

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450093

研究課題名(和文) リボヌクレアーゼを介した成熟リボソーム排除機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of mature ribosome degradation by RNase T2 in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

小川 哲弘 (Ogawa, Tetsuhiro)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40323480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母において、栄養飢餓に誘導される成熟リボソーム分解の分子機構解明を目指した。出芽酵母に対し、栄養飢餓を誘導する抗生物質であるラパマイシンを作用させると、生物に高度に保存されたRNase T2型リボヌクレアーゼであるRny1pによりrRNAが分解された。また、同条件でリボソームタンパクが分解されることも確認された。そして、このリボソーム分解を通して酵母は栄養飢餓に適応する。ここで観察されたりボソーム分解のうち、一部は非選択的オートファジーにより液胞で起こるが、大部分のリボソームは液胞外で分解されたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to elucidate the molecular mechanism of mature ribosome degradation observed in *Saccharomyces cerevisiae* by the treatment of rapamycin, an antibiotic inducing cellular starvation response. 18S and 25S ribosomal RNA (rRNA) is degraded by Rny1p, which belongs to the conserved RNase T2 family. Ribosomal proteins are also degraded in the same condition. These results indicate that mature ribosomes are actually degraded by the rapamycin treatment, which results in adaptation of host cells to the starvation condition. The degradation partly occurs in the vacuole, which depends on non-selective autophagy pathway. However, most of ribosomes seem to be degraded outside the vacuole.

研究分野：細胞生物学

キーワード：出芽酵母 リボソーム リボヌクレアーゼ ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

リボソームはタンパク質合成の工場である。細胞内に膨大な量存在し、細胞内体積の30~40%を占めるとの試算もある。これら大量のリボソームは、盛んに増殖する細胞にはプラスに作用する。一方で、ストレスなどの環境下では逆に負荷となる。そこで、細胞はTOR (Target Of Rapamycin) 経路を介して新規のリボソーム合成を停止する。しかし、すでに細胞内に存在する成熟リボソームにどう対処するかは明らかにされていなかった。成熟リボソームを野放しにすれば、エネルギーや基質が続く限りは無駄に翻訳を続けるであろうし、結果的に異常タンパク質が蓄積する危険性も高まり、細胞にとって有害であると考えられる。

この問題に対して、申請者は以下に述べる理由から、ストレスにตอบสนองして成熟リボソームが分解されること、この分解に非特異的リボヌクレアーゼである RNase T2 が関与することを考えた。RNase T2 は江上不二夫博士がタカジアスターゼから分離した日本発のリボヌクレアーゼである。ほぼ全ての生物種に存在することから、生物学的に重要かつ普遍的な機能を持つと考えられる。しかし、植物における自家不和合性やカビなどにおける栄養素の取り込みなどの一部の例外を除けば、多くの生物種で機能が明らかにされていなかった。

ところが、近年シロイヌナズナにおいて、RNase T2 遺伝子の変異によりリボソーム RNA (rRNA) 分解が抑制されることが分かった。また、RNase T2 が機能しないゼブラフィッシュでは、リソソームに未分解 rRNA が蓄積する。Rny1p は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に唯一存在する RNase T2 型リボヌクレアーゼであり、トランスファー RNA (tRNA) および rRNA を切断することが報告されていた。申請者は、この Rny1p の細胞内機能解析に取り組んだ結果、Rny1p の主たる標的は tRNA ではなく rRNA であることに気付いた。これらを踏まえると、出芽酵母を

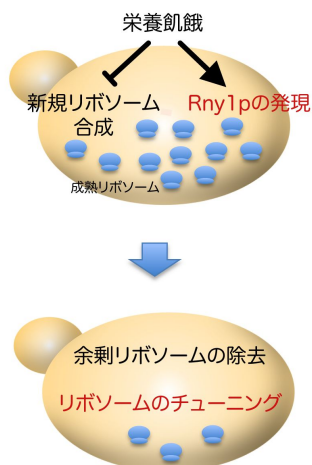


図1 リボソームのチューニング機構

め、RNase T2 は共通して rRNA を分解することが示唆された。

Rny1p はストレスにตอบสนองして一過的に発現が上昇することが報告されている。また、Rny1p 欠損株は、高温・高浸透圧下で生育出来ない。これに加えて申請者は Rny1p が低温・酸化ストレス下の生育にも必要であることを明らかにしている。Rny1p により rRNA が切断されることから、同時にリボソームそのものも分解されると思われる。以上のことから申請者は、これが環境条件に応じて細胞が自身のリボソーム量を調節する「リボソームのチューニング機構」であると考えた (図1)。

## 2. 研究の目的

以上を踏まえ、申請者は次のようなモデルを考えた。すなわち、ストレスにตอบสนองして Rny1p が rRNA を分解し、これと同調して余剰な成熟リボソームが分解・除去され、ストレスに適応するというものである (図1)。Rny1p が機能しない場合、リボソーム分解そのものが妨げられ、結果的に未分解リボソームが細胞内に蓄積して負荷となることが考えられる。これに加え、例えば mRNA 上で立ち往生したリボソームが適切に排除されず、ストレスに抗するのに必要なレベルの翻訳までもが阻害される可能性もある。

そこで、本研究はこの「リボソームのチューニング機構」を実証し、リボソーム排除の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の3つの項目に注目して実験を行った。

- (1) Rny1p の rRNA 分解と同調し、実際に成熟リボソームが分解されることを実証する。
- (2) Rny1p が rRNA を分解する細胞内の場を特定する。
- (3) rRNA およびリボソームタンパク分解に関与する Rny1p 以外の因子を同定し、これに基づいて成熟リボソームの排除機構を解明する。

(2)、(3)に関しては、以下に述べることを考慮しつつ実験を行った。シロイヌナズナでは、RNase T2 は小胞体や液胞に、またゼブラフィッシュではリソソームに局在する。出芽酵母における Rny1p の局在性は定まっていないが、他の宿主で見られるように液胞に局在するならば、Rny1p と細胞質に存在するリボソームが会う機会はない。一方、窒素源飢餓に曝された出芽酵母において、リボソームが液胞内で選択的に分解される現象 (ribophagy) が報告されていた。Rny1p を欠損すると液胞が肥大化することが報告されているが、これは未分解の rRNA が液胞に蓄積することを連

想させる。また、rRNA 上の変異に由来する機能異常リボソームが特異的に分解される系も示されており、これは nonfunctional rRNA decay (NRD) と呼ばれる。こうしたことから、Rny1p による rRNA 分解が細胞質、液胞のいずれで起こるかを検証することとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rny1p の rRNA 分解と同調し、実際に成熟リボソームが分解されることの実証

飢餓応答を誘導する抗生物質であるラパマイシンを作用させた出芽酵母において、rRNA が速やかに分解されることが報告された。申請者は、この分解に Rny1p が関与すると想定し、以下の実験を行った。まず、野生株および Rny1p の遺伝子破壊株 (*rny1Δ*株) に対しラパマイシンを作用させた後、両株の生育を経時的に追跡した。その結果、野生株では、生育速度が低下するものの増殖が継続されることに対し、破壊株では生育はほぼ停止した。このことから、Rny1p はラパマイシンによる栄養飢餓に生育を適応化させるために必要と考えられた。そこで、以降ではラパマイシンをストレスとして利用することとした。

次に、ラパマイシンに反応した rRNA 分解に Rny1p が関与するかを検討した。野生株および *rny1Δ*株にラパマイシンを作用させた後、経時的に菌体をサンプリングした。これら菌体から全 RNA を調製した後、前駆体である 35S rRNA および成熟リボソームに含まれる 18S, 25S rRNA を逆転写し、リアルタイム PCR を用いてそれぞれの rRNA を定量した。野生株、破壊株共にラパマイシンの作用に反応して 35S rRNA 量が同程度に減少していた。このことから、既知の報告の通り、ラパマイシンにより新規 rRNA 転写が抑制されるが、これに Rny1p は関与しないことが分かった。一方、18S, 25S rRNA 量は、野生株では著しく減少していた。破壊株でもこれら rRNA 量の減少は見られるものの、その程度は低かった。このことから、予想した通りラパマイシンの作用に反応して Rny1p が 18S, 25S rRNA を分解することが分かり、この様子を定量的に示すことが出来た。しかしながら、*rny1Δ*株であってもラパマイシンに反応した rRNA 分解が観察されたことから、この rRNA 分解には Rny1p 以外のリボヌクレアーゼも関与することが示唆された。

続けてリボソームタンパク分解の様子をウエスタンブロットングにより調べた。ここで、特異抗体を用いた特定のリボソームタンパクの検出に加え、C 末端にエプトタグを融合させたリボソームタンパクを発現する酵母株を作製し、タグに対する抗体を用いてリボソームタンパクの検出を行った。これらの株にラパマイシンを作用させ、rRNA の定量の際と同様、経時的に菌体をサンプリ

ングした。その後、SDS-PAGE、ウエスタンブロットングにより各リボソームタンパクを定量した。その結果、ラパマイシンに反応してリボソームタンパク量が減少した。前述の rRNA 分解を踏まえると、ラパマイシンに反応してリボソームが分解されることが示され、目的とした「リボソームのチューニング」が実証出来た。しかし、rRNA 量とリボソームタンパク量の減少の推移は完全には一致しなかった。rRNA とリボソームタンパクの分解は協調的と予想していたが、これは必ずしも正しくないことが示唆された。

##### (2) Rny1p が rRNA を分解する細胞内の場の特定

Rny1p を欠損した株では、細胞内に未分解 rRNA が蓄積すると考えられる。この rRNA の蓄積部位を特定すれば、rRNA がどこで分解されるかが推察出来ると考えた。そこで、ラパマイシンを作用させた野生株、*rny1Δ*株の細胞を核酸染色して顕微鏡観察を行った。その結果、破壊株でのみ液胞に核酸が検出された。このことから、Rny1p による rRNA 分解は液胞で起こると考えた。

##### (3) rRNA およびリボソームタンパク分解に関与する Rny1p 以外の因子の同定

上記の通り、rRNA 分解が液胞で起こることが示唆されたため、リボソームが液胞で分解される現象である ribophagy との関連性について検証した。Ribophagy では、Ubp3p, Ufd3p が分解対象であるリボソームの液胞への移行に関与する。これら因子を欠損するとリボソームは液胞に運ばれないため、更に Rny1p を欠損しても液胞に rRNA は蓄積しないと考えられた。そこで、*rny1Δ/ubp3Δ*および *rny1Δ/ufd3Δ*二重破壊株を作製し、これらにラパマイシンを作用させ、核酸染色後、顕微鏡観察を行った。しかし、いずれの株においても *rny1Δ*株と同様に液胞での核酸蓄積が見られた。また、本研究の進行中、非選択的オートファジーによってリボソームが分解されることが報告された。ここでは、Atg2p がリボソームの液胞への移行に関与する。そこで *rny1Δ/atg2Δ*株に対して、同様に核酸染色、顕微鏡観察を行ったところ、液胞内に核酸が蓄積しなくなった。このことから、非選択的オートファジーによりリボソームが液胞に移行し、Rny1p により rRNA が分解されることが示唆された。

次に、リボソームタンパクの液胞への移行を調べた。特定のリボソームタンパクに GFP を融合させ、これを発現する株に対してラパマイシンを作用させた後、蛍光顕微鏡観察を行った。野生株では、リボソームタンパクの液胞への移行が観察されたことから、本実験系が有効に機能すると考えた。そこで、*ubp3Δ, ufd3Δ, atg2Δ*株においても同様の実験を行っ

た。上記の通り、Ubp3p, Ufd3p は本研究で目的とするリボソーム分解に関与しないと考えられたが、実際に *ubp3Δ*, *ufd3Δ*株のいずれにおいてもリボソームタンパクが液胞に移行したことから、これが確かめられた。一方、*atg2Δ*株では、リボソームタンパクの液胞への移行が見られなかった。

更に、*ubp3Δ*, *ufd3Δ*, *atg2Δ*株に対してラパマイシンを作用させ、リボソームタンパク分解を調べた。*ubp3Δ*, *ufd3Δ*株では、野生株と同様にリボソームタンパク量が減少しており、ribophagy はこのリボソーム分解に関与しないことが再度確認された。しかし、*atg2Δ*株でも野生株とほぼ同程度にリボソームタンパクの分解が見られた。以上を踏まえると、液胞内で非選択的オートファジーによりリボソーム分解が起こるが、細胞全体から見れば分解の程度は低いことが分かった。

本研究全体から得られた成果は以下の通りである。ラパマイシンを作用させた出芽酵母では成熟リボソームが分解されるが、このうち rRNA は非特異的リボヌクレアーゼ Rny1p により分解される。また、この分解は、ラパマイシンに誘導される栄養飢餓条件への適応化に必要であった。ラパマイシンにตอบสนองしたリボソーム分解は非選択的オートファジー依存的に液胞で起こるが、ここで分解されるリボソームの割合は低く、大部分の分解は液胞以外の場で起こることが示唆された。現在、もう一つの選択肢である細胞質での分解について検証を行っている。

#### 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3件)

Sakai F, Sugita R, Chang JW, Ogawa T, Tsumadori N, Takahashi K, Hidaka M, Masaki H. (2015) Transfer-messenger RNA and SmpB mediate bacteriostasis in *Escherichia coli* cells against tRNA cleavage. *Microbiology*, **161**, 2019-2028. (査読有)  
DOI: 10.1099/mic.0.000144

Ogawa T, Shimizu A, Takahashi K, Hidaka M, Masaki H. (2014) Mitochondrial tRNA cleavage by tRNA-targeting ribonuclease causes mitochondrial dysfunction observed in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **451**, 131-136. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.07.084

Shigematsu M, Ogawa T, Tanaka W, Takahashi K, Kitamoto HK, Hidaka M, Masaki H. (2013) Evidence for DNA cleavage caused directly by a transfer RNA-targeting toxin. *PLoS One*, **8**, e75512. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0075512

#### 〔学会発表〕(計3件)

赤川博文、陣内凱、島日佳理、大石早希子、大本哲也、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、「ラパマイシンにตอบสนองした出芽酵母リボソーム分解機構の解析」、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月29日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

陣内凱、島日佳理、大石早希子、大本哲也、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、「出芽酵母 RNase T2 が関与するリボソーム分解機構の解析」、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学(岡山県・岡山市)

陣内凱、島日佳理、大石早希子、大本哲也、小川哲弘、日高真誠、正木春彦、「出芽酵母 RNase T2 を介したストレス応答機構の解析」、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月29日、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

#### 〔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  
<http://mcb.bt.a.u-tokyo.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小川 哲弘 (Ogawa, Tetsuhiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40323480