

シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子の翻訳停止と 共役した mRNA 分解制御機構の研究

学位論文内容の要旨

シスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) は高等植物のメチオニン生合成経路において鍵となる反応を触媒する酵素である。シロイヌナズナにおいて CGS をコードする *CGS1* 遺伝子の発現は、メチオニンの代謝産物である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) に応答して負のフィードバック制御を受ける。これは、*CGS1* mRNA の分解が促進されることによる転写後制御である。*CGS1* mRNA 分解制御は翻訳中に起こり、*CGS1* 第 1 エキソン内部にコードされる制御領域 (MTO1 領域) の新生ペプチドが、自身をコードする mRNA の分解にのみ関与する。*CGS1* の制御は小麦胚芽試験管内翻訳系で再現され、SAM 添加によって生体内で産生されるものと同様の mRNA 分解中間体が蓄積する。最近、この試験管内翻訳系での解析により、*CGS1* 第 1 エキシソンのコード領域内部で、MTO1 領域に依存した翻訳制御が起こることが示され、この翻訳制御と *CGS1* mRNA 分解との関連が考えられている。

真核生物においては *CGS1* 遺伝子の発現制御のように、新生ペプチドとして機能する制御領域が mRNA 分解と翻訳制御の双方に関与する例は無い。その一方で、終止コドンを欠いた mRNA、通常の終止コドンに加えてコード領域内部にも終止コドンを持つ mRNA など、異常な mRNA を排除する機構である mRNA 品質管理機構の研究から、異常な mRNA の分解がリボソームの動態と密接に関連して起こることが明らかになってきている。しかもこの機構は単に異常な mRNA を排除するに留まらず、真核生物の多くの遺伝子の発現を調節していることも示された。このように翻訳と mRNA 分解との相互関係に注目が集まる中、*CGS1* 遺伝子で見られる翻訳制御の性質を理解し、それが mRNA 分解に対して何らかの意義を持つのかを明白にすることは、遺伝子発現制御の研究分野に新たな展開をもたらさう重要な課題である。

MTO1 ペプチドに依存して起こる翻訳制御が、コード領域内における翻訳の中途終結であるのか、あるいは翻訳の一時停止であるのかは明らかにされていなかった。翻訳制御の基本的性質とも言えるこの点を理解するため、翻訳制御の指標となる部分翻訳産物に着目してパルス・チェイス実験を行い、その挙動を経時的に解析した。その結果、*CGS1* mRNA で見られる翻訳制御は翻訳の中途終結ではなく、翻訳の一時停止であることが示された。この翻訳停止と mRNA 分解との関連性を把握することを目的として、mRNA 分解中間体の蓄積と部分翻訳産物の蓄積を経時的に比較した。これにより、mRNA 分解中間体は部分

翻訳産物よりも遅れて蓄積することが明らかとなり、翻訳停止の後に mRNA 分解が起こることが示唆された。アミノ酸置換などの導入により翻訳停止を強く阻害した場合、その mRNA の分解中間体は検出されなかった。また、翻訳停止を弱く阻害するアミノ酸置換を導入した mRNA では、mRNA 分解中間体の蓄積量は通常よりも減少した。これらの結果は、翻訳停止と mRNA 分解が強く相関することを示すものであった。以上により、SAM に応答して起こる翻訳の停止が mRNA 分解の引き金となることが示唆された。このように新生ペプチドによる翻訳停止と共役して mRNA が分解される現象は珍しく、高等真核生物では初めての例である。

試験管内における mRNA 分解の解析過程で、*CGS1* 遺伝子の発現制御では 5' 領域を欠いた mRNA 分解中間体が複数種類産生されることを発見した。これらの 5' 末端をプライマー伸長法で解析したところ、それぞれの mRNA 分解中間体の 5' 末端位置は約 30 塩基ずつ離れていることが明らかになった。真核生物のリボソームが mRNA を覆う範囲が約 30 塩基であることから、複数種類の mRNA 分解中間体の産生には、mRNA に結合したリボソームの数に関係するとの仮説を立てた。翻訳開始阻害剤の添加などによって 1 分子の mRNA に結合するリボソームの数を制御したところ、mRNA 分解中間体の種類は mRNA に結合したリボソームの数に相関して増減した。また、ショ糖密度勾配遠心法により試験管内翻訳後の反応液をリボソームの数に従って分画し、それぞれの画分に存在する mRNA 分解中間体を解析したところ、長い分解中間体にはより多くのリボソームが結合していることが明らかになった。これら一連の結果から、SAM に応答して停止したリボソームを先頭にして、複数個のリボソームが連なって停止し、停止したそれぞれのリボソームに対応した位置で mRNA 分解が起こることが示唆された。新生ペプチドによる mRNA 分解系において、*CGS1* 遺伝子のようにリボソームの“交通渋滞”が複数種類の mRNA 分解中間体を産生するという報告はない。

mRNA 分解経路の決定を目的として、RNase による分解を受けにくいチオ化ヌクレオチドを mRNA の 5' 末端に導入し、エキソヌクレアーゼによる 5'→3' 方向の分解を阻害した条件下で mRNA 分解中間体の解析を行った。その結果、mRNA 分解中間体の種類や蓄積量は通常と変わらなかった。さらに、小麦胚芽抽出液中で機能する RNase 阻害剤を用いた解析などにより、末端位置がほぼ一致するそれぞれ 2 種類の 5' 側 mRNA 断片と 3' 側 mRNA 断片の存在が明らかになった。以上の結果から、*CGS1* mRNA 分解制御が起こる際に、mRNA は少なくとも 2 箇所においてエンドヌクレアーゼにより切断されることが示唆された。RNase 阻害剤を添加した条件下で mRNA 分解中間体を解析したところ、1 種類の分解中間体の蓄積量が減少した。この結果から、SAM 添加に応答して起こる *CGS1* mRNA の分解には、特定の RNase 阻害剤の影響を受ける機構と影響を受けない機構が働くことが示された。この結果は、*CGS1* mRNA が分解される際に、異なる 2 種類の mRNA 分解機構が協調して働くことを意味するものである。

本研究で明らかにした *CGS1* 遺伝子発現制御の分子機構は、いずれも真核生物においては非常にユニークなものであった。しかしながら、この制御を引き起こす制御領域は高等植物間で高度に保存されており、原核生物においても類似の分子機構が数例報告されてい

る。従って、*CGS1* 遺伝子発現制御機構は稀なものではなく、同様の分子機構が多様な生物種に存在すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	内藤	哲
副査	教授	伴戸	久徳
副査	教授	木村	淳夫
副査	准教授	尾之内	均

学位論文題名

シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子の翻訳停止と 共役した mRNA 分解制御機構の研究

本論文は、和文 70 頁、18 図からなり、参考論文 3 編が添付されている。

シスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) は高等植物のメチオニン生合成経路において鍵となる反応を触媒する酵素である。シロイヌナズナにおいて CGS をコードする *CGS1* 遺伝子の発現は、メチオニンの代謝産物である S-アデノシルメチオニン (SAM) に応答して、負のフィードバック制御を受ける。これは、*CGS1* mRNA の分解が促進されることによる転写後制御である。*CGS1* mRNA 分解制御は翻訳中に起こり、*CGS1* 第 1 エキソン内部にコードされる MTO1 領域と名付けた制御領域の新生ペプチドが、自身をコードする mRNA の分解に関与する。この制御は小麦胚芽試験管内翻訳系で再現され、SAM 添加によって生体内で産生されるものと同じ mRNA 分解中間体が蓄積する。この制御においては、*CGS1* 第 1 エキシソンのコード領域内部で、MTO1 領域の新生ペプチドに依存した翻訳制御が起こる。

本論文は、この翻訳制御と *CGS1* mRNA 分解との関係、および *CGS1* mRNA の分解機構を論じたものである。論文の内容は以下のように要約される。

まず、MTO1 新生ペプチドに依存して起こる翻訳制御が、翻訳の中途終結であるのか、あるいは一時停止であるのかを調べた。翻訳制御の指標となる部分翻訳産物に着目してパルス・チェイス実験を行い、その挙動を経時的に解析した結果、*CGS1* mRNA の翻訳制御は翻訳の中途終結ではなく、翻訳の一時停止であることを示した。次いで、この翻訳停止と mRNA 分解との関連性を明らかにすることを目的として、mRNA 分解中間体の蓄積と部分翻訳産物の蓄積を経時的に比較した。これにより、mRNA 分解中間体は部分翻訳産物よりも遅れて蓄積することを明らかにした。アミノ酸置換などの導入により翻訳停止を強く阻害すると、mRNA 分解中間体も検出されなかった。また、翻訳停止を弱く阻害するアミノ酸置換を導入した場合は mRNA 分解中間体の蓄積量は通常よりも減少した。これらの結果が

ら、翻訳停止と mRNA 分解が強く相関していることを明らかにした。新生ペプチドによる翻訳停止と共役して mRNA 分解が起こるのは、高等真核生物では初めての報告である。

試験管内における mRNA 分解の解析過程で、CGS1 遺伝子の発現制御では 5'領域を欠いた mRNA 分解中間体が複数種類産生されることを発見した。これらの 5'末端をプライマー伸長法で解析し、それぞれの mRNA 分解中間体の 5'末端位置が約 30 塩基ずつ離れていることを明らかにした。真核生物のリボソームが mRNA を覆う範囲が約 30 塩基であることから、複数種類の mRNA 分解中間体の産生には mRNA に結合したリボソームの数に関係するとの仮説を立てた。翻訳開始阻害剤の添加などの方法によって 1 分子の mRNA に結合するリボソームの数を制御したところ、mRNA 分解中間体の種類は mRNA に結合したリボソームの数に相関して増減した。また、ショ糖密度勾配遠心法により試験管内翻訳後の反応液をリボソームの数に従って分画し、それぞれの画分に存在する mRNA 分解中間体を解析することにより、長い分解中間体にはより多くのリボソームが結合していることを明らかにした。これら一連の結果から、SAM に応答して停止したリボソームを先頭にして、複数個のリボソームが連なって停止し、停止したそれぞれのリボソームに対応した位置で mRNA 分解が起こると考察した。新生ペプチドによる mRNA 分解系において、本研究のようにリボソームの“交通渋滞”が複数種類の mRNA 分解中間体を産生するという報告は初めてのものである。

mRNA 分解経路を明らかにするため、RNase による分解を受けにくいチオ化ヌクレオチドを mRNA に導入し、エキソヌクレアーゼによる分解を阻害した条件下で mRNA 分解中間体の解析を行った。チオ化ヌクレオチドを導入した mRNA においても、SAM に応答して CGS1 mRNA 分解中間体が観察され、この制御は正常に起こることを示した。さらに、小麦胚芽抽出液中で RNase 阻害効果を持つポリ G を用いた解析などにより、末端位置がほぼ一致する 2 対の 5'側 mRNA 断片と 3'側 mRNA 断片の存在を明らかにした。これらの結果から、CGS1 mRNA 分解制御において、mRNA は少なくとも 2 箇所においてエンドヌクレアーゼにより切断されると考察した。さらに、ポリ G 感受性を比較した結果などから、SAM に応答して起こる CGS1 mRNA の分解には、少なくとも 2 種類の mRNA 分解機構が働くことを明らかにした。

本研究で明らかにした CGS1 遺伝子発現制御の分子機構は、真核生物においては非常にユニークなものであり、学術的に高く評価できる。また、一連の成果はメチオニン含量の高い作物の分子育種を考える上でも重要な成果である。よって審査員一同は、原口雄飛が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。