

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07657

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるリボソーム分解を介したストレス適応化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cellular adaptation to nutrient starvation mediated by ribosome degradation in *Saccharomyces cerevisiae*

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(農学部)・助教

研究者番号：40323480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の工場であるリボソームは、栄養が豊富な条件では盛んに合成されるが、貧栄養環境では逆に負荷となる。そこで、出芽酵母では、栄養飢餓にตอบสนองしてリボソームが分解され、これを介して貧栄養状態への適応化が図られる。リボソームは、リボソームRNA (rRNA) とリボソームタンパクから構成される複合体である。本研究、およびこれまでの研究成果から、リボソームタンパクおよびrRNAが共にオートファジーに依存して分解されることが示された。また、このrRNA分解がオートファジーを活性化し、リボソーム分解を促進することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々を取り巻く環境には様々なストレスが存在する。生体を構成する細胞は、こうしたストレスに適応する能力を備えている。この適応化の破綻は細胞にとって有害であり、時として細胞死をもたらす。こうしたことから、ストレス環境への適応メカニズムの理解は重要な課題である。本研究は、貧栄養条件に対する適応化メカニズムについて、細胞に多量に存在するリボソームの動態に注目し、これを明らかにしようとするものである。リボソームの動態と適応化との関係性については未だ多くの不明な点が存在するが、本研究により新たな視点が拓けるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Rapidly growing *Saccharomyces cerevisiae* cells synthesize a large amount of ribosome and promote cell division in nutrient-rich condition. However, when nutrient is exhausted, ribosomes are degraded to adapt to the starvation condition. Ribosome is composed of ribosomal RNAs (rRNAs) and ribosomal proteins. Previously, it was reported that rRNA degradation depends on autophagy. In this study, we demonstrated that ribosomal protein is also degraded via autophagy. Moreover, rRNA degradation upregulates autophagy, which facilitates the degradation of ribosomal protein.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リボソーム リボヌクレアーゼ ストレス応答

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は種々のタンパク質から構成されており、これは細胞を構成する成分としては水について多い。これら膨大なタンパク質は、「工場」であるリボソームで合成される。細胞には20万個のリボソームが存在すると試算され、その総体積は細胞全体の4割にも達する。また、リボソームによるタンパク合成には、膨大なエネルギーが消費される。栄養が豊富な環境では、細胞は盛んにリボソームを合成し、タンパク合成を活性化させることで細胞増殖を促進する。しかし、栄養が枯渇すると、逆にこれらリボソームは細胞にとって負荷となる。そこで、細胞が貧栄養状態に陥ると、新規リボソーム合成が停止し、更に翻訳開始が抑制される。しかし、すでにタンパク合成に従事しているリボソーム(成熟リボソーム)が、どのような運命を辿るかは不明であった。

近年、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において、栄養飢餓を誘導する抗生物質であるラパマイシン (rapamycin) を作用させると、速やかに rRNA が分解されることが報告された。すなわち、栄養飢餓に陥ると、細胞は成熟リボソームを分解すると考えられる。我々は、この rRNA 分解に、リボヌクレアーゼ Rny1p が関わることを見出した。また、この Rny1p による rRNA 分解を介して、宿主細胞が飢餓条件へと適応することを明らかにした。Rny1p は、RNase T2 スーパーファミリーに属するリボヌクレアーゼである。ほぼ全ての生物に存在し、多様かつ重要な生命現象に関わるユニークな因子である。出芽酵母に対して窒素源飢餓を誘導すると、オートファゴソームにリボソームが蓄積する。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分解されることが報告された。一方、同じ窒素源飢餓により、リボソームが選択的オートファジーにより分解されることも示されている。これはリボファジー (ribophagy) と呼ばれる。一方、正常に機能しないリボソームが分解される現象も知られている。ここでは、機能上重要な部位に変異を持つ rRNA を含むリボソームが分解対象となる。これらは、nonfunctional rRNA decay (NRD) と呼ばれ、変異部位により異なる分解機構が存在する。18S rRNA に変異がある場合は 18S NRD、25S rRNA 変異の場合は 25S NRD と呼ばれる。これらは、リボソームの機能異常を細胞が認識し、排除する「品質管理機構」と考えられる。この 25S NRD には、ユビキチン-プロテアソーム系が関与することが報告されている。以上述べた通り、同じリボソーム分解であっても、様々なメカニズムが存在する。また、窒素源飢餓におけるリボソーム分解では、同じ現象を観察しているにも関わらず、報告された内容に相違がみられる。

2. 研究の目的

リボソームは、rRNA とリボソームタンパクとが複雑に相互作用することで構成される巨大複合体である。こうしたことから、栄養飢餓に応答したリボソーム分解の全体像を理解するためには、rRNA 分解とリボソームタンパク分解の双方向から、体系的に検証することが必須と考えた。

前述の通り、我々は、Rny1p の機能に注目することで、これまでにラパマイシンに応答した rRNA 分解について研究を行ってきた。そこで、本研究では、リボソームタンパクの分解機構を明らかにすることとした。ここで得られた成果と、rRNA 分解に関する知見とを総合的に考察することで、出芽酵母における、栄養飢餓に応答した成熟リボソーム分解機構の全容を解明することを目的とした。また、このリボソーム分解において重要な鍵を握ると考えられる Rny1p の動態について明らかにする。更に、このリボソーム分解を介した栄養飢餓への適応機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 栄養飢餓に応答したリボソームタンパク分解機構の解明

実験対象株に対し、ラパマイシンを作用させて栄養飢餓を誘導する。その後、細胞を経時的にサンプリングし、ウェスタンブロッティングにより残存リボソームタンパク量を見積もる。得られた結果から、分解の進行度を算出する。これまでの知見から、リボソームタンパク分解には、ユビキチン-プロテアソーム系あるいはオートファジーのいずれかが関与すると考えられた。そこで、プロテアソーム活性が低下した株や、オートファジーの機能欠損株におけるリボソームタンパク分解の程度を野生株のものと比較する。この実験結果から、リボソームタンパク分解がいずれの経路に依存するかを検証する。

(2) Rny1p における C 末端領域の機能解明

Rny1p には、C 末端に機能不明な領域が存在し、これが Rny1p による rRNA 分解、環境適応能の付与に関わると予想した。そこで、野生型および C 末端領域欠失型 Rny1p を、*rny1Δ*破壊株で発現させる。そして、この形質転換株の rRNA 分解能、および環境適応能を調べ、野生型発現株の結果と比較する。これを通して、この C 末端領域の、Rny1p の機能への関与を検討する。

(3) リボソーム分解を介した適応化機構の解明

植物において、RNase T2 を欠損するとオートファジー活性が変化することが報告されている。これが出芽酵母でもみられるのであれば、rRNA 分解すなわちリボソーム分解を介した環境適応化に、オートファジーに関わる可能性がある。そこで、*rny1Δ*株におけるオートファジー活性を定量し、野生株と比較することで、出芽酵母でも Rny1p (RNase T2) がオートファジー活性に関わるかを検証する。

4. 研究成果

(1) 栄養飢餓に応答したリボソームタンパク分解機構の解明

野生株に対し、ラパマイシンを作用させることで栄養飢餓を誘導した。そして、残存リボソームタンパク量を、ウエスタンブロッティングで経時的に測定した。これを飢餓誘導直前のものと比較し、減少量を見積もることで、分解の進行度を測定した。ここでは、Rps14p および Rpl3p を特異的に認識する抗体を使用した。また、C 末端に FLAG タグを付加した Rpl28p を発現する株を作製し、FLAG 抗体を用いることで Rpl28p 分解の観察も行った。ラパマイシンを作用させると、これらリボソームタンパク mRNA の合成が速やかに停止したことから、これまで知られていた通り、この条件で新規リボソームタンパク合成が停止することが示された。そのため、残存リボソームタンパク量の推移を算出することで、分解程度の評価が可能と判断した。そこで、野生株に対して同様に飢餓誘導を行った後、これらリボソームタンパク分解を調べた。その結果、Rpl3p に関して、経時的に分解が進行する様子が観察された。

次に、リボソームタンパク分解が、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーのいずれに依存するかを調べた。Rpn4p は、プロテアソーム構成因子の遺伝子発現を制御する転写因子であり、これを欠損した株ではプロテアソーム活性が低下する。そこで、野生株および *rpn4Δ*株に対し、ラパマイシンを作用させた後の Rpl3p 分解を観察した。その結果、*rpn4Δ*株で Rpl3p の分解が抑制された。もしリボソームタンパクがプロテアソームにより分解されるのであれば、*rpn4Δ*株では、ユビキチン化されたリボソームが蓄積すると考えられる。しかし、野生株および *rpn4Δ*株から粗調製したリボソームのユビキチン化の程度に明確な差は見られなかったことから、ユビキチン-プロテアソーム系が関与する可能性は低いと考えた。

次に、オートファジー欠損株 *atg2Δ*, *atg7Δ*株で Rpl3p が分解されるかを調べた。その結果、これら欠損株では、ラパマイシンに応答した Rpl3p の分解が抑制されたが、結果にみられる誤差が大きかった。ラパマイシンに応答したリボソームタンパクの分解程度は、最大で二割程度であった。ウエスタンブロッティングは、転写効率や抗体反応の不均一性などが原因となり定量誤差を生じやすい。そのため、この程度の差を、残存リボソームタンパクのシグナル強度だけで比較検討するのは困難と考えた。そこで、これに替わる方法として、Rpl25p と GFP との融合体 (Rpl25p-GFP) を発現する株を用いることとした。オートファジーにより標的因子は液胞へ運ばれて分解されるが、GFP は液胞で安定なため、未分解物として残存する。これを利用し、特定のリボソームタンパクに GFP を融合させ、GFP 抗体を用いて検出することで、未分解物と分解物との量比が GFP のシグナル強度比として計算出来る。そこで、Rpl25p-GFP 発現株を用い、リボソームタンパク分解を測定することとした。まず、Rpl25p-GFP 発現株において、*ATG2*, *ATG7*を破壊した。そして、これら破壊株に対しラパマイシンを作用させた後、蛍光顕微鏡観察を行うことで、Rpl25p-GFP の液胞への移行を観察した。その結果、野生株では、Rpl25p-GFP が液胞に移行する様子が観察されたが、*ATG2*, *ATG7*破壊株では観察されなかった。

次に、Rpl25p-GFP 発現株、およびこれの *ATG2*, *ATG7*破壊株に栄養飢餓を誘導した後、GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、Rpl25p の分解を調べた。ラパマイシンは TOR だけを標的とすることから、栄養飢餓応答の一部しか観察出来ない可能性がある。そこで、ここではラパマイシンに替えて実際に窒素源飢餓を誘導した。その結果、ラパマイシンを用いた時と同様、野生株で Rpl25p が経時的に分解される様子が観察された。また、この分解は *atg2Δ*, *atg7Δ*

株では観察されなかった。以上のことから、栄養飢餓に応答し、リボソームタンパクは rRNA と共にオートファジー依存的に液胞に運ばれて分解されると結論した。

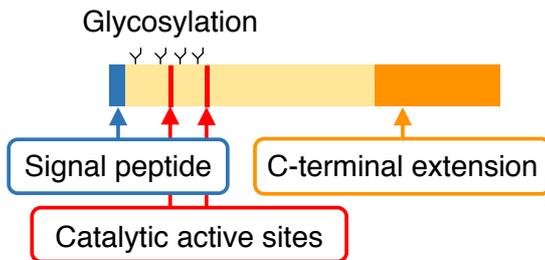
(2) Rny1p における C 末端領域の機能解明

Rny1p は、栄養飢餓に応答してリボソームに含まれる rRNA を分解する。また、Rny1p を欠損すると、液胞に rRNA が蓄積する。このことから、Rny1p は液胞局在酵素であると考えられた。Rny1p の N 末端にはシグナルペプチドが存在し、これにより小胞体からゴルジ体へと移行する。この過程で糖鎖修飾を受けた後、細胞外へと運ばれて細胞壁に繫留されると報告された。一方、液胞への局在も示唆されているが、今のところ活性型 Rny1p は液胞では観察されていない。また、異常な糖鎖修飾を受けた Rny1p が、分解されるために液胞に輸送されるとの主張もある。RNase T2 の局在性は、出芽酵母のみならず他生物においてもほとんど明らかにされておらず、これが機能解明を阻む要因の一つと考えられる。

Rny1p は、RNase T2 に共通した配列に加えて、C 末端に機能未知領域 (C-terminal extension) が存在する。この C 末端領域は Rny1p に特徴的であることから、単細胞に固有の機能を持つ可能性がある。

この C 末端領域の機能を調べるために、以下の実験を行った。*rny1Δ* 株に対し、*MET3* プロモーター制御下で全長 Rny1p、C 末端領域欠失型 Rny1p、活性中心変異型 Rny1p を発現するプラスミドをそれぞれ導入した。コントロールとして、空ベクター導入株を用いた。そして、これらの株のストレスへの適応性を調べた。しかし、ラパマイシンを用いて栄養飢餓を誘導した場合、全長 Rny1p 発現株であっても生育適応性が観察されなかった。理由は不明であるが、ここで作製したプラスミドを用いた発現では、Rny1p 欠損を完全には相補出来ないため、形質転換体がストレスに高感受性を示したと考えた。そこで、ストレスの条件を種々検討したところ、熱ストレスの作用が妥当と考えられた。Rny1p は、栄養飢餓に加えて熱ストレスへの適応にも関わることがすでに報告されている。また、我々は、*rny1Δ* 株に熱ストレスを作用させると、ラパマイシンを作用させた時と同様、液胞で rRNA が蓄積することを明らかにした。こうしたことから、熱ストレスの作用は、これまでの結果を反映すると考えた。そこで、全長 Rny1p、C 末端欠損型 Rny1p、活性中心変異型 Rny1p 発現株の、熱ストレスへの生育適応性を調べた。その結果、全長 Rny1p 発現株のみが生育適応性を示した。

次に、C 末端領域と rRNA 分解との関連性を検証するために、上記の株に熱ストレスを作用させ、核酸染色した後、蛍光顕微鏡観察を行った。コントロールである空ベクター導入株および活性中心変異型 Rny1p 発現株では、液胞での rRNA 蓄積が観察された。一方、予想外なことに、C 末端領域欠失型 Rny1p 発現株では、液胞での rRNA 蓄積は観察されなかった。分解されるべきリボソームが液胞に運ばれなかった可能性がある。以上のことから、Rny1p はリボソームの液胞への移行に関与し、これに C 末端領域が必要であることが示唆された。



(3) リボソーム分解を介した適応化機構の解明

植物では、RNase T2 の欠損によりオートファジーが恒常的に活性化することが報告されている。このことから、出芽酵母においても、Rny1p がオートファジー活性に影響する可能性を考えた。そこで、*rny1Δ* 株におけるオートファジー活性を測定することとした。まず、野生株および *rny1Δ* 株に対して窒素源飢餓を誘導した。経時的に細胞をサンプリングした後、ALP アッセイによりオートファジー活性を測定した。ALP アッセイでは、液胞局在型ホスファターゼ (Pho8p) を細胞質局在型 (Pho8Δ60p) に改変したものを発現する株を用いる。この Pho8Δ60p が、オートファジーにより液胞へと運ばれて活性化した際に、この活性を定量することでオートファジー活性として評価するものである。Pho8Δ60p 発現株およびこの *RNY1* 破壊株に対して窒素源飢餓を誘導した後、ALP アッセイを行った。その結果、*RNY1* 破壊株で、オートファジー活性が有意に低下することが分かった。

すでに述べた通り、本課題研究で、我々はリボソームタンパク分解がオートファジーに依存することを明らかにした。これを踏まえると、このリボソームタンパク分解が、*rny1Δ* 株で抑制されることが考えられた。そこで、これを検証するために以下の実験を行った。Rpl25p-GFP 発現

株、およびこれの *RNY1* 破壊株に対し窒素源飢餓を誘導した。そして GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、Rpl25p の分解を観察した。その結果、*rny1Δ*株において、予想通り Rpl25p の分解が抑制されていた。以上の結果から、rRNA 分解がリボソームタンパク分解を促進することが示唆された。また、この rRNA 分解によるオートファジーの活性化が、ストレス環境への適応化の一部を担う可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nosho K, Yasuhara K, Ikehata Y, Mii T, Ishige T, Yajima S, Hidaka M, Ogawa T, Masaki H. Isolation of colonization-defective *Escherichia coli* mutants reveals critical requirement for fatty acids in bacterial colony formation. *Microbiology* (2018) **164**:1122-1132. doi: 10.1099/mic.0.000673. (査読有)
- ② Nosho K, Fukushima H, Asai T, Nishio M, Takamaru R, Kobayashi-Kirschvink KJ, Ogawa T, Hidaka M, Masaki H. cAMP-CRP acts as a key regulator for the viable but non-culturable state in *Escherichia coli*. *Microbiology* (2018) **164**:410-419. doi: 10.1099/mic.0.000618. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 角田茂、普遍的分泌型非特異的リボヌクレアーゼ遺伝子欠損マウスが呈する免疫異常の解析、第 65 回日本実験動物学会総会、2018 年
- ② 小川 哲弘、普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 の哺乳動物における機能解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年
- ③ 山田 陸翠、ラパマイシンに応答したリボソーム分解機構の解析、酵母遺伝学フォーラム、2017 年
- ④ 角田茂、新規免疫異常疾患モデルとしての分泌型非特異的リボヌクレアーゼ欠損マウス、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年
- ⑤ 角田茂、分泌型非特異的リボヌクレアーゼ遺伝子欠損マウスは免疫異常を呈する、第 64 回日本実験動物学会総会、2017 年

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし