

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	真嶋 司
論文題目	The structural analysis of RNA aptamer against prion protein and its anti-prion activity (プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの構造解析とその抗プリオン活性)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの立体構造と相互作用様式の解析及び同アプタマーの抗プリオン活性の解析に関する結果をまとめたもので、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、RNAアプタマーとプリオンタンパク質とはどのようなものなのかについて、まず説明がなされている。RNAアプタマーとは特定の分子に対して高い親和性を示すRNA分子である事、そしてこの特性を生かして分子センサー、核酸医薬等に応用されている事が述べられている。またプリオンタンパク質は通常は正常型構造をとるが、これが異常型構造に遷移するとウシの狂牛病、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病等のプリオン病を引き起こす事が説明されている。次にプリオンタンパク質に対するRNAアプタマーが最近取得され、r(GGAGGAGGAGGA)という配列の12残基からなるRNA分子(以下R12とする)である事が述べられている。そしてこのR12の立体構造と相互作用様式を決定する事で、プリオンタンパク質に対して高い親和性を示す仕組みを解明するという本研究の目的が述べられている。さらに本研究ではこのR12の抗プリオン活性を生細胞系を用いてアッセイし、核酸医薬としての応用に向けた基盤とする事が述べられている。</p> <p>第2章では、R12の単体の立体構造をNMR法によって決定した結果が述べられている。R12はグアニン塩基4個からなるテトラッド構造と、グアニン塩基4個とアデニン塩基2個からなるヘキサッド構造を分子内で形成した特異な4重鎖構造をとる事を明らかにしている。また溶液中において強固な2量体構造を形成する事も明らかにしている。</p> <p>第3章では、R12とプリオンタンパク質の相互作用様式を、NMR法と生化学・分子生物学的手法によって解析した結果が述べられている。まずプリオンタンパク質には、2つのR12結合部位(以下P1及びP16とする)が存在する事を電気泳動法により明らかにしている。P1とP16は共に、3個のリジン残基と1個のトリプトファン残基を有している事が述べられている。次にNMR法を用いた複合体の立体構造の解析から、R12のリン酸基とP1及びP16の各3個合計6個のリジン残基の間に静電相互作用がある事を明らかにしている。またR12のグアニン塩基とプリオンタンパク質のトリプトファン残基の間にはスタッキング相互作用がある事も明らかにしている。さらに2量化したR12は片方の単量体においてP1と、他方の単量体においてP16と同時に結合する事を明らかにしている。以上より、2量化したR12はプリオンタンパク質中の2か所と同時に結合する事で安定化のエネルギーを2倍獲得し、これによって結合定数が2乗分増大し、高い結合能を有するに至っている事を明らかにしている。</p> <p>第4章では、R12の抗プリオン活性を、生細胞を用いて検証した結果が述べられている。R12はプリオンタンパク質に強く結合する事でタンパク質の構造を安定化し、病気を引</p>			

き起す異常型構造への遷移を阻害し、結果的に抗プリオン活性を示す事が期待される事が述べられている。実際に異常型プリオンタンパク質を産生する細胞に R12 を添加すると、異常型の産生が阻害される事を明らかにしている。即ち R12 は期待通り抗プリオン活性を示す事を明らかにしている。

第 5 章では、総括として、本論文で得られた成果について要約している。

以上本論文では RNA アプタマーが、いかにして標的タンパク質に非常に高い親和性で結合するのかを、RNA アプタマー単体及び標的タンパク質との複合体の立体構造・相互作用解析に基づいて明らかにしている。さらにこの高い結合能によるタンパク質の構造の安定化によって、病気を引き起こす異常型構造への遷移を食い止める事ができる事を、生細胞を用いた系によって明らかにしている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの立体構造と相互作用様式の解析及び同アプタマーの抗プリオン活性の解析に関する結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 狂牛病等を引き起こすプリオンタンパク質に対して高い親和性で結合するRNAアプタマー(r(GGAGGAGGAGGA))という配列の12残基からなるRNA分子、以下R12とする)の立体構造をNMR法によって決定する事に成功した。R12はグアニン塩基4個からなるテトラッド構造と、グアニン塩基4個とアデニン塩基2個からなるヘキサッド構造を分子内で形成した特異な4重鎖構造をとる事を明らかにした。また溶液中において強固な2量体構造を形成する事も明らかにした。
2. R12とプリオンタンパク質の相互作用様式の決定に成功した。まずプリオンタンパク質には、2つのR12結合部位(以下P1及びP16とする)が存在する事を明らかにした。次にNMR法を用いた複合体の立体構造の解析から、R12のリン酸基とP1及びP16の各3個合計6個のリジン残基の間に静電相互作用がある事を明らかにした。またR12のグアニン塩基とプリオンタンパク質のトリプトファン残基の間にはスタッキング相互作用がある事も明らかにした。さらに2量化したR12は片方の単量体においてP1と、他方の単量体においてP16と同時に結合する事を明らかにした。以上より、2量化したR12はプリオンタンパク質中の2か所と同時に結合する事で安定化のエネルギーを2倍獲得し、これによって結合定数が2乗分増大し、高い結合能を有するに至っている事を明らかにした。
3. 異常型プリオンタンパク質を産生する細胞にR12を添加すると、異常型の産生が阻害される事を明らかにした。即ちR12はプリオンタンパク質に強く結合する事でタンパク質の構造を安定化し、病気を引き起す異常型構造への遷移を阻害し、結果的に抗プリオン活性を示す事を明らかにした。

以上本論文は、RNAアプタマーがいかにして標的タンパク質に非常に高い親和性で結合するのかを、立体構造と相互作用様式の解析に基づいて明らかにした。さらにRNAアプタマーがタンパク質の活性を制御できる事を、生細胞を用いた系によって実証した。RNAアプタマーによるタンパク質の活性の制御の実現とその構造学的な基盤を確立した成果は、学術上、實際上、寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成24年12月21日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降