

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05710

研究課題名（和文）膜透過型オートファジーの制御機構

研究課題名（英文）Mechanism and regulation of transport-type autophagy

研究代表者

株田 智弘（Kabuta, Tomohiro）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・室長

研究者番号：70535765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 51,400,000円

研究成果の概要（和文）：RNautophagy/DNautophagy (RDA)における核酸のリソソーム取り込みにATP消費が必要であり、V-ATPaseは必要でないことを示した。RNautophagyについて、自然免疫受容体を介した活性化機構、SIDT2細胞質側の核酸結合配列など、新たな制御機構を複数見いだした。リソソームにATP依存的にタンパク質が直接取り込まれ、分解されるという現象を発見した。その分子機構の1つとしてSIDT2を介した経路を見いだした。さらに、この分解機構が破綻するとタンパク質が細胞内に蓄積し、神経筋疾患の原因となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルチモードオートファジーについては不明な点が多かった。本研究ではそのような多様なオートファジー経路の分子機構、制御機構と生理・病態生理的意義の一端を解明した。本研究で明らかとなった分解経路やこれらの経路において機能するタンパク質は、アルツハイマー病・パーキンソン病など、タンパク質蓄積が原因となる神経変性疾患や筋疾患について新たな治療標的となり得る。

研究成果の概要（英文）：We showed that ATP consumption is required for lysosomal uptake of nucleic acids during RNautophagy/DNautophagy (RDA), but V-ATPase is not required. We found multiple regulatory mechanisms underlying RNautophagy, including an activation mechanism mediated by innate immune receptors and a nucleic acid binding sequence in the cytoplasmic domain of SIDT2. We found a phenomenon in which proteins are directly taken up into lysosomes in an ATP-dependent manner and degraded. We also found that SIDT2 mediates this pathway. Furthermore, we revealed that dysfunction of this degradation mechanism leads to accumulation of proteins within cells, causing neuromuscular diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー タンパク質分解 核酸分解

1. 研究開始当初の背景

リソソームはタンパク質だけでなく、核酸、脂質など様々な生体高分子を分解することができる。リソソームによる高分子分解は生体恒常性維持に必須であり、例えば、リソソームに局在する RNA 分解酵素 RNaseT2 の機能欠損は幼児期に白質脳症を引き起こす (Nat Genet 2009 pp773-)。オートファジー研究においては、これまでマクロオートファジーの研究が中心に進められてきた。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 (CMA)は膜透過型オートファジーであるとされているが、膜透過機構は解明されていない。一方我々は「リソソームが ATP 依存的に RNA/DNA を直接取り込み、分解する」というタイプのオートファジーを発見し、「RNautophagy/DNautophagy」 (RDA)と名付けた (Autophagy 2013)。また、RDA のリソソーム内への基質輸送におけるキー分子としてリソソームに局在する複数回膜貫通タンパク質 SIDT2 を同定した (Autophagy 2016, Autophagy 2017)。SIDT2 は、双方向性 RNA チャネルであることが示唆される線虫 SID-1 (RNA 2011 pp1057-)の脊椎動物オルソログであることから、核酸を膜透過させるタンパク質である可能性がある。RDA は核酸が関与する様々な生命現象や疾患において重要な役割を果たしていると推定されるが、詳細な分子機序や生体における役割の解明にはさらなる研究が必要である。また我々は「リソソームが ATP 依存的にタンパク質を直接取り込み、分解する」という現象も見いだし (開始当初未発表データ)研究中所である。

2. 研究の目的

以上の研究背景のもと、本研究では RDA 活性を制御する機構と細胞内シグナルの解明、ATP 依存性のエネルギー基盤解明、RDA 内在性基質の同定、RDA の生理・病態生理的意義の解明、透過に関する輸送装置の同定と機能解明を目的とする。さらに得られた結果を応用し、タンパク質のリソソームへの取り込み機構解明も目指す。

3. 研究の方法

核酸のリソソーム内への輸送活性は単離リソソームを用いたアッセイ、またはパルス・チェイスアッセイにより測定した。タンパク質のリソソーム内への輸送活性についても単離リソソームを用いたアッセイ、またはパルス・チェイスアッセイにより測定した。また、タンパク質やオルガネラの動態解析については、ライブセルイメージング、超解像共焦点顕微鏡解析、CLEM などを用いた。詳細は論文内に記載している。

4. 研究成果

RDA 活性を制御する機構と細胞内シグナルの解明

SIDT2 の細胞質側領域にアルギニン・リッチ核酸結合配列が存在し、この配列が SIDT2 を介した RDA 活性に重要であることを見いだした (Autophagy. 2020, 図 1, 2)。

RDA の制御分子 SIDT2 や LAMP2C の発現および RDA 活性が、核酸の自然免疫受容体シグナル活性化により上昇し、ウイルス核酸の分解やウイルス増殖抑制に寄与することを見いだした (RNA Biol. 2024, 図 3)。

RDA の活性に関与する RNA helicase を同定した (投稿準備中)。

ATP 依存性のエネルギー基盤解明

RDA における核酸のリソソームへの取り込みは、V-ATPase、リソソームの酸性化に依存せず、しかし ATP 消費に依存することを示した (BBRC. 2023, 図 4)。

基質のリソソーム内への取り込みに関与する ATPase 候補を 2 種類同定した (投稿準備中)。

RDA 内在性基質の同定

ポリグルタミン病の原因となる伸長 CAG リpeat RNA と SIDT2 の細胞質領域が直接結合すること、CAG リpeat RNA が SIDT2 を介した RNautophagy の基質となって分解されることを見いだした (Autophagy. 2020)。そのほかにも複数の RNA 基質を同定した(投稿準備中)。

タンパク質のリソソーム内への取り込み機構解明

単離リソソームを用いて、ATP 依存的にタンパク質が直接リソソーム内に取り込まれ分解されるという現象を発見した。また、タンパク質の取り込みについても SIDT2 が仲介することを見いだした (Fujiwara et al. bioRxiv. 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.11.245688>)。

膜透過に関する輸送装置の同定と機能解明

研究開始当初は SIDT2 が膜透過を担う輸送タンパク質であると想定していたが、2023 年にクライオ電子顕微鏡構造が報告され (Nat Commun. 2023, 3568)、SIDT2 はチャネルやトランスポーターではないことが強く示唆された。現在 SIDT2 がマイクロオートファジーのように膜陥入を変化させているかどうか解析中である。

生理・病態生理的意義の解明

上述のように CAG リピート RNA が SIDT2 を介した RNautophagy の基質となって分解されることから (Autophagy. 2020)、ポリグルタミン病の病態に RNautophagy が関与することが示唆された。他の研究グループからも、LAMP2C を介した RNautophagy により伸長 CAG リピート RNA foci の形成が阻害されているということが報告されている (Nature Chemical Biol. 2023, 19, 1372–1383)。

SIDT2 を介したオートファジー経路 (RDA およびタンパク質の直接取り込み分解経路) の生理・病態生理的意義を解明するために SIDT2 KO マウスを作出し解析を行なった。その結果、骨格筋に顕著な異常が観察された。詳細な解析の結果、KO マウスにおいて筋力低下・筋萎縮・縁取り空胞 (巨大な凝集体) の出現・SIDT2 を介したオートファジー経路の活性低下・基質タンパク質と RNA の蓄積が明らかとなった (Fujiwara et al. bioRxiv. 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.11.245688>)。さらに、ヒトにおいてニューロパチーおよび縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの家系患者において SIDT2 の変異を見いだした (bioRxiv)。以上の結果から、SIDT2 を介したオートファジー経路は骨格筋の恒常性維持に必要であることが明らかとなった。また、SIDT2 を介したオートファジー経路が破綻すると骨格筋内にタンパク質や RNA が蓄積し、凝集体が形成され筋萎縮に至るといった病態機序が示唆された。

比較対象としてマクロオートファジーに必要な ATG7 の骨格筋特異的 cKO マウスの解析も行なった。このマウスでは縁取り空胞は観察されず (bioRxiv)、これらの結果からマルチモードオートファジー各経路における生理・病態生理的役割の違いの一端が明らかとなった。

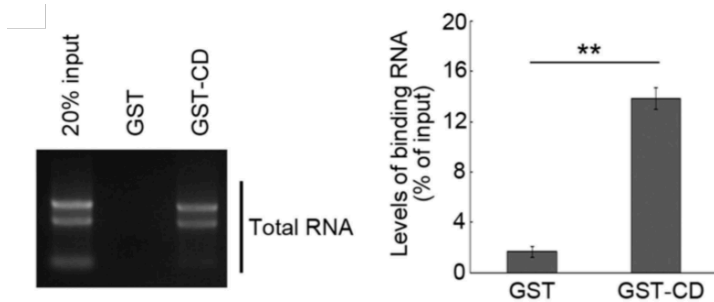


図 1. SIDT2 細胞質領域 (CD) と RNA の結合. (Autophagy. 2020 より改変引用)

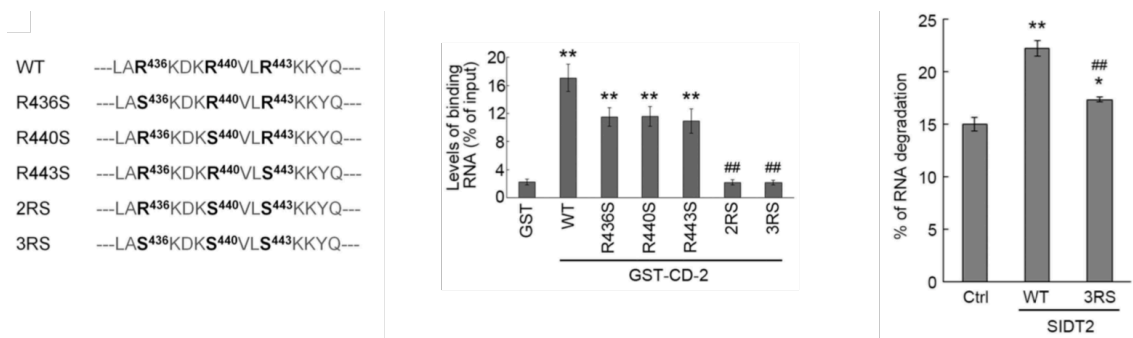


図 2. SIDT2 CD の各種変異体の配列 (左). 各種 CD と RNA の結合. 2RS と 3RS は結合しない. (中央). パルス・チェイスアッセイによる細胞内 RNA 分解. 野生型 SIDT2 全長では分解が促進され 3RS SIDT2 全長では促進されない (右). (Autophagy. 2020 より改変引用)

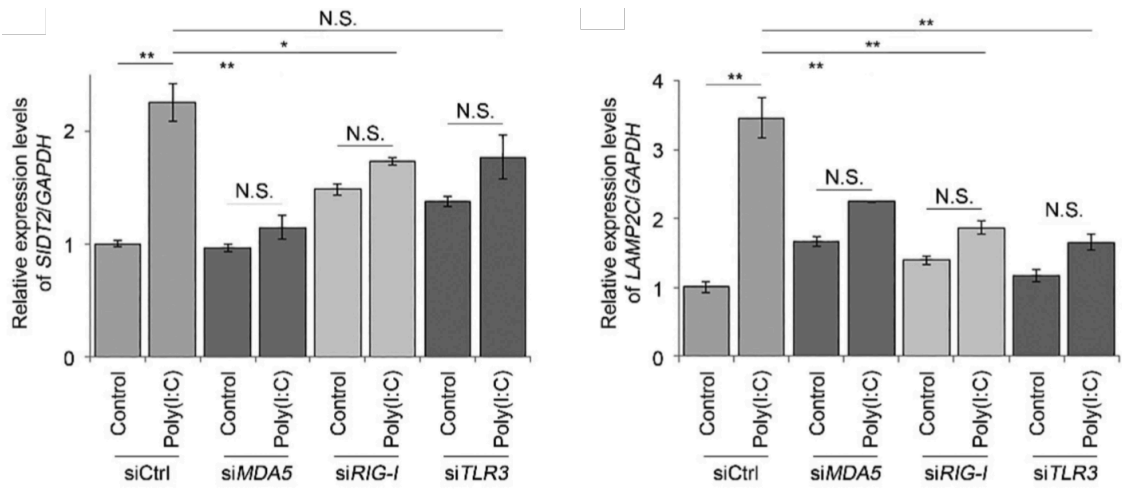


図 3. Poly(I:C)処理による SIDT2 や LAMP2C の発現上昇は MDA5, RIG-I, TLR3 それぞれのノックダウンにより阻害される。(RNA Biol. 2024 より改変引用)

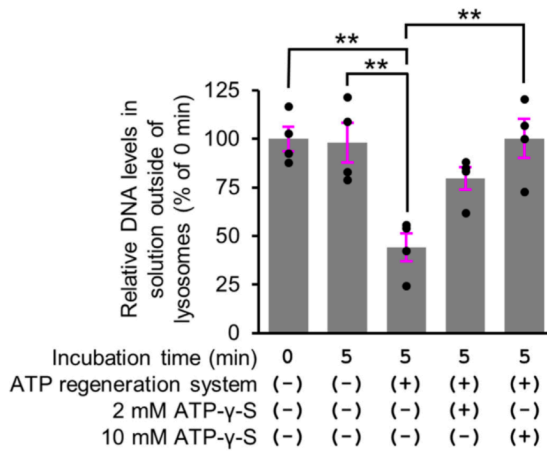


図 4. 単離リソソームへの ATP 依存的な核酸移行. 100%からの減少量が移行した核酸量 (%)を示す。(BBRC. 2023 より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Contu Viorica Raluca, Sakai Ryohei, Fujiwara Yuuki, Kabuta Chihana, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 644
2. 論文標題 Nucleic acid uptake occurs independent of lysosomal acidification but dependent on ATP consumption during RNautophagy/DNautophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 105 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Yuuki, Kabuta Chihana, Sano Terunori, Murayama Shigeo, Saito Yuko, Kabuta Tomohiro	4. 巻 152
2. 論文標題 Pathology-associated change in levels and localization of SIDT2 in postmortem brains of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105243 ~ 105243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2021.105243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hase Katsunori, Contu Viorica Raluca, Kabuta Chihana, Sakai Ryohei, Takahashi Masayuki, Kataoka Naoyuki, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Fujiwara Yuuki, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Cytosolic domain of SIDT2 carries an arginine-rich motif that binds to RNA/DNA and is important for the direct transport of nucleic acids into lysosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1974 ~ 1988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1712109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Yuuki, Contu Viorica Raluca, Kabuta Chihana, Ogawa Megumu, Fujita Hiromi, Kikuchi Hisae, Sakai Ryohei, Hase Katsunori, Suzuki Mari, Koyama-Honda Ikuko, Inoue Michio, Oya Yasushi, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Takahashi Ryosuke, Nishino Ichizo, Wada Keiji, Noguchi Satoru, Kabuta Tomohiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Discovery of a protein uptake pathway in lysosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.08.11.245688	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Klionsky DJ et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujiwara Yuuki, Oroku Kazuki, Zhou Yinping, Takahashi Masayuki, Katayama Taiichi, Wada Keiji, Tsutsumi Nobuyuki, Sato Tetsuo, Kabuta Tomohiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression of RNautophagy/DNautophagy-related genes is regulated under control of an innate immune receptor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2023.2291610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomohiro Kabuta
2. 発表標題 ATP-dependent uptake of proteins by lysosomes
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 新規の膜透過型オートファジーと神経変性疾患
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 リソソームによる新しいタンパク質分解機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 RNautophagyの分子メカニズムと役割
3. 学会等名 第67回日本薬学会 関東支部大会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 LAMP2Bを介したミクロリポファジーの分子メカニズムと役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会, シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 リソソームが直接的にタンパク質・核酸を取り込む細胞内分解機構とその役割
3. 学会等名 第2回タンパク質シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 SIDT2を介した生体高分子のリソソームへの 取り込み機構
3. 学会等名 日本薬剤学会第39年会, シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 株田智弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ「オートファジー-分子機構・生物学的意義・疾患との関わり」	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 標的ポリペプチド分解誘導剤	発明者 株田智弘、他5名	権利者 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究セン
産業財産権の種類、番号 特許、2020-119736	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関