

学位論文題名

シロイヌナズナの細胞抽出液を用いたシスタチオニン
 γ -シンターゼ遺伝子の発現制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

試験管内翻訳系は、生体内で起こる mRNA の翻訳反応を無細胞抽出液を用いて試験管内で行うことができる系である。これまでに、多くの生物種由来の翻訳系が作られてきたが、植物においては小麦胚芽抽出液や、タバコ BY-2 細胞抽出液を用いた試験管内翻訳系が確立されている。しかし、モデル植物として多くの研究が行われてきたシロイヌナズナに関しては、未だ試験管内翻訳系として用いることのできる系は報告されていない。本研究では、シロイヌナズナの遺伝学的な資源を背景に、無細胞抽出液を用いた植物の転写後制御機構の研究を強力に推し進めるべく、シロイヌナズナ由来の抽出液を用いた試験管内翻訳系を確立した。シロイヌナズナのプロトプラストを調製し、Percoll 密度勾配遠心を行うことで RNA やタンパク質の分解酵素が豊富に含まれている液胞が除かれたミニプロトプラストを調製した。プロトプラストをそのまま破碎して調製した抽出液では翻訳活性がほとんど得られなかったが、脱液胞化したミニプロトプラストを用いることによって翻訳活性を持つ抽出液(ACE)を得ることに成功した。試験管内翻訳の条件検討を行い、翻訳される mRNA に 5' キャップ構造を要求する系であることも明らかにした。また、キャップへの依存性は 5' → 3' エクソヌクレアーゼの変異株 *xm4-5* 由来の ACE において弱まることも示された。

シスタチオニン γ -シンターゼ(CGS)はメチオニン生合成の鍵段階を触媒する酵素である。シロイヌナズナ *CGSI* 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 mRNA の安定性制御の段階で負のフィードバック制御を受ける。*CGSI* 第 1 エキソンがこの制御に必要な十分な領域であり、この領域にコードされるポリペプチドが自身の mRNA にシスに働くことが明らかになっている。SAM に応答した制御は *CGSI* 第 1 エキシソンの新生ポリペプチドと自身の mRNA が近接している翻訳中に起こることが示唆された。これまで翻訳と共役して起こる制御を解析する手段と

して、小麦胚芽抽出液を用いた試験管内翻訳系が用いられてきた。この系による研究で、*CGSI* mRNA を翻訳中に SAM に応答した翻訳アレストが起こることが示されており、この翻訳アレストには、翻訳中の *CGSI* 新生ペプチドがリボソーム出口トンネル内で収縮構造をとることが関係していることも明らかになっている。また、mRNA の分解産物の解析により、リボソームの翻訳停止位置と対応するような複数の分解産物が検出され、翻訳停止が mRNA 分解と深く関わっていることも明らかになった。今後 *CGSI* の発現制御のより詳細な解析を行う上で、モデル植物であるシロイヌナズナの豊富な情報量を生かした解析を行うことができれば理想的である。本研究では ACE を用いて、*CGSI* の発現制御機構の解析を行った。ACE においても、SAM に応答した翻訳アレスト、およびそれに伴って起こる mRNA 分解が再現され、*CGSI* mRNA の SAM に応答した発現制御機構の解析に応用可能であることを示した。また、リボソーム出口トンネルを形成するリボソームタンパク質の変異を導入した ACE においては、翻訳アレストが起こりにくくなっていることを示唆する結果を得た。また、*xrn4-5* 変異株を用いた解析では、SAM に応答した mRNA 分解に直接的な影響は見られなかったが、下流の 2 次構造によるものと考えられる新たな分解中間体を発見した。

本研究によりシロイヌナズナ由来の新規試験管内翻訳系が確立され、mRNA 分解をはじめとするシロイヌナズナ細胞内のいくつかの制御が再現されることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	内藤	哲
副査	教授	山本	興太郎
副査	教授	山口	淳二
副査	准教授	尾之内	均 (農学院)
副査	ユニット長	石川	雅之

((独)農業生物資源研究所)

学位論文題名

シロイヌナズナの細胞抽出液を用いたシスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子の発現制御機構に関する研究

試験管内翻訳系は、生体内で起こる mRNA の翻訳反応を無細胞抽出液を用いて試験管内で行うことができる系である。これまでに、多くの生物種由来の翻訳系が作られてきたが、植物においてはコムギ胚芽抽出液や、タバコ BY-2 細胞抽出液を用いた試験管内翻訳系が確立されている。しかし、モデル植物として多くの研究が行われてきたシロイヌナズナでは、未だ試験管内翻訳系として用いることのできる系は報告されていない。本研究は、シロイヌナズナの遺伝学的な資源を、無細胞抽出液を用いた植物の転写後制御機構の研究に適用すべく、シロイヌナズナ由来の試験管内翻訳系を確立したものである。

シロイヌナズナの芽生えから液体培養カルスを起こし、カルスから調製したプロトプラストを Percoll 密度勾配遠心を行うことで RNA やタンパク質の分解酵素を多く含む液胞が除かれたミニプロトプラストを調製した。プロトプラストをそのまま破碎して調製した抽出液では翻訳活性がほとんど得られなかったが、脱液胞化したミニプロトプラストを用いることで、コムギ胚芽抽出液と同等の翻訳活性を持つシロイヌナズナ抽出液 (ACE) を得ることに成功した。ACE を用いた翻訳条件の検討を行い、翻訳される mRNA に 5' キャップ構造を要求する系であることを明らかにするとともに、このキャップ依存性は 5' → 3' エキソヌクレアーゼの

変異株 *xrn4-5* 由来の ACE において弱まることを示した。これにより、シロイヌナズナの野生型株および変異株を用いた試験管内翻訳実験が可能となった。

ACE の有効性を示すため、シスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) をコードする *CGS1* mRNA を用いた解析を行った。CGS はメチオニン合成の鍵段階を触媒する酵素である。シロイヌナズナ *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 mRNA の安定性の制御段階で負のフィードバック制御を受ける。この制御は *CGS1* mRNA の翻訳中に起こり、SAM に応答した翻訳アレストと、これに共役した *CGS1* mRNA 分解からなる。*CGS1* 第 1 エキソンが制御に必要な十分な領域であり、この領域にコードされるポリペプチドが自身の mRNA にシスに働く。また、翻訳中の *CGS1* 新生ペプチドが、SAM に応答してリボソーム出口トンネル内で収縮構造をとることも明らかになっている。これまでの研究は、コムギ胚芽抽出液の試験管内翻訳系が用いられてきたが、ACE においても、SAM に応答した翻訳アレスト、およびこれと共役した mRNA 分解が再現され、*CGS1* mRNA の SAM に応答した発現制御機構の解析に適用可能であることを示した。また、リボソーム出口トンネルを形成するシロイヌナズナのリボソームタンパク質遺伝子に変異を導入した株から調製した ACE においては、翻訳アレストが起こりにくくなっていることを示唆する結果を見いだしている。さらに、*xrn4-5* 変異株を用いた解析では、SAM に応答した mRNA 分解に直接的な影響は見られなかったが、下流の 2 次構造によるものと考えられる新たな分解中間体を発見した。

以上を要するに、著者は、シロイヌナズナを用いた実験系に新たな方法論を導入することに成功したものであり、高等植物における転写後制御の研究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。