

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06102

研究課題名(和文) 染色体ドメインを形造るグアニン四重鎖結合タンパク質Rif1の分子形態解析

研究課題名(英文) Electron microscopic analysis of a G4 DNA-binding protein Rif1, a key organizer of chromosomal domains

研究代表者

森山 賢治 (MORIYAMA, Kenji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・研究員

研究者番号：00250217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Rif1オリゴマー、及びそのグアニン四重鎖(G4) DNAとの複合体の微細形態を単粒子解析で決定する目的でマウスRif1(2,418アミノ酸)の大量精製を進めた。全長産物の精製は困難だったので、その2つの機能ドメイン(NTDとCTD)の間にある長い天然変性領域(968アミノ酸)を欠失したRif1-NCを精製し、電顕観察した。その結果、オリゴマーではあるが、その形態は高解像度には確定できなかった。そこで、元々小さい分裂酵母のRif1(SpRif1、1,400アミノ酸)を解析することにした。全長SpRif1の精製は困難であったが、N末端欠失体(SpRif1dN92)の精製に成功し、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者の先行研究の中で、Rif1が複数のG4(グアニン四重鎖) DNA結合部位を持つオリゴマーであることを生化学的に示してはいたが、今回の電子顕微鏡解析によりRif1がオリゴマーであることを視覚的に裏付けることができたのは学術的に意義深い。また、本研究は米国のクライオ電顕解析のエキスパートであるHuilin Li教授達(Van Andel Research Institute)との国際共同研究であり、科学的な国際強調の観点でその社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：I made enormous efforts to purify 2,418 amino acid (a.a.)-long murine Rif1 to analyze molecular shapes of its oligomer(s) and its complex with G-quadruplex (G4) DNA via single particle analyses. However, amount of the purified Rif1 was not enough to electron microscopic (EM) analysis. Thus, I next purified partially-truncated Rif1 protein, termed Rif1-NC, lacking a long IDP (intrinsically disordered polypeptide) segment (968 a.a.) present between its NTD and CTD. EM analyses of the purified Rif1-NC verified its oligomeric nature, but failed to unveil its molecular shape in high resolution. Then, I turned my plan toward EM analysis of fission yeast Rif1 from *Schizosaccharomyces pombe* (SpRif1), because of its natively short length (1,400 a.a.). It was difficult to purify full-length SpRif1, but I succeeded to purify it after short deletion of an N-terminal 92 a.a. (thus, termed as SpRif1dN92). The EM analysis is now in progress with the purified SpRif1dN92 protein.

研究分野：生物化学

キーワード：Rif1 タンパク質精製 オリゴマー グアニン四重鎖 G4 DNA 電子顕微鏡 単粒子解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rif1 (Rap1-interacting factor 1) は、出芽酵母でテロメア伸長抑制因子として見出されたが、分裂酵母や哺乳類の Rif1 は、テロメア以外の染色体領域に広く分布し、ゲノム DNA の何処が何時複製するのかを制御する鍵となるタンパク質である (文献 1, 4)。また、Rif1 は中断した複製の再開や DNA 損傷修復、転写制御等にも関わっている。Rif1 は主に核膜近傍の核骨格に局在することから、核内の染色体高次構造の制御を通してゲノム全体の複製を統合していると想定される。しかし、Rif1 は核骨格からの抽出や精製が容易ではない巨大タンパク質であるため、その生化学的・構造学的研究は殆ど成されていなかった。このような状況の中、本研究代表者は微量ながら全長マウス Rif1 (2, 418 アミノ酸) の精製に成功し、それがオリゴマーであることや G-quadruplex (グアニン四重鎖) DNA に特異的に結合することを示す生化学的証拠を得た (文献 2)。

2. 研究の目的

本研究の当初目的は、巨大なマウス Rif1 タンパク質 (muRif1) を更に大量に精製し、そのオリゴマーの微細形態や高次構造を電子顕微鏡観察による単粒子解析を通して明らかにすることであった。更に、DNA の G4 (グアニン四重鎖) 部位を介した Rif1 による DNA ループや DNA ブリッジ形成機構についても、電子顕微鏡による微細形態観察を通して解明しようとした。これらの観察に基づき、Rif1 による染色体の立体的ドメイン構築の分子メカニズムを知ろうとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト 293T 細胞発現系を利用したタンパク質調製 - 文献 2 に記載したように、マウス Rif1 (2, 418 アミノ酸) とその部分欠失体を 293T 細胞に 2 日間発現させた。界面活性剤を含む低塩濃度バッファー中で発現細胞をヌクレアーゼ処理して抽出した後、高塩濃度バッファーで抽出した。発現タンパク質の N 末端に 6xHis タグ、C 末端に 3xFLAG タグを付加しているため、抗 FLAG 抗体カラムとニッケルカラムを順次用いてアフィニティー精製した。

(2) マウス ES 細胞株を材料とした Rif1 タンパク質調製 - N 末端に 2xFLAG タグを付加した Rif1 を恒常的に発現している ES 細胞株 (E14-D8 株) を研究協力者の吉沢直子氏に御供与頂いた。この細胞株を大量培養し、その抽出液から抗 FLAG 抗体カラムと G4-DNA アフィニティーカラムを順次用いて精製した。G4-DNA カラムは、四重鎖形成させたビオチン化 T6G24 オリゴヌクレオチドを磁気ビーズ (ストレプトアビジン dynabeads) に固定化したもので作成した。

(3) ヒト 293FT 細胞発現系を利用した分裂酵母 Rif1 タンパク質 (SpRif1) 調製 - 分裂酵母 Rif1 タンパク質は、293T 細胞より産生効率が良いとされる 293FT 細胞に一過性に発現させ、抗 FLAG 抗体カラムとニッケルカラムを順次用いてマウス Rif1 の場合と同様に精製した。

(4) 精製タンパク質の電子顕微鏡観察と構造解析 - 精製したマウス Rif1 の部分欠失体を研究協力者の Huilin Li 教授 (Van Andel Research Institute) に送付し、彼の研究室で電子顕微鏡解析を実施した。

4. 研究成果

(1) G4 (グアニン四重鎖) DNA と全長 Rif1 オリゴマーとの複合体の微細形態をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析で決定することを目指し、マウス Rif1 (2, 418 アミノ酸) の精製に着手した。しかし、全長 Rif1 をヒト 293T 細胞から大量精製することは困難であったため、発現系をマウス ES 細胞の FLAG-Rif1 安定発現株 (E14-D8 株) に切り替えた。100 mm 培養皿 100 枚の E14-D8 細胞から抗 FLAG 抗体カラムと G4-DNA アフィニティーカラムを順次用いて FLAG2-Rif1 を精製した (図 1)。しかし、培養皿 100 枚から精製された FLAG2-Rif1 は 100 ng 程度に留まり、タンパク質量が全く足りず、全長 Rif1 の電子顕微鏡解析は断念せざるを得なかった。

(2) 全長の代わりに、マウス Rif1 の N 末端領域 (NTD) と C 末端領域 (CTD) の間にある長い天然変性領域 (LID, 968 アミノ酸) を欠失させた Rif1-NC (NTD+CTD の意) を精製して解析することにした。NTD と CTD は、各々単独でオリゴマーとして G4 DNA に結合する一方、LID は何れにも関与しないからである (文献 2)。莫大な労力を費やし、Rif1-NC を発現させた 293T 細胞からこれを大量精製することに成功した (図 2)。細胞の低塩濃度と高塩濃度の各抽出液双方から別々に Rif1-NC を大量精製し、Huilin Li 教授に送付し、彼の研究室で電子顕微鏡解析を実施した。多数のネガティブ染色電顕像の二次元平均像を算出した結果、G4 オリゴ DNA の有無に拘らず、どちらの Rif1-NC も三方に 11 nm 程の分岐突出塊を有する形態を取ることが多く、その大きさからオリゴマーであることが示唆された (図 3)。以前、私達の生化学的解析では、Rif1-NTD は 4 量体と 8 量体、Rif1-CTD は二量体と 12 量体 (主に 12 量体) を形成している可能性が高く、Rif1-NC は図 4 に模式的に示したような形態をしていると推定した。実際、図 3 の幾つかの電顕像は、図 4B~C に示した例と類似しており、私達の推定を支持するものと言えるかも知れない。しかしながら、電顕像には不定形凝集体の割合が多かったため、残念ながら分子形態の高解像度の確定には至らなかった。また、Rif1-NC が正確に何量体なのかも特定できなかった。

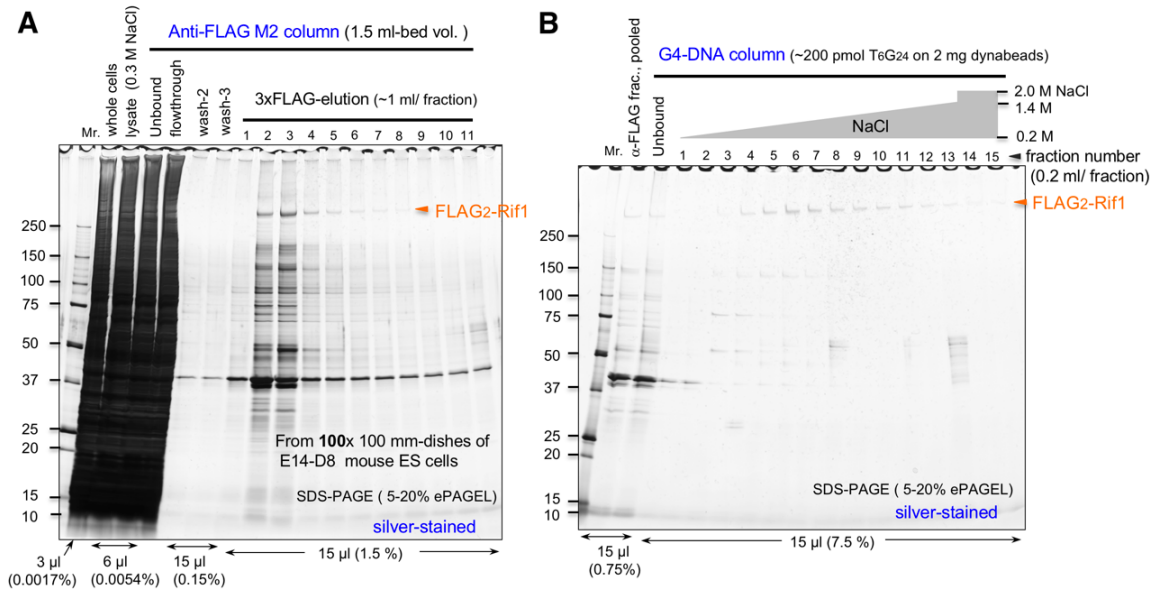


図1. マウス Rif1 タンパク質の抗 FLAG 抗体カラムと G4-DNA カラムによるアフィニティー精製。
 (A) 100 mm 培養皿 100 枚分の E14-D8 細胞抽出液を抗 FLAG 抗体カラムにアプライして洗浄した後、3xFLAG ペプチドで FLAG2-Rif1 タンパク質を溶出した。
 (B) 抗 FLAG 抗体カラムからの溶出物を G4-DNA カラムにアプライして洗浄した後、NaCl 濃度勾配 (0.2 M~1.4 M) で FLAG2-Rif1 タンパク質を溶出・精製した。

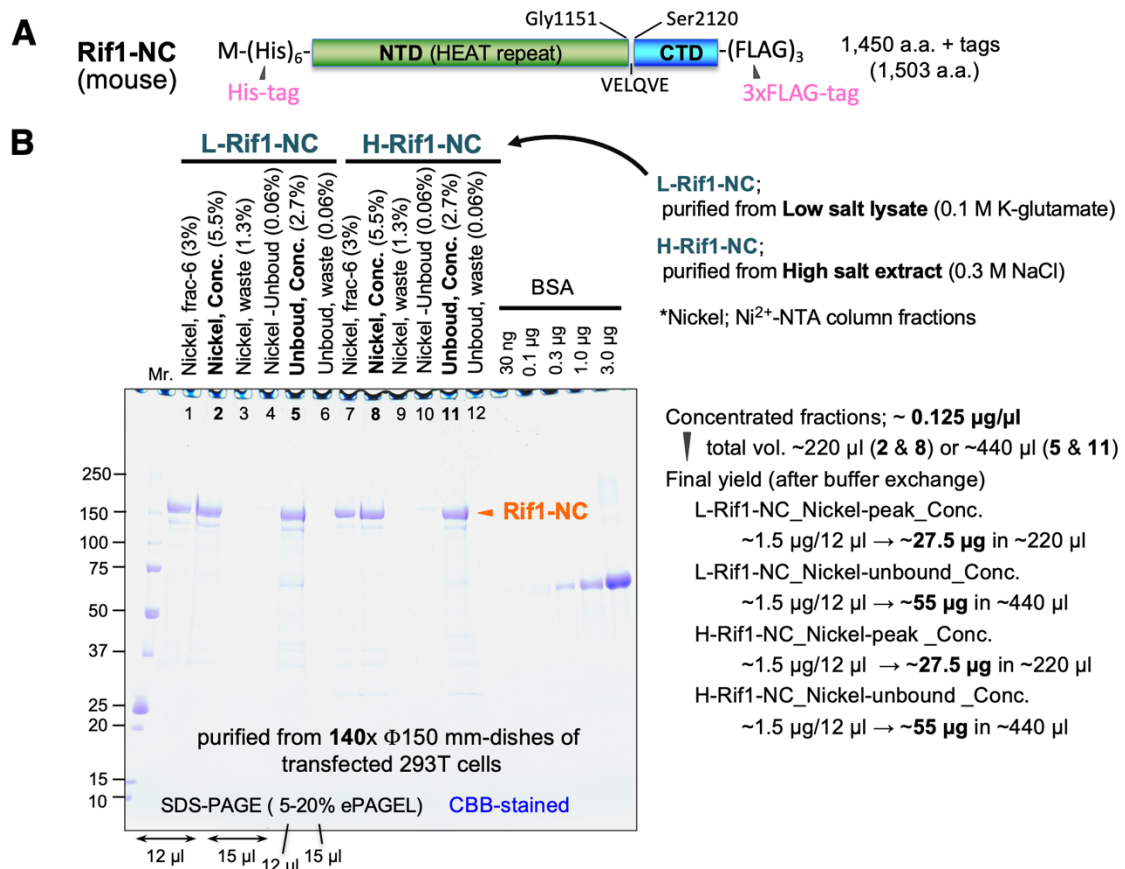


図2. 293T 細胞に発現させたマウス Rif1-NC タンパク質の精製。
 (A) 長い天然変性領域 (LID, 968 アミノ酸) を欠失させた Rif1-NC の一次構造の模式図。
 (B) 150 mm 培養皿 140 枚分の 293T 細胞から抗 FLAG 抗体カラムとニッケルカラムを順次用いてマウス Rif1-NC タンパク質を精製した。細胞の低塩濃度抽出液から精製したものを L-Rif1-NC、高塩濃度抽出液から精製したものを H-Rif1-NC とする。

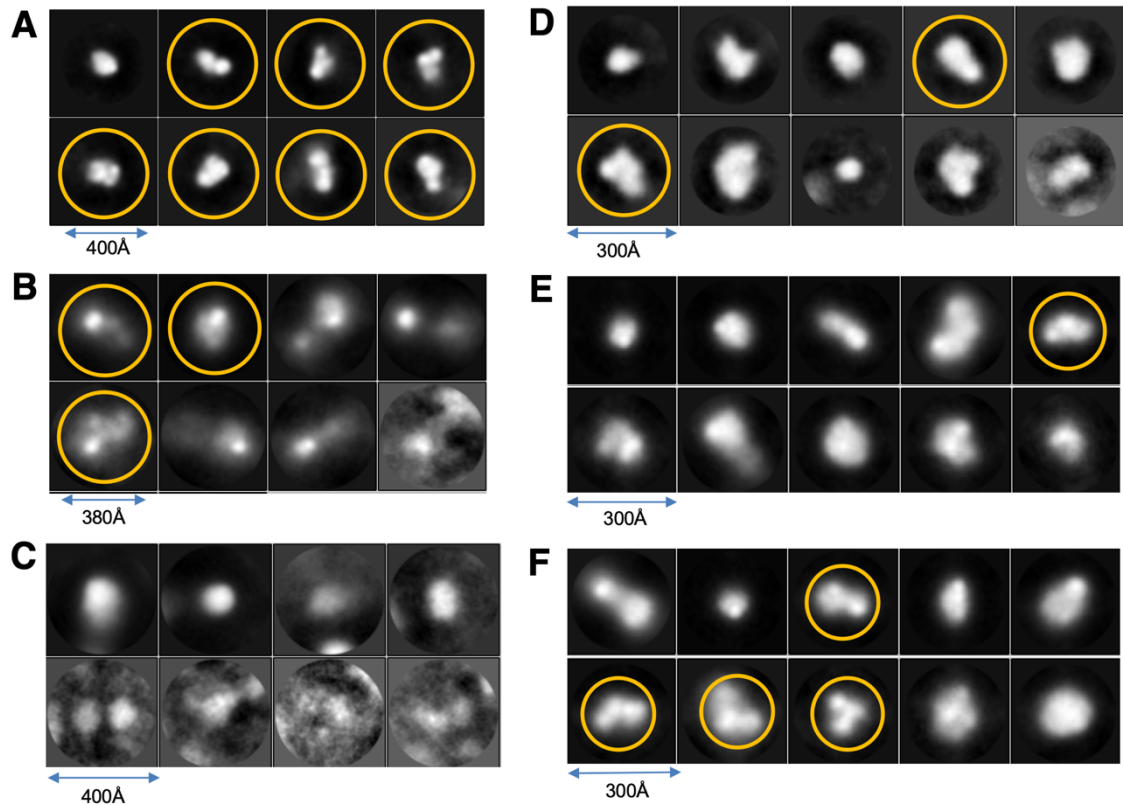


図 3. 精製したマウス Rif1-NC タンパク質の電子顕微鏡解析 (クラス分け二次元平均像). (A-B) 低塩濃度抽出液から精製した Rif1-NC タンパク質 (L-Rif1-NC) の二次元平均像. (C) 高塩濃度抽出液から精製した Rif1-NC タンパク質 (H-Rif1-NC) の二次元平均像. (D-E) G4 オリゴ DNA (T6G24) を添加して観察した L-Rif1-NC の二次元平均像. (F) G4 オリゴ DNA (T6G24) を添加して観察した H-Rif1-NC の二次元平均像.

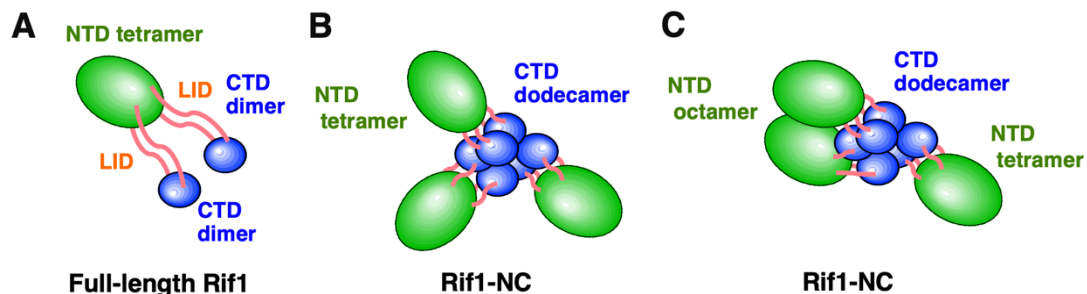


図 4. 本研究実施前のマウス Rif1-NC 分子形態の推定イメージ (文献 2 より改変). (A) Rif1-CTD が二量体を形成している場合の全長 Rif1 オリゴマーの推定図 (文献 2). (B) Rif1-CTD が 12 量体、Rif1-NTD が 4 量体のみを形成している場合の Rif1-NC オリゴマーの推定図. (C) Rif1-CTD が 12 量体、Rif1-NTD が 4 量体と 8 量体を形成している場合の Rif1-NC オリゴマーの推定図.

(3) そこで、マウス Rif1 は一旦保留し、代わりに分裂酵母の Rif1 (SpRif1) を大量精製することにした。SpRif1 は、マウス Rif1 と同様に N 末端領域 (NTD) と C 末端領域 (CTD) に G4 結合部位を持ちながら全長 1,400 アミノ酸と小さいからである。しかし、全長 SpRif1 をヒト 293T 細胞や昆虫細胞 (Sf9 細胞) に発現させると分解産物が大量に蓄積してしまった (文献 3)。特に 65K 辺りの分解産物は全長 SpRif1 の 4~5 倍量蓄積してしまい、数段階精製を進めても除去困難であった (図 5A)。この除去困難な分解産物を質量分析で解析したところ、N 末端 63 アミノ酸と C 末端 366 アミノ酸とを含む奇妙なポリペプチドであることが判明した (図 5B)。この発見に基づき、N 末端 92 アミノ酸を欠失させた SpRif1 を 293FT 細胞に発現させたところ、分解が極度に軽減することを見出した。そこで、この欠失体 (SpRif1ΔN92) をマウス Rif1-NC の時のように大量発現させ、抗 FLAG 抗体カラムとニッケルカラムを順次用いて精製した (図 5C)。ニッケルカラムのピーク画分後半では分解産物が殆ど除去されており、精製に成功したと言える。現在、精製した SpRif1ΔN92 を Huilin Li 教授に送付し、彼の研究室で試験的な電子顕微鏡解析を進めて

いる。高解像度の単粒子解析が十分可能であるという見通しが立てば、更に本タンパク質の大量精製、及び電子顕微鏡解析を進めたい。

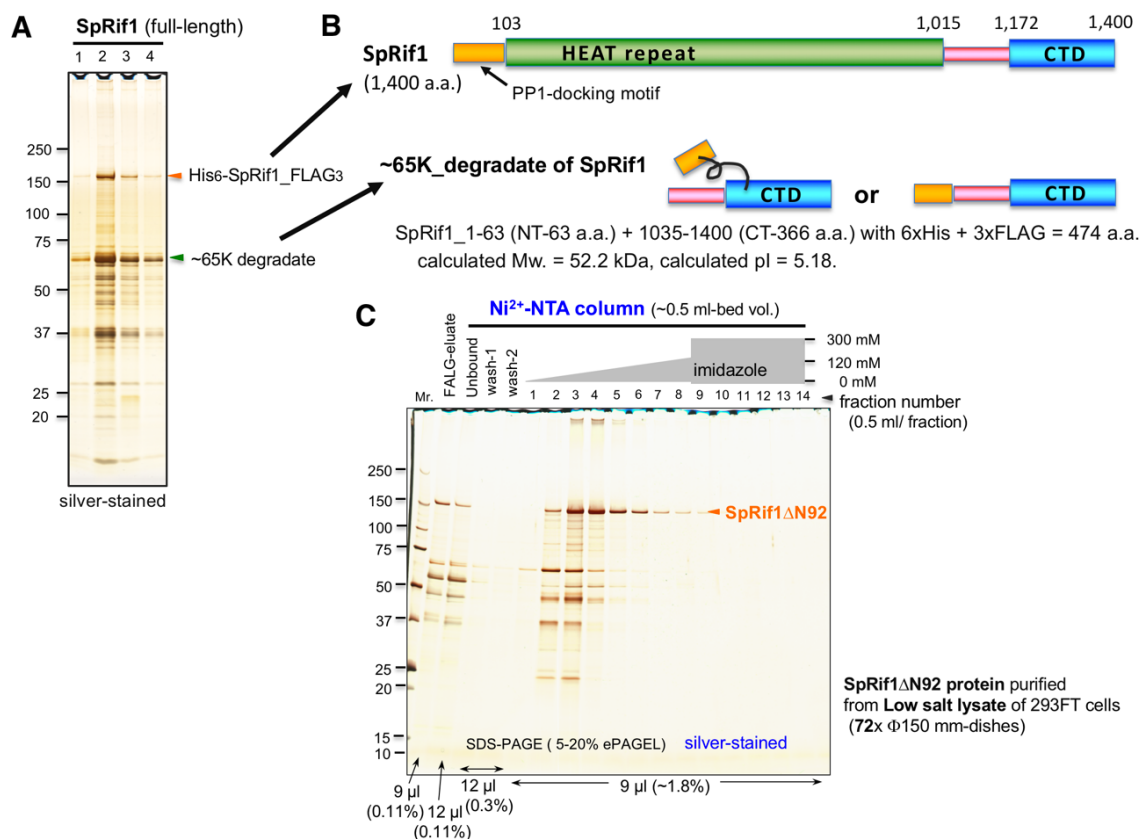


図5. 293FT細胞に発現させた分裂酵母のRif1タンパク質 (SpRif1ΔN92) の精製。

(A) 全長 SpRif1 を 293T 細胞から抗 FLAG 抗体カラムで精製した際の溶出プロファイル。主に 65K 辺りの分解産物が大量に蓄積してしまい、その後も除去困難であった。

(B) 65K の分解産物を電気泳動後ゲルから切り出して質量分析で解析し、その実態を模式的に示した。奇妙なことに、SpRif1 の N 末端 63 アミノ酸と C 末端 366 アミノ酸とを含む。

(C) 150 mm 培養皿 72 枚分の 293FT 細胞から抗 FLAG 抗体カラムとニッケルカラムを順次用いてマウス Rif1-NC タンパク質を精製した。ここでは、細胞の低塩濃度抽出液から精製した際のニッケルカラムクロマトグラフィーの結果を示したが、高塩濃度抽出液から精製した際もほぼ同様の結果であった。

<引用文献>

- (1) Moriyama, K., Lai, M.S., and Masai, H. (2018) Interaction of Rif1 Protein with G-Quadruplex in Control of Chromosome Transactions. doi: 10.1007/978-981-10-6955-0_14. Adv. Exp. Med. Biol., 1042:287-310.
- (2) Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N., and Masai, H. (2018) Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture. doi: 10.1074/jbc.RA117.000446. J. Biol. Chem., 293:3607-3624.
- (3) Masai, H., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kanoh, Y., Moriyama, K., Ma, Y., Iida, K., and Nagasawa, K. (2019) Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities. doi: 10.1038/s41598-019-44736-9. Sci Rep., 9:8618.
- (4) Alavi, S., Ghadiri, H., Dabirmanesh, B., Moriyama, K., Khajeh, K. and Masai, H. (2021) G-quadruplex binding protein Rif1, a key regulator of replication timing. doi: 10.1093/jb/mvaa128. J. Biochem., 169:1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masai Hisao, Fukatsu Rino, Kakusho Naoko, Kanoh Yutaka, Moriyama Kenji, Ma Yue, Iida Keisuke, Nagasawa Kazuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44736-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Alavi Sana, Ghadiri Hamed, Dabirmanesh Bahareh, Moriyama Kenji, Khajeh Khosro, Masai Hisao	4. 巻 169
2. 論文標題 G-quadruplex binding protein Rif1, a key regulator of replication timing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masai, H., Kanoh, Y., Tanaka, T., Yoshizawa, N., Ito, S., Moriyama, K., et al.
2. 発表標題 In search of a universal mode of DNA replication.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 2019.12.4. 福岡国際会議場（2PW-04-4）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉沢直子、森山賢治、正井久雄
2. 発表標題 複製タイミング制御因子Rif1の欠失が誘導する2細胞期胚様細胞のZscan4遺伝子エンハンサー構造
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 2019.12.6. 福岡国際会議場（4P-0217）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山賢治、吉沢直子、正井久雄
2. 発表標題 Identification of dual G-quadruplex DNA-binding domains in murine Rif1, a key organizer of higher-order chromatin architecture
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正井久雄、加納豊、覚正直子、深津理乃、田中卓、吉沢直子、森山賢治、小林駿介、鷺朋子、關口直樹、松本清治、加藤宏幸
2. 発表標題 DNA-RNA hybrid and G-quadruplex: exploring their biological significance as new genome signatures
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/genome/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	正井 久雄 (Masai Hisao)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	Li Huilin (Li Huilin)		
研究協力者	吉沢 直子 (Sugata-Yoshizawa Naoko)		
研究協力者	Feng Xiang (Feng Xiang)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Van Andel Research Institute			
イラン	Tarbiat Modares University			