

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06949

研究課題名(和文)オートファジーによるRNA分解の分子機構とその普遍性の解明

研究課題名(英文)RNA degradation via autophagy in eukaryote

研究代表者

堀江 朋子(川俣朋子)(Horie, Tomoko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70435527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内の分解システムであり、タンパク質、核酸(主としてRNA)、脂質分解を担う。オートファジーは一般的には非選択的であるが、選択的に分解される基質タンパク質が同定されている。RNAも同様に基質選択性があるかどうかを調べることにした。その結果、ある種のRNAについて、基質選択性があることが明らかになった。本課題ではまた、オートファジーによるRNA分解の結果生じるRNA分解代謝物の輸送の実態の解明を試みた。液胞膜に局在するヌクレオシド輸送体候補としてFun26を同定しているが、これ以外にも輸送体が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an intracellular catabolic system that facilitates the degradation of proteins, nucleic acids and lipids. In general, autophagy is considered a non-selective process, but defined targets degraded by selective autophagy have also been identified. In this study, we set out to determine whether specific RNA species can also be degraded selectively by autophagy. To this end, we first developed a means of purifying RNA that is degraded by autophagy in yeast. Using this technique, we identified targets of selective autophagy and studied the mechanism of their selective degradation. In addition, we also undertook a study of transporters required for the efflux of autophagy-derived RNA degradation products from the vacuole. We identified Fun26, a transporter localizing to the vacuole membrane, as such a nucleoside transporter, and our analyses indicate several further candidate transporter proteins involved in the recycling of RNA degradation products to the cytosol.

研究分野：オートファジー

キーワード：オートファジー 分解 RNase 核酸 RNA RNA-seq 輸送体 液胞

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の主要な自己成分の分解システムであり、真核生物で広く保存されている。オートファジーにより、細胞内の一部がオートファゴソームに取り込まれ、分解コンパートメントであるリソソーム/液胞内で異化され、様々な形でリサイクルされることから、細胞の代謝と密接な関係があると考えられている。これまでオートファジーはタンパク質分解システムとして広く支持されていたが、実際にはタンパク質と匹敵する量の RNA も分解されることが示唆されていた。しかし、オートファジーによる RNA 分解の分子機構は、オートファジーによるタンパク質分解機構と比較して長らく不明であった。近年、研究代表者自身による酵母を用いた解析から、オートファジー依存的な RNA 分解のフローが解明された (Huang and Kawamata et al., EMBO J, 2015)。オートファジーにより液胞へと運ばれた RNA は、ヌクレオチドからヌクレオシドへと変換され、細胞質でさらに塩基へと代謝され、そのほぼ全量が細胞外に放出されるということ、またその責任酵素を明らかにしてきた (図 1)。その結果、オートファジーが細胞内の RNA 代謝に与える影響を解析することが初めて可能となった。

オートファジーは一般的には非選択的な過程であると考えられているが、一部のタンパク質はオートファジーの優先的な基質となりうることで多くの生物種で証明されている。RNA も同様に基質特異性があるのか、これまで解析する手段が存在しなかった。また、液胞内で核酸が分解された後のステップ、すなわち液胞内 RNA 分解代謝物の輸送とリサイクル機構はこれまで全く不明であった。

### 2. 研究の目的

第一の課題は、オートファジーにより分解される RNA 分子種を調べる。液胞内の RNA 分解は、T2 型 RNase である Rny1 が責任酵素である。そのため、野生型と Rny1 欠損株を用いてオートファジーを誘導し、オートファジーにより分解される RNA を回収・精製し、その種類と塩基配列を定量的に同定する系を確立させる。

第二の課題は、RNA 分解によって生じた RNA 分解代謝物、特にヌクレオシドについては「液胞から細胞質へ」、塩基については「細胞質から細胞外へ」と輸送されていく過程における分子基盤を解明する (図 1 参照)。

RNA 分解の分子機構とその普遍性を解明するため、上記の結果を高等動物での解析に発展させ、普遍性を検証するとともに、オートファジーによる RNA 分解の生理的機能を解明する。

### 3. 研究の方法

第一の課題の実験方法: 野生株や Rny1 欠損株、また、それぞれの株でオートファジーも同時に機能しない株 (Atg2 欠損株、または Rny1Atg2 二重欠損株) の株を用いて、オートファジーが誘導される条件下で液胞を高度

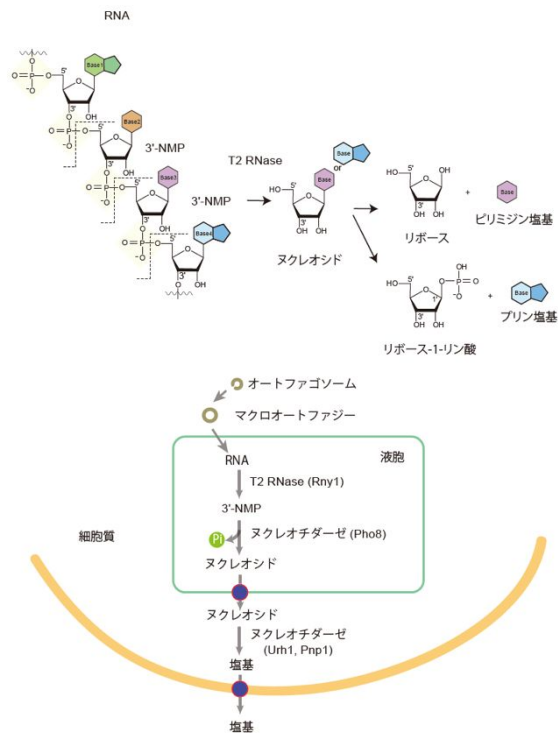


図 1 オートファジーによる液胞内 RNA 分解機構 (酵母)  
未知の輸送体を ● で示した。

に単離する。液胞単離実験の際、RNA 解析に適した液胞の単離精製法を確立する。その後、RNA を精製し、RNA シーケンス解析を行う。

第二の課題の研究方法: 研究代表者はこれまで、RNA がヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基へと変換され、塩基は細胞外に排出されることを明らかにしている (図 1)。しかし、その過程で働く RNA 分解産物の輸送体はこれまで明らかにされていない。そこで、酵母の網羅的な非必須遺伝子破壊株セットを利用し、細胞膜と液胞膜に局在する膜局在性トランスポータ候補を選び (約 300 種類)、その各々の遺伝子破壊株を用いて飢餓条件下で検出される細胞外の核酸代謝物の量と種類を調べ、輸送体を特定する。

### 4. 研究成果

研究代表者は、本計画の研究実施前から液胞単離実験を繰り返し行なっており、技術を習得していたが、本研究計画では RNA 解析に適した液胞の精製法を確立させることを試みた。RNA、特に一本鎖 RNA は一般的に大変不安定で分解されやすい性質を持っており、細胞分画実験の各過程での RNA 精製には、細胞質や液胞に存在する RNase の活性を極力抑える必要がある。実験をスタートした当初は、野生株でオートファジー誘導後の経時変化を追って液胞単離を行い、RNA を回収精製し

て解析した。この際、各ステップで注意深く RNase 阻害剤を加えて実験を行っていたが、それにもかかわらず野生株では RNA が分解されてしまい、解析するために十分な RNA 量を確保するのが大変困難であることがわかった。生化学的な解析から、*in vitro* 実験系において Rny1 は非常に強い酵素活性を持っていることを確認している。(堀江(川俣)ら、未発表)。本研究で観察された現象は、主に Rny1 の酵素活性に由来することを確認した。よって、Rny1 欠損株を実験株として用いることにより、オートファジーにより分解される RNA を精製できると仮定した。実際に、Rny1 欠損株では、液胞中でオートファゴソームに由来する RNA が安定的に存在していた。リボソーム RNA を指標にした解析では、その部分分解も全く確認されなかった。

RNA シーケンス解析では、十分な深度を持つデータが得られて初めて、信頼できる統計解析が可能となり、実験結果の解釈が可能となる。そのため、細胞培養の系のスケールアップを行い、実験系の最適化を行った。

また、液胞単離精製時に混入してくる可能性のある細胞質由来の RNA を区別するための予備実験を行った。液胞単離後に界面活性剤存在下、非存在下において RNase 処理を行い、液胞画分に含まれる RNA は界面活性剤の存在下でのみ RNase で消化されることを確認した。この実験から、オートファジーに由来する RNA のみ、液胞膜で保護されていることが確認された。オートファジー不能株では、液胞内の RNA はほぼ観察されないことも確認した。

次に、ラパマイシン処理や炭素源飢餓などのオートファジー誘導条件下において、実際に Rny1 欠損株と Rny1Atg2 欠損株から液胞を単離し RNA を回収、精製し、RNA シーケンス解析により液胞内に蓄積する RNA 種を同定した。RNA シーケンス解析から得られた結果より、オートファジーにより優先的に分解される RNA 種の存在が示唆された。

それらの RNA の選択性の分子機構を解明するため、複数の仮説を立て、モデル基質での検証実験を行う予定であり、現在その系の構築を行っている。RNA のプロファイリングデータと、選択的分解の分子基盤の解明とを合わせ、近い将来論文としてまとめることが可能であると考えている。

第一の課題と平行して、第二の課題であるオートファジー依存的に放出されるヌクレオシドと塩基の輸送体の同定を試みた。代表者のこれまでの解析から、オートファジーにより液胞へと輸送された RNA は、液胞内で RNase とヌクレオチダーゼにより、ヌクレオシドへと変換され、その後ヌクレオチドは細胞質へと輸送される。その後、ヌクレオチドは細胞質中に存在するヌクレオチダーゼに

より、塩基へと変換される。塩基の大部分は、細胞外へと放出される。また、量は少ないものの一部のヌクレオシドはヌクレオシドのまま細胞外へ放出されることも確認している。そのため、液胞膜上にヌクレオシドの輸送体、細胞膜にヌクレオシドと塩基の輸送体が存在すると考えられた。

そのため、酵母の非必須遺伝子破壊株セットのなかで輸送体の可能性がある膜結合型タンパク質約 300 種類を選び、その各々の遺伝子破壊株を用いて飢餓条件で放出される細胞外の核酸代謝物の量と種類を調べ、輸送を担う未知の輸送体の特定(図 1)を試みた。

その結果、FUN26 (Function Unknown Now 26) が候補の一つであることが明らかとなった。Fun26 欠損株では、図 2 に示すとおり、一部のヌクレオシド量が増加し、逆に塩基が減少していた。Fun26 は液胞膜に局在することを確認しており(堀江(川俣)ら、未発表)。これらの結果から、Fun26 はヌクレオシドの輸送体として機能していると考えられる。しかし、Fun26 欠損株では完全に輸送が停止しなかったことから、他にも輸送体がある可能性が考えられる。そこで、液胞膜のトランスポーター解析を専門に行う研究者との共同研究を開始し、輸送体候補である膜タンパク質のさらなるスクリーニングを(研究期間終了後にも継続して)行っていく予定である。

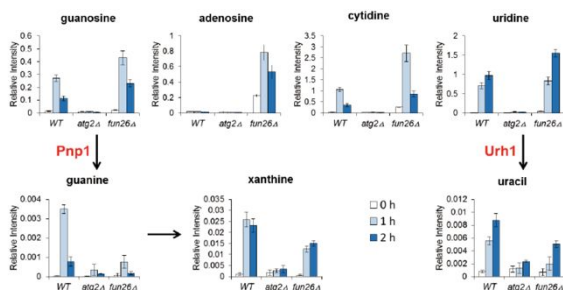


図 2 Fun26 欠損株のヌクレオシドと塩基の時間変化

本研究は、オートファジーと RNA 分解というこれまで別々の研究領域であると考えられていた分野を横断するものである。

本研究では、Rny1 の活性が高いことが理由で Rny1 欠損株での実験結果を先に解析してきたが、Rny1 の活性は高濃度の亜鉛イオン存在下では部分的に阻害されるという生化学的な結果を得ている(堀江(川俣) 未発表)。そこで、野生株でオートファジーによる分解の経時変化を見る実験では、細胞破碎や分画時に亜鉛イオンを調節して加えることができれば、野生株においても RNA 分解の経時変化を追うことができると考えている。

本研究から、オートファジーにより分解される RNA に選択性がある可能性が示唆された。現在、そのメカニズムを解析中であり、普遍

的であるかどうかも検討する予定である。

また、輸送体については、候補因子を一つ同定しているが、それ以外にも輸送体が存在するという結果が得られた。機能が重複している遺伝子もあるため、今後は多重破壊株も考慮して解析を進める予定である。輸送体が同定できれば、それを阻害した場合、細胞にどのような影響を与えるのかを酵母と高等動植物で解析することで、オートファジーによる核酸代謝研究の応用面において、指針を与えることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

堀江 朋子 (川俣 朋子)

オートファジーと代謝

第 11 回 メタボロームシンポジウム (招待講演) 2017 年 11 月

堀江 朋子 (川俣 朋子)

オートファジーの誘導と代謝変化

日本農芸化学会 2017 年度第三回関東支部例会 (招待講演) 2017 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 朋子 (HORIE, Tomoko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号 : 70435527

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

関藤 孝之 (SEKITO, Takayuki)

愛媛大学農学部生物資源学科・教授

研究者番号 : 20419857

大隅 良典 (OHSUMI, Yoshinori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任教授

研究者番号 : 30114416