

令和 3 年 6 月 22 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：18K06072

研究課題名(和文)細胞内でのグアニン4重鎖構造形成の証明とその形成メカニズムの解析

研究課題名(英文)The detection and formation mechanism of guanine quadruplex DNA structure in the cell

研究代表者

加納 豊 (KANO, Yutaka)

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：90450593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNAは4塩基からなる配列により構成される情報体だが、生命情報を維持するために多くの染色体制御がなされており、適切なタイミングと強度で調整されなければならない。既知の染色体制御機構に加え、グアニン4重鎖(G4)DNAを含む非B型DNA構造が転写の抑制・DNA複製の活性化・テロメア制御等に関与していることも判明してきた。in vitroでのG4DNAの解析が進んでいるが、細胞内でのG4DNAによる染色体制御の解明は学術的に重要である。本研究では細胞内での解析を進める上でのG4DNAの新たな検出方法の確立等の成果を上げた。さらにG4DNAの染色体上でのオープンヌクレオソームである特徴を突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで染色体制御は、DNAの1次配列・ヒストン修飾・DNA修飾等による研究が行われてきた。近年これに加えG4DNAをはじめとした非B型DNA構造が染色体の制御に関与していることが判明してきている。しかし、非B型DNA構造の研究は試験管内の再構築がメインに行われてきたため、細胞内でどのような事象に関与しているか、未だ不明な面が多い。そこで我々が確立した方法等を用いることにより非B型DNA構造の機能的な解明が進めば、より生命現象の理解に寄与できる。ひいては染色体の正常化維持の理解につながり、癌研究やその治療などへの社会に貢献できる意義がある。

研究成果の概要(英文)：DNA is an information device composed of four nucleotides. Many chromosome regulations are regulated to maintain biological information and must be adjusted at the appropriate timing and intensity. In addition to the known chromosome regulation mechanisms, Guanine Quadruplex (G4) DNA included in non-B-type DNA structures have been found to be involved in repression of transcription, activation of DNA replication, telomere regulation, etc. Although in vitro analysis of G4 DNA is improving well, the elucidation of chromosome regulation by G4DNA in the cell is important academically. In this study, we have established a new detection method of G4DNA for intracellular analysis. In addition, we identified the feature of G4DNA on the chromosome is an open nucleosome.

研究分野：分子細胞生物学分野

キーワード：グアニン4重鎖DNA 非B型DNA 研究法開発 染色体機能

### 1. 研究開始当初の背景

DNA は4塩基からなる配列によって構成される情報体だが、生命情報を維持するために、その情報を書き出し(転写)、間違いなく正確に複製し、破損すればできる限り元の状態に修復しなければならない。そのON/OFFの制御は適切なタイミングで適切な強度で行うことで、調整されている。それらの機能は、ヒストンの修飾などによるエピジェネティクスと呼ばれる配列には依存しない制御等で行なわれている。近年、これらに加えてグアニン4重鎖DNA(G-quadruplex DNA, G4DNA, 図1A)を含む非B型DNA構造が、転写の抑制、DNA複製の活性化、テロメア制御等に関与していることが報告され始めている(図1B)。研究代表者はDNA複製の抑制因子であるRif1の結合配列から、Rif1がG4DNA構造に結合することを見出した(参考文献1)。このように、G4DNAが染色体の新たな制御シグナルとして注目を集め始めている。しかし、*in vitro*でのG4DNAの解析が進む一方で、G4DNAが実際に染色体上に存在しているかどうかを疑問視する研究者も存在するため、細胞内でのG4DNAの存在の有無の検証はG4による染色体制御の解明にとって学術的に重要である。本研究では、G4DNAは本当に細胞内に存在するのか?存在するのなら、そのゲノム上、細胞内の局在、動態は?さらに、その形成過程にどのような因子が関与するのか?という問いが主要な研究背景にある。

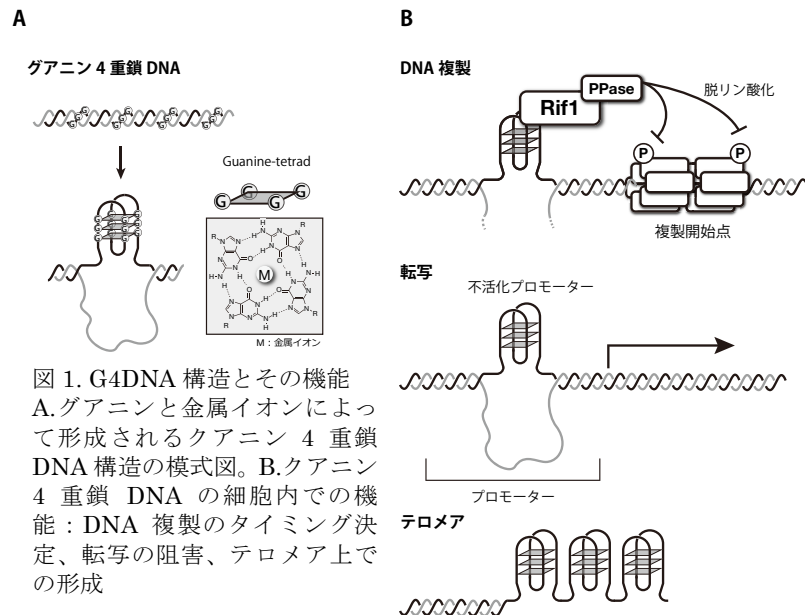


図1. G4DNA構造とその機能  
A.グアニンと金属イオンによって形成されるグアニン4重鎖DNA構造の模式図。B.グアニン4重鎖DNAの細胞内での機能: DNA複製のタイミング決定、転写の阻害、テロメア上での形成

### 2. 研究の目的

細胞内でのグアニン4重鎖構造形成の証明とその形成メカニズムの解明は、染色体制御機構の新たな側面を理解する上での基盤となり学術的重要性と独自性は高い。そこで本申請研究は以下の項目の達成を目的としていた。

- (1) 新規のG4DNAの検出方法の確立
- (2) 染色体上でのG4DNAの形成メカニズムの解明
- (3) 染色体上でのG4DNAなどのゲノムプロファイル・動態の解明

### 3. 研究の方法

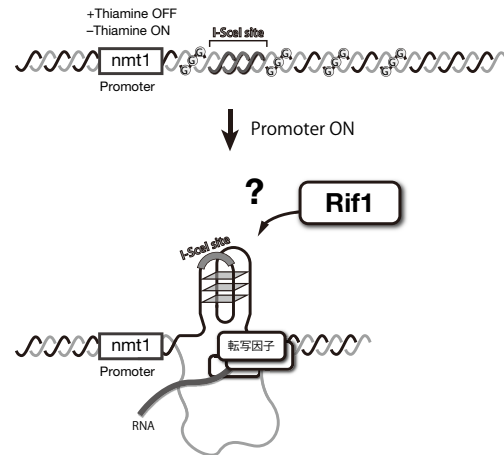
(1) G4DNAのループへのI-SceI配列挿入による構造の有無の検出法の確立  
G4DNA配列のループ構造に着目し、まずは人為的にI-SceI認識切断配列を挿入し、G4DNA-I-SceIのI-SceIでの切断の有無を検出する。一方でこの配列を細胞内(分裂酵母)に挿入した時、細胞内で発現させたI-SceIでのG4DNAの切断を損傷DNAに認識するRad52-GFPで検出する。またG4DNAを解消する因子の変異株等で変化するか測定する。

## (2) 染色体上での G4DNA の形成メカニズムの解明

I で確立した方法を用いて分裂酵母の DNA ヘリケースの変異株等を用いて、G4DNA の形成効率やその解除に変化があるかを検証する。

## (3) 転写による染色体上での G4 構造の人工的形成と Rif1 結合解析

G4DNA のような構造は、通常安定な 2 本鎖の DNA から自然に形成されないと考えられる。その形成は、2 本鎖 DNA の DNA 複製、転写による巻き戻しや、ゆがみ、トポロジーなどに関連している可能性が考えられる。分裂酵母で転写の ON/OFF 制御可能なプロモーターに Rif1 の結合配列を挿入する。培地より Thiamine を除去することにより転写誘導し Rif1 の ChIP-qPCR など で検証する(図 2)。



## (4) スクレオソームと G4 DNA-Rif1 相互作用との関連についての解析

スクレオソームの配置は染色体の機能を制御する上で、様々な役割を果たしている。Rif1 の結合領域とスクレオソーム配置を比較したところ、殆どの Rif1 結合サイトがオープンスクレオソーム構造であることが判明している。このオープンスクレオソームの領域が Rif1 の結合によるものなのか、もしくは G4DNA 構造形成によるものなのか、Rif1 の欠損株もしくは G4 形成配列変異株において、スクレオソームの存在を検証する。これにより、オープンスクレオソーム形成が G4 構造依存的かどうか検討する。

図 2. 転写による G4DNA 構造の形成  
分裂酵母の Thiamine で制御可能なプロモーターに I-SceI 認識配列を含む Rif1 の結合配列を挿入。転写 ON/OFF により G4DNA が構築されたかを Rif1 の ChIP と I-SceI の切断により確認する。

## 4. 研究成果

### (1) G4DNA のループへの I-SceI 配列挿入による構造の有無の検出法の確立

18bp の I-SceI 切断配列を Rif1 が結合する G4DNA のループに挿入し、in vitro で G4DNA を形成させ切断を試みたところ、通常の二重らせん構造の DNA は切断されたが、G4DNA 構造を形成させた DNA は I-SceI に抵抗を示した。次に、この I-SceI 切断配列を Rif1 の結合配列に導入した。I-SceI 切断配列を挿入によって G4DNA の機能が失われているか検証するため Rif1 の ChIP を行った。Rif1 の結合が見られたため機能は保全されていることが判明した。一方で、コントロールとして、G4DNA を形成できないようにグアニン連続配列に変異を入れた株も作成した。これらの細胞で I-SceI の発現を誘導したところ、DNA の損傷を認識する Rad52-GFP の集積が、G4DNA を形成できる株に比べ、G4DNA を形成できない株で Rad52-GFP の集積が促進された。また、I-SceI による DNA の切断面へ結合できる Adaptor Oligo を融合させ定量 LM-PCR による切断効率の測定でも同様の結果が得られた。以上を参考文献 2 に報告した。

## (2) 染色体上での G4DNA の形成メカニズムの解明

幾つかの変異株(Sen1, Rnh1 等)で G4DNA の形成効率が落ちるかどうかが検証したが、現在のところ影響を与える因子は特定できていない。

### (3) 転写による染色体上での G4 構造の人工的形成と Rif1 結合・複製制御解析

Thimaine の有無で転写の ON/OFF 制御されている nmt1 プロモーター下流に G4DNA 構造を取りうる Rif1 結合配列を挿入し転写誘導的に Rif1 が結合するか ChIP で検証したところ、予想外にプロモーターの有無、転写の有無にかかわらず、Rif1 の結合が検出された。これは G4DNA の形成には DNA 複製および転写以外の機構が存在する可能性を示す結果であった。

### (4) スクレオソームと G4 DNA-Rif1 相互作用との関連についての解析

分裂酵母において Rif1 の結合配列はほぼ全て、オープンスクレオソームであることがデータベースで判明している。そこでこのオープンスクレオソームが G4DNA 依存的であるか Rif1 依存的であるかを Rif1 欠損株や G4DNA 配列変異株(それぞれ 2 箇所の Rif1 結合 G4DNA 配列へ変異導入)で検証した。

細胞核を MNase で処理し DNA をスクレオソーム単位に切断した。スクレオソーム単位で Primer をデザインし、MNase 処理 DNA で定量 PCR を行った。その結果、Rif1 欠損株ではオープンスクレオソームが維持されたが、それぞれ 2 箇所の G4DNA 形成配列変異株では、スクレオソームの再配置が行われた。このことは Rif1 結合サイトのオープンスクレオソームは Rif1 に依存せず G4DNA に依存して形成されていることを示している。これは、G4DNA が染色体上のどこに形成されているかを予想する指標を得ることに成功した。

### 参考文献

1. Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., Renard-Guillet, C., Masuda, K., Iida, K., Nagasawa, K., Shirahige, K., et al. (2015). Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nature structural & molecular biology* 22, 889-897.
2. Masai, H., Kanoh, Y., Kakusho, N., Fukatsu, R. (2020). Detection of cellular G-quadruplex by using a loop structure as a structural determinant. *Biochem. Biophys.* 531, 75-83

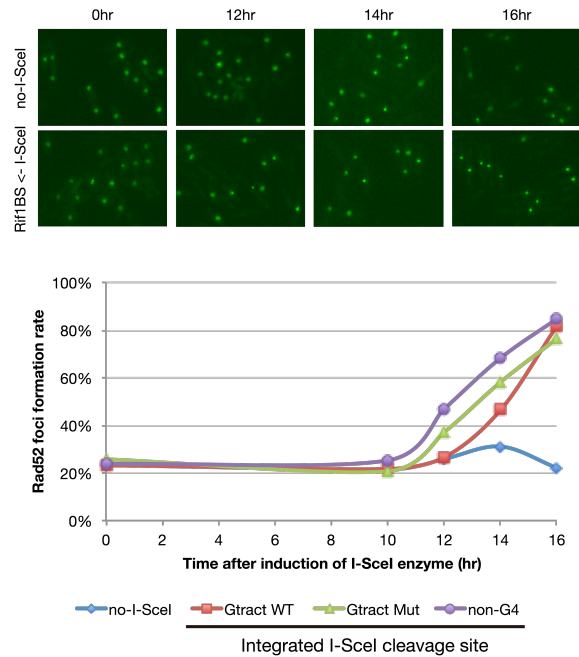


図 3. 細胞内での G4DNA の切断  
分裂酵母に G4DNA 配列のループ領域に I-SceI 切断配列を挿入(Gtract WT)、また Gtract へ変異を導入した株の作成をした。pREP41-I-SceI プラスミドにより誘導的に I-SceI を発現させ、DNA の切断を Rad52-GFP の集積率を測定した。

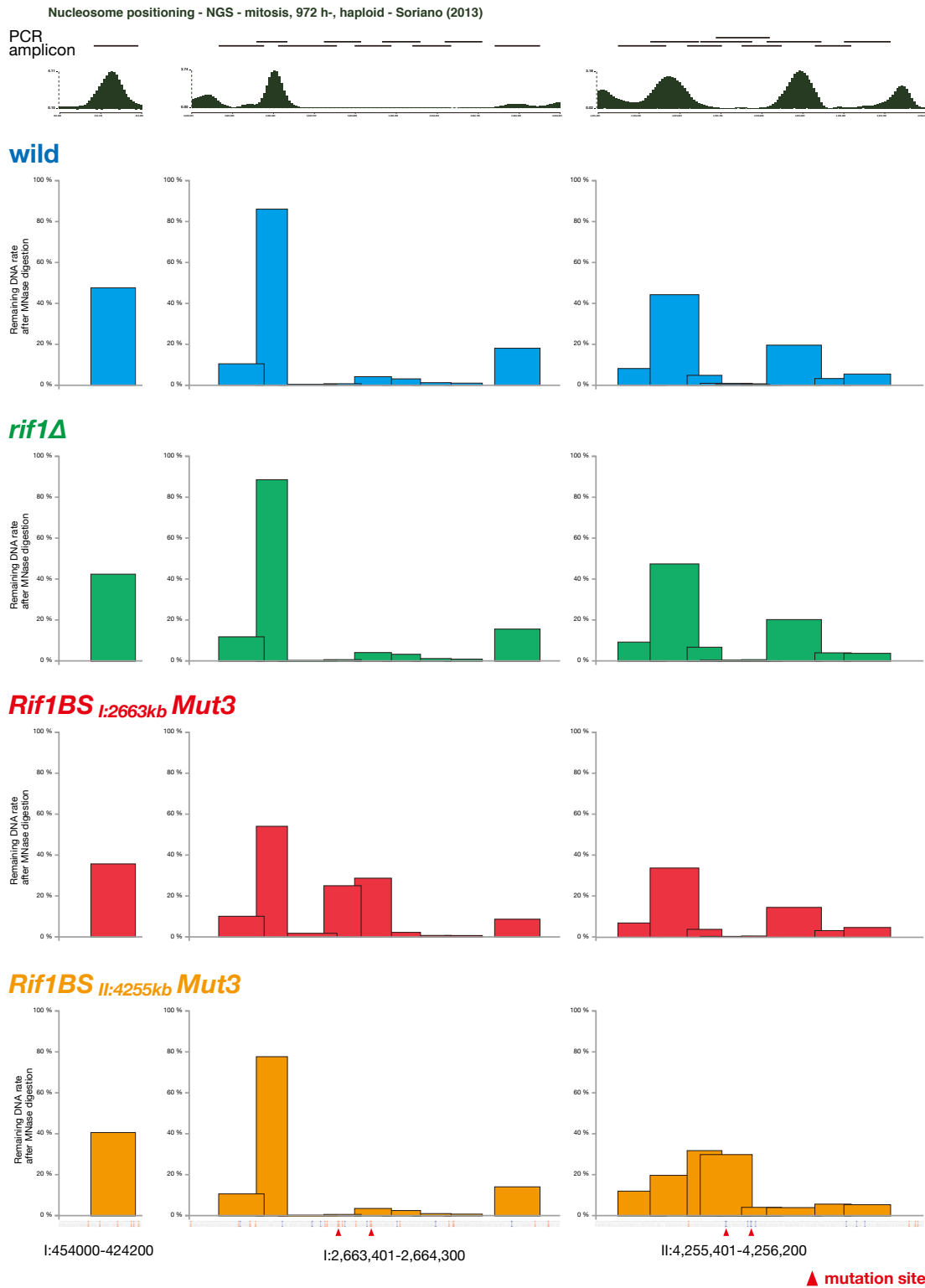


図 4. G4DNA によるオープンヌクレオソームの形成

図に示された分裂酵母株を MNase で処理しヌクレオソーム単位まで DNA を切断。その後切断されずに残った DNA を G4DNA 形成領域にタンデムに設計された Primer Sets を用いて定量 PCR により定量した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1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 -
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 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 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00364-18
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masai Hisao, Kakusho Naoko, Fukatsu Rino, Ma Yue, Iida Keisuke, Kanoh Yutaka, Nagasawa Kazuo	4. 巻 293
2. 論文標題 Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1-binding sequences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17033 ~ 17049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加納 豊・松本 清治・高沢 佳芳・小林 駿介・関口 直樹・深津 理乃・覚正 直子・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 MBSJ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Kanoh, Shunsuke Kobayashi, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Seiji Matsumoto, Kaho Takasawa, Hisao Masai
2. 発表標題 Genetic analysis of Rif1 protein and G-quadruplexes in the fission yeast
3. 学会等名 EMBO Workshop on Fission Yeast 10th International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納 豊・松本 清治・関口直樹・深津 理乃・覚正 直子・正井久雄
2. 発表標題 DNA複製を制御するグアニン4重鎖構造の細胞内存在と形成のメカニズムの解明
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 Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Hisao Masai
2. 発表標題 Fission yeast Rif1 functional analysis in DNA replication
3. 学会等名 3R-3C (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納 豊・松本 清治・上野 勝・正井 久雄
2. 発表標題 Rif1 の過剰発現は M 期への進行を阻害することにより分裂酵母の増殖を阻害し細胞死を誘導する
3. 学会等名 第 4 3 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〕

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 ゲノム動態プロジェクト ホームページ  
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/genome.html>

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