

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24680038

研究課題名(和文)脳特異的かつ選択的な新規オートファジー経路の解明とその生理的意義

研究課題名(英文)Analyses of a novel type of 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) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体の恒常性維持には生体高分子が細胞内で適切に分解されることが必須である。またその破綻は、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患に関連していると考えられていることから、細胞内分解システムの解明は生命科学・医学において極めて重要なテーマの1つである。本研究では、リソソームがATP依存的に直接RNAまたはDNAを外部から内部に取り込み、分解するという全く新しい細胞内分解システムを世界で初めて発見し、これをRNautophagy及びDNautophagyと名付けた。さらにRNautophagyの生理的役割の1つは、細胞内の定常的なRNA分解であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：A proper intracellular degradation of biological macromolecules is essential for the maintenance of biological homeostasis. Dysfunction of the degradation systems is thought to be involved in various diseases, such as neurodegenerative disorders. Therefore, it is important to clarify intracellular degradation systems. In this study, we discovered a novel degradation system, RNautophagy and DNautophagy, where RNA and DNA are directly taken up by lysosomes in an ATP-dependent manner and degraded, respectively. We also found that one of the physiological functions of RNautophagy is a constitutive degradation of intracellular RNA.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：リソソーム オートファジー RNA分解 選択的オートファジー RNautophagy DNautophagy SIDT2

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持には生体高分子が細胞内で適切に分解されることが必須である。またその破綻は、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患に関連していると考えられていることから、細胞内分解システムの解明は生命科学・医学において極めて重要なテーマの1つである。

オルガネラであるリソソームは細胞内において最大の分解区画である。リソソームの内部には蛋白質、核酸、脂質などに対する分解酵素が含まれており、リソソームは様々な生体高分子を分解することができる。リソソームによる細胞内蛋白質分解、すなわちオートファジーとしては、1) マクロオートファジー、2) ミクロオートファジー、3) シャペロン介在性オートファジー (CMA) の3種類が知られている。マクロオートファジーはオートファゴソームを介したオートファジーであり、細胞質の基質はオートファゴソームに取り込まれた後にリソソーム内へ輸送され分解される。ミクロオートファジーは、リソソーム膜が陥入・変形することにより直接細胞質の基質を取り込み・分解する経路であるが、哺乳類細胞において機能しているかは不明である。CMA においては、細胞質の基質蛋白質は HSC70 シャペロンによって認識され、リソソーム膜を直接通過し内部で分解されるが、リソソーム膜通過のメカニズムは不明である。CMA は HSC70 及び ATP 依存的であり、リソソーム膜上の LAMP2A 蛋白質が受容体として機能すると報告されている。研究代表者は、この3種類以外にもオートファジーが存在する可能性を見いだしていた。

2. 研究の目的

上記の新規オートファジーの存在を示し、そのメカニズムと生理的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

リソソーム膜蛋白質である LAMP2C の細胞質側配列に、蛋白質が結合することを見いだしていた。そこで、LAMP2C の細胞質側配列に直接結合する物質についてプルダウンアッセイにより検討した。リソソームによる生体高分子の分解については、組織や細胞から単離したリソソームを用いた無細胞実験系を新たに構築した。培養細胞を用いた実験に関しては、常法に従った。また、その他の方法は適宜下記に示した。

4. 研究成果

LAMP2C の細胞質側配列に結合する蛋白質を質量分析により解析したところ、そのほとんどは RNA 結合蛋白質であった。精製 RNA を用いたプルダウンアッセイの結果から、LAMP2C の細胞質側配列に RNA が直接

結合することを見いだした。LAMP2C 細胞質配列と RNA 結合蛋白質の結合は、RNA を介した間接的な結合であった。さらに単離リソソームを用いた無細胞実験系により、ATP 依存的に RNA がリソソーム内に直接取り込まれ、分解されるということを見出した。この経路は CMA と異なり、HSC70 には非依存的であった。この新規分解システムを RNautophagy と名付けた。

DNA についても検討し、同様の現象を見いだした。この分解システムについては DNautophagy と名付けた。

LAMP2C を過剰発現細胞あるいは、LAMP2 遺伝子 (LAMP2C は LAMP2 遺伝子産物の1つ) のノックアウトマウス組織由来のリソソームを用い、LAMP2C が RNautophagy/DNautophagy (RDA) において核酸受容体として機能することができることを示した。また、マウスの組織における発現パターンを解析した結果、LAMP2C はユビキタスに発現しているが、特に脳に多く発現しており、なかでも神経細胞に多く発現していた。さらに、LAMP2 ノックアウトマウスの脳において、野生型と比較して RNA 蓄積 (RNA 量の増加) が観察されたことから、RNautophagy は動物個体においても機能していることが示唆された。

RNA/DNA はチャネル蛋白質などの輸送体を介して膜通過すると考えられるが、一般的にチャネルを形成する蛋白質は複数回膜貫通蛋白質であり、LAMP2C 自身がチャネルである可能性は非常に低い。そこで、RDA における RNA/DNA トランスポーターをデータベースから探索した。その結果、RNA トランスポーターの候補分子として、SIDT2 を見いだした。C. elegans の SID-1 蛋白質は細胞膜における RNA トランスポーターであることが報告されており、SIDT2 は SID-1 の哺乳類オルソログの1つである。SIDT2 を過剰発現細胞あるいは、ノックダウンした細胞由来のリソソームを用い、SIDT2 が RNautophagy を仲介することを示した。さらに、MEF 細胞において SIDT2 のノックダウンしたところ、細胞内の定常的 RNA 分解の約 50% が阻害されたことから、RNautophagy は細胞内の恒常的 RNA 分解において主要経路の1つであることが強く示唆された。

一方で疾患との関連性についても解析をすすめた。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンの変性を特徴とする致死的な神経変性疾患である。孤発性、家族性を含む多くの患者において、原因として C9ORF72 遺伝子内の非翻訳領域における GGGGCC リピート配列の異常伸長が特定され、異常リピート配列を有する RNA が主な病因となると考えられている。単離リソソームを用いたアッ

セイにより、このレポート配列が in vitro での RDA の基質となることを見いだした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

1. Aizawa S, Fujiwara Y, Contu VR, Hase K, Takahashi M, Kikuchi H, Kabuta C, Wada K, *Kabuta T. Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy*. 2016;12(3):565-578. doi: 10.1080/15548627.2016.1145325. 査読有

2. Hase K, Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Hakuno F, Takahashi S, Wada K, *Kabuta T. RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(13):6439-6449. doi: 10.1093/nar/gkv579. 査読有

3. Fujiwara Y, Hase K, Wada K, *Kabuta T. An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(2):281-286. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.025. 査読有

4. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Spiro AS, Furuta A, Cooper A, Garner B, Kabuta T, *Halliday GM. Lysosomal-associated membrane protein 2 Isoforms Are Differentially Affected in Early Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1639-1647. doi: 10.1002/mds.26141. 査読有

5. Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada D, Fujiwara Y, Kabuta T, Nishino I, Wada K, Uchiyama Y. Property of lysosomal storage disease associated with midbrain pathology in the central nervous system of Lamp-2-deficient mice. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1713-1723. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.015. 査読有

6. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, *Kabuta T. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. 2013;9(8):1167-1171. doi: 10.4161/autophagy.24880. 査読有

7. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, *Kabuta T. Discovery of a Novel type of Autophagy Targeting RNA. *Autophagy*. 2013;9(3):403-409. doi: 10.4161/autophagy.23002. 査読有

8. Furuta A, Wakabayashi K, Haratake J, Kikuchi

H, Kabuta T, Mori F, Tokonami F, Katsumi Y, Tanioka F, Uchiyama Y, Nishino I, Wada K. Lysosomal storage and advanced senescence in the brain of LAMP-2-deficient Danon disease. *Acta Neuropathol*. 2013;125(3):459-461. doi: 10.1007/s00401-012-1075-4. 査読有

[学会発表](計6件)

1. 株田智弘: RNautophagy/DNautophagy のメカニズム. 第 67 回日本細胞生物学会大会(シンポジウム), 東京, 2015, 6.30 - 7.2

2. Kabuta T: A Novel Type of autophagy targeting RNA and its possible involvement in Danon disease. Max Planck Institute & National Center of Neurology and Psychiatry Joint Symposium. Hakone: 2014, 11.5 - 11.7

3. 株田智弘: リソソームにおける新たな核酸分解システム. 第 87 回日本生化学会大会(シンポジウム). 京都: 2014, 10.15 - 10.18

4. Kabuta T: Direct uptake and degradation of RNA/DNA by lysosomes. The 16th Northeastern Asian Symposium on Autophagy: from Basic to Medicine. Busan, Korea: 2014, 12.18 - 12.21

5. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T: A Novel Type of Autophagy that targets RNA. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, Autophagy, Inflammation and Immunity, Montreal, Canada, 2013, 2.18 - 2.21

6. Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T: 脳における RNA を標的とした新規オートファジー経路. A novel type of autophagy targeting RNA in brain. (第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会 合同大会、シンポジウム) 京都, 2013, 6.20 - 6.23

[図書](計2件)

1. Kabuta T, Fujiwara Y, Wada K. (2013) ROLES OF MULTIPLE TYPES OF AUTOPHAGY IN NEURODEGENERATIVE DISEASES. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection (Elsevier)*

2. Kabuta T, Fujiwara Y, Wada K. (2013) Do lysosomes take up various macromolecules independently of membrane traffic? 「生化学」, 2013;85(12):1057-1066. URL: http://www.jbsoc.or.jp/back_no/85-12

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 異常核酸分解誘導剤

発明者：株田智弘, 藤原悠紀, 和田圭司, 相澤修, 長谷勝徳
権利者：国立精神・神経医療研究センター
種類：特許権

番号：PCT/JP2015/78730

出願年月日：2015.10.9

国内外の別： 国外

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/staff/kabuta_RNautophagy.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

株田智弘 (Kabuta Tomohiro)
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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：