HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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	https://hdl.handle.net/2115/81422
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hayashi_Noriya_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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、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ャ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エ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。