

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570243

研究課題名(和文)複製ストレスによる複製フォーク複合体の変動と細胞応答機構の解析

研究課題名(英文)Mechanism of the replication stress response of variable replication fork complexes

研究代表者

吉沢 直子(須賀田直子)(YOSHIZAWA=SUGATA, Naoko)

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・主任研究員

研究者番号：30344071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトフォーク因子複合体はS期のクロマチン画分でリン酸化型Mcm4を特異的に含むことを見出した。次に、マウスES細胞で発現解析したところ、フォーク因子や複製タイミング制御因子Rif1が高発現していた。発現抑制の実験などにより、Rif1の発現はES細胞の自然分化を抑制しiPS細胞の形成効率に必要な一方、多能性を亢進する二細胞期の遺伝子群を抑制するという双方向の作用を持つことがわかった。また、Rif1が分化誘導において重要な遺伝子のプロモーター領域に結合することも見出した。

研究成果の概要(英文)：In attempts to identify fork complex components and its binding proteins, we purified Timeless complexes and found that it specifically contains phosphorylated Mcm4 proteins in the chromatid fraction. We also found that the replication fork proteins AND-1 and Tipin, and a replication timing regulator Rif1, are highly expressed in the undifferentiated mouse embryonic stem (ES) cells. Among them, Rif1 is highly correlated with the undifferentiated states of ES cells. Interestingly, Rif1 may play dual roles in ES cells; In addition to its counteraction with spontaneous differentiation, Rif1 also inhibits the expression of 2 cell-specific genes, which are involved in promoting reprogramming for pluripotency. We found that Rif1 binds to the promoter of differentiation-regulating genes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：ゲノム不安定性 多能性幹細胞 初期胚 複製フォーク

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本研究の背景

DNA複製(S)期は、二重鎖のゲノムDNAがほどかれ一時的に不安定な構造を取るだけでなく、内外のストレスによるDNAの損傷やDNA結合タンパク質による立体障害などにより一時的に複製が停止することがある。このとき、複製フォーク構造を安定化して細胞周期を一時的に停止するしくみを「複製チェックポイント」という。癌の初期段階では複製ストレス応答が強く見られることから、複製チェックポイントの破綻がゲノム不安定化を誘導しがんの発症に至る、というモデルも提唱されている(Gorgoulisら, 2005)。

チェックポイントの活性化は、細胞周期を安全に停止するだけでなく、複製ストレスの次に起こる、DNA修復や、DNA複製のバイパス経路の活性化、修復不可の場合は細胞死や細胞老化などのイベントを誘導するシグナル伝達を活性化する役割がある。しかし、複製中のフォークの進行をモニターする仕組みは明らかになっていなかった。

### (2) 本研究に先行する報告や研究代表者の準備状況

前回の基盤研究(C)(課題番号20570173)において、研究代表者は、複製フォーク結合因子が複製装置とチェックポイントの橋渡しをしていると仮説を立て、ヒト複製フォーク因子タンパク質Tim, Tipin, AND-1がチェックポイント経路におけるシグナル伝達のかなめとして重要な機能を持つことを相次いで報告した(吉沢と正井, 2007と2009)。これらの因子は共通してチェックポイント活性化するのに必要であった。しかし一方で、DNA修復、特に相同性組換え修復においては因子間で異なる機能を持つこと、また、複製フォーク複合体にサブ複合体が存在することから、フォーク複合体のバリエーションが複製停止後の経路選択機構に寄与する可能性を見だし、本研究の計画を申請するに至った。

本研究の途上でフォーク因子が未分化細胞で予想外に高発現していることを見いだした。DNA修復因子が多能性獲得に重要な役割をもつことが最近報告されたことから(Gonzálezら, 2013)、フォーク因子が未分化細胞でのゲノム安定性において新たな機能を担う可能性が考えられた。さらにフォーク因子だけでなく、非相同性組換えに関与するタンパク質Rif1が未分化細胞の複製ストレス応答に寄与し特徴的な局在変化をすることを見いだした。本研究では研究材料をヒトがん細胞とマウス胎生幹(ES)細胞とし、各因子の機能の解析を行うことにした。

## 2. 研究の目的

(1) 構成の異なるフォーク複合体の同定: Tim, AND-1などをbaitとして、複製ストレスの有無など様々な条件下で複合体を精製

し、結合因子とその翻訳後修飾などを解析する。

(2) 相同組換え修復と損傷バイパス経路の選択におけるフォーク因子の機能を解析する。

(3) 細胞死の抑制や促進をもたらすフォーク複合体を同定する。

上記に加え、新たに以下を追加した。

(4) マウスES細胞における複製フォーク因子などの機能解析: 発現と分化との相関や、発現抑制するにより未分化状態や多能性の維持への影響について調べる。

(5) フォーク因子などが結合するゲノム領域を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) フォーク複合体の精製: フォーク因子Tim, AND-1やRif1などを標的として、ヒトHeLa細胞やマウスES細胞抽出液から単離精製し、複合体構成因子や結合タンパクをイムノプロットや質量分析で同定した。細胞周期や複製ストレスの有無で比較した。

(2) 遺伝子発現の抑制: RNAiによるノックダウン: 標的となる遺伝子のsiRNAを作製し、Oligofectamineトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入した。mRif1 flox/flox MEF細胞でのノックアウト: Buonomo博士より譲渡されたmRif1 flox/floxマウスの胎児繊維芽細胞を取得、Creリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを感染させてmRif1をノックアウトした。

(3) イムノプロットおよび免疫沈降: 細胞抽出液をアクリルアミドゲルで電気泳動し、これを転写したPVDF膜上でタンパク質を検出した。抗AND-1抗体、抗Tipin抗体は前回の基盤研究(C)(課題番号20570173)で作製したものをを用いた。抗Rif1抗体は種間で保存されたN末端(mRif1 1-206 aa)および構造不定領域(1673-1851 aa)を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製、これをアフィニティー精製して用いた。免疫沈降は、細胞抽出液に抗体を加えて結合させ、ProteinA/Gセファロースで沈降させて複合体をイムノプロットにて解析した。TAPタグを付加したタンパク質の精製はIgGセファロースで行った。

(4) ES細胞及び初期胚におけるAND-1, Tipin, Rif1の局在解析: 未分化のES細胞及び分化誘導した胚様体を固定し、それぞれの抗体で免疫染色により局在を調べた。また、体外受精により得たマウス初期胚を培養し、経過を追って局在の変化をみた。

(5) クロマチン結合領域の解析: 増殖中のES細胞をホルムアルデヒドで固定し、自作の抗AND-1C端抗体または抗Rif1N端抗体を用いて全ゲノムクロマチン免疫沈降解析(ChIP-seq)を行った。得られたDNAをさらに切断・増幅して次世代シーケンサーGAIIxで解析した。得られた配列からプログラム

BowTie でゲノムへのアライメントを行い、MACS 1.4 (AND-1; p 値 $<1 \times 10^{-5}$ ) または MACS2 (Rif1; q 値 $<0.05$ ) にてピークを検出した。

#### 4. 研究成果

(1) フォーク因子および Rif1 複合体の解析: Tim 複合体: FLAG と TAP タグを付加した Tim の安定発現株を HeLaS3 細胞で樹立し、S 期の Tim 複合体の精製と結合タンパク質の解析を行った。その結果、Claspin, Mcm7, Mcm4 (特にリン酸化型 Mcm4) の結合はクロマチン画分 (図 1、NP) で特異的に Tim に結合していた。AND-1 複合体: HeLaS3 細胞で免疫沈降を行ったところ、AND-1 がほぼ単独で精製され、特異的に結合するタンパク質が同定できなかった。Rif1 複合体: マウス ES 細胞 E14 から Rif1 複合体を免疫沈降にて精製し、この画分に含まれる結合タンパク質を質量分析で同定した。その結果、ヒストン H3K4 や H3K9 のメチル化酵素および脱メチル化酵素などが検出された。

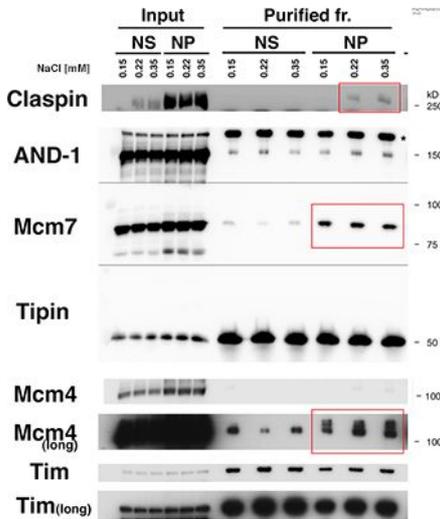


図 1 . 核可溶性画分 (NS) と DNase で消化したクロマチン画分 (NP) から精製した Tim 複合体の解析 (\*は FLAG-Tim-TAP のシグナルを示す)

(2) 複製制御因子の未分化細胞における発現解析: 増殖の盛んなマウス ES 細胞での複製制御因子の発現を、胎児繊維芽細胞 (MEF) と比較した。その結果、予想に反して、DNA 鎖伸長に必要な複製クランプ PCNA や、Mcm2, GINS など一部の前複製複合体 (Pre-RC) 因子の発現は大きな差は無かった。一方で、Pre-RC の Orc2, Cdc6、フォーク因子の AND-1 や Tipin は MEF 細胞に比べ数十倍高く発現していた (図 2)。この発現は、ES 細胞を胚様体形成誘導により分化させると著しく減少した。このことから、これらの因子質群は細胞の未分化状態と相関があることが示された。

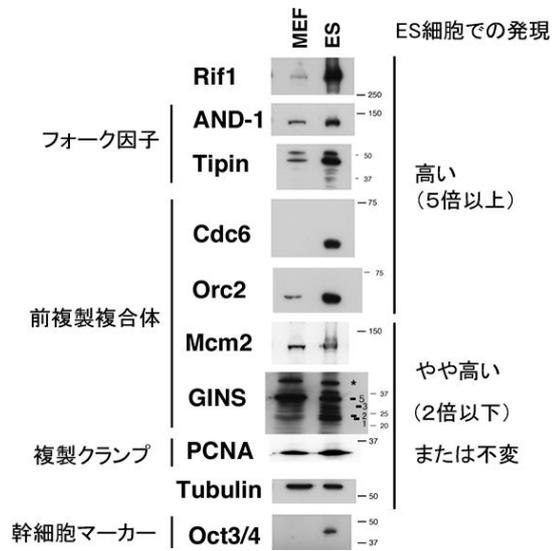


図 2 前複製複合体、複製フォーク因子などの発現比較: マウス MEF と ES 細胞

(3) マウス ES 細胞および初期胚での細胞内局在解析: ES 細胞で Rif1 および AND-1 の細胞内局在を解析した。AND-1, Tipin はヒトがん細胞のように核で一様に局在した。Rif1 は核膜で強く、核内全体でも弱く検出された。自然分化した ES 細胞では AND-1, Tipin, Rif1 の発現が低下していることが多かった。

次にマウス初期胚での Rif1 の局在を調べた (図 3)。Rif1 の発現レベルは未受精卵か

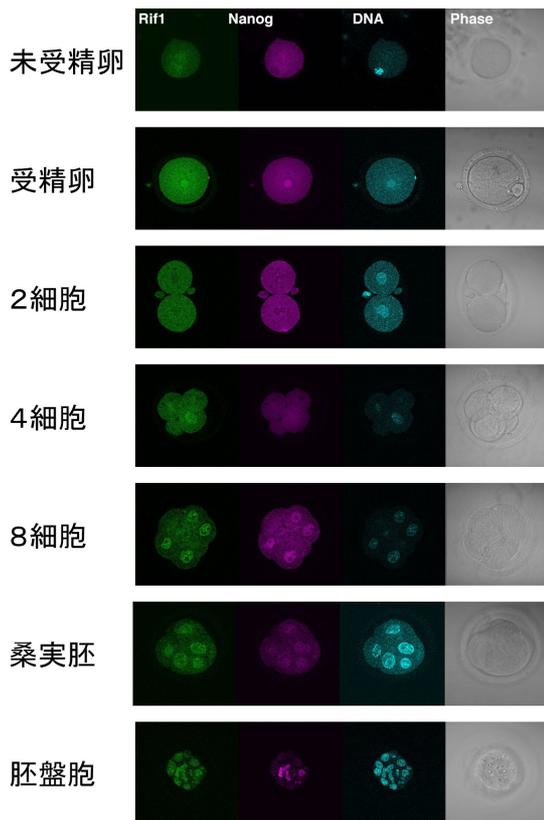


図 3 マウス初期胚における Rif1 の局在

ら胚盤胞まで終始高く維持されており、受精を経て細胞質から徐々に核へ移行し、胚盤胞

期にはほぼ核のみにみられた。核内での局在は、4細胞期以降では核膜とヘテロクロマチン領域で顕著である。興味深いことに2細胞期でのみ、Rif1は一旦核から除外される。このことはRif1が2細胞期特異的遺伝子発現を負に制御していることに関連があるかもしれない(4)で後述)。

(4) ES細胞でのRif1の発現抑制：マウスES細胞でRif1の発現を抑制したところ、ES細胞で分化が弱く誘導が見られた。具体的には、立体的なES細胞様の形態から平らな分化細胞様のコロニーが増加し、アルカリフォスファターゼ(AP)活性の低下が見られた(図4)。Rif1の発現を抑制するとOct3/4は72時間で4割程度まで減少したが、Nanogの発現は不変で48時間までは一時的に4割程度まで増加した。

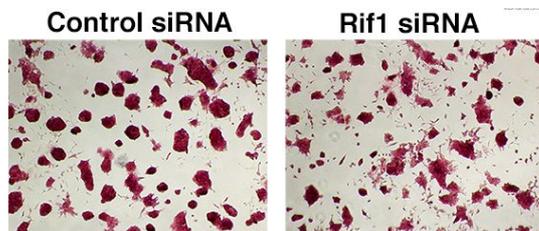


図4. Rif1をノックダウンしたES細胞でのアルカリフォスファターゼ染色像(右)。左はコントロールsiRNAを導入したものの。

次に、Rif1をノックダウンしたES細胞での遺伝子発現プロファイルを解析したところ、2細胞期特異的に発現する遺伝子群Zscan4, Tcstv1, Usp171aなどの発現が顕著に増加した。Zscan4は多能性細胞へのリプログラミングを正に制御する因子として知られている。このことから、ES細胞でのRif1の発現抑制は、細胞の形態変化やOct3/4の発現低下で見られる部分的な分化誘導

Zscanの発現誘導による分化誘導の抑止という2つの相反する作用をもたらす可能性がある。

(4) Rif1の発現抑制によるiPS細胞作製効率への影響：mRif1 flox/floxマウスよりMEF細胞を取得し、Rif1をノックアウトしてから山中因子を導入してiPS細胞を作製した。その結果、アルカリフォスファターゼ陽性の出現効率が2割程度まで低下した(図5)。さらに、顕微鏡下で観察するとアルカリフォスファターゼ陽性細胞であっても、形態的には平らな分化細胞様の細胞が多かったことから、実質的にはリプログラミング効率が著しく低下していると考えられた。

(5) クロマチン結合領域の解析：AND-1：ES細胞で免疫沈降を行い得られたDNAを解析した。検出したピークは転写開始細胞の未分化状態と相関があることが示された。

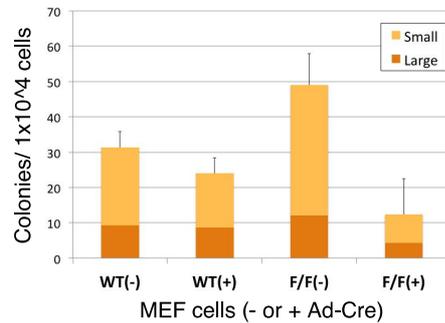


図5 野生型マウスMEF細胞(WT)とマウスRif1を発現抑制した細胞(F/F)でのアルカリフォスファターゼ陽性細胞の割合

部位の位置と統計的に相関が高く、転写が活発な遺伝子のプロモーター領域で顕著に蓄積していた(図6)。一方、ES細胞で発現の低い遺伝子領域のプロモーターではAND-1の蓄積が見られないことから、AND-1はDNA複製を安定に行うために転写の活発な領域で常時局在している可能性が示唆された。

Rif1：局在が広範囲で、特定部位への蓄積が少ないため、検出されたピークは数百以下と少なかった。(3)より、分化を制御する遺伝子との関連が予測されたことから、全ゲノム解析でなく、特定の遺伝子のプロモーター領域にしぼってChIPアッセイを行った。その結果、内胚葉系へのマーカーであるGata6およびSox17遺伝子のプロモーターで顕著に蓄積が見られた(図7)。Sox17遺伝子の上流は転写活性化型と抑制型のヒストンマークが共存する二相性の領域といわれ、分化制御のかなめであることから、Rif1がこうした領域に結合して未分化から分化細胞へ変換するタイミングや活性化を制御している可能性が示唆された。

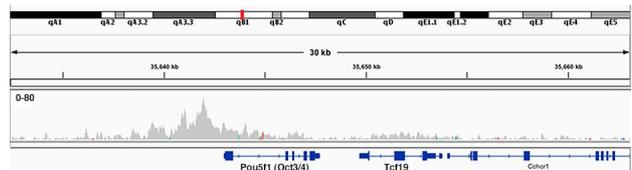


図6 Pou5f1(Oct3/4)遺伝子領域におけるAND-1の結合ピーク(縦軸：80倍)

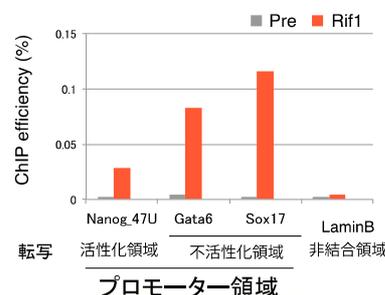


図7: AND-1結合領域の同定: Nanogおよび内胚葉分化マーカー遺伝子上流(Gata6, Sox17)でのRif1の結合解析

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

[原著論文: 欧文]

1. Tanikawa, M., Wada-Hiraike, O., Yoshizawa-Sugata, N., Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto, Y., Sone, K., Ikeda, Y., Kashiya, T., Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai, H., Roy AL, Osuga, Y., Fujii, T. (2013) Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br. J. Cancer.* 109, 3042-8. (査読有)

2. Moriyama, K., Yoshizawa-Sugata, N., Obuse, C., Tsurimoto, T. and Masai, H. (2012) EBNA1-dependent recruitment of Orc on OriP of Epstein-Barr virus with purified proteins: Stimulation by Cdc6 through its direct interaction with EBNA1. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 23977-23994. (2012年7月)(査読有)

[学会発表](計4件)

1. 吉沢直子, 正井久雄 「Rif1のES細胞での未分化能維持、および体細胞のリプログラミングにおける機能解析: クロマチン構造制御因子としての可能性」第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸(ポスター発表)

2. 吉沢直子, 覚正直子, 山崎聡, 深津理乃, 正井久雄「Rif1はクロマチン高次構築を制御してES細胞特異的な核内構造を形成する」第35回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2012年12月11-14日, 福岡(口頭発表およびポスター発表)

3. Yoshizawa-Sugata, N., Kakusho, N., Yamazaki, S., Fukatsu, R. and Masai, H.: "The maintenance of undifferentiated state in mouse embryonic stem cells by Rap1 interacting factor-1 (Rif1), a potential regulator of chromatin architecture in nuclei." 分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 横浜(口頭発表およびポスター)

4. Yoshizawa-Sugata, N., Kakusho, N., Yamazaki, S., Fukatsu, R. and Masai, H. "The maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells by Rif1, a potential regulator of replication domains." Joint CSH-Asia / ISSCR Conference on Cellular Programs &

Reprogramming, 2011年10月24-28日, 中国, 蘇州(ポスター発表)

[図書](計1件)

1. Yoshizawa-Sugata, N. and Masai, H. (2014) "Cell cycle synchronization and flow cytometry analysis of mammalian cells": *Methods in Molecular Biology*, 1170:279-293. DOI:10.1007/978-1-4939-0888-2\_13 (査読有)

[その他]

ホームページ等:

<http://www.igakuken.or.jp/genome/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉沢直子(須賀田直子)

(YOSHIZAWA-SUGATA, Naoko)

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・主任研究員

研究者番号: 30344071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし