

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21477

研究課題名(和文) A 受容体であるプリオン蛋白質をRNAで阻害する事による抗アルツハイマー病効果

研究課題名(英文) Anti-Alzheimer's disease effect by inhibition of prion protein which is an Ab receptor by RNA

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の表面にアンカリングされたプリオン蛋白質(PrP)は、オリゴマー化したアミロイド(A β)蛋白質の受容体として機能し、アルツハイマー病と密接に関連するA β オリゴマーの病理性シグナルを細胞内に伝達する事が報告された。本研究ではPrPに高い親和性で結合するRNA分子(RNAアプタマー)を用い、これによってPrPをマスクする事でPrPが受容体として機能できないようにし、A β オリゴマーの病理性シグナルが細胞内に伝達するのを阻害する事を、京都大学工学研究科の森泰生教授・中尾章人助教との共同研究により試みた。その結果、RNAアプタマーがPrPの受容体としての働きを阻害する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイド(A β)蛋白質の病理性シグナルが、細胞表面の受容体であるプリオンタンパク質を介して細胞内に伝達される事を、プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーによって遮断できる事が示唆されたことは、アルツハイマー病の治療に向けた新たな基盤となる可能性を有する新知見であり、学術的及び社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：It was reported that prion protein (PrP) functions as a receptor of oligomerized amyloid b protein (Ab), which is related to Alzheimers's disease, and transmits a pathological signal into cells. We attempted to mask PrP by an RNA aptamer toward PrP and thus block the transmission of the pathological signal. Collaborative study with Professors Mori and Nakao, Kyoto University, implied that the RNA aptamer could repress the transmission of the signal.

研究分野：生物物理化学

キーワード：アルツハイマー病 プリオン蛋白質 アミロイド RNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

応募者はプリオン蛋白質(PrP)に高い親和性を有する RNA 分子(RNA アプタマー)を探索・取得し、これを用いて PrP が正常型から異常型に遷移するのを阻害する事で、プリオン病の治療を目指す研究を行ってきた。その結果、有望な RNA アプタマーの取得に成功し(片平他, 2013, *Nucleic Acids Res.*; 片平他, 2014, *Nucleic Acids Res.*)、その後の研究によってより活性が高い RNA アプタマーの探索・取得にも成功しつつあった。

しかし PrP がアミロイド (A)オリゴマーの受容体として機能し、アルツハイマー病に関連した A オリゴマーの病因性シグナルを細胞内に伝達している事が報告され(Lauren 等, *Nature*, 2009)、応募者のこれまでの研究にはもう一つ別の重要な意義がある事に気付いた。即ち、上記の RNA アプタマーによって PrP と A オリゴマーの間の蛋白質 - 蛋白質相互作用を阻害すれば、A オリゴマーの病因性シグナルの細胞内への伝達を遮断でき、アルツハイマー病の治療に役立つ可能性があると思いついた。

このアイデアの有効性を実証する第一歩として、PrP と A オリゴマーの間の蛋白質 - 蛋白質相互作用を RNA アプタマーが本当に阻害できるのかを、まず *in vitro* で物理化学的な実験で検証する事とした。その結果、RNA アプタマーは確かに期待した効果を *in vitro* で発揮できる事を示せた(片平他, *FEBS J.*, 2019)。この結果に力を得て、本研究では海馬切片を用いた電気生理学的な実験で、我々のアイデアの有効性の検証を行う事とした。生体の系に近いここでもポジティブな結果が得られれば、アルツハイマー病の治療へ応用という事が現実味を帯びてくる。

2. 研究の目的

神経細胞の表面にアンカリングされたプリオン蛋白質(PrP)は、オリゴマー化したアミロイド (A)蛋白質の受容体として機能し、アルツハイマー病と密接に関連する A オリゴマーの病因性シグナルを細胞内に伝達する事が報告された(Lauren 等, *Nature*, 2009)。PrP に対する抗体で PrP をマスクして受容体として機能できないようにすると、A オリゴマーの病因性シグナルは、細胞内に伝達されない事も報告された。本研究では抗体ではなく、PrP に高い親和性で結合する RNA 分子(RNA アプタマー)を用い、これによって PrP をマスクする事で PrP が受容体として機能できないようにし、A オリゴマーの病因性シグナルが細胞内に伝達するのを阻害する事を試みる。本研究は、PrP と A オリゴマー間の蛋白質 - 蛋白質相互作用を RNA 分子によって阻害する事で、アルツハイマー病の治療に向けた新たな道筋を拓く事に挑戦するものである。

また、上記の戦略には PrP に高い親和性で結合する RNA アプタマーの探索・獲得が必須である。これまでに既にこのような RNA アプタマーを獲得する事に成功しているが、獲得した RNA アプタマーよりさらに高い親和性を示す RNA アプタマーの探索・獲得も並行して行う。より高性能の RNA アプタマーの獲得に成功した場合は、その立体構造を NMR 法によって決定する。得られた立体構造に基づいて、高い結合能がもたらされているメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) プリオン蛋白質(PrP)に高い親和性を示す RNA 分子の探索・取得

正常型の PrP に高い親和性を有し、これにより PrP が異常型に遷移する事を阻害する活性(抗プリオン活性)が生細胞において確認された RNA 分子(RNA アプタマー)を応募者は見出した。この RNA アプタマーの塩基配列をベースにして、より高い活性を有する事が期待される RNA アプタマーの塩基配列をデザインした。具体的には、二つの RNA アプタマーを連結して一つの RNA 分子にする事で、PrP に結合した際の安定化のエネルギーを 2 倍にして、結合能の飛躍的な上昇を目指した。さらに、二つの RNA アプタマーを連結する際に、アプタマー間にいくつかの残基を挿入した。これによって、PrP に結合した際に二つのアプタマー間に生じるテンションを解消する事を目指した。このようにして新たにデザインした RNA アプタマーの活性をアッセイし、その結果を塩基配列のデザインにフィードバックする。これを繰り返す事で、抗プリオン活性が高い RNA 分子を探索・取得する事を行った。

(2) 正常な電気生理学的なシグナルのアミロイド (A)オリゴマーによる消失とその RNA アプタマーによる復活の検証

細胞表面の PrP によって A オリゴマーの病因性シグナルが細胞内に伝達されると、正常な電気生理学的なシグナルが消失する事が、海馬切片を用いた解析から示された。一方あらかじめ PrP に対する抗体を作用させると、正常な電気生理学的なシグナルは消失しなかった(共に上記の Lauren 等の論文)。そこで第一に海馬切片を A オリゴマーとプレインキュベートし、正常な電気生理学的なシグナルの消失が再現するかを検証する。第二に海馬切片をまず初めに RNA ア

プタマーとプレインキュベートし、次に A オリゴマーとプレインキュベートした場合には、正常な電気生理学的なシグナルの消失を免れるのかを調べる。

上記(2)の第二の実験は、PrP を先に RNA アプタマーでマスクしておく事で、PrP が A オリゴマーと相互作用する事を阻害して正常な電気生理学的なシグナルの消失を免れる事を目指すものである。抗体がこの効果を発揮できる事が、先述の論文で示されている。

(1)は、片平が研究協力者である山置博士研究員、永田崇准教授及び研究補助員と協力して行った。(2)は片平と山置が、研究協力者である京大工学研究科の森泰生教授・中尾章人助教と協力して行った。

4. 研究成果

(1) これまでに得ていた RNA アプタマーの塩基配列を基にして、これよりはるかに高い抗プリオン活性を示す RNA 分子を取得する事に成功した。従来の RNA アプタマーと比較して、抗プリオン活性は 100 倍程度向上した。次にこの RNA アプタマーの立体構造を NMR 法によって決定した。得られた立体構造に基づいて、プリオンタンパク質中の RNA アプタマー結合部位ペプチドとの複合体の立体構造のモデリングを行った。これによって、今回得られた RNA アプタマーと PrP との結合様式・相互作用様式の推定が可能となり、高い抗プリオン活性が発揮される理由を説明する事ができた。

上記の核酸アプタマーは 4 重鎖構造を形成するが、4 重鎖構造を形成する核酸分子一般の構造機能相関を解析する為に、複製に関与するタンパク質 ORC1 と 4 重鎖構造を形成する核酸分子との相互作用の解析も行った。ORC1 は、2 重鎖構造を形成する核酸分子よりも、4 重鎖構造を形成する核酸分子により強く結合する事が、蛍光異方性を用いた実験によって示された。4 重鎖構造のどの部位が、ORC1 との特異的な相互作用に関与しているのかも、NMR のケミカルシフトパーティーション法により決定された。これをプリオンタンパク質と 4 重鎖構造を形成する核酸アプタマーとの相互作用様式と比較したところ、4 重鎖を形成する核酸分子とタンパク質との相互作用様式には、共通項がある事が示唆された。

(2) 細胞表面の PrP によって A オリゴマーの病理性シグナルが細胞内に伝達されると、正常な電気生理学的なシグナルが消失する事が、海馬切片を用いた解析から示された。一方あらかじめ PrP に対する抗体を作用させると、正常な電気生理学的なシグナルは消失しない事が報告されている(Lauren et al., 2009)。そこで、京都大学工学研究科の森泰生教授・中尾章人助教との共同研究で、海馬切片をまず初めに RNA アプタマーとプレインキュベートし、次に A オリゴマーとプレインキュベートしたところ、正常な電気生理学的なシグナルの消失を免れる事が示唆された。これは、A オリゴマーの病理性シグナルが受容体であるプリオンタンパク質を介して細胞内に伝達される事を、RNA アプタマーによってブロックできる可能性を示すものである。即ち上述した PrP に対する抗体が示した機能を、RNA アプタマーも発揮できる事を示唆する実験結果である。これは、アルツハイマー病の治療法の開発に向けた新たな基盤となり得る知見である。

参考文献

Lauren et al., Nature, 457, 1128-1132, 2009.

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 4件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Eladl Afaf, Yamaoki Yudai, Hoshina Shoko, Horinouchi Haruka, Kondo Keiko, Waga Shou, Nagata Takashi, Katahira Masato | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Investigation of the Interaction of Human Origin Recognition Complex Subunit 1 with G-Quadruplex DNAs of Human c-myc Promoter and Telomere Regions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 3481 ~ 3481 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073481 | 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 該当する |
| 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 Hamad Nesreen, Watanabe Hiroki, Uchihashi Takayuki, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Direct visualization of the conformational change of FUS/TLS upon binding to promoter-associated non-coding RNA | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 9134 ~ 9137 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC03776A | 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, Nagata Takashi, Kondo Keiko, Sakamoto Tomoki, Takami Shohei, Katahira Masato | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Shedding light on the base-pair opening dynamics of nucleic acids in living human cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 7143 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34822-4 | 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 Eladl Omar, Yamaoki Yudai, Kondo Keiko, Nagata Takashi, Katahira Masato | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Detection of interaction between an RNA aptamer and its target compound in living human cells using 2D in-cell NMR | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 102 ~ 105 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CC05576G | 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 該当する |

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katahira, M. |
| 2. 発表標題 Quadruplex RNA aptamers with anti-disease activities and in-cell NMR of nucleic acids |
| 3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 片平正人 |
| 2. 発表標題 RNA アプタマーの構造・抗プリオン活性・抗アミロイド 活性及びヒト細胞中における核酸の in-cell NMR |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Eladl, A., Yamaoki, Y., Hoshina, S., Horinouchi, H., Kondo, K., Waga, S., Nagata, T. and Katahira, M. |
| 2. 発表標題 Study of the interaction between human origin recognition complex subunit 1 and G-quadruplex forming nucleic acids |
| 3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Waga, S., Yamaoki, Y., Eladl, A., Hoshina, S., Horinouchi, H., Kondo, K., Nagata, T. and Katahira, M. |
| 2. 発表標題 Human origin recognition complex subunit 1 bound to DNAs that form G-quadruplex structures |
| 3. 学会等名 The 12th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 片平正人 |
| 2. 発表標題 抗プリオン病・抗アルツハイマー病効果が期待されるRNA分子の構造・機能研究とin-cell NMR |
| 3. 学会等名 日本分光学会NMR分光部会集中講義 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 片平正人 |
| 2. 発表標題 試験管内及び生細胞内におけるRNAの構造と塩基対の開閉挙動の解析 |
| 3. 学会等名 よこはまNMR第69回ワークショップ「RNA構造とNMR」 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 森 泰生 (Mori Yasuo) | | |
| 研究協力者 | 中尾 章人 (Nakao Akito) | | |
| 研究協力者 | 山置 佑大 (Yamaoki Yudai) | | |
| 研究協力者 | 永田 崇 (Nagata Takashi) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |