

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840081

研究課題名(和文)哺乳類Rif1タンパクによる複製タイミングドメイン制御機構の解析

研究課題名(英文)Global regulation of DNA replication, transcription and DNA repair by Rif1 protein

研究代表者

山崎 聡志(YAMAZAKI, Satoshi)

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・研究員

研究者番号：30648548

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)：Rif1はDNAの複製時期を制御する因子である。染色体構造維持に関するコヒーシン複合体やラミン等の発現抑制はDNA複製タイミングに影響を与えなかった。Rif1は非相同末端連結に関与することが知られているがRif1 KO B細胞ではクラススイッチ組換え反応に異常を示した。更に、Rif1 KO細胞の転写プロファイルの解析を行い、Rif1が遺伝子クラスターを含む領域の転写活性を包括的に制御している事を見いだした。Rif1は核膜にアンカーすると共に、C端領域を介して多量体を形成している事が示唆された。Rif1はクロマチン構造の制御を介してDNA複製、転写ドメインを協調的に制御しているかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Rif1 is a regulator of replication timing which regulates chromatin loop sizes by binding to nuclear insoluble structures. Depleted of Rif1, but not that of other chromatin factors including cohesion subunits or LaminB1, results in major changes of replication domains in HeLa cells, suggesting that Rif1 is rather unique in its ability to affect genome-wide replication timing. We have analyzed functions of Rif1 using conditional KO mice and cells. Consistent with previous reports in B cells, IgG1 production by class switch recombination is reduced by Rif1 deficiency. We also found a ~1Mb genome segment containing a gene cluster whose transcription is coordinately suppressed by Rif1. This result is consistent with a possibility that Rif1 regulates replication and transcription as well as other chromosome transactions through generation of functional chromatin domains.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA replication timing Rif1 transcription

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上では、転写やクロマチン制御、核内配置の構造制御など様々なイベントが同調的に行われている。そのため、ゲノムの複製開始の活性化は、時間的、空間的な制御が必要とされている。ゲノムの複製はメガベース単位(タイミングドメイン)で複製起点が活性化し進行することが分かっている。これらのドメイン構造は未分化細胞から分化が進行するにしたがって変動することが明らかとなっている。更に Hi-C データとの比較から複製タイミングのプロファイルはゲノムの核内配置のプロファイルと相関関係にあることも示されている。我々はこの複製タイミングを制御する因子として、初めてヒト Rif1 を報告した。Rif1 欠損により巨大なタイミングドメイン(100kb - 1Mb)が著しく変動する。更に、中期複製 foci パターンが消失して、クロマチンループサイズも増加する。Rif1 は DNase I 耐性の核骨格に強く結合している事から、染色体核内構造の制御を介して、複製タイミングドメインを決定していると考えられる。しかしながら、Rif1 制御領域の特性あるいは制御機構については未だ不明な点が多く、各臓器における機能についても報告がない。また、現在まで DNA 複製タイミングドメインを規定する因子は Rif1 以外報告されていないことから、他に複製タイミングドメイン制御因子が存在するか探索を行う必要がある。本研究では、Rif1 を中心としたゲノム制御機構の解明を通して、細胞の運命決定を決めるメカニズムの一端の解明を目指す。

2. 研究の目的

(1)DNA 複製タイミングの制御機構の解明

Rif1 欠損による複製タイミングドメインの変動は、染色体の核内構造の変化に依存している可能性が考えられる。よって染色体の配置転換による影響を詳細に解析する。また、タイミングプロファイルより Rif1 依存、非依存的領域が存在するため、Rif1 制御下のゲノム領域にどのような特徴があるのか明らかにする。更に Rif1 以外のタイミングドメイン制御因子を同定することで、支配区域の境界を明確にする。

(2)Rif1 コンディショナル KO マウスを用いた臓器特異的な Rif1 の機能解析

Rif1 KO マウスは発生初期の異常により胎生致死を示す。そのため、Rif1 の各臓器での機能については未知である。Rif1 コンディショナル KO マウスを作製して生体内の Rif1 の役割について調べることで新規機能の発見を目指す。

3. 研究の方法

(1) DNA 複製タイミングのプロファイル解析

HeLa 細胞に BrdU (ハロゲン化ウリジン) 処理を行い複製時にゲノムに取り込まれた BrdU を回収する。その後、次世代シーケンサーにより解析を行い、DNA 複製タイミングのプロファイルを解析する。

(2) Rif1 コンディショナル KO マウスによる解析

マウス作製にあたり、ロックフェラー大学 De Lange 博士らが作製した Rif1 flox マウスを使用する。各臓器特異的に Cre recombinase が発現するマウスと交配させることで、条件的 Rif1 欠損マウスを作製する。主に脳特異的、血球特異的に Rif1 欠損を誘導し、その後の変化を行動学、病理組織学あるいは免疫学的な見地から解析を進める。同時に複製タイミングの生物学的意義についても詳細な情報を獲得する。

(3) Rif1 KO 細胞の樹立

マウス胎児線維芽 (MEF) 細胞や Rif1 KO 血球細胞を単離することで、*in vitro* 培養系による解析を行う。

(4) FISH 解析による核内配置の変動解析

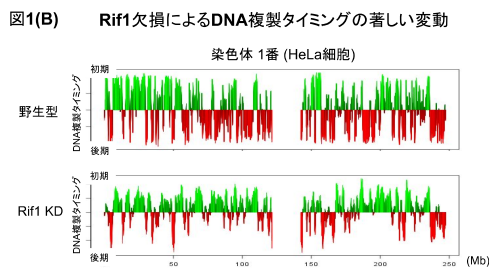
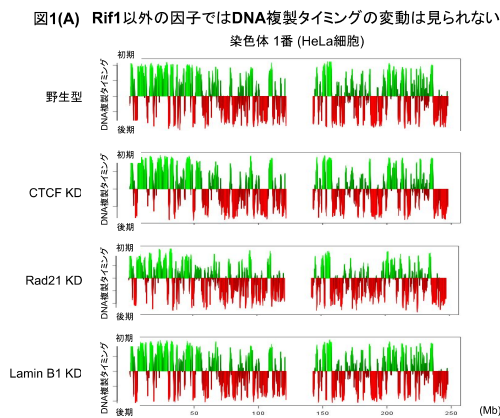
X 染色体に対して複数の FISH プローブを作製する。雌由来の細胞における核内の活性化、不活性化 X 染色体の構造を解析する。

4. 研究成果

(1) DNA 複製タイミングを制御する因子の探索

染色体核内配置の維持に寄与する因子として、核骨格を形成する Lamin B やコヒーシ複合体等が上げられる。これらの因子が複製タイミングのプロファイルを制御している可能性、及び Rif1 制御領域との相関性について解析を行った。HeLa 細胞を使用して、各遺伝子を siRNA 法で発現抑制させた細胞に BrdU 処理を行い、次世代シーケンサーにて DNA 複製タイミングのプロファイルを観察した。結果、下記で示したように、野生型と比較して Lamin B、CTCF、Rad21 発現抑制細胞のプロファイルに著しい変化は観察されなかった(図 1A)。ただし、非常に小さいドメインの変化は観察されている。この変化と発現抑制した因子との機能的相互関係について解析する必要がある。一方、Rif1 発現抑制では、S 期後期ドメインが S 期初期ドメインへ大きく変動する領域が複数観察された(図

1 B)。以上の結果を鑑みると、Rif1 欠損による複製タイミングドメインの変化は核内配置の変動だけに依存するものではないと考えられる。

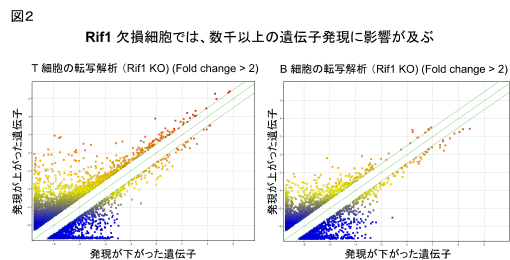


(2) Rif1 コンディショナル KO マウス解析

脳発生における Rif1 の機能解析
条件的に Rif1 を神経幹細胞で欠損させたマウスを作製し、ロータロッドテスト、自発的交替行動実験など運動機能解析を行った。Rif1 欠損マウスの体重および神経分化に著しい変化は観察されず、野生型マウスと有意な差は確認されなかった。

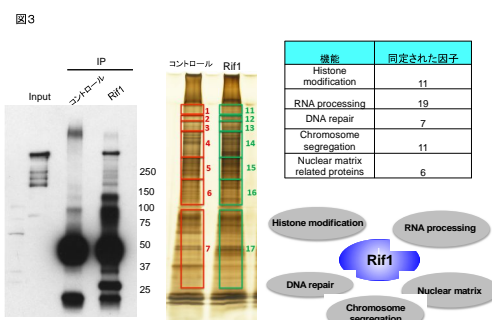
血球系における Rif1 の機能解析
造血幹細胞で Rif1 欠損を誘導したマウスの B 細胞で、クラススイッチ組換え反応 (CSR) の異常が見られた。この事実は、2013 年に報告された結果と合致する。また MEF 細胞では Rif1 欠損を誘導すると 3-4 日後に細胞増殖の減少が観察されるが、血球細胞 (B 細胞、T 細胞) では細胞増殖について大きな変化は観察されなかった。Rif1 発現抑制 HeLa 細胞の結果から Rif1 欠損の核内では染色体配置が変動している事が考えられる。これに応じて、X 染色体の凝集頻度にも影響が出る可能性が示唆された。よって、雌由来 T 細胞内の活性化型、不活性化型 X 染色体の核内配置を FISH プロブにて観察した。不活性化型は活性化型と比較して凝集傾向を示す。Rif1 欠損細胞を解析した結果、野生型と同様に不活性化型 X 染色体は凝集傾向にあった。よって、Rif1 は

染色体全体を包括的に制御するのではなく、特定の領域に機能していると考えられる。一方、B 細胞、T 細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにて解析を行った結果、Rif1 欠損により数千もの遺伝子発現に変動が生じていた。更に、1Mb に渡る巨大な遺伝子クラスター領域の遺伝子発現を Rif1 が抑制的に制御していることを見いだした。Rif1 制御の詳細を調べるため、変動領域の DNA メチル化頻度をバイサルファイト法にて測定した。野生型のメチル化パターンと Rif1 欠損を比較した結果、非常に類似したパターンを示した。このことから、Rif1 の転写活性化制御は DNA のメチル化以外のエピジェネティックな制御に起因していると思われる。



(3) Rif1 相互作用因子の探索

Rif1 は DNA 複製や転写など多岐に渡って機能し、制御している可能性が示唆される。そのため、Rif1 を含む複合体を質量分析法により解析した。下記で示す通り、Rif1 は核内様々な機能的因子と相互作用している事が分かった。相互関係の意義について検討を行っている。



(4) Rif1 変異体タンパク質による機能解析

Rif1 は分子量 270 kDa ほどの非常に巨大なタンパク質である。これまで、N 端領域は HEAT リpeat 構造をとり、C 端領域は DNA 結合に重要であることが報告されている。様々な Rif1 変異体を作製し、動態や局在の解析を行った。細胞分画実験の結果より、Rif1 は核骨格のみならず核膜にも結合していることが明らかとなった。また、C 端欠損変異体解析

から、Rif1 は C 端領域を介して多量体を形成している事が分かった。これらの結果は、核内の Rif1 局在の様式やクロマチン制御の解明に非常に有用な情報だと思われる。

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 1 件)

Yamazaki S, Hayano M, Masai H.
Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing. Trends Genet. 2013;29(8):449-60.
(査 読 有) DOI:
10.1016/j.tig.2013.05.001

[学会発表](計 3 件)

第 37 回日本分子生物学会年会
発表者: 山崎聡志, 井口智弘, 宮武昌一郎, 正井久雄
核内染色体高次構築を制御する Rif1 の機能解析 (P1-0146)
神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜 (2014 年 11 月 25 - 27 日)

The 9th 3R symposium
Presenter : Satoshi Yamazaki, Tomohiro Iguchi, Shoichiro Miyatake and Hisao Masai.
Global regulation of replication, transcription and DNA repair by Rif1 protein. (P-106)
Gotemba Kogen Hotel, Gotemba-shi, Shizuoka, Japan. (17-21, November, 2014)

第 36 回日本分子生物学会年会
発表者: 山崎聡志, 正井久雄
核内染色体高次構築を制御する Rif1 の生体内における機能解析 (P1-0126)
兵庫県 神戸市 神戸ポートピアホテル (2013 年 12 月 03 - 06 日)

[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

山崎 聡志 (YAMAZAKI, Satoshi)
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 研究員

研究者番号 : 30648548

(2)研究協力者

David M. Gilbert 博士
フロリダ州立大学 教授