

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

リソソームによる新規核酸分解機構
における核酸認識メカニズム

およびその生理的役割に関する研究

Studies on nucleic acid-recognition mechanism in a
novel nucleic acid-degradation system by lysosomes
and its physiological role

申請者

藤原	悠紀
Yuuki	FUJIWARA

電気・情報生命専攻 薬理学研究

2015年11月

生体の恒常性は物質の合成と分解のバランスの上に成り立っている。リソソームは内部にさまざまな加水分解酵素をもつオルガネラであり、細胞内における物質分解の主要な場のひとつである。リソソームに細胞内の物質を運び込み、分解するシステムのことを広義にオートファジーと呼ぶ。オートファジーにはこれまでマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーという少なくとも3種類のシステムが知られていた。これらのうちシャペロン介在性オートファジーは、基質となるタンパク質をATP依存的にリソソーム内腔へと直接取り込み、分解するシステムである。シャペロン介在性オートファジーにおいて、主要なリソソーム膜タンパク質のひとつであるLAMP2の3種類のスプライスバリエーションのひとつ、LAMP2Aが受容体として機能する。LAMP2は一回膜貫通型のリソソーム膜タンパク質であり、構造の大部分がリソソーム内腔ドメインである一方でC末端の11-12アミノ酸配列のみが細胞質側に露出している。3種類のスプライスバリエーション、LAMP2A、LAMP2B、LAMP2Cは共通したリソソーム内腔配列をもつ一方で、それぞれ異なる細胞質側配列を持つという特徴を持っている。シャペロン介在性オートファジーにおいてLAMP2Aはその細胞質側配列が基質タンパク質と結合することで受容体として機能する。近年、筆者らはリソソームがATP依存的にRNAやDNAを直接内腔へと取り込み、分解するという新規のオートファジーシステムを発見し、RNautophagyおよびDNautophagyと名付けそれぞれ報告してきた。RNautophagy/DNautophagy (RDAと略記)において、LAMP2のスプライスバリエーションのひとつであるLAMP2Cが核酸受容体の少なくともひとつとして機能する。これらに加えてさらに最近では線虫(*C. elegans*)において知られている細胞膜の双方向性RNAトランスポーター、SID-1の哺乳類オルソログで、リソソーム膜に局在するSIDT2がRNautophagyにおいてRNAのリソソームへの取り込みを仲介することも明らかとなっている。

LAMP2Cの細胞質側配列はRNAやDNAと直接結合する。これまでの研究で、核酸のLAMP2Cの細胞質側配列との結合性とRDAにおけるリソソームへの輸送に相関が見られることから、RDAにおいて基質となる核酸のリソソーム膜の受容体との結合が不可欠であることが示唆されるが、一方で*Lamp2*ノックアウトマウス由来のリソソームにおいてもRDA活性は減弱してはいるものの失われていない。これらのことからリソソーム膜にはLAMP2Cと同様の結合様式をもつ別の核酸受容体が存在することが示唆されるが、これまで具体的にどのような機構でLAMP2Cの細胞質側配列が核酸と結合するのかは不明であった。また、これまでのところRDAが具体的に生体において生理的にどのような役割を果たしているのかも、ほとんど明らかになっていない。

本博士論文は、第1章 緒言、第2章 LAMP2Cにおける核酸結合モチーフの探索、第3章 RNautophagyの抗ウイルス免疫応答に対する関与の検討、第4章 総括の全4章からなる。第1章では本研究の背景および導入として、リソソームお

よびこれまで知られていた 3 種類のオートファジー、LAMP2 ならびに RDA について概説した。第 2 章では野生型やさまざまな変異を導入した LAMP2C の細胞質側配列に相当するビオチン標識ペプチドを用いて、LAMP2C の細胞質側配列の核酸結合モチーフの決定を目的に行った研究について記述した。一般的に LAMP2C などの膜タンパク質は溶液中で変性・凝集しやすく、全長での精製や分子間相互作用の研究には不向きである。そこで本研究では LAMP2C の細胞質側配列に相当するビオチン標識ペプチド (LAMP2C ペプチド) を用いたプルダウンアッセイにより、まず LAMP2C の細胞質側配列において核酸結合に必須なアミノ酸残基の探索を行った。野生型および種々の置換変異を導入した LAMP2C ペプチドの精製 RNA や精製 DNA との結合性や細胞ライセート中の RNA や RNA 結合タンパク質との相互作用の解析から、LAMP2C の細胞質側配列がアルギニンリッチモチーフ (ARM) と呼ばれる RNA 結合モチーフの特徴をもつことが明らかとなった。LAMP2C の細胞質側配列をスクランブルさせた配列をもつペプチドにおいて核酸結合性の低下が見られなかったが、これもまた他の ARM 配列にも見られる特徴である。*C. elegans* およびショウジョウバエ (*D. melanogaster*) にはそれぞれ 1 種類ずつ LAMP オルソログが知られているが、これらの細胞質側配列はいずれも核酸結合能を持つ。これらの配列とヒト LAMP2 の各スプライズバリエーションの細胞質側配列との相同性を調べたところ、いずれの配列も LAMP2C の細胞質側配列と最も高い相同性を示した。また *C. elegans* および *D. melanogaster* の LAMP オルソログの細胞質側配列はいずれも ARM において重要な役割を果たすアミノ酸残基であるアルギニン残基を豊富に含むことから、これらの配列も ARM を介して核酸と結合することが示唆された。そこで *C. elegans* の LAMP オルソログの細胞質側配列について、野生型およびすべてのアルギニン残基を置換した変異型のビオチン標識ペプチドの核酸結合性を検討したところ、野生型の配列において見られた核酸結合能が変異型の配列では完全に失われていた。このことから LAMP ファミリータンパク質による ARM を介した核酸認識機構が後生動物に広く保存されていることが示唆された。また LAMP2 以外の複数のヒト LAMP ファミリータンパク質の細胞質側配列においても複数のアルギニン残基が見られることから、LAMP1、DC-LAMP および CD68 という 3 種類の LAMP ファミリータンパク質の細胞質側配列に相当するペプチドについても核酸結合性を検討したところ、LAMP1 および CD68 の細胞質側配列と RNA の間に明らかな結合が見られ、DNA との間にも弱い結合が見られた。このことから LAMP2 以外の LAMP ファミリータンパク質が RDA において受容体として機能する可能性が示唆された。第 3 章では細胞において抗ウイルス免疫応答を惹起する物質である poly(I:C)を用いて、RNautophagy の生理的役割の一端の解明を目的として行った研究について記述した。通常、細胞質における RNA のほとんどは一本鎖 RNA であるが、多くのウイルスが複製の過程で宿主細胞の細胞質に二本鎖 RNA を生じ、二本鎖 RNA は細胞

による非自己の認識に関わる主要な分子のひとつである。興味深いことに、二本鎖 RNA などの核酸を認識することで免疫応答反応を惹起する複数種類のタンパク質がリソソーム/エンドソームに局在する。また、ウイルス由来の核酸をリソソームにより隔離、分解することはウイルス感染時におけるウイルスの増殖や拡散の抑制にもつながると考えられる。これらのことなどから RNautophagy が抗ウイルス免疫応答に関わりうるのではないかと考え、細胞においてウイルス感染を模倣することのできる物質である poly(I:C)を用いて、まず poly(I:C)導入時の RDA 関連遺伝子の発現動態について研究を行った。まずリポフェクションにより poly(I:C)を導入した HeLa 細胞における、2 種類の RDA 関連遺伝子、*Lamp2c* および *Sidt2* の mRNA の発現量を検討したところ、いずれの遺伝子にも発現量の上昇が見られた。Poly(I:C)を培地に加えただけではこのような RDA 関連遺伝子の発現上昇は見られなかったことから、poly(I:C)が細胞内に導入されることが、poly(I:C)による RDA 関連遺伝子の発現上昇に必要であると考えられる。また poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇は一過的であり、導入量依存的であった。Poly(I:C)の導入による量依存的な RDA 関連遺伝子の発現上昇は HEK-293FT 細胞においても見られた。また、poly(I:C)を導入した HeLa 細胞において *Lamp2a* および *Lamp2b* の発現量はむしろ低下しており、*Lamp2* 全体および *Lamp1* の発現量に有意な変化は見られなかった。このことから、poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇はリソソーム膜タンパク質の遺伝子の中でも特異性をもった現象であると考えられる。細胞内において poly(I:C)を認識し、遺伝子の発現誘導を介して免疫応答反応を惹起するタンパク質として MDA5、RIG-I および TLR3 が知られている。*Mda5*、*Rig-i* および *Tlr3* それぞれに対して設計した siRNA を導入した HeLa 細胞において、poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇の抑制が見られた。しかしながら各 siRNA を導入した細胞における *Mda5*、*Rig-i*、*Tlr3* の発現量を調べたところ、標的遺伝子の発現低下に加え、各 siRNA を導入した細胞いずれにおいても *Mda5* および *Tlr3* の発現低下が見られたため、必ずしも検討した 3 種類すべての遺伝子が poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇に関わるとは言えなかった。そこで次に MDA5、RIG-I、TLR3 それぞれを過剰発現させた HeLa 細胞における poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇を検討したところ、MDA5 過剰発現細胞において poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇の顕著な促進が見られた。このことから HeLa 細胞における poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇において、少なくとも MDA5 が重要な役割を担うと考えられる。これらの結果を元に、ウイルス感染時に MDA5 などを介して RDA 関連遺伝子の発現上昇が誘導され、これにより RDA 活性が上昇することでウイルス由来核酸などを隔離・分解し、宿主細胞がウイルスの増殖や拡散を抑制する可能性などについて論じた。第 4 章においては第 2 章および第 3 章で得られた結果を総括し、今後の研究課題などについても論じた。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 藤原 悠紀 印

(2016年 1月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	<p>Aizawa S, <u>Fujiwara Y</u>, 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. <i>Autophagy</i>. (掲載決定)</p> <p>Hase K, <u>Fujiwara Y</u>, Kikuchi H, Aizawa S, Hakuno F, Takahashi S, Wada K, Kabuta T. RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. <i>Nucleic Acids Research</i>. 43 (13): 6439-6449; 2015.</p> <p>Furuta A, Kikuchi H, Fujita H, Yamada D, <u>Fujiwara Y</u>, 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. <i>The American Journal of Pathology</i>. 185 (6): 1713-1723; 2015.</p> <p>○<u>Fujiwara Y</u>, Hase K, Wada K, Kabuta T. An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>. 460 (2): 281-286; 2015.</p> <p><u>Fujiwara Y</u>, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. <i>Autophagy</i>. 9 (8): 1167-1171; 2013.</p> <p>○<u>Fujiwara Y</u>, 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. <i>Autophagy</i>. 9 (3): 403-409; 2013.</p>
総説	株田智弘、藤原悠紀、和田圭司、リソソームは小胞輸送を介さずに生体高分子を取り込むか?、 <i>生化学</i> 、85 (12): 1057-1066; 2013.
講演	<p>・国際学会 (口頭発表) <u>Fujiwara Y</u>, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. A Novel Type of Autophagy that Targets RNA. <i>Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Autophagy, Inflammation and Immunity</i>. 1029. Montreal, Canada. February, 2013.</p> <p>・国際学会 (ポスター発表) <u>Fujiwara Y</u>, Wada K, Kabuta T. Direct Uptake and Degradation of RNA by Lysosomes. <i>EMBO Conference - Autophagy: Molecular mechanism, physiology and pathology</i>. 48. Hurtigruten MS Trollfjord, Norway. May, 2013.</p> <p><u>Fujiwara Y</u>, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. A Novel Type of Autophagy that Targets RNA. <i>Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Autophagy, Inflammation and Immunity</i>. 1029. Montreal, Canada. February, 2013.</p> <p>・国内学会 (口頭発表) 藤原悠紀、RN/DNautophagy とその生理的意義・疾患との関わり、第8回オートファジー研究会・第2回新学術「オートファジー」班会議 若手の会、札幌、2014年11月</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
著書	<p>藤原悠紀、和田圭司、株田智弘、脳における RNA を標的とした新規オートファジー経路、Neuro2013、シンポジウム、神経系における RNA 研究の新たな展開：RNA の機能、代謝、病態への関与、S-2-2-2、京都、2013 年 6 月</p> <p>・国内学会（ポスター発表） 藤原悠紀、長谷勝徳、和田圭司、株田智弘、LAMP2C, a receptor for novel lysosomal RNA/DNA degradation systems, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding、第 58 回日本神経化学学会大会、大宮、2015 年 9 月</p> <p>藤原悠紀、RN/DNautophagy とその生理的意義および疾患との関わり、第 8 回オートファジー研究会・第 2 回新学術「オートファジー」班会議、札幌、2014 年 11 月</p> <p>Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T. Direct Uptake and Degradation of RNA and DNA by Lysosomes. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014"、東京、2014 年 3 月</p> <p>藤原悠紀、古田晶子、菊地寿枝、相澤修、畑中悠佑、紺谷千穂、内田健康、和田圭司、株田智弘、RNA を標的とする新たなオートファジー機構、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月</p> <p>Kabuta T, <u>Fujiwara Y</u>, Wada K. Chapter 4 Roles of Multiple Types of Autophagy in Neurodegenerative Diseases, Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and Aging Volume 1, Elsevier, 2013.</p>
その他	<p>・論文</p> <p>Nagamine S, <u>Fujiwara Y</u>, Shimizu T, Kawata A, Wada K, Isozaki E, Kabuta T. Association of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 in cerebrospinal fluid with clinical severity in a cohort of patients with Guillain-Barré syndrome. Neurological sciences, 36 (6): 921-926; 2015.</p> <p>Kabuta T, Mitsui T, Takahashi M, <u>Fujiwara Y</u>, Kabuta C, Konya C, Tsuchiya Y, Hatanaka Y, Uchida K, Hohjoh H, Wada K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) acts as a novel potentiator of cyclin-dependent kinases to enhance cell proliferation independently of its hydrolase activity. The Journal of Biological Chemistry, 288 (18): 12615-12626; 2013.</p> <p>Konya C, Hatanaka Y, <u>Fujiwara Y</u>, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T. Parkinson's disease-associated mutations in alpha-synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. Neurochemistry International, 59 (2): 251-258; 2011.</p> <p>・訳書 藤原悠紀、和田圭司、第 5 章 イオンチャネル、カンデル神経科学、メディカル・サイエンス・インターナショナル、2014</p>