

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410176

研究課題名(和文) グアニン四重鎖結合タンパク質によるDNA構造制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of DNA structures regulated by G-quadruplex 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン四重鎖DNAとRNAはゲノムDNAや転写されたRNAに存在すると考えられている。しかし、それらの機能はほとんどわかっていない。その理由の1つに、グアニン四重鎖DNAとRNAをそれぞれ特異的に認識する分子が存在しないことが挙げられる。そこでグアニン四重鎖DNAとRNAに対してそれぞれ特異的に結合する分子を開発して、グアニン四重鎖の機能を解明することにした。特に、本研究では染色体末端構造のテロメアについて解析した。その結果、テロメアのグアニン四重鎖DNAとRNAは異なる機構でテロメアのヘテロクロマチン化を促進していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplex DNA and RNA are thought as components of genome DNA and transcribed RNA, respectively. But the biological significance of their G-quadruplex formation is unknown. Compounds that selectively bind G-quadruplex DNA and RNA are useful toward understanding the functions of each G-quadruplex. Especially, human telomere DNA and telomeric repeat-containing RNA (TERRA) are integral telomere components. We report that engineered Arg-Gly-Gly repeat (RGG) domains of translocated in liposarcoma containing only Phe (RGGF) and Tyr (RGGY) specifically bind and stabilize the G-quadruplexes of telomere DNA and TERRA, respectively. Moreover, RGGF inhibits trimethylation of both histone H4 at lysine 20 and histone H3 at lysine 9 at telomeres, while RGGY inhibits only H3 trimethylation in living cells. These findings indicate that G-quadruplexes of telomere DNA and TERRA have distinct functions in telomere histone methylation.

研究分野：生物化学

キーワード：グアニン四重鎖 テロメア 核酸結合タンパク質 ヌクレオソーム エピジェネティクス ガン遺伝子
ヒストン修飾

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、その配列から DNA の構造は二本鎖だけでなく、さまざまな局所構造が存在していると予想されている。特に、細胞のガン化や寿命に関係するテロメア領域の DNA や、そこから転写される RNA である TERRA は、局所構造の1つであるグアニン四重鎖を形成する。

(2) テロメア領域のヌクレオソームは高度に凝集したヘテロクロマチンであることが知られているが、これらの核酸局所構造とヌクレオソーム構造との関係は明らかになっていない。その原因の1つとして、これらの機能を解析するために必要なグアニン四重鎖 DNA と RNA にそれぞれ特異的に結合する分子が開発されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

これまでに申請者らが解明してきたグアニン四重鎖結合タンパク質の認識機構をもとに、新規グアニン四重鎖 DNA または RNA 結合タンパク質の開発を行ない、ヒストン修飾能との関係を解明する。

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。

(2) 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。

(3) タンパク質の核酸に対する結合定数と結合比は ITC (等温滴定型カロリーメトリー法) によって解析した。

(4) DNA ポリメラーゼストップアッセイと逆転写酵素ストップアッセイにより、目的のタンパク質がグアニン四重鎖 DNA と RNA を安定化しているか、不安定化しているかそれぞれ調べた。

(5) 細胞内におけるタンパク質の核酸結合性を調べるために、DNA クロマチン免疫沈降 (DNA chIP) 法と RNA chIP 法を用いた。それぞれのタンパク質には FLAG タグをつけて発現させて、抗 FLAG 抗体によって精製して、検出した。

(6) グアニン四重鎖 DNA と RNA のヒストン修飾能の違いを解析するために、開発したグアニン四重鎖 DNA と RNA に結合するタンパク質をそれぞれヒト細胞中に高発現させて、DNA

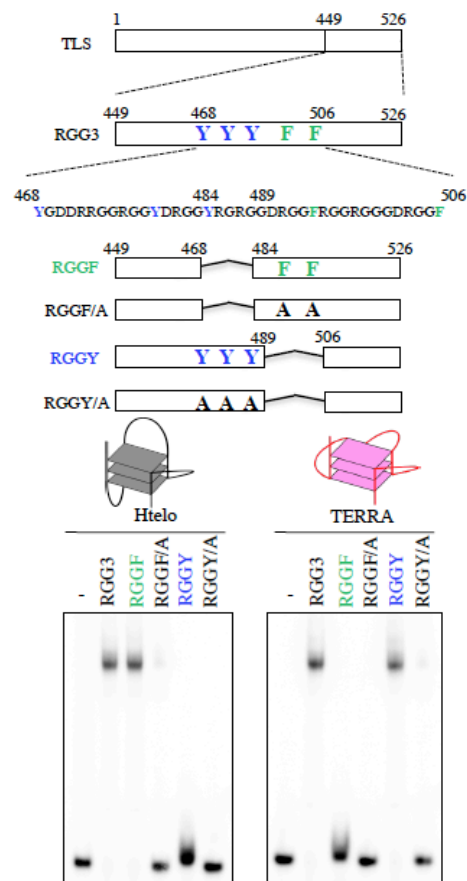


図1 開発したグアニン四重鎖結合タンパク質

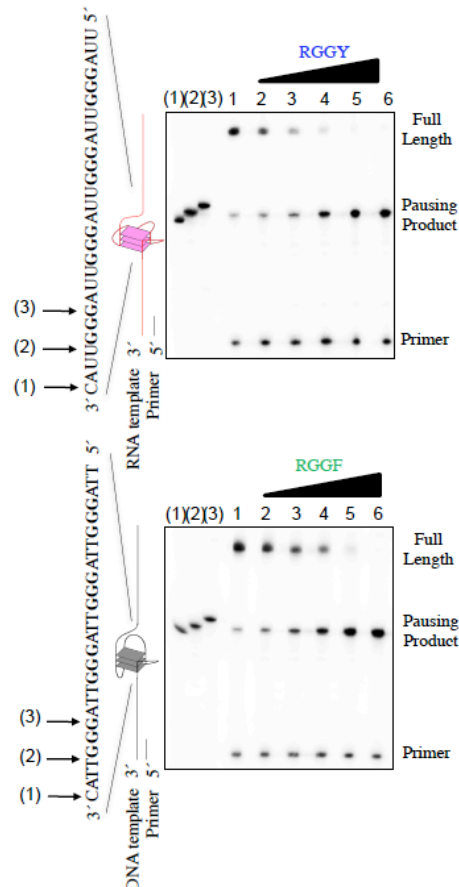


図2 グアニン四重鎖-タンパク質複合体の安定性

chIP 法によって調べた。このとき使用した抗体は、ヒストン H3 の 9 番目のリシンとヒストン H4 の 20 番目のリシンのそれぞれのトリメチル化を認識する。

4. 研究成果

(1) グアニン四重鎖 DNA と RNA に対してそれぞれ特異的に結合する人工タンパク質を開発するために、これまで申請者が報告している TLS の RGG3 領域をもとに作成した(図 1)。この RGG3 領域はアルギニン-グリシン-グリシンの繰り返し配列を多く含み、この C 末端側にチロシンもしくはフェニルアラニンが存在する。この芳香族アミノ酸がグアニン四重鎖 DNA と RNA の結合性に重要であることを既に見出しているため、それぞれの領域を欠損させたタンパク質である RGGF と RGGY を作成し、それぞれの核酸結合性をゲルシフトアッセイ法によって解析した。その結果、RGGF はグアニン四重鎖 DNA と、RGGY はグアニン四重鎖 RNA とそれぞれ特異的に結合することがわかった。また、それぞれの芳香族アミノ酸をアラニンに置換すると結合性が低下することから、芳香族アミノ酸がグアニン四重鎖結合性に重要であることがわかった。

(2) RGGF と RGGY はグアニン四重鎖に結合して構造を安定化させるか不安定化させるか調べるために、逆転写酵素ストップアッセイとポリメラーゼストップアッセイを行った(図 2)。もしタンパク質によってグアニン四重鎖構造が安定化されるならば、その構造が形成される部位で合成が停止した産物が増加する。解析を行なった結果、RGGY はグアニン四重鎖 RNA を、RGGF はグアニン四重鎖 DNA を安定化させることがわかった。

(3) 細胞内における RGGF と RGGY の結合性を調べるために、それぞれのタンパク質を細胞内で高発現させ、結合する核酸を解析した(図 3)。特に、テロメア領域において、テロメア DNA はグアニン四重鎖 DNA を形成し、そこから転写された TERRA はグアニン四重鎖 RNA を形成することが知られているので、それぞれとの結合性を DNachIP 法 RNAchIP 法により解析した。その結果、試験管内の結合性と同様に細胞内においても、RGGF はグアニン四重鎖 DNA であるテロメア DNA と、RGGY はグアニン四重鎖 RNA である TERRA と結合することがわかった。

(4) テロメア領域におけるグアニン四重鎖 DNA と RNA のクロマチン構造に対する機能を解明するために、RGGF と RGGY を高発現させたときのヒストン修飾を解析した(図 4)。特に、テロメアは、ヒストン H3 の 9 番目のリシン (H3K9me3) とヒストン H4 の 20 番目のリシン (H4K20me3) のそれぞれのトリメチル化がヘテロクロマチンの指標として知られている。そこで、この 2 つの修飾の変化に

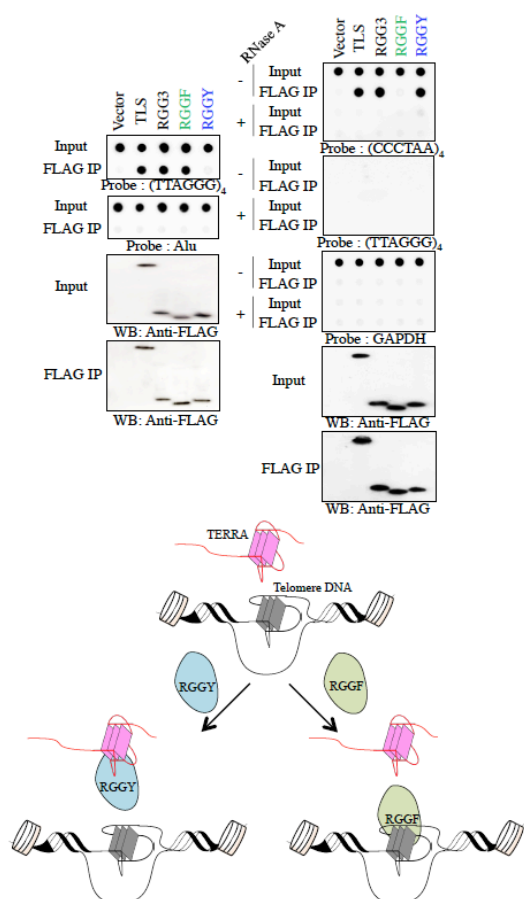


図3 開発したグアニン四重鎖結合タンパク質の細胞内結合性

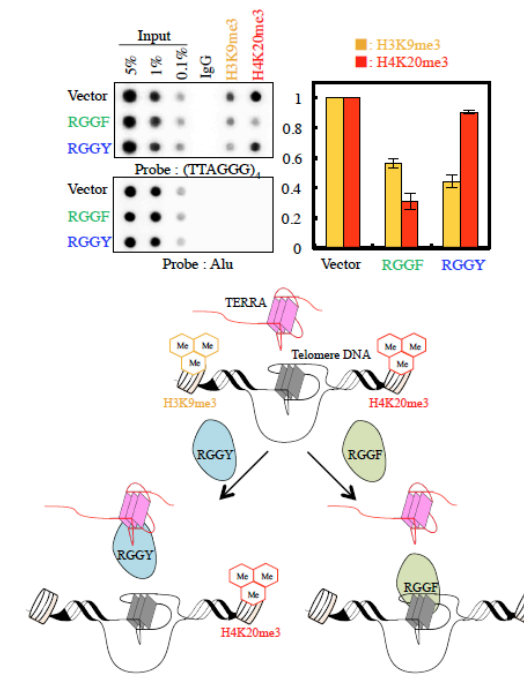


図4 グアニン四重鎖結合タンパク質によるヒストン修飾阻害

について調べてみた結果、RGGF はこの 2 つのメチル化を阻害するが、RGGY は H3K9me3 のみを阻害することがわかった。これらの結果から、テロメアにおけるグアニン四重鎖 DNA と RNA の機能は異なることがわかった。

(5) 今回の研究によって開発された新規グアニン四重鎖 DNA、RNA 結合分子はテロメア

だけにとどまらずゲノム中に存在すると考えられているグアニン四重鎖の機能解明やこの構造を標的とした医薬品の開発につながるかと期待できる。

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 6 件)

1. Contiguous 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone obstructs DNA synthesis by DNA polymerases α , β , η , ι , κ , REV1, and Klenow Fragment exo-, but not by DNA polymerase ζ . Suzuki, M.; Kino, K.; Kawada, T.; Oyoshi, T.; Morikawa, N.; Kobayashi, T.; Miyazawa, H. *J. Biochem.* **2016**, 159, 323-329. 査読有
2. G-quadruplex DNA- and RNA-specific-binding proteins engineered from the RGG domain of TLS/FUS. Takahama, K.; Miyawaki, A.; Shitara, T.; Mitsuya, K.; Morikawa, M.; Hagihara, M.; Kino, K.; Yamamoto, A.; Oyoshi, T.; *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2564-2569. 査読有
3. Calculation of the HOMO localization of Tetrahymena and Oxytricha telomeric quadruplex DNA. Morikawa, M.; Kino, K.; Oyoshi, T.; Suzuki, M. Kobayashi, T.; Miyazawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 3359-3362. 査読有
4. Analysis of guanine oxidation products in double-stranded DNA and proposed guanine oxidation pathway in single-stranded, double-stranded or quadruplex DNA. Morikawa, M.; Kino, K.; Oyoshi, T.; Suzuki, M. Kobayashi, T.; Miyazawa, H. *Biomolecules* **2014**, 4, 140-159. 査読有
5. Tailor-made designer helical peptides inducing mitochondrial cell death without necrosis. Nogami, K.; Takahama, K.; Okushima, A.; Oyoshi, T.; Fujimoto, K.; Inoue, M. *ChemBioChem* **2014**, 15, 2571-2576. 査読有

6. Supramolecular gel electrophoresis of acidic native proteins. Munenobu, K. Hase, T. Oyoshi, T.; Yamanaka, M. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 9924-9929. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 八木涼太、大吉崇文「ガン遺伝子 TLS のグアニン四重鎖結合性の解析」日本化学会第 97 春季年会 2017 年 3 月 16 日、慶應義塾大学 (神奈川県・横浜市)
2. 大吉崇文、早野貴大、岩波文佳「グアニン四重鎖結合タンパク質による RNA 凝集体形成機構」第 10 回バイオ関連化学化学シンポジウム 2016 年 9 月 7 日、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
3. 八木涼太、高濱謙朗、大吉崇文「ガン遺伝子 TLS のグアニン四重鎖結合性の解析」日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都府・京田辺市)
4. 早野貴大、宮脇有紗、大吉崇文「グアニン四重鎖結合タンパク質 TLS によるクロマチン構造制御機構の解明」日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都府・京田辺市)
5. 奥島彩子、高濱謙朗、大吉崇文「グアニン四重鎖結合タンパク質 TAF15 によるエピジェネティクス制御機構」日本化学会第 96 春季年会 2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都府・京田辺市)
6. 大吉崇文、高濱謙朗、奥島彩子、黒川理樹「連続したグアニン四重鎖を含む長鎖非コード RNA によるエピジェネティクス制御機構」第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
7. 大吉崇文、高濱謙朗、奥島彩子「グアニン四重鎖を介したエピジェネティクス制御機構」第 9 回バイオ関連化学シンポジウム 2015 年 9 月 10 日、熊本大学 (熊本県・熊本市)
8. 宮脇有紗、高濱謙朗、大吉崇文「グアニン四重鎖 DNA と RNA に選択的に結合するタンパク質の開発」日本化学会第 95 春季年会 2015 年 3 月 26 日、日本大学 (千葉県・船橋市)
9. 高濱謙朗、奥島彩子、大吉崇文「核酸結合タンパク質 TAF15 のグアニン四重鎖結合性」日本化学会第 95 春季年会 2015 年 3 月 26 日、日本大学 (千葉県・船橋市)
10. 大吉崇文、高濱謙朗、奥島彩子、萩原正規、三津谷佳大「グアニン四重鎖結合タンパク質の開発」第 8 回バイオ関連化学シンポジウム 2014 年 9 月 11 日、岡山大学 (岡山県・岡山市)

[図書] (計 2 件)

1. Long noncoding RNAs: Characterization of G-quadruplex DNA- and RNA-binding protein. **Oyoshi, T.** *Springer* **2015**, 57-65. 査読有
2. Biological relevance & therapeutic applications of DNA- & RNA-quadruplexes: Assessing the biological relevance of G-quadruplexs in telomeres by specific quadruplex-binding proteins. **Oyoshi, T.** *Future Science* **2015**, 72-83. 査読有

()

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~stohyos/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者