

【目的】 グアニン4重鎖構造（以下 G4 と記載）は、一本鎖 DNA 上のグアニンの連続配列が存在する部位に形成される。G4 を形成する potential を有する配列は、ヒトゲノム上に 37 万箇所以上存在すると推定される。最近の研究から、G4 は転写、組換え、転移、エピゲノム制御など染色体の種々の動態・機能に関与することが示唆されると同時に、その異常な形成は、神経変性疾患などの原因にもなることが示唆されている。本研究では、G4 の生物学的意義についてゲノム複製を中心に解析することを目的とする。

【方法】 精製したタンパク質と G4 との相互作用をゲルシフトなどで解析した。また、タンパク質のオリゴマー形成を未編成ゲル、ゲルろ過などで解析した。分裂酵母を用いて、細胞内の G4 を、ヌクレアーゼ感受性で検出する方法を開発した。

【結果】 我々は、G4 が、DNA 複製制御において果たす負と正の役割について解析した。その結果、①ゲノム上に多数存在する G4 の一部に Rif1 タンパク質が結合し、クロマチンを束ね核膜近傍に複製開始に阻害的な染色体高次構造体を形成することを明らかにした。Rif1 タンパク質の生化学的解析から、C 端領域に、G4 結合ドメイン、多量体化ドメイン、クロマチン会合領域が存在することが示された。又、②複製開始における G4 の役割について解明するために、大腸菌染色体および plasmid DNA の、RNaseH (RNA-DNA ハイブリッド上の RNA を選択的に分解するヌクレアーゼ) 欠損株で効率よく観察される第二の DNA 複製様式をモデルに G4 依存的複製機構の解明を試みた。その結果、RNaseH 欠損下で観察される染色体複製は、G4 形成を阻害する LiCl で阻害されること、その配列要求性から、G4 の重要性が示唆された。また plasmid 複製開始においても、G の連続配列の重要性、G4 リガンドによる複製阻害、primer RNA 内の guanine の 7deaza guanine (B 型二重らせんは形成できるが、G4 を形成できない) への置換による複製阻害などから、G4 の関与が示唆された。

次に、細胞内での G4 形成のメカニズムとその存在を検証するため、まず *in vitro* で G4 形成配列をもつ二本鎖 DNA の転写により RNA と DNA を含む RNA-DNA ハイブリッド上に G4 が形成されることを示した。実際、上記の Rif1 結合部位 G4 は非コード転写領域の中に存在する。また、複製開始においても転写は重要な役割を果たし、G4 を含む RNA-DNA ハイブリッドが安定に維持される条件で効率よく開始する。また、細胞内での G4 のダイナミクスを解析するために、G4 抗体ポリペプチドを蛍光分子に連結し G4 の可視化に成功した。さらに、G4 の構造的特性を利用して、細胞内での G4 形成を証明する技術を開発した。

これらの結果から、細胞内に実際に G4 は、転写と強く連動して形成され、形成された G4 は、種々のタンパク質と相互作用し、複製開始の負と正の制御に関与することが明らかとなった。これらの知見はまだ大部分未解決の高等動物の複製開始機構に重要な示唆を与えるものである。

G4 結合タンパク質 Rif1 の構造と、それによる DNA 複製、修復、組換え、転写などの制御

