

審査の結果の要旨

氏名 長谷 勝徳

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。この中で、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、膜の動態を介さず、基質が直接リソソーム膜を透過するという特徴がある。膜透過型オートファジーとしては、タンパク質を基質とするシャ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。RDAの分子機構としては、複数回膜貫通リソソームタンパク質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、これらのシステムにおける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。本研究は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おり、6章からなっている。

まず、第一章の序論では、本研究の背景および意義を概説し、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

第二章の材料と方法では、本論文で用いた手法について説明している。

第三章では、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から、少なくとも*in vitro*におけるRNA/DNAのリソソームへの取り込みの段階で、RDAはグアニンヌクレオチドからなる一本鎖RNA/DNAを選択的に認識することを明らかにした。

第四章では、SIDT2もLAMP2Cと同様に核酸と結合するという仮説の検証を試みた。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。さらに、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と核酸の結合にこのモチーフが必要であるということも見出した。さらに、単離リソソームを用いた解析によって、これらのアルギニン残基の変異はSIDT2を

介したリソソームへのRNAの取り込みを阻害することを示した。この結果と一致して、アルギニンリッチモチーフの変異はSIDT2を介した細胞内RNA分解も阻害した。これらの結果は、SIDT2を介するRNautophagyにはSIDT2 CD1の核酸結合活性が重要であることを示している。更に、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発見した。

第五章では、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体HTTの減少は、SIDT2の核酸結合活性に必要なアルギニン残基、SIDT2の核酸輸送活性に必要なセリン残基の変異によって抑制された。これらのことは、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であるということを示している。以上の結果より、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指摘している。

第六章の総合討論では、RDAの基質選択性の生理的意義、RDAにおける輸送体と基質核酸の相互作用の必要性、膜透過型オートファジーにおける基質の膜透過機構、RDAを利用した疾患原因変異タンパク量の低減への可能性などについて論じている。

このように、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活性化によって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を明らかにしたもので、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位として価値あるものと認めた。