

ゲノムに潜む未解明のシグナル、グアニン4重鎖

正井久雄
東京都医学総合研究所

英文： G-quadruplex, unexplored message from genomes

サマリー

グアニン4重鎖(G4)は、グアニンの連続配列に依存してDNAのみならず、RNAやRNA-DNAハイブリッド上に形成される。G4は転写、複製、組換え、転移など、多様なクロマチン代謝に関与することが明らかとなっている。最近、G4を検出するプローブが開発され、細胞内でのG4形成とその動態が解析され、細胞型などによる多様性が示されている。私たちはG4の複製制御における機能を新たに見出した。その発見をもとに、G4構造の多様性、新たな検出技術、クロマチン制御における未知の役割の解明に向けた研究を概説し、G4構造の機能の全貌解明に向けて解決すべき課題について論じる。

執筆者：正井久雄 Hisao Masai

所属：

東京都医学総合研究所 基礎医科学研究分野

Department of Basic Medical Sciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

略語

KD: knock down

ChIP-chip: Chromatin immunoprecipitation on microarray

ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation and sequencing

はじめに：セントラルドグマと非典型的核酸構造

DNA→RNA→タンパク質の流れにおいて、DNAはワトソンクリックのB型右巻き二重らせん構造が前提となっている。しかし、特殊な配列を有するDNAの構造解析から、非典型的な核酸構造が発見された。もっとも衝撃的であったものが、左巻きDNAの発見であった¹⁾。Z-DNAとも呼ばれるこの構造は、プリンとピリミジンが交互に並んだ配列（特にGCが並んだ配列）上に形成される。このほかにも種々の繰り返し構造を含む特殊配列が形成する3重鎖DNAや、4重鎖DNAなどが発見された。

進化的には、RNAが始原細胞における遺伝情報であると考えられているが、RNAは1本鎖ゆえにその配列に依存して種々の”形”を形成すると想像される。その形態に依存して酵素活性を示し、進化初期の細胞のRNA遺伝情報の複製や組換えなどに貢献したであろう。その後、遺伝情報がより安定なDNAに置き換わった後も、特殊な構造を形成する配列はゲノム上にその痕跡が残された可能性がある。そしてこれらの配列は、局所的、あるいは一過性に非典型的な核酸構造を形成し、それが、種々の核酸遺伝情報の発信・クロマチン構造の形成など、現在の生物の生物機能の制御に重要な役割をはたしていると考えられる。

グアニン4重鎖(G4)構造はグアニンの連続配列により形成される特殊な構造であるが、DNA、RNAそしてRNA-DNAハイブリッド上に形成され、セントラルドグマのすべての過程に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。この構造が、細胞内でいつ、どこで、どのように形成され、ゲノム機能の発現にいかに関与するか、分子メカニズム、そしてその生物学的意義の解明は、頑強性・適応性の高いゲノム機能発現の解明の鍵を握るかもしれない。

1 グアニン4重鎖構造の基礎知識

1) 発見の歴史

1962年にMartin Gellertらは、グアニン酸(GMP)の高濃度ゲル状溶液の解析から、4個のグアニン酸が環状構造を形成する可能性を示した。さらにこれらはstackingしてhelical構造を形成することを提唱した²⁾。

1988年にSenとGilbertは、グアニンに富む1本鎖DNAが4重鎖DNAを形成する可能性を提唱した³⁾。Cechらのグループは、テロメア由来の配列が1価性の陽イオンの存在下で、G-quartet構造を介して4重鎖構造を形成することをしめした⁴⁾。

2) 主に核酸化学研究から明らかになったG4の構造的基盤

i) 基本的構造⁺

G4構造は平面的なG-quartetが π - π 相互作用を介して積み重なり形成される(図1A)。G-quartet形成には、グアニンのN1HとO6、N2HとN7間のHoogsteen型水素結合により維持される。またグアニンO6による中央部の陰イオン性の空間は Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Pb^{2+} 、 Ba^{2+} 、および Sr^{3+} などの陽イオンにより安定化される⁵⁾。一方、一価の陽イオンであるが Li^+ は、G4構造を不安定化する⁶⁾。また、G4構造は、PEG、acetonitrile、あるいは深共晶溶媒(両方もしくはどちらか一方が

固体である「水素結合ドナー性の化合物」と「水素結合アクセプター性の化合物」をある一定の割合で混ぜることによって『室温で液体』になる化合物)など、分子混雑環境下でも安定化される⁷⁾。G4構造の特徴の一つはループの存在である。これらの長さや塩基組成はG4の安定性に影響を与えることが知られている⁸⁾。

ii) トポロジー

G4はその主鎖の相対的な方向に従って、parallel, hybrid, anti-parallel の3種類の主要なトポロジーをとる⁶⁾。G4がどのようなトポロジーの構造をとるかは、X線結晶解析、NMR、CD spectroscopy の3種類の方法により決定される。

トポロジーは配列により一義的に決定されない。たとえば d[AGGG(TTAGGG)3] という 22mer の配列は Na⁺ の存在下では、anti-parallel 型を示すが、K⁺ の存在下で形成された結晶は parallel 型であった⁹⁾。一方、同じ配列が、K⁺ の溶液中では hybrid 型であった。また、分子混雑環境下では、parallel 型を示した。このように、トポロジーは配列により一義的に決定されるものではなく、環境によって変化する。したがって、細胞の中でも、G4構造はダイナミックに変化している可能性がある。

iii) G4 形成配列

G₃N₁₋₇G₃N₁₋₇G₃N₁₋₇G₃ で定義される典型的なG4形成配列はヒトゲノムに約 37万箇所存在する^{10,11)}。一方、polymerase stop assay (鋳型DNA上にG4が形成されると、そこでDNAポリメラーゼによるDNA鎖の伸長が停止する)を用いた探索から、ヒトゲノム上には>70,000のG4形成可能配列の存在が示唆された¹²⁾。これらの配列の中には、上記の典型的なG4形成配列以外に、8-15ヌクレオチドの長いループを有するもの(4GL15)、隣り合うG-quartetのグアニンの間にbulge(出っ張り,グアニン以外のヌクレオチド)が存在するもの、G-quartetのひとつのグアニンが欠失しているものなど、非典型的なG4構造が発見された(図1B)。

2 G4の細胞内動態と生物学的機能

Aaron Klug 博士は、40年前に、‘If G-quadruplexes form so readily in vitro, Nature will have found a way of using them in vivo’ と言われた。G4は試験管内で発見され、その構造学的研究は、優れた核酸化学研究により進展したが、細胞内で実際にG4が形成されているかを検証するためにはG4を検出するプローブの開発を待たねばならなかった。

1) G4の多様な生物学的機能 : G4はDNAのみでなく、RNAおよびRNA-DNAハイブリッド上に形成される。最近の研究から、これらのG4が、多様な核酸が関与する反応の制御シグナルとなっていることが明らかになっている(図2A)。一方、G4は、複製中のDNA鋳型鎖に形成されると、複製を阻害し、究極的にガンの原因になるゲノム不安定性を誘導する。また、繰り返し配列のコピー数の増加により、異常なG4構造が形成され、神経変性疾患の原因となることが知られている(図2B)。従って、G4は「諸刃の刃」であると言える。

2) 細胞内に存在するG4を検出するプローブ : G4特異的ポリペプチド抗体、BG4

細胞内で実際に G4 が形成されているかを検討するためには G4 を検出するプローブの開発が必要であった。BG4 は、G4 構造を特異的に認識するポリペプチド抗体である¹³⁾(図 3)。これを用いた免疫蛍光染色の解析により細胞内の G4 が検出された。その数は S 期に最大になり、Pyrifostatin, Phen-DC3, TMPyP4 などの G4 を安定化することが知られている化合物に添加によっても増加した。細胞内での G4 形成部位を同定するために、BG4 を用いた ChIP-seq 解析が行われた¹⁴⁾。ヒト正常上皮皮膚角化細胞(NHEKs; normal human epidermal keratinocytes)においては 1496 個の G4 ピークが同定されたのに対して、自然不死化したヒト上皮皮膚角化細胞(HaCaT; spontaneously immortalized, non-oncogenic human epidermal keratinocyte)では 10560 個のピークが同定された。このことは不死化細胞では、より多くの G4 が形成されることを示唆する。さらに同定された G4 部位の 98% は、FARE-seq あるいは ATAC-seq により同定されたヌクレオソームフリー領域に存在した。

3) G4 を検出する新規プローブの開発 : G4P

しかし、BG4 は、トポロジー特異性が高く、網羅的に細胞内 G4 を検出できているという保証がない。最近、G4 ヘリカーゼ DHX36 の G4 結合ドメインをリンカーで結合した分子が新規 G4 プローブとして開発された¹⁵⁾(図 3)。この分子は *in vitro* では高親和性 (nM レベルの Kd) で G4 構造に特異的に結合する。このプローブを用いてヒト肺基底上皮腺癌由来 A549 細胞を解析した結果、123,274 個の G4 ピーク (Fold change > 1.6) が検出された。BG4 に比べて数が多いのは、G4P の G4 親和性の高さと、より広範なトポロジーの G4 を認識する能力による。このうちの 43,752 個は Fold change が 5 より大きくより安定な G4 を形成していると想像される。これらの安定な G4 の 80% は遺伝子の前後 2kb の領域に存在する。また 50% は TSS の前後 2kb の領域に存在する。この割合は Fold change を高くするほど増加した。また遺伝子の 70%、TSS 近傍領域の 60% に G4 が検出された。不死化細胞あるいはがん細胞において、G4 は、MYC, PTEN and KRAS, などのガン関連遺伝子のプロモーター領域に検出されたが、正常細胞では検出されなかった。

さらに、転写の活性と G4 形成効率の間に、強い相関が観察された。すでにつづの実験から G4 形成配列の転写により、その上流と下流に G4 構造が形成されることが明らかとなっている¹⁶⁾¹⁷⁾。その形成は、RNA-DNA hybrid 形成と共役する。これらの結果から、細胞内においても転写が G4 形成の主要なドライビングフォースとなっている可能性が強く示唆された。

二本鎖 DNA 上の G4 形成配列が G4 構造を形成するためには、安定な二本鎖構造が、一過性にでも 1 本鎖に転換されることが必要である。転写のほか、最もこれが起こりやすいのは DNA 複製時である。実際、BG4 を用いた細胞内 G4 の可視化により、G4 形成は S 期に促進されることが示された。これらの G4 は複製時に一過性に形成され、DNA 合成に進行を妨げる。細胞はこれらの G4 を破壊する酵素、G4 ヘリカーゼを有しており、複製進行の G4 阻害を解除する。この役割をはたす代表的な G4 ヘリカーゼは Pif1 である¹⁸⁾¹⁹⁾。

3) G4 結合低分子化合物 (G4 リガンド) : G4 検出・機能解明のための重要なツール

1997 年に G4構造に特異的に結合する低分子化合物2, 6-ジアミノアントラキノン BSU-1051 が初めて報告されて以来、今日までに800を超える様々な G4 リガンドが報告されている²⁰⁾ (図3)。これらは、G quartetを上下から挟み込むあるいは、その間に挿入されるなどの様式でG4に結合する。放線菌*Streptomyces anulatus* 3533-SV4 より単離された天然化合物G4リガンドであるtelomestatinは、テロメア繰り返し配列 5'-TTAGGG-3'に結合しテロメラーゼ活性を阻害する²¹⁾。telomestatin は G4 を強く安定化するが、これをリード化合物とした、より強力かつ特異性の高いG4リガンドが開発されている。L2G2-6OTD²²⁾は、ポリオキサゾールの環状化により telomestatin の大環状構造を模倣し、さらに G4 との静電親和相互作用のための側鎖を有し、G4を強く安定化する。ビスキノリニウム化合物Phen-DCファミリーのひとつ、Phen-DC3は、優れたG4選択性および親和性を示し、化学的にも安定であり、溶解性も高い。

G4リガンドは、一般にG4構造を安定化するものが多いが、G4形成の促進、さらにトポロジーの変換を誘導し、その機能を変換できる化合物も開発されている。G4リガンドは、制ガン剤の候補としても期待されている。G4構造は、DNA複製を強く阻害するので、G4リガンドによる安定化により、より強く複製を阻害しDNA損傷を誘導し、がん細胞死を誘導する可能性が想定される²³⁾。また、G4構造は、転写にも影響をあたえる。2002 年には TMPyP4 が、c-MYC の発現を抑制し、ヒト乳がん細胞株 MX-1 担がんマウスおよびヒト前立腺がん細胞株 PC3 担がんマウスにおいて、腫瘍増殖率の低下や生存期間の延長を示すことが明らかにされた²³⁾。また、TMPyP4はテロメラーゼ活性を阻害テロメアの機能不全を誘導する。一方、G4はRNA上にも形成され、翻訳を阻害し、がん関連遺伝子の発現に影響を与える。このように、G4リガンドは複数のメカニズムで制がん作用を及ぼす。

4) G4 結合タンパク質 : G4 の機能解明、新規プローブへの応用

G4に特異的に結合するタンパク質がこれまで多く見出されている。これらのタンパク質は、生化学的には、G4に結合するのみでなく、G4形成の促進、G4構造の安定化、G4構造の除去(巻き戻し)などの性質を有する。機能的には、転写、DNA複製や修復の制御、複製進行を阻害するG4構造を開裂し、複製進行の促進、mRNAに結合し翻訳の制御、クロマチン構造の形成、ウイルス増殖の制御(ウイルス由来の因子)などに分類される。

RAP1とDHX36のG4への結合の解析から、 α -helixとG-quartetとの相互作用が、共通の相互作用様式であることが示唆された²⁴⁾²⁵⁾。一方、多くのG4結合タンパク質はRGGドメインを介してG4のループ領域と相互作用する²⁶⁾。中でも、ヌクレオリンは、そのRBDおよびRGGドメインを介してG4構造に結合し、その構造を安定化する。しかし、G4との相互作用がどのようにG4の安定化あるいは不安定化をもたらすかは不明である。

3 G4 を介した DNA 複製の正と負の制御

最初に述べたように、G4 は DNA, RNA, RNA-DNA hybrid の上に形成され、広く細胞内の核酸機能の制御に関与すると想像される。実際、G4 は、これまでの研究から、転写、組換え、翻訳、転移、エピゲノム制御など、数多くの核酸が関与する反応を制御することが知られている²⁷⁾。

DNA 複製の制御に関しても、その正と負の制御に極めて重要な機能を果たすことが、筆者の研究も含めて明らかになってきた。

1) G4 による DNA 複製の正の制御

上記にも記載したように G4 は転写プロモーターの近傍に濃縮しているが、ハエ、マウス、ヒトの複製起点の 60%において、その近傍に G4 形成配列が存在することが報告された。一方、大腸菌や古細菌では、通常の複製起点に依存しない複製システムが知られている²⁹⁾³⁰⁾。特に大腸菌では、RNaseH や RecG ヘリカーゼの変異体など、RNA-DNA ハイブリッド構造が安定化する背景でゲノム複製を行う「安定 DNA 複製」が知られている²⁸⁾。G4 形成配列が RNA-DNA ハイブリッド構造形成を強く促進するという事実から、この安定 DNA 複製における G4 の役割に着目した。

i) 高等生物の複製起点と G4 形成配列

G4 を形成しうる G-rich 配列が高等生物複製起点の 250-300bp 上流に高頻度で同定された。この G-rich 配列は nucleosome-free 領域と相関していた。G-rich 配列の複製起点近傍での存在は、ヒトの他にマウス、ニワトリ細胞でも、種々の複製起点マッピング法により示され、方法、細胞種によるバイアスではないと考えられる³¹⁾³²⁾³³⁾。一方、G-rich 配列の近傍に ORC や MCM の結合も示され、preRC の形成も示唆された。さらに、ニワトリの β -globin 複製起点を用いて、G-rich 配列の機能的な重要性が、新生 DNA 鎖を解析する複製開始マッピング法によりしめされた³⁴⁾。また、ヒト細胞における複製起点近傍の G4 形成配列の変異解析、EB ウイルスベクターをもちいた一過性 DNA 複製による起点活性の測定、カエル卵抽出液による *in vitro* 複製系において G4 配列による競合アッセイなどから、G4 形成配列の機能的な重要性が報告された³⁵⁾。

これまでの解析から G4 構造は preRC の形成ではなくその活性化の過程に関与することが示唆されているが、G4 の高等生物の複製開始における役割の詳細は不明である。

ii) RNA-DNA hybrid/G4 構造の複製開始における役割

大腸菌ゲノムは通常、レプリケーター *oriC* からイニシエーター DnaA タンパク質の作用により開始するが、RNaseH 変異株では *oriC* や DnaA の不在下でも複製が進行し、細胞が生育可能になる。この「安定 DNA 複製(タンパク質合成を阻害した条件下でも複製が進行することからこう名付けられた)」は、複製起点の反対側の複製終結領域(*ter*)の一部が、重要な役割を果たし、その中に G4 形成配列を同定した。さらに、G4 リガンドの影響、Li⁺イオンの影響などから、この複製には G4 構造が関与する可能性が強く示唆された(田中卓ら、未発表 data)。In vitro の複製システムの解析から、RNA-DNA hybrid に依存した DNA 複製が観

察され、この複製は G4 リガンドや G4 構造を有する DNA の添加による特異的に阻害された (深津理乃ら、未発表 data)。これらの結果から、G4 形成配列の転写により形成される RNA-DNA hybrid/G4 構造が複製開始のシグナルとなる可能性が示唆された。

2) G4 による DNA 複製の負の制御

i) S 期における複製タイミングの制御

酵母において、複製起点が詳細にマップされた結果、これらの複製起点の活性化は、S 期の時間的制御を受けることが明らかとなった。動物細胞においては、より広いゲノム領域を単位として、細胞種に特異的な複製タイミングドメインが存在すること、また、それは、TAD (Topologically Associated Domain) と関連することがこれまでの研究から明らかになっている³⁶⁾。S 期後期に活性化される後期複製起点は、複製障害によるチェックポイント機構により抑制される。しかし、正常な S 期進行時に複製起点の活性化の秩序を決定する因子は不明であった。

ii) 複製タイミング因子 Rif1 の同定

私たちは、分裂酵母を用い、複製開始のアクセルといえる Cdc7 キナーゼ(分裂酵母では Hsk1)のバイパス変異の探索から、複製のブレーキの同定を試みた。この結果、Rif1 を見出した。分裂酵母 *rif1* 欠損株では、細胞増殖や複製ストレス応答はほぼ正常であったが、複製起点活性化のゲノムワイドプロファイルが大きく変化した³⁷⁾。特に、後期複製起点が、初期に活性化するように変化した。動物細胞において Rif1 を KD すると、ゲノムワイドに複製タイミングドメインが変化することが示された³⁸⁾。その変化の大部分は後期領域の初期領域への転換であった。これらの事実は、私たちが初期に想定した、複製のブレーキとしての因子に期待されるものであった(図 4A)。

iii) Rif1 は G4 を介してクロマチン に結合する

もともとテロメア結合因子として知られていた Rif1 は、テロメア以外の染色体腕部にも結合することが明らかとなった。結合部位を ChIP-chip, ChIP-seq で解析した結果、Rif1 は分裂酵母染色体上の 35 箇所にも顕著な結合をすることを見出した。それらの部分の配列解析からグアニンに富んだ保存配列の存在が明らかになった。さらに、これ以外にもグアニンの連続配列が複数存在することから、G4 構造形成の可能性が示唆された。実際、次のような実験から、Rif1 結合部位は、G4 構造を形成し、Rif1 は、クロマチン上に形成される G4 構造を認識し結合することが証明された³⁹⁾。① Rif1BS 二本鎖 DNA を熱変性し、リアニールさせると G4 構造を有する移動度の異なる分子がアクリルアミド上に検出される。②この分子は G の連続配列の変異や、グアニンのデアザグアニンへの置換により消失し、G4 リガンドにより安定化する。③ 精製した Rif1 は、二本鎖 DNA 上に熱変性で形成される G4、および一本鎖上に形成される G4 に特異的に結合する。④ 同様な変異をゲノム上の Rif1BS に導入すると、Rif1 のクロマチン結合が消失する。

iv) Rif1 による複製開始抑制のメカニズム

分裂酵母において特定の Rif1BS の変異により、変異部位の周辺 50kb に渡り、複製起点活性化の脱制御が誘導される。また、動物細胞の Rif1 KD 細胞では、核膜近傍のクロマチンループのサイズが増大することがわかった。これらの事実から、Rif1 はクロマチン構造を変化させる可能性が示唆された⁴⁰⁾。実際、4C 解析から、Rif1 がクロマチン相互作用に影響を与えることが示された⁴¹⁾。

分裂酵母 Rif1 は、クロマチン に G4 認識を介して結合し、その近傍に存在する複製起点からの開始を、2つのメカニズムで抑制すると考えられている。① フォスファターゼを呼び込み、複製開始に必要なリン酸化を阻害する。② G4 結合、多量体形成能に依存して、核膜近傍に複製開始に抑制的なクロマチン構造を形成する(図 4BC)。

①は N 末領域に存在する PP1 結合ドメインの欠損により複製抑制が解除すること、②は C 末領域に存在する G4 結合、多量体化のドメインの変異により複製抑制が解除すること、により示される。

分裂酵母、動物細胞の Rif1 の C 末領域は G4 結合ドメインを有する。いずれの生物種の Rif1 も C 末領域は両親媒性の coiled-coil domain を形成すると予想される(井口ら、未発表 data)。C 末領域の変異解析から、G4 結合、多量体形成がそれぞれ失活した変異体を同定し、そのいずれも複製抑制能が喪失することから、両者が Rif1 の機能に重要であることが示された(加納ら、未発表 data)。

4 Rif1 結合部位 G4 形成配列の解析から明らかになってきた G4 の形成と機能の新事実

1) G4 形成配列の多様性と G4 形成の可塑性

ChIP seq から同定された Rif1 の強い結合部位が 35 個同定され、それらはすべてグアニンの連続配列の共通配列を複数個有しており、より安定な G4 構造を形成すると考えられる。弱い Rif1 結合部位も同定されており、それらは、共通配列を一個しか有していないものが多い。一方、分裂酵母ゲノム上には 442 個の G4 形成可能配列が推定されているが、35 個の Rif1BS と重なっているものは 2 個のみで残りの 33 個は通常のアプローチで予測できない。このことは細胞内に形成される G4 を配列のみから予測することは困難であることを示す。Rif1BS の配列を見ると、ループ配列が典型的な G4 形成配列に比較して極めて長いことが特徴的である。この長さは、非標準的な long loop G4 形成配列、4GL15 に定義される 8-15nt に比較しても長く、G4 は、これまで想定されていないような配列にも形成されうることを示す。

さらに、Rif1BS のグアニンの連続配列の一部を欠損しても、近傍に存在する別のグアニン配列を用いて、異なる G4 構造を形成することも、明らかとなった。このように、G4 形成配列は可塑性を有し、頑強なゲノムシグナルである可能性を示唆する。

また、Rif1BS は、すべてが遺伝子間領域に存在し、その内の 29 個は非コード転

写領域と重なっている。このことは、Rif1BS の G4 は、これらの非コード転写に依存して形成される可能性を強く示す。

2) G4 構造とヌクレオソーム構造の関連

さらに、35 個の Rif1BS のうちの 30 個は、ヌクレオソームフリー領域に存在した。上記で、ヒト細胞内でマップされた G4 の 90%以上がオープンクロマチン領域に存在すると述べた(図 5A)が、G4 構造形成とヌクレオソーム形成の因果関係は、あるのだろうか？

私たちはこれについて、Rif1 結合部位を用いて検証した。3つの可能性を想定した。i) 結合する Rif1 がオープンクロマチン 構造の形成を促進する。ii) オープンクロマチン 構造の存在が G4 形成を促進する。iii) G4 形成がオープンクロマチン 構造を促進する。Rif1 を欠損してもヌクレオソームは形成されなかった。一方、G4 構造を形成しない変異をゲノム上に導入すると、変異を有する Rif1 結合部位でヌクレオソーム構造が回復した(加納ら、未発表 data) (図 5B)。この事実は、G4 構造の形成が、ヌクレオソーム形成を促進することを示す。

3) 細胞内の G4 を検出する新規技術の開発

G4 結合タンパク質や、化合物をプローブとした G4 検出法では、これらのプローブによる G4 構造への影響や、転写や増殖への影響による間接的な G4 形成への影響を除外できない。したがって、G4 構造に摂動を与えない状況下で、G4 を検出する方法の開発が望まれる。

Rif1BS 上に形成される G4 は、実際に長いループ構造を形成することを、1 本鎖特異的ヌクレアーゼを用いた解析により証明した⁴²⁾。そこで、この長いループ構造を利用して、細胞内で G4 を検出する新しい方法の開発を試みた⁴³⁾。この方法では、23bp のループ領域に 18bp の *I-SceI* 制限酵素部位を導入した。この配列の導入によりこの配列上での G4 形成能、Rif1 結合、さらに *in vivo* での機能が影響されないことは確認した。*I-SceI* は二本鎖状態の時のみしか DNA 切断できないので、G4 構造を形成すると *I-SceI* による切断が阻害されると想定した(図 6A)。熱処理と転写の 2 つの方法で、この *I-SceI* を含む配列上に G4 を形成させ、切断すると、切断は強く阻害された。一方、グアニン連続配列に変異を導入し、G4 形成能を阻害させると、熱処理や転写をしても *I-SceI* で切断される(図 6B)。この事実は、G4 形成に依存してループに導入した *I-SceI* 部位が切断されなくなることを示す。

次に、細胞内でこの切断を指標に、G4 形成を検出できるか検討した。このために、*I-SceI* 切断部位を導入した G4 形成可能(野生型)Rif1BS 株と G4 非形成(変異型)Rif1BS 株内で *I-SceI* 制限酵素を誘導的に発現し、切断を linker-mediated PCR で検出した。その結果、野生型では切断されず、変異体では切断が観察された(図 6C)。この事実は、この新しい方法を用い、特定の標的部位での細胞内 G4 形成の有無を測定することができることを示す。

この方法では、標的部位に制限酵素サイトを導入し、対応する制限酵素を発現する必要があるなど、方法がやや煩雑であるが、内在性の酵素部位を用いるために、界面活性剤で核膜を通過できるようにした単離核を用いて、ループに存在する制限酵素部位を用い、G4 構造の有無を検出できる系も確立しつつある。

おわりに：将来の展望

G4 構造の基盤となる G-tetrad 構造が発見されてから 50 年、G4 の細胞内での存在と、その生物学的重要性について疑う人はいないと思われる。しかしながら、G4 およびその関連構造の生体内における基本的意義の解明のための研究は、まだその緒に就いたばかりである。

1) 生体内での形成機構

細胞内の DNA の大部分は、極めて安定な、B 型右巻き二重らせん構造をとる。この安定な構造に打ち勝って、G4 構造を形成するためには、大きなエネルギーを必要とする。多くの因子が細胞内での G4 形成に影響を与える(図 7)。複製や転写などの反応に連動して形成される経路が最も重要であると考えられるが、*in vitro* の再構成反応系を利用し、G4 形成の過程を詳細に解析する必要がある。G4 構造がクロマチン形成に及ぼす影響を、*in vitro* で詳細に解析し、その構造を解明する必要がある。

2) 生体内での存在様式

プローブの開発に伴い、ゲノム上での G4 構造のマッピング、細胞内局在、ダイナミクスを解析することが可能になってきた。しかし、G4 の細胞内での存在様式を明らかにするためには、次のような事項を考慮する必要がある。

i) トポロジー：すでに陽イオンの種類や分子混雑状況により同じ配列が異なるトポロジーを形成することが *in vitro* で明らかになっている。トポロジー特異的なプローブ、あるいはトポロジーを制御（変換）するプローブの開発が望まれる⁵⁾。

ii) 形成された G4 の安定性：G4 はその構造や環境により、安定なものから不安定なものまで存在する。不安定な G4 は、生体内でダイナミックに形成と消失を繰り返している可能性がある。そしてこのような不安定な G4 構造は、複製や転写の開始の可塑的な制御、確率論的な反応事象に関連する可能性がある。G4 構造を、高感度で **real time** で検出するプローブの創成が必要である。

iii) 多量体形成の意義：G4 は繰り返し配列上にも形成され、この場合、G4 が連続的に連なり多量体を形成する可能性がある⁴⁴⁾。amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal dementia (FTD) などの神経変性疾患の原因となる繰り返し配列も DNA あるいは RNA の上で大きな多量体構造を形成し、それが疾患の原因となる可能性がある(図 2)。また、単量体の G4 が π -stacking を介して多量体を形成することも知られており、別のゲノム領域に形成される G4 が、連結し、クロマチンループを形成する可能性も指摘されている。さらに大きな多量体を形成し、より複雑なクロマチンループ構造を形成する可能性もある⁴⁵⁾。このように、多様な G4 構造の集合がもたらす構造体の形成は生物学的に重要な役割を果たすであろう。もともと、グアニル酸の自己集合から G-カルテット構造の原型が見出されたことを思い起こす必要がある²⁾。この分子集合は次の iv) にも関連する。

iv) 液-液相分離と G4 : LLPS は、核酸とタンパク質の low-complexity domain との相互作用に依存するが、G4 もタンパク質との相互作用を介して、LLPS を形成し、転写や複製に必要なタンパク質が濃縮された compartment を形成する可能性がある⁴⁴⁾。最近 Rif1 は C 末領域を介して相分離をすることを見出したが、この領域は G4 や脂質との相互作用を介して、核内で特異なクロマチンドメインを形成する可能性がある(伊藤、森山ら未発表 data)。このように G4 DNA や G4 RNA が核となり、分子が集合し、機能的な LLPS を形成するメカニズムとその生物学的意義の解明が期待される。

3) 生体内での機能解析

i) G4 の新規機能の解明 : G4 は DNA のみでなく RNA、RNA-DNA hybrid にも形成され、その機能は、生理的な機能から、病理的なものまで多岐にわたる。最近、CCG リピートの増大により生じる Fragile X-related tremor/ataxia syndrome (FXTAS) において、CGG リピートの形成する G4 RNA がプリオノイドタンパク質である FMRpolyG の凝集・細胞間伝搬の核となることが報告された⁴⁶⁾。先に述べたように、G4 は、これまで考えられていた古典的な形成配列以外にも形成される。したがって、G の連続配列、あるいは G-rich 配列が関与する、生物現象は今後益々多く発見されると予想される。

ii) G4 の細胞内動態のダイナミクス : G4 の細胞内存在様式、プロファイルは細胞により大きく異なる。ある意味でエピゲノム情報であると言える。そしてそれらは、細胞内外の環境変化により、大規模に、あるいはゲノム局所的に変動すると推定される。種々の G4 を生細胞で特異的に検出するプローブの創成とそれを用いた、細胞内 G4 の動態の解析が必須である。

iii) 反応中間体としての G4 : G4 構造形成はグアニンの 7 位の N を介した Hoogsteen 水素結合に依存する。同様に、3 重鎖構造形成にも Hoogsteen 水素結合が関与する。これらの、あるいは類似した非 B 型核酸構造は、複製、組換え、修復、反応の中間体として一過性に形成される可能性がある。Hoogsteen 水素結合の形成を手掛かりとして、核酸の未知の反応中間体としての G4 関連構造の存在の探索は、核酸が関与する反応メカニズムの解明の上で重要な課題である。

iv) G4 解析の 1 分子、1 細胞技術の応用 : G4 の動態を詳細に解析するため、分子ダイナミクスシミュレーション、量子力学的な方法、一分子 FRET、G4 動態などの一分子可視化、G4 形成部位の 1 細胞解析など、新規技術の開発と応用が必要である⁴⁷⁾。

用語解説

Hoogsteen 型水素結合

塩基対を形成する水素結合パターンの一つ。ピリミジン塩基の N3 位から供与された水素の受容体が、ワトソン・クリック型塩基対ではプリン塩基の N1 位だが、Hoogsteen 型では N7 位である。

TAD topologically associated domain

chromosome conformation capture 法を応用した Hi-C 法により同定される、相互作用頻度の高いゲノム領域に対応しており、相互作用のギャップ（境界）により囲まれる。その長さは、約 0.5-1Mb である。

文献

- 1) Wang AJ et al. *Nature* **282**(5740): 680–686, 1979
- 2) Gellert M Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48: 2013-2018, 1962
- 3) Sen D & Gilbert W *Nature* 334: 364-366, 1988
- 4) Williamson JR et al. *Cell* 59: 871-880, 1989
- 5) Ma Y et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531: 3-17, 2020
- 6) Sen D & Gilbert W *Methods Enzymol.* 211 191-199, 1992
- 7) Miyoshi D et al. *J. Am. Chem. Soc.* 128:7957-7963, 2006
- 8) Guedin A et al. *Nucleic Acids Res.*, **38**: 7858–7868, 2010
- 9) Parkinson GN et al. *Nature* 417: 876-880. 2002
- 10) Huppert JL et al. *Nucleic Acids Res.* 35: 406-413, 2007
- 11) Todd AK et al. *Nucleic Acids Res.* 33: 2901-2907, 2005
- 12) Chambers VS et al. *Nat. Biotechnol.* 33: 877-881, 2015
- 13) Biffi G. et al. *Nat. Chem.* **5**., 182–186, 2013
- 14) Hänsel-Hertsch R. et al. *Nat. Genet.* **48**: 1267–1272, 2016
- 15) Zheng K-W *Nucleic Acids Research* 48: 11706–11720, 2020
- 16) Zhang C et al. *Nucleic Acids Res.* **41**: 7144–7152, 2013
- 17) Liu JQ et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**: 8992–8996, 2015
- 18) Paeschke K et al. *Cell* 145: 678-691, 2011
- 19) Paeschke K et al. *Nature* 497: 458-462, 2013
- 20) Sun D et al. *J Med Chem.* 40(14): 2113-2116, 1997
- 21) Shin-ya K et al. *J Am Chem Soc.* 123(6):1262-1263, 2001
- 22) Tera M et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47: 5557-5560, 2008
- 23) Nakanishi c & Seimiya H *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531: 45-50, 2020
- 24) Traczyk A et al. *Nucleic Acids Res.* 48: 4562–4571, 2020
- 25) Chen MC. *Nature* 558, 465–469, **2018**
- 26) Mcrae EKS et al *J. Nucleic Acids* 2017:9675348, 2017
- 27) Santos T et al. *Trends Cell Biol.*S0962-8924(22): 00075-7, 2022
- 28) Masai H and Tanaka T *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531: 25-38, 2020
- 29) Kogoma T. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61: 212-238, 1997
- 30) Malla S et al. *NATURE* 503: 544, 2013
- 31) Cayrou, C. et al. *Genome Res.* 25: 1873–1885 2015
- 32) Comoglio F et al. *Cell Rep.* 11: 821–834, 2015
- 33) Langley AR *Nucleic Acids Res.* 44: 10230–10247, 2016
- 34) Valton, A. L. et al. *EMBO J.* 33: 732–746, 2014
- 35) Prorok P et al. *Nature Commun.* 10:3274, 2019
- 36) Masai H, et al. *Annu Rev Biochem.* 79: 89-130, 2010
- 37) Hayano M et al. *Genes Dev.* 26(2):137-50, 2012

- ³⁸⁾ Yamazaki S et al. *EMBO J.* 31(18):3667-77, 2012
- ³⁹⁾ Kanoh Y et al. *Nat Struct Mol Biol* 22(11): 889-897, 2015
- ⁴⁰⁾ Yamazaki S et al. *Trends Genet.* 29(8): 449-460, 2013
- ⁴¹⁾ Foti R et al. *Mol Cell.* 61(2):260-273, 2016
- ⁴²⁾ Masai H et al. *J Biol Chem.* 293(44):17033-17049, 2018
- ⁴³⁾ Masai H. et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 531: 75-83, 2020
- ⁴⁴⁾ Frasson I et al. *International Journal of Biological Macromolecules* 204: 89–102, 2022
- ⁴⁵⁾ Robinson J et al. *Nucleic Acids Research* 49: 8419–8431, 2021
- ⁴⁶⁾ Asamitsu S et al. *Sci Adv.* 7(3): eabd9440, 2021
- ⁴⁷⁾ Cheng Y et al. *Biomolecules* 11: 1579, 2021
- ⁴⁸⁾ Kobayashi S et al. *Mol Cell Biol.* 39(4):e00364-18, 2019

図の説明

図1 グアニン4重鎖(G4)構造

A. グアニン4重鎖構造の模式図。典型的な3種類のトポロジー。B. 3種類の非標準的なG4構造。

図2 G4の生体内での機能：諸刃の刃

A. G4はDNA、RNA、およびRNA-DNAハイブリッド上に形成され、種々の核酸の動態の制御に参与する。B. G4は、複製阻害によるゲノム不安定性の増加、繰り返し配列が形成する異常なG4構造による神経変性疾患の原因など、負の側面も有する。G4の生体内での機能についての詳細は、最近の総説を参照してほしい²⁸⁾⁴⁵⁾。

図3 G4の検出あるいはマッピングに用いられるプローブ

BG4はフェージディスプレイにより見出されたポリペプチド抗体¹³⁾。G4Pは、DHX36 G4ヘリカーゼのG4結合ペプチド2個をリンカーで連結した新規G4プローブ¹⁵⁾。種々のG4リガンドが開発され、それらの機能分子を誘導しプローブとする開発も進んでいる⁵⁾。

図4 G4結合たんぱく質Rif1による複製開始の抑制

A. Rif1は、複製起点の近傍に結合し、複製開始を抑制する(分裂酵母)。B. マウスおよび分裂酵母Rif1たんぱく質の機能ドメインの模式図。いずれもC末にG4結合、および多量体形成ドメインが存在する。HEATリピートもG4結合能を有する。C. 多量体形成したRif1がクロマチン繊維を寄せ集め、クロマチン高次構造を形成するモデル⁴⁸⁾。

図5 G4はオープンクロマチン領域に存在し、ヌクレオソームフリー領域の形成を促進する

A. ヒトゲノム上のG4のピークの98%は、ATAC seqやFAIRE測定で規定されるクロマチンフリー領域と一致する。B. 分裂酵母のRif1結合領域の一つは、ヌクレオソームが存在しない(上のパネル)。rif1欠損株においても同様ヌクレオソームは存在しない(中のパネル)。一方、このRif1BSのグアニン繰り返し配列に変異を入れるとRif1結合しなくなるが、この時は、ヌクレオソーム構造が回復した(下のパネル)。C. G4構造は、ヌクレオソームを排除することにより、オープンヌクレオソーム構造形成を促進する。グアニン変異によりG4が形成されないとヌクレオソーム構造が回復する。

図6 細胞内のG4構造を検出する新しい方法

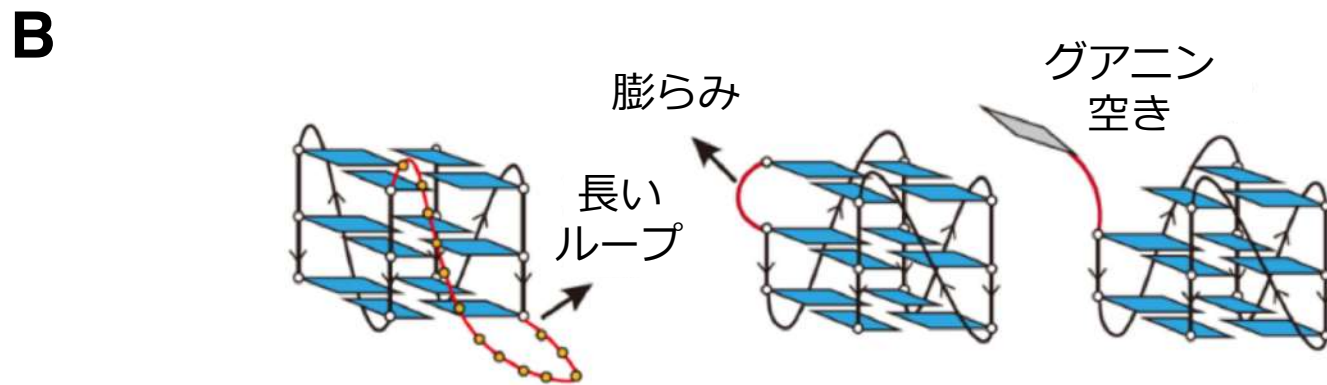
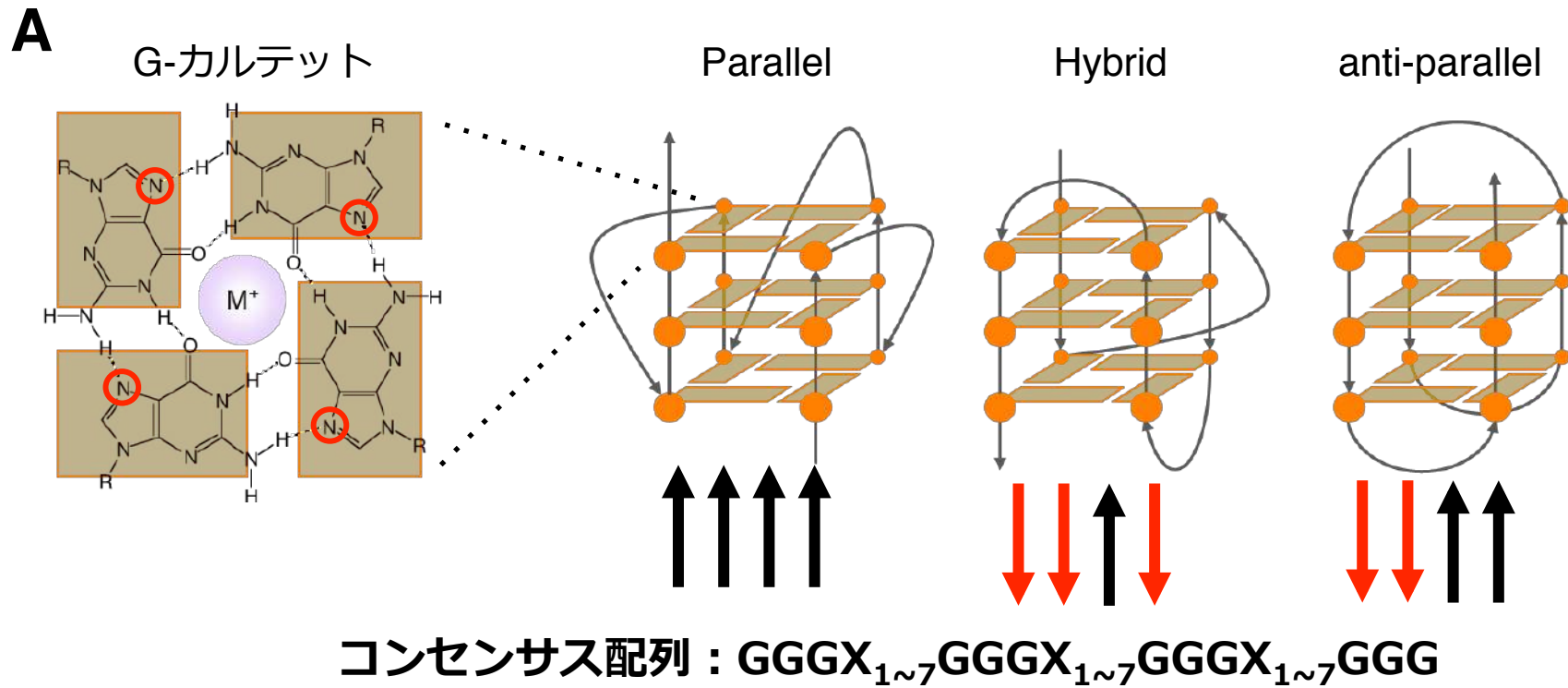
A. Rif1BS由来のG4形成配列は典型的なG4形成配列に比べて長いループ配列(23nt)を有する。B. Rif1BS由来のG4配列(野生型およびグアニン変異)のループ領域をI-SceIサイト配列に置き換えた。この配列上に熱処理あるいは転写により、

in vitro で G4 構造を形成した。野生型の場合にのみ、I-SceI により切断された。
C. 細胞内で I-SceI で切断し、Linker-mediated ligation により切断を検定した。

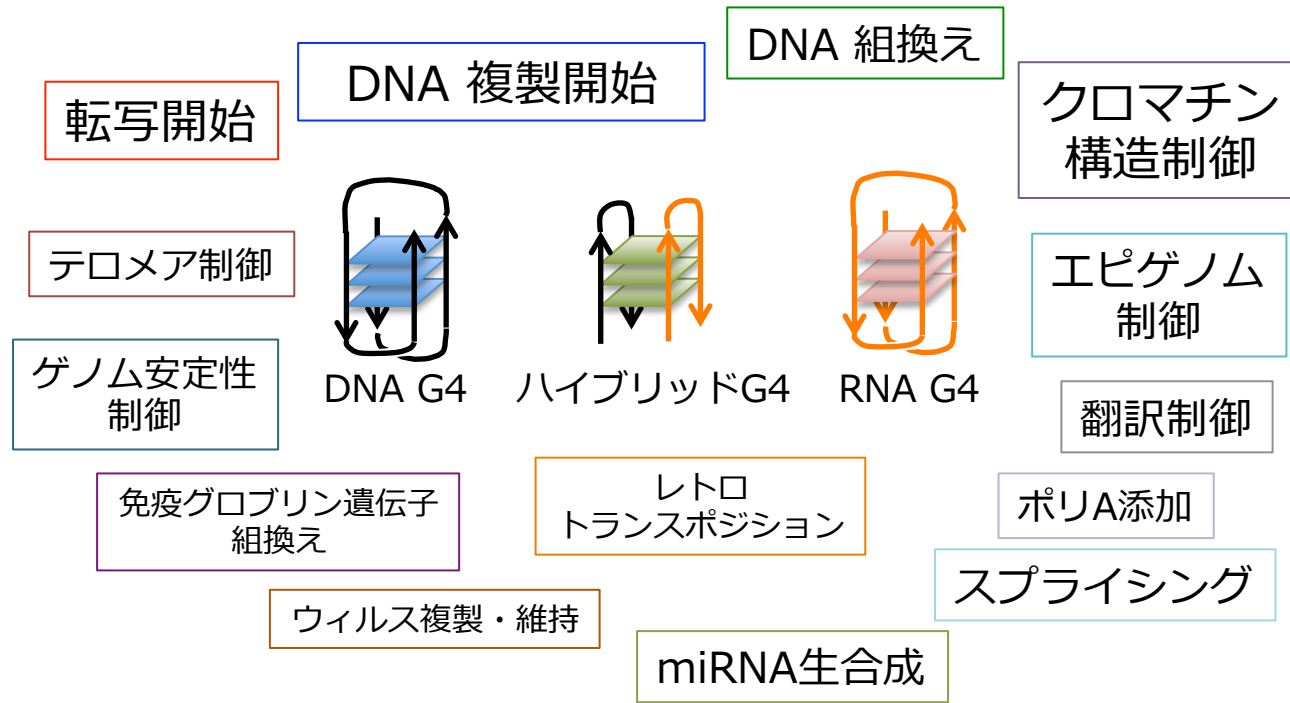
図 7 細胞内での G4 形成に影響を与える因子
染色体環境、たんぱく質、そのほかの種々の因子が細胞内における G4 構造の形成、安定性に影響を与える。

略歴

東京都医学総合研究所、所長。1981 年，東京大学理学部生物化学科卒業。1986 年，同大学院理学系研究科生物化学専攻理学博士。1981 年から 1990 年まで DNAX 分子細胞生物学研究所（新井賢一先生）で大学院生、ポストドクとして研究に従事。1990～東京大学医科学研究所、2000～東京都臨床医学総合研究所、2018 年から現職。一貫して DNA 複製の研究に従事。多様な生物種の DNA 複製の研究を通して、可塑性、適応性の高い DNA 複製のメカニズムの解明、そして、複製システムの進化についての洞察を深めた。

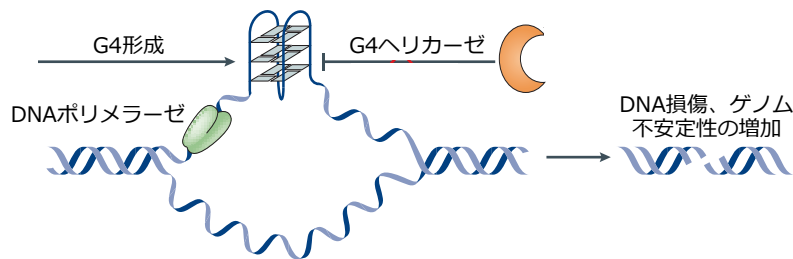


A



B

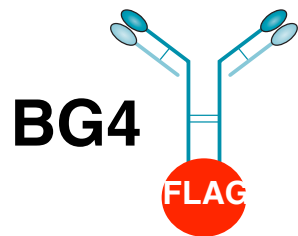
複製阻害によるゲノム不安定性の増加 → がんの原因



病原性を有するG4

GGGGCC 繰り返し配列の増幅
Amyotrophic lateral sclerosis ALS
Frontotemporal dementia FTD

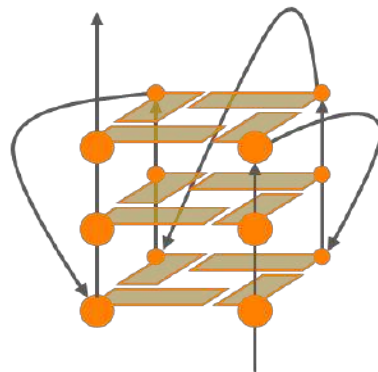




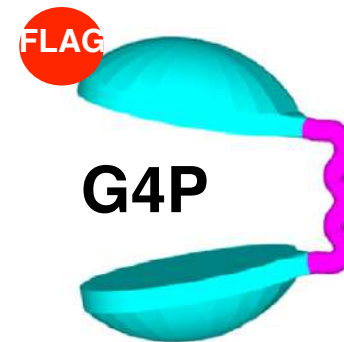
ポリペプチド抗体

10,560 G4 (HaCaT細胞)
1,496 G4 (NHEK細胞)

Nat. Chem. 5, 182–186 (2013)



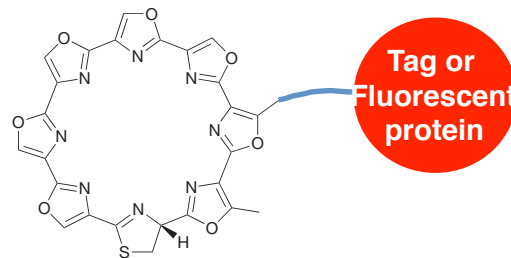
G4



G4結合タンパク質
G4結合ドメイン

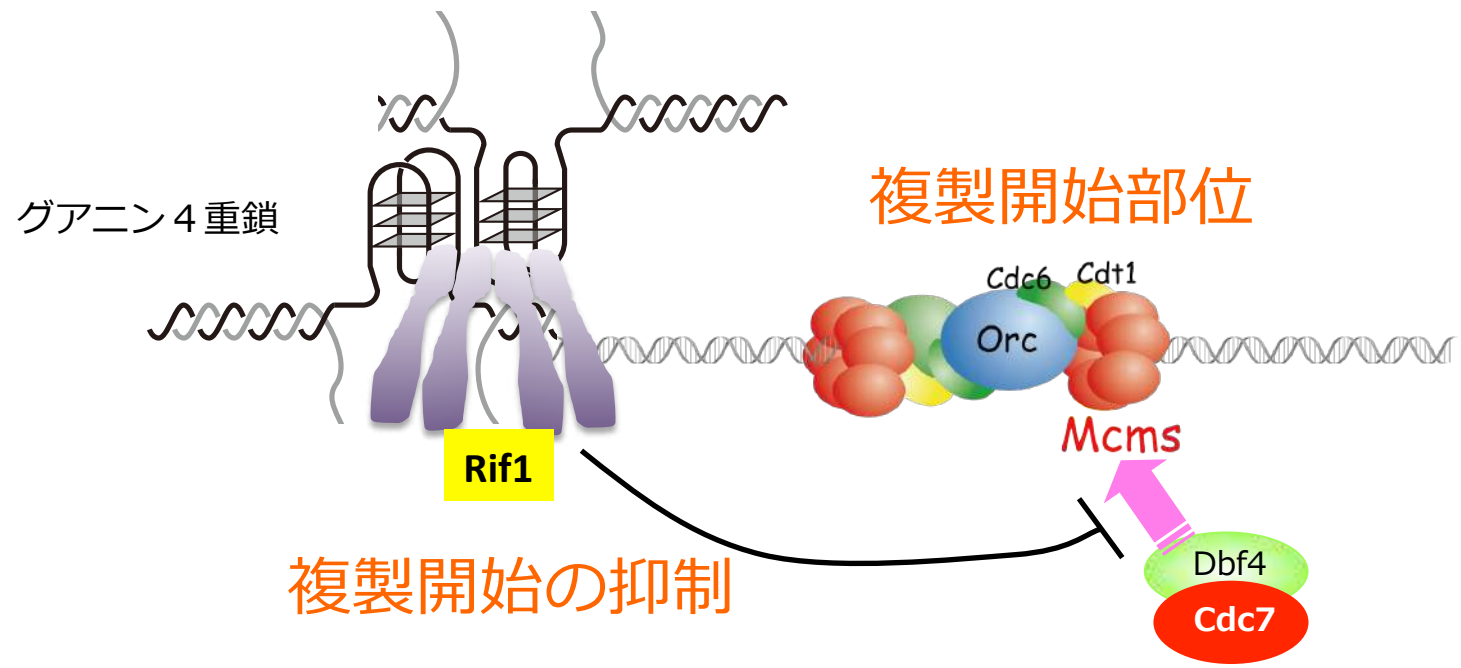
123,274 G4 (A549細胞)

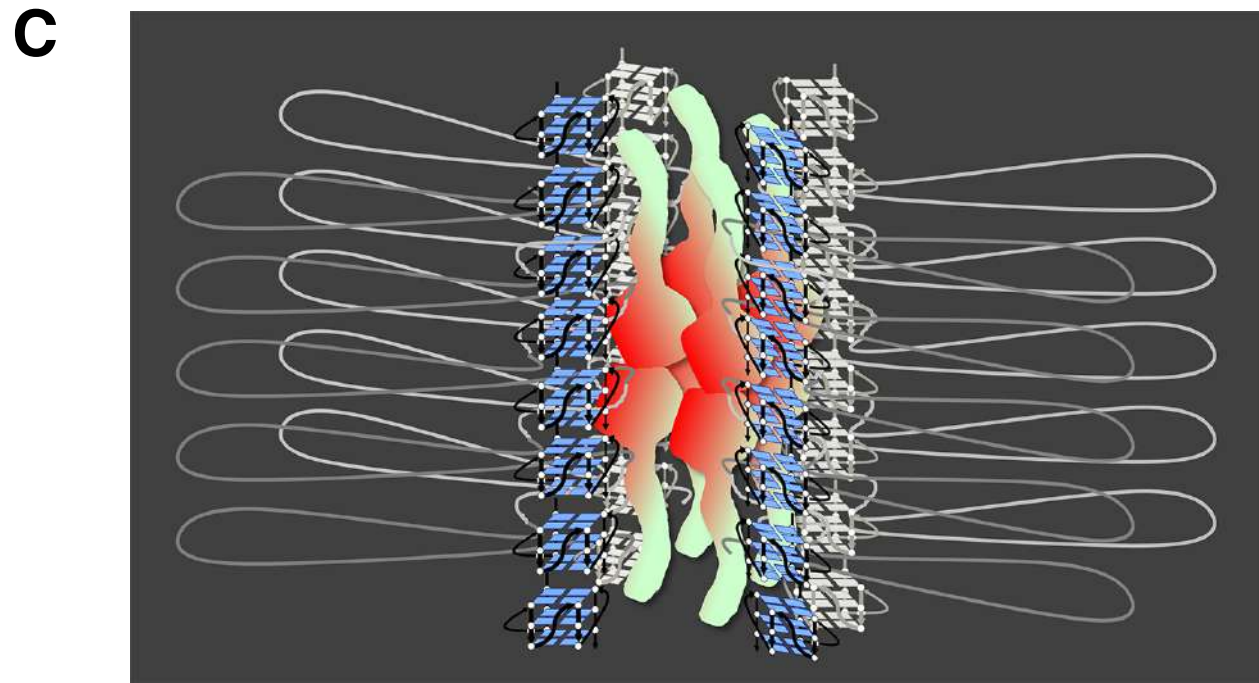
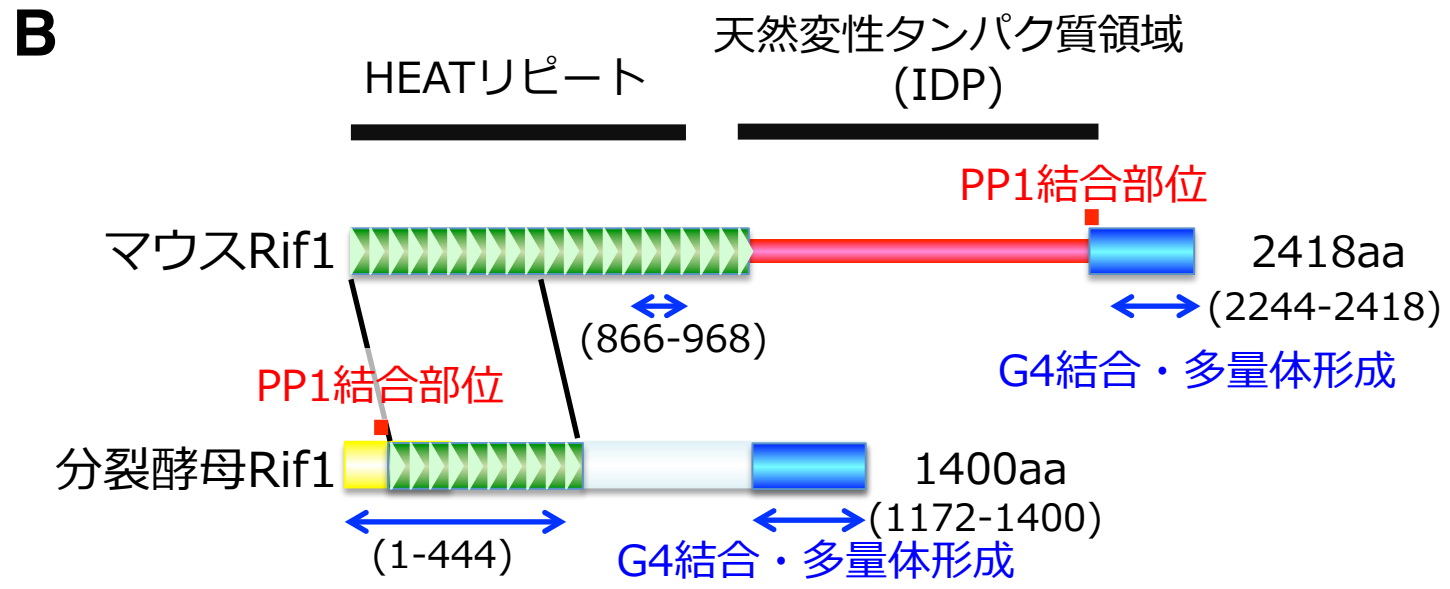
Nucleic Acids Research. 48, 11706–11720 (2020)



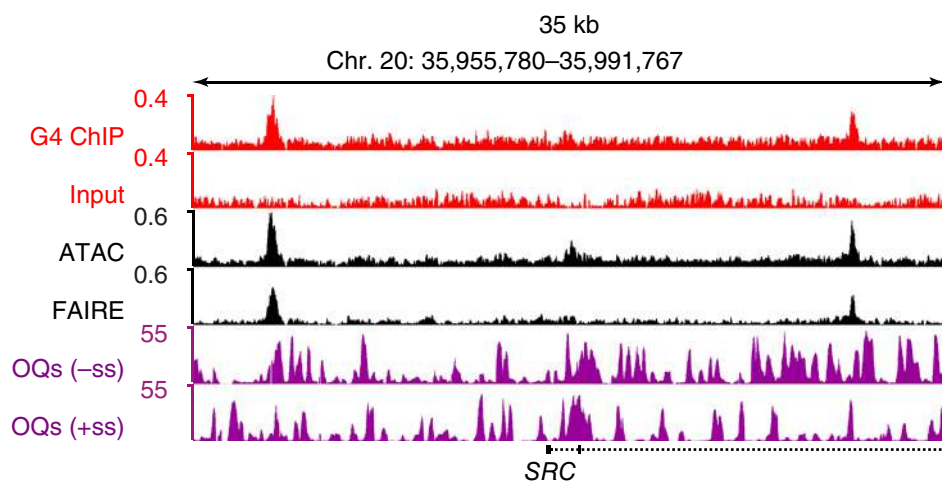
G4リガンド(低分子化合物)

A



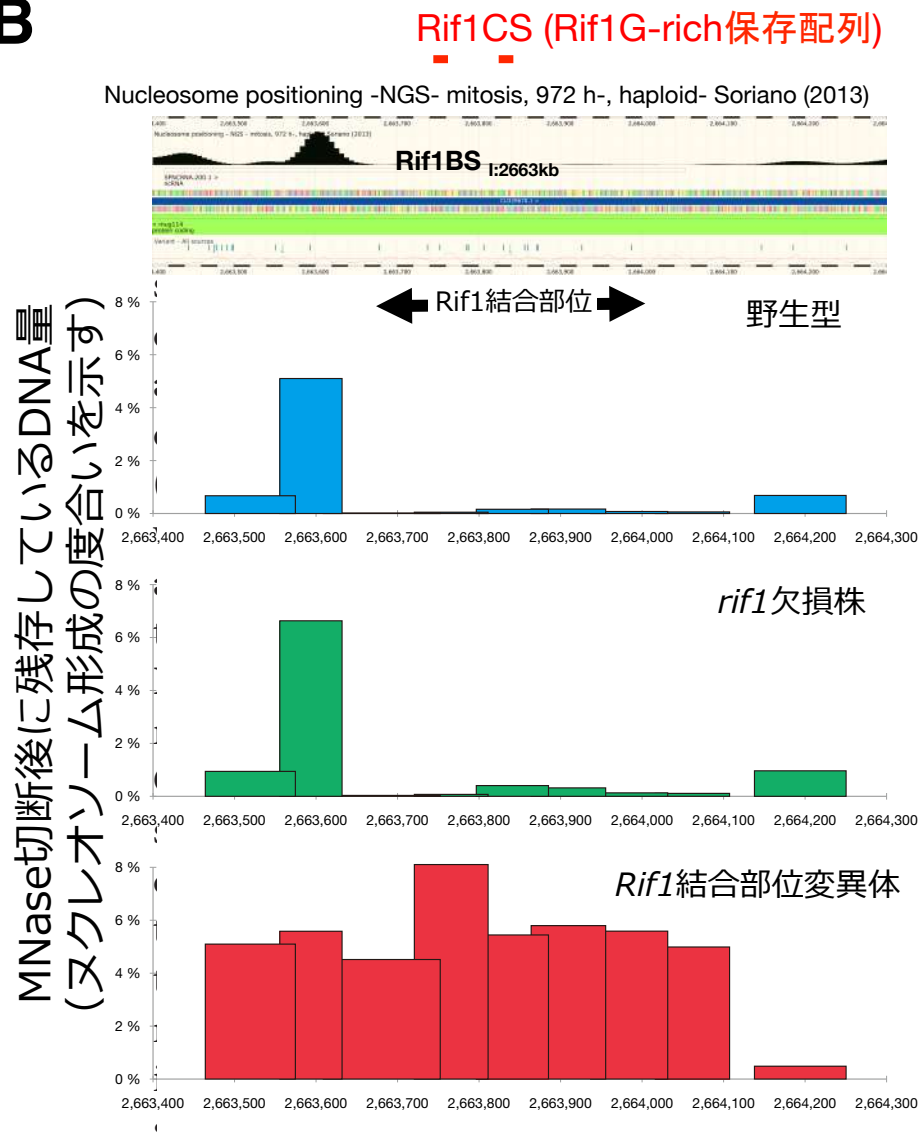


A

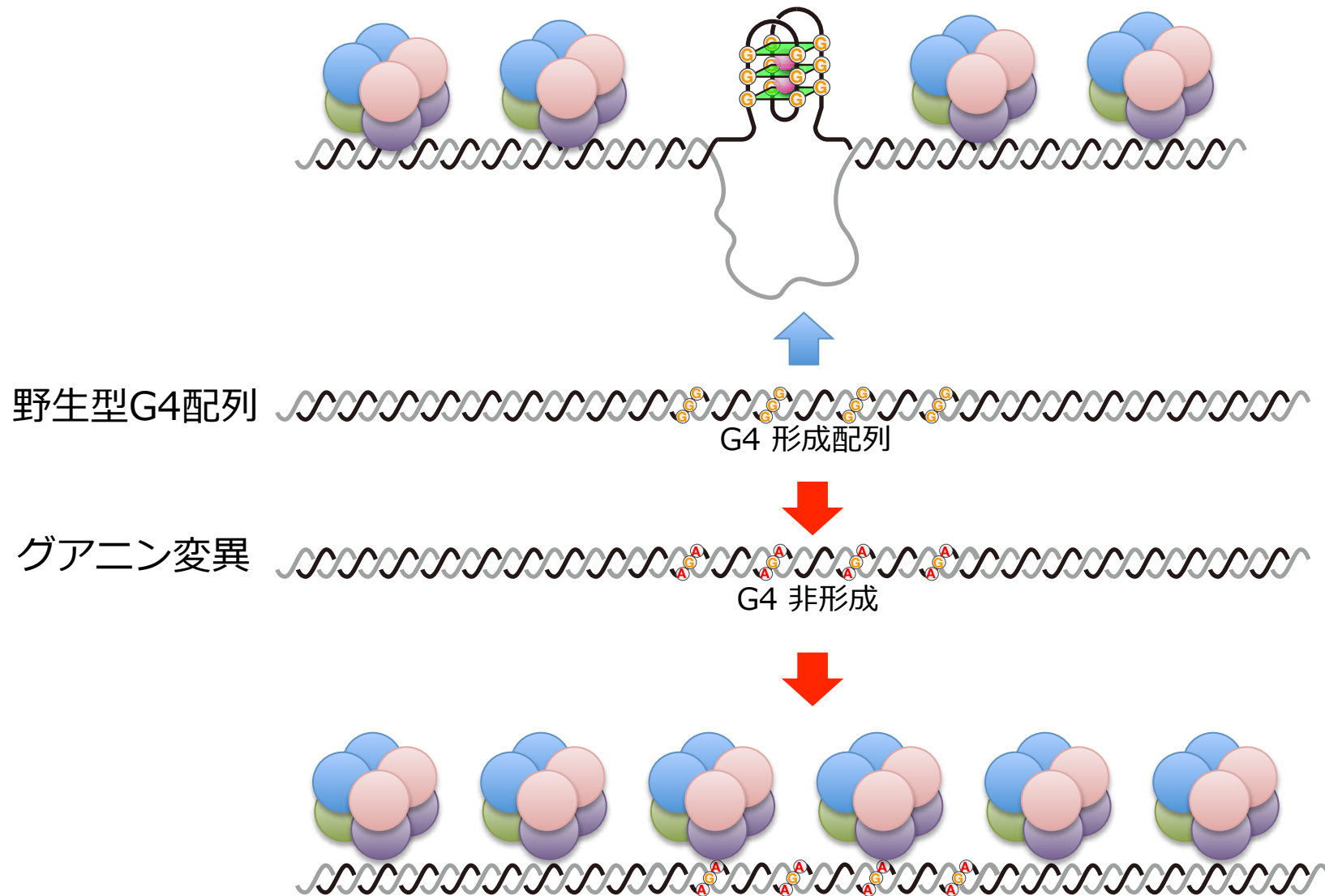


Robert Hänsel-Hertsch *Nature Genetics* 10 1267 (2016)

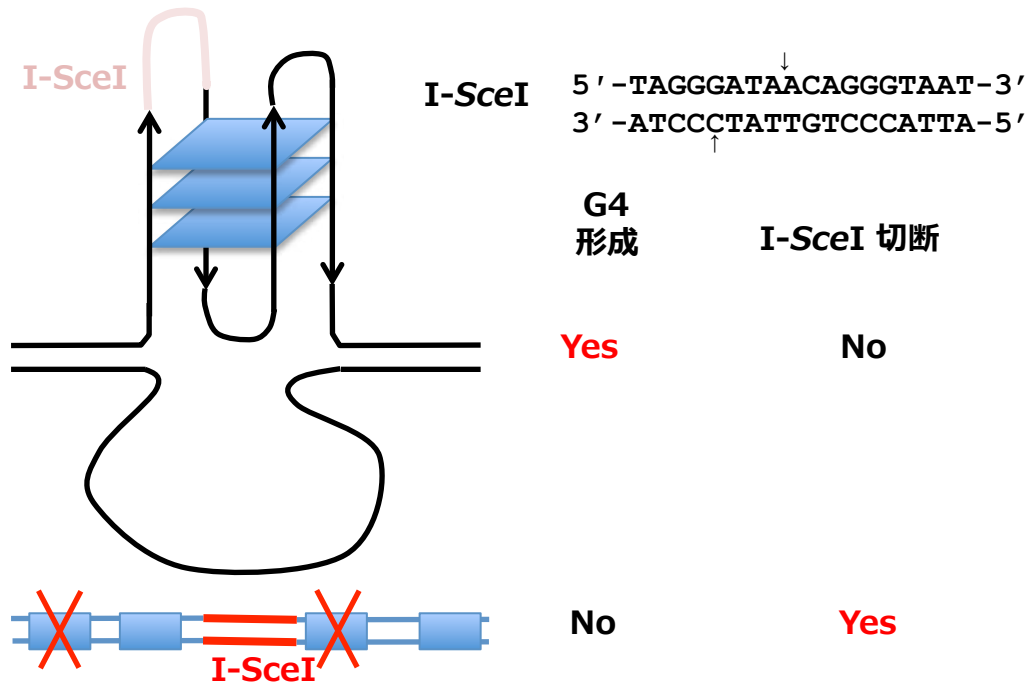
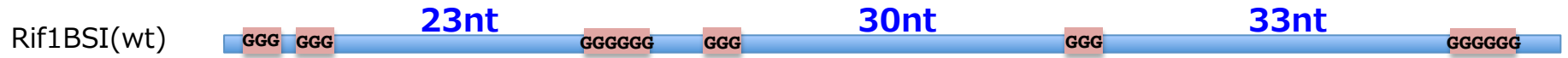
B



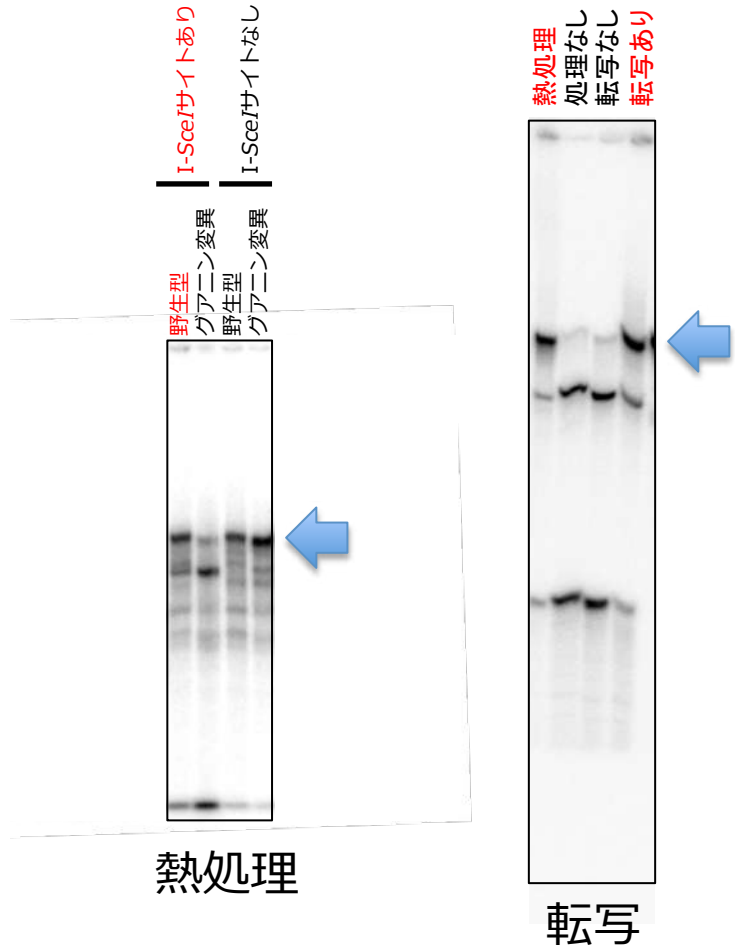
C



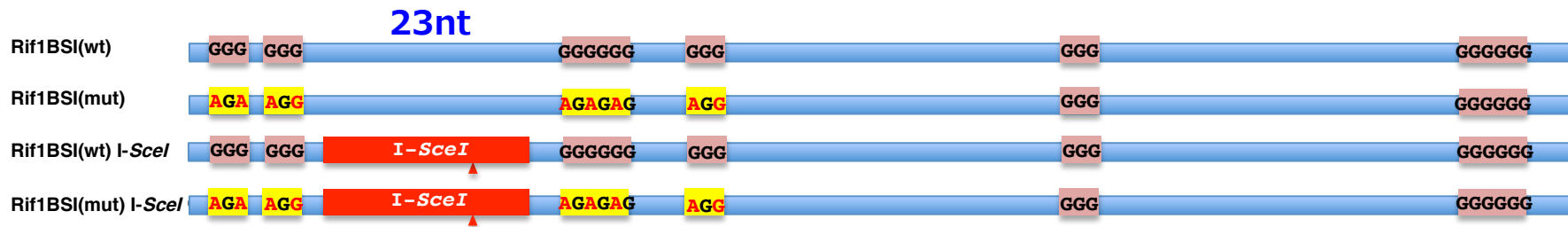
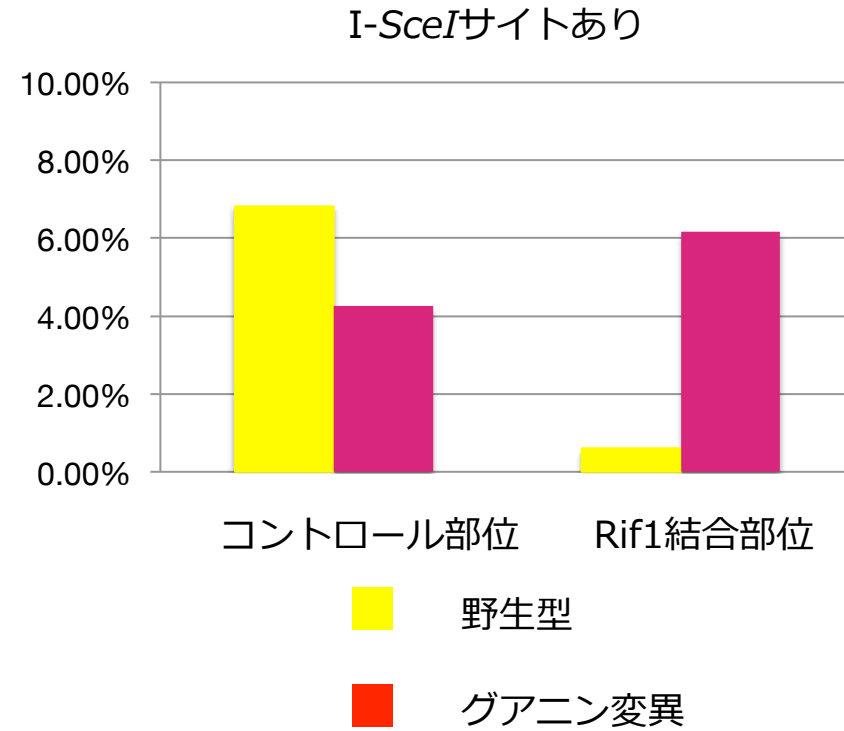
A

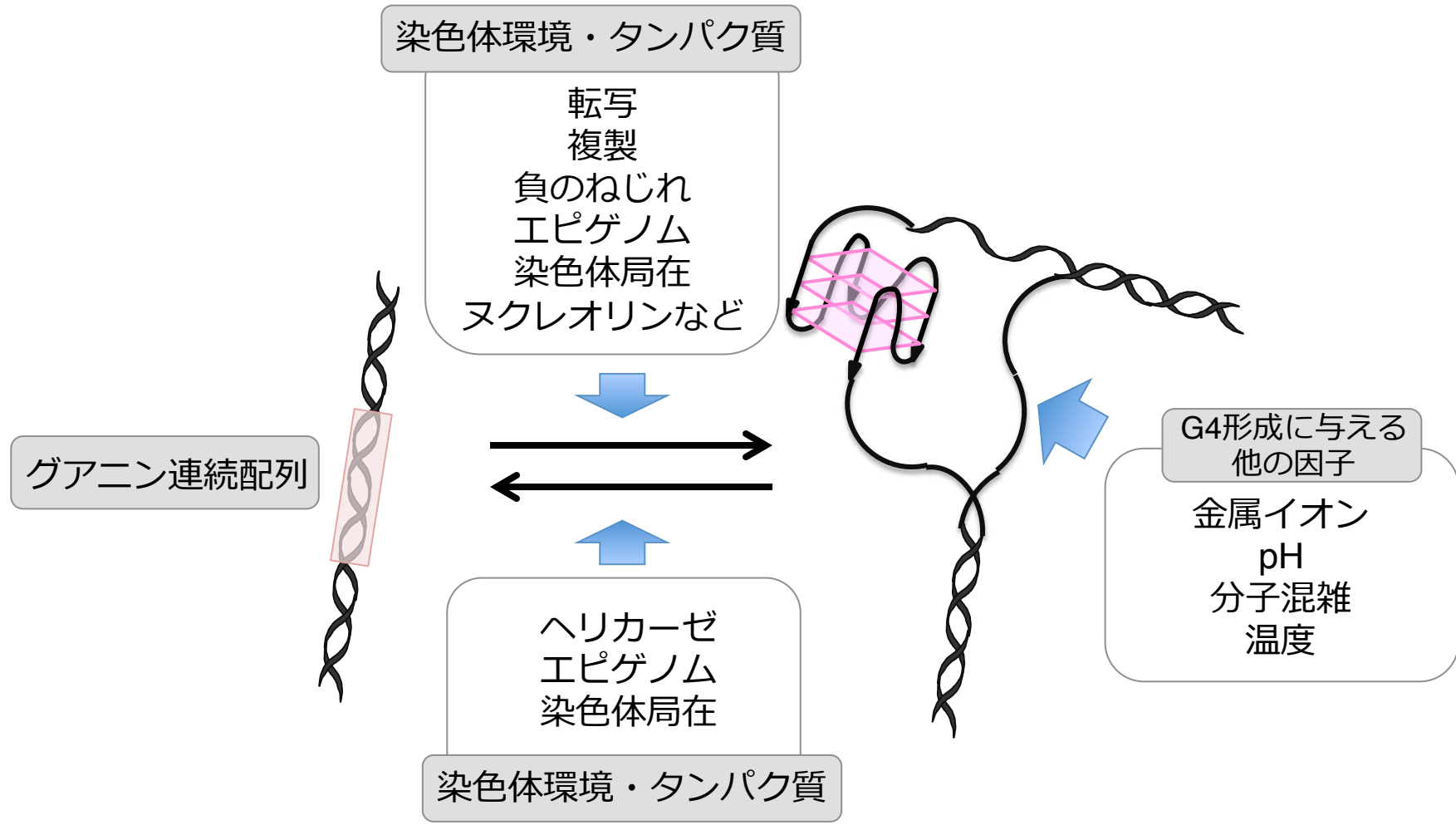


B 試験管内での反応



C 細胞内での反応





グアニン 4 重鎖構造の常識2022-1

- 1 グアニン 4 個から形成されるG-カルテットという平面構造が 2 – 3 層に重なる
- 2 K^+ , Na^+ などの一価の陽イオンが安定な形成に必要
- 3 Li^+ は構造を不安定化する
- 4 グアニンのN7位が関与するHoogsteen水素結合がG-カルテット形成に必須の役割を果たす
- 5 4本の鎖の相対的な方向により 3 種類のトポロジーをとる
- 6 DNA, RNA および RNA-DNA ハイブリッド上に形成される
- 7 標準的(古典的)な配列から逸脱した配列および構造のG4が多く存在する

グアニン 4 重鎖構造の常識2022- 2

- 1 古典的な標準的な配列からヒトゲノム上に37万個存在と予測された
- 2 物理的に形成しうるG4はヒトゲノム上に70万個
- 3 細胞内ではゲノム上に均一に配置されていない(その数は1500~12万個と細胞により大きく異なる。配列やin vitroからの予測より少ない)
- 4 TSS(転写開始部位)近傍に濃縮している
- 5 複製起点近傍にも多く存在する
- 6 がん細胞(不死化細胞)では正常細胞より多く存在する
- 7 大部分のG4がヌクレオソームフリー領域に存在する
- 8 G4に特異的に結合し、安定化するG4リガンドが多く開発された
- 9 G4構造を破壊するヘリカーゼ、安定化する機能を持つG4結合タンパク質が存在する