

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16082

研究課題名(和文)クロマチン高次構造を制御するRif1タンパク質によるグアニン4重鎖構造の認識機構

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms of recognition of G-quadruplex by Rif1, a conserved nuclear factor regulating chromatin architecture

研究代表者

覺正 直子 (KAKUSHO, Naoko)

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：30599593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：進化的に保存された分裂酵母Rif1は、G4構造を認識しクロマチン結合を介して結合部位近傍100kbにわたりDNA複製開始を抑制する。Rif1C末領域は、多量体形成、G4結合能を有する。まず、C末ポリペプチドにおいて多量体形成能、G4結合能が欠損した変異体を同定した。その変異を染色体上Rif1遺伝子に戻し、hsk1変異の相補能を検討し、両者ともRif1の複製抑制活性を喪失したことから、多量体形成能、G4結合能がRif1の機能に必要であると分かった。SEC-MALSにより、C末領域は4量体を形成することが明らかとなった。また、構造予測から両親媒性コイルドコイル構造を形成する可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rif1は、染色体の高次構造の形成を介して、複製や修復などクロマチン機能を制御すると考えられる。また、Rif1はG4構造に特異的に結合する。G4はヒト細胞内の染色体上に、実際に120,000個以上存在し、種々のゲノム機能に重要な役割を果たすことが示唆されており、G4の核内動態とその結合タンパク質による認識機構は、最近大きな注目を集めている。Rif1-G4相互作用とそれによる複製制御をモデルとした本研究は、ゲノムの未知のシグナルの解明、及びその疾患との関連に新たな洞察を与える。

研究成果の概要(英文)：The evolutionally conserved Rif1 protein binds to chromatin through recognizing G4 structure in fission yeast, and regulates replication timing by suppressing origin activation. The C-terminal segment of Rif1 contains G4 binding and oligomerization activities and we have identified critical residues for each function. We then showed both functions are independently required for Rif1-mediated replication inhibition. We have shown that the C-terminal 229 aa exhibits G4 binding activity in gel shift assays, while the C-terminal 44 aa polypeptide shows oligomerization activity. The C-terminal segment was shown to be a tetramer by SEC-MALS analyses. Structure prediction strongly suggests that the C-terminal segment adopts an amphipathic coiled-coil structure. The mutations were predicted to disrupt the stability of coiled-coil and their oligomerization.

研究分野：分子生物学

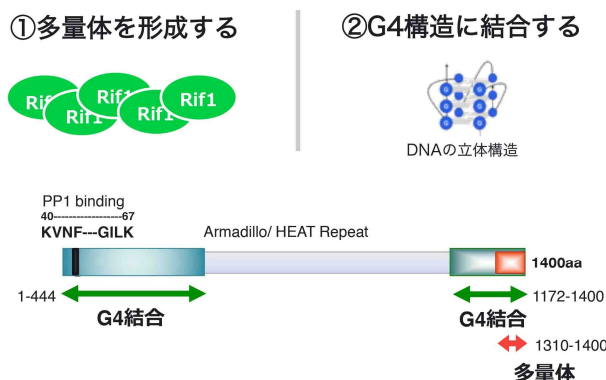
キーワード：グアニン4重鎖DNA Rif1タンパク質 クロマチンループ 高次構造 複製タイミング RNA-DNAハイブリッド 分裂酵母 多量体形成

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

代表者らのグループは、分裂酵母 DNA 複製タイミングの決定因子としてテロメア結合タンパク質として知られていた Rif1 を同定した。Rif1 に関して、研究開始当初に下記が明らかとなっていた。

- (1) 分裂酵母 Rif1 はゲノム上の 35 箇所の特異的に結合する。その結果、結合部位の近傍 100kb 近くにわたって複製開始を抑制する。
- (2) その結合部位には G-rich な共通配列が複数存在する。
- (3) その配列に依存して G4 構造が形成され、Rif1 は G4 構造依存的に結合する。G4 特異的 DNA 結合は動物細胞の Rif1 にも保存される。
- (4) G4 結合部位は遺伝子間領域に存在し、多くの場合非コード転写領域内に存在する。
- (5) Rif1 は N 端 HEAT/Armadillo リピート、C 端未知ドメインからなり、両ドメイン(N 端 444aa あるいは C 端 229aa)が G4 に特異的に結合する(Dual G4 結合ドメイン) (図 1)。
- (6) Rif1 は多量体を形成し、多量体形成ドメインは分裂酵母 Rif1 の C 端 91aa に限定される。
- (7) Rif1 はその多量体形成能により、複数の分子に同時に結合する。
- (8) N 端あるいは C 端の欠失により複製起点抑制能を喪失する。
- (9) ランダム変異導入により、L848S、R236H という 2 個の複製起点抑制能を喪失した変異体が同定された。前者は細胞内でクロマチン結合しない変異体である。これらの結果から、G4 を介したクロマチン結合が、Rif1 の機能に必須であることが強く示唆された。



## 2. 研究の目的

図 1 Rif1 タンパク質の構造と生化学的特徴

Rif1 はクロマチン結合を介して、結合部位近傍 100kb にわたり DNA 複製開始を抑制する。生化学的解析から Rif1 は G4 構造に特異的に結合すること、その結合によりクロマチンファイバーを寄せ集め、特異的なクロマチンドメインを形成する可能性を指摘した(図 2)。本研究では、Rif1 が 2 つの DNA 結合ドメインを介して G4 に結合し、染色体を束ねてクロマチン高次構造ドメインを形成するメカニズムの解明が目的である。

具体的には、Rif1 の多量体形成のメカニズム、G4 結合の構造的基盤とその機能的意義について知見を得る。

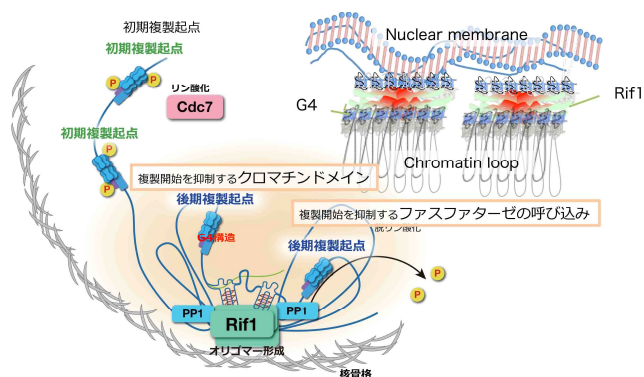


図 2 Rif1 タンパク質による核膜近傍でのクロマチンドメインの形成(モデル)

### 3. 研究の方法

- (1) Rif1 (全長、N端、C端ドメイン) とRif1結合部位由来のG4の相互作用をヌクレアーゼフットプリントなどにより詳細に解析する。G4構造としては、同一配列であるが、一本鎖上に形成されるG4、二本鎖DNAを熱処理して形成されるG4、転写により形成されるG4を用い、その構造、及び相互作用の様式を比較する。
- (2) C端にはG4結合ドメインと、多量体化ドメインの両者が存在する。多量体化のみに必要な変異体を発見し、多量体化の意義を明らかにする。Mn-PCRによるランダム変異導入を行い、単離されたすべてのクローンを代表者が開発したnative gelを用いた多量体解析法による検定し変異体を取得する。
- (3) Rif1-G4複合体をグリセロール密度勾配遠心あるいはゲルろ過により単離し、Rif1とG4分子の量比を正確に決定する。
- (4) Rif1 (全長、N端、C端ドメイン) タンパク質を大量に調製・精製し、クライオ電顕で、タンパク質単独およびG4との複合体の構造を観察する。
- (5) C端ドメインは大量調製が可能であるため、X線構造解析の準備を行う。
- (6) 分裂酵母のRif1を主に用いて解析をするが、代表者のグループでは動物細胞のRif1もG4に結合すること、N端、C端のいずれもDNAに結合することを明らかにしており(JBC, 2018)、上記の解析を動物細胞Rif1タンパク質にも応用する。

### 4. 研究成果

- (1) C端にはG4結合ドメインと、多量体化ドメインの両者が存在する。G4結合のみ、あるいは多量体化のみに必要な変異体を発見するため、分裂酵母Rif1C末領域を標的としてMn-PCRによるランダム変異導入を行い、スクリーニングした結果、G4結合、あるいは多量体化能のみを欠損した変異体を同定した。責任変異をさらに限定した (I1373M, および Q1392P) (図3, 4)。

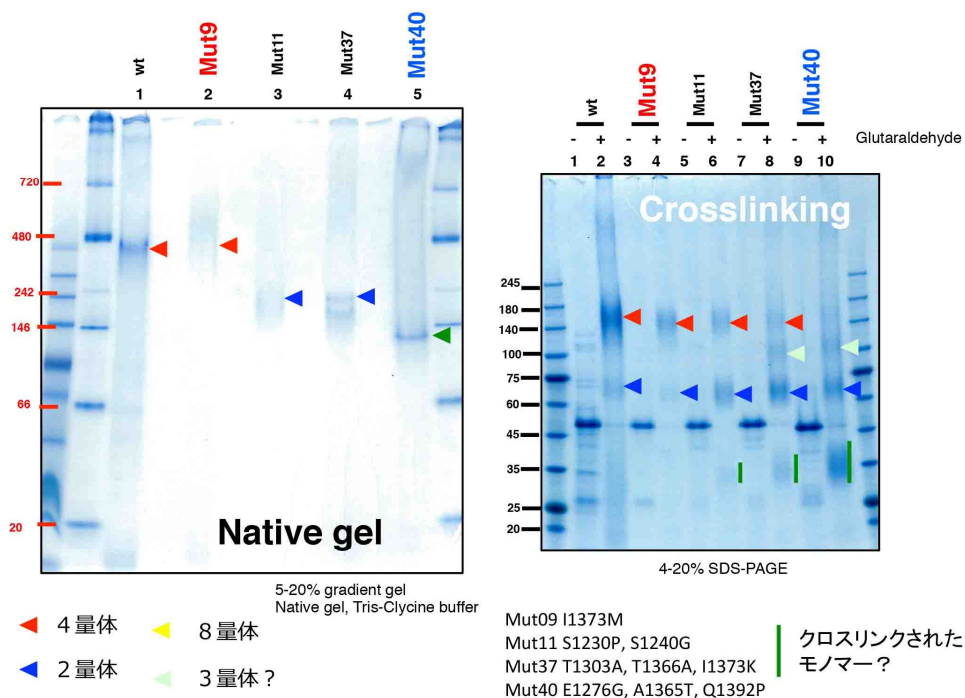


図3 G4結合あるいは、多量体形成のみが特異的に不全になった変異体の同定

(2) 得られた変異を全長Rif1に導入し、*hsk1ts*株の相補能を検証した結果、両者とも部分的な相補能を有することが明らかとなり、Rif1のG4結合、多量体化能の両者がその複製抑制機能に必要なことが明らかとなった(図5)。

(3) 分裂酵母C末272aa, 91aa, 64aa, 44aaについてクロスリンクにより多量体状態を解析した。その結果、44aaでは2

量体がメインであったが91aa, 272aaでは4量体がそれぞれ70%,90%をしめた(図6)。さらに、この領域はコイルドコイル構造を形成し4量体を形成することがSEC-MALS (size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering)解析により明らかとなった(図7)。

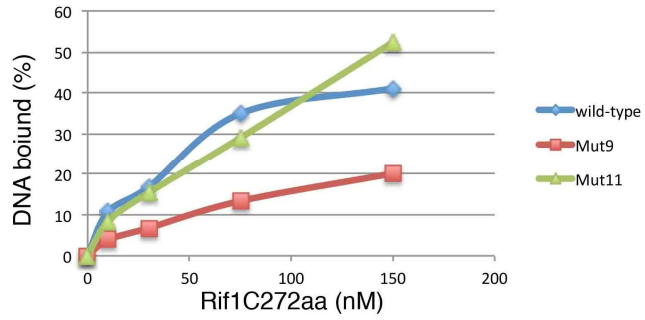


図4 ゲルシフトによるDNA結合活性測定。Mut9はDNA結合能が低下している。

- ① *rif1 mut9* I1373M G4結合低下
- ② *rif1 mut40* Q1392P 多量体形成低下

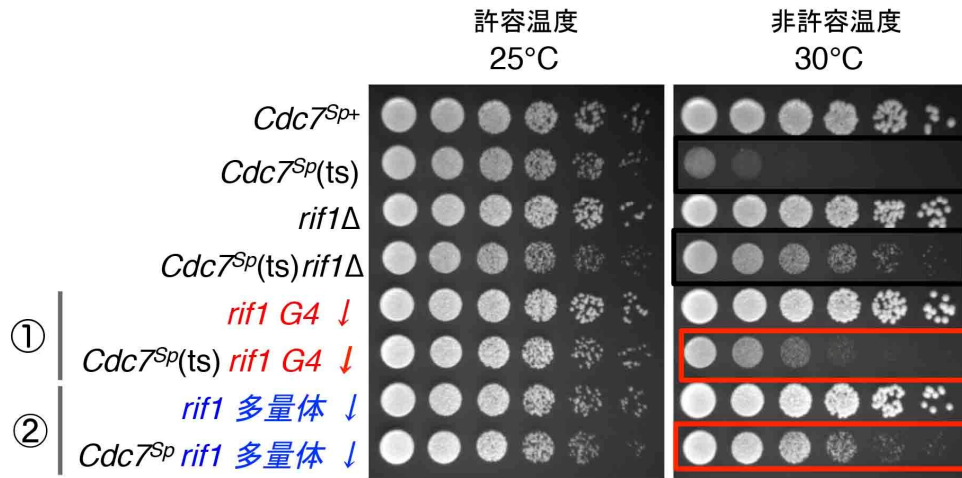
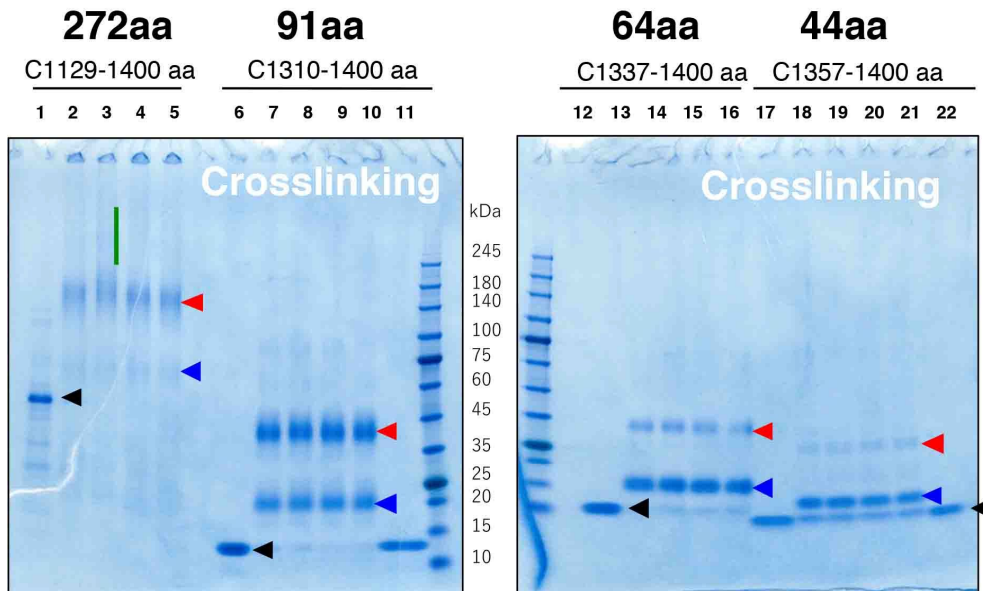


図5 *hsk1* 変異の相補アッセイによるRif1の機能検定。複製タイミング制御には多量体形成能、G4結合能の両方が必要である。



DNA-タンパク質複合体? ◀ 4量体 ◀ 2量体 ◀ 単量体

lane 3,8,14,19: G4 DNA共存

図6 多量体形成に必要なドメインの最小化。C末44aaでも4量体を形成するが、2量体・単量体比が高い。



(4) 分裂酵母及び動物細胞のRifI（全長、N端、C端ドメイン）タンパク質を大量に調製・精製した。C端ドメインについてはX線構造解析を行い、全長はクライオ電顕による観察を行っている。

(5) より分解の少ない、全長RifIを取得するため、S.japonicusのRifI(1296aa)の増産、また分解の少ないN端に変異を有する分裂酵母変異型RifIを作製した。

(6) native agarose gelを用いた新規G4-タンパク質複合体測定系を開発した。それにより、C末91aaもG4と特異的に相互作用すること、さらに短いC末64, 44aaのポリペプチドも、この測定系でG4と相互作用したが、G4を作らない1本鎖DNAとも相互作用することから特異性を喪失していることが示唆された。

(7) 構造予測から、C末領域は両親媒性のコイルドコイル構造を形成し、それを介して多量体形成することが予測された（図8）。また多量体形成に影響を与える変異により多量体、特に4量体形成が不全になることが予測された（図9）。

多量体の絶対分子量解析 (SEC-MALSによる)

SpRifI	SEC-MALS ピーク解析結果	単量体分子量	単量体数
C1129-1400	120 kDa (±52%)	31.1 kDa with His tag	3.8
C1310-1400	53 kD (±1%)	11.5 kDa with His tag	4.6
C1337-1400	36 kDa (±2%)	8.5 kDa with His tag	4.2
	41 kDa (±7%)		4.8
C1346-1400	27 kDa (±5%)	7.5 kDa with His tag	3.6
C1357-1400	28 kDa (±1.5%)	6.4 kDa with His tag	4.4

平均 約4.2量体

図7 SEC-MALS(size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering)による絶対分子量の測定。RifI C末領域は4量体を形成する。

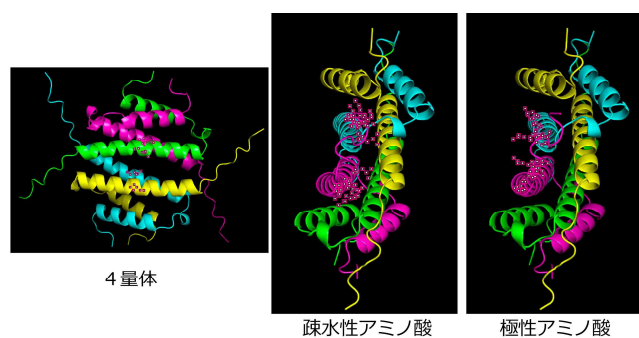


図8 RifI C末領域の構造予測。両親媒性の反平行型コイルドコイル構造を形成する。

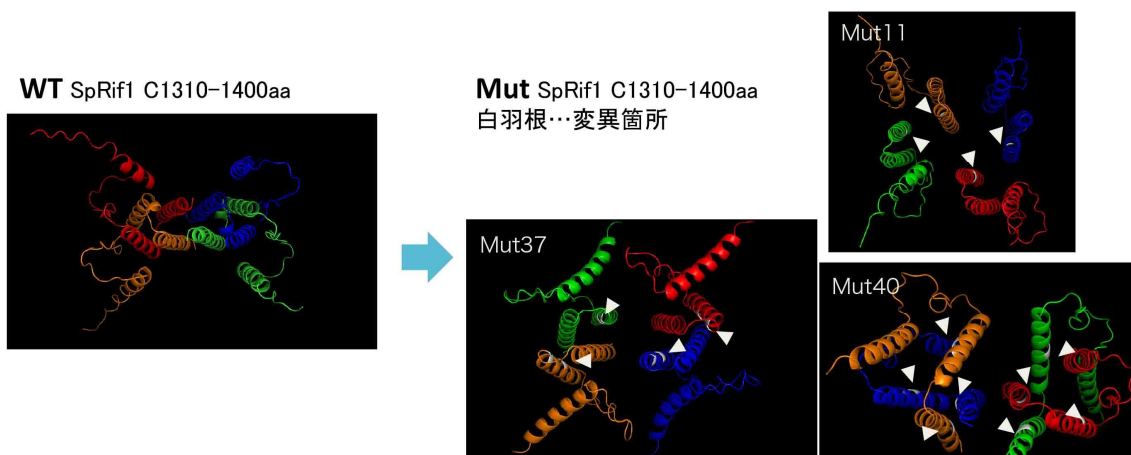


図9 多量体形成変異体の構造予測。変異体では多量体立体構造が大きく変化している。Mut40では4量体形成が特に不安定になっている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masai Hisao, Kanoh Yutaka, Kakusho Naoko, Fukatsu Rino	4. 巻 531
2. 論文標題 Detection of cellular G-quadruplex by using a loop structure as a structural determinant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 75 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.191	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 Kobayashi Shunsuke, Fukatsu Rino, Kanoh Yutaka, Kakusho Naoko, Matsumoto Seiji, Chaen Shigeru, Masai Hisao	4. 巻 39
2. 論文標題 Both a Unique Motif at the C Terminus and an N-Terminal HEAT Repeat Contribute to G-Quadruplex Binding and Origin Regulation by the Rif1 Protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00364-18	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 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomohiro Iguchi, Sayuri Ito, Naoko Kakusho, Satoshi Yamazaki, Asami Oji, Rino Fukatsu, Ichiro Hiratani, Hiroyuki Sasanuma, Hisao Masai
2. 発表標題 Association of Rif1 with nuclear membrane is essential for genome-wide replication timing regulation
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 直也、覺正 直子、正井 久雄
2. 発表標題 転写によるRNA-DNAハイブリッド上でのG4構造形成
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高沢 佳芳、加納 豊、松本 清治、小林 駿介、深津 理乃、覺正 直子、正井 久雄
2. 発表標題 Rif1多量体形成能の複製タイミング制御における役割の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 さゆり、井口 智弘、覺正 直子、大字 亜沙美、平谷 伊智朗、正井 久雄
2. 発表標題 ヒトRif1C末領域はその核膜局在と複製タイミング制御に必要とされる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正井久雄、加納豊、田中卓、井口智弘、高沢佳芳、鷺朋子、伊藤さゆり、深津理乃、覺正直子、森山賢治
2. 発表標題 グアニン4重鎖/RNA-DNAハイブリッド構造によるDNA複製の制御機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正井久雄, 加納豊, 田中卓, 吉沢直子, 伊藤さゆり, 森山賢治, 加藤宏幸, 井口智弘, 松本清治, YOU Zhiying, 深津理乃, 覺正直子, 鷺朋子, 小林駿介, 楊其駿, 楊其駿, 堀かりん, 高沢佳芳, 富樫育子, 上野勝, 長澤和夫, MA Yue
2. 発表標題 DNA複製の正と負の制御に関わるグアニン4重鎖構造
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高沢佳芳, 高沢佳芳, 加納豊, 松本清治, 正井久雄, 小林駿介, 深津理乃, 覺正直子
2. 発表標題 Rif1の多量体形成能の複製タイミングおよびクロマチン制御における役割の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納豊, 松本清治, 高沢佳芳, 高沢佳芳, 小林駿介, 小林駿介, 關口直樹, 關口直樹, 深津理乃, 覺正直子, 正井久雄, 正井久雄
2. 発表標題 Rif1の結合サイトから読み解くグアニン4重鎖構造の染色体上での形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ゲノム動態プロジェクト  
<https://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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------