



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	平郡, 雄太
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15770号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92641
Type	doctoral thesis
File Information	HIRAGORI_Yuta_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 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

第1章 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 序論

上流オープンリーディングフレーム（uORF）は真核生物の mRNA においてタンパク質をコードする主要オープンリーディングフレーム（mORF）の上流、すなわち 5' 非翻訳領域（5'-UTR）に存在する短い読み枠である。一般に、翻訳される uORF はその終止コドンでリボソームを解離させることで mORF の翻訳を抑制する。一方、翻訳開始効率の低い開始コドンを持つ uORF はリボソームに翻訳されずに読み飛ばされる「リーキースキャニング」が起これやすく、mORF の翻訳に与える影響は比較的小さい。

一部の uORF はコードするペプチドが翻訳中のリボソームに作用することによりリボソーム停滞を誘導し mORF の翻訳をより強く抑制する。リボソーム停滞を誘導する uORF はペプチド配列が進化的に保存されたものが多く、そのような uORF を conserved peptide uORF（CPuORF）という。また、リボソーム停滞を引き起こす uORF のうちの一部は RNA 品質管理機構による RNA 分解を誘導することによってもタンパク質の発現を抑制することが知られている。

近年、ゲノムワイドに翻訳される ORF を探索することができるリボソームシーケンス（Ribo-seq）が発展したことにより、様々な生物種で実際に翻訳される uORF が探索された。その結果、uORF は典型的な AUG よりも、AUG と 1 塩基異なる near cognate codon（NCC）から翻訳されるものが過半数を占めることが明らかになった。しかし、非 AUG 開始型の uORF による翻訳制御の報告例は少なく、未知の非 AUG 開始型 uORF が生理学的に重要な翻訳制御に関与する可能性が考えられた。

著者らはこれまでに、植物において生理学的に重要な翻訳制御に関わる非 AUG 開始型 uORF を同定することを目的とし、進化的に配列が保存されかつ mORF の翻訳を制御する非 AUG 開始型 uORF をゲノムワイドに探索した。NCC から始まる読み枠を様々な植物種のオルソログ間で比較することにより、進化的に保存された配列を持つ非 AUG 開始型 uORF を 14 個同定した。さらに、シロイヌナズナの培養細胞を用いた一過的発現解析により、それらのうち、*RAPTOR1B*, *MASPI*, *SPE2* 遺伝子に存在する CUG 開始型 uORF が mORF の翻訳を抑制すること、*MPK22* 遺伝子に存在する CUG 開始型 uORF が mORF の翻訳を促進することを明らかにした。*MPK22* の CUG 開始型 uORF については、その下流に存在する先行研究で同定された AUG 開始型 CPuORF による翻訳抑制を緩和することにより mORF の翻訳を促進していることを明らかにした。しかし、*RAPTOR1B*, *MASPI*, *SPE2* の CUG 開始型 uORF がどのように mORF の翻訳を抑制しているかは不明であった。

非 AUG 開始コドンは翻訳開始効率が AUG よりも低いため一般に mORF に対する影響は大きくないと考えられる。逆説的にこれら 3 つの非 AUG 開始型 uORF には効率的に mORF の翻訳を抑

制する機構が存在することが考えられた。そこで本研究では、*RAPTOR1B*、*MASPI*、*SPE2* の CUG 開始型 uORF が mORF の翻訳を抑制する詳細な機構について解析した。

結果

最初に、3つの CUG 開始型 uORF による翻訳抑制効果が uORF にコードされるペプチド配列に依存するかを調べた。それぞれの uORF のフレームシフト (fs) 変異型を作製し一過的発現解析により翻訳抑制に対するペプチド配列の重要性を調べた。使用したコンストラクトでは、高発現プロモーターの下流にそれぞれの uORF (野生型または変異型) を含む 5'-UTR 配列と mORF の開始コドンをつなぎ、開始コドンと読み枠を合わせてルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を繋いだ。これを用いることで mORF の翻訳活性を Luc 活性によって評価した。その結果、*RAPTOR1B* および *MASPI* の CUG 開始型 uORF では、fs 型の Luc 活性が野生型と比較して有意に高く uORF の開始コドンを変異させた Δ CUG 型と同程度であった。このことから、これらの uORF による翻訳抑制効果が uORF にコードされたペプチド配列に依存していることが示唆された。一方、*SPE2* の非 AUG 開始型 uORF については、 Δ CUG 型よりも fs 型の Luc 活性が有意に高くなった。この結果から *SPE2* の非 AUG 開始型 uORF による翻訳抑制効果のすべてを CUG からの翻訳開始で説明できないことが示唆された。そこで、他の NCC からの翻訳開始による影響を検討するため、CUG の 3 コドン上流にある AUU の変異型を作製した。一過的発現解析の結果、 Δ AUU 型では Δ CUG 型よりも Luc 活性が有意に高く、AUU と CUG を同時に変異させた Δ AUU Δ CUG 型ではさらに Luc 活性が高くなった。このことから、*SPE2* の非 AUG 開始型 uORF による翻訳抑制には、AUU と CUG の 2 つの NCC からの翻訳開始が寄与していることが明らかになった。

次に、*RAPTOR1B* と *MASPI* の CUG 開始型 uORF について、保存性が高いアミノ酸残基を 1 つずつアラニンに置換することで翻訳抑制に重要なアミノ酸残基を同定した。その結果、*RAPTOR1B* の CUG 開始型 uORF では Arg-8, Ser-11, Gly-12, Asp-15 のアラニン置換型で野生型と比較して Luc 活性が有意に増加した。一方、*MASPI* の CUG 開始型 uORF では、Trp-38, Arg-39, Arg-42, Asp-50, Tyr-51, および Gly-52 のアラニン置換が Luc 活性の有意な増加をもたらした。特に終止コドンに近い Asp-50 と Gly-52 の置換の影響が大きかった。

次に、*RAPTOR1B* と *MASPI* の CUG 開始型 uORF について、コムギ胚芽抽出液を用いた試験管内翻訳と western blotting により uORF にコードされるペプチドがリボソーム停滞を起こすかを調べた。その結果、*MASPI* の uORF ペプチドを翻訳させると全長産物とともにリボソームの停滞を表すペプチジル tRNA が検出された。このことから、*MASPI* の CUG 開始型 uORF のペプチドはリボソームの停滞を誘導することが示唆された。一方、*RAPTOR1B* の uORF ペプチドを翻訳させた場合には顕著なペプチジル tRNA の蓄積は見られなかったことから、*RAPTOR1B* の CUG 開始型 uORF のペプチドは少なくとも今回行った条件ではリボソーム停滞を誘導しないことがわかった。

最後に、*RAPTOR1B* と *MASPI* の CUG 開始型 uORF が mRNA の安定性に影響を与える可能性を検討した。野生型または Δ CUG 型の uORF を含むコンストラクトを MM2d プロトプラストに導入し、定量 PCR により導入したコンストラクト由来の mRNA 量を測定した。結果として、*RAPTOR1B* と *MASPI* のいずれの uORF についても野生型と Δ CUG 型で mRNA 量には違いが見られなかった。したがって、*RAPTOR1B* と *MASPI* の CUG 開始型 uORF は mRNA の安定性には影響を与えず、翻訳抑制によって mORF の発現を制御していることが示唆された。

考察

本研究の結果から、*RAPTOR1B* および *MASPI* の CUG 開始型 uORF の翻訳抑制効果には、uORF にコードされるペプチド配列が重要であることが明らかになった。また、*MASPI* の CUG 開始型 uORF については、より強い翻訳抑制効果を持つリボソーム停滞を引き起こすことにより効率的に mORF の翻訳を抑制していることが明らかになった。一方、*RAPTOR1B* の CUG 開始型 uORF のペプチドは本研究の結果からはリボソーム停滞を引き起こすとはいえなかった。しかし、mORF

にコードされる RAOTOR タンパク質は植物の生長のメインレギュレーターである TOR 複合体の構成因子であり、環境ストレスによって TOR 複合体から解離して TOR 複合体を不活性化することが報告されている。そのため、*RAPTOR1B* の CUG 開始型 uORF は環境ストレスに応答して mORF の翻訳抑制を誘導している可能性が考えられる。

SPE2 の CUG 開始型 uORF については、本研究の結果から CUG だけではなく上流の AUU から翻訳開始されることが示された。2つの開始コドンから翻訳開始されることでリーキースキャニングされる確率を下げ効率的に mORF の翻訳を抑制している可能性が考えられる。AUU と CUG の周辺配列はいずれも Kozak 配列に一致しておらず、それらの NCC からの翻訳開始効率は低いと予測される。しかし、これらの下流には先行研究で報告された RNA 二次構造を形成する保存モチーフが存在している。RNA 二次構造がその上流に存在する NCC からの翻訳開始を促進する例が報告されており、*SPE2* uORF においても NCC の下流に存在する RNA 二次構造が NCC からの翻訳開始を促進し、これが uORF による効率的な翻訳抑制に寄与している可能性が考えられる。

本研究の結果より、翻訳開始効率が低い非 AUG 開始型の uORF であっても、比較的強い翻訳抑制効果を持つリボソーム停滞を誘導したり、リーキースキャニングを低減する機構を有することで、効率的に mORF の翻訳を抑制するということが明らかになった。

第2章 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

背景

ポリアミンは脂肪族炭化水素骨格に複数のアミノ基を持つ化合物の総称であり、すべての生物に存在する普遍的な生体分子である。植物において主要なポリアミンとしてはブトレシン (Put)、スペルミジン (Spd)、スペルミン (Spm)、サーモスペルミン (Tspm) がある。ポリアミンは細胞中で正電荷を持ち核酸と相互作用することで遺伝子発現に影響を与える。植物においてポリアミンは生長や環境ストレス応答に重要な分子である一方、過剰に存在すると矮化や開花遅延をもたらす。そのため、植物の細胞内ポリアミン濃度は厳密に制御されていると考えられる。

ポリアミンの生合成経路においては最初に Put が合成される。Put の合成経路はオルニチンから ornithine decarboxylase (ODC) により直接合成される経路と、アルギニンを原料とし arginine decarboxylase (ADC) を律速酵素とする3段階の反応により合成される経路が存在する。シロイヌナズナは ODC を持たないため、ADC 経路が Put 合成において重要だと考えられている。

Spd は Put と decarboxylated S-adenosylmethionine (dcSAM) を基質として合成される。また Spm と Tspm はいずれも Spd と dcSAM を基質として合成される。これらのポリアミンの合成における律速段階は S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) による dcSAM の合成である。

これまでに、ポリアミン生合成の鍵酵素の発現における負のフィードバック制御の例がいくつか報告されてきた。Spd と Spm の合成における律速酵素である SAMDC をコードする mRNA には uORF が存在し、高濃度の Spd および Spm 存在下ではこの uORF が SAMDC の翻訳を抑制する。また、シロイヌナズナにおいては Tspm 合成酵素をコードする *ACL5* 遺伝子の発現が Tspm の添加によって減少することが報告されており、Tspm も転写段階におけるフィードバック制御によって調節されることが示唆されている。しかしながら、他のポリアミン合成の出発点となる Put の生合成におけるフィードバック制御は知られておらず、生体内 Put 濃度がどのように制御されているかは不明であった。

これまでに、植物の Put 合成の律速酵素 ADC をコードする mRNA の 5'-UTR において、ADC の翻訳を抑制する複数のシスエレメントが報告されてきた。カーネーションの *ADC* 遺伝子においては短い AUG 開始型 uORF が同定され mORF の翻訳を抑制することが報告された。他の研究では、陸上植物の *ADC* 遺伝子で高度に保存された配列モチーフが同定された。この配列モチーフは "ADC ボックス" と名付けられ RNA 二次構造を形成することが予測された。また、トマトにお

いて ADC ボックスの存在が mORF の翻訳を抑制することが報告された。また、著者らはシロイヌナズナにおける ADC をコードする遺伝子の一つである *SPE2* において、AUU と CUG から翻訳され mORF の翻訳を抑制する非 AUG 開始型 uORF を同定した。しかし、いずれのシスエレメントによる翻訳抑制についても細胞内ポリアミン濃度との関係は調べられておらず、生理学的な役割は不明であった。

そこで本研究では、シロイヌナズナ *SPE2* の 5'-UTR に存在するシスエレメントが細胞内 Put 濃度に応答して ADC の翻訳を制御し、これが負のフィードバック機構として機能する可能性を検証することで、シロイヌナズナにおける Put 調節機構を明らかにすることを試みた。

結果

まず初めに、細胞内の Put 濃度に応答して *SPE2* の 5'-UTR による翻訳抑制が変化するかを検証した。シロイヌナズナの葉肉細胞からプロトプラストを作製し、*SPE2* の 5'-UTR の下流に Luc を繋いだコンストラクトを導入した。このプロトプラストを懸濁した培地に対し、様々な濃度の Put または ADC の活性阻害剤である DL- α -(difluoromethyl)arginine (DFMA) を加え 24 時間培養した後 Luc 活性を測定した。その結果、添加した Put の濃度が高いほど mORF の翻訳活性を表す Luc 活性は低くなり、逆に添加した DFMA の濃度が高いほど Luc 活性は高くなるという相関が見られた。またこれらの相関は *SPE2* の 5'-UTR を持たないコンストラクトでは見られなかった。これらのことから、*SPE2* の 5'-UTR は細胞内の Put 濃度が高いほど mORF の翻訳を強く抑制し、逆に細胞内の Put 濃度が低いほど mORF への翻訳抑制を緩和することが示唆された。

次に、*SPE2* の 5'-UTR において Put に応答した翻訳制御に必要なシスエレメントの同定を試みた。まず、生理学的に重要な役割を持つシスエレメントは進化的に保存されていると考え、多重アライメント解析により ADC 遺伝子の 5'-UTR において保存されたシスエレメントの探索を行った。その結果、先行研究で同定された ADC ボックスのほか、UCUUCUGAA という配列モチーフおよび putative な GUG 開始型 uORF が同定された。シロイヌナズナの *SPE2* の 5'-UTR においては他の種の GUG 開始型 uORF と開始コドンが一致する GUG 開始型 uORF と終止コドンが一致する GUG 開始型 uORF の 2 つが存在したため、それぞれ GUG 開始型 uORF1 および 2 とした。

次に *SPE2* の 5'-UTR において活発に翻訳される領域を探索するため、公共の Ribo-seq データを *SPE2* の 5'-UTR について解析した。その結果、AUG 開始型 uORF、GUG 開始型 uORF1、および AUU/CUG 開始型 uORF が活発に翻訳されていることが示唆された。

次に各シスエレメントの変異型コンストラクトを用いた一過的発現解析を行った。各シスエレメントの変異型コンストラクトを葉肉プロトプラストに導入し、Put を終濃度 2 mM になるように加えた場合と同体積の滅菌水を加えた場合で Luc 活性を比較することで、各エレメントが細胞内 Put 濃度に応答した翻訳制御に必要などうかを評価した。結果として、ADC ボックス、UCUUCUGAA モチーフ、GUG 開始型 uORF1 および 2、AUU/CUG 開始型 uORF をそれぞれ変異させると Put 添加に伴う Luc 活性の有意な低下が消失した。一方、AUG 開始型 uORF の変異型コンストラクトは Put 添加により野生型コンストラクトと同程度まで Luc 活性が低下した。これらのことから、*SPE2* 5'-UTR による細胞内 Put 濃度に応答した翻訳制御には ADC ボックス、UCUUCUGAA モチーフ、GUG 開始型 uORF1 および 2、AUU/CUG 開始型 uORF が必要であることが示された。

最後に、*SPE2* 5'-UTR による Put に応答した翻訳制御が植物体内の Put 濃度の恒常性維持に寄与するかを検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により *SPE2* 5'-UTR に変異を導入したシロイヌナズナを作出した。作出した変異株では野生型株と比較して主根長および生重量の減少が認められた。また、HPLC により植物内の Put、Spd、および Spm 量を測定したところ、変異株では野生型株と比べて Put 含量が有意に高かったが、Spd および Spm 含量には変化がなかった。これらのことから、*SPE2* 5'-UTR による Put に応答した翻訳制御は植物体の正常な生長と Put 濃度の恒常性維持に重要であることが示された。

考察

本研究の結果より、①シロイヌナズナ *SPE2* の 5'-UTR は細胞内の Put 濃度に応答して mORF にコードされる ADC の翻訳を抑制するフィードバック制御に関わること、②この翻訳制御には3つの非 AUG 開始型 uORF および保存された ADC ボックスと UCUUCUGAA モチーフが必要であること、③この翻訳制御が植物体の正常な生長と植物体内における Put 濃度の恒常性維持に寄与していることが明らかになった。これにより、今まで植物における Put 恒常性維持機構は未知であったが、シロイヌナズナにおける Put 恒常性維持機構が初めて明らかになった。

一方で新たな課題も生じた。その一つとして、*SPE2* 5'-UTR における各シスエレメントがどのように細胞内 Put 濃度を感知し mORF の翻訳を制御するかは未知である。ポリアミンは RNA 二次構造の安定性に関与することが知られており、細胞内 Put 濃度の変化は ADC ボックス上の RNA 二次構造の形成に影響を与える可能性がある。また、ADC ボックスの RNA 二次構造はそれぞれ GUG 開始型 uORF の終止コドンの直後と AUU/CUG 開始型 uORF の AUU および CUG のそれぞれ 10 塩基下流および 19 塩基下流に位置しており、ADC ボックスの RNA 二次構造の形成が GUG 開始型 uORF の翻訳終結、あるいは AUU/CUG 開始型の翻訳開始に影響を与えている可能性が考えられる。また UCUUCUGAA モチーフの機能は依然として不明である。今後の研究によってポリアミンに応答した *SPE2* 5'-UTR による翻訳制御の詳細な分子機構の解明が期待される。

もう一つの課題は、ADC のフィードバック制御が Put 恒常性維持機構としてどれだけ普遍的であるか、という点である。多くの植物において Put 合成経路は ADC から始まる経路のほかに ODC による経路が存在する。シロイヌナズナは ODC を欠く特殊な植物種であるため、ADC の発現レベルが Put 量に与える影響が特に大きいと考えられる。したがって、ODC が存在するシロイヌナズナ以外の種においても ADC 遺伝子の 5'-UTR によるフィードバック制御が存在し、Put 恒常性維持に重要であるかは検証する必要があるといえる。

結論として、本研究は植物において初めて Put 恒常性維持機構を明らかにしただけでなく、これまで植物において1例しかなかった非 AUG 開始型 uORF が関与する生理学的に重要な制御を明らかにしたという点で、植物生理学的にも植物分子生物学的にも重要であるといえる。