

グアニン4重鎖の形成と複製における役割と生物学的意義

公益財団法人 東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト いぐち ともひろ 井口 智弘

公益財団法人 東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト リーダー まさい ひさお 正井 久雄

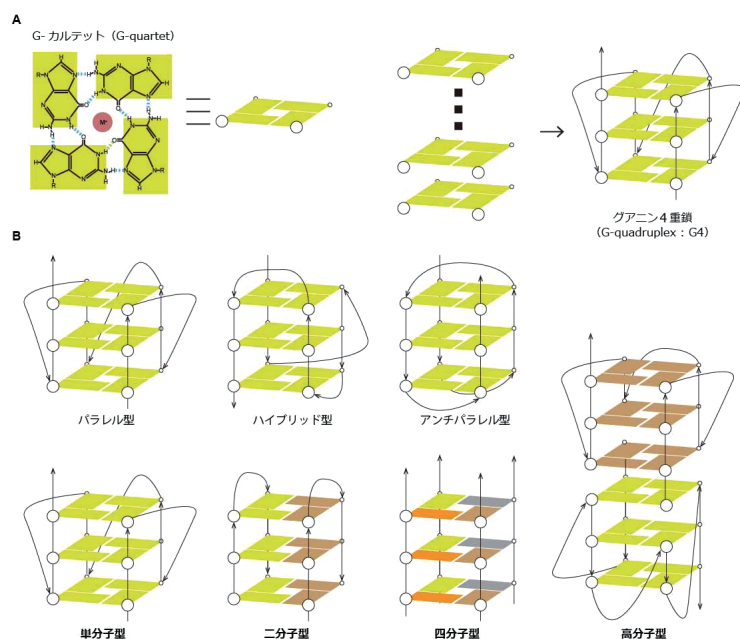
はじめに

一般的な DNA の形態は、ワトソン-クリック型の右巻き 2 重らせん構造であり、B 型 DNA 構造と呼ばれている。この 2 重らせん構造は DNA の鋳型依存的および半保存的複製を担保する分子基盤であり、ゲノム情報の正確な伝搬に寄与している。一方で DNA は構造的にダイナミックであり、種々の二次構造を形成することが知られている。実際、ワトソン-クリック型以外の DNA 構造が存在し非 B 型 DNA 構造と呼ばれる。現在までに多くの非 B 型 DNA 構造として左巻き DNA (Z-DNA)、3 重鎖 DNA、グアニン 4 重鎖 (G-quadruplex : G4) 構造など、発見されている。このような特殊な構造を形成する配列は、局所的かつ一過性に非典型的な構造を形成し DNA の複製や転写、エピジェネティクス修飾など、生物の機能の制御に重要な役割を担っていると考えられる。

G4 はグアニンの連続配列に依存して形成される特殊な構造であるが、DNA 上だけでなく RNA や RNA-DNA hybrid 上においても形成され、哺乳類から酵母、バクテリアやウイルスにまで共通にして存在する。近年 *in vivo* において、G4 が複製、組換え、転写、エピゲノム制御などの多様なクロマチン動態の制御に関与することが明らかとなってきた。また、G4 の異常な形成は神経変性疾患や癌などの様々な疾患の原因になることや、G4 結合リガンドがこのような疾患に対する治療薬となる可能性も報告されている^{1,2)}。G4 の生物学的意義の解明は、医薬品開発の新たな標的を提示するだけでなく、ゲノム機能発現の全体像を明らかにすることに寄与する。

グアニン 4 重鎖 (G4) 構造

約 50 年前にグアニル酸が、Hoogsteen 型水素結合により安定化され、G-quartet という正方形の平面構造が形成されるというモデルが提唱された³⁾。その後、グアニンに富む 1 本鎖 DNA 配列が 1 価の陽イオン存在下において、平面 G-quartet を形成し、 π - π 相互作用を介して重層することにより、グアニン 4 重鎖と呼ばれる特殊な高次構造が形成されることが示された⁴⁾【図 1A】。G4 のグアニンの O6 による中央部の陰イオン性の空間は Na^+ 、 K^+ などの陽イオンにより安定化されるため、生理的な環境下では形成されやすい状態にあるが、1 価の陽イオンである Li^+ は G4 を不安定化する⁵⁾。また、G4 は単分子でも分子間でも形成され、鎖の方向、長さ、ループの構成などの組み合わせにより、多様なトポロジーをとることができる【図 1B】。典型的な G4 形成配列 ($\text{G}_3\text{N}_1\sim\text{G}_3\text{N}_1\sim\text{G}_3\text{N}_1\sim\text{G}_3$) はヒトゲノム上に約 37 万カ所以上存在し、



【図 1】グアニン 4 重鎖 (G4) 構造の多様性

A) G-quartet の化学構造およびグアニン 4 重鎖構造の模式図

B) 3 種類の典型的なトポロジー、分子内、複数分子間により形成される G4 構造

その動態制御や生理的意義に関して注目が集まっている。

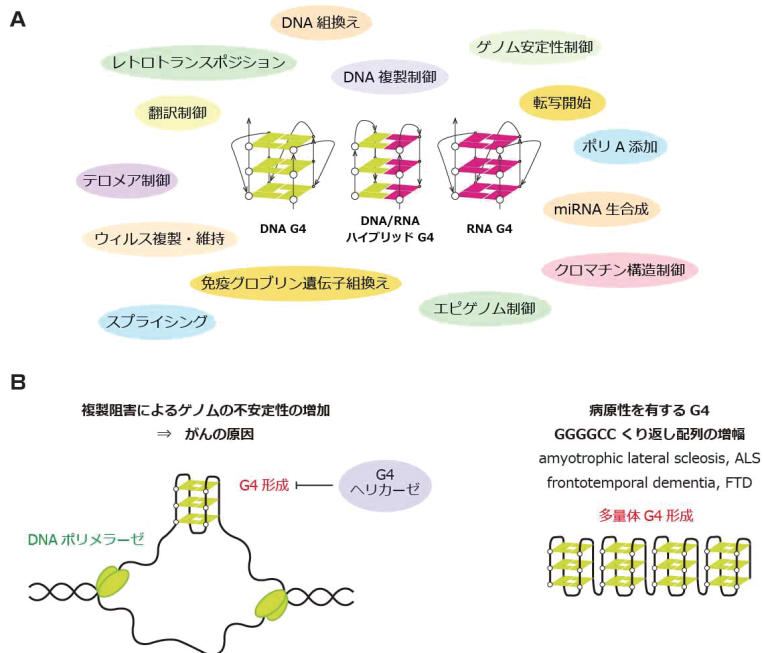
G4 の多様な機能

G4 は TTAGGG の繰り返し配列を持つテロメアで高頻度にみられるだけでなく、DNA 複製開始点近傍にも多く見られ、このような G4 はテロメア構造の維持や複製制御などに関与している【図 2A】。G4 が複製中の DNA 鋳型鎖に形成されると複製を阻害し、がんの原因となるゲノムの不安定性を誘導する。また、繰り返し配列のコピー数の増加により形成される G4 が神経変性疾患の原因となることが知られている【図 2B】。G4 は遺伝子、特にがん遺伝子のプロモーター領域や 5'UTR に多く見られ転写や翻訳を制御しており、例えば、c-myc や K-ras, c-kit などではプロモーター領域で G4 が形成され転写が負に制御されている、N-ras などでは mRNA の 5'UTR において形成され翻訳を抑制していることが報告されている⁶⁾。さらに最近の抗 G4 抗体や G4 結合リガンドを使用した次世代シーケンスによるゲノムワイドな G4 マッピングから、G4 形成と遺伝子発現の相関関係を直接的に調べることが可能となり、G4 が転写活性遺伝子のプロモーターに多く存在し、転写エンハンサーとしても機能することが明らかにされている⁷⁾。

G4 を介した DNA 複製制御

DNA 複製は、細胞増殖におけるもっとも基本的なプロセスの一つであり、1 回の細胞周期につき一度だけ行われる。この「一度きりの複製」は、G1 期にのみ複製前複製複合体が形成され、DNA 合成開始後には形成されないことを保証する複数のメカニズムにより担保されている。その後、DNA 合成期（S 期）において、複製複合体が活性化し複製起点から DNA 合成が開始される。この複製起点の上流において、G4 を形成しうるグアニン-rich 配列が高等生物において高頻度で同定されており、種々の実験から G4 形成配列の機能的な重要性は示唆されているが、複製開始における役割の詳細は未だ明らかとなっていない。

筆者らは、酵母において Rif1 タンパク質が G4 を認識して DNA に結合し、DNA 複製を負に制御していることを報告し、G4 と DNA 複製制御に着目して研



【図 2】 G4 の生体内での機能

- A) G4 は DNA, RNA および RNA-DNA hybrid 上に形成され、様々な核酸の動態の制御に関わる。
B) G4 は、複製阻害によるゲノム不安定性の増加、くり返し配列が形成する異常な G4 による神経変性疾患の原因など負の側面も有する。

究を行っている。以降において、これらの研究内容について紹介していく。

1) 複製タイミング制御因子 Rif1

酵母における複製起点の詳細な解析から、複製起点の活性化は S 期の時間的および空間的制御下にあることが明らかとされたが、この複製起点の活性化の秩序を制御する因子は不明であった⁸⁾。

筆者らは分裂酵母において、複製開始のアクセラである Cdc7 キナーゼのバイパス変異の探索を行い、複製のブレーキとして機能する新規の因子の探索を行い、Rif1 を同定した。rif1 欠損株では、細胞増殖や複製ストレスに対する応答はほぼ正常であるが、複製起点活性化のゲノムワイドプロファイルは変化しており、特に S 期後期において活性化する複製起点が、S 期初期において活性化する⁹⁾。この効果は、動物細胞において Rif1 を KD もしくは欠失させた場合においても同様で、ゲノムワイドで複製タイミングが変化し、大部分が後期から初期への変換であった¹⁰⁾。

2) Rif1 は G4 を認識して DNA に結合する

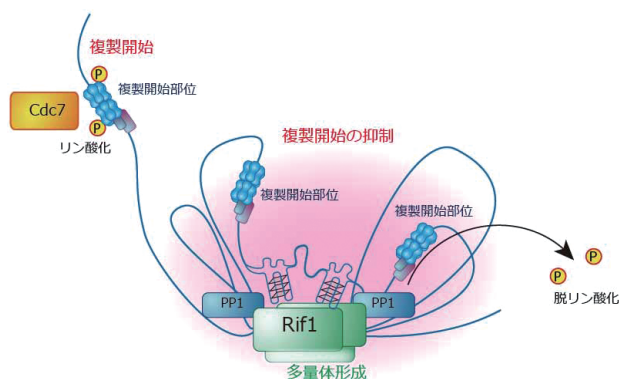
テロメア結合因子でもある Rif1 が、テロメア以外の染色体部分にも結合しうることから、酵母において、ChIP-chip, ChIP-Seq による Rif1 結合部位および配

列の解析を行った結果、Rif1 はグアニン-rich な配列部位に結合することが明らかとなった (Rif1BS)。そこで、①Rif1BS 2 本鎖 DNA を熱変性し、リアニールさせ G4 を *in vitro* にて形成しうること、②グアニン塩基の他の塩基への置換および G4 を形成できないデアザグアニンへの置換により Rif1 BS の G4 形成能の喪失、③精製 Rif1 タンパク質が *in vitro* において G4 依存的に DNA に結合すること、④酵母のゲノム上の Rif1BS 箇所②と同様の変異を導入すると、Rif1 のクロマチン結合が喪失することを明らかとし、Rif1BS が G4 を形成し、Rif1 がこの G4 を認識・結合していることを証明した¹¹⁾。

3) Rif1 による複製開始抑制のメカニズム

酵母における Rif1BS 部位への配列変異の導入は、導入部位の周辺 50 kb にわたり影響を及ぼし、複製起点の脱制御が誘導される。また、動物細胞における Rif1 の KD および欠失は、核膜近傍のクロマチンループのサイズを増加させることから、Rif1 がクロマチン構造を制御していることが示唆され¹²⁾、実際 3C 解析から、Rif1 がクロマチン相互作用に関与していることが明らかとされている¹³⁾。

また、精製 Rif1 タンパク質の生化学的解析から、Rif1 の C 末端は多量体形成能を有するだけでなく G4 結合ドメインを有する。酵母において G4 結合、多量体形成がそれぞれ失活した変異体においても、複製抑制能が低下することから両者がともに Rif1 の機能発現に重要であることが強く示唆されている (加納ら、未発表データ：【図 3】)。



【図 3】 G4/Rif1 による DNA 複製開始の制御

Rif1 は核膜近傍で G4 を認識・結合し、その多量体化能により、クロマチン繊維を寄せ集め、複製タイミングを抑制するクロマチンドメインを形成する。

また、脱リン酸化酵素 PP1 を呼び込むことにより、リン酸化反応を阻害し、複製開始を抑制する。

4) Rif1 BS 配列における G4 形成と機能

酵母における ChIP-Seq 解析により同定された Rif1 が強く結合する Rif1BS 部位の配列解析から、保存配列 (Rif1CS) が同定された。Rif1BS の多くは、複数の Rif1CS を有しており、G4 形成が比較的安定的に形成される。一方で、Rif1 の結合が弱い部位では Rif1CS を 1 個しか有していないものが多い。酵母のゲノム上における G4 形成可能な配列の推定によれば、400 個以上の部位が示されているが、我々が同定した Rif1 が強く結合する 35 カ所の Rif1BS 部位と一致するのは 2 カ所のみであり、残りの箇所はアルゴリズムでは予測できない。この事実は、細胞内に形成される G4 を塩基配列の情報からのみで予測することは非常に困難であることを示している。また、Rif1BS 部位のグアニンの連続配列の一部を欠損しても、近傍に存在するグアニンの配列を利用して、G4 を形成し得ることが明らかとなった。このように、G4 形成配列は可塑性を有する強力なゲノムシグナルである可能性が示唆される。

5) G4 とヌクレオソーム構造

細胞内の DNA は、クロマチンとよばれるヒストンタンパク質からなるヌクレオソームに巻き付き、核内で DNA をおりたたみ収納されている。しかしながら、このヌクレオソームは DNA 上で均一に分布しているわけではなく、ヌクレオソームフリーの領域が存在している。筆者らが同定した 35 カ所の Rif1BS 部位のうち 30 カ所は、ヌクレオソームフリー領域であることから、G4 形成とヌクレオソーム形成に関連があることが示唆された (加納ら、未発表データ)。実際、G4 特異的抗体である BG4 抗体を用いたヒト細胞における ChIP-Seq により、同定された G4 形成部位の大部分はヌクレオソームフリー領域であることから^{7,14)} G4 形成とクロマチン構造に相互関係が存在し、G4 形成がヌクレオソームの配置に影響を与えている可能性が示唆される。

筆者らは G4 形成とヌクレオソーム形成の関係を明らかにするために、*rif1* 欠損株あるいは Rif1BS 部位変異株 (G4 形成できない) において、ヌクレオソーム形成を調べた。

Rif1 を欠損しても、Rif1BS 近傍にヌクレオソームは形成されないが、G4 形成能を有さない配列に置換するとヌクレオソームが形成されることを見出した

(加納ら, 未発表データ). この結果は, 細胞内で形成された G4 がヌクレオソームを阻害する因子として機能していることを示す.

6) G4 と RNA-DNA ハイブリッド

近年, ゲノム上に形成される RNA-DNA ハイブリッドの生物学的意義が注目されている. 通常転写産物は, 転写産物から鋳型 DNA から乖離するが, 鋳型鎖と相補対を形成し, RNA-DNA ハイブリッドを形成する場合がある. 最近の研究から, センス鎖がグアニン-rich な鋳型を転写すると, 大変高い効率で RNA-DNA ハイブリッドが形成されることが明らかとなった. また, 細胞内において形成される RNA-DNA ハイブリッドの多くが, グアニン-rich な G4 形成配列領域の転写により形成されることも明らかとなってきた¹⁵⁾. 実際, Rif1BS の多くが非コード転写領域にあり, 転写により RNA-DNA ハイブリッド上に G4 が形成されている可能性が示唆された.

7) G4 形成と複製開始

現在までに, DNA 複製過程において鋳型 DNA に形成された G4 は, DNA ポリメラーゼによる新生 DNA 鎖の伸長を阻害すること, 一方でこのような G4 を紐解く G4 ヘリカーゼが存在し, DNA 合成を補助していることが報告されている¹⁶⁾ **【図 2B】**. しかし, DNA 複製開始メカニズムと G4 形成の関連に関しては未だ明らかとなっていない. 筆者らは, ある条件下の大腸菌の複製開始に G4 形成が関与していることを見出している. 通常, 大腸菌のゲノム複製は, レプリケーター *oriC* からイニシエーター DnaA タンパク質の作用により開始される. しかし, RNaseH 変異株では *oriC* や DnaA の不在下でも複製が進行し, 細胞が生育可能である. この「安定 DNA 複製」と呼ばれる条件下では, ゲノム上に形成される RNA-DNA ハイブリッド/R-loop が複製開始に重要な役割を果たすと想像される. 安定 DNA 複製に依存する生存に必要なゲノム領域をマッピングした結果, 複製起点の反対側にある複製終結領域 (*ter*) の一部分が重要な役割を果たし, この領域に G4 形成配列を見出した. G4 リガンドによる影響や L^+ イオン (G4 形成を阻害する陽イオン) による影響を検討した結果, G4 形成配列により形成される RNA-DNA hybrid/R-loop/G4 が複製開始のシグナルとして機能している可能性が示唆された (田中卓ら,

未発表). このような構造に依存した複製開始が, 大腸菌以外の生物でも存在するのか, 今後の解析がまたれる.

おわりに

G4 構造の基盤となる G-quartet が提唱されてから 50 年以上が経過している. その間に多くの生物学的重要性についての報告がなされてきたが, G4 およびその関連構造の生体内での基本的意義の解明に向けた研究はまだその緒についたばかりである.

G4 に結合するリガンドや G4 特異的抗体の開発により, ゲノム上での G4 マッピング, 細胞内局在, ダイナミクスの解析が可能となってきた. しかしながら, 陽イオンの種類や分子混雑状況により, 同じ配列から異なるトポロジーの G4 が形成されることや, G4 はその構造および周辺環境により, 安定性が大きく変化することなどから, G4 の細胞内での存在様式を明らかにするためには, G4 構造のトポロジー, 形成された G4 の安定性などを考慮する必要がある. これらの諸問題を解決するトポロジー特異的またはトポロジー制御可能なリガンドの開発や, 生体内でダイナミックに形成と消失を繰り返している G4 を高感度で検出できるリガンドなどの創成が必要であるだろう.

最後に, 我々の研究室においては, 大腸菌から酵母, 哺乳動物細胞そしてマウスを用いた個体での解析を通して, DNA 複製制御機構をメインとした研究を行っている. ここで紹介した研究に興味を持ってくれて, 一緒に追及してくれる若者を募集している.

【参考文献】

- 1) Balasubramanian S, et al: Nat Rev Drug Discov. 2011; 10: 261-275
- 2) Hansel-Hertsch R, et al: Nat Rev Mol Cell Biol. 2017; 18: 279-284
- 3) Gellert M, et al: Proc Natl Acad Sci USA. 1962; 48: 2013-2018
- 4) Williamson JR, et al: Cell. 1989; 59: 871-880
- 5) Sen D, et al: Nature. 1988; 344: 410-414
- 6) Robinson J, et al: Nucleic Acids Res. 2021; 49: 8419-8431
- 7) Hansel-Hertsch R, et al: Nat Genet. 2020; 52: 878-883
- 8) Masai H, et al: Annu Rev Biochem. 2010; 79: 89-130
- 9) Hayano M, et al: Genes Dev. 2012; 26: 137-150
- 10) Yamazaki S, et al: EMBO J. 2012; 31: 3667-3677
- 11) Kanoh Y, et al: Nat Struct Mol Biol. 2015; 22: 889-897
- 12) Yamazaki Y, et al: Trends Genet. 2013; 29: 449-460
- 13) Foti R, et al: Mol Cell. 2016; 61: 260-273
- 14) Lago S, et al: Nat Commun. 2021; 12: 3885
- 15) Masai H, et al: Biochem Biophys Res Commun. 2020; 531: 75-83
- 16) Lerner LK, et al: Genes. 2019; 10: 95