

テロメア結合蛋白質とテロメラーゼによるテロメア調節機構

《研究の概要》

真核生物の染色体末端のテロメアは、G 塩基に富む反復配列を有する 2 本鎖 DNA 領域と 3' 末端の突出した 1 本鎖 DNA 領域からなる。正常細胞では細胞分裂ごとにテロメアは短縮するが、癌細胞では細胞分裂を繰り返してもテロメアは保たれる。テロメアは細胞の癌化や老化と密接な関係にあると考えられている。テロメア調節には、テロメア伸長酵素であるテロメラーゼと共に、テロメアの 2 本鎖 DNA 領域及び 3' 末端の 1 本鎖 DNA 領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。本研究課題では、テロメアの 1 本鎖 DNA 領域に結合する蛋白質である Pot1 蛋白質がテロメア 1 本鎖 DNA 領域及びテロメラーゼと相互作用しながら、テロメアを統合的に調節する機構を解明することを目的とした。

テロメア 1 本鎖 DNA 領域との特異的結合に必要なドメイン Pot1DBD (Pot1 の N 末端側 182 アミノ酸残基) を調製し、Pot1DBD の 3 次元構造を解析したところ、3 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドを有し、OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding) fold のファミリーに属することが明らかとなった。長さおよび塩基配列の異なる一連の変異型テロメア 1 本鎖 DNA と野生型 Pot1DBD の結合能をゲルシフト法で解析し、G2:d (GGTTAC) が Pot1DBD との特異的結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基配列であることが明らかとなった。Pot1DBD と G2 の複合体の 3 次元構造を解析し、G2 の塩基と水素結合で結合する Pot1DBD 側のアミノ酸と、G2 の塩基とスタッキング及び van der Waals 力で相互作用する Pot1DBD 側のアミノ酸を明らかにした。これらのアミノ酸に変異を導入した Pot1DBD の点変異型蛋白質を作製した。ゲルシフト法による G2 との結合能の解析より、5 個のアミノ酸 (T62、D64、K124、F88、L122) がテロメア DNA 認識に顕著に寄与した。X 線結晶構造で、T62、D64、K124 各々と同じ塩基に水素結合で結合すると考えられる K90、S58、D125 各々に変異導入しても結合能は変化しなかった。同じ塩基に結合する 2 つのアミノ酸の間でも、テロメア DNA 認識への寄与の度合は顕著に異なることが明らかとなった。DNA 認識機構解明には、X 線結晶構造解析のみでは十分でなく、点変異型蛋白質の解析が必須であることを示唆している。

テロメア DNA 配列 4G4:d (G₄TTAC)₄ が 150mM Na⁺イオン存在下においてアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を形成することが明らかとなった。4G4 のアンチパラレル型 4 本鎖に Pot1DBD を添加した際の CD スペクトル変化、及び 5' と 3' 末端各々を蛍光色素と消光色素で標識した 4G4 のアンチパラレル型 4 本鎖に Pot1DBD を添加した際の蛍光スペクトル変化から、Pot1DBD がアンチパラレル型 4 本鎖をほどく活性を有することが明らかとなった。アンチパラレル型 4 本鎖がテロメラーゼのテロメア DNA 伸長活性を阻害するという既報の知見を考慮すると、Pot1DBD が 4 本鎖 DNA 構造をほどく活性は、テロメアラーゼを介したテロメア伸長を制御する上での重要な因子であると考えられる。

また、Pot1 の C 末端領域と結合する蛋白質として snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) の 1 つである Gar1 蛋白質を見出し、Pot1 の C 末端領域と Gar1 蛋白質

質が結合することが明らかとなった。ヒト Gar1 がヒトテロメラーゼの RNA 成分と結合することが報告されており、Gar1 は生物種間で保存性が高いため、種を問わず Gar1 がテロメラーゼの RNA 成分と結合することが期待される。つまり、Pot1 の C 末端領域が Gar1 と結合することによりテロメラーゼをテロメア上にリクルートし、テロメア長を調節すると考えられる。つまり、Pot1 は N 末端領域でテロメアのアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどこき、テロメラーゼがテロメアを伸長できる場を作り、C 末端領域で Gar1 を介してテロメラーゼをテロメア上にリクルートするというモデルが考えられる。

鳥越 秀峰	東京理科大学理学部 応用化学科准教授	テロメア結合蛋白質とテロメア DNA・テロメラーゼ の相互作用解析
緒方 一博	横浜市立大学医学部 生化学講座教授	テロメア結合蛋白質とテロメア DNA の相互作用解 析

研究報告

I 研究目的

真核生物の染色体末端のテロメアは、G 塩基に富む反復配列を有する 2 本鎖 DNA と 3' 末端の突出した 1 本鎖 DNA からなる。正常細胞では細胞分裂ごとにテロメアは短縮するが、癌細胞では細胞分裂を繰り返してもテロメアは保たれる。テロメアは細胞の癌化や老化と密接な関係にあると考えられている。テロメア調節には、テロメア伸長酵素であるテロメラーゼと共に、テロメアの 2 本鎖 DNA 領域及び 3' 末端の 1 本鎖 DNA 領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。

テロメアの 2 本鎖 DNA 領域に結合する蛋白質のテロメア認識機構について、申請者は本研究課題以前に解析を進めてきた。一方、テロメアの 1 本鎖 DNA 領域に結合する蛋白質については、これをコードする遺伝子が近年クローニングされたばかりであり、テロメアの 2 本鎖 DNA 領域に結合する蛋白質に比べて解析が遅れている。そこで本研究課題では、テロメアの 1 本鎖 DNA 領域に結合する蛋白質である Pot1 蛋白質がテロメア 1 本鎖 DNA 領域及びテロメラーゼと相互作用しながら、テロメアを統合的に調節する機構を解明することを目的とした。

このようにして得られる知見は、テロメア調節機構そのもののみならず、テロメア調節機構と密接な関係にある細胞の老化や癌化の機構を解明する上において必要不可欠であり、ひいては細胞の老化や癌化の視点から癌治療の方法を開発する上で必要性がきわめて高い。

本研究課題は、テロメア調節機構を 3 次元構造レベルで捉える構造生物学的解析からアプローチする点でユニークであり、従来の細胞生物学的・遺伝学的解析では見過ごされてきた、テロメア調節機構の新しい知見を見つけることが期待される。3 次元構造レベルの知見は、テロメア調節機構が関与する癌化や老化などの重要な生命現象を人工的に制御する医薬品開発などを行う上で必要不可欠であり、医薬品開発に端を発する幅広い分野で多大な寄与が期待される。

また本研究課題は、従来ほとんど手つかずであったテロメア結合蛋白質とテロメラーゼとの相互作用について解析する。転写などにおいて重要性が認識されながら、テロメア調節機構の研究においては従来未開拓であった蛋白質-蛋白質相互作用の重要性を提示することとなり、新たな研究分野の開拓につながることを期待される。

II 研究計画および材料と方法

オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドは日清紡から購入し、精製を必要とする時は Wakoshibi DNA カラムを用いた逆相 HPLC により精製した。蛍光標識したオリゴヌクレオチドは Thermo Electron (ドイツ) から購入した。精製したオリゴヌクレオチドを実験用緩衝液に溶解させ、95°C

で 10 分間熱処理後、室温まで徐冷し、実験前に最低 2 日間インキュベートした。オリゴヌクレオチドの濃度は、260nm の吸光度から算出した。

Pot1DBD の発現用プラスミドの構築

Pot1 の N 末端側 182 アミノ酸残基がテロメア 1 本鎖 DNA 領域との特異的な結合に必要なドメイン (DBD) であることを、本研究課題を開始する前に既に明らかにしていた。この Pot1DBD をコードする DNA 断片を cDNA ライブラリー (Clontech) から KOD DNA ポリメラーゼ (Toyobo) を用いた PCR により増幅した。増幅した PCR 断片を EcoRI と SmaI で切断後、pGEX-6P-1 ベクター (Amersham Biosciences) の EcoRI と SmaI 部位の間に挿入した。構築したプラスミドの EcoRI と SmaI 部位間の塩基配列は、ダイデオキシ法による塩基配列解析で確認した。これを Pot1DBD の発現用プラスミドとした。

一連の点変異型 Pot1DBD の発現用プラスミドの構築

Pot1DBD をコードする遺伝子への点変異導入には、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いた。構築した点変異型 Pot1DBD をコードする遺伝子の塩基配列は、ダイデオキシ法による塩基配列解析で確認した。

構築した発現用プラスミドの大腸菌内での発現と発現した蛋白質の精製

野生型及び点変異型 Pot1DBD 各々の発現用プラスミドを大腸菌 BL21 に導入した。アンピシリン 50 mg/l とグルコース 2% (w/v) を含む LB 液体培地にシングルコロニーを植え、25°C で培養した。OD₆₀₀=1.0 において最終濃度が 0.4mM になるように IPTG を添加し、目的蛋白質の発現を誘導した。IPTG 添加 5 時間後に集菌し、BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) を菌 1g 当たり 2ml と Benzonase Nuclease (Novagen) を BugBuster 1ml 当たり 25 ユニット加え、大腸菌を破碎した。室温で 20 分間インキュベートした後、遠心によって細胞残屑を除去した。樹脂ベッド体積の 10 倍の 1×PBS (10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 2.7mM KCl, pH7.3) で平衡化させたグルタチオンセファロース 4B アフィニティカラム (Amersham Bioscience) に、GST 融合蛋白質を含む破碎上清を添加した。樹脂ベッド体積の 30 倍の 1×PBS で洗浄し、非特異吸着成分を除去した。樹脂ベッド体積と同体積のグルタチオン溶出緩衝液 (50mM Tris-HCl, 10mM グルタチオン, 10mM DTT, pH8.0) を加えることにより目的の GST 融合蛋白質を溶出し、この操作を 4 回繰り返した。得られた GST 融合蛋白質から GST を除去するために、溶出分画に PreScission Protease (Amersham Biosciences) を GST 融合蛋白質 100 μg 当たり 2 ユニット加え、酵素切断用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10mM DTT, pH7.0) 中 4°C で終夜インキュベートした。AKTA purifier system (Amersham Biosciences) において、緩衝液 A (50mM Tris-HCl, 1mM DTT, pH7.5) で平衡化させた HiPrep 16/10 CM Sepharose Fast Flow カラム (Amersham Biosciences) にこの酵素切断液を添加し、0 M-1.0 M NaCl の直線勾配で目的蛋白質を分離・溶出した。最終精製標品の N 末端のアミノ酸配列と分子量を、各々アミノ酸シーケンサーと質量分析計を用いて解析した。

ゲルシフト法

[γ - ^{32}P] ATP (6000Ci/mmol, Amersham Biosciences) により T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Toyobo) の酵素反応で、基質のオリゴヌクレオチドの 5' 末端を標識した。Sephadex G-50 Fine 樹脂を充填したマイクロスピンドルろ過カラム (Bio-Rad) を用いてこれを精製し、未反応の [γ - ^{32}P] ATP を除去した。標識したオリゴヌクレオチドは、95°C で 10 分間熱処理後、室温まで徐冷し、最低 2 日間インキュベートした。 ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドに未標識のオリゴヌクレオチドを加えて最終濃度が 5 μM になるように調節した後、上記の熱処理等の操作を行った。野生型及び点変異型 Pot1DBD との相互作用を解析するために、蛋白質と ^{32}P 標識オリゴヌクレオチドとを緩衝溶液 (20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT) 中で混合し、25°C で 30 分間インキュベートした。これにローディング緩衝液を 1 μl 加えた後、10% の未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。電気泳動は、0.5xTBE (89mM Tris-borate、2mM EDTA) 中 10V/cm で 4°C、約 3-5 時間行った。泳動後、ゲルを乾燥させ、イメージアナライザー BAS2000 (FujiFilm) でゲルを解析した。

円偏光二色性 (CD)

DNA 単独、蛋白質単独、DNA-蛋白質複合体の CD スペクトルは、パソコンと繋いだ Jasco J-725 分光偏光計で測定した。測定用試料を 20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT に溶解し、23°C で測定した。セル長は 1cm、走査速度は 50nm/min (蛋白質単独の測定では 10nm/min) とし、各スペクトルは 8 回の積算の平均により得た。DNA 濃度は 4Gn (n=2、3、4) が 3 μM であり、蛋白質濃度は 5 μM であった。DNA-蛋白質複合体の測定においては、野生型及び点変異型 Pot1DBD のいずれかを DNA に対して添加し、測定前に 25°C で 60 分間インキュベートした。[蛋白質のモル数/DNA のモル数] の比率を段階的に変化させて、CD スペクトルの変化を解析した。

Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

FRET は、パソコンと繋いだ Jasco FP-6300 分光蛍光光度計で測定した。測定用試料を 20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT に溶解し、25°C で測定した。1cm \times 1cm のクォーツキュベットを用いた。FRET のドナー色素である 6-carboxyfluorescein (6-FAM) の最大吸収波長 495nm に、発光スペクトルの励起波長をセットした。DNA 濃度は 100nM であった。野生型及び点変異型 Pot1DBD のいずれかを DNA に対して添加し、測定前に 25°C で 60 分間インキュベートした。[蛋白質のモル数/DNA のモル数] の比率を段階的に変化させて、蛍光スペクトルの変化を解析した。

酵母 two-hybrid 法

酵母 two-hybrid 法は MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) を用いて製造社の指示する方法に従った。具体的には、Bait プラスミドとして GAL4 DBD と Pot1 の部分欠失変異体が融合蛋白質として発現するようなプラスミドを構築して用いた。また、Prey プラスミドとして GAL4 AD と cDNA ライブラリー蛋白質が融合蛋白質として発現するようなプラスミドを構築して用いた。Bait プラスミドと Prey プラスミドを出芽酵母 AH109 株

へ同時にトランスフォーメーションし、高度選択用寒天培地 SD (-Ade、-His、-Leu、-Trp)、SD (-Ade、-His、-Leu、-Trp、X- α -Gal) へプレーティングし数日間 30°C で培養した。出芽酵母 AH109 株はレポーター遺伝子 *Ade2*、*His3*、*LacZ*、*Me11* を有しており、レポーター遺伝子 *Ade2*、*His3* の発現により、高度選択用寒天培地で生育できる。またレポーター遺伝子 *Me11* から発現する α -ガラクトシダーゼの酵素活性により、培地に添加した基質である X- α -Gal を加水分解して緑色に発色する。この原理に基づいて、Bait プラスミドの発現産物と Prey プラスミドの発現産物が相互作用する陽性クローンを判別した。Prey プラスミドに cDNA ライブラリーが挿入されたものを用いた場合は、生育してきた陽性コロニーからプラスミドを抽出した。得られたプラスミドを大腸菌へ形質転換し、プラスミドを精製した。プラスミドの塩基配列を決定することにより、Pot1 の部分欠失変異体と相互作用する蛋白質の同定を行った。

GST プルダウンアッセイ

大腸菌内で目的の GST 融合蛋白質を発現させ、BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen) を菌 1g 当たり 5ml と Protease inhibitor cocktail for use with bacterial cell extracts (Sigma) を菌 1g 当たり 0.25ml と 1mM PMSF (Benzylsulfonyl Fluoride) (Wako) と 1mM DTT を含む溶液で菌を破碎し、4°C で 20 分間ローテーターにより回転させながらインキュベートした後、16000 回転において 4°C で 20 分間遠心し、上清を回収した。これを可溶分画とした。ベッド体積が 150 μ l のグルタチオンセファロース 4B アフィニティカラム (Amersham) をベッド体積の 10 倍の 1×PBS (140mM NaCl、2.7mM KCl、10.1mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、pH7.3、1mM DTT) で平衡化した後、大腸菌の可溶分画をチャージしてカラム管を閉じた。このカラム管の内容物を 4°C で 13 時間ローテーターにより穏やかに混和させながら、樹脂上に固定化させた。その後、樹脂をスピンドウンし、素通り分画を回収した。更に、1.5ml の Wash buffer (1mM PMSF、75 μ l Protease inhibitor cocktail、1mM DTT/0.1% PBST) でカラムを 3 回洗浄した。その後、*in vitro* 蛋白質合成系により調製した Myc-spPot1C 融合蛋白質を Binding buffer (20mM Tris-HCl、0.2% Triton X-100、2mM EDTA、150mM NaCl、1mM PMSF、pH7.4) で 200 倍希釈し、GST 融合蛋白質を固定化した樹脂と 4°C で 2 時間ローテーターにより穏やかに混和させながら、樹脂上に固定化させた。その後、樹脂をスピンドウンし、素通り分画を回収した。更に、1.5ml の Wash buffer でカラムを 3 回洗浄した。カラム管から樹脂を取り出し、75 μ l の 2×sample buffer を加え、100°C で 5 分間煮沸した。この試料をトリシン SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動し、ウェスタンブロッティングと免疫染色により検出した。

免疫沈降法

in vitro 蛋白質合成系で目的蛋白質を合成し、相互作用を検出したい目的蛋白質同士 Myc-spPot1C 10 μ l と HA-spGar1 90 μ l を 4°C で 1 時間混和させた。Protein A beads (Clontech) 3 μ l を 500 μ l の 0.1% PBST で 3 回平衡化した。非特異的吸着を減少させるために、目的蛋白質同士を混和させた溶液を 500 μ l の 0.1% PBST で希釈し、平衡化済みのビーズと共に 4°C で 30 分間ローテーターにより混和し、ビーズ上に非特異吸着をさせた。その後、遠心して上清を回収し、沈降用抗体である抗 Myc タグポリクロナール抗体 4

μl を加え、 4°C で 1 時間インキュベートした。この間に、新しいビーズ $3\mu\text{l}$ を $500\mu\text{l}$ の 0.1% PBST で 3 回平衡化し、0.1% BSA 1ml と共に 4°C で 30 分間ローテーターにより混和し、ビーズをブロッキングした。その後、1ml の 0.1% PBST で 3 回洗浄した。抗 Myc タグポリクロナール抗体とインキュベートした上清にブロッキングしたビーズを加え、 4°C で 1 時間ローテーターにより混和した。その後、遠心して上清を素通り分画として回収し、ビーズを 1ml の Wash buffer (150mM NaCl、50mM Tris、0.1% Triton X-100、pH8.0) で 5 回洗浄した。得られたビーズに $2\times$ sample buffer を $20\mu\text{l}$ 加え、 80°C で 5 分間煮沸した。この試料をトリシン SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動し、ウェスタンブロッティングと免疫染色により検出した。

III 研究成果

1. Pot1DBD 単独の高次構造に関する解析

Pot1 の N 末端側 182 アミノ酸残基 (1-182 アミノ酸) がテロメア 1 本鎖 DNA 領域との特異的な結合に必要なドメイン (DBD) であることを、本研究課題を開始する前に既に明らかにしていた。また、大腸菌内での大量発現系を用いた Pot1DBD の調製方法についても、本研究課題を開始する前に既に確立していた。この系を用いて Pot1DBD を調製し、Pot1DBD の円偏光二色性 (CD) スペクトルを 20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT 中で室温付近において測定したところ、Pot1DBD が α ヘリックスと β シート構造を有することが明らかとなった。さらに、Pot1DBD の 3 次元構造を詳細に解析したところ、3 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドを有することが明らかとなった。また、Pot1DBD の 3 次元構造は OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding) fold のファミリーに属することも明らかとなった。

2. Pot1DBD とテロメア 1 本鎖 DNA の結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基に関する解析

Pot1DBD との結合に必要なテロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基を明らかにするために、長さおよび塩基配列の異なる一連の変異型テロメア 1 本鎖 DNA のオリゴヌクレオチドを DNA 合成機で合成し、逆相 HPLC で精製した。これらの変異型テロメア 1 本鎖 DNA と野生型 Pot1DBD との結合能をゲルシフト法で解析した。d (GGTTAC) が Pot1DBD との特異的な結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基配列であることが明らかとなった。6 塩基いずれも他の塩基に置換すると Pot1DBD との結合能が極端に低下した。

3. Pot1DBD とテロメア 1 本鎖 DNA 領域との複合体の 3 次元構造解析

2. より、d (GGTTAC) が Pot1DBD との特異的な結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基配列であることが明らかとなった。そこで、Pot1DBD と d (GGTTAC) の複合体の 3 次元構造を詳細に解析したところ、Pot1DBD 側の K124 及び D125 が d (GGTTAC) 側の G1 と、Pot1DBD 側の T111 及び S123 が d (GGTTAC) 側の G2 と、Pot1DBD 側の T62 及び K90 が d (GGTTAC) 側の T3 と、Pot1DBD 側の S58 及び D64 が d (GGTTAC) 側の T4 と、Pot1DBD 側の Y115 及び Q120 が d (GGTTAC) 側の C6 と水素結合で特異的に結合していることが明らかとなった (図 1)。また、Pot1DBD 側の L122 が d (GGTTAC) 側の G1 及び G2 と、Pot1DBD 側の F88 が d

(GGTTAC) 側の T3 及び T4 と、Pot1DBD 側の Y115 が d (GGTTAC) 側の A5 及び C6 とスタッキング及び van der Waals 力を介して相互作用していることが明らかとなった (図 1)。複合体中の Pot1DBD の 3 次元構造は、単独の Pot1DBD と同様に、3 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドを有する OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding) fold であるが、d (GGTTAC) との結合により部分的に大きな構造変化を起こしていることが示唆された。また、複合体中の d (GGTTAC) は、単独で見られるようなランダムな構造ではなく屈曲した独特の構造を有していることが明らかとなった。

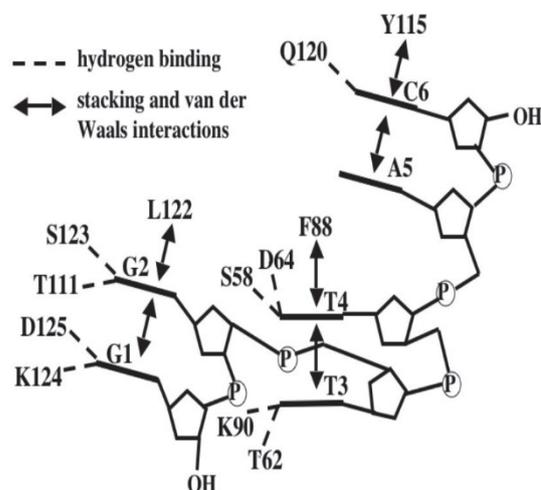


図 1 : Pot1DBD-d(GGTTAC) 複合体の 3 次元構造

4. Pot1DBD とテロメア 1 本鎖 DNA の結合に必要な、Pot1DBD 側のアミノ酸に関する解析

3. より、複合体形成に関与する Pot1DBD 側のアミノ酸が明らかとなった。そこで、これらのアミノ酸に点変異を導入するための発現プラスミドを構築し、大腸菌内での大量発現系を用いて変異型 Pot1DBD を調製した。具体的には、d (GGTTAC) の塩基との水素結合を除去するようにデザインした S58A、T62V、D64A、

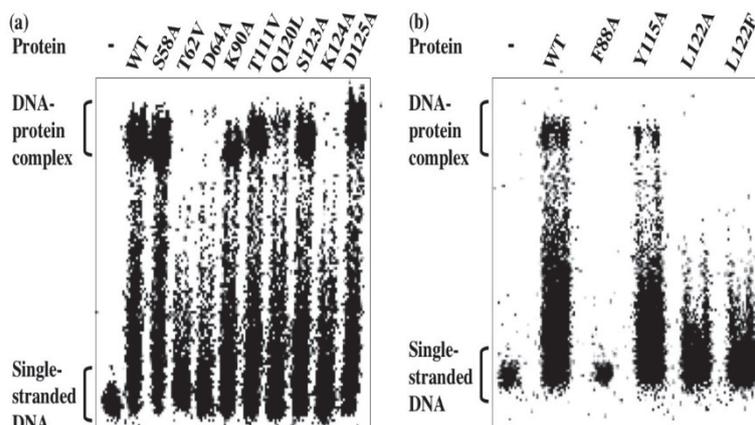


図 2 : 変異型 Pot1DBD と d(GGTTAC) の結合能のゲルシフト解析

K90A、T111V、Q120L、S123A、K124A、D125A と、d (GGTTAC) の塩基とのスタッキング及び van der Waals 相互作用を除去するようにデザインした F88A、Y115A、L122A、L122F である。これらの変異型 Pot1DBD と d (GGTTAC) との結合能をゲルシフト法で解析した (図 2)。T62V、D64A、K124A、F88A、L122A、L122F のみが G2 への結合能を顕著に消失し、他の変異型蛋白質は G2 への結合能をほとんど失わないか、あるいはわずかに失うのみであった。これより、5 個のアミノ酸残基 (T62、D64、K124、F88、L122) がテロメア DNA 認識に顕著に寄与することが明らかとなった。上記の X 線結晶構造によると、G2 : d (GGTTAC) の 1 番目の塩基 G が K124 及び D125 と、3 番目の塩基 T が T62 及び K90 と、4 番目の塩基 T が S58 及び D64 と、水素結合を介して相互作用している。しかし、K124A と T62V と D64A の G2 との結合能は顕著に消失しているのとは対照的に、D125A と K90A と S58A の DNA との結合能はほとんど変化していない。これは、同じ塩基が 2 つのアミノ酸残基と結合しているけれども、一方のアミノ酸 (K124、T62、D64) の塩基認識への寄与が他方のアミノ酸 (D125、K90、S58) の寄与よりも著しく大きいことを示すと考えられる。一方、上記の X 線結晶構造によると、G2 の 2 番目の塩基 G が T111 及び S123 と水素結合を介して結合している。しかし、

T111V と S123A の G2 との結合能は、野生型と比較してわずかに減少しているのみである。これは、T111 と S123 の塩基認識への寄与は大きくないが、同程度に寄与していることを示すと考えられる。さらに、上記の X 線結晶構造によると、G2 の 2 番目の塩基 G が L122 と、4 番目の塩基 T が F88 と、スタッキングや van der Waal 力を介して相互作用している。L122A と L122F と F88A の G2 との結合能は顕著に消失していた。これより、L122 と F88 が G2 の塩基認識において顕著な役割を果たすことが明らかとなった。以上の解析から、X 線結晶構造からテロメア DNA 認識に関与すると判断されるアミノ酸残基の中でも、テロメア DNA 認識への寄与の程度は大きく異なることを見出した。DNA 認識機構の理解のためには X 線結晶構造解析のみでは必ずしも十分ではなく、点変異型蛋白質による解析が必須であることを、これらの結果は示唆している。

5. テロメア DNA 配列が折り畳まって形成する 4 本鎖 DNA 構造形成と Pot1DBD との相互作用に関する解析

G 塩基に富む DNA 配列は 4 本鎖 DNA 構造を形成することが知られている [reviewed in Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 275-283 (2003) ; Biochem. Biophys. Res. Commun. 343, 1-7 (2006)]. 4 本鎖 DNA 構造とは、G 塩基 4 個が非ワトソン-クリック型水素結合を介して同一平面上に環状に配置した G-quartet 構造がスタッキング相互作用で積み重なった構造である (図 3)。G 塩基を有する 4 本の DNA 鎖がすべて平行である場合には平行型 4 本鎖 DNA 構造と呼び、反平行である場合にはアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造と呼ぶ (図 3)。Na⁺イオンや K⁺イオンによって 4 本鎖 DNA 構造は安定化される (図 3)。

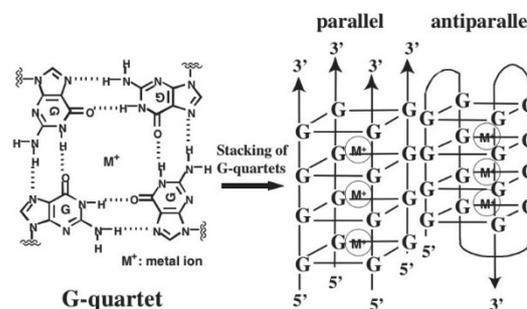


図 3 : 4 本鎖 DNA 構造

d (GGTTAC) が Pot1DBD との特異的結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基配列であることを考慮して、一連のテロメア DNA 配列 $4G_n : d (G_nTTAC)_4$ ($n=2-4$) の 4 本鎖 DNA 構造形成の有無を検討するために、 $4G_n$ ($n=2-4$) の CD スペクトルを 20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT 中で室温付近において測定した。 $4G_2$ の CD スペクトルは、276nm に正のピークと 250nm に負のピークを与えた。このスペクトルは構造を有しない 1 本鎖 DNA に典型的であり、 $4G_2$ が 150mM Na⁺イオン存在下において高次構造を形成しないことを示す。一方、 $4G_4$ の CD スペクトルは、295nm に正のピークと 264nm に負のピークを与えた。このスペクトルはアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造に典型的であり、 $4G_4$ が 150mM Na⁺イオン存在下においてアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を形成することを示す。また、 $4G_3$ の CD スペクトルは、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造由来の 290nm 付近の大きな正のピークに加えて、260nm 付近に小さい正のピークと 240nm 付近に負のピークを与えた。260nm 付近の正のピークと 240nm 付近の負のピークは、平行型 4 本鎖 DNA 構造に由来する。よって、 $4G_3$ が 150mM Na⁺イオン存在下において平行型とアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造の混合物であることを示す。以上より、150mM NaCl 存在下で $4G_2$ は 1 本鎖 DNA 構造のままであるが、 $4G_3$ は平行型 4 本鎖 DNA 構造とアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造との混合

物であり、4G4 はアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造のみを形成することを見出した。

4G4 のアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造に Pot1DBD を加えていくと、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造に特徴的な 295nm 付近の正のピークの強度が減少した (図 4)。これより、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造は Pot1DBD との相互作用により減少する、つまり Pot1DBD がアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を減少させる活性を有することが明らかとなった。

5' 末端を蛍光色素 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識し、3' 末端を消光色素 dabcy1 (Dab) で標識した 4G4 を 20mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM DTT 中でインキュベートし、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を形成させると、5' 末端の蛍光色素 6-FAM と 3' 末端の消光色素 Dab が近接するために蛍光強度が抑えられている。これに Pot1DBD を加えていくと、蛍光色素 6-FAM の発光波長に相当する 520nm の蛍光強度が増加した (図 5)。

Pot1DBD を加えていくとアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造がほどかれ、5' 末端の蛍光色素 6-FAM と 3' 末端の消光色素 Dab が離れるために蛍光強度が増加したと考えられる。これより、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造は Pot1DBD との相互作用によりほどかれる、つまり Pot1DBD がアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどく活性を有することが明らかとなった。

4. で作製した一連の点変異型 Pot1DBD が、1 本鎖 DNA 構造に結合する活性、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を減少させる活性、またはアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどく活性を解析し、これらの中に相関があるかどうかを検討した。1 本鎖 DNA 構造に結合する活性が強い点変異型 Pot1DBD ほど、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を減少させる活性及びアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどく活性が強いことが明らかとなった。これより、Pot1DBD が 1 本鎖 DNA 構造に結合すると遊離状態の 1 本鎖 DNA の量が減少するため、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造と 1 本鎖 DNA 構造との間の平衡が 1 本鎖 DNA 構造のほうにシフトしてしまい、これがアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどくのを誘発すると考えられる。

アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造が形成されると、テロメラーゼのテロメア DNA 伸長活性が阻害されることが報告されている [Nature 350、718-720 (1991); Biochemistry 37、5536-5541 (1998)]。これを考慮すると、テロメア DNA の 3' 末端の突出した 1 本鎖 DNA 領域が折れ畳んで形成したアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を Pot1 がほどくことによって、テロメラーゼによるテロメア DNA 伸長に Pot1 が重要な役割を果たすと考えられる。これは、生体内において Pot1 の過剰発現がテロメア DNA 伸長を誘導するという報告 [J. Biol. Chem. 280、9119-9128 (2005); Mol. Cell. Biol. 25、5567-5578 (2005)] と一致す

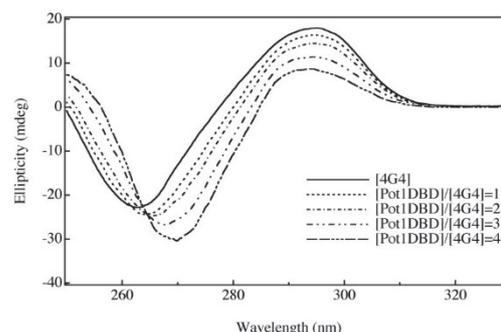


図 4 : 4G4 のアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造と Pot1DBD との相互作用の CD スペクトル解析

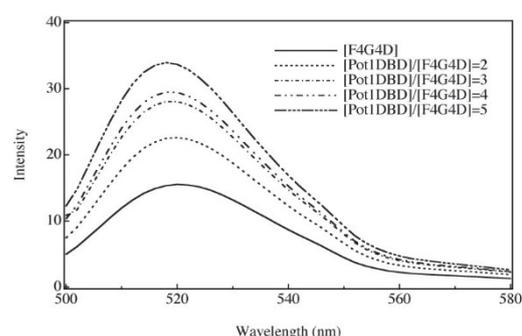


図 5 : 4G4 のアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造と Pot1DBD との相互作用の蛍光スペクトル解析

る。

6. Pot1 とテロメラーゼとの相互作用に関する解析、および相互作用に必要な、各蛋白質の結合ドメインの解析

Pot1 の C 末端領域 (Pot1C) (186-555 アミノ酸) の生物学的機能を明らかにするために、Pot1C を bait として cDNA ライブラリーの発現産物を two-hybrid 法でスクリーニングしたところ、Pot1C と相互作用する蛋白質として snoRNP の 1 つである Gar1 が分離された。

そこで、大腸菌内で発現した GST-Gar1 融合蛋白質と *in vitro* 蛋白質合成系で発現した Myc-Pot1C 蛋白質とを用いた *in vitro* におけるプルダウンアッセイを行った (図 6)。GST 蛋白質と Myc-Pot1C 蛋白質との組み合わせでは、Myc-Pot1C 蛋白質を検出することはできなかったが (図 6 (a))、GST-Gar1 融合蛋白質と Myc-Pot1C 蛋白質との組み合わせでは、Myc-Pot1C 蛋白質を検出することができた (図 6 (b))。これらの結果より、Pot1C と Gar1 が *in vitro* で直接的に結合できることが明らかになった。

また、*in vitro* 蛋白質合成系で発現した HA-Gar1 蛋白質と Myc-Pot1C 蛋白質とを用いた *in vitro* における免疫沈降を行った (図 7)。HA-Gar1 蛋白質のみを用いて抗 myc タグ抗体で沈降させても、HA-Gar1 蛋白質を検出することはできなかったが (図 7 (a))、HA-Gar1 蛋白質と Myc-Pot1C 蛋白質双方を用いて抗 myc タグ抗体で沈降させると、HA-Gar1 蛋白質と Myc-Pot1C 蛋白質双方を検出することができた (図 7 (b))。これらの結果より、Pot1C と Gar1 とが *in vitro* で直接的に結合できることが明らかになった。

さらに、HA-Gar1 蛋白質あるいは Myc-Pot1C 蛋白質の発現プラスミドを細胞内に取り込ませ、細胞内で強制発現させ、*in vivo* における免疫沈降によって、Pot1C と Gar1 とが *in vivo* で直接的に結合できることが明らかとなった。

Pot1C と Gar1 各々をコードする遺伝子に部分欠失変異を導入し、各々の変異型蛋白質を発現する系を構築した。これを用いて、変異型蛋白質の関与する結合を two-hybrid 法や *in vitro* における免疫沈降によって解析した。Pot1C のうちの 186-389 アミノ酸が Gar1 との結合に関与することを示唆する結果が得られた。

ヒト Gar1 がヒトテロメラーゼの RNA 成分と結合することが報告されており、Gar1 は生物種間で保存性が高いため、種を問わず Gar1 がテロメラーゼの RNA 成分と結合することが期待される。つまり、Pot1C が Gar1 と結合することによりテロメラーゼをテロメア上に

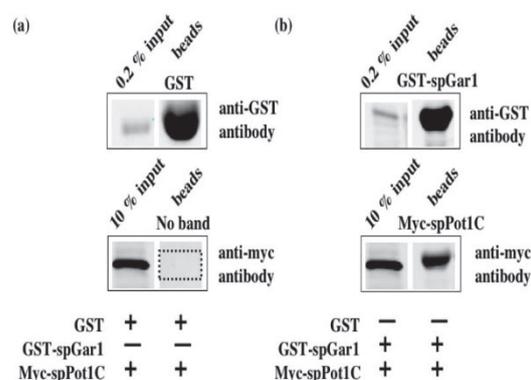


図 6 : Pot1C-Gar1 相互作用のプルダウンアッセイ

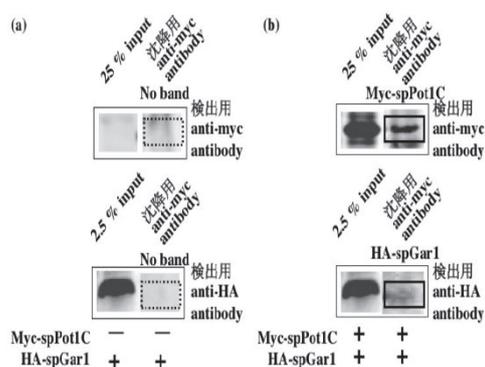


図 7 : Pot1C-Gar1 相互作用の免疫沈降

リクルートし、テロメア長を調節すると考えられる。以上より、Pot1はテロメラーゼと直接的に結合するのではなく、Gar1を介してテロメラーゼと間接的に結合することが明らかとなった。

IV 考察

本研究で Pot1DBD の 3 次元構造を詳細に解析したところ、3 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドを有し、OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding) fold のファミリーに属することが明らかとなった。また、長さおよび塩基配列の異なる一連の変異型テロメア 1 本鎖 DNA と野生型 Pot1DBD との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G2:d(GGTTC) が Pot1DBD との特異的な結合に必要な、テロメア 1 本鎖 DNA 側の塩基配列であることが明らかとなった。そこで、Pot1DBD と G2 の複合体の 3 次元構造を詳細に解析し、G2 の塩基と水素結合で結合する Pot1DBD 側のアミノ酸と、G2 の塩基とスタッキング及び van der Waals 力で相互作用する Pot1DBD 側のアミノ酸が明らかとなった。また、テロメア 1 本鎖 DNA の認識に必要である Pot1DBD 内のアミノ酸残基を解析するために、これらのアミノ酸に変異を導入した Pot1DBD の点変異型蛋白質を作製した。標的テロメア 1 本鎖 DNA である G2 との結合能を解析したところ、5 個のアミノ酸残基 (T62、D64、K124、F88、L122) のみがテロメア DNA 認識に顕著に寄与することが明らかとなった。これより、X 線結晶構造からテロメア DNA 認識に関与すると判断されるアミノ酸残基の中でも、テロメア DNA 認識への寄与の程度は大きく異なることを見出した。DNA 認識機構の理解のためには、X 線結晶構造解析のみでは必ずしも十分ではなく、点変異型蛋白質による解析が必須であることを示唆した。

次に、Pot1DBD とアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造の相互作用を解析し、Pot1DBD がアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどこく活性を有することを明らかにした。さらに、1 本鎖 DNA 構造に結合する活性が強い点変異型 Pot1DBD ほど、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどこく活性が強いことも明らかにした。Pot1DBD が 1 本鎖 DNA 構造に結合すると遊離状態の 1 本鎖 DNA の量が減少するため、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造と 1 本鎖 DNA の間の平衡が 1 本鎖 DNA のほうにシフトしてしまい、アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどくのを誘発すると考えられた。アンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造が形成されると、テロメラーゼのテロメア DNA 伸長活性が阻害されることが報告されている。これを考慮すると、テロメア DNA の 3' 末端の突出した 1 本鎖 DNA 領域が折れ畳んで形成したアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造を Pot1 がほどこくことによって、テロメラーゼによるテロメア DNA 伸長に Pot1 が重要な役割を果たすと考えられた。

出芽酵母のテロメアに関する他のグループの研究より、特殊な構造を形成しない open の状態と、詳細な構造は不明であるが、特殊な構造を形成していると考えられる close の状態との間を、テロメアは行き来していることが示されている。細胞周期のほとんどの時期において 4 本鎖 DNA 構造などの何らかの構造を形成してテロメアは close の状態となり、形成された構造の立体障害によりテロメラーゼがテロメアにアクセスすることを妨げ、テロメア伸長を阻害している。しかし、S 期の後期においてのみ特殊な構造を形成せずテロメアは open な状態となり、テロメラーゼがテロメアにアクセスすることを可能として、テロメア伸長を進める。出芽酵母 Cdc13 は、テロメア 1 本鎖 DNA に結合してテロメラーゼを

テロメア 1 本鎖 DNA にリクルートする活性、およびテロメア 4 本鎖 DNA をほども活性を有しており、上記の close の状態から open の状態へ移るのに Cdc13 が関与する可能性が指摘されている。これらの出芽酵母に関する過去の知見から、本研究において得られた、テロメア 1 本鎖 DNA が 4 本鎖 DNA 構造を形成する性質の生物学的意義は、テロメアの 1 本鎖 DNA 領域の構造を変化させて close の状態にすることで、テロメラーゼがテロメアにアクセスしてテロメアを伸長するのを細胞周期の時期特異的に制限することではないかと考えられる。また、本研究において得られた、Pot1 が 4 本鎖 DNA 構造をほども活性の生物学的意義は、テロメア DNA 伸長を行う時期つまり S 期においてのみ、Pot1 がテロメアの 4 本鎖 DNA 構造をほども open の状態にすることで、テロメラーゼがテロメアにアクセスしてテロメアを伸長するのを可能にすることではないかと考えられる。以上から、本研究において見つけた、テロメア 1 本鎖 DNA が 4 本鎖 DNA 構造を形成する性質や Pot1 が 4 本鎖 DNA 構造をほども活性は、テロメラーゼを介したテロメア伸長を制御する上での重要な因子であると考えられる。

また、本研究で Pot1 の C 末端領域と snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) の 1 つである Gar1 蛋白質とが結合することが明らかとなった。また、ヒト Gar1 がヒトテロメラーゼの RNA 成分と結合することが報告されており、Gar1 は生物種間で保存性が高いため、種を問わず Gar1 がテロメラーゼの RNA 成分と結合することが期待される。つまり、Pot1 の C 末端領域が Gar1 と結合することによりテロメラーゼをテロメア上にリクルートし、テロメア長を調節すると考えられる。つまり、Pot1 は N 末端領域でテロメアの 4 本鎖 DNA 構造をほども、テロメラーゼがテロメアを伸長できる場を作り、C 末端領域で Gar1 を介してテロメラーゼをテロメア上にリクルートするというモデルが考えられる (図 8)。

本研究は、Pot1 のテロメア DNA 認識機構に関する新規の知見を与えると共に、テロメラーゼによるテロメア DNA 調節機構に果たすテロメア DNA 結合蛋白質の役割を議論する上で意義深い。更に、テロメア DNA 調節機構が細胞老化・細胞癌化と密接に関係することを考慮すると、本研究は細胞老化・細胞癌化の機構を解析する上での有用な分子論的基盤を与えるものである。

本研究において提唱する、Pot1 がアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造をほどもことによりテロメラーゼがテロメア DNA を伸長できるようにするという新規モデルは、癌の分子標的治療など制癌を目指す上でも有用な手がかりを提示すると考えられる。具体的な分子標的治療の方策として、Pot1 とテロメア DNA との相互作用を阻害できる低分子化合物を創製することができれば、テロメア DNA のアンチパラレル型 4 本鎖 DNA 構造形成は維持され、テロメラーゼによるテロメア DNA 伸長を阻害できると期待される。このようなアプローチは、癌細胞のテロメラーゼ活性を阻害し、癌細胞を死滅に誘導する上で有効であるかもしれない。

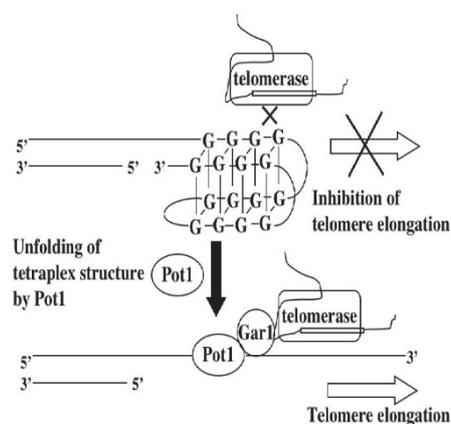


図 8 : Pot1 のテロメラーゼリクルートモデル

V 研究成果の発表

<書籍>

1. Torigoe, H. “Data Analysis in Titration Calorimetry” in “Comprehensive Handbook of Calorimetry and Thermal Analysis” edited by The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 208-212 (2004).
2. Torigoe, H. “Molecular Recognition of Antibody” in “Comprehensive Handbook of Calorimetry and Thermal Analysis” edited by The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 438-441 (2004).
3. Ogata, K., Tahirov, T. H. and Ishii, S. “c-Myb DNA-binding domain: from molecular structure to functions” in “Myb Transcription Factors: Their Role in Growth, Differentiation and Disease” edited by J. Frampton., Kluwer Academic Publishers B. V., pp. 223-238 (2004).
4. 緒方一博 “構造生物学—生体分子の機能発現機構の解明を目指して—” in “特集：ゲノムからプロテオームへ—ヒトプロテオミクスの目指すもの—ポストゲノム時代の生化学” 生化学 76, 1305-1319 (2004).
5. 鳥越秀峰 “滴定カロリメトリー” in 実験化学講座改訂第5版第6巻 “温度・熱・圧力”、阿竹徹、小國正晴編、丸善、pp.235-244 (2005).
6. 椎名政昭、浜田恵輔、緒方一博 “分子構造解析のためのタンパク質試料調製法” in “分子生物学実験シリーズ「図・写真で観るタンパク構造・機能解析実験実践ガイド」タンパク質の立体構造解析を行うために” メディカル ドゥ 18-32 (2005).
7. 緒方一博 “タンパク質の分子構造異常と癌化” in “特集:転写制御と疾患” Molecular Medicine 42, 64-75 (2005).
8. Torigoe, H. and Ono, A. “Novel Strategy for Efficient Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) : Specific Binding of Mercury (II) Cation to T:T Mismatch Base Pair and That of Silver (I) Cation to C:C Mismatch Base Pair” in “Moleculomics and Thereafter” edited by Takaki Hiwasa, Research Signpost, Ltd., pp. 1-21 (2006).
9. Torigoe, H. and Maruyama, A. “Promotion of Triplex Formation under the Physiological Condition: A Strategy for the Artificial Regulation of Gene Expression” in “DNA Structure, Chromatin and Gene Expression” edited by Ryoiti Kiyama and Mitsuhiro Shimizu, Transworld Research Network, Ltd., pp. 27-41(2006).
10. 鳥越秀峰 “分裂酵母テロメア1本鎖DNAへ結合蛋白質Pot1による4本鎖DMA構造のアンフォールディングとその生物学的意義” 生物物理 47, 印刷中 (2007).

<雑誌>

1. Torigoe, H., Ono, A., and Kawahashi, K. Thermodynamic Analyses of the Specific Interaction between T:T Mismatch Base Pair and Mercury (II) Cation: Toward the Efficient Detection of Single Nucleotide Polymorphism (1). Nucleic Acids Symp. Ser. 48, 275-276 (2004).
2. Torigoe, H., Ono, A., and Takamori, A. Silver (I) Cation Specifically

- Stabilizes Heteroduplex with C:C Mismatch Base Pair: Toward the Efficient Detection of Single Nucleotide Polymorphism(2). *Nucleic Acids Symp. Ser.* 48, 101-102(2004).
3. Katayama, T., Maruyama, A., Obika, S., Imanishi, T., and Torigoe, H. Synergistic Stabilization of Triplex by Combination of Comb-type Cationic Copolymer and 2', 4'-BNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 48, 139-140 (2004).
 4. Torigoe, H., and Maruyama, A. Synergistic Stabilization of Nucleic Acid Assembly by Oligo-N3' -P5' Phosphoramidate Modification and Additions of Comb-type Cationic Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1705-1710 (2005).
 5. Torigoe, H., Katayama, T., Obika, S., Maruyama, A., and Imanishi, T. Combination of Poly(L-lysine)-graft-dextran Copolymer and 2' -0,4' -C-methylene Bridged Nucleic Acid(2', 4' -BNA) Modification Synergistically Stabilizes Pyrimidine Motif Triplex at Neutral pH. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 24, 635-638 (2005).
 6. Torigoe, H., Kawahashi, K., Takamori, A., and Ono, A. Novel Strategy for Single Nucleotide Polymorphism(SNP) Genotyping by Heteroduplex Analysis: Specific Stabilization of TT Mismatch Base Pair by Mercury (II) Cation and CC Mismatch Base Pair by Silver (I) Cation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 24, 915-917 (2005).
 7. Torigoe, H., Kawahashi, K., and Tamura, Y. Promotion of Pyrimidine Motif Triplex Formation by Morpholino Modification of Triplex-forming Oligonucleotide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 24, 1019-1021 (2005).
 8. Furukawa, A., and Torigoe, H. Tetraplex Structure of Fission Yeast Telomeric DNA and Its Unfolding by the Interaction with Telomeric DNA Binding Protein Pot1. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 49, 63-64 (2005).
 9. Torigoe, H., Kozasa, T., Takamori, A., and Ono, A. Thermodynamic Analyses of the Specific Interaction between C:C Mismatch Base Pair and Silver (I) Cation: Toward the Efficient Detection of Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 49, 217-218 (2005).
 10. Torigoe, H., and Tsukamoto, Y. Development of Triplex Formation-based Artificial Transcription Factor to Recognize Any Upstream Sequence of Target Genes. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 49, 321-322 (2005).
 11. Sugiyama, H., Adachi, N., Kawauchi, S., Kozasa, T., Katayama, T., Torigoe, H., Ono, A., and Tamura, Y. Computational Evaluation of the Specific Interaction between Cation and Mismatch Base Pair. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 49, 215-216 (2005).
 12. Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., and Osada, H. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11663-11668

- (2005).
13. Torigoe, H., Kozasa, T., and Ono, A. Detection of C:C Mismatch Base Pair by Fluorescence Spectral Change upon Addition of Silver (I) Cation: Toward the Efficient Analyses of Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 89-90 (2006).
 14. Torigoe, H., Kozasa, T., and Ono, A. Detection of T:T Mismatch Base Pair by Fluorescence Spectral Change upon Addition of Mercury (II) Cation: Toward the Efficient Analyses of Single Nucleotide Polymorphism. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 223-224 (2006).
 15. Torigoe, H., Miyakawa, Y., Nagasawa, N., Kozasa, T., and Ono, A. Thermodynamic Analyses of the Specific Interaction between Two C:C Mismatch Base Pairs and Silver (I) Cations. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 225-226 (2006).
 16. Torigoe, H., and Furukawa, A. Tetraplex Structure of Fission Yeast Telomeric DNA and Unfolding of the Tetraplex on the Interaction with Telomeric DNA Binding Protein Pot1. *J. Biochem.*, 141, 57-68 (2007).
 17. Torigoe, H., Dohmae, N., Hanaoka, F., and Furukawa, A. Mutational Analyses of a Single-stranded Telomeric DNA Binding Domain of Fission Yeast Pot1: Conflict with X-ray Crystallographic Structure. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 481-490 (2007).
 18. Torigoe, H., and Furukawa, A. Tetraplex Structure of Fission Yeast Telomeric DNAs and Unfolding of the Tetraplex by the Interaction with Telomeric DNA Binding Protein Pot1. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
 19. Torigoe, H., Katayama, T., and Tsukamoto, Y. Development of Triplex Formation-based Artificial Transcription Factor to Recognize Any Upstream Sequence of Target Genes. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
 20. Torigoe, H., Ono, A., and Kozasa, T. Detection of Mismatch Base Pair by Fluorescence Spectral Change upon the Addition of the Metal Cation -Toward the Efficient Analyses of Single Nucleotide Polymorphism-. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
 21. Katayama, T., Inoue, N., and Torigoe, H. Location of the triplex DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Stm1 protein. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, in press.
 22. Torigoe, H., and Nagasawa, N. Effect of ENA modification of triplex-forming oligonucleotide on pyrimidine motif triplex formation. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, in press.
 23. Torigoe, H., Miyakawa, Y., Kozasa, T., and Ono, A. The specific interaction between two T:T mismatch base pairs and mercury (II) cation. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, in press.
 24. Torigoe, H., Kozasa, T., and Ono, A. The specific interaction between two C:C mismatch base pairs and silver (I) cation. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, in

press.

25. Torigoe, H., and Kaneda, K. Unfolding of tetraplex structure of mouse telomeric DNA by the interaction with mouse telomeric DNA binding protein Pot1. Nucleic Acids Symp. Ser., in press.
26. Tanaka, Y., Oda, S., Yamaguchi, H., Haruta, K., Kawamura, T., Kondo, Y., Uchiyama, T., Miura, T., Takeuchi, H., Torigoe, H., Kojima, C., and Ono, A. Structural and physicochemical features on the metal-mediated base pairs. Nucleic Acids Symp. Ser., in press.