

課題番号 35

修飾ヌクレオシドの細胞外排出に働く タンパク質の機能解析

〔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)
 分担者：永野 沙也加
 (大阪大学大学院生命機能研究科)

研究費：物件費 16,670 万円，旅費 183,330 円

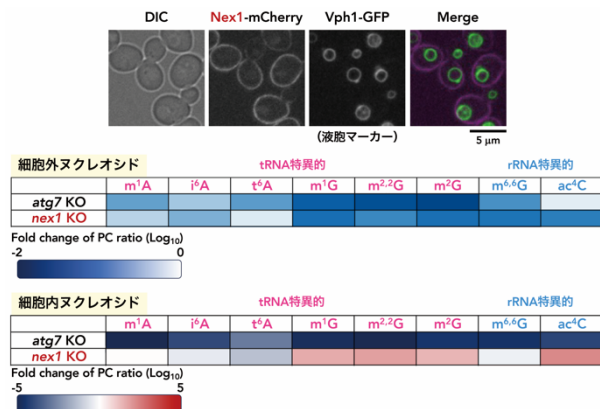
〔2〕研究経過

オートファジーは、生物種を超えて保存された細胞内分解経路の一つであり、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系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（酵母や植物では液胞と呼ばれる）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ほとんど未解明であり、故にその生理的意義も謎のベールに包まれている。

代表者のグループはこれまでに、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举に獲得することに成功した。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行なった。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いる。これら RNA 由来ヌクレオシドの細胞外排出に異常が生じた変異体を、*nex* (nucleoside export) として同定した。

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。



本年度の研究活動状況の概要については、出張先での打合せを 2 回実施した。

〔3〕成果

(3-1) 研究成果

Nex1-mCherry を発現した細胞を窒素源飢餓下 (-N) で培養すると、細胞外ヌクレオシド排出が誘導される。この際、蛍光顕微鏡解析を行うとともに、回収した細胞から全細胞抽出液を調製し、ウェスタン解析を行なった。蛍光顕微鏡観察の結果、-N 24h の細胞においても、Nex1-mCherry の細胞膜局在パターンはほとんど減弱することなく維持されていることがわか

った。興味深いことに、細胞膜パターンに加えて、液胞パターンの mCherry シグナルも検出された。また、mCherry 抗体を用いたウェスタン解析から、-N 24h のサンプルにおいて遊離型の mCherry が蓄積していることが明らかとなった。これらの知見は、Nex1-mCherry の一部が細胞膜から液胞へ運ばれることを示唆している。なお、mCherry は液胞内分解に対して耐性であるため、液胞内へ運ばれた Nex1-mCherry が液胞内酵素で速やかに処分され、遊離型の mCherry が残存したと考えられる。

驚いたことに同条件下において、オートファジー関連経路の全てに必須なタンパク質 Atg7 の欠損細胞では、Nex1-mCherry 由来の遊離 mCherry シグナルが顕著に減少することを偶然見出した。同様の結果が、液胞内分解酵素の欠損細胞でも得られている。これらの結果は、オートファジーの仕組みに依存して Nex1 の一部が液胞へ輸送され、液胞内酵素によって分解されるというシナリオを支持するものである。このオートファジーに依存した液胞移行が Nex1 に特異的な減少なのか、細胞膜タンパク質に共通の仕組みなのかは明らかになっていない。

(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の細胞外排出の仕組みについて、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。実際に、Nex1 のホモログと思われる哺乳類タンパク質が複数推測されており、Nex1 ファミリータンパク質が生物種を超えて同様の機能を果たしている可能性がある。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) 永野 沙也加, 久保田 満聖, 魏 范研, 岡本 浩二. RNA 由来修飾ヌクレオシドの細胞外排出に関与する ABC トランスポーター Nex1 の分解機構. 第 70 回日本生化学会近畿支部例会. 吹田. 2024 年 5 月 25 日.
- (2) 久保田 満聖, 永野 沙也加, 魏 范研, 岡本 浩二. オートファジーによる tRNA 分解と分解産物の細胞外排出メカニズムの解析. 酵母遺伝学フォーラム第 57 回研究報告会. 神戸. 2024 年 9 月 9 日.
- (3) 永野 沙也加, 久保田 満聖, 魏 范研, 岡本 浩二. オートファジーは出芽酵母の細胞膜 ABC トランスポ

ーターの分解を促進する. 第 41 回 YEAST WORKSHOP. 鹿児島. 2024 年 11 月 10 日.

- (4) 永野 沙也加, 久保田 満聖, 魏 范研, 岡本 浩二. オートファジーは出芽酵母の細胞膜 ABC トランスポーターの分解を促進する. 第 47 回日本分子生物学会年会. 福岡. 2024 年 11 月 27 日.