

研究終了報告書

「生きた脳で DNA 高次構造を網羅的に捉える技術の開発」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：朝光 世煌

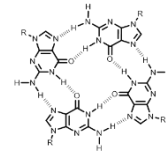
1. 研究のねらい

グアニンが連続した核酸配列は、グアニン四重鎖 (G4) と呼ばれる核酸高次構造をとる。G4 構造は哺乳細胞のゲノムや転写産物に多数存在し、遺伝子発現・クロマチン構造制御や RNA 代謝制御に関与することが示されている。一方で、生きた細胞内で G4 構造の形成挙動を捉える実験手法が不十分であるため、相反する結果が導かれる等、未だ統一的な理解には至っていない (図 1)。本研究課題では、実験手法のボトルネックを解消するため、生体マウス内で G4 構造を網羅的に捉える技術の開発とそれを用いた G4 構造の生物学的意義の解明を目指した。

グアニン四重鎖構造 (G-quadruplex, G4)

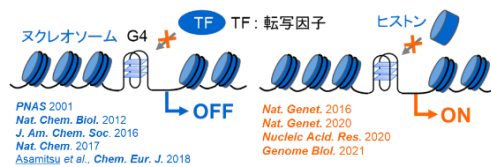


G4カルテット



- ・連続したグアニンを豊富に含む配列で形成
- ・ヒトゲノムにおおよそ10,000～30,000カ所

G4構造と転写との関連



転写の抑制？促進？これらを決定する因子は？

図1. G4構造に関する概要

2. 研究成果

(1)概要

上記の研究目的を踏まえ、以下 (i), (ii), (iii) の研究成果を得た。

(i) G4 構造特異的一本鎖抗体 BG4 を基盤とし、安定的に哺乳細胞内で発現可能なペプチド G4 プローブ (以下、G4p) の開発に成功した。この G4p に mNeonGreen (mNG) を付与した蛍光 G4p を考案・駆使することで、細胞内の G4RNA が、酸化ストレスに応答して形成されるストレス顆粒に蓄積することを見出した (代表的な論文 1)。(ii) この G4p を核内に発現させることにより、生きた初代培養細胞におけるゲノム G4 構造を網羅的に捉えることができる技術、iG4

CUT&Tag の開発に成功した (図 2a)。これを用いた G4 構造のゲノムワイドな形成挙動のプロファイリングにより、神経細胞におけるゲノム G4 構造の役割の一端を明らかにした (次項で詳細を説明)。(iii) 蛍光 G4p を時期特異的に発現することが可能な遺伝子改変マウス (G4p 発現マウス) の作出に成功した (図 2b)。

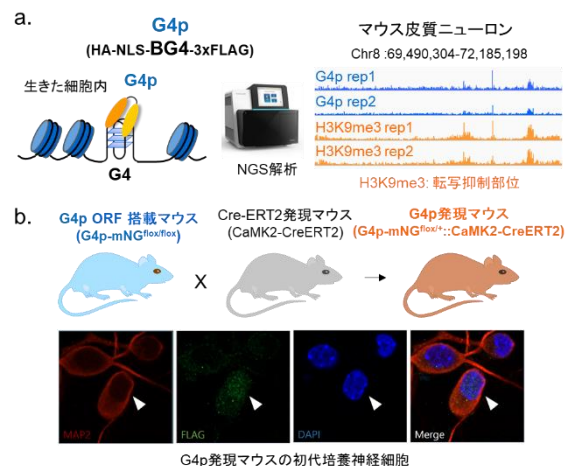


図2. 研究成果概要

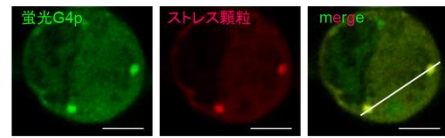
(2) 詳細

上述した 3 つの研究成果項目 (i), (ii), (iii) の詳細を以下に記す。

(i) 新規 G4p による G4RNA のストレス顆粒への集積の可視化

G4 構造特異的一本鎖抗体 BG4 は、BG4 のコードするプラスミドを哺乳細胞内に発現させると、細胞質内に凝集体を形成してしまうという問題があり、細胞質内の G4RNA を検出するためには改良が必要だった。

本研究課題では、BG4 の C 末端、N



マウス神経芽細胞腫細胞株

新規G4pによりG4RNAがストレス顆粒に集積することを示した

S. Asamitsu et al., *Sci. Adv.* 2023, 9, eade2035

図3. 新規G4pの開発概要

末端に適切なエピトープタグのペアを付与することで、BG4 全体の等電点を調節し、凝集体形成を顕著に抑制することに成功した (図 3)。この新規 G4p により、細胞質に存在する G4 構造が酸化ストレス依存的にストレス顆粒に集積する現象をイメージングで捉えることに成功した。

(ii) iG4 CUT&Tag による神経細胞におけるゲノム G4 構造の役割の解明

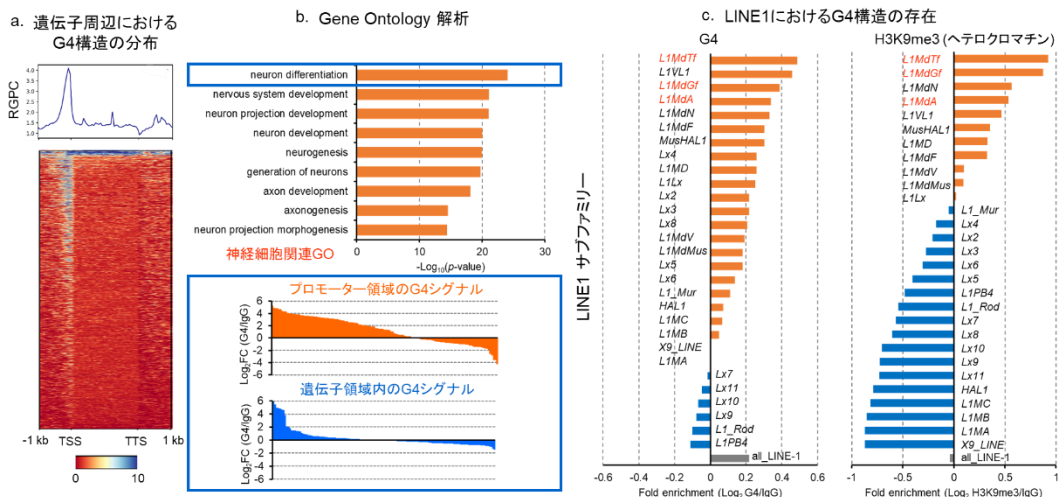


図4. 神経細胞におけるiG4 CUT&Tagの解析結果の概要

上述した G4p に核移行シグナルを導入することで、G4p を核内に発現させることにより、生きた初代培養細胞におけるゲノム G4 構造を網羅的に捉えることができる技術、iG4 CUT&Tag の開発に成功した。新規分析ツール iG4 CUT&Tag を用いた解析により、ゲノム G4 構造は神経細胞に関連する遺伝子群のプロモーター領域に濃縮されることが分かった (図 4a,b)。また、更なる詳細な解析により、G4 構造がレトロトランスポゾン的一种である LINE1 に多く存在することがわかった (図 4c)。LINE1 は「動く遺伝子」として知られており、転写を介して自身の遺伝子を移動・複製させることができる。また H3K9me3 (ヘテロクロマチンマーカー) 抗体を用いた CUT&Tag の解析により、G4 構造がヘテロクロマチン依存的に LINE1 の転写プロセスに関与していることを示唆する結果を得た (図 4c)。現在、LINE1 を代表とする非コードゲノム領域と G4 構造との関連性を、マウスの培養細胞 (マウス神経芽細胞及びマウス ES 細胞) の系を用いて、詳細に調査している。

(iii) G4p を時期特異的に発現することが可能な遺伝子改変マウスの作出

新規 G4p を細胞内に安定的に発現させることができるようになったことを踏まえ、G4p をゲノムに導入した遺伝子改変マウスの開発を行った。具体的には、CAG プロモータ配列と G4p をコードした配列を Rosa26 遺伝子座に導入した ES 細胞を用いてキメラマウスを作出した (G4 発現マウス, 図 2b)。G4p 発現マウスはタモキシフェン薬剤依存的に Cre を活性化し、G4p の発現を誘導することが可能なシステムになっている。G4 発現マウスから取得した神経細胞の初代培養系を用いて、G4p が核内に発現していることを確認できた (図 2b)。現在、G4 発現マウスの生体脳を用いたゲノムワイドな G4 構造のマッピングを実施している。

3. 今後の展開

本研究課題で開発した新技術は、「生きた体内」でゲノム G4 構造の形成挙動を網羅的に捉えることができる唯一の手法であり、今後、「G4 構造の生物学的意義」における混沌とした学説を刷新する起爆剤になると考えている。また、この方法論を生体組織に適用し、脳における G4 バイオロジーを新たに展開することは学術的な新たな価値であり、その発展は神経疾患の病態分子基盤の統合的解明に貢献することが期待される。近年の G4 結合性薬剤の前臨床・臨床試験での躍進や血液脳関門ドラッグデリバリーシステム (DDS) の発展を加味すると、将来的に神経疾患を患う患者さんの QOL の向上に繋がる可能性を秘めている点で学術研究を越えた波及効果が期待される。

分子プローブの開発では主に化学反応を駆使した特異的プローブの開発が進められているが、その多くは細胞株における応用に留まる等、汎用性に乏しい。本研究で開発したプローブは遺伝子工学的手法への応用が可能なデザインであり、プローブを発現する遺伝子改変マウスの作出のみならず、モデルマウスとの交配によるハイブリッドマウス等により、詳細な分子遺伝学的研究・医学研究へと応用が可能である。

4. 自己評価

本研究では、新規の G4 検出手法の開発により未だ統一した見解が得られていない G4 構造の生物学的役割を解明することを目的とした。本研究課題を通して、ゲノムワイドに G4 構造を検出する手法 iG4 CUT&Tag の開発に成功し、この手法「生きたマウス」で実施可能な遺伝子改変マウスの開発まで実施することができた。またこの手法から派生させることで、細胞質に存在する G4RNA をイメージング可能な手法の開発に成功し、論文として成果を発表することができた。この成果は JST ACT-X と共同でプレスリリースを行い、多くのメディアでその紹介記事が掲載された。一方で、生体マウスを用いた解析は現在解析を行っており、加速フェーズ移行課題にて完遂することを予定している。また研究課題を通して、現在のスタッフ研究員の職位に就くことができ、当初の予定の範囲内で研究実施体制を維持し研究費の執行を終えることができた。以上の達成状況を踏まえ、概ね当初の計画通りに研究を遂行できたと評定した。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6 件

1. **S. Asamitsu**, Y. Yabuki, K. Matsuo, M. Kawasaki, Y. Hirose, G. Kashiwazaki, A. Chandran, T. Bando, D. O. Wang, H. Sugiyama, N. Shioda, RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPTP6 in neurons, *Sci. Adv.* 2023, 9, eade2035

G4 構造は、哺乳細胞の mRNA に約 4,000 カ所存在することが報告されている。他方で、G4 構造が豊富に存在する生物学的意義は未だ十分に解明されていない。神経細胞で発現するグアニン四重鎖構造を持つ RNA とそれに結合するタンパク質を同定し、ストレス顆粒の適切な形成を介して神経細胞の細胞恒常性を維持することを明らかにした。筆頭著者、共同責任著者として JST ACT-X と共同でプレスリリースした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース

代表的な論文 1 は JST ACT-X と共同でプレスリリースした。

学会発表

代表的な論文 1 に関連する研究成果を、日本化学会第 102 春季年会(口頭発表)、第 46 回日本分子生物学会年会(口頭発表、査読有)にて発表した。他、国内外の学会・シンポジウムにて 3 件の招待講演を含む 5 件の発表を行った。

著作物

日本神経科学学会の機関誌にて代表的な論文 1 に関連する総説を執筆した。