

学 位 論 文 題 名

植物遺伝子の翻訳制御配列に関する研究

学位論文内容の要旨

真核生物の遺伝子の発現は転写、mRNAの安定性、翻訳など、様々な段階にわたって重層的な制御をうけている。翻訳レベルでの制御機構については近年、その重要性が次第に明らかになってきた。細胞内の多種多様なmRNA分子種はそれぞれに固有な代謝回転や翻訳速度をもっており、mRNA上の5'非翻訳領域(5'UTR)や3'非翻訳領域(3'UTR)の塩基配列が様々な分子機構でその翻訳開始頻度に影響を与えていると考えられている。しかし、これまで5'UTRや3'UTR上の塩基配列要素と翻訳開始速度との関係が実際に解析された例はきわめて限られており、多くの遺伝子についてはUTRの機能は未解明である。本学位論文では、植物遺伝子の翻訳制御機構を解明する端緒として、5'UTRや3'UTRに存在する翻訳制御配列を体系的に解析し、その共通性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究を進めるにあたり、筆者はまず、5'UTRに特徴的な構造をもった遺伝子群に着目し、それらをモデルケースとして解析を進めることを考えた。タバコの*psaE*遺伝子のmRNAはこの領域に20塩基程度のポリ(U)モチーフをもっている。そこで、この5'UTRの構造がこの遺伝子の発現にどのような影響をあたえているのかを検討するため、GUS (β -グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子を用いたモデル実験を行った。レポーター遺伝子の5'非翻訳領域に20塩基のポリ(U)配列を挿入したキメラ遺伝子を作成し、挿入していない対照遺伝子とともに、それぞれをタバコに導入した。得られた形質転換植物体中での遺伝子の発現を比較したところ、5'非翻訳領域中にポリ(U)配列をもつGUSmRNAは、mRNAの転写や安定性には殆ど差がないにも拘わらず、翻訳の効率だけが5-6倍にも上昇していた。この例では5'UTR中のポリ(U)モチーフは翻訳段階でのエンハンサー因子として機能したと考えられる。

そこで、このポリ(U)モチーフによる翻訳活性化の分子機構を解析するため、このキメラ遺伝子に様々な塩基置換、挿入、欠失等を導入し、それらをタバコ培養細胞、小麦胚芽由来の*in vitro* 翻訳系、などの様々な遺伝子発現系に適用してその効果を検討した。しかし、予期せぬことに、多くの場合、ポリ(U)モチーフによる翻訳エンハンサー効果そのものが再現されなかった。これに類似した例が、タバコの*psaDb*遺伝子の翻訳エンハンサーについても生じることが最近分かってきた。これらの知見は、5'UTR中のモチーフがmRNAの翻訳効率に与える影響はタンパク質コード領域やUTR内の塩基配列によって強く変化することを意味している。このことは同時に、少数のモデル遺伝子の解析からでは5'UTRの機能モチーフの一般的性質の解明は困難であろうことを示唆している。

ここで筆者は研究の方向を修正し、個々の遺伝子のUTRを一つずつ解析するかわりに、

モデル遺伝子を用いた*in vitro* 分子進化系を利用し、所与の翻訳系の中で機能するUTR 制御配列群を包括的に単離し、解析する新しい手法を考案した。これは次のような原理に基づいている。まず、モデル遺伝子のmRNAの5'UTRや3'UTR中にランダムな塩基配列を挿入する。これにより、モデル遺伝子に翻訳効率の異なったmRNAの集団が形成されると予想される。次にこのmRNA集団を小麦胚芽無細胞系で翻訳させ、一定時間後、その反応液を蔗糖密度勾配遠心にかけ、翻訳途上のmRNAをポリソームの沈降速度の違いに基づき分離する。翻訳開始頻度の高いmRNA分子は一分子当たりより多くのリボソームを結合しているので沈降速度の大きなポリソーム画分に分布し、一方、翻訳効率の悪いmRNA分子は軽い画分に分布する。従って、この遠心分画によって、翻訳効率を促進するUTR配列が挿入されたmRNA群と、翻訳効率を低下させるUTR挿入配列をもったmRNA群をある程度分離できると考えられる。しかし、一回の遠心分画ではその分解能に限界があると予想されるため、いったん分離されたポリソーム画分からmRNAを回収し、それをもとにRT-PCRや*in vitro* 転写反応を行って再度mRNAを作製し、同様な手法で*in vitro* 翻訳反応と蔗糖密度勾配遠心を2回、3回、4回、と繰り返す。原理的には、このような手法で所与のmRNAの翻訳活性を促進/低下させるUTRモチーフ群を包括的に単離・解析することができるはずである。

筆者はこのようなアイデアに基づき、GUS遺伝子を改変したモデル遺伝子を用いて、実際にUTR中の翻訳制御配列について解析を行ったところ、次に述べるような非常に興味深い知見が明らかになった。5'キャップ構造やポリ(A)尾部の有無、挿入ランダム配列の位置(5'UTR内、ATG翻訳開始コドン周辺、3'UTR内)等を組み合わせた様々なmRNAを用意し、その各々について上述の分子進化の手法によるmRNA集団の分離を試みたところ、実際に高頻度翻訳mRNA群が出現したのは、(1) 5'キャップとポリ(A)尾部の両方を持つmRNAの5'UTRにランダム配列を挿入した場合と(2) 5'キャップを欠きポリ(A)尾部を持つmRNAの3'UTRにランダム配列を挿入した場合、の2例に限られた。この結果は、mRNA上の全ての部位が同様な比重で翻訳制御に関わっているわけではなく、mRNA上には翻訳制御機能を担いやすい領域があること、また、3'UTRには5'キャップ非依存的翻訳を促進するモチーフが容易に出現しうることを示している。真核細胞mRNAに関するこの二つの性質は、従来全く予想されていなかった、というわけではないが、しかし、それらを実験的手法によって明らかにしたのは今回の研究が初めてである。

本研究は植物遺伝子の5'UTRや3'UTRに存在する翻訳制御配列の構造や機能を体系的に解明したいという動機ではじめられたが、これまでは、そのような研究を進めるために必要な方法論自体がそもそも存在していなかった。本研究では、人為的分子進化を応用した機能性配列の包括的検索法を用いることで、そのような研究が実際に可能であることを明らかにした。本研究で明らかにした方法論と実験手法を用いれば、単に翻訳制御配列を検索するばかりではなく、植物細胞中での翻訳制御機構の進化の解明や、翻訳レベルでの遺伝子操作技術の開発など、いずれも従来の考え方では不可能だった研究領域に、新たな方向性をあたえることができる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太朗

副 査 教 授 高 木 信 夫

副 査 教 授 田 中 歩

副 査 助教授 小保方 潤 一 (名古屋大学遺伝子実験施設)

副 査 助教授 山 崎 健 一

学 位 論 文 題 名

植物遺伝子の翻訳制御配列に関する研究

真核生物の遺伝子発現は転写段階だけではなく、転写後の段階においても制御を受けていることが認識されるようになってきた。なかでも翻訳レベルでの制御機構については近年、その重要性を示す知見がもたらされ、国外を中心に盛んな研究活動が始まっている。mRNA の翻訳効率は 5'非翻訳領域 (5'UTR) や 3'非翻訳領域 (3'UTR) の塩基配列を介した多様な機構によって制御されていると考えられているが、実際に UTR 内 の翻訳制御配列が解析された例はまだ非常に少なく、多くの遺伝子については未解明のままである。また特に、植物遺伝子においては翻訳を含め転写後制御機構の解明は、動物や酵母に比べて非常に後れているのが現状である。そこで申請者は、植物遺伝子の翻訳制御機構を解明する端緒として、UTR に存在する翻訳制御配列を体系的に解析し、その共通性質を明らかにすることを試みた。

申請者はまず、5'UTR に特徴的な構造をもった遺伝子群に着目し、それらをモデルケースとして解析を進めることを考えた。タバコの *psaE* 遺伝子の mRNA の 5'UTR には 20 塩基程度のポリ (U) モチーフのあることが知られていたが、申請者はこの配列に注目し、レポーター遺伝子と形質転換植物を用いた解析からこのモチーフが翻訳段階での エンハンサー因子として機能することを見つけた。次に、この翻訳促進の分子機構を解明するため、ポリ (U) モチーフを含む様々なキメラ遺伝子を作成して解析を進めたが、当初の予想に反し、多くの場合ではポリ (U) モチーフによる翻訳エンハンサー効果そのものが再現されなかった。これらの結果は、5'UTR 中のモチーフが mRNA の翻訳効率に与える影響は、タンパク質コード領域や UTR 内の塩基配列によって大きく変化することを示している。このことは同時に、少数のモデル遺伝子の解析からでは 5'UTR の機能モチーフの一般的性質を解明することは困難であることを示

唆している。

ここで申請者は研究の方向を修正し、個々の遺伝子の UTR を一つずつ解析するかわりに、与えられた遺伝子上で機能する翻訳エンハンサーやリプレッサー配列を数多く集め、それらの中から共通した性質を抽出する方法を考案した。従来この様な解析は行われた例が無く、ここで申請者が考案した方法が果たして実際に可能なのか、また、それによってどのような結果が導かれるのかはこの時点では全く予想できなかった。しかし、様々な工夫を行った結果、以下に述べるような実験手法の開発に成功した。まず、モデル遺伝子の mRNA の UTR 中にランダムな塩基配列を挿入して翻訳効率の異なった mRNA の集団を作成し、小麦胚芽無細胞系で翻訳させ、蔗糖密度勾配遠心によって翻訳途上の mRNA をポリソームサイズの違いに基づいて分離した。この分離によって翻訳効率に従った mRNA の分離が行われていることが期待されたが、実際には一度の分離では翻訳効率の高い mRNA と低い mRNA を完全に分離することは困難であることがわかった。そこで、いったん分離されたポリソーム画分から mRNA を回収し、翻訳反応と蔗糖密度勾配遠心を繰り返すことで最終的に両者を分離した。申請者はこの手法を用いて、ランダム配列の挿入位置、5'キャップと 3'ポリ(A)尾部の有無、をそれぞれ組み合わせて作成した様々な mRNA 群を解析し、以下に示す三つの非常に興味深い知見を得た。第一に、mRNA 上の全ての部位が同様な比重で翻訳制御に関わっているわけではなく、mRNA 上には翻訳制御機能を担いやすい領域があるということ、第二に、3'UTR には 5'キャップ非依存的翻訳を促進するモチーフが容易に出現しうること、第三として、翻訳の促進や抑制をひきおこす UTR 配列には多様性があること、である。真核細胞 mRNA に関するこの三つの性質は、従来全く予想されていなかったという訳ではないが、それらを実験的に明らかにしたのは今回の研究が初めてであり、審査員一同はこの知見を高く評価した。

申請者は、植物遺伝子の UTR に存在する翻訳制御配列の構造や機能を体系的に解明しようという目的を持って研究を始めたが、従来、そのような研究は殆ど行われていなかった。申請者はその研究の過程で様々な工夫をしながら、与えられた mRNA 上で機能する多数の翻訳エンハンサー/リプレッサーを包括的に単離する全く新しい実験手法を開発し、その手法を用いて UTR 中の翻訳制御配列のもつ興味深い性質を実験的に明らかにした。申請者が明らかにした研究手法や知見は今後の翻訳制御配列の研究に大きな貢献をなすものと期待される。

審査員一同は申請者の創造的な研究姿勢と、その結果生み出された新しい知見とを高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などもあわせ申請者が博士(地球環境科学)の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。