



Title	シロイヌナズナの非AUG 開始型uORF を介した翻訳制御の機構および生理学的役割に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	平郡, 雄太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15770号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92640
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HIRAGORI_Yuta_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 平 郡 雄 太

学位論文題名

シロイヌナズナの非 AUG 開始型 uORF を介した翻訳制御の機構および生理学的役割に関する研究

背景

上流オープンリーディングフレーム (uORF) は、真核生物の mRNA の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) に存在する短い読み枠である。翻訳される uORF は、リボソームの mRNA からの解離や uORF にコードされるペプチドに依存したリボソームの停滞 (翻訳アレストという) を引き起こすことによって、下流のタンパク質コード領域 (mORF) の翻訳を抑制する。近年、翻訳される mRNA の配列を網羅的に解析するリボソームプロファイリング法の発展により、実際に翻訳される uORF がゲノムワイドに同定可能になった。驚くべきことに、様々な生物において翻訳される uORF の開始コドンは AUG と 1 塩基異なる near cognate codon (NCC) が過半数を占めるということが明らかになった。しかしながら、このような非 AUG 開始型 uORF による翻訳制御の報告例は限られており、植物においてはアスコルビン酸合成に関わる *GGP* 遺伝子における ACG 開始型 uORF の 1 例のみであった。そこで、非 AUG 開始型 uORF による翻訳制御の機構とその生理学的な役割の理解を拡張することを目的とし以下の研究を行った。

1. シロイヌナズナにおける非 AUG 開始型 uORF による翻訳制御機構の研究

以前、金沢大学の高橋広夫 博士との共同研究により、シロイヌナズナのゲノムから配列と開始コドンが進化的に保存された非 AUG 開始型 uORF を探索し、14 個の保存された非 AUG 開始型 uORF を同定した。また、シロイヌナズナの MM2d 懸濁細胞プロトプラストを用いた一過的発現解析により、*RAPTOR1B*、*MASPI*、*SPE2* 遺伝子の CUG 開始型 uORF が mORF の翻訳を抑制することを明らかにした。NCC は AUG に比べ翻訳開始効率が低いため、大多数の非 AUG 開始型 uORF はリボソームによって読み飛ばされ、mORF の翻訳に対して及ぼす影響は小さいと考えられる。逆説的に、翻訳制御に関わるこれら 3 つの非 AUG 開始型 uORF は mORF の翻訳を効果的に制御するための機構を備えていることが考えられた。

本研究では、*RAPTOR1B*、*MASPI*、*SPE2* の CUG 開始型 uORF が mORF の翻訳を効果的に制御する機構を明らかにするため、一過的発現解析および試験管内翻訳による検証を行った。その結果、*RAPTOR1B* および *MASPI* の uORF による翻訳抑制は、uORF にコードされるペプチド配列に依存することを明らかにした。また、*MASPI* uORF にコードされるペプチドはコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞翻訳系において翻訳アレストを起こすことを示した。一方、*SPE2* uORF による翻訳抑制にはコードされるペプチド配列は重要ではなかったが、保存された CUG だけでなくその上流に存在する AUU からの翻訳開始が寄与することを明らかにした。

SPE2 非 AUG 開始型 uORF の AUU および CUG の周辺配列からは、それらの NCC の翻訳開始効率が mORF の翻訳に影響するほど高くないことを示唆している。しかし、先行研究により、*SPE2* の 5'-UTR には RNA 二次構造を形成する保存された配列モチーフが存在することが報告され、この配列モチーフは AUU および CUG のすぐ下流に位置していた。NCC の下流に存在する RNA 二

次構造によって NCC からの翻訳開始が促進される例が複数の先行研究により報告されていることから、*SPE2* の AUU および CUG からの翻訳開始も下流の二次構造により促進されている可能性が示唆された。また、2つの NCC から uORF が翻訳開始されることも、リーキースキャニングを回避し mORF の翻訳を効率的に制御することに寄与していると考えられる。

本研究の結果から、mORF の翻訳を制御する非 AUG 開始型 uORF は、本来翻訳開始効率が低い NCC から翻訳されるにも関わらず、強い翻訳抑制効果を発揮する翻訳アレストを誘導することや、低い翻訳開始効率を補完する機構を持つことで、mORF の翻訳を効果的に制御しているという示唆が得られた。

2. シロイヌナズナにおけるポリアミン生合成鍵酵素の翻訳制御を介したフィードバック調節機構

前章で扱った非 AUG 開始型 uORF を持つ *SPE2* 遺伝子は、ポリアミンの一つプトレシン (Put) の合成における律速段階酵素 arginine decarboxylase (ADC) をコードしている。Put は生長やストレス応答など様々な生理学的過程に重要な低分子化合物である一方、過剰に存在すると植物の生長抑制などの負の効果をもたらすことから、その量は厳密に制御されていると考えられる。また、植物において様々なポリアミン種の量は合成酵素の発現に対するフィードバック制御により調節されていることが報告されている。しかしながら、Put の合成量を調節する機構はこれまで不明であった。

本研究では、「AUU/CUG 開始型 uORF や RNA 二次構造を含めた *SPE2* の 5'-UTR に存在するシスエレメントが細胞内の Put 濃度に応答して mORF にコードされる ADC の翻訳を制御する」という仮説をたて、シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた一過的発現解析による検証を行った。まず、*SPE2* 5'-UTR の下流にルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を接続したコンストラクトをプロトプラストに導入し、培地に様々な濃度の Put を添加して培養した。その結果、添加した Put の濃度に応答して、mORF の翻訳活性の指標となる Luc 活性が減少した。また、ADC 活性阻害剤により内在の Put 合成量を減少させると、Put の添加とは逆に Luc 活性は増加した。このことから *SPE2* 5'-UTR は Put 濃度に応答して mORF の翻訳を制御していることが明らかになった。

次に、*SPE2* 5'-UTR における Put 濃度に応答した翻訳制御に必要なシスエレメントを探索するため、多重アライメント解析を行った。その結果、新たに開始コドンが保存された GUG 開始型 uORF および保存された配列モチーフ UCUUCUGAA が同定された。さらに、変異型コンストラクトを用いた一過的発現解析では、前述の AUU/CUG 開始型 uORF や RNA 二次構造の変異に加え、GUG 開始型 uORF および UCUUCUGAA モチーフの変異が Put 濃度に応答した翻訳制御を減衰または消失させた。このことから、これらのシスエレメントが *SPE2* 5'-UTR による Put 濃度に応答した翻訳制御に必要であることが明らかになった。

本研究の結果から、シロイヌナズナにおいて *SPE2* 5'-UTR に存在する複数の非 AUG 開始型 uORF や RNA 二次構造などによる翻訳制御を介して、Put 生合成鍵酵素 ADC の発現がフィードバック制御を受けていることが示され、これまで不明であった植物における Put 調整機構が明らかになった。

以上の研究により、新たに3つの非 AUG 開始型 uORF が効率的に mORF の翻訳を制御する機構を明らかにした。また、そのうちの一つについて注目し、シロイヌナズナにおいて生理学的に重要な制御に非 AUG 開始型 uORF が関与することを明らかにした。これらの研究成果は、機構と生理学的役割の観点から、植物における非 AUG 開始型 uORF による翻訳制御の理解を拡張するものである。