

環境ストレスの影響を考慮した植物発現ベクターの開発

山崎将太郎・上田 清貴・加藤 晃*

近年の植物バイオテクノロジーの発展は著しく、植物体や植物培養細胞へ有用な外来遺伝子を導入することで、植物機能を改良・利用する試みが盛んに行われてきている。しかし、実用化の例は限られており、多くが研究室スケールにとどまっているのが現状である。そのおもな原因の一つとして、導入した有用遺伝子の発現量が低いことがあげられる。一方で、過去20年間の植物分子生物学の目覚ましい発展により、遺伝子発現制御機構が明らかにされるとともに、その知見を活用して導入遺伝子の発現を高める試みも行なわれてきている。

本稿では、その試みを概説するとともに、特に遺伝情報の変換プロセスの一つの過程である「翻訳」に着目し、これまでほとんど顧みられてこなかった「環境ストレスが翻訳過程へ及ぼす影響」を考慮した「植物発現ベクターの開発」について紹介する。

導入遺伝子の発現量増加のためのさまざまな試み

これまでに導入遺伝子の発現量を増加させるために、さまざまな研究開発が行われてきており、それらのおもなターゲットはセントラルドグマにおける転写ステップと翻訳ステップである。転写ステップにおいては最終的に翻訳可能な転写産物を増加させることが重要であり、CaMV35Sに替わる新規なプロモーター¹⁾や効率的な

ターミネーター²⁾を活用することで正味の転写産物量の増加がなされている。翻訳ステップでは単位mRNA当たりの翻訳効率を高める翻訳エンハンサーの活用^{3,4)}、開始コドンAUG⁵⁾や終止コドン⁶⁾近傍配列の最適化による翻訳効率の上昇が試みられている。最終的により高い生産性を目指すためには、目的によって翻訳産物であるタンパク質の局在や修飾などその他のステップの最適化を合わせて行い、導入遺伝子の発現量を増加させることが必要となってくる。

環境ストレスによる翻訳状態変化

植物の生育環境にはさまざまな環境ストレス要因(熱、浸透圧、乾燥、塩など)が存在しており、そういった環境ストレスに曝された植物は生育が阻害され、結果的に生産性が大きく低下してしまう。この時植物細胞内では、大部分のmRNAからの翻訳過程が抑制されることが知られている(図1A)⁷⁾。こうした細胞内の翻訳状態変化は、リボソームの結合数に応じてmRNAをシヨ糖密度勾配遠心により分画することで解析可能である(ポリソーム解析)。図1Bは、シロイヌナズナ培養細胞T87株を通常条件(22°C)および熱ストレス条件(37°C, 10 min)で培養し、それぞれの翻訳状態を比較したものである。通常条件では、mRNAに多くのリボソームが結合したポリソーム画

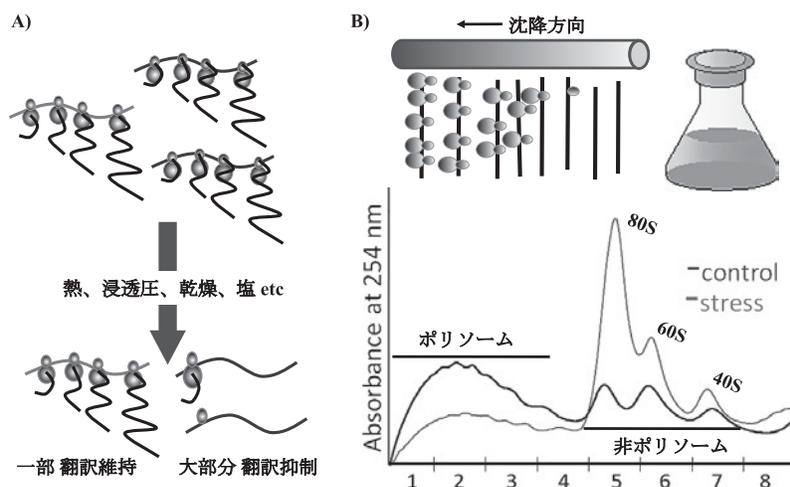


図1. 環境ストレスによる翻訳状態変化。A) 翻訳状態変化の概念図, B) ポリソーム解析の概要図。通常条件(22°C; control)および熱ストレス処理(37°C, 10 min; stress)した細胞から細胞抽出液を調製し、シヨ糖密度勾配遠心(15–60%)により分画した後、254 nmの吸光プロファイルを記録した。

* 著者紹介 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科(助教) E-mail: kou@bs.naist.jp

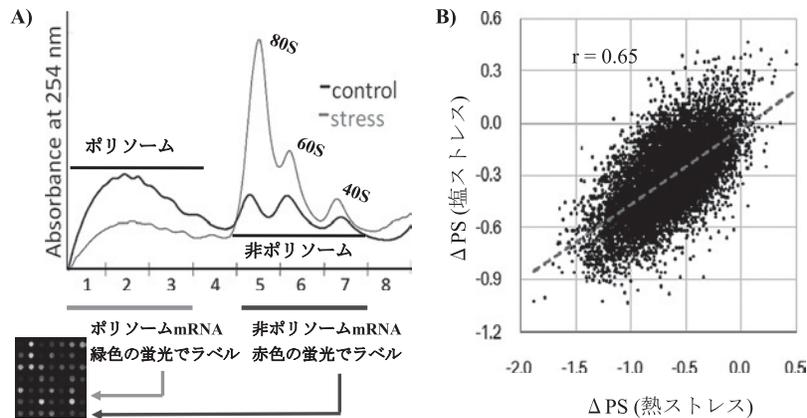


図2. 熱および塩ストレスによる翻訳状態変化の相関. A) ポリソーム/DNA マイクロアレイ解析の概念図. ショ糖密度勾配液を8分割し, 第1-3画分(ポリソーム画分)と第5-7画分(非ポリソーム画分)からmRNAを精製し, それぞれを蛍光色素でラベル後, DNA マイクロアレイ解析に供した. B) 翻訳状態変化の指標である各 Δ PS値の散布図. r はピアソンの相関係数を表す(文献8より, 一部改変).

分にピークがあり, 活発に翻訳が行われている. 一方, 熱ストレス処理を行うことで, ポリソーム画分が減少し, mRNAにリボソームがほとんど結合していない非ポリソーム画分が増加し, 細胞全体としての翻訳抑制が起きている. このような翻訳状態変化は, 塩や浸透圧ストレスにおいても同様に観察されることから, 植物に導入した有用遺伝子もこれら環境ストレスに曝された場合に, 翻訳過程で発現が抑制されてしまうことを意味している. しかし, 大部分のmRNAが翻訳抑制を受ける一方で, 一部のmRNAからの翻訳は維持されており, 環境ストレス下でも効率的に翻訳が行なわれることも知られている(図1A)⁷⁾. つまり, このようなmRNAの特徴を導入遺伝子に応用することで環境ストレス下においても効率的に発現できることが期待できる.

次に筆者らは, 図1Bで示した通常条件および熱ストレス条件に加えて, 塩ストレス処理(200 mM NaCl, 10 min)した細胞抽出液から調製したポリソーム画分および非ポリソーム画分を, DNA マイクロアレイ解析に供することにより, 各mRNAの翻訳状態(ポリソーム画分と非ポリソーム画分での存在比:ポリソームスコア; PS)を各条件について数値化した(図2A). さらに, ストレス条件でのPS値と通常条件のPS値の差分をとることで各mRNAの翻訳状態変化の指標である Δ PS値を算出した. その結果, 両ストレスともに多くのmRNAが負の Δ PS値を示し(負の値ほどストレスにより翻訳が抑制されている), ポリソーム解析による吸光プロファイルの変化が示す全体的な傾向と一致した. また, Δ PS値が変化しない0付近の値をとるmRNAも存在していた. さらに, 熱と塩ストレスで全mRNAの Δ PS値を比較すると, 両者の間には正の相関があり(ピアソンの相関係

数 $r = 0.65$), 両ストレスに応答した翻訳状態変化は非常に類似するものであった(図2B). 言い換えると熱ストレスで翻訳が大きく抑制される遺伝子は塩ストレスによっても抑制され, そして両ストレスにおいてともに翻訳が維持される遺伝子を多数特定した⁸⁾. 同様の解析はイネ培養細胞を対象としても行っている⁹⁾.

環境ストレス下における翻訳制御を規定する5'UTR

また, 筆者らは環境ストレス下における翻訳状態を規定する要因がmRNAの5'非翻訳領域(5'UTR)であることを明らかにしている¹⁰⁾. ポリソーム/DNA マイクロアレイ解析の結果から, さまざまな Δ PS値を示すmRNAの5'UTRをレポーター遺伝子に連結した*in vitro*合成レポーターmRNAをシロイヌナズナプロトプラストに導入し, 熱ストレス下において各5'UTRが持つ翻訳能力を一過性発現実験により評価した. 通常条件(22°C, 20 min)と熱ストレス条件(37°C, 20 min)で翻訳されるレポータータンパク質の活性値を測定し, 相対活性値として算出したところ, DNA マイクロアレイ解析の結果から熱ストレス下において翻訳が抑制されなかった遺伝子の5'UTRを連結したレポーターmRNAは, 一過性発現実験においても抑制されることなく翻訳された. 逆に翻訳が抑制された遺伝子の5'UTRを連結した場合には, 熱ストレス下において強く翻訳が抑制された(図3)¹¹⁾.

このように5'UTRは, 環境ストレス下での翻訳能力を規定する要因であるが, その翻訳制御に関わる5'UTRの配列上の特徴は不明であった. 筆者らは, ポリソーム/DNA マイクロアレイ解析の結果から抽出した39遺伝子の5'UTRについて, その5'UTRを連結したレポーター遺伝子解析と*in silico*解析(PLS解析)から, 翻訳制御を

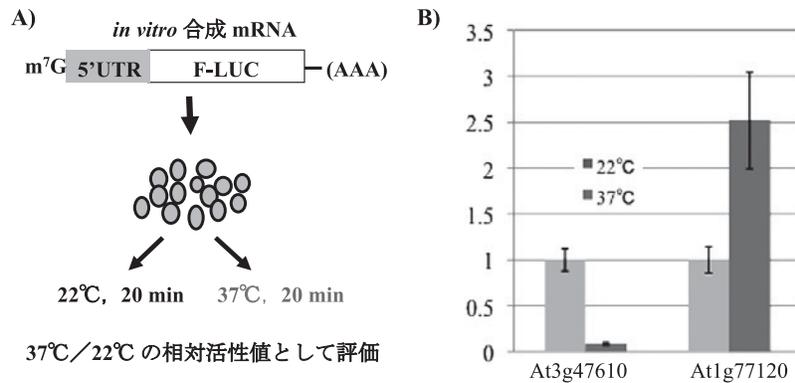


図3. 5'UTRが持つストレス下での翻訳能力. A) CAP構造を持つ *in vitro* 合成 mRNA を用いた一過性発現実験の概要. B) 22°C に対する 37°C の Fluc 相対活性値. ストレス下で翻訳が抑制される At3g47610 遺伝子の 5'UTR および抑制されない At1g77120 遺伝子の 5'UTR を試験した結果. m⁷G は CAP 構造を表す.

規定する 5'UTR 内の重要領域の探索を行い、配列的特徴を世界で初めて明らかとしている¹¹⁾. 具体的には、5'UTR 内の二つの領域 (Region1: 5' 端 1~7 塩基と Region2: 12~32 塩基) がストレス下での翻訳制御に大きく関与し (図4A), Region1 と Region2 を本来の位置から移動させた実験から、これらの領域が存在することに加えて 5' 末端に位置することが翻訳制御にきわめて重要であることが明らかとなった (図4B).

環境ストレスの影響を考慮した発現ベクター

先にも述べたが、植物に導入した有用遺伝子の発現は環境ストレスに曝された場合には翻訳過程で抑制されてしまう危険性がある. そこで、熱ストレスにより翻訳が抑制される At3g47610 遺伝子の 5'UTR を CaMV35S プロモーターの支配下でホタルルシフェラーゼ (*Fluc*) 遺伝子に連結した発現ベクターを構築し、シロイヌナズナ安定形質転換体を作成して 5'UTR の翻訳能力を評価した (図5A). 細胞を通常条件 (22°C) および熱ストレス条件 (37°C, 10 min) 下で培養し、ポリソーム解析を行い、さらに、ショ糖密度勾配液を 8 画分に分画し、それぞれから mRNA を精製し、各画分に存在する mRNA 量を定量 RT-PCR 解析により定量した. その結果、At3g47610 5'UTR を連結した *Fluc* mRNA は、内在の At3g47610 mRNA と同様に、通常条件では重いポリソーム画分 (第 2 画分) におもに存在していたが、熱ストレスによって軽い非ポリソーム画分 (第 6 画分) へ移行し、翻訳が抑制された (図5A)¹¹⁾. この結果は、5'UTR の選択など、適切に発現ベクターを構築しない場合には、導入した有用遺伝子の発現がストレス下で抑制されることを示している.

次に翻訳が抑制されない At1g77120 遺伝子の 5'UTR

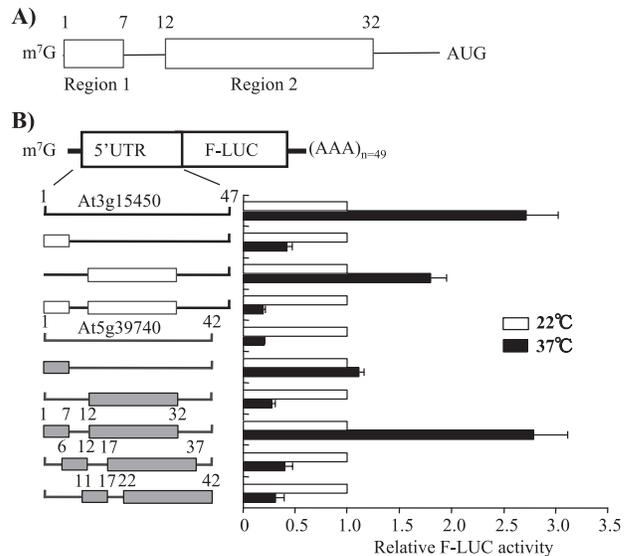


図4. ストレス下における翻訳制御を規定する 5'UTR 内の特徴. A) 制御を規定する Region1 (5' 端 1~7 塩基) と Region2 (12~32 塩基). B) ストレス下で翻訳が抑制されない At3g15450 および抑制される At5g39740 遺伝子の 5'UTR の Region1 と Region2 を相互に入れ換え試験した結果. m⁷G は CAP 構造を表す (文献 11 より、一部改変).

を *Fluc* 遺伝子に連結し、同様に 5'UTR の翻訳能力を評価した (図5B). ストレス下での翻訳維持能力には 5'UTR の特に 5' 末側の配列が重要なため、ここで示した発現ベクターでは、CaMV35S プロモーターの転写開始点と *Fluc* 遺伝子の翻訳開始点の間に余分な配列が付加されないように 5'UTR を挿入している (転写されたキメラ mRNA の 5'UTR に余分な配列が付加された場合には、同じ 5'UTR の配列を持っていてもここで示すような翻訳維持能力を発揮できない). その結果、At1g77120 5'UTR を連結した *Fluc* mRNA は、内在の At1g77120 mRNA と同様に、熱ストレス下においても

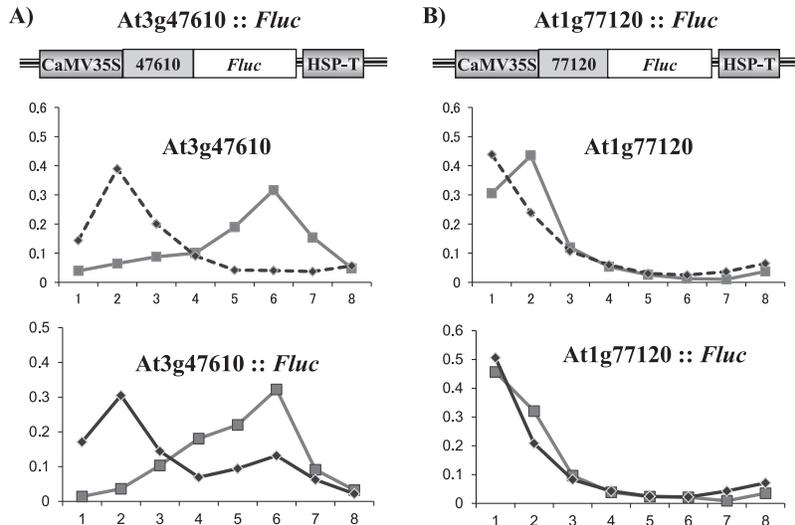


図5. 安定形質転換体を用いた5'UTRの評価. バイナリーベクターの構築図とポリソーム/定量RT-PCRによる個別mRNAの挙動解析. CaMV35Sプロモーターの転写開始点と*Fluc*遺伝子の翻訳開始点の間に各5'UTRを挿入したバイナリーベクター. HSP-Tはターミネーター領域. 縦軸は各画分に存在するそれぞれのmRNA量を全画分に対する割合として表示, 点線は通常条件, 実線は熱ストレス条件を示す. A) 熱ストレス下で翻訳が抑制されるAt3g47610遺伝子の5'UTRを*Fluc*遺伝子に連結. B) 熱ストレス下で翻訳が抑制されないAt1g77120遺伝子の5'UTRを*Fluc*遺伝子に連結.

非ポリソーム画分に移行することなくポリソーム画分に存在し, 翻訳された(図5B)¹¹⁾. また, 塩(200 mM NaCl, 10 min)と浸透圧(300 mM Mannitol, 10 min)処理した細胞についても熱ストレス同様の実験を行ったところ, この5'UTRは翻訳維持能力を発揮し, ストレス下で翻訳が抑制されない5'UTRを活用することで, 熱ストレス下においても導入遺伝子の翻訳状態を維持できることが実証された¹²⁾. 加えて, 別の植物種であるタバコについても形質転換細胞を作出して試験したところ(この時の導入遺伝子は, β グルクロニダーゼ遺伝子および西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子), 熱ストレス下においても導入遺伝子が効率的に翻訳されたことから, 汎用性の高い発現系といえる. これまでにこのような環境ストレスの影響を考慮した導入遺伝子発現系は存在せず, 今後, この発現系は導入した有用遺伝子をストレス環境下でも効率的に発現させるための重要な基盤技術になると期待される.

培養経過による翻訳状態変化

ニンジン培養細胞で生産された組換えグルコセレブロシダーゼがゴーシェ病の治療薬として承認されたように, 植物培養細胞も有用物質生産を行う上で魅力的な宿主の一つである. しかし, 植物体で想定された環境ストレスに加えて植物培養細胞においては, 培養後期(定常期)に栄養飢餓や酸素欠乏といったストレスが存在し, これらストレスによっても翻訳抑制が起きることが予想

される. そこで筆者らは, シロイヌナズナ培養細胞T87株を用いて, 各培養日数における翻訳状態をポリソーム解析によって調べた. その結果, 継代1日目にもっとも良い翻訳状態を示したが, 予想通り培養後期(8日目)の細胞では著しい翻訳抑制が認められた(図6). しかし, プロファイルの変遷を見ると, ある時点で劇的に翻訳抑制が引き起こされる訳ではなく, 培養経過とともにストレスが強まっていくことで徐々に翻訳が抑制の方向へ向かっていくことが明らかとなった.

次に培養前期(1日目)と培養後期(8日目)の細胞を用いて, ポリソーム/DNAマイクロアレイ解析を行うことで, 培養経過に伴う翻訳状態変化をゲノムワイドに解析した. その結果, ポリソーム解析による吸光プロファイルの変化が示す全体的な傾向と同じく, 多くのmRNAの翻訳が培養後期に抑制されていた¹³⁾. この傾向は熱ストレス下での翻訳状態変化と類似しており, 全mRNAについてその翻訳状態変化を比較すると, 両者の間には正の相関があることが明らかとなった(ピアソンの相関係数 $r = 0.41$). この結果は, 培養後期および熱ストレス下における個々のmRNA種の翻訳状態変化がゲノムスケールで見ると類似する傾向にあることを示しており, 同様の翻訳制御機構が働いていることが考えられた. 実際, 熱ストレス下で翻訳が維持されるAt1g77120遺伝子は, 培養後期でも翻訳が維持され, At3g47610遺伝子は抑制されていた. また, 図5の形質転換細胞を用いて, ポリソーム/定量RT-PCR解析により, 1日目と8

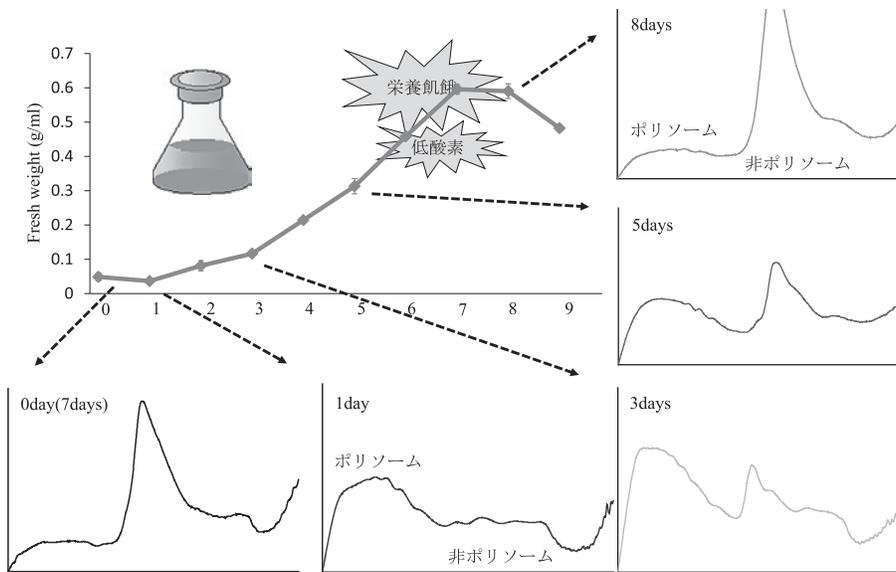


図6. シロイヌナズナ培養細胞 T87株の増殖曲線と各培養日数における翻訳状態. 7日目の細胞を継代後, 培養細胞の新鮮重量を1日おきに9日目まで測定した. 3回の測定平均と標準偏差を示す. 回収した細胞から調製した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画した後, 254 nmの吸光プロファイルを記録した(0, 1, 3, 5, 8日目の結果を示す). ポリソーム画分および非ポリソーム画分を図中に示した. 沈降方向は右から左である.

日目のFluc導入遺伝子の翻訳状態を調べると, 熱ストレスの場合と同じ傾向であった. この時, 翻訳産物であるFlucタンパク質の蓄積量変化をFluc活性として調べると, 翻訳が抑制されるAt3g47610 5'UTR::Fluc形質転換培養細胞では4~8日目にかけて緩やかな増加が認められたが, 9日目では8日目と比較して活性値が減少した. 一方で, 翻訳が維持されるAt1g77120 5'UTR::Fluc形質転換培養細胞では9日目まで高い活性値の増加を示し, 9日目には4日目の3倍以上のFlucタンパク質蓄積量となった. これらのことから, 翻訳が維持される遺伝子の5'UTRを活用することで, 培養後期においても導入遺伝子が活発に翻訳されていることが実証された¹³⁾. また, 翻訳が抑制される5'UTRを用いた場合と比較すると, 最終的なタンパク質生産性に大きな違いがあり, 今後, 高密度培養などさらにストレスの負荷がかかると予想される場合に, 新たな発現系としてその有用性が期待される.

おわりに

今回, 「翻訳」に着目し「環境ストレスの影響を考慮した植物発現ベクターの開発」について紹介したが, 器官・時期特異的プロモーターなどの転写エレメントやmRNAの安定化エレメントと組み合わせることで, 汎用的に高い発現ポテンシャルが期待できる外来遺伝子発現系が構築できると考えられる. 一般に行われている発

現ベクターの構築では, プロモーター下流の適当な位置に, 導入したい遺伝子もしくはその遺伝子由来の5'UTRを一部含むように連結される. その際, もっとも考慮されてきたことは, 利用するプロモーターの転写活性を損なわないことであるが, 新たに生じる5'UTRを介した翻訳活性を損なわないことも, 導入遺伝子産物である目的タンパク質の高発現化に重要なポイントと考えられる.

本研究は, 経済産業省「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発-植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発-組換えレタスによる家畜用経口ワクチンタンパク質の研究開発」および「密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発-密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発」の研究助成により行われた.

文 献

- 1) Wu, K. *et al.*: *Mol. Gen. Genomics*, **265**, 763 (2001).
- 2) Nagaya, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 328 (2010).
- 3) Sugio, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 300 (2008).
- 4) Matsui, T. *et al.*: *Plant Biotech.*, **29**, 319 (2012).
- 5) Sugio, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 170 (2010).
- 6) Angenon, G. *et al.*: *FEBS Lett.*, **4**, 142 (1999).
- 7) Bailey-Serres, J.: *Trends Plant Sci.*, **109**, 170 (2010).
- 8) Matsuura, H. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 448 (2010).
- 9) Ueda, K. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **53**, 1481 (2012).
- 10) Matsuura, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 39 (2008).
- 11) Matsuura, H. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 474 (2013).
- 12) 加藤晃ら, PCT出願, JP2010-64006.
- 13) 加藤晃ら, PCT出願, JP2012-71815.