

## 膜透過型オートファジーにおいて基質核酸が認識される分子機構の解明

著者	長谷 勝徳
学位授与年月日	2018-03-22
URL	<a href="http://doi.org/10.15083/00078197">http://doi.org/10.15083/00078197</a>

## 論文の内容の要旨

応用動物専攻  
平成27年度博士課程入学

氏名 長谷 勝徳  
指導教員名 高橋 伸一郎 准教授

論文題目 膜透過型オートファジーにおいて基質核酸が認識される分子機構の解明

生体はその体内でタンパク質や核酸などの生体高分子の合成と分解のバランスを保っている。生体が恒常性を維持するにはこのバランスを保つことが必要であり、この合成と分解は細胞内で能動的に行われている。

細胞において生体高分子を分解する主要なオルガネラとして、リソソームが存在する。リソソームはその内部にプロテアーゼやヌクレアーゼ、リパーゼなど多種類の加水分解酵素を有しており、これらのリソソーム内酵素がリソソームによる生体高分子の分解を担っている。そのため、リソソーム内酵素などのリソソームタンパク質の機能が欠損すると、生体高分子の合成と分解のバランスが崩れ、分解されるべき物質が蓄積し、リソソーム病と総称される疾患の原因となることが知られている。例えば、リソソームに局在する RNA エンドヌクレアーゼである RNase T2 の機能欠損は神経変性疾患を引き起こすことや、リソソーム内 DNA エンドヌクレアーゼの 1 つである DNase II 欠損マウスは胚発生の段階で致死となることが報告されている。これらの報告はリソソームによる RNA/DNA の分解が生体の恒常性の維持に必要不可欠なものであることを示している。

リソソームに細胞内構成成分を輸送し、分解するシステムは総称してオートファジーと呼ばれている。オートファジーにはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、膜透過型オートファジーの少なくとも 3 種類の形態が存在する。マクロオートファジーはオートファゴソームという 2 重膜構造のオルガネラが細胞内物質を取り囲み、膜輸送系を介してリソソームに輸送、分解する経路である。ミクロオートファジーはリソソーム膜が陥入することによって分解すべき物質をリソソーム内部に取り込み、分解するプロセスとして知られている。膜透過型オートファ

ジーは他の 2 つのオートファジーとは異なり、膜の形態変化を介さずに、基質が直接リソソーム膜を透過するという特徴が存在する。膜透過型オートファジーは、タンパク質を基質とするシヤペロン介在性オートファジーと RNA、DNA それぞれを基質とする RNautophagy、DNautophagy の存在が報告されている。

RNautophagy/DNautophagy (RDA) は 2013 年に発見された新規オートファジーであり、細胞質中の RNA/DNA を ATP 依存的に直接リソソームに取り込み、分解するシステムである。RNautophagy はマウス線維芽細胞における細胞内 RNA 分解の数十パーセントを担っていることが報告されており、少なくとも培養細胞では主要な RNA 分解経路の 1 つとして機能すると推測される。これらのシステムにおいて、複数回膜貫通りソソームタンパク質である SIDT2 が核酸の細胞質からリソソーム内腔への輸送を媒介することも示されており、SIDT2 は RDA の核酸輸送体として機能すると考えられている。さらに、1 回膜貫通型リソソームタンパク質である LAMP2C が細胞質側で核酸と結合し、これらのシステムにおける核酸受容体として機能するということが報告されている。

上記のように SIDT2 や LAMP2C などの RDA 構成分子の知見は増加しつつある一方、RDA がシステムとしてどのような核酸をどのように認識するのか、不明な点も多い。そこで、本研究では RDA システムが基質核酸を認識する分子機構を解明することを目的として研究に着手した。

まず、RDA システムによって認識される基質核酸を解析した。マウス脳から単離したリソソームを用いた生化学的解析を行い、グアニンヌクレオチドから成る一本鎖 RNA/DNA である poly-G/dG は RDA の基質となるのに対して、他の塩基から成る poly-A/dA、poly-C/dC、poly-U、poly-dT は RDA の基質とならないことを発見した。この結果は、少なくとも *in vitro* において RNA/DNA をリソソームへ取り込む段階で、RDA は選択性を有していることを示している。

これまでに LAMP2C の核酸結合ドメインが poly-G/dG と結合するが、poly-A/dA、poly-C/dC、poly-U、poly-dT とは結合しないという結果を得ており、RDA の基質選択性と LAMP2C の核酸結合活性は一致することがわかった。これらの研究成果から、RDA システムによる基質核酸のリソソーム内へ取り込みには、細胞質側で基質核酸とリソソーム膜タンパク質と結合することが必要であると示唆された。その一方で、LAMP2C が存在しない LAMP2 ノックアウト (KO) マウス由来のリソソームにおいても、RDA 活性が残存することが報告されている。このことから LAMP2C 以外のリソソーム膜上に存在するタンパク質が核酸と結合していることが推測される。さらに、LAMP2 KO 細胞においても、SIDT2 過剰発現による RNautophagy の活性化が

観察されることも報告されている。上述の研究成果から、SIDT2 も LAMP2C と同様に核酸と結合するという仮説を構築し、SIDT2 の核酸結合活性を解析した。SIDT2 の組み換えタンパク質を用いたプルダウンアッセイの結果、SIDT2 の膜貫通ドメイン 1 と 2 の間に存在する細胞質ドメイン (CD1) は RNA/DNA と結合し、LAMP2C と同様の選択性を有するということが明らかになった。CD1 には核酸結合モチーフの 1 つとして知られるアルギニンリッチモチーフが存在し、SIDT2 と核酸の結合にはこのモチーフが必要であることも見出した。さらに、このモチーフの変異によって SIDT2 を介した RNA のリソソームへの取り込み、および細胞内 RNA 分解が阻害されることも示した。これらの結果から、SIDT2 を介する RNautophagy には SIDT2 CD1 の核酸結合活性が重要であると考えられる。また、リソソーム内腔に存在する SIDT2 の N 末端領域は、核酸結合活性を有し、この領域に存在する 154 番目のフェニルアラニン残基や 171 番目のプロリン残基の変異はこの結合活性を減少させることが報告されている。そこで、これらのアミノ酸が SIDT2 を介する RNA 分解に与える影響を解析した。興味深いことに、SIDT2 の 154 番目のフェニルアラニン残基の変異は SIDT2 を介する RNA 分解に影響を与えなかったが、171 番目のプロリン残基の変異は SIDT2 過剰発現による RNA 分解の促進を阻害した。このことは、SIDT2 を介した細胞質からリソソーム内腔側への RNA 輸送には、SIDT2 の細胞質ドメインだけでなく、リソソーム内腔ドメインの核酸結合活性も重要であることを示している。SIDT2 の一部は細胞膜にも存在し、細胞膜上で核酸の細胞外から細胞内への輸送に関与できることが報告されている。細胞膜上の SIDT2 の核酸輸送の方向は N 末端側から CD1 側であり、リソソーム膜上の SIDT2 による核酸輸送の方向、CD1 側から N 末端側と反対である。そこで、SIDT2 の N 末端側から CD1 側への核酸輸送にも細胞質側の核酸結合活性が重要であるのか検討するため、SIDT2 を介した細胞内への核酸取り込みにアルギニン残基の変異が与える影響を解析した。その結果、RNautophagy 活性に影響を与える細胞質側のアルギニン残基の変異により、SIDT2 を介する核酸の細胞内への取り込みが完全に阻害された。さらに、細胞外に存在する N 末端領域のフェニルアラニン残基やプロリン残基の変異も同様に核酸の細胞内への取り込みを阻害した。これらの結果は、SIDT2 の細胞質ドメインと細胞外ドメインの核酸との結合は細胞膜上における核酸輸送についても必要であることを示している。一連の研究成果から、SIDT2 を介する効率的な核酸輸送には基質核酸が SIDT2 の細胞質ドメインおよびリソソーム内腔ドメインの双方と結合することが必要であると結論した。

最後に、今回得られた知見をもとに RNautophagy のヒト疾患への関与や治療への応用の可能

性を検討した。神経細胞にとって生体高分子の分解システムは重要であると考えられているため、本研究では神経変性疾患に着目した。一部の神経変性疾患は、その原因タンパク質の凝集体形成を伴い、凝集体形成の過程で細胞毒性を発揮する。そのため、発症の分子メカニズムにおけるカスケードの下流側をターゲットとした治療方法は効果が限定的であることが報告されている。本研究では、RNautophagyの活性化によってこのタンパク質の mRNA を分解することで原因タンパク質量を減少させ、結果として細胞毒性を減少させるという治療方法の有効性を検討することにした。神経変性疾患のひとつであるハンチントン病は *HTT* 遺伝子中の CAG リピートの異常伸長が原因となる。核酸中の G が RDA における核酸認識に関与することから、CAG リピートが異常伸長した変異型 *HTT* の mRNA は RNautophagy の基質となると考え、RNautophagy 活性化による変異型 *HTT* への影響を解析した。その結果、SIDT2 を細胞に過剰発現させると変異型 *HTT* の単量体および凝集物のタンパク量が減少した。この SIDT2 過剰発現による変異型 *HTT* の減少は、SIDT2 の核酸結合活性に必要なアルギニン残基の変異によって抑制され、さらに SIDT2 の核酸輸送活性に必要なセリン残基の変異によっても抑制された。これらの結果は、SIDT2 を介した変異型 *HTT* の減少が SIDT2 の核酸結合活性と核酸輸送活性依存的事であることを示している。さらに、SIDT2 過剰発現が *HTT*-mRNA 量を低下させることや *HTT*-mRNA 分解活性を亢進させることも明らかとなった。また、この SIDT2 を介した変異型 *HTT* の減少は主要なタンパク質分解経路であるプロテアソーム、マクロオートファジー非依存的であった。以上の結果は、SIDT2 過剰発現による変異型 *HTT* の減少は RNautophagy によることを示しており、ハンチントン病の予防・治療に RNautophagy の活性化が有効な手段となる可能性を示している。

本研究により、核酸をリソソームへ取り込むステップにおいて、RDA の基質となる核酸、基質とならない核酸の存在を具体的に示し、RDA の基質選択性の存在を明らかにした。さらに、RDA において輸送体と基質核酸の相互作用が必要であることを示し、膜透過型オートファジーにおける基質の膜透過機構の解明に貢献した。最後に、SIDT2 を利用して疾患原因変異タンパク量を低減できることを見出した。本研究は RNautophagy の疾患への関与の可能性を具体的に示した初めての研究であり、RNautophagy の活性化がハンチントン病を含めた様々な疾患の予防・治療に有効な手段となることが期待される。