

維管束形成を司るシロイヌナズナ *LONESOME HIGHWAY* 遺伝子の

上流 ORF が介する翻訳制御と mRNA 分解制御

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子生物学 梅原 俊一

1. 背景と目的

シロイヌナズナの *LONESOME HIGHWAY* (*LHW*) 遺伝子は bHLH 型転写因子をコードし、転写因子 *LHW* は維管束木部細胞の細胞分裂および分化を促進することが知られている。*LHW* 遺伝子の 5' 非翻訳領域には3つの上流 ORF (uORF) が存在し、そのうち2番目の uORF2 は被子植物間で高度に保存されたアミノ酸配列を持つ uORF (Conserved Peptide uORF: CPuORF) である。当研究室のこれまでの研究によって、正電荷をもつ低分子化合物であるポリアミンの一種のサーモスペルミンに応答して uORF2 のアミノ酸配列依存的に *LHW* mRNA の分解が促進されることが明らかになっていた。本研究では、*LHW* uORF による転写後制御のさらに詳細な機構の解明を目的として実験を行った。

2. 方法と結果

LHW 5' 非翻訳領域の下流にレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナを用いて、サーモスペルミンに応答したレポーター遺伝子の翻訳効率と mRNA 量の変化を調べた。その結果、サーモスペルミンに応答して *LHW* uORF2 によって促進される mRNA 分解に、主要 ORF の翻訳抑制が伴うことが明らかになった。一方、uORF2 の翻訳開始効率はサーモスペルミンの影響を受けないことが示された。uORF2 が介する翻訳抑制は新生ペプチドによるリボソームの停滞が原因である可能性が考えられたため、*in vitro* 翻訳系において新生ペプチドによってリボソームが停滞した場合に蓄積される翻訳の中間体であるペプチジル tRNA の検出を試みた。その結果、uORF2 のペプチジル tRNA が検出され、uORF2 の翻訳により合成されるペプチド依存的にリボソームの停滞が起きることが明らかになった。また、uORF2 におけるリボソームの停滞位置を調べるために uORF2 の終止コドンの位置を変えたところ、終止コドンのひとつ前のコドンを終止コドンに置換したことによってペプチジル tRNA が検出されなくなり、リボソームは uORF2 の終止コドンの位置で停滞することが示された。さらに形質転換シロイヌナズナから抽出した mRNA を鋳型にしたプライマー伸長解析において、リボソームの停滞位置に対応した位置に 5' 末端を持つ mRNA 分解中間体が検出されたことから、終止コドンにおけるリボソームの停滞と共役して *LHW* mRNA の分解が起こることが明らかになった。続いて、リボソームの異常翻訳終結により誘導される mRNA の品質管理機構として知られる Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) に必須の因子である UPF1 と UPF3 の欠損変異体を用いて *LHW* mRNA 分解制御への影響を調べたところ、uORF2 が介する *LHW* mRNA の分解に NMD が関与することが明らかになった。

3. 結論

LHW mRNA の転写後制御において、サーモスペルミンに応答して uORF2 にコードされるペプチドにより uORF2 の終止コドンでリボソームの停滞が促進され、それと共役して NMD による *LHW* mRNA 分解が誘導されることが示された。本研究で見いだされた転写後制御機構は、uORF ペプチドによるリボソームの停滞が関与する発現制御が植物の発生分化に関わる初めての例である。