

## 123. 新しく発見した autophagy の RNA 蓄積病における役割

株田 智弘

Key words : RNautophagy, RNA, オートファジー

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

### 緒言

近年、複数の筋ジストロフィーや神経変性疾患において、遺伝子内の非翻訳領域における塩基反復配列の異常伸長が原因として特定されている。これらの疾患において、反復配列を有する異常伸長 RNA の細胞内蓄積が病因と深く関与すると考えられていることから、病態解明と治療法開発において細胞内 RNA 分解システムの理解が重要である。致死的な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) において、C9ORF72 遺伝子の非翻訳領域中の (GGGGCC)<sub>n</sub> リピートの異常伸長が原因として報告されている。これは孤発性および家族性 ALS のなかで最も頻度の高い遺伝子変異である。我々は最近、神経細胞を含む様々な細胞で機能する新規細胞内 RNA 分解システムを発見し、RNautophagy と名付けた。この新規システムにおいて、RNA は ATP 依存的に直接リソソームに取り込まれ、内部で分解される。また、このシステムにおいてリソソーム膜蛋白質 LAMP2C の細胞質側配列は RNA 結合能を有し、RNA 受容体として機能する<sup>1)</sup>。本研究では、この新規システムの基質選択性と、これによる異常 RNA 分解を中心に解析したので報告する。

### 方法および結果

これまで RNautophagy における基質核酸の選択性の有無は全くわかっていなかった。基質選択性を明らかにするために、まずまずそれぞれ 15 base の poly-A, poly-U, poly-C, poly-G を作製し、プルダウンアッセイにより LAMP2C 細胞質配列との結合性を検討した。その結果、驚いたことに LAMP2C 配列は poly-G と顕著に結合し、poly-A, poly-U, poly-C とは結合しなかった (図 1)。リンカーペプチドをコントロールとして用いた場合、および LAMP2A の細胞質側配列のペプチドをコントロールとして用いた場合の双方において結合が確認できた (図 1)。



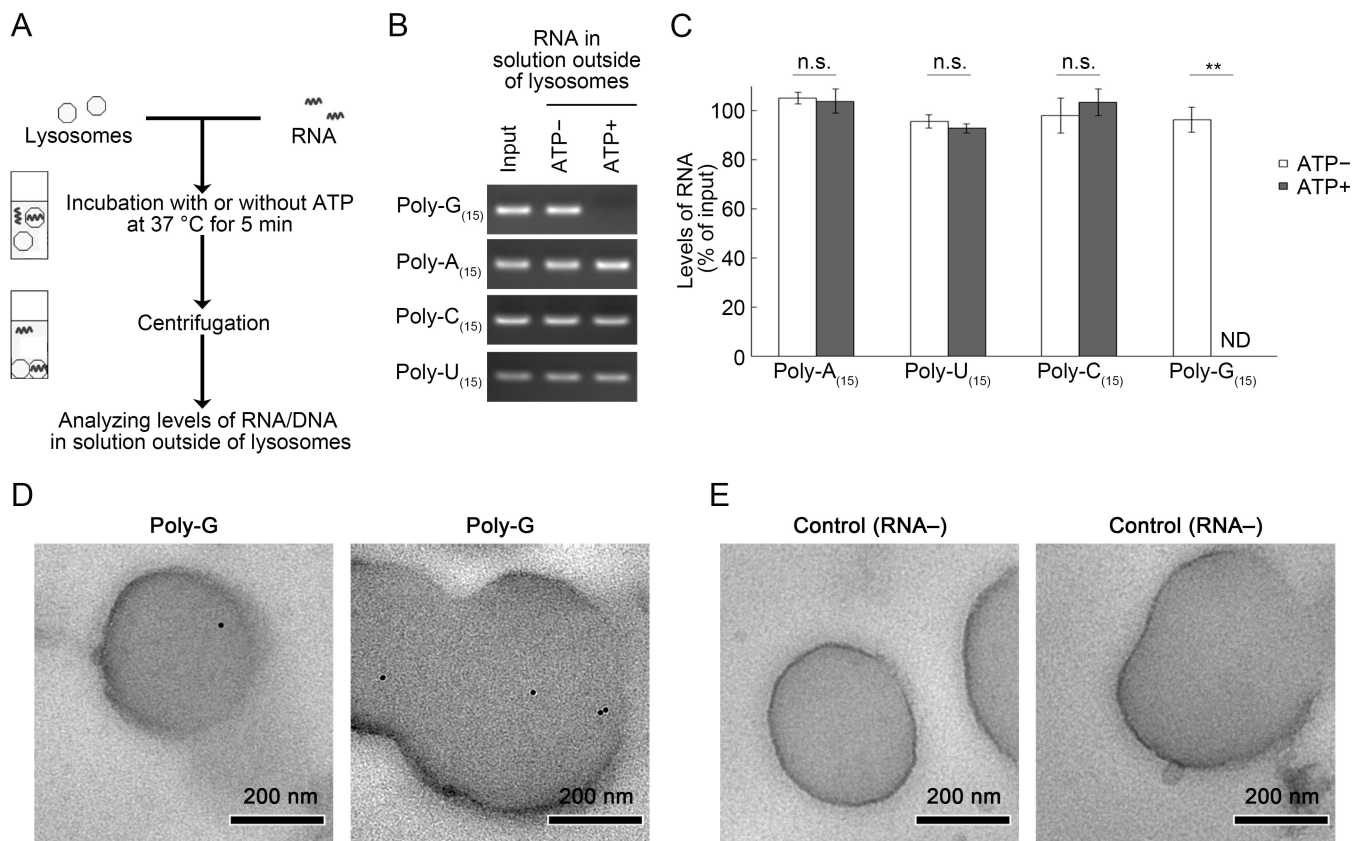


図2. 単離リソソームによる poly-G の取り込み (文献2より改変引用) .

A) 単離リソソームへの RNA 取り込みアッセイの概略. B) それぞれの RNA と単離リソソームを ATP regeneration system 存在下および非存在下 (ATP<sup>+</sup>, ATP<sup>-</sup>) で5分間インキュベーションした. その後リソソーム外液中の RNA を相補的 DNA とアニールさせ, エチジウムブロマイドを用いたアガロース電気泳動を行った. C) 電気泳動の結果を定量した. 平均値と SEM (n = 3) を示す. \*\*P < 0.01, n.s., not significant (Tukey's test による). ND, not detected . D) 単離リソソームと poly-G<sub>(15)</sub> を ATP regeneration system 存在下でインキュベーションした. Poly-G の検出は, ビオチン化 DNA プローブとストレプトアビジン標識金コロイド (10 nm) を用いた電子顕微鏡観察により行った. Poly-G はリソソーム中に検出された. E) Poly-G 非存在下で D と同様にコントロール実験を行った. リソソーム中に金コロイドが検出されないことを確認した.

また, LAMP2C との結合に必要な poly-G の長さをプルダウンアッセイにより検討したところ, RNA については GGGGGG の 6 塩基配列が必要であることがわかった (図3).

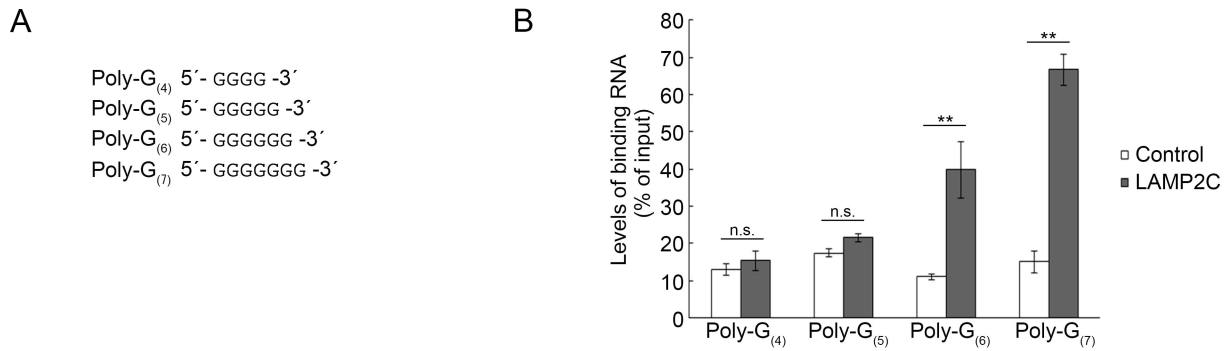


図3. LAMP2Cの細胞質側配列と poly-G の結合に必要な poly-G の塩基数 (文献2より改変引用)。

A) プルダウンアッセイに用いた poly-G 配列. B) プルダウンアッセイの結果. OD<sub>260</sub> 測定により結合 RNA の定量を行った. 平均値と SEM (n = 3) を示す. \*\*P < 0.01, n.s., not significant (Tukey's test による).

ALS 原因に関与する (GGGGCC)リピード RNA についても同様に解析を行った. その結果, プルダウンアッセイにおいて (GGGGCC)<sub>6</sub> 配列は LAMP2C の細胞質側配列と結合し, *in vitro* での単離リソソームを用いた RNA 取り込みアッセイにおいて RNauophagy の基質となった (図4).

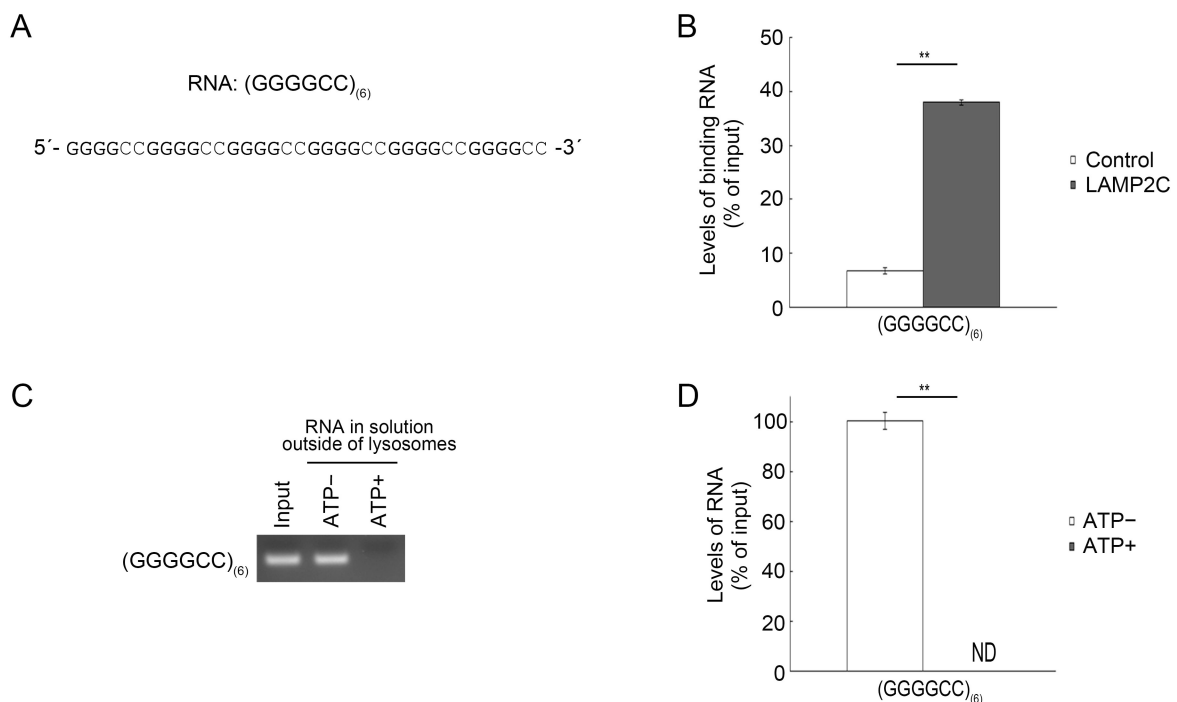


図4. 単離リソソームによる GGGGCC リピード RNA の取り込み (文献2より改変引用)。

A) プルダウンアッセイおよび単離リソソームへの RNA 取り込みアッセイに用いた RNA 配列. B) プルダウンアッセイの結果. OD<sub>260</sub> 測定により結合 RNA の定量を行った. 平均値と SEM (n = 3) を示す. \*\*P < 0.01 (t-test による). C) 単離リソソームへの RNA 取り込みアッセイの結果. D) 電気泳動の結果を定量した. 平均値と SEM (n = 3) を示す. \*\*P < 0.01 (t-test による).

## 考 察

本研究結果から、RNautophagy は基質選択性を有することが初めて明らかになった。また、G の連続配列が RNautophagy における基質核酸のモチーフの1つとして機能していることが示唆された。また、ALS 原因に関与する (GGGGCC)リピート RNA も RNautophagy の基質となることがわかった。LAMP2C ペプチドと poly-G の結合には GGGGGG が必要であったが、(GGGGCC)<sub>6</sub> 配列は LAMP2C ペプチドと結合した。これらの結果から、LAMP2C は RNA の構造を認識している可能性がある。実際に、poly-G や (GGGGCC)<sub>4</sub> 配列は G-quadruplex と呼ばれる 4 量体構造をとることが知られている。今後は細胞内で疾患関連 RNA が RNautophagy によって分解されるのかを検討する必要がある。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、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の長谷勝徳である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 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*, **9** : 403-409, 2013.
- 2) Hase, K., Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hakuno, F., Takahashi, S. I., Wada, K. & Kabuta, T. : RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nuc. Acids Res.* **43** : 6439-6449, 2015.