

シロイヌナズナ *TTM3* 遺伝子の上流 ORF は 後期促進複合体の構成因子 CDC26 をコードする

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子生物学 垣内 俊哉

1. はじめに

シロイヌナズナの *Triphosphate Tunnel Metalloenzyme 3 (TTM3)* 遺伝子の 5'非翻訳領域には上流 ORF (uORF) が一つ存在し、その uORF のアミノ酸配列は高等植物種間で高度に保存されている。さらにこのアミノ酸配列は動物における CDC26 のアミノ酸配列と類似性が見られる。CDC26 は酵母や動物では細胞周期を制御する後期促進複合体 (APC/C) の構成因子の一つとして知られており、APC/C の別の構成因子である APC6 と相互作用する機能をもつことが報告されている。しかし、植物ではこれまでに CDC26 に相当するタンパク質は同定されていない。そこで本研究では植物の *TTM3* uORF にコードされるペプチドが CDC26 オルソログとして機能する可能性を検証した。また、*TTM3* uORF に CDC26 がコードされているとするならば一つの mRNA から CDC26 と *TTM3* の二つのタンパク質が翻訳されると考えられるが、植物ではこれまでにそのようなダイシストロニックな mRNA の翻訳制御に関する知見はほとんどない。そこで *TTM3* mRNA の二つの ORF の翻訳制御機構の解明を目指した。

2. 方法

まず、酵母 2-ハイブリッド法により *TTM3* uORF にコードされるペプチドと APC6 の相互作用解析を行った。次に、植物体における *TTM3* uORF の機能を調べるために、RNAi 法により *TTM3* uORF をノックダウンさせた変異株を作出し表現型を解析した。続いて、*TTM3* uORF (CDC26) の翻訳効率と下流の *TTM3* の翻訳効率の関係性を調べるために、*TTM3* の 5'非翻訳領域の下流に *TTM3* の途中から読み枠を合わせてレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、シロイヌナズナ MM2d 細胞を用いた一過的発現解析を行った。CDC26 の開始コドン付近の配列に変異を導入し CDC26 の翻訳開始効率を変化させた場合や、CDC26 の ORF 内に ATG コドン挿入した場合に、下流の *TTM3* の翻訳効率がどのように変化するかを調べた。

3. 結果と考察

酵母 2-ハイブリッド法による相互作用解析の結果、*TTM3* uORF にコードされるペプチドは動物の CDC26 と同様に APC6 と相互作用することが示された。次に *TTM3* uORF のノックダウン株の表現型解析を行ったところ、矮性の表現型が観察された。この表現型は APC/C の他の構成因子をノックダウンさせたシロイヌナズナの表現型と類似の表現型であった。これらの結果から、植物の *TTM3* uORF には CDC26 オルソログがコードされており、APC/C の構成因子として機能していることが明らかになった。続いて、一過的発現解析において *TTM3* uORF (CDC26) の開始コドンを点変異で破壊すると下流の *TTM3* の翻訳が促進された。逆に CDC26 の開始コドン付近の配列を Kozak 配列へと変化させ CDC26 の翻訳開始効率を上昇させると、下流の *TTM3* の翻訳が抑制された。また、CDC26 の ORF 内に AUG コドン挿入した場合には下流の *TTM3* の翻訳が抑制された。これらの結果から、CDC26 の最初の開始コドンを読み飛ばしたリボソームが次の AUG コドンまで mRNA 上をスキッピングし続け、下流の *TTM3* の開始コドンを認識することで *TTM3* が翻訳されているということが示唆された。すなわち、リーキスキッピングにより *TTM3* mRNA の 2 つの ORF が翻訳されることが示唆された。