

博士論文審査報告書

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

2016年2月

本博士論文は、全4章から構成されている。第1章緒言では、細胞内物質分解から論を進め、リソソームとオートファジーの重要性が述べられたのち、これまでに報告されている3種のオートファジー（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）について、その概要とそれぞれの違い、並びにこれまで報告されている知見がまとめられている。シャペロン介在性オートファジーに関する記載においては、リソソーム膜タンパク質である LAMP2 の重要性が強調され、スプライスバリエーションの実体について紹介されている。ついで、LAMP2C に関して申請者がこれまで係わってきた研究が触れられ、RNA, DNA が LAMP2C に結合し、ATP 依存的にリソソーム内に取り込まれ分解されることが紹介されている。この現象は、申請者らによって RNautophagy、DNautophagy と命名され、総称して RDA と呼ばれるようになったことも述べられている。以上、第1章では、博士論文として報告する研究に至った経緯が十分説明されているものと判断した。

第2章 LAMP2C における核酸結合モチーフの探索では、LAMP2C の細胞内ドメイン、つまり細胞質内において核酸と結合する C 末端側部分において、どのアミノ酸配列が重要であるかを決定することが目的とされた。LAMP2C の細胞質側配列に相当するビオチン標識ペプチドと精製 RNA、精製 DNA との結合度をプルダウンアッセイにて解析したものであるが、その際さまざまな変異が導入され、野生型ペプチドと比較された。ペプチドが使用された理由は、LAMP2C は膜タンパク質であり、そのタンパク質化学的性状から分子間相互作用の解析に不向きなためであった。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も実施され、結果として、LAMP2C の細胞質側配列におけるアルギニンリッチモチーフ (ARM) の重要性が見いだされている。LAMP2C の細胞質側配列をスクランブルさせた配列のペプチドにおいては核酸結合性が低下しないことも述べられている。さらに、ARM の重要性と普遍性について、*C. elegans* およびショウジョウバエ (*D. melanogaster*) の1種類ずつの LAMP オルソログ配列を用いて検討している。いずれの細胞質側配列も、ヒト LAMP2 のスプライスバリエーションのなかでは LAMP2C の細胞質側配列と最も高い相同性を示し、いずれも核酸結合能を持つことを確認した。さらに、*C. elegans* の LAMP オルソログの細胞質側配列のすべてのアルギニン残基を置換した変異型と野生型のビオチン標識ペプチドの核酸結合性の解析から、アルギニン残基が核酸結合性に重要であることが確認された。*C. elegans* およびショウジョウバエのオルソログを用いた結果は、LAMP ファミリータンパク質の ARM を介した核酸認識機構が後生動物で保存されていることを示唆するものであった。

また LAMP2 以外のヒト LAMP ファミリータンパク質細胞質側配列でも、複数のアルギニン残基が存在することから、LAMP1、DC-LAMP および CD68 の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さらに核酸結合性が検討されている。その結果、LAMP1 および CD68 の細胞質側配列と RNA の結合が確認された。また、DNA との間では弱い結合が見いだされた。LAMP1、DC-LAMP および CD68 の結果は、核酸との結合性が LAMP2 以外の LAMP ファミリータンパク質においても存在することを示唆するものであった。

以上、第 2 章における研究成果は、LAMP2C における ARM の発見を通して、LAMP ファミリータンパク質が核酸結合の受容体として機能する可能性を示したもので、これまでの他の報告には見られない新規の内容であった。

第 3 章 RNautophagy の抗ウイルス免疫応答に対する関与の検討では、RNautophagy の生理的役割の解明を目的としたものである。申請者は、RNautophagy の役割の一つとして、ウイルス感染等による外来性 RNA の分解を想定し、その実証のため、poly(I:C)を使用している。poly(I:C)は細胞において抗ウイルス免疫応答を惹起する物質として知られている 2 重鎖 RNA である。細胞質における内在性の RNA のほとんどは一本鎖 RNA であるのに対し、外来性ウイルスの複製過程で生じる RNA は二本鎖であることから、poly(I:C)はウイルス感染を模倣することのできる物質としても良く知られている。さらに、二本鎖 RNA は自己と非自己の認識に関わる主要な分子のひとつであるが、二本鎖 RNA の認識により誘導される免疫応答反応に係わる複数のタンパク質はリソソーム/エンドソームに局在することが説明されている。申請者は、ウイルスなど外来性由来の核酸がリソソームに隔離され、分解される機構が存在し、そこに RNautophagy が重要な役割を担うとの仮説を提案している。つまり、RNautophagy が抗ウイルス免疫応答に係わるという仮説である。そこで、申請者はリポフェクション法により poly(I:C)を導入した HeLa 細胞で、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。その結果、poly(I:C)導入により両遺伝子の発現量が増加することが見いだされた。Poly(I:C)の培地添加だけでは *Lamp2c* および *Sidt2* の mRNA 発現上昇は見られなかった。つまり、poly(I:C)の細胞内導入が RDA 関連遺伝子の発現上昇に要求されることが示されている。poly(I:C)の導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇は一過性で、導入量依存的であることも報告された。HEK-293FT 細胞においても Poly(I:C)の導入による導入量依存的な RDA 関連遺伝子の発現上昇が観察されたことが述べられている。他方、*Lamp2a* および *Lamp2b* については、poly(I:C)を導入した HeLa 細胞ではその発現量は低下した。これらの結果より、poly(I:C)の細胞質内導入による RDA 関連遺伝子の発現上昇には特異性があることが述べられている。

申請者はさらに、poly(I:C)を認識し免疫応答反応を惹起するタンパク質 MDA5、RIG-I および TLR3 に着目し、それぞれの siRNA 導入による発現抑制が poly(I:C)導入時の RDA 関連遺伝子の発現にどう関わるかを HeLa 細胞で解析した。各 siRNA を導入した細胞では、*Lamp2c* および *Sidt2* の発現上昇の抑制が認められたが、*Mda5*、*Rig-i*、*Tlr3* については標的遺伝子の発現低下だけでなく着目した他の分子の発現低下が観察された。siRNA の特異性に課題があったことから、検討された MDA5、RIG-I および TLR3 の 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ことは結論されていない。そのため、申請者は MDA5、RIG-I、TLR3 をそれぞれ過剰発現させた際の poly(I:C)導入時 RDA 関連遺伝子の発現変化を HeLa 細胞で検討している。その結果、MDA5 過剰発現細胞で poly(I:C)導入による RDA 関連遺伝子の顕著な発現上昇が観察された。この結果より、HeLa 細胞における poly(I:C)導入時の RDA 関連遺伝子の発現上昇に少なくとも MDA5 が重要な役割を担うことを結論付けている。

第3章に述べられた研究は、RNautophagyの生理的役割解明のための最初の重要な研究と考えられる。その結果はRNautophagyが抗ウイルス免疫応答に係わるとの申請者の仮説と矛盾しない。以上の研究結果から、申請者は、ウイルス感染時に際してMDA5などを介したRDA関連遺伝子の発現上昇機構が存在すること、ウイルス由来核酸などの隔離・分解においてRDA活性上昇に係わる可能性を論じている。

第4章（総括）では、第2章および第3章で得られた結果の考察から、現時点で科学的に言及できることが整理され、今後の研究課題などについて論じられている。

以上、本論文は、申請者らがこれまでに見いだしたリソソームにおける新規核酸分解機構であるRDAでの核酸認識メカニズムを明らかにし、RDAの生理的役割解明の一步として、免疫応答関連分子の発現制御にRDAに係わる可能性を示している。これらの研究成果は、細胞質内における核酸分解に関し、新たな知見と提供し、核酸代謝、オートファジーに係わる研究分野においても高い学術的価値が認められる。以上より、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値のあるものと認める。

2016年1月

審査員

（主査）早稲田大学教授

薬学博士（九州大学）

柴田 重信

早稲田大学教授

博士（理学）名古屋大学

岩崎 秀雄

早稲田大学客員教授

（国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナル・メディカルセンターセンター長） 医学博士（大阪大学） 和田 圭司
