

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19589

研究課題名（和文）Smad転写複合体のheterogeneityを識別する手法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to detect heterogeneity of Smad transcriptional complexes

研究代表者

宮澤 恵二（MIYAZAWA, Keiji）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：40209896

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）：TGF- のシグナル伝達に関するSmad複合体のheterogeneityを識別する測定系を開発する目的で、DNAアプタマーのスクリーニングを行った。活性型Smad複合体を認識するDNAアプタマーはグアニン四重鎖構造を形成するコンセンサス配列にあてはまるG-richな構造を持っていた。しかし、診断法に応用できるような高親和性のDNAアプタマーは取得できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- はがんをはじめとする様々な疾病への関与が指摘されている細胞増殖因子である。そのシグナル伝達に関するSmad複合体がグアニン四重鎖構造と相互作用する可能性が示唆され、研究の新たな展開に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Signaling of transforming growth factor- (TGF-) is mediated by Smad complexes. In the present study, we screened DNA aptamers that can specifically interact with distinct subsets of Smad complexes. We found that DNA aptamers that can interact with transcriptionally active Smad complexes contain G-rich sequences. Their affinities were not high enough to pull down Smad complexes. However, the results suggest a possibility that Smad proteins can interact with G-quadruplex.

研究分野：基礎医学、生化学、腫瘍生物学

キーワード：TGF- Smad DNA aptamer

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖因子 TGF- β (transforming growth factor- β) は、がん化に対して抑制的に機能する一方で、がん細胞の悪性を促進するという二面性をもつ。したがって、腫瘍組織において TGF- β のシグナル伝達が検出されたとしても、がん化を抑制しているのか、悪性を促進しているのか、判断は困難である。TGF- β が標的細胞の種類や状態(細胞コンテキスト)により多様な応答を惹起するメカニズムについては、下流のシグナル伝達因子 Smad と結合して協調的に機能する DNA 結合性転写因子 (Smad cofactor と総称される) の発現状況の違いによって説明されている^[1]。そこで、TGF- β シグナル下流の Smad 複合体の heterogeneity を識別する手法の開発が重要であると考えた。

2. 研究の目的

活性型 Smad 複合体と不活性型 Smad 複合体を識別したり、がん悪性化に関与する Smad-Smad cofactor 複合体を検出する手法を開発し、liquid biopsy 等、診断への応用が可能な測定系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質複合体を検出するためには、抗体と比べ、より大きい領域を認識することのできる核酸アプタマーが適切と考えられる。申請者はすでに、二本鎖オリゴヌクレオチドライブラリーを用い、転写活性化能のある Smad 複合体と結合する DNA 配列を取得している。この手法で得られた二本鎖 DNA 配列を利用して組成の異なる Smad 複合体を pull-down し、Smad 複合体と結合して共沈してくる DNA アプタマーを収集した。

(1) 一本鎖 DNA のライブラリーはランダム部分が 40 ヌクレオチドのものを用いた^[2]。ランダム部分の 5' 側と 3' 側には各々、20 ヌクレオチドからなる PCR 増幅用の配列を付加した。

(2) スクリーニングに先立ち、ライブラリーから Smad 複合体の pull-down に用いる二本鎖 DNA 配列で 2回、転写不活性な Smad 複合体を結合した二本鎖 DNA 配列 (3xCAGA 配列*) で 2回の吸収操作を行った。この操作は、pull-down 用の二本鎖 DNA 配列に直接結合したり、転写不活性な Smad 複合体に結合する一本鎖 DNA 配列を除去するために行っている。

(3) 転写活性のある Smad 複合体を結合した 3種類の二本鎖 DNA 配列で 5サイクルの濃縮操作を行った^[3]。具体的には、TGF- β で 1時間刺激したマウス正常乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞の核抽出液を各二本鎖 DNA 配列と混合し、Smad タンパク質との複合体を調製した。これと一本鎖 DNA ライブラリーを混合し、結合する一本鎖 DNA を pull-down した。一本鎖 DNA を PCR で増幅後、相補鎖と分離し、同様の操作を 4 回繰り返すことにより、高度に濃縮された DNA 配列を得て、次世代シーケンサーで配列決定した。

*注) 3xCAGA 配列は Smad 複合体と強く結合するが、この Smad 複合体には転写活性化能はない^[4]。

5'-TCGAG CCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAC-3'

4. 研究成果

(1) 活性型 Smad 複合体あるいは Smad-Smad cofactor 複合体と結合する DNA アプタマー

Smad 結合性で転写が活性化される 3xSBE 配列、あるいは Smad 複合体が AP-1 または Ets1 と協調的に転写を活性化する配列を用いて、Smad 複合体と結合する DNA アプタマーをスクリーニングした。

3xSBE 配列: 5'- TCGAG CGTGTCTAGACAATGTCTAGACAATGTCTAGACA-3'

Smad-AP-1 結合配列: 5'-TCGAG CGATGAGTCACGCGTCTGTCTAGACAATG-3'

Smad-Ets1 結合配列: 5'-TCGAG TTCTCCAGGATGCATTCCAGACATATGTCTAGACTG-3'

3xSBEと結合するSmad複合体にはG-richな配列が結合していた。一方、Smad-AP-1配列とSmad-ECS配列に結合するSmad複合体と結合するDNAアプタマーにはG-richなものも見られたが、各々、特有の配列を含むDNA配列も結合することがわかった。

(2) ビオチン化DNAアプタマーによるSmad複合体沈降能の検定

濃縮度の高い配列についてSmadタンパク質との結合実験を行なった。転写活性化能のある3種類のSmad複合体に結合するDNAアプタマー配列についてビオチン化したプローブを合成し、TGF- β 刺激した細胞の抽出液から活性型Smad複合体、Smad-Smad cofactor複合体の沈降を試みた。Smad結合性二本鎖オリゴヌクレオチドを共存させたり、スケールアップ等の条件検討を行ったが、どの条件においても、イムノブロット法で検出できる量のSmadタンパク質は沈降できなかった。

(3) Smad 複合体による DNA アプタマーの沈降能の確認

実際に DNA アプタマーをスクリーニングした時の条件に準じて、Smad 複合体への結合能を再検討した。TGF- β 刺激した細胞の抽出液から Smad 結合性二本鎖オリゴヌクレオチドを用いて活性型 Smad 複合体を沈降する時に、DNAアプタマーも共沈されることが確認できた。また、DNAアプタマーの共沈は細胞のTGF- β 刺激依存的であった。したがって、単離されたDNAアプタマーは実際にSmad複合体に結合する能力はあるが、タンパク質複合体を pull-down できるほどの高い親和性を示すものではないことがわかった。

(4) グアニン四重鎖構造の安定化剤による TGF- β シグナルへの影響の検討

活性型 Smad 複合体結合性の DNA アプタマー配列は G-rich であり、多くの配列はグアニン四重鎖構造(G4 構造)を形成するコンセンサス配列の条件を満たしていた。一方、ゲノム中には遺伝子発現調節領域などに G4 構造をとる部分があることも知られている^[5]。そこで、G4 構造の安定化剤である TMPyP4 存在下で細胞の TGF- β 応答性を検討した。TGF- β シグナル全般をモニターする CAGA レポーター活性には影響がなかったが、一部の標的遺伝子の発現調節には影響することが明らかとなった。この知見は、Smad タンパク質の機能に G4 構造との親和性が関与する可能性を示唆している。

<引用文献>

- ① Ross S, Hill CS (2008) How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 383-408
- ② Kowalska E, Bartnicki F, Fujisawa R, Bonarek P, Hermanowicz P, Tsurimoto T, Muszynska K, Strzalka W.(2015) Inhibition of DNA replication by an anti-PCNA aptamer/PCNA complex. *Nucleic Acids Res.* 46: 25-41
- ③ Marimuthu C, Tang TH, Tominaga J, Tan SC, Gopinath SC. (2012) Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst.* 137: 1307-1315.
- ④ Itoh Y, Koinuma D, Omata C, Ogami T, Motizuki M, Yaguchi S, Itoh T, Miyake K, Tsutsumi S, Aburatani H, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K. A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF- β transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 2019 Oct 18; 294(42): 15466-15479
- ⑤ Hänsel-Hertsch R, Beraldi D, Lensing SV, Marsico G, Zyner K, Parry A, Di Antonio M, Pike J, Kimura H, Narita M, Tannahill D, Balasubramanian S. (2016) G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. *Nat Genet.* 48: 1267-1272.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh Yuka, Koinuma Daizo, Omata Chiho, Ogami Tomohiro, Motizuki Mitsuyoshi, Yaguchi So-ichi, Itoh Takuma, Miyake Kunio, Tsutsumi Shuichi, Aburatani Hiroyuki, Saitoh Masao, Miyazono Kohei, Miyazawa Keiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF-transcriptional activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15466 ~ 15479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009877	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuka Itoh, Daizo Koinuma, Masao Saitoh, Keiji Miyazawa
2. 発表標題 Transcription activation by TGF- through the Smad-binding element and CAGA motifs.
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiji Miyazawa
2. 発表標題 Minimal requirements for Smad-dependent transcription activation
3. 学会等名 TGF- meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部生化学講座第2教室ホームページ
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche02/bioch2.html>

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	伊藤 友香 (ITOH Yuka) (40454326)	山梨大学・大学院総合研究部・特任助教	
研究協力者	三宅 邦夫 (MIYAKE Kunio) (60550712)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授	