御と記載する)に関する報告はこれまで存在せず、背景にある制御機構も複雑な翻訳制御機構の一部であると考えた。そのため、ストレス種特異的に翻訳状態が変化する mRNA を対象とした解析を行うことで、分子メカニズム面から、環境ストレスに応答した翻訳制御機構の解明に向けたアプローチを試みた。具体的には、翻訳制御に関わる制御配列に着目し、以下 2 つの仮説の検証を行った。①既に確認されている共通の翻訳制御に関わる重要領域とは別に、翻訳状態を規定する制御配列が存在する。②特定のストレスに応答して転写開始点(5'UTR の 5'末端の重要領域)が変化する。つまり、ストレス応答した転写調節が mRNA の翻訳状態を規定する 1 要因となっている。

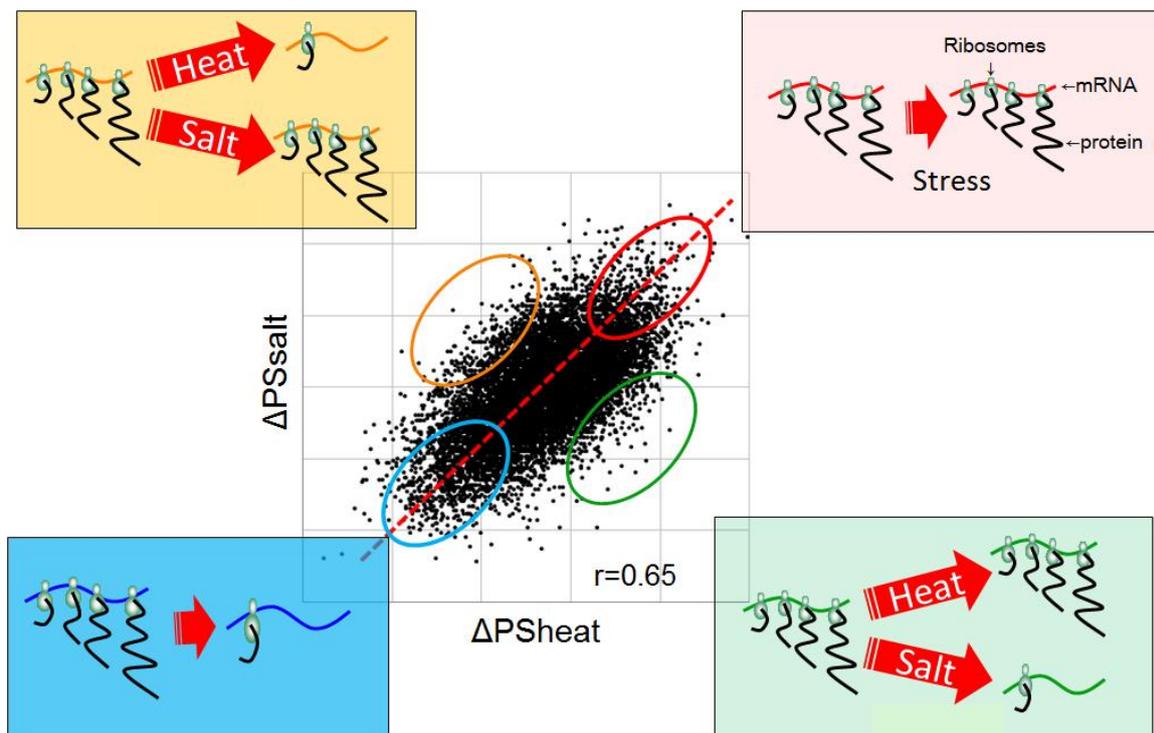


図 13 熱及び塩処理による翻訳状態変化の網羅的解析結果の比較

シロイヌナズナ T87 培養細胞を材料に、37°C 10 分の熱処理及び 200 mM の NaCl 処理した場合の細胞内の翻訳状態変化をゲノムワイドに比較した。用いたマイクロアレイデータは、松浦らが解析を行い、公共データベース上にて一般に公開されている (Matsuura et al., 2010)。 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} は、熱及び塩ストレスに応答した翻訳状態変化の指標である。図中に、ピアソンの相関係数、回帰直線を示し、代表的な翻訳状態変化を示す mRNA 群を赤、青、黄、緑の線で囲み、対応する翻訳状態変化(リボソーム結合数の変化)の模式図を示した。

2-2. 方法と材量

2-2-1. マイクロアレイデータからの情報抽出

マイクロアレイデータは、松浦らが T87 培養細胞を材料に実験を行い、公共データベース CIBEX(center for information biology gene expression database)上で一般に公開されているものを用いた(アクセッションナンバー CBX69)(Matsuura et al., 2010)。マイクロアレイデータからの情報抽出作業には Microsoft excel を使用した。まず、比較のため別個のデータである熱ストレス及び塩ストレスに曝された時の翻訳状態変化を示す指標(ΔPS)をマイクロアレイ上の各スポットに対応する Feature number を用いて結合させた。この時、シグナル強度のバックグラウンドに対する優位差が無い等の理由により片方でも ΔPS が存在しない mRNA については除外した。17657 の mRNA について ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} についての散布図を作成し、回帰式、ピアソンの相関係数、及び各 mRNA について回帰直線からの垂直距離を算出した。

2-2-2. ストレス種特異的な翻訳状態変化を示す mRNA の抽出

ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} の間には正の相関(ピアソンの相関係数 $r=0.65$)が認められた。そのため、回帰直線からの距離が近い mRNA ほど両方のストレス下で類似した翻訳状態変化を示し、反対に、回帰直線からの距離が遠い mRNA ほど、他のものに比較してストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する。回帰直線からの垂直距離の長さを 17657 の mRNA についてランキング化し、距離が長い上位 3%($n=530$)をストレス種特異的に翻訳が制御される mRNA の候補として選択した。

2-2-3. ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

基本的に第 1 章の方法に従っているが、ショ糖密度勾配液の吸引時に用いた機器は、Gradient fractionator (BioComp, New Brunswick, Canada)を使用した。

2-2-4. ショ糖密度勾配液からの RNA 抽出

第 1 章の方法に従った。

2-2-5. 定量 RT-PCR 法

第 1 章の方法に従った。

2-2-6. 5'RACE 法

5' RACE 法は既知 cDNA 配列を基に、その cDNA の未知配列部分を決める方法である。解析には 5' RACE kit (Invitrogen)を使用し、基本的に付属の作業説明書に従って実験を行った。具体的には、まずストレス及び非ストレス処理細胞より TRIZOL REAGENT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用

Reverse プライマーは、5'UTR の下流に下記の Aat II サイトまでの *FLUC* 配列を持つように設計した。

5'GACGTCTTCCAT_5'UTR...3'

↑ Aat II

cDNA 及びプラスミドを鋳型として PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を pUC118 のマルチクローニングサイト内に挿入し、シーケンスによって 5'UTR の 5'側に EcoRV サイト及び 35S プロモーター部分配列、3'側に Aat II サイトまでの *FLUC* 部分配列が付加されていることを確認した。次に EcoRV /Aat II サイトを用いて、35S pro._*ADH* 5'UTR_*FLUC* が挿入された pBluescript 上で 5'UTR 領域の置換を行い、さらに、pRI909 35S::*AtADH* 5'UTR *FLUC*::*HSP-T*(Okawara, 2012)の XbaI-SacI ギャップに挿入し、形質転換用ベクターを作製した。

2-2-7-2. アグロバクテリウム法による培養細胞へのバイナリーベクター導入

定常期に達した7日目のシロイヌナズナ培養細胞 T87 を新しい改変 LS 培地(95 ml)に 2 ml を植え継ぎ、3 日間 24 時間明期、22°C にて振盪培養した。3 日目のシロイヌナズナ培養細胞 T87 培養液に 2×YT 培地で培養したアグロバクテリウム を 500 μ l または 1 ml (O.D.600 測定値 \approx 1) 接種した。同時に終濃度 100 μ M のアセトシリコンを添加し、22°C、連続明期、攪拌速度 120 r.p.m. の条件下で 2 日間、振盪共存培養した。その後、共存培養液 50 ml (全量の半分) を 50 ml 遠心管に移し、遠心(800 \times g, 1 min, 4°C)を行った後、上清を除き、100 mg/l カルベニシリンを含む改変 LS 培地(洗浄培地)を約 20 ml 加え、5 回の洗浄を行った。洗浄後の培養細胞を洗浄培地 100 ml に移し、22°C、連続明期、攪拌速度 120 r.p.m. の条件下で 2 日間、振盪回復培養した。回復培養後の培養細胞全量を洗浄培地で洗浄を行った。洗浄後の培養細胞と等量の洗浄、培地を加えたものを 1 ml 又は 500 μ l、改変 LS Km Cb プレート(改変 LS 培地, 40 mg/l カナマイシン, 250 mg/l カルベニシリン, 3 g/l ゲランガム)に広げた。22°C、連続明期に 2~3 週間静置し、形成したカルスを新たな改変 LS Km Cb プレートに移し、さらに増殖の良好なカルスを選択し、導入遺伝子の発現を確認後、十分に増殖したカルス塊を、95 ml の改変 LS 液体培地中(40 mg/l カナマイシン, 250 mg/l カルベニシリン)で培養し、その後の実験に用いた。

2-2-8. CAGE 解析

2-2-8-1. CAGE ライブラリーの作製

CAGE 解析に供したトータル RNA は、シロイヌナズナ T87 培養細胞を材料に TRIzol (Invitrogen) を用いて抽出を行った。T87 培養細胞の条件は、37°C 10 分の熱ストレス処理、200 mM NaCl 処理、及びストレス未処理の 3 種である。CAGE ライブラリーの作製は、Kodzius らが開発した手法に従った (Kodzius et al., 2006)。まず、トータル RNA 5 μ g を鋳型に、N15 ランダムプライマーと Primer Script Reverse Transcriptase (TAKARA) を用いた逆転写反応を行い cDNA を合成した。合成された RNA/cDNA 複合体に対して Agencourt RNAClean XP (Beckman) を用いて cDNA の精製を行った。次に、cDNA に対して CAGE linker を結合させた。CAGE linker は既知の ssDNA であり、Mme I 及び XmaJ I 制限酵素サイトを含む。また ssDNA の 5' 末端には Biotin が付加されている。結合後、CAGE linker をプライマーとして ssDNA から dsDNA を合成した。合成された dsDNA に対して、Mme I 制限酵素処理を施した。Mme I はクラス I 制限酵素であり、認識部位の 5' 末端から 20 塩基下流を切断する。本実験系においては、CAGE linker に結合させた cDNA 由来領域が切断部位に相当する。Mme I 切断部位に対して、さらに既知のリンカーを結合させた。この段階で、両末端に既知の配列が付加された、mRNA の 5' 末端

20 塩基に対応する配列を含む dsDNA(CAGE タグ)が得られる。さらに、制限酵素 XmaI 処理で余分なリンカー領域を取り除き、CAGE タグをつなぎ合わせることで、CAGE ライブラリーを得た。

2-2-8-2 シーケンス解析

シーケンス解析は、illumina(R) HiSeq 2000 を使い、付属のプロトコールに従って行った。

2-2-8-3 マッピング

得られた raw データから CAGE linker 配列を除去し、エラーリード及びリボソーム RNA に対応するタグを除去した。次に TAIR10 の情報を基にマッピングを行った。表 5 に CAGE 解析結果から得られた raw データ中のタグ数とマッピングされたタグ数示す。サンプル間における総リード数の違いを補正するため、リード数を 10 million リードあたりの相対値として表示し、以降の解析に用いた。

	raw	mapped
Con-1	26977436	23425227
Con-2	29445082	25634149
HS-1	17230935	14759000
HS-2	17438325	15069225
SS-1	20446162	17669545
SS-2	17111124	14553225

表 5 CAGE 解析結果から得られた raw データ中のタグ数及びマッピングされたタグ数
Con, 非ストレス条件、HS, 熱ストレス条件、SS, 塩ストレス条件のサンプルを用いて CAGE 解析を行った。各条件について 2 反復の解析を行った。得られた raw データ中のタグ数及びマッピングされたタグ数を示す。

2-2-9. RNA 一過性発現実験

2-2-9-1. *in vitro* 転写用鋳型プラスミド構築

試験する 5'UTR の配列は、CAGE 結果で同定されたものを用いた。解析対象の 5'UTR は、熱ストレス条件と非ストレス条件で長さの違いが認められ、かつ塩ストレス条件と非ストレス条件で 5'UTR が同一であることが示されたものを用いた(表 6)。構築に際して、下記に示すように forward プライマーは 5'端に Nco I 及び T3 プロモーターを持つように、Reverse プライマーは 5'端に Aat II *FLUC* 領域を持つようにそれぞれ設計し、cDNA を鋳型とした PCR 反応にて目的 DNA 断片の増幅を行った。

5' CCATGGAATTAACCCTCACTAAAG 5'UTR...3'

↑ Nco I

5' GACGTCTTCCAT 5'UTR...3'

↑ Aat II

その後、*in vitro* 転写用鋳型プラスミド pFL-pA(Matsuura et al., 2008)の *Nco* I / *Aat* II サイトに挿入した (pT3- 5'UTR- FL-pA; 図 15)。なお、*Renilla luciferase* (*RLUC*) mRNA の *in vitro* 合成には、プラスミド pT3-RL-pA (Matsuura et al., 2008)を用いた。

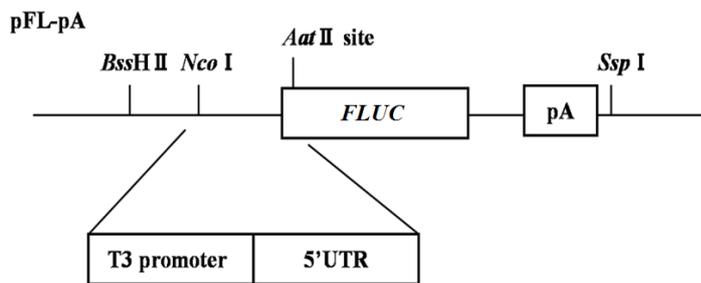


図 15 プラスミドの構築概略

T3 プロモーターの下流に試験する 5'UTR 配列を連結した DNA 断片を、*Nco* I / *Aat* II サイトを用いて *FLUC* mRNA 合成用プラスミドに挿入した。*in vitro* 合成された *FLUC* mRNA は、T3 プロモーター由来の GG が、試験する 5'UTR の 5'端に付加される。

Gene name	condition	length of 5'UTR	5'UTR (5'→3')
At1g16030.1	CON/SS	246	GTACGTTTGCGCGATTTCACCTTTCCACAATCCCTGGGTTGTGCCACGACCTTTTTCTCGAAATGTC TCGTTCTCTCGTCGGATTTCGTATATATAGCTTCTCCATCGTTCCGATTCTTCATCAAACAGATAAACAA ACAAAAGAAATCGAAAACCTCACTTCCAATTCATTCATTAATTAAGCTTTTTTTAGCAACA
	HS	119	ATCAAACAGATAAACAAACAAAAGAAATCGAAAAACCTCACTTCCAATTCATTCATTAATTAAGCTTTTT TTTAGCAACA
At1g53540.1	CON/SS	229	AAGGATACCATCGATCAAAATAATTTTCAAGAACTCGCAGAAATGTTCTATCTTACTTTCCATACTCTCTCC CTATAAATATGCGAAGGCTCGTAGCTGTACGAACCAACAAGGAGCAAAGAGTTCATAGCAAAGCAAAGCTT CAAAACAGAGCAAACGAAAGAGTAGCAATCACAAGAGGAAGTGAACG
	HS	122	AACAAGGAGCAAAGAGTTCATAGCAAAGCAAAGCTTCAAAACAGAGCAAACGAAAGAGTAGCAATCACA AGAGGAAGTGAACG
At1g70300.1	CON/SS	360	ACAAGTAAGCAACTTCAAAATCTGGTTAACCCAAATTACAAAAAACAATAAAAGTTCGCTCTCTT TCTTCTTAAAAATCTCAACTTTGTCTGTCAAAACCTCCAAATCCAGAAACCCATACGCAAATATCCTTCTACG TGTTTGCTCCTTTCACGTTTTTCTCGAATCTCTCGCATTTACCAATCAAACAGATTCTAAAGTCCAAACTT TTCTTTCTTCTCAAACCTTCTCTGTTTCTCAACTCTTCACTTTCCAGTGGTAAGATTGAATCATGGGTT TCTCAAATCTTAACTTTTCACAAAAGCCACC
	HS	129	AAACCATTCTCTGTTTCTCAACTCTTCACTTTCCAGTGGTAAGATTGAATCATGGGTTTCTCAAATCTTA ACTTTTCACAAAAGCCACC
At3g08970.1	CON/SS	100	GTTGAGTTTCGTGAATAAGACACGCTTAGAAGAGGAAGAAGAAGATTGTTGACAACAAAACAATAAAAGA GAAAAAGATTGAGAGGTTGTACTTTCGGG
	HS	52	GTTGACAACAAAACAATAAAAGAGAAAAAGATTGAGAGGTTGTACTTTCGGG
At2g46240.1	CON/SS	284	AGATTTTCAAAGTGATGCGAGAATGATCTGGAGAGCAGAAGAAATATCTTTTCCCTCTGAACGTTGTTGT TCGCTTTTCTATAAATCAAGAAATGTCTTTGGATTGTTCACTACCCATAGAAAAAGCTGCAATCATCTGAAT CAGAAAGTAATTCGAAGAAGAAATCTGCTTTTTTAATTGGTGGAGAGAGTGAGAGAGCTTCGCAGGAAC GAGTCATCGGAATTCAGGATCGTTTCTGTTTCTGTTTACTGGAATTGGTTAAGTGATCTTGATTAAG
	HS	171	ACCCATAGAAAAAGCTGCAATCATCTGAATCAGAAAGTAATTCGAAGAAGAAATCTGCTTTTTTAATTGGT GGAGAGAGTGAGAGAGCTTCGCAGGAACGAGTCATCGGAATTTACGGATCGTTTCTGTTTCTGTTTACT GGAATTGGTTAAGTGATCTTGATTAAG
At5g37340.1	CON/SS	86	GGTGTCTCTGCTTCTTGCTGAGTTTAGTAAAATTTCAAGCATTGTCTCTTTTACTCGGATTGTTGGAGA AATTTTTGGAGGTG
	HS	337	AAGTTTCTTGTGTTGATACACATATTCGCTTCTCACATCAGAAATGATATCAAAGTAAAGTTCCTTTTTCTT ATTATTCTCTCGAGATTGACGAAATGAACTCTGTTTCTCGATTCTAGGAACTTATCTTGAGCACTCTGTC CCACTCTGATTGACCTTTGAAAGAGCTTATATAAATCTTAGTATAGGGATTGTGTTGGAAATTTGG ATATAAGTTTATGTTTTGTCTAGCTGTTAATGAGCACAAAGTTTCATGCTTTTTAGCTTGTTTCTCTAATAA TAGGTTTTGAACCTCATAGGATTGTTGGAGAAATTTTGGAGGTG

表 6 CAGE 法によって同定された熱ストレス処理前後の 5'UTR

解析対象の遺伝子について、遺伝子名、熱ストレス(HS)及び非ストレス (CON)条件の細胞由来の 5'UTR の配列(5'→3')及び長さを示す。塩ストレス条件における 5'UTR は非ストレス条件と同一であった。表示されている 5'UTR は、CAGE 解析結果より、最も頻度が高かったものである。

2-2-9-2. *in vitro* 転写

ポリ A 配列を持つ *in vitro* 転写用プラスミド (pT3-5'UTR-FL-pA、pT3-RL-pA)は *in vitro* 転写反応に先立ち、*Ssp* I (AATATT)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)に続いてウラシル残基が 1 塩基付加されることになる。*Ssp* I 処理した DNA 断片は、FastGene Gel/PCR Extraction kit (NIPPON Genetics)を用いて精製した。精製された DNA 断片を鋳型に、Megascript T3 transcription kit (Life Technologies)を用いて、cap 構造を持たない mRNA を合成した。合成された RNA はキットに付属の DNase I で処理した後、LiCl 沈殿により精製し、付属の RNase-free 水で溶解した。cap 構造の付加は ScriptCap m⁷G Capping System (EPICENTRE, Madison, WI, USA)を用い

た。cap 構造を付加した RNA は RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて精製し、RNase-free 水で溶出した。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を用いた電気泳動(100 V, 40 min)により検定した。

2-2-9-3. 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、Satoh らの方法に若干の変更を加えて行った(Satoh 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, Tokyo), 0.1% Pectolyase (Kikkoman, Osaka) [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(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)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、氷中に 30 分間静置した。細胞数の計測は血球計算板を用いて行った。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/ μl 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。

2-2-9-4. プロトプラストへの mRNA の導入

mRNA のプロトプラストへの導入は、基本的に Kovtun らの polyethlen glycol (PEG)を用いた方法に従った (Kovtun et al., 2000)。約 7 μg の mRNA に 1×10^4 cell/ μl に調製したプロトプラストを 350 μl 加えた後、混合液と等量の PEG CMS 溶液 (40% PEG 4000, 0.4 M Mannitol, 0.1 M Ca (NO₃)₂) (Sheen, 2001) を加えてゆっくりと転倒混和した。細胞を 5 分間室温にて静置した後、W5 溶液を加えて転倒混和し、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、遠心操作(13,000 r.p.m., 2 min, 4°C)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。

2-2-9-5. ルシフェラーゼ酵素活性測定

細胞の溶解は、 3×10^6 個のプロトプラスト当たり 75 μl の passive lysis buffer (Promega)を用い、室温にて 15 分間のミキサー処理によって溶解させた。溶解液中の FLUC、RLUC 活性測定には、Dual-luciferase reporter assay system (Promega)とマルチモードプレートリーダー (TriStar LB941, Berthold technology, Germany)を付属のプロトコールに従って使用した。

2-3. 結果

2-3-1. ストレス種特異的な翻訳状態変化を示す mRNA の抽出

熱及び塩ストレスに応答した時の翻訳状態変化を示す指標である $\Delta\text{PS}_{\text{heat}}$ 及び $\Delta\text{PS}_{\text{salt}}$ をゲノムワイドに比較すると、全体として正の相関(ピアソンの相関係数 $r=0.65$)が認められた(図 16)。この結果は、多くの mRNA のストレスに応答した翻訳状態変化は、熱及び塩ストレス下で類似するものであることを示していた。一方で、散布図よりストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する mRNA の存在が示された。このような mRNA は、全体的傾向(正の相関)を示す回帰直線からの距離が遠い。そのため、回帰直線からの垂直に伸びる線の長さがより長い上位 5% の mRNA を、ストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する mRNA の候補として選択した。さらに、 ΔPS の中央値 ($\Delta\text{PS}_{\text{heat}}=-0.77$, $\Delta\text{PS}_{\text{salt}}=-0.31$)を用いて、全 mRNA を 4 つの象限に分類し、第 2 象限に属する mRNA を塩ストレスで翻訳維持され熱ストレス下で抑制されるもの、及び第 4 象限に属する mRNA を熱ストレス下では維持されるが塩ストレス下で抑制されるものとして選択した(図 16)。

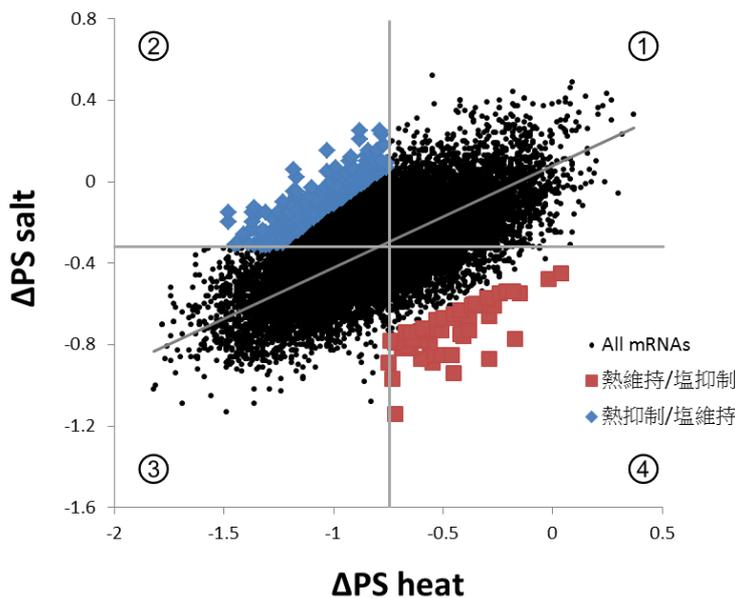


図 16 ストレス種特異的に翻訳状態が変化する mRNA の抽出

シロイヌナズナ T87 培養細胞を材料に、 37°C 10 分の熱処理及び 200 mM の NaCl 処理した場合の細胞内の翻訳状態変化をゲノムワイドに比較した。用いたマイクロアレイデータは、松浦らが解析を行い、公共データベース上にて一般に公開されている (Matsuura et al., 2010)。図中に、回帰直線、 $\Delta\text{PS}_{\text{heat}}$ 及び $\Delta\text{PS}_{\text{salt}}$ の中央値を直線で示す。 ΔPS の中央値、及び回帰直線からの垂直に伸びる線の距離が遠い mRNA を赤及び青のプロットで示す($n=316$)。

2-3-2. 定量 RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性の確認

抽出された mRNA からランダムに選択した 10 種の mRNA(以下候補 mRNA と称する)について、ポリソーム/定量 RT-PCR 法を用いたマイクロアレイ結果の追試を行った。候補 mRNA には、塩ストレス維持/熱ストレス抑制の挙動を示すものの割合が高いが、これは図 13 で選抜された mRNA における比率をおおむね反映したものであった。また、解析手法は、第 1 章と同様である。定量 RT-PCR 及びマイクロアレイ結果それぞれから算出した ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} 値を比較した結果、いずれの指標値も相関を示した(ピアソン相関係数 $r > 0.58$) (表 7、図 17)。この定量 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り、また、独立した 2 種類の手法より、候補 mRNA の多くは確かに、特定のストレス種に応答して翻訳状態が変化していることが示された。

Gene name	qRT-PCR		Microarray	
	Δ PSheat	Δ PSsalt	Δ PSheat	Δ PSsalt
At2g29570.1	-0.21	-0.65	-0.16	-0.55
At1g36160.1	-0.64	0.57	-0.54	0.04
At1g36180.1	-0.26	0.69	-0.11	0.19
At1g09970.1	-0.84	0.47	-1.08	-0.14
At3g58050.1	0.05	1.39	-0.48	0.15
At4g03430.1	-0.70	-0.38	-0.62	0.07
At1g48040.1	-0.75	0.16	-0.79	0.04
At3g48880.2	-0.54	-0.01	-0.56	-0.02
At5g13180.1	-1.13	-0.48	-0.56	-0.02
At2g44500.1	-0.34	0.36	-0.74	0.00

表 7 候補 mRNA のマイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR から得られた Δ PS
 定量 RT-PCR 解析(qRT-PCR)を用いて、各遺伝子のストレスに応答した翻訳状態変化の指標である Δ PS を算出し、マイクロアレイ解析から得られた結果と共に示した。

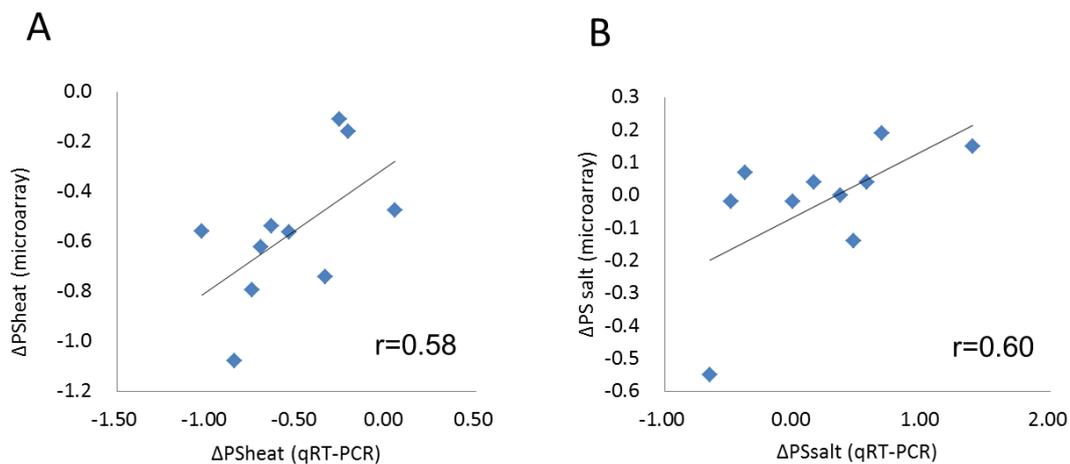


図 17 マイクロアレイ解析及び定量 RT-PCR 解析の結果の比較

表 7 に示した定量 RT-PCR 解析及びマイクロアレイ解析から得られた Δ PSheat (A)、 Δ PSsalt (B)を比較した結果を散布図にて示す。縦軸がマイクロアレイ解析、横軸が定量 RT-PCR 解析由来の Δ PS を示す。 r はピアソンの相関係数を、点線はプロットに対する回帰直線を示す。

2-3-3. 候補 mRNA の 5'UTR の同定

特定のストレスに応答して翻訳状態が変化する mRNA の存在が示された。背景には、これら mRNA を他の mRNA と区別して選択的に翻訳状態を変化させる機構が存在していると考えられた。一方、先行研究より、ストレスの種類に依存せずストレス下における mRNA の翻訳状態を決定する共通の翻訳制御に、5'UTR が重要であることが報告されていた(Matsuura et al., 2013)。そのため、本研究においても、まずは 5'UTR に着目した解析を行った。特に、変異挿入実験からストレス下での翻訳維持能力を示す 5'UTR 内の重要領域には、5'UTR の 5'末端からの位置情報も重要であり、重要領域の上流への 1 塩基挿入が翻訳維持能力を著しく失わせることが報告されていた(Hata, 2012)。この結果は、ストレス下における 5'UTR の翻訳能力を検証する上で、5'UTR の厳密な同定が重要であることを示していた。そのため、cap 構造依存的 5'RACE 法により 5'UTR の同定を試みた。解析対象の mRNA について熱ストレス、塩ストレス、非ストレス処理を施した細胞を用いた 5'RACE 解析結果の一例を示す(表 8)。シーケンス結果より、At2g29670.1 等いくつかの mRNA 種は、長さの異なる複数の 5'UTR が確認された。例えば、At2g29670.1 5'UTR は、25~125 塩基間の長さの違いが認められたが、77 塩基前後に集中する傾向が認められた。このような複数の 5'UTR 種の存在は先行研究からも確認されており、転写開始点が厳密に定まっていないことが原因の 1 として挙げられた(Yamamoto et al., 2009)。一方で At1g09970.1 等確認される 5'UTR がすべて同一であるものも存在し、転写開始点が厳密に定まっている遺伝子も認められた。5'UTR に着目した解析を行うに際し、転写開始点が厳密に定まっている遺伝子、もしくは、分散が認められるが転写開始点の収束率の高い遺伝子を選択した。

表 8 5'RACE 解析により同定された 5'UTR

熱ストレス(HS)、塩ストレス(SS)及び非ストレス処理 (Control) 条件由来の細胞を材料とした 5'RACE 解析より同定された配列を示す。各条件について最低でも 10 個のプラスミドをシーケンスで読み取り、長いものより降順に表示した。cap 構造除去部位に付加されたアダプターRNA 由来の配列(オレンジ)と TAIR10 で示された開始コドン(青)の間に挟まれた領域を 5'UTR として示した。シーケンス結果がすべて同一の 5'UTR の場合は、1 配列のみ表示している。

2-3-4. 5'UTR を連結した *FLUC* mRNA を発現する形質転換体を用いた翻訳状態変化の解析

5'RACE 解析より、ストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する mRNA の 5'UTR が特定された。次に、5'UTR がストレス種特異的に翻訳状態が変化するものの要因であるかを調べた。具体的には、熱ストレス下では翻訳が抑制/塩ストレス下では翻訳が維持される At1g09970.1 や At5g13180.1 mRNA の 5'UTR(142 及び 67 塩基)を 35S プロモーターの支配下でレポーター *FLUC* 遺伝子と連結したバイナリーベクターを、それぞれシロイヌナズナ培養細胞 T87 に導入した形質転換培養細胞を用いてポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行った。用いた 5'UTR は、5'RACE 解析より、5'UTR がすべて同一の遺伝子、もしくは最も存在頻度が高い 5'UTR である。

ポリソームプロファイルより、翻訳が維持される内在性 *IAA1* mRNA は、熱及び塩ストレスの両方の条件下でも、ポリソーム画分に留まることが示された。一方で、翻訳が抑制される *ACT2* mRNA は、ストレスに応答して非ポリソーム画分に移行することが示された(図 18 及び 19)。これら mRNA の挙動は、以下すべての形質転換細胞について解析し、各ラインが確かにストレスに曝されていることの指標とした。さらに、熱及び塩ストレス下での候補 mRNA の 5'UTR が連結された *FLUC* mRNA、及び *FLUC* に連結された 5'UTR の由来である内在性 mRNA のポリソームプロファイルを示した。(図 18 及び 19)。

結果、熱ストレス下では翻訳が抑制/塩ストレス下では翻訳が維持される At1g09970.1 や At5g13180.1 の 5'UTR を連結した *FLUC* mRNA は、内在性 At1g09970.1 及び At5g13180.1 mRNA と同様に、熱ストレス下と比較して、塩ストレス下では翻訳が維持される挙動を示した(図 18 及び 19)。ここで、これら mRNA は塩ストレス下で翻訳が維持される *IAA1* mRNA や抑制される *ACT2* mRNA と比較して中間的な挙動を示したが、この結果は、ゲノムワイドに各 mRNA のストレスに応答した翻訳状態変化を解析した結果(Δ PS)と相関するものであった。また、用いた細胞から mRNA を精製し、再度 5'RACE 解析をすることで、35S プロモーターから転写された At1g09970.1 5'UTR::*FLUC* mRNA の 5'末端が内在性のものと同一であることを確認した。以上より、At1g09970.1 や At5g13180.1 の 5'UTR は、熱抑制/塩維持のストレス種特異的な翻訳状態に寄与し、熱抑制/塩維持のストレス種特異的な翻訳状態を規定する要因としての 5'UTR の重要性が示唆された。

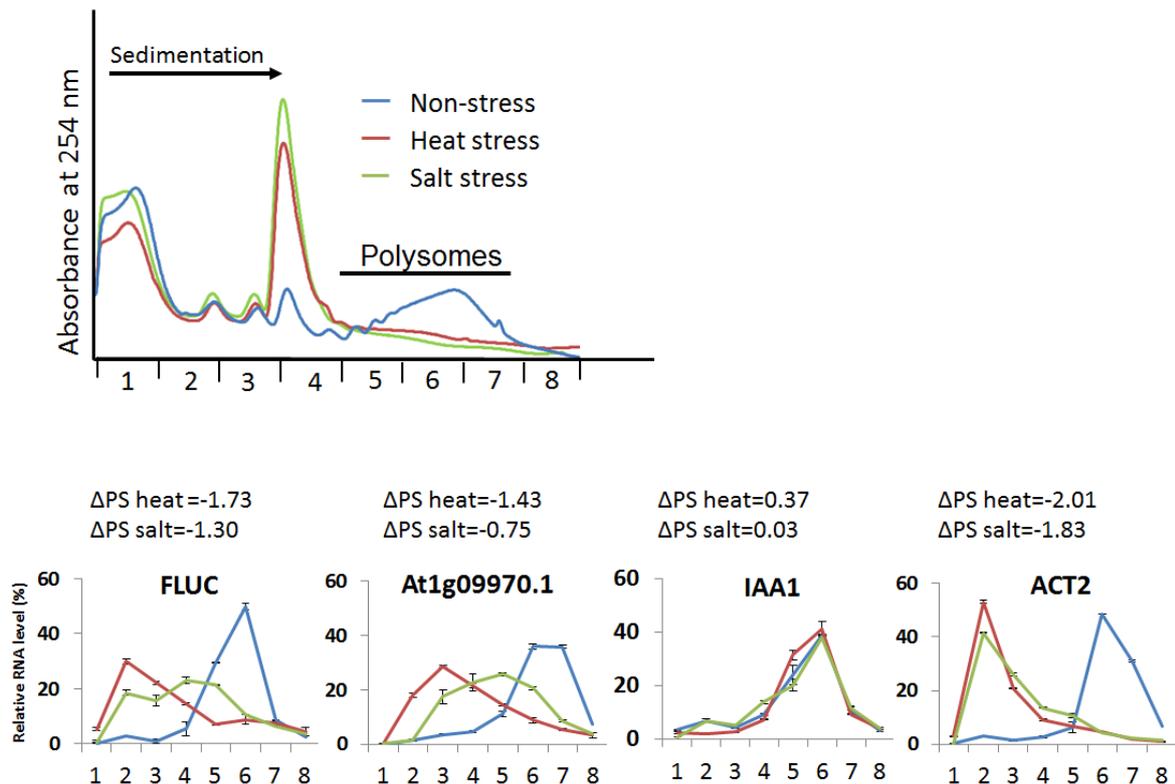


図 18 At1g09970.1 5'UTR::*FLUC*形質転換培養細胞における *FLUC* mRNA の挙動解析

熱ストレス処理(37°C 10分)、塩ストレス処理(200 mM NaCl 10分)、及び非ストレス処理条件の細胞それぞれ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、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。各画分から抽出したRNAを等容量ずつ定量RT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt1g09970.1 mRNAの5'UTRを連結した*FLUC*、内在性At1g09970.1、*IAA1*及び*ACT2* mRNAを定量した。縦軸は各画分に存在するそれぞれのmRNA量を全画分に対する割合で表記している。画分1-3を非ポリソーム画分、画分5-7をポリソーム画分とし、ポリソーム画分の非ポリソーム画分に対するmRNAの割合を ΔPS として算出した。

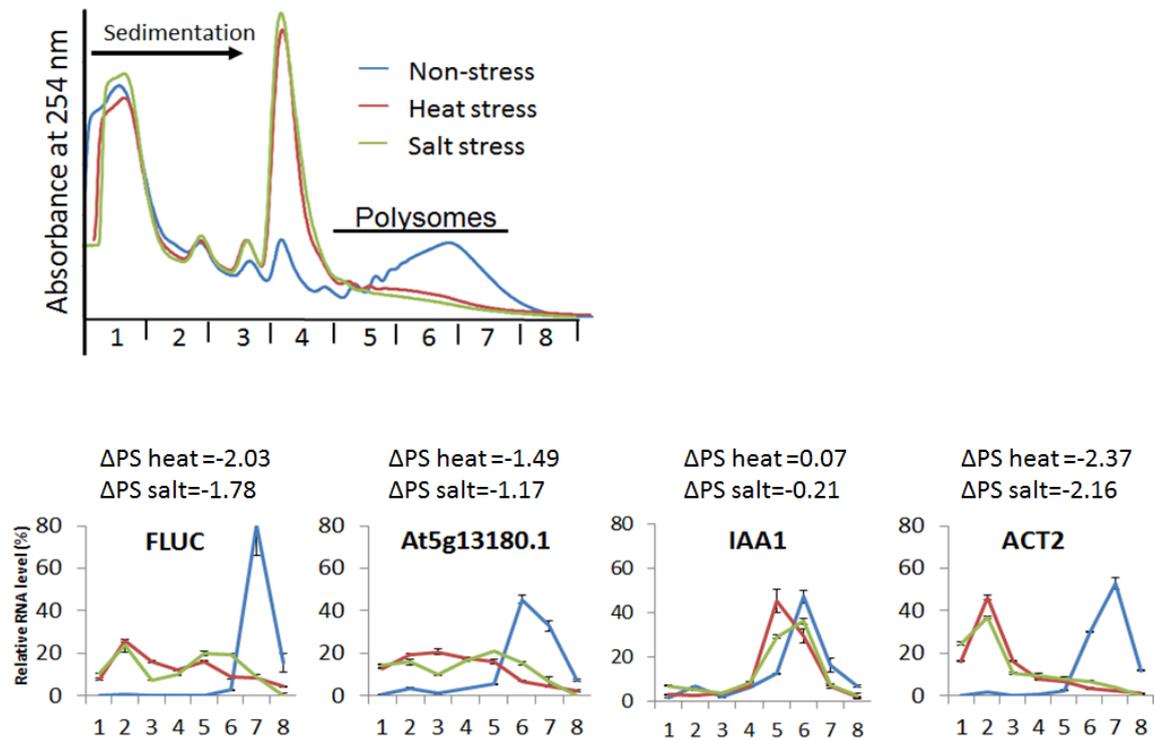


図 19 At5g13180.1 5'UTR::*FLUC*形質転換培養細胞における *FLUC* mRNA の挙動解析

熱ストレス処理(37°C 10分)、塩ストレス処理(200 mM NaCl 10分)、及び非ストレス処理細胞それぞれ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、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。各画分から抽出したRNAを等容量ずつ定量RT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt5g13180.1 mRNAの5'UTRを連結した*FLUC*、内在性At5g13180.1、*IAA1*及び*ACT2* mRNAを定量した。縦軸は各画分に存在するそれぞれのmRNA量を全画分に対する割合で表記している。画分1-3を非ポリソーム画分、画分5-7をポリソーム画分とし、ポリソーム画分の非ポリソーム画分に対するmRNAの割合を ΔPS として算出した。

2-3-5. ゲノムワイド解析-5'UTR に CT 反復及び CT rich 領域を有する mRNA の翻訳状態変化

形質転換体を用いた解析より、ストレス種特異的な翻訳状態変化を規定する要因としての 5'UTR の重要性が示された。用いた 5'UTR 内に、ストレス種特異的な翻訳状態変化を規定する制御配列が存在すると考えられる。また、熱抑制/塩維持という翻訳の挙動を示す候補 mRNA の 5'UTR に限定すると、CT 反復という共通性が認められた。例えば、At1g09970.1 5'UTR 内(148 塩基)には、5'末端から数えて 22~74 塩基に 13×CT 反復が認められた。また、At5g13180.1 5'UTR 内(67 塩基)には、5'末端から数えて 9~67 塩基の間に 4×CT 反復及び CT rich 領域が認められた。このことから、5'UTR 内に存在する CT 反復領域や CT rich 領域が、熱抑制/塩維持というストレスの種類に特異的な翻訳状態変化に関係している可能性が考えられた。もし、CT 反復領域等が翻訳制御に関わる制御配列ならば、ゲノムワイド解析においても、同様の傾向が認められると考えられた。そのため、次に CAGE 解析によって転写開始点(5'UTR)を網羅的に同定し、得られたデータを用いて、5'UTR 内に CT 反復領域等を有する mRNA のストレスに応答した翻訳状態変化を網羅的に解析した。

CAGE 解析の詳細は後述するが、解析対象とした mRNA は、以下の条件を満たしたものである(n=5292)。①CAGE タグが 5'UTR 内に存在した。②タグ数が 10 以上(10 Tag Per Ten Million)であった。③転写開始点の収束率が 30%以上であった。④最も頻度の高い転写開始点が HS、SS、及び非ストレス処理サンプル間で同一であった。⑤対応するマイクロアレイデータ(トランスレイトーム)が存在する。CT を 1 単位とした反復を 5'UTR 内に有する mRNA をゲノムワイドに複数の条件で検索すると、最低でも 8 反復有する mRNA は 67 個、16 反復を有する mRNA は 6 個存在した。また、形質転換体を用いた評価で用いた 5'UTR の中には、CTCTCTTCT のように CT が完全には反復しない CT rich 領域が存在するが、これら 5'UTR は先の検索条件では抽出できていなかった。そのため、C もしくは T が 16 又は 32 個連続するものを検索条件に加えた。16 連続以下の検索条件では、該当する mRNA の数が非常に多かった。結果、C もしくは T の連続を 16 有する mRNA が 815 個、32 有する mRNA が 59 個認められた。以上の各条件に該当する mRNA の ΔPS の分布を示し(図 20)、 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} の中央値を用いて mRNA を ΔPS を用いて 4 つの象限に分類した場合における、全 mRNA に対する ΔPS の偏りの有無を χ 二乗独立性の検定により解析した(図 21A、B)。例えば、CT×8 を有する 67 個の mRNA を 4 つの象限に分類し(図 21B、C)、全 mRNA の各象限における分布(期待値)との差で χ 二乗独立性の検定を行うことで(図 21D、E)、CT×8 を有する mRNA がストレス下に応答してどのような翻訳状態変化をとるのかを調べた。結果、CT×16 を除く 3 条件において、統計的な有意性が確認された。CT×16 については、統計的な有意性は認められな

かったが、その ΔPS 分布の偏りは顕著に表れていた。この原因として、検定を行う上での CT×16 を有する mRNA の数の少なさが挙げられた。4 条件それぞれで、第 2 象限に属する mRNA の割合が増加する傾向が認められた。さらに、CT rich を有する mRNA よりも、CT 反復を有する mRNA の方が、この傾向が顕著に表れていた。加えて、5'RACE 法で確認された 5'UTR の中には、CT rich 領域の中に G や A が数塩基含まれるものも存在していた。そこで、C もしくは T の 32 連続の中、1 塩基の G もしくは A を許容した場合についても同様の解析を行った(図 22)。結果、1 塩基の G もしくは A を許容した場合においても、分布に偏りが認められた。反対に、対比として用いた G or A ×32 を 5'UTR 内に有する mRNA の分布に偏りは認められなかった。これらの結果は、5'UTR 内の CT 反復もしくは CT rich 領域が、熱抑制/塩維持というストレス種特異的な翻訳状態変化に寄与する制御配列である可能性を示していた。

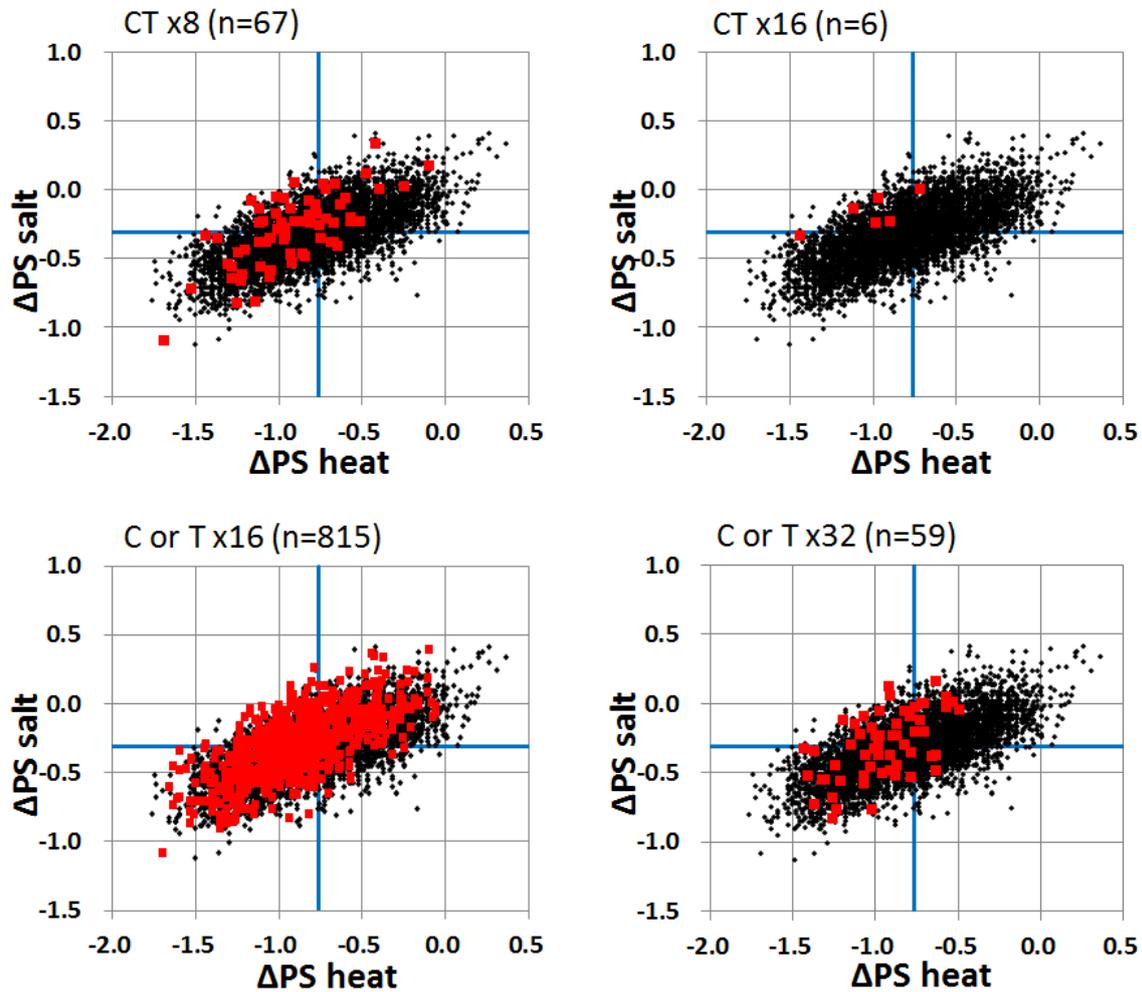


図 20 5'UTR に CT 反復もしくは CT rich 領域を有する mRNA のストレスに応答した翻訳状態変化

CAGE 解析結果より、5'UTR 内に CT 反復もしくは CT rich 領域を有する mRNA を同定し、それらと全 mRNA のストレス応答した翻訳状態変化(ΔPS)の分布を示した。CT \times 8,16(CT の反復を少なくとも 8 もしくは 16 有する)、C or T \times 16, 32(C もしくは T の連続を少なくとも 16 もしくは 32 有する)の各条件に該当する mRNA を図中赤で示している。横軸は熱ストレスに応答した翻訳状態変化の指標(ΔPS_{heat})、縦軸は塩ストレス応答した翻訳状態変化の指標(ΔPS_{salt})を示している。

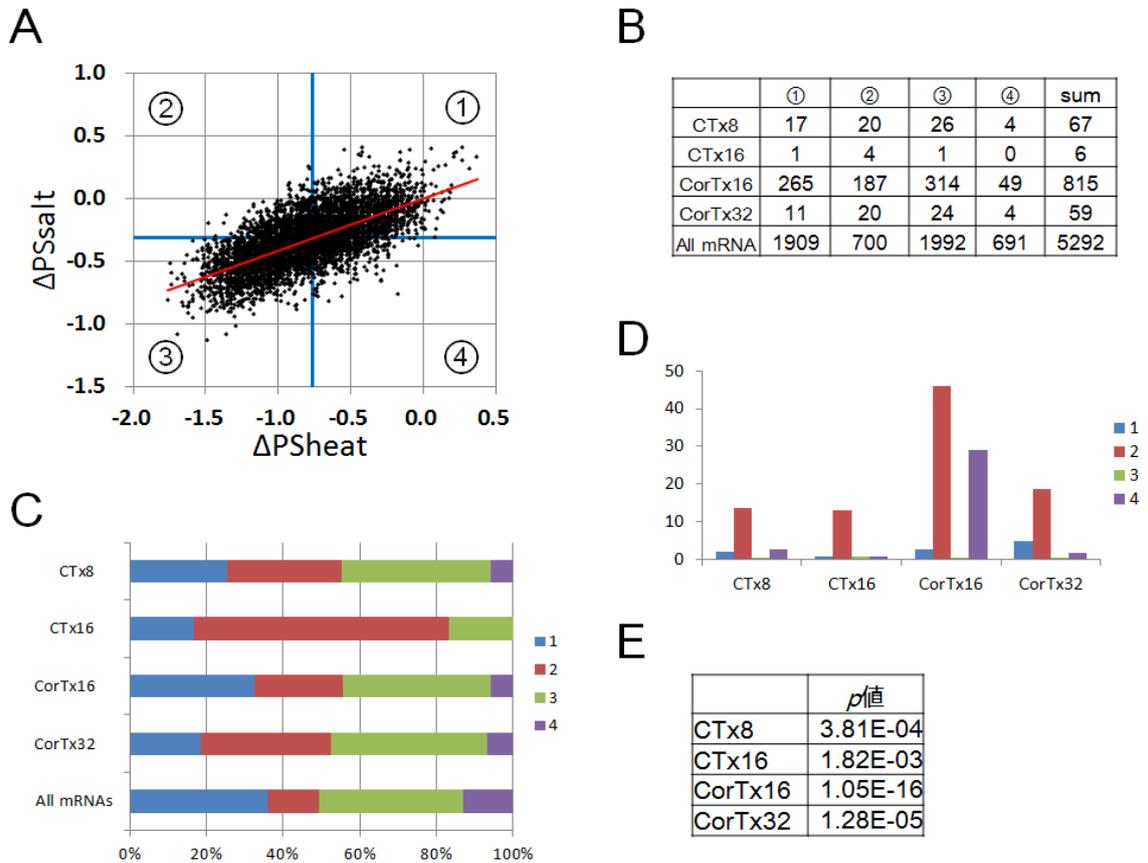


図 21 図 17 の結果に基づく χ 二乗独立性の検定

(A) ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} それぞれの平均値を用いて全 mRNA を象限に分類した。
 (B) 各象限に含まれる候補 mRNA 数を検索条件別に示した。(C) 各象限に含まれる候補 mRNA の比率を、全 mRNA の分布の比率(期待値)と共に示した。(D) 象限別の観測値と期待値のずれを示す。(E) 観測値と期待値を用いた χ 二乗独立性の検定結果を示す。

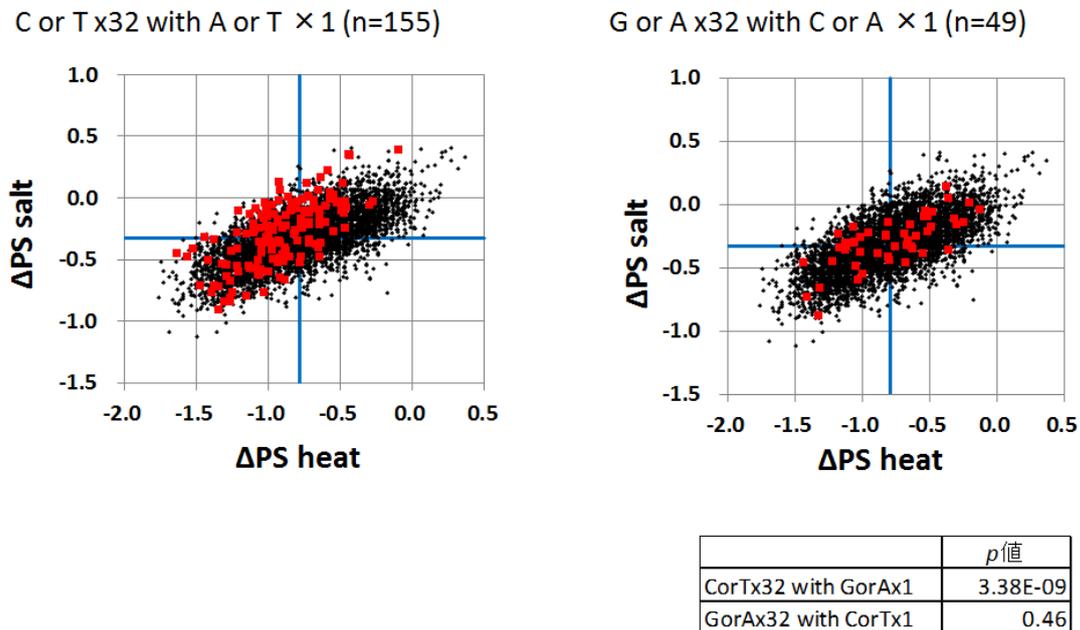


図 22 5'UTR に CT rich 領域もしくは GA rich 領域を有する mRNA のストレスに
 応答した翻訳状態変化

CAGE 解析より同定された 5'UTR 内に CT rich 領域を有する mRNA を同定し、それらと全 mRNA のストレス応答した翻訳状態変化(ΔPS)の分布を解析した。図中赤で示された mRNA は、C もしくは T を少なくとも 32 有し、その内 1 塩基の A もしくは T を許容されたものである。また、対比として CT rich の代わりに GA rich を有する mRNA の分布を示した。各検索条件に該当する mRNA 数を表示し、それらの ΔPS の分布を赤で示す。また、分布の偏りを χ^2 二乗独立性の検定により解析した

2-3-6. At1g09970.1 部分 5'UTR(CT 反復領域)をレポーター遺伝子に連結した mRNA を発現する形質転換体を用いた翻訳状態変化の解析

5'UTR 内に CT 反復領域を有する mRNA は、熱ストレス下で抑制され塩ストレス下で維持される傾向にあることが網羅的な解析から示された。次に、CT 反復が熱抑制/塩維持のストレス種特異的な翻訳制御に寄与しているのか調べるため、キメラ 5'UTR を連結したレポーター遺伝子が発現する形質転換体を用いた解析を行った。具体的には、2-3-4 で使用した At1g09970.1 5'UTR を CT 反復部分とその上流と下流の 3 つに分割し、それぞれを mRNA の 5'末端からの長さを基準に対応する ACT2 5'UTR と置換したキメラ 5'UTR を作製した(表 4)。さらにキメラ 5'UTR を *FLUC* 遺伝子と連結したバイナリーベクターを、それぞれシロイヌナズナ培養細胞 T87 に導入した形質転換培養細胞を用いてポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行った。2-3-4 と同様に、*IAA1* 及び *ACT2* mRNA のポリソームプロファイルを解析し、またストレスに応答した翻訳状態変化の指標である ΔPS より、各形質転換細胞がストレス下にあることを確認した。キメラ 5'UTR①を連結した *FLUC* mRNA は、熱及び塩ストレス処理後による非ポリソーム画分へ移行が認められ、2 種のストレス下では共通して翻訳が抑制されることが示された(図 23)。一方で、キメラ 5'UTR②やキメラ 5'UTR③を連結した *FLUC* mRNA は、内在性 At1g09970.1 mRNA と類似した挙動を示した。(図 24 及び 25)。キメラ 5'UTR②は At1g09970.1 5'UTR に特徴的な 13×CT 反復領域を有し、キメラ 5'UTR③にも開始コドン近傍に CT rich 領域が存在する(表 4)。これらの結果は、5'UTR 内の CT 反復もしくは CT rich 領域が塩ストレス特異的に mRNA の翻訳状態を規定する因子である可能性を示していた。

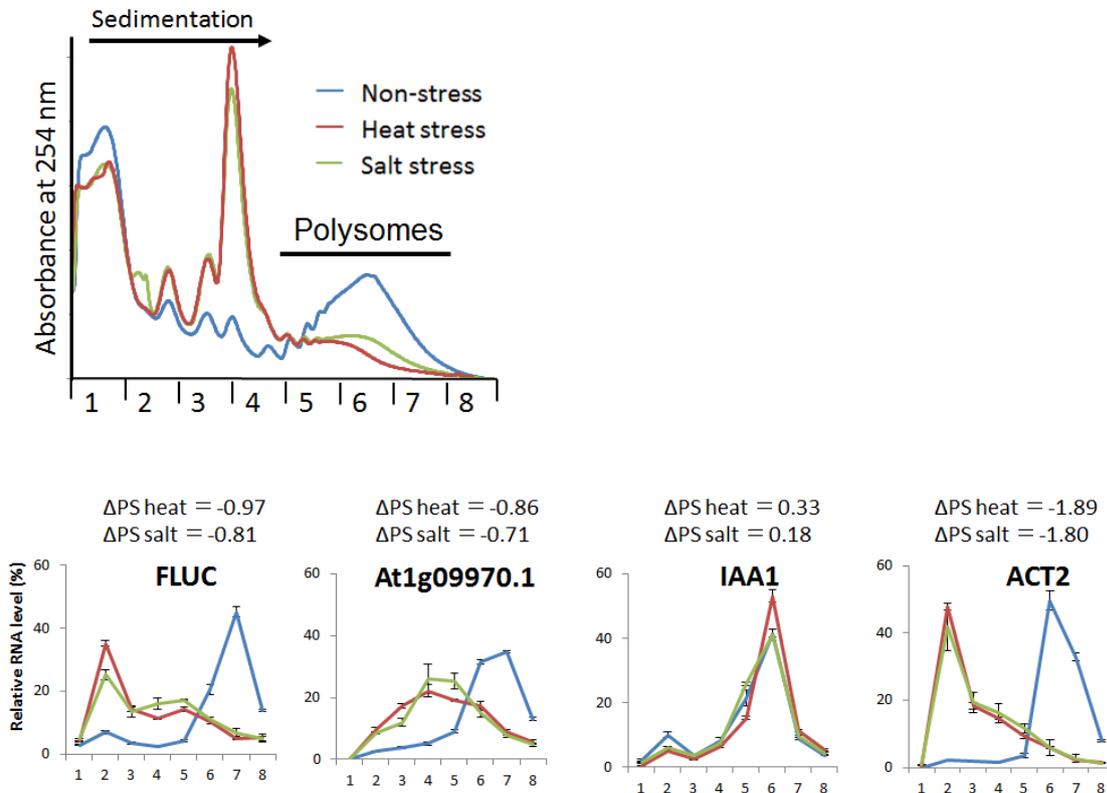


図 23 キメラ 5'UTR①::*FLUC*形質転換培養細胞における *FLUC* mRNA の挙動解析
 熱ストレス処理(37°C 10分)、塩ストレス処理(200 mM NaCl 10分)、及び非ストレス
 条件の細胞それぞれから調製した抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画した後、
 RNA の分布を見積もるために 254 nm の吸光プロファイルを記録した。各画分から抽
 出した RNA を等容量ずつ定量 RT-PCR 解析に供し、各画分に存在するキメラ 5' UTR
 ①(表 4)を連結した *FLUC*、内在性 *At1g09970.1*、*IAA1* 及び *ACT2* mRNA を定量し
 た。縦軸は各画分に存在する mRNA 量の全画分に対する割合を示している。画分 1-3
 を非ポリソーム画分、画分 5-7 をポリソーム画分とし、ポリソーム画分の非ポリソ
 ーム画分に対する mRNA の割合を ΔPS として算出した。

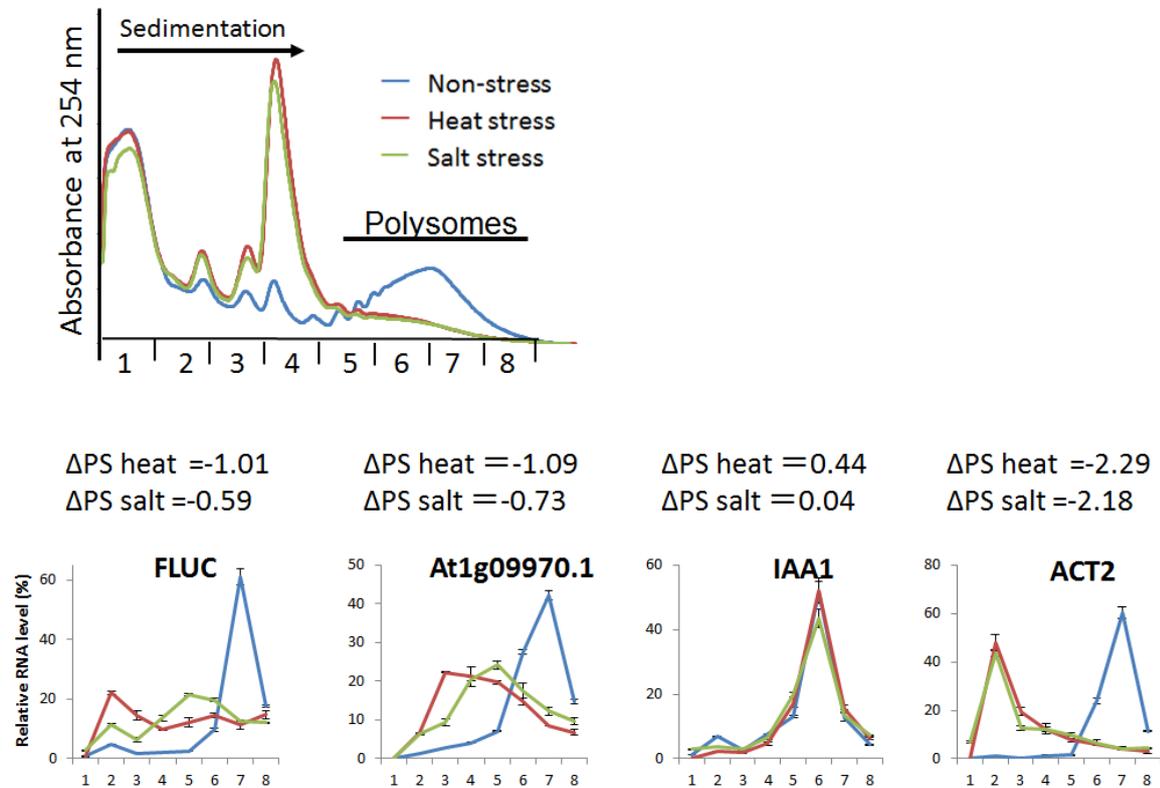


図 24 キメラ 5'UTR②::*FLUC*形質転換培養細胞における *FLUC* mRNA の挙動解析
 熱ストレス処理(37°C 10分)、塩ストレス処理(200 mM NaCl 10分)、及び非ストレス
 件の細胞それぞれから調製した抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画した後、RNA
 の分布を見積もるために 254 nm の吸光プロファイルを記録した。各画分から抽出し
 た RNA を等容量ずつ定量 RT-PCR 解析に供し、各画分に存在するキメラ 5' UTR②
 を連結した *FLUC*(表 4)、内在性 *At1g09970.1*、*IAA1* 及び *ACT2* mRNA を定量した。
 縦軸は各画分に存在する mRNA 量の全画分に対する割合を示している。画分 1-3 を非
 ポリソーム画分、画分 5-7 をポリソーム画分とし、ポリソーム画分の非ポリソーム画
 分に対する mRNA の割合を ΔPS として算出した。

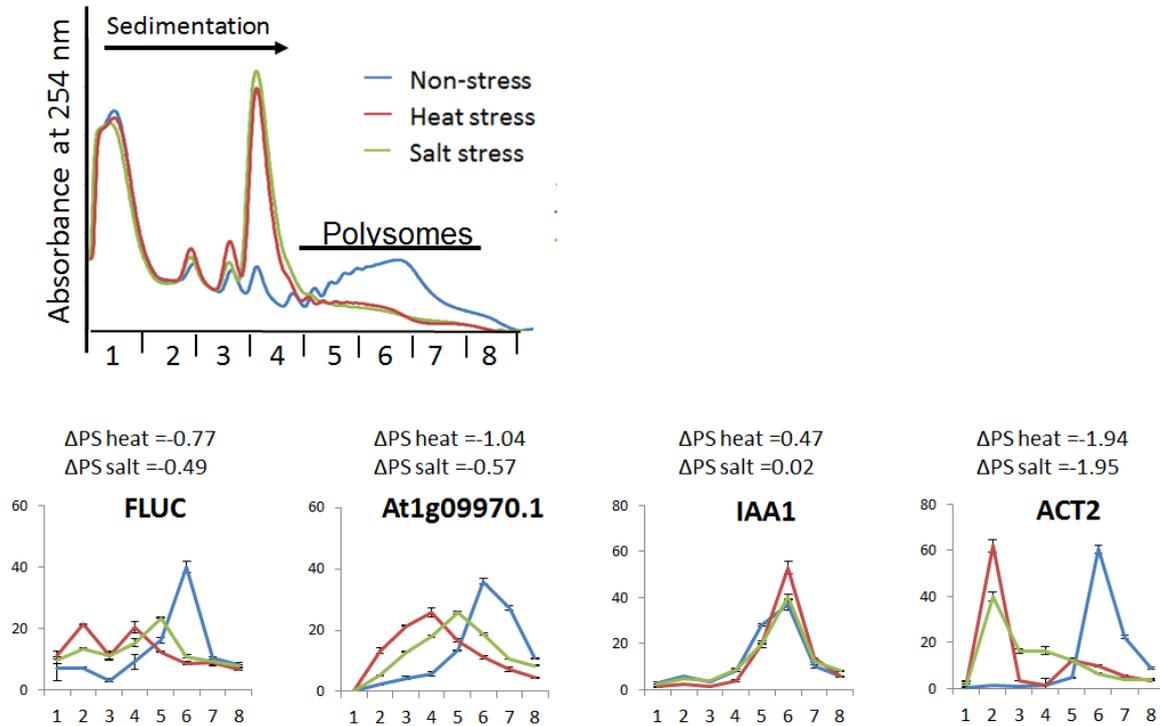


図 25 キメラ 5'UTR③::*FLUC*形質転換培養細胞における *FLUC* mRNA の挙動解析
 熱ストレス処理(37°C 10分)、塩ストレス処理(200 mM NaCl 10分)、及び非ストレス
 条件の細胞それぞれから調製した抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画した後、
 RNA の分布を見積もるために 254 nm の吸光プロファイルを記録した。各画分から抽
 出した RNA を等容量ずつ定量 RT-PCR 解析に供し、各画分に存在するキメラ 5' UTR
 ③を連結した *FLUC*(表 4)、内在性 *At1g09970.1*、*IAA1* 及び *ACT2* mRNA を定量し
 た。縦軸は各画分に存在する mRNA 量の全画分に対する割合を示している。画分 1-3
 を非ポリソーム画分、画分 5-7 をポリソーム画分とし、ポリソーム画分の非ポリソ
 ーム画分に対する mRNA の割合を ΔPS として算出した。

2-3-7. ストレスに応答した転写開始点変化の網羅的解析(CAGE 解析)

5'RACE 解析結果より、大部分の mRNA 種について、シーケンスで確認された 5'UTR は、ストレス及び非ストレス処理細胞間で同一であった。しかし、一部 mRNA 種については、ストレス処理前後の細胞で 5'UTR の長さが異なっていた (表 8 には記されていない)。この結果は、ストレスに応答して一部遺伝子の転写開始点に変化している可能性を示唆するものであった。ストレスに応答して転写開始点に変化する遺伝子についての報告は存在するものの、その意義については不明な点が多く残っている (Mitschke et al., 2011)。一方で、植物細胞では環境ストレス下における mRNA の翻訳状態を決定する重要領域が 5'UTR の 5'末端に存在と示されている。そのため、ストレス下での翻訳状態を決定する要因の 1 つに、ストレスに応答した転写開始点の変化が挙げられるのではないかと考えた。例えば、ストレス種依存的に転写が強く誘導され、かつ転写開始点に変化する遺伝子ならば、細胞内に存在する mRNA の大部分は転写開始点の変化後に対応する 5'UTR を有するものとなる。この場合、ストレス下における翻訳状態を決定する 5'UTR の 5'末端の配列が、ストレス種間で異なるため、特定のストレスに応答した転写開始点の変化が、ストレス種特異的な翻訳状態変化の要因である可能性が考えられた。以上の仮説を検証するためには、ストレスに応答して転写開始点に変化する mRNA 種と、変化前後の 5'UTR の厳密な同定が重要となる。前述の 5'RACE 解析より転写開始点が変わるストレスに反応して変化する遺伝子の存在が示され、そのシーケンスより確認された mRNA の長さは様々であったが、リード数を増加させることにより 1 点に収束する傾向が認められた。そのため、転写開始点の変化を解析するためには、より多くのリード数を得られる解析手法が望ましいと考え、次世代シーケンサーを応用した転写開始点の網羅的同定手法である CAGE 法 (Cap Analysis Gene Expression) を行った (Kodzius et al., 2006)。

本解析では、染色体コードの遺伝子のみを対象にしており、CAGE ライブラリーを用いたシーケンス解析結果から、シロイヌナズナの公共データベースである TAIR10 の情報に従ってマッピングされた遺伝子数は 30322 個であった。TAIR10 では、いくつかの遺伝子についてスプライスバリエーション等の mRNA バリエーションが登録されている。この内、CDS 以降におけるバリエーションは 5'UTR のタグ情報では区別がつかないため、解析対象から除外した。残った 25126 遺伝子について、2 反復実験の比較を行った (図 26)。比較には各遺伝子についてマッピングされたタグ数の合計値を用い、比較結果より、すべてのサンプル間で 2 反復の間に高い相関が認められた (図 26)。以降の解析には、2 反復の平均値を用いている。次に、ATG 以降 (CDS など) に該当するタグの全体に占める割合を調べた。これらの mRNA は、TAIR10 で示された開始コドンより下流より転写が開始されている。大部分の遺伝子は TAIR10 で示される 5' UTR に対応する DNA 領域から転写されていたが、一部コー

ディング領域から転写される割合が高い遺伝子が存在した(図 27)。このようなデータベースと本解析で用いた細胞間で、開始コドンを跨いで転写開始点異なる遺伝子が存在する理由は不明だが、データベースで示されている開始コドン以降から転写が始まる割合が 10% を超える遺伝子は少数であり、他方に網羅的解析を行うには十分な遺伝子数が存在するため、これらは以後の解析より除外した。また、残った遺伝子についても ATG 以降から転写されているタグを除外した。次に、タグ数より各遺伝子の蓄積転写産物量をゲノムワイドに解析したところ、蓄積転写産物量は各条件共に正規様分布を示すが、タグ数が非常に少ない遺伝子は正規様分布に従わないことが示された(図 28)。これらの遺伝子は、他に比べて存在量が極めて少なく、また、得られた結果の信頼性に乏しいと考えられた。そのため、各条件でタグ数が 10 以下の遺伝子を除外した。最後に、翻訳状態変化の指標である ΔPS (ΔPS_{heat} と ΔPS_{salt}) が存在している遺伝子のみを抽出し、以降の解析に用いた。最終的な解析対象となる遺伝子数は、13026 個となった。

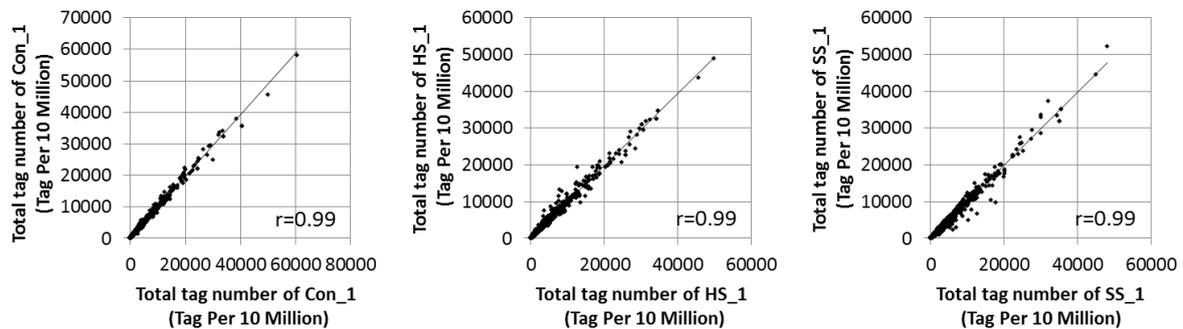


図 26 CAGE 解析における 2 反復実験の相関

Con, 非ストレス処理、HS, 熱ストレス処理、SS, 塩ストレス処理の 3 条件のサンプルを材料に行った 2 反復の CAGE 解析を行った。2 反復の比較結果を 25126 の遺伝子について示している。表示されたタグ数は、10 million リードあたりの相対値として示している。

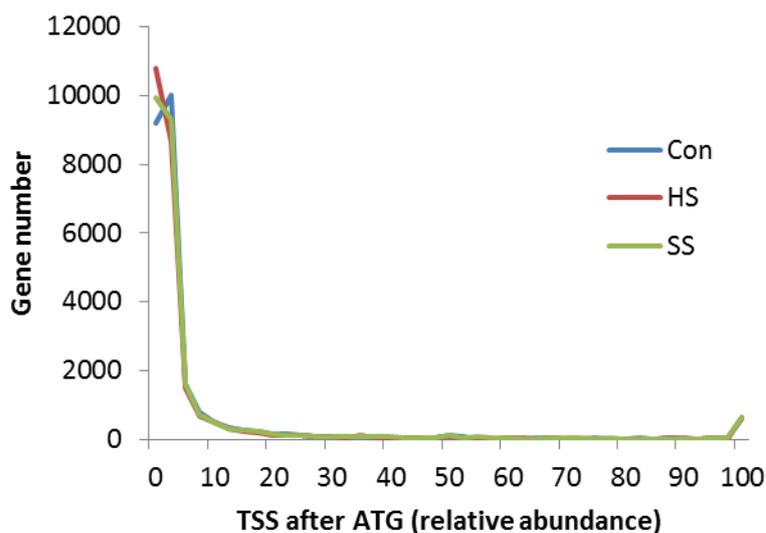


図 27 開始コドン下流に転写開始点(TSS)が存在する割合

TAIR10 の情報を基に各 mRNA の開始コドンを決定し、開始コドンより下流から転写が行われた mRNA の割合を各遺伝子について算出した。Con,非ストレス処理、HS,熱ストレス処理、SS,塩ストレス処理細胞由来の解析結果。

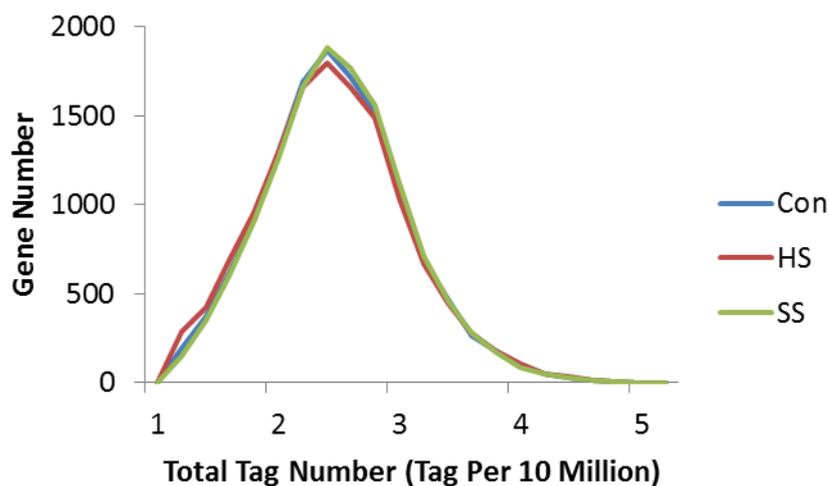


図 28 蓄積転写産物量の分布

Con,非ストレス処理、HS,熱ストレス処理、SS,塩ストレス処理の 3 条件のサンプルを材料とした CAGE 解析より得られたタグ数(各遺伝子の発現量)の分布を示す。縦軸に遺伝子数を、横軸にタグ数を対数表記で示した。

次に、最も出現頻度が高い転写開始点の全体に対する比率を示すことで、転写開始点の分散の程度を解析した(図 29A)。結果、転写開始点が一塩基に収束している遺伝子や、幅広く分散する遺伝子等、転写開始点の分散率は遺伝子間で多様であることが示された。収束率が高い遺伝子と低い遺伝子の転写開始点分布の一例を示す(図 29B、C)。

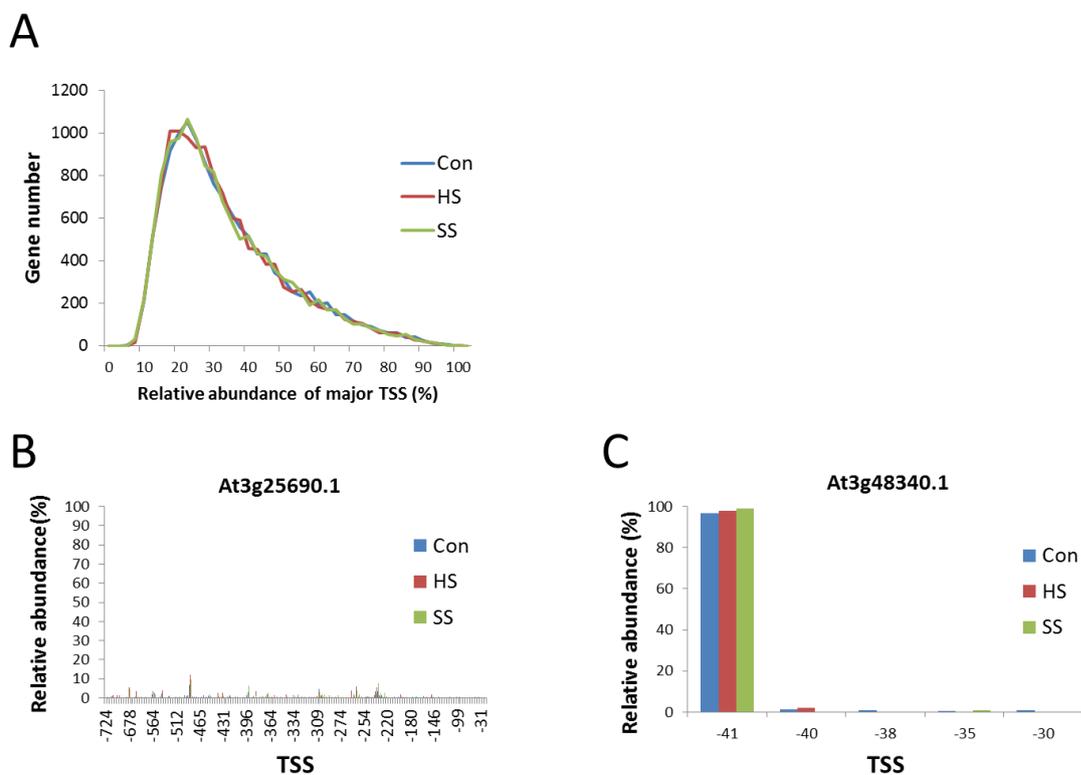


図 29 転写開始点の収束率

CAGE 解析結果より、各遺伝子について最も出現頻度の高い転写開始点(TSS)の全転写開始点に対する割合を算出し、その分布をゲノムワイドに示した(A)。各ストレス条件で転写開始点の収束率が 7-12%(B)、及び 98-99%(C)を示した遺伝子の転写開始点の分布の一例を示す。横軸は開始コドンからの距離(nt)を示し、縦軸は各転写開始点に対応するタグの全体に対する相対値として示している。Con,非ストレス処理、HS,熱ストレス処理、SS,塩ストレス処理

次に、ストレスに応答した転写開始点の変化の指標である Δ transcription start site(Δ TSS) を算出した。多くの遺伝子の転写開始点は分散する傾向が認められたため(図 29)、 Δ TSS は各転写開始点の総リード数に対する相対値を求め、ストレス処理前後のサンプル間における各転写開始点の差の絶対値の合計として、以下の式に従って算出した(図 30A)。

$$\sum_{i=1}^n |\text{RatioCon}_i - \text{RatioHS}_i|$$

Δ TSS は 0 から 2 までの値を示し、数値が低いほどストレスで転写開始点が変わらない、また数値が高いほどストレスで転写開始点が変わったことを意味する。ゲノムワイドに Δ TSS を熱ストレス処理、塩ストレス処理、熱-塩ストレス間の 3 条件で比較したところ、各 Δ TSS の分布に違いは認められなかった(図 30B)。この結果は、本解析に用いたストレス条件では、ストレスに反応した転写開始点の変化は、ゲノム全体として大規模に生じる現象ではないことを示唆していた。また、 Δ TSS 値が高い mRNA 及び低い mRNA の転写開始点の分布を個別に解析したところ、 Δ TSS の値と実際の転写開始点のストレスによる分布変化の間に相関が認められ、このことから、ストレスに反応して転写開始点が変わる遺伝子の選抜の指標として、 Δ TSS は有用であると考えた(図 30C 及び D)。

次に、 Δ TSS が高い値(0.8 以上)を示し、かつ χ^2 二乗独立性の検定により優位に転写開始点が変わっている遺伝子($p < 0.01$)を選抜し($n=55$)、これらのストレスに反応した翻訳状態変化を解析した(図 31)。図 21 と同様の手法で 55 mRNA の Δ PS の分布の偏りを解析したところ、全 Δ PS の分布に対して、第 1 及び第 2 象限に属するものの割合が高く、第 3 象限に属するものの割合が低くなる傾向を示すものの、全体としては、全象限に分散することが示された。この結果より、ストレス種特異的な転写開始点の変化は、かならずしもストレス種特異的な翻訳状態変化に影響するわけではないが、一方で、ストレスに反応して転写開始点が変わる遺伝子には、その mRNA がストレス種特異的な翻訳状態変化を示すものが含まれていることを示された。特に、55 個の mRNA の大部分は、熱ストレスのみに反応して転写開始点が変わる特徴が認められ、このような mRNA は、熱ストレスに反応した転写開始点の変化による 5'UTR 内の重要領域の位置変化が、ストレス種特異的な翻訳状態変化の要因であると考えられた。そのため、55 個の候補遺伝子から、熱ストレスに反応して蓄積転写産物量が劇的に増加し、熱ストレスのみに反応して転写開始点が変わり、変化前後の転写開始点のピークが明確であり(収束率が 20%以上、図 29)、ストレス種特異的な翻訳状態変化を示す 6 遺伝子を選抜し(表 9)、5'UTR を用いた一過性発現実験にて、熱ストレス処理による転写開始点変化前後の 5'UTR の翻訳活性の評価を行った。ここで、先述の第 2 及び第 4 象限に含まれる mRNA に加えて、 Δ PS heat 及び Δ PS salt の比

較からストレス種特異的に翻訳状態が変化している可能性が考えられた *At1g70300.1* や *At3g08970.1* を解析対象とした。この 6 遺伝子には、*HSP70* 等の熱ストレス誘導性の遺伝子が含まれており、熱ストレスに応答して蓄積 mRNA 量が約 3~70 倍に増加する。また、6 遺伝子の Δ TSS(Con-SS)は 0.20~0.44 と平均的な値を示すのに対して、 Δ TSS(Con-HS)は 1.34~1.87 と相対的に高い値を示した(図 30B、表 9)。加えて、ストレス処理細胞間の転写開始点変化の指標である Δ TSS(HS-SS) が高い値を示したことから、6 遺伝子は、熱ストレスのみに応答して特に転写開始点が変わるものであることが示された。また、TSS の分布を個別に解析したところ、6 遺伝子の転写開始点は、非ストレス及び塩ストレス処理細胞間で分散が認められるものの、主要な転写開始点は同一であることが示された(図 32)。一方、熱ストレス処理細胞では、この非ストレス処理及び塩ストレス細胞における同一の転写開始点の下流に1つもしくは複数の転写開始点のピークが生じることが認められた。例えば、*At1g16010.1* は非ストレス処理及び塩ストレス処理細胞では、開始コドン上流 192 塩基に主要な転写開始点が認められるが、熱ストレス処理細胞では、開始コドン上流 82 及び 79 塩基に主要な転写開始点が認められた。一方で、 Δ PS より、6 遺伝子のストレスに応答した翻訳状態変化はストレス種特異的に変化しており、熱維持/塩抑制及び熱抑制/塩維持の両方の挙動を示すものが認められた(図 33、表 9)。

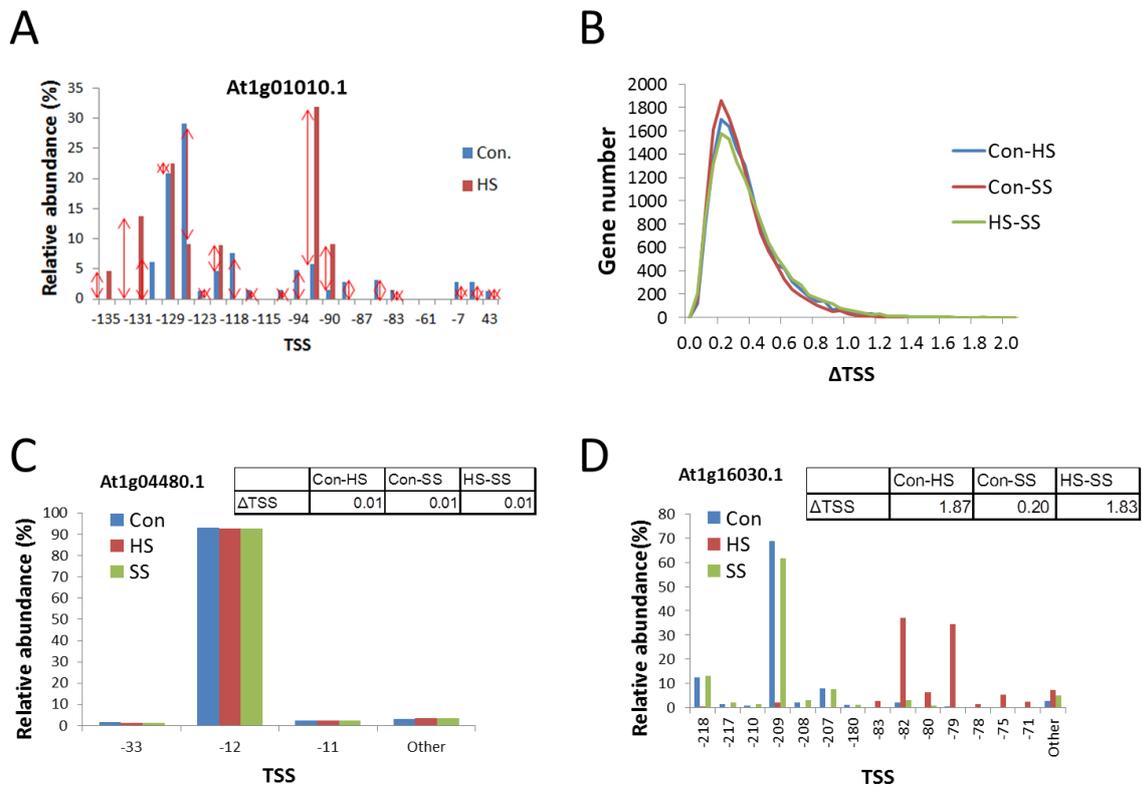


図 30 ストレスに応答した転写開始点の変化

(A) 各遺伝子のストレス(熱,HS もしくは塩ストレス,SS)もしくは非ストレス処理(Con)細胞における転写開始点には分散が認められるため、サンプル間における各転写開始点の差の絶対値の合計(赤矢印で示す)を、ストレスに応答した転写開始点の変化(Δ TSS)として算出した。(B) Δ TSS の分布、Con-HS 熱ストレス処理、Con-SS 塩ストレス処理に応答した転写開始点変化の指標、HS-SS 熱及び塩ストレス処理間における転写開始点の違いの指標。(C) Δ TSS 値が低い遺伝子(ストレス処理により転写開始点に変化しない遺伝子)の TSS の分布。(D) 熱ストレス処理の Δ TSS 値が高い遺伝子(ストレス処理により転写開始点に変化した遺伝子)の TSS の分布。

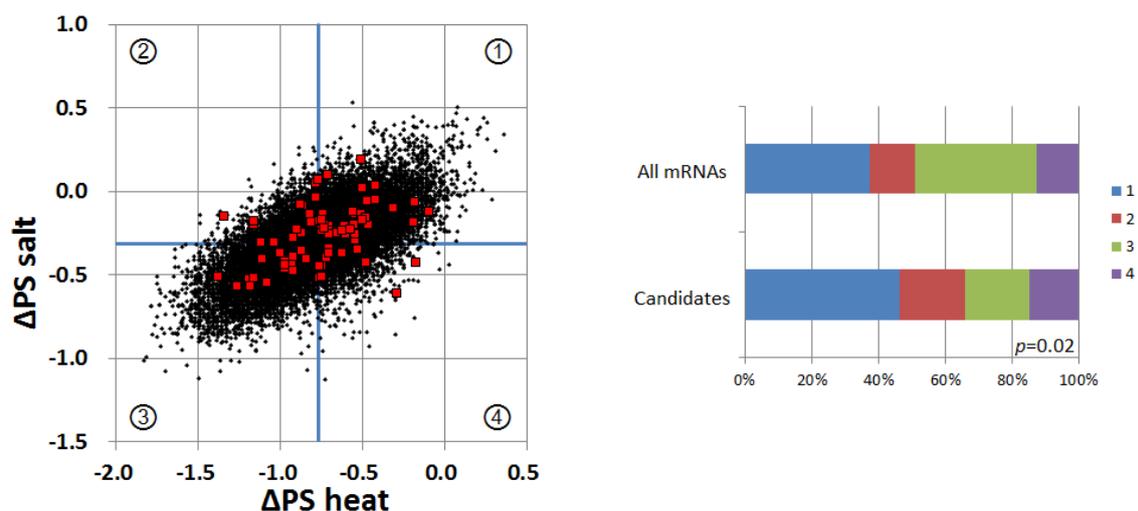


図 31 ストレスに応答して転写開始点に変化する候補 mRNA の ΔPS 分布

55 の候補 mRNA の ΔPS 分布を赤で示す。横軸は熱ストレスに応答した翻訳状態変化を示す指標、縦軸は塩ストレスに応答した翻訳状態変化を示す指標である。候補 mRNA について、図 19 と同様の χ^2 二乗独立性の検定を行い、各象限における ΔPS 分布の偏りを解析した。

Gene name	Tag number (Expression levels)			ΔTSS			ΔPS_{heat}	ΔPS_{salt}	5'UTR length		
	Con	HS	SS	Con-HS	Con-SS	HS-SS			Con	HS	SS
At1g16030.1 (<i>HSP70</i>)	118	4823	133	1.87	0.2	1.83	-0.09	-0.12	209	82	209
At1g53540.1 (<i>HSP17.6</i>)	232	13706	182	1.58	0.41	1.32	-0.17	-0.43	192	85	192
At3g08970.1 (<i>TMS1</i>)	65	1762	51	1.72	0.32	1.66	-1.16	-0.2	100	52	100
At1g70300.1 (<i>KUP6</i>)	37	96	44	1.51	0.44	1.56	-0.51	0.19	323	92	323
At2g46240.1 (<i>BAG6</i>)	300	21052	320	1.52	0.2	1.57	-0.77	0.07	284	171	284
At5g37340.1 (<i>ZPR1</i>)	121	796	157	1.34	0.21	1.37	-0.48	-0.43	398	337	398

表 9 5'UTR を用いた一過性発現実験に供した遺伝子群

熱ストレスに応答した転写開始点変化前後の 5'UTR を用いた一過性発現実験に供した遺伝子について、遺伝子名、総タグ数(mRNA 発現量)、 ΔTSS 、 ΔPS 、用いた 5'UTR の長さを示す。Con-HS 熱ストレス処理、Con-SS 塩ストレス処理に応答した転写開始点変化の指標、HS-SS 熱及び塩ストレス処理間における転写開始点の違いの指標。

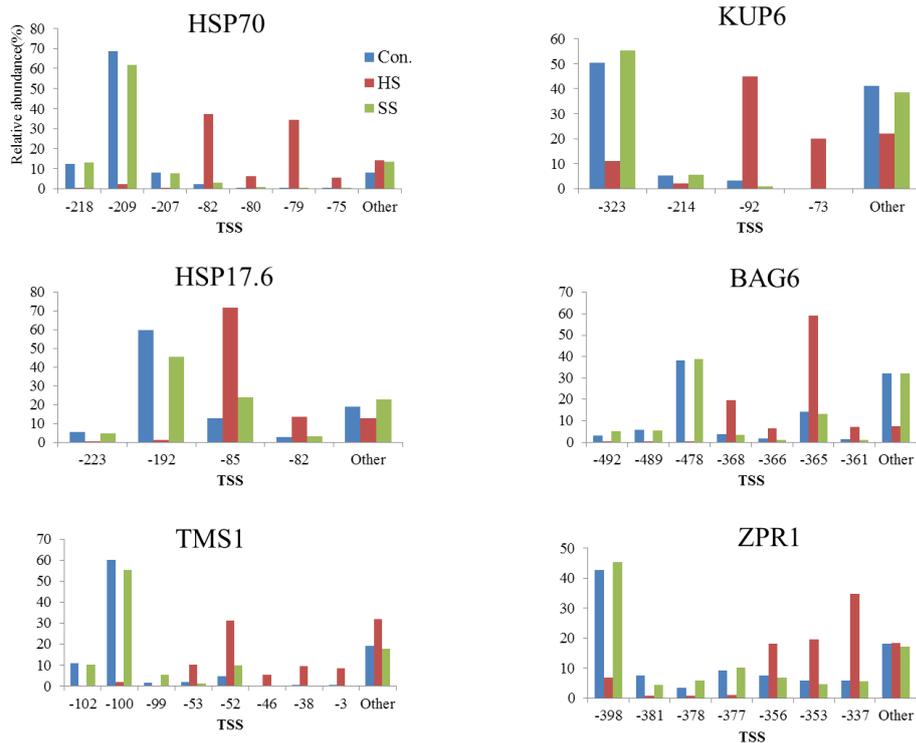


図 32 一過性発現実験に供した候補遺伝子の TSS の分布

縦軸は総タグ数に対する相対値を、横軸は開始コドンからの距離を示している。横軸の範囲は、TSS の主要なピークを示し、全体に対する出現頻度が 5%以下の TSS については、other に分類した。

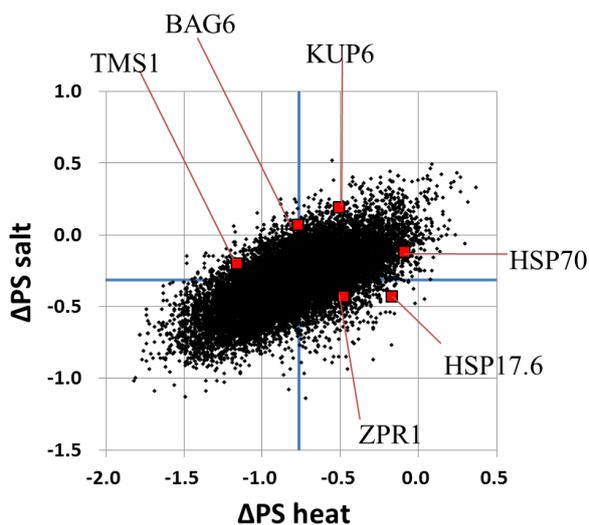


図 33 一過性発現実験に供した候補の ΔPS 分布

横軸は熱ストレスに応答した翻訳状態変化を示す指標 (ΔPS_{heat})。縦軸は塩ストレスに応答した翻訳状態変化を示す指標である (ΔPS_{salt})。 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} の中央値を用いて全 mRNA を 4 象限に分類し、表 9 で示された 6 遺伝子の ΔPS 分布を赤で示した。

2-3-8. 転写開始点変化の変化前後に対応する 5'UTR の各温度条件における翻訳活性

候補遺伝子の 5'UTR を連結した、cap 構造、ポリ A 配列を有する合成 *FLUC* mRNA を、コントロール RNA である cap 構造、ポリ A 配列を有する *RLUC* mRNA とプロトプラストに共導入し、通常条件 (22°C) 及び熱ストレス条件下 (37°C) に 20 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、37°C の 22°C に対する相対レポーター活性値を示した (図 34)。 *FLUC* mRNA からの発現量は、転写開始点変化前後の 5'UTR 間で異なり、一方、対照として共導入した *RLUC* mRNA からの発現量は、*FLUC* mRNA の種類に関わらず、熱ストレス処理によって一様に減少した。この *RLUC* の挙動は、各細胞は、確かにストレス下にあることを示していた。加えて、*FLUC* の挙動は、用いた 5'UTR の種類によって様々であり、このことより、ストレスに応答した転写開始点の変化は、mRNA の熱ストレス下での翻訳活性を変化させることが示された。

非ストレス処理及び熱ストレス処理の細胞間では、細胞全体としての翻訳活性が大きく異なり、特に熱ストレス下では翻訳が強く抑制される。熱ストレスに応答した転写開始点の変化による mRNA の翻訳活性の違いを、熱ストレスの有無の影響を加えて評価するために、熱ストレスに応答した転写開始点の変化前に対応する 5'UTR の 22°C における活性値と、変化後に対応する 5'UTR の 37°C における活性値の比較を行った (図 35)。この時、比較対象の 22°C 及び 37°C 温度処理を行った異なるサンプル間において、共導入した *RLUC* の活性値に大きな違いがないことを確認している。結果、*HSP70*、*HSP17.6*、*BAG6* の 5'UTR を連結した *FLUC* mRNA は、熱ストレスに応答して転写開始点が変わった結果、mRNA の翻訳活性が上昇することが示された。この結果は、これら mRNA は、転写開始点が変わることによって初めて熱ストレス下で生じる翻訳抑制を回避する能力を得ることを示唆していた。反対に、*TMS1* や *ZPR1* の 5'UTR を連結した *FLUC* mRNA は、熱ストレスに応答して転写開始点が変わった結果、熱ストレス下における翻訳活性が減少することが示された。この結果は、これら mRNA は、転写開始点が変わることで熱ストレス下において翻訳が抑制されやすくなることを示唆していた。なお、*KUP6* は、back ground 以下の *FLUC* 活性しか測定できなかったため除外している。以下、各遺伝子の挙動について個別に記載する。*HSP70* は、 ΔPS 分布 より第 4 象限に属するものの、 ΔPS より熱維持/塩抑制という翻訳の挙動を示す遺伝子である。つまり、熱ストレスに応答して転写開始点が変わることで、*HSP70* mRNA は初めて熱ストレス下での翻訳抑制を回避する能力を得ている可能性が考えられた。一過性発現実験結果より、熱ストレスに応答した転写開始点の変化後に対応する 5'UTR を連結した場合、変化前のものと比較して *FLUC* 遺伝子の発現は約 12 倍に上昇することが認められ、この結果は ΔPS と相関を示すものであった (図 35)。同様に、*HSP17.6*

mRNA は、 ΔPS 分布より第 4 象限に属し、熱維持/塩抑制という翻訳の挙動を示す遺伝子である。熱ストレスに応答して転写開始点が変わった結果、その mRNA は初めて熱ストレス下で翻訳が維持される能力を得ると想定された。結果、転写開始点の変化後に対応する 5'UTR を連結した場合、変化前の 5'UTR に比較した翻訳活性は約 2 倍に上昇することが認められ、この結果は ΔPS と相関を示すものであった(図 35)。TMS1 mRNA は、 ΔPS 分布より第 2 象限に属し、 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} より熱抑制/塩維持という翻訳の挙動の傾向を示す遺伝子である。そのため、TMS1 mRNA は、熱ストレスに反応した転写開始点の変化によって、その mRNA はストレス下で翻訳が抑制される可能性が考えられた。結果、転写開始点の変化後に対応する 5'UTR を連結した場合、変化前の 5'UTR に比較して翻訳活性が低下することが認められ、この結果は ΔPS と相関を示すものであった(図 35)。BAG6 mRNA は、TMS1 mRNA は、 ΔPS 分布より第 2 象限に属し、 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} より熱抑制/塩維持という翻訳の挙動の傾向を示す遺伝子である。そのため、TMS1 mRNA は、熱ストレスに反応した転写開始点の変化によって、その mRNA はストレス下で翻訳が抑制される可能性が考えられた。しかし、転写開始点の変化後に対応する 5'UTR を連結した場合、転写開始点の変化前に比較して翻訳活性が著しく上昇することが認められた。ZPR1 mRNA は ΔPS 分布より第 4 象限に属し、 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} より塩ストレスで翻訳が抑制され、熱ストレスでやや抑制が弱い挙動を示す遺伝子である。実際、 ΔPS_{heat} 及び ΔPS_{salt} をそれぞれ降順に上位、中位、下位に分類した場合、 ΔPS_{heat} は中位に属すが ΔPS_{salt} は下位に属する。そのため、ZPR1 mRNA は、熱ストレスに反応した転写開始点の変化によって、熱ストレス下での mRNA の翻訳は、初めてストレス下での翻訳抑制を緩和する能力を得ると想定した。一過性発現実験結果より、転写開始点の変化後に対応する 5'UTR の連結した場合、転写開始点の変化前に比較して翻訳活性が 1.2 倍に上昇することが認められ、この結果は、 ΔPS と相関するものであった。

また、熱ストレス細胞における複数の転写開始点の存在、つまり長さの異なる複数の 5'UTR が細胞内に共存している点に留意が必要と考えられた。例えば、ZPR1 には、開始コドン上流 356、353、337 塩基に転写開始点が存在した(図 32)。複数の転写開始点の存在は、他の候補遺伝子についても認められるが、本解析に用いた 5'UTR は、この内 1 種のみに対応するものであった。用いた 5'UTR に対応する転写開始点の場所と相対頻度は、それぞれ開始コドン上流、HSP70(82 塩基、40%)、HSP17.6(85 塩基、70%)、TMS1(52 塩基、30%)、BAG6(365 塩基、60%)、ZPR1 (337 塩基、35%)であった(図 32)。 ΔPS は、複数存在する転写開始点すべてに対応する mRNA のストレスに反応した翻訳状態変化の総和であり、候補遺伝子の中で相対頻度が最も高い HSP17.6 において ΔPS と一過性発現実験間の相関が示されたことから、今後、複数存在する転写開始点それぞれに対応する 5'UTR の熱ストレス下での翻

訳活性を測定する必要性が考えられた。以上の結果より、熱ストレスに応答した転写開始点の変化は、かならずしもストレス下における翻訳状態変化 (ΔPS) と相関するものではないが、熱ストレス下の翻訳活性を変化させる要因であることが示された。つまり、一部の遺伝子については、 ΔPS と一過性発現実験結果間に相関が認められ、このことより特定のストレスに応答した転写開始点の変化も、ストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する要因の 1 つである可能性が示された。

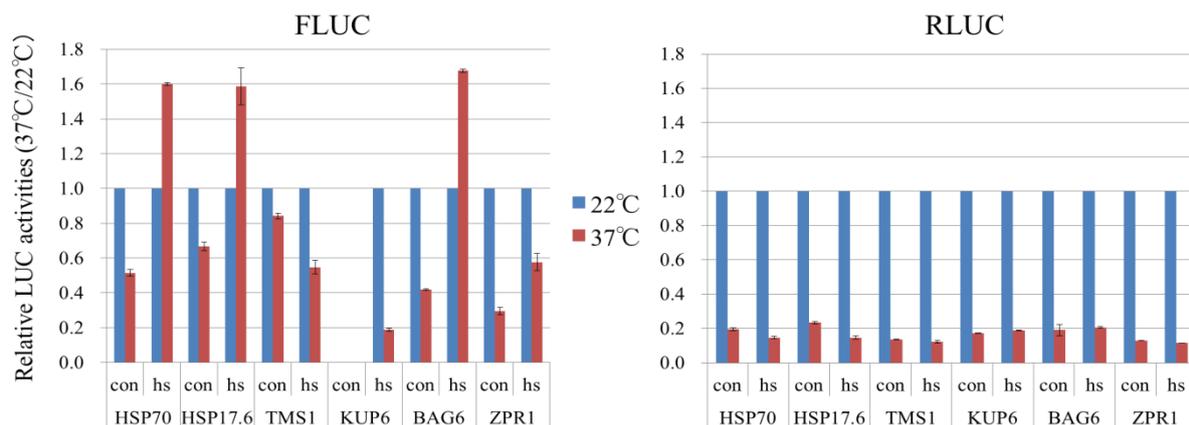


図 34 37°Cの 22°Cに対する相対活性値

転写開始点変化前後の 5'UTR を付加した *FLUC* mRNA を等量ずつ、コントロールである *RLUC* mRNA と共にプロトプラストに導入した。mRNA を導入したプロトプラストを分割した後、それぞれを通常温度(22°C)、または熱ストレス下(37°C)にて 20 分間静置した。その後プロトプラストを回収し、*FLUC* 及び *RLUC* 活性を測定した。横軸に用いた非ストレス処理細胞(con)及び熱ストレス処理細胞由来(hs)の 5'UTR を、縦軸に各 5'UTR の 22°C に対する 37°C の相対活性値を示した。3 回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

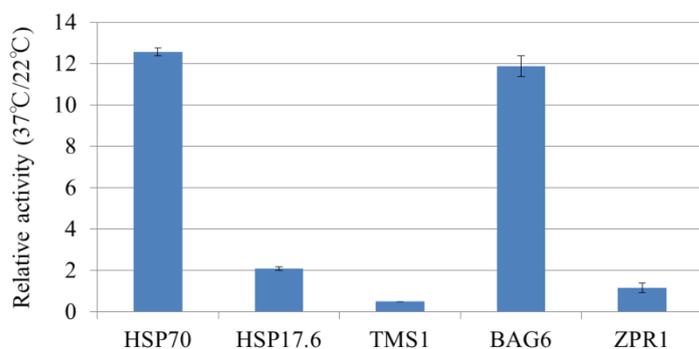


図 35 熱ストレスに応答した転写開始点の変化による翻訳活性の変化

非ストレス処理細胞由来 5' UTR の 22°C における活性値に対する熱ストレス細胞由来 5' UTR の 37°C における活性値の相対値を示す。横軸は遺伝子名を、縦軸は相対活性値を示した。3 回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

2-4. まとめ及び考察

2-4-1. ストレス種特異的な翻訳制御に寄与する 5'UTR 内の CT 反復及び CT rich 領域

形質転換体を用いた解析及び CAGE 解析より、5'UTR 内の CT 反復領域が mRNA のストレス種特異的な翻訳状態変化に寄与する可能性が示された。このような CT 反復領域および類似する CT rich 領域が翻訳制御に関わる事例として、動物細胞における 5'TOP(5'末端オリゴピリミジン) 経路が知られている。この経路は、細胞内の翻訳状態を大きく変化させることが知られているラパマイシン処理時に翻訳状態が特に抑制される mRNA をターゲットとして見出された。(Harold et al., 1997; Thoreen et al., 2012)。一方、本研究では、ストレスの種類特異的な翻訳状態変化を示す mRNA をターゲットとした解析により、塩ストレス下で翻訳が維持され、熱ストレス下で抑制される mRNA の 5'UTR 内に共通する特徴として CT 反復及び CT rich 領域が示された。そのため、CT 反復及び CT rich 領域は、熱ストレスに応答して mRNA からの翻訳を選択的に抑制する、もしくは塩ストレスに応答して mRNA からの翻訳を選択的に維持することに寄与していると考えられる。また、CT 反復及び CT rich 領域は、植物細胞で既に確認されている共通の翻訳制御に関わる重要領域(AT rich)と比較して配列の特徴が大きく異なり、また、重要領域は 5'UTR の 5'末端に位置することが重要であるが(Matsuura et al., 2013)、ゲノムワイドに捉えると 5'UTR 内の CT 反復及び CT rich 領域に位置の偏りは認められなかった。これらの結果より、CT 反復及び CT rich 領域は、環境ストレスに応答した翻訳制御に関わる新規な制御配列だと考えられ、細胞全体で翻訳状態を大きく変化させる翻訳制御機構に、複数の経路が存在する可能性が示された。

ストレスの種類に関係なく、ストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する重要領域や、ストレス種依存的な翻訳状態変化に寄与する CT 反復及び CT rich 領域は共に 5'UTR 内に存在する。また、真核生物の翻訳は、mRNA の 5'末端に存在する cap 構造を認識することから始まり、この過程に重要なタンパク質である翻訳開始因子は mRNA の 5'末端に複合体を形成することが知られている。特に中心的な役割を担うタンパク質として、リボソームのリクルート能力を有する 4G が挙げられ、4G を足場に複合体を形成する因子の総和として翻訳活性が決定される(Pestova et al., 2002)。しかしながら、4G と親和性を示す翻訳に重要な因子の働きについては不明な点が残っており、また、近年新しい因子も発見されている(Uniacke et al., 2012)。本研究により 5'UTR 内に認められた特徴も、既知もしくは未知のトランス因子を介することで 4G のリボソームリクルート能力に影響を及ぼしている可能性が考えられ、今後、5'UTR 内に存在する 2 種類の配列情報にどういったトランス因子が関与しているのかを検証することが、植物の環境ストレス応答した翻訳制

御機構に関する理解を深める上で重要な課題となると考えられる。

2-4-2. ストレスに応答した転写開始点の変化が mRNA の翻訳活性に強く影響する

ストレスに応答して転写開始点が増加する遺伝子の存在は、植物細胞のみならず、微生物を材料とした研究でも報告されている(Mitschke et al., 2011; Jortha et al., 2013)。例えば、酵母を材料とした、窒素不足条件下に移行した場合の転写開始点変化を網羅的に解析した研究より、900 余りの遺伝子の転写開始点が増加して変化することが報告されている(Mitschke et al., 2011)。しかし、このようなストレスに応答した転写開始点変化が遺伝子発現に与える影響については不明な点が多く残っている。仮説の1つとして、転写開始点の変化によって、コーディング領域の5'側に存在するシグナルペプチドの有無が生じるため、転写開始点の変化はタンパク質の局在に影響しているのではないかと考えられていた。

一方、シロイヌナズナでは、ストレス下での共通の翻訳制御を規定する重要領域が5'UTRの5'末端に存在している(Matsuura et al., 2013)。また、本研究で行った、熱ストレスに応答した転写開始点の変化前後に対応する5'UTRを用いた一過性発現実験より、転写開始点の変化前後に対応する5'UTRの各温度条件における翻訳活性は大きく異なることが示された。これらの結果より、植物細胞では、ストレスに応答した転写開始点の変化は、ストレス下でのmRNAの翻訳状態に影響する重要な要因の1つであることが示された。実際、At1g53540.1(*HSP17.6*)は熱ストレスに応答してmRNA量が60倍に増加し、かつ、そのmRNAは、転写開始点が増加することによって初めて熱ストレス下における翻訳抑制を回避する能力を得ている。そのため、ストレスに応答した*HSP17.6*の発現量は、他の多くの遺伝子と比較して著しく増加していると考えられる。また、試験した5'UTRは、複数存在する転写開始点の中で最も頻度の高い1つのみである。近年、細胞内で共存する複数の転写開始点それぞれに対応する5'UTR間において、mRNAからの翻訳活性が異なることが示された(Rojas-Duran et al., 2012)。本研究で着目した熱ストレス下での翻訳状態変化(ΔPS)は、複数存在する転写開始点それぞれに対応する5'UTRの翻訳活性の総和であることから、今後、他の転写開始点に対応する5'UTRの熱ストレス下における翻訳活性の評価を行う必要があると考えられた。しかし、熱ストレスに応答した転写開始点変化後の転写開始点の収束率が高い*HSP17.6*において、 ΔPS と一過性発現実験の結果に相関が示されたことから、熱ストレスに応答した転写開始点の変化も熱ストレス下での翻訳状態変化に影響する1要因であることが示された。また、これまで、ストレスに応答した転写調節と翻訳状態変化は独立した制御機構として解析が進められてきたが、本研究結果より、両調節段階が協調する新しい遺伝子発現調節機構の存在も示せた。

ストレスに応答して転写開始点が変わるメカニズムは不明であるが、先行研究により関連する情報が提供されている。例えば、酵母を材料とした解析より、転写因子 HMO1 は DNA 上の転写開始前複合体形成領域を変化させ、それに伴って転写開始点が変わることが提唱されている (Kasahara et al., 2011)。また、酵母を材料としたストレスに答した転写開始点変化の網羅的解析より、ストレスに答して転写開始点が変わる遺伝子 900 の内、1 つの転写因子のノックアウトにより約 200 遺伝子の転写開始点の変化が生じなくなることが報告され、少数の転写因子によって一群の遺伝子の転写開始点が調節されている可能性が示されている (Mitschke et al., 2011)。また、CAGE 解析から示された、ストレスに答して転写開始点が変わる遺伝子の多くは、ストレス誘導性であった。ストレスによる転写誘導のメカニズムは、先行研究によって様々なモデルが示され、また制御に重要な役割を担う転写因子が多数同定されているが、ストレス誘導に加えて生じる転写開始点の変化や、転写開始点の変化によるストレス下での翻訳活性の違いにまで着目した研究はない。本研究結果より、転写及び翻訳段階の一貫した遺伝子発現調節の重要性の一端が示され、今後、ストレスに答した転写誘導、転写開始点の変化及び翻訳活性の変化といった複数の情報を総合して解析することで、ストレスに答した遺伝子発現調節の更なる理解に繋がると考えられる。

総括

本研究は、環境ストレスに曝された細胞内で、劇的に変動することが知られていた「翻訳」という視点から、ストレスに応答した遺伝子発現調節の仕組みについて理解を深める目的で行ったものである。

まず、第1章ではストレスに曝された細胞で認められる翻訳状態変化の生物学的意義について解析を進めた。最初に、イネを材料に、熱ストレスに反応して個別 mRNA の翻訳状態は選択的に変化することをポリソーム/マイクロアレイ解析によって網羅的に示した。具体的には、大部分の mRNA の翻訳はストレスに反応して抑制され、その一方で、一部の mRNA からの翻訳は維持されることが示された。次に、網羅的解析結果を基にした機能別解析より、ストレスに反応した翻訳状態変化と mRNA がコードするタンパク質の機能との間に関連性が存在することを示した。さらに、機能的な傾向を、イネ及びシロイヌナズナ間で比較したところ、特に、ストレス反応に重要な mRNA からの翻訳が共通して維持される傾向にあることを示した。この結果より、細胞全体として翻訳を抑制し、ストレス反応に重要なタンパク質をコードする mRNA からの翻訳を優先して行う、という翻訳制御の特徴が示され、ストレス下に移行した時に生ずる翻訳状態の変化も、植物のストレス反応の1側面であることが示唆された。

第2章では、ストレスの種類に依存して翻訳状態が変化する mRNA をターゲットとして、分子メカニズム面から、ストレスに反応した翻訳制御機構のさらなる理解を目指した。具体的には、ストレスに反応した翻訳状態変化に関する網羅的解析結果に加えて、蓄積転写産物量、転写開始点変化の(5'UTR)に関する網羅的解析結果を取り入れることで、ゲノムワイドに制御に関わる制御領域の探索を行った。その結果、ストレス下における mRNA の翻訳状態を決定する要因として、5'UTR 内の CT 反復及び CT rich 領域やストレスに反応した転写開始点変化の重要性が示された。これらの結果は、ストレスに反応した翻訳状態変化の分子メカニズムの一端を示すものであり、ストレス下で認められる細胞全体としての翻訳状態変化は、複数の経路を介して、個別 mRNA の翻訳状態が 5'UTR に依存して選択的に制御された結果であることが示唆された。また、ストレス種特異的に翻訳状態が変化する mRNA には、上記の特徴を有しない mRNA も存在した。このことより、他にもストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する要因が存在する可能性が考えられ、ストレスに反応した翻訳制御機構は、従来考えられていたものより遥かに複雑であることが想定された。そのため、近年報告数が増加している様々なストレス種に反応した翻訳状態変化の網羅的解析結果を比較していくことも、今後ストレスに反応した翻訳状態変化に関して理解を深めていく上で重要な切り口の1つだと考えられた。

また、今後の課題の1つとして、ストレスに反応したリボソーム形成状態

変化の解析に加えて、タンパク質蓄積量変化を網羅的に同定することが重要だと考えられる。ストレスに応答した mRNA の翻訳状態変化は、mRNA の種類ごとに異なるため、網羅的解析は翻訳に関する解析を進める上で非常に有用である。このような、ストレスに曝された時の翻訳状態変化の網羅的解析結果とタンパク質蓄積量変化の間には、全体として正の相関が存在することが報告されているが(Schwanhäusser et al., 2011)、一方で、一部の mRNA のリボソームの伸長スピードがストレス下で選択的に変化するため、mRNA 種によっては、リボソームの結合数変化が必ずしもタンパク質蓄積量変化と相関しないことも報告されている (Shalgi et al., 2013)。具体的には、ストレス下では、一部 mRNA の 5'側でリボソームの伸長がポーズするために、次にリクルートされてきたリボソームとの間での詰まり現象が引き起こされる。これら mRNA に対しては、従来のリボソーム結合数を翻訳状態の指標とする解析手法は適さないと考えられる。また、この現象は、ストレスに応答した翻訳制御の1つとして、ストレスに応答して各 mRNA の翻訳伸長効率を選択的に制御する機構の存在を示唆するものであった。そのため、今後ストレス下における翻訳状態をより詳細に解析するためには、mRNA 種毎の新規タンパク質合成量を調べ、翻訳伸長等の影響を加えた評価を行うことが重要となる。

本研究を、別の視点から捉えてみると、外来遺伝子の高発現を試みる上でも有用な情報を提供している。環境ストレスは、内在の mRNA と同様に、外来遺伝子の mRNA からの翻訳も抑制するため、外来遺伝子の発現量の低下を招く要因となっていることが危惧される。ストレス下での翻訳状態変化を規定するのは 5'UTR であり、仮に、抑制されるタイプの 5'UTR を外来遺伝子に連結した場合は、外来遺伝子の mRNA からの翻訳も抑制されることが示されている(Mastuura et al., 2013)。逆に、熱や塩ストレス下でも翻訳が維持される mRNA の 5'UTR を外来遺伝子の発現系に応用することで、ストレス下でも翻訳抑制を回避し、活発に外来遺伝子を発現させることが可能となり、このような系は外来遺伝子の導入による有用物質生産や植物への環境ストレス耐性の付与といったことに役立つと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました出村拓教授に厚く御礼申しあげます。加藤晃助教には大変お忙しい中、直接の懇切なる御指導ならびに格別なる御高配を賜り深く御礼申し上げます。米田新助教には貴重な御助言ならびに、多大なるご配慮を賜り、感謝申し上げます。埼玉大学の山口雅利准教授には折々に適切且つ有益な御助言を頂き、深く感謝いたします。大阪大学の松浦秀幸助教には研究における有益な手法及び御助言を頂きました。心から感謝いたします。出光興産株式会社の松井健史博士には研究における御指導のみならず、多岐に渡ってお世話になりました。

植物代謝制御研究室の皆様には本当にお世話になりました。田中雅恵氏、大平菜緒氏、原田麻記氏には、事務的な面で何かとお世話になりました。津田貴子氏、金城聖子氏には試薬類の作製に関し大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。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、檜木智恵氏、三河周平氏、久保佑喜氏、大河原錬也氏、矢村寿啓氏、西垣直哉氏、畑健介氏、山崎将太郎氏、上田直國氏、米田裕基氏には、私の至らないところもあり、迷惑をかけることもありましたが、研究の遂行にあたって様々な面でお世話になりました。植物代謝制御研究室の皆様の御指導、御助言、御協力等に対し、心から御礼申し上げます。皆様からの励ましによって本研究を遂行することができました。心から御礼申し上げます。

最後に、両親にはいつも自分の意思を尊重し、暖かく見守ってもらいました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

Bailey-Serres, J. (1999). Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 142-148.

Bailey-Serres, J., Dawe, K. (1996). Both 5' and 3' sequences of maize *ADH1* mRNA are required for enhanced translation under low - oxygen conditions. *Plant Physiol.* 112: 685-695.

Bailey-Serres, J., Sorenson, R., Juntawong, O. (2009). Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complex. *Trends Plant Sci.* 14:443-453.

Ben-Zioni, A., Itai, C., Vaadia, Y. (1967). Water and salt stresses, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 42: 361-365.

Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B., Bailey-Serres, J. (2005). Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann. Bot.* 96: 647-660.

Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists 1158-1249.

Browning, K. S. (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 589-91.

Dansako, T., Kato, K., Satoh, J., Sekine, M., Yoshida, K., Shinmyo, A. (2003). 5' Untranslated region of the *HSP 18.2* gene contributes to efficient translation in plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 52-58.

Fennoy, S. L., Nong, T., Bailey-Serres, J. (1998). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* 15: 727-735.

Hata, K. (2013). 熱ストレス下での翻訳制御に関与する 5'UTR の詳細解析. 奈良先端科学技術大学院大学.

Hsiao, T. C. (1970). Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in

response to water stress. *Plant Physiol.* 46: 281-285.

Kasahara, K., Ohyama, Y., Kokubo, T. (2011). Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res.* 39: 4136-4150.

Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A., 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.

Key, J. L., Lin, C. Y., Chen, Y. M. (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3526-3530.

Klaus, A., Heribert, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction 55: 373-99.

Kodzius, R., Kojima, M., Nishiyori, H., Nakamura, M., Fukuda, S., Tagami, M., Sasaki, D., Imamura, K., Kai C., Harbers, M., Hayashizaki, Y., Carninci, P. (2006). CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat. Methods* 3: 211-22.

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, T., Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* 74: 1301-1322.

Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 6: 2940-2945.

Li, F., Guo, S., Zhao, Y., Chen, D., Chong, K., Xu, Y. (2010). Overexpression of a *homeptide repeat-containing bHLH protein gene (OrbHLH001)* from Dongxiang Wild Rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 29: 977-986.

Nagaya, S., Kawamura, K., Shinmyo, A., Kato, K. (2010). The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol.* 51: 328-332.

Ndimba, B. K., Chivasa, S., Simon, W. J., 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.

Nicolai, M., Roncato, M. A., Canoy, A. S., Rouquie, D., Sarda, X., Freyssinet, G., 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.* 141: 663-673.

Nishigaki, N. (2013). 単子葉植物において熱ストレス下での翻訳維持に寄与する 5' UTR の網羅的探索. 奈良先端科学技術大学院大学.

Matsuura, H., Shinmyo, A. Kato K. (2008). Preferential translation mediated by *Hsp-3* 5'UTR during heat shock involves ribosome entry at the 5'-end rather than an internal site in *Arabidopsis* suspension cells. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 39-47.

Matsuura, H., Ishibashi, Y., Shinmyo, A., Kanaya, S., Kato, K. (2010). Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51: 448-462.

Matsuura, H., Kiyotaka, U., Ishibashi, Y., Kubo, Y., Yamaguchi, M., Hirata, K. et al. (2010). A short period of mannitol stress but not LiCl stress led to global translational repression in plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 2110-2112.

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

Mitschkea, J., Vioqueb, A., Haasa, F., Hessa, W., Muro-Pastorb, M. (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena sp. PCC7120*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 : 130-135.

Okawara, R. (2012). 植物培養細胞における導入遺伝子高効率発現システム. 奈良先端科学技術大学院大学.

Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 15: 2906-2922.

Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J.* 403: 217-234.

Raught, B., Gingras, A. C. (2007). Signalling to translation initiation. In translational control in biology and medicine, M. B. Cold Spring Harbor Laboratory Press 369-400.

Roya, B., von Arnim, A. G. (2013). Translational regulation of cytoplasmic mRNAs. The Arabidopsis Book.

Sachs, M. M., Freeling, M., Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins of maize. Cell 20: 761-767.

Satoh, J., Kato, K., Shinmyo, A. (2004). The 5'-untranslated region of the tobacco *alcohol dehydrogenase* gene functions as an effective translational enhancer in plant. J. Biosci. Bioeng. 98: 1-8.

Serres-Giardia, L., Belkhira, K., Davidb, J., Glémina, S. (2012). Patterns and evolution of nucleotide landscapes in seed plants 24: 1379-1397.

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

Sormani, R., Delannoy, E., Lageix, S., Bitton, F., Lanet, E., Saez Vasquez, J., Deragon, J. M., Renou, J. P., Robaglia, C. (2011). Sublethal cadmium intoxication in *Arabidopsis thaliana* impacts translation at multiple levels. Plant Cell Physiol. 52: 436-447.

Harold B. J., Stefano, F., Patrick, B. D., Christoph, R., Richard, B. P., George, T. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. EMBO J. 16: 3693 -3704.

Holland, T., Sack, M., Rademacher, T., Schmale, K., Altmann, F., Stadlmann, J., Fischer, R., Hellwig, S. (2010). Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. Biotechnol. Bioeng. 107: 278-289.

Jorth, P., Trivedi, U., Rumbaugh, K., Whiteley, M. (2013). Probing bacterial metabolism during infection using high-resolution transcriptomics. J. Bacteriol. 195: 4991-4998.

Rojas-Duran, M. F., Gilbert, W. V. (2012). Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast. *RNA* 18:2299-305.

Shalgi, R., Hurt, J. A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist S., Burge, C. (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Molecular Cell* 49: 439-452.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337-342.

Sheen, J. (2001). Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 127:1466-1475.

Shinozaki, K., 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.

Sugio, T., Satoh, J., Matsuura, H., Shinmyo, A., Kato, K. (2008). The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa alcohol dehydrogenase* gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 300-302.

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

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P. et al. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37: 914-939.

Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., Sabatini, D. M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485: 109-113.

Uniacke, J., Holterman, C. E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M. D., Fabian, M. R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A., Lee, S. (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486: 126-129.

Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, M. (2010). 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current opinion in plant biology* 13: 132-138.

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O. E., Palacios-Rojas, N., et al. (2005). Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol.* 138: 1195-1204.

Usadel, B., Nagel, A., Steinhauser, D., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Redestig, H., et al. (2006). PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* 7: 535.

Wang, W., Vinocur, B., 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., Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252.

Wang, Y., Deng, D., Bian, Y., Lv, Y., Xie, Q. (2010). Genome-wide analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in maize (*Zea mays. L.*). *Molecular Biology Reports* 37: 3991-4001.

Yamamoto, Y. Y., Yoshitsugu, T., Sakurai, T., Seki, M., Shinozaki, K., Obokata, J. (2009). Heterogeneity of Arabidopsis core promoters revealed by high-density TSS analysis. *Plant J.* 60: 350-362.