

## 修飾ヌクレオシド代謝関連遺伝子の ゲノムワイドスクリーニング

### [1] 組織

代表者：岡本 浩二

(大阪大学大学院生命機能研究科)

対応者：魏 范研

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：久保田 満聖

(大阪大学大学院生命機能研究科)

研究費：物件費13万円，旅費0円

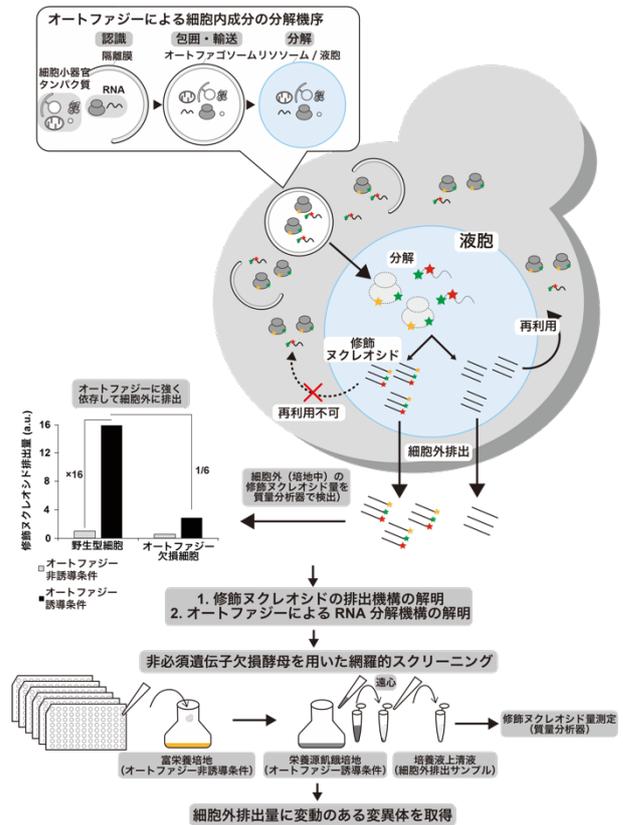
### [2] 研究経過

オートファジーは、生物種を超えて高度に保存された細胞内分解経路であり、真核生物の恒常性維持に欠かせない役割を果たしている。これまでの研究から、オートファジーは非選択的なバルク分解だけでなく、特定の基質を選択的に分解することが知られており、タンパク質・脂質・核酸を含む生体分子に加え、小胞体やミトコンドリアなどの細胞小器官も、オートファゴソームと呼ばれる膜構造に隔離した後、様々な酵素を含むリソソーム（酵母では液胞）と膜融合することで、内容物を分解する。

最近の研究から、DNA や RNA などの核酸関連分子の分解が、既知の各種ヌクレアーゼだけでなくオートファジーにも依存していること、リソソームでの分解の後、未修飾および修飾ヌクレオシドの一部は細胞外へ排出されることがわかってきた。一方、これらオートファジーに依存した核酸分解経路の諸過程に関する分子機構は未解明であり、その生理的意義も謎のベールに包まれている。

そこで本共同研究では一昨年度および昨年度に引き続き、出芽酵母の培地中に排出された修飾ヌクレオシドを指標として、その排出異常を引き起こす変異体を網羅的に探索・同定し、オートファジーに依存した修飾ヌクレオシド代謝関連経路の分子基盤を一挙に獲得することを目的とする。具体的には、出芽酵母の非必須遺伝子欠損ライブラリー（約 5,000 株）の培養上清からヌクレオシドを精製し、魏研究室の質量分析計を用いた定量解析を進めている。

本年度の研究活動状況の概要については、Zoom 会議を 1 回、出張先での打合せを 2 回実施した。

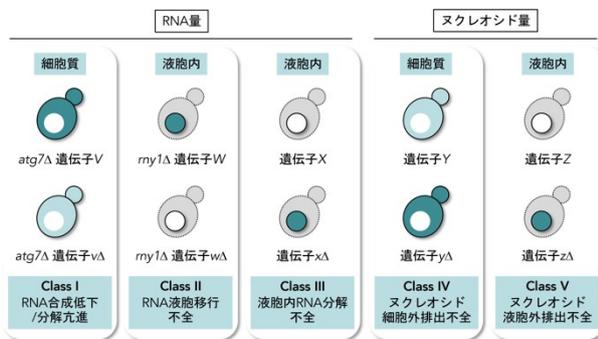


### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

出芽酵母を富栄養培地から窒素源飢餓培地に移すと、RNA 由来ヌクレオシドの細胞外排出がオートファジーの仕組みに依存して 10 倍以上増加する。本年度も引き続き、この培養条件下において、96 ウェルフォーマットの非必須遺伝子欠損変異体の培養上清からヌクレオシドを抽出し、質量分析計による定量解析を進めた。本年度においては、非必須遺伝子欠損変異体 5,000 株全ての一次スクリーニングを完了した。その結果、オートファジー関連因子に加えて、リボソーム生合成関連因子・膜輸送関連因子・トランスポーター関連因子・RNA 分解およびプロセッシング関連因子・ミトコンドリア関連因子・液胞生合成関連因子などの関与が示唆された。さらに、機能未知あるいは未解析の因子も得られており、今後の解析が待たれる。

RNA の合成に始まり、窒素源飢餓誘導型オートファジーに依存した RNA の液胞移行、液胞内腔での RNA 分解、液胞内 RNA 分解によって生じたヌクレオシドの液胞外および細胞外排出までの過程は、様々な細胞内区画の輸送経路・分解酵素・トランスポーターなどの働きによって駆動されているものと考えられる。それらの実態を明らかにするには、上記の網羅的探索から得られた、RNA 由来修飾ヌクレオシドの細胞外排出不全を示す変異体の表現型解析が不可欠である。そこで、この現象の基質である RNA と、その分解産物であるヌクレオシドに着目し、細胞質および液胞内の存在量を調べることを計画している。これらのデータにより、RNA 由来ヌクレオシドの細胞外排出に異常が生じた候補変異体、*nex* (nucleoside export) を少なくとも 5 つの異なるクラスに分類できると考えられる。



[Class I] RNA 合成低下/分解亢進変異体：オートファジー必須因子 *Atg7* 欠損で RNA の液胞移行を停止させ、細胞質の RNA 量を測定する。遺伝子 V の欠損で RNA 量が減少している場合、RNA 合成の低下もしくは分解亢進が考えられる。

[Class II] RNA 液胞移行不全変異体：液胞内 RNA 分解酵素 *Rny1* 欠損で RNA 分解を停止させ、液胞内の RNA 量を測定する。遺伝子 W の欠損で RNA 量が減少している場合、RNA の液胞移行の不全が考えられる。なお、オートファジーが低下している可能性もあるので、定法にしたがって検証する。

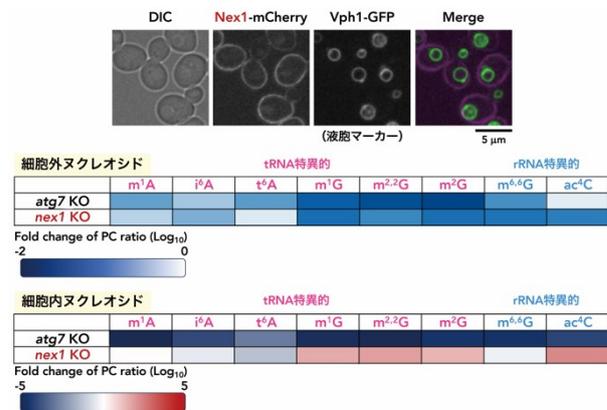
[Class III] 液胞内 RNA 分解不全変異体：遺伝子 X の欠損変異体について、液胞内の RNA 量を測定する。増加がみられる場合、*Rny1* 欠損に類似した液胞内 RNA 分解の不全が考えられる。

[Class IV] ヌクレオシド細胞外排出不全変異体：遺伝子 Y の欠損変異体について、細胞質のヌクレオシド量を測定する。増加がみられる場合、ヌクレオシドの細胞外排出の不全が考えられる。

[Class V] ヌクレオシド液胞外排出不全変異体：遺伝子 Z の欠損変異体について、液胞内のヌクレオシド

量を測定する。増加がみられる場合、ヌクレオシドの液胞外排出の不全が考えられる。

興味深いことに、アミノ酸配列の相同性から、トランスポーターをコードする遺伝子を欠損した *nex* 変異体を見出し、同遺伝子を *NEX1* と呼ぶことにした。*Nex1* に *mCherry* を付加した融合タンパク質を染色体上の内在性プロモーターで発現させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、典型的な細胞膜局在を示した。*Nex1* 欠損細胞は細胞外ヌクレオシド排出の顕著な抑制を示す一方、細胞内のヌクレオシド量は顕著に増加することがわかった。これらの知見は、*Nex1* が細胞膜を隔てたヌクレオシドの細胞外排出に機能していることを示唆している。



### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究計画の実施により、オートファジーに依存した修飾ヌクレオシド代謝関連経路の破綻がもたらす細胞の構造と機能の様々な異常について、これまでに知られていない全く新しい知見が得られると考えている。さらに、出芽酵母をモデルとして明らかとなった基本的な分子機構は、生物種を超えて普遍的に保存されている可能性が高い。そのため本研究の成果は、哺乳類培養細胞および個体における解析に、有用な手がかりを与えることが期待できる。

### [4] 成果資料

- (1) Mitsutaka Kubota, Hiroko Miyamoto, Fan-Yan Wei, Koji Okamoto. Extracellular export of RNA-derived modified nucleosides in budding yeast. Cold Spring Harbor Asia Conference on Yeast and Life Sciences. Matsue, Shimane. October 12, 2023.
- (2) 久保田 満聖, 宮本 寛子, 魏 范研, 岡本 浩二. オートファジーによる RNA 分解と修飾ヌクレオシドの細胞外排出経路の解析. 第 46 回日本分子生物学会年会. 神戸. 2023 年 12 月 8 日.