



Title	Studies on upstream open reading frame-eoncoded peptides that cause ribosome stalling in plants [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	林, 憲哉
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第14379号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/81422
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Hayashi_Noriya_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 林 憲 哉

審査担当者 主査 准教授 尾之内 均
副査 教授 木村 淳 夫
副査 助教 山下 由 衣
副査 教授 久保 友 彦
副査 特任教授 内 藤 哲（本学大学院生命科学院）

学位論文題名

Studies on upstream open reading frame-encoded peptides that cause ribosome stalling in plants

(植物におけるリボソームの停滞を起こす上流ORFペプチドの研究)

本論文は、英文109頁、図20、表6、2章からなり、参考論文2編が添えられている。

真核生物のmRNAの5'非翻訳領域には小さな読み枠が存在する場合があります、これを上流オープンリーディングフレーム(上流ORF)と呼ぶ。大半の上流ORFには機能を持つペプチドはコードされていないが、一部の遺伝子では上流ORFにコードされる特殊なペプチドがリボソームの停滞を誘導する。上流ORFにおいてリボソームが停滞すると、停滞したリボソームは後続のリボソームのスキヤニングを阻害する障壁となるため、タンパク質をコードする主要ORFの翻訳が抑制される。リボソーム停滞を起こすペプチドをコードする上流ORFを網羅的に同定すべく、生物情報学的手法によりペプチド配列が保存された上流ORF(CPuORF)のゲノムワイド探索が行われてきた。本研究では、これまでに同定されたシロイヌナズナのCPuORFの中から実際にリボソームの停滞を起こすものを探索し、CPuORFによるリボソーム停滞の生理学的意義について解析した。

1) リボソームの停滞を起こす上流ORFペプチドの探索

研究開始時点で同定されていた植物のCPuORFのうちペプチドの機能について解析がなされていなかったシロイヌナズナの22個のCPuORFの中から、リボソームの停滞を起こすものを探索した。そのために、小麦胚芽抽出液由来の試験管内翻訳系においてそれらのCPuORFを翻訳し、リボソーム停滞の指標となるペプチジル tRNA の蓄積が見られるかを翻訳産物のウェスタン解析により調べた。この解析により、3つの遺伝子のCPuORFにコードされるペプチドがリボソームの停滞を引き起こすことを示した。同定した3つのCPuORFにおいてリ

ボソームの停滞が起こる位置を特定すべく、リボソームが結合した mRNA を鋳型に逆転写を行うトープリント解析を行なった。その結果、CPuORF の 1 つでは翻訳終結段階で、2 つでは翻訳伸長段階でリボソームの停滞が起こることが示された。また、培養細胞由来のプロトプラストを用いた一過的発現解析により、CPuORF のペプチドが主要 ORF の発現にどのように影響するかを調べたところ、3 つの CPuORF のいずれにおいても CPuORF にコードされるペプチドが主要 ORF の発現を抑制することを見出した。

2) マグネシウムに応答して翻訳を制御する上流 ORF ペプチドの発見

同定した CPuORF を持つ遺伝子の 1 つに着目してリボソームの停滞がどのような遺伝子発現制御に関与するかを解析した。この遺伝子の主要 ORF にはマグネシウム(Mg)輸送体と相互作用するタンパク質がコードされることから、この遺伝子を *MAGNESIUM TRANSPORTER INTERACTING PROTEIN 1 (MTIP1)* と命名した。MTIP1 遺伝子の CPuORF ペプチドが Mg 濃度の変化に応答して MTIP1 の発現を制御する可能性を検証するために、シロイヌナズナ培養細胞由来のプロトプラストにおいて培地中の Mg の濃度を変化させた際に CPuORF ペプチドによる発現抑制が変化するかを調べた。その結果、CPuORF ペプチドは Mg 濃度依存的に主要 ORF の発現を抑制することを見出した。さらに、Mg に応答した発現抑制において CPuORF 中の保存されたペプチド配列が重要であること、CPuORF にコードされるペプチドがシスに作用すること、CPuORF のペプチドが Mg 依存的な発現抑制に必要なかつ十分であることがわかった。また、ウサギ網状赤血球ライセート由来の試験管内翻訳系において Mg 濃度を変化させて MTIP1 遺伝子の CPuORF を翻訳させ、試験管内翻訳産物をウエスタン解析で調べたところ、Mg 濃度が上昇するにつれてペプチジル tRNA の蓄積の程度が増加した。これにより、Mg に応答して CPuORF ペプチドによってリボソームの停滞が誘導されることが示された。以上の結果から、MTIP1 遺伝子の CPuORF ペプチドは Mg に応答してリボソームの停滞を起こし、細胞内の Mg 濃度に応じて主要 ORF の発現を調節する遺伝子発現制御に関与することが示された。

以上、本研究ではリボソームの停滞を起こすペプチドをコードする上流 ORF を新たに 3 つ同定し、そのうちの 1 つが Mg に応答した翻訳制御に関与することを明らかにした。無機イオンに応答してリボソームの停滞を起こす新生ペプチドはこれまでに例が無く、全生物を通じて初めての発見である。以上の成果は、上流 ORF ペプチドによるタンパク質発現制御機構とその生理学的意義の解明に寄与するものである。

よって、審査員一同は、林憲哉が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。