

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650014

研究課題名(和文)クロマチンループ構造の人為的改変による核内構造の操作

研究課題名(英文)Regulating chromatin structures by manipulating chromatin loops

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・副所長

研究者番号：40229349

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)：本研究では、保存された核因子Rif1を用い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。

Rif1はG-richの共通保存配列に依存して形成されるG4構造に特異的に結合する。Rif1タンパク質はC端271aaでG4構造に結合し、C端近傍の保存配列がG4結合に必要である。この配列はRif1の多量体形成にも必要であった。分裂酵母でRif1を増産すると核内染色体構造の異常が誘導され、著しい増殖阻害が観察される。Rif1がhigh affinityで結合するG4形成配列を特定の部位に導入することによる染色体機能の変換を現在試みている。

研究成果の概要(英文)：We try to develop a novel method by which to manipulate chromatin loop structures by using a conserved nuclear protein, Rif1. Rif1 was shown to regulate DNA replication timing domains through facilitating formation of chromatin loops. Fission yeast Rif1 binds specifically to G-quadruplex (G4) structures through its C-terminal 271 aa segment and conserved amino acids near its C-terminus are required for both its DNA binding and oligomerization. Overexpression of Rif1 in fission yeast induced aberrant chromatin structures and growth inhibition. Growth inhibition did not require its PP1 binding but required DNA binding activity. Based on the target preference of Rif1 protein, we are now manipulating chromatin structures and activities by introducing high-affinity Rif1 target G4 sequences at specific locations on the chromosomes.

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

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は複製タイミングを制御する重要な因子として Rif1 を分裂酵母で同定した (Hayano et al. 2012)。Rif1 は動物細胞においても複製タイミングドメイン制御の鍵を握る因子であることも見出した (Yamazaki et al. 2012, 2013)。分裂酵母では、Rif1 欠損により telomere や arm 領域の後期複製領域が初期に複製するようになり、centromere 近傍の初期複製領域は逆に後期に複製するようになった。動物細胞において Rif1 は核膜近傍や核小体辺縁部に局在し、DNaseI 不溶性の核骨格様領域に存在する。Rif1 が発現しないと、S 期中/後期の複製パターンが完全に消失することから、Rif1 は中/後期の複製タイミングドメインの形成に参与する可能性がある。Rif1 を抑制するとクロマチンループの大きさが大きくなったことから、Rif1 は、核膜近傍においてクロマチンループの形成に参与し、それにより複製のタイミングドメインを規定すると想定された (図 1)。さらに、他のグループから Rif1 は、二重鎖 DNA 切断の修復に参与するという報告もされた。そこで、Rif1 を介してクロマチンループの改変により、複製、転写、組換え、修復など染色体機能を操作する方法を開発するという提案に至った。



図 1 ヒト Rif1 KD により複製タイミングドメインが大きく変化する。Rif1 は核骨格に局在し核膜近傍でクロマチンループのサイズを制御する (Rif1 ノックダウンによりクロマチンループサイズが増加する)。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の独自の発見「Rif1 はクロマチンループ構造の形成を介して複製タイミング機能ドメインを規定する」に基づき、Rif1 を用いてクロマチンループ構造の人為的改変を介して核内染色体構造を操作し、細胞の機能改変を誘導する新規技法を開発する。研究期間内に、Rif1 を用いて細胞内のクロマチンループ構造を改変する技術を開発し、これによりゲノム上の特定の部位に機能ドメインを形成し、ゲノムの転写や複製を操作する技術を開発する。具体的には、Rif1 あるいはその誘導体を細胞内で発現し、ゲノムワイドあるいはゲノム上の部位特異的なクロマチンループ形成を操作することにより、染色体構築を改変し、核機能の制御、改変することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Rif1、およびその欠失誘導体、変異体の増産と精製、生化学的解析：293T 細胞を用いて分裂酵母およびマウスの Rif1 を増産し、Flag 抗体カラム、ニッケルカラム、monoQ、ゲル

ろ過などにより精製する。Rif1 の欠失誘導体、変異体についても同様に精製する。精製されたタンパクのサイズ、形態をゲルろ過、glycerol gradient などを用いて解析する。また精製した Rif1 の形態を電子顕微鏡で直接観察する。

(2) Rif1 結合部位 DNA の解析：PEG200 および KCl の存在下で heat denature し polyacrylamide gel で解析する。

(3) Rif1 と DNA との相互作用の解析：精製した分裂酵母あるいはマウスの Rif1 タンパク質と種々の DNA (G4 構造を形成する 1 本鎖 DNA, 分裂酵母あるいはマウスゲノム上の Rif1 結合部位由来の二本鎖 DNA) を用いてゲルシフトアッセイ、nuclease footprinting assay、ビオチン化された DNA を用いた pull down assay などを行う。

(4) Rif1 増産による細胞増殖への影響の解析：pREP41 vector の nmt1 promoter の下流に Rif1 をクローニングし、培地から thiamine を除去することにより promoter を活性化し、Rif1 の増産が分裂酵母の増殖、細胞周期進行、染色体の構造、テロメアの構造などに与える影響を解析する。

(5) 動物細胞において Rif1 の種々の変異体の stable line を樹立する。Retrovirus vector に cloning して stable line を取得する。あるいは CRISPR/Cas9 システムを用いて AAVS1 部位に特異的に transgene を組み込む。そして内在性の Rif1 遺伝子を knock down することにより Rif1 変異体の機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 当初の研究計画

Rif1 発現レベルの変動によるクロマチンループサイズの操作とその生物学的影響について-1。(a)不死化した Rif1(-/flox)MEF 細胞 (樹立済み)を用いて Rif1 の種々の欠失体を retrovirus で発現する。Adeno-Cre 感染により Rif1(-/-)にした時に、表現型を相補する最小の欠失体を選択する。(b)全長 Rif1 或は同定された最小 Rif1 を種々の promoter 下で Rif1(-/flox)MEF 株の rosa26、或はヒト正常細胞の AAVS1 挿入 locus で発現する細胞株を樹立する。

Rif1 タンパク質の機能ドメインの決定。ヒト Rif1 は 2472 アミノ酸からなる巨大タンパク質である。二量体化に必要なドメイン、IDP (Intrinsically Disordered Polypeptide) の機能、N 端領域の機能等を精製タンパク質を用いた生化学アッセイと Rif1 変異 MEF 株を用いて解明する。(a)種々の変異 Rif1 タンパク質の発現と精製 (最近申請者が開発した 293T 細胞を用いた高効率発現精製システムを用いる)。DNA 結合、ヒストン結合、二量体形成能などの測定を行いそれぞれに必要なドメイン

を決定する。

Rif1 を用いた部位特異的なクロマチンループの形成。Rif1 は二量体を形成し、二つのクロマチン領域をリンクしクロマチンループを形成すると考えられる。Rif1 は C 端領域に核膜への局在配列と DNA 結合ドメインを有する。ここで決定した DNA 結合ドメインを Gal4 結合ドメインに置換し、特定のゲノム領域に tether (連結) する。(a) 不死化 Rif1(-/flox)MEF 細胞株のゲノム上の少なくとも二カ所に Gal4 結合配列を挿入し、上記 Rif1-Gal4DNA 結合ドメイン融合タンパク質を発現する。その結果これらの配列に結合した Rif1 がクロマチンループを形成するか調べる。

Rif1 発現レベルの変動によるクロマチンループサイズの操作とその生物学的影響について-2。(a) 樹立した Rif1 全長あるいは部分領域安定発現細胞株を用いてクロマチンループサイズ、複製タイミング、遺伝子発現プロファイル等を測定し比較する。

Rif1 タンパク質の機能ドメインの決定。(a) 精製した、Rif1 の全長または機能ドメインタンパク質を用いて Rif1 分子の形態を DNA 存在下、非存在下で高速原子間力顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察し、クロマチンループ形成能を試験管内で検討する。(b) 変異 Rif1 を Retrovirus vector 上にクローニングし、不死化 Rif1(-/flox)MEF 細胞株で安定に発現する細胞株を樹立する。

Rif1 を用いた部位特異的なクロマチンループの形成。(a) Rif1 を特異的部位に連結した細胞株において、形成されたクロマチンループの内側及び外側の複製タイミングが変動するかどうかを調べる。(b) 形成されるループの内側または外側に GFP 発現ユニットを挿入し、ループ形成が遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。

(2) 得られた結果

ChIP-seq により Rif1 結合部位を分裂酵母およびマウス ES 細胞で決定した。分裂酵母の結合部位の配列解析から G の連続配列をふくむ保存配列が見出され(図 2)、細胞内で Rif1 はこの保存配列に依存して染色体に結合する(図 3)。この G の連続配列に依存して結合部位の DNA は G4 構造を形成すること(図 4)、Rif1 は形成された G4 構造に特異的に結合すること(図 5)を見出した。マウス Rif1 の結合配列にも G-rich な配列が見出され、この配列は実際に G4 構造を形成することを示した。これらの結果から Rif1 による複製タイミングを規定するクロマチンドメイン形成のメカニズムについてモデルを提示した(図 6)。

精製した Rif1 タンパク質は、多量体(マウス Rif1 は 8 量体及び 12 量体、分裂酵母 Rif1 は 4 量体および 8 量体)を形成し、同時に多数の DNA 分子と結合できる。また精製したマウス Rif1 を電子顕微鏡で観察したが、分子内に含まれる IDP(天然変性ポリペプチド)領域

のためか、多様な形態が観察された。現在 DNA と Rif1 の複合体の電子顕微鏡による観察を進めている。

分裂酵母 Rif1 の C 端 271aa を動物細胞で発現精製した。このポリペプチドは G4 構造に結合できる。C 末端近くの保存された 7aa をアラニン置換した変異体は、DNA 結合および多量体化の能力を喪失していた。動物細胞 Rif1 タンパク質の解析から、C 端に加えて N 端の HEAT repeat 領域も DNA 結合能を有することが明らかになった。High affinity の G4 結合には両者の存在が必要であることを見出した(図 7)。

Rif1-Gal4DNA 結合ドメイン融合タンパク質を作製し、これをゲノム上の特異的な部位に結合させようと試みた。しかしこの融合タンパク質は不安定で細胞内で十分量発現することができなかった。

Rif1 タンパク質の増産の影響(図 8): 分裂酵母細胞内で Rif1 タンパク質を増産すると強い増殖阻害、異常な染色体構造が観察された。動物細胞においても Rif1 を構成的に増産すると toxic で、安定な発現株は樹立できなかった。そこで現在 tet 誘導 promoter の下流に cloning して、dox 添加により誘導的に発現誘導できる株の樹立を CRISPR-Cas9 システムを用いて進めている(AAVS1 サイトに transgene を導入)。

ヒト Rif1 の分子内の IDP 領域に GFP を挿入したタンパク質を解析した結果、G1 初期に ER に局在し、きわめて特徴的な細胞内動態をしめした。IDP の欠損により NLS が失われたために NLS を再導入することにより核内、特に核膜近傍への局在が観察された。ER あるいは核膜への局在は C 末領域に依存する。

Rif1CS : Rif1 binding consensus sequence

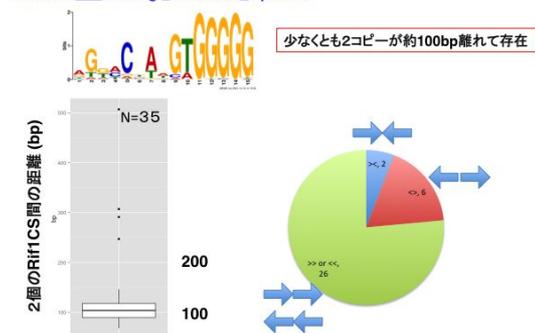


図 2 分裂酵母ゲノム上の Rif1 結合配列の解析から共通保存配列(Rif1CS)を発見した。2 コピーが順列に並んで存在する場合が多い。

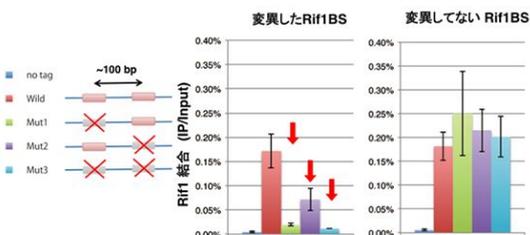
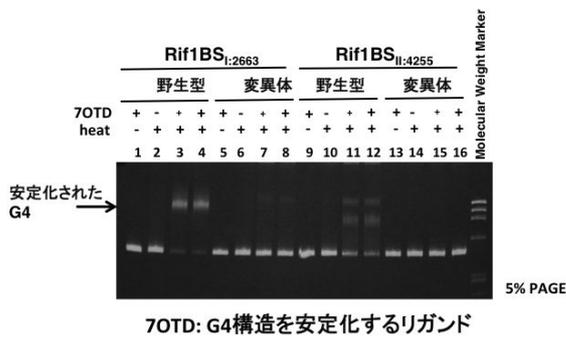


図 3 Rif1CS は Rif1 のクロマチン結合に必須である。



7OTD: G4構造を安定化するリガンド

図4 Rif1BSは熱変性により特殊な構造をとり、それはG4リガンドにより安定化される。

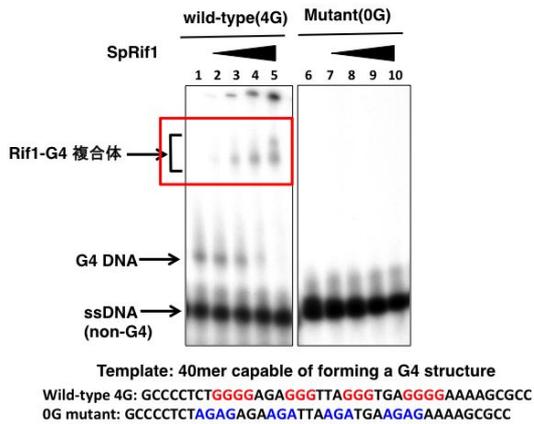


図5 精製した分裂酵母 Rif1 タンパク質は G4 構造に特異的に結合する

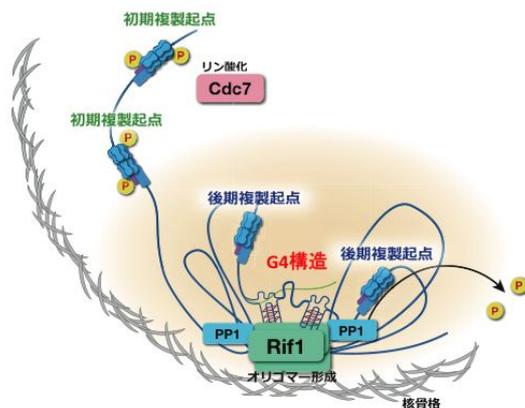


図6 Rif1 タンパク質による複製タイミングドメインの形成機構。Rif1は遺伝子間領域に存在するG4構造に結合し、クロマチンを束ねるとともに、核膜近傍に後期複製タイミングドメインを形成する

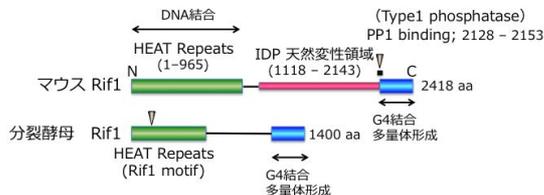


図7 Rif1 タンパク質の構造と機能

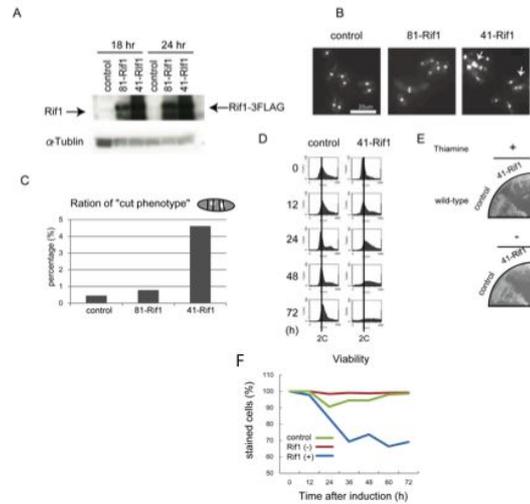


図8 Rif1の増産は増殖阻害および細胞死を引き起こす(D,E,F)。また増産により染色体の分断(B)、prematureな細胞分裂によるcut細胞が出現する(C)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計26件)

1. Chi-Chun Yang, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Ai Ishii, Satoshi Yamazaki, Rino Fukatsu, Ryo Fujisawa, Kenji Sakimura, Toshiki Tsurimoto, *Hisao Masai (2016) Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nature Communications* accepted for publication 査読有

2. Zhiying You, Koji L. Ode, Haruhiko Takisawa, and *Hisao Masai (2016) Characterization of conserved arginine residues on Cdt1 that affect licensing activity and interaction with Geminin or Mcm complex. *Cell Cycle* 15,1213-1226 doi: 10.1080/15384101.2015.1106652. 査読有

3. Tanaka T, Nishito Y, *Masai H. (2016) Fork restart protein, PriA, binds around oriC after depletion of nucleotide precursors: Replication fork arrest near the replication origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 546-551 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.108. 査読有

4. Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Nobuaki Kono, Claire Renard-Guillet, Koji Masuda, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Katsuhiko Shirahige, and *Hisao Masai (2015) Rif1 binds to G-quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22,889-897 doi: 10.1038/nsmb.3102. 査読有

5. Koiwai K, Kubota T, Watanabe N, Hori K, Koiwai O, and *Masai H. (2015) Definition of the transcription factor TdIF1 consensus-binding sequence through genomewide mapping of its binding sites. *Genes Cells* 20,242-254 doi: 10.1111/gtc.12216. 査読有

6. Bellelli R, Castellone MD, Guida T, Limongello R, Dathan NA, Merolla F, Cirafici AM, Affuso A, Masai H, Costanzo V, Grieco D, Fusco A, Santoro M, and *Carlomagno F. (2014) NCOA4 transcriptional coactivator inhibits activation of DNA replication origins. *Mol Cell* 55, 123-137 doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.031. 査読有

7. Renard-Guillet C, Kanoh Y, Shirahige K, *Masai H. (2014) Temporal and spatial regulation of eukaryotic DNA replication: from regulated initiation to genome-scale timing program. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 30, 110-120 doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.014. 査読有

8. Matsumoto S, *Masai H. (2013) Regulation of chromosome dynamics by Hsk1/Cdc7 kinase. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1712-1719 doi: 10.1042/BST20130217. 査読有

9. *Masai H. (2013) A personal reflection on the replicon theory: from R1 plasmid to replication timing regulation in human cells. *J. Mol. Biol.* 425, 4663-4672 doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.039. 査読有

10. Yamada M, Watanabe K, Mistrik M, Vesela E, Protivankova I, Mailand N, Lee M, Masai H, Lukas J, and *Bartek J. (2013) ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev.* 27, 2459-2472 doi: 10.1101/gad.224568.113. 査読有

11. You Z, De Falco M, Kamada K, Pisani FM, and *Masai H. (2013) The mini-chromosome maintenance (Mcm) complexes interact with DNA polymerase α -primase and stimulate its ability to synthesize RNA primers. *PLoS One* 8, e72408 doi: 10.1371/journal.pone.0072408. 査読有

12. Yamazaki S, Hayano M, and *Masai H. (2013) Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing *Trends Genet.* 16, 263-265 doi: 10.1016/j.tig.2013.05.001. 査読有

[学会発表](計58件)

1. 正井 久雄 "Interaction with G-quadruplex structures forms a basis for Rif1-mediated regulation of DNA replication, transcription and chromatin architecture" BMB2015 2015年12月1-4日 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)

2. Hisao Masai "Roles of G-quadruplex

structures in regulation of DNA replication. "Cold Spring Harbor Meeting EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE 2015年9月1-5日 Cold Spring Harbor, New York (USA)

3. Hisao Masai "Interaction of Rif1 and G-quadruplex forms a basis of Rif1-mediated chromatin regulation." The 8th international fission yeast meeting (Pombe2015) 2015年6月21-25日 生田神社会館 (兵庫県 神戸市)

4. 正井 久雄 "ゲノムからミトコンドリアへ" 医療のパラダイムシフト ~ 情報革命とバイオメディカル革命のシステム融合 ~ 2015年3月26日 かながわサイエンスパーク (神奈川県 川崎市)

5. Hisao Masai "Regulation of DNA replication program in fission yeast and human cells" 9th 3R meeting 2014年11月17-20日 御殿場高原リゾート時之栖(静岡県 御殿場市)

6. Hisao Masai "Regulation of mammalian Mcm helicase complexes" 第87回日本生化学会大会シンポジウム 2014年10月15-18日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)

7. 正井 久雄 "染色体 DNA 複製プログラムの制御機構" 大阪大学蛋白質研究所セミナー「染色体伝承の分子背景：複製から染色体分離まで」 2014年9月25-26日 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府 吹田市)

8. 正井 久雄 "染色体 DNA 複製プログラムの制御機構と起源・進化" The 2nd Symposium of Cell Cycle Control and Cell Fate 2014年2月13-14日 浜松医科大学 (静岡県 浜松市)

9. 正井 久雄 "イントロダクション" 第36回 (2013年) 日本分子生物学会年会, ワークショップ『レプリコン仮説50周年: 染色体複製装置の形成とその活性の時空間制御』オーガナイザー 2013年12月3-6日 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)

10. Hisao Masai "Rif1: a potential global regulator of DNA replication, DNA repair, and recombination." 第36回 (2013年) 日本分子生物学会年会, ワークショップ『DNA二重鎖切断の end-resection と修復機構の選択・制御』 2013年12月3-6日 神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)

11. Hisao Masai "Introduction" Symposium, 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society 2013年9月11-13日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

12. Hisao Masai "Chromatin architecture that

regulates replication timing of eukaryotic chromosomes." 第 86 回日本生化学会大会事務局 インターナショナルセッション 『 Assembly and architecture of protein complexes regulating inheritance and stable maintenance of genome』 2013 年 9 月 11-13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

13. Hisao Masai "Control of origin firing timing in fission yeast cells" EMBO Conference "Pombe 2013 7th International Fission Yeast Meeting" 2013 年 6 月 24-29 日 London (UK)

14. Hisao Masai "A personal reflection on the Replicon Theory: from R1 plasmid to replication timing regulation in human cells" Symposium "Half a Century With Replicon Theory for Genome Stability and Instability" (The 50th anniversary of the replicon theory) 2013 年 3 月 25-28 日 Paris (France)

15. Hisao Masai "Cell cycle and chromatin regulators in stem cell regulation" The Gene and Immunotherapy conference 2013 年 3 月 21-22 日 Ho chi Min City (Vietnam)

〔図書〕(計 1 件)

1. 加納 豊、松本 清治、正井 久雄 (2016) Rif1 はグアニン 4 重鎖構造を介して染色体に結合し、広範囲に複製を抑制する 羊土社 実験医学 34 巻-no.3, 458-461.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 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・副所長
研究者番号: 40229349