HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	真核生物における翻訳アレストに関する研究 ： 植物の小胞体ストレス応答に関与する翻訳アレストの解析および翻訳アレストの定量的解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	今道, 朋哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15763号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92619
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	IMAMICHI_Tomoya_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　今道　朋哉

学 位 論 文 題 名

真核生物における翻訳アレストに関する研究

－植物の小胞体ストレス応答に関与する翻訳アレストの解析および翻訳アレストの定量的解析－

【背景】

翻訳装置であるリボソームによって合成された新生ペプチドは、リボソーム大サブユニットの出口トンネルを通ってリボソームの外側へと出てくる。タンパク質は生命活動の大部分を担うが、翻訳が完了し、折りたたまれて初めて機能するものと考えられてきた。しかしながら、近年、合成途上でリボソーム出口トンネルに働きかけて翻訳の停滞（アレスト）を誘導する「アレストペプチド」の存在が明らかにされてきた。アレストペプチドは原核・真核生物を問わず報告されており、それらは様々な生物学的プロセスに関与している。

アレストペプチドの中でも、哺乳類の小胞体ストレス応答に関与する XBP1u は、それ自身をコードする mRNA の細胞内局在を調節するという点でユニークである。外的あるいは内的な要因により小胞体内腔に折り畳み不良のタンパク質が蓄積すると、小胞体膜を貫通するセンサータンパク質によって小胞体内腔の異常が核へと伝えられ、特定の遺伝子群の転写を誘導することで小胞体ストレス応答が惹起される。小胞体ストレスセンサーの 1 つである IRE1 は、小胞体ストレス下で活性化することによって、細胞質に存在する基質 mRNA のスプライシングを行う。哺乳類では、細胞質スプライシングにより、*XBP1u* mRNA の読み枠が変わり、小胞体ストレス応答を惹起する転写因子をコードするようになる。IRE1 によるスプライシングが効率良く起こるためには、*XBP1u* mRNA が小胞体膜近傍に局在する必要がある。XBP1u タンパク質の C 末端側には、疎水性領域がコードされており、この領域が合成されてリボソーム出口トンネルから出たところで翻訳アレストが起こる。これにより、シグナル認識粒子が XBP1u 新生ペプチドの疎水性領域を認識できるようになり、翻訳の中間体が維持された状態で *XBP1u* mRNA が小胞体膜近傍へと運ばれる。

シロイヌナズナにおいては、細胞質スプライシングの基質として *AtbZIP60u* が同定された。AtbZIP60u のドメイン構造は XBP1u とは異なり、アミノ酸配列も保存されていないものの、C 末端側に疎水性領域をもつ。このことから、本研究では、*AtbZIP60u* mRNA においても翻訳アレストが起こるという作業仮説を立て、その検証を行った。

また、真核生物において、XBP1u や AtbZIP60u（オルソログ）はストレス応答に関与するが、これら以外のアレストペプチドは細胞内の恒常性維持あるいはウイルスの遺伝子発現制御に関与する。このようにアレストペプチドごとに司る生物学的プロセスが異なることに鑑みると、その定量的性質がそれぞれに最適化されていると期待される。そこで、翻訳アレストの定量的解析法を確立し、それらの定量的性質と生物学的意義との関係を考察した。

1. *AtbZIP60* mRNA における翻訳アレストの解析

コムギ胚芽由来の無細胞翻訳系において *AtbZIP60u* mRNA およびそのスプライシング産物を翻訳し、ウェスタン解析を行ったところ、*AtbZIP60u* mRNA を翻訳した場合に翻訳アレスト産物が検

出された。次に、*AtbZIP60u* mRNA のタンパク質コード領域を N 末端側から徐々に欠失させた系列を用いて翻訳アレストが起こる位置を絞り込んだ。その結果、AtbZIP60u の C 末端側を翻訳中に翻訳アレストが起こることが明らかになり、続けて行った終止コドン導入系列を用いた解析によって、アレスト位置は N 末端から 287 番目のリジンコドンであることを示した。さらに、アラニン置換系列を用いて AtbZIP60u による翻訳アレストの誘導に重要なアミノ酸残基を同定した。

2. 植物の bZIP60 オルソログにおける翻訳アレストの解析

細胞質スプライシングは、シロイヌナズナ以外の植物においても報告されている。系統間での翻訳アレストの保存性を明らかにするため、既報の bZIP60 オルソログに加え、多様な種におけるオルソログを用いて翻訳アレストが起こるかどうかを検証した。その結果、イネの OsbZIP50u、イヌカタヒバ（小葉シダ）の SmbZIP50u、ヒメツリガネゴケの PpbZIP60Lu において翻訳アレストが誘導されることを明らかにした。他方、ゼニゴケや藻類の bZIP60 オルソログにおいては、翻訳アレスト産物は検出されなかった。次に、翻訳アレストが誘導される bZIP60 オルソログについて、上記の AtbZIP60 と同様の解析を行ったところ、SmbZIP50u と PpbZIP60Lu においてはアレストペプチドの保存性が見られなかった。さらに、翻訳アレストが起こる翻訳の段階にも違いがあることを明らかにした。

3. 翻訳アレストの定量的解析

翻訳反応はいくつもの素反応から構成されており、このような複雑系から翻訳アレストに関わる反応に絞って定量することは現段階では困難である。そこで、数理モデルを利用した解析が有効であると考えた。まず、コムギ胚芽由来の無細胞翻訳系を用いて、一定時間のみ翻訳開始を行い、その後の翻訳産物の蓄積量の経時変化を調べるパルス翻訳系を確立した。次に、パルス翻訳系の数理モデルを検討した。翻訳アレストの定量的性質は、翻訳を開始したリボソームのうち、翻訳アレストが起こるものの割合（r）と翻訳アレストの半減期（τ_{AF}）からなると考えた。これらのパラメータに加え、翻訳アレストが起こったまま翻訳が再開しない中途終了型の翻訳産物を仮定することで、最適と考えられるモデルを導き出した。

確立した翻訳アレストの定量的解析法を用いて、真核生物におけるアレストペプチドの定量的性質を調べたところ、翻訳アレストの半減期はウイルスの遺伝子発現制御に関わるもので長く、細胞内の恒常性維持に関わるもので短い傾向が見られた。一方で、翻訳アレストが起こる割合はほぼ 1 となる傾向が見られた。AtbZIP60u が誘導する翻訳アレストの半減期は約 5 分であり、*AtbZIP60u* mRNA が細胞質スプライシングを受けるために必要十分な時間であることが示唆された。また、一部のアレストペプチドは、特定の低分子化合物（エフェクター）に応答して翻訳アレストを誘導することで、当該化合物のフィードバック制御を司っている。このようなエフェクター依存型の翻訳アレストにおいて、エフェクター濃度と定量的性質の関係を調べたところ、エフェクター濃度の上昇と平行して翻訳アレストの半減期が長くなる一方で、翻訳アレストが起こる割合はエフェクター濃度に依存せず 1 となる傾向が見られた。

以上、本研究により、小胞体ストレス応答に応答した bZIP60u（オルソログ）の細胞質スプライシングには翻訳アレストが関与すること、アレストペプチドが司る生物学的プロセスと翻訳アレストの半減期が密接に関係していることが見出された。また、植物の陸上進出後に翻訳アレスト機構を獲得したことも示唆された。細胞質スプライシング自体は藻類でも報告されており、基質 mRNA における翻訳アレストに依らない小胞体近傍へのターゲッティング機構を調べることにより、植物における細胞質スプライシングの進化の全体像についての理解が深まることが期待される。