



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on upstream open reading frame-encoded peptides that cause ribosome stalling in plants [an abstract of entire text]
Author(s)	林, 憲哉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81424
Type	doctoral thesis
File Information	Hayashi_Noriya_summary.pdf



博士論文の要約

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)

本学位論文の構成

本学位論文は Chapter 1. Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosome stalling と Chapter 2. Mg^{2+} -responsive ribosome stalling through a nascent peptide encoded by a uORF regulates Mg^{2+} homeostasis in *Arabidopsis thaliana* の2章から構成される。

Chapter 1.

Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosome stalling

研究の背景

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。

これまで、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。本項ではリボソームの停滞を起こす 6 つの遺伝子の上流 ORF について、リボソームの停滞が起こる機構、環境変化を感知する機構に関して述べた。

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。

研究の内容

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。この解析から、3 つの遺伝子の CPuORF がそのペプチド配列依存的にペプチジル tRNA の蓄積、すなわち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。

まとめ

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。これらの結果の一部は” 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.)

Chapter 2.

Mg²⁺-responsive ribosome stalling through a nascent peptide encoded by a uORF regulates Mg²⁺ homeostasis in *Arabidopsis thaliana*

研究の背景

マグネシウム (Mg) は植物の必須栄養であり、種々の生理学的プロセスに必要とされる。Mg の欠乏と過剰は植物の生育阻害を引き起こす。これまで、植物では Mg²⁺ の輸送を担う輸送体が複数同定され、その生理的機能が研究されていた。しかしながら、植物が細胞内の Mg²⁺ の濃度を感知し、遺伝子発現を制御する機構は明らかでなかった。

本章では、Chapter 1. の研究で同定した遺伝子 A に着目して細胞内の Mg²⁺ 濃度を感知する機構について研究した。遺伝子 A の主要 ORF にはマグネシウム (Mg²⁺) 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 が細胞内の Mg²⁺ 濃度の変化を感知して *MTIP1* の発現を制御する可能性を検証した。

研究の内容

シロイヌナズナ培養細胞由来のプロトプラストを用いた発現解析から、*MTIP1* の CPuORF のペプチドが Mg²⁺ 濃度依存的に主要 ORF の発現を抑制することを示した。同様の解析系を用いてさらに解析したところ、Mg²⁺ 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、*MTIP1* の 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 のペプチドが Mg²⁺ の濃度依存的にリボソームの停滞を引き起こす可能性が考えられた。この可能性を検証するため、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さまざまな Mg²⁺ 濃度下で CPuORF を翻訳させた。この結果、Mg²⁺ 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。これは Mg²⁺ に応答してリボソームの停滞が誘導されることを示す。*MTIP1* 遺伝子とその CPuORF は植物特有のものであるにも関わらず、動物由来の試験管内翻訳系でも Mg²⁺ に応答してリボソーム停滞を起こした。このことから、翻訳複合体と上流 ORF の新生ペプチドが Mg²⁺ を感知している可能性が示唆された。

まとめ

本研究により、CPuORF のペプチドによるリボソームの停滞が Mg²⁺ 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。Mg は植物の必須栄養の 1 つであるが、植物が細胞内の Mg²⁺ の過不足を感知する機構はこれまで知られていなかった。本研究は植物が細胞内の Mg²⁺ の濃度を感知して遺伝子発現を制御する機構を初めて示した。