

シロイヌナズナ・シスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子の
新生ペプチドと SAM による
リボソームの翻訳アレスト機構の研究

学位論文内容の要旨

反芻動物を除く哺乳類では、20 種類のアミノ酸のうち 9 種類が必須アミノ酸であり、このうちメチオニンは唯一の含硫アミノ酸である。したがって、植物および微生物によって合成されるメチオニンに依存せざるを得ない。一方、メチオニンはタンパク質の構成成分のみならず、生体内で様々な役割を果たす *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の前駆体でもある。SAM は DNA, RNA およびヒストンを始めとするタンパク質をメチル化する際に、メチル基供与反応の主要なドナーとなる他、植物ではエチレン生合成の前駆体として重要な化合物である。

高等植物において、メチオニンの生合成の鍵となる段階を触媒する酵素はシスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) 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 SAM によって、mRNA 分解段階で負のフィードバック制御を受けている。SAM が過剰に存在する条件下では、*CGS1* mRNA の分解が促進される。この mRNA 分解に先立って、*CGS1* mRNA を翻訳中のリボソームが翻訳伸長を一時停止する (翻訳アレスト) ことがこれまでに明らかとなっているが、翻訳アレストがどのように引き起こされるかは分かっていない。本研究はこのアレスト機構の解明を目的とし、*CGS1* 新生ペプチド、アレストしたリボソームおよび SAM の作用機構を解析した。

翻訳アレストには *CGS1* 第 1 エキソン内にコードされる MTO1 領域のアミノ酸配列が重要であり、MTO1 領域の翻訳直後にアレストすることから、翻訳された MTO1 領域はアレスト時にリボソーム出口トンネル内に存在すると考えられる。出口トンネルはリボソーム大サブユニットを貫通する構造であり、翻訳伸長中である新生ペプチドの通り道である。本解析では、翻訳アレスト時に MTO1 領域を含む *CGS1* 新生ペプチドが、SAM に応答して出口トンネル内でコンフォメーション変化を生じるという仮説を立て、これをペジレーションアッセイにより検証した。その結果、*CGS1* 制御のエフェクターである SAM に応答して、*CGS1*

新生ペプチドが収縮構造をとることを本研究で明らかにした。さらに、*CGS1*の制御を損なわせるアミノ酸置換である *mtol* 変異を MTO1 領域に導入すると、SAM に応答した収縮が損なわれた。また、アレストしたリボソームの 28S rRNA に対して、メチレーションプロテクションアッセイと UV クロスリンク解析をおこなったところ、新生ペプチドの収縮と関連して、出口トンネル内壁を構成する rRNA のメチレーションプロテクションと UV クロスリンクパターンに特異的な変化が生じることを明らかにした。以上の結果は、SAM に応答して MTO1 領域は新生ペプチドが収縮構造をとるように誘導し、新生ペプチドと出口トンネル内壁との相互作用の変化を引き起こすことで、*CGS1* の制御における翻訳アレストに関与することを示唆するものである。

また、MTO1 領域と近接する因子を探索するために、新生ペプチド中にクロスリンク能をもつアミノ酸を導入して、近接する因子の解析をおこなったところ、22 kDa のタンパク質因子（おそらくリボソームタンパク質 L17）と MTO1 領域が近接していることが示唆された。さらに、リボソームタンパク質 L4 に変異を導入した形質転換シロイヌナズナにおいて、*CGS1* の制御に影響が生じることを明らかにした。リボソームタンパク質 L17 と L4 はリボソーム出口トンネルにおいて最も狭くなっている狭窄部位を構成することから、この部位が翻訳アレストに関与することが示唆された。

以上、本研究の結果より、*CGS1* の制御における翻訳アレストの際に、リボソーム出口トンネル内で *CGS1* 新生ペプチドが SAM に応答して収縮し、新生ペプチドと出口トンネル内壁との相互作用が変化するというモデルを提唱する。またその際に、出口トンネル狭窄部位が関与するモデルも合わせて提唱する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 山 口 淳 二
副 査 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

シロイヌナズナ・シスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子の 新生ペプチドと SAM による リボソームの翻訳アレスト機構の研究

シスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) は、高等植物におけるメチオニン生合成の鍵段階を触媒する。メチオニンはタンパク質の構成成分であるのみならず、生体内で様々な反応に関与する *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の前駆体である。SAM は、ほとんどのメチル化反応でメチル基供与体となる他、ポリアミン合成、さらに植物ではエチレン合成にも関与する重要な化合物である。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、SAM に応答した翻訳伸長の一時停止 (翻訳アレスト) と共役した mRNA 分解によって負のフィードバック制御を受ける。本論文は、この翻訳アレストの分子機構を明らかにする目的で行った研究をまとめたものである。

翻訳アレストには *CGS1* 第 1 エキソン内にコードされる MT01 領域のアミノ酸配列が重要であり、MT01 領域の翻訳直後に翻訳アレストが起こる。従って、翻訳された MT01 領域は翻訳アレスト時にリボソーム出口トンネル内に存在すると考えられる。出口トンネルはリボソーム大サブユニットを貫通する構造であり、翻訳伸長中の新生ペプチドの通り道である。本論文では、まず、翻訳アレスト時に MT01 領域を含む *CGS1* 新生ペプチドが、SAM に応答して出口トンネル内でコンフォメーション変化を生じるという仮説を立て、これをペジレーションアッセイ法を用いて検証している。ペジレーションアッセイ法は、ポリエチレングリコール・マレイミド (PEG-MAL) と新生ペプチド中のシステイン残基との反応効率を解析するものである。その結果、*CGS1* 新生ペプチドが SAM に応答して収縮構造をとることを明らかにし、この応答に MT01 領域の機能が密接に関与することを示した。また、翻訳アレストしたリボソームの 28S rRNA について、メチレーションプロテクションアッセイ法と UV クロスリンク法による解析を行い、新生ペプチドの収縮と関連して、出口トンネル内壁を構成する rRNA のコンフォメーション、もしくは rRNA と新生ペプチドの位置関係に特異的な変化が生じることを明らかにした。

さらに、新生ペプチドの MT01 領域とリボソームタンパク質 L17 と考えられる 22 kDa のタンパク質因子が近接していること、またリボソームタンパク質 L4 に変異を導入した形質転換シロイヌナズナにおいて、*CGS1* の制御に影響が生じることを示した。リボソームタンパク質

L17 と L4 はリボソーム出口トンネルにおいて最も狭くなっている狭窄部位を構成することから、この部位が翻訳アレストに関与することが示唆された。

以上の結果をもとに、CGS1 の翻訳アレストの際に、リボソーム出口トンネル内で CGS1 新生ペプチドが SAM に応答して収縮し、新生ペプチドと出口トンネル内壁との相互作用が変化するというモデルを提唱している。

これを要するに、著者は、新生ペプチドが細胞内低分子化合物に応答して翻訳伸長を停止させる分子機構に関して新知見を得たものであり、リボソームの持つ未知機能の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。