

日本神経化学会優秀賞受賞者研究紹介

液-液相分離によるシヌクレイノパチー発症機構の解明

矢吹 悌

熊本大学発生医学研究所ゲノム神経学分野

はじめに

α シヌクレイン (α -synuclein: α Syn) は、パーキンソン病やレビー小体型認知症に代表されるシヌクレイノパチー患者脳における特徴的な病理所見である「細胞内凝集体」の主要構成タンパク質である。 α Syn は、正常な神経細胞ではシナプス小胞と細胞膜の融合に関与する SNARE タンパク質複合体の一部としてシナプス前終末に局在する。一方、シヌクレイノパチー患者脳では何らかの異なる分子と複合体を形成し、細胞内にアミロイド凝集体を形成する。近年、 α Syn アミロイド凝集体は分子クラウディングの一形態である液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) を介して形成されることが報告されているが、これは主に α Syn タンパク質単体を用いた *in vitro* 研究にとどまっております¹⁾、*in vivo* での病態発症メカニズムとの関連は未だ不明である。

一般に広く知られている核酸の構造は右巻きの二重らせん構造であり、この基本構造は「B型」と呼ばれている²⁾。このB型構造以外にも、左巻らせん構造であるZ型や、三重鎖構造(H型)など、いわゆる「非B型」構造と総称される多様な高次構造が存在することが明らかになっている³⁾。これらの構造は、塩基配列の特徴や溶液条件などの環境要因に応じて形成されることが知られている。非B型核酸構造の一つであるグアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) は、グアニンに富む配列を有する一本鎖核酸上に形成される高次構造である (図1)。本稿では、RNA グアニン四重鎖 (RNA G-quadruplex: G4RNA) について概説するとともに、

我々が最近明らかにした G4RNA を介した α Syn 相転移制御機構と神経変性メカニズムについて紹介する。

G4RNA について

G4 構造は各グアニン塩基が隣接する2つのグアニン塩基と非ワトソン・クリック型のフーグスティーン塩基対を形成することで、4つのグアニンが正方形に配列されたGカルテットを構成する (図1)。このGカルテットが複数積み重なることにより、G4 構造が形成される。G4 は、少な

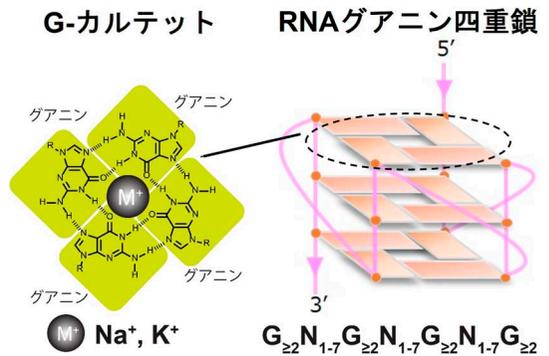


図1 G4 構造の基本概略図

各グアニン塩基は隣接する2つのグアニンと水素結合を形成し、4つのグアニンが「Gカルテット」と呼ばれる平面構造をとる。このGカルテットが積み重なることで、G4 構造が構築される。G4 構造は、4つのグアニントラクトとそれらを連結する3つのループ領域によって形成され、ループの長さや配列の違いによって多様な構造多様性が生じる。特に、RNA 由来の G4 (rG4) は、すべてのストランドが同一方向を向く「パラレル型トポロジー」をとることが知られている (文献4より改変)。

くとも2つの連続したグアニンを含む4つのグアニントラクトと、それらを連結する3つのループ領域から構成される(図1)⁴⁾。G4の形成および安定性は、カチオンの種類、温度、ストランドの配向、ループの長さなど、複数の要因によって影響を受ける⁵⁾。特に、Gカルテットの中心に一価の陽イオンが結合することで構造が安定化されることが知られており、一般的には $K^+ > Na^+ > Li^+$ の順に安定化作用が強いとされている⁶⁾。ループの長さや配列により多様なG4構造が形成されるが、G4RNAは、ループ長にかかわらずストランドがすべて同一方向を向くパラレル型トポロジーをとることが特徴である(図1)^{7,8)}。一方で、これらG4構造のトポロジーに関する知見は、すべて*in vitro*解析に基づくものであり、その物理化学的特性が*in vivo*における生理機能にどの程度寄与しているのかについては依然として不明な点が多い。

α SynはG4RNA特異的結合を介してゾル-ゲル相転移する

まず我々は α Synが神経細胞内でLLPSを介して凝集するかどうかを検討した。シヌクレイノパチー患者の死後脳ではリン酸化 α Syn (pS129)陽性の凝集体が観察されており、pS129は α Syn凝集のマーカーとして広く用いられている。 α Synアミロイド線維 (preformed fibril: PFF) をマウス神経細胞に処置すると、時間経過に伴って患者脳と同様のpS129陽性凝集体が細胞体に出現することが知られている。一方で、pS129陽性凝集体が形成される前段階における α Synの細胞内動態は不明であった。我々は、ヒト由来の α Syn PFFをマウス培養神経細胞に処置し、マウス α Synに特異的な抗体を用いてその動態を観察した。その結果、 α SynはまずDCP1a陽性のRNA顆粒(P-body)に集積し、その後pS129陽性の凝集体を形成することが明らかとなった。P-bodyを含む非膜オルガネラは、多価の分子間相互作用によって形成されるLLPSによって構築されることが知られている。LLPSはタンパク質や核酸が多価の相互作用によって液滴状に会合した状態であることから⁹⁾、 α Synの物性

に対するタンパク質およびRNAの影響についても検討した。マウス神経芽細胞腫から抽出した細胞由来タンパク質またはRNAを*in vitro*の分子クラウディング条件下で精製 α Synと混合したところ、細胞由来タンパク質では α Syn液滴に顕著な影響は見られなかったが、細胞由来RNAを加えると α Synはゾル-ゲル相転移を呈した。 α SynのRNA結合性についてはこれまで不明であったため、RNA-Bind-n-seq法を用いてランダム配列RNAの中から α Synが結合する配列を同定した¹⁰⁾。その結果、 α Synはグアニンが豊富で連続する一次配列を有するRNAによく結合することが示された。このような配列では先述したG4構造の形成が示唆されるため、 α SynのRNA結合においてG4RNAが関与するかを検証するためにゲルシフト解析を実施した。代表的なG4RNAであるテロメアRNA (UUAGGG)₄、G4構造を形成しない変異型テロメアRNA (UUACCG)₄、ミスマッチヘアピン構造(CAG)₈、およびポリアデニン(AAA)₈を用いて比較した結果、G4RNAのバンドは α Syn濃度に依存して上方にシフトし、他のRNA配列では明確な移動が見られなかった。この結果は、 α SynがG4RNAに特異的に結合することを示している。さらに、G4RNAを加えた条件下で α Syn液滴の状態を観察すると、予想通り α Synはゾル-ゲル相転移を示した。これらの結果から、G4RNAは α Synの凝集を誘導するキーファクターであることが示唆された。

G4RNA会合が α Syn凝集を誘導と神経変性を誘導する

次に、細胞ストレス時におけるG4RNAの動態について検討した。マウス培養神経細胞に α Syn PFFを処置したところ、pS129陽性凝集体が形成される以前に、G4RNAの増加および会合が観察され、最終的にはG4RNAが α Synと共に凝集することが明らかとなった。さらに、このような α SynとG4RNAの共凝集体はパーキンソン病患者の死後脳組織においても確認された。興味深いことに、G4RNAの増加および会合はカルシウムイオンフォ

アであるイオノマイシン処置によって誘導され、*in vitro*においてもカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度依存的に G4RNA の自己会合による相分離が促進されることが確認された。また、 Ca^{2+} 存在下では、G4RNA による αSyn のゾル-ゲル相転移が強く誘導された。加えて、 αSyn PFF 処置後の神経細胞においてはカルシウムホメオスタシスが破綻し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高く保たれていることが明らかとなった。これらの結果は、 Ca^{2+} による G4RNA の自己会合が αSyn のゾル-ゲル相転移の起点となる可能性を示唆している。

続いて、細胞内における G4RNA 会合が αSyn の凝集を誘導するかどうかを検討した。細胞内で G4RNA の自己会合を制御可能な実験系として、光照射によって G4RNA 会合を誘導する OptoG4 システムを構築した。このシステムでは、G4RNA 形成配列にバクテリオファージ MS2 由来のステムループ構造 (MS2 配列) を付加したコンストラクトと MS2 ステムループに特異的に結合する MS2 コートタンパク質 (MCP) に、光照射で自己会合を誘導する Cry2oligo を融合させたコンストラクトを細胞

に発現させ、青色光 (480 nm) を照射することで細胞内における G4RNA の会合を人為的に制御可能とした。この OptoG4 システムをマウス培養神経細胞に導入し、青色光を照射すると、G4RNA の会合に伴い αSyn が共凝集し、さらに興奮性神経伝達の障害が引き起こされた。この神経機能障害は G4 構造を形成しない RNA 配列を用いた場合には観察されなかった。次に、*in vivo* での検討を行うため、アデノ随伴ウイルスを用いてマウスの黒質ドパミン神経細胞に OptoG4 システムを特異的に発現させて青色光を照射した。その結果、OptoG4 発現マウスでは時間経過に伴ってパーキンソン病様の運動機能障害が観察された。作製した脳スライスにおいてドパミン神経細胞を観察すると、*in vitro* と同様に G4RNA と αSyn の共凝集体が確認され、ドパミン神経細胞の変性および脱落が認められた。以上の結果から、G4RNA の自己会合が細胞内における αSyn 凝集の起点となり、それが神経変性を誘導することが示された¹¹⁾。

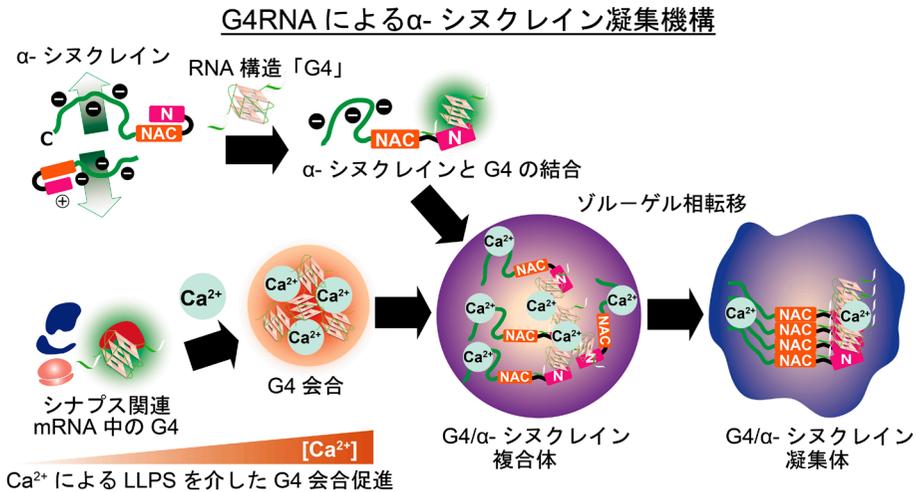


図2 G4RNA による αSyn 凝集と神経変性メカニズムの仮説

通常、 αSyn はモノマーとして機能している。細胞ストレスにより細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると、G4RNA が増加・会合し、その結果として αSyn は LLPS を介してゾル-ゲル相転移を起こし、凝集体を形成する。 αSyn 凝集に関与する G4RNA の多くはシナプス関連分子をコードする mRNA であり、これらの mRNA と αSyn が共凝集することでタンパク質翻訳が阻害され、シナプス機能が障害される。最終的に神経変性が引き起こされ、神経変性疾患の発症に至ると考えられる (文献11より改変)。

シナプス関連タンパク質をコードする mRNA 上の G4 が α Syn 凝集に寄与する

最後に、 α Syn 凝集に寄与する内在性 G4RNA について、免疫沈降法と RNA シーケンスを組み合わせた解析を行った¹²⁾。G4 構造認識抗体および pS129 抗体を用いて免疫沈降を行い、濃縮された RNA をシーケンス解析したところ、その大半がシナプス関連タンパク質をコードする mRNA であることが判明した。特に、CaMKII や PSD95 といったシナプス可塑性に必須な mRNA が含まれており、これらは 3'-UTR 領域に G4 構造を形成することが既に知られている。これらの結果は、細胞ストレスによりシナプス関連分子の mRNA 上に形成された G4 構造が LLPS を介して自己会合し、それが α Syn 凝集の足場となる可能性を示唆している。さらに、G4RNA と α Syn の共凝集により RNA の隔離が起り、それに伴って局所翻訳が障害され、結果としてシナプス機能不全が引き起こされることが考えられる (図2)。

おわりに

本稿では、G4RNA が α Syn のゾル-ゲル相転移の起点となり、シヌクレイノパチー発症に寄与することを紹介した¹¹⁾。本稿では詳細を割愛するが、G4RNA が α Syn の N 末端に結合してゾル-ゲル相転移を誘導すること (図2)、また、G4 構造を不安定化させる化合物がパーキンソン病様の神経変性を予防するという結果も得ている。さらに、G4RNA は α Syn だけでなく、Tau を含む他のプリオン性タンパク質のゾル-ゲル相転移にも寄与しており^{13, 14)}、多くの神経変性疾患の発症に G4 構造が関与している可能性が示唆される。今後は、G4RNA による神経変性機構について、疾患間での「共通性」と「特異性」を明らかにするとともに、G4 構造を標的とした新たな治療法および予防法の開発に向けて、精力的に研究を進めていきたい。

謝 辞

本研究は、熊本大学発生医学研究所ゲノム神経学分野・塩田倫史教授のご指導のもとに実施することができました。ここに深く感謝申し上げます。また、多くの共同研究者の先生方ならびに、日本医療研究開発機構をはじめとする各種研究助成により多大なご支援を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。さらに、本研究成果をご評価いただき、2025 年度 日本神経化学会優秀賞に選出いただきましたこと、関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ray S, Singh N, Kumar R, Patel K, Pandey S, Datta D, Mahato J, Panigrahi R, Navalkar A, Mehra S, Gadhe L, Chatterjee D, Sawner AS, Maiti S, Bhatia S, Gerez JA, Chowdhury A, Kumar A, Padinhateeri R, Riek R, Krishnamoorthy G, Maji SK. α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nat Chem*, 12(8), 705–716 (2020).
- 2) Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738 (1953).
- 3) Zhao J, Bacolla A, Wang G, Vasquez KM. Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. *Cell Mol Life Sci*, 67(1), 43–62 (2010).
- 4) Asamitsu S, Takeuchi M, Ikenoshita S, Imai Y, Kashiwagi H, Shioda N. Perspectives for applying G-quadruplex structures in neurobiology and neuropharmacology. *Int J Mol Sci*, 20(12), 2884 (2019).
- 5) Kumar N, Sahoo B, Varun KA, Maiti S, Maiti S. Effect of loop length variation on quadruplex-Watson Crick duplex competition. *Nucleic Acids Res*, 36(13), 4433–4442 (2008).
- 6) Bhattacharyya D, Mirihana Arachchilage G, Basu S. Metal cations in G-quadruplex folding and stability. *Front Chem*, 4, 38 (2016).
- 7) Patel DJ, Phan AT, Kuryavyi V. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse

- higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res*, 35(22), 7429–7455 (2007).
- 8) Zhang AY, Bugaut A, Balasubramanian S. A sequence-independent analysis of the loop length dependence of intramolecular RNA G-quadruplex stability and topology. *Biochemistry*, 50(33), 7251–7258 (2011).
 - 9) Ryan VH, Fawzi NL. Physiological, pathological, and targetable membraneless organelles in neurons. *Trends Neurosci*, 42(10), 693–708 (2019).
 - 10) Lambert N, Robertson A, Jangi M, McGearry S, Sharp PA, Burge CB. RNA Bind-n-Seq: quantitative assessment of the sequence and structural binding specificity of RNA binding proteins. *Mol Cell*, 54(5), 887–900 (2014).
 - 11) Matsuo K, Asamitsu S, Maeda K, Suzuki H, Kawakubo K, Komiya G, Kudo K, Sakai Y, Hori K, Ikenoshita S, Usuki S, Funahashi S, Oizumi H, Takeda A, Kawata Y, Mizobata T, Shioda N, Yabuki Y. RNA G-quadruplexes form scaffolds that promote neuropathological α -synuclein aggregation. *Cell*, 187(24), 6835–6848.e20 (2024).
 - 12) Asamitsu S, Yabuki Y, Matsuo K, Kawasaki M, Hirose Y, Kashiwazaki G, Chandran A, Bando T, Wang DO, Sugiyama H, Shioda N. RNA G-quadruplex organizes stress granule assembly through DNAPTP6 in neurons. *Sci Adv*, 9(8), eade2035 (2023).
 - 13) Asamitsu S, Yabuki Y, Ikenoshita S, Kawakubo K, Kawasaki M, Usuki S, Nakayama Y, Adachi K, Kugoh H, Ishii K, Matsuura T, Nanba E, Sugiyama H, Fukunaga K, Shioda N. CGG repeat RNA G-quadruplexes interact with FMRpolyG to cause neuronal dysfunction in fragile X-related tremor/ataxia syndrome. *Sci Adv*, 7(3), eabd9440 (2021).
 - 14) Yabuki Y, Matsuo K, Komiya G, Kudo K, Hori K, Ikenoshita S, Kawata Y, Mizobata T, Shioda N. RNA G-quadruplexes and calcium ions synergistically induce Tau phase transition in vitro. *J Biol Chem*, 300(12), 107971 (2024).