

課題番号 55

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：旅費 15 万円

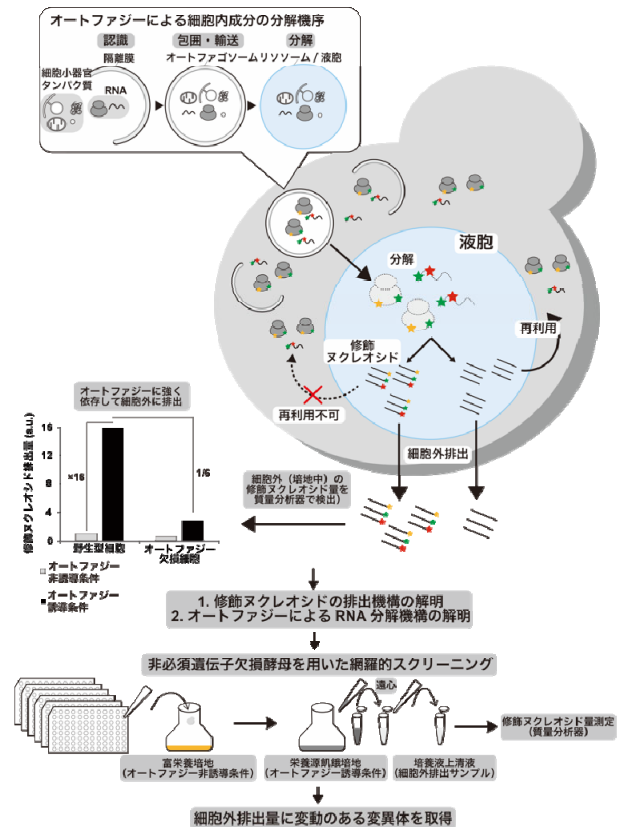
[2] 研究経過

オートファジーは、酵母からヒトまで高度に保存された細胞内異化経路の一つであり、真核生物の恒常性維持に重要な役割を果たしている。一般に、オートファジーは非特異的な大規模分解として機能することが知られており、タンパク質・脂質・核酸を含むほとんど全ての生体分子をターゲットとし、かつ小胞体やミトコンドリアなどの細胞小器官をも丸ごと隔離・除去する。

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、ヌクレオチドや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、培地中に排出された修飾ヌクレオシドを指標として、その増減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器を用いた定性・定量プロファイリングを進めている。

本年度の研究活動状況の概要については、Zoom を用いたオンラインでの研究打合せを 4 回行い、2021 年 11 月下旬に加齢研での実験を実施した。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまでの研究から、出芽酵母を富栄養培地から窒素源飢餓培地に移すと、ヌクレオシドの細胞外排出が 10 倍以上増加することがわかった。この現象は、オートファジー不全変異体で野生株の 15% 程度まで抑制されることから、RNA がオートファジーの仕組みに依存して液胞（リソソーム様の細胞小器官）に運ばれ、分解された後、細胞外へ排出されていると考えられる。

そこで、上記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、質量分析器による定性・定量解析系を確立した。本年度においては、非必須遺伝子欠損変異体 5,000 株のうち、3,000 株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・

ミトコンドリア関連因子などの関与が示唆されている。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。残り 2,000 株の中からも、多数の修飾ヌクレオシド代謝関連候補因子が見出されるものと期待している。

(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、出芽酵母で明らかとなった基本的な分子機構は生物種を超えて保存されている可能性があり、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

該当無し