

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15063

研究課題名(和文)オートファジーによるRNA分解の分子機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Selective RNA degradation by autophagy

研究代表者

牧野 支保 (Makino, Shiho)

東京工業大学・科学技術創成研究院・研究員

研究者番号：70791458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーはこれまでタンパク質の分解機構として理解されてきたため、オートファジーの分解の標的となるRNAやその生理機能は未知である。オートファジーで液胞に運ばれたRNAを網羅的に解析した結果、オートファジーによるmRNA分解には選択性があることが分かった。さらに、優先的に分解されるmRNAはオートファジー誘導時にリボソームとの相互作用を維持するもしくは増加する傾向があることを見出した。また、tRNA分解についても選択性があり、tRNAのアミノアシル化の有無により選択性は変化することが明らかになった。以上より、オートファジーは翻訳段階の遺伝子発現制御機構として機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は生物の基本的な機能維持に必須なオートファジーの生理機能を、選択的なRNA分解という観点から理解する独自の試みである。液胞/リソソーム内のRNA分解酵素は出芽酵母から高等生物まで高度に保存されている。出芽酵母で得られた知見や手法を高等生物に応用させることで、選択的なRNA分解を基盤としたオートファジーの更なる理解が期待される。

研究成果の概要(英文)：The role of autophagy in the degradation of proteins and organelles is well-characterized. However, the autophagy-mediated RNA degradation in response to stress and the potential preference of such RNA degradation have not been examined. In this study, we analyzed selective mRNA and tRNA degradation by autophagy in yeast. Profiling of mRNAs delivered to the vacuole reveals that a subset of mRNAs is preferentially delivered to the vacuole by autophagy where it is subsequently degraded. mRNA delivery to the vacuole is associated with translation: genome-wide ribosome profiling revealed a high correspondence between ribosome association and targeting to the vacuole. Moreover, tRNA is also preferentially delivered to the vacuole. We found that aminoacylation of tRNA has an important role in alteration of selectivity. We propose that autophagy-mediated mRNA and tRNA degradation is a previously-unappreciated function of autophagy that affords post-transcriptional regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：オートファジー RNA分解 液胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは栄養飢餓時に自己の細胞内成分を液胞/リソソームに輸送し分解する機構であり、真核生物で高度に保存されている。オートファジーが誘導されると、細胞質成分が二重膜構造をもつオートファゴソームに取り囲まれて液胞に運ばれた後、液胞内の分解酵素により分解され様々な形でリサイクルされる。オートファジーは非特異的な分解系として考えられてきたが、近年、特異的な基質のみが分解される選択的オートファジーの存在が明らかになってきた。オートファジー研究は出芽酵母で始まり、発生や分化、免疫系などの高次機能に關与することが高等生物で明らかにされている。遺伝学・生化学的な解析が容易な酵母は、他のモデル生物よりも倍加時間が速く圧倒的に解析が早いことから、オートファジー研究をリードしてきた。オートファジーはこれまでタンパク質の分解機構として理解されてきたが、最近の所属研究室における解析により、これまで全く知られてこなかったオートファジーによる RNA 分解機構の存在を見出した<sup>1)</sup>。オートファジーと RNA 分解という異分野を横断する研究はスタートしたばかりであり、分解の標的となる RNA の特異性やその生理機能は未知である。

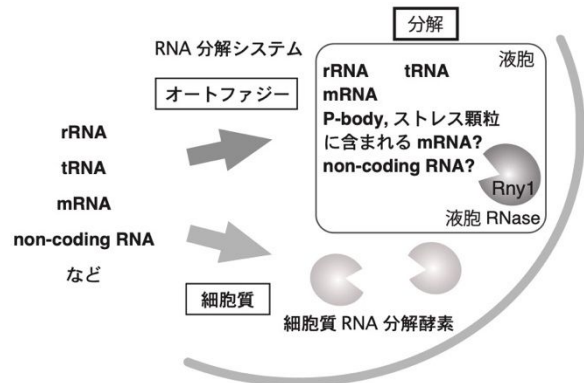


図 1. 本研究の目的  
オートファジーによって分解される RNA の特徴を同定し、分子構造と生理機能を明らかにする

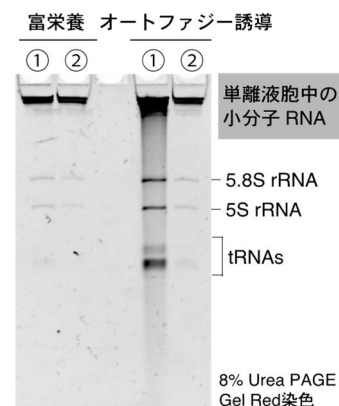
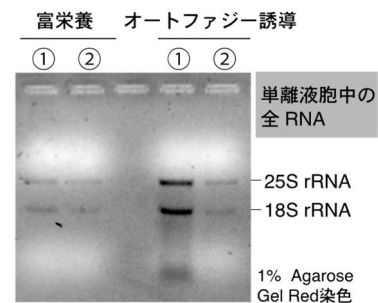
1) Huang and Kawamata *et al.*, *EMBO J.* 2015

### 2. 研究の目的

本研究では、オートファジーによって分解される RNA の種類・量を RNA-seq により網羅的に解析する。RNA-seq の情報を元に、選択的に分解される RNA を同定し、RNA が認識される分子機構を解明する。さらに、分子生物学的な解析を駆使することにより、オートファジーを介した転写後段階の遺伝子発現制御の生物学的意義を明らかにする (図 1)。

### 3. 研究の方法

本研究では、オートファジーによって分解される RNA について、酵母の液胞を用いて網羅的解析を行った。酵母の液胞は高純度に単離精製することができ、生化学的解析が可能である。申請者はオートファジーを誘導し、液胞内 RNase, Rny1 欠損株と Rny1Atg2 二重欠損株 (オートファジー不能株) から液胞を単離して RNA を抽出すると、オートファジー依存的に RNA が液胞内に蓄積することを見出している (図 2)。そこで、本研究では Rny1 欠損株の利点を利用してオートファジー誘導下で液胞に蓄積する RNA とその量を mRNA-seq と tRNA-seq により明らかにした。この方法により、オートファジーによって分解される RNA の種類を網羅的に同定した。解析結果を元に、モデルとなる個別の RNA につい



① 液胞内 RNase 欠損株  
② 液胞内 RNase 欠損 + オートファジー不能株

図 2. オートファジー依存的に RNA は液胞内に蓄積する

て特異性を生み出す RNA の領域や配列特異性を探った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

##### オートファジーによる mRNA 分解

##### 1) mRNA-seq による網羅的解析

オートファジー誘導下で液胞に RNA が蓄積する条件、及び RNA が蓄積した液胞の単離条件の最適化を行った。Rny1 欠損株と Rny1Atg2 二重欠損株を用いて、オートファジー誘導下で液胞に蓄積する RNA とその量を RNA-seq により解析した。Rny1 欠損株の液胞内の mRNA は intact であることを確認した。解析の結果、優先的に液胞に運ばれる 500 個以上の mRNA を同定することに成功し、オートファジーによって mRNA は選択的に分解されることを明らかにした(図3)。さらに、Gene ontology 解析

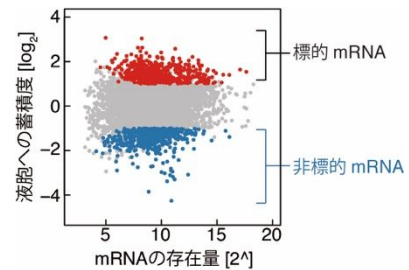


図3. mRNA は選択的に液胞に蓄積する

からアミノ酸生合成酵素やリボソームタンパク質をコードする一群の mRNA が選択的に分解されていることを見出した。一方で、転写活性化因子などをコードする mRNA を含む同程度数の mRNA が液胞に運ばれにくいことも分かった。

##### 2) 選択性に関与する mRNA 領域の同定

選択性に重要な役割を持つ mRNA 領域を明らかにするために、代表的な標的 mRNA のレポーター遺伝子を作製し液胞への蓄積を調べた。ORF や 3'UTR の配列を GFP や非標的 mRNA のものに置換すると、液胞への蓄積度合いにほとんど影響はなかった。一方で、5'UTR を置換すると液胞への蓄積の顕著な低下が観察された。また、5'UTR を置換したレポーター遺伝子のタンパク質量は低下していることが分かった。さらに、開始コドンの上流にステムループ構造を挿入もしくは開始コドンを塩基置換した、翻訳されない標的 mRNA は液胞に蓄積しなかった。以上の結果から、標的 mRNA は 5'UTR によって規定される翻訳活性に依存して液胞へ運ばれることが示唆された。

##### 3) 選択性とリボソームとの結合の関係

液胞への運ばれやすさと翻訳との関係の詳細を明らかにするために、リボソームプロファイリングにより網羅的に mRNA とリボソームとの相互作用を調べた。その結果、オートファジー誘導後に標的 mRNA はリボソームとの相互作用が維持もしくは増加し、非標的 mRNA はやや減少することが分かった。オートファジー誘導下の栄養飢餓などの条件では細胞全体の翻訳は阻害されることが知られているが、この翻訳阻害を免れる mRNA がオートファジーで分解されていることが明らかになった。

##### オートファジーによる tRNA 分解

オートファジー誘導下では細胞内のアミノ酸量が変化することが知られている。tRNA のアミノシル化の有無を区別して tRNA-seq のライブラリー作製を最適化し、解析を行った。その結果、オートファジーによる tRNA 分解にも選択性があることを発見した(図4)。翻訳開始に必須な iMet-tRNA が分解されやすいことや、tRNA のアミノアシル化の有無により選択性が変化することが分かった。現在、選択性を決める特徴を同定するために、情報学・生化学的な解析を進めている。

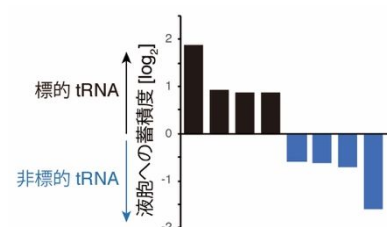


図4. tRNA は選択的に液胞に蓄積する

以上の結果より、オートファジーは選択的に mRNA や tRNA を分解することで翻訳段階における遺伝子発現制御に関わることが示唆された。

### (2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまでオートファジーによる RNA 分解の選択性については全く理解されてこなかったが、液胞内で本来分解されている RNA を捉える独自の実験系により、オートファジーは RNA を選択的に分解することを発見した。オートファジーはタンパク質の分解機構として主に解析が進められてきたが、オートファジーが転写後段階の遺伝子発現制御機構として働くという新たな機能的側面を見出した。

### (3) 今後の展望

今後は、選択性を生み出す分子機構の詳細を明らかにし、基質 RNA がオートファジーによって分解される生理的条件や意義の解明を目指す。具体的には、既存のオートファジーの選択性を与えるレセプターとして知られている因子との結合の可能性を検討する。さらに、基質 RNA やリボソームに結合するタンパク質を同定し、オートファジー因子との結合様式を調べる。オートファジーの基質となる RNA が進化的に保存されている場合、哺乳類細胞の実験系に応用・発展させ、RNA 分解の基質特異性の普遍性を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Selective mRNA degradation by autophagy in yeast
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Autophagy-mediated selective mRNA degradation in yeast
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 支保、川俣（堀江）朋子、岩崎 信太郎、大隅 良典
2. 発表標題 オートファジーによる選択的なRNA分解機構の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 支保、川俣（堀江）朋子、岩崎 信太郎、大隅 良典
2. 発表標題 オートファジーによる選択的なmRNA分解機構の解析
3. 学会等名 第12回オートファジー研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----