

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04818

研究課題名(和文) 試験管内染色体複製系を用いたDNA維持メチル化制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of maintenance DNA methylation

研究代表者

西山 敦哉 (Nishiyama, Atsuya)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50378840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は、細胞の特性を規定する「細胞記憶」として働く化学修飾であり、細胞の分化やがん化の抑制に重要な役割を果たす。DNAメチル化酵素1(DNMT1)は、染色体複製に伴い、娘DNAへのDNAメチル化パターンの正確な継承を保證するDNAメチル化酵素である。DNMT1のDNAメチル化部位への集積にはE3ユビキチンリガーゼUHRF1の機能が必須であるが、その分子機構は未だ明らかでない。本研究においては、DNAメチル化継承の分子機構について解析を行い、PAF15タンパク質のユビキチン化がDNMT1のメチル化部位への局在に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化酵素は抗がん剤の作用点としても注目を集めており、本研究成果はDNAメチル化継承の新たなメカニズムを明らかとした学術的な意義に加えて、DNAメチル化酵素阻害剤の開発推進に大きく寄与する可能性がある。また、PAF15は様々ながん細胞で高発現していることが報告されており、PAF15の高発現がDNAメチル化制御に与える影響を明らかにすることは今後の重要な課題と考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is a chemical modification that acts as a "cellular memory" and plays an important role in cell differentiation and suppression of carcinogenesis. DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is a DNA methylation enzyme that ensures accurate inheritance of DNA methylation patterns to daughter DNA during chromosome replication. The function of the E3 ubiquitin ligase UHRF1 is also essential for the localization of DNMT1 at DNA methylation sites, but the molecular mechanism is not yet clear. In this study, we identified PAF15 as a novel DNMT1 interacting protein. We then clarified that UHRF1-dependent ubiquitination of PAF15 controls the localization of DNMT1 at the methylation sites and ensures faithful inheritance of DNA methylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAメチル化 DNA複製 ユビキチン DNMT1 UHRF1 PCNA PAF15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は主に CpG 配列中のシトシン 5 位を標的として起こるエピジェネティックな化学修飾である。DNA メチル化は染色体構造・機能の制御を介して、遺伝子発現制御やトランスポゾンの抑制、X 染色体の不活性化、またゲノム安定性に重要な役割を果たしている。染色体上の DNA メチル化パターンは、DNA 複製時に伴い、維持 DNA メチル化機構により正確に娘 DNA に継承され、その破綻は細胞のがん化や異常な発生の原因となる。

DNA メチル化酵素 1 (DNMT1) は、DNA 複製時に一過的に生じる片鎖のみメチル化された中間体 (ヘミメチル化 DNA) に特異性を示し、これを再び両鎖メチル化 DNA へと変換する維持型 DNA メチル化酵素である。細胞内では、DNMT1 に加えてヘミメチル化 DNA に特異的に結合する E3 コピキチンリガーゼ UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and RING fingers 1) が重要な役割を果たす。従来、UHRF1 は DNMT1 と直接相互作用し、DNMT1 のメチル化部位への局在を促進すると考えられてきたが、申請者は UHRF1 がヒストン H3 をコピキチン化し、DNMT1 はコピキチン化 H3 と特異的に相互作用することで、ヘミメチル化 DNA 部位に集積することを見出し、発表した (Nature, 2013)。一方、DNMT1 は PCNA と相互作用することで、DNA 複製部位に局在することが報告されており、UHRF1 がこの仕組みにどのように関わるかは明らかでなかった。

また、過眠症や認知症などの症状を示す遺伝性神経変性疾患 ADCA-DN (Autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness, narcolepsy) の原因として複数の *DNMT1* 遺伝子変異が報告された (Hum. Mol. Genet., 2012)。しかし、報告された遺伝子変異が DNMT1 の維持 DNA メチル化における機能とどのような関連があるかは不明であった。本研究では、これらの問題にツメガエル卵抽出液由来の無細胞系を用いて取り組んだ。

2. 研究の目的

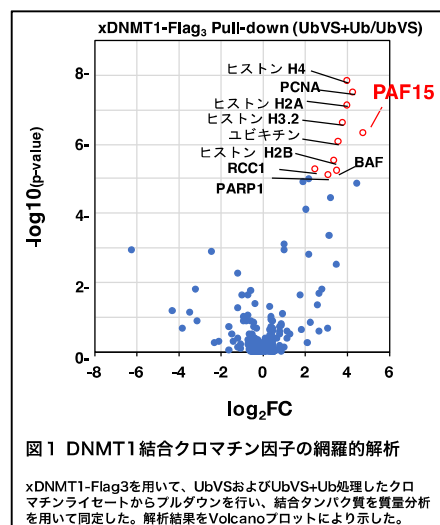
項目 1 として新たな DNA 維持メチル化制御因子の同定と機能解析を行った。DNMT1 の複製部位への局在が UHRF1 によるコピキチン化によって制御されている場合、DNA 複製装置に結合するヒストン H3 以外のコピキチン化タンパク質が存在する可能性がある。DNA 維持メチル化に関わる新たな因子を同定するために、DNMT1 およびコピキチン化 H3 に結合するタンパク質を網羅的に同定し、その DNA 維持メチル化における役割を明らかにすることを目的として研究を行った。また、項目 2 として ADCA-DN 変異をもつ DNMT1 の機能解析を行った。

3. 研究の方法

ヒストン H3 コピキチン化レベルを制御するために、脱コピキチン化酵素阻害剤である Ubiquitin vinyl sulfone (UbVS) を用いた。ツメガエル間期卵抽出液に UbVS を加えると、コピキチン鎖の脱コピキチン化が完全に阻害され、フリーのコピキチン分子が枯渇するため、コピキチンシグナルを完全に阻害することが可能である。一方、UbVS 処理抽出液にリコンビナントコピキチンを添加することで (UbVS+Ub)、脱コピキチン化を阻害した上でコピキチンシグナルを活性化することができる。これら二種類の抽出液を用いてクロマチン画分を調製したところ、UbVS 処理抽出液では、ヒストン H3 コピキチン化が完全に阻害されていた一方、UbVS+Ub 処理抽出液においては H3 コピキチン化が強く亢進していた。そこで、これらのクロマチン lysates から、リコンビナント DNMT1 によるプルダウン、あるいは内在性 DNMT1 複合体について免疫沈降を行うことにより、DNMT1 やコピキチン化 H3 と相互作用するタンパク質の網羅的な同定を行った。また、ADCA-DN 変異を導入した様々な変異体をリコンビナントタンパク質として調製し、その機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 新規 DNMT1 結合タンパク質 PAF15 の同定
上記 3 にて単離した DNMT1 複合体について、質量分析による解析を行い、結合タンパク質を同定した (図 1)。その結果、予想された通り、ヒストン H3 と共にコアヒストンタンパク質 (histone H4, H2A, H2B) が高いスコアで同定された。これは DNMT1 とコピキチン化ヒストン H3 との結合を反映したものと考えられ、本手法の妥当性が示された。また、その他のタンパク質として、ヒストンタンパク質に加えて、DNA 複製の主制御因子である PCNA、そしてその結合因子である PCNA-associated factor 15 (PAF15/KIAA0101) が同定された。PAF15 は N 末にヒストン H3 とよく似た配列を持ち、さらにヒト PAF15 は S 期に Lys15, Lys24 の二箇所がコピキチン化されることが報告されていた (Povlsen et al, NCB, 2012)。これは、ヒストン H3 が UHRF1 によって Lys14, 18, 23 がマルチプルモノコピキチン化を受けることと類似していたため、PAF15 が DNA 複製装置に DNMT1 を局在させる機能をもつかどうか、更に検討を進めた。



(2)Xenopus PAF15(xPAF15)はDNA複製およびUHRF1 依存的にクロマチンに結合する

維持 DNA メチル化を再現可能であるツメガエル卵由来の無細胞系を用いて、xPAF15 の機能解析を行った。xPAF15 の特異抗体を作成し、S 期クロマチンへの結合を調べたところ、xPAF15 は DNA 複製に依存してクロマチンに結合することが明らかになった。また、ユビキチン化部位、及び PCNA 結合部位変異体を用いた解析から、PAF15 のクロマチン結合には自身のユビキチン化と PCNA との結合が不可欠であることが分かった。次に、PAF15 のユビキチン化とクロマチン結合が UHRF1 によるものであるかどうか調べた。間期卵抽出液から抗 UHRF1 抗体を用いて、UHRF1 を免疫除去したところ、PAF15 のクロマチン結合は完全に抑制された。これは、野生型リコンビナント UHRF1 の添加により回復したが、PHD ドメインに変異を導入した変異体ではそのような効果は見られなかった。また、UHRF1-PHD による認識配列である VRTK 配列に変異を導入した PAF15 でも同様にクロマチン結合の喪失が見られた。さらに、分担研究者である有田博士の研究グループによって、UHRF1-PHD ドメインと PAF15N 末ペプチドの複合体結晶構造が解かれ、UHRF1-PHD がヒストン H3N 末テイルを認識するのと同様の仕組みで PAF15 を認識していることが明らかとなった。

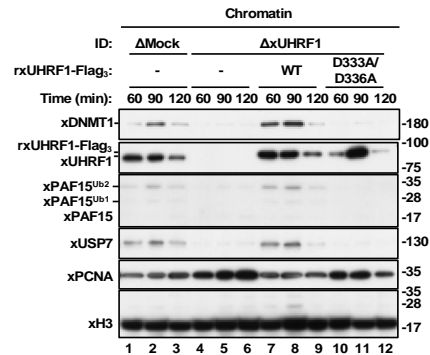


図2 PAF15のクロマチン結合はUHRF1 依存的に起こる

コントロールおよびUHRF1 除去抽出液中でのS期クロマチンへのPAF15の結合を調べた。PAF15のクロマチン結合はUHRF1に依存的であり、PHDドメインの活性がそれに重要であることがわかった。

(3)PAF15-Ub2 は DNMT1 と特異的に相互作用する

DNMT1 は H3 Lys14, 18, 23 のうち二箇所がユビキチン化された dual モノユビキチン化ヒストン H3 と RFTS ドメインを介して特異的に相互作用することが分かっている (Mol. Cell, 2017)。そこで、ユビキチン化 PAF15 が同様の機構で DNMT1 と相互作用するか調べた。まず、S 期クロマチンフラクションから、抗 DNMT1 及び PAF15 抗体による免疫沈降を行ったところ、DNMT1 と PAF15 が共沈降することが分かった。またこの時、DNMT1 はユビキチンが二分子結合した PAF15 (PAF15-Ub2)と選択的に結合していた。Dual モノユビキチン化の必要性について調べるために、xPAF15 の二ヶ所のユビキチン化部位 (Lys18 と Lys27)にそれぞれ Arg 変異を導入したところ、single モノユビキチン化 PAF15 はクロマチンや PCNA との結合は野生型と同様であるにもかかわらず、DNMT1 との結合が見られないことが分かった。同様の結果が、hDNMT1-RFTS とユビキチン化 PAF15 を用いた ITC 実験によっても得られ、PAF15-Ub2 と DNMT1-RFTS が特異的に相互作用することが示された。

(4)PAF15 のユビキチン化は S 期における DNMT1 リクルートを促進する主要経路として働く

PAF15 の DNA 維持メチル化における役割を調べるために、特異抗体を用いて PAF15 を免疫除去した抽出液を調製した。まず、放射線標識した S-adenosyl-methionine (SAM)のゲノム DNA への取り込みを指標として、PAF15 除去抽出液における DNA メチル化効率を調べたところ、コントロールの抽出液に比べて、約 60%程度までメチル化効率が低下していることが分かった。この時のクロマチンタンパク質の挙動について調べたところ、PAF15 除去抽出液では、コントロールではみられなかったヒストン H3 ユビキチン化が検出された。これと一致して、コントロール条件下ではクロマチン上で DNMT1 は PAF15 と結合していたのに対し、PAF15 除去抽出液ではユビキチン化 H3 との結合を示すことが分かった。以上の結果は、通常 PAF15 が DNMT1 リクルートの主要制御因子であること、また PAF15 が機能的でない場合、代替経路としてヒストン H3 のユビキチン化が起こり、DNMT1 のリクルートを相補していることを示唆している。

(5)PAF15 の機能は哺乳細胞で保存されている

最後に PAF15 の機能が哺乳細胞で保存されているか、mouse ES 細胞を用いた解析を、ミュンヘン大学 Loeonhardt 研との国際共同研究として行った。まず共免疫沈降や F3H アッセイを用いて Mouse PAF15 が DNMT1 と相互作用することを確認した。次に、Mouse ES 細胞でゲノム編集を用いて PAF15 のユビキチン化部位に Arg 変異を導入し、DNA メチル化レベルの変化について調べた。その結果、リピート配列、プロモーターなど特定部位に限らず、ゲノムワイドな DNA メチル化レベルの低下が観察された。さらに、どのような領域で DNA メチル化レベルが低下しているかについて、様々な公共データと比較したところ、特定のヒストン修飾との相関は見られなかったものの、early replication domain との有意なオーバーラップが見られた。以上の結果は、PAF15 が early replication domain での維持メチル化を主に制御しており、その他の領域ではヒストン H3 ユビキチン化による制御が行われている可能性を示す (図 3)。

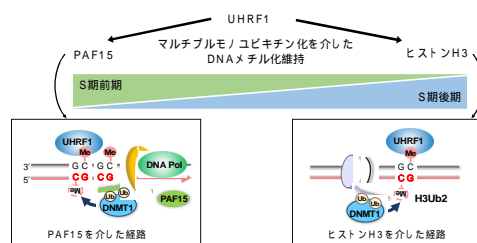


図3: PAF15Ub2 と H3Ub2 を介した DNA 維持メチル化制御のモデル

UHRF1 は PAF15 とヒストン H3 をそれぞれマルチモノユビキチン化することで、DNMT1 のメチル化部位への局在を制御している。PAF15 は S 期の前期に主に機能する DNA 複製と協調的に機能する経路である一方、ヒストン H3 ユビキチン化は S 期の後期に PAF15 経路のバックアップとして働くと考えられる。

(6) ADCA-DN を引き起こす DNMT1 変異は DNMT1 のヒストン H3 結合能に関わる神経変性疾患 (ADCA-DN)の原因となる DNMT1 変異体の機能異常について、無細胞系を用いた解析を行った。その結果、解析した3つの変異体について、ユビキチン化ヒストン H3 との結合が異常に亢進していることが明らかになった。またこの表現型は、ADCA-DN 変異体は DNMT1 の分子間内相互作用の脱制御に由来する可能性が示された。

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 2件）

1. 著者名 Ishiyama S, Nishiyama A, Saeki Y, Moritsugu K, Morimoto D, Yamaguchi L, Arai N, Matsumura R, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, Shimamura S, Ishikawa F, Tajima S, Tanaka K, Ariyoshi M, Shirakawa M, Ikeguchi M, Kidera A, Suetake I, Arita K, Nakanishi M	4. 巻 68
2. 論文標題 Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 350 ~ 360.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2017.09.037	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 Luna Yamaguchi; Atsuya Nishiyama; Toshinori Misaki; Yoshikazu Johmura; Jun Ueda; Kyohei Arita; Koji Nagao; Chikashi Obuse; Makoto Nakanishi	4. 巻 7
2. 論文標題 Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-00136-5	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 Toshinori Misaki; Luna Yamaguchi; Jia Sun; Minami Orii; Atsuya Nishiyama; Makoto Nakanishi	4. 巻 470
2. 論文標題 The replication foci targeting sequence (RFTS) of DNMT1 functions as a potent histone H3 binding domain regulated by autoinhibition.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 741-747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.01.029	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 Atsuya Nishiyama; Christopher B Mulholland; Sebastian Bultmann; Satomi Kori; Akinori Endo; Yasushi Saeki; Weihua Qin; Carina Trummer; Yoshie Chiba; Haruka Yokoyama; Soichiro Kumamoto; Toru Kawakami; Hironobu Hojo; Genta Nagae; Hiroyuki Aburatani; Keiji Tanaka; Kyohei Arita; Heinrich Leonhardt; Makoto Nakanishi	4. 巻 11(1):1222
2. 論文標題 Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-020-15006-4	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西山 敦哉, 千葉 祥恵, 隈本 宗一郎, 佐伯 泰, 郡 聡実, 有田 恭平, 川上 徹, 中西 真
2. 発表標題 UHRF1依存的なマルチプルモノユビキチン化を介した維持DNAメチル化制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 敦哉, 千葉 祥恵, 隈本 宗一郎, 佐伯 泰, 郡 聡美, 川上 徹, 有田 恭平, 中西 真
2. 発表標題 Uhrf1依存的なPAF15のコピキチン化を介した DNA維持メチル化制御
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 敦哉
2. 発表標題 DNAメチル化維持制御機構の解明
3. 学会等名 東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業平成30年度若手研究者シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 敦哉, 石山 玲, 佐伯 泰, 三島 優一, 川上 徹, 北條 裕信, 未武 勲, 有田 恭平, 中西 真
2. 発表標題 DNAメチル化継承を制御するユビキチン・コード
3. 学会等名 ConBio2017 [4AW13] ユビキチン・コード：細胞内の最も難解な暗号を読む（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山 敦哉、佐伯 泰、有田 恭平、中西 真
2. 発表標題 PAF15 のユビキチン化を介した 維持DNA メチル化制御
3. 学会等名 第35回 染色体ワークショップ・第16回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山 敦哉
2. 発表標題 ユビキチン修飾系によるDNAメチル化維持経路の制御
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山敦哉、山口留奈、三崎紀展、佐伯泰、中西真
2. 発表標題 片鎖メチル化結合蛋白質UHRF1によるPCNAのユビキチン化
3. 学会等名 第34回染色体ワークショップ/第15回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ライフサイエンス 新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/17386>
 東京大学大学院 理学系研究科 癌防御シグナル分野 中西研究室
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cancer-cell-biology/hp2018/01index.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
連携 研究者	有田 恭平 (Arita Kyohei) (40549648)	横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授 (22701)	