

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05930

研究課題名(和文) グアニン四重鎖によるヌクレオソーム構造制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of nucleosome structure regulated by G-quadruplex

研究代表者

大吉 崇文 (Oyoshi, Takanori)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：80406529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン四重鎖(G4)結合タンパク質であるTLS/FUSは、アルギニン-グリシン-グリシン繰り返し領域(RGG領域)依存的にテロメアに結合してヘテロクロマチン化することで、テロメアからの転写を抑制することがわかった。さらに、このRGG領域の二次構造とG4結合性との関係を調べた結果、 β -スパイラル構造依存的にG4に結合することがわかった。さらに、G4結合タンパク質中のRGG領域とRRM領域のG4結合性と構造制御の機構を調べた結果、RGG領域中のフェニルアラニンはG4結合性とG4の安定化に寄与しており、RRM領域はG4構造の5'と3'末端の1本鎖に結合して、G4構造を安定化させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報を有するDNAやRNAは、単純な1本鎖や典型的な右巻き二本鎖構造だけでなく、細胞内でさまざまな局所構造を形成している。特に、染色体末端構造のテロメアや特定の遺伝子のグアニン塩基が豊富なDNAは、グアニン四重鎖構造を形成して、現代の高齢化社会で問題になっているガンや神経性疾患に関与することが知られている。本研究では、このような疾患に関与しているグアニン四重鎖に結合するタンパク質の機能と構造的特徴、さらにグアニン四重鎖認識機構を明らかにした。これらの結果は、グアニン四重鎖に関わる疾患機構の解明につながるだけでなく、グアニン四重鎖構造を標的とする薬剤の開発に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplex (G4) binding protein, TLS/FUS, led to trimethylation of histone H4 at lysine 20 at the heterochromatin of telomeres and downregulation of transcription of telomeric repeat-containing RNA. To investigate the effect of structure of the arginine-glycine-glycine repeat (RGG) domain in TLS/FUS for G4 binding, we analyzed the G4 binding activities of proteins purified in a buffer with high concentrations of urea and KCl to disrupt the β -spiral structure of RGG domain. It reveals that the G4-specific binding abilities of TLS/FUS require β -spiral structure formation of RGG domain. Furthermore, we investigated the effect of the RNA recognition motif (RRM) and RGG domain of nucleolin on G4 binding and formation. Our findings indicate that Phe in RGG domain is responsible for G4 binding and folding. Moreover, RRM potentially binds to a guanine-rich single strand and folds the G4 with a 5'-terminal and 3'-terminal single strand containing guanine.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：グアニン四重鎖 ヌクレオソーム テロメア ヒストン修飾 RGG領域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝情報を有する DNA や RNA は、単純な 1 本鎖や典型的な右巻き二本鎖構造だけでなく、細胞内でさまざまな局所構造を形成している。特に、染色体末端構造のテロメアや特定の遺伝子のグアニン塩基が豊富な DNA や RNA は、グアニン四重鎖構造を形成して、細胞の寿命やガン、神経性疾患に関わることが知られている。

(2) テロメア DNA とそこから転写された TERRA (Telomeric repeat-containing RNA) が形成するグアニン四重鎖が、グアニン四重鎖結合タンパク質である TLS (Translocated in liposarcoma) / FUS (Fused in sarcoma) と結合して、テロメア長を短縮されることを我々はすでに報告している¹。

(3) TLS/FUS 中のアルギニン-グリシン-グリシン繰り返しから成る約 100 アミノ酸の領域が、グアニン四重鎖構造に結合することがわかった。特に、この領域内のフェニルアラニンとチロシンがそれぞれグアニン四重鎖 DNA と RNA の結合に関与する²。

2. 研究の目的

(1) 細胞内のグアニン四重鎖構造によるヌクレオソーム構造の制御機構を解明して、グアニン四重鎖による新たな転写制御機構を明らかにする。

(2) グアニン四重鎖結合タンパク質はどのような機構でグアニン四重鎖に結合して、グアニン四重鎖の構造と機能を制御するのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内におけるヒストン修飾を調べるために、DNA クロマチン免疫沈降 (DNA chIP) 法を用いた。特にヒストン H4 の 20 番目のトリメチル化されたリシンに対する抗体によって検出した。この時、TLS/FUS の影響を調べるために、TLS/FUS に対する siRNA を用いて、発現を抑制した。

(2) 実験に用いたタンパク質は、タグとしてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合させて大腸菌で大量発現させ、GST により精製した。実際、解析に用いたタンパク質は GST を切断した。タンパク質を変性させるときは、尿素もしくは塩化ナトリウムを緩衝液に加えて精製した。

(3) タンパク質内のどの領域がグアニン四重鎖結合性に関与しているのか、またそれぞれどのような二次構造を形成しているのか調べるために、RGG 領域を含む各領域を欠損させたり、特定のアミノ酸を変異させたタンパク質を設計した。

(4) タンパク質の核酸結合性はゲルシフトアッセイ法によって解析した。調べたい核酸の末端を放射線ラベル化して、タンパク質との結合性はポリアクリルアミドゲルによって解析した。

(5) 円二色性分散計によってタンパク質の二次構造を調べた。

4. 研究成果

(1) グアニン四重鎖 (G4) 結合タンパク質である TLS/FUS は、アルギニン-グリシン-グリシン繰り返し領域 (RGG 領域) 依存的にテロメアに結合してヘテロクロマチン化することで、テロメアからの転写を抑制した。

(2) TLS/FUS の RGG 領域の二次構造と G4 結合性との関係を調べた結果、 β -スパイラル構造依存的に G4 に結合した³。

(3) TLS/FUS の RGG 領域が形成する β -ターンからなる β -スパイラル構造は、RGG 領域内の N 末端領域であるプロリン豊富な領域と、C 末端領域であるアルギニン豊富な領域によって安定化されている(図 1)^{3,4}。

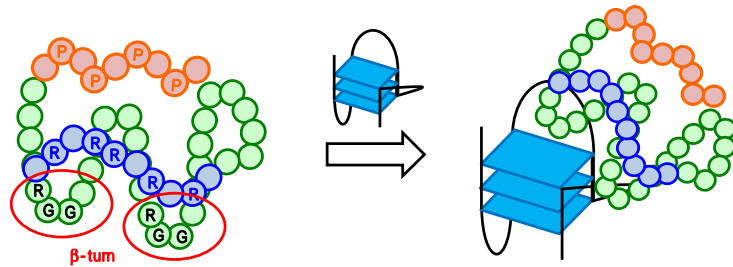


図 1 TLS/FUS の RGG 領域が形成する β -ターン

(4) グアニン四重鎖結合タンパク質である Nucleolin の RGG 領域は、その領域内のフェニルアラニンがグアニン四重鎖に対する結合性に重要であり、かつグアニン四重鎖の安定化に重要である(図 2)⁵。

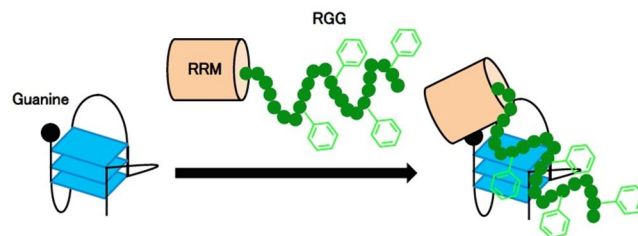


図 2 Nucleolin の G4 結合モデル図

(5) Nucleolin の RRM 領域は、グアニン四重鎖の 5' と 3' 末端にあるグアニン豊富な 1 本鎖 DNA に結合して、グアニン四重鎖を安定化することがわかった(図 2)⁵。

<引用文献>

1. Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS. Takahama, K., Takada, A., Tada, S., Shimizu, M., Sayama, K., Oyoshi, T. *Chem. Biol.* **2013**, 20, 341-350.
2. Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to G-quadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the ribose of loops in G-quadruplex. Takahama, K., Oyoshi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 18016-18019.
3. G-quadruplex binding ability of TLS/FUS depends on the β -spiral structure of the RGG domain. Yagi, R., Miyazaki, T., Oyoshi, T. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, 5894-5901.
4. Modulation of histone modifications and G-quadruplex structures by G-quadruplex-binding proteins. Oyoshi, T. and Masuzawa, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *in press*.
5. Roles of the RGG domain and RNA recognition motif of Nucleolin in G-quadruplex stabilization. Masuzawa, T. and Oyoshi, T. *ACS Omega* **2020**, 5, 5202-5208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yagi, R., Miyazaki, T., and Oyoshi, T.	4. 巻 46
2. 論文標題 G-quadruplex Binding Ability of TLS/FUS Depends on the γ -Spiral Structure of the RGG Domain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5894-5901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky391	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 -
1. 著者名 Kurokawa, R., Komiya, R., Oyoshi, T., Matsuno, Y., Tani, H., Katahira, M., Hitachi, K., Iwashita, Y., Yamashita, T., Kondo, K., Yoneda, R., Yamaoki, Y., Ueda, N., Mashima, T., Kobayashi, N., Nagata, T., Kiyoshi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Hamad, N., Sasaki, K., and Shoji, N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Multiplicity in long noncoding RNA in living cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20180402.11	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 -
1. 著者名 Kaweewan, I., Komaki, H., Hemmi, H., Hoshino, K., Hosaka, T., Isokawa, G., Oyoshi, T., and Kodani, S.	4. 巻 72
2. 論文標題 Isolation and structure determination of a new cytotoxic peptide, curacozole, from Streptomyces curacoii based on genome mining.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antibiot	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-018-0105-4	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 Kondo K., Mashima, T., Oyoshi, T., Yagi, R., Kurokawa, R., Kobayashi, N., Nagata, T., and Katahira, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Plastic roles of phenylalanine and tyrosine residues of TLS/FUS in complex formation with the G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-21142-1	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 -

1. 著者名 Nogami, K., Tokumaru, H., Isokawa, G., Oyoshi, T., Fujimoto, K., and Inouye, M	4. 巻 53
2. 論文標題 Bcl-XL-binding helical peptides possessing D-Ala residues at their C-termini with the advantage of long-lasting intracellular stabilities.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemComm	6. 最初と最後の頁 12104-12107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cc06904a	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 Bao, H.-L., Ishizuoka, T., Iwanami, A., Oyoshi, T., and Xu, Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 A simple and sensitive 19FNMR approach for studying the interaction of RNA G-quadruplex with ligand molecule and protein.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemistry SELECT	6. 最初と最後の頁 4170-4175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.201700711	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 Oyoshi, T., and Kino, K.	4. 巻 52
2. 論文標題 Epigenetics regulated by DNA damage repair protein TLS/FUS	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radiation Biology Research Communications	6. 最初と最後の頁 227-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masuzawa T. and Oyoshi, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Roles of the RGG Domain and RNA Recognition Motif of Nucleolin in G-Quadruplex Stabilization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5202-5208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b04221	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 -

1. 著者名 Takuma, M., Kuroha, M., Nagano, Y., Kaweewan, I., Hemmi, H., Oyoshi, T., and Kodani, S.	4. 巻 72
2. 論文標題 Heterologous production of coryneazolicin in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antibiot	6. 最初と最後の頁 800-806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0212-x	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 Oyoshi, T., and Masuzawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Modulation of histone modifications and G-quadruplex structures by G-quadruplex-binding proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.178.	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 Hamad Nesreen, Mashima Tsukasa, Yamaoki Yudai, Kondo Keiko, Yoneda Ryoma, Oyoshi Takanori, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 RNA sequence and length contribute to RNA-induced conformational change of TLS/FUS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59496-0	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 Arg-Gly-Gly繰り返し領域によって制御される非ワトソクリック型核酸の機能
3. 学会等名 有用物質合成研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖結合タンパク質によるエピジェネティクス制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 非ワトソン・クリック型塩基対が広げる遺伝情報
3. 学会等名 日本薬学会東海支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 RGG繰り返し領域の核酸結合性の制御機構
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖DNAとRNAに特異的に結合するタンパク質の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 RGGモチーフによるグアニン四重鎖RNA凝集体形成機構
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 Is DNA a double-stranded helix? -The relationship between DNA local conformations and epigenetics-
3. 学会等名 第60回歯工学連携講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大吉崇文
2. 発表標題 メチル化によって制御されるTLS/FUSのRGG領域の核酸結合性の解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学理学部大吉研究室 https://www.shizuoka.ac.jp/oyoshilaboratory/ 静岡大学教員データベース http://tdb.shizuoka.ac.jp/ResearcherDB/public/Default2.aspx?id=11049&l=0
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----