

研究終了報告書

「オートファジーによる選択的 mRNA 分解機構の解明」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：牧野 支保

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

1. 研究のねらい

オートファジーは栄養飢餓時に自己の細胞内成分を液胞/リソソームに輸送し分解する機構であり、真核生物で高度に保存されている。オートファジーが誘導されると、細胞質成分がオートファゴソームという二重膜に取り囲まれて液胞に運ばれた後、液胞内の酵素により分解され様々な形でリサイクルされる。遺伝学・生化学的な解析が容易な出芽酵母は、他のモデル生物よりも倍加時間が速く圧倒的に解析が早いことから、オートファジー研究をリードしてきた。従来オートファジーは非特異的な分解系として理解されてきたが、近年特異的なタンパク質やオルガネラが分解される選択的オートファジーの存在が明らかになってきた。疾患との関連性も報告されており、選択的に基質を分解することで環境の変化に迅速に適応していると考えられる。一方で、オートファジーは主にタンパク質の分解機構として解析が進められてきたため、核酸代謝における役割は見過ごされてきた。近年オートファジーによってRNAが分解され、その責任酵素が高等真核生物にまで保存された液胞内 RNase, Rny1 であることが見出されている。しかし、オートファジーと RNA 分解という分野を横断した研究はスタートしたばかりであり、様々な栄養飢餓にตอบสนองしてどのような特徴を持つ RNA がオートファジーによって分解されているのか、という根本的な問いについては全く明らかになっていない。

本研究では、1)種々の栄養飢餓条件において選択的に分解されるRNAを網羅的解析により明らかにする。さらに、各飢餓条件において選択的な分解を受ける生理的意義を探る。2)標的RNAの特徴を見出し、制御する新規因子を同定することで様々な飢餓条件で選択性が生じる分子機構を解明する。また、3)実際に液胞内に蓄積する標的RNAを可視化する実験系の構築を目指す。本研究では、酵母の利点を最大限生かした独自の液胞解析(単離)技術とRNAの網羅的解析、さらにイメージング技術を組み合わせることで、RNAの選択的な分解という観点からオートファジーの生物学的機能を統合的に理解することを目指す。

加速フェーズでは、出芽酵母の実験系を様々な遺伝学的ツールが確立された多細胞生物であるショウジョウバエ初期胚に発展させ研究に取り組む。動物発生初期の受精卵で起こる母性-胚性転移という過程では、mRNA やタンパク質などの母性因子が迅速に分解され胚性ゲノム由来の遺伝情報による発生プログラムが進行する。近年オートファジーは初期胚発生に必須であり、オートファジーを介してオルガネラや特異的なタンパク質が分解されることが報告されている。一方で、胚発生過程でのオートファジーのRNA分解への寄与は不明である。本研究では初期胚発生におけるオートファジーを介した選択的なRNA分解の有無とその生理機能を明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

これまで、生理的な飢餓条件では液胞の収率が著しく低く解析が難しいという問題点があった。そこで本研究では、種々の栄養飢餓において高効率に液胞を単離する手法を検討し最適化を行なった。次に栄養飢餓の種類に応じたオートファジーの標的 mRNA を同定するため、窒素源飢餓や硫黄源飢餓といったオートファジー誘導下で Rny1 欠損変異株から液胞を単離し、分解されずに液胞内に蓄積した mRNA を網羅的に解析した。その結果、飢餓条件ごとに1) mRNA の液胞への運ばれやすさが異なること、2) 異なる機能のタンパク質をコードする mRNA が液胞に運ばれていることが明らかとなった。また、リボソームとの結合を網羅的に解析する手法であるリボソームプロファイリング法や、全ての飢餓条件に共通した標的 mRNA の個別の解析から、液胞への運ばれやすさとリボソームとの相互作用の相関の程度や分解に必要な因子の依存性は飢餓条件ごとに異なることが分かった。

また、当初は予定していなかったが細胞内の主なノンコーディング RNA である tRNA に対しても同様の飢餓条件で液胞を単離し、網羅的解析を行った。まず、tRNA に特化したライブラリー調製法を検討・確立した。tRNA-seq のデータを解析したところ、オートファジーによる分解のされやすさはラパマイシン処理と窒素源飢餓時は似た傾向があるが、硫黄源飢餓時は異なる tRNA が分解されることを見出した。また、液胞に運ばれやすい tRNA を可視化する実験系を構築し、実際にオートファジー依存的に液胞内に蓄積する tRNA を観察することに成功した。

以上の結果より、細胞は飢餓の種類に応答して、異なる mRNA や tRNA をオートファジーで分解することで RNA 量を調節し、環境の変化に適応していることが示唆された。

さらに、オートファジーによる RNA 分解の特徴の普遍性や生理機能を明らかにするため、出芽酵母の系を遺伝学的ツールが確立された多細胞生物であるショウジョウバエの初期胚に発展させた。ゲノム編集技術により Rny1 の相同因子 RNaseX25 の欠損変異体の作出を試み、ホモの欠損変異体の作製に成功した。今後は、ショウジョウバエ初期胚でオートファジーを介した RNA 分解の選択性を解析する予定である。

加速フェーズでは、作製した RNaseX25 欠損変異体の初期胚を用いて、mRNA 量の変化を RNA-seq により定量的かつ網羅的に解析した。その結果、ごく少数の mRNA が野生型と比較して RNaseX25 欠損変異体で増加することが分かった。このことから初期胚発生段階において、一部の mRNA が RNaseX25 によって選択的に分解されることが示唆された。次に、実際に一部の mRNA がリソソーム内に運ばれ蓄積しているかを調べるため、ショウジョウバエ初期胚からリソソームを単離する手法の構築に取り組み、精度高くリソソームを個体から単離する方法を確立した。今後 RNaseX25 欠損変異体のリソソーム内に運ばれた RNA を解析する準備が整った。

(2) 詳細

研究テーマ「種々の栄養飢餓条件における標的 mRNA の同定と分解機構の解析」

1) 栄養飢餓条件における液胞単離方法の検討と最適化

出芽酵母の液胞単離時は、まず①細胞をスフェロプラスト化し、浸透圧ショックにより破碎する。その後②超遠心を用いてフローテーション法により単離する。種々の生理条件で細胞破碎方法等の条件を検討し、最適化した。

改良した方法で細胞を破碎後、液胞を単離し液胞内アルカリフォスファターゼの活性を指標に液胞の収率を見積もった。その結果、従来の方法と比較して高効率に液胞を単離できることが分かった。

2) 種々の飢餓条件におけるオートファジーの標的 mRNA の網羅的解析

Rny1 欠損株を用いて、ラパマイシン処理や窒素源飢餓、硫黄源飢餓のオートファジー誘導条件下で細胞から液胞を単離し、液胞内に蓄積する mRNA を RNA-seq により網羅的な解析を行なった (図 1)。その結果、オートファジーを介した mRNA 分解は、栄養飢餓の種類毎に優先的に分解される mRNA や

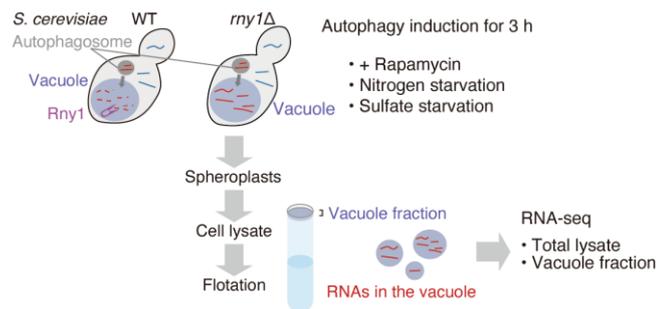


図 1. 液胞内に運ばれた RNA の網羅的解析

分解を免れるものが異なることが明らかとなった。Gene Ontology 解析を行ったところ、ラパマイシン処理ではリボソームタンパク質をコードする mRNA が標的 mRNA に多く含まれていたが、他の飢餓条件では分解を免れているということが分かった。

異なる機能のタンパク質をコードする mRNA が液胞に運ばれていることから、飢餓の種類に応答して異なる機能を持つ mRNA をオートファジーで分解することで、転写後段階で mRNA 量を調節し環境の変化に適応していると考えられる。

3) 標的 mRNA とリボソームとの相互作用の解析

標的 mRNA の特異性が生じる分子機構について、まずリボソームとの結合に着目した。種々の生理条件下における標的 mRNA の翻訳効率をリボソームプロファイリングにより網羅的に解析し、オートファジーによる分解とリボソームとの結合との関係性を調べた。その結果、標的 mRNA のリボソームとの相互作用の程度は飢餓条件ごとに異なることが分かった。また、共通した標的 mRNA の詳細な解析からも、液胞への運ばれやすさとリボソームとの相互作用の依存性は飢餓条件によって異なることが分かった。

研究目的の達成状況

種々の飢餓条件におけるオートファジーの標的 mRNA の同定に成功した。リボソームとの相互作用の程度との関係まで明らかにすることが出来、当初の目的を概ね達成した。

研究テーマ「種々の栄養飢餓条件における標的 tRNA の同定と分解機構の解析」

1) tRNA-seq のライブラリー調製法の確立

これまでにオートファジー依存的に分解されることを見出していた tRNA に関して、mRNA と同様の飢餓条件で網羅的解析を行った。tRNA の修飾や二次構造を考慮し、全長の tRNA が得られるよう逆転写の条件検討を行い、ライブラリー調製方法を最適化した。

2) 種々の飢餓条件におけるオートファジーの標的 mRNA の網羅的解析

tRNA-seq のデータ解析の結果、オートファジーによる分解のされやすさはラパマイシン処理と窒素源飢餓時は似た傾向があったが、硫黄源飢餓時では異なる tRNA が分解されることが分かった。tRNA は多くの修飾を受けることが知られているため、修飾の有無と液胞への運ばれやすさについて、修飾酵素の欠損変異株を作製して解析を進めた。分解されやすい tRNA の構造が及ぼす影響についても今後着目して解析する。

3) 標的 tRNA を可視化する実験系の構築

液胞に運ばれやすい tRNA を可視化し局在の特徴を明らかにするため、RNA in situ hybridization の実験系の構築を試みた。液胞内に運ばれたオートファジックボディ(細胞質成分を取り込んだ構造体)が分解されずに蓄積する条件で、実際にオートファジー依存的に液胞内に運ばれた tRNA を観察することに成功した。細胞質での局在の特徴について、様々な飢餓条件で比較することで今後明らかにしていきたい。

研究目的の達成状況

当初は tRNA の解析は予定していなかったが、種々の飢餓条件におけるオートファジーの標的 tRNA の同定に成功した。また、標的 tRNA を可視化する実験系を確立し、局在を観察することが出来、概ね目的を達成した。

研究テーマ「ショウジョウバエ初期胚におけるオートファジーを介した選択的 RNA 分解機構の解析」

オートファジーによる RNA 分解の特徴の相違点や普遍性、生理機能を明らかにするため、出芽酵母の系を遺伝学的ツールが確立された多細胞生物であるショウジョウバエの初期胚に発展させることとした。ゲノム編集技術により Rny1 の相同因子の欠損変異体の作出を試み、ホモの欠損変異体の作製に成功した。

(加速フェーズ)

作製した RNaseX25 欠損変異体の初期胚を用いて、mRNA 量の変化を RNA-seq により定量的かつ網羅的に解析した。

RNaseX25 欠損変異体から生まれた初期胚を実態顕微鏡下で集めた後、rRNA 除去によって mRNA を濃縮し、RNA-seq を行なった。

その結果、ごく少数の mRNA が野生型と比較して RNaseX25 欠損変異体で増加することが分かった。このことから初期胚発生段階において、ごく一部の mRNA が RNaseX25 によって分解されることが示唆された。

次に、実際に一部の mRNA がリソソーム内に蓄積していることを調べるため、ショウジョウバエ初期胚からリソソームを単離する手法の構築に取り組んだ。リソソームの膜タンパク質

の免疫沈降法によるリソソームの単離を試みた。免疫沈降時の洗浄バッファーの塩濃度等の条件を検討した結果、他のオルガネラの混入がほとんど無く精製度の高いリソソームを個体から単離する手法の構築に成功した。今後は RNaseX25 欠損変異体からリソソームを単離し、リソソーム内に前述の RNA-seq で同定した mRNA が蓄積しているかを網羅的に明らかにし、分解する生理的意義を探る。

研究目的の達成状況

ACT-X 研究期間以降に取り組む予定であった研究内容だが、出芽酵母で発見した現象を他の生物種に展開しはじめることが出来た。解析に必要なショウジョウバエの作出に成功しており、今後ショウジョウバエ初期胚でオートファジーを介した RNA 分解の選択性を解析する準備が整った。

(加速フェーズ実施後追記)

出芽酵母と同様の実験系をショウジョウバエ初期胚で構築することに成功し、当初の目的をおおよそ達成した。

本研究実施にあたり連携した研究者と手法は以下の通りであり、研究の迅速な進展に繋がった。

・理化学研究所・岩崎信太郎主任研究員

リボソームプロファイリングのライブラリー調製、tRNA-seq のライブラリー調製、データ解析のアドバイス(出芽酵母における解析)

・東京大学定量生命科学研究所・深谷雄志准教授

ショウジョウバエにおけるゲノム編集技術を用いた欠損変異体の作出

3. 今後の展開

今後は、出芽酵母で行ってきた解析を個体発生における機能まで解析可能なショウジョウバエに発展させる。ショウジョウバエを用いた解析を今後行い、その後共同研究等により他の高等生物での解析へと展開させていきたい。オートファジーによる選択的な RNA 分解機構の保存性・普遍性、さらに生理機能を明らかにしていきたいと考えている。今後本研究の成果が様々な生物種での機能解析に広がり、リソソームにおける RNA 分解の異常が原因と考えられている疾患のメカニズム解明など、基礎医学の基盤となる知見が得られることが期待される。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズでは、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、RNA 分解機構の保存性や個々の生物種での特徴を明らかにするための実験系が整った。今後選択的に分解される RNA を直接可視化するライブイメージング解析にも取り組み、その動態からオートファジーによる選択的 RNA 分解の分子機構の詳細を明らかにしていきたい。本研究が発展していくことにより、オートファジーを介した RNA 代謝の生理的意義が明らかになることが期待される。



4. 自己評価

おおよそ予定通りに研究計画を進めることが出来、研究目的の大半は達成することができた。当初予定していなかった tRNA についても追加で解析を行い、mRNA だけでなく tRNA に関しても興味深い結果が得られ、オートファジーによる RNA 分解の選択性の一端が明らかになった。東工大で最初の一年半は技術員1名と共に取り組み、実験材料の作製など補助業務を行って頂き効率良く研究を進めることが出来た。異動に伴い本研究を実施するための必要な費用が生じたが、研究費は基本的には計画通りに執行することが出来た。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズの研究計画はおおよそ予定通り進めることが出来た。ショウジョウバエ初期胚からのリソソーム単離は難航することが予想されたが、短期間で手法の構築に成功した。また、同領域内の研究者との領域会議や勉強会を通じた交流により新たな観点で本研究を捉えるきっかけを得た。今後も、異なる分野の研究者との交流を大事にして、独自の視点に基づいた研究を発展させていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. **Shiho Makino**, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi

Selectivity of mRNA degradation by autophagy in yeast

Nature Communications, 12(1):2316 (2021) (Recommended in *Faculty Opinions*)

出芽酵母において、オートファジー誘導条件下で液胞に運ばれた mRNA を網羅的に解析した結果、オートファジー依存的に分解される mRNA には分解されやすいものと分解されにくいものがあることを明らかにした。また、分解されやすい mRNA はオートファジー誘導時にリボソームとの結合を維持する傾向があることを見出した。以上の結果から、オートファジーによる mRNA 分解には選択性があり、転写後段階の mRNA 量の調節に寄与することが明らかとなった。

(2) 特許出願

無し

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi

Selectivity of autophagy-mediated mRNA degradation in various nutrient starvation

The 10th of International Symposium on Autophagy (2022年10月)

Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi



Selectivity of autophagy-mediated mRNA degradation in various nutrient starvation
第23回日本RNA学会年会 (2022年7月)

Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
Selectivity of autophagy-mediated RNA degradation
第 44 回日本分子生物学会年会(2021 年 12 月)

Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
Analysis of ribosome-associated mRNA degradation by autophagy
EMBL Conference: Protein Synthesis and Translational Control (2021年9月)

Shiho Makino, Tomoko Kawamata, Shintaro Iwasaki, Yoshinori Ohsumi
Mechanism of ribosome-associated mRNA degradation by autophagy
第22回日本RNA学会年会 (2021年7月)

牧野 支保、川俣 朋子、岩崎 信太郎、大隅 良典
オートファジーによる RNA 分解機構の解析
第 13 回オートファジー研究会若手の会(2020 年 12 月)

受賞

2020 年 第 13 回 オートファジー研究会若手の会 優秀発表賞

学術雑誌に発表した総説(査読無し)

牧野 支保、大隅 良典
オートファジーを介した RNA 分解 (2022)
生化学,ミニレビュー, 94 巻 3 号

プレスリリース

「オートファジーによる mRNA 分解の選択性を発見」2020 年 4 月 19 日

