

令和 4 年 4 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21400

研究課題名(和文) グアニン四重鎖によるDNA可塑性とRNAエングラムの解明

研究課題名(英文) DNA plasticity and RNA engrams by G-quadruplexes

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAのうち、グアニン残基が連続する配列は、4本鎖のRNA G-quadruplex (G4RNA) 構造を形成することがある。我々は、新たに同定したG4RNA結合タンパク質がG4RNA依存的に相分離を起こし、細胞の相分離区画であるストレス顆粒の形成に寄与していることを明らかにした。さらに、G4構造を形成するmRNAがG4構造依存的に相分離を起こし、それによって細胞内のストレス顆粒の形成を調整することを明らかにした。これらの結果と同様に、バイオインフォマティクスアプローチにより、G4形成mRNAはG4を形成しないmRNAと比較してストレス顆粒内に有意に濃縮されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、未だ生物学的機能が不明である「グアニン四重鎖」に着目し研究を行っている。グアニン四重鎖はグアニンが豊富な配列領域でDNA・RNAが形成する特殊な核酸高次構造のひとつである。しかしながら、mRNAグアニン四重鎖と「精神疾患の認知障害」との関連性は未だ詳細に明らかにされていない。本研究では、グアニン四重鎖を形成し、神経機能維持のために必要なタンパク質をコードするmRNA群と神経細胞に高発現する新たなグアニン四重鎖結合タンパク質を同定した。それらはストレス顆粒の形成に重要であり、神経細胞死に関与することが本研究により明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sequences within RNA that are rich in consecutive guanine residues can adopt quadruple-stranded structures, RNA G-quadruplexes (G4RNAs). G4RNAs have profound implications for RNA metabolism, and prolonged disequilibrium of G4RNA formation is associated with neurodegeneration. Although G4RNA-forming sequences are abundant in transcriptomes, the comprehensive roles of G4RNAs remain poorly understood. Here we demonstrate that a newly identified G4RNA-binding protein undergoes G4RNA-dependent phase separation and contributes to the assembly of stress granules (SGs), a cellular phase-separated compartment. Importantly, we showed that G4-forming mRNAs undergo phase separation in a G4 structure-dependent manner, thereby coordinating SG assembly in cells. Consistent with these results, the bioinformatics approach revealed that G4-forming mRNAs are significantly enriched within SGs compared with non-G4 mRNAs. Cumulatively, G4RNA-dependent phase separation plays a critical role in SG assembly.

研究分野：神経科学

キーワード：グアニン四重鎖 RNA高次構造 神経機能 ストレス顆粒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA 二次構造は、タンパク質翻訳、mRNA 分解、炎症反応、RNA ゲノムウイルスの進化など、多面的な生理的機能を担っている。特に、RNA G-quadruplex (G4RNA) と呼ばれるグアニン残基を多く含む配列による 4 本鎖 RNA 構造は、熱安定性が非常に高く、トポロジー的特徴が多様なことから、mRNA スプライシング、安定性、局在、翻訳の制御に関与すると考えられている。G4RNA 形成配列の数は、HeLa 細胞における約 2,300 の遺伝子転写産物中に約 3,800 存在すると推定されている。mRNA 内の G4RNA 形成配列は、コーディング領域 (CDS) に比べ、5'非翻訳領域 (UTR) および 3'UTR に比較的多く存在することが知られている。

G4RNA の異常な形成は、神経変性疾患と関連している。C9orf72 の GGGGCC 繰り返し RNA 配列によって形成される G4RNA は、神経細胞内で相分離した凝集体を形成し、これが筋萎縮性側索硬化症/前頭側頭型認知症 (C9ALS/FTD) の発症因子と考えられている。我々は、FMR1 の CGG リピート RNA 配列によって形成される G4RNA が、主要な病原タンパク質である FMRpolyG の凝集体の液相から固相への転移を誘導することを報告した。この相転移は、神経細胞内に不溶性の封入体を生成し、脆弱性 X 関連振戦/運動失調症候群で観察される神経細胞機能障害につながる。しかし、G4RNA の細胞内機能は未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、G4 構造による「DNA 可塑性」と「RNA エングラム」の存在を証明することを目的とした。つまり、G4 構造が脳機能における学習・記憶の分子実態のひとつであることを生物学的に明らかにする。エングラムは、動物の脳内に学習によって核酸やタンパク質などに暗号化されているとされているが、その分子実態は不明である。G4 構造が記憶の分子実態であることを解明できれば、これまでの科学における「記憶 シナプス可塑性」仮説に一石を投じる革新的な研究となる。本研究では、この研究の先駆けとして、神経細胞におけるグアニン四重鎖形成 mRNA を同定することができた。さらに、それらの中で特に神経機能に重要な役割を担う mRNA を特定し、その mRNA で形成されるグアニン四重鎖の高次構造を明らかにした。そして、グアニン四重鎖の形状変化によってその RNA 動態が制御されることを見出した。さらに、神経細胞に高発現する新たなグアニン四重鎖結合タンパク質を同定した。

3. 研究の方法

LC-MS/MS によるグアニン四重鎖相互作用タンパク質の同定

マウス前脳組織を 50 mM tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, およびタンパク質分解阻害剤 (trypsin inhibitor, pepstatin A, and leupeptin) を含むバッファーで溶解し、15,000 g, 10 min で遠心分離をした。上清を回収し、His タグ付きグアニン四重鎖抗体 BG4 (またはコントロール用の通常のウサギ IgG) と抗 6×His 抗体を予め結合させたプロテイン A セファロースカラム (GE ヘルスケア) 上で 4°C、4 時間、一定回転でインキュベートした。その後、結合したタンパク質を TBS で洗浄し、2.5% 酢酸で溶出させた。全サンプルの LC-MS/MS 解析は外部委託した。なお、10µg のマウス IgG でプルダウンした対照試料で同定されたタンパク質は、同定されたタンパク質から減算した。

EMSA

100 mM KCl または LiCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中の Fluorescein phosphoramidite (FAM) 標識 RNA (20 nM) を 95°C で加熱し、1.5 時間かけて徐々に室温に冷却した。折りたたんだ RNA サンプルに組み換え新規 G4RNA 結合タンパク質「X」およびその変異体を加え、室温で 30 分インキュベートした。得られた混合物をゲル電気泳動で分析した (6% native TBE polyacrylamide, 90 min, 100 V, 4°C)。ゲル上の RNA は Typhoon Trio 装置 (GE Healthcare) を用いて可視化した。RNA と新規 G4RNA 結合タンパク質「X」およびその変異体との相互作用に関する K_d の決定には、バンドシフトデータを非線形最小二乗法で算出した。

SPR-binding アッセイ

SPR 実験は、Biacore X 装置 (GE ヘルスケア) を用いて行った。ビオチン化 RNA をストレプトアビジン機能化 SA センサーチップに固定化した。SPR 測定は、100 mM KCl を含む HBS バッファー (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20) を用いて、25°C で行った。一連のサンプル溶液を同じバッファーで調製し、50 µL/分の流速で注入した。各サイクル終了後、センサーグラムのベースラインが回復するまで、RNA 上に残った試料を 10 mM グリシン (pH 2.0) で剥離した。得られたセンサーグラムは、BIAevaluation v. 4.1 プログラム上で 1:1 ラングミュア結合のモデルでフィッティングした。

CD spectroscopy

RNA オリゴマー (2.5 μ M) を、KCl (100mM および 10mM) または LiCl (100mM) を含む 10mM Tris HCl (pH7.5) バッファー中で調製し、実験を行う前にすべての RNA オリゴマーを加熱/冷却プロセスによって再フォールディングさせた。CD スペクトルは、JASCO J-805LST スペクトロメーターで、25°C、200-350 nm で、3 mm 経路長の石英キュベットを用いて記録した。RNA 変性アッセイでは、各 RNA の最大 CD シグナル(262 nm) をモニターした。温度スキャンは 25°C から 95°C まで 1°C/min の速度で連続的に行った。T_m 値は、最大シグナル増加の半分の温度として決定した。

RNase T1 フットプリンティング

FAM 標識 RNA オリゴマー (1.5 μ M) を 100 mM KCl または LiCl を含む 10 mM Tris HCl (pH 7.5) バッファー中で調製し、実験を行う前にすべての RNA オリゴマーを加熱/冷却プロセスによってリフォールドさせた。RNA を RNase T1 (Thermo Fisher Scientific) で室温で 3 分間処理した後、尿素バッファーを加えて反応を終了させた。得られた溶液を 15% TBE-Urea polyacrylamide (acrylamide:bis-acrylamide, 19:1) ゲルにロードし、1×TBE running buffer 中 1500 V で 2 時間電気泳動した。ゲル上の RNA は、Typhoon Trio 装置 (GE Healthcare) を用いて可視化した。

ライブセルイメージングおよび FRAP アッセイ

各種プラスミドをトランスフェクトした Neuro-2A 細胞を 12 ウェルプレートのポリ L-リジン (PLL) コートしたカバースリップ上で 48 時間増殖させ、測定前に 0.5 mM NaAsO₂ で 1-1.5 時間処理した。カバースリップをイメージングチャンバー (Chamlide) に設置し、LSM780 顕微鏡システム (Carl Zeiss) を用いて蛍光画像を取得した。フォトブリーチは、ZEN ソフトウェアのブリーチングプログラムを用いて、レーザー出力 100% で強度 50% まで行った。光回復を追跡するために、Zeiss Objective Plan-Apochromat 63X/1.4 oil differential interference contrast (DIC) M27 を用いて 5 秒ごとにタイムラプス画像を記録した。

in vitro 相分離および FRAP アッセイ

1 μ M フルオレセイン標識タンパク質を含む指定濃度の非標識タンパク質を、40-150mM NaCl および 2% グリセロールを含む 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) 中で調製した。指定された濃度の RNA は、25 mM NaCl および 0-500 mM MgCl₂ を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) でリフォールディングした。タンパク質/RNA 複合体溶液の調製のために、プレフォールディングした RNA をタンパク質溶液に加え、室温で 10-30 分間インキュベートした。得られた溶液は、0.12mm のスパーサー (Sigma-Aldrich) とカバースリップを用いてスライドグラスにマウントした。フォトブリーチは、Zeiss LSM780 マシンの ZEN ソフトウェアのブリーチングプログラムを使用して、100% のレーザー出力で 50% の強度に行った。Zeiss Objective Plan-Apochromat 63X/1.4 oil DIC M27 を用いて 5 秒ごとにタイムラプス画像を記録し、光回復を追跡した。RNA やタンパク質がどの程度集まっているかは、母集団における不均一性の統計的尺度である分散指数 (σ^2/μ) を計算することで評価した。

4. 研究成果

本研究では、G4RNA 構造と新規 G4RNA 結合タンパク質「X」が、液-液相分離により細胞質膜のないストレス顆粒の集合を調整することを明らかにした。「X」は、G4RNA と優先的に結合し、G4RNA 依存的な相分離を介してストレス顆粒の形成を促進する。また、G4RNA 自体が RNA 相分離を起こすことも明らかになった。バイオインフォマティクス解析により、複数の G4RNA を含む mRNA がストレス顆粒に有意に濃縮されていることを発見した。新規 G4RNA 結合タンパク質「X」のノックダウンによる G4 関連相分離の障害は、ストレス顆粒の形成を乱し、神経変性につながることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Asamitsu Sefan, Shioda Norifumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Potential roles of G-quadruplex structures in RNA granules for physiological and pathological phase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asamitsu Sefan, Yabuki Yasushi, Ikenoshita Susumu, Kawakubo Kosuke, Kawasaki Moe, Usuki Shingo, Nakayama Yuji, Adachi Kaori, Kugoh Hiroyuki, Ishii Kazuhiro, Matsuura Tohru, Nanba Eiji, Sugiyama Hiroshi, Fukunaga Kohji, Shioda Norifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 CGG repeat RNA G-quadruplexes interact with FMRpolyG to cause neuronal dysfunction in fragile X-related tremor/ataxia syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd9440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd9440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yabuki Yasushi, Matsuo Kazuya, Yu Mengze, Xu Jing, Sakimura Kenji, Shioda Norifumi, Fukunaga Kohji	4. 巻 e13613
2. 論文標題 Cav3.1 t type calcium channel is critical for cell proliferation and survival in newly generated cells of the adult hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 e13613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama Yuji, Adachi Kaori, Shioda Nofirifumi, Maeta Shoya, Nanba Eiji, Kugoh Hiroyuki	4. 巻 398
2. 論文標題 Establishment of FXS-A9 panel with a single human X chromosome from fragile X syndrome-associated individual	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112419 ~ 112419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2020.112419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakoe Kumi, Shioda Norifumi, Matsuura Tohru	4. 巻 1868
2. 論文標題 A newly identified NES sequence present in spastin regulates its subcellular localization and microtubule severing activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118862 ~ 118862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2020.118862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabuki Yasushi, Liu Jiaqi, Kawahata Ichiro, Izumi Hisanao, Shinoda Yasuharu, Koga Kohei, Ueno Shinya, Shioda Norifumi, Fukunaga Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Anti-Epileptic Effects of FABP3 Ligand MF1 through the Benzodiazepine Recognition Site of the GABAA Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5525 ~ 5525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yabuki Yasushi, Matsuo Kazuya, Kawahata Ichiro, Fukui Naoya, Mizobata Tomohiro, Kawata Yasushi, Owada Yuji, Shioda Norifumi, Fukunaga Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Fatty Acid Binding Protein 3 Enhances the Spreading and Toxicity of α -Synuclein in Mouse Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2230 ~ 2230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21062230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asamitsu Sefan, Imai Yoshiki, Yabuki Yasushi, Ikenoshita Susumu, Takeuchi Masayuki, Kashiwagi Hirohito, Tanoue Yuki, Fukuda Takaichi, Shioda Norifumi	4. 巻 531
2. 論文標題 Identification and immunohistochemical characterization of G-quadruplexes in mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 67 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asamitsu Sefan, Yabuki Yasushi, Ikenoshita Susumu, Wada Takahito, Shioda Norifumi	4. 巻 531
2. 論文標題 Pharmacological prospects of G-quadruplexes for neurological diseases using porphyrins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 51 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Takahito, Suzuki Shuichi, Shioda Norifumi	4. 巻 60
2. 論文標題 5 Aminolevulinic acid can ameliorate language dysfunction of patients with ATR X syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 147 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塩田 倫史
2. 発表標題 DNA・RNA 高次構造を標的とした神経疾患の病態解明と創薬研究
3. 学会等名 第30回 神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩田 倫史
2. 発表標題 脳神経におけるDNA・RNA 高次構造の機能解明
3. 学会等名 三融会・武田神経科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩田 倫史
2. 発表標題 脳神経におけるグアニン四重鎖の機能解明を目指して
3. 学会等名 Chem for研究会 (Chemistry for Complex Processes in Cells)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リピート結合剤	発明者 杉山弘、坂東俊和、 池田修司、塩田倫 史、矢吹悌、朝光世	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-110752	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関