

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840020

研究課題名(和文) 抗プリオン活性を有する四重鎖核酸の探索とそれらの作用機構に基づく分子設計

研究課題名(英文) Screening of quadruplex-forming anti-prion nucleic acids and molecular design on the basis of its mechanism

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウシの海綿状脳症(BSE)に代表されるプリオン病は、異常型プリオン蛋白質の蓄積が原因と考えられている。我々は四重鎖構造を形成する核酸分子の中から、プリオン感染細胞の異常型プリオン蛋白質の産生を抑制できるものを探索したところ、50%阻害濃度(IC50)100 nM程のRNA分子の発見に成功した。しかしこのRNA分子のNMRスペクトルは信号の分離が極めて悪く、立体構造の解析が困難であった。そこでこのRNA分子の配列の改変および溶液条件と調製方法の検討を行った。その結果、NMR信号がよく分離したRNA変異体を見出し、また測定における最適な溶液条件を確立した。

研究成果の概要(英文)：Prion diseases typified by the spongiform encephalopathy (BSE) are thought to be caused by the accumulation of abnormal form of prion protein (PrPSc). In this study, we have performed screening of the quadruplex-forming nucleic acids that reduce PrPSc levels in prion-infected cells. We have succeeded in obtaining an RNA molecule whose IC50 value is around 100 nM. Unfortunately, NMR spectra of this RNA were too complex to analyze on account of the poor dispersion of signals. Therefore, we carried out the modification of sequence of RNA and the investigation of optimal buffer condition for NMR measurement. As a result, we found a mutated RNA molecule showing good dispersion of NMR signals and also established the suitable buffer condition for NMR measurement.

研究分野：構造生物学

キーワード：アプタマー 四重鎖核酸 プリオン病 立体構造 NMR

1. 研究開始当初の背景

プリオン蛋白質はヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質と、シートに富む異常型プリオン蛋白質が存在し、正常型から異常型への構造遷移がプリオン病(ウシの狂牛病、羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病等)の原因と考えられている。現在プリオン病には根治できる治療法が無く、効果的な治療薬の開発が望まれている。

申請者等は、試験管内分子進化法によって、正常型プリオン蛋白質に高い親和性で結合する RNA アプタマー(配列 r(GGA GGA GGA GGA)、以後 R12)を得た。そして NMR 法による立体構造解析により、R12 が 2 量体化して四重鎖構造を形成することを明らかにした。さらに R12 と正常型プリオン蛋白質の相互作用様式を調べたところ、2 量化した R12 の各単量体が、正常型プリオン蛋白質における離れた 2ヶ所の結合部位と同時に結合することで、高い親和性をもたらすことを明らかにした。各結合部位における相互作用は、四重鎖構造による特異な位置に配置されたリン酸基と、4 つの塩基を提示する平面的な構造体が、それぞれ静電相互作用とスタッキング相互作用を担っており、四重鎖核酸の特異な立体構造こそが、高い親和性で正常型プリオン蛋白質と結合するのに重要であることを見出した。また恒常的に異常型プリオン蛋白質を産生する神経細胞へ R12 を添加すると、異常型プリオン蛋白質の産生量の減少が見られたことから、R12 は抗プリオン活性を持つことを見出した。

2. 研究の目的

これまでの研究により、四重鎖構造を形成する核酸は正常型プリオン蛋白質と高い親和性で結合し、抗プリオン活性を有する可能性を見出した。そこで R12 とは異なる配列・トポロジーで四重鎖構造を形成する DNA 及び RNA について抗プリオン活性を調べることで、R12 以上に高い抗プリオン活性を有する分子を取得できるのではないかとこの着想に至った。本研究では高い抗プリオン活性を持つ核酸分子を発見し、その活性のメカニズムを構造学的に明らかにすることを目指した。本研究成果が抗プリオン薬剤の開発の基盤となるとともに、近年注目されている核酸医薬の発展をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 抗プリオン活性の高い四重鎖核酸の探索

ヒトのプリオン病を感染させたマウスの神経由来の細胞 GT-FK 株は、恒常的に異常型プリオン蛋白質を産生する。これに四重鎖核酸を添加後、培養し、細胞抽出液中の異常型プリオン蛋白質の量を測定することで、四重鎖核酸の抗プリオン活性を評価する。

(2) 得られた四重鎖核酸の構造研究

研究の方法(1)によって見出した抗プリオン活性の高い核酸分子について、各種 NMR スペクトルを測定する。スペクトルの質が悪い場合は、溶液の緩衝液の種類と pH、塩の種類と濃度、また界面活性剤の添加等によって、改善を図る。

(3) 得られた四重鎖核酸の配列の改変

後述する研究成果(2)の通り、抗プリオン活性の高い四重鎖核酸の立体構造は多型であり、溶液条件を検討しても立体構造を 1 系にすることはできなかった。そこで、単一のコンホメーションで存在する変異体の取得を試みた。核酸分子の抗プリオン活性への影響が少ないと考えられる残基、例えば配列の末端へ数残基の付加や、適切な位置へのリンカー残基の挿入などを施した変異体を調製する。調製した変異体について NMR スペクトルを測定し、シグナルの本数やシグナルの分離の良さを指標として、コンホメーションの多型性を評価する。

4. 研究成果

(1) 抗プリオン活性の高い RNA 分子の発見

細胞実験によるスクリーニングの結果、抗プリオン活性の非常に高い 24 残基の RNA 分子(配列 r(GGA GGA GGA GGA GGA GGA GGA GGA)、以後 R24)を見出した。R12 は細胞培養液中の濃度 10 μ M で異常型プリオン蛋白質を 50% まで減少させたのに対し、R24 は同濃度で 9% まで減少させた。さらに R24 の 50% 阻害濃度(IC50)を算出したところ、100 nM 程であり、非常に強い抗プリオン活性を示した。

(2) R24 の測定条件の検討

R24 は 16 個のグアニン残基を有する。よって R24 が単量体かつ単一のコンホメーションで存在している場合、グアニンのイミノプロトンに由来する共鳴線が 16 本観測される。しかし実際に測定した R24 の NMR スペクトルは、16 本よりも遥かに多いグアニンのイミノプロトンに由来する共鳴線を示した(図中の a)。これは R24 の立体構造に多型性があり、各コンホメーションのシグナルが同時に観測されたためであると考えられる。R24 を溶解する溶液について様々な条件を検討したが、R24 の立体構造を 1 系にすることはできなかった。そこで、研究の方法(3)の通りに、単一のコンホメーションで存在する R24 変異体の取得を試みた。

(3) R24 変異体の獲得

研究の方法(3)の戦略に則って作製した変異体について、NMR スペクトルを測定した(図)。図中の(a)は R24、(b)から(d)はそれぞれ R24 変異体であり、グアニンのイミノプロトンが観測される領域を示している。各 RNA はいずれも 16 個のグアニン残基を有しているため、単一のコンホメーションで存在して

いる場合、16本の共鳴線が観測される。しかし(a)から(c)は共鳴線の個数がグアニン残基数より多かった。これは、(a)から(c)のRNA分子が多型で存在することを示唆している。一方、図中の(d)は他と比べてシグナルの分離がよく、イミノプロトンの共鳴線の数も概ねR24変異体を構成するグアニン残基数と一致しており、単一のコンホメーションで存在することを示唆している。(d)のR24変異体について溶液条件を検討し、NMR法による構造解析が可能なレベルのスペクトルを取得することに成功した。

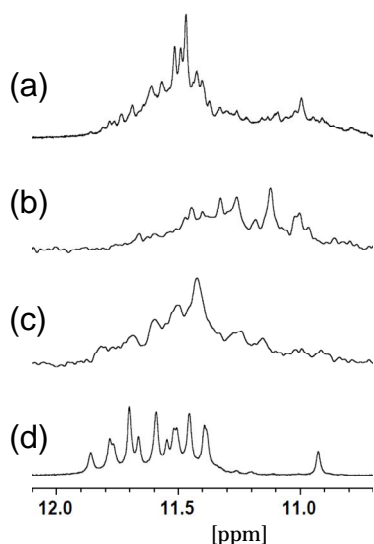


図 R24 及びその変異体の ^1H NMR スペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

全て査読有り

Masuda, K., Mashima, T., Kishimoto, T. 他(15人中10番目) "Arid5a regulates naive CD4⁺ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA" *Journal of Experimental Medicine*, 213, 605-619, 2016, doi: 10.1084/jem.20151289

Yoneda, R., Mashima, T., Kurokawa, R. 他(7人中3番目) "The binding specificity of translocated in liposarcoma/fused in sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1" *Cell and Bioscience*, 6, 4, 2016, doi: 10.1186/s13578-016-0068-8

Yamaoki, Y., Mashima, T., Katahira, M. 他(4人中3番目) "K⁺-responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment" *Biochemical and biophysical research communications*, 468, 27-31, 2015, doi:

10.1016/j.bbrc.2015.10.173

Takezawa, Y., Mashima, T., Shionoya, M. 他(5人中3番目) "Bifacial Base-Pairing Behaviors of 5-Hydroxyuracil DNA Bases Both through Hydrogen Bonding and Metal Coordination" *Chem. Eur. J.*, 21, 14713-14716, 2015, doi: 10.1084/jem.20151289

Kusano, S., Mashima, T., Nagatsugi, F. 他(8人中4番目) "Crosslinking reactions of 4-amino-6-oxo-2-vinylpyrimidine with guanine derivatives and structural analysis of the adducts" *Nucleic Acids Res.*, 43, 7717-7730, 2015, doi: 10.1093/nar/gkv797

Yamaoki, Y., Mashima, T., Katahira, M. 他(4人中2番目) "Boosting of activity enhancement of K⁺-responsive quadruplex hammerhead ribozyme" *Chem. Commun.*, 51, 5898-5901, 2015, doi: 10.1039/C5CC00961H

Hayashi, Mashima, T., Kinoshita, M. 他(6人中3番目) "Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: Crucial importance of water entropy in molecular recognition" *Nucleic Acids Res.*, 42, 6861-6875, 2014, doi: 10.1093/nar/gku382

[学会発表](計 12件)

Nagatsugi, F., Mashima, T. 他(5人中6番目) "Development of the selective crosslinking reactions to 8-oxoguanine" The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015.9.23-25, 姫路

Kondo, K., Mashima, T., Katahira, M. 他(6人中2番目) "NMR study of the recognition of non-coding RNA and DNA by TLS/FUS, a key regulator of cyclin D1" The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015.9.23-25, 姫路

真嶋 司, 片平 正人 他(7人中1番目) "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, 2015.9.10-12, 熊本

山置 佑大, 真嶋 司, 片平 正人 他(4人中2番目) "カリウムイオンを認識して活性がスイッチングする Tat 結合 RNA アプタマーおよびハンマーヘッドリボザイムの創製" 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015.9.10-12, 熊本

近藤 敬子, 真嶋 司, 片平 正人 他(6人中

2 番目) “転写抑制やテロメア短縮を引き起こす TLS/FUS と長鎖非コード RNA および DNA との結合の構造基盤” 第 17 回 RNA ミーティング, 2015.7.15-17, 札幌

Yamaoki, Y., Mashima, T., Katahira, M. 他(4 人中 2 番目) “Creation of novel Tat-binding aptamer and ribozyme whose activities switch on in response to K⁺ via quadruplex formation” The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014.11.5-7, 福岡

Kanba, K., Mashima, T., Katahira, M. 他(9 人中 2 番目) “Real-time NMR monitoring of enzymatic reaction of anti-HIV protein, structure of anti-prion RNA aptamer and wood biomass analysis” The 5th Japan-Taiwan NMR symposium, 2014.9.29-30, 北海道

近藤 敬子, 真嶋 司, 片平 正人 他(6 人中 2 番目) “CCND1 転写抑制とテロメア短縮をもたらす TLS/FUS による非コード RNA と DNA 認識機構の NMR 法による解明” 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014.11.25-27, 神奈川

真嶋 司, 片平 正人 他(7 人中 1 番目) “Screening for novel aptamer against prion protein and its structural study.” 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014.9.25-27, 北海道

山置 佑大, 真嶋 司, 片平 正人 他(4 人中 2 番目) “Development of Tat-binding aptamer and ribozyme which switch their activities in response to K⁺” 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014.9.25-27, 北海道

山置 佑大, 真嶋 司, 片平 正人 他(4 人中 2 番目) “カリウムイオンを感知して自らの活性をスイッチングする Tat 捕捉アプタマーおよびリボザイムの創製” 第 16 回日本 RNA 学会年会, 2014.7.23-25, 愛知

近藤 敬子, 真嶋 司, 片平 正人 他(6 人中 2 番目) “CCND1 転写抑制とテロメア短縮に關与する天然変性蛋白質 TLS/FUS による非コード RNA と DNA の認識機構の NMR 法による解明” 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25-27, 神奈川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし