

平成30年6月9日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18485

研究課題名(和文) 転写抑制とテロメア長短縮に寄与するTLS蛋白質-非コード核酸相互作用の解析

研究課題名(英文) NMR analysis of interaction between TLS and non-coding DNA and RNA, that is involved in the regulation of transcription and telomere lengthening

研究代表者

近藤 敬子 (Kondo, Keiko)

京都大学・エネルギー理工学研究所・研究員

研究者番号：00707474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCyclin D1遺伝子の転写制御に関わる非コードRNA (lncRNA)の Translocated in liposarcomaタンパク質 (TLS)結合領域について、その二次構造をNMR法により決定した。さらに、TLSのRGG3ドメインがlncRNAの一本鎖領域に結合することを明らかにした。一方で、テロメア長制御に関わるTLSとテロメアDNAおよびTERRAの結合に関して、結合に関与する残基をNMR法によって同定した。これにより、RGG3ドメインのTyr残基とPhe残基が状況に応じて結合対象を切り替えることで、効率的な複合体形成がもたらされるというモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：Translocated liposarcoma protein (TLS) plays important role in the regulation of cyclin D1 (CCND1) transcription and telomere lengthening. In the regulation of CCND1, long non-coding RNA (lncRNA) that is transcribed from upstream of CCND1 interacts with TLS. We determined secondary structure of TLS-binding motif in the lncRNA. NMR study showed that RGG3 domain of TLS interacts with single-stranded region of lncRNA. In the regulation of telomere lengthening, RGG3 recognizes G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA to form ternary complex. We identified guanine residues involved in the interaction with RGG3. Furthermore, Triple-resonance NMR experiments showed that both Phe and Tyr residues can interact with both telomeric DNA and TERRA. However, in the ternary complex, Phe and Tyr residues prefer to interact with telomeric DNA and TERRA, respectively. We proposed that the plastic roles of Phe and Tyr residues are important for efficient formation of the ternary complex.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR TLS/FUS タンパク質-核酸相互作用

1. 研究開始当初の背景

核酸結合タンパク質として知られる Translocated in liposarcoma (TLS)は発ガン性融合蛋白質として1993年に見出された。このタンパク質は主に細胞核内に局在し、核酸への結合を介して転写調節やゲノム維持等の種々の制御機構に関与している。TLSの核酸結合領域はC末端側に集中しており、RNA認識モチーフ (RRM)、Znフィンガードメイン (ZnF)、および天然変性領域である3つのArg-Gly-Glyドメイン (RGG1、2、および3)で構成されている。本研究ではTLSが関与する下記2種の制御機構に着目した。

(1) Cyclin D1 遺伝子 (*CCND1*)の転写調節

*CCND1*の転写はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)であるCBP/p300によるヒストンのアセチル化によって促進される。DNAが損傷を受けた際には、*CCND1*遺伝子上流から長鎖非コードRNA (lncRNA)が転写される。TLSはlncRNAと結合することで*CCND1*のプロモーター領域に繫留され、CBP/p300のHAT活性を阻害する。これによって*CCND1*の転写が抑制される (図1)。TLSはGGU配列やGGUG配列を含むRNAに結合しやすいことが報告されていた。さらに、*CCND1*の転写制御において生理活性を持つlncRNAの配列からもこれらの配列を持ち、かつTLSに強く結合する領域が見出されていた。しかし、TLSの核酸結合領域の内、RGG2-ZnF-RGG3の領域がlncRNAとの結合に重要であることは示唆されていたものの、lncRNAのTLS結合領域の二次構造や、TLSとの結合様式は調べられていなかった。

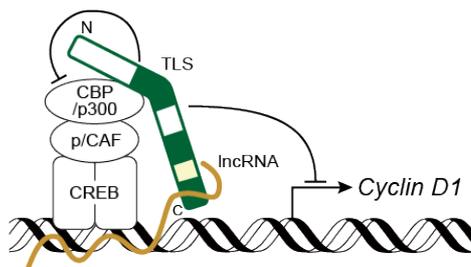


図1 lncRNAとTLSの結合を介した*CCND1*の転写抑制

(2) テロメア長制御

テロメアの伸長にはテロメラーゼによる機構の他に、テロメアDNAの相同組み換えによる機構が存在する。TLSは相同組み換えによるテロメア伸長を阻害することで、テロメア短縮をもたらすことが報告されていた。その機構は下記のように考えられている。テロメアDNA、およびテロメアDNAから転写されるRNA (TERRA)はグアニン残基間の相互作用によってグアニン四重鎖構造を形成可能である (図2)。TLSはテロメアDNAとTERRAの2種のグアニン四重鎖をそれぞれ個別に認識して三者複合体を作る。複合体中のTLSがヒストン修飾酵素をリクルートすることで、テ

ロメアのヘテロクロマチン化を促進し、その結果、相同組み換えによるテロメア伸長が抑制される (図3)。グアニン四重鎖構造の認識を担うのはTLSのRGG3ドメインであることが既に分かっていたが、詳細な結合様式は明らかにされていなかった。

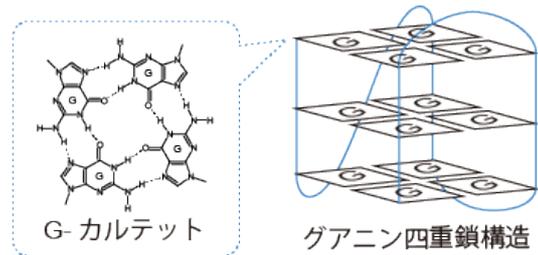


図2 グアニン四重鎖の模式図

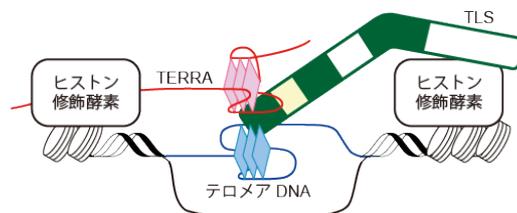


図3 テロメアDNAやTERRAとTLSの結合を介したヒストン修飾酵素のリクルート

2. 研究の目的

本研究では、*CCND1*の転写制御に関与するTLSとlncRNAの結合に関して、その結合様式をNMR法によって解析し、lncRNA結合によるTLSの活性制御機構に関する構造学的知見を得ることを目的とした。

他方で、テロメア長短縮をもたらすTLSとテロメアDNAおよびTERRAの複合体に関して、複合体の構造をNMR法によって解析することで、TLSによるテロメアDNAおよびTERRAのグアニン四重鎖構造認識の機構、ひいてはテロメア長制御におけるTLSの役割についての構造学的知見を得ることをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) *CCND1*の転写調節

lncRNAから見出されたTLS結合領域について、NOESYスペクトルを測定して二次構造を解析した。続いてTLSのRGG3ドメインの大腸菌による大量調製法を確立した。決定したTLS結合領域の二次構造に基づいて、TLS結合領域を2つの領域に分割し、それぞれに対してRGG3を添加して、化学シフト摂動法によりRGG3の認識部位を同定した。

(2) テロメア長制御

テロメアDNAとTERRAのグアニン四重鎖に対してそれぞれRGG3を添加し、化学シフト摂動法によりRGG3との結合に関与するグアニン残基を同定した。続いて、RGG3の¹³C、¹⁵N-標識体を調製し、各種多次元NMR測定を行い、

主鎖のシグナル帰属を行った。次に RGG3-テロメア DNA 二者複合体、RGG3-TERRA 二者複合体、および RGG3-テロメア DNA-TERRA 三者複合体を調製した。これらの複合体についても多次元 NMR 測定を行い、複合体中の RGG3 の主鎖のシグナル帰属を試みた。しかし、複合体形成によって NMR シグナルが一部不明瞭化したため、完全なシグナル帰属は不可能であった。そこで、RGG3 の N 末端側のみからなる低分子量のコンストラクト (RGG3NterY) を作成し、RGG3NterY とテロメア DNA や TERRA の複合体についても同様にシグナル帰属を行った。以上の帰属結果を用いて、RGG3 あるいは RGG3NterY の化学シフト摂動法によりテロメア DNA や TERRA との結合に関与するアミノ酸残基を同定した。

4. 研究成果

(1) CCND1 の転写調節

lncRNA から見出された TLS 結合領域の二次構造を NOESY スペクトルによって解析した結果、当該領域は 3 側がステムループ構造をとり、5 側は一本鎖であることが判明した (図 4)。



図 4 lncRNA の TLS 結合領域の二次構造

当時、lncRNA との結合を担うのは TLS の RGG2-ZnF-RGG3 の領域であることが示されていた。しかし、lncRNA の TLS 結合領域に対して RGG3 を添加する NMR 滴定実験を行ったところ、RGG3 のみでも TLS 結合領域に対する結合能を持つことが判明した。そこで RGG2-ZnF-RGG3 および RGG3 の TLS 結合領域に対する結合をプルダウンアッセイによって調べたところ、RGG3 単独でも十分な親和性を持つことが示された。そのため、以後は RGG3 に着目した研究を進めた。申請者らは TLS の RGG3 が GGUG 配列を持つ他の RNA の G-U 塩基対近傍に結合するという予備的知見を得ていたため、RGG3 は lncRNA の TLS 結合領域のステムループ部分に結合すると予想した。そこで、TLS 結合領域を 3 側のステムループ領域と 5 側の一本鎖領域に分割し、それぞれに対して RGG3 の NMR 滴定実験を行い、RGG3 の結合する領域を同定した。その結果、予想に反して RGG3 は 3 側のステムループ領域よりも 5 側の一本鎖領域に強く結合することが明らかになった。

(2) テロメア長制御

テロメア DNA あるいは TERRA のグアニン四重鎖に対して RGG3 を添加する NMR 滴定実験

を行い、グアニンのイミノプロトンの化学シフト摂動から RGG3 との相互作用に関わるグアニン残基を同定した (図 5)。

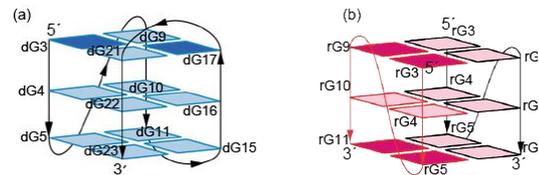


図 5 テロメア DNA (a) および TERRA (b) のグアニン四重鎖構造、および RGG3 の結合に関わる残基 (濃色部)

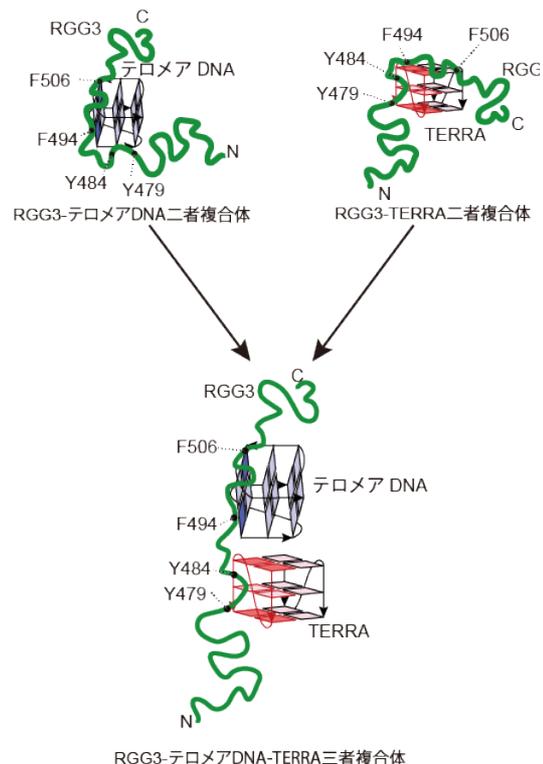


図 6 RGG3、テロメア DNA および TERRA の複合体形成モデル

続いて RGG3 単体、RGG3-テロメア DNA 二者複合体、RGG3-TERRA 二者複合体、および RGG3-テロメア DNA-TERRA 三者複合体における RGG3 の主鎖のシグナル帰属を行った。しかし、複合体形成に伴う分子量増加の為に NMR シグナルが広幅化し、完全な帰属は困難であった。そのため、より低分子量のコンストラクトである RGG3NterY を調製して、テロメア DNA や TERRA との複合体の NMR 測定を行ったところ、NMR シグナルの改善が見られた。そこで、RGG3 の N 末端側の残基については、RGG3NterY を使用した複合体の帰属結果を踏まえて再度帰属を行った。

RGG3 とテロメア DNA あるいは TERRA の二者複合体形成時の化学シフト摂動より、テロメア DNA と TERRA のどちらに対しても Phe 残基と Tyr 残基、およびその周囲のアミノ酸残基が結合に関与することが判明した。さらに、これらの二者複合体に三者目の分子を加えて三者複合体を形成した際には、Phe 残基が

テロメア DNA、Tyr 残基が TERRA に優先的に結合することを明らかにした。すなわち、RGG3-テロメア DNA 二者複合体に TERRA が加わって三者複合体が形成される際には Tyr 残基、RGG3-TERRA 二者複合体にテロメア DNA が加わって三者複合体となる際には Phe 残基の結合相手が変わる。以上の結果に基づき、Phe 残基と Tyr 残基の柔軟な結合対象の切り替えによって効率的に三者複合体の形成がなされるというモデルを提案した(図 6)。

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 2 件)

Ryoma Yoneda, Shiho Suzuki, Tsukasa Mashima, Keiko Kondo, Takashi Nagata, Masato Katahira, and Riki Kurokawa, The binding specificity of translocated in liposarcoma/Fused in sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1, *Cell Biosci.*, 査読有, 6, 2016, 4, doi: 10.1186/s13578-016-0068-8.

Keiko Kondo, Tsukasa Mashima, Takanori Oyoshi, Ryota Yagi, Riki Kurokawa, Naohiro Kobayashi, Takashi Nagata, and Masato Katahira, Plastic roles of phenylalanine and tyrosine residues of TLS/FUS in complex formation with the G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA, *Sci. Rep.*, 査読有, 8, 2018, 2864, doi: 10.1038/s41598-018-21142-1.

[学会発表](計 11 件)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、黒川 理樹、永田 崇、片平 正人、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 回日本 RNA 学会年会 (北海道、ホテルライフオー ト札幌)、2015 年 7 月 15-17 日(口頭発表)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、黒川 理樹、永田 崇、片平 正人、NMR study of the recognition of non-coding RNA and DNA by TLS/FUS, a key regulator of cyclin D1 transcription and telomere shortening、第 42 回国際核酸化学シンポジウム (兵庫、あいめっせホール)、2015 年 9 月 23-25 日(ポスター発表)

真嶋 司、小澤 駿介、近藤 敬子、永田 崇、黒川 理樹、片平 正人、Cyclin D1 転写抑制を担う TLS/FUS タンパク質と非コード RNA の相互作用の NMR 法による解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会 (福岡、福岡国際会議場)、2016 年 6 月 7-9 日 (ポスター発表)

Tsukasa Mashima, Keiko Kondo, Takanori Oyoshi, Ryoma Yoneda, Riki Kurokawa, Takashi Nagata, Masato Katahira, NMR analysis of the recognition of non-coding RNA and DNA by TLS/FUS which causes transcriptional repression of cyclin D1 and telomere shortening, The 21th annual meeting of the RNA Society (京都、京都国際会館)、2016 年 6 月 28 日-7 月 2 日 (ポスター発表)

Keiko Kondo, Tsukasa Mashima, Takanori Oyoshi, Ryoma Yoneda, Riki Kurokawa, Takashi Nagata, Masato Katahira, NMR studies of non-coding RNA and DNA recognition by TLS/FUS which induces transcriptional repression of cyclin D1 and telomere shortening, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (京都、京都国際会館)、2016 年 8 月 21-26 日 (ポスター発表)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、米田 竜馬、黒川 理樹、永田 崇、片平 正人、Non-coding RNA/DNA recognition by TLS/FUS that causes repression of cyclin D1 transcription and telomere elongation, 第 43 回国際核酸化学シンポジウム (熊本、熊本大学工学部百周年記念館)、2016 年 9 月 27-29 日 (口頭発表)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、米田 竜馬、黒川 理樹、永田 崇、片平 正人、Cyclin D1 遺伝子転写制御やテロメア長制御に関わる TLS/FUS タンパク質と非コード核酸間の相互作用の NMR 法による解析、第 43 回国際核酸化学シンポジウム (広島、広島国際会議場)、2016 年 11 月 16-18 日 (ポスター発表)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、永田 崇、片平 正人、三者複合体形成によってテロメア短縮をもたらす TLS/FUS のテロメア DNA および TERRA 認識機構に関する NMR 解析、第 39 回分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜)、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター発表)

真嶋 司、小澤 駿介、近藤 敬子、Nesreen Hamad、米田 竜馬、黒川 理樹、永田 崇、黒川 理樹、片平 正人、非コード RNA と結合して cyclin D1 転写を抑制する TLS/FUS の RNA 認識機構の構造学的基盤、第 39 回分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜)、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (ポスター発表)

Keiko Kondo, Tsukasa Mashima, Takanori Oyoshi, Ryoma Yoneda, Riki Kurokawa, Takashi Nagata, Masato Katahira, NMR study for the recognition of non-coding RNA and

DNA by TLS/FUS, a key regulator of the transcriptional repression of cyclin D1 and telomere shortening、International Symposium for NMR of Nucleic Acids (韓国、Gyeongsang National university)、2017年1月17日(口頭発表)

近藤 敬子、真嶋 司、大吉 崇文、黒川 理樹、小林 直宏、永田 崇、片平 正人、NMR studies for the complex of TLS/FUS protein and G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA, which induces telomere shortening、第43回国際核酸化学シンポジウム(熊本、熊本大学)、2017年9月19-21日(口頭発表)

〔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〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 敬子 (Kondo, Keiko)

京都大学・エネルギー理工学研究所・研究員

研究者番号：00707474

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし