

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370047

研究課題名（和文） A1蛋白質-テロメア-テロメラーゼ 3者複合体の構造解析と  
テロメラーゼ阻害法の開発研究課題名（英文） Structural analysis of A1 protein-telomere-telomerase complex,  
and development of inhibition of telomerase

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

研究成果の概要（和文）：A1 タンパク質と同じ RRM 型に属する Musashi タンパク質に関し、標的 RNA との複合体の立体構造を、ロングレンジの構造情報を活かす事で決定する事に成功した。この手法で A1 蛋白質-テロメア-テロメラーゼ 3者複合体の構造解析を行った結果、A1 タンパク質はテロメア DNA とテロメラーゼ RNA をブリッジしている事が分かった。これより A1 はテロメラーゼをテロメア DNA までリクルートする働きを持つ事が示唆された。さらにデコイ核酸によるテロメラーゼ阻害戦略の有効性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have determined the structure of the Musashi-target RNA binary complex with the assist of long-range structural information. With the same assist, the structure of the A1 protein-telomere DNA-telomerase RNA ternary complex has been analyzed. It has been shown that A1 works as a bridge between telomere DNA and telomerase RNA. This suggests that A1 functions to bring telomerase to telomere DNA. The strategy to inhibit telomerase with decoy nucleic acids has also been suggested to be promising.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：テロメア、テロメラーゼ、A1タンパク質、癌、デコイ

## 1. 研究開始当初の背景

正常細胞においては、末端複製問題の為に DNA は複製・分裂の度に短小化する。この為細胞の分裂可能な回数には限りがある。一方癌細胞においては、染色体末端のテロメア DNA を伸長する酵素であるテロメラーゼの活性が、異常に亢進している。この為に本来細胞の分裂の度に生じるテロメア DNA の短小化

が生ぜず、細胞は無制限に分裂・増殖し、様々な障害を引き起こす。テロメラーゼの活性を阻害できれば、癌の治療につながると考えられている。これまでにテロメラーゼに直接作用する阻害剤の開発が、アカデミアと製薬メーカーの双方で国内外において行なわれてきたが、成功に至っていない。

これに替わる戦略として、以下の

ようなものがあり得る。我々は A1 タンパク質が存在して初めて、テロメレーズの活性の発現が十分に引き起こされる事を示した。即ちテロメレーズの活性の発現は、A1 タンパク質の働きによって支えられている。そこでまず A1 タンパク質のこの働きの仕組みを、解明する。次にそれを逆手にとって、A1 タンパク質がテロメレーズの活性の発現を支えるのを妨害する手法を開発すれば、結果的にテロメレーズの活性を阻害できる事に思い至った。

A1 タンパク質がテロメレーズの活性の発現を引き起こすメカニズムに関して、申請者等は世界に先駆けた成果を挙げてきている。染色体の最末端のテロメア DNA は相補鎖を有しない 1 本鎖であるが、生理的なイオン条件下においては、テロメア DNA は 4 重鎖構造を形成し易い。4 重鎖構造が形成されてしまうと、テロメレーズはテロメア DNA にアクセスできなくなり、その伸長を行う事ができない。我々はテロメア DNA が形成した 4 重鎖構造を、A1 タンパク質が 1 本鎖状態にアンフォールドする事を世界で初めて見出した。そしてこの効果によってテロメレーズの活性の発現が引き起こされる事を提唱した。アンフォールドによって活性の発現が引き起こされる事は、その後他の研究者の研究によっても支持されている。

## 2. 研究の目的

まず A1 タンパク質と同じ RRM 型の類縁タンパク質である Musashi を用いて、ロングレンジの構造情報を NMR 法によって取得する為の方法論の確立を行う。次に確立された方法論を用いて、A1 タンパク質-テロメア DNA-テロメレーズ RNA の 3 者複合体における相互作用様式を解明する。さらにおとりの核酸(デコイ核酸)が A1 タンパク質に及ぼす効果を検証する。

以上によって、A1 タンパク質を介したテロメレーズ阻害というストラテジーの有効性を見極める。

## 3. 研究の方法

Musashi タンパク質とその標的 RNA の複合体に関し、常磁性緩和促進(PRE)と残余双極子結合(RDC)を用いてロングレンジの構造情報を取得する。これに NOE から得られるショートレンジの距離情報を合わせる事で、複合体の構造と相互作用様式を解明する。

上記で確立された方法論を、A1 タンパク質-テロメア DNA-テロメレーズ RNA の 3 者複合体に適用し、3 者複合体における相互作用に関する構造的な基盤を獲得する。

おとりの核酸(デコイ核酸)が A1 タンパク質に及ぼす影響を、競合を通して検証する。

## 4. 研究成果

テロメレーズは、テロメア DNA に作用してこれを伸長する事で癌の原因となっている。本研究では A1 タンパク質-テロメア DNA-テロメレーズ RNA の複合体における相互作用様式を、NMR 法によって構造的な見地から解析し、A1 タンパク質がテロメレーズの活性の発現を引き起こしている仕組みに迫った。

常磁性緩和促進及び残余双極子結合を用いたロングレンジの構造情報の取得に関しては、A1 タンパク質と同じ RRM 型の類縁タンパク質である Musashi を用いて方法論の確立を行った。NOE から得られるショートレンジの構造情報に、これらの情報を加味する事で、Musashi タンパク質とその標的 RNA の複合体の立体構造を決定する事に成功した。RNA のグアニン塩基を、タンパク質の 2 つのフェニルアラニン環が両側からサンドイッチする事で認識するという新しい分子認識様式が見出された。さらに同タンパク質がいかんして 4 残基ないしは 3 残基からなる特定の塩基配列を特異的に認識するのかに関し、そのメカニズムが明らかになった。

A1 タンパク質-テロメア DNA-テロメレーズ RNA の複合体に関し、ショートレンジの構造情報とケミカルシフトパータベーションから得られた情報に、ロングレンジの構造情報を加味して総合的な考察を行った。その結果 A1 タンパク質の 2 つの RRM 型ドメインの内、片方がテロメア DNA と結合し、同時にもう片方がテロメレーズ RNA と結合する事が構造的に可能であり、実際にそのような相互作用様式をとっている事が強く示唆された。即ち A1 タンパク質はテロメア DNA をアンフォールドする事に加え、その 2 つの核酸結合ドメインを用いてテロメア DNA とテロメレーズの両者と同時に結合し、両者をブリッジする事で、テロメア DNA のところまでテロメレーズをリクルートする効果も有する事が示唆された。

標的配列に近い親和性を有する別の核酸を添加すると、タンパク質の奪い合いが生じて、本来の相互作用が妨害される事も実験的に確認された。

以上より、おとりの核酸(デコイ核酸)により A1 タンパク質の働きを妨害する事によってテロメレーズの活性の発現を阻害し、この事によって癌治療を目指すというストラテジーは有望であると考えられた。

## 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 12 件)

(1) Ohyama, T., Nagata, T., Tsuda, K., Kobayashi, N., Imai, T., Okano, H., Yamazaki, T. and

- Katahira, M. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3218-3231. "Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: The role of aromatic stacking interactions", doi:10.1093/nar/gkr1139, 査読有.
- (2) Nagata, T., Sakurai, Y., Hara, Y., Mashima, T. and Katahira, M. (2012) *FEBS J.*, **279**, 1456-1463. "Intelligent ribozyme that switches its activity in response to K<sup>+</sup> through quadruplex formation", doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08538.x, 査読有.
- (3) Takeda, M., Kondo, K., Ymamada, M., Sumikawa, M., Koizumi, J., Mashima, T. and Katahira, M. (2012) *Internat. J. Biol. Macromol.*, **50**, 236-244. "Presence of alternating glucosaminoglycan in the sheath of *Thiothrix nivea*", doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.10.024, 査読有.
- (4) Nakano, S., Mashima, T., Matsugami, A., Inoue, M., Katahira, M. and Morii, T. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4567-4579. "Structural aspects for the recognition of ATP by ribonucleopeptide receptors", DOI: 10.1021/ja110725d, 査読有.
- (5) Sugiyama, R., Nishitsuji, H., Furukawa, A., Katahira, M., Habu, Y., Takeuchi, H., Ryo, A. and Takaku, H. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 10051-10057. "Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G", doi: 10.1074/jbc.M110.166108, 査読有.
- (6) Kondo, K., Takeda, M., Ejima, W., Kawasaki, Y., Umezumi, T., Yamada, M., Koizumi, J., Mashima, T., and Katahira, M. (2011) *Internat. J. Biol. Macromol.*, **48**, 256-262. "Study of a novel glycoconjugate, thiopeptidoglycan, and a novel polysaccharide lyase, thiopeptidoglycan lyase", doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.11.009, 査読有.
- (7) Nagata, T., Niyada, E., Fujimoto, N., Nagasaki, Y., Noto, K., Miyanoiri, Y., Murata, J., Hiratsuka, K. and Katahira, M. (2010) *Proteins*, **78**, 3033-3047. "Solution structures of the trihelix DNA-binding domains of the wild-type and a phosphomimetic mutant of *Arabidopsis* GT-1, implying a mechanism for an increase in DNA-binding affinity through phosphorylation", DOI: 10.1002/prot.22827 査読有.
- (8) Takeda, M., Kondo, K., Yamada, M., Koizumi, J., Mashima, T., Matsugami, A. and Katahira, M. (2010) *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 206-211. "Solubilization and structural determination of a glycoconjugate which is assembled into the sheath of *Leptothrix cholodnii*", doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.12.006, 査読有.
- (9) Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2009) *EMBO J.*, **28**, 440-451. "Structure, interaction, and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G", doi:10.1038/emboj.2008.290, 査読有.
- (10) 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", doi: 10.1093/nar/gkp647, 査読有.
- (11) Sannohe, Y., Sato, K., Matsugami, A., Shinohara, K., Mashimo, T., Katahira, M. and Sugiyama, H. (2009) *Bioorg. Medici. Chem.*, **17**, 1870-1875. "The orientation of the ends of G-quadruplex structures investigated using end-extended oligonucleotides", doi:10.1016/j.bmc.2009.01.051, 査読有.
- (12) Nishikawa, F., Murakami, K., Matsugami, A., Katahira, M. and Nishikawa, S. (2009) *Oligonucleotides*, **19**, 179-190. "Structural studies of an RNA aptamer containing GGA repeats under ionic conditions using microchip electrophoresis, circular dichroism and 1D-NMR", doi:10.1089/oli.2008.0167, 査読有.
- [学会発表] (計 26 件)
- (1) Furukawa, A., Mashima, T., Sugase, K., Fujiwara, H., Nagata, T., Morishita, R., Ryo, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Kamatari, Y., Kuwata, K. and Katahira, M. (2012) Korea-Japan Bilateral NMR Symposium, "Sliding-direction-dependent activity of anti-HIV enzyme, and structural basis of anti-prion activity of RNA aptamer", 2012/3/16, Sapporo.
- (2) Nishimura, H., Kozawa, Y., Okamura, H., Watanabe, T. and Katahira, M. (2012) Korea-Japan Bilateral NMR Symposium, "Towards evaluation of wood cell wall structures and those biodegradation using solution NMR", 2012/3/16, Sapporo.
- (3) Mashima, T., Fujiwara, H., Nishikawa, F.,

- Saimura, M., Kamatari, Y., Kuwata, K., Imamura, M., Yokoyama, T., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2012) Korea-Japan Bilateral NMR Symposium, "Recognition of prion protein by the RNA aptamer", 2012/3/16, Sapporo.
- (4) Mashima, T., Fujiwara, H., Koshida, T., Saimura, M., Imamura, M., Yokoyama, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2011) The 16th annual meeting of the RNA society, "Structural basis of the high affinity of the RNA aptamer against prion protein", 2011/6/14-18, Kyoto.
- (5) Iwaoka, R., Furukawa, A., Okamura, H. and Katahira, M. (2011) 3<sup>rd</sup> G-COE International Symposium –Zero Carbon Energy 2011-, "Elucidation of functions on APOBEC3DE and APOBEC3F based on structure-oriented analysis", 2011/8/18-19, 水原.
- (6) Nagata, T., Sakurai, Y., Mashima, T. and Katahira, M. (2011) The 38<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, "r(GGA)<sub>4</sub> chimeric ribozyme switches its activity in response to K<sup>+</sup> via quadruplex formation", 2011/11/9-11, Sapporo.
- (7) Nishimura, H., Furukawa, A., Okamura, H., Kozawa, Y., Morishita, R., Ryo, A., Sugase, K., Watanabe, T. and Katahira, M. (2011) The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, "Base-deamination rate dependent on the direction of sliding of an enzyme along DNA as revealed by numerical analysis of NMR data, and wood biomass studied by solution NMR", 2011/11/15-18, Yokohama.
- (8) Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Ryo, A., Takaori, A. and Katahira, M. (2011) The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, "Real-time monitoring of the cytidine deamination along single-stranded DNA by an anti-HIV factor, APOBEC3G", 2011/11/15-18, Yokohama.
- (9) Furukawa, A., Mashima, T., Matsugami, A., Nagata, T., Sugiyama, R., Takaku, H., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) International Symposium of Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology -Structural Biology and Drug Discovery-, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure of the RNA aptamer against prion protein", 2010/5/17-19, Seoul.
- (10) Mashima, T., Furukawa, A., Nagata, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) XXIV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure and interaction of the RNA aptamer against prion protein", 2010/8/22-27, Cairns.
- (11) Mashima, T., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, "Structure and interaction of an RNA aptamer with potential therapeutic use", 2010/12/15-20, Hawaii.
- (12) Mashima, T., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, "Unique quadruplex structure and interaction of r(GGAGGAGGAGGA) with protein" , 2010/12/15-20, Hawaii.
- (13) Furukawa, A., Mashima, T., Nagata, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) The 10<sup>th</sup> KIAS Conference on Protein Structure and Function, "Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure and interaction of the RNA aptamer against prion protein", 2010/9/30-10/2, Seoul.
- (14) Furukawa, A., Nagata, T., Morishita, R., Iwaoka, R. and Katahira, M. (2010) Korea-Japan Bilateral NMR Symposium, "The real-time monitoring of the enzymatic reaction of an anti-HIV factor APOBEC3G",
- (15) Furukawa, A., Nagata, T., Morishita, R., Iwaoka, R. and Katahira, M. (2010) XXIV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, "The real-time monitoring of the enzymatic reaction of an anti-HIV factor APOBEC3G", 2010/8/22-27, Cairns.
- (16) Iwaoka, R., Furukawa, A. and Katahira, M. (2010) The 2<sup>nd</sup> International Symposium of Kyoto University Global COE Program –Zero Carbon Energy Kyoto 2010-, "The analysis of the mechanism of an enzyme reaction toward the development of new

- energy systems”, 2010/8/19-20, Kyoto.
- (17) Mashima, T., Koshida, T., Saimura, M., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2010) The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, “Structure and interaction of RNA aptamer against prion protein in complex with the partial binding peptide”, 2010/11/10-12, Yokohama.
- (18) Nagata, T., Niyada, E., Fujimoto, N., Nagasaki, Y., Noto, K., Miyanoiri, Y., Murata, J., Hiratsuka, K. and Katahira, M. (2010) The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, “A mechanism for a increase in DNA-binding affinity of the trihelix DNA-binding domain via its phosphorylation” 2010/11/10-12, Yokohama.
- (19) Nakano, S., Mashima, T., Tainaka, K., Katahira, M. and Morii, T. (2010) The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, “Structural aspects of the fluorescence intensity changes of the ATP-binding ribonucleopeptide sensor” 2010/11/10-12, Yokohama.
- (20) Yoshioka, K., Daidai, M., Katahira, M. and Watanabe, T. (2010) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, “Linkage analysis of lignin for lignocellulosic biorefinery”, 2010/12/15-20, Hawaii.
- (21) Furukawa, A., Mashima, T., Nagata, T., Takaku, H., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2009) The 3<sup>rd</sup> Asia-Pacific NMR Symposium, “Real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G possessing anti-HIV activity, and the structure of the RNA aptamer against prion”, 2009/11/15-18, Cheju.
- (22) Furukawa, A., Nagata, T., Sugiyama, R., Takaku, H. and Katahira, M. (2009) The 3<sup>rd</sup> Asia-Pacific NMR Symposium, “Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which possesses anti-HIV activity”, 2009/10/25-28, Cheju.
- (23) Mashima, T., Matsugami, A., Nakano, S., Inoue, M., Fukuda, M., Morii, T. and Katahira, M. (2009) The 6<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, “Structural analysis of ribonucleopeptide aptamer against ATP”, 2009/11/4-6, Gifu.
- (24) Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Kobayashi, N., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2009) The 6<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, “Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity”, 2009/11/4-6, Gifu.
- (25) Nakano, S., Fukuda, M., Mashima, T., Katahira, M. and Morii, T. (2009) The 6<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, “Structural aspects for the function of ATP-binding ribonucleopeptide receptors”, 2009/11/4-6, Gifu.
- (26) Mashima, T., Matsugami, A., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Katahira, M. (2009) Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19<sup>th</sup> Antisense Symposium, “Unique quadruplex structure and interaction of the RNA aptamer against bovine prion protein”, 2009/11/4-6, Fukuoka.

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) Katahira, M. and Mashima, T. (2012) Encyclopedia of Biophysics, “Introduction to Nucleic Acids NMR”, Springer, in press.
- (2) 片平正人、日本化学会編・CSJ カレントレビュー “核酸化学のニュートレンドー DNA・RNA の新たな可能性を開く” (分担)、化学同人、Vol. 6、pp. 36-40 (2011) “論文にみる最重要概念と革新実験データ ”

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称 : Nucleic Acid-Enzyme Complex  
 発明者 : 片平正人  
 権利者 : 横浜国立大学長 飯田嘉宏  
 種類 : 特許  
 番号 : 7910721  
 取得年月日 : 23年3月10日  
 国内外の別 : 国外(米国)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/a-13\\_j.html](http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/a-13_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片平 正人 (KATAHIRA MASATO)

京都大学・エネルギー工学研究所・教授

研究者番号：70211844

(2) 研究分担者

永田 崇 (NAGATA TAKASHI)

京都大学・エネルギー工学研究所・助教

研究者番号：10415250