

グアニン四重鎖による DNA 可塑性と RNA エングラム

熊本大学 発生医学研究所ゲノム神経学分野

塩田 倫史

○ G4 構造の概要

[Asamitsu and Shioda* et al. *Int. J. Mol. Sci.* 20, (2019) E2884. の総説より]

私は「ゲノム DNA・RNA 高次構造からなる脳の個性・病態を解明すること」に興味を抱き、研究に取り組んでいる。ゲノム DNA・RNA 高次構造には多様性がある。DNA は、右巻き二重らせんであることが Watson 博士と Crick 博士によって 1953 年に発見された。この DNA の基本的な構造は「B 型 DNA」と呼ばれている。実は、一般的に知られているこの右巻き二重らせん以外にも、左巻き (Z-型) DNA、三重鎖 (H-型) DNA など「非 B 型 DNA」と呼ばれる構造が発見されており、DNA はその配列の特徴や溶媒の環境により右巻き二重らせん以外の構造を形成する。

非 B 型 DNA のひとつであるグアニン四重鎖 (G4; G-quadruplex) 構造は、グアニンが豊富な配列領域で一本鎖 DNA (G4DNA) もしくは RNA (G4RNA) で形成される (図1)。各グアニンが 2 つ隣接するグアニンと水素結合し、4 つのグアニン分子が「G カルテット」と呼ばれる正方形の平面配置をとる (図1A)。さらに G カルテットは、互いの上に積み重なり G4 構造を形成する。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 (図1B)。

ループ長および配列の違いにより様々な G4DNA が形成される。これまで、G4DNA は分子内構造、二分子構造、四分子構造、高次 G カルテット構造、ストランドが同一の配向をもつパラレル型、4 本のうち 1 本だけ逆を向くハイブリッド型、配向が 2 本ずつ交互になるアンチパラレル型などが報告されている。一方、G4RNA はループ長とは無関係にパラレル型を形成することが知られている。一例として、テロメアとテロメア RNA (TERRA) の構造を 図1C に示した。テロメアは TTAGGG の 4 リピート配列でハイブリッド型 G4DNA を形成し、TERRA は UUAGGG の 4 リピート配列でパラレル型 G4RNA を形成する。重要な点として、上述の G4 構造のトポロジー解析は全て *in vitro* による結果であり、この物理化学的性質が *in vivo* における生理的現象にどのように関与するのかは未解明である。

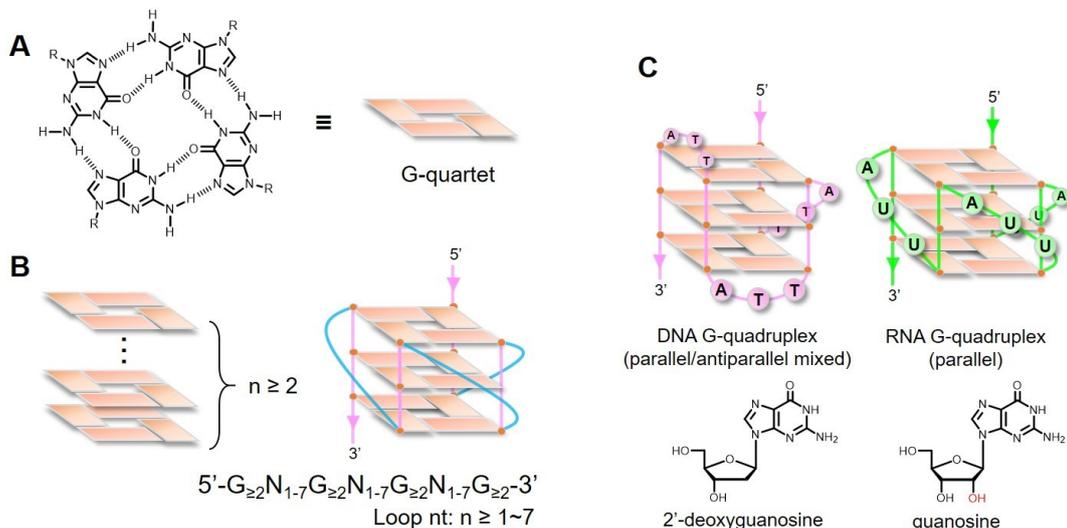


図1. グアニン四重鎖構造の基本概略図。(A) G カルテットの化学構造。(B) グアニン四重鎖構造は、少なくとも 2 つまたは 3 つの G カルテットと、長さが異なる 3 つのループ (1~7 ヌクレオチド) からなる。(C) テロメア DNA グアニン四重鎖 (左) およびテロメア RNA グアニン四重鎖 (右) の構造。

(Asamitsu and Shioda* et al. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E2884. (2019) より一部改変)

○ G4RNA 構造と神経変性疾患との関与について

[Asamitsu, Yabuki and Shioda* et al. *Sci Adv.* 7, (2021) eabd9440. の成果と Asamitsu and Shioda* et al. *BBRC.* 531, (2020) 51–55. および Asamitsu and Shioda*. *J Biochem.* 169, (2021) 527-533. の総説より]

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可能性がある。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。私は、G4 構造の神経生物学的機能について研究を行っている。

これまで、グアニンリッチ配列の伸長によるリピート病において 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) の研究が最も盛んに行われている。C9ALS/FTD では、*C9ORF72* 遺伝子非翻訳領域内にヘキサヌクレオチド GGGGCC (G4C2) リピート伸長が起こり、DNA および RNA で G4 構造とヘアピン構造が混在した状態が形成される。この核酸構造異常に起因した病態メカニズムがこれまでに 4 つ提唱されている。① RNA 毒性；DNA センス鎖 G4C2 リピートの RNA 転写産物が核内に RNA 凝集体を形成・蓄積し、その凝集体に多くの RNA 結合タンパク質群を巻き込み、それらを機能不全にすることで神経変性を引き起こす。② repeat-associated non-AUG (RAN) 翻訳；リピート伸長 RNA において、全てのリーディングフレームでジペプチドリピートタンパク質が異常翻訳され、神経変性を引き起こす。③ *C9ORF72* タンパク質ハプロ不全；G4DNA 構造が RNA ポリメラーゼを失速させ、*C9ORF72* タンパク質産生を抑制する。*C9ORF72* タンパク質の減少は、グルタミン酸受容体の凝集・機能不全を誘導し神経変性を引き起こす。④ 内因性 DNA 損傷；G4DNA が二本鎖切断の形成を促進し、DNA 修復経路の機能不全を引き起こす。

その他の例として、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、*FMRI* 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、RNA 代謝に異常を引き起こす。また RNA 毒性に加えて、RAN 翻訳も観察されている。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。

私は、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 CGG99 リピート (FXTAS 発症リピート数) RNA と混合して観察したところ、FMRpolyG は CGG99 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 CGG17 リピート RNA がヘアピン型であるのに対し、CGG99 リピート RNA は G4 構造を形成すること、また、CGG99 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-ゲル転移することを明らかにした (図2)。

次に、FMRpolyG に結合するタン

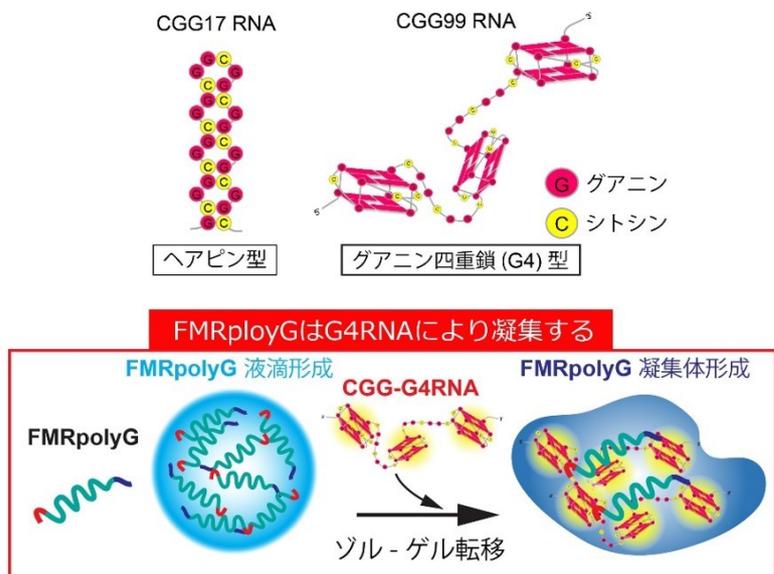


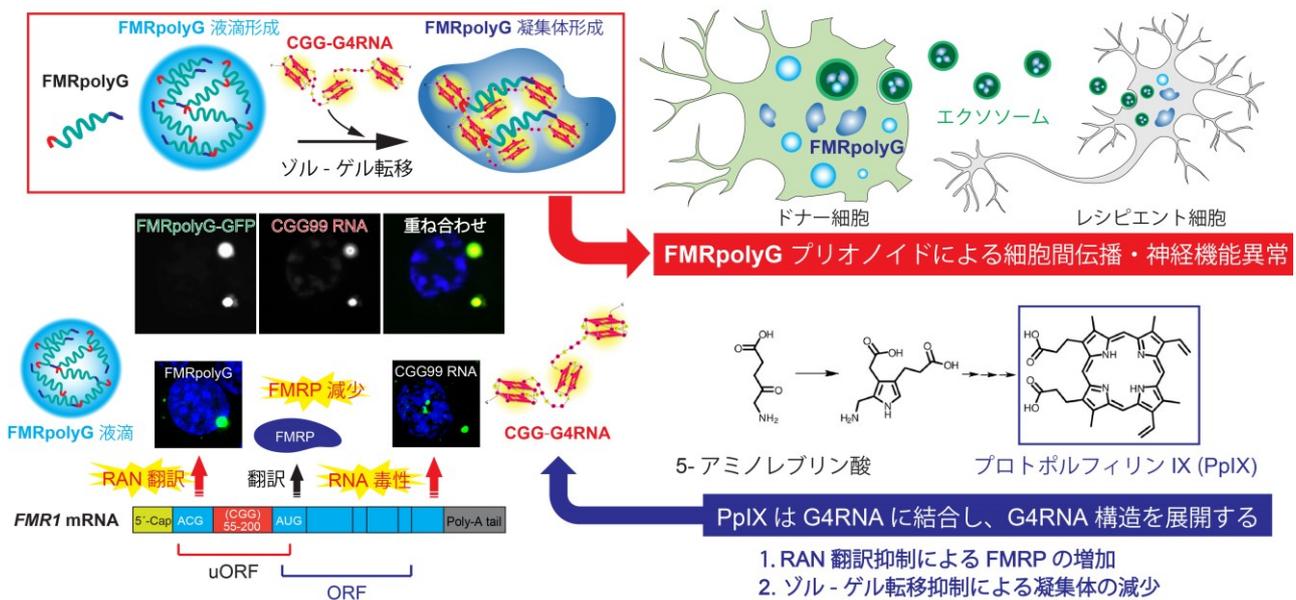
図2. FMRpolyG は G4RNA と結合し凝集体を形成する。

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 (図3)。

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-G4RNA 凝集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、抑制神経伝達機能・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 (図3)。

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。このプリオノイド機構の引き金が G4 構造の凝集であると考えられ、現在検討中である。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。

図 3. 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



謝辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に感謝申し上げます。今後も、革新的な研究を行い、新たな知見の発信に尽力していく所存です。