様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２１ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５２９１０１３

研究課題名（和文）プリオンの異常化とアミロイドβとの相互作用のＲＮＡアプタマーによる阻害の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis of prevention by RNA aptamer of transformation of prion protein and its interaction with Ab

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）　　14,100,000円

研究成果の概要（和文）：　アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβ蛋白質（Aβ）は、線維を形成する。近年プリオン蛋白質（PrP）がAβと相互作用する事が見出された。我々は、PrPに強く結合するRNAアプタマー（R12）を見出してきた。今回PrPがAβの線維化を阻害する事が分かった。一方R12を共存させるとAβは線維化する事が分かった。このようにAβの線維化をPrPとRNAアプタマーによって制御できる事が分かった。R12より活性が高いアプタマーを創製する事にも成功した。さらに本研究で培われた核酸の解析技術を生かして、クロスリンク核酸と金属結合核酸に関し、特異な立体構造と機能との相関に関する知見を得る事もできた。

研究成果の概要（英文）：The Ab protein, that is supposed to be responsible for the Alzheimer's disease, forms the fibril. Recently it was proposed that the prion protein serves as a receptor of the Ab protein. This time, we studied the effect of the prion protein and the RNA aptamer against the prion protein on fibril formation of the Ab protein. First, it was confirmed that the Ab protein forms the fibril. Secondary, it was revealed that the prion protein interferes with the fibril formation of the Ab protein. Thirdly, it was demonstrated that the RNA aptamer against the prion protein cancels the interfering effect of the prion protein and restores the fibril formation of the Ab protein. Additionally, the techniques developed to study the structure and interactions of nucleic acids such as the RNA aptamer were applied to other nucleic acids. Then, the correlation between the unique structure of the nucleic acids and their function were elucidated.

研究分野：構造生命科学

キーワード：Ab蛋白質　プリオン蛋白質　RNAアプタマー　機能性核酸　NMR

１．研究開始当初の背景

アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβ蛋白質（Aβ）は、線維を形成する。細胞表面において PrP^{C} は、オリゴマー化したアミロイドβタンパク質(Aβ)の受容体として機能し、アルツハイマー病の引き金となっている事が提唱された(Lauren et al., Nature, 457, 1128-1132, 2009)。一方我々は試験管内分子進化法によって、PrP^{C} に対して高い結合能(解離定数 10^{-8} M)を有する RNA アプタマー(R12)を得た。我々は R12 が PrP^{C} のどの部位に結合するのかを明らかにし、結合部位ペプチドと R12 の複合体の立体構造の決定に成功してきた。さらにプリオンタンパク質(PrP)の N 末側 110 残基(上記の結合部位を含む)と R12 の複合体の解析から、R12 は 2 量化し、各単量体が PrP 中の異なる２つの結合部位と同時に結合する事で高い結合が達成されているという新しいモデルを構築した。

２．研究の目的

アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβ蛋白質（Aβ）は、会合して可溶性のオリゴマーや、不溶性のアミロイド線維を形成する。近年、細胞膜上に繋留されているプリオン蛋白質（PrP）がAβオリゴマーの受容体として機能し、アルツハイマー病を引き起こす事が提唱された。我々は、PrPを高い親和性で認識するRNAアプタマー（R12）とPrPとの相互作用様式を明らかにしてきた。R12によって認識されるPrPのアミノ酸残基100番前後は、Aβオリゴマーとも相互作用する領域である。従って、Aβオリゴマーと競合的にPrPと結合するR12によって、PrPとAβオリゴマーの結合を阻害することが期待される。本研究では、PrPがAβの線維化に及ぼす影響およびその影響をR12によって妨害できるのかについて調べる事を目的とした。またR12よりもさらにPrP結合の高いアプタマー分子を創製する。さらにR12の解析で培った技術を、他の機能性核酸の構造ー機能相関の解析にも適用する。

３．研究の方法

アミロイド線維に結合して蛍光を発するチオフラビン S（ThS）を用いて、経時的に Aβの線維化反応を追跡した。Aβ単独の場合、Aβに PrP を加えた場合、さらに Aβに PrP と R12 を両方加えた場合の３通りについて、Aβの線維化反応を追跡した。

また R12 が２分子会合して形成する特異な立体構造とほぼ同一な立体構造を、一分子で形成する事ができる RNA 配列をデザインし、意図した立体構造を形成するのかを検証した。またデザインした分子が、PrP に対して高いアプタマー活性を有すのかを検証した。

さらにR12の研究で培われた核酸の構造解析の技術を生かす事で、クロスリンク核酸と金属結合核酸に関し、特異な立体構造と機能との相関に関する知見を得る事も試みた。

４．研究成果

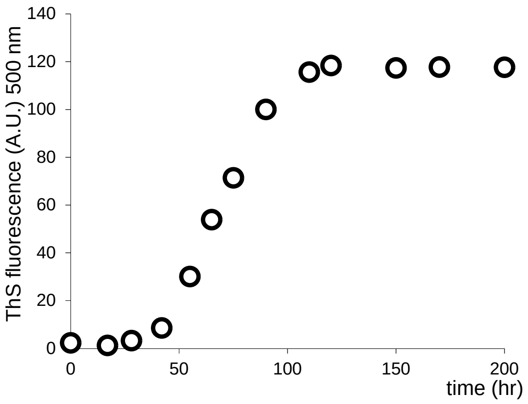
アミロイド線維に結合して蛍光を発するチオフラビンS（ThS）を用いて、経時的に線維化反応を追跡した。まずAβ単体では、時間変化に伴ってThSの蛍光強度の増加がみられ、Aβの線維化を確認した(図1(a))。一方で、AβとPrP共存下の場合、時間変化によるThSの蛍光強度の増加がみられなかった。これより、PrPがAβと相互作用してAβの線維化が阻害されたと考えられる(図1(b))。さらに、AβとPrPおよびR12共存下では、ThSの蛍光強度の増加がみられた(図1(c))。このことから、PrPの相互作用の相手がAβからR12となり、PrPから遊離したAβが線維化した事が示唆された。このようにAβの線維化は、PrP及びPrPに対するRNAアプタマーによって制御できる事が示された。今回得られた結果は、アルツハイマー病に対する薬剤の開発に向けた基盤となると期待される。

またR12が２分子会合して形成する特異な立体構造とほぼ同一な立体構造を、一分子で

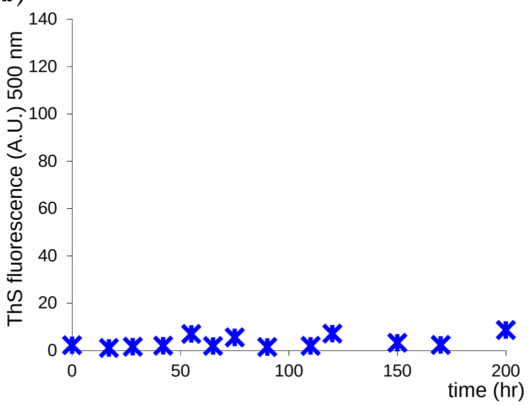
形成する事ができるRNA配列を見出す事に成功した。この配列からなるRNA分子は、PrPを捕捉・不活化する活性がR12よりも高い事が示された。

さらに本研究で培われた核酸の構造解析の技術を生かす事で、クロスリンク核酸と金属結合核酸に関し、特異な立体構造と機能との相関に関する知見を得る事もできた。

(a)



(b)



(c)

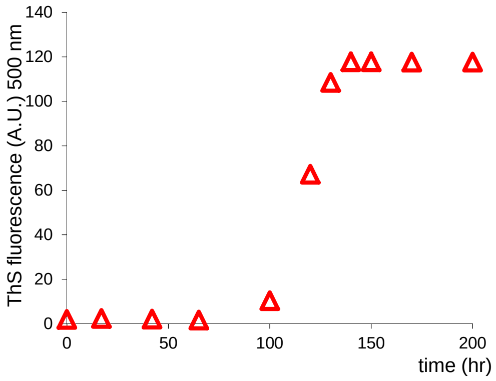


図１チオフラビンＳ（ThS）を用いたＡβの線維化の追跡.(a) Ａβのみ.(b) ＡβとPrP の共存下.(c) ＡβとPrP とR12の共存下.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４件）

①Kusano, S., Ishiyama, S., Lam, S. L., Mashima, T., Katahira, M., Miyamoto, K., Aida, M. and Nagatsugi, F. (2015) ***Nucleic Acids Res.***, 43, 7717-7730. "Crosslinking reactions of 4-amino-6-oxo-2-vinylpyrimidine with guanine derivatives and structural analysis of the adducts" 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkv797

②Takezawa, Y., Nishiyama, K., Mashima, T., Katahira, M. and Shionoya, M. (2015) ***Chem. Eur. J.***, 21, 14713-14716. "Bifacial base-pairing behaviors of 5-hydroxyuracil DNA bases both through hydrogen bonding and metal coordination" 査読有 DOI: 10.1002/chem.201502772

③Hayashi, 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" 査読有 DOI: 10.1093/nar/gku382

④Mashima, 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”査読有 DOI: 10.1093/nar/gks1132

〔学会発表〕（計　６件）

①飯田 真美子、真嶋 司、山置 佑大、永田 崇、片平 正人、 プリオン蛋白質とそれを標的とするRNA分子のＡβ;繊維化への影響、第１６回日本蛋白質科学会、2016年06月07日～2016年06月09日、福岡国際会議所（福岡市）

②Nagatsugi, F., Kusano, S., Ishiyama, S., Lam, S. L., Mashima, T. and Katahira, M., Development of the selective crosslinking reactions to 8-oxoguanine, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015.9.23-25, エグレット姫路（姫路）

③真嶋司, 西川富美子, 鎌足雄司, 永田崇, 西川諭, 桑田一夫, 片平正人、異常型プリオン蛋白質の産生を抑制する四重鎖核酸の構造解析、第９回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 09 月 10 日～2015 年 09 月 12 日、熊本大学（熊本市）

④Katahira, M., Real-time monitoring and switching of enzyme/aptamer activities, The 4th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR, 2015 年 02 月 04 日～2015
年 02 月 05 日, 理化学研究所（横浜市）

⑤Tsukasa Mashima, Fumiko Nishikawa, Yuji O. Kamatari, Masayuki Saimura, Takashi Nagata, Satoshi Nishikawa, Kazuo Kuwata, Masato Katahira, Origin of the anti-prion activity of quadruplex, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013, 2013 年 11 月 13 日～2013 年 11 月 15 日, 神奈川大学(横浜市)

⑥ Ayako Furukawa, Kenji Sugase, Ryo Morishita, Takashi Nagata, Akifumi, Takaori-Kondo, Akihide Ryo, Tsukasa Mashima, Fomiko Nishikawa, Satoshi, Nishikawa, Yuji Kamatari, Kazuo Kuwata, Masato Katahira, The deamination of APOBEC3G is controlled by the sliding-direction-dependent catalytic activity, and anti-prion activity of an RNA aptamer and its structual basis, The 10th Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, 2013 年 07 月 04 日,ソウル(韓国)

〔その他〕
ホームページ：

http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/

６．研究組織
(1)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

(2)連携研究者
永田　崇(NAGATA Takashi)
京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授
研究者番号：10415250

真嶋　司(MASHIMA Tsukasa)
京都大学・エネルギー理工学研究所・助教
研究者番号：20707426