

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06762

研究課題名(和文) グアニン四重鎖による染色体DNA複製開始の制御

研究課題名(英文) The regulation of initiation for chromosomal DNA replication by formation of G4 structure

研究代表者

田中 卓 (TANAKA, Taku)

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・主席研究員

研究者番号：80425686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：最近、グアニン四重鎖(G4)構造が様々な核酸代謝に関与する可能性が示唆され、DNAのかたちによる新たな制御機構が存在する可能性が高い。真核細胞のmulti-repliconのモデルを構築するため、バクテリアの安定DNA複製(SDR)に着目した。複製起点として同定したoriT1には、機能未知の遺伝子、ycjDと、典型的なG4形成配列が含まれる。精製YcjDタンパク質は、G4特異的結合能を示した。SDRは転写に依存するため、T7 promoter下にG4配列を置き、転写依存性ゲノム複製系を構築した。この結果は、転写に伴って、DNAとRNA間に形成されるG4が重要な役割を果たすことを強く示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA複製開始機構の解明は様々な疾患の原因究明と治療法確立に必須の課題であるが、分子間相互作用に基づく解析のみで解明することができない。G4の核酸代謝機構への関与は、DNAのかたちによる新たな制御機構の存在を示唆しており、真核細胞の複製機構の解明にブレークスルーをもたらすものである。真核生物のmulti-repliconの解明に、大腸菌SDRをモデルとして用いる発想は他になく、ユニークな結果を得られることを期待できる。本研究では、G4の転写に依存する複製開始を、転写誘導依存性複製開始機構を人工的に構築することで実現しており、新たな制御基盤の確立に重要な視点を提供する。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is reported that G quadruplex (G4) structure involves in several nucleotide transactions. In Escherichia coli, stable DNA replication (SDR) can be initiated with a multi-replicon mode. Constitutive SDR (cSDR) activated in RNase HI-defective cells suggests roles of transcription in its initiation. oriT1 is identified in terminal region as novel origin candidate. oriT1 contains an uncharacterized open reading frame, ycjD, and canonical G quadruplex (G4)-forming sequences which are known to facilitate RNA-DNA hybrid formation upon transcription. Furthermore, the purified YcjD protein specifically binds to G4 in vitro. We also found that ectopic transcription can induce cSDR-like replication initiation and established minimum replicon which can be initiated replication by transcription dependent manner. These results suggest that forming of G4 is critical for initiation of transcription-dependent replication.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 RecA PriA 転写 SDR G4

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の可塑的複製開始制御

真核細胞の染色体複製は、ゲノム上の多数の複製起点 (multi-origin) から、stochastic に開始される。origin の選択や開始のタイミングは、細胞の状態や環境に柔軟に応答して変動するが、その可塑性を保証する制御機構はよく分かっていない。適応性の高さを維持するしくみの解明は、染色体複製全体像の理解に必須となる。

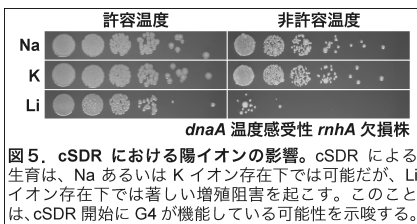
(2) 大腸菌 SDR 様式と G4

高等生物の直接解析は困難を極めるため、よりシンプルなモデルが不可欠である。原核生物は、よいモデルであるが、唯一の複製起点 (*oriC*) から *DnaA* により効率よく開始される通常のシステムは、真核細胞の複製機構の原形とは言いがたい。しかしながら、大腸菌の、*oriC*-*DnaA* に依存しない第二の複製機構は、厳格な制御をはずれて複数箇所から開始される。研究代表者は、これが高等生物システムの始原である可能性が高く、モデルとして利用できると考えている。この機構は、stable DNA replication (SDR) と呼ばれて古くから研究されており、*PriA* と *RecA* に依存することが分かっているが、固有の複製起点の位置や開始の分子機構は不明である。研究代表者は、これまでに下記の通り複製開始点の候補を同定し、その機能を解析してきた。

① *oriT1* の同定。RNA-DNA ハイブリッドの RNA を選択的に消化する RNase HI 欠損株では、constitutive SDR (cSDR) が常に活性化している。*DnaA* の温度感受性株は、非許容温度下で生育できないが、RNase HI を欠損させると cSDR のみで増殖する (図 1)。研究代表者は、cSDR において *PriA* や *RecA* が複製終結領域 (*ter* 領域) に特異的に結合することを見出した (図 2)。この領域の欠損株は、cSDR による増殖をできないことから、絞り込みによって *oriT1* を同定した。この領域から確かに DNA 合成が開始されることを、BrdU の取込みを検出するマイクロアレイで確認した (図 3)。*oriT1* には機能未知の遺伝子 *ycjD* と、G4 を形成する典型的な配列が含まれる。

② *oriT1* の複製起点活性。*oriT1* の複製起点活性を調べるため、*ter* 領域欠損株のゲノム上の別の部位に *oriT1* を含む断片を挿入すると、増殖を相補することが分かった (図 4)。この遺伝子群は operon を形成していることから、*sapA* 上流の promoter からの転写が重要であることが示唆され、これは cSDR が転写を必要とすることと矛盾しない。これらの結果は、*oriT1* が複製起点活性を持つことを示唆している。

③ G4 の機能。*oriT1* に含まれるすべての G クラスターに変異を入れると増殖が弱まることから、G4 の形成が複製開始に関与する可能性が強く示唆された。一方、G4 構造の安定化には、一価の陽イオン (K および Na) が必要とされるが、Li では安定しないことが知られる。確かに Li を含む培地上では著しい増殖阻害を起こした (図 5)。この結果は、G4 が重要な役割を果たしている証拠の 1 つと見てよい。



興味深いことに、最近、非 B 型 DNA の特異的な形状が、様々な細胞機能に関わる可能性が報告されており、G4 は、転写や複製開始などに機能する可能性が示唆されている。G4 構造を形成しうる配列は、真核生物のゲノム上では数十万カ所存在するため、広範な複製開始制御に関わる可能性が

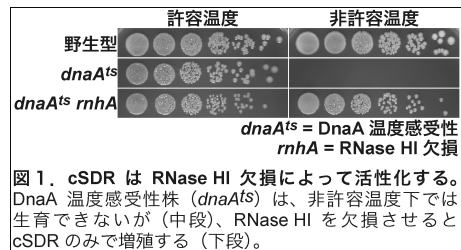


図 1. cSDR は RNase HI 欠損によって活性化する。*DnaA* 温度感受性株 (*dnaA<sup>ts</sup>*) は、非許容温度下では生育できないが (中段)、RNase HI を欠損させると cSDR のみで増殖する (下段)。

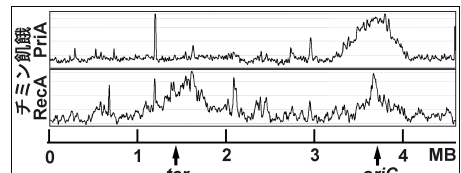


図 2. *PriA* および *RecA* の結合。ChIP-on-chip で *PriA* および *RecA* の結合部位を検出すると、チミン飢餓処理によりフォーク停止を誘発したとき、両者は *oriC* 付近と、特に *RecA* は *ter* 領域にも強く結合する。

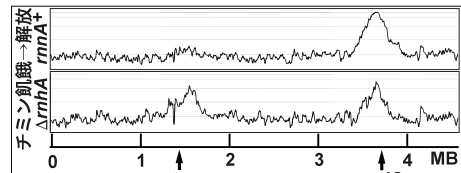


図 3. DNA 合成の開始。チミン飢餓から BrdU 中に解放し、抗 BrdU 抗体による ChIP-on-chip で DNA 合成を検出すると、*PriA* および *RecA* の結合位置から開始していることが分かる。

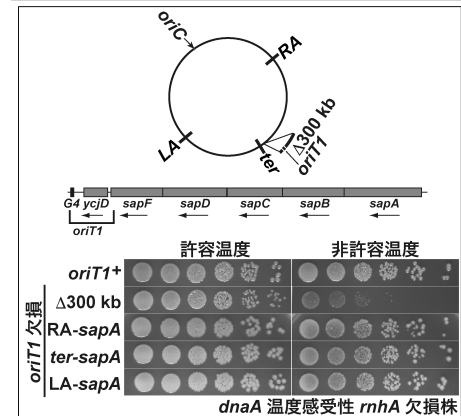


図 4. *oriT1* の複製起点活性。cSDR は、*oriT1* 領域を欠損させると阻害される (Δ300 kb)。ゲノムの right arm (RA)、*ter* 領域 (*ter*)、あるいは left arm (LA) に *oriT1* を含む断片 (*sapA* まで) を挿入すると、cSDR 増殖を回復する。このことは、*oriT1* を含む断片が、複製起点として機能する可能性を示唆する。矢印は転写の方向を示す。

あるが、詳細は不明である。ゲノム全体のダイナミックな変動を制御する分子機構に G4 が関わる可能性は高く、これを解明することは、DNA のかたちによる新たな制御機構を確立し、様々な細胞機能の解明にブレークスルーをもたらす。

## 2. 研究の目的

本研究は、新たな染色体複製開始制御機構における、G4 構造の機能を解明することを目的とする。モデルとして大腸菌の multi-origin 複製機構 (SDR) を用い、特定された複製起点の候補、およびそれに関わる因子を、*in vitro* 再構成系により再現することで立証して、本機構の分子基盤を確立する。ここで得られる結果を、真核細胞に敷衍し、高度な適応性と可塑性を保証する分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *oriT1* の機能解析

*oriT1* が SDR の開始に重要な役割を果たすことを確認するため、SDR を恒常的に活性化する *rnhA* 欠損ではなく、温度感受性株を樹立する。Mn ランダム変異導入により、SDR 条件下で温度感受性を示す株を単離する。得られた *rnhA* 温度感受性株を用い、チミン飢餓処理なしに BrdU 取込み実験を行い、正確な SDR 開始時に *oriT1* 近傍から DNA 合成が開始されるかを BrdU ChIP により検出する。また、 $[^3\text{H}]$ チミンの直接計測によっても DNA 合成の有無を検証する。

### (2) *dif* 配列と RecA の機能

*oriT1* を同定する際に cSDR を著しく抑制する領域として *dif* 欠損を見出した。*dif* は複製終結後の染色体分離・分配到に機能することが知られており、複製開始の不能によるものではないと予想されるが、これを確かめるため、 $[^3\text{H}]$ チミンの計測を行う。一方、RecA は、*in vitro* で R-loop 形成を触媒することが報告されており、RNA-DNA ハイブリッドを介した複製開始に RecA が必須の因子であることが知られているが、正確な機能は分かっていない。SDR 開始に RecA が必須かどうかを確認するため、欠損株の DNA 合成を、 $[^3\text{H}]$ チミンの測定で確定する。

### (3) 転写に依存する最小複製単位の構築

*in vivo* での複製起点活性を証明するため、pSC101 プラスミドの温度感受性 origin を用い、T7 promoter 下に G4 配列を含む断片を挿入した最小複製単位を含むプラスミドを構築し、非許容温度下で転写誘導性に維持できるかどうかを薬剤耐性で確認する方法を利用する。通常の株で増幅できないプラスミドとするため、複製起点としては pSC101 の origin を持たせる。pSC101 は RepA 発現株でのみ増幅されるので、まず *repA* 遺伝子をゲノムに挿入した株を構築する。pSC101 は低コピープラスミドで、このままでは使いにくいので既に報告されている E93R という変異を持たせることで、高コピーに維持することが可能となる。T7 RNA polymerase (RNAP) を *lac* promoter 下に持つ株を作製し、IPTG 誘導性に最小複製単位の G4 配列の転写を亢進させ、*rnhA* 有無で SDR 性に薬剤耐性が発揮されるかどうか調べる。さらに、ゲノム上の内在性 G4 配列に T7 promoter を挿入した株で、実際にそこから複製が開始していることを spot test などで確認する。

### (4) 細胞内に形成される G4 の検出

G4 は、RNA-DNA 間に形成される可能性がある。その位置を同定し、転写との共役を明らかにする。*oriT1* からの複製開始に、G4 が関与することが強く示唆され、YcjD タンパク質が、G4 構造特異的に結合する事を *in vitro* で見出している。これらの結果から導かれる、もっとも魅力的なモデルは、G4 配列の転写と YcjD の機能の共役によって、RNA-DNA 間に G4 が形成され、複製開始を制御するという分子機構である。細胞内で形成された G4 の位置を、DNA-RNA hybrid に特異的に結合するヒト RNaseH1 D145N タンパク質あるいは、抗 G4 抗体である BG4 や G4 特異的リガンド G4P に GFP を融合したプローブを作製し、顕微鏡下で直接検出を試み、*in vivo* でその位置を確認する。

### (5) SDR の生理的意義の確定

SDR は、*oriC*-DnaA システムを獲得する前の、より原始的なしくみであると考えられる。真核生物は、この様式を採用することで、可塑性を獲得できたのではないか。すなわち、この複製様式は、error prone (エラーしがちな) な特性を持つことが予想される。この可能性を検証するため、SDR 活性化時の変異率を測定する。*rpsL* を利用した変異測定を採用する。*rpsL128* allele はストレプトマイシン耐性を提供するが、遺伝的に劣勢なので野生型 allele があると感受性となる。そのため、*rpsL128* 株のゲノム上に *rpsL* 野生型 allele を挿入した、部分的 2 倍体を作製し、ストレプトマイシン含有培地上で生育すると、野生型 allele に変異が入った場合のみ耐性となって生育してくる。この数を数え、さらに変異箇所を配列決定により同定することで、突然変異率を計算する。野生型 allele の挿入位置を *oriC* 近傍と *oriT1* 近傍に分けることで、変異率の違いを比較することができる。

#### 4. 研究成果

染色体複製開始において、真核細胞では活性の低い多数の複製起点が活性化するのに対して、バクテリアでは唯一の複製起点が利用される。しかしながら、大腸菌においても安定 DNA 複製様式 (SDR) においては、複数箇所から開始されることが知られており、これが真核細胞の multi-replicon 様式の始祖である可能性を検証するため、SDR の詳細な解析を行った。cSDR は RNaseHI 欠損株で恒常的に活性化することから、転写と R-loop の形成が開始に重要であることは予想されてきたが、固有の複製起点とそのメカニズムは明らかになっていない。これまでに *ter* 領域に同定した複製起点候補、*oriT1* は典型的なグアニン四重鎖 (G4) 形成配列を含むことから、SDR 開始は、転写とグアニン四重鎖に制御されるモデルを想定しており、この可能性を検証した。RNaseHI 温度感受性株の樹立により、*oriT1* の極めて近傍からの DNA 合成開始を検出し (図6)、 $[^3\text{H}]$  チミンの直接計数によっても、*oriT1* を含む領域の欠損株は確かに合成が減弱することを確認した (図7)。また、*dif* 配列の欠損は、DNA 合成に影響を与えないことから、当初の予想通り *dif* 欠損による SDR 増殖阻害は、DNA 合成ではなく、染色体の分離分配の不具合によることが示唆された。SDR に必須の *RecA* 欠損も、弱いながら DNA 合成が維持されることから、*RecA* は SDR において、DNA 複製開始以外に機能している可能性が示唆された (図8)。*RecA* はもう一つの必須因子、*PriA* と *in vitro* で相互作用するが、*ter* 領域への *RecA* 結合は *PriA* 非依存であるのに対して、*PriA* 結合は *RecA* に依存することから、複製開始における機能は *RecA* 依存性に制御される可能性を見出した。*oriT1* は機能未知の遺伝子 *ycjD* と、典型的なグアニン四重鎖 (G4) 形成配列を含むことから、SDR 開始が、転写とグアニン四重鎖に制御される新規モデルを想定している。そのメカニズムを明らかにするために、*in vitro* 複製系を確立する必要がある。G4 の関与をより明確に判定できる、最小複製単位 (minimum replicon) を持つプラスミドを構築した。転写を制御するため、T7 promoter を G4 配列上流に挿入したカセットを薬剤耐性遺伝子に繋ぎ、生育のみで複製を評価する系を確立した。このプラスミドは、pSC101 origin を持たせてあり、RepA 発現株での

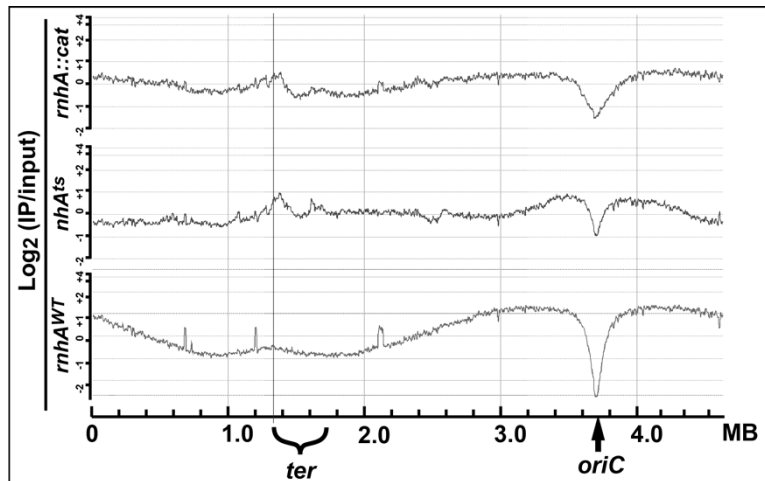


図6. SDRによるDNA合成は*oriT1*近傍から開始される。SDRによるDNA合成が*oriT1*から開始されることを正確に決めるため、*rnhA*の温度感受性株を樹立し、チミン飢餓処理なしにBrdUの取込みを検出すると、*oriT1*の近傍にピークが観察された。コントロールの*rnhAWT*株ではピークは見られない。縦線は*oriT1*の位置を示す。

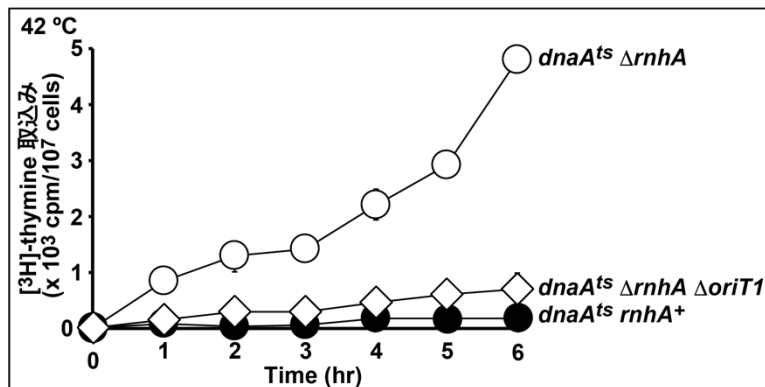


図7. 効率のよいSDRに*oriT1*が必要とされる。 $[^3\text{H}]$ -thymineの取込みによるDNA合成能測定。*oriT1*欠損株では、非許容温度でのDNA合成が減弱する。

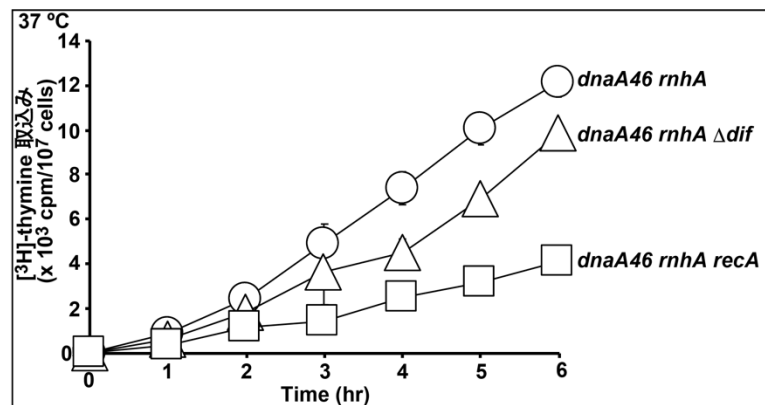


図8. *dif*と*RecA*はSDRのDNA合成に必須ではない。*dif*配列と*recA*遺伝子の欠損はSDRのDNA合成を完全に阻害しない。これらは染色体の分離・分配等、複製開始とは別の過程に役割を果たす可能性が示唆される。

見出した。*oriT1* は機能未知の遺伝子 *ycjD* と、典型的なグアニン四重鎖 (G4) 形成配列を含むことから、SDR 開始が、転写とグアニン四重鎖に制御される新規モデルを想定している。そのメカニズムを明らかにするために、*in vitro* 複製系を確立する必要がある。G4 の関与をより明確に判定できる、最小複製単位 (minimum replicon) を持つプラスミドを構築した。転写を制御するため、T7 promoter を G4 配列上流に挿入したカセットを薬剤耐性遺伝子に繋ぎ、生育のみで複製を評価する系を確立した。このプラスミドは、pSC101 origin を持たせてあり、RepA 発現株での

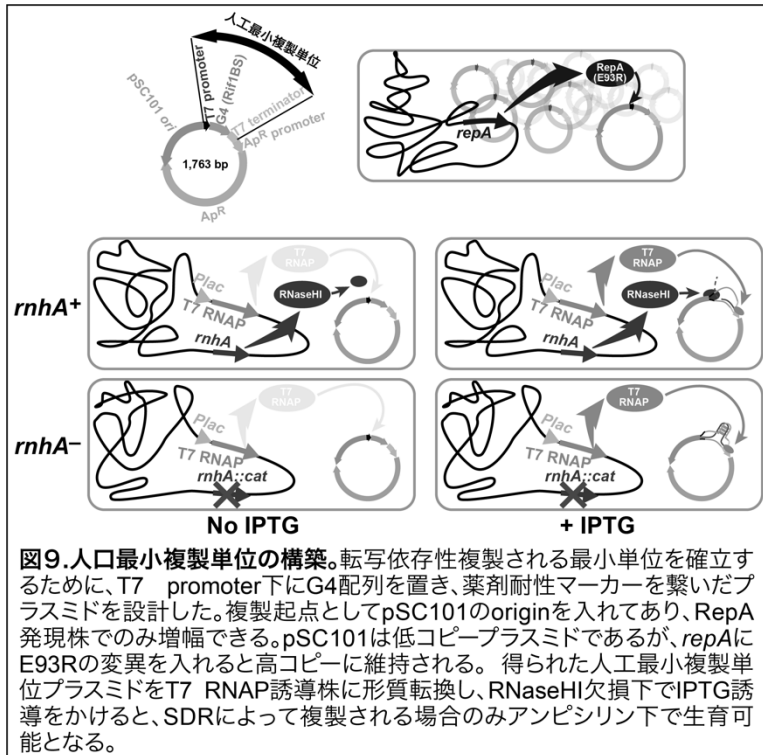


図9. 人工最小複製単位の構築。転写依存性複製される最小単位を確立するために、T7 promoter下にG4配列を置き、薬剤耐性マーカーを繋いだプラスミドを設計した。複製起点としてpSC101のoriginを入れてあり、RepA発現株でのみ増幅できる。pSC101は低コピープラスミドであるが、repAにE93Rの変異を入れると高コピーに維持される。得られた人工最小複製単位のプラスミドをT7 RNAP誘導株に形質転換し、RNaseHI欠損下でIPTG誘導をかけると、SDRによって複製される場合のみアンピシリン下で生育可能となる。

み増幅できる。これを、T7 RNAポリメラーゼ発現株に形質転換し、薬剤入りプレート上で転写誘導性の生育を観察し、転写依存性に複製するプラスミドを確立した(図9、10)。この系ではT7 promoterのみでも弱いながら複製することが分かったが、terminatorに含まれるGクラスターが複製開始を促進する可能性が強く示唆されたため、G4形成は本最小複製単位の複製開始効率に機能している可能性を見出した。in vivoでもoriT1内の内在性G4形成モチーフ直前にT7 promoterを挿入すると、転写依存性にdnaA温度感受性を相補することから(図11)、この領域の強力な転写がゲノム全体の複製を推進する可能性が示される。また、このモチーフはゲノム上に30箇所以上散在するので

(図12)、他の位置でもT7 promoter挿入により転写依存性複製が活性化されるかを調べ、転写誘導性G4形成がmulti-replicon様式の複製開始に機能する可能性を検証することにより転写依存性複製開始機構の詳細を決定する予定である。転写に伴うG4形成を検出するため、DNA-RNA hybridとG4構造に対するプローブを開発した。ヒトRNaseHI D145N変異体タンパク質は、DNA-RNA hybridに、G4PおよびBG4はG4構造に特異的に結合するので、これらの因子にGFPを融合して細胞内で発現させ、発光を観察した。これまでのところ、SDR条件下でRNaseHI D145Nが複数のfociを形成し、multi-repliconによる複製を反映する可能性のある結果が得られているが、G4のfociは観察できておらず、特異的検出はさらなる技術開発を必要とする。またrpsLの変異率を調べると、dnaA温度感受性rnhA欠損株において非許容温度では変異率が上昇することが確認された。SDRによる複製がより変異率を高めるかどうかを検証する必要がある。これらの結果は、バクテリアのmulti-replicon様式の分子機構を初めて明らかにするものであり、真核細胞に応用することで、その複製開始機構の詳細と進化について新たな視点をもたらす可能性が高いと考えている。

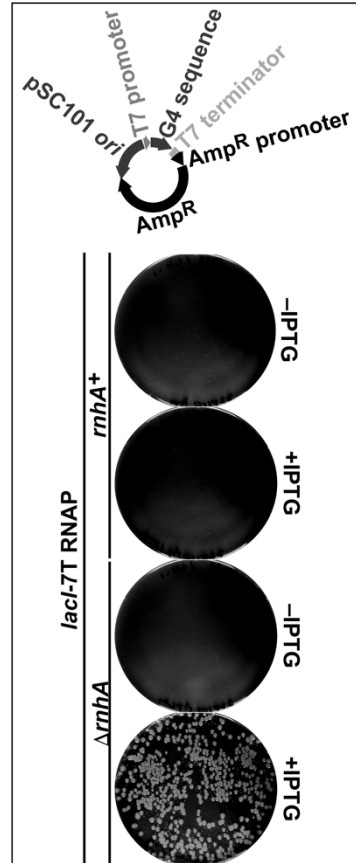


図10. 最小複製単位の構築。転写依存性G4形成ユニットと薬剤耐性マーカー(AmpR)のみのプラスミドはrnhA欠損株でT7 RNAP誘導性に複製される(最下段)。pSC oriはrepA発現株内のみで複製するので、本株では転写誘導しない限り複製せず、薬剤存在下で生育できない(-IPTG)。

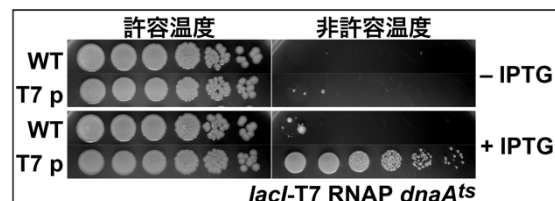
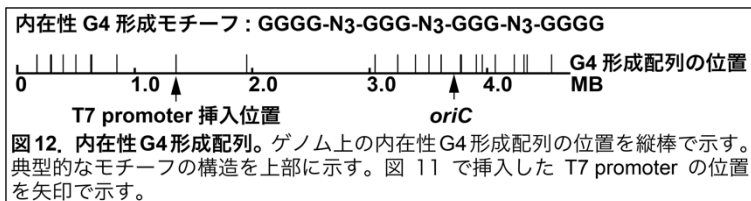


図11. 転写に伴うG4形成依存性複製。大腸菌ゲノムに内在するG4形成配列直前にT7 promoterを挿入した株(T7 p)は、dnaA温度感受性条件下で、T7 RNAP発現依存性に増殖する(下段)。すなわち、G4配列を含む領域の転写誘導のみで、ゲノム全体の複製が進行することを示しており、この複製開始にG4形成が関与する可能性が強く示唆される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 卓、鷺 朋子、深津 理乃、正井 久雄
2. 発表標題 multi-replicon 様式の大腸菌染色体複製は転写に伴うG4形成に依存する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 卓、鷺 朋子、深津 理乃、西藤 泰昌、正井 久雄
2. 発表標題 multi-replicon 様式の大腸菌染色体複製機構 : RNA-DNA hybrid/G4 構造の関与
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 田中 卓、鷺 朋子、西藤 泰昌、正井 久雄
2. 発表標題 multi-replicon 様式の大腸菌染色体複製メカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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