

博士論文（要約）

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

長谷 勝徳

# 目次

論文要旨

略語一覧

第 1 章 序論

第 2 章 材料と方法

第 3 章 RNautophagy/DNautophagy によって認識される核酸の特徴の解析

第 4 章 SIDT2 の基質核酸認識機構の解析

第 5 章 RNautophagy のヒト疾患への関与

第 6 章 総合討論

参考論文

謝辞

## 論文要旨

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 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、複数回膜貫通リ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であるということを示している。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 によるということを示しており、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。

## 略語一覽

a.a.	amino acid
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ATG	Autophagy related gene
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD	Cytosolic Domain
ChUP-1	Cholesterol Uptake Protein-1
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
dsRNA/DNA	double stranded RNA/DNA
EtBr	Ethidium Bromide
GST	Glutathione S-transferase
HTT	Huntingtin
KO	Knockout
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Proteins
LIMP	Lysosome Integral Membrane Protein
Me	Methylation
mTOR	mammalian target of rapamycin
mtDNA	Mitochondrial DNA
PolyQ	Polyglutamine
RDA	RNautophagy/DNautophagy
SID-1	Systemic RNA Interference Deficiency-1
SIDT2	SID1 transmembrane family member 2
SSC	Saline Sodium Citrate
ssRNA/DNA	single stranded RNA/DNA
TOM	Translocase of the Outer Membrane



## 第 1 章 序論

生体はその内部でアミノ酸やヌクレオチドなどをもとにして、タンパク質や核酸などの様々な生体高分子を合成している。その一方で、これらの物質の分解も行っており、生体高分子の合成と分解の動的平衡状態を保っている。この合成と分解のバランスを保つことは、恒常性を維持することに必須であり、恒常性を維持することは生体の生存に必要不可欠である。この生体高分子の合成と分解は、細胞内で能動的に行われている。

### リソソーム

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、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関連タンパク質の遺伝的な異常は、生体高分子の合成と分解のバランスを崩し、分解されるべき物質を蓄積させる。その結果として、細胞レベルの代謝制御不全に陥り、生体に様々な症状をもたらす。これをリソソーム病またはリソソーム蓄積病と呼ぶ (1, 2)。リソソーム病は機能に異常がみられるリソソームタンパク質や蓄積する生体高分子の種類によって様々に分類されており、例えば、リソソームプロテアーゼの 1 つであるカテプシン K は骨が折れやすくなる大理石病の原因遺伝子として知られている (3)。さらに、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 の機能欠損はヒトにおいて神経変性疾患を引き起こし、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も報告されている (4–6)。これらのことはリソソームにおける RNA/DNA を含めた生体高分子の分解が生体の恒常性維持に不可欠なものであることを示している。

## オートファジー

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オートファジーと総称されている (7)。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 (7) (Fig. 1-1)。

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 (7, 8)。マクロオートファジー研究はオートファジー研究の中で歴史的に最も古く、リソソームの発見者である Cristian de Duve が名付けた「オートファジー」というリソソームによる分解システムを意味する言葉は、この現象に由来して名付けられたと考えられる (9)。一般にオートファジーと呼ぶとこのマクロオートファジーを指すことが多く、そのため、マクロオートファジーのことを「狭義のオートファジー」、リソソームに細胞内構成成分を輸送し、分解するシステムのことを「広義のオートファジー」と呼び分けることもある。マクロオートファジーは、非選択的でバルクな分解システムとして考えられてきたが、近年、選択的な経路の存在も明らかになってきた。例えば、ミトコンドリアを基質とするマイトファジー、核の一部を基質とするヌクレオファジーなど、細胞内の様々なオルガネラなどに対する選択的なマクロオートファジーが報告されている (10, 11)。このシステムには多種類の ATG タンパク質群が関与するが、マイトファジーにおいては ATG32 などその経路に特異的に機能する因子により選択性がもたらされている (12, 13)。

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細胞質成分をリソソーム内部に取り込み、陥入した膜と共に分解する現象として Cristian de Duve により発見された (7, 10, 14, 15)。ミクロオートファジーにも非選択的な経路や核の一部などを分解する選択的な経路が存在する (16)。ミクロオートファジーの機能は主にオルガネラサイズの維持やリソソーム膜成分の恒常性維持ということが示唆されている (17)。しかし、ミクロオートファジーに関する研究の多くは酵母における研究であり、哺乳細胞におけるミクロオートファジーに関する研究の進行は遅れている。

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 (Chaperone-mediated autophagy; CMA) 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 (18–21)。

### シャペロン介在性オートファジー

CMA は細胞質に存在する可溶性タンパク質が直接リソソーム膜を透過し、分解される経路である。CMA は Dice らによってリソソームによる選択的な分解現象として報告され、後に、CMA と名付けられた (22)。この経路は基質選択性を有しており、この選択性は基質タンパク質中に存在する KFERQ 様配列が担うとされている (23)。このペプチドモチーフは、F が同じ疎水性アミノ酸である I、L、V などでも良いことや Q は N 末端側でも機能することなど、ある程度の柔軟性を有しており、さらにリン酸化などの翻訳後修飾によって新たに形成できると考えられている (24)。CMA の代表的な基質としては GAPDH や  $\alpha$ -シヌクレインが知られており、細胞質タンパク質の約 30% がこのモチーフを有すると推測されている (25–28)。

このモチーフを有する可溶性タンパク質は Hsc70 によって認識され、細胞質中で複合体を形成する。その後、この複合体はリソソーム膜近傍まで移動し、そこで基質タンパク質とリソソーム膜タンパク質である LAMP2A (Lysosome-Associated Membrane Proteins 2A) が結合する (29, 30)。LAMP2A と結合したタンパク質は Hsc70 によって立体構造を解かれながらリソソーム膜を透過した後、リソソーム内酵素によって分解される。Hsc70 はリソソーム内腔にも存在し、基質タンパク質のリソソーム内腔への取り込む際に、リソソーム内腔側の Hsc70 が基質タンパク質を引き込んでいると考えられている。CMA において Hsc70 はタンパク質シャペロンとして、LAMP2A はタンパク質受容体として機能し、どちらも CMA の必須因子であるとされている。

CMA の基質として報告されている分子には、代謝に関与するものが比較的多く存在する (31)。肝臓の LAMP2A を欠損させたコンディショナルノックアウト (KO) マウスは、GAPDH やピルビン酸キナーゼなどの CMA 基質の蓄積や、糖代謝・脂質代謝の異

常、さらに脂肪肝が引き起こされることが報告されている (24, 31)。また、CMA はパーキンソン病の原因遺伝子である  $\alpha$ -シヌクレインを基質とするため、パーキンソン病やハンチントン病などの神経変性疾患への関与も示唆されている (28, 32, 33)。

### **RNautophagy/DNautophagy**

CMA と同じく膜透過型オートファジーの一種である 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 (Fig. 1-2)。RNautophagy はマウス線維芽細胞内 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においては主要な RNA 分解経路のひとつとして機能していると推測される (34)。

これらのシステムにおいて、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 RNA/DNA と結合し、RDA システムの核酸受容体として機能することが報告されている (18, 19)。さらに、複数回膜貫通リ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、これらのシステム内で核酸輸送体として機能すると考えられている (34, 35)。

### **RDA と CMA**

RDA と CMA はどちらも膜透過型オートファジーに分類され、いくつかの共通点が存在する。いずれも ATP 依存的な現象であり、それぞれのシステムにおいてリソソーム膜上に存在する受容体が機能する。これらの経路の受容体である LAMP2A と LAMP2C は *LAMP2* 遺伝子のスプライスバリエントであり、11-12 アミノ酸から成る細胞質ドメインと膜貫通ドメインが異なるのみで、その構造の大部分は共通する。

このように RDA と CMA は共通点が存在する一方で、相違点や明らかになっていない点も存在する。まず、RDA は細胞質中の核酸を分解するシステムであるが、CMA はタンパク質を分解するシステムであり、分解基質がそれぞれ異なる。さらに、CMA では基質タンパク質中の KFERQ 様モチーフが認識され、基質選択性が存在することが

明らかになっているが、RDA は RNA/DNA 中の何を認識するのか、基質選択性を有するのか不明である。それに加えて、CMA は基質タンパク質のリソソーム内へ取り込むステップにおいて、基質タンパク質が細胞質側で LAMP2A と、リソソーム内腔側で Hsc70 と結合することが必要であると考えられているが、RDA において基質をリソソーム内へ取り込むメカニズムに関する知見は少ない。

上記のように、現象としての RDA や RDA 構成分子の知見は増加しつつあるが、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。具体的に述べると、RDA が細胞質中の RNA/DNA をリソソームに直接取り込み、分解するという現象としては明らかとなっているが、RDA が核酸中の何を認識するのか、核酸をどのように認識してリソソーム内腔へと取り込んでいるのかわかっていない。

そこで、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た。

本論文の構成は以下の通りである。

## 第 1 章

本研究の背景を説明した。

## 第 2 章

本研究で用いた材料と方法について記述した。

## 第 3 章

前述したように、RDA は RNA/DNA を分解するシステムであるが、RDA が核酸中の何を認識するのか不明であった。これまでの研究から、RDA における受容体である LAMP2C は選択的に poly-G/dG と結合することを見出していたが、実際に RDA が選択的に poly-G/dG を認識するのか、詳細な解析は行われていなかった。そこで、第 3 章で、RDA によって認識される基質核酸の解析を行った。

## 第 4 章

第 3 章の研究成果から、RDA システムによる基質核酸のリソソームへ取り込みには、

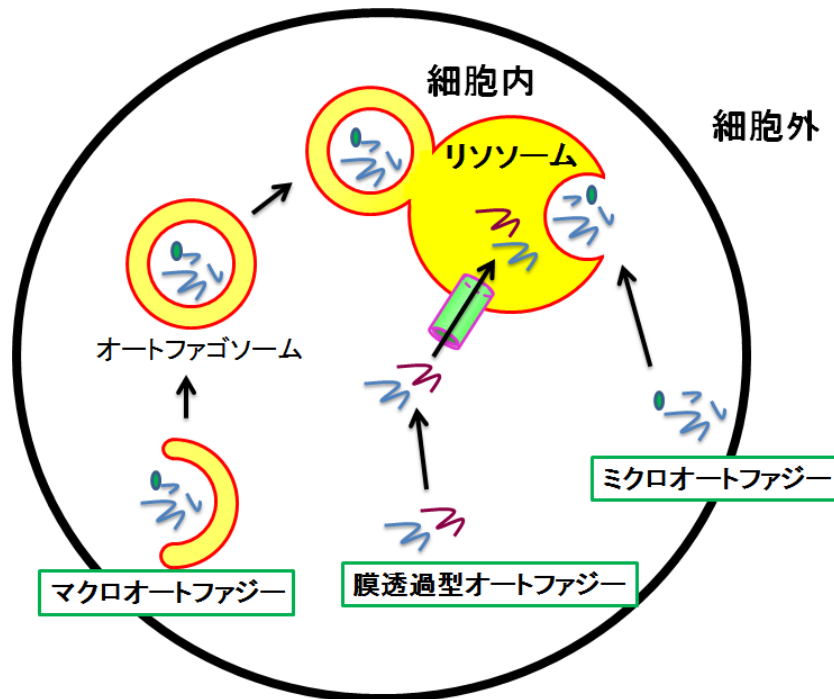
CMA と同様に細胞質側で基質核酸とリソソーム膜タンパク質との結合が必要であることが示唆された。しかし、LAMP2 KO マウスから単離したリソソームにおいても RDA 活性は残存していることが報告されており、LAMP2C 以外にも核酸と結合する因子の存在が推測されている。さらに、SIDT2 過剰発現による RNautophagy の活性化が LAMP2 KO 細胞においても観察されることが報告されている。これらのことから、SIDT2 が核酸と結合することが考えられたため、SIDT2 の核酸結合活性を解析した。

## 第 5 章

第 5 章では 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。第 3 章で、核酸中の G の存在が RDA における核酸認識に関与することを見出したことから、ハンチントン病の原因となる CAG 反復配列が異常伸長した変異型ハンチンチンの mRNA は RNautophagy の基質となると考え、RNautophagy 活性化による変異型ハンチンチンの減少効果を検証した。

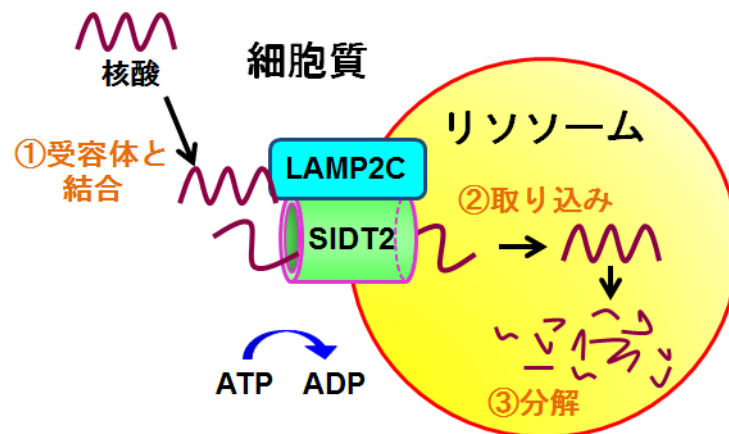
## 第 6 章

最後に、本研究で得られた知見と現在までの報告に基づき、進化やオートファジーなどの視点から、RDA のメカニズムおよび役割について、総合的に議論した。



**Fig.1-1** オートファジーには少なくとも 3 種類の形態が存在する

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 3 種類の形態が知られている。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で細胞内物質の取り込み、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、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 の存在が報告されている。



**Fig.1-2 RNautophagy/DNautophagy の概念図**

RNautophagy/DNautophagy (RDA)は細胞質中の 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。細胞質中の核酸が RDA における核酸受容体である LAMP2C の細胞質側と結合する。その後、RDA における核酸輸送体と考えられている SIDT2 が核酸を細胞質からリソソーム内腔へ輸送し、輸送された核酸はリソソーム内腔に存在する加水分解酵素によって分解される。



## 第2章 材料と方法

### ペプチドとオリゴヌクレオチド

ビオチン標識ペプチドは、Life Technologies (USA)の受託合成サービスを利用し、合成した。本論文で使用したペプチドの配列は以下の通りである。

Control peptide: [Biotin]-GSGSGSGSGS

ヒト LAMP2A peptide: [Biotin]-GSGSGSGSGSIGLKHHHAGYEQF

ヒト LAMP2C peptide: [Biotin]-GSGSGSGSGSIGRR KSRTGYQSV

オリゴヌクレオチドは、ファスマック (Japan)の受託合成サービスを利用し、合成した。本論文で使用したオリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである。

### Gymnosis アッセイ用オリゴヌクレオチド

Anti-miR-16: CGCCAAUAUUUACGUGCUGCUA

### リアルタイム PCR 用 Primer

ACTB forward: CGTGCGTGACATCAAAGAGAA

ACTB reverse: CAATAGTGATGACCTGGCCGT

GFP forward: ACGTAAACGGCCACAAGTTC

GFP reverse: GCTTCATGTGGTCGGGGTAG

### 抗体

ウェスタンブロットで使用した1次抗体は以下のものを使用した。ウサギポリクローナル抗 Lamin A 抗体 (H-102, Santa Cruz, USA, sc-20680)、ウサギポリクローナル抗 Rab 5A 抗体 (S-19, Santa Cruz, USA, sc-309)、ウサギポリクローナル抗 LIMP2 抗体 (Abcam, UK, ab176317)、ウサギモノクローナル抗 Atg5 抗体 (EPR1755(2), Abcam, UK, ab108327)、ウサギモノクローナル抗 LC3B 抗体 (D11, CST, USA, #3868)、マウスモノクローナル抗 GM130 抗体 (clone 35, BD Biosciences, USA)、マウスモノクローナル抗 COX4 抗体 (20E8C12, Life Technologies, USA, A21348)、

マウスモノクローナル抗 KDEL 抗体 (10C3、Enzo Life Science、USA、SPA-827)、マウスモノクローナル抗  $\beta$ -actin 抗体 (AC15、sigma、USA、A5441)、マウスモノクローナル抗 GFP 抗体 (B-2、Santa Cruz、USA、sc-9996)、ヤギポリクローナル抗 GAPDH 抗体 (V-18、Santa Cruz、USA、sc-20357)、ウサギポリクローナル抗 SIDT2 抗体はスクラム (Japan)の受託合成サービスを利用し、作製した。抗原として、SIDT2 の C 末端に含まれる配列である C+DLDTVQRDKIYVF ペプチドを用いた。

## マウス

本研究では、C57BL/6J マウスを使用した。また、動物実験については、マウスを用いた実験を行った国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 動物委員会の承認を受けている。

## 大腸菌培養

プラスミド DNA の構築、回収には DH5 $\alpha$  を用いた。大腸菌は LB 培地 (1% tryptone、0.5% yeast extract、1% NaCl) で培養した。Ampicillin (Wako、Japan)は 50  $\mu$ g/mL、kanamycin (Sigma、USA)は 30  $\mu$ g/mL の濃度で使用した。固体培地プレートは LB 培地に Agar を 1.5%になるように添加した。

## プラスミドベクターの作製

pGEX6p-1 (GE Healthcare、USA) ベクターの EcoR I-Xho I サイトに、マウス SIDT2 CD1 (316 a.a. – 447 a.a.)、CD1-1 (316 a.a. – 377 a.a.)、CD1-2 (378 a.a. – 447 a.a.) をコードする配列を挿入した。pEGFP N1 (Clontech、USA) ベクターの EcoR I-Xho I サイトに、pCI-neo (Promega、USA) ベクターの Xho I-Not I サイトに、コザック配列として GCCGCCACC を ATG の上流に付加したマウス SIDT2 cDNA を挿入した。pEGFP N1 (Clontech、USA) ベクターの BamH I サイトに野生型または変異型 HTT の exon1 を挿入した。さらに、この変異型 HTT を挿入したベクターを EcoR I と Not I で切断し、この断片を pTRE Tight ベクターに組み込んだ。また、全ての SIDT2 変異

体は Quik-Change Mutagenesis Kit (Agilent technologies, USA) または PrimeSTAR Mutagenesis Kit (Takara, Japan)を用いて作製した。変異体 R436S、R440S、R443S はそれぞれコドン を CGA→AGT、GGT→AGT、CGG→TCG に置換した。作製したすべての cDNA 配列はファスマック (Japan)の受託合成サービスを利用し、確認した。

#### GST/GST タグタンパク質の精製

全ての GST/GST タグタンパク質は Rosetta 2 (DE3) (Merck Millipore, USA) を用いて作製した。形質転換を行った大腸菌を、LB 培地の OD 値が 0.3 から 0.5 程度になるまで培養し、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (Wako, Japan) を終濃度 0.5 mM になるように加え、20℃、17 時間インキュベートした。インキュベーション後、大腸菌培養液を 10,000×g、25℃、3 分間遠心分離し、上清を除去した。大腸菌を Protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland) を加えた懸濁溶液 (0.05% Triton X-100 in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; DPBS (Life Technologies, USA)) で懸濁し、UR-21P (Tommy, Japan) を用いてソニケーションを行った。大腸菌溶解液を 18,000×g、4℃、10 分間遠心分離し、上清と Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, USA) を混合し、4℃、1 時間ローテーションすることによってタンパク質とビーズを結合させた。ローテーション後、9,700×g、4℃で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。次に、遠心したビーズに懸濁溶液を加え、ボルテックスを行い、9,700×g、4℃で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。この操作を 2 回繰り返した。同様の操作を洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl) を用いて 2 回繰り返した。その後、結合したタンパク質を溶出バッファー (10 mM Reduced Glutathione、50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl) を加え、4℃、10 分間ローテートした。ローテート後、Pierce Spin Cups-Paper Filter (Thermo Scientific, USA) を用いてビーズとタンパク質溶出液を分離した。溶出後、タンパク質溶出液に終濃度 1M になる様に 5M NaCl を加え、氷上で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、タンパク質溶出液を Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, 20K MWCO, 0.5 mL (Thermo Scientific, USA)、DPBS を用いて 4℃で 1

晩透析を行った。

#### マウス脳からの RNA 抽出

プルダウンアッセイや単離リソソームによる核酸取り込みアッセイで用いた基質 total RNA は 10 から 15 週齢の C57BL/6J マウスの全脳から抽出した。マウスから全脳を摘出し、そこに TRI Reagent (コスモバイオ、Japan) 5mL を加え、ポッター型ホモジナイザーを用いて完全に破碎した。破碎後、TRI Reagent 5mL を添加、混合し、室温、5 分間インキュベートを行った。その後、chloroform 2 mL を加え、混合後、室温、3 分間インキュベートした。インキュベート後、12,000×g、4℃、15 分間遠心分離を行った。上清 5 mL と isopropanol 5 mL を混合し、室温において 5 分間インキュベート後、12,000×g、4℃、10 分間遠心分離した。上清を除去し、80% ethanol 5 mL 加え、転倒混和後、18,000×g、4℃、5 分間遠心分離した。上清を完全に除去し、ミリ Q 水を用いて抽出した RNA を溶解させた。微量分光光度計 DS-11 (Denovix、USA) を用いて、RNA 濃度を 1 mg/mL に調整した。濃度調整後、アガロースゲル電気泳動を行い、RNA が精製されていることを確認した。

#### 細胞培養

Neuro2a 細胞 (ATCC) は 10% fetal bovine serum (Hyclone、USA)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco、USA) を用いて培養を行った。37℃、湿度 100%、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件下で培養を行った。

#### CRISPR-Cas9 システムを用いた *Atg5* 遺伝子欠損細胞の樹立

pX330 ベクターに *Atg5* 遺伝子 exon2 に存在する AAGATGTGCTTCGAGATGTG をターゲットとした配列を組み込んだ。

ATG5 ex2 forward: CACCGAAGATGTGCTTCGAGATGTG

ATG5 ex2 reverse: AAACCACATCTCGAAGCACATCTTC

作製した *Atg5* 遺伝子 exon2 をターゲットとした Cas9 ベクターを Neuro2a 細胞に

Lipofectamine LTX (Life Technologies, USA)を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション 4 日後、Neuro2a 細胞をディッシュから剥離し、限界希釈を行い、96well プレートに播種した。翌日、well あたり細胞数が 1 細胞となっている well をチェックし、1 週間ほど培養を行った。その後、96well プレートの細胞を 24well プレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。その後、培養のスケールを 12well プレート、3.5 cm ディッシュと大きくすることで、細胞のクローニングを行った。クローニング後、*Atg5* 遺伝子に、クローン No.1 には A または G の挿入変異が、No.2 には C または A の挿入変異が起こっていることをゲノムのシーケンスを読むことにより確認した。さらに、*Atg5* 遺伝子の発現を、ウェスタンブロット法を用いることによって確認した。

#### ゲノムの抽出・ゲノムシーケンスの確認

クローニングを行った Neuro2a 細胞を DNA 抽出バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS, 0.1 mg/mL Proteinase K, 1 µg RNase A in Saline Sodium Citrate (SSC; 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0)) で溶解し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、キアシュレッターを用いてゲノムを切断し、等量のクロロパンを混合し、15,000×g、室温で 3 分間、遠心分離を行った。上清と上清の 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウムおよび上清の 3 倍量の ethanol、20 mg/mL グリコーゲン溶液 1 µL を混合し、18,000×g、4°C、10 分間遠心を行った後、上清を除去した。沈殿物をミリ Q 水で溶解し、それをテンプレートとして、*Atg5* をターゲットにした PCR を行った。その PCR 産物をファスマック (Japan) の受託サービスを利用し、ゲノムのシーケンスを確認した。

#### プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイは、藤原らの方法を参照した (18, 19, 36)。第 3 章で行ったプルダウンアッセイは以下のとおりである。ブロッキング溶液 (3% BSA in DPBS) を用いて Streptavidin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare, USA) を 1 晩ブロ

ッキングした。ブロッキングを行ったビーズ 40  $\mu$ L と 1 nmol または 2 nmol の RNA/DNA および 8 nmol のビオチン標識ペプチドを 1 mL のインキュベーションバッファー (0.05% Triton-X 100 in DPBS) 中で混合し、ローテーターで攪拌を行いながら 4°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、9,700 $\times$ g、4°C で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。次に、遠心したビーズに 1 mL のインキュベーションバッファーを加え、ボルテックスを行い、9,700 $\times$ g、4°C で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。この操作を 2 回繰り返した。その後、プルダウンした RNA/DNA の抽出を行った。RNA の抽出は、洗浄操作を行ったビーズに TRIzol (Life Technologies, USA) または TRI Reagent を 1 mL 加え、ボルテックスを行い、5 分間、室温において静置した。静置後、chloroform 200  $\mu$ L 加え、ボルテックス後、3 分間、室温において静置した。その後、12,000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心分離を行い、上清と isopropanol 600  $\mu$ L、20 mg/mL グリコーゲン溶液 1  $\mu$ L を混合した。遠心分離を 12,000 $\times$ g、4°C で 10 分間の設定で行い、上清除去後、ミリ Q 水に溶解した。DNA の抽出は、洗浄操作を行ったビーズと DNA 抽出バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA pH 8.0、1% SDS、0.1 mg/mL Proteinase K in SSC) 100  $\mu$ L を混合し、37 °C、90 分間インキュベートした。インキュベート後、等量のクロロパンを混合し、15,000 $\times$ g、室温で 3 分間、遠心分離を行った。上清と上清の 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウムと上清の 3 倍量の ethanol、20 mg/mL グリコーゲン溶液 1  $\mu$ L を混合した。その後、17,730 $\times$ g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を除去後、ミリ Q 水に溶解した。抽出した DNA および RNA は OD260 を計測することによって定量した。

第 4 章で行ったプルダウンアッセイは以下のとおりである。ブロッキング溶液 (3% BSA in DPBS) を用いて Glutathione Sepharose 4B を 1 晩ブロッキングした。ブロッキングを行ったビーズ 20  $\mu$ L と 1  $\mu$ g のマウス脳由来 total RNA/プラスミド DNA (pCI neo) および 8 nmol の GST/GST タグタンパク質を 1 mL のインキュベーションバッファー (0.05% Triton-X 100 in DPBS) 中で混合し、ローテーションを行いながら 4°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、9,700 $\times$ g、4°C で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。次に、遠心したビーズに 1 mL のインキュベーションバッファーを加

え、ボルテックスを行い、 $9,700\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で 10 秒間遠心分離を行い、上清を廃棄した。この洗浄操作を 2 回繰り返した。その後、プルダウンした RNA/DNA の抽出を行った。RNA/DNA の抽出は第 3 章の方法と同様である。

#### リソソームの単離

リソソームの単離、そして単離リソソームを用いた取り込みアッセイは藤原らの方法を参照した (18, 19, 36)。リソソームの単離は Lysosome Enrichment Kit for Tissues and Cultured Cells (Thermo Scientific, USA)を用いて行った。10 から 12 週齢の C57BL/6J マウスの全脳または培養細胞からリソソームを単離した。マウス全脳または培養細胞にキットに添付の A バッファー 2 mL を加え、ポリトロンホモジナイザー PT1200E (KINEMATICA, Switzerland)を用いてホモジナイズを行った。ホモジナイズ溶液とキットに添付の B バッファー 2 mL を混合し、 $500\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離した。超遠心管に 30%グラジエント溶液、27%グラジエント溶液、23%グラジエント溶液、20%グラジエント溶液、17%グラジエント溶液を下から重層し、その上に遠心後の上清 3 mL と OptiPrep 1 mL の混合溶液を重層した。その後、 $145,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、2 時間、超遠心分離を行った。グラジエント溶液の上層 3 mL と DPBS 5 mL を混合し、 $18,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、30 分間遠心分離し、上清を廃棄した。ペレットを A バッファーと B バッファーの混合溶液 1 mL に懸濁し、再び  $18,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、30 分間遠心分離した。上清を廃棄後、0.3 M sucrose に懸濁した。

#### 単離リソソームによる核酸取り込みアッセイ

単離リソソームと 100 または 200 pmol の RNA/DNA を ATP 溶液 (10 mM ATP、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、2 mM Phosphocreatine、50  $\mu\text{g/mL}$  Creatine PhosphoKinase)の存在下、または非存在下で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5 分間インキュベートした。インキュベート後、遠心分離を行い、上清と沈殿に分けた。上清側およびペレット側の RNA/DNA は TRI Reagent または DNA 抽出バッファーを用いて抽出した。抽出した RNA および DNA はアガロースゲル電気泳動または  $\text{OD}_{260}$  を計測することによって定量した。

## 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡による観察は藤原らの方法を参考に行った (19)。単離したリソソーム 50 から 100  $\mu\text{g}$  と 0 または 2 nmol の RNA (poly-G) を混合し、ATP バッファの存在下で、37°C、5 分間インキュベートを行った。インキュベート後、17,730 $\times$ g、4°C で 3 分間遠心分離し、上清を除去後、固定液 (0.1% Glutaraldehyde、4% Paraformaldehyde in Phosphate buffer pH 7.2) を加え、4°C で 1 晩、固定を行った。固定後、0.1M phosphate buffer によって、2 回洗浄後、50%、70%、90% ethanol を用いて 5 分間、それぞれ 1 回ずつ、95% ethanol を用いて 10 分間、3 回、氷上においてインキュベートすることによって脱水処理を行った。脱水後、95% ethanol と LR White 樹脂 (日新 EM、Japan) の 1:1 混合溶液において、1 時間、LR White 樹脂溶液において 4 時間インキュベートした。その後、54°C、24 時間、加熱処理を行い、樹脂を重合させた。樹脂包埋したサンプルから 100 nm の切片を作製し、コロジオン膜貼付 400 メッシュニッケルグリッドに切片を拾った。この切片を 20  $\mu\text{M}$  のビオチン標識オリゴヌクレオチド DNA プローブ ([Biotin]- AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCCCCCCCCCCCCC) 溶液で室温、1 晩インキュベートした。10 nm 金粒子標識ストレプトアビジン (Sigma、USA) で標識し、その後、Tecnai Spirit 透過型電子顕微鏡を用いて 80 kV で観察した。

## Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色

精製タンパク質 1  $\mu\text{g}$  を SDS-PAGE を用いて分離し、ポリアクリルアミドゲルを CBB 染色液 (0.04% CBB G250、60% 過塩素酸) を用いて 30 分間染色した。染色後、染色したゲルはミリ Q 水を用いて脱染色した。

## ウェスタンブロット

単離したリソソームを Protease inhibitor cocktail を含む溶解バッファ (3% SDS、5% glycerol、10 mM Tris-HCl pH7.8、0.02% BPB、2% 2-mercaptoethanol) を用いて溶解した。同量のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、0.22 $\mu\text{m}$  PVDF メンブレン (Bio Rad、USA) に転写した。転写後、メンブレンをブロッキングバッファ (1%



nonfat milk in PBS-T (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4, 0.1% Tween 20) で1時間、室温でブロッキングを行い、3% BSAを含むDPBSで希釈した1次抗体で4℃、1晩インキュベートした。インキュベーション後、PVDFメンブレンをPBS-Tで洗浄し、HRP標識2次抗体をPBS-Tを用いて1万倍で希釈した溶液で室温、1時間インキュベートした。インキュベート後、PVDFメンブレンを洗浄し、ImmunoStar Zeta または ImmunoStar LD (Wako, Japan) を用い、FluorChem 8000 (Alpha Innotech, USA) によって検出した。解析は FluorChem software (Alpha Innotech, USA)を用いた。

#### Live cell imaging

Neuro2a 細胞を  $\mu$ -dishes 35-mm (ibidi, Germany)に播種した。24時間後、それぞれのベクターを 1.8  $\mu$ g、polyethyleneimine 5.4  $\mu$ g、Opti MEM 250  $\mu$ L を混合し、室温、20 分間インキュベートし、細胞を処理した。翌日、LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fisher, USA) を培地に終濃度 100 nM になるように加え、30 分間のインキュベーション後、細胞を FV10-i (Olympus, Japan)を用いて観察した。

#### Gymnosis アッセイ

細胞外から細胞内への核酸の取り込みは高橋らの方法を参考に行った (37)。すなわち、Neuro2a 細胞を  $5.0 \times 10^5$  / dish ずつ  $\mu$ -dishes 35-mm (ibidi, Germany)に播種した。24時間後、それぞれのベクターを 1.8  $\mu$ g、polyethyleneimine 5.4  $\mu$ g、Opti MEM 250  $\mu$ L を混合し、室温、20 分間インキュベートし、細胞を処理した。トランスフェクション 24 時間後、培地交換を行い、2'-O-メチル化し、Alexa568 標識した miR-16 に対するアンチセンスオリゴを 500 nM になるように加えた。24 時間後、培地交換を行い、FV10-i を用いて観察した。

#### 内在性 RNA 分解測定

細胞内 RNA 分解は Contu らの方法を参照した (38)。Neuro2a 細胞を 24 well プレ

ートに  $1.0 \times 10^5$ /well ずつ播種した。24 時間後、それぞれのベクターを 2.5 ng、pCI-neo ベクター 97.5 ng、polyethyleneimine 0.4  $\mu$ g、Opti MEM 50  $\mu$ L を混合し、室温、20 分間インキュベートし、細胞を処理した。翌日、0.15  $\mu$ Ci/mL [ $^3$ H]-uridine (PerkinElmer, USA) を培地に添加し、RNA を標識した。24 時間後、細胞を洗浄し、5 mM uridine (Wako, Japan) を加えた培地に交換した。0 時間、24 時間のインキュベーション後、細胞をトリプシンで剥離し、酸不溶性の radioactivity を Tri-Carb 3100TR Low Activity Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer, USA) を用いて測定した。

#### フィルタートラップアッセイ

Neuro2a 細胞を 24well プレートに  $1.0 \times 10^5$ /well ずつ播種した。24 時間後、それぞれのベクターを HTT-Q22 または HTT-Q145 を 20 ng、pCI-neo ベクターを 260 ng、polyethyleneimine 0.9  $\mu$ g、Opti MEM を 50  $\mu$ L を混合し、室温、20 分間インキュベートし、細胞を処理した。48 時間後、細胞を Protease inhibitor cocktail を含む溶解バッファー (3% SDS、5% Glycerol、10 mM Tris-HCl pH7.8、0.02% BPB、2% 2-mercaptoethanol) を用いて溶解し、シリンジを用いてゲノムを切断した。酢酸セルロースメンブレン (GE Healthcare, USA) を希釈バッファー (1% SDS in DPBS) に浸漬後、Filter Paper, 60 (Bio Rad, USA) を BIO-DOT APPARATUS (Bio Rad, USA) にセットした。希釈バッファーで希釈したサンプルを well にアプライし、アスピレーターを用いてフィルトレーションした。フィルトレーション後、0.1% SDS を含む DPBS 200  $\mu$ L をアプライし、アスピレーターを用いて吸引することで、well の洗浄を行った。この操作をもう 1 度繰り返した。その後、メンブレンを希釈バッファーで 5 分間、インキュベートした。インキュベート後、1% nonfat milk を含む PBS-T によって室温、1 時間、ブロッキングを行い、3% BSA を含む DPBS で希釈したマウスモノクローナル抗 GFP 抗体で 4°C、1 晩インキュベートした。インキュベーション後、PVDF メンブレンを PBS-T で洗浄し、HRP 標識 2 次抗体を PBS-T を用いて 1 万倍で希釈した溶液で室温、1 時間インキュベートした。インキュベート後、PVDF メンブレンを洗浄し、ImmunoStar Zeta (wako, Japan) を用い、FluorChem 8000 (Alpha Innotech, USA)

によって検出した。解析は FluorChem software (Alpha Innotech、USA) を用いた。

#### 培養細胞からの RNA の抽出

24well プレーットの Neuro2a 細胞から TRI Reagent を用いて RNA を抽出した。TRI Reagent を well あたり 500  $\mu$ L 加え、室温で 5 分間インキュベートした。その後、chloroform を 100  $\mu$ L 加え、室温で 3 分間インキュベート後、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心分離を行った。遠心後、上清 200  $\mu$ L と isopropanol 300  $\mu$ L、20 mg/mL グリコーゲン溶液 1  $\mu$ L を混合し、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離を行った。遠心後、上清を廃棄し、80% ethanol を 500  $\mu$ L 加え、7,500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離を行った。上清を除去後、風乾を行い、ミリ Q 水 10  $\mu$ L 加え、60 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることによって、抽出した RNA を溶解した。

#### cDNA 合成

cDNA は PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA、Japan) を用いて合成した。抽出した RNA 500 ng、gDNA Eraser Buffer 1  $\mu$ L、gDNA Eraser 0.5  $\mu$ L を加え、ミリ Q 水を用いて 5  $\mu$ L に合わせた。42 $^{\circ}$ C で 2 分間インキュベート後、PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 2  $\mu$ L、Prime Script RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ L、RT Primer Mix 0.5  $\mu$ L、ミリ Q 水 2  $\mu$ L を混合し、37 $^{\circ}$ C、15 分間インキュベートした。その後、85 $^{\circ}$ C で 5 秒間インキュベートすることによって、酵素を不活化した。

#### Real Time PCR

2 step で行った Real Time PCR は以下の通りである。合成した cDNA を、ミリ Q 水を用いて 10 倍希釈を行った。TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH plus) 10  $\mu$ L、10  $\mu$ M PCR Forward と Reverse Primers 0.8  $\mu$ L、10 倍希釈 cDNA template 2  $\mu$ L、ミリ Q 水 7.2  $\mu$ L を混合した。CFX96 Touch リアルタイム解析システム (Bio Rad、Japan) を用いて測定した。反応条件は以下の通りである。95 $^{\circ}$ C、30 秒後、95 $^{\circ}$ C、5 秒、60 $^{\circ}$ C、30 秒を 40 cycle 行い、Melt Curve を測定した。ACTB を内部標準とする  $2^{-\Delta\Delta}$

Ct法を用いて定量を行った。以下の式により  $\Delta \Delta Ct$  を算出した。

$\Delta Ct = \text{ターゲット遺伝子 Ct 値} - \text{内部標準遺伝子 Ct 値}$

$\Delta \Delta Ct = \text{それぞれのサンプルの } \Delta Ct - \text{コントロールの } \Delta Ct$

1 step で行った Real Time PCR は以下の通りである。抽出した RNA を、ミリ Q 水を用いて 20 ng/ $\mu$ L に濃度調整を行った。One Step SYBR RT-PCR Buffer 4 を 5  $\mu$ L、TaKaRa Ex Taq HS Mix 0.6  $\mu$ L、Prime Script PLUS RTase Mix 0.2  $\mu$ L、10  $\mu$ M PCR Forward と Reverse Primers 0.4  $\mu$ L、20 ng/ $\mu$ L total RNA template 2  $\mu$ L、ミリ Q 水 1.8  $\mu$ L を混合した。測定は CFX96 Touch リアルタイム解析システムを用いた。反応条件は以下の通りである。42°C 5 分、95°C 10 秒後、95°C 5 秒、60°C 30 秒、を 40 cycle 行い、Melt Curve を測定した。定量は pEGFP N1 ベクターを template にし、その希釈系列を作製することによって検量線を作製し、dish あたりの mRNA 量を算出することによって行った。

#### 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間比較は Student's t-test、2 群以上の比較は Turkey's test を用いて行った。本研究において、P 値が 0.05 未満のことを統計的に有意な差が存在するものとした。

### 第 3 章 RNautophagy/DNautophagy によって認識される核酸の特徴の解析

#### 序

第 1 章でも述べたように、RDA は RNA/DNA を分解するシステムであるが、RDA が核酸中の何を認識するのか不明であった。そこで、博士前期課程において、RDA システムの受容体である LAMP2C と結合する核酸の特徴を解析した。LAMP2C は 1 回膜貫通タンパク質であり、その構造の大部分をリソソーム内腔に有する一方、C 末端側の 11-12 アミノ酸は細胞質側に露出している。この LAMP2C の細胞質側配列のペプチドは核酸と結合し、核酸との結合を調べるツールとして有用であることが示されている (18, 19, 36)。そこで、このペプチドを用いて LAMP2C の核酸結合活性を解析した。これまでの研究により、TATA-binding protein や poly(rC)-binding protein ファミリーなどがそれぞれ poly-T や poly-C など特定の塩基と高い親和性を持つことが報告されている (39, 40)。これらの報告を参考に、LAMP2C も特定の塩基に対して親和性を有するか、検討した。その結果、LAMP2C の核酸結合ドメインは単一の塩基からなる 1 本鎖 RNA/DNA (ssRNA/DNA) である poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC と結合しないのに対し、poly-G/dG とは結合するということを発見した (Fig. 3-1)。poly-G/dG は LAMP2C のスプライスバリエントである LAMP2A の細胞質側配列ペプチドとは結合しなかったことから、LAMP2C と poly-G/dG との結合は poly-G/dG による非特異的な結合ではないことも明らかとなった。この結果と一致して、LAMP2C ペプチドは poly-A/dA および poly-U/dT から成る 2 本鎖 RNA/DNA (dsRNA/DNA) である poly-(A:U)、poly-(dA:dT) と結合しない一方で、poly-(G:C)/(dG:dC) とは結合するということも見出した (Fig. 3-2)。さらに、LAMP2C の核酸結合ドメインと poly-dG との結合は dG が 4 塩基以上連続した ssDNA において観察されること (Fig. 3-3A, B) やこの LAMP2C と poly-dG の結合に DNA のメチル化が影響を与えないこと (Fig. 3-4A-C)、

反復した GGGGCC 配列を含む RNA が LAMP2C と結合することも見出した (Fig. 3-5A-C)。しかし、実際に poly-G/dG が RDA によって認識されるのか、詳細な解析まで至らなかったため、本章において、RDA によって認識される基質核酸の解析を行った。

## 結果

### Poly-G/dG はリソソームに取り込まれる

RDA によって poly-G/dG が選択的に認識されるのか解析するため、単離リソソームによる核酸取り込みアッセイを行った。これまでの報告から、単離したリソソームが ATP 依存的に基質 RNA/DNA をリソソーム内腔に取り込むことが報告されている (18, 19)。ここで、単離リソソームによる核酸取り込みアッセイの概要を説明したい (Fig. 3-6A)。まず、単離したリソソームと基質となるオリゴヌクレオチドを混合し、ATP 存在下または非存在下で 37 °C、5 分間インキュベートする。インキュベート後、遠心分離によって、上清とペレット (リソソーム) に分離し、それぞれのサンプルの核酸量を、アガロースゲル電気泳動を用いて解析する。RDA は ATP 依存的に機能するので、これらのシステムの基質となる RNA/DNA は ATP 依存的に、リソソームに取り込まれる。

まず、この核酸取り込みアッセイが機能するのか確認を行った。超遠心法によって単離したリソソームの精製度をそれぞれのオルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法によって解析した。その結果、調製したリソソーム画分には、核、ゴルジ体、ミトコンドリア、細胞質、小胞体、エンドソームが含まれず、リソソームが単離・濃縮されていることを確認した (Fig. 3-6B)。次に、単離したリソソーム膜が維持されているか検討した。基質核酸を混合せずにリソソームを 37°C で 5 分間インキュベートを行った後、上清とリソソームを分離した。このリソソーム外液と total RNA を混合し、5 分間インキュベートを行ったが、RNA は分解されなかった (Fig. 3-6C)。しかし、Triton X-100 を用いてリソソームを溶解させた溶液と total RNA を混合すると、total RNA は分解された (Fig. 3-6D)。これらのことは単離したリソソーム膜が損傷を受けていないことを示している。さらに、この単離したリソソームが ATP 依存的に基質核酸を取り込むのか確認を行った。これまでに、マウス脳由来 total RNA が RNautophagy の基質になることが報告されている (19)。そこで、total RNA を基質にして単離リソソームによる核酸取り込みアッセイを行った結果、total RNA が ATP 依存的にリソソームに取り込まれた (Fig. 3-6E)。以上より、このアッセイ系が機能す

ることが証明されたと考えた。

次に、RDA が poly-G/dG を選択的に認識するのか、単離リソソームによる核酸取り込みアッセイを用いて検討した。その結果、ssRNA/DNA である poly-G/dG は ATP 依存下ではリソソーム外液中では検出されず、リソソーム側で検出された (Fig. 3-7A-D)。これに対して、poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC は ATP 存在下においても上清画分の核酸量は変化せず、沈殿画分では ATP 存在下においても検出されなかった。これらの結果は、poly-G/dG は ATP 依存的にリソソームに取り込まれるが、poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC は ATP 存在下でもリソソームに取り込まれないことを示している。

さらに、poly-G がリソソーム内腔に取り込まれていることをより明確にするため、電子顕微鏡を用いて解析を行った。poly-G と混合したリソソームを ATP 存在下でインキュベートし、遠心分離による上清の除去後、リソソームを化学固定した。その後、樹脂包埋を行い、100 nm の超薄切片を作製した。リソソームの直径は 100 nm から 1  $\mu$ m であるので、この処理によってリソソームは切断され、リソソームの断面が露出した超薄切片が作製される。その後、ビオチン標識した poly-dC を用いて、切片上に露出している poly-G とハイブリダイズさせた後、金粒子標識ストレプトアビジンを用いて検出した。その結果、poly-G を取り込ませたサンプルのリソソーム内腔に金粒子が観察されたが (Fig. 3-7E)、poly-G を取り込ませていないサンプルには金粒子は認められなかったことから (Fig. 3-7F)、poly-G がリソソームの内腔に取り込まれることがわかった。

以上の結果から、poly-G/dG が RDA の基質核酸になる一方で、poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC は RDA の基質にならないと結論した。

### LAMP2C は連続した G と結合する

博士前期課程に行った研究により、LAMP2C の核酸結合ドメインと poly-dG との結合は、dG が 4 塩基以上連続した ssDNA において観察されることがわかっているが (Fig. 3-3A, B)、ssRNA における LAMP2C と poly-G との結合の最小塩基数は不明であった。そこで、LAMP2C と結合する poly-G の最小塩基数を検討した。その結果、ssDNA と



は異なり 4 塩基の poly-G は LAMP2C ペプチドと結合しないが、6 塩基以上の poly-G は結合するという事を見出した (Fig. 3-8A, B)。このことから、GGGGGG 配列は poly-G と LAMP2C ペプチドとの結合に必要十分であると考えられた。

### **DNA 損傷は LAMP2C と DNA の結合に影響を与えない**

メチル化などの核酸の修飾は制限酵素など一部の核酸結合タンパク質の核酸結合活性に影響を与えることが知られている (41)。そこで、DNA の修飾や損傷が LAMP2C と DNA との結合に与える影響を調べた。博士前期課程に行った解析により、DNA のメチル化は LAMP2C と DNA との結合に与えないことがわかっている (Fig. 3-4A-C)、本論文では、DNA 損傷がこの結合活性に影響を与えるのか検討した。DNA を過酸化水素と鉄 (II)イオンと混合すると、フェントン反応が発生し、DNA にニックが入ることが知られている (42)。この方法によって作製した一本鎖切断された DNA を使用して LAMP2C との結合を解析した。その結果、DNA の一本鎖切断は、DNA と LAMP2C との結合に影響を与えなかった (Fig. 3-9)。

### **DNA の高次構造は LAMP2C と DNA の結合活性に影響を与える**

一部の核酸結合タンパク質は核酸中の特定の構造を認識し、結合することが報告されている (43)。そのため、DNA の構造が LAMP2C の核酸結合活性に与える影響を解析した。中心に dG の 5 連続した配列が存在する DNA を 95℃で 2 分間加熱した後、氷上で急冷した核酸と、室温まで徐々に冷却した核酸を用意した (Fig. 3-10A)。この処理により、急冷した DNA はその構造が解かれ、1 本鎖構造となるが、アニールした DNA は固有の立体構造を形成する。この 2 種類の構造が異なる DNA を使用し、同様にしてプルダウンアッセイを行った。その結果、急冷処理によって、この DNA 配列と LAMP2C の結合活性が約 50%に低下した (Fig. 3-10B)。この結果から、核酸の高次構造が LAMP2C の核酸結合活性に影響を与えることがわかった。

### 核酸結合活性を有する LAMP ファミリータンパク質も基質選択性を有する

LAMP2C は LAMP ファミリーに属しており、このファミリーは 1 回膜貫通型タンパク質であり、構造の大部分がリソソームの内腔に存在するという共通した特徴を有する (44)。LAMP ファミリータンパク質には、ヒトにおいて LAMP1、LAMP2A、LAMP 2B、LAMP 2C、LAMP3 (DC-LAMP)、LAMP4 (CD68)などが存在し、この中の LAMP1、LAMP2B、LAMP2C、LAMP4 は RNA/DNA 結合活性を有していることが報告されている (19, 36)。そこで、これらのタンパク質が LAMP2C 同様に選択性を有するのか、細胞質ドメインの配列をビオチン標識したペプチドを用いたプルダウンアッセイによって解析した (Fig. 3-11A)。まず、これらのペプチドが RNA 結合活性を有するか検討したところ、これまでの報告の通り (36)、LAMP1、LAMP2B、LAMP2C、LAMP4 は核酸結合活性を有することが確認された (Fig. 3-11B)。また、プルダウンされた RNA 量を比較すると、LAMP2C > LAMP1 > LAMP4 > LAMP2B の順であり、核酸に対する親和性は LAMP ファミリー間で異なることが示唆された。次に、単一の塩基からなる ssRNA を使用し、プルダウンアッセイを行った結果、LAMP1、LAMP2B、LAMP3、LAMP4 は LAMP2C と同様に poly-A、poly-U、poly-C とは結合しない一方、poly-G とは結合することを見出した (Fig. 3-11C)。このことから、核酸結合活性を有する LAMP ファミリータンパク質は LAMP2C と同様の選択性を有することがわかった。

## 考察

これまでの研究により、RDA における核酸受容体である LAMP2C の核酸結合ドメインは poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC と結合しないのに対し、poly-G/dG とは結合するというを示していた。しかし、実際に RDA が poly-G/dG を認識するのか、詳細な解析は行われていなかった。本研究によって、poly-A/dA、poly-U、poly-dT、poly-C/dC は単離したリソソームに取り込まれないという一方で、poly-G/dG が RDA の基質となることを明らかにした。さらに、LAMP2C の細胞質ドメインと結合する ssRNA の最小単位の配列 GGGGGG の同定に成功した。これらの結果は、RDA は少なくとも核酸のリソソームへの取り込みの段階において基質選択性を有しており、RDA は非選択的な RNA/DNA 分解システムではないことを示している。

### LAMP2C の核酸結合様式と G の関係

LAMP2C の細胞質側領域は RNA 結合モチーフの 1 つであるアルギニンリッチモチーフを有しており、LAMP2C はこのモチーフを介して核酸と結合することが報告されている (36)。アルギニンリッチモチーフにおけるアルギニン残基は、多くの場合、G/dG の主溝 (major groove) 側と水素結合を形成する (45–47)。LAMP2C ペプチドが G/dG を含む核酸と結合するという本研究結果と一致する。しかし、アルギニン残基は核酸のリン酸骨格と水素結合を形成することもできるので、LAMP2C のアルギニンリッチモチーフは G を含まない核酸とも結合する可能性も十分に考えられる。

### LAMP2C の核酸結合活性と核酸構造の関係

博士前期課程において、反復した GGGGCC 配列を含む RNA は LAMP2C と結合するという結果を得ている (Fig. 3-5)。しかし、この反復配列は poly-G の最小結合配列である GGGGGG を含んでいない。これらの結果は LAMP2C と核酸との結合に核酸の高次構造などの他の要因も影響を与えることを示唆している。GGGG/d(GGGG)配列を含むような G/dG リッチ配列は分子間または分子内においてグアニン四重鎖構造を形

成し (48–50)、反復した GGGGCC 配列もグアニン四重鎖構造を形成する (51)。そのため、グアニン四重鎖構造は LAMP2C の細胞質ドメインと結合し、RDA の基質選択性に関与している可能性が考えられる。

さらに、グアニン四重鎖構造に加え、核酸はヘアピン構造やシュードノット構造などの多様な構造を形成できることや、アルギニンリッチモチーフは核酸中の G が 1 つでも存在すればその核酸と結合できることから、核酸の構造が LAMP2C と核酸との結合に影響を与えていることも想定できる。実際に、加熱急冷処理によって、LAMP2C と DNA の結合活性は低下した (Fig. 3-10)。このことは、核酸の高次構造が LAMP2C との結合活性に影響を与えることを示している。今回使用した DNA は、連続した dG 配列を中心としたヘアピン構造を形成していることが予想され、ヘアピン中に dG が存在すると、dG が露出し、LAMP2C と結合しやすくなっていると推察している。円二色性スペクトル測定装置などを用いた、LAMP2C と結合する核酸の立体構造の詳細な解析は今後の課題である。

### LAMP ファミリータンパク質の核酸結合活性

LAMP2C は RDA における核酸受容体のひとつとして機能することが示されているが、LAMP2 KO マウスから単離したリソソームでも RDA 活性が完全には消失していないことが報告されている (18, 19)。このことから、RDA には LAMP2C 非依存的な経路が存在することが示唆される。本研究によって、LAMP2C ペプチドと結合した核酸はリソソームに取り込まれるのに対して、LAMP2C ペプチドと結合しなかった核酸はリソソームに取り込まれないことが示された。このことから、LAMP2C 非依存的な経路においても LAMP2C と類似した性質を有する核酸結合タンパク質の存在が想定された。

LAMP2C は LAMP ファミリーに属しており、LAMP ファミリータンパク質には、ヒトにおいて LAMP1、LAMP2A、LAMP2B、LAMP2C、LAMP3 (DC-LAMP)、LAMP4 (CD68)などが存在する。LAMP1、LAMP2B、LAMP2C、LAMP4/CD68 は RNA/DNA 結合活性を有していることが報告されており (36)、本研究でも同様の結果を得た (Fig.

3-8B)。さらに、選択性を解析すると、核酸結合活性を有する LAMP ファミリータンパク質は LAMP2C と同様に、選択的に poly-dG と結合することを見出した (Fig. 3-11C)。興味深いことに、poly-G を用いたプルダウンアッセイでは、これまで核酸との結合が報告されていなかった LAMP3 も核酸と結合し、CMA のタンパク質受容体である LAMP2A 以外の LAMP ファミリータンパク質は核酸と結合活性を有することがわかった。LAMP2A は LAMP ファミリータンパク質内で唯一、細胞質ドメインにアルギニン残基を有していないことは、LAMP ファミリータンパク質はアルギニンリッチモチーフを介して核酸と結合することを支持する結果である。また、LAMP2A 以外の LAMP ファミリータンパク質は LAMP2C 同様の核酸結合活性および選択性を有することから、これらのタンパク質は RDA における RNA/DNA 受容体の候補であると考えられる。

### LAMP2C の核酸結合活性と DNA のメチル化の関係

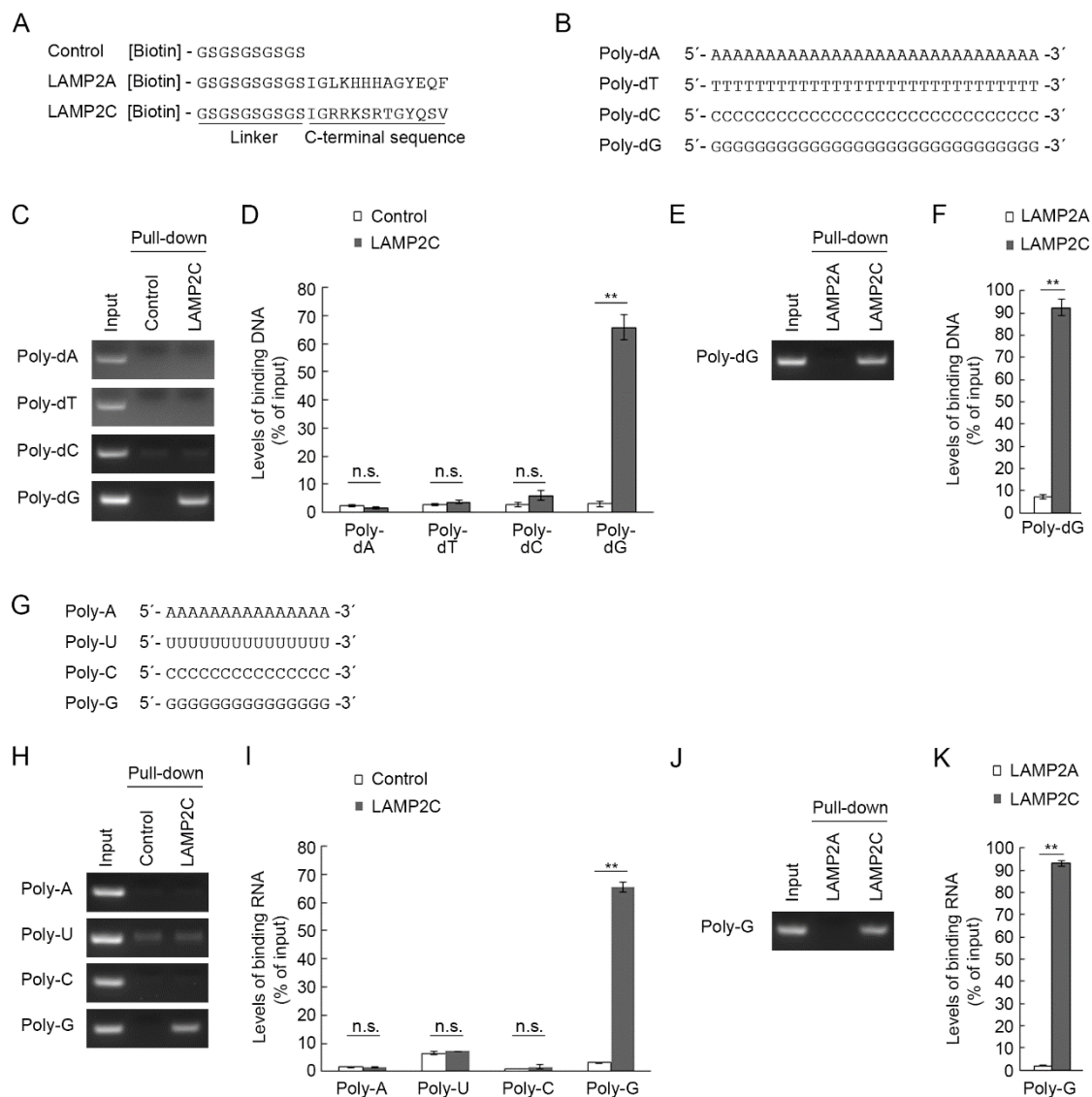
哺乳類では約 60% から 90% の CpG サイトがメチル化されている一方、ウイルスやバクテリア、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の CpG サイトはメチル化されていないものが多い (52)。また、mtDNA やメチル化されたプラスミド DNA は少なくとも *in vitro* において、DNautophagy の基質となることが明らかにされている (18)。博士前期課程の研究成果から、DNA のメチル化は LAMP2C と DNA の結合に影響を与えないことが示されたが、このことは、DNautophagy はリソソームへの取り込みのステップで自己 DNA と非自己 DNA の区別しないことを示唆している。DNA が細胞質中に放出されることは、感染時などの特殊な条件であり (53, 54)、通常、メチル化の有無にかかわらず細胞質中に DNA は存在しない。そのため、mtDNA やウイルス DNA が DNautophagy の基質であった場合、細胞質中から DNA を除去し、正常な状態に戻す仕組みと推測される DNautophagy がメチル化、非メチル化を区別することは重要ではないのかもしれない。

### RDA と疾患の関係

博士前期課程に行った研究によって、反復した GGGGCC 配列からなる RNA は

RNautophagy の基質となることを見出した (Fig. 3-5)。最近の研究により、9 番染色体 open reading frame 72 (C9ORF72) 遺伝子の exon 1a と 1b の間に存在する GGGGCC の反復配列の異常伸長は前頭側頭型認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の原因となることが報告されている (55, 56)。ALS は 1 次運動神経に影響を与える致死的な神経変性疾患である (57, 58)。C9ORF72 が関連する ALS の病理学的知見において、異常伸長した GGGGCC 反復配列を含む pre-mRNA は運動神経に対して毒性を有すると考えられている (59, 60)。また、LAMP2C は神経細胞において高く発現していることが報告されている (19)。以上の研究成果から、RNautophagy は異常伸長した GGGGCC 反復配列を含む pre-mRNA の分解に関与することが予想される。

本章では、核酸中の G/dG は RDA に認識されることを示した (Fig. 3-10)。さらに、RDA が *in vitro* において基質選択性を有することも明らかにすることができた。RDA の基質となる核酸、特に基質とならない核酸を具体的に示したのは初めての成果である。RDA の基質選択性を考慮すると、RDA は細胞内の内在性 RNA や外来性 RNA/DNA、毒性を有する疾患関連 RNA などの分解に寄与する可能性が考えられる。

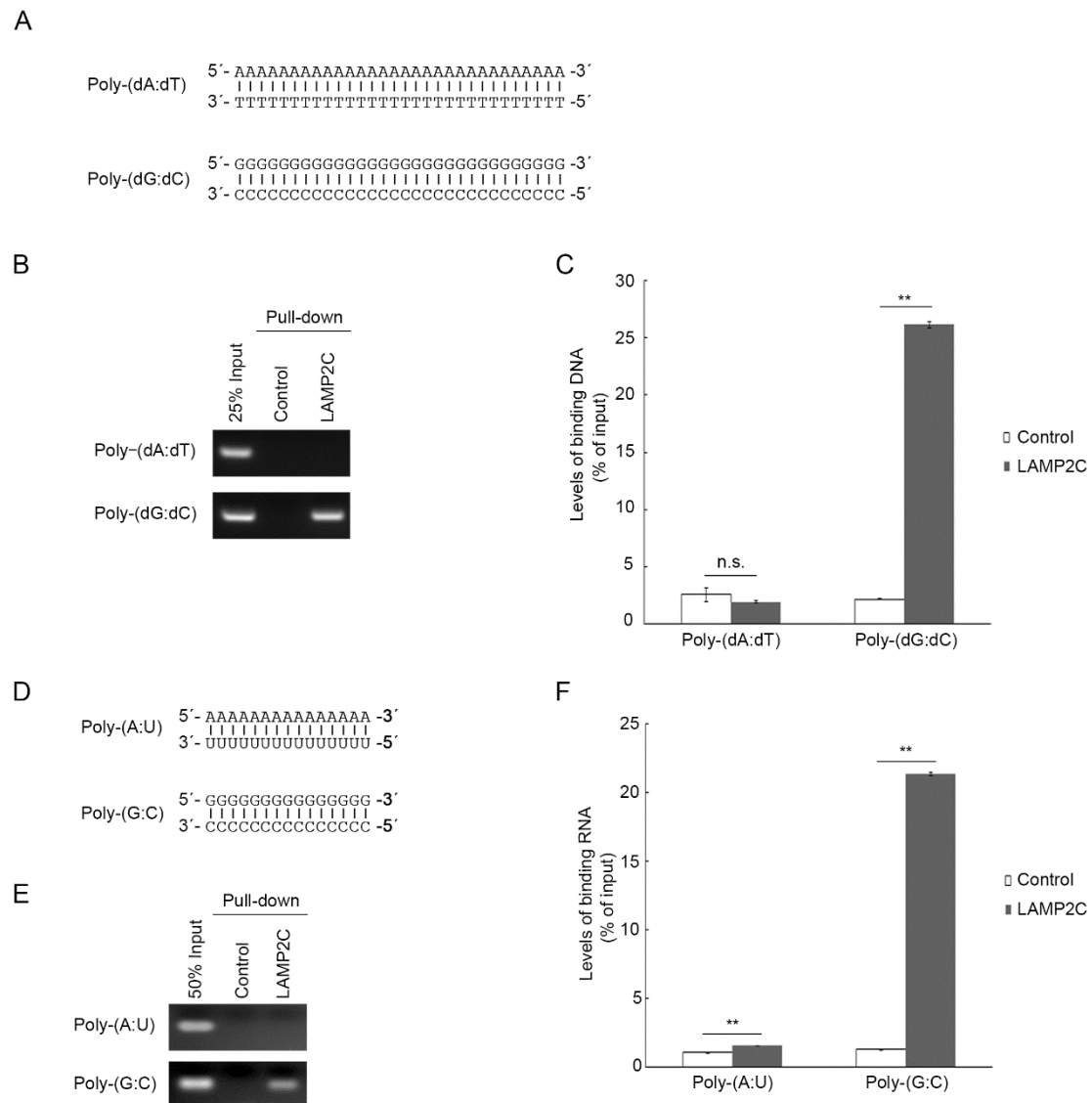


**Fig.3-1 LAMP2C ペプチドは poly-G/dG と結合する**

(A) プルダウンアッセイに用いたペプチドの模式図 (B) プルダウンアッセイに用いた ssDNA の配列 (C-F) プルダウンアッセイを 1 nmol の ssDNA (B) とビオチン標識ペプチド (A) を用いて行った。プルダウンした核酸の溶出後、ssDNA を ssDNA の相補鎖とアニーリングし、プルダウンした DNA 量をアガロースゲル電気泳動と EtBr 染色法を用いて解析した (C, E)。結合した DNA 量は OD<sub>260</sub> で定量した (D: n=4, F: n=3)。 (G) プルダウンアッセイに用いた ssRNA の配列 (H-K) プルダウンアッセイを 2 nmol の ssRNA (G) とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした核酸の溶出後、

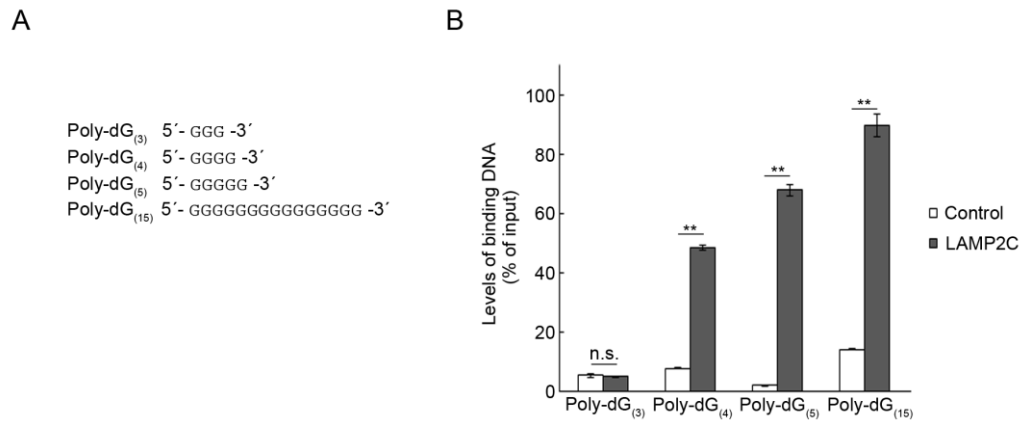
ssRNA を ssRNA の相補鎖とアニーリングし、プルダウンした RNA 量をアガロースゲル電気泳動と EtBr 染色法を用いて解析した (H, J)。結合した RNA 量は OD<sub>260</sub> で定量した (I, K: n=3)。





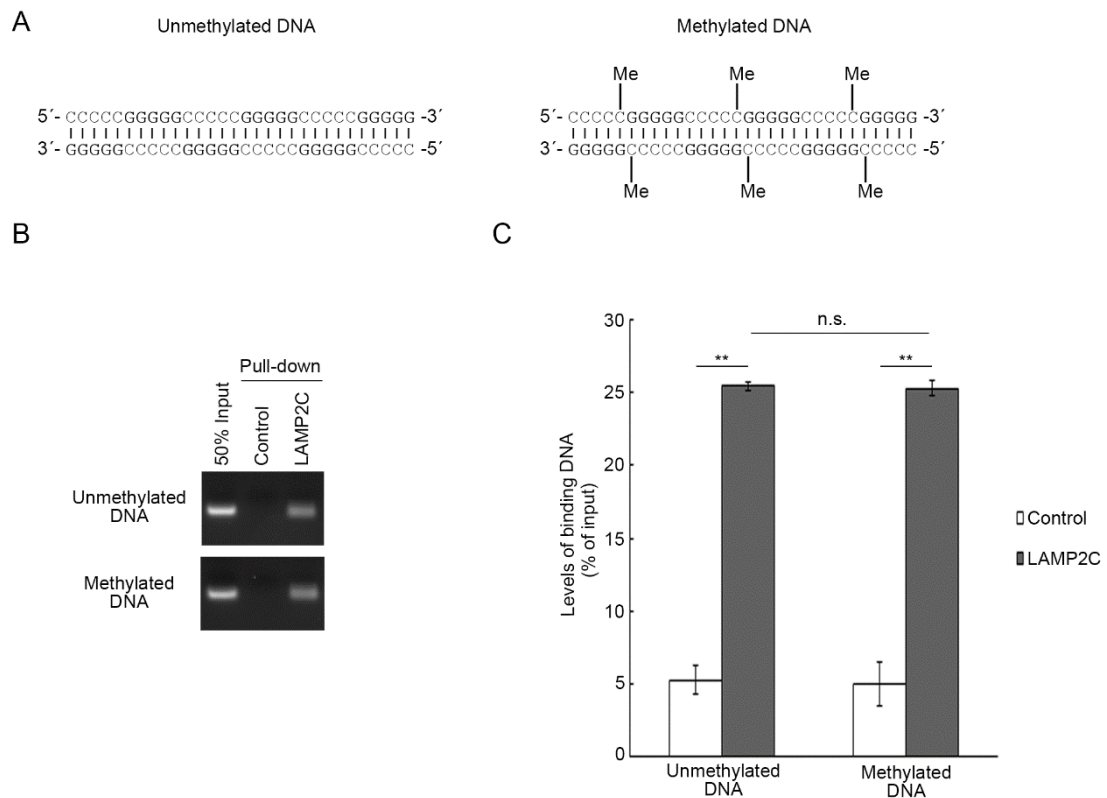
**Fig.3-2 LAMP2C ペプチドは poly-(dG:dC)/(G:C)と結合する**

(A) プルダウンアッセイに用いた dsDNA の配列 (B) プルダウンアッセイを 1 nmol の dsDNA (A) とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした dsDNA を、アガロースゲル電気泳動を行い、EtBr 染色を行った。(C) プルダウンした上記の DNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。(D) プルダウンアッセイに用いた dsRNA の配列 (E) プルダウンアッセイを 2 nmol の dsRNA (D) とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした dsRNA を、アガロースゲル電気泳動を行い、EtBr 染色を行った。(F) プルダウンした上記の RNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。



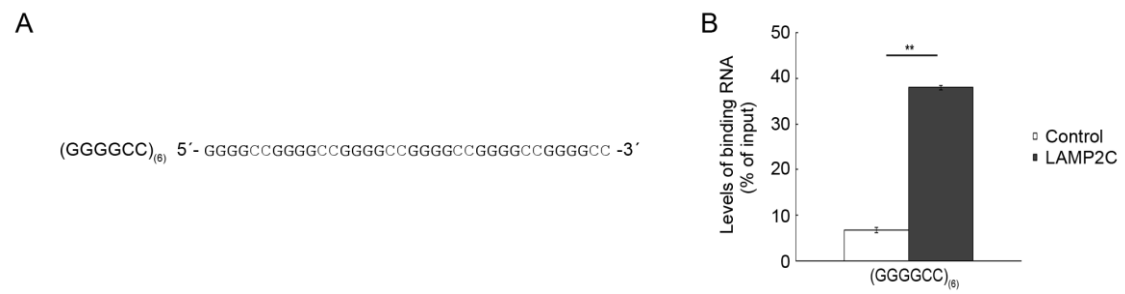
**Fig.3-3 LAMP2C の核酸結合ドメインと結合する poly- dG の最小塩基配列**

(A) プルダウンアッセイに用いた poly-dG の配列 (B) プルダウンアッセイを 1 nmol の poly-dG (A)とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした上記の DNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。



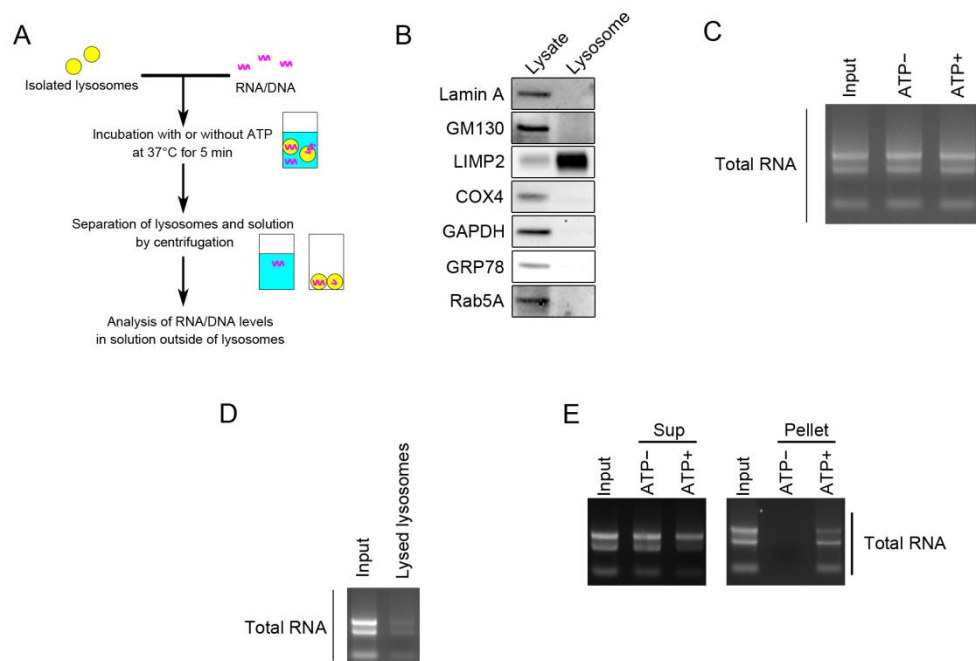
**Fig.3-4 DNA のメチル化が LAMP2C の核酸結合ドメインと DNA との結合に与える影響**

(A) プルダウンアッセイに用いたメチル化、非メチル化 DNA の配列 (B) プルダウンアッセイを 1 nmol のメチル化 DNA または非メチル化 DNA (A) とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした DNA を、アガロースゲル電気泳動を行い、EtBr 染色を行った。(C) プルダウンした上記の DNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。



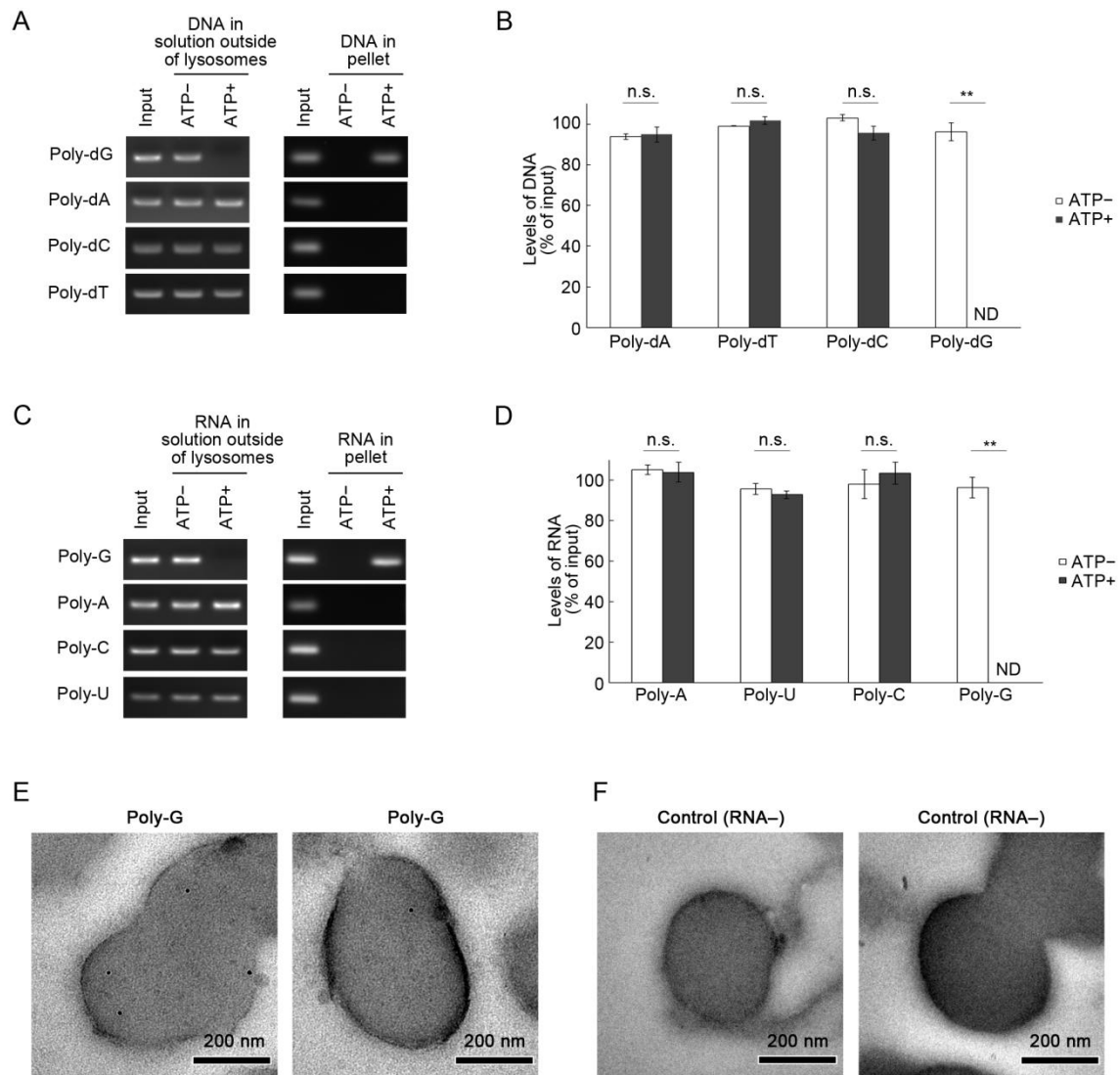
**Fig.3-5 LAMP2C ペプチドは GGGGCC 反復 RNA と結合する**

(A) プルダウンアッセイで使した RNA の配列 (B) 1 nmol の ssRNA (A) とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした上記の DNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。



**Fig.3-6 単離したリソソームは ATP 依存的に total RNA をリソソームに単離する**

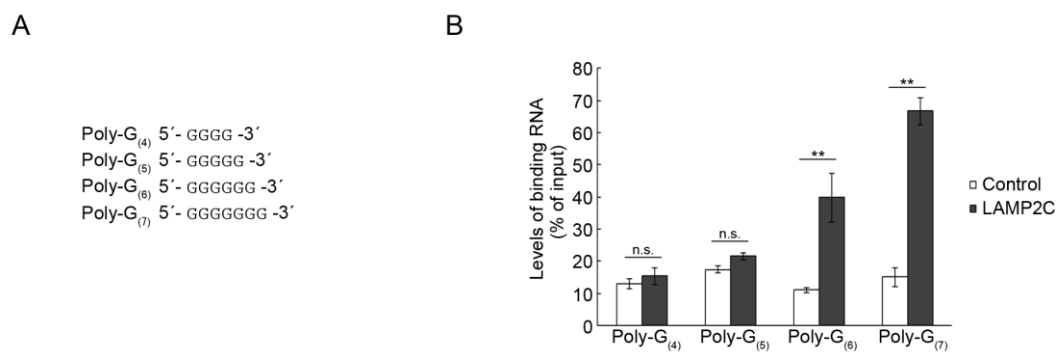
(A) 単離リソソームを用いた核酸取り込みアッセイの概要 (B) 単離したリソソームとリソソームを単離する前の溶解液を用いたウェスタンブロット法: Lamin A (核マーカー)、GM130 (ゴルジ体マーカー)、LIMP2 (リソソームマーカー)、COX4 (ミトコンドリアマーカー)、GAPDH (細胞質マーカー)、GRP78 (小胞体マーカー)、Rab5A (エンドソームマーカー) (n=1) (C) 単離したリソソームを ATP 存在下または非存在下で 37°C、5 分間インキュベートした。遠心分離によって、リソソームを除去し、リソソーム外溶液と total RNA 1 $\mu$ g を混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、アガロースゲル電気泳動を用いて RNA 量を解析した (n=1)。 (D) 単離したリソソームを 1% Triton X-100 を含むクエン酸-リン酸バッファー (pH 5.0) を用いて溶解し、total RNA 1 $\mu$ g と混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、アガロースゲル電気泳動を用いて RNA 量を解析した (n=1)。 (E) 単離したリソソームと total RNA 5 $\mu$ g を ATP 存在下または非存在下で 37°C、5 分間インキュベートした。遠心によって、リソソームとリソソーム外溶液を分離し、それぞれの核酸量を、アガロースゲル電気泳動を用いて解析した (n=1)。



**Fig.3-7 単離したリソソームは poly-G/dG を取り込む**

(A, B) マウス脳から単離したリソソームを poly-dG、poly-dA、poly-dC、poly-dT と混合し、ATP 存在下または非存在下で 37℃、5 分間インキュベートした。インキュベーション後、遠心を行い、上清とペレットに分離した。ssDNA にそれぞれ相補的な ssDNA をアニーリングし、核酸量をアガロースゲル電気泳動と EtBr 染色を行い、検出した (A)。相対 DNA 量を (A) のデンシトメトリーを測定することによって定量化した (B: n=3)。(C, D) マウス脳から単離したリソソームを poly-G、poly-A、poly-C、poly-U と混合し、ATP 存在下または非存在下で 37℃、5 分間インキュベートした。インキュベーション

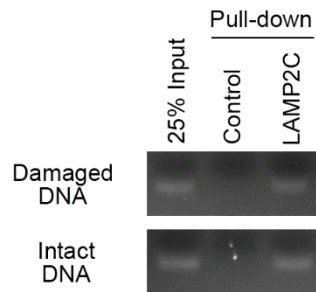
後、遠心を行い、上清とペレットに分離した。ssRNA にそれぞれ相補的な ssDNA をアニーリングし、核酸量をアガロースゲル電気泳動と EtBr 染色を行い、検出した (C)。相対 RNA 量を (A) のデンシトメトリーを測定することによって定量化した (D: n=3)。(E, F) 単離したリソソームと poly-G 混合したサンプル (E) と混合していないサンプル (F) を ATP 存在下で 37°C、5 分間インキュベートした。インキュベート後、リソソームを固定し、樹脂包埋した。その後、超薄切片を作製し、ビオチン標識した poly-dG と 10 nm の金標識したストレプトアビジンを用いて poly-G を検出した。Poly-G と混合したリソソームには金粒子のシグナルが検出された (E) が、poly-G と混合しなかったリソソームにおいては金粒子のシグナルは検出されなかった (F)。



**Fig.3-8 LAMP2C の核酸結合ドメインと結合する poly- dG の最小塩基配列**

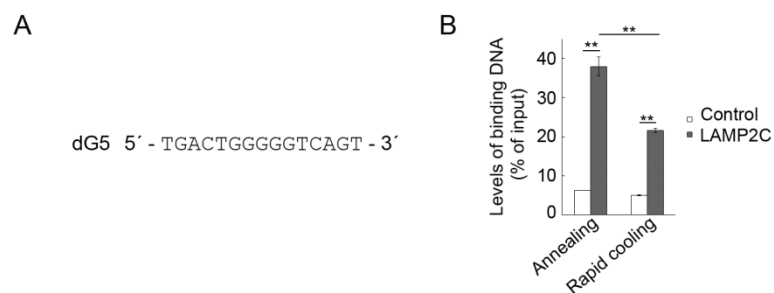
(A) プルダウンアッセイに用いた poly-G の配列 (B) プルダウンアッセイを 1 nmol の poly-G (A)とビオチン標識ペプチドを用いて行った。プルダウンした上記の RNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。





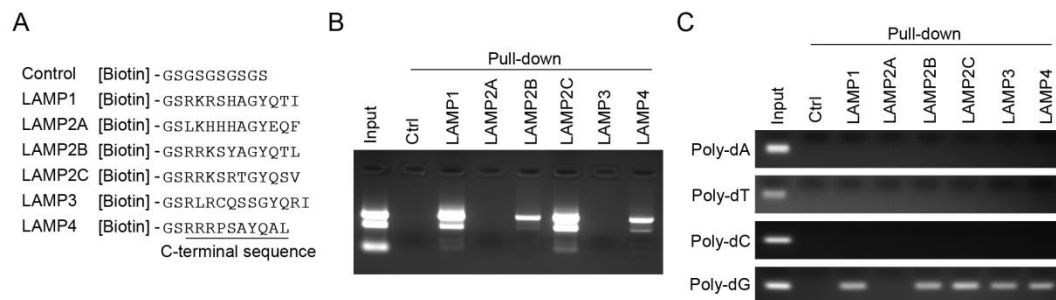
**Fig.3-9 DNA の損傷が LAMP2C の核酸結合ドメインと DNA との結合に与える影響**

LAMP2C の細胞質側配列と損傷 DNA、非損傷 DNA との結合 過酸化水素、硫酸鉄 (II) と DNA を混合し、DNA にニックを挿入した。この DNA 1 nmol とビオチン標識ペプチドを用いてプルダウンアッセイを行い、プルダウンした上記の DNA を、アガロースゲル電気泳動を行い、EtBr 染色を行った (n=3)。



**Fig.3-10 核酸の構造は LAMP2C と核酸の結合に影響を与える**

(A) プルダウンアッセイに用いた DNA の配列 (B) (A)で示した DNA を 95℃で 2 分間加熱し、氷上で 5 分間急冷を行った。さらに、(A)で示した DNA を同様の加熱後、室温に静置することで緩やかに室温まで冷やした。これら 2 種類の処理を行った DNA とビオチン標識ペプチドを用いてプルダウンアッセイを行った。プルダウンした DNA 量を、OD<sub>260</sub> で定量した (n=3)。



**Fig.3-11 核酸結合活性を有する LAMP ファミリータンパク質は選択性を有する**

(A) プルダウンアッセイに用いたペプチドの模式図 (B) HeLa 細胞の細胞溶解液をビオチン標識したそれぞれのタンパク質の細胞質ドメインのペプチドを用いてプルダウンアッセイを行った。その後、プルダウンした RNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動と EtBr 染色によって定量した (n=2)。(C) 1 nmol の ssDNA (poly-dA, poly-dT, poly-dC, poly-dG)とビオチン標識ペプチド (A)を用いてプルダウンアッセイを行った。プルダウンした ssDNA を ssDNA の相補鎖とアニーリングし、プルダウンした DNA 量をアガロースゲル電気泳動と EtBr 染色法を用いて解析した (n=2)。

## 参考論文

1. Futerman, A. H., and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 554–565
2. Menzies, F. M., Moreau, K., and Rubinsztein, D. C. (2011) Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 190–197
3. Gelb, B., Shi, G., Chapman, H., and Desnick, R. (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science (80-. ).* **273**, 1236–1238
4. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2001) Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science.* **292**, 1546–1549
5. Haud, N., Kara, F., Diekmann, S., Henneke, M., Willer, J. R., Hillwig, M. S., Gregg, R. G., Macintosh, G. C., Gärtner, J., Alia, A., and Hurlstone, A. F. L. (2011) rnaset2 mutant zebrafish model familial cystic leukoencephalopathy and reveal a role for RNase T2 in degrading ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1099–1103
6. Henneke, M., Diekmann, S., Ohlenbusch, A., Kaiser, J., Engelbrecht, V., Kohlschütter, A., Krätzner, R., Madruga-Garrido, M., Mayer, M., Opitz, L., Rodriguez, D., Rüschenhoff, F., Schumacher, J., Thiele, H., Thoms, S., Steinfeld, R., Nürnberg, P., and Gärtner, J. (2009) RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat. Genet.* **41**, 773–775
7. Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011) Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell.* **147**, 728–741
8. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011) The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–132
9. Klionsky, D. J. (2008) Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy.* **4**, 740–743
10. JJ., L. (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted

defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging.

*Rejuvenation Res.* **8**, 3–5

11. Park, Y. E., Hayashi, Y. K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., and Nishino, I. (2009) Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*. **5**, 795–804
12. Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009) Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev. Cell*. **17**, 87–97
13. Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D. J. (2009) Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Dev. Cell*. **17**, 98–109
14. De Duve, Christian and Wattiaux, R. (1966) FUNCTIONS OF LYSOSOMES I. *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435–492
15. Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., and Santambrogio, L. (2011) Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell*. **20**, 131–139
16. Paul Roberts Sharon Moshitch-Moshkovitz, E. K., and Eileen O'Toole, M. W. and D. S. G. (2003) Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. **14**, 129–141
17. Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005) The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell*. **19**, 15–26
18. Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Furuta, A., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Wada, K., and Kabuta, T. (2013) Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. **9**, 1167–1171
19. Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Yoshimura, A., Tamai, Y., Wada, K., and Kabuta, T. (2013) Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*. **9**, 403–409
20. Orenstein, S., and Cuervo, A. M. (2010) Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol*. **21**, 719–726
21. Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2009) *Chapter 19 Methods to Monitor Chaperone-Mediated Autophagy*, 1st Ed., Elsevier Inc.,

10.1016/S0076-6879(08)03619-7

22. Dice, J. F., Walker, C. D., Byrne, B., and Cardiel, A. (1978) General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2093–7
23. Fred Dice, J. (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 305–309
24. Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2015) Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat. Cell Biol.* **17**, 759–770
25. Chiang, H. L., and Dice, J. F. (1988) Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* **263**, 6797–6805
26. Aniento, F., Roche, E., Cuervo, A. M., and Knecht, E. (1993) Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 10463–10470
27. Kon, M., Kiffin, R., Koga, H., Chapochnik, J., Macian, F., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2011) Chaperone-Mediated Autophagy Is Required for Tumor Growth. *Sci. Transl. Med.* **3**, 109ra117-109ra117
28. Cuervo, A. M. (2004) Impaired Degradation of Mutant  $\alpha$ -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science (80-. ).* **305**, 1292–1295
29. Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996) A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes. *Science (80-. ).* **273**, 501–503
30. Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., and Dice, J. F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science (80-. ).* **246**, 382–385
31. Schneider, J. L., Suh, Y., and Cuervo, A. M. (2014) Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab.* **20**, 417–432
32. Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., and Wada, K. (2008) Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* **283**, 23731–23738
33. Bauer, P. O., Goswami, A., Wong, H. K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., and Nukina, N. (2010)

- Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* **28**, 256–263
34. Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V. R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K., and Kabuta, T. (2016) Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy*. **12**, 565–578
  35. Aizawa, S., Contu, V. R., Fujiwara, Y., Hase, K., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K., and Kabuta, T. (2016) Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes. *Autophagy*. **8627**, 1–5
  36. Fujiwara, Y., Hase, K., Wada, K., and Kabuta, T. (2015) An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 281–286
  37. Takahashi, M., Contu, V. R., Kabuta, C., Hase, K., Fujiwara, Y., Wada, K., and Kabuta, T. (2017) SIDT2 mediates gymnosis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells. *RNA Biol.* **0**, 1–10
  38. Contu, V. R., Hase, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Fujiwara, Y., Kabuta, C., Takahashi, M., Hakuno, F., Takahashi, S.-I., Wada, K., and Kabuta, T. (2017) Lysosomal targeting of SIDT2 via multiple YxxΦ motifs is required for SIDT2 function in the process of RNautophagy. *J. Cell Sci.* **130**, 2843–2853
  39. Ahn, S., Huang, C. L., Ozkumur, E., Zhang, X., Chinnala, J., Yalcin, A., Bandyopadhyay, S., Russek, S., Ünlü, M. S., Delisi, C., and Irani, R. J. (2012) TATA binding proteins can recognize nontraditional DNA sequences. *Biophys. J.* **103**, 1510–1517
  40. Makeyev, A. V, and Liebhaber, S. a (2002) The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*. **8**, 265–278
  41. McClelland, M., and Nelson, M. (1988) The effect of site-specific DNA methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases--a review. *Gene*. **74**, 291–304
  42. Leba, L. J., Brunschwig, C., Saout, M., Martial, K., Vulcain, E., Bereau, D., and Robinson, J. C. (2014) Optimization of a DNA nicking assay to evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* antioxidant capacity. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18023–18039
  43. Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, N. K. (1994) Crystal structure at 1.92

- Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*. **372**, 432–8
44. Wilke, S., Krausze, J., and Büssow, K. (2012) Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: Implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC Biol.* 10.1186/1741-7007-10-62
  45. Ye, X., Gorin, A., Frederick, R., Hu, W., Majumdar, A., Xu, W., McLendon, G., Ellington, A., and Patel, D. J. (1999) RNA architecture dictates the conformations of a bound peptide. *Chem. Biol.* **6**, 657–669
  46. Weiss, M. A., and Narayana, N. (1998) RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolym. - Nucleic Acid Sci. Sect.* **48**, 167–180
  47. Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., and Harrison, S. C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted  $\alpha$  Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*. **71**, 1223–1237
  48. Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11593–11598
  49. Subramanian, M., Rage, F., Tabet, R., Flatter, E., Mandel, J. L., and Moine, H. (2011) G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep.* **12**, 697–704
  50. Haider, S. M., Parkinson, G. N., and Neidle, S. (2003) Structure of a G-quadruplex-ligand complex. *J. Mol. Biol.* **326**, 117–125
  51. Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A. J., Shaw, G., Kim, M., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D., and Wang, J. (2014) Cascades of Disease. **507**, 195–200
  52. Tucker, K. L. (2001) Methylated cytosine and the brain: A new base for neuroscience. *Neuron*. **30**, 649–652
  53. Den Boon, J. A., Diaz, A., and Ahlquist, P. (2010) Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe*. **8**, 77–85
  54. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., and Choi, A. M. K. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA



- mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **12**, 222–230
55. Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R. J., Orrell, R. W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I. E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J. B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M. A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V. M., Kaivorinne, A. L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J. D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E. E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N. M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H. R., Tienari, P. J., and Traynor, B. J. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. **72**, 257–268
  56. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. C. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Feldman, H., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Miller, B. L., Dickson, D. W., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., and Rademakers, R. (2011) Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*. **72**, 245–256
  57. Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., and Gitler, A. D. (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* **201**, 361–372
  58. Fecto, F., and Siddique, T. (2011) Making connections: Pathology and genetics link amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobe dementia. in *Journal of Molecular Neuroscience*, pp. 663–675, **45**, 663–675
  59. Donnelly, C. J., Zhang, P. W., Pham, J. T., Heusler, A. R., Mistry, N. A., Vidensky, S., Daley, E. L., Poth, E. M., Hoover, B., Fines, D. M., Maragakis, N., Tienari, P. J., Petrucelli, L., Traynor, B. J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C. F., Blackshaw, S., Sattler, R., and Rothstein, J. D. (2013) RNA Toxicity from

- the ALS/FTD C9ORF72 Expansion Is Mitigated by Antisense Intervention. *Neuron*. **80**, 415–428
60. Xu, Z., Poidevin, M., Li, X., Li, Y., Shu, L., Nelson, D. L., Li, H., Hales, C. M., Gearing, M., Wingo, T. S., and Jin, P. (2013) Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 7778–7783
  61. Jialin, G., Xuefan, G., and Huiwen, Z. (2010) SID1 transmembrane family, member 2 (Sidt2): A novel lysosomal membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 588–594
  62. Li, W., Koutmou, K. S., Leahy, D. J., and Li, M. (2015) Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1. *J. Biol. Chem.* **290**, 18904–18913
  63. Castanotto, D., Lin, M., Kowolik, C., Wang, L. A., Ren, X. Q., Soifer, H. S., Koch, T., Hansen, B. R., Oerum, H., Armstrong, B., Wang, Z., Bauer, P., Rossi, J., and Stein, C. A. (2015) A cytoplasmic pathway for gapmer antisense oligonucleotide-mediated gene silencing in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9350–9361
  64. Stein, C. A., Hansen, J. B., Lai, J., Wu, S. J., Voskresenskiy, A., Høg, A., Worm, J., Hedtjärn, M., Souleimanian, N., Miller, P., Soifer, H. S., Castanotto, D., Benimetskaya, L., ørum, H., and Koch, T. (2009) Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1–8
  65. Soifer, H. S., Koch, T., Lai, J., Hansen, B., Hoeg, A., Oerum, H., and Stein, C. A. (2012) Functional Genomics. **815**, 333–346
  66. Zhang, H., Fan, X., Bagshaw, R. D., Zhang, L., Mahuran, D. J., and Callahan, J. W. (2007) Lysosomal membranes from Beige mice contain higher than normal levels of endoplasmic reticulum proteins. *J. Proteome Res.* **6**, 240–249
  67. Takahashi, M., Elbarbary, R. A., Abe, M., Sato, M., Yoshida, T., Yamada, Y., Tamura, M., and Nashimoto, M. (2012) Elimination of specific miRNAs by naked 14-nt sgRNAs. *PLoS One*. **7**, 1–8
  68. Winston, W. M. (2002) Systemic RNAi in *C. elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1. *Science (80- )*. **295**, 2456–2459
  69. Feinberg, E. H. (2003) Transport of dsRNA into Cells by the Transmembrane

- Protein SID-1. *Science (80-. )*. **301**, 1545–1547
70. Jose, A. M., Smith, J. J., and Hunter, C. P. (2009) Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 2283–2288
  71. Shih, J. D., Fitzgerald, M. C., Sutherlin, M., and Hunter, C. P. (2009) The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. *Rna*. **15**, 384–390
  72. Shih, J. D., and Hunter, C. P. (2011) SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. 10.1261/rna.2596511.genetic
  73. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, J. D. W. (1995) 細胞の分子生物学, 3rd Ed., 教育社
  74. Deng, D., Sun, P., Yan, C., Ke, M., Jiang, X., Xiong, L., Ren, W., Hirata, K., Yamamoto, M., Fan, S., and Yan, N. (2015) Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature*. **526**, 391–396
  75. Yu, J., Ge, J., Heuveling, J., Schneider, E., and Yang, M. (2015) Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5243–5248
  76. Elhassan, M. O., Christie, J., and Duxbury, M. S. (2012) Homo sapiens systemic RNA interference-defective-1 transmembrane family member 1 (SIDT1) protein mediates contact-dependent small RNA transfer and microRNA-21-driven chemoresistance. *J. Biol. Chem.* **287**, 5267–5277
  77. Duxbury, M. S., Ashley, S. W., and Whang, E. E. (2005) RNA interference: A mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 459–463
  78. Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* **147**, 959–968
  79. Dekker, P. J., Ryan, M. T., Brix, J., Müller, H., Hönliger, A., and Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6515–6524
  80. Künkele, K., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., and Neupert, W. (1998) of the Outer Membrane of Mitochondria. *Cell*. **93**, 1009–1019

81. Young, J. C., Hoogenraad, N. J., and Hartl, F. U. (2005) Contents, Ed. Board + Forthc. articles. *Trends Biochem. Sci.* **30**, i
82. Dembowski, M., Künkele, K. P., Nargang, F. E., Neupert, W., and Rapaport, D. (2001) Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM Core Complex of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **276**, 17679–17685
83. Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P. J. T., Eckerskorn, C., Lottspeicht, F., Kübrich, M., and Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*. **388**, 195–200
84. Kanamori, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Shin, I., Schultz, P. G., and Endo, T. (1999) 29\_Uncoupling of transfer of the presequence and unfolding of the mature domain in precursor translocation across the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3634–9
85. Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V. L., Tan, K., Shen, H.-H., Sakiyama, N., Fukasawa, Y., Hayat, S., Kamiya, M., Elofsson, A., Tomii, K., Horton, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., Lithgow, T., and Endo, T. (2015) Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science (80- )*. **349**, 1544–1548
86. Yamamoto, H., Itoh, N., Kawano, S., Yatsukawa, Y. -i., Momose, T., Makio, T., Matsunaga, M., Yokota, M., Esaki, M., Shodai, T., Kohda, D., Aiken Hobbs, A. E., Jensen, R. E., and Endo, T. (2011) Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 91–96
87. Nixon, R. A., Yang, D. S., and Lee, J. H. (2008) Neurodegenerative lysosomal disorders: A continuum from development to late age. *Autophagy*. **4**, 590–599
88. Sherman, M. Y., and Goldberg, A. L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*. **29**, 15–32
89. Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y. Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D. E., Jackson, G. R., Marsh, J. L., and Thompson, L. M. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. **413**, 739–743
90. Gusella, J. F., and MacDonald, M. E. (2000) Molecular genetics: Unmasking

- polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 109–115
91. Zoghbi, H. Y. (2006) Trinucleotide repeat disorders. *Princ. Mol. Med.* 10.1007/978-1-59259-963-9\_116
  92. Rubinsztein, D. C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* **18**, 202–209
  93. Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4604–4609
  94. Wanker, E. E., Scherzinger, E., Heiser, V., Sittler, A., Eickhoff, H., and Lehrach, H. (1999) Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. *Methods Enzymol.* **309**, 375–386
  95. Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., and Nukina, N. (2011) Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell.* **44**, 279–289
  96. Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L. J., and Rubinsztein, D. C. (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* **170**, 1101–1111
  97. Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585–595
  98. Ravikumar, B. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1107–1117
  99. Klionsky, D. J., Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Arozena, A. A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., Aguirre-Ghiso, J., Airoidi, E. M., Airoidi, E. M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E. T., Al-Rubeai,

M., Albaiceta, G. M., Albanese, C., Albani, D., Albert, M. L., Aldudo, J., Algül, H., Alirezaei, M., Alloza, I., Alloza, I., Almasan, A., Almonte-Beceril, M., Alnemri, E. S., Alonso, C., Altan-Bonnet, N., Altieri, D. C., Alvarez, S., Alvarez-Erviti, L., Alves, S., Amadoro, G., Amano, A., Amantini, C., Ambrosio, S., Amelio, I., Amer, A. O., Amessou, M., Amon, A., An, Z., Anania, F. A., Andersen, S. U., Andley, U. P., Andreadi, C. K., Andrieu-Abadie, N., Anel, A., Ann, D. K., Anoopkumar-Dukie, S., Antonioli, M., Antonioli, M., Aoki, H., Apostolova, N., Aquila, S., Aquilano, K., Araki, K., Arama, E., Aranda, A., Araya, J., Arcaro, A., Arias, E., Arimoto, H., Ariososa, A. R., Armstrong, J. L., Arnould, T., Arsov, I., Asanuma, K., Askanas, V., Asselin, E., Atarashi, R., Atherton, S. S., Atkin, J. D., Attardi, L. D., Auburger, P., Auburger, G., Aurelian, L., Autelli, R., Avagliano, L., Avagliano, L., Avantiaggiati, M. L., Avrahami, L., Awale, S., Azad, N., Bachetti, T., Backer, J. M., Bae, D. H., Bae, J. S., Bae, O. N., Bae, S. H., Baehrecke, E. H., Baek, S. H., Baghdiguian, S., Bagniewska-Zadworna, A., Bai, H., Bai, J., Bai, X. Y., Bailly, Y., Balaji, K. N., Balduini, W., Ballabio, A., Balzan, R., Banerjee, R., Bánhegyi, G., Bao, H., Barbeau, B., Barrachina, M. D., Barreiro, E., Bartel, B., Bartolomé, A., Bassham, D. C., Bassi, M. T., Bast, R. C., Basu, A., Batista, M. T., Batoko, H., Battino, M., Bauckman, K., Baumgarner, B. L., Bayer, K. U., Beale, R., Beaulieu, J. F., Beck, G. R., Beck, G. R., Becker, C., Beckham, J. D., Bédard, P. A., Bednarski, P. J., Begley, T. J., Behl, C., Behrends, C., Behrens, G. M. N., Behrns, K. E., Bejarano, E., Belaid, A., Belleudi, F., Bénard, G., Berchem, G., Bergamaschi, D., Bergami, M., Berkhout, B., Berliocchi, L., Bernard, A., Bernard, M., Bernassola, F., Bertolotti, A., Bess, A. S., Besteiro, S., Bettuzzi, S., Bhalla, S., Bhattacharyya, S., Bhutia, S. K., Biagosch, C., Bianchi, M. W., Bianchi, M. W., Bianchi, M. W., Biard-Piechaczyk, M., Billes, V., Bincoletto, C., Bingol, B., Bird, S. W., Bitoun, M., Bjedov, I., Blackstone, C., Blanc, L., Blanco, G. A., Blomhoff, H. K., Boada-Romero, E., Böckler, S., Boes, M., Boesze-Battaglia, K., Boise, L. H., Boise, L. H., Bolino, A., Boman, A., Bonaldo, P., Bordi, M., Bordi, M., Bosch, J., Botana, L. M., Botti, J., Bou, G., Bouché, M., Bouchecareilh, M., Boucher, M. J., Boulton, M. E., Bouret, S. G., Boya, P., Boyer-Guittaut, M., Bozhkov, P. V., Brady, N., Braga, V. M. M., Brancolini, C., Braus, G. H., Bravo-San-Pedro, J. M., Bravosan-Pedro, J. M., Bravosan-Pedro, J. M., Bravosan-Pedro, J. M., Brennan, L. A., Bresnick, E.

H., Brest, P., Bridges, D., Bringer, M. A., Brini, M., Brito, G. C., Brodin, B.,  
Brookes, P. S., Brown, E. J., Brown, K., Broxmeyer, H. E., Bruhat, A., Bruhat,  
A., Brum, P. C., Brumell, J. H., Brunetti-Pierri, N., Brunetti-Pierri, N.,  
Bryson-Richardson, R. J., Buch, S., Buchan, A. M., Budak, H., Bulavin, D. V.,  
Bulavin, D. V., Bulavin, D. V., Bultman, S. J., Bultynck, G., Bumbasirevic, V.,  
Burelle, Y., Burke, R. E., Burke, R. E., Burmeister, M., Bütikofer, P.,  
Caberlotto, L., Cadwell, K., Cahova, M., Cai, D., Cai, J., Cai, Q., Calatayud, S.,  
Camougrand, N., Campanella, M., Campbell, G. R., Campbell, M., Campello,  
S., Campello, S., Candau, R., Caniggia, I., Cantoni, L., Cao, L., Caplan, A. B.,  
Caraglia, M., Cardinali, C., Cardoso, S. M., Carew, J. S., Carleton, L. A.,  
Carlin, C. R., Carloni, S., Carlsson, S. R., Carmona-Gutierrez, D., Carneiro, L.  
A. M., Carnevali, O., Carra, S., Carrier, A., Carroll, B., Casas, C., Casas, J.,  
Cassinelli, G., Castets, P., Castro-Obregon, S., Cavallini, G., Ceccherini, I.,  
Cecconi, F., Cecconi, F., Cecconi, F., Cederbaum, A. I., Ceña, V., Ceña, V.,  
Cenci, S., Cenci, S., Cerella, C., Cervia, D., Cetrullo, S., Chaachouay, H., Chae,  
H. J., Chagin, A. S., Chai, C. Y., Chai, C. Y., Chakrabarti, G., Chamilos, G.,  
Chan, E. Y. W., Chan, M. T. V., Chandra, D., Chandra, P., Chang, C. P.,  
Chang, R. C. C., Chang, T. Y., Chatham, J. C., Chatterjee, S., Chauhan, S.,  
Che, Y., Cheetham, M. E., Cheluvappa, R., Chen, C. J., Chen, G., Chen, G.,  
Chen, G. C., Chen, G., Chen, H., Chen, J. W., Chen, J. K., Chen, J. K., Chen,  
M., Chen, M., Chen, P., Chen, Q., Chen, Q., Chen, S. Der, Chen, S., Chen, S. S.  
L., Chen, W., Chen, W. J., Chen, W. Q., Chen, W., Chen, X., Chen, Y. H., Chen,  
Y. G., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y. J., Chen, Y. Q., Chen,  
Y., Chen, Z., Chen, Z., Cheng, A., Cheng, C. H. K., Cheng, H., Cheong, H.,  
Cherry, S., Chesney, J., Cheung, C. H. A., Chevet, E., Chi, H. C., Chi, S. G.,  
Chiacchiera, F., Chiang, H. L., Chiarelli, R., Chiariello, M., Chiariello, M.,  
Chiariello, M., Chieppa, M., Chin, L. S., Chiong, M., Chiu, G. N. C., Cho, D. H.,  
Cho, S. G., Cho, W. C., Cho, Y. Y., Cho, Y. S., Choi, A. M. K., Choi, E. J., Choi,  
E. K., Choi, E. K., Choi, E. K., Choi, E. K., Choi, J., Choi, M. E., Choi, S. Il,  
Choi, S. Il, Chou, T. F., Chouaib, S., Choubey, D., Choubey, V., Chow, K. C.,  
Chowdhury, K., Chu, C. T., Chuang, T. H., Chun, T., Chung, H., Chung, T.,  
Chung, Y. L., Chwae, Y. J., Cianfanelli, V., Ciarcia, R., Ciechomska, I. A.,  
Ciriolo, M. R., Cirone, M., Claerhout, S., Claerhout, S., Clague, M. J., Clària,  
J., Clarke, P. G. H., Clarke, R., Clementi, E., Clementi, E., Cleyrat, C., Cnop,

M., Coccia, E. M., Cocco, T., Codogno, P., Coers, J., Cohen, E. E. W., Colecchia, D., Colecchia, D., Colecchia, D., Coletto, L., Coll, N. S., Colucci-Guyon, E., Comincini, S., Condello, M., Cook, K. L., Coombs, G. H., Cooper, C. D., Cooper, J. M., Coppens, I., Corasaniti, M. T., Corazzari, M., Corazzari, M., Corbalan, R., Corcelle-Termeau, E., Cordero, M. D., Corral-Ramos, C., Corti, O., Corti, O., Cossarizza, A., Costelli, P., Costes, S., Cotman, S. L., Coto-Montes, A., Cottet, S., Cottet, S., Couve, E., Covey, L. R., Cowart, L. A., Cox, J. S., Coxon, F. P., Coyne, C. B., Cragg, M. S., Craven, R. J., Crepaldi, T., Crespo, J. L., Criollo, A., Crippa, V., Cruz, M. T., Cuervo, A. M., Cuezva, J. M., Cui, T., Cutillas, P. R., Czaja, M. J., Czyzyk-Krzeska, M. F., Dagda, R. K., Dahmen, U., Dai, C., Dai, W., Dai, Y., Dalby, K. N., Valle, L. D., Dalmaso, G., D'amelio, M., Damme, M., Darfeuille-Michaud, A., Dargemont, C., Darley-Usmar, V. M., Dasarathy, S., Dasgupta, B., Dash, S., Dass, C. R., Davey, H. M., Davids, L. M., Dávila, D., Davis, R. J., Dawson, T. M., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Daza, P., de Belleruche, J., de Figueiredo, P., de Figueiredo, P., de Figueiredo, R. C. B. Q., de la Fuente, J., De Martino, L., De Matteis, A., De Meyer, G. R. Y., De Milito, A., De Santi, M., de Souza, W., De Tata, V., De Zio, D., Debnath, J., Dechant, R., Decuypere, J. P., Decuypere, J. P., Deegan, S., Dehay, B., Del Bello, B., Del Re, D. P., Delage-Mourroux, R., Delbridge, L. M. D., Deldicque, L., Delorme-Axford, E., Deng, Y., Dengiel, J., Denizot, M., Dent, P., Der, C. J., Deretic, V., Derrien, B., Deutsch, E., Devarenne, T. P., Devenish, R. J., Di Bartolomeo, S., Di Daniele, N., Di Domenico, F., Di Nardo, A., Di Paola, S., Di Pietro, A., Di Renzo, L., Di Antonio, A., Díaz-Araya, G., Díaz-Laviada, I., Diaz-Meco, M. T., Diaz-Nido, J., Dickey, C. A., Dickson, R. C., Diederich, M., Digard, P., Dikic, I., Dinesh-Kumar, S. P., Ding, C., Ding, W. X., Ding, Z., Dini, L., Distler, J. H. W., Diwan, A., Djavaheri-Mergny, M., Dmytruk, K., Dobson, R. C. J., Doetsch, V., Dokladny, K., Dokudovskaya, S., Donadelli, M., Dong, X. C., Dong, X., Dong, Z., Donohue, T. M., Donohue-Jr, T. M., Doran, K. S., D'orazi, G., Dorn, G. W., Dosenko, V., Dridi, S., Drucker, L., Du, J., Du, L. L., Du, L., du Toit, A., Dua, P., Duan, L., Duann, P., Dubey, V. K., Duchen, M. R., Duchosal, M. A., Duez, H., Dugail, I., Dumit, V. I., Duncan, M. C., Dunlop, E. A., Dunn, W. A., Dupont, N., Dupuis, L., Dupuis, L., Durán, R. V., Durcan, T. M., Duvezin-Caubet, S., Duvvuri, U., Eapen, V., Ebrahimi-Fakhari, D., Echard, A., Eckhart, L., Edelstein, C. L., Edinger, A. L., Eichinger, L.,



Eisenberg, T., Eisenberg-Lerner, A., Eissa, N. T., El-Deiry, W. S., El-Khoury, V., Elazar, Z., Eldar-Finkelman, H., Elliott, C. J. H., Emanuele, E., Emmenegger, U., Engedal, N., Engelbrecht, A. M., Engelder, S., Enserink, J. M., Erdmann, R., Erenpreisa, J., Eri, R., Eriksen, J. L., Erman, A., Escalante, R., Eskelinen, E. L., Espert, L., Esteban-Martínez, L., Evans, T. J., Fabri, M., Fabrias, G., Fabrizi, C., Facchiano, A., Færgeman, N. J., Faggioni, A., Fairlie, W. D., Fairlie, W. D., Fairlie, W. D., Fan, C., Fan, D., Fan, J., Fang, S., Fanto, M., Fanzani, A., Farkas, T., Faure, M., Favier, F. B., Favier, F. B., Fearnhead, H., Federici, M., Fei, E., Felizardo, T. C., Feng, H., Feng, Y., Feng, Y., Feng, Y., Ferguson, T. A., Fernández, Á. F., Fernandez-Barrena, M. G., Fernandez-Checa, J. C., Fernandez-Checa, J. C., Fernández-López, A., Fernandez-Zapico, M. E., Feron, O., Ferraro, E., Ferreira-Halder, C. V., Fesus, L., Feuer, R., Fiesel, F. C., Filippi-Chiela, E. C., Filomeni, G., Filomeni, G., Fimia, G. M., Fimia, G. M., Fingert, J. H., Fingert, J. H., Finkbeiner, S., Finkbeiner, S., Finkel, T., Fiorito, F., Fiorito, F., Fisher, P. B., Flajolet, M., Flamigni, F., Florey, O., Florio, S., Floto, R. A., Folini, M., Follo, C., Fon, E. A., Fornai, F., Fornai, F., Fortunato, F., Fraldi, A., Franco, R., Francois, A., Francois, A., François, A., Frankel, L. B., Fraser, I. D. C., Frey, N., Freyssenet, D. G., Frezza, C., Friedman, S. L., Frigo, D. E., Frigo, D. E., Fu, D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujitani, Y., Fujiwara, Y., Fujiya, M., Fukuda, M., Fulda, S., Fusco, C., Gabryel, B., Gaestel, M., Gailly, P., Gajewska, M., Galadari, S., Galadari, S., Galili, G., Galindo, I., Galindo, M. F., Galliciotti, G., Galluzzi, L., Galluzzi, L., Galluzzi, L., Galluzzi, L., Galluzzi, L., Galy, V., Gammoh, N., Gandy, S., Gandy, S., Ganesan, A. K., Ganesan, S., Ganley, I. G., Gannagé, M., Gao, F. B., Gao, F., Gao, J. X., Nannig, L. G., Vescovi, E. G., Garcia-Macía, M., Garcia-Ruiz, C., Garg, A. D., Garg, P. K., Gargini, R., Gassen, N. C., Gatica, D., Gatica, D., Gatti, E., Gatti, E., Gatti, E., Gavard, J., Gavathiotis, E., Ge, L., Ge, P., Ge, S., Gean, P. W., Gelmetti, V., Genazzani, A. A., Geng, J., Genschik, P., Gerner, L., Gestwicki, J. E., Gewirtz, D. A., Ghavami, S., Ghigo, E., Ghosh, D., Giammarioli, A. M., Giammarioli, A. M., Giampieri, F., Giampietri, C., Giatromanolaki, A., Gibbings, D. J., Gibellini, L., Gibson, S. B., Ginet, V., Giordano, A., Giordano, A., Giorgini, F., Giovannetti, E., Giovannetti, E., Girardin, S. E., Gispert, S., Giuliano, S., Giuliano, S., Gladson, C. L., Glavic, A., Gleave, M., Godefroy, N., Gogal, R. M.,

Gokulan, K., Goldman, G. H., Goletti, D., Goligorsky, M. S., Gomes, A. V.,  
 Gomes, L. C., Gomez, H., Gomez-Manzano, C., Gómez-Sánchez, R., Gonçalves,  
 D. A. P., Goncu, E., Gong, Q., Gongora, C., Gonzalez, C. B., Gonzalez-Alegre,  
 P., Gonzalez-Cabo, P., Gonzalez-Cabo, P., González-Polo, R. A., Goping, I. S.,  
 Gorbea, C., Gorbunov, N. V., Goring, D. R., Gorman, A. M., Gorski, S. M.,  
 Gorski, S. M., Goruppi, S., Goto-Yamada, S., Gotor, C., Gottlieb, R. A., Gozes,  
 I., Gozuacik, D., Graba, Y., Graef, M., Granato, G. E., Grant, G. D., Grant, S.,  
 Gravina, G. L., Green, D. R., Greenhough, A., Greenwood, M. T., Grimaldi, B.,  
 Gros, F., Grose, C., Groulx, J. F., Gruber, F., Grumati, P., Grumati, P., Grune,  
 T., Guan, J. L., Guan, K. L., Guerra, B., Guillen, C., Guillen, C., Gulshan, K.,  
 Gunst, J., Guo, C., Guo, L., Guo, M., Guo, W., Guo, X. G., Gust, A. A.,  
 Gustafsson, Å. B., Gutierrez, E., Gutierrez, M. G., Gwak, H. S., Haas, A.,  
 Haber, J. E., Hadano, S., Hagedorn, M., Hahn, D. R., Halayko, A. J.,  
 Hamacher-Brady, A., Hamada, K., Hamai, A., Hamann, A., Hamasaki, M.,  
 Hamer, I., Hamid, Q., Hammond, E. M., Han, F., Han, W., Handa, J. T.,  
 Hanover, J. A., Hansen, M., Harada, M., Harhaji-Trajkovic, L., Harper, J. W.,  
 Harrath, A. H., Harris, A. L., Harris, J., Hasler, U., Hasselblatt, P., Hasui, K.,  
 Hawley, R. G., Hawley, T. S., He, C., He, C. Y., He, F., He, G., He, R. R., He, X.  
 H., He, Y. W., He, Y. Y., Heath, J. K., Hébert, M. J., Heinzen, R. A., Helgason,  
 G. V., Hensel, M., Henske, E. P., Her, C., Herman, P. K., Hernández, A.,  
 Hernandez, C., Hernández-Tiedra, S., Hetz, C., Hetz, C., Hiesinger, P. R.,  
 Higaki, K., Hilfiker, S., Hill, B. G., Hill, J. A., Hill, W. D., Hill, W. D., Hill, W.  
 D., Hill, W. D., Hino, K., Hofius, D., Hofman, P., Höglinger, G. U., Höglinger,  
 G. U., Höhfeld, J., Holz, M. K., Holz, M. K., Hong, Y., Hood, D. A., Hoozemans,  
 J. J. M., Hoppe, T., Hsu, C., Hsu, C. Y., Hsu, L. C., Hu, D., Hu, G., Hu, H. M.,  
 Hu, H., Hu, M. C., Hu, Y. C., Hu, Z. W., Hua, F., Hua, Y., Huang, C., Huang,  
 C., Huang, H. L., Huang, K. H., Huang, K. Y., Huang, S., Huang, S., Huang,  
 W. P., Huang, Y. R., Huang, Y., Huang, Y., Huber, T. B., Huber, T. B., Huber,  
 T. B., Huebbe, P., Huh, W. K., Hulmi, J. J., Hulmi, J. J., Hur, G. M., Hurley, J.  
 H., Husak, Z., Hussain, S. N. A., Hussain, S. N. A., Hussain, S., Hwang, J. J.,  
 Hwang, S., Hwang, T. I. S., Ichihara, A., Imai, Y., Imbriano, C., Inomata, M.,  
 Into, T., Iovane, V., Iovanna, J. L., Iozzo, R. V., Ip, N. Y., Irazoqui, J. E.,  
 Iribarren, P., Isaka, Y., Isakovic, A. J., Ischiropoulos, H., Ischiropoulos, H.,  
 Isenberg, J. S., Ishaq, M., Ishida, H., Ishii, I., Ishmael, J. E., Isidoro, C., Isobe,

K. I., Isono, E., Issazadeh-Navikas, S., Itahana, K., Itakura, E., Ivanov, A. I., Iyer, A. K. V., Izquierdo, J. M., Izumi, Y., Izzo, V., Izzo, V., Izzo, V., Izzo, V., Jäättelä, M., Jaber, N., Jackson, D. J., Jackson, W. T., Jacob, T. G., Jacques, T. S., Jagannath, C., Jain, A., Jain, A., Jana, N. R., Jang, B. K., Jani, A., Jani, A., Janji, B., Jannig, P. R., Jansson, P. J., Jean, S., Jendrach, M., Jeon, J. H., Jessen, N., Jeung, E. B., Jia, K., Jia, L., Jiang, H., Jiang, H., Jiang, L., Jiang, T., Jiang, X., Jiang, X., Jiang, X., Jiang, Y., Jiang, Y., Jiang, Y., Jiang, Y., Jiménez, A., Jin, C., Jin, H., Jin, L., Jin, M., Jin, M., Jin, S., Jinwal, U. K., Jo, E. K., Johansen, T., Johnson, D. E., Johnson, G. V. W., Johnson, J. D., Jonasch, E., Jones, C., Joosten, L. A. B., Jordan, J., Joseph, A. M., Joseph, B., Joubert, A. M., Ju, D., Ju, J., Juan, H. F., Juenemann, K., Juhász, G., Jung, H. S., Jung, J. U., Jung, Y. K., Jungbluth, H., Jungbluth, H., Jungbluth, H., Justice, M. J., Justice, M. J., Jutten, B., Kaakoush, N. O., Kaarniranta, K., Kaasik, A., Kabuta, T., Kaeffer, B., Kågedal, K., Kahana, A., Kajimura, S., Kakhlon, O., Kalia, M., Kalvakolanu, D. V., Kamada, Y., Kambas, K., Kaminsky, V. O., Kampinga, H. H., Kandouz, M., Kang, C., Kang, C., Kang, R., Kang, T. C., Kanki, T., Kanneganti, T. D., Kanno, H., Kanthasamy, A. G., Kantorow, M., Kaparakis-Liaskos, M., Kapuy, O., Karantza, V., Karim, M. R., Karmakar, P., Kaser, A., Kaushik, S., Kawula, T., Kaynar, A. M., Kaynar, A. M., Ke, P. Y., Ke, Z. J., Kehrl, J. H., Keller, K. E., Kemper, J. K., Kenworthy, A. K., Kepp, O., Kern, A., Kesari, S., Kessel, D., Ketteler, R., Kettelhut, I. do C., Khambu, B., Khan, M. M., Khandelwal, V. K. M., Khare, S., Kiang, J. G., Kiger, A. A., Kihara, A., Kim, A. L., Kim, C. H., Kim, D. R., Kim, D. H., Kim, E. K., Kim, E. K., Kim, H. Y., Kim, H. R., Kim, J. S., Kim, J. H., Kim, J. H., Kim, J. C., Kim, J. H., Kim, J. H., Kim, K. W., Kim, M. D., Kim, M. M., Kim, P. K., Kim, S. W., Kim, S. Y., Kim, Y. S., Kim, Y., Kimchi, A., Kimmelman, A. C., Kimura, T., King, J. S., Kirkegaard, K., Kirkin, V., Kirshenbaum, L. A., Kishi, S., Kitajima, Y., Kitamoto, K., Kitaoka, Y., Kitazato, K., Kley, R. A., Klimecki, W. T., Klinkenberg, M., Klucken, J., Knævelsrud, H., Knecht, E., Knuppertz, L., Ko, J. L., Kobayashi, S., Koch, J. C., Koechlin-Ramonatxo, C., Koenig, U., Koh, Y. H., Köhler, K., Kohlwein, S. D., Koike, M., Komatsu, M., Kominami, E., Kong, D., Kong, H. J., Konstantakou, E. G., Kopp, B. T., Korcsmaros, T., Korhonen, L., Korolchuk, V. I., Koshkina, N. V., Kou, Y., Koukourakis, M. I., Koumenis, C., Kovács, A. L., Kovács, T., Kovacs, W. J., Koya, D., Kraft, C.,

Krainc, D., Kramer, H., Kravic-Stevovic, T., Krek, W., Kretz-Remy, C.,  
 Kretz-Remy, C., Kretz-Remy, C., Krick, R., Krishnamurthy, M., Kriston-Vizi,  
 J., Kroemer, G., Kroemer, G., Kroemer, G., Kroemer, G., Kruer, M. C., Kruger,  
 R., Ktistakis, N. T., Kuchitsu, K., Kuhn, C., Kumar, A. P., Kumar, A., Kumar,  
 A., Kumar, D., Kumar, D., Kumar, R., Kumar, S., Kundu, M., Kung, H. J.,  
 Kung, H. J., Kuno, A., Kuo, S. H., Kuret, J., Kurz, T., Kwok, T., Kwok, T.,  
 Kwon, T. K., Kwon, Y. T., Kyrmizi, I., La Spada, A. R., La Spada, A. R.,  
 Lafont, F., Lahm, T., Lakkaraju, A., Lam, T., Lamark, T., Lancel, S.,  
 Landowski, T. H., Lane, D. J. R., Lane, J. D., Lanzi, C., Lapaquette, P.,  
 Lapierre, L. R., Laporte, J., Laukkanen, J., Laurie, G. W., Lavandero, S.,  
 Lavandero, S., Lavie, L., Lavoie, M. J., Law, B. Y. K., Law, H. K. W., Law, K.  
 B., Layfield, R., Lazo, P. A., Lazo, P. A., Le Cam, L., Le Cam, L., Le Cam, L.,  
 Le Roch, K. G., Le Stunff, H., Le Stunff, H., Leardkamolkarn, V., Lecuit, M.,  
 Lee, B. H., Lee, C. H., Lee, E. F., Lee, E. F., Lee, E. F., Lee, G. M., Lee, H. J.,  
 Lee, H., Lee, J. K., Lee, J., Lee, J. H., Lee, J. H., Lee, J. H., Lee, M., Lee, M. S.,  
 Lee, P. J., Lee, S. W., Lee, S. J., Lee, S. J., Lee, S. Y., Lee, S. H., Lee, S. S., Lee,  
 S. S., Lee, S. J., Lee, S., Lee, Y. R., Lee, Y. J., Lee, Y. H., Leeuwenburgh, C.,  
 Lefort, S., Legouis, R., Lei, J., Lei, Q. Y., Leib, D. A., Leibowitz, G., Lekli, I.,  
 Lemaire, S. D., Lemasters, J. J., Lemberg, M. K., Lemoine, A., Leng, S., Lenz,  
 G., Lenzi, P., Lerman, L. O., Barbato, D. L., Leu, J. I. J., Leung, H. Y., Leung,  
 H. Y., Levine, B., Levine, B., Lewis, P. A., Lewis, P. A., Lezoualch, F., Li, C.,  
 Li, F., Li, F. J., Li, J., Li, K., Li, L., Li, M., Li, M., Li, Q., Li, R., Li, S., Li, W.,  
 Li, W., Li, X., Li, Y., Lian, J., Liang, C., Liang, Q., Liao, Y., Liberal, J.,  
 Liberski, P. P., Lie, P., Lieberman, A. P., Lim, H. J., Lim, K. L., Lim, K. L.,  
 Lim, K., Lima, R. T., Lima, R. T., Lima, R. T., Lin, C. S., Lin, C. S., Lin, C. F.,  
 Lin, F., Lin, F., Lin, F. C., Lin, K., Lin, K. H., Lin, P. H., Lin, T., Lin, W. W.,  
 Lin, Y. S., Lin, Y., Linden, R., Lindholm, D., Lindqvist, L. M., Lingor, P.,  
 Linkermann, A., Liotta, L. A., Lipinski, M. M., Lira, V. A., Lisanti, M. P.,  
 Liton, P. B., Liu, B., Liu, C., Liu, C. F., Liu, F., Liu, H. J., Liu, J., Liu, J. J.,  
 Liu, J. L., Liu, K., Liu, L., Liu, L., Liu, Q., Liu, R. Y., Liu, S., Liu, S., Liu, W.,  
 Liu, X. De, Liu, X., Liu, X. H., Liu, X., Liu, X., Liu, X., Liu, X., Liu, X., Liu, Y.,  
 Liu, Y., Liu, Z., Liu, Z., Liuzzi, J. P., Lizard, G., Ljubic, M., Lodhi, I. J., Logue,  
 S. E., Lokeshwar, B. L., Long, Y. C., Lonial, S., Loos, B., López-Otín, C.,  
 López-Vicario, C., Lorente, M., Lorenzi, P. L., Lorenzi, P. L., Lőrincz, P., Los,

M., Lotze, M. T., Lovat, P. E., Lu, B., Lu, B., Lu, J., Lu, Q., Lu, S. M., Lu, S.,  
 Lu, Y., Luciano, F., Luckhart, S., Lucocq, J. M., Ludovico, P., Ludovico, P.,  
 Lugea, A., Lukacs, N. W., Lum, J. J., Lum, J. J., Lum, J. J., Lund, A. H., Luo,  
 H., Luo, J., Luo, S., Luparello, C., Lyons, T., Ma, J., Ma, Y., Ma, Y., Ma, Z.,  
 Machado, J., Machado-Santelli, G. M., Macian, F., MacIntosh, G. C.,  
 MacKeigan, J. P., Macleod, K. F., MacMicking, J. D., MacMillan-Crow, L. A.,  
 Madeo, F., Madesh, M., Madesh, M., Madrigal-Matute, J., Maeda, A., Maeda,  
 T., Maegawa, G., Maellaro, E., Maes, H., Magariños, M., Maiese, K., Maiti, T.  
 K., Maiuri, L., Maiuri, M. C., Maki, C. G., Malli, R., Malorni, W., Malorni, W.,  
 Maloyan, A., Mami-Chouaib, F., Man, N., Man, N., Mancias, J. D.,  
 Mandelkow, E. M., Mandell, M. A., Manfredi, A. A., Manié, S. N., Manzoni, C.,  
 Manzoni, C., Mao, K., Mao, K., Mao, Z., Mao, Z. W., Marambaud, P., Marconi,  
 A. M., Marelja, Z., Marfe, G., Margeta, M., Margittai, E., Mari, M., Mariani, F.  
 V., Marin, C., Marinelli, S., Mariño, G., Markovic, I., Marquez, R., Martelli, A.  
 M., Martens, S., Martin, K. R., Martin, S. J., Martin, S., Martin-Acebes, M. A.,  
 Martín-Sanz, P., Martinand-Mari, C., Martinet, W., Martinez, J.,  
 Martinez-Lopez, N., Martinez-Outschoorn, U., Martínez-Velázquez, M.,  
 Martinez-Vicente, M., Martins, W. K., Martins, W. K., Mashima, H.,  
 Mastrianni, J. A., Matarese, G., Matarese, G., Matarrese, P., Mateo, R.,  
 Matoba, S., Matsumoto, N., Matsushita, T., Matsuura, A., Matsuzawa, T.,  
 Mattson, M. P., Matus, S., Matus, S., Matus, S., Maugeri, N., Mauvezin, C.,  
 Mayer, A., Maysinger, D., Mazzolini, G. D., McBrayer, M. K., McCall, K.,  
 McCormick, C., McInerney, G. M., McIver, S. C., McKenna, S., McMahon, J.  
 J., McNeish, I. A., Mechta-Grigoriou, F., Medema, J. P., Medina, D. L.,  
 Megyeri, K., Mehrpour, M., Mehta, J. L., Mei, Y., Meier, U. C., Meijer, A. J.,  
 Meléndez, A., Melino, G., Melino, G., Melino, S., de Melo, E. J. T., Mena, M.  
 A., Meneghini, M. D., Menendez, J. A., Menezes, R., Menezes, R., Meng, L.,  
 Meng, L. H., Meng, S., Menghini, R., Menko, A. S., Menna-Barreto, R. F. S.,  
 Menon, M. B., Meraz-Ríos, M. A., Merla, G., Merlini, L., Merlot, A. M., Meryk,  
 A., Meschini, S., Meyer, J. N., Mi, M. T., Miao, C. Y., Micale, L., Michaeli, S.,  
 Michiels, C., Migliaccio, A. R., Mihailidou, A. S., Mihailidou, A. S., Mijaljica,  
 D., Mikoshiba, K., Milan, E., Milan, E., Miller-Fleming, L., Mills, G. B., Mills,  
 I. G., Mills, I. G., Mills, I. G., Minakaki, G., Minassian, B. A., Ming, X. F.,  
 Minibayeva, F., Minina, E. A., Minter, J. D., Minucci, S., Miranda-Vizuete,

A., Mitchell, C. H., Miyamoto, S., Miyazawa, K., Mizushima, N., Mnich, K.,  
 Mograbi, B., Mohseni, S., Moita, L. F., Molinari, M., Molinari, M., Molinari,  
 M., Møller, A. B., Mollereau, B., Mollinedo, F., Mongillo, M., Monick, M. M.,  
 Montagnaro, S., Montell, C., Montell, C., Moore, D. J., Moore, M. N.,  
 Mora-Rodriguez, R., Moreira, P. I., Morel, E., Morelli, M. B., Moreno, S.,  
 Morgan, M. J., Moris, A., Moriyasu, Y., Morrison, J. L., Morrison, L. A.,  
 Morselli, E., Moscat, J., Moseley, P. L., Mostowy, S., Motori, E., Mottet, D.,  
 Mottram, J. C., Moussa, C. E. H., Mpakou, V. E., Mukhtar, H., Levy, J. M. M.,  
 Muller, S., Muñoz-Moreno, R., Muñoz-Pinedo, C., Münz, C., Murphy, M. E.,  
 Murray, J. T., Murthy, A., Mysorekar, I. U., Nabi, I. R., Nabissi, M., Nader, G.  
 A., Nagahara, Y., Nagai, Y., Nagata, K., Nagelkerke, A., Nagy, P., Naidu, S.  
 R., Nair, S., Nakano, H., Nakatogawa, H., Nanjundan, M., Napolitano, G.,  
 Naqvi, N. I., Nardacci, R., Narendra, D. P., Narita, M., Nascimbeni, A. C.,  
 Natarajan, R., Navegantes, L. C., Nawrocki, S. T., Nazarko, T. Y., Nazarko, V.  
 Y., Neill, T., Neri, L. M., Netea, M. G., Netea-Maier, R. T., Neves, B. M., Ney,  
 P. A., Nezis, I. P., Nguyen, H. T. T., Nguyen, H. P., Nicot, A. S., Nilsen, H.,  
 Nilsen, H., Nilsson, P., Nilsson, P., Nishimura, M., Nishino, I., Niso-Santano,  
 M., Niu, H., Nixon, R. A., Njar, V. C. O., Noda, T., Noegel, A. A., Nolte, E. M.,  
 Norberg, E., Norga, K. K., Noureini, S. K., Notomi, S., Notterpek, L.,  
 Nowikovskiy, K., Nukina, N., Nürnberger, T., O'donnell, V. B., O'donovan, T.,  
 O'dwyer, P. J., Oehme, I., Oeste, C. L., Ogawa, M., Ogretmen, B., Ogura, Y.,  
 Oh, Y. J., Ohmuraya, M., Ohshima, T., Ojha, R., Okamoto, K., Okazaki, T.,  
 Oliver, F. J., Ollinger, K., Olsson, S., Orban, D. P., Orban, D. P., Ordonez, P.,  
 Orhon, I., Orosz, L., O'rourke, E. J., Orozco, H., Orozco, H., Ortega, A. L.,  
 Ortona, E., Osellame, L. D., Oshima, J., Oshima, S., Osiewacz, H. D., Otomo,  
 T., Otsu, K., Ou, J. H. J., Outeiro, T. F., Ouyang, D. Y., Ouyang, H.,  
 Overholtzer, M., Ozbun, M. A., Ozdinler, P. H., Ozpolat, B., Pacelli, C.,  
 Paganetti, P., Page, G., Pages, G., Pagnini, U., Pajak, B., Pajak, B., Pak, S. C.,  
 Pakos-Zebrucka, K., Pakpour, N., Palková, Z., Palladino, F., Pallauf, K.,  
 Pallet, N., Palmieri, M., Paludan, S. R., Palumbo, C., Palumbo, S., Pampliega,  
 O., Pan, H., Pan, W., Panaretakis, T., Pandey, A., Pandey, A., Pantazopoulou,  
 A., Papackova, Z., Papademetrio, D. L., Papassideri, I., Papini, A., Parajuli,  
 N., Pardo, J., Parekh, V. V., Parenti, G., Park, J. I., Park, J., Park, O. K.,  
 Parker, R., Parlato, R., Parlato, R., Parys, J. B., Parzych, K. R., Parzych, K. R.,

Pasquet, J. M., Pasquier, B., Pasumarthi, K. B. S., Patschan, D., Patterson, C., Pattingre, S., Pattingre, S., Pattison, S., Pause, A., Pavenstädt, H., Pavone, F., Pedrozo, Z., Peña, F. J., Peñalva, M. A., Pende, M., Peng, J., Penna, F., Penninger, J. M., Pensalfini, A., Pepe, S., Pereira, G. J. S., Pereira, P. C., de la Cruz, V. P., Pérez-Pérez, M. E., Pérez-Rodríguez, D., Pérez-Sala, D., Perier, C., Perl, A., Perlmutter, D. H., Perrotta, I., Pervaiz, S., Pervaiz, S., Pervaiz, S., Pesonen, M., Pessin, J. E., Peters, G. J., Petersen, M., Petrache, I., Petrof, B. J., Petrovski, G., Petrovski, G., Petrovski, G., Phang, J. M., Piacentini, M., Pierdominici, M., Pierre, P., Pierre, P., Pierre, P., Pierre, P., Pierrefite-Carle, V., Pietrocola, F., Pietrocola, F., Pietrocola, F., Pietrocola, F., Pimentel-Muiños, F. X., Pinar, M., Pineda, B., Pinkas-Kramarski, R., Pinti, M., Pinton, P., Piperdi, B., Piret, J. M., Platanias, L. C., Platanias, L. C., Platta, H. W., Plowey, E. D., Pöggeler, S., Poirot, M., Polčić, P., Poletti, A., Poon, A. H., Popelka, H., Popova, B., Poprawa, I., Poulouse, S. M., Poulton, J., Powers, S. K., Powers, T., Pozuelo-Rubio, M., Prak, K., Prange, R., Prescott, M., Priault, M., Prince, S., Proia, R. L., Proikas-Cezanne, T., Prokisch, H., Promponas, V. J., Przyklenk, K., Puertollano, R., Pugazhenth, S., Puglielli, L., Pujol, A., Pujol, A., Pujol, A., Puyal, J., Puyal, J., Pyeon, D., Qi, X., Qian, W. Bin, Qin, Z. H., Qiu, Y., Qu, Z., Quadrilatero, J., Quinn, F., Raben, N., Rabinowich, H., Radogna, F., Ragusa, M. J., Rahmani, M., Raina, K., Ramanadham, S., Ramesh, R., Rami, A., Randall-Demllo, S., Randow, F., Randow, F., Rao, H., Rao, V. A., Rasmussen, B. B., Rasse, T. M., Ratovitski, E. A., Rautou, P. E., Rautou, P. E., Rautou, P. E., Rautou, P. E., Ray, S. K., Razani, B., Razani, B., Reed, B. H., Reggiori, F., Rehm, M., Reichert, A. S., Rein, T., Reiner, D. J., Reits, E., Ren, J., Ren, X., Renna, M., Reusch, J. E. B., Reusch, J. E. B., Revuelta, J. L., Reyes, L., Rezaie, A. R., Richards, R. I., Richardson, D. R., Richetta, C., Riehle, M. A., Rihn, B. H., Rikihisa, Y., Riley, B. E., Rimbach, G., Rippo, M. R., Ritis, K., Rizzi, F., Rizzo, E., Roach, P. J., Robbins, J., Roberge, M., Roca, G., Roccheri, M. C., Rocha, S., Rodrigues, C. M. P., Rodríguez, C. I., de Cordoba, S. R., Rodríguez-Muela, N., Roelofs, J., Rogov, V. V., Rohn, T. T., Rohrer, B., Romanelli, D., Romani, L., Romano, P. S., Roncero, M. I. G., Rosa, J. L., Rosello, A., Rosen, K. V., Rosen, K. V., Rosenstiel, P., Rost-Roszkowska, M., Roth, K. A., Roué, G., Rouis, M., Rouschop, K. M., Ruan, D. T., Ruano, D., Rubinsztein, D. C., Rucker, E. B.,

Rudich, A., Rudolf, E., Rudolf, R., Ruegg, M. A., Ruiz-Roldan, C., Ruparelia, A. A., Rusmini, P., Russ, D. W., Russo, G. L., Russo, G., Russo, R., Rusten, T. E., Rusten, T. E., Ryabovol, V., Ryan, K. M., Ryter, S. W., Sabatini, D. M., Sacher, M., Sacher, M., Sachse, C., Sack, M. N., Sadoshima, J., Saftig, P., Sagi-Eisenberg, R., Sahni, S., Saikumar, P., Saito, T., Saitoh, T., Sakakura, K., Sakoh-Nakatogawa, M., Sakuraba, Y., Salazar-Roa, M., Salomoni, P., Saluja, A. K., Salvaterra, P. M., Salvioli, R., Samali, A., Sanchez, A. M. J., Sánchez-Alcázar, J. A., Sanchez-Prieto, R., Sandri, M., Sanjuan, M. A., Santaguida, S., Santambrogio, L., Santoni, G., Dos Santos, C. N., Dos Santos, C. N., Saran, S., Sardiello, M., Sargent, G., Sarkar, P., Sarkar, S., Sarrias, M. R., Sarwal, M. M., Sasakawa, C., Sasaki, M., Sass, M., Sato, K., Sato, M., Satriano, J., Savaraj, N., Saveljeva, S., Schaefer, L., Schaible, U. E., Scharl, M., Schatzl, H. M., Schekman, R., Scheper, W., Scheper, W., Scheper, W., Schiavi, A., Schiavi, A., Schipper, H. M., Schipper, H. M., Schmeisser, H., Schmidt, J., Schmitz, I., Schmitz, I., Schneider, B. E., Schneider, E. M., Schneider, J. L., Schon, E. A., Schönenberger, M. J., Schönthel, A. H., Schorderet, D. F., Schorderet, D. F., Schröder, B., Schuck, S., Schulze, R. J., Schwarten, M., Schwarz, T. L., Sciarretta, S., Sciarretta, S., Sciarretta, S., Scotto, K., Scovassi, A. I., Screatton, R. A., Screatton, R. A., Screen, M., Seca, H., Seca, H., Seca, H., Sedej, S., Segatori, L., Segatori, L., Segev, N., Seglen, P. O., Seguí-Simarro, J. M., Segura-Aguilar, J., Seiliez, I., Seki, E., Sell, C., Semenkovich, C. F., Semenza, G. L., Sen, U., Serra, A. L., Serrano-Puebla, A., Sesaki, H., Setoguchi, T., Settembre, C., Shacka, J. J., Shajahan-Haq, A. N., Shapiro, I. M., Sharma, S., She, H., Shen, C. K. J., Shen, C. C., Shen, H. M., Shen, S., Shen, W., Sheng, R., Sheng, X., Sheng, Z. H., Shepherd, T. G., Shi, J., Shi, J., Shi, Q., Shi, Q., Shi, Y., Shibutani, S., Shibuya, K., Shidoji, Y., Shieh, J. J., Shih, C. M., Shimada, Y., Shimizu, S., Shin, D. W., Shinohara, M. L., Shintani, M., Shintani, T., Shioi, T., Shirabe, K., Shiri-Sverdlov, R., Shirihai, O., Shore, G. C., Shu, C. W., Shukla, D., Sibirny, A. A., Sibirny, A. A., Sica, V., Sica, V., Sica, V., Sica, V., Sigurdson, C. J., Sigurdsson, E. M., Sijwali, P. S., Sikorska, B., Silveira, W. A., Silvente-Poirot, S., Silverman, G. A., Simak, J., Simmet, T., Simon, A. K., Simon, H. U., Simone, C., Simons, M., Simonsen, A., Singh, R., Singh, S. V., Singh, S. K., Sinha, D., Sinha, S., Sinicrope, F. A., Sirko, A., Sirohi, K., Sishi, B. J. N., Sittler, A., Siu, P. M., Sivridis, E.,



Skwarska, A., Slack, R., Slaninová, I., Slavov, N., Smaili, S. S., Smalley, K. S. M., Smith, D. R., Soenen, S. J., Soleimanpour, S. A., Solhaug, A., Somasundaram, K., Son, J. H., Sonawane, A., Song, C., Song, F., Song, H. K., Song, J. X., Song, W., Soo, K. Y., Sood, A. K., Sood, A. K., Soong, T. W., Soontornniyomkij, V., Sorice, M., Sotgia, F., Soto-Pantoja, D. R., Sotthibundhu, A., Sousa, M. J., Spaink, H. P., Span, P. N., Spang, A., Sparks, J. D., Speck, P. G., Spector, S. A., Spies, C. D., Springer, W., Clair, D. S., Stacchiotti, A., Staels, B., Stang, M. T., Starczynowski, D. T., Starokadomskyy, P., Steegborn, C., Steele, J. W., Stefanis, L., Steffan, J., Stellrecht, C. M., Stenmark, H., Stepkowski, T. M., Stern, S. T., Stevens, C., Stockwell, B. R., Stockwell, B. R., Stoka, V., Storchova, Z., Stork, B., Stratoulis, V., Stravopodis, D. J., Stravopodis, D. J., Strnad, P., Strohecker, A. M., Ström, A. L., Stromhaug, P., Stulik, J., Su, Y. X., Su, Z., Subauste, C. S., Subramaniam, S., Sue, C. M., Suh, S. W., Sui, X., Sukserree, S., Sulzer, D., Sun, F. L., Sun, J., Sun, J., Sun, S. Y., Sun, Y., Sun, Y., Sun, Y., Sundaramoorthy, V., Sung, J., Suzuki, H., Suzuki, K., Suzuki, N., Suzuki, T., Suzuki, Y. J., Swanson, M. S., Swanton, C., Swärd, K., Swarup, G., Sweeney, S. T., Sylvester, P. W., Szatmari, Z., Szegezdi, E., Szlosarek, P. W., Taegtmeyer, H., Tafani, M., Taillebourg, E., Tait, S. W. G., Takacs-Vellai, K., Takahashi, Y., Takáts, S., Takemura, G., Takigawa, N., Talbot, N. J., Tamagno, E., Tamburini, J., Tan, C. P., Tan, L., Tan, M. L., Tan, M. L., Tan, M., Tan, Y. J., Tan, Y. J., Tanaka, K., Tanaka, M., Tang, D., Tang, D., Tang, G., Tanida, I., Tanji, K., Tannous, B. A., Tapia, J. A., Tasset-Cuevas, I., Tatar, M., Tavassoly, I., Tavernarakis, N., Tavernarakis, N., Tavernarakis, N., Taylor, A., Taylor, G. S., Taylor, G. A., Taylor, G. A., Taylor, G. A., Taylor, G. A., Taylor, J. P., Taylor, M. J., Tchetina, E. V., Tee, A. R., Teixeira-Clerc, F., Teixeira-Clerc, F., Telang, S., Tencomnao, T., Teng, B. B., Teng, R. J., Terro, F., Tettamanti, G., Theiss, A. L., Theron, A. E., Thomas, K. J., Thomé, M. P., Thomes, P. G., Thorburn, A., Thorner, J., Thum, T., Thumm, M., Thurston, T. L. M., Tian, L., Till, A., Till, A., Ting, J. P. Y., Ting, J. P. Y., Titorenko, V. I., Toker, L., Toldo, S., Tooze, S. A., Topisirovic, I., Topisirovic, I., Torgersen, M. L., Torgersen, M. L., Torgersen, M. L., Torosantucci, L., Torriglia, A., Torrisi, M. R., Tournier, C., Towns, R., Trajkovic, V., Travassos, L. H., Triola, G., Tripathi, D. N., Trisciuglio, D., Troncoso, R., Troncoso, R., Trougakos, I. P.,

Truttmann, A. C., Tsai, K. J., Tschan, M. P., Tseng, Y. H., Tsukuba, T., Tsung, A., Tsvetkov, A. S., Tu, S., Tuan, H. Y., Tucci, M., Tumbarello, D. A., Turk, B., Turk, V., Turner, R. F. B., Tveita, A. A., Tyagi, S. C., Ubukata, M., Uchiyama, Y., Udelnow, A., Ueno, T., Umekawa, M., Umemiya-Shirafuji, R., Underwood, B. R., Ungermann, C., Ureshino, R. P., Ushioda, R., Uversky, V. N., Uzcátegui, N. L., Vaccari, T., Vaccaro, M. I., Váchová, L., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Valdor, R., Valente, E. M., Vallette, F., Valverde, A. M., Van den Berghe, G., Van Den Bosch, L., van den Brink, G. R., van der Goot, F. G., van der Klei, I. J., van der Laan, L. J. W., van Doorn, W. G., van Egmond, M., van Golen, K. L., van Golen, K. L., van Golen, K. L., Van Kaer, L., Campagne, M. van L., Vandenabeele, P., Vandenberghe, W., Vandenberghe, W., Vanhorebeek, I., Varela-Nieto, I., Vasconcelos, M. H., Vasconcelos, M. H., Vasconcelos, M. H., Vasko, R., Vavvas, D. G., Vega-Naredo, I., Velasco, G., Velentzas, A. D., Velentzas, P. D., Vellai, T., Vellenga, E., Vendelbo, M. H., Venkatachalam, K., Ventura, N., Ventura, N., Ventura, S., Veras, P. S. T., Verdier, M., Vertessy, B. G., Viale, A., Vidal, M., Vieira, H. L. A., Vierstra, R. D., Vigneswaran, N., Vij, N., Vila, M., Vila, M., Vila, M., Villar, M., Villar, V. H., Villarroja, J., Vindis, C., Viola, G., Viscomi, M. T., Vitale, G., Vogl, D. T., Voitsekhovskaja, O. V., von Haefen, C., von Schwarzenberg, K., Voth, D. E., Vouret-Craviari, V., Vuori, K., Vyas, J. M., Waeber, C., Walker, C. L., Walker, M. J., Walter, J., Wan, L., Wan, L., Wan, X., Wang, B., Wang, C., Wang, C. Y., Wang, C., Wang, C., Wang, C., Wang, D., Wang, F., Wang, F., Wang, G., Wang, H. J., Wang, H., Wang, H. G., Wang, H., Wang, H. D., Wang, J., Wang, J., Wang, M., Wang, M. Q., Wang, P. Y., Wang, P., Wang, R. C., Wang, S., Wang, T. F., Wang, X., Wang, X. J., Wang, X. W., Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y. J., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y. T., Wang, Y., Wang, Z. N., Wappner, P., Ward, C., Ward, D. M. V., Warnes, G., Watada, H., Watanabe, Y., Watase, K., Weaver, T. E., Weekes, C. D., Wei, J., Weide, T., Weihl, C. C., Weindl, G., Weis, S. N., Wen, L., Wen, X., Wen, X., Wen, Y., Wen, Y., Westermann, B., Weyand, C. M., White, A. R., White, E., Whitton, J. L., Whitworth, A. J., Wiels, J., Wild, F., Wildenberg, M. E., Wileman, T., Wilkinson, D. S., Wilkinson, S., Willbold, D., Willbold, D., Williams, C., Williams, C., Williams, K., Williamson, P. R., Winklhofer, K. F., Witkin, S. S., Wohlgemuth, S. E., Wollert, T., Wolvetang, E. J., Wong, E., Wong, G. W.,

- Wong, R. W., Wong, V. K. W., Woodcock, E. A., Wright, K. L., Wu, C., Wu, D., Wu, G. S., Wu, J., Wu, J., Wu, M., Wu, M., Wu, S., Wu, W. K. K., Wu, Y., Wu, Z., Xavier, C. P. R., Xavier, C. P. R., Xavier, R. J., Xia, G. X., Xia, T., Xia, W., Xia, W., Xia, Y., Xiao, H., Xiao, J., Xiao, S., Xiao, W., Xie, C. M., Xie, Z., Xie, Z., Xilouri, M., Xiong, Y., Xu, C., Xu, C., Xu, F., Xu, H., Xu, H., Xu, J., Xu, J., Xu, J., Xu, J., Xu, L., Xu, X., Xu, Y., Xu, Y., Xu, Z. X., Xu, Z., Xu, Z., Xue, Y., Yamada, T., Yamamoto, A., Yamanaka, K., Yamashina, S., Yamashiro, S., Yan, B., Yan, B., Yan, X., Yan, Z., Yanagi, Y., Yang, D. S., Yang, J. M., Yang, L., Yang, M., Yang, P. M., Yang, P., Yang, Q., Yang, W., Yang, W. Y., Yang, X., Yang, Y., Yang, Y., Yang, Z., Yang, Z., Yao, M. C., Yao, P. J., Yao, X., Yao, Z., Yao, Z., Yao, Z., Yasui, L. S., Ye, M., Yedvobnick, B., Yeganeh, B., Yeh, E. S., Yeyati, P. L., Yi, F., Yi, L., Yin, X. M., Yip, C. K., Yoo, Y. M., Yoo, Y. H., Yoon, S. Y., Yoshida, K. I., Yoshimori, T., Young, K. H., Yu, H., Yu, J. J., Yu, J. T., Yu, J., Yu, L., Yu, W. H., Yu, X. F., Yu, Z., Yuan, J., Yuan, Z. M., Yue, B. Y. J. T., Yue, J., Yue, Z., Zacks, D. N., Zacksenhaus, E., Zaffaroni, N., Zaglia, T., Zakeri, Z., Zecchini, V., Zeng, J., Zeng, M., Zeng, Q., Zervos, A. S., Zhang, D. D., Zhang, F., Zhang, G., Zhang, G. C., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J. P., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, M. Y., Zhang, X., Zhang, X. D., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhao, M., Zhao, W. L., Zhao, W. L., Zhao, W. L., Zhao, X., Zhao, Y. G., Zhao, Y., Zhao, Y., Zhao, Y. X., Zhao, Z., Zhao, Z. J., Zheng, D., Zheng, X. L., Zheng, X., Zhivotovsky, B., Zhivotovsky, B., Zhong, Q., Zhong, Q., Zhou, G. Z., Zhou, G., Zhou, H., Zhou, S. F., Zhou, X. J., Zhou, X. J., Zhou, X. J., Zhu, H., Zhu, H., Zhu, W. G., Zhu, W., Zhu, X. F., Zhu, Y., Zhuang, S. M., Zhuang, X., Ziparo, E., Zois, C. E., Zoladek, T., Zong, W. X., Zorzano, A., Zorzano, A., Zorzano, A., and Zughaier, S. M. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. **12**, 1–222
100. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001) Dissection of Autophagosome Formation using Apg5-deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657–667
  101. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003) Erratum: LC3, a

- mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (EMBO Journal (2000) 19 (5720-5728)). *EMBO J.* **22**, 4577
102. Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K. Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H., Bates, G. P., Schulman, H., and Kopito, R. R. (2007) Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*. **448**, 704–708
  103. Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N., and Bonini, N. M. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*. **93**, 939–949
  104. Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C. A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure IV, L. S., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L., and Detloff, P. J. (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*. **91**, 753–763
  105. Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H., and Toda, T. (2007) A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 332–340
  106. Wang, Y. L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K., and Kanazawa, I. (2005) Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.* **53**, 241–249
  107. Boado, R. J., Kazantsev, a, Apostol, B. L., Thompson, L. M., and Pardridge, W. M. (2000) Antisense-mediated down-regulation of the human huntingtin gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 239–243
  108. Nellesmann, C., Abell, K., Nørremølle, A., Løkkegaard, T., Naver, B., Röpke, C., Rygaard, J., Sørensen, S. A., and Hasholt, L. (2000) Inhibition of Huntingtin Synthesis by Antisense Oligodeoxynucleotides. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 313–323
  109. Yen, L., Strittmatter, S. M., and Kalb, R. G. (1999) Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann. Neurol.* **46**, 366–373
  110. Yu, D., Pendergraff, H., Liu, J., Kordasiewicz, H. B., Cleveland, D. W., Swayze, E. E., Lima, W. F., Crooke, S. T., Prakash, T. P., and Corey, D. R. (2012) Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Cell*. **150**, 895–908

111. Méndez-Acevedo, K. M., Valdes, V. J., Asanov, A., and Vaca, L. (2017) A novel family of mammalian transmembrane proteins involved in cholesterol transport. *Sci. Rep.* **7**, 1–12
112. Valdes, V. J., Athie, A., Salinas, L. S., Navarro, R. E., and Vaca, L. (2012) CUP-1 is a novel protein involved in dietary cholesterol uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. **7**, 1–13
113. Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M., and Machaca, K. (2005) RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **436**, 1044–1047
114. Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X., and Ding, S. W. (2005) Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **436**, 1040–1043
115. Tsukada, Miki Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of. *October*. **333**, 169–174
116. Cuervo, a M., Knecht, E., Terlecky, S. R., and Dice, J. F. (1995) Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* **269**, C1200–C1208
117. Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P. H., Goldman, S., and Jin, S. (2009) Targeted deletion of autophagy-related 5 (*atg5*) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy*. **5**, 1118–1130
118. Taichi Hara, Kenji Nakamura, Makoto Matsui, Akitsugu Yamamoto, Yohko Nakahara, Rika Suzuki-Migishima, Minesuke Yokoyama, Kenji Mishima, Ichiro Saito, Hideyuki Okano, & N. M. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. **441**, 885–889
119. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. **441**, 880–884
120. Deretic, V. (2010) Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 252–262
121. Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., and Guan, J. L. (2010) FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*. **116**, 4806–4814
122. Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C. Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M. A.,

- Ney, P. A., and Thompson, C. B. (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*. **112**, 1493–1502
123. Mortensen, M., Ferguson, D. J. P., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., and Simon, A. K. (2010) Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 832–837
  124. Honda, S., Arakawa, S., Nishida, Y., Yamaguchi, H., Ishii, E., and Shimizu, S. (2014) Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat. Commun.* **5**, 1–13
  125. Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 425–434
  126. Farré, J. C., Krick, R., Subramani, S., and Thumm, M. (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 522–530
  127. Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D. C. (2007) Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.* **282**, 5641–5652
  128. Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, Cuervo AM, García de Yébenes J, M. M. (2010) Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis.* **39**, 423–38
  129. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, S. A. (2010) Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Arch Neurol.* **67**, 1464–72
  130. Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1221–1228
  131. Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H. W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. **469**, 323–335

132. Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G. R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A. D., Sun, Q., Pallauf, K., MacDuff, D., Huerta, C., Virgin, H. W., Bernd Helms, J., Eerland, R., Tooze, S. A., Xavier, R., Lenschow, D. J., Yamamoto, A., King, D., Lichtarge, O., Grishin, N. V., Spector, S. A., Kaloyanova, D. V., and Levine, B. (2013) Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*. **494**, 201–206
133. Ren, R., Xu, X., Lin, T., Weng, S., Liang, H., Huang, M., Dong, C., Luo, Y., and He, J. (2011) Cloning, characterization, and biological function analysis of the SidT2 gene from *Siniperca chuatsi*. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 692–701

## 謝辞

本研究を行うにあたり、親身にご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 高橋伸一郎 准教授に深く感謝いたします。さらに、研究を進めるにあたりご指導、アドバイスを頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 伯野史彦 助教、片岡直行 特任准教授、米山鷹介 博士をはじめとした動物細胞制御学研究室の皆様にご挨拶を申し上げます。また、共同研究を行う機会を与えて下さいました国立・精神神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部 和田圭司 部長、共同研究先においてご指導を賜りました株田智弘 室長、研究を進めるにあたりご協力して頂きました藤原悠紀 博士を含めた疾病研究第四部の皆様、さらに第3章の電子顕微鏡観察を補助して下さいました菊地 寿枝さん、第4章の RI 実験を手伝って下さいました Contu Viorica Raluca さん、第4章の Gymnosis 実験を手伝って下さいました高橋昌幸 博士、第4章の SIDT2 の局在を解析する顕微鏡観察の補助して下さいました新潟大学医学部 井川 彩土さんにも心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、結びとさせていただきます。



## 追記

本論文の第3章の Fig. 3-1 から Fig. 3-5 は博士前期課程の成果としてまとめたものである。