

# グアニン 4 重鎖構造の生物学的意義の解明

正井 久雄

(公財) 東京都医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野 ゲノム動態プロジェクト

Key words: グアニン 4 重鎖、ゲノム複製、染色体高次構造、RNA-DNA ハイブリッド、複製タイミング

## 緒言

グアニン 4 重鎖構造 (以下 G4 構造と記載) を形成しうる配列は、ヒトゲノム上に 37 万カ所以上存在すると推定される (図 1)。最近の研究から、G4 構造は転写、組換え、転移、エピゲノム制御など染色体の種々の機能に関与することが示唆されると同時に、その異常な形成は、神経変性疾患などの原因ともなること示唆されている [1]。しかし、G4 構造の細胞内での存在、動態、プロファイル、そしてその普遍的な生物学的意義の解明は、大部分未解決の研究課題である。

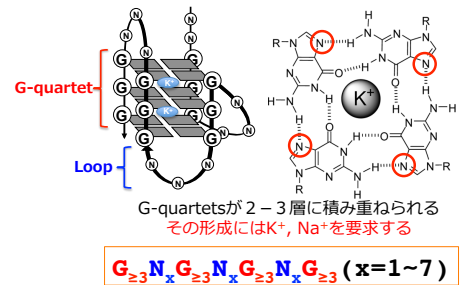


図 1. グアニン 4 重鎖(G4)構造

私たちは、ゲノム複製の分子機構の解析から、Rif1 という進化的に保存された因子が、ゲノム複製のタイミングの決定因子であることを発見した [2, 3, 4]。その後の研究から、Rif1 の染色体上結合部位の配列は、G4 構造を形成しうる事、更に Rif1 は G4 に特異的に結合することを見出した [5]。その結果、核内に複製開始に抑制的なクロマチンドメインを形成する可能性を提案した (図 2)。

最近の高等生物の複製開始部位の網羅的解析から、複製開始領域の近傍に G4 形成配列が高い頻度で存在することが明らかになった [6]。そこで、私たちは、大腸菌染色体の通常複製開始領域 *oriC* に依存しない、第二の複製開始機構に着目した。この機構は RNaseH のない株で効率よく観察される [7]。私たちはこの複製系は、G4 に依存すると想定し、種々の検証実験を行ってきた。特に遺伝的に要求される配列内に G4 形成配列が存在すること、また G4 に特異的に結合する未知の遺伝子産物を同定した。これらの発見は、ゲノム DNA 複製の正及び負の制御において、G4 構造が重要な役割を果たすことを示唆する (図 3)。G4 構造は、試験管内ではグアニンの連続配列に依存して 1 本鎖 DNA 上に容易に形成されるが、細胞内において 2 本鎖 DNA と競合して、実

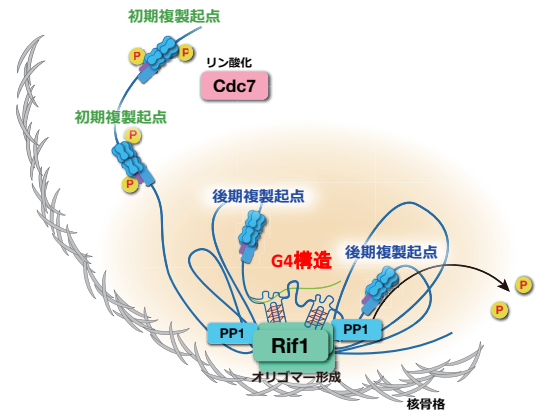


図 2. Rif1-G4 によるクロマチン構造制御  
Rif1 は 遺伝子間領域に存在する G4 構造に結合し、クロマチンを束ねるとともに核膜近傍に複製抑制ドメインを形成する。

際に形成されるのかは、慎重に検証する必要がある。私たちは、種々の方法を用いて、細胞内における G4 の形成を検証し、実際に G4 構造が細胞内染色体上に形成されることを示す data を得た。

本研究では、G4 構造が、ゲノムの収納、維持、継承において果たす役割を解析し、その普遍的な生物学意義を解明することを目標とする。

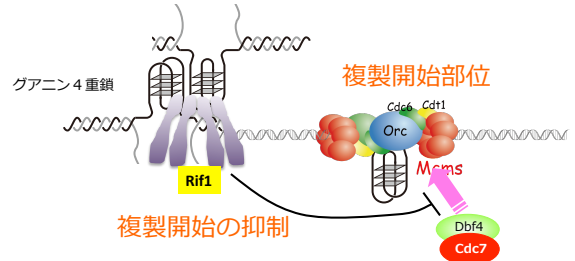


図 3. 複製の正と負の制御における G4 構造の関与

## 方法および結果

### Part 1 グアニン 4 重鎖構造と Rif1

1. 分裂酵母及び、マウス Rif1 タンパク質とその標的 Rif1BS-G4 構造との相互作用による核内染色体ドメイン形成の機構

Rif1 は複製タイミング制御の他に、二重鎖 DNA 切断修復、テロメア制御、転写制御に関与する (図 3)。

(1) 分裂酵母 Rif1 (1400 アミノ酸) およびその誘導体を Flag 抗体カラム、ニッケルカラムなどで精製し、それらの DNA

結合能、多量体形成能を解析した。その結果、G4 結合ドメイン、多量体化ドメインは C 端の 229aa, 91aa に限定された。C 端ドメインはそのサイズから 16mer を形成すると推定される。また、N 端 444aa 内にも、選択性がやや減少しているが、G4 結合能が存在することがわかった(図 4)。

- (2) 全長 2418 アミノ酸マウス Rif1 タンパク質を精製し、これも G4 構造に特異的に結合する事を示した(図 5, 6)。また、種々の部分ポリペプチドを精製し、N 端 HEAT Domain および C 端の領域に G4 結合能を有することを見出した(図 5) [8]。
- (3) Rif1 は、パラレルタイプの G4 構造がオリゴマーを形成した DNA 構造に高親和性に結合する(ゲルシフトアッセイによる)。
- (4) Rif1 は、一度に複数の G4 構造 DNA に結合することができる(ビオチン化された G4 DNA を用いた pull down アッセイによる)。これらの結果から、Rif1 タンパク質の多量体形成のモデルを提唱した(図 7)。

## 2 分裂酵母及び動物細胞 Rif1 結合部位の解析

- (1) 分裂酵母 Rif1 結合部位、Rif1BS の配列には、G<sub>5-6</sub> を含む Rif1CS (consensus sequence) の他に、多くの G<sub>3</sub> を含む。これらの配列も G4 形成に貢献する。
- (2) Rif1BS を有する二本鎖 DNA を熱変性し、G4 構造を試験管内で形成させた結果、G-rich 鎖および逆鎖の両者にある種のヌクレアーゼに感受性になることから、両鎖が特徴的な高次構造を形成することが明らかとなった。
- (3) 二本鎖 DNA 上での高次構造の形成は、熱変性、グアニン連続配列、K<sup>+</sup> の存在への依存性、7' -deaza dGTP の導入による阻害、などにより G-rich 鎖上での G4 構造形成に依存することが示された。また、転写によっても同様な高次構造が形成される。
- (4) Rif1BS は、多くの場合 (>90%) 非コード領域領域の中に存在し、非コード転写領域に含まれる。
- (5) マウス ES 細胞の Rif1 結合領域を ChIP-seq で解析した結果、比較的弱い Rif1 結合部位がゲノム全域に観察された。一方、非常に強い結合部位も同定され、これらの領域には G4 形成配列が存在

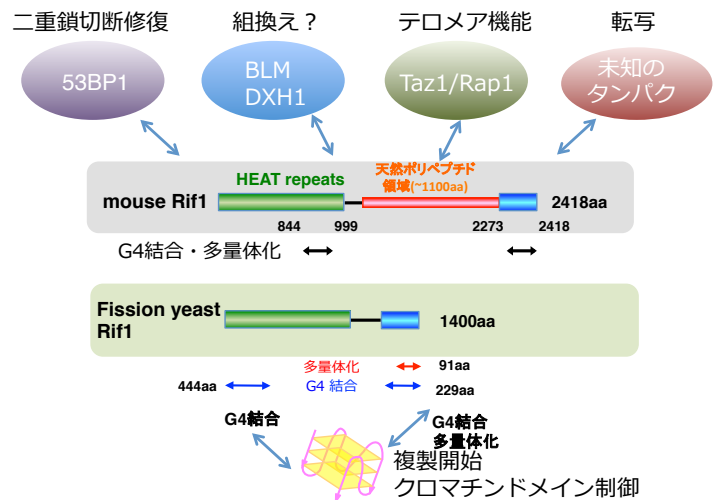


図 4. Rif1 タンパク質の構造と機能

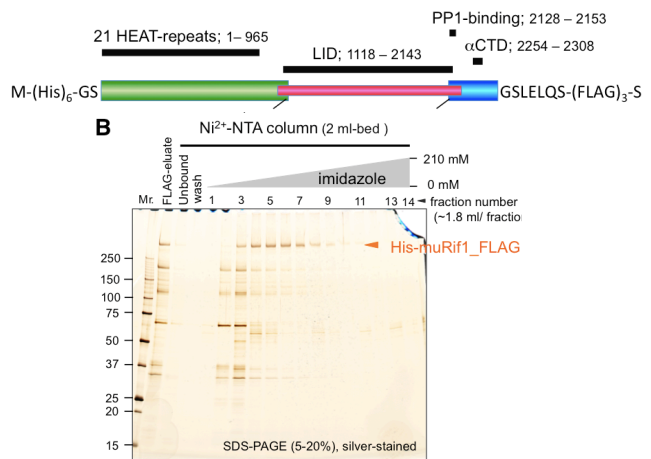


図 5. マウス Rif1 タンパク質の生成  
全長 2418 アミノ酸のマウス Rif1 タンパク質を 293T 細胞で発現し、精製した。

## Pull down experiments

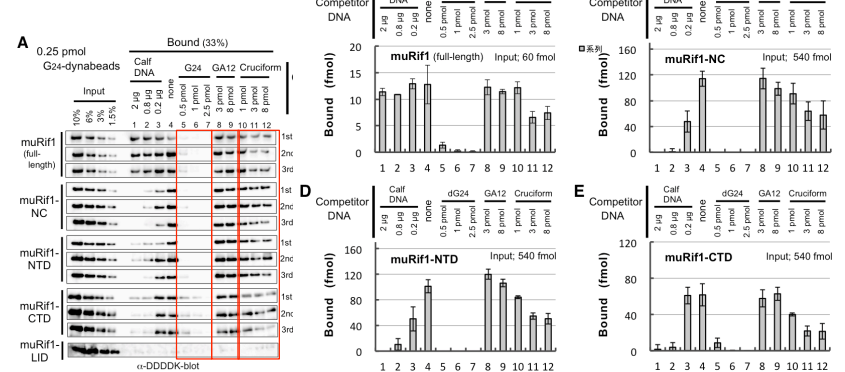


図 6. マウス Rif1 の G4 結合ドメインの同定 (文献 8)

マウス Rif1 タンパク質の種々のドメインを精製し、その G4 結合能をプルダウンアッセイで検討した。その結果、N 端 1151 アミノ酸及び C 端 299 アミノ酸ポリペプチド領域のいずれもが、単独で G4 に特異的に結合することが明らかとなった。

し、実際、*in vitro*でG4を形成する。

### 3 動物細胞 Rif1 タンパク質の挙動の解析

(1) Rif1 タンパク質の細胞内挙動を解析するために、Rif1 タンパク質内の巨大 IDP(天然タンパク質領域)を蛍光分子に置き換えた組換え Rif1 を動物細胞で発現した。Time laps 観察を行ったところ、この分子はM-G1 期以降時に、多数の細胞内 foci を形成した。これらの foci はERに局在していた。

この foci の形成は、C 端領域に依存する。

(2) Rif1 のC 端に変異あるいは欠失を導入すると、不溶性画分からの遊離し、大部分可溶性画分に回収される。この事は不溶性画分への局在に C 末領域が重要であることを示す。

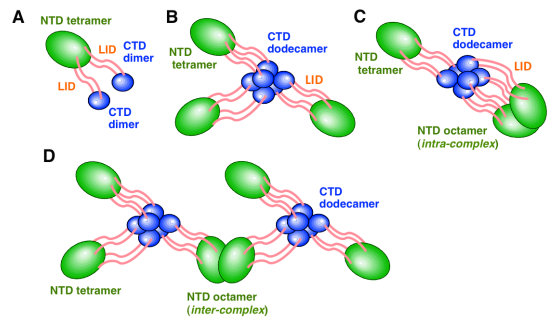


図7. Rif1 タンパク質による多量体形成のモデル  
 緑色及び青色の楕円は、それぞれN 端ドメイン(NTD)の4 量体及びC 端ドメイン(CTD)の2 量体を示す。ピンクの線は両者をつなぐ長い天然ポリペプチド領域(LID と記載)。NTD, CTD ともにG4 に結合するので、DNA は Rif1 により複雑に折りたたまれる可能性がある。

## Part 2 グアニン4 重鎖構造と複製開始

### 1 大腸菌染色体の第二の複製様式

- (1) RNaseH 欠損株で観察される複製様式は、DnaA-oriC に依存しないが、ある遺伝的背景では *ter* 領域 (複製集結領域) を要求する。
- (2) 必要とされる領域にはグアニンの連続配列が存在し、さらに未知

の遺伝子が存在した。その遺伝子産物は G4 構造に *in vitro* で結合する。

- (3) 第二の複製様式は、染色体上の多数の部位から複製が開始する。しかし、*ter* 領域からの開始(BrdU の取り込み)、*ter* 領域への PriA, RecA タンパク質 (いずれも第二の複製様式に必須であることがわかっている) の結合が観察された。
- (4) 第二の複製は、G4 構造の形成を阻害する LiCl の存在下では、阻害された (細胞レベル)。
- (5) G4 リガンドの添加により、第二の複製への影響が観察される (細胞レベル)。

### 2 plasmid DNA の第二の複製様式

pBR322 plasmid も染色体と同様に、RNaseH の欠損下で第二の複製を行う。この系では、転写により形成される primer RNA が G4 構造を形成する可能性を検証した。その結果、下記が明らかになった。

- (1) 鋳型上に存在するグアニンの連続配列は複製開始に必要である。
  - (2) *in vitro* での DNA 複製系において、G4 形成を阻害する 7' -deaza GTP を用いて primer RNA の転写を行うと複製が阻害される。
  - (3) ある種の G4 リガンドは 複製を強く阻害する。
  - (4) G4 リガンドの添加により細胞レベルの複製が阻害される。
- これらの結果は、複製開始に G4 が関与する可能性を支持する(図8)。

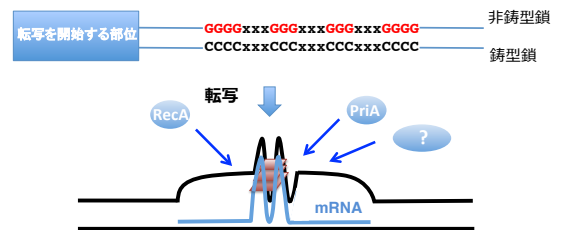


図8. 大腸菌の第二の染色体複製開始様式のモデル  
 転写により DNA-RNA 混合 G4 構造を含む安定な DNA-RNA ハイブリッドが形成され、それに PriA などの因子が結合して複製が開始する。

図9. 細胞内の G4 構造の可視化  
 G4 を認識するポリペプチド抗体 BG4 に蛍光分子を連結し、ヒト細胞内で誘導的に発現し、細胞内の G4 を可視化した。

## Part 3 グアニン4 重鎖構造の細胞内での検出と動態解析

(1) G4 を検出する1 本鎖ポリペプチド抗体(BG4)に蛍光分子を連結し、動物細胞内で発現し、time laps 解析した結果、

核内に foci が観察された。同様に、G4 と関連の深い RNA-DNA hybrid に結合するヒト RNaseH1 D145N 変異体を発現するヒト細胞株を樹立し、RNA-DNA hybrid の細胞内動態を観察した(図 9)。

(2) 1) に用いた検出プローブを用いて大腸菌ゲノム上の G4 および RNA-DNA hybrid のプロファイルを解析した。

## 考 察

G4 構造は、ほとんど全ての生物のゲノム上に普遍的に存在し、転写、組換え、エピゲノム制御、転移など、多くの染色体制御に関与することが明らかになりつつある[9]。私たちは Rif1 が複製タイミングの制御に関与すること、大腸菌の第二のゲノム複製開始システムにおいて、G4-RNA/DNA hybrid が重要な役割を果たす可能性を見出した。今回 Rif1 タンパク質の詳細な生化学的解析から、Rif1 がどのように複製開始が抑制的なドメインを核膜近傍に形成できるかについてモデルを提唱した。また、大腸菌の複製システムをモデルに、G4 構造/RNA-DNA hybrid に依存して開始する複製の機構を解析した。これらの研究から、G4 構造は、それぞれ特異的な G4 結合タンパク質に認識され、種々の染色体動態に関与すると考えられる。

細胞内での G4 構造の動態を解析することは、G4 の未知の機能、作動機構を解明する上で極めて重要である。私たちは G4 および RNA-DNA hybrid に結合するプローブ、あるいは その構造的特徴を認識するプローブにより、これらの構造を検出する方法を開発しつつある。今後、細胞内での G4 形成に必要な因子、条件、さらに生体内での機能との相関を解析し、G4 構造の普遍的な生物学的機能を解明したい。

## 共同研究者・謝辞

東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクトの共同研究者の加納豊博士、田中卓博士、森山賢治博士、松本清治博士、吉沢直子博士、小林駿介さん、覺正直子さん、深津理乃さん、伊藤さゆりさん、関由美香さん、鷺朋子さん、に感謝します。また研究室の他のメンバーの有益な discussion に感謝します。また、G4 リガンドを提供して下さった東京農工大の長澤和夫教授、ゲノム解析で協力して下さった東大定量生物学研究所、白髭克彦教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hänsel-Hertsch R, Di Antonio M, Balasubramanian S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 May;18(5):279-284. Epub 2017 Feb 22. Review. PubMed PMID: 28225080. doi: 10.1038/nrm.2017.3.
- 2) Hayano M, Kanoh Y, Matsumoto S, Renard-Guillet C, Shirahige K, Masai H. Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes Dev.* 2012 Jan 15;26(2):137-50. PubMed PMID: 22279046; PubMed Central PMCID: PMC3273838. doi: 10.1101/gad.178491.111.
- 3) Yamazaki S, Hayano M, Masai H. Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing. *Trends Genet.* 2013 Aug;29(8):449-60. Epub 2013 Jun 25. Review. PubMed PMID: 23809990. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.001.
- 4) Yamazaki S, Hayano M, Masai H. Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing. *Trends Genet.* 2013 Aug;29(8):449-60. Epub 2013 Jun 25. Review. PubMed PMID: 23809990. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.001.
- 5) Kanoh Y, Matsumoto S, Fukatsu R, Kakusho N, Kono N, Renard-Guillet C, Masuda K, Iida K, Nagasawa K, Shirahige K, Masai H. Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nat Struct Mol Biol.* 2015 Nov;22(11):889-97. Epub 2015 Oct 5. PubMed PMID: 26436827. doi: 10.1038/nsmb.3102.
- 6) Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, Fenouil R, Coulombe P, Andrau JC, van Helden J, Méchali M. The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res.* 2015 Dec;25(12):1873-85. Epub 2015 Nov 11. PubMed PMID: 26560631; PubMed Central PMCID: PMC4665008. doi: 10.1101/gr.192799.115.

- 7) Masai H, Asai T, Kubota Y, Arai K, Kogoma T. Escherichia coli PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J.* 1994 Nov 15;13(22):5338-45. PubMed PMID: 7525276; PubMed Central PMCID: PMC395490.
- 8) Moriyama K, Yoshizawa-Sugata N, Masai H. Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture. *J Biol Chem.* 2018 Mar 9;293(10):3607-3624. Epub 2018 Jan 18. PubMed PMID: 29348174; PubMed Central PMCID: PMC5846147. doi:10.1074/jbc.RA117.000446.
- 9) Moriyama K, Lai MS, Masai H. Interaction of Rif1 Protein with G-Quadruplex in Control of Chromosome Transactions. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1042:287-310. PubMed PMID: 29357064. doi:10.1007/978-981-10-6955-0\_14.