

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750130
 研究課題名 (和文) グアニン四重鎖構造を認識する核酸結合タンパク質の解析
 研究課題名 (英文) Identification and characterization of G-quadruplex DNA binding protein
 研究代表者
 大吉 崇文 (OYOSHI TAKANORI)
 静岡大学・理学部・助教
 研究者番号：80406529

研究成果の概要 (和文) : 本研究により、ガンに関与する EWS タンパク質のアルギニン-グリシン-グリシンが豊富な領域はグアニン四重鎖構造に対して特異的に結合することが明らかとなった。この時グアニン四重鎖構造は安定化されて、パラレル構造からハイブリット構造に変化することが明らかとなった。更にこの複合体内で、グアニン四重鎖中のループと RGG 中のアルギニンにより水素結合が形成されることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : We report that Arg-Gly-Gly domain (RGG) in EWS binds G-rich single strand DNA fold in G-quadruplex DNA while it cannot bind G-rich double and single stranded DNA. Inhibition of DNA polymerase on a template containing G-quadruplex in the presence of RGG occurred in an RGG concentration-manner by forming a stabilized G-quadruplex-RGG complex. Moreover, specific binding of RGG to G-quadruplex DNA is dictated by hydrogen bonding of arginine in RGG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生体機能関連化学

科研費の分科・細目：4706

キーワード：核酸化学、核酸結合タンパク質、グアニン四重鎖構造

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの全ゲノム配列が解明されたことにより、これまで無意味と思われていた DNA 配列さえも生命活動に重要であることが明らかになってきた。特に染色体の末端配列にグアニン塩基が多く、グアニン四重鎖構造を形成することが解明されている。

(2) DNA は生体内においてタンパク質と結

合して機能しているが、グアニン四重鎖構造を特異的に認識して機能するタンパク質の研究が進んでいないため、生体内におけるグアニン四重鎖構造の機能は不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) グアニン四重鎖構造を特異的に認識するタンパク質の認識機構と機能の解明を目的とする。

(2) 特に注目したタンパク質はアルギニン-グリシン-グリシン (RGG) 配列の富む領域を有するタンパク質であり、ガン化に関与する核酸結合性タンパク質である EWS (Ewing's sarcoma) である。RGG 領域とグアニン四重鎖構造の結合性を調べる。

(3) 結合性の解析結果をもとにして、細胞内でのタンパク質の機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いたタンパク質は、タグとしてグルタチオ-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。この手法を用いて目的のタンパク質を合成してグアニン四重鎖との結合性の解析をゲルシフトアッセイ法により検証した。

(2) グアニン四重鎖中の塩基に変異を加えた DNA と RGG タンパク質との結合性を調べた。

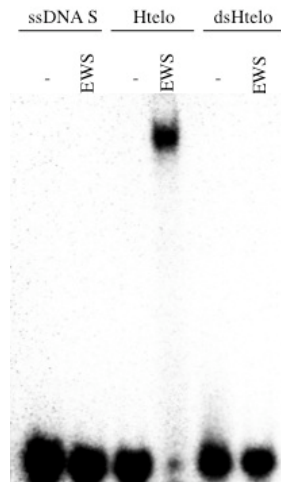
(3) DNA ポリメラーゼストップアッセイにより、EWS がグアニン四重鎖構造を安定化しているか、不安定化しているか調べた。

(4) EWS とグアニン四重鎖 DNA との構造を解析するために円二色性スペクトルの解析を行なった。

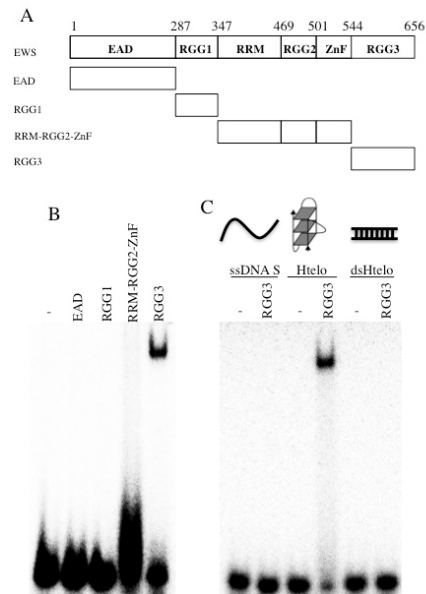
(5) EWS タンパク質中のアルギニンをメチル化したり、リシンに置換してグアニン四重鎖との結合性を調べた。

4. 研究成果

(1) 核酸結合性タンパク質である EWS の核酸結合性を調べるために、放射線ラベルした 1 本鎖 DNA、2 本鎖 DNA、グアニン四重鎖 DNA と EWS との結合性をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、グアニン四重鎖 DNA 特異的に結合することが明らかとなった。

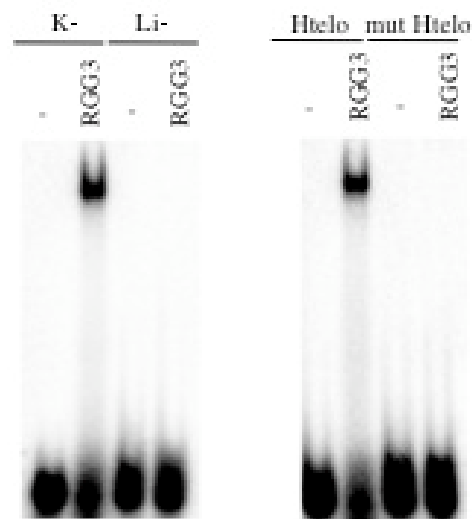


(2) EWS の中でどの領域がグアニン四重鎖 DNA に結合するのは調べるために、EWS を各領域ごとにわけたタンパク質とグアニン四重鎖 DNA とのゲルシフトアッセイを行なった。その結果、C 末のアルギニン-グリシン-グリシン配列を多く有する領域 (RGG3 領域) が結合することがわかった。

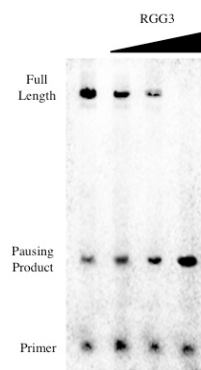


更に RGG3 領域はグアニン四重鎖特異的に結合するか更に詳細に調べるために、グアニン四重鎖構造を安定化するカリウムイオン存在下と、不安定化するリチウムイオン存在下において結合性をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、リチウムイオン存在下では結合しないことから、DNA 配列ではなくグアニン四重鎖構造を認識して結合することがわかった。

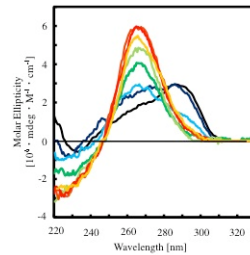
またテロメアが形成するグアニン四重鎖配列 d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) の内、グアニン四重鎖を不安定化させた変異型 d(AGGGTTAGTGTTAGTGTTAGGG) との結合性を検証した。その結果、変異型 DNA には結合しないことがわかった。これらの結果より、RGG3 領域はグアニン四重鎖構造に特異的に結合することがわかった。



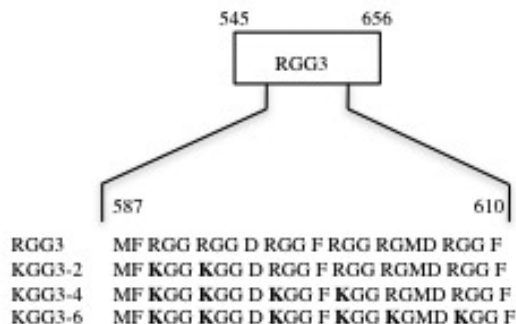
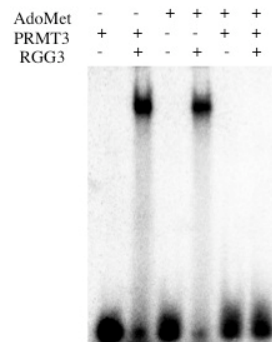
(3) EWS が結合したグアニン四重鎖構造の安定性を調べるために、DNA ポリメラーゼストップアッセイを行なった。その結果、グアニン四重鎖構造は RGG3 領域により安定化されることがわかった。



(4) EWS が結合した際のグアニン四重鎖構造を円二色性スペクトルにより解析した。その結果、RGG3 なしでは 288nm のポジティブピークと 235nm のネガティブピークからわかるが、RGG 存在下では 265nm のポジティブピークにシフトした。これはテロメア DNA のみでは (3 + 1) ハイブリット構造を形成しているが、RGG3 存在下ではパラレル型を形成していることが明らかとなった。



(5) グアニン四重鎖 DNA への結合に関与しているアミノ酸の特定と更なる認識機構の解明のために、アルギニンをメチル化した EWS とグアニン四重鎖構造との結合性を調べた。その結果、メチル化した EWS はグアニン四重鎖 DNA との結合性を示さなかった。この結果、EWS はグアニン四重鎖とアルギニン残基による水素結合で認識していることが示唆された。



さらに RGG3 中の 587 番目から 610 番目のアミノ酸配列のうち、いくつかのアルギニンをリシンに置換したタンパク質を 3 種類作成した。それぞれのタンパク質とグアニン四重鎖構造との結合性をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、リシン置換した数が多いほどグアニン四重鎖との結合性は低下した。これらの結果より、EWS は RGG3 中のアルギニン残基により水素結合でグアニン四重鎖構造と結合することがわかった。

さらに RGG3 中の 587 番目から 610 番目のアミノ酸配列のうち、いくつかのアルギニンをリシンに置換したタンパク質を 3 種類作成した。それぞれのタンパク質とグアニン四重鎖構造との結合性をゲルシフトアッセイにより調べた。その結果、リシン置換した数が多いほどグアニン四重鎖との結合性は低下した。これらの結果より、EWS は RGG3 中のアルギニン残基により水素結合でグアニン四重鎖構造と結合することがわかった。

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)

- ① Takahama, K., Kino, K., Arai, S., Kurokawa, R., Oyoshi, T. Identification of DNA Binding Specificity of TLS. *Nucleic Acids Symp.*, 53, 247-248, 2009
- ② Takahama, K., Arai, S., Kurokawa, R., Oyoshi, T. Identification of RNA Binding Specificity for the TET-family Proteins. *Nucleic Acids Symp.*, 52, 213-214, 2008

[学会発表] (計 13 件)

- ① 高濱謙太郎, 荒井重紀, 黒川理樹, 大吉崇文 「核酸結合タンパク質 EWS のグアニン四重鎖構造認識機構の解明」 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪
- ② 渡辺裕美, 高濱謙太郎, 茶山和敏, 大吉崇文 「細胞内における核酸結合タンパク質 EWS の機能解析」 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪
- ③ 内山裕美子, 高田麻美, 高濱謙太郎, 大吉崇文 「核酸結合タンパク質 TLS による
- ④ 杉本知恵莉, 高濱謙太郎, 大吉崇文 「RGG タンパク質が結合したグアニン四重鎖構造の解析」 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪
- ⑤ 高田麻美, 高濱謙太郎, 大吉崇文 「核酸結合タンパク質 TLS の核酸結合性の解析」 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪
- ⑥ 田出朋也, 高濱謙太郎, 杉本知恵莉, 道

羅英夫, 大吉崇文 「グアニン四重鎖に結合するペプチドの開発」日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪

⑦齋藤悠, 高濱謙太郎, 丑丸敬史, 大吉崇文 「RNA オリゴマーによる細胞内の転写活性化機構」日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 大阪

⑧高濱謙太郎, 荒井重紀, 黒川理樹, 大吉崇文 「Identification of DNA Binding Specificity of TLS.」第 6 回国際核酸化学シンポジウム 2009 年 9 月 高山

⑨大吉崇文, 高濱謙太郎, 喜納克仁, 荒井重紀, 黒川理樹 「EWS タンパク質の核酸結合性の解析」第 24 回生体機能関連化学シンポジウム 2009 年 9 月 福岡

⑩高濱謙太郎, 喜納克仁, 荒井重紀, 黒川理樹, 大吉崇文 「TET タンパク質による DNA 結合認識機構の解明」日本化学会第 89 回春季年会 2009 年 3 月 船橋

⑪内山裕美子, 高濱謙太郎, 黒川理樹, 大吉崇文 「RNA 結合タンパク質 EWS による翻訳制御機構の解明」日本化学会第 89 回春季年会 2009 年 3 月 船橋

⑫高濱謙太郎, 喜納克仁, 荒井重紀, 黒川理樹, 大吉崇文 「Identification of RNA Binding Specificity for the TET-family Proteins.」第 35 回核酸化学国際シンポジウム合同シンポジウム 2008 年 9 月 京都

⑬高濱謙太郎, 喜納克仁, 荒井重紀, 黒川理樹, 大吉崇文 「核酸結合タンパク質 EWS の DNA 結合性の解析」第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008 年 9 月 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大吉 崇文 (OYOSHI TAKANORI)

静岡大学・理学部・助教

研究者番号：80406529

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：