特集

脳を理解し制御する化学　3

DNA・RNA 高次構造を標的とした神経疾患の病態解明と治療薬開発

塩田倫史　Norifumi SHIODA

DNA の基本的な構造は「B 型 DNA」と呼ばれる右巻き二重らせんであるが，それ以外にも「非 B 型 DNA・RNA」が報告されており，配列の特徴や溶媒の環境により多様な構造を形成する。非 B 型の 1 つであるグアニン四重鎖（G-quadruplex : G4）は，グアニンが豊富な 1 本鎖の DNA および RNA において形成される。しかしながら，G4 の生物学的機能に関するエビデンスはいまだ少なく，未解明な点が多い。本稿では，G4 の概要ついて述べるとともに，筆者が取り組んでいる神経疾患との関連性について紹介する。

DNA・RNA 高次構造

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ワトソン博士とクリック博士によって 1953 年に報告された[1]。この DNA の基本的な構造は「B 型 DNA」と呼ばれている。一般的に知られているこの構造以外にも，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様々な構造を形成する[2]。非 B 型 DNA の 1 つであるグアニン四重鎖（G-quadruplex : G4）は，グアニンが豊富な配列領域内の 1 本鎖 DNA や RNA で形成される（本稿では各々 G4DNA，G4RNA と略称）。各グアニンが2つの隣接するグアニンと非ワトソン・クリック塩基対であるフーグスティーン塩基対を形成し，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 を形成する。G4 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）[3]。

G4 の形成は，カチオンの結合・温度・配向・ループサイズなど，いくつかの要因により影響を受ける。

しおだ・のりふみ
熊本大学発生医学研究所ゲノム神経学分野　教授
〔経歴〕2004 年岐阜薬科大学卒業。同年東北大学大学院薬学研究科助手。10 年同大学で博士（薬学）取得。同年同助教，14 年同特任准教授，16 年岐阜薬科大学准教授，18 年熊本大学発生医学研究所独立准教授，22 年より現職。〔専門〕神経科学・ゲノム生物学・薬理学。〔趣味〕読書，剣道，パン作り。
E-mail: shioda@kumamoto-u.ac.jp

G4 は 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安定化する。一般的には，$K^+ > Na^+ > Li^+$ の順に G4 の安定化作用が強い。ループ長および配列により様々な G4 が形成され，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。G4RNA は G4DNA より熱力学的に安定で構造的多様性が低い。1〜5 ヌクレオチドの様々なループ長の RNA オリゴヌクレオチド・ライブラリーを使用した実験の結果，G4RNA トポロジーはループ長には無関係にパラレル型を形成す

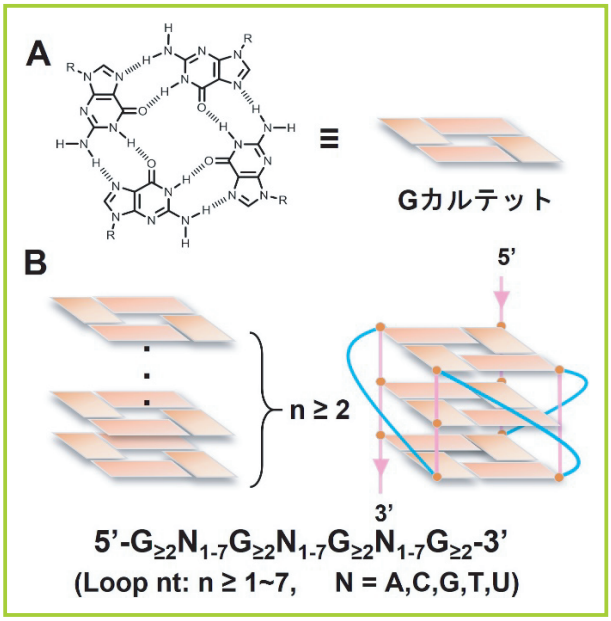

図 1　グアニン四重鎖（G-quadruplex : G4）はグアニンが豊富な配列領域内の 1 本鎖 DNA および RNA で形成される

ることが示されている。例として，テロメアの構造が挙げられる。テロメアは，TTAGGG 配列の 4 リピートで K^+ 結合によりハイブリッド型 G4DNA を形成し，UUAGGG 配列の 4 リピートでパラレル型 G4RNA を形成する。重要な点として，上述の G4 トポロジー解析はすべて *in vitro* による結果であり，生物物理学的な解析結果が *in vivo* においても適応されるのか，そして生体内イベントにどのように関与するのかは未解明である。

G4 と神経疾患

これまで，グアニンリッチ配列の伸長によるリピート伸長病において G4 の異常形成が神経疾患の発症に関与することが示唆されている。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 とヘアピン構造が混在した状態が形成される[4, 5]。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[6]。①RNA 毒性：G4C2 リピートの RNA 転写産物が核内に RNA 凝集体を形成し，その凝集体に多くの RNA 結合タンパク質（RNA binding protein : RBP）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。②Repeat-Associated Non-AUG（RAN）翻訳：リピート伸長 RNA において，すべ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。③C9ORF72 タンパク質ハプロ不全：G4DNA 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 2 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。その他の疾患例として，脆弱 X 随伴振戦/失調症候群（FragileX-associated tremor/ataxia syndrome : FXTAS）が挙げられる[7]。FXTAS では，*FMR1* 遺伝子の 5’ 非翻訳領域における CGG リピート伸長が見られる。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[8]。

筆者らは，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。予想どおり，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いだした。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–ゲル相転移することが明らかになった[9]。

次に，FMRpolyG に結合するタン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 RBP 群（HNRNPA2/B1，FUS，SFPQ など）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いだした。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。さらに，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 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発見した。PPIX を FMRpolyG と G4RNA の複合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。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，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[9]。

近年，アルツハイマー病やパーキンソン病を代表するタウオパチーやシヌクレイノパチー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。FXTAS の結果から，プリオノイドの引き金が G4RNA であると考えられた。本稿では割愛するが，筆者らは，タウやαシヌクレインの凝集が G4RNA により引き起こされることを明らかにした[10, 11]。さらに近年，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神経変性疾患が近年のロングリード・シーケンス技術により多数発見されている。筆者らが発見したプリオノイド機構「G4 プリオノイド」を基盤とした神経変性疾患全般（遺伝性および孤発性）に対する病態解明と治療薬開発が期待される[12]。

G4 を標的とした治療薬開発

これまで多種多様な G4 結合性リガンドが同定されており，がんをはじめとした様々な疾患に対して治療薬となる可能性が報告されている[13]。前述した C9ALS/FTD の G4C2 リピート RNA を標的とする G4 結合性リガンドやアンチセンスオリゴヌクレオチドは RNA 毒性を抑制するとともに RAN 翻訳を阻害することによって，C9ALS/FTD の神経症状を改善することが報告されている[14~16]。筆者らも，異なる観点から G4 結合性リガンドによる脳機能の改善を試みている。これまでに筆者らは，G4 結合タンパク質である ATRX をコードする *Atrx* 遺伝子の変異マウス（Atrx マウス）において認知機能障害が見られることを報告した[17]。さらに，ポルフィリン骨格が G4 結合能を有する点に着目し，生体内ポルフィリンである PPIX とヘミンについて検討した。PPIX とヘミンは細胞内で 5-アミノレブリン酸から産生される。5-アミノレブリン酸を Atrx マウスに経口投与したところ，認知機能障害が有意に改善した[18]。ヒトにおいて，*ATRX* 遺伝子の変異は X 連鎖αサラセミア・精神遅滞症候群（ATR-X 症候群）の原因となる。臨床医との共同研究により，ATR-X 症候群患者では 5-アミノレブリン酸の服用により言語能力が劇的に改善することを症例報告した[19]。

おわりに

細胞内 G4 の網羅的解析法を含め，新しい解析手法の開発により G4 の生物学的機能に関する理解は，ここ数年で飛躍的に高まっている。一方で，数多くの G4DNA・G4RNA ヘリカーゼが同定されているが，それらが細胞内のどの G4 に作用するのか，また，細胞内で G4 の解消がどのように制御されるのか，などに関することは未解明である。さらに，G4 の調節異常がどのようにヒト病態に関与しているかを根本的に理解し，G4 を新たな治療標的として開発するためには，さらなる研究が必要である。

1）J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
2）J. Zhao, A. Bacolla, G. Wang, *Cell. Mol. Life Sci*. **2010**, *67*, 43.
3）S. Asamitsu, M. Takeuchi, S. Ikenoshita, Y. Imai, H. Kashiwagi, N. Shioda, *Int. J. Mol. Sci*. **2019**, *20*, E2884.
4）M. DeJesus-Hernandez et al., *Neuron* **2011**, *72*, 245.
5）A. E. Renton et al., *Neuron* **2011**, *72*, 257.
6）I. Malik, C. P. Kelley, E. T. Wang, P. K. Todd, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **2021**, *22*, 589.
7）P. J. Hagerman, R. J. Hagerman, *Ann. N. Y. Acad. Sci*. **2015**, *1338*, 58.
8）P. K. Todd et al., *Neuron* **2013**, *78*, 440.
9）S. Asamitsu et al., *Sci. Adv*. **2021**, *7*, eabd9440.
10）Y. Yabuki et al., *J. Biol. Chem*. **2024**, *300*, 107971.
11）K. Matsuo et al., *Cell* **2024**, *187*, 6835.e20.
12）S. Asamitsu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2020**, *531*, 67.
13）S. Asamitsu et al., *Molecules* **2019**, *24*, 429.
14）C. Lagier-Tourenne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **2013**, *110*, E4530.
15）J. Jiang et al., *Neuron* **2016**, *90*, 535.
16）T. F. Gendron et al., *Sci. Transl. Med*. **2017**, *9*, eaai7866.
17）N. Shioda et al., *J. Neurosci*. **2011**, *31*, 346.
18）N. Shioda et al., *Nat. Med*. **2018**, *24*, 802.
19）T. Wada, S. Suzuki, N. Shioda, *Congenit. Anom*. **2020**, *60*, 147.

© 2025 The Chemical Society of Japan