

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14691

研究課題名(和文) RNA分解を軸としたオートファジーによる飢餓生存戦略の研究

研究課題名(英文) Studies on RNA degradation by autophagy for cell survival during starvation

研究代表者

鈴木 邦律 (Suzuki, Kuninori)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：20373194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞が栄養飢餓にさらされると、細胞内分解システムであるオートファジーが誘導され、周囲の環境に適応しようとする。最近になってオートファジーが細胞内でRNAを分解する過程が知られるようになってきた。本研究ではオートファジーによる分解対象となるRNAの一覧を作成することを目的とした。その過程でオートファジーによる分解の最終段階を担うと考えられている酵素Atg15の精製に取り組み、大腸菌内でAtg15を過剰発現する系を確立した。

研究成果の概要(英文)：When eukaryotic cells face with nutrient starvation, they degrade their cytoplasmic materials to adapt the severe environment. Recently, it has been reported that autophagy contributes to degrade RNA in response to starvation. In this study, we aimed to make a list of RNA species selectively degraded by autophagy. We have established an overexpression system of Atg15, which is responsible for the final step of autophagic degradation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー オートファゴソーム RNA分解 栄養飢餓 出芽酵母 オートファジックボディ RNA sequence

1. 研究開始当初の背景

真核細胞が栄養飢餓にさらされると、細胞内分解システムであるオートファジーが誘導され、自身の細胞質成分を分解することにより、生存に必須な生体高分子を合成することで厳しい環境に適応しようとする。オートファジーが誘導されると、細胞質に出現した小さな袋状の膜が伸展して隔離膜となり、最終的に端が閉じて、被分解物を内包した球状の二重膜胞であるオートファゴソーム(以下 AP)が完成する。AP は分解コンパートメントである液胞/リソソームと融合することで内容物ごと分解される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、AP 形成に必須な ATG (autophagy-related) 遺伝子を欠いた細胞は栄養飢餓条件における生存が顕著に低下する (Tsukada and Ohsumi (1992))。その後の研究により、オートファジーによるタンパク質分解は細胞内の遊離アミノ酸の増加に貢献していることが明らかとなってきた (Kuma *et al.* (2004); Onodera and Ohsumi (2005))。これらの遊離アミノ酸は細胞質に大量に存在するタンパク質を非選択的に分解することで供給されていると考えられていた。しかしながら、細胞質に局在するリボソームが AP 中に優先して取り込まれるリボファジーと呼ばれる現象が示されたこともあり (Kraft *et al.* (2008))、細胞質内であっても AP に取り込まれやすいものが存在することが明らかとなった。リボソームはタンパク質と rRNA との複合体であることから、オートファジーはタンパク質分解に加えて RNA 分解機構としての側面を有する。こうした中、最近になってオートファジーが細胞内の RNA 循環に寄与していることが示された (Huang *et al.* (2015))。

2. 研究の目的

申請者は AP を単離して質量分析に供することで AP に含まれる積荷タンパク質を網羅的に同定することに成功した (Suzuki *et al.* (2014) PLoS One)。本解析により、リボソームを含め、代謝に関わるいくつかのタンパク質が優先的に AP に取り込まれることが示された。しかしながら、AP 内に含まれる RNA 種についての研究はこれまでに全くなされていない。そこで、申請者はこの AP 単離の技術を利用して、得られた AP 画分から RNA を抽出し RNA sequencing に供することで、細胞内の RNA 循環における各 RNA 種 (rRNA, tRNA, mRNA 等) の寄与をそれらの量的比率から解析する。また mRNA sequencing の結果からは、栄養飢餓時に分解される mRNA のリストが得られるので、RNA 分解の寄与を質的に評価することが可能である。それらの mRNA にコードされているタンパク質の量的制御について、分解される mRNA 種との関係に注目して解析を進める。本研究では、単離 AP 画分に含まれる RNA の sequencing を行い、そのプロファイルを決定し、そのデータ

を基に、遺伝子破壊株やタンパク質の過剰発現株を作製して栄養飢餓時の生存率を調べ、栄養飢餓における RNA 循環の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

申請者らにより開発された出芽酵母 AP の単離法を利用して AP を分離し、RNA sequencing を行う。この AP 単離法で分画された AP 画分にはミトコンドリアが混入する。より精度の高い解析を行うために、必要に応じて解析に供するサンプルの調製方法の改善を行う。改善に当たっては Autophagic body (AB) の使用を検討する。AB は AP の外膜が液胞膜と融合し、液胞内に放出されることによって生じるオルガネラなので、積荷は AP と同一である。AB を含む液胞を単離したとされる報告は既になされているので、その手法を改良して AB を精製し、RNA sequencing を行い、AP および AB に内包されている RNA 種の解析を行う。続いて遺伝子破壊やタンパク質の過剰発現の技術を使用して、RNA 循環におけるオートファジーの生理学的な意義を抽出する。

4. 研究成果

RNA sequencing に使用するサンプルは、申請者らにより開発された単離法 (Suzuki *et al.*, 2014) を用いて単離された出芽酵母の AP を利用して行うことを予定していた。しかし、この AP 単離法で分画された AP 画分にはミトコンドリアが混入するので、本研究ではまず autophagic body の使用を検討した。AB は AP の外膜が液胞膜と融合し、液胞内に放出されることによって生じるオルガネラなので、積荷は AP と同一である。野生型の酵母では、AB はほどなく分解されるが、AB 分解に関わる Atg15 を欠いた変異酵母では AB は分解されずに液胞内に蓄積する。AB を蓄積した液胞を単離する手法は既に報告がある (Takeshige *et al.* 1992)。我々の研究グループはまず、Atg15 を欠いた酵母を用いて AB を蓄積した液胞を単離可能であることを示した (未発表データ)。AB の内容物を取り出して解析するために、AB 膜を溶解すると考えられている酵素 Atg15 の精製に取り組み、大腸菌内で Atg15 を過剰発現する系を確立した (未発表データ)。この成果を基に、現在論文の執筆を進めている。

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4件)

Tatsuya Kawaoka, Shinsuke Ohnuki, Yoshikazu Ohya and Kuninori Suzuki. (2017) Morphometric analysis of autophagy-related structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 13, 2104-2110. DOI:

10.1080/15548627.2017.1384888. (査読有)

Eri Hirata, Yoshikazu Ohya and Kuninori Suzuki. (2017) Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*, 12, e0181047. DOI: 10.1371/journal.pone.0181047. (査読有)

Farzan Ghanegolmohammadi, Mitsunori Yoshida, Shinsuke Ohnuki, Yuko Sukegawa, Hiroki Okada, Keisuke Obara, Akio Kihara, Kuninori Suzuki, Tetsuya Kojima, Nozomu Yachie, Dai Hirata, Yoshikazu Ohya (2017) Systematic analysis of Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Mol. Biol. Cell*, 28, 3415-3427. DOI: 10.1091/mbc.E17-04-0216. (査読有)

Akinori Yamasaki, Yasunori Watanabe, Wakana Adachi, Kuninori Suzuki, Kazuaki Matoba, Hiromi Kirisako, Hiroyuki Kumeta, Hitoshi Nakatogawa, Yoshinori Ohsumi, Fuyuhiko Inagaki and Nobuo N. Noda. (2016) Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* 16, 19-27. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.066. (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

河岡辰弥、大貫慎輔、大矢禎一、鈴木邦律 (2017) 高速形態解析システムを用いた出芽酵母オートファジー変異体の解析. 第50回酵母遺伝学フォーラム(東京大学・東京都文京区)

平田恵理、鈴木邦律 (2017) Atg4 を介した隔離膜伸展機構の解析. 第50回酵母遺伝学フォーラム(東京大学・東京都文京区)

李楚寧、河岡辰弥、鈴木邦律 (2017) 出芽酵母におけるオートファゴソーム形成過程の包括的解析. 第50回酵母遺伝学フォーラム(東京大学・東京都文京区)

白井亨、児玉史人、鈴木邦律 (2017) 液胞内での膜オルガネラ分解に関わる Atg15 の解析. 第50回酵母遺伝学フォーラム(東京大学・東京都文京区)

緑川知輝、鈴木邦律 (2017) 出芽酵母を用いた蛍光試薬の染色対象オルガネラ同定法の開発. 第50回酵母遺伝学フォーラム(東京大学・東京都文京区)

Kuninori Suzuki (2017) Mechanisms of isolation membrane expansion in *Saccharomyces cerevisiae*. The 8th International Symposium on

Autophagy (奈良県奈良市)

平田恵理、鈴木邦律 (2016) Atg4 の局在解析を基盤とした隔離膜伸展メカニズムの解明. 第39回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜・神奈川県横浜市)

河岡辰弥、鈴木邦律 (2016) 出芽酵母オートファジーにおける隔離膜の高速形態解析. 第39回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜・神奈川県横浜市)

Kuninori Suzuki (2016) Mechanisms of autophagic isolation membrane expansion in *Saccharomyces cerevisiae*. The 14th International Congress on Yeasts (淡路夢舞台国際会議場・兵庫県淡路市) Symposium "Organelle, membrane traffic and autophagy", Session Organizer

Eri Hirata, Kuninori Suzuki (2016) Mechanisms of autophagosome formation based on the analysis of Atg4, a cysteine protease. The 14th International Congress on Yeasts (淡路夢舞台国際会議場・兵庫県淡路市)

Tatsuya Kawaoka, Kuninori Suzuki. (2016) Rapid and reliable phenotypic analysis of autophagic isolation membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. The 14th International Congress on Yeasts (淡路夢舞台国際会議場・兵庫県淡路市)

平田恵理、鈴木邦律 (2016) Atg4 の局在解析を基盤としたオートファゴソーム形成機構の解明. 第49回酵母遺伝学フォーラム(シーサイドホテル舞子ピラ神戸・兵庫県神戸市)

河岡辰弥、鈴木邦律 (2016) 出芽酵母オートファジーにおける隔離膜長の高速解析システムの開発. 第49回酵母遺伝学フォーラム(シーサイドホテル舞子ピラ神戸・兵庫県神戸市)

鈴木邦律 (2016) 出芽酵母におけるオートファゴソーム形成分子機構の可視化解析. 第68回日本細胞生物学会大会(招待講演)(京都テルサ・京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

Kuninori Suzuki. (2016) Autophagic structures in yeast. In AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Volume 9: Human Diseases and Autophagosome, Hayat. M.A., ed. (Elsevier), pp 75-90.

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院新領域創成科学研究科・先端
生命科学専攻・生命応答システム分野ホーム
ページ

<http://ps.k.u-tokyo.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 邦律 (SUZUKI KUNINORI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准
教授

研究者番号：20373194