

令和元年5月23日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08265

研究課題名(和文) 神経疾患におけるRNAグアニン四重鎖複合体凝集機構の解明と創薬研究

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism that RNA G-quadruplex aggregation and its drug discovery in neurological diseases

研究代表者

塩田 倫史 (Shioda, Norifumi)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：00374950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン四重鎖構造(G4構造)はグアニンリッチ配列で、1本鎖DNAもしくはRNAが形成する特殊な高次構造である。特定のDNAグアニンリッチ配列異常反復伸長から転写されるRNA-G4構造が数種のRNA結合タンパク質と凝集体を形成し、神経変性疾患の病態に関与する。本研究では、RNA-G4構造/タンパク質複合体の脳における構成成分を解析し、神経変性疾患におけるRNA-G4構造/タンパク質の異常凝集機構を解明することを目的とした。結果として、G4構造認識フラグメントを利用して免疫沈降を行い、マウス脳組織におけるRNA-G4構造/タンパク質複合体のタンパク質分子とRNA構成成分を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経変性疾患の病態に関与するRNA-G4構造/タンパク質複合体の神経細胞における構成成分を解析・同定した。今後、この異常凝集機構を解明することで、ALS等の神経変性疾患の病態解明に迫ることができ、新たな治療標的を提示できる。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplex (G4) structures are stacked nucleic acid structures that can form within G-rich DNA or RNA sequences. In the pathogenesis of neurodegenerative diseases, G4 structures are formed by guanine-rich repeats, which are transcribed, result in forms aggregates with several RNA binding proteins. In this study, we aimed to analyze the components of the RNA-G4/protein complex in the brain and to elucidate the abnormal aggregation mechanism in neurodegenerative diseases. We performed immunoprecipitation using a G4 structural recognition fragment, and identified some novel G4-binding proteins and G4 formed mRNAs in mouse brain.

研究分野：神経科学、神経薬理学、核酸化学

キーワード：グアニン四重鎖 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA の基本的な構造である右巻き二重らせん以外にも、左巻き DNA、三重鎖 DNA、四重鎖 DNA 等「非 B 型 DNA」と呼ばれる構造が発見されており、DNA はその配列の特徴や溶媒の環境により、試験管の中では右巻き二重らせん構造以外の構造を取り得ることが報告されている。近年、非 B 型 DNA・RNA 構造のひとつである「グアニン四重鎖」が実際に細胞内に存在することが報告された。さらに、グアニン四重鎖は神経変性疾患の原因となる可能性も示唆されてきている。

グアニン四重鎖構造は、グアニンが豊富な配列領域で、1 本鎖 DNA もしくは RNA が形成する特殊な高次構造の 1 つである。グアニン残基を豊富に含む DNA や RNA の一本鎖配列において 4 分子のグアニン残基が Hoogsteen 型塩基対を介して G カルテットとよばれる平面構造を形成する。これが π - π 相互作用を介して層状に重なることで、グアニン四重鎖構造が形成される。グアニン四重鎖構造を形成する DNA 配列はこれまでに、テロメア領域をはじめとして、がん関連遺伝子の DNA プロモーター領域に存在し、抗がん作用の標的として知られている。パイオインフォマティクス解析では、ヒトゲノム中に 376,000 個の DNA グアニン四重鎖構造形成配列が存在することが予測され、テロメア、遺伝子プロモーター、リボソーム DNA および組換えホットスポットに特に多く見られる。また、mRNA 合成、発現および機能において重要な役割を果たす第 1 イントロンの 5' 末端非翻訳領域に多く位置することも示されており、がん関連遺伝子以外の遺伝子における転写・翻訳にも関与すると考えられている。

遺伝性神経変性疾患の遺伝子変異の特徴のひとつとして、数塩基の繰り返し配列（マイクロサテライトリピート）の異常伸長が病原性変異となっているリピート病が多いことが挙げられる。これまでの研究で、40 以上の遺伝性神経変性疾患が翻訳領域および非翻訳領域のマイクロサテライトリピート伸長を原因とする疾患であることが判明している。リピート病の中で、GGGGCC リピート *C9orf72* 遺伝子変異筋萎縮性側索硬化症 (C9ALS) と CGG リピート *FMRI* 遺伝子変異脆弱 X 関連振戦 / 失調症候群 (FXTAS) では、非翻訳領域のリピート伸長から転写される RNA が、種々の RNA グアニン四重鎖結合タンパク質と結合することにより、RNA 代謝に異常を与える「RNA 毒性」がその病態機序として考えられている。

さらに、RNA 毒性に加えて、リピートをもった RNA が開始コドン (AUG) 非依存性にリボソームでの翻訳を開始する「RAN 翻訳」が見出されている。通常、タンパク質への翻訳は開始コドン (AUG) から始まる。しかし、リピート配列が存在すると、開始コドンを介さず翻訳が生じることが報告され、repeat-associated non-AUG (RAN) 翻訳が起こる。リピート配列の異常伸張に起因する多くの神経疾患において、変性過程にある細胞にリピート配列由来のポリペプチドが蓄積していることが確認されており、RAN 翻訳も病態発症に重要な役割を担っていることが示唆されている。

これまでにいくつかの研究グループから GGGGCC リピートで形成される RNA グアニン四重鎖を標的とする小分子化合物が C9ALS 患者の治療に有効であることを報告している。このことは、グアニン四重鎖結合性小分子化合物が GGGGCC リピートのグアニン四重鎖構造を歪め、RNA 毒性を減弱させるとともに、RAN 翻訳阻害によるジペプチド反復タンパクの発現抑制を引き起こす可能性を示している。しかしながら、脳内における RNA グアニン四重鎖/タンパク質複合体の構成成分や、細胞毒性機構は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的はマウス脳サンプルを用いて RNA グアニン四重鎖/タンパク質複合体の構成成分を解析することにより、神経変性疾患における RNA グアニン四重鎖/タンパク質複合体の異常凝集機構を解明することである。

3. 研究の方法

マウス脳組織 (海馬) から細胞質溶解液を採取し、グアニン四重鎖認識抗体を用いて免疫沈降を行う。その沈降物に対して次世代 RNA シーケンサーと LC-MS/MS ショットガン解析を行い、マウス脳内のグアニン四重鎖形成 mRNA とその結合タンパク質を同定する。

4. 研究成果

上記免疫沈降物に対して次世代 RNA シーケンサーと LC-MS/MS ショットガン解析を行い、いくつかの mRNA とタンパク質を同定した。同定された分子に関して、mRNA のグアニン四重鎖形成能、及びタンパク質のグアニン四重鎖結合能が確認できた。結果として、新規グアニン四重鎖形成 mRNA と新規グアニン四重鎖結合タンパク質を数種同定できた (論文準備中)。今後、これら分子の神経変性疾患との関与について検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Fukunaga K, Izumi H, Yabuki Y, Shinoda Y, **Shioda N**, Han F. Alzheimer's disease therapeutic candidate SAK3 is an enhancer of T-type calcium channels. *J Pharmacol Sci.* 139, 51-58. (2019) 査読有 doi: 10.1016/j.jphs.2018.11.014.

- 2) Yamada K, Hamashima T, Ishii Y, Yamamoto S, Okuno N, Yoshida N, Yamada M, Huang TT, **Shioda N**, Tomihara K, Fujimori T, Mori H, Fukunaga K, Noguchi M, Sasahara M. Different PDGF Receptor Dimers Drive Distinct Migration Modes of the Mouse Skin Fibroblast. *Cell Physiol Biochem*. 51, 1461-1479. (2018) 査読有 doi: 10.1159/000495594.
- 3) Yamaguchi K, **Shioda N**, Yabuki Y, Zhang C, Han F, and Fukunaga K. SA4503, A Potent Sigma-1 Receptor Ligand, Ameliorates Synaptic Abnormalities and Cognitive Dysfunction in a Mouse Model of ATR-X Syndrome. *Int J Mol Sci*. 19, pii: E2811. (2018) 査読有 doi: 10.3390/ijms19092811.
- 4) **Shioda N**, Yabuki Y., Yamaguchi K., Onozato M., Li Y., Kurosawa K., Tanabe H., Okamoto N., Era T., Sugiyama H., Wada T. and Fukunaga K. Targeting G-quadruplex DNA as cognitive function therapy for ATR-X syndrome. *Nat Med*. 24, 802-813. (2018) 査読有 doi: 10.1038/s41591-018-0018-6.
- 5) Tamura S., Okada M., Kato S., Shinoda Y., **Shioda N**, Fukunaga K., Ui-Tei K. and Ueda M. Ouabagenin is a naturally occurring LXR ligand without causing hepatic steatosis as a side effect. *Sci Rep*. 8, 2305. (2018) 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-20663-z.
- 6) Moriguchi S., Ishizuka T., Yabuki Y., **Shioda N**, Sasaki Y., Tagashira H., Yawo H., Yeh J., Sakagami H., Narahashi and Fukunaga K. Blockade of the KATP channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy *Molecular Psychiatry*. 23, 211-221. (2018) 査読有 doi: 10.1038/mp.2016.187.
- 7) **Shioda N**, Fukunaga K. Physiological and Pathological Roles of CaMKII-PP1 Signaling in the Brain. *Int J Mol Sci*. 19, pii: E20. (2017) 査読有 doi: 10.3390/ijms19010020.
- 8) **Shioda N**. Involvement of G-quadruplexes in neurodegenerative diseases. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 150, 298. (2017) 査読有 doi: 10.1254/fpj.150.298.
- 9) **Shioda N**. Dopamine D2L receptor-interacting proteins regulate dopaminergic signaling. *J Pharmacol Sci*. pii: S1347-8613(17)30171-8. 査読有 doi: 10.1016/j.jphs.2017.10.002.
- 10) **Shioda N**. RNA toxicity and RAN translation in repeat expansion disorders. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 150, 165. (2017) 査読有 doi: 10.1254/fpj.150.165.
- 11) **Shioda N**, Yabuki Y., Wang Y., Uchigashima M., Hikida T., Sasaoka T., Mori H., Watanabe M., Sasahara M. and Fukunaga K. Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR β signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular Psychiatry*. 22,1205-1222. (2017) 査読有 doi: 10.1038/mp.2016.200.
- 12) Li Y., Syed J., Suzuki Y., Asamitsu S., **Shioda N**, Wada T. and Sugiyama H. Effect of ATRX and G-Quadruplex Formation by the VNTR Sequence on α -Globin Gene Expression. *Chembiochem*. 17, 928-935. (2016) 査読有 doi: 10.1002/cbic.201500655.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 塩田倫史. トリプレットリピート病 FXTAS における RAN 翻訳産物と神経変性の関与 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14-16 日 (大阪) シンポジウム
- 2) 今井快樹、塩田倫史、矢吹梯、福永浩司. ドパミン D2L 受容体異常による精神ストレス脆弱性にはセロトニン 1A 自己受容体の機能不全が関与する 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 14-16 日 (大阪) ポスター発表
- 3) 塩田倫史. 非 B 型 DNA/RNA を標的とした神経疾患の病態解明と治療薬開発. 2019 年 3 月 5-6 日 第一回 日本医学会連合 Rising Star リトリート 口頭発表【優秀賞受賞】
- 4) Norifumi Shioda. G-quadruplexes as a therapeutic target for ATR-X syndrome. TMiMS International Symposium 2018 年 12 月 19 日 東京都医学総合研究所 (東京) シンポジウム
- 5) 塩田倫史. グアニン四重鎖を標的とした神経疾患の病態解明と治療薬開発 第 71 回日本薬理学会西南部会 2018 年 11 月 17 日 (博多) 口頭発表
- 6) 塩田倫史. 金属イオンにより安定化する DNA/RNA 構造体「グアニン四重鎖」と神経疾患の関与 メタルバイオサイエンス研究会 2018. 2018 年 11 月 16 - 17 日 (仙台) シンポジウム
- 7) Norifumi Shioda. G-quadruplexes as a therapeutic target for ATR-X syndrome. 第 13 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2018 年 10 月 18-19 日 (博多) 口頭発表 【優秀賞受賞】
- 8) 塩田倫史、中山祐二、足立香織、久郷裕之、難波栄二. 脆弱 X 関連振戦 / 失調症候群 (FXTAS) における RAN タンパク質の病態との関与 第 63 回日本人類遺伝学会第 63 回大会 2018 年 10 月 9-12 日 (横浜) 口頭発表
- 9) Norifumi Shioda, Takahito Wada, Hiroshi Sugiyama, Kohji Fukunaga Targeting G-quadruplex DNA as cognitive function therapy for ATR-X syndrome. WCP2018 第 91 回日本薬理学会年会 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議 2018 年 7 月 1 - 6 日 (京都) ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：神経障害を改善するための医薬組成物
発明者：石塚昌宏、高橋究、芳賀直実、塩田倫史
権利者：SBIファーマ株式会社
種類：特許
番号：特願 2017-122838
出願年月日：平成 29 年 6 月 23 日
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：神経発達障害改善剤
発明者：田中徹、和田敬仁、福永浩司、塩田倫史、石塚昌宏、高橋究
権利者：SBIファーマ株式会社
種類：特許
番号：特開 2017-95396
取得年月日：2017 年 6 月 1 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/genomic_neurology/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。