

令和元年6月20日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14675

研究課題名(和文) グアニン4重鎖とRif1蛋白質を用いた染色体ループ構造の改変によるゲノム機能操作

研究課題名(英文) Alterations of chromatin loop structures thorough manipulation of G-quadruplex and its binding protein, Rif1

研究代表者

正井 久雄 (MASAI, Hisao)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・所長

研究者番号：40229349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン4重鎖DNA結合タンパク質Rif1を用い、染色体の核内配置や高次構築を操作する為に、(1)発現レベルの変動によるクロマチン構造の操作、(2)人為的なRif1局在化によるクロマチンループ構造の操作、を検討した。Rif1増産は、S期障害、染色体構造異常と同時に、short spindleでのM期の停止も誘導した。この効果はRif1のフォスファターゼ結合に依存せず、染色体への結合による。又、今回Rif1の染色体結合欠損変異体L848Sを発見し、これを別のDNA結合ドメインを介して特定の部位に局在化させたが、発現レベルが低い為か、クロマチン構造改変、複製タイミングへの効果は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rif1はTAD(Topologically Associated Domain)等に関連したクロマチン高次構造を、G4結合を介して形成する。このクロマチンドメインは、複製タイミングや転写等の制御ユニットとなる。ゲノム操作が容易な分裂酵母を用いて、今回、それ自身ではクロマチンに結合しない変異Rif1を同定した。これを用いて、別のDNA結合ドメインを介して、任意の場所にRif1を局在化し、近傍のクロマチン高次構造を変化させうる可能性が生まれた。この方法は、特定の遺伝子のみを標的とするのではなく、クロマチンドメイン全体を制御可能であり、従来のゲノム操作技術とは異なる、新しい細胞改変技術をもたらす。

研究成果の概要(英文)：In order to manipulate chromatin loop formations, we used G-quadruplex binding protein, Rif1, which is known to regulate chromatin loops. We first identified L848S mutant, which cannot bind to chromatin. Overexpression of Rif1 resulted in inhibition of S phase progression and aberrant chromosome structures, as well as mitotic arrest with short spindles. The effects can be observed with Rif1 incapable of binding to phosphatase, but not with L848S deficient in chromatin binding. Thus, chromatin binding of Rif1 is responsible for these effects. By using the L848S mutant, we tried to tether Rif1 at a specific location on the genome. We used Gal4DBD-Gal4BS, and replaced a cellular Rif1BS with Gal4BS, and expressed Rif1L848S-Gal4BD at the endogenous locus. However, significant effects on the replication timing near the binding site were not observed, presumably due to low expression of the Gal4DBD fusion protein

研究分野：分子生物学

キーワード：Rif1タンパク質 クロマチンループ 核内染色体構造 複製タイミング グアニン4重鎖構造 核膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

左巻き Z-DNA、3 重鎖 DNAs(H-DNA)、グアニン 4 重鎖 DNA(以下 G4 と記載)などの非 B 型 DNA はその配列特性に基づきゲノム上の数多く存在すると推定されてきた。G4 構造はヒトゲノムに 37 万カ所以上存在すると言われている(Huppert et al., Todd et al. *Nucleic Acids Res* [2005])。しかし、これらの構造の生物学的意義はこれまで不明であった。代表者は、DNA 複製タイミングの解析から、Rif1 という進化的に保存された因子が、ゲノムワイドの複製タイミングドメインを規定することを発見した(Hayano et al. *Genes Dev* [2012], Yamazaki et al. *EMBO J* [2012])。その後の研究から Rif1 は転写プロファイルにも大きな影響を与える事が明らかとなった。Rif1 はゲノム上の核骨格に類似した不溶性の領域に特異的に結合し(図 1)、クロマチンループの形成に関与する(図 2)。Rif1 の発現レベルに応じてクロマチンループサイズが変化することから、このクロマチンループが複製タイミングドメインと関連すると考えられる。代表者は、最近 Rif1 はグアニン 4 重鎖 DNA(以下 G4 と記載)に特異的に結合することを見出した (Kanoh et al. *Nature Struc Mol Biol* [2015]; 図 1)。

Rif1 は多量体を形成し、複数の DNA 鎖に同時に結合することができる。又、Rif1 の C 端 288 アミノ酸内に G4 構造認識ドメインが存在する(図 3)。Rif1 は CTCF や SATB1 等やや局所的なクロマチンを制御する因子とは異なり、クロマチンループ構造の制御を介してゲノム全体での染色体機能ドメインを制御する。これらの発見を元に代表者は Rif1 を用いて細胞の核内のクロマチンループを改変することにより、染色体機能ドメインを操作できるのではというアイデアに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、進化的に保存された核タンパク質 Rif1 とその標的であるグアニン 4 重鎖構造を利用して、クロマチンループ構造の人為的改変を介して核内構造を操作し、細胞の機能改変を誘導する新規技法を開発する。

### 3. 研究の方法

Rif1 を用いて、染色体の核内配置や高次構築を操作するために、(1) 発現レベルを変動することによりゲノム全体のクロマチンループ構造を操作する、(2) 部位特異的にクロマチンループを形成し、局所的に染色体機能ドメインを操作する、の二つのアプローチをとる。(2)を達成するために、① 人為的に Rif1 をクロマチン上に誘導し、クロマチンループ形成を確認する。② Rif1 を転写プロモーター+G4 構造をゲノム上の標的領域の両側に挿入する、及び③ 特異性を改変した Rif1 タンパク質+標的 G4 構造をゲノム上に挿入する、の 3つのアプローチをとる。

### 4. 研究成果

(1) 発現レベルを変動することによりゲノム全体のクロマチンループ構造を操作

Rif1 増産により、次の事象が観察された。

- ① S 期進行の遅延
  - ② short spindle で増殖停止 (M 期停止) する細胞の増加
  - ③ 染色体構造の異常の誘導 (断片化した染色体、異常な構造の染色体の増加 (図 4))
- 上記の事象は、脱リン酸化酵素 PP1 の結合には依存せず、複製ストレスチェックポイント因子や SAC 関連の因子も関与しない。従って、Rif1 の染色体への結合増加が、直

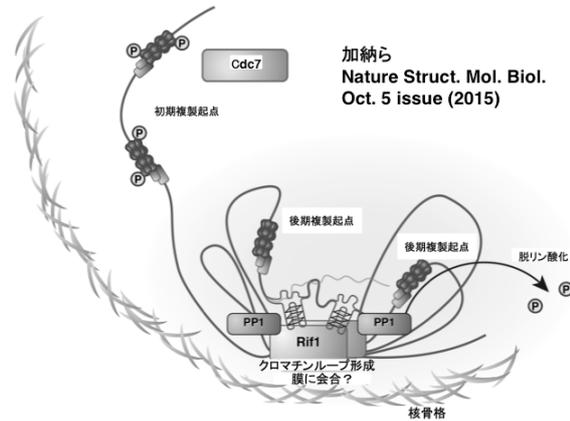


図 1 Rif1 による染色体ドメインの形成: Rif1 は多量体を形成し複数の G4 構造を有する DNA に結合し、染色体ループ形成を促進する。

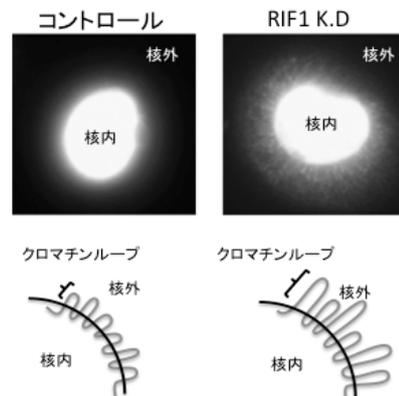


図 2 Rif1KD により、クマチンループサイズが増加する。この事実は Rif1 がクロマチンループ形成に貢献している可能性を示唆する。

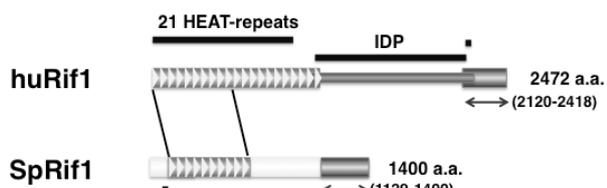


図 3 Rif1 の G4 結合ドメイン(両矢印の領域) G4 のみでは全長ほど G4 への特異性がない。huRif1, ヒト Rif1; SpRif1, 分裂酵母 Rif1.

接上記の影響を及ぼしていると考えられた。また、高温 37°C では Rif1 の増産はほとんど増殖阻害を引き起こさなかった。増殖阻害は、hsk1 変異株でより強く観察されること、複製の Hsk1/Cdc7 の要求性は高温ではバイパスされることから、Rif1 増産の主要な影響は複製の阻害であると考えられた。しかし、②の short spindle の増加は、顕著であり、Rif1 が、M 期の染色体分配に直接関与する可能性がある。なお、分裂酵母 Rif1 タンパク質の C 端に G4 結合ドメインと多量体形成部位があるが、C 端のみの増産では増殖阻害は観察されなかった

(2) 部位特異的にクロマチンループを形成し、局所的に染色体機能ドメインを操作

① 人為的に Rif1 をクロマチン上に誘導し、クロマチンループ形成を確認する。

クロマチンに結合せず、複製を抑制できない変異体 L848S を同定した。この変異 rif1 に Gal4DBD(Gal4 DNA Binding Domain) を連結し、染色体上の Rif1 を置き換えた。さらに、Rif1BS のひとつを、Gal4BS (Gal4 Binding Site)を含む UAS に置き換えた(図 5)。しかし、Gal4DBD を発現しても、複製の抑制は観察されなかった(図 6)。理由は不明であるが、Rif1L848SGal4DBD の発現が野生株に比べて低かったことが原因かもしれない。

② Rif1 を転写プロモーター+G4構造をゲノム上の標的領域の両側に挿入する。

誘導可能なプロモーターの下流に Rif1 結合部位に由来する G4 構造形成配列を配置し分裂酵母ゲノム上に導入した。その結果、Rif1 の結合が観察されたが、転写を誘導してもしなくても観察された。これは導入した領域が、近傍にある内在性のプロモーターから構成的に転写されているからかもしれない。より強く内在性の転写を shut off するか、別の転写活性のない場所で行う必要がある。

③ 特異性を改変した Rif1 タンパク質+標的 G4 構造をゲノム上に挿入する。

これについては、完成していない。One hybrid assay で特殊な G4 に結合する Rif1G4BD の変異体を探索している。

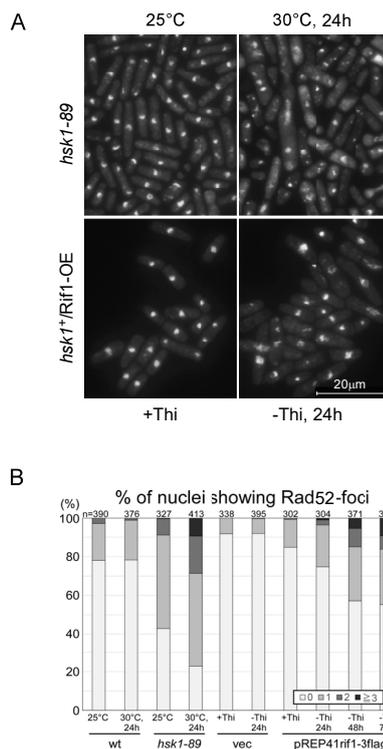


図 4 Rif1 増産の分裂酵母生存への影響 hsk1-89 株 (30°C で増殖しない)と同様に Rif1 の増産により、染色体構造の異常が観察される(A)。また、DNA 損傷を表す Rad52 foci の数が増加する。とくに hsk-89 株でより顕著である。

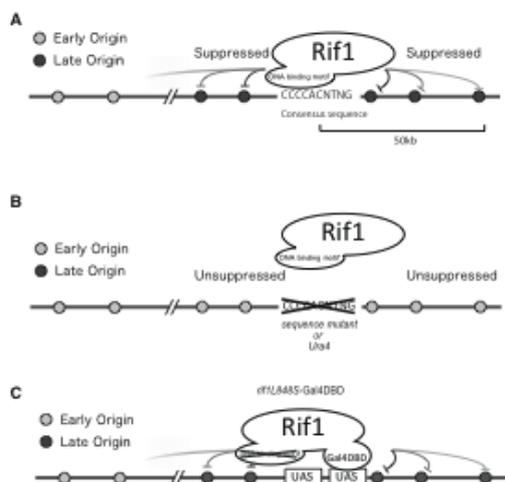


図 5 Rif1 の特定のクロマチン上への局在化 Rif1BS を Gal4BS を含む UAS に置き換え、Rif1BS に結合できない L848S 変異 Rif1 に Gal4BD を連結した。これにより Rif1 が Gal4BS 上に局在化され、そのまわりの複製開始が抑制される可能性がある。

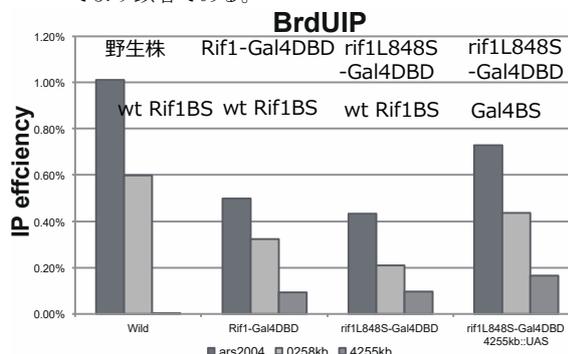


図 6 Gal4DBD-Gal4BS を用いた Rif1 局在化の影響 内在性の Rif1 を Rif1-Gal4DBD に置き換えた。4255kb にある Rif1BS (後期複製開始起点)を Gal4BS に置き換えた。ars2004 は初期活性化起点、0258kb は別の初期活性化起点。Gal4DBD-Gal4BS の組み合わせで顕著な複製開始の抑制は観察されなかった。これは Rif1-Gal4 雄剛タンパク質の発現レベルが低すぎたからかもしれない (野生型 Rif1-Gal4DBD で 4255kb の複製が抑制されていない)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Masai H, Fukatsu R, Kakusho K, Kanoh Y, Moriyama K, Ma Y, Iida K, Nagasawa K(2019)” Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities” Scientific Reports in press 査読有
2. Kobayashi Shunsuke, Fukatsu Rino, Kanoh Yutaka, Kakusho Naoko, Matsumoto Seiji, Chaen Shigeru, Masai Hisao (2018)” Unique Motif at the C Terminus and an N-Terminal HEAT Repeat Contribute to G-Quadruplex Binding and Origin Regulation by the Rif1 Protein. Molecular and Cellular Biology” Molecular and Cellular Biology 39, e00364-18 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00364-18
3. Moriyama Kenji, Yoshizawa-Sugata Naoko, Masai Hisao (2018)” Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture” Journal of Biological Chemistry 293, 3607-3624, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.RA117.000446
4. Iguchi Tomohiro, Miyauchi Emako, Watanabe Sumiko, Masai Hisao, Miyatake Shoichiro (2018)” A BTB-ZF protein, ZNF131, is required for early B cell development” Biochemical and Biophysical Research Communications 501, 570-575 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.044
5. Masai Hisao, Kakusho Naoko, Fukatsu Rino, Ma Yue, Iida Keisuke, Kanoh Yutaka, Nagasawa Kazuo (2018)” Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1-binding sequences” Journal of Biological Chemistry 293, 17033-17049 査読有, DOI: 10.1074/jbc.RA118.005240
6. Matsumoto Seiji, Kanoh Yutaka, Shimmoto Michie, Hayano Motoshi, Ueda Kyosuke, Fukatsu Rino, Kakusho Naoko, Masai Hisao (2017)” Checkpoint-Independent Regulation of Origin Firing by Mrc1 through Interaction with Hsk1 Kinase” Molecular and Cellular Biology 37, e00355-16 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00355-16
7. Toteva Tea, Mason Bethany, Kanoh Yutaka, Brgger Peter, Green Daniel, Verhein-Hansen Janne, Masai Hisao, Thon Genevive (2017)” Establishment of expression-state boundaries by Rif1 and Taz1 in fission yeast” Proceedings of the National Academy of Sciences 114, 1093-1098 査読有, DOI:10.1073/pnas.1614837114
8. You Zhiying, Masai Hisao (2017)” Potent DNA strand annealing activity associated with mouse Mcm2-7 heterohexameric complex” Nucleic Acids Research 45, 6494-6506 査読有, DOI: 10.1093/nar/gkx269
9. Irie Takayuki, Asami Tokiko, Sawa Ayako, Uno Yuko, Hanada Mitsuharu, Taniyama Chika, Funakoshi Yoko, Masai Hisao, Sawa Masaaki (2017)” Discovery of novel furanone derivatives as potent Cdc7 kinase inhibitors” European Journal of Medicinal Chemistry 130, 406-418 査読有, DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.030
10. Moriyama Kenji, Yoshizawa-Sugata Naoko, Masai Hisao (2017)” Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture” Journal of Biological Chemistry 293, 3607-3624 査読有, DOI:10.1074/jbc.RA117.000446
11. Masai H, Kanoh Y, Moriyama K, Yamazaki S, Yoshizawa N, and Matsumoto S. (2017)” Telomere-binding factors in the regulation of DNA replication.” Genes & Genetic Systems 92, 119-125 査読有, DOI:10.1266/ggs.17-00008
12. Masai Hisao (2017)” A novel p53-Cdc7 link induced by genotoxic stress” Cell Cycle 16, 735-736 査読有, DOI:10.1080/15384101.2017.1304746
13. Masai Hisao, Yang Chi-Chun, Matsumoto Seiji (2017)” Mrc1/Claspin: a new role for regulation of origin firing” Current Genetics 63, 813-818 査読有, DOI:10.1007/s00294-017-0690-y
14. Moriyama Kenji, Lai Mong Sing, Masai Hisao (2017)” Interaction of Rif1 Protein with G-Quadruplex in Control of Chromosome Transactions” Adv Exp Med Biol. 287-310 査読有, DOI:10.1007/978-981-10-6955-0\_14
15. 正井久雄 (2017)” 多様な染色体ダイナミクスのmodulator kinase, Cdc7” 生化学 5, 719-730 査読有
16. You Z, Ode KL, Shindo M, Takisawa H, Masai H. (2016)” Characterization of conserved arginine residues on Cdt1 that affect licensing activity and interaction with Geminin or Mcm complex.” Cell Cycle. 15, 1213-1226 査読有, DOI:10.1080/15384101.2015.1106652

17. Tanaka T, Nishito Y, Masai H. (2016) “Fork restart protein, PriA, binds around oriC after depletion of nucleotideprecursors: Replication fork arrest near the replication origin.” *Biochem Biophys Res Commun.* 470, 546–551 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.108.
18. Tanaka H, Muto A, Shima H, Katoh Y, Sax N, Tajima S, Brydun A, Ikura T, Yoshizawa N, Masai H., Hoshikawa Y, Noda T, Nio M, Ochiai K, Igarashi K. (2016) “Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3.” *J Biol Chem.* 291, 6316–6330 査読有, DOI:10.1074/jbc.M116.713842.
19. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H., Hasegawa M. (2016) “Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 $\delta$  Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43.” *J. Biol. Chem.* 291, 5473–5483 査読有, DOI:10.1074/jbc.M115.695379.
20. Kozel, C., (他19名), Masai, H., Wagner, G., Beeser, A., Kikkawa, U., Fleming, S.D., and Asano, K. (2016) “Overexpression of eIF5 or its protein mimic 5MP perturbs eIF2 function and induces ATF4 translation through delayed re-initiation.” *Nucleic Acids Res.* 44, 8704–8713 査読有, DOI:10.1093/nar/gkw559
21. Yang, C-C., Suzuki, M., Yamakawa, S., Uno, S., Ishii, A., Yamazaki, S., Fukatsu, R., Fujisawa, R., Sakimura, K., Tsurimoto, T., and Masai, H. (2016) “Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells.” *Nature Communications* 7, 12135 査読有, DOI:10.1038/ncomms12135.

[学会発表] (計 26 件)

1. 正井 久雄 “生体内でのグアニン 4 重鎖構造の検出・生物学的意義の解明を目指して” 非ワトソン・クリック型核酸に関する九州地区セミナー(日本核酸化学会共催) (招待講演) 2018 年
2. Hisao Masai “G-quadruplexes: in vivo regulations and biological” functions THE 3RD TRANSMED-VN CONFERENCE 2018 University of Medicine & Pharmacy (招待講演) 2018 年
3. 田中 卓、関 由美香、鷺 朋子、西藤 泰昌、正井 久雄 “大腸菌染色体の oriC-DnaA 非依存性複製開始に必要なとされるゲノム配列とその機能” 日本遺伝学会ワークショップ (招待講演) 2018 年
4. 正井 久雄 “グアニン 4 重鎖構造の細胞内動態と生物学的意義の解明にむけて: DNA 複製制御における機能” 第 91 回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演) 2018 年
5. 正井 久雄 “Roles of Claspin-Cdc7 in initiation and checkpoint activation: differential functions of Cdc7 in cancer and normal cells” 3R&3C Symposium (招待講演) 2018 年
6. Hisao Masai “RNA-DNA hybrid and G-quadruplex: exploring their biological significance as new genome signature” 第 41 回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演) 2018 年
7. 正井 久雄 “DNA 複製研究からひもとくゲノムの謎～恩師 新井賢一先生に導かれて～” 第 41 回日本分子生物学会年会 ランチョンセミナー (招待講演) 2018 年
8. Hisao Masai “From mechanisms of primer RNA synthesis to revelation of hidden messages of genome” OKAZAKI Fragment Memorial Symposium (招待講演) 2018 年
9. 正井 久雄、(他13名) “グアニン 4 重鎖構造: 諸刃の剣のゲノム情報” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演) 2017年
10. 正井 久雄、加納 豊、覺正 直子 “細胞内におけるグアニン 4 重鎖DNA構造の存在を証明する新規技法の開発” 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2017年
11. 小林 駿介、深津 理乃、加納 豊、正井 久雄 “グアニン 4 重鎖結合タンパク質Rif1の構造・機能解析” 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2017年
12. Zhiying You、Chi-Chun Yang、正井 久雄 “The intramolecular interaction mechanism of human Claspin activation” 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2017年
13. 加納 豊、松本 清、深津 理乃、覺正 直子、正井久雄 “Rif1が結合するグアニン 4 重鎖構造の細胞内存在と形成のメカニズムの解明” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
14. 田中 卓、関 由美香、鷺 朋子、西藤 泰昌、正井 久雄 “大腸菌染色体のoriC-DnaA非依存性複製開始に必要なとされる新たなゲノム領域とその機能” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
15. 吉沢 直子、正井 久雄 “マウスES細胞におけるZscan4の脱抑制とRif1依存的なクロマチン

- 構造変化の解析” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
16. 森山 賢治、吉沢 直子、正井 久雄 “マウスRif1タンパク質のグアニン4重鎖DNA結合活性の生化学的解析” 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
  17. 正井 久雄、加納 豊、覺正 直子 “Rif1タンパク質の標的であるグアニン4重鎖DNA構造の分裂酵母細胞内での存在を証明するための新しい方法の開発” 第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会 2017年
  18. Masai, H. “Interaction with G-quadruplex structures forms a basis for Rif1-mediated regulation of DNA replication, transcription and chromatin architecture” Cold Spring Harbor Asia conference on DNA Metabolism, Genomic Stability and Human Disease (招待講演) 2016年
  19. Masai, H. “Biological roles of G-quadruplex structures” 14th IGAKUKEN International Symposium IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016 (招待講演) 2016年
  20. Masai, H. “グアニン4重鎖構造の生物学的意義Molecular basis of chromosome and genome instability in cancer” HiHA 第6回 Workshop Hiroshima Research Center for Healthy Aging (招待講演) 2016年
  21. 正井 久雄 “大腸菌の第二の複製システムから考える複製システムの進化” 日本進化学会第18回東京大会 (招待講演) 2016年
  22. 正井 久雄 “大腸菌染色体の第二の複製システム” 第88回日本遺伝学会大会 (招待講演) 2016年
  23. 正井 久雄 “グアニン4重鎖の形成と、その認識タンパク質との相互作用” 第89回 日本生化学会大会 (招待講演) 2016年
  24. 正井 久雄 “グアニン4重鎖構造の生物学的意義 Biological Roles of G-quadruplex” 第75回日本癌学会学術総会 (招待講演) 2016年
  25. Masai, H. “Novel higher-order DNA structures containing G-quadruplex structures on both strands of Rif1 binding region play a crucial role in determination of replication timing domain” 第10回3R国際シンポジウム (国際学会) 2016年
  26. 正井 久雄 “グアニン4重鎖構造の普遍的生物学的意義の解明に向けて” 第39回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2016年

[図書] (計 1件)

1. Sangdun Choi (編集), Masai Hisao (2017) ” Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition: Dbf4” Springer 総ページ数 6330

[その他]

ホームページ: <http://www.igakuken.or.jp/genome/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。