

氏名	CONTU VIORICA RALUCA		
博士の専攻分野の名称	博士（医学）		
学位記番号	医工博4甲 第241号		
学位授与年月日	平成30年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
専攻名	生体制御学専攻		
学位論文題名	Lysosomal targeting of SIDT2 via multiple YxxΦ motifs is required for SIDT2 function in the process of RNautophagy (複数の YxxΦ モチーフを介した SIDT2 のリソソーム局在は RNautophagy における SIDT2 の機能に必要である)		
論文審査委員	委員長	教授	小泉 修一
	委員	准教授	布村 明彦
	委員	講師	猪爪 隆史

学位論文内容の要旨

【研究の目的】

生体の恒常性維持において RNA の厳密な制御が行われており、不要となった RNA や異常な RNA の適切な分解が極めて重要である。RNautophagy はリソソームによる RNA 分解経路の 1 つであり、ATP の消費を伴って RNA がリソソーム内に直接取り込まれ、分解される。リソソーム膜タンパク質 SIDT2 は RNA のリソソーム膜通過を仲介することも明らかとなっている。また、RNautophagy は細胞内における RNA 分解に貢献している。本研究では、SIDT2 を介する RNautophagy の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 細胞内 RNA 分解の測定

Neuro2a 細胞に各種タンパク質を過剰発現させた後、 $[^3\text{H}]$ -ウリジンで RNA をラベルし、パルス・チェイスアッセイを行った。

2. SIDT2 局在解析

EGFP 融合各種タンパク質を Neuro2a 細胞に発現させた後、リソソームを LysoTracker で染色してライブセルイメージングを用いて局在を観察した。

3. SIDT2 結合タンパク質の解析

FLAG 修飾 SIDT2 を発現させた Neuro2a 細胞の細胞溶解液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、相互作用するタンパク質を質量分析法またはウエスタン・ブロッティング法によって検出した。

4. RNautophagy *in vitro* 取り込み活性の測定

各種タンパク質を過剰発現した Neuro2a 細胞から単離したリソソームを ATP 存在下で RNA と混合し、リ

リソソームによる RNA 取り込み活性を測定した。

【結果】

1. 細胞内 RNA 分解に対する SIDT2 過剰発現の影響

SIDT2 の過剰発現によって細胞内 RNA 分解量が最大で 1.7 倍まで上昇した。この分解促進がリソソームにおける RNA 分解によるものであることも確認した。

2. SIDT2 のリソソーム局在に必要な選別シグナルの解明

(a) リソソーム膜への局在にはタンパク質の細胞質側に選別モチーフが必要である。YxxΦ モチーフはその代表的なモチーフの 1 つである。SIDT2 の細胞質側には 3 つの YxxΦ モチーフ (Y³⁵⁹GSF、Y⁴¹⁰DTL、Y⁴²⁸LCV) が存在する。これらの 3 つのモチーフに変異を導入した SIDT2 変異体 SIDT2^{3YS} はリソソームに局在しなくなったことから、これらのモチーフが SIDT2 のリソソーム局在に必要であることが明らかとなった。

(b) SIDT2 がリソソームに輸送される経路を明らかにするために SIDT2 と相互作用するタンパク質を解析した。その結果、SIDT2 が Y³⁵⁹GSF モチーフを介して adaptor protein complexes AP-1 と AP-2 と相互作用することが明らかとなった。このことから Y³⁵⁹GSF モチーフを介する SIDT2 のリソソーム局在は AP-1 と AP-2 を介して行われていることが示唆された。

(c) SIDT2^{3YS} の過剰発現によって RNautophagy の *in vitro* 取り込み活性が上昇しないこと、さらに細胞内 RNA 分解が促進されないことを確認した。これらのことから、3 つの YxxΦ モチーフによる SIDT2 のリソソーム局在は *in vitro* においても細胞レベルにおいても SIDT2 を介する RNautophagy の活性に必要であることが示された。

(d) リソソームにほとんど局在しない SIDT1 に SIDT2 の 3 つの YxxΦ モチーフを導入すると、この SIDT1 変異体はリソソームに局在を示すようになり、また SIDT2 と同程度に細胞内 RNA 分解を促進できるようになった。これらの結果から SIDT2 の 3 つの YxxΦ モチーフが実際に機能していることが確認された。

【考察】

本研究ではまず、SIDT2 の過剰発現によって細胞内 RNA 分解が顕著に上昇することを見出した。SIDT2 が細胞内 RNA 分解において重要な役割を果たすことが強く示唆された。我々の知る限り、SIDT2 は、単独で過剰発現させるだけでこのように著しく細胞内 RNA 分解を促進できる初めての内在性細胞内タンパク質である。

次に 3 つの YxxΦ モチーフを介した SIDT2 のリソソーム局在は RNautophagy における SIDT2 の機能に必要であることが明らかとなった。これまでに知られていた YxxΦ モチーフを介してリソソーム膜に局在する膜タンパク質は全て C 末端に存在する 1 つの YxxΦ モチーフによって制御を受けている。本研究は C 末端以外の YxxΦ モチーフを介してリソソームに局在する膜タンパク質、また複数の YxxΦ モチーフを介してリソソームに局在する膜タンパク質として初めての報告である。

【結論】

本研究により、SIDT2 のリソソーム局在化機構が明らかとなり、3 つの YxxΦ モチーフを介した SIDT2 のリソソーム局在は RNautophagy における SIDT2 の機能に必要であることが示された。本研究結果は RNautophagy の分子メカニズムの解明、細胞内 RNA 分解機構の理解、そしてリソソーム膜タンパク質の局在化機構の解明に貢献することが期待される。

論文審査結果の要旨

学位論文研究テーマの学術的意義

細胞は、不要・異常な RNA を速やかに分解して恒常性を維持する仕組みを複数有し、Rnautophagy はその一つである。不要となった RNA は、Rnautophagy のメカニズムで lysosome に直接取り込まれて分解されるが、その取り込みで中心的な役割を果たすものが、lysosome 膜タンパク質 SIDT2 であると考えられている。しかし、本分子がどのようなメカニズムで lysosome 膜に移動しそこで機能するのか、については不明のままであった。今回、(1) RNA の分解に SID2 依存的な RNautophagy が必要であること、(2) SID2 の I-II 貫通領域の間にある 3 種類の YxxΦ 配列のどれもが lysosome 膜への移動に必要であること、(3) SID2 の 3 種の YxxΦ は RNautophagy が機能するためにも必須であること、(4) これまで良く知られている移動に関するシグナル配列 C 末 Yxx は、SIDT2 の局在・機能には関係していないこと、を明らかとした。本論文は、一連の Rnautophagy 研究の中のブラックボックスであった部分にメスを入れたもので、非常に切れ味良くその証明を行った研究成果であると言える。新規性が高く、学術的にも医学的にも、本分野のマイルストーン的な研究となり得るものである。

学位論文及び研究の争点，問題点，疑問点，新しい視点等

RNautophagy 重要性、ストレス感受性、臨床的側面からの重要性等は。

RNautophagy は RNA 分解のうち、約 50% 程度を占めていると考えられる。従って、それがすべてではないが、非常に重要な役割を果たしている。Autophagy のように飢餓等のストレスにより発現も変化するが、ストレスにより発現が誘導して機能する、というよりは、常に一定程度発現していて、細胞の恒常性維持に働いている面が強い。臨床的側面からの重要性は、ノックアウト動物を用いた解析を行っているので、今後の研究成果を待たないと詳しいことは回答出来ないが、ALS 等種々の疾患で RNautophagy の異常が関係していることが示唆されており、疾患との関連性は高いと考えている。将来的には、種々の神経変性疾患等を視野に入れて、研究をつづけて行きたい。

RNautophagy は神経系以外での重要性。

RNautophagy は、ユビキタスに認められるが、特に神経系で多く認められる。今回 Neuro2A を用いて検討を行ったが、神経系を意識したことが、その理由の 1 つである。しかし他の臓器例えば、筋肉等でも良く認められる。筋変性、糖代謝とも強く関連したイベントであると考えられる。

SIDT2 の移動及び機能に必要な SIDT2 について。

I-II 間にある 3 つの YxxΦ が重要で、C 末の Yxx が不要であることは、アミノ酸置換の検討によりク

リアにできた。3つの YxxΦ のどれもが重要であるが、特に重要と考えられたのは、最初の Y359 であった。また、AP2 との結合により lysosome 膜に移動することが分かったことから、間接経路が関係していることがわかった。しかし SID2 発現小胞は、endosome 等ではなくて、lysosome であることも明らかとできている。

実験及びデータの信頼性。

1. 技術的な信頼性。

非常に多くのエネルギーと時間を費やして、基礎的な研究を繰り返した後に行った、非常に信頼性の高い研究成果である。Neuro2A における SIDT2 発現量が高すぎると細胞傷害が起こること、しかし発現量が少ないと十分な lysosome が回収出来ないこと等の難しい条件を、クリアして得られた結果であった。

2. RNA 分解のライブイメージング

RNautophagy のイメージング、SIDT2 移動のライブイメージング等があるとより、説得力のある成果になると考えられる。RNautophagy のイメージングデータは、一部取得済みである。

学位論文の改善点、等々。

特に改善点は無い。発表は、流暢な日本語で非常に分かりやすく、ロジカルであり、質疑に対する応答も必要十分であった。

以上、本研究の新規性は高く、またその学術的及び医学的な意義も非常に高い。RNautophagy に関する知見、背景も非常によく調べてあり、将来の展望もきちんと示されていた。従って、本研究論文は、学位論文として十分なものであると審査員一同で判断した。