研究成果報告書 科学研究費助成事業

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号: 14603

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2015~2017

課題番号: 15K07107

研究課題名(和文)植物の環境ストレス種特異的な翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of environmental stress-specific translational

regulation in plant

研究代表者

加藤 晃 (kato, ko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号:80283935

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文): 植物は環境ストレス(熱、塩等)に曝されると細胞内の翻訳状態が劇的に変化する。熱と塩ストレスによる翻訳状態変化をゲノムスケールで比較すると非常に類似しているが、熱では維持されるが塩では抑制されるなどストレス間で翻訳状態変化が異なるmRNAも存在する。 本研究により、特異的な挙動を示すmRNAの5'UTRをレポーター遺伝子に連結した一過性発現実験および形質転換体を用いた解析から、5'UTR内のCU反復領域等が、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と熱ストレスに応答した転写開始点の変化が、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。

研究成果の概要(英文): When plants are exposed to environmental stress (heat, salt etc.) the translation state changes dramatically. Translation state changes due to heat and salt stress are very similar when compared on the genome wide scale, but there are also mRNAs that differ in translation state change between two stresses such as being maintained by heat but suppressed by

In this study, transient expression experiments and analysis using a transformant in which the 5' UTR of mRNA showing specific behavior was fused to a reporter gene were performed. As a result, the possibility that the CU repeat region in the 5'UTR contribute to the stress state-specific translation state change (heat suppression and salt maintenance) and the change of the translational state of mRNA under heat stress by change of transcription initiation site in response to heat stress were indicated.

研究分野: 植物へ導入した有用遺伝子の効率的発現

キーワード: 翻訳制御 環境ストレス 植物培養細胞 ゲノムワイド解析 5'UTR

1.研究開始当初の背景

環境ストレス (熱・塩・乾燥等)に曝されると細胞内の翻訳状態は大きく変化する。具体的には全体的な翻訳抑制と一部 mRNA からの翻訳維持である。この中で mRNA がコードするタンパク質機能に着目すると、特に抑制または維持される機能集団が存在することから、このような翻訳状態の変化は、細胞の恒常性を維持し、ストレス環境に対応するストレス応答における重要な制御の1つであると考えられる。

細胞内の翻訳状態は、リボソームの結合数 に応じて mRNA をショ糖密度勾配により分 離するポリソーム解析により調べることが 可能である。我々はこれまでに、シロイヌナ ズナ培養細胞を対象に、ポリソーム画分と非 ポリソーム画分に存在する mRNA の量比を、 ストレスを与えたことによる変化という観 点から DNA マイクロアレイを用いて数値化 している。その結果、熱(37 10 min) お よび塩(200 mM NaCl 10 min) ストレスに よる翻訳状態変化を比較すると、正の相関が 認められた。アメリカの研究グループがシロ イヌナズナ植物体を対象に行った乾燥スト レスによる翻訳状態変化についての解析デ ータと比較しても同様に正の相関が認めら れ、共通の機構によりストレス下での翻訳が 制御されていることが示唆された。また、そ の共通制御に関わる 5'UTR の配列特徴につ いても明らかにしている。

一方で、熱では維持されるが塩では抑制される、逆に塩では維持されるが熱では抑制されるなどストレス間で翻訳状態変化が異なる mRNA の存在も認められた(図1)。これら mRNA はストレス種特異的に翻訳が制御されているものと考えられる。

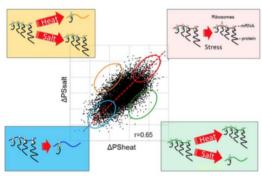


図1熱及び塩処理による翻訳状態変化

2.研究の目的

植物は環境ストレス(熱、塩、乾燥等)に曝されると細胞内の翻訳状態が劇的に変化し、多くの mRNA からの翻訳が抑制される中で一部 mRNA からの翻訳は維持される。我々はこれまでに、熱と塩ストレスによる翻訳状態変化をゲノムスケールで比較することで、両ストレス下での制御が非常に類似しており、また、その共通制御に関わる 5'非翻訳領域(5'UTR)の配列特徴を明らかにしているが、熱では維持されるが塩では抑制される

などストレス間で翻訳状態変化が異なる mRNA の存在も認められた。そこで、これら mRNA に着目し、特にストレスの種類に特異的 な翻訳制御に関わる 5 'UTR の配列特徴を明らかにすることで、未だ全体像が不明である ストレス応答における翻訳制御機構の解明に迫る。

3.研究の方法

(1)ストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する要因は 5 '非翻訳領域(5 'UTR)である。一般的に植物では、各遺伝子の転写開始点(5 'UTR の 5 '末端)は均一ではなく、多くの転写開始点が存在している。また、環境ストレスにより各遺伝子の転写開始点が存在している。また、環境ストレスにより各遺伝子の転写開始点が変化することも予想されるため、まず、通常条件、熱ストレス条件、塩ストレス条件で培養したシロイヌナズナ培養細胞から mRNA を精製し、 CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)ライブラリーを作製後、次世代シークエンサーにより各遺伝子の転写開始点をゲノムスケールで確定し、ストレス間で翻訳状態変化が異なる候補 mRNA の 5 'UTR 配列を決定した。

(2)候補 mRNA の5'UTR を連結した in vitro 合成レポーターmRNA を、もしくは35Sプロモーターの支配下に5'UTR / レポーター遺伝子 / ターミネーターを連結したプラスミドDNA をシロイヌナズナプロトプラストへ導入する一過性発現実験を行ない、各ストレス条件下での翻訳能力をレポーター活性として評価した。

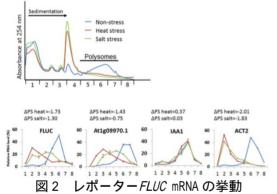
(3)特異的な挙動を取る mRNA の 5'UTR 内の重要領域を in silico にて抽出し、対応する変異や欠失を導入し、上記と同様に一過性発現実験による詳細な評価を行い、ストレス種特異的な翻訳制御に関わる 5'UTR の特徴を同定した。また、5'UTR を連結したレポーター遺伝子を導入したシロイヌナズナ安定形質転換体を作出し、翻訳制御に関わる5'UTR の特徴を in vivoで検証した。

4.研究成果

(1) 植物遺伝子の転写開始点は、一般的に複数存在していることが知られている。また、この転写開始点は、環境ストレス等によって変動することも考えられる。そこで、本研究では 5 ' UTR の配列に着目することから、コイヌナズナ培養細胞 T-87 の培養 3 日目のイヌナズナ培養細胞 T-87 の培養 3 日目の中心(Control) 37 熱ストレス条件下(37,10 min) NaCl 200 mM 塩ストレス条件下(200 mM,10 min) の細胞から抽出した全 RNA から CAGE ライブラリーを作製し、シークエンス解析を行うことで、全 mRNA について5 ' 未端の配列情報(5 ' UTR 配列情報)の取得を行った。その結果、熱抑制/塩維持、の取得を行った。その結果、熱抑制/塩維持、熱維持/塩抑制される mRNA の中で、転写開始点が収束していて転写開始点が各条件で

変化しない2種(At1g09970, At5g13180)と 各条件で転写開始点が変化していた 6 種 (At1g16030, At1g53540, At3g08970, At1g70300, At2g46240, At5g37340)をスト レス種特異的な翻訳挙動を示す mRNA として 選び、それぞれの 5'UTR を解析候補として 選抜した。

(2) 選抜した候補 5 'UTR の中で、熱ストレ ス下では翻訳が抑制され塩ストレス下では 翻訳が維持される At1g09970 や At5g13180 mRNA の 5 'UTR (142 および 67 塩基、 転写開始 点が条件間で一致)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 を作出し、ポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行 った。その結果、それぞれの 5 'UTR を連結 した FLUC mRNA は、内在性 At1g09970 およ び At5g13180 mRNA と同様に、熱ストレス下 と比較して、塩ストレス下で翻訳が維持され る挙動を示した(図2)。これら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。



(3)各条件で転写開始点が変化していた 6 種

[At1g16030:HSP70(118:con/82:HS/209:SS), At1g53540: HSP17.6(192:con/85: HS/192: SS), At3g08970:TMS1(100:con/52:HS/100:SS), At1g70300: KUP6(323: con/92: HS/323: SS), At2g46240: BAG6(284: con/171: HS/284: SS), At5g37340:ZPR1(398:con/337:HS/398:SS)] の候補遺伝子の 5'UTR について、それぞれ 変化前後の5'UTRを連結した、cap 構造、ポ リ A 配列を有する合成 FLUC mRNA を in vitro で合成し、プロトプラストに導入した。その 後、通常条件(22)および熱ストレス条件 下 (37)に 20 分間静置後、それぞれの FLUC 活性値を測定した(図3)。結果として FLUC 活性値は、転写開始点変化前後の 5 'UTR 間 で異なり、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。

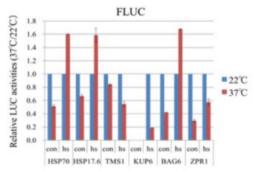


図3 5'UTR の差異による翻訳活性

(4) これまでに行った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、5 'UTR 内に制御配列が存在すると、では、 2 の中で、熱抑制/塩維持という対して、 5 'UTR 内にという共通性があられた。そこで、CAGE 解析によって共通性があられた。そこで、CAGE 解析によって共通性にが関始点(5 'UTR)を網羅的に同定 CU 反復領域に同じ、得領域訳状態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(図 4)。その結果、5 'UTR 内に CU 反復領域等を有する mRNA の翻訳状態変化は、全 mRNA の翻訳状態変化は、 1 で統計的に有意な偏りが認められた。

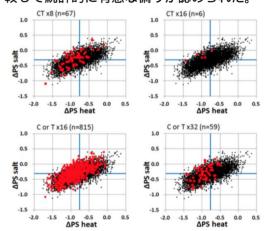


図 4 5'UTR に CT 反復もしくは CT rich 領域を有する mRNA のストレスに応答した 翻訳状態変化

(5)次に、CU 反復領域等が熱抑制/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、ACT2 mRNA (GAATTGTCTCGTTGTCCTCCTCACTTTCATCAGCCGTT TTGAATCTCCGGCGACTTGACAGAGAAGAACAAGGAAGA AGACTAAGAGAGAAAGTAAGAGATAATCCAGGAGATTCA TTCTCCGTTTTGAATCTTCCTCAATCTCATCTTCTTCCG CTCTTTCTTTCCAAGCTCATAAAAA)に対して CU 反 に 置 換 (GAATTGTCTCGTTGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCT AAGACTAAGAGAGAAAGTAAGAGATAATCCAGGAGATTC ATTCTCCGTTTTGAATCTTCCTCAATCTCATCTTCTTCC GCTCTTTCTTTCCAAGCTCATAAAAA)を持つキメ ラ 5 'UTR を連結したレポーター遺伝子を発 現する形質転換体を用いた解析を行った。ポ リソーム/定量 RT-PCR 解析を行った結果、CU 反復配列を持つキメラ 5'UTR を連結した FLUC mRNA は、熱抑制/塩維持である内在性 At1g09970.1 mRNA と類似した挙動を示した (図5)。これらの結果から、5'UTR内のCU 反復領域等が、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 配列である可能性が考えられた。

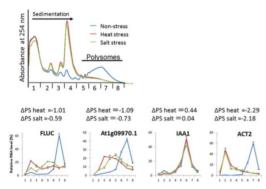


図 5 CU 反復配列を挿入した場合の挙動

(6)本研究により、特異的な挙動を示す mRNA の 5 'UTR をレポーター遺伝子に連結した-過性発現実験および形質転換体を用いた解 析から、5 ' UTR 内の CU 反復領域等が、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と 熱ストレスに応答した転写開始点の変化が、 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。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Yamasaki, S., Sanada, Y., Imase, R., Matsuura, H., Ueno, D., Demura, T. and Kato, K. Arabidopsis thaliana cold-regulated 47 gene 5-untranslated region enables stable high-level expression of transgenes. J. Biosci. Bioeng. 査読あり、125巻, 124-130, 2018, DOI:10.1016/j.jbiosc.2017.08.007

加藤晃、山﨑将太朗、植物でのタンパク質 の高効率翻訳を可能にする数理モデル、バイ オサイエンスとインダストリー、査読なし、 75 巻, 240-241, 2017

Takeshi Matsui, Kazutoshi Sawada, Eiji Ko Kato, Compatibility of translational enhancers with various plant species, Plant Biotechnology, 査読 巻, 32 309-316, 2015. DOI:10.5511/plantbiotechnology. 15. 1103a

[学会発表](計10件)

Ko Kato, Transgene expression system in plants optimized translation process. The 2nd Japan-Korea-China Trilateral Joint Symposium on Plant Biotechnology, 2017

Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato, Mathematical approach to improvement of transgene expression focus on efficiency of mRNA translation. The 1st Asian Conference for Plant Made Pharmaceuticals. 2017

加藤晃、植物での有用タンパク質生産、第 5回奈良まほろば産学官連携懇話会、2017

山崎将太朗、上野大心、出村拓、加藤晃、 導入した目的遺伝子の配列に特化した翻訳 エンハンサーの選抜システム、第 35 回日本 植物細胞分子生物学会、2017

山崎将太朗、上野大心、松浦秀幸、出村拓、 加藤晃、植物での転写開始点の網羅的な同定 と遺伝子発現制御における転写開始点の重 要性、NGS 現場の会第 5 回研究会、2017

Ko Kato, Transgene expression system optimizing translation process. PepTalk 2017、2017

山崎将太朗、今瀬諒司、出村拓、加藤晃、 翻訳効率を 5'UTR 配列から予測できる数式 モデルの構築、第 34 回日本植物細胞分子生 物学会、2016

今瀬諒司、山崎将太朗、出村拓、加藤晃 高翻訳に資する 5'UTR を用いた導入遺伝子 高発現系、第 34 回日本植物細胞分子生物学 会、2016

加藤晃、植物での有用遺伝子高発現系とそ の活用、2016年度日本生物工学会北日本支部 弘前シンポジウム、2016

山崎将太朗、出村拓、加藤晃、mRNA からの 翻訳効率を改良した導入遺伝子高発現系、第 67 回日本生物工学会大会、2015

〔図書〕(なし)

〔産業財産権〕(なし)

出願状況(なし)

取得状況(なし)

[その他] ホームページ等(なし)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 晃 (KATO, Ko) 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授研究者番号:80283935

- (2)研究分担者(なし)
- (3)連携研究者(なし)
- (4)研究協力者 山崎将太朗 (YAMASAKI, Shotaro)