

令和 2 年 11 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05146

研究課題名（和文）非小胞輸送型オートファジーの生理・病態生理的意義

研究課題名（英文）Physiological and pathophysiological roles of nonmembrane 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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：RNautophagyにおけるputative transporter SIDT2の制御機構を明らかにした。また、SIDT2の細胞質側ドメインはarginine rich motifを介してハンチントン病の原因遺伝子であるHTT mRNAの直接結合すること、結合はpolyQ依存的であること、HTT mRNAはRNautophagyの基質となって分解されることを見いだした。SIDT2 KOマウスの詳細な解析やヒトの疾患家系におけるSIDT2変異の探索を行ない、SIDT2の機能異常により発症する病態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であった新規オートファジーの生理・病態生理的意義の解明が進んだ。本研究結果から、RNautophagyは翻訳中あるいは翻訳前のmRNAを分解することができると考えられ、神経変性疾患など疾患の原因となるタンパク質の量を低下させるためにRNautophagyの活性化が応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of regulation of putative transporter SIDT2 in RNautophagy was clarified. In addition, We found that the cytoplasmic domain of SIDT2 binds directly to HTT mRNA, the causative gene of Huntington's disease, via the arginine rich motif, and that the binding is polyQ-dependent, and that HTT mRNA is degraded as a substrate of RNautophagy. We performed a detailed analysis of SIDT2 KO mice and searched for SIDT2 mutations in human disease families, and clarified the pathology caused by SIDT2 dysfunction.

研究分野：細胞内分解

キーワード：オートファジー RNautophagy リソソーム RNA分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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ことから、リソソームによる RNA 分解は生体恒常性維持に必須である。我々は近年、リソソームが RNA/DNA を直接取り込み分解するという新たな非小胞輸送型オートファジーシステムを発見し、「RNautophagy/DNautophagy (RDA)」と名付けた (Autophagy, 2013a, Autophagy, 2013b)。これらの新システムにおいて、リソソーム内への RNA/DNA の取り込みは ATP 依存的であり、またリソソーム膜タンパク質 LAMP2C (LAMP2 スプライスバリエーション A, B, C の 1 つ) が RNA/DNA 受容体として機能することを明らかにした。LAMP2C の細胞質配列は RNA/DNA との結合能をもつ (Autophagy, 2013ab)。Lamp2 欠損マウス (A, B, C 全て欠損) では RNA 蓄積が観察され、新規オートファジーが *in vivo* において機能していることが示唆された。しかしながら Lamp2 欠損マウス由来のリソソームでは RDA 活性は減弱するものの残存しており、より重要であると考えられる輸送体の同定を行ってきた。そして、RNautophagy におけるリソソーム膜 RNA 輸送体 SIDT2 を同定、この分子が細胞内の恒常的 RNA 分解において主要な役割をしていることを示した (Autophagy, 2016)。さらに RDA の基質選択性も明らかにした (Nucleic Acids Res. 2015)。以上のように 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考えられるが、生体における意義の解明にはさらなる研究が必要である。

哺乳類のリソソームにおいて、この他にも非小胞輸送型オートファジーである chaperone-mediated autophagy (CMA) が機能していることが報告されている。CMA では、ATP 及び Hsc70 シャペロン依存的に特定の基質タンパク質が直接リソソームに取り込まれ、分解される。この経路においてリソソーム膜タンパク質 LAMP2A が受容体として機能すると報告されている。しかしながら、Lamp2 欠損マウスにおいて CMA 基質の蓄積は起きておらず、より重要と考えられる輸送体の同定が必要である。このように CMA に関しては不明な点が多く、その解明はオートファジー研究における重要課題の 1 つである。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した RDA 及びその類似システムである直接的なタンパク質分解経路の生理・病態生理的意義解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) RNautophagy により分解される細胞内基質の同定
ヒトの疾患に関連のある RNA が RNautophagy の基質となるか調べるために、ハンチントン病の原因遺伝子である HTT (huntingtin) の mRNA について、SIDT2 の細胞質側ドメインとの結合性をプルダウンアッセイにより解析した。SIDT2 の細胞質側ドメインは GST との融合タンパク質として大腸菌を用いて精製し、mRNA は *in vitro* transcription により作製した。HTT mRNA が RNautophagy の基質となるかどうか、培養細胞レベルで Tet-off システムを用いて解析した。(Hase et al. Autophagy, 2020)

2) SIDT2 と LAMP2C の関係性の解明
Neuro2a 細胞に SIDT2 と LAMP2C を、それぞれまたは同時に発現させ、パルスチェイスアッセイにより細胞内 RNA 分解活性への影響を解析した。(Hase et al. Autophagy, 2020)

3) リソソームへの直接的なタンパク質取り込み機構の解明
単離リソソームを用いて、リソソームへのタンパク質取り込みの実験系を構築した。単離リソソームで起こる既知のオートファジー経路である CMA・RDA と、この現象の関係性を解析した。

4) RDA の動物個体における意義の解明
CRISPR/Cas9 系を用いて新たに SIDT2 KO マウス (exon 13-26 欠損マウス) を作出した。本研究では、顕著な変化が観察された骨格筋について、詳細な病理解析などを行なった。また、関連するマウス行動テストも行なった。

5) SIDT2 の新規遺伝子変異の探索
我々の所属する国立精神・神経医療研究センターの whole exome sequencing data を活用し、SIDT2 遺伝子変異の検索を行った。

4. 研究成果

1) RNautophagy により分解される細胞内基質の同定
SIDT2 の細胞質ドメイン (cytosolic domain, CD) は、直接 HTT mRNA と結合することを見いだした。SIDT2 CD の核酸結合モチーフ arginine-rich motif (ARM) に変異を導入した 3RS 変異体では mRNA と結合せず、この結合は ARM を介していることを明らかにした。正常長の CAG

リピートを含む野生型 HTT mRNA と比較して、異常伸長 CAG リピートを有する変異型 HTT mRNA では SIDT2 CD との結合量が多く、結合は CAG リピート依存的事であることを示した。細胞レベルの解析では、SIDT2 の過剰発現によって HTT mRNA 分解が亢進したことから、HTT mRNA は RNautophagy の基質として分解された。さらに、SIDT2 の過剰発現により HTT タンパク質の量やその凝集体の量が減少した。以上の結果から、神経変性疾患の原因となるタンパク質の量を低下させるために RNautophagy の活性化が応用できる可能性が示された。(Hase et al. Autophagy. 2020)

2) SIDT2 と LAMP2C の関係性の解明

SIDT2 過剰発現細胞では、LAMP2C 過剰発現細胞と比較して、より RNA 分解が亢進した。また、SIDT2 と LAMP2C を同時に過剰発現させると、相乗的に RNA 分解を亢進した。この相乗効果は、SIDT2 3RS 変異体を用いた際には観察されず、また LAMP2C の核酸結合モチーフ ARM の変異体を用いた際にも観察されなかったことから、相乗効果は ARM を介していることが明らかになった。LAMP2C は RNautophagy に必須ではないという、これまでの結果をあわせ、SIDT2 が RNautophagy の重要因子であるというモデルがさらに支持された。(Hase et al. Autophagy. 2020)

3) リソソームへの直接的なタンパク質取り込み機構の解明

単離リソソームを用いて、リソソームへのタンパク質取り込みの実験系を構築した。その結果、ATP の存在下でタンパク質が直接的にリソソームへ取り込まれ、内部の加水分解酵素により分解されるという新規の現象を発見した。単離リソソームで起こる既知のオートファジー経路である CMA・RDA と、この新規経路の関係性を解析したところ、Hsc70 や KEFRQ-like モチーフに非依存的事であり CMA とは異なる経路であった。また、この経路は RDA と類似した経路であり、SIDT2 がタンパク質の取り込みも仲介することを見いだした。SIDT2 の過剰発現やノックダウンは、リソソームの pH やタンパク質分解活性自体には影響しないことを確認した。また、単離リソソームでタンパク質基質が取り込み・分解される間に SIDT2 の分解は見られなかったことから、基質取り込みの際に SIDT2 はリソソーム内には取り込まれておらず、タンパク質取り込み機構はミクロオートファジーではなく膜透過型である可能性が高いと考えられた。この新規経路と RDA をあわせて DUMP と名付けた。

4) 動物個体における意義の解明

SIDT2 KO マウスの骨格筋の解析の結果、顕著な筋萎縮と縁取り空胞が観察された。一方、マクロオートファジーに必要な Atg7 の骨格筋 cKO マウスでは、筋萎縮は見られるが縁取り空胞は観察されない。マクロオートファジー欠損骨格筋と異なる病態を示すことは、DUMP が既知のオートファジーと異なる新経路であることと一致していた。縁取り空胞をともなうミオパチーは protein aggregation disease の 1 つであり、DUMP がタンパク質品質管理に必要であることが明らかとなった。

5) SIDT2 の新規遺伝子変異の探索

Whole exome sequencing data を探索し、ニューロパチーおよび縁取り空胞をともなうミオパチーの家系から、原因として SIDT2 遺伝子変異 c.2226delG を見いだした。また、この変異 SIDT2 は、DUMP の活性を有しておらず、dominant negative となることを生化学実験で示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 株田智弘	4. 巻 65
2. 論文標題 核酸を分解する新規細胞内分解経路の発見とその分子メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日生研たより (NIBS LETTER)	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Contu Viorica Raluca, Hase Katsunori, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Fujiwara Yuuki, Kabuta Chihana, Takahashi Masayuki, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 130
2. 論文標題 Lysosomal targeting of SIDT2 via multiple Yxx motifs is required for SIDT2 function in the process of RNautophagy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 2843 ~ 2853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.202481	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 Takahashi Masayuki, Contu Viorica Raluca, Kabuta Chihana, Hase Katsunori, Fujiwara Yuuki, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 SIDT2 mediates gymnosis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1534 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2017.1302641	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 Aizawa Shu, Contu Viorica Raluca, Fujiwara Yuuki, Hase Katsunori, Kikuchi Hisae, Kabuta Chihana, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 218 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2016.1248019	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 Takahashi Masayuki, Contu Viorica Raluca, Kabuta Chihana, Hase Katsunori, Fujiwara Yuuki, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 SIDT2 mediates gymnosis, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1534 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2017.1302641	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, Wada Keiji, Kabuta Tomohiro	4. 巻 161
2. 論文標題 Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids?multiple autophagic pathways	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 145-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvw085	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 -
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 -
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 株田 智弘, Contu Viorica Raluca	4. 巻 91
2. 論文標題 核酸を標的とする膜透過型オートファジー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 620 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910620	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 RNautophagyの細胞内基質
3. 学会等名 第11回オートファジー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 新しいタイプのオーファジー：発見・メカニズム・生物学的意義・神経疾患治療への応用
3. 学会等名 NCNP-TUAT 若手研究シンポジウム2018夏（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kabuta T
2. 発表標題 Molecular mechanisms of RNautophagy DNautophagy
3. 学会等名 KSAP Annual convention 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 非小胞輸送型オートファジーRNautophagy/DNautophagyの分子メカニズム
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 核酸を分解する非小胞輸送型オートファジー –その発見と解明への挑戦–
3. 学会等名 第33回 高峰カンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 株田智弘
2. 発表標題 新しい膜透過型オートファジーの分子機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 藤原悠紀, Viorica Raluca Contu, 長谷勝徳, 株田智弘	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 224 (8ページ分を担当)
3. 書名 The オートファジー 研究者たちの集大成が見える最新ビジュアルテキスト	

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ページ分を担当
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・疾患との関わりー」	

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	野口 悟 (Noguchi Satoru)		