

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19297

研究課題名（和文）グアニン四重鎖によるレトロトランスポゾン転移制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of retrotransposons 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・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）：グアニン四重鎖構造(G4)は、グアニンが豊富なDNAおよびRNAで形成される核酸高次構造体である。本研究では、マウス初代培養神経細胞におけるG4-ChIP-Seq解析を行った。結果としてマウス神経細胞におけるG4は遺伝子のプロモーター領域で多く検出された。加えて、G4はヘテロクロマチン領域にも多く局在した。さらなる詳細な解析の結果、神経細胞のヘテロクロマチン領域におけるG4は、長鎖散在反復配列LINE領域、特に転移活性を持つLINE1で形成されることを明らかにした。LINE1の *in vitro* 逆転写反応を行いG4有無による逆転写産物DNA量を測定したところG4により逆転写反応が阻害された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のG4DNAプロファイリングの新技术には利点がある。従来のCUT & Tag法を用いた超音波処理によるG4DNAの構造的損傷を回避でき、細胞内発現に最適化されたプローブを使用して生細胞内の内因性G4DNAを検出することが可能となった。この分析によりマウス培養神経細胞におけるG4DNAシグナルはプロモーター領域で高度に濃縮されていることを示した。さらにG4DNAはヘテロクロマチン、特にLINE1で有意な濃縮を示した。これまでの報告ではLINE1転移は神経前駆細胞で高頻度に観察されることから脳の多様性との関与が指摘されている。今後G4がLINE1転移を介して脳の多様性を制御する可能性を追求する。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrates the genome-wide profiling of DNA G-quadruplex (G4DNA) in mouse post-mitotic neurons and developed an improved method for comprehensive G4DNA profiling. We demonstrate the superior performance of our improved method compared to existing profiling methods. We believe that our study makes a significant contribution to the literature because we clarified that neuronal G4DNA is involved in neurobiological processes via regulating euchromatic gene transcription and LINE-1-associated heterochromatin.

研究分野：細胞生物学、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

## 1. 研究開始当初の背景

最も研究されている DNA の形態は、B 型 DNA と呼ばれる右巻き二重らせん構造である。1953 年に、ワトソン博士とクリック博士は X 線結晶構造解析に基づいて、B 型 DNA モデルである二重らせん構造を明らかにした。一方、このワトソン-クリック型以外の DNA 構造も存在し、それらは「非 B 型 DNA 構造」と呼ばれる。これまでに多くの非 B 型 DNA 構造体が報告されており、代表例として左巻きらせん Z 型構造、i モチーフ構造、グアニン四重鎖 (G-quadruplex ; G4) 構造などが挙げられる。これら非 B 型 DNA 構造は、DNA 複製、転写、組換え、修復などの生命現象に重要な役割を担うことが示唆されている。

非 B 型 DNA 構造の中で、G4 構造はグアニンに富む DNA または RNA 配列内に形成される核酸高次構造である。1910 年に、グアニル酸の濃縮溶液がゲル状になることが初めて報告されたが、この結果はグアニンに富む核酸配列が高次構造を形成する可能性を示唆するものであった。その約 50 年後、グアニル酸の濃縮ゲルの特性が X 線回折法により詳細に調べられ、各グアニンが 2 つの隣接するグアニンと水素結合し、4 つのグアニン分子が正方形の平面配置をとることが明らかにされた。この平面構造は現在「G カルテット」と呼ばれている。その後、生理的塩濃度の条件下で、グアニンに富む一本鎖 DNA が G カルテットを形成し、互いの上に積み重ねられて G4 構造を形成することが示された。G4 構造は、少なくとも 2 つの隣接グアニンを有する 4 つのトラクトと 3 つのループ領域で形成される。

G4 構造はその物理学的に高い熱安定性やゲノム上の領域特性から、生体内での機能に注目が集まっている。G4 構造の形成は、DNA 複製、転写、エピジェネティクス、および RNA 代謝など様々な生物学的機能と関連する。例えば、G4DNA は、テロメア、有糸分裂および減数分裂の二本鎖切断部位、転写開始部位、および複製起点において重要な役割を果たす。さらに、G4RNA は、RNA スプライシング、RNA 輸送から mRNA 翻訳まで、RNA 代謝の多くの段階に参与する。G4DNA 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 (c-myc, c-kit, bcl2 等) 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。また、G4 構造は神経変性疾患の原因となる可能性が示唆されている。しかしながら、G4 構造の脳神経細胞における局在及びその機能は未解明である。

ヒトゲノムは半分ほどが「トランスポゾン(転移因子)」と呼ばれるゲノム内を動くことができる塩基配列で占められており、ゲノム構造の多様性と生物進化に大きな影響を与えている。中でもレトロトランスポゾン LINE-1 (Long Interspersed Nucleotide Element-1) は、自身の配列にコードされたタンパク質を使用して、自身のコピー配列を合成し、新たなゲノム領域に「転移する(増える)」ことができる唯一の自立型トランスポゾンである。興味深いことに、この「LINE-1 転移」は脳の神経前駆細胞で高頻度に観察されており、「脳の多様性(個性)」と「神経障害」の機能的二面性を生み出している可能性が指摘されている。また、以前のバイオインフォマティクス解析で G4DNA が LINE-1 に豊富に形成されることが示唆されている。しかしながら、実際に LINE-1 に G4 構造が形成されるか、また、LINE-1 の転移メカニズムと神経機能の関連性は未解明である。本研究は、生物進化の原動力のひとつである転移因子「LINE-1」が引き起こす「脳の多様性」と「神経障害」の機能的二面性に着目し、G4 構造との関連性を検討した。

## 2. 研究の目的

G4 構造の LINE-1 における機能解析を行うにあたり、神経細胞のゲノム上における G4DNA 形成位置を明らかにすることを試みた。また、いくつかの生物種における LINE-1 の 3' UTR 配列解析を行い、G4DNA の形成と断片化 LINE-1 の転移頻度の相関に関するバイオインフォマティクス解析を行うこと、物理化学的解析 (CD スペクトル、RNase T1 フットプリントアッセイ) により LINE-1 における G4 構造の構造形成を検討すること、in vitro 転写により各種 RNA を合成し RT-qPCR を行い、G4 構造形成と DNA 産生量の相関関係を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス前脳初代神経細胞培養

マウス培養神経細胞は、培養 1 日目 (Day in vitro; DIV1) に NEPA21 エレクトロポレーター (NEPAGENE) で pCAG-HA-NLS-BG4-3xFLAG をエレクトロポレーションを使用して遺伝子導入した。その後、細胞を DIV 21 に収集した。

### (2) プラスミド構築

HA-NLS-BG4-3xFLAG (pCAG-HA-NLS-BG4-3xFLAG) および mNeonGreen タグ付き BG4 (pCAG-HA (-NLS) -BG4-mNeonGreen-3xFLAG) の哺乳類発現プラスミドは、BG4 および/または mNeonGreen インサートを使用し In-Fusion<sup>®</sup>HD クローニング (タカラバイオ) により pCAG ネオベクター (FujiFilm) に挿入した。BG4 を含むインサートは pSANG10-3F-BG4 (Addgene#55756) から採用し、mNeonGreen を含むインサートは pAAV-hSyn1-mNeonGreen (Addgene#99135) から採用した。

### (3) CUT & Tag

10,000 個のマウス培養神経細胞を収集し、1 つのサンプルとして使用した。細胞を HEPES バッ

ァーで3回洗浄した。次に、pAG-Tn5を活性化されたビーズを細胞と混合し、室温で10分間インキュベートした。次に、細胞を0.05%ジギトニン含有HEPESバッファー中の抗体で処理し、4で一晩インキュベートした。G4 CUT&Tagの場合、一晩のインキュベーション後、ビーズを抗FLAG抗体で室温で30分間処理した。上清を除去した後、ビーズを二次抗体で処理した。洗浄後、ビーズをpAG-Tn5 (EpiCypher)で室温で30分間処理した。洗浄後、10 mM MgCl<sub>2</sub>含有バッファーを添加し、タグ付けのために37で1時間インキュベートすることにより、pAG-Tn5を活性化した。得られたビーズをSDSバッファー中で58で1時間インキュベートし、タグ付きDNAを回収した。以前に報告された条件に従って、NEBNext High-Fidelity2×PCRMasterMixを使用してDNAを増幅した。増幅されたDNAはAMPureビーズで精製され、精製度をTapestationで確認した。GenNext NGS Library Quantification Kitを使用して、最終的なライブラリー調製を行った。ライブラリーは、paired-end Mid Output (75 x 2 cycles) kitを使用してNextSeq500でシーケンスした。

#### (4) データ処理とデータ分析

Fastqファイルは、品質チェックとadapter trimming (TrimGalore)処理をした。Bowtie2を使用したマウスゲノム (mm10)へのマッピングには、トリミングされたデータを使用した。SamファイルはBamファイルに変換した。正規化されたデータは、deepToolsのbamCoverageプログラムを使用してIGV視覚化用のbigwigファイルとして使用した。データ分析において、IgGコントロールと比較して有意なピークがMACS2を使用して得られた。ヒストンマーカのデータのcallpeakプログラムは、keepduplicateで実行した。iG4 CUT&Tagデータのcallpeakプログラムは、keepduplicateおよびp1e05で実行した。iG4 CUT&Tagデータのモチーフ分析は、HomerまたはMEME ChIPを使用して実行した。ピーク注釈は、HomerのannotationPeakプログラムを使用して実行した。メタプロットと集計プロットは、deepToolsのcomputeMatrixとplotProfileを使用して実行した。フィンガープリント分析は、deepToolsのplotFingerprintプログラムを使用して実行した。IDR分析は、RパッケージのIDRライブラリーを使用して実行した。相関分析は、deepToolsのmultiBigwigSummaryおよびplotCorrelationプログラムを使用して実行した。

## 4. 研究成果

### iG4 CUT&Tagの確立と神経細胞におけるG4DNAゲノムプロファイリング

iG4 CUT&Tagと名付けたG4DNAプロファイリングの新しい手法を開発した。この手法にはG4DNAを効率よく認識するための2つの特徴がある。1) CUT&Tag法は、従来のChIP-seq法と比較して、シグナル・ノイズ比を改善し、低細胞数の少ない条件で実験可能であることが知られている。さらに、CUT&Tag法を採用することで、従来のChIP-seq法で必要な超音波処理を行う必要がないのでG4DNA高次構造の損傷を回避することができる。2) 通常のChIP-seq法やCUT&Tag法ではG4結合タンパク質やクロマチン関連因子によってBG4のG4への結合が阻害され、内因性G4を検出できない。この問題を解決するために、BG4を生細胞内に発現させることにより内因性G4を検出可能にした。具体的には、BG4に核局在化シグナル(NLS)ペプチドとヘマグルチニン(HA)タグおよび3 x FLAGタグを追加し、BG4をG4DNAの細胞核内プローブとして最適化した。これらエピトープタグの導入により、最適化されていないBG4では困難であった細胞核内発現が認められた。

iG4 CUT&Tagの2回の実験の結果、実験間でG4DNAシグナルの高い相関関係を確認した(スピアマンの順位相関係数:  $r = 0.89$ )。また、マウス培養神経細胞におけるG4DNAシグナルのピークとクロマチン状態の相関を評価するために、マウス培養神経細胞のH3K4me3(プロモーター)、H3K9me3(構成的ヘテロクロマチン)、H3K36me3(遺伝子本体)、およびH3K27me3(条件的ヘテロクロマチン)部位のゲノムワイドな分布を調べた。iG4 CUT&Tagの実験結果をさらに検証するために、Homerプログラムによるモチーフ分析を実行した。連続したGリッチ配列が上位5ヒットのモチーフとして得られた。マウス培養神経細胞におけるiG4 CUT&Tagにより、G4DNAシグナルのピークが2,446個同定された。次に、マウス胚性幹細胞の公開されているG4DNAのゲノムプロファイルデータを使用して、G4DNAシグナルのピークを算出した。結果として、マウス胚性幹細胞におけるG4DNAシグナルのピークは10,887個同定された。マウス培養神経細胞におけるG4DNAシグナルのピークはマウス胚性幹細胞よりも著しく少ないが、578ピークがマウス胚性幹細胞のG4DNAシグナルとオーバーラップすることがわかった。マウス培養神経細胞とマウス胚性幹細胞のG4DNAの位置の違いを調べるために、ターゲット遺伝子の近くでメタ遺伝子プロット分析を実行した。マウス培養神経細胞におけるG4DNAシグナルは、近位プロモーター領域で高度に濃縮されていた。これは、過去に報告されたマウス胚性幹細胞でのG4DNAの分布と同様であった。

次に、各ヒストンマーカースイグナルとマウス培養神経細胞におけるG4DNAシグナルの相関分析を行った。その結果、構成的ヘテロクロマチン領域のマーカであるH3K9me3が最も高い相関を示した。プロモーター領域のマーカであるH3K4me3が豊富なゲノム位置でマウス培養神経細胞とマウス胚性幹細胞におけるG4DNAシグナルの有意な相関が観察されたが(スピアマンの順位相関係数:  $r = 0.34$ ) H3K9me3が豊富なゲノム位置でこれらのG4DNAシグナルの相関は観察されなかった( $r = 0.12$ )。

マウス神経細胞におけるG4DNAのゲノム機能との相関関係をさらに検討するために、マウス神経細胞におけるG4DNAシグナルとマウス胚性幹細胞のG4DNAシグナルのピークアノテーシ

ンを比較した。その結果、マウス神経細胞における G4DNA は、LINE1 領域に関連するゲノム機能が著しく豊富であることが分かった。凝集プロットによる解析でも、神経細胞の G4 シグナルが LINE1 領域で高度に濃縮されていることが示された。

さらなる詳細な解析の結果、神経細胞のヘテロクロマチン領域における G4DNA は、特に転移活性を持つ LINE1 の 5' UTR および 3' UTR で形成されることを明らかにした。LINE1 は 5' UTR をプロモーターとして転写後、逆転写を経て新たなゲノム領域に転移する。LINE1 の 3' UTR 全長 RNA に対して *in vitro* 逆転写反応を行い G4 有無による逆転写産物 DNA 量を測定したところ、G4 により逆転写反応が阻害された。

本研究では、マウス培養神経細胞における G4DNA のゲノムワイドなマッピングを行った。まず、G4DNA プロファイリングの新しい技術である iG4 CUT&Tag を開発した。この手法には 2 つの利点がある。従来の CUT & Tag 法を用いた超音波処理による G4DNA の構造的損傷を回避でき、さらに、細胞内発現に最適化された BG4 を使用して生細胞内の内因性 G4DNA を検出することが可能となった。この分析により、マウス培養神経細胞における G4DNA シグナルはプロモーター領域で高度に濃縮されており、マウス胚性幹細胞での以前の報告と一致していた。さらに、神経細胞の G4DNA は、H3K9me3 でマークされたヘテロクロマチン、特に LINE1 で有意な濃縮を示した。マウス胚性幹細胞ではこれらの濃縮は観察されなかった。また、神経細胞におけるこれらの G4DNA プロファイリングデータは、以前、免疫組織化学的分析を使用した私達の報告と一致している。これらの結果は、非分裂細胞である神経細胞において、G4DNA がヘテロクロマチンによる遺伝子サイレンシングに役割を持つ可能性があることを示している。

これまでの報告では、LINE1 転移は神経前駆細胞で高頻度に観察されることから脳の多様性との関与が指摘されている。また、精神ストレス負荷時における脳の LINE1 転移の増加が報告されている。今後、G4 が LINE1 転移を介して「脳の多様性」と「ストレス病態」を制御する可能性を追求する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asamitsu S., Yabuki Y., Matsuo K., Kawasaki M., Hirose Y., Kashiwazaki G., Chandran A., Bando T., Wang D.O., Sugiyama H., and Shioda N	4. 巻 9
2. 論文標題 RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPT6 in neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances eade2035	6. 最初と最後の頁 eade2035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade2035.	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 該当する
1. 著者名 Katsuda Y, Sato SI, Inoue M, Tsugawa H, Kamura T, Kida T, Matsumoto R, Asamitsu S, Shioda N, Shiroto S, Oosawatsu Y, Yatsuzuka K, Kitamura Y, Hagihara M, Ihara T, Uesugi M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Small molecule-based detection of non-canonical RNA G-quadruplex structures that modulate protein translation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res. 8143	6. 最初と最後の頁 8143-8153.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac580.	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 Ngwe Tun MM, Sakura T, Sakurai Y, Kurosaki Y, Inaoka DK, Shioda N, Yasuda J, Kita K, Morita K.	4. 巻 50
2. 論文標題 Antiviral activity of 5-aminolevulinic acid against variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trop Med Health.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-022-00422-7.	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 該当する
1. 著者名 Guo Q, Kawahata I, Jia W, Wang H, Cheng A, Yabuki Y, Shioda N, Fukunaga K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 -Synuclein decoy peptide protects mice against -synuclein-induced memory loss.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CNS Neurosci Ther.	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） 10.1111/cns.14120.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 塩田倫史
2. 発表標題 神経疾患におけるグアニン四重鎖の細胞内機能
3. 学会等名 NEUR02022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩田倫史
2. 発表標題 グアニン四重鎖の神経生物学的機能の解明を目指して
3. 学会等名 2022年度 若手支援技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Shioda
2. 発表標題 Pathophysiological significance of G-quadruplexes in neurobiology
3. 学会等名 G4 webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	西原 秀典  (Nishihara Hidenori)  (10450727)	東京工業大学・生命理工学院・助教   (12608)	

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
---------	---------