

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06579

研究課題名(和文) RNAグアニン四重鎖による  $\alpha$ -シヌクレイン凝集・伝播調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of alpha-synuclein aggregation and propagation by RNA G-quadruplexes.

研究代表者

矢吹 悌 (Yabuki, Yasushi)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：70756121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レビー小体病は病原性  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) が凝集・伝播することで進行する脳アミロイドーシスである。その全容は未だに不明であり、根本的な治療薬はない。申請者は  $\alpha$ -Syn が核酸高次構造である RNA グアニン四重鎖 (G4RNA) に強く結合することを見出した。In vitro において、G4RNA は  $\alpha$ -Syn の液-液相分離 (LLPS)、および凝集体形成を促進した。  $\alpha$ -Syn 凝集を誘導する内因性 RNA の存在を明らかにした。また、G4 作用薬の薬効を評価した。本研究から、G4RNA による  $\alpha$ -Syn 凝集と神経変性機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経病態における G4RNA の挙動・役割は良く分かっておらず、本研究により、G4RNA の病態生理学的意義の一部が明らかとなった。また、超高齢化社会である本国において、レビー小体病は増加しており、新規治療法や予防医学の発展が急務である。本研究は G4 構造が新たな治療標的になる可能性を示唆しており、ドラッグ・リポジショニングによる臨床開発や創薬研究への発展ができる。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative disorders with Lewy bodies are progressive brain amyloidosis caused by the aggregation and propagation of pathogenic  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -Syn). The mechanism underlying neurodegeneration by  $\alpha$ -Syn aggregation is still unknown, and then there is currently no fundamental cure. We demonstrated that  $\alpha$ -Syn binds specifically to RNA G-quadruplex (G4RNA), and that G4RNA promoted liquid-liquid phase separation (LLPS) and aggregate formation of  $\alpha$ -Syn in vitro. We also identified endogenous G4RNAs that contribute to the induction of  $\alpha$ -Syn aggregation in mouse neurons. We investigated effects of G4 ligands on aggregated  $\alpha$ -Syn-induced neurodegeneration. Taken together, we revealed a part of the mechanism of  $\alpha$ -Syn aggregation and neurodegeneration induced by G4RNA.

研究分野：神経薬理学、神経科学、分子生物学

キーワード：RNA グアニン四重鎖  $\alpha$ -Synuclein 液-液相分離 ゾル-ゲル相転移 神経変性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

-Synuclein ( $\alpha$ -Syn) はレビー小体病 (パーキンソン病、レビー小体型認知症など) 患者脳の特徴的な病理所見である細胞封入体の主要構成タンパク質である。 $\alpha$ -Syn は正常な神経細胞ではシナプス前終末に局在しているが、レビー小体病患者脳内ではクロスマチングシート構造に富むアミロイド凝集封入体として細胞体にみられる (病原性獲得)。近年、病原性  $\alpha$ -Syn がプリオン同様に細胞間を伝播し、正常型  $\alpha$ -Syn を病原性に変換することで病態を進行させることが示唆されている。実際に、マウスまたはラット脳内に超音波破砕した  $\alpha$ -Syn アミロイド線維 (preformed fibril; PFF) を注入すると、レビー小体様の  $\alpha$ -Syn 凝集体が注入部位に形成され、時間経過に伴い  $\alpha$ -Syn 病変が脳全体に拡大し、運動および学習障害を呈する (Yabuki Y et al., 2020. *Int J Mol Sci.*)。つまり、レビー小体病では  $\alpha$ -Syn が凝集し、細胞間を伝播することで脳全体に病変が拡がり、病態が進行すると考えられる。根本治療薬開発のために、 $\alpha$ -Syn 凝集・伝播機構の解明は必要急務である。

一般的な DNA は右向き二重らせん構造であるが、細胞内の分子環境に応じて左巻きらせん Z 型やグアニン四重鎖 (G4) 構造など多様な高次構造を形成する。RNA も G4 構造、ヘアピンループなど多様で複雑な高次構造を形成する。これら高次構造はタンパク質が核酸に結合するときの目印であり、複製、転写、翻訳等の極めて重要な生命現象に大きな役割を果たす。特に、G4RNA は遺伝性神経疾患への関与が示唆されている。実際に、家族性の前頭側頭型認知症患者の一部では G4RNA の凝集体 (RNA foci) が観察される。RNA foci は、RNA 結合タンパク質を集積させ、RNA 毒性を呈する。これは、G4RNA が RNA 結合タンパク質の凝集体形成を促進することを示唆している。

プロテオミクス解析から、 $\alpha$ -Syn 凝集および伝播に関与するタンパク質が多数報告されているが、未だその全容は明らかではない。また、これまで  $\alpha$ -Syn の核酸結合性は不明であった。申請者は、 $\alpha$ -Syn が RNA に結合すること、特に G4RNA への結合性が非常に高いことを見出した。さらに、G4RNA は  $\alpha$ -Syn LLPS 形成を促進し、ゾル-ゲル相転移を誘導した。これらの結果は、G4RNA が足場となり、凝集体形成を促進し、 $\alpha$ -Syn 病原性獲得に寄与すること示唆している。しかしながら、その詳細や生体内における G4RNA の  $\alpha$ -Syn 凝集・伝播における役割については解明できていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\alpha$ -Syn 凝集・伝播機構における G4RNA 機能を解明し、レビー小体病新規治療候補薬としての G4 結合性リガンドの可能性を追求することを目的とした。

### 3. 研究の方法

電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) により、変異  $\alpha$ -Syn をもちいて G4RNA 結合領域を検討する。ランダム配列合成 RNA を用いた RNA Bind-n-Seq (Lambert N et al., 2014. *Mol Cell.*) により  $\alpha$ -Syn に結合する RNA 配列を網羅解析し、配列情報から高次構造を予測する。

培養神経細胞に  $\alpha$ -Syn PFF 注入し、RNA 免疫沈降シーケンス (RIPseq) 解析により生体内で  $\alpha$ -Syn に結合する RNA を同定する。得られた RNA の高次構造を予測し、バイオフィーマティクス解析、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により G4 構造を組む RNA を検討する。

蛍光ラベル化した  $\alpha$ -Syn と RNA を合成し、蛍光退色後回復測定 (FRAP) による LLPS、ゾル-ゲル相転移解析を行う。また、電子顕微鏡により、凝集体の構造を解析する。更に、申請者は光刺激により会合する Cry2 分子を用い、細胞内において  $\alpha$ -Syn LLPS 形成を促進し、凝集体形成を誘導する実験系を確立した (Opto- $\alpha$ -Syn)。光刺激により exosome に Opto- $\alpha$ -Syn が取り込まれるか解析する。また、AAV-Opto- $\alpha$ -Syn を作製し、初代培養神経細胞を用いてより詳細な検討を行う。

5-ALA および PpIX により  $\alpha$ -Syn LLPS および凝集体形成が抑制されるか *in vitro* で検討する。さらに、両側線条体  $\alpha$ -Syn PFF 注入モデルマウスに 5-ALA (3.0 mg/kg, p.o.) を投与し、リン酸化  $\alpha$ -Syn を指標に伝播抑制作用を検討すると共に、運動機能および神経機能障害改善作用についても評価する。

### 4. 研究成果

EMSA により、G4RNA は  $\alpha$ -Syn N 末端に結合することが分かった。また、RNA Bind-n-Seq 解析により、 $\alpha$ -Syn はグアニンが豊富かつ連続した 1 次配列を持つ RNA に結合することが分かった。RIP-seq 解析により、 $\alpha$ -Syn 凝集体にはシナプス関連タンパク質をコードする mRNA が含まれること、これら mRNA 上には G4 構造を形成しうるグアニン連続配列が存在することがわかった。CD スペクトル解析から、カリウム依存的な G4 スペクトルが観測され、今回エンリッチされた RNA 上で G4 構造が形成されることが分かった。mCherry ラベルした  $\alpha$ -Syn (mCh- $\alpha$ -Syn) と FAM ラベルした G4RNA が *in vitro* において共凝集することを確認した。また、FRAP により、mCh- $\alpha$ -Syn 単独液滴では退色した蛍光が改善するが、G4RNA によって円形が崩

れた mCh- $\alpha$ -Syn ではブリーチ後の蛍光回復がみられなかった。つまり、G4RNA によって  $\alpha$ -Syn ゾル-ゲル相転移が誘導されていることが分かった。透過性電子顕微鏡を用いて構造を見るとアモルファス状の凝集体が形成されていることが分かった。Opto- $\alpha$ -Syn を培養細胞に発現させ、光を照射し、エクソソームを回収した。エクソソーム内に Opto- $\alpha$ -Syn が含まれ、伝播活性があることを細胞で確認した。PpIX が G4RNA による  $\alpha$ -Syn ゾル-ゲル相転移を抑制すること、5-ALA により両側線条体  $\alpha$ -Syn PFF 注入モデルマウスの運動機能障害と神経変性が抑制されることを確認した。

本研究結果から、G4 構造を形成する RNA が  $\alpha$ -Syn 凝集を誘導し、細胞間伝播の起点となることが示唆された。今後、神経変性メカニズムについて詳細な解析を継続する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

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 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 -

1. 著者名 Guo Qingyun, Kawahata Ichiro, Jia Wenbin, Wang Haoyang, Cheng An, Yabuki Yasushi, Shioda Norifumi, Fukunaga Kohji	4. 巻 Online ahead of print.
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 Neuroscience & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 -
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 -

1. 著者名 Yabuki Yasushi, Shioda Norifumi	4. 巻 158
2. 論文標題 The neuropathological mechanism on guanine-rich repeat expansion diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 30~33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22078	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 Fukuda H, Yamaguchi D, Nyquist K, Yabuki Y, Miyatake S, Uchiyama Y, Hamanaka K, Saida K, Koshimizu E, Tsuchida N, Fujita A, Mitsuhashi S, Ohbo K, Satake Y, Sone J, Doi H, Morihara K, Okamoto T, Takahashi Y, Wenger AM, Shioda N, Tanaka F, Matsumoto N, Mizuguchi T.	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 Clin 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) なし	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 Matsuo Kazuya, Asamitsu Sefan, Maeda Kohei, Kawakubo Kosuke, Komiya Ginji, Kudo Kenta, Sakai Yusuke, Hori Karin, Ikenoshita Susumu, Usuki Shingo, Funahashi Shiori, Kawata Yasushi, Mizobata Tomohiro, Shioda Norifumi, Yabuki Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA G-quadruplexes forming scaffolds for $\alpha$ -synuclein aggregation lead to progressive neurodegeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.07.10.548322	査読の有無 無
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, Komiya Ginji, Kudo Kenta, Hori Karin, Ikenoshita Susumu, Kawata Yasushi, Mizobata Tomohiro, Shioda Norifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA G-quadruplexes and calcium ions synergistically induce Tau phase transition <i>in vitro</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.03.01.582861	査読の有無 無
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 Kudo Kenta, Hori Karin, Asamitsu Sefan, Maeda Kohei, Aida Yukari, Hokimoto Mei, Matsuo Kazuya, Yabuki Yasushi, Shioda Norifumi	4. 巻 300
2. 論文標題 Structural polymorphism of the nucleic acids in pentanucleotide repeats associated with the neurological disorder CANVAS	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 107138 - 107138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.107138	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 Ikenoshita Susumu, Matsuo Kazuya, Yabuki Yasushi, Kawakubo Kosuke, Asamitsu Sefan, Hori Karin, Usuki Shingo, Hirose Yuki, Bando Toshikazu, Araki Kimi, Ueda Mitsuharu, Sugiyama Hiroshi, Shioda Norifumi	4. 巻 133
2. 論文標題 A cyclic pyrrole-imidazole polyamide reduces pathogenic RNA in CAG/CTG triplet repeat neurological disease models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI164792	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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Norifumi Shioda
2. 発表標題 RNA phase transition disrupts -Synuclein proteostasis.
3. 学会等名 第17回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、松尾和哉、酒井勇輔、塩田倫史
2. 発表標題 RNA 相転移による -シヌクレイン凝集体誘導メカニズム.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、松尾和哉、酒井勇輔、塩田倫史
2. 発表標題 RNA グアニン四重鎖による -シヌクレイン相転移促進メカニズム.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、塩田倫史
2. 発表標題 NA 相転移に着目した神経変性疾患発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Kohei Maeda, Yusuke Sakai, Tomohiro Mizobata, Norifumi Shioda
2. 発表標題 RNA G-quadruplex promotes phase transition of prion-like proteins.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、松尾和哉、前田康平、溝端知宏、川久保厚佑、塩田倫史
2. 発表標題 RNA 相転移によるシヌクレイン凝集促進機構の検討
3. 学会等名 令和4年度日本生化学会 九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、塩田倫史
2. 発表標題 RNA相転移によるプリオン性タンパク質凝集機構と創薬研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢吹悌、塩田倫史
2. 発表標題 RNA 相転移によるシヌクレイノパチー病態解明と治療戦略
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川久保厚佑、池ノ下侑、松尾和哉、朝光世煌、矢吹悌、杉山弘、塩田倫史
2. 発表標題 CAG/CTGトリプレットリピート病における環状ピロール-イミダゾールポリアミドを用いた伸長DNA標的治療法の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田康平、矢吹悌、朝光世煌、松尾和哉、溝端知宏、河田康志、塩田倫史
2. 発表標題 Cellular stress-induced formation of RNA G-quadruplexes accelerates $\alpha$ -Synuclein aggregation.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝光世煌、川寄萌、廣瀬優希、矢吹悌、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 矢吹悌、朝光世煌、前田康平、松尾和哉、溝端知宏、河田康志、塩田倫史
2. 発表標題 RNA グアニン四重鎖は $\alpha$ -シヌクレインのプロテオスタシス破綻を誘導する
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 矢吹悧、朝光世煌、前田康平、松尾和哉、溝端知宏、河田康志、塩田倫史
2. 発表標題 RNA グアニン四重鎖は $\beta$ -シヌクレイン液-固相転移を誘起する
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田康平、矢吹悧、朝光世煌、松尾和哉、溝端知宏、河田康志、塩田倫史
2. 発表標題 RNAグアニン四重鎖は $\beta$ -シヌクレインのゾル-ゲル相転移を誘導する
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹悧、松尾和哉、前田康平、溝端知宏、河田康志、朝光世煌、塩田倫史
2. 発表標題 RNAグアニン四重鎖は $\beta$ -シヌクレイン相転移を誘導する
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹悧、朝光世煌、前田康平、松尾和哉、溝端知宏、河田康志、塩田倫史
2. 発表標題 RNAグアニン四重鎖は $\beta$ -シヌクレイン相転移を誘導する
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 Kenta Kudo, Karin Hori, Kazuya Matsuo, Yasushi Yabuki and Norifumi Shioda
2. 発表標題 Targeting therapy to expanded DNA using pyrrole-imidazole polyamides in repeat expansion diseases.
3. 学会等名 20th International Workshop on Fragile X & Other Neurodevelopmental Disorders (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢吹 悌, 松尾 和哉, 塩田 倫史
2. 発表標題 RNA 相転移による -シヌクレイン凝集メカニズムの解明
3. 学会等名 第 2 回ダウン症基礎研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢吹 悌、塩田 倫史
2. 発表標題 RNA 相分離を起点としたシヌクレイノパチー発症機序の解明
3. 学会等名 第17回日本臨床ストレス応答学会大会シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Norifumi Shioda
2. 発表標題 The mechanism of -Synuclein aggregation induced by RNA phase transition.
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会/第66回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢吹 悧、塩田 倫史
2. 発表標題 RNA 相分離による神経変性メカニズムの解明
3. 学会等名 第76回日本薬理学会西南部会 次世代薬理学セミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢吹 悧、松尾 和哉、前田 康平、工藤 健太、堀 かりん、塩田 倫史
2. 発表標題 RNA 相分離による -シヌクレイン凝集が神経変性を誘導する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
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
研究協力者	前田 康平  (Maeda Kohei)	熊本大学・発生医学研究所・学生  (17401)	
研究協力者	池ノ下 侑  (Ikenoshita Susumu)	熊本大学・発生医学研究所・学生  (17401)	

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