

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

ゲノムワイドの DNA 複製プログラムを制御するヒト Rif1 タンパク質の機能解析  
(Human Rif1 protein, a key regulator of the genome-wide DNA replication program)

氏 名 山崎 聡志

## 背景と目的

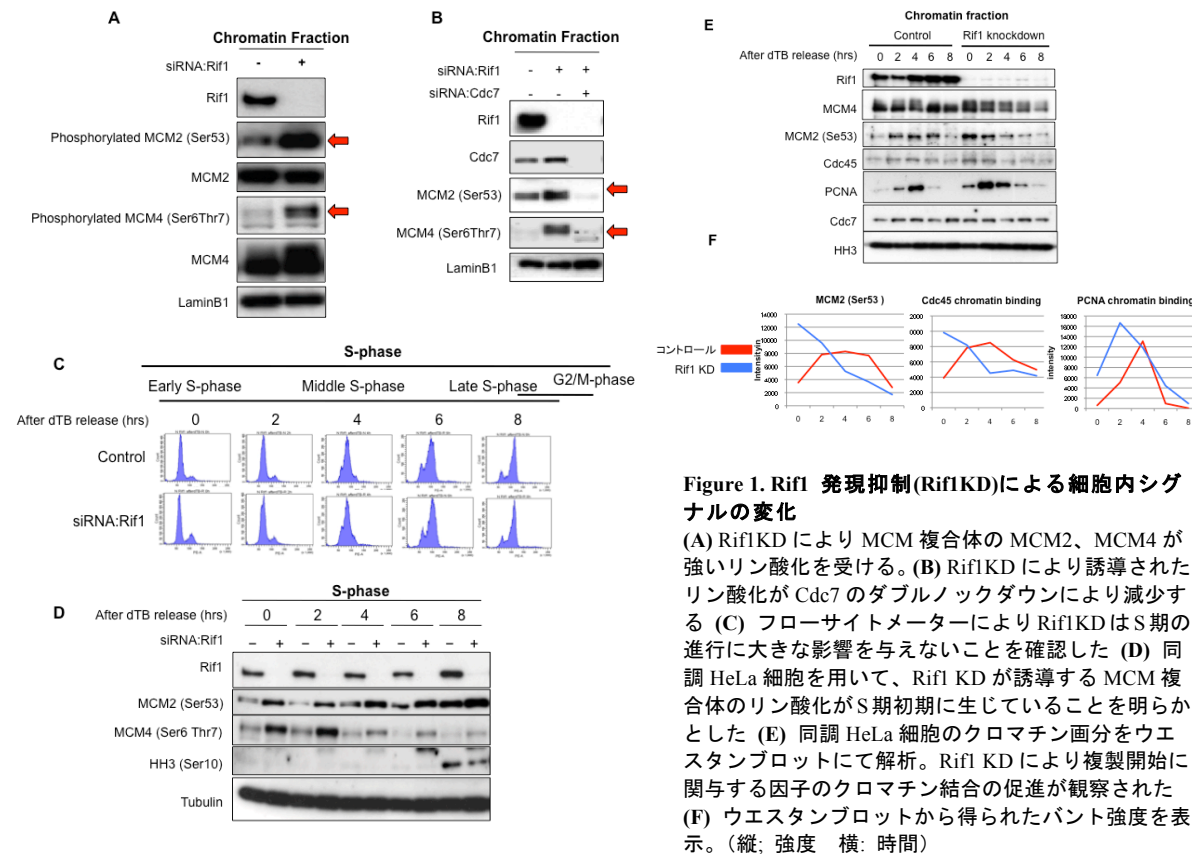
哺乳類細胞、特にヒトにおける染色体 DNA 複製は、ゲノム一次配列上での制御を受けるとともに、細胞周期の時間軸上および核内での染色体空間的配置などの制御下にもある。これらの機構は複雑で、遺伝子発現、ヒストンのメチル化やアセチル化修飾、クロマチン構造、核内構造などにも影響されると考えられる。さらに外部環境の変化にも影響を受け、それに順応する可塑性も有している。DNA 複製を行うレプリソームには様々な因子が関与していることが明らかとなっている一方で、複製プログラムの制御機構、すなわちゲノム全体でいつ、どこで、どのように複製が開始されるのか、その選択性やタイミングの制御メカニズム、因子については未だ不明な点が多い。近年、我々は分裂酵母を用いた解析から rif1(Rap1 Interacting Factor 1)欠損株が複製開始の脱制御を誘導し、通常複製されない領域から複製が開始される現象を見いだした。Rif1 は酵母からヒトまで広く保存されている。出芽および分裂酵母における Rif1 は、テロメアの伸長を負に制御することが知られているが、ヒト Rif1 はテロメア制御には関与しない。ヒトおよびマウス Rif1 は ATM 依存的な DNA 損傷、複製ストレスにおける DNA 修復及び組換え反応に機能し、胚幹細胞では未分化性維持に関与することが報告されている。しかし、DNA の複製制御における役割は未だ報告されていない。このような背景から本研究では、ヒト Rif1 による、複製起点の選択性やタイミングなど DNA 複製プログラム制御の可能性について検討し、解析を行った。

## 実験結果

### Rif1 は核に局在しクロマチンに強固に結合する

Rif1 タンパク質の細胞内局在を観察すると共にクロマチン結合能についても解析を行った。HeLa 細胞における Rif1 の局在は大部分が核に局在していた。興味深いことに、M 期では、Rif1 はクロマチンから解離し細胞質に存在する。さらに、染色固定前に界面活性剤(TritonX-100) 処理を

行い、より強く核内に結合している領域を観察した結果、Rif1 は核膜およびヘテロクロマチン領域に一部局在していることが明らかとなった。更に DNase I を用いてクロマチン結合能を解析すると、Rif1 は 1% NP40 では可溶化されないが DNase I を加える事により容易に可溶化された。このことから、Rif1 は核内でもクロマチンに強く結合していることが明らかとなった。



## Rif1 発現抑制 (Rif1 KD) の細胞への影響

HeLa 細胞を用いて siRNA により Rif1 発現抑制解析を試みた結果、Rif1 タンパク質発現を検出限界以下まで抑制することができた。また、それに伴い細胞の形態変化が生じ、マイクロアレイ解析から多くの遺伝子発現のレベルが変動することが解った(1.5 倍以上変動する遺伝子が 600 個近く同定された)。次に、DNA 複製に関与する因子に注目し解析を行った。DNA 複製ヘリカーゼである MCM 複合体の MCM2 Ser53, MCM4 Ser6 Thr7 部位は Cdc7 キナーゼによりリン酸化されることが知られているが、これらのリン酸化が顕著に増加した (Fig1-A)。また、このリン酸化の増強は S 期 (複製期) の初期にすでに起こっていることが同調実験から明らかとなった (Fig1-D)。このリン酸化がどのキナーゼによる制御なのか確認するため、もっとも有力候補である Cdc7 キナーゼと Rif1 の双方を発現抑制させた結果、Rif1 依存的な MCM 複合体のリン酸化が Cdc7 発現抑制により消失した (Fig1-B)。一方、Rif1 KD による細胞周期 S 期の進行はコントロールと比較してほとんど変化がみられない (Fig1-C)。興味深いことに MCM 複合体の強いリン酸化が確認される S 期初期に、Cdc45 や PCNA など他の複製開始に重要な関連因子のクロマチンローディングが増強された (Fig1-E, F)。

## Rif1 抑制による核内 DNA 複製領域の変化

長い S 期(6-8 時間)の間に、核内の様々な場所で複製が行われていることを BrdU 免疫染色で観察することができる。この特徴的な DNA 複製領域を同調細胞を用いて経時的に観察した。コントロ

ール細胞では、S 期初期(1-2hrs)に核全体が染色される細胞が多く見られ、中期から後期(4-6hrs)へと進行すると、複製領域が核膜、核小体周辺へと移行した像が多く観察された。S 期後期(8hrs)ではヘテロクロマチン領域が複製され、染色像も特徴的なスポットが観察された。一方、Rif1 KD 細胞では、S 期初期(1-2hrs)ではコントロール同様、核全体が染色される細胞が多く見られたが、中期から後期(4-6hrs)にかけても、継続的に核全体が染色された細胞が多く観察された。さらに、後期まで進行するとヘテロクロマチン領域が複製される特徴的なスポットが観察された一方で、未だ核全体が染色される細胞も多く観察された。

### Rif1 抑制による複製起点の減少と複製フォーク進行速度の増加

Rif1 KD における複製起点の頻度と複製フォークの進行に与える影響を非同調 HeLa 細胞にて解析した。その結果、Rif1 KD により、複製フォークの速度が 1.7 倍速くなり、隣接している複製 Origin 間の距離が大きくなるという結果が得られた。また、S 期中期に同調させた HeLa 細胞でも同様に、複製フォークの速度が増加することが示された。

### Rif1KD が DNA 複製タイミングの変動に及ぼす影響

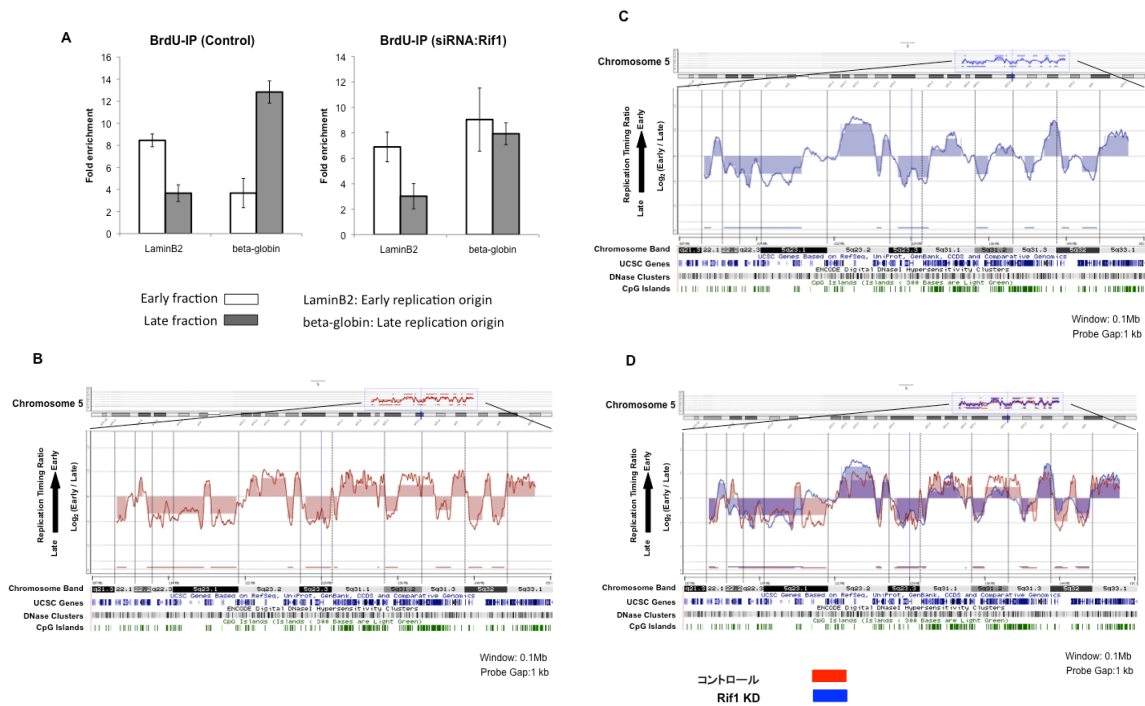


Figure 2. Rif1 発現抑制による DNA 複製タイミングの変動

(A) 既知の複製起点領域のプライマーを使い Quantitative-PCR 解析を行った (B) 染色体 5 番の DNA 複製タイミング解析結果 (HeLa 細胞)。中央の線を境に上方が S 期初期、下方が S 期後期に複製する領域を示す (C) Rif1 KD における DNA 複製タイミングドメインの変化 (D)コントロールと Rif1 KD による DNA 複製タイミングの比較

Rif1 の複製タイミングに及ぼす影響を調べるために、既知の複製起点の複製開始タイミングを解析した。HeLa 細胞を BrdU で短時間標識し、その後 FACS により S 期初期と後期細胞をそれぞれ分画し回収した。次に、複製時に BrdU が取り込まれ置換されたゲノム DNA を BrdU 抗体を使い採取した。S 期初期、あるいは後期に複製が開始されることが知られている複製起点領域のプライマーを用い、定量 PCR を行い解析した。S 期初期に複製されることが知られている既知の複製起点、LaminB2 遺伝子領域では、コントロール、Rif1 KD とともに初期に複製された。しかしながら、S 期後期に複製される beta-globin 遺伝子領域は、Rif1 KD では、初期にすでに複製されていることが明らかとなった (Fig2-A)。次に、BrdU-IP Microarray 法にてゲノムワイドな複製タイミング解析を行った。解析した領域は染色体 5 番の長腕 q21~33 領域(およそ 40Mb)である。コントロール細胞の結果が

ら、DNA 複製がメガベース単位で複製タイミングドメインを形成することが解った (Fig2-B)。これは、以前報告された複製タイミング解析の結果と同様の結果であった。また、S 期初期(上方領域)と後期(下方領域)との移行領域と Chromosome R/G band の移行領域を比較するとほぼ相関が見られた。一方、Rif1 KD 細胞では、コントロールで S 期後期に複製される領域が初期複製へと変動するゲノムドメインが存在していた (Fig2-C , D)。さらに、分割されていた複製ドメインが一つに統合される領域も観察された。このように Rif1KD 細胞では、複製タイミングドメインの大きな変動が起こることが示された (Fig2-C , D)。

## 結論

得られた結果から次のような結論が導かれた。Rif1 の細胞内での挙動について

- (1) Rif1 は間期において大部分が核に局在し一部ヘテロクロマチン領域にも存在している。
- (2) Rif1 は間期にはクロマチンに強く結合するが、M 期にはクロマチンから離れる。

Rif1 発現抑制細胞は下記のような特徴を示した。

- (1) 形態変化を誘導して遺伝子発現に大きく影響を及ぼす。
- (2) MCM 複合体の Cdc7 によるリン酸化のタイミングとそのレベルが亢進する(S 期初期)。
- (3) Rif1 発現抑制により Cdc45 や PCNA などのクロマチンローディングの時期とその程度が増加する。
- (4) 核内で行われる複製開始領域の局在パターンが S 期を通じて初期型に変動する。
- (5) 複製起点の数が減少し複製フォーク進行の速度が速くなる。
- (6) S 期初期、後期に開始する複製起点のタイミングが変動する。
- (7) 複製タイミングのドメインがゲノムワイドで大きく変化する。

Rif1 の発現抑制により、一般に複製ドメインが融合あるいは、初期後期の差別化が減少し、ゲノム全体が一様なタイミングで複製されるようになることが示唆された。これは、S 期を通じて初期の複製 foci のパターンが観察されること、また S 期初期におこる Cdc7 による標的のリン酸化が Rif1 抑制により増加し、さらに Cdc45 や PCNA の染色体結合が促進するという観察とも合致する。私の得た結果は、Rif1 がこれまで全く未知であった動物細胞の複製タイミングドメインを規定するメカニズムにおいて中心的な役割を果たす因子である可能性を強く示唆するものである。