

核酸・蛋白質の代謝恒常性破綻モデルの解析を通じた神経変性病態の解明と創薬

業務担当責任者：和田圭司

研究協力者：長谷勝徳、藤原悠紀、株田智弘

(独)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

研究要旨

脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が原因であることが報告されている。病態機序として、原因遺伝子から産生される異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられている。したがって、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得ると考えられる。我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新たなオートファジーシステムを発見し、このシステムを RNautophagy と名付けた (Autophagy, 2013)。本研究では、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。そのため、RNA RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また神経変性に関与するリピート RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。その結果、RNautophagy は基質選択性を有していること、また少なくとも特定のリピート RNA は *in vitro* において RNautophagy の基質となることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が発症の原因となることが報告されている。原因遺伝子から作られる異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられており、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得る。ところが、神経細胞内における RNA 分解機構についてはほとんどわかっていない。細胞内分解システムのうち、リソソームを分解の場とするものは総称してオートファジーと呼ばれている。リソソームは多種類の加水分解酵素を内部に有しており、蛋白質だけでなく核酸や脂質、糖質も分解することができる。

我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新

たなオートファジーシステムを発見し、この選択的分解システムを RNautophagy と名付けた (Autophagy, 2013)。同時に、このシステムにおいてリソソーム膜蛋白質である LAMP2C が核酸受容体として機能することを見いだした。興味深いことに、LAMP2C は脳内、とりわけ神経細胞に高発現しており、RNautophagy は神経細胞において機能し神経の恒常性維持に働いていると考えられる。また、LAMP2 遺伝子欠損マウス脳のトータル RNA 量を解析したところ、野生型と比較して RNA の蓄積が観察された。

本研究では、脊髄小脳変性症の治療のため、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。本年度は、RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また異常伸長 RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。

B. 研究方法

LAMP2C の細胞質側配列(約 12 アミノ酸)を用いたプルダウンアッセイにより、LAMP2C に結合する RNA 配列を検討した。またマウス脳から単離したリソソームを用いて、どのような配列の RNA が RNautophagy の基質となるかについて解析した。RNA の配列としては、polyA, polyU, polyG, polyC および神経変性疾患の原因と関与するリピート RNA を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経医療研究センター 神経研究所において該当する委員会の承認を受けて行った。実際の実施に当たっては 3R の原則に、研究者の responsibility を加えた 4R に配慮して行った。

C. 研究結果

PolyA, polyU, polyG, polyC のうち、特定の配列のみが LAMP2C の細胞側配列と結合した。また、LAMP2C の細胞質側配列と結合した RNA は RNautophagy によって単離リソソームに取り込まれたが、結合しない RNA は取り込まれなかった。さらに、神経変性疾患の原因と関与するリピート RNA についても LAMP2C の細胞質側配列と結合し、RNautophagy によって単離リソソームに取り込まれた。

以上の結果から、RNautophagy は基質選択性を有すること、少なくともある種の神経変性関連リピート RNA は in vitro において RNautophagy の基質となることが明らかとなった。

D. 考察

RNautophagy は神経細胞内において、不必要な RNA や異常 RNA をある程度選択的に分解している可能性がある。

E. 結論

RNautophagy は基質 RNA に対して選択性を有し、少なくとも特定の神経変性関連リピート RNA は in vitro において RNautophagy の基質となる。今後、細胞内において神経変性関連リピート RNA が RNautophagy の基質となるか検討し、脊髄小脳変性症の治療のための RNautophagy 活用法を構築する。

[参考文献]

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*. 2013; 9(3): 403-409.
2. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. 2013; 9(8): 1167-1171.

F. 健康危険情報

該当するものは無し。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Furuta, A., kikuchi, H., Fujita, H., Yamada, D., kabuta, T., Blanz, J., Saftig, P., Nishino, I., Wada, k., Uchiyama, Y. Property of lysosomal storage disease associated with midbrain pathology in the CNS of LAMP-2-deficient mice. *Am. J., Pathol.*, in press

2. 学会発表

- 1) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 2) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 3) 藤掛伸宏, 木村展之, 長野清一, 齊藤勇二, 横関明男, 小野寺理, 和田圭司, 永井義隆. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 4) 石黒太郎, 石川欽也, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 和田圭司, 水澤英洋. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 5) 石黒太郎, 藤掛伸宏, 佐藤望, 和田圭司, 水澤英洋, 永井義隆, 石川欽也. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜,

2014.9.11-13.

- 6) 鈴木マリ, Anne-Marie Neumann, 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜, 2014.9.11-13.
- 7) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜, 2014.9.11-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2014-209340 「異常核酸分解誘導剤」、
出願人：国立精神・神経医療研究センター、
発明人：株田智弘、藤原悠紀、和田圭司、相澤修、長谷勝徳、出願日：2014 年 10 月 10 日

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し