

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03393

研究課題名(和文) 学習・記憶制御機構におけるグアニン四重鎖の機能解明と創薬研究

研究課題名(英文) The function of G-quadruplexes in learning and memory and its pharmaceutical research

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNAは右巻き二重らせん構造であることが知られているが、それ以外にも様々な特殊構造の存在が報告されている。その中で、「グアニン四重鎖(G-quadruplex; G4)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ひとつとして細胞内に存在する。本研究では、G4構造の神経生物学的意義を明らかにするため、G4構造と神経細胞との関与を「脆弱X随伴振戦/失調症候群」に着目し解析した。結果としてG4構造がプリオノイドを制御し、脳機能における学習・記憶に関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アルツハイマー病等の神経変性疾患の発症にプリオノイド機構が関与することが注目されているが、その細胞内メカニズムは未解明である。本研究から、プリオノイドの引き金がG4構造の凝集であると考えられた。現在、タウやシヌクレインの凝集とG4構造の関与を解析中である。また、FXTASと同様の神経症状を呈するグアニンリッチ・リピートに由来する疾患がロングリード・シーケンス技術により多数発見されている。本研究で使用したG4構造作用薬5-アミノレブリン酸は、安全性の高い既承認医薬品である。従って、本研究により発見されたプリオノイド機構を基盤とした神経変性疾患全般に対する治療が期待される。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplex (G4) is a unique nucleic acid structure formed when a four-stranded structure is produced within a single-stranded guanine-rich sequence. Four guanine molecules form a square planar arrangement, termed G-quartet, which are stacked on top of each other to form the G4 structure in DNA (G4DNA) and in RNA (G4RNA). Recent studies have revealed that G4DNA and G4RNA are folded in cells, which suggested their biological and pharmacological significance in DNA replication, transcription, and RNA metabolism. So far, we have reported the following; 1) G4 is a target of cognitive function therapy for ATR-X intellectual disability syndrome, in which mutations are found in a G4 binding protein ATRX. 2) G4 is formed in heterochromatin depending on neuronal development. Here, we found that G4 promotes prionoids in a CGG triplet repeat disease, FXTAS. In addition, 5-aminolevulinic acid is a potential candidate drug for treating some neurological diseases through the G4 binding ability.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の設計図である DNA は右巻き二重らせん構造であることが知られているが、それ以外にも様々な特殊構造の存在が報告されている。その中で、「グアニン四重鎖 (G-quadruplex; G4) 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ひとつとして細胞内に存在する。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。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・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・mRNA 翻訳など RNA 代謝の多くの段階に関与することが示唆されている。これらの生物学的知見は哺乳類の胚性幹細胞など有糸分裂細胞で得られており、終末分化した神経細胞における G4 構造の機能は明らかではない。

研究代表者はこれまで G4 構造の異常が神経障害を引き起こすことをマウスで明らかにした。また、既に厚生労働省に認可を受け市販されている医薬品の中から G4 構造に結合する安全性の高い薬剤を同定し、その薬剤がマウスの認知機能低下を改善できることを明らかにした。しかしながら、脳内における G4 構造の生理的役割や G4 構造異常による神経疾患発症機構の詳細は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、G4 構造の神経生物学的意義を明らかにするため、G4 構造と神経細胞との関与を脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome; FXTAS) に着目し解析する。そして G4 構造が脳機能における学習・記憶の分子実体のひとつであることを提唱し、明らかにする。この成果は神経疾患におけるアンメット・メディカル・ニーズの新たな治療薬の標的として社会に提示できる。

3. 研究の方法

これまでの遺伝医学的な研究により、DNA のグアニンリッチ配列の伸長によるリピート伸長病において G4 構造の異常形成が神経疾患の発症に関与する可能性が示唆されている。中でも、*C9ORF72* 遺伝子変異を起因とする筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭葉変性症 (C9ALS/FTD) や脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome; FXTAS) が挙げられる。FXTAS では、*FMR1* 遺伝子の 5' 非翻訳領域における CGG リピート伸長がみられる。FXTAS では、C9ALS/FTD と同様に RNA 毒性が観察され、神経細胞の RNA 代謝に異常をきたす。また RNA 毒性に加えて、RAN 翻訳も観察される。伸長した CGG リピート RNA は、RAN 翻訳を介して有毒なポリグリシン含有タンパク質「FMRpolyG」を産生する。

本研究では、FMRpolyG に含まれる CGG リピート由来のポリグリシン領域にプリオン様の性質があることに着目した。プリオン様領域を持つタンパク質は液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) により液滴を形成することが知られている。予想通り、FMRpolyG 精製タンパク質は液滴を形成した。また、FMRpolyG の液滴を FXTAS 発症リピート数である (CGG)99 リピート RNA と混合して観察したところ、FMRpolyG は (CGG)99 リピート RNA と複合体を形成しゲル状の凝集体となった。RNA の物性解析を行ったところ、健常人のリピート数である (CGG)17 リピート RNA がヘアピン型であるのに対し、(CGG)99 リピート RNA は G4 構造を形成すること、また、(CGG)99 リピート RNA は FMRpolyG のポリグリシン領域と直接結合することを見出した。つまり、FMRpolyG はポリグリシン領域を介して、G4RNA と結合することでゾル-ゲル転移することが明らかになった。

次に、FMRpolyG に結合するタンパク質を網羅的に解析した。その結果、FMRpolyG は、神経変性疾患の発症に関与する RNA 結合タンパク質群 (HNRNPA2/B1、FUS、SFPQ 等) と結合することがわかった。また、FMRpolyG は細胞外小胞であるエクソソームに含まれるタンパク質群とも複合体を形成することを見出した。FXTAS モデルマウスの脳由来エクソソームには FMRpolyG が高発現しており、野生型マウス神経細胞 (レシピエント細胞) に FXTAS モデルマウス神経細胞 (ドナー細胞) 由来エクソソームを処置することによって、野生型マウス神経細胞にも FMRpolyG の発現が確認され、神経機能異常が見られた。つまり、FMRpolyG はエクソソームを介して細胞間に伝播し、神経機能異常を引き起こすプリオノイドタンパク質であることを発見した。

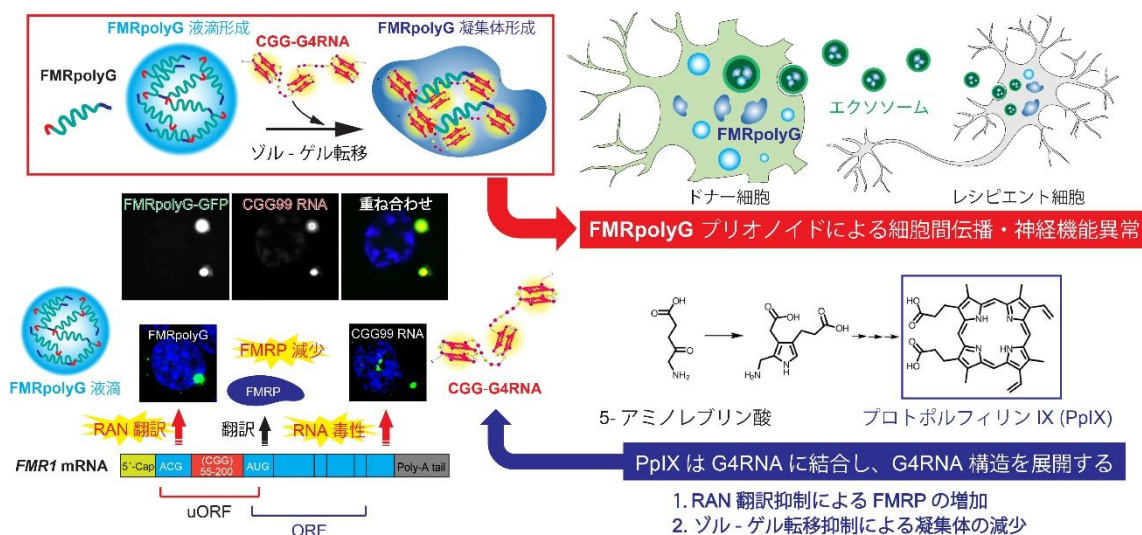
また、生体内ポルフィリンであるプロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX: PPIX) が、G4 構造に結合することでプリオノイドタンパク質の凝集を抑制することを見出した。PPIX を FMRpolyG と G4RNA の複合体に処置することで、LLPS を介した凝集体形成が劇的に抑制さ

れた。さらに、体内で PPIX を産生する 5-アミノレブリン酸を FXTAS モデルマウスに経口投与することで RAN 翻訳を抑制し、神経伝達機能・認知機能・運動機能の低下を有意に改善することができた。

4. 研究成果

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患の発症にプリオノイド機構が関与することが注目されているが、その細胞内メカニズムは未解明である。このプリオノイドの引き金が G4 構造の凝集であると考えられる。現在、タウや α シヌクレインの凝集と G4 構造の関与を解析中である。また、FXTAS と同様の神経症状を呈するグアニンリッチ・リピートに由来する疾患がロングリード・シーケンス技術により多数発見されている。5-アミノレブリン酸は、安全性の高い既承認医薬品である。従って、本研究により発見されたプリオノイド機構を基盤とした神経変性疾患全般に対する治療が期待される。

CGG リピート由来 G4RNA による FMRpolyG プリオノイドと治療メカニズム



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5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	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.	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

1. 著者名 Fukuda Hiromi, Shioda Norifumi, Matsumoto Naomichi, Mizuguchi Takeshi et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Father-to-offspring transmission of extremely long NOTCH2NLC repeat expansions with contractions: genetic and epigenetic profiling with long-read sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-021-01192-5	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, Shioda Norifumi	4. 巻 169
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 527 ~ 533
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, 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2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 NEURO2022
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

1. 発表者名 塩田倫史
2. 発表標題 神経疾患の新しい治療標的 ~ グアニン四重鎖 ~
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩田倫史
2. 発表標題 神経生物学におけるDNA・RNA 高次構造の機能解明を目指して.
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会 (招待講演)
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 (招待講演)
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) (招待講演)
4. 発表年 2020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

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