

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05704

研究課題名（和文）グアニン四重鎖RNA結合タンパク質による凝集体の形成機構と機能の解明

研究課題名（英文）Mechanism and function of aggregate formation by G-quadruplex RNA-binding protein

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、グアニン塩基が豊富な核酸が形成する構造であるグアニン四重鎖（G4）は、アルギニン-グリシン-グリシン繰り返し（RGG）配列を多く含むタンパク質と結合して、様々な疾患に関与することが報告されている。しかし、これらのタンパク質のG4認識機構は不明である。そこで本研究では、新規G4結合性タンパク質を見出し、そのG4認識機構の解明を目的とした。その結果、RGG配列を多く含むFibrillarinという新規G4結合性タンパク質を見出した。また、FibrillarinやRGG配列を有するTLS/FUSのG4認識機構を解析して、それぞれのタンパク質のG4結合性の制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G4は、G4結合タンパク質とともに細胞内で凝集体を形成して、ALS（筋萎縮性側索硬化症）やFTD（前頭側頭型認知症）の原因となることが知られている。また、ゲノム中のプロモーター中にあるG4にG4結合タンパク質が結合することで、下流の遺伝子発現が制御され、細胞のガン化が制御されている。本研究によりG4結合タンパク質によるG4認識機構が明らかになったので、G4とG4結合タンパク質が関与する疾患の機構解明に役立つ。さらに、これらの知見を元に天然のG4結合タンパク質から様々な新規人工G4DNA結合タンパク質の作成が可能になり、G4関連疾患の薬剤開発につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, G-quadruplex (G4), which is formed in guanine-rich sequences, and G4-binding proteins that contain many arginine-glycine-glycine repeats (RGG) have been reported to be involved in various diseases, cancer, ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) and FTD (Frontotemporal dementia). However, the mechanism of G4 recognition by these proteins is unknown. Therefore, I found the novel G4-binding protein in this study and aimed to elucidate their G4 recognition mechanisms. As a result, we found a novel G4-binding protein, Fibrillarin, which contains many RGG sequences. I also analyzed the G4 recognition mechanism of RGG sequences in Fibrillarin and TLS (Translocated in liposarcoma) /FUS (Fused in sarcoma) to elucidate the regulatory mechanism of G4 binding abilities. Furthermore, based on these findings, it will be possible to create various novel artificial G4 DNA-binding proteins from natural G4-binding proteins, which will lead to the development of drugs for G4-related diseases.

研究分野：生物化学

キーワード：グアニン四重鎖 核酸結合タンパク質 遺伝子発現制御 ガン 筋萎縮性側索硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、生体分子であるタンパク質や核酸はある条件下で凝集体を形成して、その結果、疾患の原因になることが報告されている。しかし、どのような機構でゲル化や凝集体が形成されているか、さらにそれらの生体分子の元々の機能等は不明である。特にグアニン塩基が豊富な核酸が形成する構造であるグアニン四重鎖 (G4) は、この核酸構造に結合するタンパク質とともに細胞内で凝集体を形成して、ALS (筋萎縮性側索硬化症) や FTD (前頭側頭型認知症) に関与することが報告されている。

(2) アルギニン-グリシン-グリシン繰り返し配列を多く含む領域 (RGG 領域) は、G4 に結合するタンパク質中に多く見られることを我々はすでに見出している。一方で、RGG 領域を含むタンパク質は液滴や凝集体を形成しやすく、正常な細胞のみならず、疾患細胞にも存在してその病因となることが報告されている。しかし、RGG 領域を含むタンパク質による G4 認識機構は不明であり、またその機能や液滴形成機構も不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、G4 と G4 結合性タンパク質が形成する凝集体の形成機構とその機能を解明するために、新規 G4 結合性タンパク質を見出し、さらに G4 結合性タンパク質による G4 認識機構の解明をする。

(2) タンパク質の液滴形成機構の解明をする。

3. 研究の方法

(1) G4 に結合するタンパク質の網羅的に解析するための手法の開発を東北大学の佐藤伸一助教らと共に行った。既存の G4 結合タンパク質検出法であるプルダウンアッセイ法などでは、結合力の弱い G4 結合タンパク質を同定することが困難となっているため、G4 結合タンパク質はほとんど明らかになっていない。そこで、G4 結合小分子であるヘミンが有するペルオキシダーゼ活性を利用して、G4 結合タンパク質を選択的にビオチン化修飾した。その後、分子量測定法により、ラベル化されたタンパク質の網羅的解析が行われた。

(2) 上記の方法で発見された RGG 領域を有する G4 結合タンパク質である Fibrillarin や、これまでの実験で我々がすでに G4 結合タンパク質として見出している TLS/FUS の G4 認識機構を調べた。Fibrillarin と TLS/FUS それぞれヒト細胞内と大腸菌内でそれぞれプラスミドを使って大量発現させた後、試験管における結合性をプルダウンアッセイ法、またはゲルシフトアッセイ法により解析した。

(3) タンパク質が液滴を形成する条件を試験管内の実験により明らかにした。モデル分子としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いて、pH 変化によるタンパク質の構造変化と、それに伴って形成するゲルをレオメーターによって測定することで、pH 依存的ゲル化形成能の解析を明治薬科大学の山中正道教授らと共に行った。

4. 研究成果

(1) G4 に結合するタンパク質を新たな手法によって解析した結果、これまでに我々の研究によって見出された G4 結合タンパク質である Translocated in liposarcoma (TLS) / Fused in sarcoma (FUS) や Ewing's sarcoma (EWS) 以外に、Fibrillarin を新規 G4 結合タンパク質として見出した (*Chem. Comm.* 56, 11641-11644, 2020)。このタンパク質は N 末端に RGG 領域を有しており、これまでに我々のグループで見出した G4 結合たんぱく質である TLS/FUS などと同様の構造的特徴があった (図 1)。

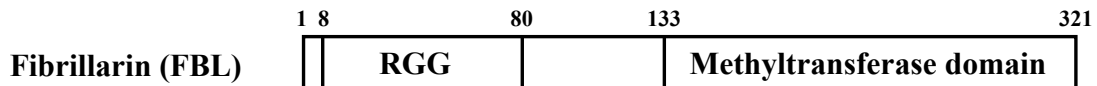


図 1 Fibrillarin の構造

(2) Fibrillarin と TLS/FUS の試験管内の G4 との結合性を調べた結果、それぞれのアルギニン残基が細胞内でうける修飾であるメチル化によって、G4 結合性が変化することがわかった。さらに、TLS/FUS 内の RGG 領域はループ長が長い G4 に結合することがわかり、ループ中の DNA と RNA を見分けて結合することがわかった (*ACS Omega*, 8, 10459-10465, 2023、図 2)。これらの性質を利用すると、細胞内のプロモーターにある G4 を標的とした遺伝子発現制御を行なう新規人工 G4DNA 結合タンパク質を作成することができ、G4 が関与するガンや筋萎縮性側索硬化症などの疾患の機構解明に役立つと期待できる (図 3)。

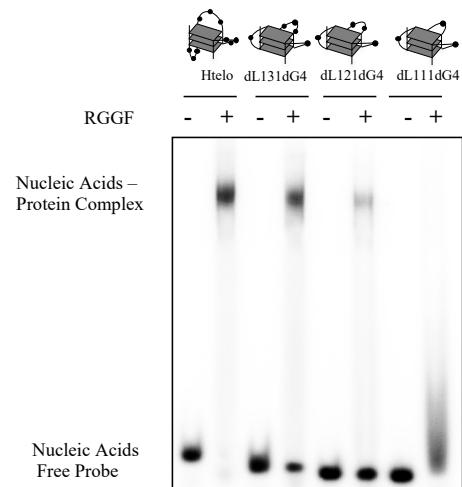


図 2 RGG 領域に結合する G4 の特徴

(3) タンパク質の凝集体形成機構を解明するために、モデル分子としてウシ血清アルブミン (BSA) を用いて、pH 依存的ゲル化形成能の解析を明治薬科大学の山中正道教授らと共に行った。その結果、pH が低下すると BSA 内の α ヘリックス含有量が減少することで BSA がゲル化することがわかった (*Chem. Pharm. Bull.*, 71, 229-233, 2023)。これらの結果は、疾患に関与するタンパク質のゲル化機構を解明するのに重要な知見である。

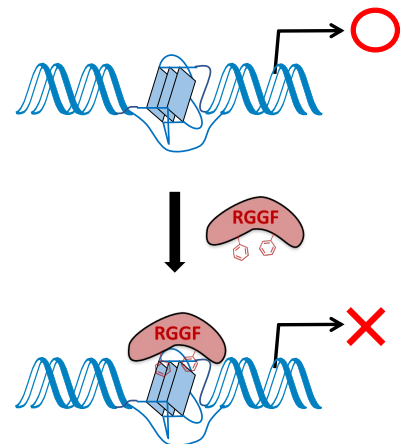


図 3 G4 結合タンパク質による転写制御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsuhiko Yoshida, Takanori Oyoshi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki, Miki Imanishi	4. 巻 50
2. 論文標題 Recognition of G-quadruplex RNA by a crucial RNA methyltransferase component, METTL14	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 449-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1211	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 Masuzawa, T., Sato, S., Niwa, T., Tagushi, H., Nakamura, H., Oyoshi, T.	4. 巻 56
2. 論文標題 G-quadruple-proximity protein labeling based on peroxidase activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Comm.	6. 最初と最後の頁 11641-11644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC02571B	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., Masuzawa, T.	4. 巻 513
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 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 39-44
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 Okita, H., Kato, Y., Masuzawa, T., Arai, K., Takeo, S., Sato, K., Mase, N., Oyoshi, T., Narumi, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Stereoselective synthesis of Gly-Gly-type (E)-methylalkene and (Z)-chloroalkene dipeptide isosteres and their application to 14-mer RGG peptidomimetics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Adv.	6. 最初と最後の頁 29373-29377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0RA06554D	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., Masuzawa, T., Oyoshi, T., Xu, Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Oligonucleotides DNA containing 8-trifluoromethyl-2'-deoxyguanosine for observing Z-DNA structure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 7041-7051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa505	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 Kimura Shinya, Komiyama Tomoki, Masuzawa Tatsuki, Yokoya Masashi, Oyoshi Takanori, Yamanaka Masamichi	4. 巻 71
2. 論文標題 Bovine Serum Albumin Hydrogel Formation: pH Dependence and Rheological Analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 229 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00758	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 Ulum Luthfi Lulul, Karikome Yamato, Yagi Ryota, Kawashima Tomoe, Ishihara Akinori, Oyoshi Takanori	4. 巻 8
2. 論文標題 DNA G-Quadruplex-Binding Protein Developed Using the RGG Domain of Translocated in Liposarcoma/Fused in Sarcoma Inhibits Transcription of bcl-2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 10459 ~ 10465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.3c00050	査読の有無 無
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19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 TastukiMasuzawa, Ryota Yagi, Shinnosuke Kawai, Takanori Oyoshi
2. 発表標題 Nucleic Binding Selectivity of RGG Domain in TLS/FUS Regulated by Arginine Methylation
3. 学会等名 日本核酸化学会若手フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Luthfi Lulul Ulum, Ryota Yagi, Tomoe Kawashima, Takanori Oyoshi
2. 発表標題 Down-Regulation of c-myc Transcription by G-Quadruplex DNA-Specific-Binding Protein from the RGG Domain of TLS/FUS
3. 学会等名 日本核酸化学会若手フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 苅米 倭・山梨 舞子・大吉 崇文
2. 発表標題 G 4 含有プロモーターを制御する人工転写因子の開発
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 皓哉・大吉 崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖DNAに対するトポイソメラーゼIの反応性の評価
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増澤 樹・大吉 崇文
2. 発表標題 FBLによるグアニン四重鎖構造認識の制御機構の解明
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田畑 舞子・野本 賢也・竹尾 沙優里・鳴海 哲夫・大吉 崇文
2. 発表標題 アルケン型ペプチド結合等価体を有したペプチドのグアニン四重鎖結合性
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Luthfi Lulul Ulum, Ryota Yagi, Tomoe Kawashima, Takanori Oyoshi
2. 発表標題 Inhibition of Transcription in c-myc by G-Quadruplex DNA-Specific-Binding Protein Engineered from the RGG Domain of TLS/FUS
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 皓哉・大吉 崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖DNAに対するトポイソメラーゼIの反応性の評価
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増澤 樹・大吉 崇文
2. 発表標題 新規G4結合タンパク質であるFBLのG4結合性と機能の解析
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuki Masuzawa, Ryota Yagi, Shinnosuke Kawai, Takanori Oyoshi
2. 発表標題 Nucleic Binding Selectivity of RGG Domain in TLS/FUS Regulated by Arginine Methylation
3. 学会等名 環太平洋国際化学会議2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Al Amin, Kazuhisa Fujimoto, Takanori Oyoshi.
2. 発表標題 Comparative Photo Sensitivity of Psoralen Derivatives
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Luthfi Lulul Ulum, Ryota Yagi, Tomoe Kawashima, Takanori Oyoshi.
2. 発表標題 Inhibition of Transcription in c-myc by G-quadruplex DNA-Binding Protein Engineered from the RGG Domain of TLS/FUS
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 苅米 倭・山梨 舞子・大吉 崇文
2. 発表標題 G4含有プロモーターを制御する人工転写因子の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 皓哉・横澤 龍馬・大吉 崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖を含む DNA に対するトポイソメラーゼI の反応性
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増澤 樹・八木 涼太・河合 信之輔・大吉 崇文
2. 発表標題 TLS/FUSのRGG領域の核酸結合性のアルギニンメチル化による制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増澤 樹・高濱 謙太郎・奥島 彩子・黒川 理樹・大吉 崇文
2. 発表標題 TERRAの凝集体の形成機構とその機能の解明
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 苅米 倭・Luthfi Lulul Ulum・八木 涼太・大吉 崇文
2. 発表標題 G4含有プロモーターを制御する人工転写因子の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 皓哉・西村 優利・世良 貴史・大吉 崇文
2. 発表標題 グアニン四重鎖DNA切断タンパク質の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021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95回生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大吉研究室HP https://wpp.shizuoka.ac.jp/oyoshi laboratory/ 大吉研究室HP https://wpp.shizuoka.ac.jp/oyoshi laboratory/
--

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