

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14636

研究課題名(和文) テロメアの伸長抑制に関わるTLS蛋白質による四重鎖核酸認識の構造基盤解明

研究課題名(英文) Structural basis of G-quadruplex recognition by TLS protein which lead to 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Translocated in liposarcoma蛋白質(TLS)と四重鎖核酸との結合に関し、Phe残基あるいはTyr残基の周囲にRGGモチーフを持つTLSの部分配列が、テロメアDNAにおいてはグアニンテトラッドとその上に張り出したループ構造、TERRAにおいてはグアニンテトラッドが結合に関与することを見出した。また、TLSの部分配列ペプチドが、テロメアDNAとTERRAのDNA-RNAハイブリッド四重鎖に対しても結合能を有することを示唆する結果を得た。加えて、テロメアDNAやTERRAの結合が、TLSにN端とC端が閉じた構造から開いた構造への変化をもたらすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLSは細胞核内において遺伝子発現制御をはじめとする種々の制御に関与する核酸結合蛋白質であり、その機能不全は神経疾患をもたらすことも知られている。しかし、その核酸結合の機構は十分には明らかにされていない。本研究において得られたTLSと四重鎖核酸との結合に関する知見、および核酸との結合がTLSに構造変化をもたらすという知見は、生体内におけるTLSの機能を解明し、遺伝子発現制御などの普遍的な生命現象への理解を深めることに繋がる。

研究成果の概要(英文)：Interaction of telomeric DNA and TERRA with peptide motifs in TLS, where tyrosine residue or phenylalanine residue is flanked with two RGG motifs, were analyzed by NMR. The peptide motif was suggested to bind to a G-tetrad and a loop region on the G-tetrad of telomeric DNA. On the other hand, it mainly bound to G-tetrads of TERRA. Additionally, the peptide motif was turned out to be able to interact with DNA-RNA hybrid quadruplex that formed by telomeric DNA and TERRA. Furthermore, conformational change of TLS from closed form to open form on binding telomeric DNA or TERRA was revealed.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 四重鎖核酸 核酸結合蛋白質 天然変性蛋白質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Translocated in liposarcoma (TLS)は、細胞内で遺伝子発現をはじめとする種々の制御に関わる多機能蛋白質である。TLS の機能の1つとして、テロメア長の制御への関与が報告されている[1]。テロメア DNA、およびテロメア DNA から転写される RNA (TERRA)はグアニンを多く含む配列を持つことから、いずれも四重鎖構造を形成し得る。TLS はテロメア DNA と TERRA の2種類の四重鎖を同時に認識し、結合することでテロメア DNA - TLS - TERRA の3者複合体を形成する。この複合体形成を契機として、TLS はテロメア DNA 上にヒストンメチル転移酵素をリクルートし、DNA の相同組み換えによるテロメア伸長を抑制すると考えられている。

TLS は N 末端側の低複雑性領域 (LC 領域)と C 末端側の核酸結合領域に大きく分けられ、その大部分は特定の構造を持たない天然変性領域である (図 1)。核酸結合領域は、RNA 認識モチーフと Zn フィンガー領域を複数のアルギニン - グリシン - グリシン (RGG)リピード配列 (RGG1-3)が繋ぐことで構成されている。このうちテロメア DNA および TERRA の四重鎖との認識を担うのは C 末端に位置する RGG3 である。それまで、Phe 残基と Tyr 残基がそれぞれテロメア DNA と TERRA の認識に重要と考えられていた[2]。我々は以前の研究において、NMR 法による解析で、Phe 残基と Tyr 残基だけでなく、その周囲の RGG モチーフや、RGG3 の C 末端領域が四重鎖との結合に関与することを示し[3]た。さらに、テロメア DNA - TLS あるいは TERRA - TLS の2者複合体では、1つの四重鎖に対して Phe 残基および Tyr 残基の周囲配列が同時に結合するのに対し、テロメア DNA - TLS - TERRA の3者複合体形成時には Phe 残基の周囲配列がテロメア DNA、Tyr 残基の周囲配列が TERRA に選択的に結合することを示した。しかし、RGG3 と四重鎖核酸間の詳細な結合様式の解明には至っておらず、3者複合体の形成がテロメア伸長抑制をもたらす機構の構造学的は明らかにされていなかった。

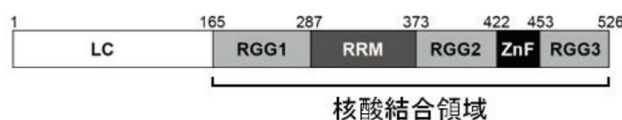


図 1. TLS のドメイン構造

### 2. 研究の目的

本研究では、RGG3 による DNA と RNA の2種の四重鎖核酸の認識機構に関して構造学的基盤を得ること、および核酸との結合がその後のヒストンメチル転移酵素リクルートをもたらす機構に関する知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) RGG3 の部分配列と四重鎖核酸との相互作用解析

RGG3 に含まれる Phe 残基および Tyr 残基の周囲配列を元に、Phe 残基および Tyr 残基の前後に RGG モチーフあるいはアルギニン - グリシン (RG)モチーフを配した部分配列ペプチドを作成した。このペプチドをテロメア DNA と TERRA の四重鎖にそれぞれ添加して、NMR による滴定実験を行った。また、テロメア DNA と TERRA が形成する DNA-RNA ハイブリッド四重鎖に対しても同様の滴定実験を行った。

#### (2) 核酸の結合による TLS の構造変化の解析

TLS の N 端に BFP、C 端に GFP をそれぞれ結合させたコンストラクトを作成した。TLS の N 端と C 端が近接している際には高い効率で BFP と GFP 間の fluorescence resonance energy transfer (FRET)が観測される。このコンストラクトに対し、テロメア DNA あるいは TERRA を添加し、FRET の変化を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) RGG3 の部分配列と四重鎖核酸との相互作用解析

RGG3 には複数の Phe 残基と Tyr 残基が含まれ、その前後には RGG/RG モチーフが存在する。そこで、Phe 残基および Tyr 残基の前後に1つないし2つの RGG/RG モチーフを持つ RGG3 部分配列ペプチドを作成した。部分配列ペプチドを使用してテロメア DNA と TERRA に対する滴定実験を行った結果、RGG/RG モチーフを1つだけ持つペプチドよりも、Phe 残基や Tyr 残基を挟んで2つの RGG/RG モチーフを持つペプチドで顕著な化学シフト摂動(CSP)が観測された。そこで、RGG/RG モチーフを2つ持つペプチドを使用して以降の相互作用解析を行った。

テロメア DNA においては、RGG3 部分配列ペプチドの添加によって、四重鎖の片面の G テトラッドに位置する G3 および G21 で顕著なイミノプロトンの CSP が観測された (図 2)。また、その G テトラッド周囲のループを構成している T18 および T19 において、H6 プロトンやメチルプロトンの CSP が観測された。この結果から、RGG3 の部分配列ペプチドは、テロメア DNA の片側の G テトラッドとその周囲のループ構造を主に認識していることが示唆された。一方、

TERRA においては、四重鎖の外側に張り出したループ部分では顕著な CSP は認められず、両側の G テトラッドとその近傍の残基において CSP が観測された。この結果から、TERRA との結合では、G テトラッドが主に認識されていることが示唆された。

テロメア DNA と TERRA は単独で四重鎖構造を形成する他、両者が組み合わさった DNA-RNA ハイブリッド四重鎖も形成する可能性が示されている[4]。さらに、この DNA-RNA ハイブリッド四重鎖が細胞内環境において確かに形成可能であることが近年報告された[5]。そこで、本研究では DNA-RNA ハイブリッド四重鎖に対しても、TLS の RGG3 が結合可能か否かを検証した。テロメア DNA と TERRA の配列を併せてアニーリングを行った後、の 1D-1H-NMR を測定したところ、両者を単独で測定した場合には観測されなかったシグナルが検出された。これらのハイブリッド四重鎖に由来すると思しきシグナルは、RGG3 部分配列ペプチドの添加によって増強した。このことから、RGG3 の部分配列がテロメア DNA と TERRA のハイブリッド四重鎖にも結合可能であることが示唆された。

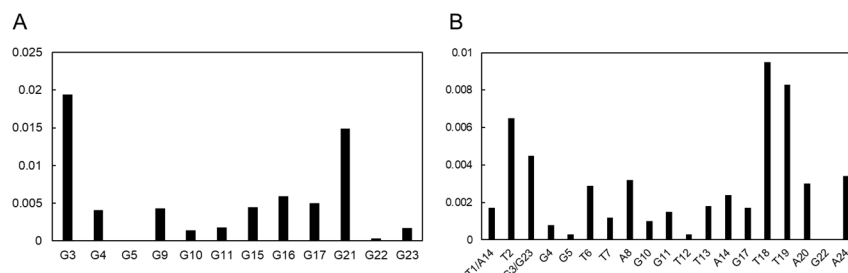


図 2. Tyr 残基を持つ RGG3 部分配列ペプチドによるテロメア DNA の CSP (A)イミノプロトン、(B) H6 および H8 プロトン

## (2) 核酸の結合による TLS の構造変化の解析

テロメア長の制御において、TLS の C 端への四重鎖核酸の結合は TLS の N 端を介したヒストンメチル転移酵素のリクルートを引き起こすと考えられている。一方、TLS が関わるサイクリン D1 遺伝子の発現制御においても、別種の核酸との結合が TLS とアセチル転移酵素の結合をもたらすことが知られている。こちらの系においては、TLS の C 端の核酸結合領域への核酸の結合が、TLS を N 端と C 端が近接した閉じた構造から開いた構造へと変化させるといふ仮説が提唱されている。そこで、テロメア DNA や TERRA の結合が、サイクリン D1 遺伝子の発現制御で提唱されているような TLS の構造変化をもたらすか否かを検証した。

N 端と C 端にそれぞれ BFP と GFP を繋げた TLS 全長を使用し、FRET 法により核酸の結合に伴う TLS のコンフォメーション変化を観測した。核酸を添加する前の TLS では、BFP と GFP 間の FRET が観測されたことから、TLS の N 端と C 端が近接していることが示された。続いてテロメア DNA あるいは TERRA を添加したところ、FRET 効率が低下(GFP の蛍光強度の低下と BFP の蛍光強度の増大)が観測された。このことから、テロメア DNA あるいは TERRA の結合により TLS の N 端と C 端が離れたことが示唆された。以上の結果から、テロメア DNA や TERRA の結合によって TLS の N 端が C 端から解放され、ヒストンメチル転移酵素の N 端への結合を可能にすると考えられる。また、テロメア DNA や TERRA の一方のみを加えた系で FRET 効率の低下が観測されたことから、上記のような TLS のコンフォメーション変化にはテロメア DNA - TLS - TERRA の 3 者複合体形成は必須ではないことが明らかとなった。

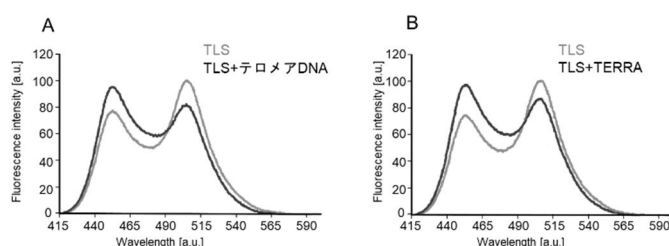


図 3. テロメア DNA (A)および TERRA (B)の添加による TLS の蛍光スペクトルの変化

## <引用文献>

- [1] K. Takahama, A. Takada, S. Tada, M. Shimizu, K. Sayama, R. Kurokawa, T. Oyoshi, Chem. Biol. 20 (2013) 341–350.
- [2] K. Takahama, T. Oyoshi, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 18016–18019.
- [3] K. Kondo, T. Mashima, T. Oyoshi, R. Yagi, R. Kurokawa, N. Kobayashi, T. Nagata, M. Katahira, Sci. Rep. 8 (2018) 2864.
- [4] Y. Xu, T. Ishizuka, J. Yang, K. Ito, H. Katada, M. Komiyama, T. Hayashi, J. Biol. Chem. 287 (2012) 41787–41796.
- [5] H.-L. Bao, Y. Xu, Chem. Commun. 56 (2020) 6547–6550.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

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 2629
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 -
1. 著者名 Kurokawa, R., Takeuchim, A., Shiina, N., Katahira, M., Yamashita, T., Matsuno Y., Hitachi, K., Ishigaki, S., Hamad, N., Yoneda, R., Ueda, N., Iida, K., Hosokawa, M., Hagiwara, M., Iida, M., Mashima, T., Yamaoki, Y., So, M., Nagata, T., Sobue, G., Kondo, K., Watanabe, H., Uchihashi, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Versatility of RNA-Binding Proteins in Living Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20190501.12	査読の有無 無
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, R., Murata, M., Hamad, N., Sasaki, K., 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 無
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 Tokunaga Yuki, Nagata Takashi, Suetomi Takashi, Oshiro Satoshi, Kondo Keiko, Katahira Masato, Watanabe Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 NMR Analysis on Molecular Interaction of Lignin with Amino Acid Residues of Carbohydrate-Binding Module from Trichoderma reesei Cel7A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1977~1988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38410-9	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 Osman Wan Hasnidah Wan, Mikami Bunzo, Saka Naoki, Kondo Keiko, Lin Meng-l, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 132
2. 論文標題 Identification of key residues for activities of atypical glutathione S-transferase of Ceriporiopsis subvermispora, a selective degrader of lignin in woody biomass, by crystallography and functional mutagenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 222 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.199	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 Wan Osman Wan Hasnidah, Mikami Bunzo, Saka Naoki, Kondo Keiko, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 510
2. 論文標題 Structure of a serine-type glutathione S-transferase of Ceriporiopsis subvermispora and identification of the enzymatically important non-canonical residues by functional mutagenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 177 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.076	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 Eladl Afaf, Yamaoki Yudai, Hoshina Shoko, Horinouchi Haruka, Kondo Keiko, Waga Shou, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 22
2. 論文標題 Investigation of the Interaction of Human Origin Recognition Complex Subunit 1 with G-Quadruplex DNAs of Human c-myc Promoter and Telomere Regions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3481 ~ 3481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073481	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hamad Nesreen, Mashima Tsukasa, Yamaoki Yudai, Kondo Keiko, Yoneda Ryoma, Oyoshi Takanori, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato
2. 発表標題 Promotor associated non-coding RNA, pncRNA, can diminish the aggregation of TLS caused by shearing stress
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Keiko Kondo, Tsukasa Mashima, Takanori Oyoshi, Riki Kurokawa, Naohiro Kobayashi, Takashi Nagata, Masato Katahira
2. 発表標題	NMR studies for the complex of TLS/FUS protein and G-quadruplexes of telomeric DNA and TERRA, which induces telomere shortening
3. 学会等名	第2回長鎖非コードRNA勉強会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	N. Hamad, T. Mashima, Y. Yamaoki, K. Kondo, H. Watanabe, T. Uchihashi, R. Kurokawa, T. Nagata, M. Katahira
2. 発表標題	Conformational change detection of translocated in liposarcoma, TLS, upon binding to promoter-associated non-coding RNA, pncRNA
3. 学会等名	International Conference on Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	N. Hamad, R. Yoneda, H. Watanabe, Y. Yamaoki, K. Kondo, T. Uchihashi, T. Nagata, M. Katahira, R. Kurokawa
2. 発表標題	Structural analysis of FUS/TLS protein upon binding to promotor-associated non coding RNA
3. 学会等名	The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Shou Waga, Yudai Yamaoki, Afaf Eladl, Shoko Hoshina, Haruka Horinouchi, Omar Eladl, Keiko Kondo, Takashi Nagata, Masato Katahira
2. 発表標題	Characterization of the interaction between human origin recognition complex subunit 1 and DNAs
3. 学会等名	The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 Afaf Eladl, Yudai Yamaoki, Shoko Hoshina, Haruka Horinouchi, Keiko Kondo, Omar Eladl, Takashi Nagata, Shou Waga, masato Katahira
2. 発表標題 Investigation of the interaction between human origin recognition complex subunit 1 and G-rich DNAs
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------