



分野：自然科学系

キーワード：機能生物科学、ケミカルバイオロジー、プロテオーム解析、非標準 DNA、核小体、SDGs

分子の「指紋」捜査によって新規非標準 DNA 結合タンパク質を同定 —タンパク質が DNA に触れた履歴を残す新技術—

【研究成果のポイント】

- ◆ タンパク質が DNA に触れた履歴を指紋のように残す技術を開発し、その履歴をもつタンパク質を捕捉して分析することが可能に
- ◆ これにより、核小体タンパク質ヌクレオリンが特殊な DNA 高次構造に結合し、構造を緩めることを発見
- ◆ 同様の手法による、疾患関連核酸等への応用と新規因子を標的とした創薬研究への展開に期待

❖ 概要

大阪大学大学院基礎工学研究科の山元淳平准教授、大学院生の伴勇輝さん(博士後期課程3年)、東北大学学際科学フロンティア研究所の佐藤伸一准教授らの研究グループは、**核小体構成タンパク質として知られているヌクレオリンが非標準 DNA^{※1} 構造の一つであるシトシン四重鎖(i-motif)に結合し、その構造を緩めることを世界で初めて明らかにしました。**

今回、山元准教授らの研究グループは、タンパク質が DNA に触れた履歴をタンパク質上に残し、その履歴をもつタンパク質を選択的に濃縮した後に質量分析に供する指紋標的濃縮法^{※2} を開発しました。この方法によって非標準 i-motif 構造に結合するタンパク質をヒト細胞中に存在するタンパク質群から網羅的に探索し、候補タンパク質の性質解析を行なったところ、細胞中の核小体^{※3} に存在するヌクレオリンと呼ばれるタンパク質が i-motif 構造に結合し、その構造を緩めることを解明しました。これにより、**非標準 DNA 構造が生体プロセスを調節する分子機構の解明が期待されます。**

本研究成果は、英国科学誌「Nucleic Acids Research」に、2024 年11月19日(火)9時(日本時間)に公開されます。

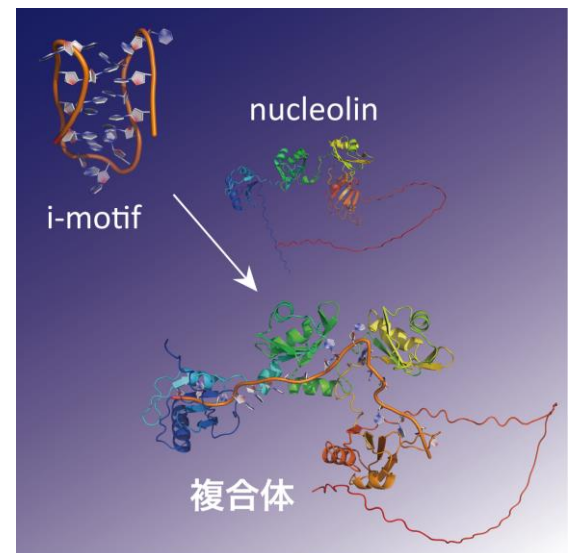


図 ヌクレオリン-DNA 複合体のモデル図

❖ 研究の背景

生体の遺伝情報を担う DNA は二重らせん構造をとりますが、グアニン四重鎖やシトシン四重鎖などの非標準 DNA と呼ばれるものは特殊な構造をとることが知られています。ゲノム中に生じる非標準 DNA 構造は転写や複製等の様々な生体プロセスの調節に関与することが知られており、非標準 DNA 構造を認識するタンパク質因子がその第一段階を担うことから、これら因子の探索が盛んに行われてきました。従来、非標準 DNA を担持したビーズ担体を用いることでこれら DNA に結合するタンパク質を濃縮し質量分析によって同定する手法が採用されており、グアニン四重鎖に結合するタンパク質の多くはこの方法によって発見されてきました。しかし、非標準 DNA のなかでも i-motif と呼ばれるシトシン四重鎖に結合するタンパク質についてはほとんど解明されていませんでした。

❖ 研究の内容

今回、研究グループでは、指紋標的濃縮法と名付けた手法を開発し、i-motif を認識するタンパク質を探索しました。化学修飾を導入した i-motif 形成 DNA をヒト由来細胞抽出液と混ぜることで、i-motif 構造に結合、もしくは近接したタンパク質に対して化学修飾を導入しました。化学修飾を有するタンパク質を選択的に捕捉・濃縮して質量分析を行ったところ、既知の i-motif 結合タンパク質の他、多数の i-motif 結合候補タンパク質を得ました。候補タンパク質群の中から核小体構成タンパク質の一つであるヌクレオリンに注目し i-motif 結合能を評価したところ、i-motif 構造に対して結合し、さらにその構造を緩めることを明らかにしました。ヌクレオリンが存在する細胞内構造体である核小体にはタンパク質合成に関与するリボソーム DNA が存在し、リボソーム DNA には i-motif 形成の可能性がある DNA 配列が多数認められています。今回、ヌクレオリンと i-motif の関係性について新たに明らかになったことから、今後非標準核酸が核小体で果たす機能について知見が深まることが期待されます。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究成果により、指紋標的濃縮法の有用性を示すことができました。今回開発した手法を疾患に関連する核酸に適用することで、疾患に関連する新規タンパク質因子の探索への応用が期待されます。ひいては、それら新規因子を標的とした創薬研究のシーズ開拓へ貢献します。

❖ 特記事項

本研究成果は、2024 年11月19日(火)9時(日本時間)に英国科学誌「Nucleic Acids Research」(オンライン)に掲載されます。

タイトル: “Profiling of i-motif binding proteins reveals functional roles of nucleolin in regulation of high-order DNA structures”

著者名: Yuki Ban, Yuka Ando, Yuma Terai, Risa Matsumura, Keita Nakane, Shigenori Iwai, Shinichi Sato and Junpei Yamamoto

DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1001>

なお、本研究は、上原記念生命科学財団・研究助成費(研究代表者: 山元淳平准教授)、武田科学新興財団・ライフサイエンス研究助成費(研究代表者: 山元淳平准教授)、日本学術振興会 学術変革領域(A)「物質共生」(研究代表者: 佐藤伸一准教授)、およびJST創発的研究推進事業(研究代表者: 山元淳平准教授、佐藤伸一准教授)の一環として行われました。

❖ 用語説明

※1 非標準 DNA

従来 DNA は塩基対形成に基づく二重らせん構造を形成しますが、二重らせん構造以外の高次構造を形成することがあり、これを非標準 DNA と言います。よく見られる非標準 DNA の例として、グアニンおよびシトシンが豊富な DNA 配列でそれぞれ形成されるグアニン四重鎖(G-quadruplex, G4)やシトシン四重鎖(intercalated motif, i-motif)が挙げられます。これら非標準 DNA はテロメア領域やタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域など、ゲノムの重要な領域に多く見られ、細胞内プロセスへの関与が注目されています。

※2 指紋標的濃縮法

目的の DNA 配列に、反応性の高いリンカーを介して炭素-炭素三重結合(アルキン)を有する部位を導入した化学修飾 DNA を調製し、これをタンパク質の化学修飾に用います。化学修飾 DNA に対してタンパク質が結合もしくは近接すると、タンパク質中のアミノ酸側鎖が DNA 上の反応性リンカーと反応し、一定の割合でアルキンがタンパク質側へ移動します。つまり、タンパク質上のアルキンの存在は DNA に近付いたという”指紋”となります。この指紋の存在を目印として追加の化学反応を行い、磁気ビーズを用いて選択的に濃縮して質量分析測定に供することで、特定の DNA に結合・近接したタンパク質群を網羅的に同定します。

※3 核小体

細胞の核内に存在する球状の構造体であり、タンパク質合成装置であるリボソームの生合成が主に行われています。中にはリボソーム DNA が格納されており、これが活発に転写され、リボソーム生合成に必要なリボソーム RNA が供給されます。これらを通じて、細胞の成長やタンパク質の合成に重要な役割を果たしています。

【山元准教授のコメント】

本研究にて開発した指紋標的濃縮法は非標準 DNA 構造に限らず、さまざまな核酸に対して使用できるポテンシャルがあります。現在、疾患関連核酸構造に結合する因子の探索を行っており、疾患の分子機構解明を通じて生命科学の発展に貢献したいと考えています。また、細胞内や生体内で本手法が適用できれば、昨今隆盛なゲノム編集技術や核酸医薬の作用機序解明につながる可能性もあり、今後創薬への応用展開を期待しています。

❖ SDGs目標



❖ 参考 URL

山元淳平准教授 研究者総覧

URL <https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/3767f0c02246eac7.html>



東北大学
TOHOKU UNIVERSITY



国立大学法人 大阪大学
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-1
TEL: 06-6877-5111 (代)
www.osaka-u.ac.jp

Press Release

❖ 本件に関する問い合わせ先

＜研究に関するお問い合わせ＞

大阪大学 大学院基礎工学研究科 准教授 山元淳平(やまもと じゅんぺい)

TEL:06-6850-6240 FAX: 06-6850-6240

E-mail: yamamoto.junpei.es@osaka-u.ac.jp

東北大学 学際科学フロンティア研究所 准教授 佐藤伸一(さとう しんいち)

TEL:022-795-5262

E-mail: shinichi.sato.e3@tohoku.ac.jp

＜広報に関するお問い合わせ＞

大阪大学 基礎工学研究科 庶務係

TEL:06-6850-6131 FAX: 06-6850-6477

E-mail: ki-syomu@office.osaka-u.ac.jp

東北大学 学際科学フロンティア研究所 企画部 特任准教授 藤原英明(ふじわら ひであき)

TEL:022-795-5259

E-mail: hideaki@fris.tohoku.ac.jp