



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                   |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Studies on upstream open reading frame-encoded peptides that cause ribosome stalling in plants [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 林, 憲哉                                                                                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                             |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                                                                            |
| Dissertation Number | 甲第14379号                                                                                                                                                          |
| Issue Date          | 2021-03-25                                                                                                                                                        |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/81422">https://hdl.handle.net/2115/81422</a>                                                                                 |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                           |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                   |
| File Information    | Hayashi_Noriya_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                                              |



# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博 士 (農学)

氏名 林 憲 哉

## 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)

真核生物のmRNAにおいて、タンパク質をコードする主要ORFよりも上流側の領域を 5' 非翻訳領域と呼ぶ。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。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。リボソームの停滞とは、翻訳中の新生ペプチドが自身を合成中のリボソームによる翻訳を途中停止させ、リボソームをmRNA上で立ち往生させる現象である。上流ORFにコードされるペプチドはリボソームの出口トンネル内部でその構成因子と相互作用する。これがリボソームの構造変化を誘導し、ペプチド転移活性が阻害されることでリボソームの停滞が起こる。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ャニングを阻害する障壁となる。このため、上流ORFでのリボソームの停滞は主要ORFの翻訳を抑制する機構となる。真菌・動物・植物の遺伝子において、上流ORFのペプチドによるリボソームの停滞が代謝の状態やストレスに応答した遺伝子発現制御に関与する例が報告されていた。

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; Conserved Peptide upstream Open Reading Frame) を網羅的に同定する研究が行われてきた。植物では複数の先行研究により合計100以上のCPuORFが報告された。これらCPuORFにコードされるペプチドには、リボソームの停滞を起こすものが含まれていると考えられていた。

著者は先行研究で未解決の課題として次の2点を抽出し、これらの解決を本論文の目的とした。第一に、生物情報学の解析で同定されたCPuORFが実際にリボソームの停滞を起こすかについて検証が必要である(課題①)。第二に、同定されたCPuORFがリボソームの停滞を起こすとして、どのような遺伝子発現制御に寄与するのかは不明である(課題②)。

課題①の解決のため、植物の CPuORF の中で実際にリボソームの停滞を起こすものを探索した。研究開始時点で同定されていた植物の CPuORF の中で、その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 を解析対象とした。小麦胚芽抽出液由来の試験管内翻訳系において 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調べた。3 つの CPuORF のいずれにおいても、CPuORF のペプチドが主要 ORF の発現が抑制されることを見出した。これは、上流 ORF で停滞したリボソームが後続のリボソームの障壁となることで主要 ORF の翻訳が抑制されるためであると考えられる。これらの結果は “Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest” と題し、国際英文学術雑誌 *Nucleic Acids Research* 誌に掲載済みである (Hayashi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2017, **45**:8844–8858. doi: 10.1093/nar/gkx528.)。

続いて課題②の解決のため、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機構に寄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 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した。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 の濃度を变化させた際に、CPuORF の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 のペプチドは 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。この実験系において Mg に応答した発現抑制機構についてさらに解析した。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かつ十分であることがわかった。これらの結果から、MTIP1 CPuORF のペプチドの機能として、Mg 濃度依存的にリボソームの停滞を引き起こす可能性が示唆された。この可能性を、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検証した。翻訳反応液中の Mg 濃度を变化させて 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。その結果、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 のペプチドは 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機構に寄与することが示された。

これまで、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 は植物では 2 例、真核生物全体でも 10 例に満たない報告しかなかった。本研究により、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 が植物において新たに 3 例同定された。また、そのうち 1 つが Mg に応答した遺伝子発現制御機構に寄与することを示した。