

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19397

研究課題名(和文) 同一RNA分子によるプリオン蛋白質とAβ蛋白質の無毒化及び三者間のクロストーク

研究課題名(英文) Inactivation of prion and amyloid beta proteins by the same RNA and the crosstalk among three components

研究代表者

片平 正人(Katahira, Masato)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：70211844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン蛋白質(PrP)は、正常型から異常型に遷移すると、クロイツフェルトヤコブ病等を引き起こす。我々は正常型のPrPに強く結合して安定化する事で、PrPの異常型への遷移を阻害するRNA分子(RNAアプタマー)を見出し、立体構造とプリオンタンパク質との相互作用様式を決定した(岐阜大の桑田教授・鎌足助教との共同研究)。これによって、このRNAアプタマーがPrPの異常型への遷移を阻害する仕組みを解明する事ができた。また、RNAアプタマーが、PrPの受容体能に及ぼす影響に関する知見を得た(京大の森教授、中尾助教との共同研究)。さらに、核酸のインセルNMR法の技術開発も併せて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病気との関係が知られているタンパク質の異常型への遷移を、RNA分子によって阻害できる事を示した。また立体構造の解析に基づいて、この阻害メカニズムも合理的に理解する事にも成功した。これらは、RNA分子を薬として活用できる可能性を示す成果である。さらに核酸のインセルNMR法の技術開発によって、ヒトの生細胞中における核酸分子の挙動を直接的に観測する手法が確立された。これは、核酸が関与した基本的な生命現象の理解に役立つ成果である。

研究成果の概要(英文)：We identified an RNA molecule (RNA aptamer) that binds strongly to a normal form of prion protein and thus inhibits the conversion to a pathological abnormal form of the prion protein. The mechanism of this inhibition was elucidated by the structural analysis. Development of in-cell NMR for nucleic acids was also carried out.

研究分野：構造生命科学

キーワード：プリオンタンパク質 アミロイド タンパク質 RNAアプタマー 立体構造 NMR 相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン蛋白質(PrP)は、正常型から異常型に遷移すると、ヒトクロイツフェルトヤコブ病等を引き起こす。我々は、正常型のPrPに強く結合して安定化する事で、PrPの異常型への遷移を阻害するRNA分子(RNAアプタマー)r(GGAGGAGGAGGA) (以下R12)を見出した()。さらに、より強い結合能を有するRNA分子r(GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA) (以下R24)及びr(GGAGGAGGAGGA-A-GGAGGAGGAGGA) (以下R12-A-R12)を獲得した。

一方、細胞表面に繫留されたPrPが、オリゴマー化したアミロイド蛋白質(A)の受容体として機能して、アルツハイマー病の引き金となる事が提唱されている。そしてPrPに対する抗体を用いてPrPをマスクして、PrPとAオリゴマーとの相互作用を遮断すると、アルツハイマー病に特徴的と考えられる長期増強(LTP)が消失してしまった状態から回復する事が、海馬切片を用いた実験で報告された。

2. 研究の目的

R24及びR12-A-R12によるPrPの異常型への遷移(有毒化)の阻害を神経細胞を用いて検証する。また、R12-A-R12とPrPの複合体の構造解析を行い、PrPに対して高い結合能、ひいては高い有毒化阻害能を示すメカニズムを、分子・原子レベルの分解能で解明する。さらに、R12/R24がPrPの受容体能に及ぼす影響を研究する。生細胞中における核酸の構造・挙動に関する情報を得る為に、核酸のin-cell NMRシグナルを検出する手法の確立も行う。

3. 研究の方法

(i) RNA分子R24及びR12-A-R12によるプリオンタンパク質(PrP)の有毒化の阻害の神経細胞を用いた検証

マウス神経細胞GT+FKを用いて、R24及びR12-A-R12の添加によって異常型PrP(有毒)の生成が阻害される事を確認した。これによって、RNAアプタマーによって、PrPの有毒化を阻害する事を検証した。本実験は岐阜大の桑田一夫教授・鎌足雄司助教との共同研究で行った。

(ii) R12-A-R12によるPrPの有毒化の阻害メカニズムの構造学的な解析による解明

R12-A-R12とPrPの複合体に関して最新のNMR技法を駆使した構造解析を行い、PrPに対する高い結合能、ひいては高い有毒化阻害能を示すメカニズムを、分子・原子レベルの分解能で解明した。なおR12に関する構造解析の実績を有するので、これを生かした解析を行った。

(iii) R12/R24が受容体PrPに及ぼす影響の研究

細胞表面に繫留されたPrPにR12/R24を作用させて、その受容体能への影響を解析した。本実験は、神経生理学的な計測系を有している京大の森泰生教授・中尾章人助教との共同研究で行った。

(iv) ヒト生細胞中における核酸のin-cell NMRシグナルの検出

毒素タンパク質SLOを用いて核酸を導入したヒト生細胞をNMR試料管に入れ、核酸のNMRシグナルを検出する事を試みた。

4. 研究成果

(i) RNA分子R24及びR12-A-R12によるプリオンタンパク質(PrP)の有毒化の阻害の神経細胞を用いた検証

マウス神経細胞GT+FKを用いた解析によって、R24の添加によって異常型PrP(有毒)の生成が阻害される事を確認する事ができた。異常型PrPの生成を半分まで抑制するのに必要とされるR24の濃度(IC₅₀)は、97 nMであった()。以前の我々の研究でR12のIC₅₀は10 μMであったので()、R24はR12より100倍強い阻害活性を有する事が示された()。また、R12-A-R12に関してもR12より強い阻害活性が見出された。

(ii) R12-A-R12及びR24によるPrPの有毒化の阻害メカニズムの構造学的な解析による解明

R12-A-R12の立体構造をNMR法によって決定する事に成功した()。さらに、PrP中の核酸結合部位ペプチドとR12-A-R12の複合体に関するモデルを構築した(図1)。なおモデルの構築にあたっては、以前我々が決定した核酸結合部位ペプチドとR12の複合体の構造()を参考として用いた。核酸結合部位ペプチドとR12-A-R12の複合体モデルに基づいて、R12-A-R12及びR24が非常に高い阻害活性を有するメカニズムを合理的に説明する事ができた()。

(iii) R12/R24がPrPの受容体能に及ぼす影響の研究

R12がPrPの受容体能に及ぼす影響を調べた。影響を及ぼす事を示唆する結果が得られたが、試行数をさらに増やして再現性を検証する必要があると考えられた。

(iv) ヒト生細胞中における核酸のin-cell NMRシグナルの検出

ヒト生細胞に導入した核酸に由来するNMRシグナルを観測する事に、初めて成功した()。

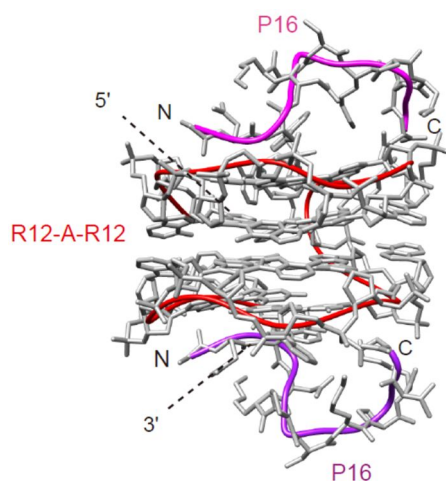


図 1 NMR 法に基づいて構築された PrP 中の核酸結合部位ペプチドと R12-A-R12 の複合体のモデル構造。

<引用文献>

Mashima, T., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2009) *Nucleic Acids Res.*, 37, 6249-6258. "Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein"

Mashima, T., Nishikawa, F., Kamatari, Y., Fujiwara, H., Saimura, M., Nagata, T., Kodaki, T., Nishikawa, S., Kuwata, K. and Katahira, M. (2013) *Nucleic Acids Res.*, 41, 1355-1362. "Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis"

Hayashi, T., Oshima, H., Mashima, T., Nagata, T., Katahira, M. and Kinoshita, M. (2014) *Nucleic Acids Res.*, 42, 6861-6875. "Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: Crucial importance of water entropy in molecular recognition"

Mashima, T., Lee, J.H., Kamatari, Y., Hayashi, T., Nagata, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Kinoshita, M., Kuwata, K. and Katahira, M. (2020) *Sci. Rep.*, 10, 4934. "Development and structural determination of an anti-PrP^C aptamer that blocks pathological conformational conversion of prion protein"

Yamaoki, Y., Kiyoshi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Nagata, T. and Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 2982-2985. "The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells"

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iida Mamiko, Mashima Tsukasa, Yamaoki Yudai, So Masatomo, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 286
2. 論文標題 The anti prion RNA aptamer R12 disrupts the Alzheimer's disease related complex between prion and amyloid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2355 ~ 2365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14819	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 Mashima Tsukasa, Lee Joon-Hwa, Kamatari Yuji O., Hayashi Tomohiko, Nagata Takashi, Nishikawa Fumiko, Nishikawa Satoshi, Kinoshita Masahiro, Kuwata Kazuo, Katahira Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 Development and structural determination of an anti-PrPC aptamer that blocks pathological conformational conversion of prion protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61966-4	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 該当する
1. 著者名 Wan Li, Kamba Keisuke, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 1864
2. 論文標題 An insight into the dependence of the deamination rate of human APOBEC3F on the length of single-stranded DNA, which is affected by the concentrations of APOBEC3F and single-stranded DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129346 ~ 129346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.04.011	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 Hayashi Tomohiko, Matsuda Tomoaki, Nagata Takashi, Katahira Masato, Kinoshita Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Mechanism of protein-RNA recognition: analysis based on the statistical mechanics of hydration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 9167 ~ 9180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CP00155C	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 Yamaoki Yudai, Kiyoshi Ayaka, Miyake Masayuki, Kano Fumi, Murata Masayuki, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2982 ~ 2985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cp05188c	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Katahira, M.
2. 発表標題 Unique quadruplex structure and anti-disease activity of RNA aptamer, and in-cell NMR of nucleic acids
3. 学会等名 The 21st Conference of International Society of Magnetic Resonance (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋司, Lee Joon-Hwa, 鎌足雄司, 林智彦, 永田;崇, 西川富美, 西川諭, 木下正弘, 桑田一夫, 片平正人
2. 発表標題 プリオンタンパク質の構造変換を抑制するRNA アプタマーの開発と構造決定
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真嶋司, Lee Joon-Hwa, 鎌足雄司, 林智彦, 永田;崇, 西川富美, 西川諭, 木下正弘, 桑田一夫, 片平正人
2. 発表標題 非常に高い活性を有する抗プリオンRNAアプタマーの構造機能相関
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Mashima, M. Iida, Y. Yamaoki, M. So, T. Nagata, M. Katahira
2. 発表標題 Disruption of the Alzheimer's disease-related complex between prion and amyloid b by an anti-prion aptamer
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Mashima, M. Iida, J.H. Lee, Y. Yamaoki, M. So, Y.O. Kamatari, T. Hayashi, M. Kinoshita, K. Kuwata, T. Nagata, M. Katahira
2. 発表標題 Development of anti-prion RNA aptamers and destruction of the Alzheimer's disease-related complex
3. 学会等名 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019(ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mashima, M., Joon-Hwa, L., Kamatari, Y. O., Hayashi, T., Nishikawa, F., Nagata, T., Nishikawa, S., Kinoshita, M., Kuwata, K. and Katahira, M.
2. 発表標題 Development of RNA Aptamer That Has High Anti-prion Activity and Its Structural Basis
3. 学会等名 Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

片平研究室 http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/
--

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

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