

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15417

研究課題名（和文）生体内の特定RNA高次構造を可視化する技術の開発

研究課題名（英文）Visualization of specific RNA secondary structures in vivo

研究代表者

朝光 世煌（Asamitsu, Sefan）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：70849091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、連続したグアニンを豊富に含む配列で形成されるグアニン四重鎖（G4）構造の分子神経科学的役割の解明を目指し、G4構造を探索可能なプローブの開発とそれを用いてマウス脳・マウス初代神経細胞における機能解析を行った。その結果、G4構造を認識する新規ペプチドプローブを駆使した種々の分子生物学的解析により、G4構造を含むメッセンジャーRNAが細胞内相分離体であるストレス顆粒に集積しやすいことを見出した。また生化学・電気生理学的解析により、G4構造が機能的なストレス顆粒の形成に必須であり酸化ストレス下での神経細胞の恒常性維持に重要な役割を担うことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G4構造は、細胞内の局所環境の変化・化学修飾・相互作用因子等、多くの要因によってダイナミックな形成挙動を示す。本研究によって得られた知見を加味すると、G4構造を足掛かりとする緻密なRNA制御機構がストレス顆粒を含む多くの細胞内相分離体の機能的な形成に貢献することが示唆された。またストレス顆粒は筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の神経変性疾患の発症要因と密接に関連している。本研究成果はストレスが関与する多くの疾患の治療薬開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, to elucidate the molecular neuroscience role of the G-quadruplex (G4) structure, which is formed by sequences rich in contiguous guanines, we developed a molecular probe that can detect the G4 structure and analyzed the functions using mouse brain and primary mouse neurons. We found that messenger RNA containing the G4 structure tends to accumulate in stress granules, intracellular phase-separating compartments, by various molecular biological analyses using novel peptide probes based on single-stranded antibodies that recognize the G4 structure. Biochemical and electrophysiological analyses revealed that the G4 structure is essential for the formation of functional stress granules and plays an important role in the maintenance of neuronal homeostasis under oxidative stress.

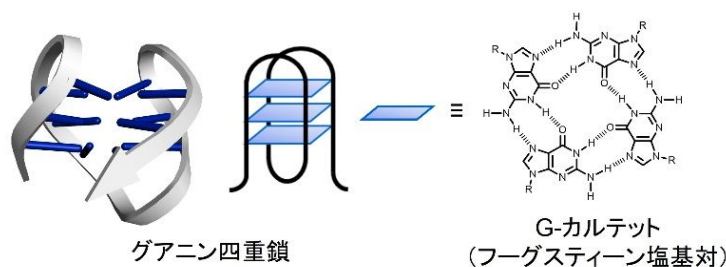
研究分野：核酸機能科学

キーワード：RNA高次構造 神経細胞 分子プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内の RNA は、塩基配列や化学修飾に基づき適切な高次構造をとることで機能を発揮することができる。RNA 高次構造はワトソン・クリック塩基対を基本要素として作られるものが多い一方で、連続したグアニンを豊富に含む配列では、グアニン四重鎖 (以下、G4) と呼ばれる”非ワトソン・クリック型”の高次構造を組むことが明らかになっている (下図)。G4 構造はヒトのトランスクリプトームに約 4,000 箇所存在し RNA の代謝プロセスに関与することが報告されている。G4 構造はがん・遺伝子疾患・神経疾患の病態に関与することが指摘されている一方で、中枢神経系における生理機能の大部分は未だ解明されていない。



2. 研究の目的

本研究では神経細胞・マウス脳を研究対象とし、生体内で G4 構造を探索可能なツールの開発とそれをを用いた G4 構造の分子神経科学的役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 従来の G4 構造のプロローブは、プロローブの結合による G4 構造の誘起が生じてしまう、初代培養細胞・組織への適用性が考慮されていない等、生体内で正確に G4 構造を捉えるには不十分であった。本研究ではこれらの問題を解決すべく遺伝子工学的応用が可能な G4 プロローブの開発を実施した。開発した新規 G4 プロローブを用いて、ケミカルバイオロジー・分子生物学的手法アプローチにより神経細胞における G4 構造の生理機能の解明を行った。

(2) マウス脳のトランスクリプトームにおける G4 構造の分布と G4 構造に結合する RNA 結合性タンパク質の網羅解析を行った。具体的には、成体マウス前脳のライセートに G4 に特異的に結合する抗体を処理し、免疫沈降法で得られた RNA 分画とタンパク質分画をそれぞれ次世代シーケンシング法とショットガンプロテオミクスにより解析した。

(3) DNAPT6 と標的 G4 構造の物理化学的性質やそれらの相互作用の解析を精製タンパク質・合成 RNA を用いて行った。

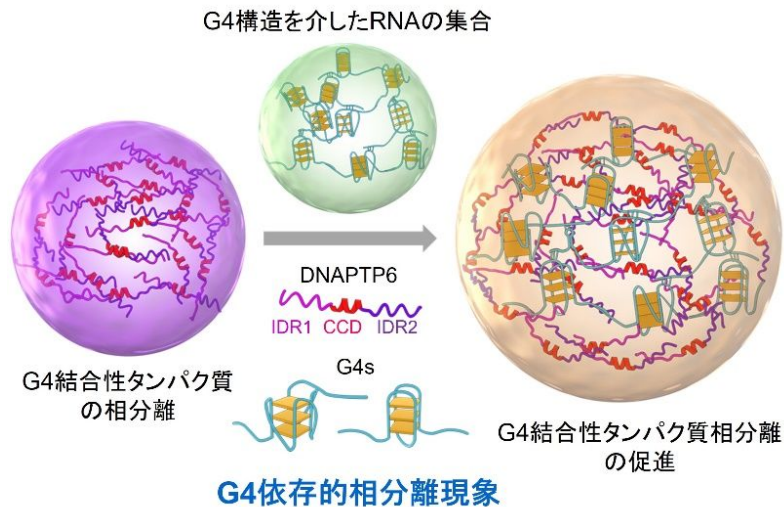
(4) G4 構造の神経生理機能の解明を目的とし、マウスの初代培養細胞を用いて電気生理学的解析等を行った。

4. 研究成果

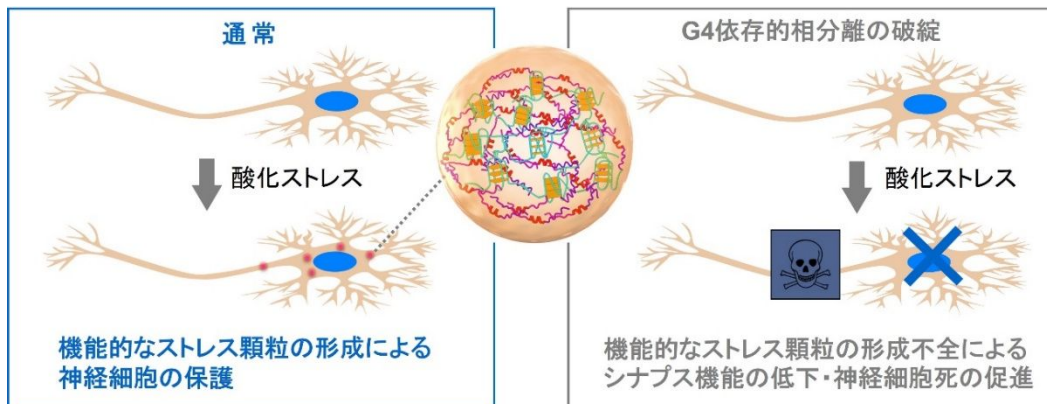
(1) G4 構造を認識する一本鎖抗体 (BG4) を基盤とし、細胞内で発現可能な G4 プロローブの開発を目指した。その結果、N 末端に HA タグ、C 末端に mNeonGreen と 3xFLAG タグを付与することで、生きた細胞内で G4 構造を検出可能な蛍光ペプチドプロローブの開発に成功した。この蛍光ペプチドプロローブを駆逐することにより、G4 構造を含む mRNA が、細胞内の相分離体の一つであるストレス顆粒に集積しやすいことを見出した。

(2) これまで G4 結合性が報告されていなかった DNAPT6 と呼ばれる RNA 結合性タンパク質を見出した。また次世代シーケンシング解析の結果と組み合わせることで、DNAPT6 の標的 G4 構造をいくつか同定することができた。

(3) 試験管内の再構成系を用いて、G4 構造依存的に DNAPT6 タンパク質の相分離が促進される現象を発見した (G4 依存的相分離現象、下図)。



(4) G4 依存的相分離現象が細胞内でどのように反映されているか、すなわち、G4 構造がストレス顆粒に集積する生理学的意義の解明を目指し、マウスの初代神経細胞を用いて電気生理学的解析を行った。自発性の興奮性シナプス後電流の測定において、G4 構造依存的なストレス顆粒の形成を阻害した条件下でシナプス伝達に異常が生じることが分かった。またこの実験結果を支持するように、酸化ストレス存在下において G4 構造依存的なストレス顆粒の形成阻害により神経細胞死が促進されることもわかった。すなわち、トランスクリプトームに豊富に存在する G4 構造は、機能的なストレス顆粒の形成を介して神経細胞の細胞恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆された (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirose Yuki, Ohno Tomo, Asamitsu Sefan, Hashiya Kaori, Bando Toshikazu, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Strong and Specific Recognition of CAG/CTG Repeat DNA (5' dWGCWGCW 3') by a Cyclic Pyrrole Imidazole Polyamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202100533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100533	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, Shioda Norifumi	4. 巻 mvab018
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 mvab018
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 Katsuda Yousuke, Sato Shin-ichi, Inoue Maimi, Tsugawa Hisashi, Kamura Takuto, Kida Tomoki, Matsumoto Rio, Asamitsu Sefan, Shioda Norifumi, Shiroto Shuhei, Oosawatsu Yoshiki, Yatsuzuka Kenji, Kitamura Yusuke, Hagihara Masaki, Ihara Toshihiro, Uesugi Motonari	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 Research	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 無
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, Matsuo Kazuya, Kawasaki Moe, Hirose Yuki, Kashiwazaki Gengo, Chandran Anandhakumar, Bando Toshikazu, Wang Dan Ohtan, Sugiyama Hiroshi, Shioda Norifumi	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 ade2035
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 無
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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 朝光 世煌、川寄 萌、柏崎 玄伍、Anandhakumar Chandran、杉山 弘、矢吹 梯、塩田 倫史
2. 発表標題 神経細胞におけるRNAグアニン四重鎖構造の役割の解明
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝光 世煌、川寄 萌、廣瀬 優希、矢吹 梯、柏崎 玄伍、Anandhakumar Chandran、板東 俊和、杉山 弘、塩田 倫史
2. 発表標題 神経細胞におけるグアニン四重鎖RNA構造の相分離現象への寄与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝光 世煌、川寄 萌、廣瀬 優希、矢吹 梯、柏崎 玄伍、Anandhakumar Chandran、板東 俊和、杉山 弘、塩田 倫史
2. 発表標題 神経細胞におけるグアニン四重鎖RNA構造の相分離現象に与える影響
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sefan Asamitsu
2. 発表標題 Toward elucidating roles for RNA G-quadruplexes in neurons
3. 学会等名 8th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acid (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝光 世煌
2. 発表標題 神経細胞におけるグアニン四重鎖の役割
3. 学会等名 FIBER 核酸化学ユニバーズRising Stars (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sefan Asamitsu
2. 発表標題 RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPT6 in neurons
3. 学会等名 Functional Genomics in Future (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Sefan Asamitsu, Norifumi Shioda, Hiroshi Sugiyama	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 546
3. 書名 Quadruplex Nucleic Acids As Targets For Medicinal Chemistry- Chapter Three - Telomeric quadruplexes as therapeutic targets	

1. 著者名 Sefan Asamitsu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 111
3. 書名 Development of Selective DNA-Interacting Ligands	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

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

〔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		
英国	University of Oxford		