

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15712

研究課題名（和文）オートファジーによる新たな翻訳制御機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of autophagy-mediated translation regulation

研究代表者

牧野 支保（Makino, Shiho）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：70791458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、オートファジーによって選択的に分解されるRNA（mRNA、tRNA）の認識機構や、その生物学的意義を明らかにすることを目的として取り組んだ。出芽酵母を用いた解析から、一部のRNAの選択的な分解に関わる因子を同定することに成功した。さらに、これまでの出芽酵母の実験系をショウジョウバエ初期胚に発展させた。オートファジーを介したRNA分解の責任酵素Rny1の相同因子で機能未知のRNaseX25のRNA分解活性が初期胚発生に必要であることを見出した。また、RNaseX25は酸性オルガネラであるリソソーム内で活性を発揮するRNA分解酵素であ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

出芽酵母を用いた実験系をショウジョウバエ初期胚に発展させ、オートファジーによるRNA分解の特徴や生理機能を解析する準備が整った。今後ショウジョウバエ初期胚を用いた解析が進展することにより、動物の初期胚発生過程におけるオートファジーを介したRNA分解の機能的役割が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to elucidate the recognition mechanisms and biological significance of RNAs that are preferentially degraded by autophagy. Through analysis using *Saccharomyces cerevisiae*, we successfully identified the factor involved in the selective degradation of certain RNAs. To further understand the role of selective RNA degradation in embryogenesis, we extended the experimental system from *Saccharomyces cerevisiae* to *Drosophila* embryos. We revealed that the RNA degradation activity of RNaseX25, a homolog of yeast vacuolar ribonuclease Rny1, is required for early embryonic development. Additionally, *In vitro* RNase assay suggested that RNaseX25 catalyzes RNA degradation specifically in lysosome, an acidic organelle, in *Drosophila*.

研究分野：分子生物学

キーワード：オートファジー RNA分解

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞質成分を液胞/リソソームに輸送し分解する、生物の基本的な機能維持に必須な機構である。これまでオルガネラやタンパク質の分解機構として主に解析されてきたため、核酸の分解に関して大きく理解が遅れている。近年、出芽酵母や線虫など様々な生物種において、オートファジーを介した RNA 分解機構の存在が明らかになってきた。しかし、オートファジーが種々の RNA を選択的に分解し得るかどうかは全く分かっていなかった。これまでに研究代表者は出芽酵母における網羅的解析から、オートファジーによって分解されやすい一群の mRNA と tRNA を同定し、オートファジーによって選択的に RNA が分解されることを見出している。しかし、オートファジーが選択的に RNA を認識するメカニズムやその分解の生理機能は不明である。

2. 研究の目的

オートファジーが誘導される栄養飢餓条件下では、リボソームの生合成と翻訳開始複合体形成の抑制により細胞全体の翻訳活性は阻害されることが知られている。最近の研究代表者による解析から、栄養飢餓状態で翻訳が維持される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 mRNA、翻訳開始に関わるものなど数種類の tRNA がオートファジーによって選択的に分解されていることが明らかとなってきた。

そこで本研究では、オートファジーによって mRNA 及び tRNA が選択的に分解される認識機構を分子生物学・生化学的に明らかにすることで、オートファジーによる選択的な RNA 分解の翻訳段階における役割を包括的に理解することを目的とする(図1)。また、選択的に分解される生理的な条件を見出し、その機能的意義を明らかにする。さらに、出芽酵母の実験系を遺伝子発現がダイナミックに制御されることが知られているショウジョウバエ初期胚に応用・発展させ、オートファジーによる RNA 分解の生理的意義を調べる。

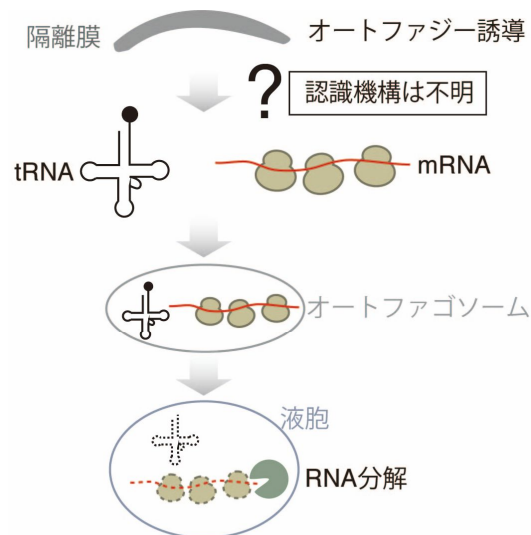


図1. 本研究の目的

オートファジーによって選択的に分解される RNA の認識機構と生理機能を明らかにする

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法により研究を進める。

(1) 選択的な mRNA 分解の標的認識機構の解明

リボソームと相互作用し得る因子やオートファジーによるリボソームの分解への関与が示唆されている因子に着目し、mRNA 分解への関わりを解析する。出芽酵母の液胞は高純度に単離できるため、液胞 RNase である Rny1 欠損変異株の液胞を単離し、液胞内に運ばれ分解されずに蓄積した RNA を捉える実験系を駆使して解析を行う。また、前述の解析により同定される因子の栄養源飢餓の種類依存性を種々の生理条件で調べる。

(2) 選択的な tRNA 分解の標的認識機構の解明

tRNA は多くの修飾を受けることが知られているため、標的 tRNA の修飾との関係をデータベースの情報を元に調べる。さらに、標的 tRNA の構造的な特徴や結合タンパク質との相互作用と、オートファジーによる液胞への運ばれやすさとの関係を検証する。また、tRNA の局在解析を行うため蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法の実験系の構築に取り組む。

(3) 出芽酵母の実験系のショウジョウバエ初期胚への応用・発展

ショウジョウバエにおいて、オートファジーを介した RNA 分解の責任酵素 Rny1 の相同因子で機能未知の RNaseX25 の欠損変異体をゲノム編集技術により作出し、初期胚発生に及ぼす影響を調べる。さらに、実際に RNaseX25 がリソソーム内で機能する RNA 分解酵素であるかを生化学的に検証する。

4. 研究成果

(1) 選択的な mRNA 分解の標的認識機構の解明

リボソームと相互作用し得る因子やオートファジーによるリボソームの分解への関与が示唆されている因子と Rny1 の二重欠損変異株を作製し、オートファジー誘導下で液胞内に運ばれた mRNA の蓄積を調べた。その結果、リボソームと相互作用する一部の因子の欠損変異株では部分的に標的 mRNA の蓄積の程度が低下していた。また、同定した因子と Rny1 の二重欠損変異株から単離した液胞内に蓄積した RNA を用いて RNA-seq を行なったところ同様の結論が得られ、同定した因子は標的 mRNA の優先的な分解に関わることが示唆された。種々の飢餓条件下で同様の解析を行なった結果、枯渇する栄養源によって同定した因子の標的 mRNA 分解への依存度は異なることが分かった。

で同定した因子とオートファゴソームのマーカータンパク質 Atg8 が相互作用する可能性を免疫沈降法により検証した。その結果、同定した因子は Atg8 と結合することが分かった。次に、同定した因子の Atg8 結合モチーフの候補となる配列を探索した。そのモチーフ配列の変異体を発現させると、優先的に分解される mRNA の液胞内蓄積量は低下していた。従って、一部のリボソーム-mRNA のオートファジーによる優先的な分解は、で同定した因子と Atg8 との相互作用に依存することが示唆された。

(2) 選択的な tRNA 分解の標的認識機構の解明

出芽酵母の tRNA データベースの情報を元に解析したところ、優先的に分解される上位の tRNA は特徴的な二次構造や修飾塩基を持つことが分かった。標的 tRNA に特徴的な二次構造と相互作用し得るタンパク質に着目し、その結合がオートファジーによる分解の程度に影響するかを検証した。相互作用し得るタンパク質の欠損変異体から単離した液胞内の RNA 蓄積量を調べたところ、部分的に低下が見られた。標的 tRNA に特徴的な二次構造と結合するタンパク質と複合体を形成することが、液胞内への輸送に重要であることが示唆された。

液胞内に運ばれた標的 tRNA の局在解析を行うため、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法の実験系の構築を試みた。細胞の固定条件などを最適化したところ、オートファジー依存的に液胞に運ばれる標的 tRNA の可視化に成功した。

(3) 出芽酵母の実験系のショウジョウバエ初期胚への応用・発展

ショウジョウバエのリソソーム内 RNase と考えられる RNaseX25 のホモ欠損変異体を作成することに成功した。この変異体では胚発生段階で発育不全が見られ、RNaseX25 は発生の初期段階に必要であることが明らかとなった。この表現型が RNaseX25 の RNA 分解活性に因るものかを明らかにするため、野生型もしくは酵素活性部位の変異体をホモ欠損変異体に相補させた個体を作成した。相補させた野生型では胚発生の発育が回復したが、酵素活性部位変異体では依然として発育不全が観察された。従って、RNaseX25 の RNA 分解活性が正常な初期胚発生に必要であることが分かった。

RNaseX25 が酸性オルガネラであるリソソーム内で機能する RNA 分解酵素であるかを、試験管内で RNA 分解活性を測定する手法を構築し解析した。その結果、緩衝液の pH が特定の酸性条件のときのみ、RNaseX25 は RNA 分解活性を発揮することを見出した。さらに、で用いた酵素活性部位変異体では全く RNA の分解は観察されなかった。よって、の結果は実際に RNA 分解活性が阻害された結果であることが生化学的に確かめられた。

以上の解析により、出芽酵母ではオートファジーを介した選択的な RNA 分解の認識機構の一端が明らかとなった。また、ショウジョウバエ初期胚ではリソソーム内の RNA 分解活性が初期胚発生に重要であることが見出された。今後、動物胚発生過程における選択的な RNA 分解の生理機能が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Selectivity of autophagy-mediated mRNA degradation in various nutrient starvation
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Selectivity of autophagy-mediated mRNA degradation in various nutrient starvation
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野支保
2. 発表標題 オートファジーを介したRNA分解機構
3. 学会等名 FIBER日本核酸化学会若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野 支保、川俣 朋子、岩崎 信太郎、大隅 良典
2. 発表標題 オートファジーを介したリボソーム-mRNA分解機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野支保
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72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiho Makino
2. 発表標題 Autophagy selectively degrades ribosome-associated mRNAs
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関