

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5769173号

(P5769173)

(45) 発行日 平成27年8月26日(2015.8.26)

(24) 登録日 平成27年7月3日(2015.7.3)

| (51) Int.Cl. | | F I | |
|----------------|--------------|------------------|-----------------------|
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 3 |
| A O 1 H | 5/00 | (2006.01) | A O 1 H 5/00 A |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A |
| G O 6 F | 19/00 | (2011.01) | G O 6 F 19/00 |

請求項の数 16 (全 65 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2011-527702 (P2011-527702) | (73) 特許権者 | 504143441 |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年8月19日(2010.8.19) | | 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2010/064006 | | 奈良県生駒市高山町8916-5 |
| (87) 国際公開番号 | W02011/021666 | (74) 代理人 | 110000796 |
| (87) 国際公開日 | 平成23年2月24日(2011.2.24) | | 特許業務法人三枝国際特許事務所 |
| 審査請求日 | 平成25年8月2日(2013.8.2) | (72) 発明者 | 加藤 晃 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2009-190179 (P2009-190179) | | 奈良県生駒市高山町8916-5 国立大 学法人奈良先端科学技術大学院大学内 |
| (32) 優先日 | 平成21年8月19日(2009.8.19) | (72) 発明者 | 金谷 重彦 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | 奈良県生駒市高山町8916-5 国立大 学法人奈良先端科学技術大学院大学内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2010-54891 (P2010-54891) | (72) 発明者 | 松浦 秀幸 |
| (32) 優先日 | 平成22年3月11日(2010.3.11) | | 奈良県生駒市高山町8916-5 国立大 学法人奈良先端科学技術大学院大学内 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 環境ストレス下の翻訳抑制を回避する5' UTRをコードする組換えDNA分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の5' UTRを有するmRNAをコードする組換えDNA分子：

- (i) 5' 端から1～7番目が配列番号4の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号4の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
- (ii) 5' 端から1～7番目が配列番号6の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号6の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
- (iii) 5' 端から1～7番目が配列番号20の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号20の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
- (iv) 5' 端から1～7番目が配列番号36の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号36の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
又は
- (v) 5' 端から1～7番目が配列番号60の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号60の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR。

【請求項2】

前記5' UTRが、5' 端に配列番号4、6、20、36、又は60の塩基配列を有する5' UTRである、請求項1に記載の組換えDNA分子。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の組換えDNA分子をプロモーターの転写開始点直後に連結してな

るベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 5】

形質転換体が形質転換植物である、請求項 4 に記載の形質転換体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の形質転換体を、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレス下で生育させ、前記組換え DNA 分子がコードするタンパク質を産生させる方法。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のベクターを植物に導入し、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避できる植物を製造する方法。

【請求項 8】

以下の 5' UTR を有する mRNA をコードするよう塩基配列を組み換えて、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する遺伝子を製造する方法：

- (i) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 4 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
- (ii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 6 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
- (iii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 20 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 20 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(iv) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 36 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 36 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
又は

(v) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 60 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 60 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR。

【請求項 9】

前記 5' UTR が、5' 端に配列番号 4、6、20、36、又は 60 の塩基配列を有する 5' UTR である、請求項 8 に記載の遺伝子を製造する方法。

【請求項 10】

以下の 5' UTR を有する mRNA をコードするよう、任意の遺伝子の塩基配列を組み換えて、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスにより、当該遺伝子がコードするタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避する方法：

- (i) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 4 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
- (ii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 6 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
- (iii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 20 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 20 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(iv) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 36 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 36 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
又は

(v) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 60 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 60 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR。

【請求項 11】

前記 5' UTR が、5' 端に配列番号 4、6、20、36、又は 60 の塩基配列を有する 5' UTR

10

20

30

40

50

Rである、請求項10に記載のタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避する方法。

【請求項12】

以下の5' UTRを有する人工mRNA分子：

- (i) 5' 端から1～7番目が配列番号4の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号4の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
- (ii) 5' 端から1～7番目が配列番号6の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号6の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
- (iii) 5' 端から1～7番目が配列番号20の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号20の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR

10

、
(iv) 5' 端から1～7番目が配列番号36の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号36の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR、
又は

(v) 5' 端から1～7番目が配列番号60の1～7番目の塩基配列からなり、5' 端から12～32番目の塩基配列が配列番号60の12～32番目の塩基配列からなる5' UTR。

【請求項13】

前記5' UTRが、5' 端に配列番号4、6、20、36、又は60の塩基配列を有する5' UTRである、請求項12に記載の人工mRNA分子。

【請求項14】

植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる、5' UTRにおける配列特徴の予測方法であって、

20

植物内で天然に発現するN個の遺伝子について、各5' UTRを含む核酸分子の対照条件下に対する環境ストレス条件下における翻訳レベルの相対活性値を求める工程、

前記5' UTRにおける5' 末端からの塩基位置kからk+L-1までの長さLの配列について、少なくとも1回出現するt個の塩基からなる塩基配列の出現頻度を求める工程、

前記相対活性値と、前記塩基配列の出現頻度との相関式を構築し、多変量解析により各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める工程、

前記回帰係数を用いて、塩基位置kからk+L-1までの長さLの領域における各塩基位置における4つの塩基A、U、G、Cに対応した回帰係数の値を求め、各塩基位置における前記相対活性値に対する各塩基の寄与度を求める工程、

30

得られた寄与度及び前記相対活性値を用いて多変量解析により回帰モデルを構築する工程、及び

k及びLを変えて構築した回帰モデルの中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定し、選定した回帰モデルを用いて塩基位置k'からk'+L'-1の領域における特定配列を予測する工程

を含む予測方法。

【請求項15】

植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる、5' UTRにおける配列特徴を予測するための、CPU及びメモリを含むシステムであって、

前記CPU及び前記メモリを使用して、植物内で天然に発現するN個の遺伝子について、各5' UTRを含む核酸分子の対照条件下に対する環境ストレス条件下における翻訳レベルの相対活性値を求める手段、

40

前記CPU及び前記メモリを使用して、前記5' UTRにおける5' 末端からの塩基位置kからk+L-1までの長さLの配列について、少なくとも1回出現するt個の塩基からなる塩基配列の出現頻度を求める手段、

前記CPU及び前記メモリを使用して、前記相対活性値と、前記塩基配列の出現頻度との相関式を構築し、多変量解析により各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める手段、

前記CPU及び前記メモリを使用して、前記回帰係数を用いて、塩基位置kからk+L-1までの長さLの領域における各塩基位置における4つの塩基A、U、G、Cに対応した回帰係数の値を求め、各塩基位置における前記相対活性値に対する各塩基の寄与度を求める手段、

50

前記CPU及び前記メモリを使用して、得られた寄与度及び前記相対活性値を用いて多変量解析により回帰モデルを構築する手段、及び

前記CPU及び前記メモリを使用して、k及びLを変えて構築した回帰モデルの中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定し、選定した回帰モデルを用いて塩基位置k'からk'+L'-1の領域における特定配列を予測する手段、

を備える予測システム。

【請求項16】

コンピューターに請求項14に記載の各工程を実行させるための、配列特徴の予測プログラム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、環境ストレス下における翻訳抑制回避に寄与する5'非翻訳領域(以下、5'UTRともいう)をコードする組換え遺伝子、当該組換え遺伝子を含んでなる発現ベクター、及び当該発現ベクターを含む形質転換体に主に関する。

【背景技術】

【0002】

動物や酵母といった他の真核生物に同じく、一般的に植物においても、翻訳の開始反応がタンパク質合成の律速となっている(非特許文献1)。

20

【0003】

この翻訳開始は、植物が外環境の変化に速やかに応答して遺伝子発現を制御するための、重要な制御段階の一つである。例えば、温度、浸透圧、嫌気(低酸素)といった様々なストレスを受けることによって、大部分のmRNAからタンパク質への翻訳が抑制される。一方、全てのmRNAからの翻訳が抑制されるわけではなく、一部のmRNAからの翻訳、つまりタンパク質合成は維持されている。このような知見から、大部分のタンパク質合成を抑制する一方で、選択的かつ迅速に必要なタンパク質を合成するという、外環境からのストレスに応答した翻訳レベルでの遺伝子発現制御機構の存在が示唆されている。

【0004】

近年では、様々な環境ストレスによる各mRNAの翻訳状態の変化を網羅的に解析する試みが行われている。これはリボソームの結合程度に応じて分画したmRNAをマイクロアレイ解析に供することによって、各遺伝子の翻訳状態を網羅的に把握するという試みである。(非特許文献2~5)。このような試みによって、ストレスによっても翻訳の抑制を受けない数多くのmRNA種の存在が明らかとなると共に、ストレスに応答した翻訳レベルの変化は、mRNA種によって抑制の有無が決定されるというデジタル的なものではなく、全体として連続的なものである様子が明らかとなってきた。

30

【0005】

一方、ストレスによる翻訳状態の変化と5'非翻訳領域(5'UTR)の関連性が示唆されている。例えば、トウモロコシHsp 101やADH、シロイヌナズナHSP 81-3の5'UTRをレポーター遺伝子に連結した解析から、ストレスによる翻訳抑制の回避には5'UTRが重要であることが報告されている(非特許文献6~8)。しかしながら、その詳細な機構はまだ明らかになっていない。

40

【0006】

Kawaguchiらは、前述のポリソーム/マイクロアレイ解析により明らかにした、乾燥ストレス下のシロイヌナズナ植物体における各mRNA種の翻訳状態と5'UTRの特徴との関連性に基づき、ストレス下での翻訳制御を規定する5'UTR内の因子の探索を試み、乾燥ストレス下の翻訳状態と5'UTRの長さや低いGC含有率との間に相関関係が存在することを報告している。しかしながら、当該報告においても、重要な配列特徴を見出すには至っておらず、Kawaguchiら自身も、「5'UTRの長さやGC含有率が、ストレス下における翻訳状態の決定的な要因ではないと考えられる」と言及している(非特許文献4)。

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Gebauer, F. and Hentze, M.W., 2004, Molecular mechanisms of translational control, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5: 827-835

【非特許文献2】Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A., and Bailey-Serres, J., 2004, Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in Arabidopsis thaliana, The Plant Journal, 38: 823-839.

【非特許文献3】Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B., and Bailey-Serres, J., 2005, Genome-wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in Arabidopsis Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation, Annals of Botany, 96: 647-660

10

【非特許文献4】Kawaguchi, R., and Bailey-Serres, J., 2005, mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis, Nucleic Acids Res., 3: 955-965

【非特許文献5】Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J. H., Larive, C. K., and Bailey-Serres, J., 2008, Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 56: 743-755

20

【非特許文献6】Matsuura, H., Shinmyo, A., and Kato, K. 2008. Preferential translation mediated by Hsp 81-3'5'-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

【非特許文献7】Dinkova, T. D., Zepeda, H., Martinz-Salas, E., Martinez, L. M., Nieto-Sotelo, J., and de Jimenez, E. S., 2005, Cap-independent translation of maize Hsp 101. The Plant Journal, 41: 722-731

【非特許文献8】Mardanov, E. S., Zamchuk, L. A., Skulachev, M. V., and Ravin, N. V., 2008, The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. Gene, 420: 11-16

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述のように、植物の環境ストレス下における翻訳制御を規定する5'UTRの配列特徴は明らかになっていない。

【0009】

本発明は、環境ストレス下における植物の翻訳状態の変化に関わる5'UTRにおける配列特徴を見出し、当該配列特徴を備えた組換え遺伝子、発現ベクター、及び形質転換体を提供することを主な課題とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、5'UTRの配列情報及び環境ストレス下での翻訳状態の変化に係る実測データを得、また当該データに基づいてin silico解析を行い、更に実測データに基づく検証を行うことにより、翻訳制御を規定する5'UTRの重要領域及び配列を同定することに成功し、更に鋭意検討を重ねて本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は例えば以下の項1～13の組換えDNA分子、人工mRNA分子、ベクター、及び形質転換体、並びに該形質転換体を用いて前記組換え遺伝子がコードするタンパク質を産生させる方法、遺伝子製造方法、翻訳抑制回避方法を包含する。

50

項 1 .

以下の (a) 又は (b) の 5 ' UTR を有する mRNA をコードする組換え DNA 分子。

(a)

(i) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 4 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(ii) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 6 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(iii) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 2 0 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 2 0 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(iv) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 3 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 3 6 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、
又は

(v) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 0 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 6 0 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR

(b) (a) の 5 ' UTR の塩基配列において、1 又は数個の塩基が置換され、かつ、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する 5 ' UTR。

項 2 .

(a) の 5 ' UTR が、5 ' 端に配列番号 4 、 6 、 2 0 、 3 6 、又は 6 0 の塩基配列を有する 5 ' UTR である、請求項 1 に記載の組換え DNA 分子。

項 3 .

項 1 又は 2 に記載の組換え DNA 分子をプロモーターの転写開始点直後に連結してなるベクター。

項 4 .

項 3 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

項 5 .

形質転換体が形質転換植物である、項 4 に記載の形質転換体。

項 6 .

項 4 又は 5 に記載の形質転換体を、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレス下で生育させ、前記組換え DNA 分子がコードするタンパク質を産生させる方法。

項 7 .

項 3 に記載のベクターを植物に導入し、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避できる植物を製造する方法。

項 8 .

以下の (a) 又は (b) の 5 ' UTR を有する mRNA をコードするよう塩基配列を組み換えて、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する遺伝子を製造する方法。

(a)

(i) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 4 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(ii) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 6 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(iii) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 2 0 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 2 0 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、

(iv) 5 ' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 3 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5 ' 端から 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列が配列番号 3 6 の 1 2 ~ 3 2 番目の塩基配列からなる 5 ' UTR、
又は

10

20

30

40

50

(v) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 60 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 60 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR
 (b) (a) の 5' UTR の塩基配列において、1 又は数個の塩基が置換され、かつ、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する 5' UTR。

項 9 .

(a) の 5' UTR が、5' 端に配列番号 4、6、20、36、又は 60 の塩基配列を有する 5' UTR である、項 8 に記載の遺伝子を製造する方法。

項 10 .

以下の (a) 又は (b) の 5' UTR を有する mRNA をコードするよう、任意の遺伝子の塩基配列を組み換えて、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスにより、当該遺伝子がコードするタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避する方法。

10

(a)

(i) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 4 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(ii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 6 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(iii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 20 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 20 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR

20

(iv) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 36 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 36 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
 又は

(v) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 60 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 60 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR

(b) (a) の 5' UTR の塩基配列において、1 又は数個の塩基が置換され、かつ、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する 5' UTR。

項 11 .

30

(a) の 5' UTR が、5' 端に配列番号 4、6、20、36、又は 60 の塩基配列を有する 5' UTR である、項 10 に記載のタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避する方法。

項 12 .

以下の (a) 又は (b) の 5' UTR を有する人工 mRNA 分子。

(a)

(i) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 4 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 4 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(ii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 6 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 6 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、

(iii) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 20 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 20 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR

40

(iv) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 36 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 36 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR、
 又は

(v) 5' 端から 1 ~ 7 番目が配列番号 60 の 1 ~ 7 番目の塩基配列からなり、5' 端から 12 ~ 32 番目の塩基配列が配列番号 60 の 12 ~ 32 番目の塩基配列からなる 5' UTR

(b)

(a) の 5' UTR の塩基配列において、1 又は数個の塩基が置換され、かつ、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも 1 種の環境ストレスによる翻訳抑制を

50

回避する5' UTR。

項 1 3 .

(a) の5' UTRが、5' 端に配列番号 4、6、20、36、又は60の塩基配列を有する5' UTRである、項 8 に記載の人工 mRNA 分子。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、環境ストレス下において翻訳抑制が回避できる組換え遺伝子が提供される。また、当該組換え遺伝子をプロモーターの転写開始点直後に連結してなるベクター、該ベクターを含む形質転換体が提供される。これらにより、環境ストレス下においても翻訳の抑制を受けずに高い効率で遺伝子の発現を行うことが可能となる。更にこれらの技術は、特に環境ストレス耐性植物の作製や植物における安定した有用物質の生産技術の確立にも寄与する。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】構築したプラスミドの概略を示す図面である。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、NcoI / AatIIサイトをを用いてf-luc mRNA合成用プラスミドに挿入している。

【図 2】配列情報と相対活性値の設定例を示す図面である。i番目のサンプルについて配列のk番目から長さLの範囲を抜き出した配列を $Seq_i = s_{ik}s_{ik+1}\dots s_{ik+L-1}$ としている。ここで、i番目のサンプルにおける塩基配列上の位置を5' 端より3' 方向に、 $s_1, s_2, \dots, s_k, \dots, s_M$ とする。また、i番目のサンプルの相対活性値を y_i とする。

20

【図 3】N個のサンプルにおける区間 $[k, k+L-1]$ の長さLの配列におけるt個の連続塩基 $R_1(t), R_2(t), \dots, R_v(t), R_v(t)$ の頻度の設定例を示す図面である。N個のサンプルにおける塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列において少なくとも1回出現するt個の塩基からなる配列を $R_1(t), R_2(t), \dots, R_v(t), R_v(t)$ としている。また、そのそれぞれの配列の出現頻度を $f_i^{(k, k+L-1)}(R_1(t)), \dots, f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t)), \dots, f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ としている。v番目の配列頻度は変量 $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ と表している。

【図 4】j+k番目の塩基位置における回帰係数と4つの塩基と対応した回帰係数の平均と普遍分散の設定例を示す図面である。k+j番目の4つの塩基A, U, G, Cそれぞれにおける平均値ならびに不偏分散を基に、4つの塩基A, U, G, Cに対応した回帰係数の分布が統計的に有意に正もしくは負とみなせるか否かを検定し、塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列のどの位置のどのような塩基が正あるいは負のいずれかの条件で相対活性値に寄与するかという情報を得る。

30

【図 5】熱ストレスによるポリソーム形成状態の変化を示す指標である PSのヒストグラムを19099種のmRNAについて示した図面である。PSの値が小さいほどより顕著に阻害される傾向を示す。縦軸は遺伝子数を示す。

【図 6】プロトプラスト過性発現実験の概要を示す図面である。シロイヌナズナ培養細胞T87から調製したプロトプラストにin vitro合成したfirefly luciferase mRNA (f-luc mRNA)とRenilla luciferase mRNA (r-luc mRNA)をPEG法により導入した後、分割したプロトプラストをそれぞれ通常温度(22)もしくは熱ストレス下(Heat stress)に20分間静置する。その後プロトプラストを回収し、ルシフェラーゼ活性(LUC activities)を測定する。m⁷Gはキャップ構造を、n=49はポリA配列の長さを示す。

40

【図 7】(A)は、PSの一定値ごとに選択した17遺伝子のPS値を、PSのヒストグラム(n=19099)上に丸印で示した図面である。(B)は選択した遺伝子の5' UTRを連結した、+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを等量ずつ、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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)、熱ストレス(37)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した結果を示す図面である。縦軸には選択した遺伝子のAGIcodeおよび括弧内にPSの値を示す。横軸には各構築の22における活性値を1とした相対活性値を示す。(a)は相対f-luc活性値、(b)は相対r-luc活性値を示す。値は3回の独立した実験

50

の平均値及び標準誤差で示した。

【図8】(A)は、PSのランキング上位を中心に選択した22遺伝子のPS値を、PSのヒストグラム上に丸印で示した図面である。(B)は、選択した遺伝子の5' UTRを連結した、+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを等量ずつ、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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)、熱ストレス(37)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した結果を示す図面である。縦軸には選択した遺伝子のAGIcodeおよび括弧内にPSの値を示す。横軸には各構築の22における活性値を1とした相対活性値を示す。(a)は相対luc活性値、(b)はr-luc活性値を示す。値は、3回の独立した実験の平均値及び標準誤差で示した。

10

【図9】図7及び図8に示した22に対する37の相対活性値とPS値の相関を、試験した計39遺伝子について示す図面である。縦軸は対数表示である。rはピアソン相関係数を示す。相関の有無は統計的に検定している(p)。

【図10】PLS法に基づいた回帰モデルの構築と回帰係数の算出の概念図を示す図面である。

【図11】本試験で扱った39遺伝子の5' UTRの配列情報及び一過性発現実験より得られた相対活性値を用いたin silico解析による、5' UTR内の熱ストレス下における翻訳に影響を及ぼす領域を示す図面である。横軸には5' UTR内の5' 端からの距離または塩基のポジションを示している。1~9(1~7)は、5' 端から1~9番目の塩基(実際の5' UTRの領域は前記領域の値から2を引いた1~7塩基)の領域を示す。14~34(12~32)は、5' 端から14~34番目の塩基(実際の5' UTRの領域は前記領域の値から2を引いた12~32塩基)の領域を示す。縦軸にはin silico解析によって示された、予測精度を表すQ²値を示している。Q²値が高い領域ほど予測精度が高く、その領域だけで構築したモデルを説明することができる。つまりその領域が熱ストレス下でのレポーターmRNAの選択的な翻訳に直接的に影響していることを示している。なお、一過性発現実験で用いたmRNAには全てT3プロモーターからの転写後に5' 端にGGが付加されており、それを含めた配列(GG + 5' UTRの配列)をin silico解析に用いていることから、実際の5' UTRの領域は領域の値から2を引いたものになる。

20

【図12】1~7番目の塩基を基にしたPLS法によって予測された相対活性値と実測の相対活性値との相関を示す図面である。縦軸には、PLS法によって5' 端9塩基(実際には7塩基)を基にした回帰モデルから予測された相対活性値、横軸には39遺伝子の実測の相対活性値を示している。rはピアソン相関係数を示す。p<0.01は無相関検定の結果を示す。

30

【図13】5' UTRの5' 端7塩基がレポーターmRNAの熱ストレス下での翻訳に与える影響を示した図面である。相対活性値の高かった5' UTR(good(1); At4g14560、good(2); At3g15450、good(3); At1g77120、黒文字)と相対活性値の低かった5' UTR(bad(1); At3g47610、bad(2); At5g57440、白文字)の5' 端7塩基を入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳への影響を検証している。(a)、(c)、(e)、(g)、(i)、(k)は5' UTRの全長からなるmRNAである。(b)、(d)、(f)、(h)、(j)、(l)は、それぞれの5' UTRの1~7番目の塩基を、示してある5' UTRに置換したものである。また、図面右には、図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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)、熱ストレス(37)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した場合における、22における活性値を1としたときのf-luc活性値を示す。値は、3回の独立した実験の平均値及び標準誤差で示した。

40

【図14】PLS法によって構築した12~32番目の塩基を基にした回帰モデルから予測された相対活性値と実測の相対活性値との相関を示す図面である。縦軸には、PLS法によって12~32番目の塩基を基にした回帰モデルから予測された相対活性値を示す。横軸には39遺伝子の実測の相対活性値を示した。rはピアソン相関係数を示す。p<0.01は無相関検定の結果を示す。

【図15】5' UTRの5' 端7塩基および12~32番目の塩基がレポーターmRNAの熱ストレス下

50

での翻訳に与える影響を短いペア(47bpと42bp)の入れ換えにより調べた図面である。相対活性値の高かった5' UTR(At3g15450)と相対活性値の低かった5' UTR(At5g39740)の5' 端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を入れ換えることによるレポーター-mRNAの翻訳への影響を検証した。(a)、(e)は5' UTRの全長配列からなるものを示す。(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を他方の5' UTRに置換したものを示す。図面右には、図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定したときの、22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示す。値は3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差で示した。

10

【図16】5' UTRの5' 端7塩基および12~32番目の塩基がレポーター-mRNAの熱ストレス下での翻訳に与える影響を長いペア(210 bpと198 bp)の入れ換えにより調べた結果を示す図面である。相対活性値の高かった5' UTR(At4g12000)と相対活性値の低かった5' UTR(At2g41630)の5' 端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を入れ換えることによるレポーター-mRNAへの発現への影響を検証した。(a)及び(e)は、5' UTRの全長配列からなるものを示す。(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を他方の5' UTRに置換したものを示す。図面右には、図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定したときの、22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示す。値は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差で示した。

20

【図17】熱ストレス下での翻訳抑制の回避に貢献する領域と5' 末端との距離を調べた結果を示す図面である。相対活性値の低かった5' UTR(At5g39740)に相対活性値の高かった5' UTR(At3g15450)を入れ換え、さらに5' 端との距離を変化させ、熱ストレス下でのレポーター-mRNAの翻訳に与える影響を調べた。(a)は示した5' UTRの全長からなるものを示す。(b)、(c)、(d)は、その5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を相対活性値の高かった遺伝子の5' UTRに置換したものを示す。図面右には、図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定したときの、各構築の22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示す。値は3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差で示した。

30

【図18】in silicoでのPLS解析によって構築されたモデル式から予測される相対活性値とポリソーム/マイクロアレイにて解析されたPSとの相関を示した図面である。横軸にポリソーム/マイクロアレイにて得られたPSを示す。縦軸には既に5' UTRの配列情報が整理されている1764遺伝子についてPLSによるin silico解析によって得られた構築モデルから予測された相対活性値を示す。rはピアソン相関係数を示す。p<0.01は無相関検定の結果を示す。

40

【図19】PLS回帰係数を用いた、各塩基位置における各塩基の相対活性値への寄与度の算出概念図を示した図面である。

【図20】本試験で扱った39遺伝子の5' UTRの配列情報及び一過性発現実験より得られた相対活性値を用いたPLSモデル構築より得られた、熱ストレス下におけるレポーター-mRNAの翻訳の抑制回避に対して最も効果的であると予想される配列の抽出結果を示した図面である。横軸には5' UTR内での塩基のポジションを示している。縦軸にはPLS法により構築されたモデルを基に算出された、各塩基の重み(発現強度)を示している。これが高いほど熱ストレス下でのレポーター-mRNAの翻訳の抑制回避に寄与していることを示している。統計的に有意であるもの(p<0.05)の中で各塩基の重みが最も高いものを選択し四角で示した。また、4種の塩基とも有意でない場合は、塩基の重みが一番高い塩基を選択し、丸枠

50

で示した。なお、一過性発現実験で用いたmRNAには全てT3プロモーターからの転写後に5'端にGGが付加されており、それを含めた配列 (GG + 5' UTRの配列)をin silico解析に用いていることから、実際の5' UTRの領域は領域の値から2を引いたものになる。

【図21】5' UTRの5'端7塩基および12~32番目の塩基を最適配列に入れ換えた場合の、レポーターmRNAの熱ストレス下での翻訳に与える影響を、短い5' UTR (42 bp)を用いて調べた結果を示す図面である。相対活性値の低かった遺伝子 (At5g39740) の5' UTRの5'端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を最適配列に入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳への影響を検証した。(a)は5' UTRの全長配列を示す。(b)は(a)に対して、示した番号の塩基領域を相対活性値の高かった5' UTR (At3g15450、good)の同領域に置換したものを示す。(c)、(d)、(e)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を最適配列に置換したものを示す。図面右には、図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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)、熱ストレス (37)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定したときの、各構築の22における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した結果を示す。値は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

10

【図22】5' UTRの5'端7塩基および12~32番目の塩基を最適配列に入れ換えた場合の、レポーターmRNAの熱ストレス下での翻訳に与える影響を長い5' UTR (198 bp)を用いて調べた結果を示す図面である。相対活性値の低かった5' UTR (At2g41630)の5'端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を最適配列に入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳への影響を検証した。(a)は5' UTRの全長配列を示す。(b)は(a)に対して、示した番号の塩基領域を相対活性値の高かった5' UTR (At4g12000、good)の同領域に置換したものを示す。(c)、(d)、(e)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を最適配列に置換したものを示す。なおdとeについては12~32番目の塩基を最適配列に置換した場合にAUGが生じるため、33番目のuをaに置換している。図面右には、各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA mRNAと共にプロトプラストに導入し、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)、熱ストレス (37)で20分間静置し、その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定したときの、各構築の22における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した結果を示す。値は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

20

30

【図23】一般的な植物発現ベクターの構築図を示す図面である。「CaMV35S」はカリフラワーモザイクウイルス35S rRNA遺伝子由来のプロモーター領域を、「NOS-T」はアグロバクテリウムのノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター領域をそれぞれ表す。「Xb」、「Sac」はそれぞれXbaI、SacI制限酵素認識部位を表す。矢印は転写開始点および転写方向を示す。

【図24】検証に用いた合成mRNAの概略を示す図面である。At1g77120+は、At1g77120の5' UTRに予想されるベクター由来の配列が付加された場合のmRNAを示す。At1g77120は、At1g77120の5' UTRのみを持つmRNAを示す。また、Cは、CaMV35Sプロモーターの転写開始点、即ち、5' UTRの5'末端を示す。

【図25】図24で示した各構築物At1g77120+及びAt1g77120について、22における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した図面である。値は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

40

【図26】(a) At4g14560、At1g77120、At3g47610、At5g39740の5' UTRをHSPターミネーターを下流に持つレポーターGUS遺伝子に付加し、CaMV35Sプロモーター支配下に置き構築したバイナリーベクターの構築図を示す。(b) At4g14560+形質転換細胞とAt1g77120+形質転換細胞に導入されたバイナリーベクターの構築図を示す。

【図27】ポリソーム/RT-PCR解析の概要を示す。

【図28】At3g47610形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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

50

より分画した後、254 nmの吸光プロファイルを記録した結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt3g47610 5' UTR付加GUS、At1g77120、At4g14560、Actin2それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図29】At5g39740形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt5g39740 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図30】At4g14560形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供しそれぞれの画分に存在するAt4g14560 5' UTR付加GUS、At4g14560、At3g47610、Actin2それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図31】At1g77120形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供しそれぞれの画分に存在するAt1g77120 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図32】At4g14560+形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供しそれぞれの画分に存在するAt4g14560+ 5' UTR付加GUS、At4g14560、At3g47610、Actin2それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図33】At1g77120+形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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

10

20

30

40

50

より分画した後、254 nmの吸光プロファイルを記録した結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供しそれぞれの画分に存在するAt1g77120+ 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2 それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図34】At5g39740-S形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。独立に取得した2ラインの形質転換細胞を用いた結果を示す。(A)通常細胞(22)及び熱ストレス処理した細胞(37 /10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び37 /10 minの熱ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt5g39740-S 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2 それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図35】At3g47610形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。(A)通常細胞(22)及び塩ストレス処理した細胞(200 mM NaCl/10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び200 mM NaCl/10 minの塩ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt3g47610 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2 それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図36】At4g14560形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。(A)通常細胞(22)及び塩ストレス処理した細胞(200 mM NaCl/10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び200 mM NaCl/10 minの塩ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt4g14560 5' UTR付加GUS、At4g14560、At3g47610、Actin2 それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図37】At1g77120形質転換細胞におけるポリソーム/RT-PCR解析結果を示す。(A)通常細胞(22)及び塩ストレス処理した細胞(200 mM NaCl/10 min)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結果を示す。(B)通常細胞及び200 mM NaCl/10 minの塩ストレス処理した細胞由来の細胞抽出液を分画したショ糖密度勾配を15の画分に分けて回収し、各画分からRNAを抽出した。各画分の位置は上記(A)の吸光プロファイルに対応している。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の位置を図に示す。(C)抽出したRNAを等容量ずつRT-PCR解析に供し、それぞれの画分に存在するAt1g77120 5' UTR付加GUS、At1g77120、At3g47610、Actin2 それぞれのmRNAを検出した結果を示す。

【図38】形質転換細胞を3日間通常培養し、その後熱ストレス条件(24時間/32)下で培養したときの、3日目における活性値を1としたときの4日目の相対GUS活性値をグラフとして示す。培養条件及び測定回数は次の通り。通常の植え継ぎ後、各形質転換細胞を3日間/22 の通常条件で培養した後、細胞を分取した。残りの培養液を24時間/32 で培養した後、再び細胞の分取を行った。分取した細胞から、粗タンパク質溶液を調製し、タンパク質量当たりのGUS活性を測定した。活性測定はそれぞれ4もしくは5回行い、GUS活性

10

20

30

40

50

の平均値、及び標準偏差を示した。

【図39】本発明の予測方法を実現するための処理を行うコンピュータ・システムの概略構成を示すブロック図である。コンピュータ・システム1は、データの演算を行うCPU10と、演算の作業領域に使用するメモリ11と、演算データを記録する記録部12と、各部の間でデータを伝送するバス13と、外部機器とのデータの入出力を行うインタフェース部14（図ではI/F部と記す）とを備えている。なお、図では記載を省略しているが、コンピュータが通常備えている操作手段（キーボード等）や表示手段（ディスプレイ等）も備えている。システム1が行う処理は、実際にはシステム1のCPU10が行う処理を意味する。CPU10はメモリ11を作業領域として必要なデータ（処理途中の中間データ等）を一時記憶し、記録部12に演算結果等の長期保存するデータを適宜記録する。また、システム1は、本発明の予測方法の各ステップの処理を行うために使用するプログラムを、例えば実行形式（例えば、C言語等のプログラミング言語からコンパイラにより変換されて生成される）で記録部12に予め記録しており、システム1は、記録部12に記録したプログラムを使用して処理を行う。

10

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明について、さらに詳細に説明する。なお、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書などの作成のためのガイドライン」（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。特に、DNAはデオキシリボ核酸を表し、RNAはリボ核酸を表し、mRNAはメッセンジャーRNAを表す。

20

【0015】

また、遺伝子操作等の分子生物学的操作については、適宜公知の方法を用いることができる。例えば、特に断りのない限り、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press)等に記載の方法に従って行うことができる。

【0016】

組換え遺伝子（組換えDNA分子）

本発明では、遺伝子の実体はmRNAをコードしているDNA分子である。遺伝子から転写されたmRNAは5'UTR、ORF（open reading frame）、及び3'UTRの3つの領域に区分けされる。本発明の組換え遺伝子は、特定の5'UTR配列を有するmRNAをコードするように組み換えられた遺伝子である。すなわち特定の5'UTR配列をコードする組換え遺伝子であるともいえる。特定の5'UTR配列を有するmRNAを発現する組換え遺伝子であるともいってもよい。本発明の組換え遺伝子は、自然界に存在する遺伝子（つまり、各種生物種が有する遺伝子）ではなく、人工的に少なくとも5'UTRに相当する部分の塩基配列を変化させて製造した遺伝子である。

30

【0017】

なお、遺伝子がコードするmRNAを翻訳することでタンパク質が得られる。よって、遺伝子はタンパク質をコードしているといえる。また、mRNAはタンパク質をコードしているともいえる。

40

【0018】

遺伝子の実体はDNA分子であるため、本明細書において、矛盾がない限り「遺伝子」を「DNA分子」と換言してもよい。例えば、組換え遺伝子は、組換えDNA分子と換言できる。詳細には、本発明の組換え遺伝子は、mRNAをコードするDNAの塩基配列を組み換えて（変化させて）得た組換えDNA分子である。また、好ましくは、単離された組換えDNA分子である。当該組換えDNA分子から転写されて得られるmRNA分子は、特定の5'UTR配列を有する。

【0019】

また、本発明は、当該特定の5'UTR配列を有する人工mRNA分子も包含する。当該人工mRNA分子は、本発明の組換えDNA分子が転写されて得られるものであってもよく

50

、化学的に合成されたものであってもよい。

【 0 0 2 0 】

遺伝子の塩基配列を人工的に変化させる方法は、様々な公知の方法が知られており、適宜選択して使用することができる。例えば、適切な制限酵素により遺伝子を切断した後新たな核酸断片を当該切断部へ連結させることにより、又は、目的遺伝子と完全に相補的ではないプライマー対を設計してPCRを行うことにより、あるいはこのような手法を組み合わせることで、遺伝子の塩基配列を改変することができる。

【 0 0 2 1 】

自然界に存在するほとんどの遺伝子は、熱ストレス又は塩ストレスといった環境ストレス下では、通常的环境下に比べてmRNAからタンパク質への翻訳が抑制される。本発明の組換え遺伝子は、特定の5' UTR配列をコードすることにより、環境ストレス（特に熱ストレス及び塩ストレス）下での翻訳抑制を回避できる。つまり、本発明の組換え遺伝子（組換えDNA分子）から転写されてできるmRNA分子は、特定の5' UTR配列を有するため、環境ストレスにより当該mRNA分子からタンパク質への翻訳が抑制されるのを低減することができ、好ましくは翻訳が抑制されるのを防止することができ、より好ましくは翻訳が促進され得る。

【 0 0 2 2 】

当該特定の5' UTR配列とは、5' 端から1～7番目が特定の塩基配列であり、かつ5' 端から12～32番目が特定の塩基配列である5' UTR配列をいう。当該特定の5' UTR配列の5' 端から8～11番目の塩基配列は、特に制限されない。例えば、5' 端から8～11番目の各塩基はアデニン、ウラシル、グアニン、又はシトシン（A、U、G、又はC）のいずれでもありえる。好ましくは、自然界に存在するmRNAが有する5' UTRの5' 端から8～11番目の塩基配列である。より好ましくは、本発明の組み換え遺伝子により環境ストレスによる翻訳抑制を回避させて発現させるタンパク質をコードする、自然界に存在するmRNAが有する5' UTR配列の5' 端から8～11番目の塩基配列である。

【 0 0 2 3 】

当該特定の5' UTR配列は、より詳細には、5' 端から1～7番目及び12～32番目の塩基配列が、配列番号4、6、20、36、又は60の配列の1～7番目及び12～32番目の塩基配列である。

【 0 0 2 4 】

配列番号4は遺伝子At4g14560の5' UTR配列であり、配列番号6は遺伝子At1g77120の5' UTR配列であり、配列番号20は遺伝子At3g15450の5' UTR配列であり、配列番号36は遺伝子At4g12000の5' UTR配列であり、配列番号60は下述する方法により予測された最適5' UTR配列である。それぞれの5' UTR配列は表1に示す通りである。なお、予測最適配列（配列番号60）の8～11番目の塩基は「n」で表されているが、当該nはアデニン、ウラシル、グアニン、又はシトシン（A、U、G、又はC）を示す。つまり、nはA、U、G、又はCのいずれの塩基でもよいことを示す。

【 0 0 2 5 】

また、それぞれの配列の1～7番目及び12～32番目の塩基配列には、表1において下線を引いた。当該特定の5' UTR配列は、5' 端から1～7番目及び12～32番目の塩基配列が、それぞれ表1の下線で示す塩基配列である5' UTR配列であるということもできる。つまり、当該特定の5' UTRは、

5' 端から1～7番目の塩基配列がacacaagであり、5' 端から12～32番目の塩基配列がuucaaggauaucaaaucacaaである5' UTR、

5' 端から1～7番目の塩基配列がuacaucaであり、5' 端から12～32番目の塩基配列がcacacaaacuaacaaaagauである5' UTR、

5' 端から1～7番目の塩基配列がauaacacであり、5' 端から12～32番目の塩基配列がcaagcauuggauuuaucaaaagである5' UTR、

5' 端から1～7番目の塩基配列がauuaacaであり、5' 端から12～32番目の塩基配列がaaccgaaaaagaaaaaaacuである5' UTR、又は

10

20

30

40

50

しくは32～120塩基長、よりさらに好ましくは32～60塩基長である。また、5'端から1～7番目及び12～32番目以外の塩基は特に制限されない。好ましくは、5'端から1～7番目及び12～32番目以外の塩基はアデニン、ウラシル、グアニン、又はシトシン(A、U、G、又はC)である。

【0028】

また、本発明の組換え遺伝子は、上述の特定の5' UTR配列において1又は複数個(好ましくは1又は数個)の塩基が置換され、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも1種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避する5' UTRをコードする遺伝子も包含する。つまり、本発明の組換え遺伝子(組換えDNA分子)には、

- 上述の特定の5' UTR配列において1又は複数個(好ましくは1又は数個)の塩基が置換された塩基配列からなるポリヌクレオチドを5' UTRとして有するmRNAをコードし、かつ

- 当該mRNAからタンパク質への翻訳が、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも1種の環境ストレスにより抑制されるのを回避する

という特徴を有する組換え遺伝子(組換えDNA分子)も包含される。

【0029】

当該5' UTR配列において置換される塩基数は、好ましくは1～9個であり、より好ましくは1～5個であり、さらに好ましくは1～3個である。また、組換え遺伝子が熱ストレス及び/又は塩ストレスによる翻訳抑制を回避できるか否かは、例えば、当該組換え遺伝子をプロモーターの転写開始点直後に連結してなるベクターを宿主(好ましくは植物、より好ましくは双子葉植物、さらに好ましくはシロイヌナズナ、又はこれらの植物由来の細胞)に導入して形質転換体を作製し、当該形質転換体を熱ストレス及び/又は塩ストレス下で生育させた時、当該組換え遺伝子がコードするタンパク質が通常条件下で生育させたのと同量以上の量が産生されるか否かで判断することができる。つまり、通常条件下で生育させたのと同量以上の量のタンパク質を産生できる場合、翻訳抑制を防止、または翻訳を促進できたと判断できる(各ストレス条件及び通常条件については下記「形質転換体」欄を参照)。タンパク質量の比較は、例えばポリソーム解析やRT-PCR解析、タンパク質量量によって行うことができる。これらの解析は公知の方法に従って行うことができる。また、タンパク質量量も公知の方法(例えばBradford法)に従って行うことができる。

【0030】

より具体的な好ましい当該特定の5' UTR配列としては、配列番号4、6、20、36、又は60の配列を5'端に有する5' UTR配列を挙げることができ、より好ましくは配列番号4、6、20、36、又は60の配列からなる5' UTR配列を挙げることができる。

【0031】

本発明の組換え遺伝子は、当該特定の5' UTR配列を有するmRNAをコードするように組み換えられた遺伝子であればよく、当該遺伝子にコードされるタンパク質(ペプチドを含む)の種類は特に限定されない。タンパク質(ペプチドを含む)としては、薬理活性を有するタンパク質が好ましく例示できる。具体的には、例えば、酵素、転写因子、サイトカイン、膜結合タンパク質、各種ペプチドホルモン(例えば、インスリン、成長ホルモン、ソマトスタチン)、ワクチンや抗体などの医療用タンパク質、等が挙げられる。また、本発明の組換え遺伝子は、このようなタンパク質をコードする遺伝子に、GFPやルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子、HisタグやFLAG(登録商標)タグ等のタグペプチドの配列が連結されてなる遺伝子や、人工的に設計されたキメラ遺伝子であってもよい。

【0032】

組換え遺伝子の原料とする遺伝子(DNA分子)は公知のものを用いることができる。公知の遺伝子配列は例えばNCBI(National Center for Biotechnology Information)が運営する配列データベースGenBank等のデータベースから入手することができる。当該配列情報を基に、例えばPCR等の常法により各種生物から遺伝子(DNA分子)を単離できる。また、各販社から例えばcDNAライブラリー等の形態で既知遺伝子が販売されており、これを購入して用いることができる。

【0033】

本発明の組換え遺伝子の原料に用いる遺伝子としては、特に制限されないが、植物由来の遺伝子が好ましく、双子葉植物由来の遺伝子がより好ましく、シロイヌナズナ由来の遺伝子がさらに好ましい。つまり、本発明の組換え遺伝子(DNA分子)がコードするタンパク質は、植物由来タンパク質が好ましく、双子葉植物由来タンパク質がより好ましく、シロイヌナズナ由来タンパク質がさらに好ましい。

【0034】

なお、下述するように、本発明の組換え遺伝子は、ベクターに組み込んでよく、また、当該ベクターを宿主に導入して形質転換体を作製することができる。このとき、ベクターを導入する宿主のコドン使用頻度が公知であれば、導入前に組換え遺伝子のORF部分の塩基配列を当該宿主に好適なコドン使用頻度に適合するよう変更してもよい。

10

【0035】

ベクター

本発明のベクターは、上述の本発明の組換え遺伝子をプロモーターの転写開始点直後に連結してなるベクターである。より詳細には、本発明のベクターは、プロモーター配列を備えたクローニングベクターに、本発明の組換え遺伝子をプロモーターの転写開始点直後に連結してなる発現ベクターである。

【0036】

用いるクローニングベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター、人工染色体ベクター(例えばYAC、BAC、PAC)等が挙げられる。これらの中でも、プラスミドベクター、ウイルスベクターが好ましい。また、用いるクローニングベクターは、遺伝子からタンパク質を発現させるためベクターを導入する生物又は細胞(即ち宿主)に応じて、適宜選択できる。本発明のベクターは、特に植物(植物細胞含む)へ導入された場合に、熱ストレス及び/又は塩ストレスといった環境ストレス下において、組換え遺伝子がコードするタンパク質の発現が抑制されないという特徴を有するため、クローニングベクターの中でも植物に通常用いられるアグロバクテリウム由来のプラスミドが好ましく、アグロバクテリウム由来でT-DNAを有するプラスミド(Ti-プラスミド)がより好ましい。

20

【0037】

クローニングベクターはプロモーター配列を有するものを用いる。プロモーター配列は、宿主の種類に応じて、適宜適切なものを選択して用いることができる。例えば、宿主が動物(動物細胞を含む)である場合は、ヒトサイトメガロウイルス由来プロモーター(CMVプロモーター)や、或いはSV40プロモーター等を例示できる。また、宿主が植物(植物細胞を含む)である場合は、カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターであるCaMV35Sプロモーター等を例示できる。また、宿主が大腸菌等の細菌類である場合、T7プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等を例示できる。宿主が酵母である場合、PGKプロモーター等を例示できる。宿主が昆虫細胞である場合は、例えば、P10プロモーター等が例示できる。本発明のベクターは、特に植物(植物細胞を含む)へ導入された場合に、熱ストレス及び/又は塩ストレスといった環境ストレス下において、組換え遺伝子がコードするタンパク質の発現が抑制されないという特徴を有するため、CaMV35Sプロモーターが特に好ましい。

30

40

【0038】

また、クローニングベクターは、薬剤耐性遺伝子等の選抜マーカーとして利用できる遺伝子群を有することが好ましい。

【0039】

このようなクローニングベクターは、公知であるもの、特に各販社から購入してできるものを用いることができる。

【0040】

上述の組換え遺伝子を、クローニングベクターへ組み込み連結する方法としては、公知

50

の方法を用いることができる。例えば、上述の組換え遺伝子を、制限酵素サイトを付加したプライマーを用いてPCR法により増幅させ、これを制限酵素で処理し、制限酵素処理済みクローニングベクターへと連結させて導入することができる。

【0041】

なお、本発明のベクターは、プロモーターの転写開始点直後に上述の組換え遺伝子を連結させたものであるが、例えば上記制限酵素を利用したクローニング手法では、プロモーター配列と組換え遺伝子配列との連結部に制限酵素サイトが存在することになる。このような場合は、例えば当該制限酵素サイトを除くようインバースPCRを行い、得られる増幅産物をセルフライゲーションさせることにより、連結部に存在する制限酵素サイトを除いたベクターを作製すればよい。なお、この場合、当該インバースPCRに用いるプライマーセットは、PCR増幅産物がセルフライゲーションできるように設計することが好ましい。また、セルフライゲーションには例えばリガーゼを用いればよい。

10

【0042】

本発明の組換え遺伝子をプロモーター配列の“転写開始点直後に連結する”とは、宿主内で本発明の組換え遺伝子を発現させた時に、本発明の組換え遺伝子がコードするmRNAの5'端(すなわち5'UTR末端)に、0、1、2、又は3塩基(好ましくは0、1、又は2塩基)のプロモーター配列から転写された塩基が結合した転写産物が得られるように、本発明の組換え遺伝子とプロモーター配列を連結させることをいう。より具体的には、プロモーター配列と本発明の組換え遺伝子配列とを直接連結させることをいう。プロモーター配列と本発明の組換え遺伝子配列の間に余分な塩基配列が存在しないように連結させる、ともいえる。このようにプロモーター配列と本発明の組換え遺伝子配列とが直接連結していても、遺伝子発現の際にはプロモーター配列の塩基が少数(例えば1、2、又は3塩基)転写される場合があり、このような転写が起こるベクターも本発明のベクターに含まれる。

20

【0043】

形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明のベクターを含む形質転換体である。より詳細には、本発明の形質転換体は、本発明のベクターが導入され、本発明のベクターにより形質転換された形質転換体である。

【0044】

本発明のベクターを導入する生物又は細胞(宿主)は、特に制限されないが、本発明のベクターは、特に植物(植物細胞を含む)へ導入された場合に、熱ストレス及び/又は塩ストレスといった環境ストレス下において、組換え遺伝子の発現が抑制されないという特徴を有するため、植物(植物細胞を含む)であることが好ましい。また、ベクターの保存及び増産等を考慮すると、大腸菌等の細菌類を宿主とすることが好ましい。

30

【0045】

植物としては、双子葉植物が挙げられ、より具体的にはシロイヌナズナ、タバコ、ダイズ、キク、レタス等が例示できる。植物細胞としては、例えば双子葉植物由来細胞が挙げられ、より具体的には、シロイヌナズナ由来細胞、タバコ由来細胞、ダイズ由来細胞、キク由来細胞、レタス由来細胞等が例示できる。また、植物細胞由来のプロトプラストもここでの植物細胞に含まれる。また、形質転換された植物細胞を培養して得られる植物体も本発明の形質転換体に含まれる。なお、形質転換の結果腫瘍組織やシュート、毛状根などが得られる場合は、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能である。また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン、例えば、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等の投与などにより植物体に再生させることができる。また、形質転換植物細胞を用いることにより、形質転換植物体を再生することもできる。再生方法としては、カルス状の形質転換細胞をホルモンの種類、濃度を変えた培地へ移して培養し、不定胚を形成させ、完全な植物体を得る方法が採用される。使用する培地としては、LS培地、MS培地などが例示される。

40

50

【0046】

また、本発明のベクターを宿主へ導入する方法は特に制限されず、宿主及びベクターの種類に応じて適宜適切な公知の方法を選択して用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、Tiプラスミドを用いた方法（例えばバイナリーベクター法、リーフディスク法）等が例示できるが、これらに制限されない。

【0047】

なお、ベクターが宿主に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、ベクター特異的プライマーを設計してPCRを行う。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用してもよい。

10

【0048】

本発明の形質転換体は、本発明のベクターにより形質転換されている。より詳細には、本発明の形質転換体では、本発明のベクターから本発明の組換え遺伝子が転写されmRNAができ、当該mRNAからタンパク質が翻訳される。上述の通り、本発明の組換え遺伝子は特定の5' UTR配列をコードしており、熱ストレス及び/又は塩ストレス下における翻訳抑制を回避又は低減できる。よって、本発明の形質転換体は、熱ストレス及び/又は塩ストレス下において、本発明の組換え遺伝子がコードするタンパク質を優先的に産生することができる。

20

【0049】

本明細書での熱ストレスとは、通常温度（室温：20～22 程度）より高い温度で形質転換体を生育させることで生じるストレスをいう。但し、形質転換体が生存可能な温度であることが好ましい。形質転換体が生存可能な温度は、組換え遺伝子から発現するタンパク質の種類及び宿主の種類等に応じて適宜設定することができる。より具体的には、好ましくは25 以上、より好ましくは25～37 、さらに好ましくは25～32 である。

30

【0050】

また、本明細書での塩ストレスとは、通常の土壌もしくは培地中の塩濃度（代表的には塩化ナトリウム（NaCl）濃度）以上の塩濃度で形質転換体を生育させることで生じるストレスをいう。但し、形質転換体が生存可能な塩濃度であることが好ましい。なお、通常の土壌もしくは培地中の塩濃度は、実質的に0 mMである。形質転換体が生存可能な塩濃度は、組換え遺伝子から発現するタンパク質の種類及び宿主の種類等に応じて適宜設定することができる。より具体的には、好ましくは50 mM NaCl以上、より好ましくは50～200 mM NaCl、さらに好ましくは50～100 mM NaClである。

【0051】

形質転換体を用いたタンパク質産生方法

40

本発明は、本発明の形質転換体を、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも1種の環境ストレス下で生育（培養）し、前記組換え遺伝子がコードするタンパク質を産生させる方法も包含する。形質転換体の生育又は培養方法は、宿主の生育又は培養方法において、環境ストレスを加えればよい。

【0052】

環境ストレス下では、通常ほとんどの遺伝子においてタンパク質の発現が翻訳レベルで抑制されるため、本発明の組換え遺伝子がコードするタンパク質を効率良く発現させることができる。また、他のタンパク質の発現が抑制されるため、産生させたタンパク質の精製も容易であり、効率的である。産生タンパク質の精製は公知の方法に従えばよく、例えばクロマトグラフィーにより精製を行うことができる。より具体的には、例えば、産生させ

50

たタンパク質を認識する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、産生させたタンパク質が何らかのタグ配列を有する場合は、そのタグを指標として精製することもできる。

【0053】

また、宿主が植物（植物細胞を含む）である場合、本発明の組換え遺伝子が二次代謝物を産生するために必要な酵素をコードすることで、二次代謝物を優先的に産生させることも可能と考えられる。つまり、植物は種々の二次代謝物を産生しているところ、当該二次代謝物を産生するために必要な酵素の遺伝子の5' UTRをコードする部分を改変して本発明の組換え遺伝子とし、これをプロモーターの転写開始点直後に連結してなるベクターを含む形質転換植物を作出すれば、当該形質転換植物に二次代謝物の原料となる成分を供給し環境ストレスをかけることで、目的の二次代謝物を優先的に産出させることも可能と考えられる。

10

【0054】

さらにまた、本発明は、上記本発明のベクターを植物（植物細胞を含む）に導入することにより、熱ストレス及び塩ストレスからなる群より選択される少なくとも1種の環境ストレスによる翻訳抑制を回避できる植物を製造する方法も包含する。このようにして製造される植物は、前記環境ストレス下で、本発明の組換え遺伝子がコードするタンパク質を効率良く発現できる。ベクターの導入方法としては、上述のように適切な公知の方法を選択して用いることができる。

【0055】

20

遺伝子改変方法

本発明は、また、任意の遺伝子において、コードする5' UTR配列が上記特定の5' UTR配列となるように、5' UTRコード部位の塩基配列を改変することにより、ストレス環境下（好ましくは熱ストレス及び/又は塩ストレス下）でコードされるタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避又は低減することができる組換え遺伝子（組換えDNA分子）を作製する方法も包含する。

【0056】

5' UTRコード部位の塩基配列が改変される遺伝子としては、特に制限はされない。コードするタンパク質が例えば上述の組換え遺伝子がコードするタンパク質と同様の遺伝子が例示できる。また、当該遺伝子の入手についても、上述の組換え遺伝子の原料とする遺伝子と同様に行い得る。塩基配列の改変についても、常法に従って行えばよく、例えば上述した方法に従えばよい。その他の条件も、上述した組換えDNA分子の作製と同様にして行い得る。

30

【0057】

本発明は、さらにまた、任意の遺伝子において、コードする5' UTR配列が上記特定の5' UTR配列となるように、5' UTRコード部位の塩基配列を改変することにより、ストレス環境下（好ましくは熱ストレス及び/又は塩ストレス下）でコードされるタンパク質の翻訳が抑制されるのを回避又は低減する方法も包含する。

【0058】

5' UTRコード部位の塩基配列が改変される遺伝子としては、特に制限はされない。コードするタンパク質が例えば上述の組換え遺伝子がコードするタンパク質と同様の遺伝子が例示できる。また、当該遺伝子の入手についても、上述の組換え遺伝子の原料とする遺伝子と同様に行い得る。塩基配列の改変についても、常法に従って行えばよく、例えば上述した方法に従えばよい。その他の条件も、上述した組換えDNA分子の作製と同様にして行い得る。

40

【0059】

人工mRNA分子

本発明は、また、上記「組換え遺伝子（組換えDNA分子）」欄で記載した“特定の5' UTR配列を有するmRNA分子”も包含する。なお、当該mRNA分子は人工物（すなわち人工mRNA分子）であり、自然界に存在するmRNA分子は含まない。

50

【0060】

当該人工mRNA分子は、本発明の組換えDNA分子が転写されて得られるものであってもよく、化学的に合成されたものであってもよい。例えば、上述の形質転換体を環境ストレス下（好ましくは熱ストレス及び/又は塩ストレス下）で生育させ、当該形質転換体から常法によりmRNAを回収することにより、効率よく当該人工mRNA分子を得ることができる。

【0061】

当該人工mRNA分子を常法により細胞（好ましくは植物細胞又はプロトプラスト）に導入し、当該細胞を環境ストレス下（好ましくは熱ストレス及び/又は塩ストレス下）で培養させることによって、上述した形質転換体と同様に、当該人工mRNA分子がコードするタンパク質を優先的に産生することができる。細胞への導入方法やストレス条件は、例えば上記と同様にすればよい。

10

【0062】

環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる配列的特徴の予測方法

さらにまた、本発明は、植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる、5'UTRにおける配列特徴の予測方法も提供する。また、当該予測方法で予測された配列特徴を備えた5'UTRを有する核酸等も提供する。具体的には、本発明には、例えば以下の項A～Fに記載する発明が包含される。

【0063】

項A．植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる、5'非翻訳領域（5'UTR）における配列特徴の予測方法であって、

20

植物内で天然に発現するN個の遺伝子について、各5'UTRを含む核酸分子の対照条件下に対する環境ストレス条件下における翻訳レベルの相対活性値を求める工程、

前記5'UTRにおける5'末端からの塩基位置kからk+L-1までの長さLの配列について、少なくとも1回出現するt個の塩基からなる塩基配列の出現頻度を求める工程、

前記相対活性値と、前記塩基配列の出現頻度との相関式を構築し、多変量解析により各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める工程、

前記回帰係数を用いて、塩基位置kからk+L-1までの長さLの領域における各塩基位置における4つの塩基A、U、G、Cに対応した回帰係数の値を求め、各塩基位置における前記相対活性値に対する各塩基の寄与度を求める工程、

30

得られた寄与度及び前記相対活性値を用いて多変量解析により回帰モデルを構築する工程、

k及びLを変えて構築した回帰モデルの中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定し、選定した回帰モデルを用いて塩基位置k'からk'+L'-1の領域における特定配列を予測する工程

を含む予測方法。

【0064】

項B．植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域又はその改変配列を含む、環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる核酸配列であって、

前記5'非翻訳領域は、植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域における項1で設定した塩基位置k'からk'+L'-1の領域が項1の特定配列である配列であり、

40

前記改変配列は、植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域における項1で設定した塩基位置k'からk'+L'-1の領域が項1の特定配列で置換されている配列である、核酸配列。

【0065】

項C．項Bに記載の核酸配列を含む遺伝子。

【0066】

項D．項Bに記載の核酸配列を含む発現ベクターであって、前記核酸配列が転写開始点直後に連結されている発現ベクター。

【0067】

50

項 E . 項 D に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【 0 0 6 8 】

項 F . 項 D に記載の発現ベクターを含む形質転換植物。

【 0 0 6 9 】

ここで、5'非翻訳領域(5'UTR)における配列特徴とは、5'UTRにおける5'末端からの塩基位置 k' から $k'+L'-1$ の領域における特定配列を意味する。

【 0 0 7 0 】

本発明は、下記(1)~(6)の工程を備えることにより、環境ストレス(好ましくは熱ストレス及びノ又は塩ストレス)による翻訳制御を規定する5'UTRの配列特徴を、*in silico*解析を用いて予測する方法を提供する。

【 0 0 7 1 】

(1)まず、植物内で天然に発現するN個の遺伝子について、各5'UTRを含む核酸分子の対照条件下に対する環境ストレス条件下における翻訳レベルの相対活性値を求める。

【 0 0 7 2 】

Nは遺伝子のサンプル数であり、2以上の整数である。

【 0 0 7 3 】

N個の遺伝子は、翻訳状態の異なる複数の遺伝子を含んでいることが好ましい。翻訳状態については、例えば、ポリソーム/マイクロアレイ解析などにより、網羅的に遺伝子の翻訳状態の変化を解析した試験結果などを参照することができる。

【 0 0 7 4 】

5'UTRを含む核酸分子としては、翻訳レベルの測定が可能であれば特に制限されないが、例えば、5'UTRの下流にf-luc遺伝子等のリポーター遺伝子を組み込んだ合成mRNA等が挙げられる。

【 0 0 7 5 】

測定に用いる核酸分子の形態も特に限定されず、例えば、上記合成mRNAを適当なプロトプラストに導入した形態であってもよい。

【 0 0 7 6 】

環境ストレス条件としては、例えば、高温、高浸透圧、高塩濃度等の、通常とは異なる環境下に置かれ、ストレス(好ましくは熱ストレス及びノ又は塩ストレス)が負荷された条件を意味する。また対照条件は、通常条件、別言すると、前記環境ストレスを加えない以外は環境ストレス条件と同様とした条件を意味する。

【 0 0 7 7 】

翻訳レベルの相対活性値を求める手法も、特に限定されず、公知の手法に従って行うことができる。例えば、ある遺伝子の5'UTRの下流にf-luc遺伝子等のリポーター遺伝子を組み込んだ合成mRNAを用いて、一過的な形質転換体を作製し、当該形質転換体を環境ストレス条件下又は対照条件下に置いた場合とのリポーター遺伝子の発現レベル(翻訳量)を活性値として測定し、その比率を「相対活性値」とすることができる。

【 0 0 7 8 】

より具体的には、実施例に記載の方法により求めることができる。

【 0 0 7 9 】

(2)次いで、5'UTRにおける5'末端からの塩基位置 k から $k+L-1$ までの長さLの配列について、少なくとも1回出現するt個の塩基からなる部分配列の出現頻度を求める。

【 0 0 8 0 】

k は5'UTRにおける5'末端からの塩基位置を示す変数であり、1以上、5'UTRの全長以下の整数である。

【 0 0 8 1 】

また、 L は、塩基位置 k からの塩基長を示す変数であり、1以上、5'UTRの全長以下の整数である。

【 0 0 8 2 】

また、 t は k から $k+L-1$ までの長さLの配列において少なくとも1回出現する部分配列に

10

20

30

40

50

における塩基の連続数を示す値であり、1以上L以下の整数である。

【0083】

上記k、L及びtを用い、N個のサンプルにおける塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列において少なくとも1回出現するt個の塩基からなる配列は、 $R_1(t)$, $R_2(t)$, ..., $R_v(t)$, $R_v(t)$ と表すことができる。またそれぞれの配列の出現頻度は、 $f_i^{(k, k+L-1)}(R_1(t))$, ..., $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ と表すことができる。ここで、v番目の配列頻度を変量 $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ と表す。

【0084】

(3)次いで、相対活性値と、前記塩基配列の出現頻度との相関式を構築し、多変量解析により各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める。

10

【0085】

相関式を構築するとは、換言すると、相対活性値を前記塩基配列の出現頻度による関数にて表現する。そして、各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める。

【0086】

そのための方法としては、PLS (Partial Least Squares)法に代表される多変量解析が用いられる。

【0087】

以下では多変量解析の一例として、PLS (Partial Least Squares)法による解析を例に挙げて説明するが、当該方法に限定されるということではない。

【0088】

相対活性値をyとする場合、配列頻度V個の変量 $f^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$, ($v=1, 2, \dots, V$)との相関式は、式(1)により表現できる。

20

【0089】

【数1】

$$y = a_{R_1(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_1(t)) + a_{R_2(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_2(t)) + \dots + a_{R_v(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_v(t)) + \dots + a_{R_V(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_V(t)) + a_{0(t)}^{(k, k+L-1)} \quad (1)$$

【0090】

ここで、

30

【0091】

【数2】

$$a_{R_v(t)}^{(k, k+L-1)}$$

【0092】

は、v番目の塩基頻度における回帰係数である。

【0093】

回帰係数は、PLS (Partial Least Squares)法により、以下のように求めることができる。

【0094】

N個のサンプルについて、i番目のサンプルについて配列のk番目から長さLの範囲を抜き出した配列を $Seq_i = s_{ik}s_{ik+1}\dots s_{ik+L-1}$ とする。ここで、i番目のサンプルにおける塩基配列上の位置を5'端より3'方向に、 $s_1, s_2, \dots, s_k, \dots, s_M$ で表す。

40

i番目のサンプルにおいて、k+jを開始とする長さtの配列を

【0095】

【数3】

$$s_{ik+j}s_{ik+j+1}\dots s_{ik+j+t-1} \equiv Seq_i(k+j, k+j+t-1)$$

【0096】

とする。 $Seq_i(k+j, k+j+t-1)$ とV個の配列 $R_v(t)$, ($v=1, 2, \dots, V$)と比べ、同一のものをR

50

$(i, k+j)$ とする。

【 0 0 9 7 】

ここで、 $R_{(i, k+j)}$

【 0 0 9 8 】

【 数 4 】

$$R_{(i, k+j)} = r_{ik} r_{ik+1} r_{ik+2} \cdots r_{ik+j+t-1}$$

【 0 0 9 9 】

とする。

【 0 1 0 0 】

この $R_{(i, k+j)}$ と対応した PLS 係数を選び

【 0 1 0 1 】

【 数 5 】

$$a_{R_{(i, k+j)}}^{(k, k+L-1)}$$

【 0 1 0 2 】

とすることにより、回帰係数を求めることができる。

【 0 1 0 3 】

(4) 次いで、前記回帰係数を用いて、塩基位置 k から $k+L-1$ の長さ L の領域における各塩基位置における4つの塩基 A、U、G、C に対応した回帰係数の値を求め、各塩基位置における前記相対活性値に対する各塩基の寄与度を求める。

【 0 1 0 4 】

具体的には以下の方法が挙げられる。

【 0 1 0 5 】

工程 (3) で得られた回帰係数を i 番目のサンプルにおける $k+j, k+j+1, \dots, k+j+t-1$ の位置に配置した行列を作る。そして、 $k+j$ 番目の塩基位置について4つの塩基 A、U、G、C を有する回帰係数の平均値及び不偏分散を求める。 $k+j$ 番目の4つの塩基 A、U、G、C それぞれにおける平均値ならびに不偏分散を基に、4つの塩基 A、U、G、C に対応した回帰係数の分布が統計的に有意に正もしくは負とみなせるか否かを検定することにより、相対活性値 y に正あるいは負に寄与する塩基配列を抽出する。

【 0 1 0 6 】

検定方法としては、例えば t 検定が挙げられる。

【 0 1 0 7 】

相対活性値 y に統計的に有意な塩基をそれぞれの塩基位置について抽出し、塩基位置 k から $k+L-1$ の範囲の長さ L の配列のどの位置のどのような塩基が正あるいは負のいずれかの条件で相対活性値に寄与するかという情報を得ることができる。

【 0 1 0 8 】

(5) 次いで、得られた寄与度及び前記相対活性値を用いて多変量解析により回帰モデルを構築する。

【 0 1 0 9 】

PLS 法では、因子 X ($N \times V$ 行列) を応答 y ($N \times 1$) へ線形的に関連付ける。

【 0 1 1 0 】

工程 (4) で得られた各塩基の寄与度及び工程 (1) で得られた相対活性値を用いて、因子 X 及び応答 Y は、以下の式 (5) 及び (6) のように表すことができる。

【 0 1 1 1 】

【 数 6 】

$$\mathbf{X} = \sum_{k=1}^D \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

【数 7】

$$\mathbf{y} = \sum_{k=1}^D \mathbf{t}_k \mathbf{q}_k + \mathbf{e} \quad (6)$$

【 0 1 1 3 】

ここで、 \mathbf{p}_k はXにおけるk番目の成分の重みベクトルであり、 \mathbf{q}_k はyにおけるk番目の成分の係数である。またDはPLSの成分数、 \mathbf{t}_k はk番目の潜在変数、EはXの残差であり、eはyの残差である。

【 0 1 1 4 】

PLSの成分数であるDは、成分数を増加させるたびにLeave-one-out cross-validationにより予測精度を逐次計算し、予測精度が最大になるときの成分数として決定される。

10

【 0 1 1 5 】

予測精度の計算は、 Q^2 値、予測値と実測値の相関係数などのLeave-one-out cross-validationによる予測値と実測値の関係付ける指標を用いて行うことができる。

【 0 1 1 6 】

Q^2 はモデルの予測精度を示す尺度であり、以下の式(7)で表すことができる。

【 0 1 1 7 】

【数 8】

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{obs} - \hat{y}_{pred})^2}{\sum y_{obs}^2} \quad (7)$$

20

【 0 1 1 8 】

ここで、 y_{obs} は実験的に得られた相対活性値であり、 y_{pred} は構築したモデルによる予測値である。

【 0 1 1 9 】

またPLSの式 (5)と (6)をあわせると式 (8)にまとめることができる。

【 0 1 2 0 】

【数 9】

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xa} + \mathbf{f} \quad (8)$$

30

【 0 1 2 1 】

このとき、aは回帰係数ベクトルであり、その要素は a_j ($j = 1, 2, \dots, N$)で表される。またfはyの残差である。

【 0 1 2 2 】

(6)次いで、k及びLを変えて構築した複数の回帰モデルの中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定し、選定した回帰モデルを用いて塩基位置k'からk'+L'-1の領域における特定配列を予測する。

40

【 0 1 2 3 】

工程(5)において構築した回帰モデルにおいて、k及びLの値を変えて複数の回帰モデルを構築する。そして、その中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定する。

【 0 1 2 4 】

予測精度としては、公知の指標を用いることができるが、例えば、 Q^2 値を上げることができる。予測精度として Q^2 値を用いた場合、 Q^2 値が高い領域ほど予測精度が高く、その領域が環境ストレス条件下での翻訳状態に直接的に影響していると考えられる。これから、そのような予測精度を高める領域とする塩基位置k'及びL'選定し、当該塩基位置k'及びL'の回帰モデルを選定する。

50

【0125】

別言すると、 k' は変数 k のうち予測精度を設定値以上とする定数であり、 L' は変数 L のうち、予測精度を設定値以上とする定数である。換言すると、 k' 及び L' で決定される k' から $k_1' + L_1' - 1$ の領域は、植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減するための重要な領域である。

【0126】

設定値は、目的に応じて適宜設定できるが、通常0以上、好ましくは0.5以上、より好ましくは0.6以上、特に0.8以上程度である。

【0127】

k' 及び L' は予測精度に応じて複数選定することもできる。即ち、設定値以上とする k' 及び L' の中から、最も予測精度の高い k_1' 及び L_1' を選定し、更に2番目に予測精度の高い k_2' 及び L_2' を選定することができる。

10

【0128】

そして、 k_1' 及び L_1' を用いて塩基位置 k_1' から $k_1' + L_1' - 1$ の領域における特定配列1を予測し、更に k_2' 及び L_2' を用いて塩基位置 k_2' から $k_2' + L_2' - 1$ の領域における特定配列2を予測することもできる。

【0129】

尚、ここで特定配列とは、前記選定した回帰モデルにより求められる塩基配列であって、予測精度を設定値以上とする塩基配列である。換言すると、植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減する機能に優れた塩基配列である。

20

【0130】

本発明の予測方法は、例えば、コンピュータプログラムを用いてコンピュータシステムにより実現することもできる。例えば、図39に示す計算機(コンピュータシステム)において実現できる。つまり、本発明は本発明の予測方法を実現する予測システムも含む。具体的には、本発明は、以下の予測システムを含む。

植物における環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させる、5'非翻訳領域(5'UTR)における配列特徴の予測システムであって、

植物内で天然に発現するN個の遺伝子について、各5'UTRを含む核酸分子の対照条件下に対する環境ストレス条件下における翻訳レベルの相対活性値を求める手段、

前記5'UTRにおける5'末端からの塩基位置 k から $k + L - 1$ までの長さ L の配列について、少なくとも1回出現する t 個の塩基からなる塩基配列の出現頻度を求める手段、

30

前記相対活性値と、前記塩基配列の出現頻度との相関式を構築し、多変量解析により各塩基配列の出現頻度の回帰係数を求める手段、

前記回帰係数を用いて、塩基位置 k から $k + L - 1$ までの長さ L の領域における各塩基位置における4つの塩基A、U、G、Cに対応した回帰係数の値を求め、各塩基位置における前記相対活性値に対する各塩基の寄与度を求める手段、

得られた寄与度及び前記相対活性値を用いて多変量解析により回帰モデルを構築する手段、

k 及び L を変えて構築した回帰モデルの中から、相対活性値に対する予測精度を設定値以上とする塩基位置 k' 及び L' の回帰モデルを選定し、選定した回帰モデルを用いて塩基位置 k' から $k' + L' - 1$ の領域における特定配列を予測する手段を備える予測システム。

40

【0131】

また、本発明の予測方法には、本発明の効果を損なわない限りで、上記(1)~(6)以外の他の工程を含むことができる。

【0132】

例えば、ポリソーム/マイクロアレイ解析により、植物において天然に発現する遺伝子の対照条件及び環境ストレス条件下における翻訳状態の変化を解析する工程を加えることができる。

【0133】

50

ポリソーム/マイクロアレイ解析は、公知の手法に従って行うことができる。例えば、対照条件下及び環境ストレス条件における植物細胞を、ショ糖密度勾配遠心を利用したポリソーム解析に供し、ポリソーム画分及び非ポリソーム画分からそれぞれRNAを抽出・精製して、マイクロアレイ解析を行う。得られたマイクロアレイ解析データから、全RNA或いは非ポリソーム画分に存在するRNAに対するポリソーム画分に存在するmRNAの比率を求める。これにより、植物における遺伝子の翻訳状態を網羅的に解析することができる。

【0134】

当該得られたポリソーム/マイクロアレイ解析の結果に基づいて、工程(1)に用いるN個の遺伝子を選定することができる。

【0135】

更に、本発明には、*in silico*解析や多変量解析において通常用いられる公知の手法を必要に応じて含めることもできる。

【0136】

予測された5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸分子

本発明には、上記予測方法により得られる配列特徴を備えた5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸分子も含まれる。換言すると、本発明は、(1)上記1の予測方法により得られた配列特徴を備えた5'非翻訳領域を含む核酸分子、及び(2)上記1の予測方法により得られた配列特徴を備えた5'非翻訳領域の改変配列を含む核酸分子を含む。

【0137】

(1)の核酸分子は、植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域を含む核酸分子であって、植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域における前記予測方法で予測した塩基位置 k' から $k'+L'-1$ の領域が前記予測方法で予測した特定配列である核酸分子である。

【0138】

また、(2)の核酸分子は、植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域の改変配列を含む核酸分子であって、改変配列は植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域の配列における前記予測方法で予測した塩基位置 k' から $k'+L'-1$ の領域が前記予測方法で予測した特定配列で置換されている配列である核酸分子である。

【0139】

例えばシロイヌナズナの場合、本発明の予測方法によって、5'非翻訳領域における $k=1$ 及び $L=7$ の配列、即ち、5'端1~7番目の特定配列として、配列表の配列番号1(acacaag)の配列、配列表の配列番号2(auaacac)の配列、或いは、配列表の配列番号3(uacauca)の配列が予測される。

【0140】

これから、本発明の予測された5'非翻訳領域を含む核酸分子の配列としては、

5'UTR1 (good (1)) : 配列表の配列番号 4

acacaagcauuucaaggaucaaaucacaaucccaagaagcaauaacaagagaagaagaaguagucaagaauuaa
ggaagagagcuucuccguuaaaguauagugagagaau

の配列、

5'UTR2 (good (2)) : 配列表の配列番号 5

auaacacauucaagcauuggauuaaucaaaagacaaaagaaaacgaaa

の配列、

5'UTR3 (good (3)) : 配列表の配列番号 6

uacaucaacaaucaacacaaaacuaacaaaagaucaaaagcaaguucucacugugaua

の配列が挙げられる。

【0141】

また、シロイヌナズナの場合、本発明の予測方法によって、5'非翻訳領域における $k=1$ 及び $L=7$ の配列、即ち、5'端1~7番目の特定配列の一つとして配列表の配列番号7(uaaaa)の配列が予測される。

【0142】

10

20

30

40

50

また、5'非翻訳領域におけるk=12及びL=21の塩基配列、即ち、5'端12~32番目の特定配列の一つとして配列表の配列番号8 (acaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa)の配列が予測される。

【0143】

これから、本発明の予測された5'非翻訳領域の改変配列を含む核酸分子としては、例えば、

改変5'UTR1：植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域の配列における5'端から1~7番目の配列が配列表の配列番号7 (uuaaaaa)の配列で置換されている配列を含む核酸分子、

改変5'UTR2：植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域における5'端から12~32番目の配列が配列表の配列番号8 (acaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa)の配列に置換されている配列を含む核酸分子、

改変5'UTR3：植物内で天然に発現する遺伝子由来の5'非翻訳領域における5'端から1~7番目の塩基配列が配列表の配列番号7 (uuaaaaa)の配列に置換され、かつ5'端から12~32番目の配列が配列表の配列番号8 (acaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa)の配列に置換されている配列を含む核酸分子が挙げられる。

【0144】

上記配列特徴を備えた本発明の予測された5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸分子は、植物の環境ストレスによる翻訳抑制を回避又は低減させ得るという特徴を有する。

【0145】

通常の植物は、環境ストレスを受けた場合に、大部分のmRNAからのタンパク質の翻訳が抑制される。しかし、本発明の5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸分子を導入した場合には、環境ストレス条件下における翻訳の抑制を回避し、タンパク質合成を維持することが可能になる。

【0146】

本発明は、上記本発明における予測された5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸配列を含む遺伝子も含む。本発明の遺伝子は、前記予測された5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸配列以外に、タンパク質のコード配列を含んでいる。

【0147】

本発明の当該遺伝子は、上記本発明の予測された5'非翻訳領域又はその改変配列を含む核酸配列を含むことにより、環境ストレスによって受ける翻訳抑制が回避又は低減されており、環境ストレス条件下においてもタンパク質合成能を維持するという特性を備えたものとなる。

【0148】

本発明は、当該核酸分子を挿入した発現ベクターも含む。ベクターの種類、核酸分子のベクターへの挿入方法、核酸分子とベクターとの連結態様等は上述と同様である。

【0149】

本発明は、上記発現ベクターを宿主中に導入することにより得ることができる形質転換体も含む。宿主の種類及び宿主への導入方法等については、上述と同様である。

【0150】

本発明の予測方法によれば、環境ストレス下の翻訳制御に重要な領域を適確に予測し得る。

【0151】

本発明の予測方法は、環境ストレス下の翻訳制御に重要な5'UTR内の配列特徴を予測する方法であり、環境ストレスによる翻訳抑制を回避する5'UTR内の重要領域を高い精度で予測できることが実験的な検証でも確認された(実施例)。

【実施例】

【0152】

以下、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の例に限定されるものではない。な

をアニーリングさせた二本鎖断片をpT3-FL、pT3-RLのEcoRI/BanIIIサイトに挿入して作製し、それぞれpT3-FL-pA、及びpT3-RL-pAとした。

【0163】

Firefly luciferaseのコーディング領域の増幅は、上記pT3-FL-pAを鋳型にしたPCR反応により行った。

【0164】

フォワード (forward) プライマーは、開始コドンに相当するATGの上流にBssHII及びNcoIの制限酵素サイトを持つように設計した。加えて、開始コドンの下流配列の一部に変異を加え (GACGCC GACGTC)、AatIIサイトとなるように設計した。変異を加えることによってf-lucの3番目のアラニンがバリンへと変わることになる。

10

【0165】

バックワード (backward) プライマーはf-lucのコーディング配列内に存在するNspVサイトを含むように、コーディング領域の602~626番目までに設計した。

【0166】

それぞれのPCR産物をBssHII/ NspVで消化し、pT3-FL-pAベクターのBssHII/ NspVサイトに挿入し、in vitro合成用鋳型プラスミドpFL-pAを得た。

【0167】

なお、NspVについては部分分解を行った。

【0168】

試験する5' UTRの配列については、5' 端にNcoI、T3プロモーター、3' 端にはAatIIを持つように設計した上で、Kawaguchiら (非特許文献4) によって整備された配列情報に基づいてプライマーを作製し、断片の増幅を行った。

20

【0169】

さらに5' UTRの配列の一部を置換した配列は、変異導入用プライマーを用いて、PCR増幅断片もしくは合成オリゴヌクレオチドとして調製し、pFL-pAのNcoI/AatIIサイトに挿入した。結果として、様々な種類の5' UTR配列が連結されたin vitro転写用プラスミド(pT3-5' UTR-FL-pA)を得た。

【0170】

プラスミドの構築概略を図1に示す。図1に示されるように、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、NcoI/AatIIサイトを用いてf-luc mRNA合成用プラスミドに挿入した。in vitro合成されたf-luc 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。

30

【0171】

1-4. mRNAの合成

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、SspI(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)に続いてチミン残基が1塩基付加されることになる。SspI処理したDNA断片は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。精製されたDNA断片を鋳型に、Megascript T3 transcription kit (Ambion)を用いて、キャップ構造を持たないmRNAを合成した。合成は、キットに添付されたプロトコールに従って行った。合成されたRNAはキットに付属のDNaseI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。キャップ構造の付加はScriptCap m⁷G Capping System (EPICENTRE)を用いた。操作は、キットに添付されたプロトコールに従った。

40

キャップを付加したRNAはRNeasy 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電気泳動により検定した。

【0172】

1-5. シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラスト調製

シロイヌナズナ培養細胞T87からのプロトプラスト調製は、佐藤らの方法に若干の変更

50

を加えて行った (Sato J. et al., 2004, J.Biosci. Bioeng. 1: 1-8)。
 培養細胞を0.4Mマンニトールで洗浄した後、酵素液 (0.4M Manitol、10% Cellulase RS [Yakult Honsha]、0.1% Pectolyase [Kikkoman]、pH 5.5)を加え、25℃にて2時間穏やかに攪拌した。40 μ mナイロンメッシュ (Cell Strainer;BD Falcon)でろ過した後、遠心 (800 rpm、5min、4℃)を行い、沈殿を回収した。回収した沈殿に0.4Mマンニトールを加え、再度遠心 (800rpm、5min、4℃)することによりプロトプラストを得た。更に、0.4Mマンニトールで洗浄した後、プロトプラストをW5溶液 (154mM NaCl、125mM CaCl₂、5mM KCl、2mM Mes-KOH、pH 5.6)に再懸濁し、氷中に30分静置した。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/ μ lになるようにMMg溶液 (0.4M mannitol、15mM MgCl₂、4mM Mes-KOH、pH5.7)に懸濁した。

10

【 0 1 7 3 】

1-6. 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のpolyethlen glycol (PEG)を用いた方法に従った (Kovtun et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 6: 2940-2945)。典型的にはmRNA (5 μ l前後)に 1×10^4 cell/ μ lのプロトプラストを加えた後、混合液と等量のPEG溶液 (40% PEG 4000、0.2M Mannitol、0.1M Ca (NO₃)₂) (Sheen J., 2001, Plant Physiol. 127:1466-1475)を加えてゆっくりと混和した。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. J. Biosci. Bioeng. 95: 52-58)により再懸濁した。再懸濁した細胞は、試験温度に一定時間静置した後、超小型遠心器を用いた遠心操作を行い、上清を除いた。

20

【 0 1 7 4 】

1-7. ルシフェラーゼ酵素活性測定

細胞の溶解は、 5×10^5 個のプロトプラスト当たり75 μ lのpassive lysis buffer (Promega)を用い、室温で15分間、ミキサーで溶解させた。溶解液中のf-luc、r-luc活性測定には、Dual-luciferase reporter assay system (Promega)とルミノメータ (Lumat LB 9501;Berthold)を付属のプロトコールに従って使用した。

【 0 1 7 5 】

2 相対活性値と関連のある配列情報の抽出

2-1 配列情報と活性情報の定義

上記1-1~1-7の方法に従った実験 (換言すると、翻訳状態が異なるいくつかの遺伝子を抽出し、それら遺伝子の5' UTRを連結したレポーター-mRNAを培養細胞プロトプラストに導入して行う一過性発現実験)において得られる、通常温度 (22℃)と熱ストレス条件 (37℃)に静置したプロトプラストにおける相対f-luc活性値 (つまり、通常温度 (22℃)に静置したプロトプラストにおけるf-luc活性値に対する、熱ストレス条件 (37℃)に静置したプロトプラストにおける相対f-luc活性値)を、以降「相対活性値」と表現する。

30

【 0 1 7 6 】

N個のサンプルにおける塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列と相対活性値yの関係性を数理モデルにより表現し、この数理モデルから相対活性値と最も関連のある塩基配列の特徴を抽出した。

40

【 0 1 7 7 】

まず初めに、i番目のサンプルについて配列のk番目から長さLの範囲を抜き出した配列をSeq_i = s_{ik}s_{ik+1}...s_{ik+L-1}とした。ここで、i番目のサンプルにおける塩基配列上の位置を5'端より3'方向に、s₁, s₂, ..., s_k, ..., s_Mとした。また、i番目のサンプルの相対活性値をy_iとした。

【 0 1 7 8 】

図2に、配列情報と相対活性値の定義との関係を示す。

【 0 1 7 9 】

2-2 相対活性値を連続塩基頻度により説明するための回帰式の構築

N個のサンプルにおける塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列において少なくとも1

50

回出現するt個の塩基からなる配列を $R_1(t)$, $R_2(t)$, ..., $R_v(t)$, $R_v(t)$ とした。今回の実験では、 $t=3$ とした。

【 0 1 8 0 】

また、そのそれぞれの配列の出現頻度を $f_i^{(k, k+L-1)}(R_1(t))$, ..., $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$, ..., $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ とした。

【 0 1 8 1 】

ここで、v番目の配列頻度を変量 $f_i^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$ と表した。

【 0 1 8 2 】

図3に、N個のサンプルにおける区間 $[k, k+L-1]$ の長さLの配列におけるt個の連続塩基 ($R_1(t)$, $R_2(t)$, ..., $R_v(t)$) の頻度を示す。

10

【 0 1 8 3 】

次に、配列頻度V個の変量 $f^{(k, k+L-1)}(R_v(t))$, ($v=1, 2, \dots, V$)と相対活性値yの線形下位形式を式(1)により表現した。

【 0 1 8 4 】

【数13】

$$y = a_{R_1(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_1(t)) + a_{R_2(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_2(t)) + \dots + a_{R_v(t)}^{(k, k+L-1)} f^{(k, k+L-1)}(R_v(t)) + a_{0(t)}^{(k, k+L-1)} \quad (1)$$

【 0 1 8 5 】

ここで、

【 0 1 8 6 】

【数14】

$$a_{R_v(t)}^{(k, k+L-1)}$$

【 0 1 8 7 】

は、v番目の塩基頻度における回帰係数である。また、配列領域における相対活性値への寄与については、2-4にて述べる回帰係数の算出による Q^2 で比較した。

【 0 1 8 8 】

2-3 配列頻度-相対活性相関式を用いた塩基情報の抽出

30

i番目のサンプルにおいて、 $k+j$ を開始とする長さtの配列を

【 0 1 8 9 】

【数15】

$$s_{ik+j} s_{ik+j+1}, \dots, s_{ik+j+t-1} \equiv Seq_i(k+j, k+j+t-1)$$

【 0 1 9 0 】

とした。

【 0 1 9 1 】

$Seq_i(k+j, k+j+t-1)$ とV個の配列 $R_v(t)$, ($v=1, 2, \dots, V$)と比べ、同一のものを $R_{(i, k+j)}$ とした。ここで、

40

【 0 1 9 2 】

【数16】

$$R_{(i, k+j)} = r_{ik} r_{ik+1} r_{ik+2} \dots r_{ik+j+t-1}$$

【 0 1 9 3 】

とした。

【 0 1 9 4 】

また、この $R_{(i, k+j)}$ と対応したPLS係数を選び

【 0 1 9 5 】

【数 1 7】

$$a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)}$$

【0 1 9 6】

とした。

【0 1 9 7】

この係数を*i*番目のサンプルにおける*k+j*, *k+j+1*, ..., *k+j+t-1*の位置に配置した行列を作った (図4上段参照)。

【0 1 9 8】

そして、*k+j*番目の塩基位置について4つの塩基A, U, G, Cを有する回帰係数の平均値及び不偏分散をそれぞれ、 $av(A)_{k+j}$ 、 $av(U)_{k+j}$ 、 $av(G)_{k+j}$ 、 $av(C)_{k+j}$ 及び $V(A)_{k+j}$ 、 $V(U)_{k+j}$ 、 $V(G)_{k+j}$ 、 $V(C)_{k+j}$ とした。すなわち、

【0 1 9 9】

【数 1 8】

$$av(A)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=A \\ i=1,2,\dots,N}} a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)}}{n(s_{ik+j} = A)} \quad (2.1)$$

【0 2 0 0】

【数 1 9】

$$av(U)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=U \\ i=1,2,\dots,N}} a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)}}{n(s_{ik+j} = U)} \quad (2.2)$$

【0 2 0 1】

【数 2 0】

$$av(G)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=G \\ i=1,2,\dots,N}} a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)}}{n(s_{ik+j} = G)} \quad (2.3)$$

【0 2 0 2】

【数 2 1】

$$av(C)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=C \\ i=1,2,\dots,N}} a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)}}{n(s_{ik+j} = C)} \quad (2.4)$$

【0 2 0 3】

および

【0 2 0 4】

【数 2 2】

$$V(A)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=A \\ i=1,2,\dots,N}} \{a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)} - av(A)\}}{n(s_{ik+j} = A) - 1} \quad (3.1)$$

【0 2 0 5】

【数 2 3】

$$V(U)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=U \\ i=1,2,\dots,N}} \{a_{R(i,k+j)}^{(k,k+L-1)} - av(U)\}}{n(s_{ik+j} = U) - 1} \quad (3.2)$$

10

20

30

40

50

【 0 2 0 6 】

【数 2 4】

$$V(G)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=G \\ i=1,2,\dots,N}} \{R_{(i,k+j)}^{(k,k+L-1)} - av(G)\}}{n(s_{ik+j}=G)-1} \quad (3.3)$$

【 0 2 0 7 】

【数 2 5】

$$V(C)_{k+j} = \frac{\sum_{\substack{r_{ik+j}=C \\ i=1,2,\dots,N}} \{R_{(i,k+j)}^{(k,k+L-1)} - av(C)\}}{n(s_{ik+j}=C)-1} \quad (3.4) \quad 10$$

【 0 2 0 8 】

と記述した。

【 0 2 0 9 】

k+j 番目の4つの塩基A, U, G, Cそれぞれにおける平均値[式(2.1-2.4)]ならびに不偏分散[式(3.1-3.4)]を基に、4つの塩基A, U, G, Cに対応した回帰係数の分布が統計的に有意に正もしくは負とみなせるか否かを検定することにより、相対活性値yに正あるいは負に寄与する塩基配列を抽出した。

【 0 2 1 0 】

20

そこで、本解析では、t検定を行うことにより、相対活性値yに統計的に有意な塩基をそれぞれの塩基位置について抽出した。t統計量は式(4)により表現した。

【 0 2 1 1 】

【数 2 6】

$$t(base)_{k+j} = \frac{|av(base)_{k+j}|}{\sqrt{\frac{V(base)_{k+j}}{n(s_{ik+j}=base)}}} \quad (4)$$

【 0 2 1 2 】

30

ここでbaseは、A, U, G, Cのそれぞれの塩基と対応する。

【 0 2 1 3 】

いま、 $t(base)_{k+j}$ は、通常、自由度 $=n-1(s_{ik+j}=base)$ のt分布に従う。そこで、 $=n-1(s_{ik+j}=base)$ のt分布により $t(base)_{k+j}$ と対応する有意水準 $p(base)_{k+j}$ とおいた。この $p(base)_{k+j}$ はk+jにおけるbaseと対応する塩基の回帰係数が偶然0とみなされる確率であるので、塩基位置kからk+L-1の範囲の長さLの配列のどの位置のどのような塩基が正あるいは負のいずれかの条件で相対活性値に寄与するかという情報を得ることができる。

【 0 2 1 4 】

図4に、j+k番目の塩基位置における回帰係数と4つの塩基と対応した回帰係数の平均と普遍分散を示す。

40

【 0 2 1 5 】

2-4 PLSによる回帰係数の算出

得られた配列情報及び相対活性値を基に、PLS (Partial Least Squares)法により回帰モデルを構築した。PLS法は、因子X ($N \times V$ 行列) を応答y ($N \times 1$) へ線形的に関連付ける方法である。

【 0 2 1 6 】

PLSは以下の式(5) と(6)で表した。

【 0 2 1 7 】

【数 2 7】

$$\mathbf{X} = \sum_{k=1}^D \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

【0 2 1 8】

【数 2 8】

$$\mathbf{y} = \sum_{k=1}^D \mathbf{t}_k q_k + \mathbf{e} \quad (6)$$

10

【0 2 1 9】

ここで、 \mathbf{p}_k はXにおけるk番目の成分の重みベクトルであり、 q_k はyにおけるk番目の成分の係数である。またDはPLSの成分数、 \mathbf{t}_k はk番目の潜在変数、EはXの残差であり、eはyの残差である。PLSの成分数であるDは、成分数を増加させるたびにLeave-one-out cross-validationにより Q^2 値を逐次計算し、 Q^2 値が最大になるときの成分数として決定される。 Q^2 はモデルの予測精度を示す尺度であり、以下の式(7)で表した。

【0 2 2 0】

【数 2 9】

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{obs} - \hat{y}_{pred})^2}{\sum y_{obs}^2} \quad (7)$$

20

【0 2 2 1】

ここで、 y_{obs} は実験的に得られた実測値であり、 y_{pred} は構築したモデルによる予測値である。またPLSの式(5)と(6)をあわせると式(8)にまとめることができる。

【0 2 2 2】

【数 3 0】

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{a} + \mathbf{f} \quad (8)$$

30

【0 2 2 3】

このとき、 \mathbf{a} は回帰係数ベクトルであり、その要素は a_j ($j = 1, 2, \dots, N$)で表される。また \mathbf{f} はyの残差である。

【0 2 2 4】

3. 熱ストレス下における選択的な翻訳と5' UTRとの関連性

3-1. 試験に用いた39遺伝子の選択

植物における環境ストレスによる翻訳状態の変化をゲノムワイドに解析するために、シロイヌナズナにおける通常細胞及びストレス処理した細胞由来の19099遺伝子について、ポリソーム/マイクロアレイ解析を行った。

【0 2 2 5】

40

まず同一条件で培養して得た培養細胞を2分割して調製した通常細胞及び熱ストレス処理(37、10分)した細胞を、それぞれショ糖密度勾配遠心を利用したポリソーム解析に供した。熱ストレス処理によりポリソーム画分が減少すると同時に非ポリソーム画分が増大することは、吸光プロファイルにより確認した。ポリソーム画分及び非ポリソーム画分からそれぞれRNAを抽出・精製し、精製したRNAを鋳型にCy3(ポリソーム画分)あるいはCy5(非ポリソーム画分)で蛍光標識したantisense RNA(aRNA)を調製し、Agilent oligoarray(Arabidopsis 3oligo microarray 44K; Agilent Technologies)上のプローブと競合ハイブリダイゼーションさせた。得られたマイクロアレイデータを基に、個々のmRNA種の翻訳状態(ポリソーム形成状態)を示す指標として、polysome score(ポリソーム画分[Cy3]/非ポリソーム画分[Cy5]のLog比)及びポリソーム画分に存在するmRNAの割合(%)を示すpoly

50

some ratio (Cy3/[Cy3+Cy5]に相当)を算出した。

【 0 2 2 6 】

通常細胞におけるpolysome scoreは、下記式により求めた。

【 0 2 2 7 】

【数 3 1】

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

【 0 2 2 8 】

上記式において、 poly_{con} は通常細胞由来のマイクロアレイデータにおけるCyanine3 (Cy3) シグナル値、換言すると通常細胞でのポリソーム画分に存在するmRNA量を表す。また、 nonpoly_{con} は通常細胞由来のマイクロアレイデータにおけるCyanine5 (Cy5) シグナル値、換言すると通常細胞でのポリソーム画分でない画分に存在するmRNA量を表す。

【 0 2 2 9 】

また、熱ストレス処理した細胞におけるpolysome scoreは、下記式により求めた。

【 0 2 3 0 】

【数 3 2】

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

【 0 2 3 1 】

上記式において poly_{heat} は、高温ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおけるCy3シグナル値、換言すると熱ストレス処理した細胞でのポリソーム画分に存在するmRNA量を表す。また、 nonpoly_{heat} は、高温ストレス処理した細胞由来のマイクロアレイデータにおけるCy5シグナル値、換言すると熱ストレス処理した細胞でのポリソーム画分でない画分に存在するmRNA量を表す。

【 0 2 3 2 】

更に、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として、下記式で表される PSを各遺伝子について求めた。

【 0 2 3 3 】

【数 3 3】

$$\Delta PS = PS_{heat} - PS_{con}$$

【 0 2 3 4 】

また、PSの大きさに従って、19099遺伝子のmRNAについて、ランキング化を行った。即ち、PSの値が大きいほど、ランキングの上位とし、値が小さいほど、下位に順位づけした。PSの値が大きいほど、翻訳状態が影響を受けないことを示し、PSの値が小さいほど翻訳が顕著に阻害されることを示す。

【 0 2 3 5 】

図5に、熱ストレスによるポリソーム形成状態の変化を示す指標であるPSのヒストグラムを19099種のmRNAについて示した。縦軸は遺伝子数を示す。

【 0 2 3 6 】

このポリソーム/マイクロアレイ解析の結果に基づいて、PSのランキングの上位から下位に位置する遺伝子を含むように一定値ごとに17遺伝子を選択した。この際、Kawaguchiら(非特許文献4)の情報を基に5' UTRの全長が特定されているもののみ選択した。

【 0 2 3 7 】

図7(A)に、選択した17遺伝子の、PS値をPSのヒストグラム上に丸で示した図を示す。

【 0 2 3 8 】

さらに、熱ストレス下においても翻訳状態が抑制されないと予想されるランキング上位の遺伝子を22個選択した。図8(A)に、22遺伝子のPS値をPSのヒストグラム上に丸で示した図を示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 9 】

上記選択した17遺伝子と22遺伝子の合計39遺伝子を、下記試験に用いた。

【 0 2 4 0 】

3-2 選択した39遺伝子由来の5' UTRがキャップ構造を持つmRNAの翻訳に与える影響

選択した39遺伝子の5' UTRの熱ストレス下における翻訳への寄与を検証するために、試験する5' UTRを付加した*in vitro*合成レポーター-mRNAをプロトプラストに導入し、レポーターの発現を評価する一過性発現実験を行った。

【 0 2 4 1 】

図6に、一過性発現実験の概要を示す。シロイヌナズナ培養細胞T87から調製したプロトプラストに*in vitro*合成したfirefly luciferase (f-luc) mRNAとRenilla luciferase (r-luc)mRNAをPEG法により導入した後、当該プロトプラストを2サンプルに分けた。プロトプラストサンプルの1方を通常温度下(22℃)、もう1方を熱ストレス下(Heat stress)に20分間静置した。その後両プロトプラストサンプルを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。m⁷Gはキャップ構造を、n=49はポリA配列の長さを示す。

10

【 0 2 4 2 】

firefly luciferase mRNA (f-luc mRNA)は、各遺伝子の5' UTRを連結したキャップ構造、ポリA配列を有しており、+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAとも表される。また、Renilla luciferase (r-luc) mRNAは、キャップ構造及びポリA配列を有するコントロールRNAであって、+cap_r-luc_pA mRNAとも表される。

【 0 2 4 3 】

図7(B)に、PSのランキング上位から下位まで一定値ごとに選択した17遺伝子の試験結果を示す。選択した遺伝子の5' UTRを連結した、+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを等量ずつ、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。縦軸には選択した遺伝子のAGIcodeおよび括弧内にPSの値を示す。横軸には各構築の22℃における活性値を1とした相対f-luc活性値(a)、またはr-luc活性値(b)を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

20

【 0 2 4 4 】

また、図8(B)に、ランキング上位を中心に選択した22遺伝子の試験結果を示す。選択した遺伝子の5' UTRを連結した、+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAを等量ずつ、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。縦軸には選択した遺伝子のAGIcodeおよび括弧内にPSの値を、横軸には各構築の22℃における活性値を1とした相対f-luc活性値(a)、またはr-luc活性値(b)を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。

30

【 0 2 4 5 】

図7(B)(a)におけるAt3g47610、At3g51860、At5g39740等のデータに示されるように、ランキング中位または下位に位置する遺伝子の5' UTRを用いた場合には、37℃の熱ストレス処理によって相対活性値が減少した。

40

【 0 2 4 6 】

一方、図7(B)(a)のAt4g14560、及び図8(B)(a)のAt1g55330、At1g77120等に例示されるように、ランキング上位に位置する遺伝子の5' UTRの場合については、そのような相対活性値の減少が見られなかった。

【 0 2 4 7 】

これに対し、図7(B)(b)及び図8(B)(b)に示されるように、対照として共導入した+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は、+cap_5' UTR_f-luc_pA 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。

【 0 2 4 8 】

50

さらに、図9に、図7、図8に示した22 に対する37 の相対活性値と PS値の相関を、試験した計39遺伝子について示した。縦軸は対数表示である。rはピアソン相関係数を示す。相関の有無は統計的に検定した(p)。

【 0 2 4 9 】

図9に示されるように、39遺伝子の5' UTRについて得られた22 に対する37 の相対活性値と、 PSの値との間に正の相関が認められた ($r=0.67$ 、 $p<0.05$)。

【 0 2 5 0 】

この結果は、熱ストレス下の翻訳状態を決定する因子としての5' UTRの重要性を示している。

【 0 2 5 1 】

4. PLS法を用いたin silico解析による、熱ストレスに応答した翻訳制御を規定する5' UTRの配列情報の抽出とその検証

前記3では、5' UTRが熱ストレス下におけるmRNAの翻訳レベルの応答を決定する重要な要因であることが示された。

【 0 2 5 2 】

そこで、更に、5' 側からの塩基のポジションという観点に基づいたPLS解析を用いたin silico解析により、熱ストレス下の翻訳状態と関連のある、5' UTR内の配列情報の抽出を試みた。

【 0 2 5 3 】

4-1 PLS法を用いた、翻訳レベルの応答と5' UTR配列情報を関連付ける予測モデルの構築

先の一過性発現実験に供した計39遺伝子の5' UTRの配列情報と22 に対する37 の相対活性値の情報を基に、実際の相対活性値に対する変数 (部分塩基配列)の係数を求める多変量解析法 (PLS法)による回帰モデルの構築を行った。概念図を図10に表した。

【 0 2 5 4 】

まず、前記3にて試験した39遺伝子の5' UTRの22 に対する37 の活性値 (相対活性値)と、それぞれの5' UTRの配列情報を抽出した (図10-A)。

【 0 2 5 5 】

次に、5' 端から10塩基、または10番目の塩基から20塩基という様に、5' UTRの任意の位置kから、長さLの配列を抜き出した (図10-B)。抜き出した領域に含まれる部分3塩基配列、例えば、AAA、AUG、UUC等の頻度を数え (図10-C)、PLS法を用いて指定した範囲の回帰モデルを構築し、3塩基配列の回帰係数を求めた (図10-D)。

【 0 2 5 6 】

そして、様々な領域の回帰モデルおよび回帰係数を算出し、実際の相対活性値に対するモデルの予測精度の尺度として Q^2 を求めた。

【 0 2 5 7 】

図11に、本試験で扱った39遺伝子の5' UTRの配列情報及び一過性発現実験より得られた相対活性値を用いたin silico解析による5' UTR内の熱ストレス下における翻訳に影響を及ぼす領域の解析結果を示す。

【 0 2 5 8 】

図11の横軸は、5' UTR内の5' 端からの距離を示している。縦軸にはin silico解析によって示された、予測精度を表す Q^2 値を示した。 Q^2 値が高い領域ほど予測精度が高く、その領域だけで構築したモデルを説明することができる。つまりその領域が熱ストレス下でのレポーターmRNAの選択的な翻訳に直接的に影響していることを示している。なお、一過性発現実験で用いたmRNAには全てT3プロモーターからの転写後に5' 端にGGが付加されており、それを含めた配列 (GG + 5' UTRの配列)をin silico解析に用いた。従って、実際の5' UTRの領域は領域の値から2を引いたものになる。

【 0 2 5 9 】

その結果、モデル構築に使用した領域によって Q^2 が大きく異なることが解り、最も Q^2 が高かった5' 端の9塩基、実際の5' UTRではT3プロモーター由来のGGを除く7塩基、が非常

10

20

30

40

50

に重要であるとの推測を得た。

【0260】

図12に、 Q^2 の値が最も高い5'端9塩基(実際は7塩基)について、その領域を基にした回帰モデル及び回帰係数から得られた相対活性値の予測値と、実際に試験した39遺伝子の実測の相対活性値との相関を示した。 r はピアソン相関係数を示す。 $p < 0.01$ は無相関検定の結果を示す。

【0261】

その結果、非常に高い相関が見られ、精度の高いモデルの構築ができたことと考えられる。

【0262】

4-2 熱ストレス下での翻訳抑制回避には5'UTRの5'端7塩基が非常に重要な役割を果たす

in silico解析から予測された5'UTRの5'端側7塩基、別言するとin silico解析より予測された9塩基からT3プロモーター由来のGGを除く7塩基、の重要性を一過性発現実験により検証した。

【0263】

これまでに一過性発現実験に供した39遺伝子の5'UTRのうち、37における22との相対活性値が高かった遺伝子At4g14560、At3g15450及びAt1g77120と、低かった遺伝子At3g47610及びAt5g57440の5'UTRの5'端7塩基を入れ換えて、先の一過性発現実験と同様に22と37におけるレポーター活性を測定した。

【0264】

相対活性値の高かった遺伝子の5'UTRについて、At4g14560はgood (1)、At3g15450はgood (2)、At1g77120はgood (3)で示した。一方、相対活性値の低かった遺伝子の5'UTRについて、At3g47610はbad (1)、At5g57440はbad (2)で示した。

【0265】

図13左部に、用いた遺伝子の5'UTRの全長、及び5'UTRの1~7番目の塩基を他の5'UTRに1~7番目の塩基で入れ換えたものの構成を図示する。

【0266】

(a)、(c)、(e)、(g)、(i)、(k)は、用いた遺伝子の5'UTRの全長を示す。また、(b)、(d)、(f)、(h)、(j)及び(l)は、それぞれの遺伝子の5'UTRの1~7番目の塩基を、図示されている5'UTRに置換したものを示す。

【0267】

また表2に、図13の解析に用いた(a)-(l)の5'UTRについてのAGIcode、配列及び塩基長を示した。太字下線部は、5'端7塩基を入れ換えた後の配列を示している。

【0268】

(a)~(l)をそれぞれ付加した+cap_5'UTR_f-luc_pA mRNAを、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22)、熱ストレス(37)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。

【0269】

図13右に、各構築物についての、22における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差で示した。

【0270】

尚、試験した+cap_5'UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

【0271】

図13における(a)と(b)、(e)と(f)、(i)と(j)との対比から示されるように、相対活性値の高い遺伝子の5'UTRの5'端7塩基を、相対活性値の低い遺伝子の5'UTRの5'端7塩基と入れ換えた場合、全ての5'UTRにおいて相対活性値の減少が認められた。

10

20

30

40

50

【0272】

一方で、図13における(c)と(d)、(g)と(h)、(k)と(l)との対比から示されるように、相対活性値の低い遺伝子の5' UTRの5' 端7塩基を、相対活性値の高い遺伝子の5' 端7塩基と入れ換えた場合には、顕著な変化は見られなかったものの、相対活性値のわずかな上昇が認められた。ただし、(l)については相対活性値の高い遺伝子の5' UTRの5' 端7塩基を入れ換えることによって、開始コドンAUGが新たに生じてしまうため(表2の(l)の配列参照)、真のレポーター活性を反映しているとは言えない。

【0273】

これらの結果は、熱ストレスによる選択的な翻訳には、5'UTRの5' 端側7塩基が大きく影響していることを示している。

10

【0274】

しかしながら、相対活性値の低い遺伝子の5' UTRの5' 端7塩基を、相対活性値の高い遺伝子の5' UTRの5' 端7塩基と入れ換えたときに、相対活性値の増加が小さかったことから、翻訳抑制の回避に重要な5' UTR領域が、5' 末端7塩基以外にも存在することが示唆された。

【0275】

【表2】

| Sample name | AGI code | Sequence | 5'UTR (nt) |
|-------------|-----------|--|------------|
| a | At4g14560 | acacaaagcauuucaaaggauucaaaucacaaucccaagaagcacaauaacaagaagaagguucaagaauuaaggagagcucuccguuaaaaguuagugagagaau | 117 |
| b | - | ccuuuc cauuucaaaggauucaaaucacaaucccaagaagcacaauaacaagaagaagguucaagaauuaaggagagcucuccguuaaaaguuagugagagaau | 117 |
| c | At3g47610 | ccuuuc <u>u</u> gucgucguuucgaagagacuaaaggcgacggagagaucggagaagaag | 57 |
| d | - | acacaa gugucgucguuucgaagagacuaaaggcgacggagagaucggagaagaag | 57 |
| e | At3g15450 | auaacacauuucagcauuggauuaucuaaagacaaagaaaacgaaa | 47 |
| f | - | gguu cguauucaagcauuggauuaucuaaagacaaagaaaacgaaa | 47 |
| g | At5g57440 | ggucgucguuucgguaucgaaucaca | 29 |
| h | - | auaacac cguaucgguaucgaaucaca | 29 |
| i | At1g77120 | uacaucacaucacacaaaacuaacaaaagaucaaaaagcaaguuucacugugaua | 58 |
| j | - | ccuuuc cauuucacacacaaaacuaacaaaagaucaaaaagcaaguuucacugugaua | 58 |
| k | At3g47610 | ccuuuc <u>u</u> gucgucguuucgaagagacuaaaggcgacggagagaucggagaagaag | 57 |
| l | - | uacauca ugucgucguuucgaagagacuaaaggcgacggagagaucggagaagaag | 57 |

20

30

図13の解析に用いた5'UTR、および入れ換え後の5'UTRの配列情報

【0276】

4-3 5' UTR内の12~32番目の塩基についても熱ストレス下での翻訳抑制の回避に貢献している

4-2より、熱ストレスによる翻訳抑制の回避に、5' UTRの5' 端7塩基以外の領域も、貢献している可能性が示唆された。

【0277】

図11に示す、先のPLS法を用いたモデル構築とQ²解析から、熱ストレスによる翻訳抑制の回避に寄与する5' UTRの5' 端7塩基以外の領域の候補として、12から32番目の塩基領域、言い換えると、in silico解析から予測された14から34番目の塩基からT3プロモーター由来のGGを除く領域、が推測された。

40

【0278】

そこで、Q²の値が2番目に高かった12~32番目の塩基について、その領域を基にした回帰モデル及び回帰係数から得られた相対活性値の予測値と、実際に試験した39遺伝子の実測の相対活性値との相関を調べた。

【0279】

結果を図14に示す。図14の縦軸には、PLS法によって12~32番目の塩基を基にした回帰モデルから予測された相対活性値、横軸には39遺伝子の実測の相対活性値を示した。rは

50

ピアソン相関係数を示す。p<0.01は無相関検定の結果を示す。

【0280】

その結果、図12に示した5'端1~7塩基の結果ほどではないが、確かに高い相関が見られ、この領域でも精度の高いモデルの構築ができると考えられる。

【0281】

そこで、12~32番目の塩基についても、先の5'端7塩基の場合と同様に、一過性発現実験による評価を行った。

【0282】

ここでは、5'UTRの塩基長の違いによる影響を排除するために、入れ換えるペアの遺伝子の5'UTRの長さを出来るだけ近いものにし、短いペア(47ntと42nt)と長いペア(210ntと198nt)同士で入れ換えを行った。

10

【0283】

図15に短いペアの入れ換え試験の結果を示す。

【0284】

図15では、相対活性値の高い遺伝子At3g15450の5'UTR(白枠)と、相対活性値の低い遺伝子At5g39740の5'UTR(灰色枠)の5'端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳への影響を検証した。

【0285】

図15において、(a)、(e)は、5'UTRの全長配列を示す。(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)は、それぞれの5'UTRに対して、示した番号の塩基領域を他方の5'UTRに置換したものを示す。

20

【0286】

また、表3に、図15の解析に用いた(a)-(h)の5'UTRのAGIcode、配列及び塩基長を示した。太字下線部は、5'端7塩基および12~32番目の塩基、または両方を入れ換え後の配列を示している。

【0287】

(a)-(h)で図示した各5'UTRを付加した+cap_5'UTR_f-luc_pA mRNAは、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。

30

【0288】

図15右に、各構築の22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。尚、試験した+cap_5'UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

【0289】

【表3】

| Sample name | AGI code | Sequence | 5'UTR (nt) |
|-------------|-----------|--|------------|
| a | At3g15450 | auaacacauuuc <u>aa</u> gcauuggauuaaucaagacaagaaaacgaaa | 47 |
| b | - | <u>gg<u>uucg</u>u</u> auuuc <u>aa</u> gcauuggauuaaucaagacaagaaaacgaaa | 47 |
| c | - | auaacacauuuc <u>caucuuuu</u> gucacuc <u>auuc</u> acaaaagaaaacgaaa | 47 |
| d | - | <u>gc<u>ccu</u>cauuc<u>caucuuuu</u>gucacuc<u>auuc</u>acaaaagaaaacgaaa</u> | 47 |
| e | At5g39740 | gc <u>gccu</u> cuugcc <u>caucuuuu</u> gucacuc <u>auuc</u> acaggaaca | 42 |
| f | - | <u>auaacac</u> cuugcc <u>caucuuuu</u> gucacuc <u>auuc</u> acaggaaca | 42 |
| g | - | gc <u>gccu</u> cuugcc <u>caagcau</u> ug <u>ga</u> uu <u>aa</u> caagacaggaaca | 42 |
| h | - | <u>auaacac</u> cuugcc <u>caagcau</u> ug <u>ga</u> uu <u>aa</u> caagacaggaaca | 42 |

40

図15の解析に用いた5'UTR、および入れ換えを行った5'UTRの配列情報

【0290】

50

短いペアの場合、相対活性値の高い遺伝子の5' UTR (白枠)の5' 端7塩基に対して、相対活性値の低い遺伝子の5' UTR (灰色枠)の5' 端7塩基を入れ換えることによって、活性値が減少した(図15-b)。また、5' 端から12~32番目の塩基を入れ換えたものでは5' 端7塩基を入れ換えたほどではないが減少が見られた(図15-c)。

【0291】

両方の領域を同時に入れ換えた場合には、7塩基のみを入れ換えた場合よりもさらに活性値が大きく減少した(図15-d)。一方、相対活性値の低い遺伝子の5' UTR (灰色枠)の5' 端7塩基を相対活性値の高い遺伝子の5' UTR (白枠)の5' 端7塩基と入れ換えた場合には活性値の増大が認められた(図15-f)。12~32番目の塩基を入れ換えた場合にも7塩基の場合ほどではないが増加が見られた(図15-g)。両方の領域を同時に入れ換えた場合には7塩基のみを入れ換えた場合よりもさらに大きく活性値が増加した(図15-h)。仮想的に、5' 端7塩基、12~32番目の塩基以外の領域を入れ換えたと考えることが可能な、図15-aとh、あるいはdとeに着目してみた場合、5' 端7塩基、12~32番目の塩基以外の領域が、相対活性値に与える影響はほとんどないことが示唆される。

10

【0292】

以上の結果は、熱ストレス下のレポーター-mRNAの翻訳に対して、5' 端7塩基が重要であることと共に、12~32番目の塩基領域単独では、その影響は小さいが、5' 端7塩基と同時に存在することで、より大きな影響を与えることを示している。

【0293】

また、図16に長いペアの入れ換え試験の結果を示した。

20

【0294】

図16では、相対活性値の高い遺伝子At4g12000の5' UTR (白枠)と相対活性値の低い遺伝子At2g41630の5' UTR (灰色枠)の5' 端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を入れ換えることによるレポーター-mRNAへの発現への影響を検証した。

【0295】

(a)及び(e)は、5' UTRの全長配列を示す。(b)、(c)、(d)、(f)、(g)及び(h)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を他方の5' UTRに置換したものを示す。

【0296】

また表4に、図16の解析に用いた、(a)~(h)の5' UTRのAGIcode、配列及び塩基長を示した。太字下線部は、5' 端7塩基および12~32番目の塩基、または両方を入れ換え後の配列を示している。

30

【0297】

(a) - (h)で図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAは、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプル分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。

【0298】

図16右に、各構築の22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。尚、試験した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

40

【0299】

(a)-(d)で 図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAは、コントロールである+cap_r-luc_pA 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)、熱ストレス (37)で20分間静置した。その後プロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。

【 0 3 0 8 】

また図17 右に、各構築の22 における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。尚、試験した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

【 0 3 0 9 】

【表 5】

| Sample name | AGI code | Sequence | 5'UTR (nt) |
|-------------|-----------|--|------------|
| a | At5g39740 | gcgcccuugcccaucuuuugucacucacucacaggaaca | 42 |
| b | - | auaacacuugccaagcauuggaauaaucuaaaacaggaaca | 42 |
| c | - | gcgccauaacacaucucaagcauuggaauaaucuaaaacaggaaca | 42 |
| d | - | gcgcccuuggaauaacacuugcaagcauuggaauaaucuaaaag | 42 |

10

図 17 の解析に用いた 5'UTR、および入れ換えを行った 5'UTR の配列情報

20

【 0 3 1 0 】

その結果、5' 端7塩基と12~32番目の塩基を入れ換えたものに比べ (図17-b)、3' 側へ5 bpあるいは10 bp移動させただけで相対活性値が著しく減少し (図17-c、d)、重要領域を入れ換える前の全長配列の場合と同程度の相対活性値を示した。

【 0 3 1 1 】

このことから、相対活性値の高かった5' UTRの5' 端7塩基、12~32番目の塩基の重要領域は、単に5' UTR内に存在するだけでなく、5' 端側に存在することが重要である可能性が示された。

【 0 3 1 2 】

4-5. in silico解析からの構築モデルを用いた活性予測値と PSとの相関

30

これまでの実験では、一過性発現実験により実際に試験した5' UTRの配列情報とその実測値 (相対活性値)を基に、PLS法を用いたモデル構築を行い、熱ストレス下におけるレポーターmRNAの翻訳に寄与する重要領域、即ち、5' 端7塩基及び12~32番目の塩基を見出した。

【 0 3 1 3 】

続いて、熱ストレスに応答した翻訳状態の変化を規定する因子としての5' 端7塩基、12~32番目の塩基の重要性を異なる角度から検証した。

【 0 3 1 4 】

まず、一過性発現実験により得られた約39種の遺伝子の5' UTRについての実測値 (相対活性値)を基に、5' 端7塩基、12~32番目の塩基の両方の配列情報を利用したPLSによる回帰モデルの構築及び回帰係数の算出を改めて行った。

40

【 0 3 1 5 】

続いて、Kawaguchiらによって全長5' UTR配列が整理された約3000の遺伝子 (非特許文献 4) について、その5' UTRの配列及び構築モデルから予測される相対活性値を算出し、3-1に記載したポリソーム/マイクロアレイ解析から算出した PS値、即ち、熱ストレスによる翻訳状態の変化を表す指標に対し、どの程度相関しているか検証した。

【 0 3 1 6 】

図18に、in silicoでのPLS解析によって構築されたモデル式から予測される相対活性値とポリソーム/マイクロアレイにて解析された PSとの相関関係を調べた結果を示す。図18の横軸にポリソーム/マイクロアレイにて得られた PSを、縦軸には既に5' UTRの配列情

50

報が整理されている1746遺伝子について3-2-1にて得られたPLSによる *in silico*解析によって得られた構築モデルから予測された相対活性値を示した。rはピアソン相関係数を示す。p<0.01は無相関検定の結果を示す。

【0317】

その結果、2つの指標値（予測相対活性値と PS値）の間に、緩やかではあるが(r=0.2737)、統計的に有意な (p<0.01)相関が見られた。

【0318】

つまり、PLS法によって構築した回帰モデルに対して5' UTRの特定領域（5' 端7塩基、12~32番目の塩基）の情報をインプットするだけで、予測した相対活性値と実測した PS値が相関することを示している。レポーターmRNAへの一過的な発現に対する寄与だけでなく、mRNAのポリソーム形成状態の変化についても5' 端7塩基及び12~32番目の塩基が重要因子として寄与していることが示唆された。

【0319】

5. 熱ストレス下においても翻訳の抑制を受けない最適配列

5-1. *in silico*解析を用いた、熱ストレス下においても翻訳の抑制を受けない最適5' UTR配列の抽出

続いて、PLS法により構築されたモデルを基に、熱ストレスによるレポーターmRNAの翻訳抑制の回避に寄与する最適配列の抽出を行った。

【0320】

具体的には、4-1において、5' 端7塩基、12~32番目の塩基情報に基づいて構築したPLSモデルによって算出した部分塩基配列の回帰係数を基に、図19の概念図に示したように、各ポジションにおける各塩基のPLS回帰係数を配置し（図19-A）、各塩基位置における4種塩基のそれぞれの平均値を求め、さらにt検定を行った（図19-B）。各塩基配列ポジションにおける各塩基の重み（発現強度に与える影響）を算出することにより最適配列を抽出した。

【0321】

図20の横軸には5' UTR内での塩基のポジションを示している。例えば、9は5' 端から9番目の塩基を示す。また縦軸にはPLS法により構築されたモデルを基に算出された、各塩基の重み、換言すると発現強度を示した。これが高いほど熱ストレス下でのレポーターmRNAの翻訳の抑制回避に寄与していることを示している。統計的に有意であるもの(p<0.05)の中で各塩基の重みが4種の塩基の中で最も高いものを選択した(黒枠)。また、4種塩基とも有意でない場合は、塩基の重みが一番高い塩基を選択した(黒丸)。

【0322】

なお、一過性発現実験で用いたmRNAには全てT3プロモーターからの転写後に5' 端にGGが付加されており、それを含めた配列 (GG + 5' UTRの配列)を *in silico*解析に用いた。実際の5' UTRの領域は領域の値から2を引いたものになる。

【0323】

5-2. *in silico*解析によって得られた最適配列の一過性発現実験による検証

5-1に示す *in silico*解析の結果を受けて、提示された最適配列が実際のレポーターmRNAの熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与しているのかどうかを一過性発現実験によって検証した。

【0324】

検証方法としては、相対活性値が低く、且つ長さの異なる2種類の5' UTR、具体的にはAt5g39740の5' UTR (42 bp) 及びAt2g41630の5' UTR (198 bp) を用いて、5' 端7塩基、12~32番目の塩基、または両方を上記に示した最適配列に入れ換えて一過性発現実験を行い、熱ストレス下におけるレポーターmRNAの翻訳に与える影響を検証した。最適配列（「best」と示す）としては、5' 端7塩基はuuaaaa、12~32番目の塩基はacaaaaaaaaaaaaaaaaaaとして、試験5' UTRの5' 端7塩基及び12~32番目の塩基またはその両方の領域を同配列と入れ換えた。

【0325】

10

20

30

40

50

尚、At2g41630の5' UTRの12~32番目の塩基を最適配列に置き換えた場合、開始コドンAUGが生じてしまうために、33番目の塩基もuからaに入れ換えた(表7)。

【0326】

図21に短い5' UTR (At5g39740)の入れ換え試験の結果を示した。

【0327】

相対活性値の低かった遺伝子At5g39740の5' UTR(灰色枠)の5' 端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を最適配列に入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳への影響を検証した。

【0328】

図21左図に5'UTRの構成を示す。(a)は5' UTRの全長配列を示す。(b)は、(a)に対して、示した番号の塩基領域を、相対活性値の高かった遺伝子At3g15450の5' UTR(「good」で示す)の同領域に置換したものを示す。(c)、(d)、(e)は、それぞれの5' UTRに対して、示した番号の塩基領域を最適配列(「best」と示す)に置換したものを示す。

10

【0329】

また、表6に、図21の解析に用いた、(a)-(e)までの5' UTRのAGI code、配列及び塩基長を示した。太字下線部は、5' 端7塩基および12~32番目の塩基、または両方を入れ換え後の配列を示している。(a)-(e)で図示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAは、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。

20

【0330】

図21右図に、各構築の22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。尚、試験した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

【0331】

短い5' UTR(灰色枠)の場合、5' 端7塩基を最適配列に入れ換えることによって、相対活性値の増大が認められた(図21-c)。12~32番目の塩基を最適配列に入れ換えた場合には相対活性値に影響は見られなかったものの(図21-d)、両方の領域を最適配列に入れ換えた場合には大きく相対活性値が増加した(図21-e)。また、その増加は図21-bに示した、同領域を相対活性値の高い5' UTRのものに入れ換えた場合よりも(図15-h)、増加の程度が大きくなった。以上の結果より、これまでも示した、5'末端7塩基及び12~32番目の領域の重要性が再度示されたことに加え、最適配列が熱ストレス下での翻訳抑制回避に寄与することが示された。

30

【0332】

【表6】

| Sample name | AGI code | Sequence | 5'UTR (nt) |
|-------------|-----------|--|------------|
| a | At5g39740 | gcgccu <u>uugcca</u> cuuuugucacucaucacaggaaca | 42 |
| b | - | <u>auaacacuugcca</u> agcauugga <u>uuuuuu</u> caaaagacaggaaca | 42 |
| c | - | <u>uuuuuuuu</u> ugcca <u>uuuu</u> gucacucaucacaggaaca | 42 |
| d | - | gcgccu <u>uugcaca</u> aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacaggaaca | 42 |
| e | - | <u>uuuuuuuu</u> ugcaca <u>aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</u> acaggaaca | 42 |

40

図21の解析に用いた5'UTR、および入れ換えを行った5'UTRの配列情報

【0333】

また、図22に長い5' UTR (At2g41630)の入れ換え試験の結果を示した。相対活性値の低かった遺伝子At2g41630の5' UTR(灰色枠)の5' 端7塩基および12~32番目の塩基、またはそれら両方を最適配列に入れ換えることによるレポーターmRNAの翻訳へ

50

通常、有用遺伝子や5' UTRを連結した植物発現ベクターは、基本となるベクターのプロモーター領域下流に位置する制限酵素部位を利用して構築する(図23)。図23に一般的な植物発現ベクターの構築図を示す。この場合は、基本となる発現ベクターのXbaIおよびSacl部位に5' UTRおよび遺伝子を導入している。

【0343】

しかし、この場合はプロモーターから転写されたmRNAの5'側にベクターに由来する配列が付加されてしまうことになる。言い換えると、本来の5' UTRの5'側に転写開始点から構築に利用した制限酵素部位までの余分な配列が付加されてしまう。一方で、4-4の結果が示すように、熱ストレスによる翻訳抑制を回避できる5' UTRの特徴としては、5' UTRの5'端7塩基、12~32番目の塩基の領域が、単に5' UTR内に存在するのではなく、5'端側に存在することが重要であることが明らかとなっている。そのため、図23のような構築を行なった場合には、ストレスによる翻訳抑制を回避するという能力を発揮できない恐れが考えられる。

10

【0344】

6-1 ベクター由来の配列が熱ストレス下におけるレポーターmRNAの翻訳に与える影響

相対活性値が高いAt1g77120の5' UTR、およびその末端に図23でXbaI部位を利用してベクターに連結した場合に予想されるベクター由来の配列が付加された場合のmRNAをそれぞれ合成し、ベクター由来の配列が付加された場合の翻訳抑制回避への影響を一過性発現実験によって検証した。

20

【0345】

図24に5'UTRの構成を示す。(At1g77120+)は、At1g77120の5' UTRに予想されるベクター由来の配列が付加された場合のmRNA、(At1g77120)は、At1g77120の5' UTRのみを持つmRNAを示す。また、Cは、CaMV35Sプロモーターの転写開始点、即ち、5' UTRの5'末端を示す。

【0346】

表8に、(At1g77120+)と(At1g77120)の5' UTR配列を示した。

【0347】

【表8】

| Sample Name | Sequence |
|-------------|--|
| At1g77120+ | cacgggggacucuaagaucaucacacaaaacuaacaaaagaucaaaagcaaguucucacugugaua |
| At1g77120 | uacaucacaaaacacacaaaacuaacaaaagaucaaaagcaaguucucacugugaua |

30

図25の解析に用いた5'UTRの配列情報

【0348】

図24で示した各5' UTRを付加した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAは、コントロールである+cap_r-luc_pA 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2サンプルに分けた後、それぞれを通常温度(22℃)、熱ストレス(37℃)で20分間静置した。その後それぞれのサンプルからプロトプラストを回収し、f-luc及びr-luc活性を測定した。図25に、図24で示した各構築物At1g77120+及びAt1g77120の22℃における活性値を1としたときのf-luc活性値を示した。結果は、3回の独立した実験の平均値、及び標準誤差を示した。尚、試験した+cap_5' UTR_f-luc_pA mRNAの種類に関わらず、+cap_r-luc_pA mRNAからの発現量は同程度に減少した。

40

【0349】

熱ストレス下において翻訳抑制を回避できるAt1g77120の5' UTRに発現ベクター構築後に予想されるベクター由来の配列を付加した場合、大きく相対活性値が減少した。

【0350】

このことから、植物へ導入した遺伝子を発現させ、かつ、ストレス下でも抑制されことなく効率的に翻訳させるためには、ストレス下でも翻訳抑制を回避できる5' UTRを適切な位置に、具体的にはプロモーターの転写開始点直後に連結する必要があることがわかつ

50

た。

【 0 3 5 1 】

7. 安定形質転換細胞作出

7-1 バイナリーベクターの構築

At1g77120+の5' UTRがCaMV35SプロモーターとGUS遺伝子(- グルクロニダーゼ遺伝子)の間に挿入されているプラスミドAtADH NF (Sugio et al., J. Biosci. Bioeng., 3, 300-302.2008)のNOSターミネーター領域をSacI/EcoRIサイトを用いてHSPターミネーター (Nagaya et.al., Plant Cell Physiol. 51(2): 328-332 (2010))と置換した(At1g77120+ NF HSP-T)。At4g14560、At3g47610、At5g39740、At5g39740-Sの5' UTRについてXbaIサイトを持つforwardプライマーと3'側にStuIサイトを持つbackwardプライマー(表9)を用い、各5' UTRが挿入されているpT3-5' UTR-FL-pAを鋳型としてPCRを行った。得られたPCR産物をXbaI/StuIサイトを用いてAt1g77120+ NF HSP-TのAt1g77120の5' UTRと置換した。得られたプラスミドをそれぞれAt4g14560+ NF HSP-T、At3g47610+ NF HSP-T、At5g39740+NF HSP-T、At5g39740-S+ NF HSP-Tと名付けた。次にCaMV35Sプロモーターの転写開始点とそれぞれの5' UTRとの間の余分配列を取り除くために、forwardとbackwardプライマー(表10)を用いてインバースPCRを行った。PCR産物を自己連結し、得られたプラスミドをそれぞれAt4g14560 NF HSP-T、At1g77120 NF HSP-T、At3g47610 NF HSP-T、At5g39740NF HSP-T、At5g39740-S NF HSP-Tと名付けた。また塩基配列を決定することで変異がないことを確認した。最後に、At4g14560+ NF HSP-T、At1g77120+ NF HSP-T、At4g14560 NFHSP-T、At1g77120 NF HSP-T、At3g47610 NF HSP-T、At5g39740 NF HSP-T、At5g39740-S NF HSP-TのHindIII/EcoRI断片をpRI910 (TAKARA-BIO)に挿入し形質転換用ベクターを作製した。作製したバイナリーベクターをエレクトロポレーション法によりAgrobacterium tumefaciens EHA105株に導入し、グリセロールストックとして-80℃で保存した。なお、図26に、作製したバイナリーベクターの構築図を例示する。

【 0 3 5 2 】

【表9】

| 5'UTR (AGI code) | Primer sequences (5' to 3') |
|------------------|---|
| At4g14560 | actctagaacacaagcattttcaaggatat tgaggccttaacatattctctcactata |
| At3g47610 | actctagacctttctgtcgtcgtttcgaa tgaggccttaacatcttcttctccgattct |
| At5g39740 | actctagagcgcctcttgccatctttgtc tgaggccttaacattgtttctgtgaagat |
| At5g39740-S | actctagattaaaaattgcacaaaaaaaaa tgaggccttaacattgtttctgtttttt |

7-1でのPCRに用いたプライマー配列

【 0 3 5 3 】

【表 10】

| 5'UTR (AGI code) | Primer sequences (5' to 3') |
|---------------------|-------------------------------------|
| At4g14560 | acacaagcattttcaaggata |
| At1g77120 | tacatcacaatcacacaaaac |
| At3g47610 | cctttcttgcgtcgtttcga |
| At5g39740 | gcgctcttgccatcttttgc |
| At5g39740-S | ttaaaaattgcacaaaaaaaaaaaaaaaaaacagg |
| backward(共通) | ttctctccaatgaaatgaac |

10

Inverse PCR に用いたプライマー配列

【 0 3 5 4 】

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℃にて振盪培養した。3日目シロイヌナズナ培養細胞T87培養液に2×YT培地(Molecular Cloning (Sambrook et al., 2001)に記載)で培養したアグロバクテリウム(作製した各バイナリーベクターが導入されている)を500 µlまたは1 ml (O.D.600測定値 1)接種した。同時に終濃度100 µMのアセトシリコンを添加し、22℃、連続明期、攪拌速度120 rpm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ファルコンに移し、遠心(800×g, 1 min, 4℃)を行った後、上清を除き、100 mg/l カルベニシリンナトリウムを含む改変LS培地(洗浄培地)を約20 ml加え、洗浄を行った(5回)。洗浄の後の培養細胞を洗浄培地100 mlに移し、22℃、連続明期、攪拌速度120 rpm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(洗浄方法は上記と同様)。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 µl、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カルベニシリンナトリウム, 3 g/l ゲランガム)に広げた。22℃、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、後述するGUS染色を行い、GUS遺伝子の発現を確認の後、十分に増殖したカルス塊を、95 mlの改変LS Km Cb液体培地中で培養し、その後の実験に使用した。

20

30

【 0 3 5 5 】

7-3 GUS染色による安定形質転換細胞の確認

基本的にJeffersonらの方法(Jefferson et al., (1987). EMBO J. 6, 3901-3907)に従い、GUS染色を行った。調整したGUS Extraction Buffer (50 mM Na₂HPO₄ pH7.0, 10 mM beta-Mercaptoethanol, 10 mM Na₂EDTA)に0.1 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronide cyclohexylammonium salt (x-gluc)を染色の直前に加え、混合液を回収したカルス塊に1 ml加え攪拌し、37℃にて30分~2時間静置した。色の変化を観察した。GUS遺伝子の発現が確認されたカルスを形質転換細胞として以下の実験(ポリソーム解析、RT-PCR、及びGUS活性測定)に用いた。

40

【 0 3 5 6 】

7-4 安定形質転換細胞の継代

培養は22℃、18時間明期/6時間暗期、攪拌速度120 rpmの条件で行い、95 mlの改変LS Km Cb液体培地を300 ml容の三角フラスコに入れ使用した。一週間ごとに、定常期に達した細胞4~10 mlを新しい培地95 mlに移植し、継代培養を行った。

【 0 3 5 7 】

8 ポリソーム/RT-PCR解析

8-1 安定形質転換細胞の生育条件及びストレス処理

形質転換細胞に対し、熱ストレス処理又は塩ストレス処理を行った。形質転換細胞の熱ストレス処理には、培養3日目の細胞を用い、37℃で10分間振盪培養した。熱ストレス処

50

理後、吸引濾過により培地を除き、液体窒素中で凍結させ、-80 にて保存した。通常細胞は温度が22 である以外は、熱ストレス処理した細胞と同様に扱った。塩ストレス処理にも、培養3日目の形質転換細胞を用いた。終濃度200 mMとなるようにNaClを細胞培養液に加えた後、通常の培養条件（上記7-4に記載の条件）で10分間振盪培養した。吸引濾過した細胞を液体窒素中で凍結させ、-80 にて保存した。

【 0 3 5 8 】

8-2 ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

ショ糖密度勾配遠心を利用したポリソーム解析は、Davisらの方法に準じて行った (Davies, E., and Abe, S. (1995). *Methods Cell Biol.* 50, 209-222.)。通常細胞もしくは熱ストレス/塩ストレス処理した細胞約300 mgを乳棒と乳鉢を用いて液体窒素中で細かく破砕した後、破砕粉末に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, 1% sodium deoxycholate)を加え、緩やかに懸濁した。遠心(15,000 ×g, 10 min, 4)により細胞残さを除いたのち、buffer B (50 mM Tris-HCl, pH8.5, 25 mM KCl, and 10 mM MgCl₂)により調製した15-60%ショ糖密度勾配4.5 ml上に上清を重層し、超遠心を行った (SW55 Ti rotor, 55,000 rpm, 50 min, 4 , brake-off) (Beckman Coulter)。ペリスタポンプ (Minipuls 3; Gilson)に連結したマイクロピペット (40 µl Calibrated Pipet; Drummond)をショ糖密度勾配の上部から挿入し、下部からショ糖密度勾配液を約1 ml/minの速度で吸引すると同時に、バイオミニ紫外吸収モニターAC-5200 (ATTO)を用いて254 nmの吸光度を記録した。

【 0 3 5 9 】

8-3 ショ糖密度勾配遠心液からのRNA抽出 (15フラクション)

ショ糖密度勾配遠心液約350 µlずつを、終濃度5.1 Mになるように8 M Guanidinium salt acid saltを予め加えておいたチューブ15本に回収した。混合液と等量の100% エタノールを加え、-20 にて一晩冷却した後、遠心操作(12,000 ×g, 45 min, 4)を行った。得られたペレットは85%エタノールにて一度洗浄した後、乾燥させた。その後のRNA精製にはRNeasy Mini Kit (Qiagen)を付属のプロトコールに従い用いた(DNaseI処理をオプションとして行った)。すべての画分のRNAをそれぞれ30 µlのRNase-free waterで溶解した。精製したRNAの品質は、1.5%変性ゲル電気泳動により検定した。

【 0 3 6 0 】

8-4 RT-PCR

15の画分から精製したRNA溶液を、等容量ずつ用いて逆転写反応を行った。逆転写反応には、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用い、反応系は20 µlとした (oligo dTプライマー使用)。PCR反応による特異的なcDNA産物の増幅は、2倍希釈した逆転写反応液2-3 µlを鋳型とし、遺伝子特異的なプライマー(表 1 1)及びKAPA Taq Extra PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS)を用いて行った(反応系は20 µl)。増幅産物は、アガロース電気泳動及びEtBr染色により可視化した。PCRのサイクル数はPCR産物の指数増加期内に設定した。

【 0 3 6 1 】

10

20

30

【表 1 1】

| Target gene | Primer sequences (5' to 3') |
|---------------------|---|
| GUS | ccttacgctgaagagatgctcg attcggatgatgataatcggctg |
| At4g14560 | cgactcaacagaagaatctg cgtatttgaacctattgc |
| At1g77120 | gagtattcgttcacatcacc caaagtgaacatcatctgca |
| At3g47610 | cgccgtaaggttctgttaa ccatccgacgtggactcaac |
| At3g18780 (Act2) | atggctgaggctgatgat ttagaacattttctggaacgatc |

RT-PCR に使用したプライマー配列

【 0 3 6 2 】

なお、ポリソーム / RT-PCR解析の概要を図 2 7 に示す。リボソームの mRNA への結合数は翻訳の効率(多数のリボソームが結合しポリソームを形成している mRNA では翻訳が活発に行われ、リボソームが解離し非ポリソームとなっている mRNA では翻訳が抑制される)を示す指標となるため (Mathews et al., (2007). (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-40.; Kawaguchi and Bailey-Serres, Kawaguchi R., and Bailey-Serres J. (2002). *Curr Opin Plant Biol.* 5, 460-5.), ショ糖密度勾配遠心により細胞抽出液中に存在する mRNA をリボソームの結合数に応じて分画できるポリソーム解析は、細胞の翻訳状態の変化を解析する手法として広く利用されている。また、リボソーム結合数により分画したショ糖密度勾配液の各画分から RNA を精製し、RT-PCR を行うことで、異なる 5' UTR を付加した GUS mRNA と内在遺伝子 mRNA のストレスの有無による挙動の変化を解析できる。このポリソーム / RT-PCR を行うことで、各 5' UTR の翻訳維持能力を検証できる。なお、再現性を得るために各形質転換細胞について、それぞれ 2 ラインを解析に用いた。

【 0 3 6 3 】

8-5 解析結果

< 熱ストレス処理 >

(At3g47610 形質転換細胞)

At3g47610 形質転換細胞に 37 10 分間の熱ストレス処理を行うことで、通常細胞と比較してポリソーム画分が減少するとともに非ポリソーム画分が増大していることが RNA 量の指標とした 254 nm の吸光プロファイルから示された(図 28 A)。また、リボソームの構成因子である 28S rRNA と 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回収した RNA をアガロース電気泳動することにより確認された(図 28 B)。さらに、アレイ解析の結果から、熱ストレス下でも翻訳が維持される遺伝子である At1g77120 もしくは At4g14560 の mRNA のショ糖密度勾配液における分布を RT-PCR 法により調べたところ、熱ストレス条件(37 /10 min)においても、翻訳が抑制されることなくポリソーム画分にとどまっていた(図 28 C)。一方で、アレイ解析の結果から、熱ストレス下で翻訳抑制を受けるハウスキーピング遺伝子 Actin2 (Act2) と At3g47610 の mRNA では熱ストレス処理により、mRNA の分布がポリソームから非ポリソーム画分に著しく移行しており(図 28 C)、At3g47610 の 5' UTR を付加した GUS mRNA でも、At3g47610 mRNA と同様に、熱ストレス下においてポリソーム形成が阻害され、翻訳が抑制されることが示された(図 28 C)。

【 0 3 6 4 】

(At5g39740 形質転換細胞)

At5g39740 形質転換細胞についても、At3g47610 形質転換細胞と同様の解析を行った。そ

10

20

30

40

50

の結果、At3g47610形質転換細胞と同様、ストレス処理によるポリソーム画分の減少と非ポリソーム画分の増大(図29 A)、28S rRNAと18S rRNAのシヨ糖密度勾配液における分布とその吸光プロファイルの挙動の一致(図29 B)、そしてAt1g77120 mRNA のポリソーム形成の維持とAct2、At3g47610 mRNAの非ポリソーム画分への移行が観察された(図29 C)。また、熱ストレス下で翻訳が抑制される遺伝子であるAt5g39740の5' UTRを付加したGUS mRNAではAt3g47610の5' UTRを用いた場合と同様に熱ストレス下での翻訳が抑制された(図29 C)。

【0365】

これらAt3g47610形質転換細胞及びAt5g39740形質転換細胞を用いた解析の結果は、熱ストレス下で翻訳が抑制される遺伝子の5' UTRを導入遺伝子に付加した場合、その内在遺伝子と同様に熱ストレス下において翻訳が抑制されることを示している。

10

【0366】

(At4g14560形質転換細胞)

At4g14560形質転換細胞についても、同様の解析を行った。その結果、これまでと同様に、37 10分間の熱ストレス処理による、ポリソーム画分の減少と非ポリソーム画分の増大(図30 A)、28S rRNAと18S rRNAのシヨ糖密度勾配液における分布とその吸光プロファイルの挙動の一致(図30 B)、そして熱ストレス下でも翻訳が維持されるAt4g14560 mRNAのポリソーム形成の維持と熱ストレス下で翻訳抑制をうけるAct2とAt3g47610 mRNAの熱ストレス処理による非ポリソーム画分への移行が認められた(図30 C)。一方で、At3g47610形質転換細胞とAt5g39740形質転換細胞とは異なり、熱ストレス下でも翻訳が維持されるAt4g14560の5' UTRを付加したGUS mRNAでは熱ストレス下においてもポリソーム画分にとどまっていた(図30 C)。

20

【0367】

(At1g77120形質転換細胞)

At1g77120形質転換細胞についても、同様の解析を行った。その結果、37 10分間の熱ストレス処理によりポリソーム画分の減少と非ポリソーム画分の増大(図31 A)、28S rRNAと18S rRNAのシヨ糖密度勾配液における分布とその吸光プロファイルの挙動の一致(図31 B)、熱ストレス下でも翻訳が維持されるAt1g77120 mRNAの熱ストレス下でのポリソーム形成の維持と熱ストレス下で翻訳抑制をうけるAct2とAt3g47610 mRNAの熱ストレス処理による非ポリソーム画分への移行が認められた(図31 C)。一方、At1g77120の5' UTRを付加したGUS mRNAでは熱ストレス下においてもポリソーム画分にとどまっていた(図31 C)。

30

【0368】

これらAt4g14560形質転換細胞及びAt1g77120形質転換細胞を用いた解析結果から、熱ストレス下でも翻訳を維持する能力を持つ5' UTRを活用することで、植物へ導入した外来遺伝子が熱ストレス下でも抑制されることなく発現できることが示された。

【0369】

(At4g14560+形質転換細胞及びAt1g77120+形質転換細胞)

At4g14560+形質転換細胞及びAt1g77120+形質転換細胞を、それぞれ2ラインずつ、計4種類の形質転換細胞を用い、通常条件下(22)と熱ストレス下(37 /10 min)で培養した細胞のGUS mRNAの挙動を、ポリソーム/RT-PCRにより解析した。その結果、余分配列を含むAt4g14560+形質転換細胞とAt1g77120+形質転換細胞では、上記4種の形質転換細胞を用いた解析結果と同様、熱ストレス処理によりポリソーム画分の減少と非ポリソーム画分の増大(図32 A、図33 A)、28S rRNAと18S rRNAのシヨ糖密度勾配液における分布とその吸光プロファイルの挙動の一致(図32 B、図33 B)、そして熱ストレス下で翻訳が維持されるAt4g14560及びAt1g77120 mRNAのポリソーム形成の維持、熱ストレス下で翻訳抑制を受けるAct2とAt3g47610 mRNAの非ポリソーム画分への移動が確認された(図32 C、図33 C)。一方で、At4g14560+ 5' UTRを付加したGUS mRNAでは、At3g47610 やAt5g39740の5' UTRを付加したGUS mRNAほどではないが、At4g14560形質転換細胞のGUS mRNA(図30 C)と比較して、熱ストレス処理により、GUS mRNAの分布が非ポリソーム画分へ移行した(図32 C)。また、At1g77120+形質転換細胞の場合も、At1g77120形質転換細胞と比較してAt1g77120+ 5' UTRを

40

50

付加したGUS mRNAが全体として非ポリソーム画分に移行していることが確認された(図31 C, 図33 C)。これらの結果は、6-1で行った一過性発現実験の結果と一致しており、5' UTRの5'側に余分な配列が存在すると、熱ストレス下での翻訳維持能力が損なわれることを示している。またこの結果は、発現ベクターを構築する際には、5' UTRにできるだけ余分な配列が付加されないように考慮する必要であることを示している。

【0370】

(At5g39740-S形質転換細胞)

熱ストレス下で翻訳が抑制されるAt5g39740の5' UTRを予想最適配列(5'端から1-7塩基: uuaaaaa, 12-32塩基: acaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa, 図20参照)に置換した5' UTRを作製し、この5' UTRを発現する発現ベクターを構築した。予想最適配列のAt5g39740 5' UTRへの導入は図21(e)及び図22(e)と同じ位置に行った。構築したバイナリーベクターを導入したAt5g39740-S形質転換細胞を作出し、予想最適配列の効果を上述の形質転換細胞の解析と同様にして検証した。結果を図34に示す。

10

【0371】

At5g39740形質転換細胞のGUS mRNAは、熱ストレス下において翻訳が抑制されることが示された(図34 C)。一方、At5g39740 5' UTRの一部を予想最適配列に置換したAt5g39740-S 5' UTRを付加したGUS mRNAでは非ポリソーム画分への移行が図29 Cの結果と比較して減少した(図34 C)。このことから、予想最適配列への置換により翻訳維持能力が向上することが示された。

【0372】

20

< 塩ストレス処理 >

熱ストレス下でも翻訳を維持する5' UTR(At4g14560及びAt1g77120)と翻訳が抑制される5' UTR(At3g47610)を用いて、塩ストレス下での翻訳維持能力を検証した。すなわち、At4g14560形質転換細胞、At1g77120形質転換細胞、及びAt3g47610形質転換細胞を用いてポリソーム/RT-PCR解析を行った。

【0373】

その結果、熱ストレス処理時と同様、塩ストレス処理によっても細胞全体としてのポリソーム画分の減少と非ポリソーム画分の増大(図35 A, 図36 A, 図37 A)、28S rRNAと18S rRNAのショ糖密度勾配液における分布とその吸光プロファイルの挙動の一致が認められ(図35 B, 図36 B, 図37 B)、塩ストレスによっても熱ストレスと同様に翻訳が阻害された。また、熱ストレス下で翻訳抑制を受けるAct2とAt3g47610 mRNAは塩ストレス処理によって非ポリソーム画分へ移行した(図35 C, 図36 C, 図37 C)。またAt3g47610の5' UTRを付加したGUS mRNAは塩ストレスによって同様に翻訳が抑制された(図35 C)。一方で、At4g14560 5' UTRを付加したGUS mRNAとAt1g77120 5' UTRを付加したGUS mRNAは、塩ストレス下でも抑制されることなくポリソーム画分にとどまっていた(図36 C, 図37 C)。

30

【0374】

このことから、少なくとも熱ストレス下で翻訳維持能力のあるAt4g14560 5' UTRとAt1g77120 5' UTRは塩ストレス下でも翻訳維持能力を発揮し、熱ストレス下において翻訳が抑制されるAt3g47610 5' UTRを用いた場合は塩ストレス下でも同様にその翻訳が抑制されることが示された。

40

【0375】

9 GUS活性測定

上述のポリソーム/RT-PCR解析では、短時間の強い熱ストレス処理(37 /10 min)を行い、mRNAのポリソーム形成状態の変化から5' UTRの翻訳能力評価を行った。ここでは、形質転換細胞を長時間の熱ストレス下におき、翻訳産物であるGUSタンパク質の蓄積量の変化を調べることにより各5' UTRの翻訳維持能力を検証した。なお、37 で長時間細胞を培養すると形質転換細胞は死滅するため、本検討では、下述するにより弱い熱ストレスである32 で培養を行った。

【0376】

9-1 安定形質転換細胞のストレス処理

50

植え継ぎ後3日目の安定形質転換細胞を、24時間32℃で培養し、熱ストレス処理とした。それ以外の条件は上記8-1に記載の条件と同様とした。

【0377】

9-2 GUS活性測定

Jeffersonらの方法 (Jefferson et al., (1987). EMBO J. 6, 3901-3907)に従い、GUS活性を測定した。培養細胞を遠心操作(800 rpm, 1 min, 22℃)により、細胞を沈殿させ、300 µlのPassive Lysis buffer (Promega)を加え、Handy Sonic(TOMY SEIKO CO., LTD)による細胞破碎を行った。破碎した細胞を再度遠心(15000 rpm, 5 min, 4℃)し、200 µlの上清を回収した。100 µlの上清と200 µlの1.5 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide液を混合し、反応させたのち、SPECTRAFLUOR(TECAN)を用いて励起波長365 nm、蛍光波長455 nmで反応生成物4-methyl-umbelliferone (4-MU)の蛍光強度を1分毎に30分間測定した。10分から20分までの1分あたりの測定値の増加量の平均値からblankの平均値を引き、1分あたりの4MU平均増加量を決定した。GUS活性はpmol/min/mg protinとして算出した。

10

【0378】

9-3 Bradford法による総タンパク質量の測定

総タンパク質量の測定はBradfordの方法(Bradford, M. (1976).Anal. Biochem. 72, 248-254.)に従った。10 µlのタンパク質溶液に500 µlのタンパク質定量試薬を加えSPECTRAFLUOR (TECAN)を用いて測定し、既知濃度のBSAを用いて作製した検量線からタンパク質濃度を決定した。

20

【0379】

タンパク質定量試薬

Commassie Brilliant blue G-250 100 mg/l

95% Ethanol 50 ml/l

85%(w/v) Phosphoric acid 100 ml/l

【0380】

9-4 結果

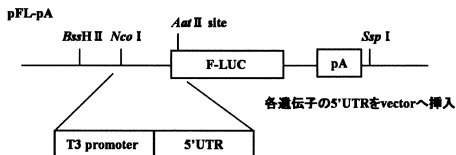
32℃/24時間の熱ストレス条件下において、翻訳維持能力のある遺伝子由来の5' UTR (At4g14560とAt1g77120)を付加した形質転換細胞では、GUSタンパク質蓄積量の維持傾向が見られた(図38)。一方、翻訳抑制を受ける遺伝子由来の5' UTR (At3g47610とAt5g39740)を用いた形質転換細胞では緩やかな熱ストレスに長時間曝される(24時間32℃)ことにより、GUSタンパク質の蓄積量に減少傾向が見られた(図38)。

30

【0381】

このことは、これらの遺伝子の5' UTRは翻訳維持能力を有しており、当該5' UTRを有するmRNAをコードする遺伝子を細胞内で発現させ、熱ストレス条件下に置くことで、当該遺伝子がコードするタンパク質が優先的に産生されることを示している。

【 図 1 】



【 図 2 】

| | | | | | | | | | |
|-----|----------|----------|-----|----------|-----|----------------|-----|----------|-------|
| | S_1 | S_2 | ... | S_k | ... | S_{k+L-1} | ... | S_M | Y |
| 1 | S_{11} | S_{12} | ... | S_{1k} | ... | $S_{1(k+L-1)}$ | ... | S_{1M} | Y_1 |
| 2 | S_{21} | S_{22} | ... | S_{2k} | ... | $S_{2(k+L-1)}$ | ... | S_{2M} | Y_2 |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| i | S_{i1} | S_{i2} | ... | S_{ik} | ... | $S_{i(k+L-1)}$ | ... | S_{iM} | Y_i |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| N | S_{N1} | S_{N2} | ... | S_{Nk} | ... | $S_{N(k+L-1)}$ | ... | S_{NM} | Y_N |

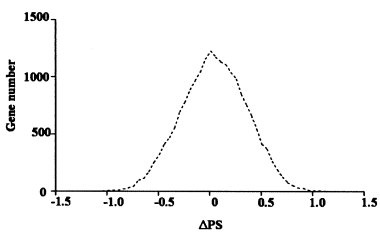
【 図 3 】

| | | | | | | | | | |
|-----|---------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------|-------|
| | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_1(t))$ | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_2(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_k(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_{k+L-1}(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_M(t))$ | Y_1 |
| 1 | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_1(t))$ | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_2(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_k(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_{k+L-1}(t))$ | ... | $f_1^{(k,k+L-1)}(R_M(t))$ | Y_1 |
| 2 | $f_2^{(k,k+L-1)}(R_1(t))$ | $f_2^{(k,k+L-1)}(R_2(t))$ | ... | $f_2^{(k,k+L-1)}(R_k(t))$ | ... | $f_2^{(k,k+L-1)}(R_{k+L-1}(t))$ | ... | $f_2^{(k,k+L-1)}(R_M(t))$ | Y_2 |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| i | $f_i^{(k,k+L-1)}(R_1(t))$ | $f_i^{(k,k+L-1)}(R_2(t))$ | ... | $f_i^{(k,k+L-1)}(R_k(t))$ | ... | $f_i^{(k,k+L-1)}(R_{k+L-1}(t))$ | ... | $f_i^{(k,k+L-1)}(R_M(t))$ | Y_i |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| N | $f_N^{(k,k+L-1)}(R_1(t))$ | $f_N^{(k,k+L-1)}(R_2(t))$ | ... | $f_N^{(k,k+L-1)}(R_k(t))$ | ... | $f_N^{(k,k+L-1)}(R_{k+L-1}(t))$ | ... | $f_N^{(k,k+L-1)}(R_M(t))$ | Y_N |

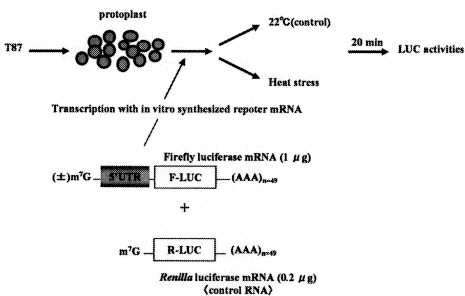
【 図 4 】

| | | | | | | | | | |
|-----|--------------------------|----------------------------|-----|------------------------------|----------------------------|-----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | k | $k+1$ | ... | $k+i-1$ | $k+i$ | ... | $k+L-3$ | $k+L-2$ | $k+L-1$ |
| 1 | $a_{R_1(k)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_1(k+1)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_1(k+i-1)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_1(k+i)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_1(k+L-3)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_1(k+L-2)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_1(k+L-1)}^{(k,k+L-1)}$ |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| i | $a_{R_i(k)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_i(k+1)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_i(k+i-1)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_i(k+i)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_i(k+L-3)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_i(k+L-2)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_i(k+L-1)}^{(k,k+L-1)}$ |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| N | $a_{R_N(k)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_N(k+1)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_N(k+i-1)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_N(k+i)}^{(k,k+L-1)}$ | ... | $a_{R_N(k+L-3)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_N(k+L-2)}^{(k,k+L-1)}$ | $a_{R_N(k+L-1)}^{(k,k+L-1)}$ |
| | $av(A)_k$ | $av(A)_{k+1}$ | ... | $av(A)_{k+i-1}$ | $av(A)_{k+i}$ | ... | $av(A)_{k+L-3}$ | $av(A)_{k+L-2}$ | $av(A)_{k+L-1}$ |
| a | $V(A)_k$ | $V(A)_{k+1}$ | ... | $V(A)_{k+i-1}$ | $V(A)_{k+i}$ | ... | $V(A)_{k+L-3}$ | $V(A)_{k+L-2}$ | $V(A)_{k+L-1}$ |
| u | $av(U)_k$ | $av(U)_{k+1}$ | ... | $av(U)_{k+i-1}$ | $av(U)_{k+i}$ | ... | $av(U)_{k+L-3}$ | $av(U)_{k+L-2}$ | $av(U)_{k+L-1}$ |
| | $V(U)_k$ | $V(U)_{k+1}$ | ... | $V(U)_{k+i-1}$ | $V(U)_{k+i}$ | ... | $V(U)_{k+L-3}$ | $V(U)_{k+L-2}$ | $V(U)_{k+L-1}$ |
| g | $av(G)_k$ | $av(G)_{k+1}$ | ... | $av(G)_{k+i-1}$ | $av(G)_{k+i}$ | ... | $av(G)_{k+L-3}$ | $av(G)_{k+L-2}$ | $av(G)_{k+L-1}$ |
| | $V(G)_k$ | $V(G)_{k+1}$ | ... | $V(G)_{k+i-1}$ | $V(G)_{k+i}$ | ... | $V(G)_{k+L-3}$ | $V(G)_{k+L-2}$ | $V(G)_{k+L-1}$ |
| c | $av(C)_k$ | $av(C)_{k+1}$ | ... | $av(C)_{k+i-1}$ | $av(C)_{k+i}$ | ... | $av(C)_{k+L-3}$ | $av(C)_{k+L-2}$ | $av(C)_{k+L-1}$ |
| | $V(C)_k$ | $V(C)_{k+1}$ | ... | $V(C)_{k+i-1}$ | $V(C)_{k+i}$ | ... | $V(C)_{k+L-3}$ | $V(C)_{k+L-2}$ | $V(C)_{k+L-1}$ |

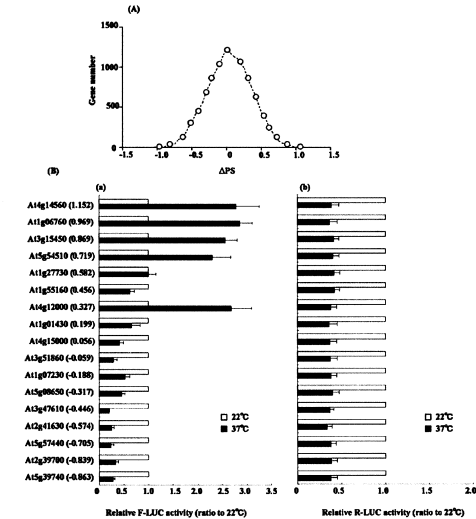
【 図 5 】



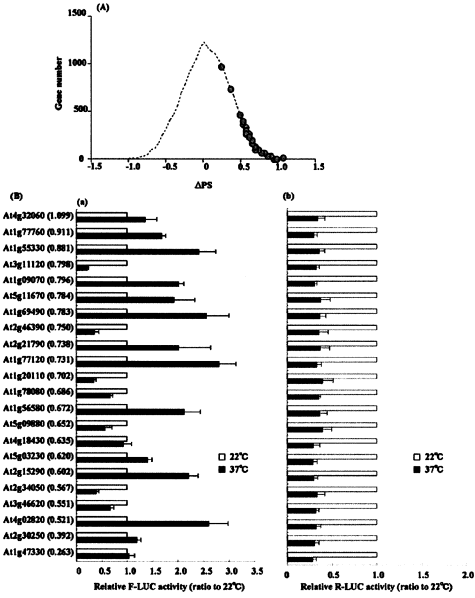
【 図 6 】



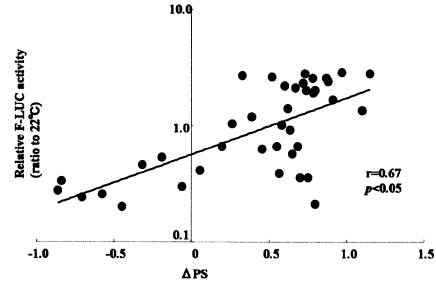
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】

A. 図 9 で試験した 39 遺伝子の 5'UTR の相対活性値と、配列情報を抽出する

| Sample | 相対活性値 | Sequence |
|---------|-------|----------------------------------|
| A 5'UTR | 1.15 | augcau auaaaauaga ucugucgguccugu |
| B 5'UTR | 0.20 | gcgauu ggagaccuaa acugcug |
| n 5'UTR | 1.80 | aaauca uuaauaaaga aaaucccc |

B. k 塩基位置から長さ L の配列を抜き出す

$k=7, L=10$

| | s_7 | s_8 | s_9 | s_{10} | s_{11} | s_{16} | y |
|------------------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|-----|
| Seq ₁ | a | u | a | a | a | ... | a |
| Seq ₂ | g | g | a | g | a | ... | a |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| Seq _N | u | u | a | u | u | ... | a |

C. 抜き出した配列に含まれる t 塩基配列の頻度を数える

$t=3$

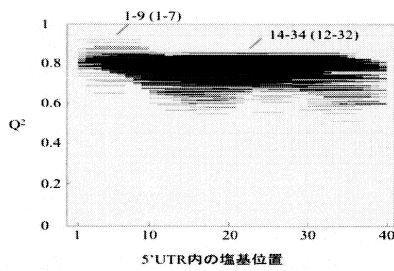
| | y | $f(aua)$ | $f(uaa)$ | $f(aaa)$ | $f(auu)$ | $f(uuu)$ | $f(aga)$ | ... | $f(R_y(t))$ |
|------------------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|---------------|
| Seq ₁ | 1.15 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | ... | $f_1(R_y(t))$ |
| Seq ₂ | 0.20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | ... | $f_2(R_y(t))$ |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| Seq _N | 1.80 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | ... | $f_N(R_y(t))$ |

D. PLS により各 t 塩基配列の回帰係数を求める

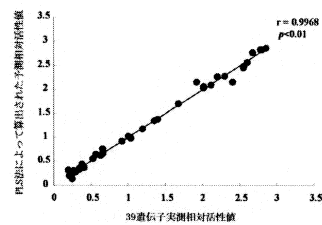
$$y = a_{(aua)}f(aua) + a_{(uaa)}f(uaa) + a_{(aaa)}f(aaa) + \dots + a_{(R_y(t))}f(R_y(t)) + a_{(t)}$$

| PLS coefficient | 0.251 | 1.234 | 1.805 | 0.777 | ... | 0.101 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|

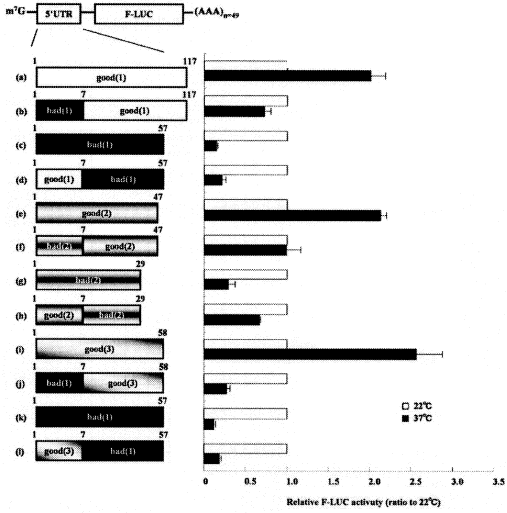
【 図 11 】



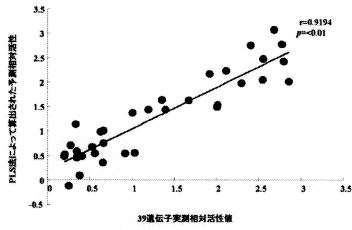
【 図 12 】



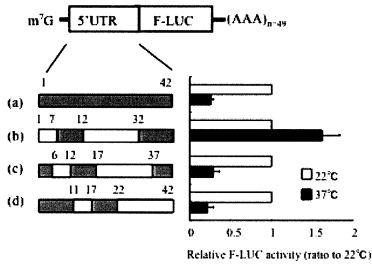
【 13 】



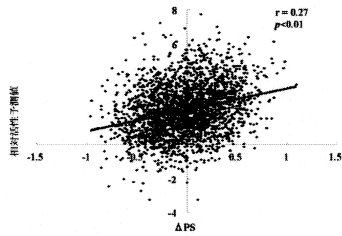
【 14 】



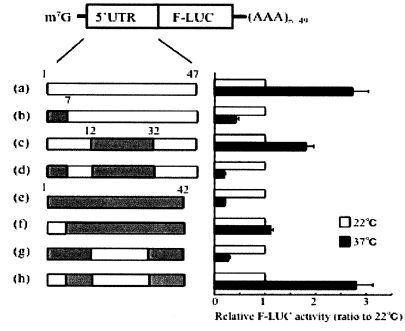
【 17 】



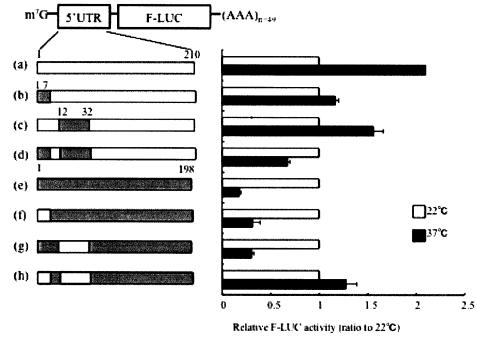
【 18 】



【 15 】



【 16 】



【 19 】

A. PLS 回帰係数を配置する

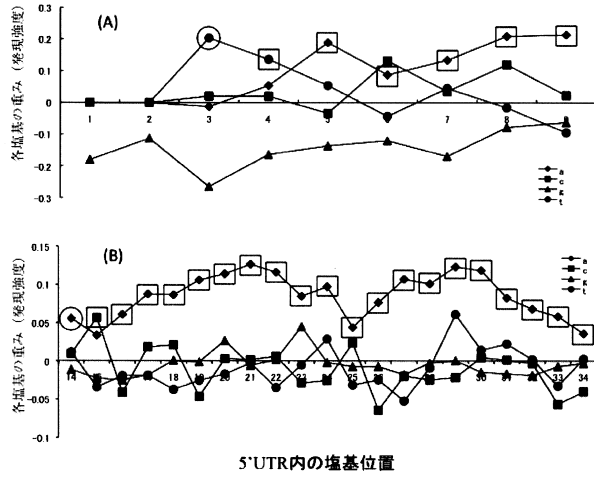
| k | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|-----|-------------|-------------|-------------|
| Seq_1 | a | u | a | a | a | ... | ... | a | g | a |
| | 0.251 | 0.251 | 0.251 | | | | | | | |
| | | 1.234 | 1.234 | 1.234 | | | | | | |
| | | | 1.805 | 1.805 | 1.805 | | | | | |
| | | | | | | ... | ... | ... | | |
| | | | | | | | | $a_{(agg)}$ | $a_{(agg)}$ | $a_{(agg)}$ |
| Seq_N | u | u | a | u | u | ... | ... | a | g | a |
| | $a_{(uaz)}$ | $a_{(uaz)}$ | $a_{(uaz)}$ | $a_{(uaz)}$ | $a_{(uaz)}$ | | | | | |
| | | $a_{(uau)}$ | $a_{(uau)}$ | $a_{(uau)}$ | $a_{(uau)}$ | | | | | |
| | | | $a_{(auu)}$ | $a_{(auu)}$ | $a_{(auu)}$ | | | | | |
| | | | | | | ... | ... | ... | | |
| | | | | | | | | $a_{(agg)}$ | $a_{(agg)}$ | $a_{(agg)}$ |

B. 配置された数値について、各塩基位置における a,u,g,c 塩基それぞれの平均値を求め、また t 検定を行う

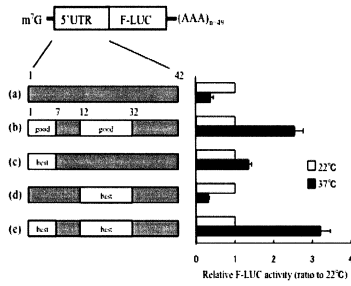
$$t(base)_{k,j} = \frac{av(base)_{k,j}}{\sqrt{\frac{V(base)_{k,j}}{n(s_{k,j} = base)}}}$$

| k | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|-----|-----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| a | $av(A)_7$ | $av(A)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $av(A)_{16}$ |
| | $V(A)_7$ | $V(A)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $V(A)_{16}$ |
| u | $av(U)_7$ | $av(U)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $av(U)_{16}$ |
| | $V(U)_7$ | $V(U)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $V(U)_{16}$ |
| g | $av(G)_7$ | $av(G)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $av(G)_{16}$ |
| | $V(G)_7$ | $V(G)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $V(G)_{16}$ |
| c | $av(C)_7$ | $av(C)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $av(C)_{16}$ |
| | $V(C)_7$ | $V(C)_8$ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | $V(C)_{16}$ |

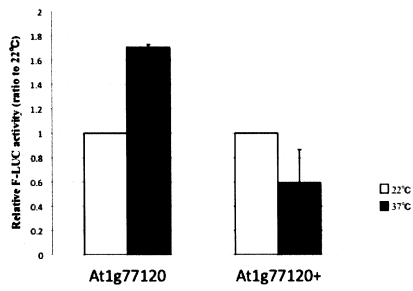
【 20 】



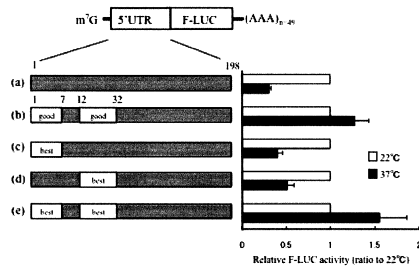
【 21 】



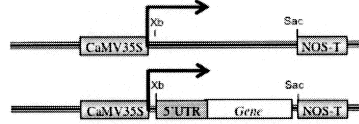
【 25 】



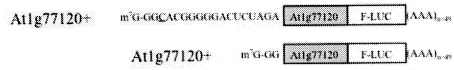
【 22 】



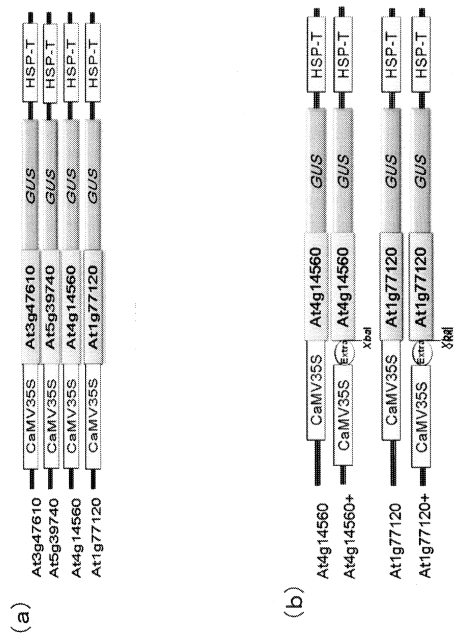
【 23 】



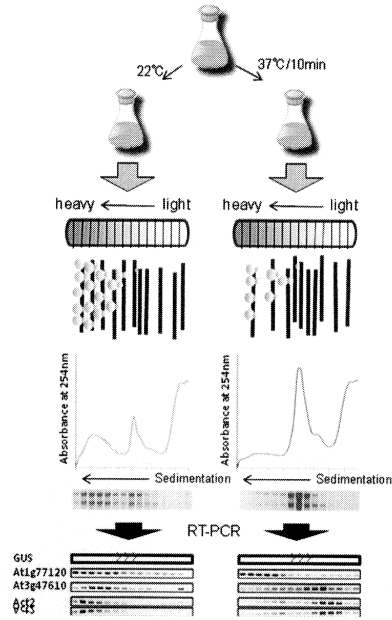
【 24 】



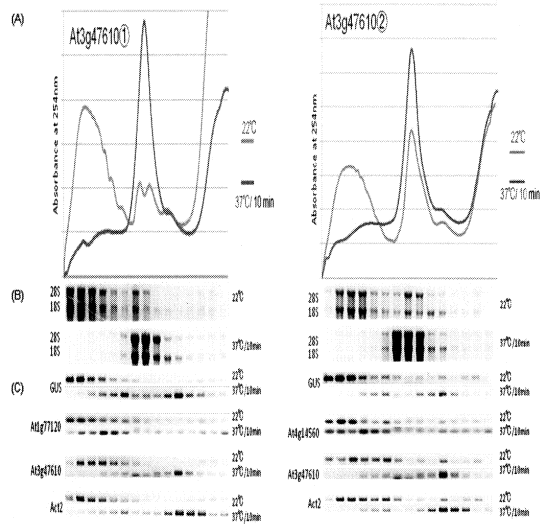
【 26 】



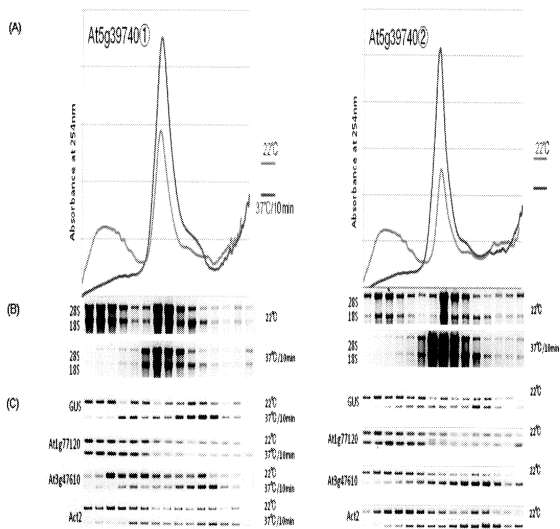
【 27 】



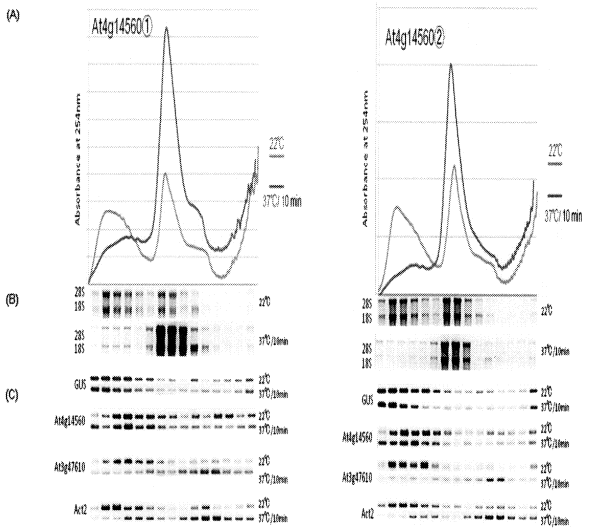
【 28 】



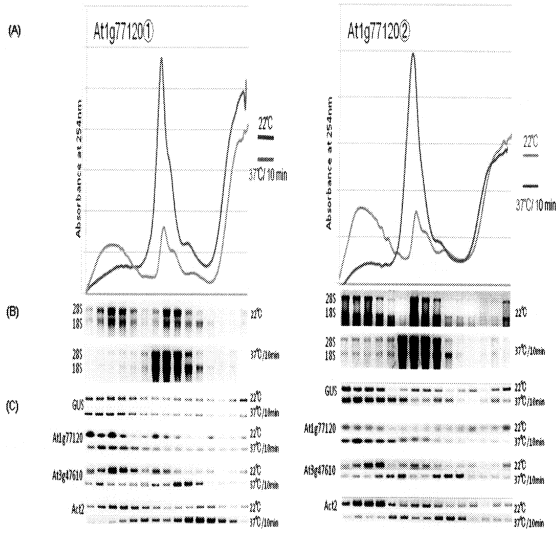
【 29 】



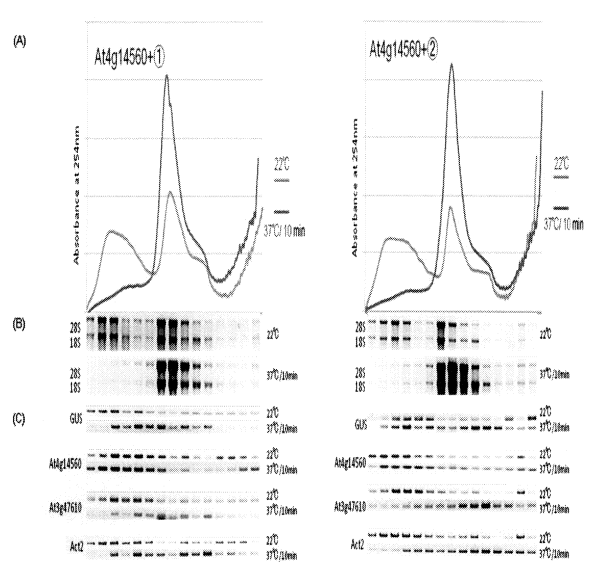
【 30 】



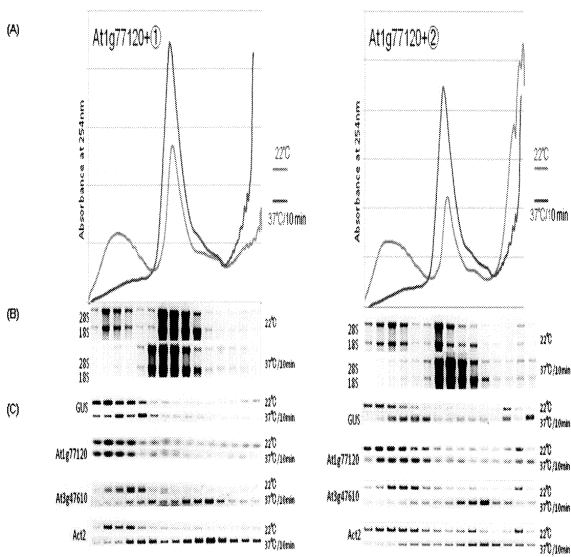
【 3 1 】



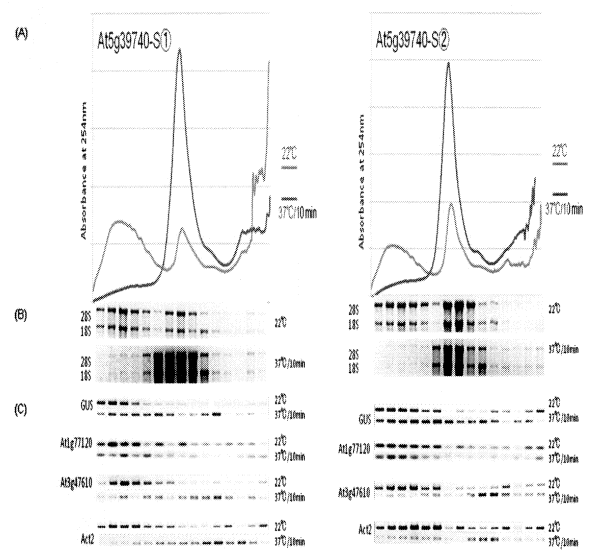
【 3 2 】



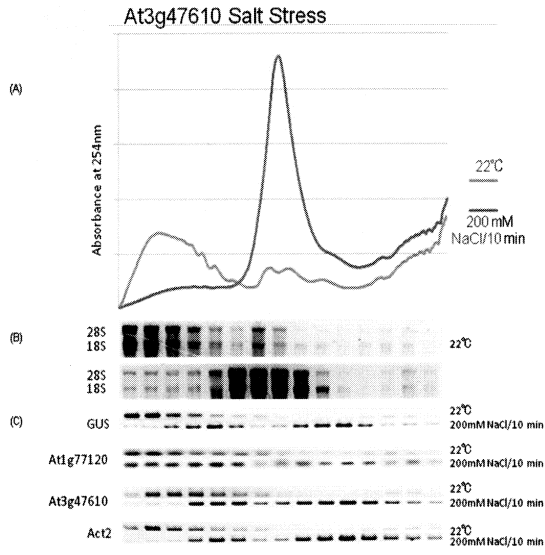
【 3 3 】



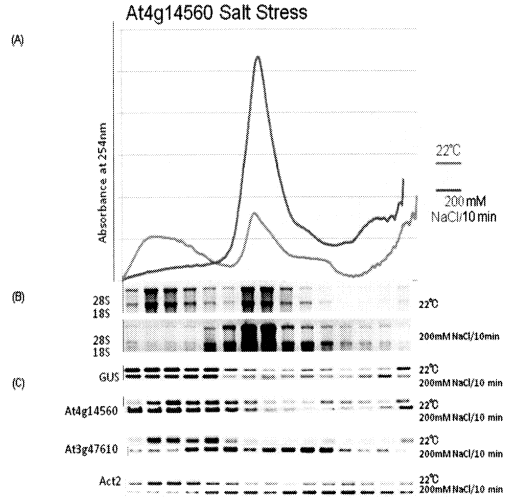
【 3 4 】



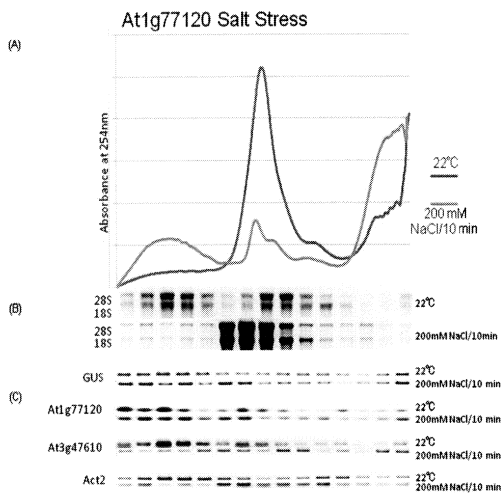
【 図 3 5 】



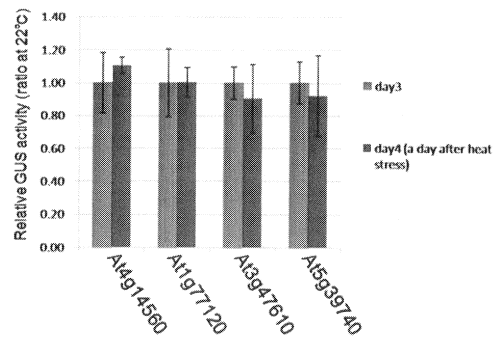
【 図 3 6 】



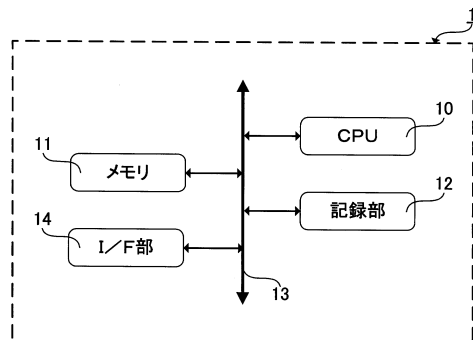
【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



【 図 3 9 】



【配列表】

0005769173000001.app

フロントページの続き

(出願人による申告)平成18年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構、「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム/植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術開発/植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発」の委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 武波 慎也

奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内

(72)発明者 納庄 達也

奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内

(72)発明者 久保 佑喜

奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内

(72)発明者 上田 清貴

奈良県生駒市高山町8916-5 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 加藤晃ら, 環境ストレスの影響を考慮した導入遺伝子発現系, 第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢)大会・シンポジウム要旨集, 2009年 7月29日, p. 149, 2Ea-04

播川幸亮ら, シロイヌナズナにおけるIRESの探索, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2005年 9月25日, p. 124, 1D14-2

津田貴子ら, 熱ストレス条件下でも翻訳されるHSP81-2, HSP81-3遺伝子の5'-UTRの特性, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2005年 9月25日, p. 124, 1D14-3

榎木智恵ら, 環境ストレス下での翻訳制御における5'-UTRの重要性, 第51回日本植物生理学会年会講演要旨集, 2010年 3月12日, p. 330, P2D016(908)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

A01H 5/00

C12N 5/00

C12Q 1/68

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

Cinii

WPIDS(STN)