

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15108

研究課題名（和文）ミトコンドリアに輸送される新奇核コードRNAの網羅的探索

研究課題名（英文）Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria in budding yeast

研究代表者

篠田 沙緒里（Saori, Shinoda）

京都産業大学・生命科学部・研究員

研究者番号：60873205

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）：50年以上前に核ゲノムにコードされたRNAがミトコンドリアへ輸送されるという現象が発見された。しかし、実験操作や解析の難しさから新規知見はほとんどなく、未だその全容は解明されていない。本研究は出芽酵母を用いてミトコンドリアへ輸送されるRNAの同定を目指した。ミトコンドリア内のRNAを特異的にラベル化手法の開発とその後のRNA-seqにより、輸送されるRNAの網羅的な解析を行った。同定した候補遺伝子は、FISHを用いたRNA細胞内局在観察とin vitroでのミトコンドリアへのRNA輸送再構成実験から、真にミトコンドリアへ輸送されるRNAであることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は2019年に報告されたRNAの直接ラベル化という新技術を取り入れ、真核モデル生物である出芽酵母におけるミトコンドリアへ輸送される新規RNAの同定に成功した。本研究で構築した一連の解析手法はヒトなど別の生物にも適用可能であり、今後の生物種を超えたミトコンドリアへ輸送されるRNAの解析の基盤となるため、学術的に意義のある成果である。また、ミトコンドリアRNA輸送の全容が解明できれば、将来的にmtDNAゲノム編集によるミトコンドリア病治療へ展開することが期待されるため、重要な基礎研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：More than 50 years ago, the transport machinery of nuclear-encoded RNAs into mitochondria was discovered. However, due to the challenges associated with experimental methods and analysis, a comprehensive analysis has not been conducted to date, and the complete scope of the phenomenon remains elusive. In this study, we aimed to identify the RNAs transported into mitochondria using budding yeast. A method for specifically labeling RNAs inside mitochondria was developed, followed by RNA-seq analysis to comprehensively examine the transported RNAs. The identified candidate gene was confirmed to be genuine RNAs imported into mitochondria through analysis of subcellular localization FISH and in vitro reconstitution of RNA transport to mitochondria.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 近位依存性標識法 RNA-seq FISH 酵母 in vitro再構成 機能性RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは独自の DNA (mtDNA) を持ち、サイトゾルとは独立した転写・翻訳システムを持つユニークなオルガネラである。一方で、ミトコンドリアは de novo には作られず、サイトゾルや小胞体などミトコンドリアの外からタンパク質や脂質を取り込むことでミトコンドリアを拡大し、機能を維持している。加えて、タンパク質や脂質以外に、RNA がミトコンドリア内へ輸送され機能する可能性が示唆されている (図1)。実際に、ヒトのミトコンドリア病の病因遺伝子としてミトコンドリアへ輸送される miRNA が複数同定されている。しかし、RNA のミトコンドリアへの輸送機構は不明のものが多く、その生理的な意義の理解もタンパク質や脂質と比較して立ち遅れている。

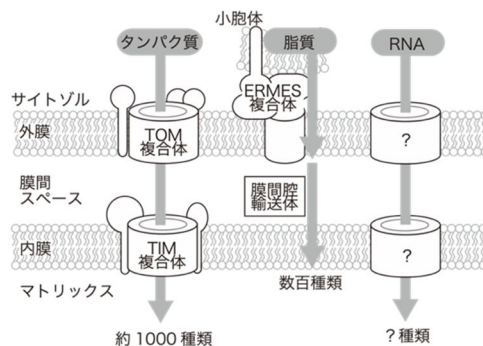


図1. ミトコンドリアへのRNAの輸送機構は理解が不十分である

これまでに報告された RNA-seq では、単離したミトコンドリアから RNA を抽出するが、サイトゾルの RNA がどの程度混入しているかどうかの定量的見積もりは不明であった。申請者が実際に検討すると、従来方法では RNA アーゼ耐性となっているサイトゾルの RNA が大量に混入してしまうことが分かった。故に、既存の研究からは核コードの RNA が真にミトコンドリア内に存在するかどうかについても、証明されたとは言い難い。ミトコンドリア内の核コード RNA の機能や輸送機構を明らかにするために、まずどのような RNA がミトコンドリアに輸送されるかを網羅的に調べることが喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア RNA の新規ラベル化手法の確立から、ミトコンドリア内に存在する核コード RNA の同定を通して、ミトコンドリアへの RNA 輸送の分子機構とその生理的意義の解明を目的とする。具体的には、RNA 同定手法の最適化と網羅的探索、RNA 輸送経路の同定、RNA 輸送の生理的意義の解析の3つの研究課題に取り組む。

3. 研究の方法

まず、これまでのミトコンドリア輸送 RNA で用いられていた検出手法では、偽陽性が多く RNA の輸送の有無を判断することが難しかったことから、ミトコンドリア内の RNA の検出・同定方法を改良する必要があると考え、ミトコンドリア内の RNA のみを近位依存性標識手法 APEX2 を用いてビオチンラベルし、目的の RNA を高純度で精製する方法を考案した (図2)。このラベル化法によりビオチン化された RNA の RNA-seq 解析により、ミトコンドリアへ輸送される可能性の高い RNA の同定を行った。同定した候補 RNA は single-molecule fluorescent in situ hybridization による細胞内局在観察と、in vitro でのミトコンドリア輸送再構成系によって詳細に解析した。さらに、生理的意義の解析は、同定した RNA 欠損株を作成し、ミトコンドリアへの機能の影響を検証した。

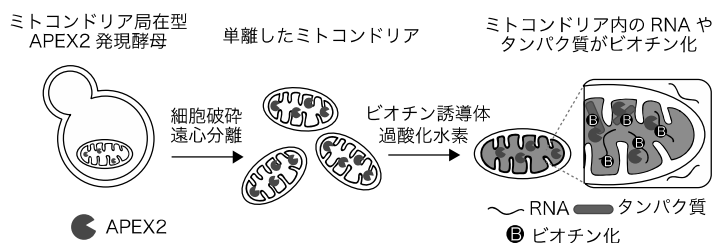
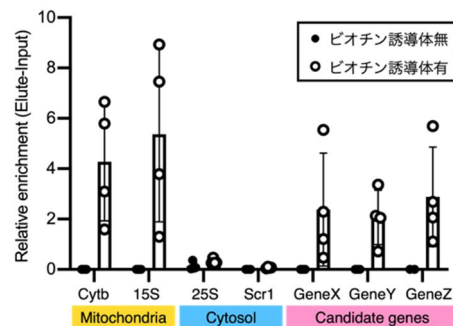


図2. APEX2 による近接標識法を用いたミトコンドリア内 RNA のビオチン化法

4. 研究成果

本研究ではまず、ミトコンドリアへ輸送された RNA を特異的に標識する新規ラベル化手法の確立を目指した。2019年に哺乳類細胞において APEX2 を用いた細胞内に存在する RNA のビオチン化技術が報告されたが、実際に試すと酵母でのミトコンドリア内の RNA のラベル化効率は低かった。酵母細胞はビオチン誘導体の細胞壁の透過効率が低いため、APEX2 を用いる方法には改良が必要と考えられた。そこで酵母細胞からミトコンドリアを単離し、さらに RNA に特異性の高いビオチン誘導体として知られるビオチンアニリンを用いたところ RNA のラベル化効率が劇的に上昇した。そこで、ストレプトアビジンビーズで精製したこのビオチン化 RNA を用いて RNA-seq を行った。ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされた mRNA や rRNA は 10 倍程度濃縮されたのに対し、サイトゾルに多量に存在する RNA はほとんど濃縮されなかった。さらに、mtDNA 由来の RNA と同程度に濃縮された核コード RNA を複数種、ミトコンドリア内に存在する可能性のある核コード RNA として同定することに成功した。個別の qPCR 解析により、これらの RNA が再

現性よくミトコンドリア内でピオチン化濃縮されることを見出した(図3)。以上の結果から、申請者が開発した手法により、ミトコンドリア内に存在する核コードRNAの同定が可能であることが示唆された。哺乳類ではミトコンドリアに輸送されるRNAの網羅的解析は現在までにほとんど行われていないが、本研究の手法は生物種を超えてミトコンドリアに輸送されるRNAの探索に利用可能であり、今後ミトコンドリア内RNAの機能研究の発展に貢献できると考える。



次に、候補RNAがミトコンドリアに局在するかどうかを細胞内局在により観察することで検証した。図2. 複数の核コードRNAは再現性よくピオチン化濃縮された

RNAの局在観察にはFISH法が一般的に用いられるが、今回同定した多くのRNAは細胞内での発現量が少ないものも多く、検出が困難であった。そこで、目的遺伝子内で複数箇所プローブを設計することにより検出感度を高めたsmFISH法を用いることとした。smFISH法により可視化した場合、複数の候補RNAでミトコンドリアと共局在するRNAシグナルを認めた。以上の結果から、RNA-seqによりピオチン化濃縮度合いの高いRNAは、ミトコンドリア内に局在することが強く示唆された。

さらに、これらのRNAが真にミトコンドリアへ輸送されうることを証明するために、*in vitro*でのミトコンドリアRNA輸送再構成系を構築することとした。過去の研究では、放射性同位体を用いたRNA輸送再構成が報告されているが、より簡便かつ安定した手法の構築を検討した。酵母から単離した蛍光標識したミトコンドリアと、*in vitro*転写により別の蛍光色素でラベルしたRNAを用いて顕微鏡下でミトコンドリアへ輸送されることが報告されているtRNA(Lys)のミトコンドリア内のシグナルの検出に成功した。したがって本研究で開発した*in vitro*再構築系はミトコンドリアRNA輸送を正しく評価できることが示唆された。そこで、候補RNAも同様に確認すると、ミトコンドリア内でのシグナルの検出が確認できた。

以上の結果から、ピオチン化RNAseqによる探索とsmFISH法による局在観察および、*in vitro*再構築系を組み合わせることで、真にミトコンドリア内に存在する核コードRNAの同定が可能であることが示唆された。以降、申請者が同定したミトコンドリアへ輸送される核コードRNAはmitoPORT RNA (mitochondrially imported RNA)と呼ぶ。

興味深いことに同定した遺伝子の機能解析を行うために、様々な条件で培養した酵母株でのmitoPORT RNAの細胞内局在をsmFISHにより観察した。その結果、ミトコンドリアストレス条件下において同定したRNAがミトコンドリアに蓄積したことから、mitoPORT RNAはミトコンドリアのストレスに応答して何らかの機能を発揮する可能性が示唆された。さらに、mitoPORT RNA欠損細胞の解析から、ミトコンドリアの呼吸活性を正負に制御する2つの表現型を見出した。また、老化した酵母を用いた解析から、野生型に比べて輸送されるRNA欠損型はmtDNAコードされたRNA量が有意に減少したことから、老化時のミトコンドリア機能調節に必要な可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Shunsuke, Ono Suzuka, Shinoda Saori, Kakuta Chika, Okada Satoshi, Ito Takashi, Numata Tomoyuki, Endo Toshiya	4. 巻 221
2. 論文標題 GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202104076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda Saori, Sakai Yuji, Matsui Takahide, Uematsu Masaaki, Koyama-Honda Ikuko, Sakamaki Jun-ichi, Yamamoto Hayashi, Mizushima Noboru	4. 巻 -
2. 論文標題 Syntaxin 17 recruitment to mature autophagosomes is temporally regulated by PI4P accumulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.92189.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo
2. 発表標題 Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria
3. 学会等名 "EMBO Workshop New challenges in protein translocation across membranes"（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠田沙緒里, 坂本智昭, 木村成介, 遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリアに輸送される新規核コードRNAの網羅的探索
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo
2. 発表標題 Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria
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 篠田沙緒里, 坂本智昭, 木村成介, 遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリアへ輸送される核コードRNAの探索技術の開発と生理学的意義の解析
3. 学会等名 第21回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠田沙緒里, 坂本智昭, 木村成介, 遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリアに輸送される新規核コードRNAの網羅的探索手法の開発
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------