

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21247013

研究課題名（和文） DNAメチル化のエピジェネティックな継承と維持の構造的基盤

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

研究代表者 白川 昌宏 (Shirakawa Masahiro)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00202119

研究成果の概要（和文）：細胞の分化状態のエピジェネティックな継承は、DNA（CpG）メチル化とヒストン修飾（ヒストンコード）によって担われる。本研究では、DNAメチル化の維持・継承において重要な役割を果たす片鎖メチル化DNA結合たんぱく質 UHRF1 と DNA修復酵素 MBD4 の構造機能解析を行った。その研究、ヒストンコード認識と DNAメチル化の機能的なカップリング、DNAメチル化・脱メチル化制御を支える分子認識機構に関する構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：DNA methylation and histone modifications are epigenetic marks that maintain an epigenetic state in each differentiated cell. We investigated structures and functions of two key proteins in maintenance and regulation of DNA methylation patterns; a hemi-methylated DNA binding protein, UHRF1 and one of methyl CpG binding domain proteins, MBD4. Our structural and biochemical data have shed light on a combinatorial recognition of two histone modifications by UHRF1. Furthermore our research have gained structural basis of versatile base recognition of MBD4.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	23,700,000	7,110,000	30,810,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
総計	36,300,000	10,890,000	47,190,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：DNAメチル化、エピジェネティック、ヒストン、X線結晶解析、NMR

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の発生過程で体細胞が獲得した分化状態は、一度成立すると安定に維持され、生理的条件下では変動しない。また細胞増殖の際には娘細胞へと継承される。この細胞分化のエピジェネティックな継承は、DNA（CpG）メチル化

とヒストンの翻訳後修飾（ヒストンコード）に担われる。DNAメチル化は細胞種ごとに異なるパターンをゲノムDNA上で示すことで、遺伝子発現調節を介して細胞の分化状態を規定する。またメチル化パターンはDNA複製の際に維持メチル化機構により忠実に写し取られて、娘細胞のゲ

ノムへと継承される。この維持メチル化は UHRF1 たんぱく質が複製過程で生成する片鎖メチル化部位を認識し、DNA メチル化酵素 DNMT1 をその部位にローディングする事で達成される。また、DNA メチル化は、もう一つのエピジェネティックマーカーであるヒストン修飾と密接にリンクしていることが報告されている。本研究申請時、すでに、我々のグループで片鎖メチル化 DNA と UHRF1 の SRA ドメインの複合体の結晶構造を決定し、その塩基認識機構を明らかにしていた。このような背景のもと、本申請では、UHRF1 の SRA ドメインを介した、DNMT1 との相互作用および UHRF1 のヒストン結合ドメインの構造機能解析を計画した。

一方、DNA メチル化は体細胞変異の主要な原因になっている。これはメチル化シトシン (mC) の4位が高頻度に脱アミノ化を受けチミンとなり、TpG/mCpG ミスマッチを生成するからである。この変異機構は発癌を初めとする様々な疾病を引き起こす。従って、TpG/mCpG ミスマッチの修復は、ゲノム DNA のメチル化状態の維持に極めて重要である。哺乳動物では、このミスマッチは MBD4 とチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) によって認識され、塩基除去修復の過程を経て修復される。さらに、本研究申請時には MBD4 と TDG はメチル化シトシンの脱アミノ化によって開始する脱メチル化過程に関与することを示唆する報告があった。従って、MBD4 と TDG によるミスマッチ認識は DNA メチル化の維持のみでなく、DNA 脱メチル化経路にも関与すると考え、これら二つのたんぱく質の構造機能解析を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、分化した細胞における DNA メチル化の維持・継承と機能発現に必要な、①維持メチル化におけるメチル化酵素のローディング、②DNA メチル化とヒストン修飾のカップリング、③メチル化 DNA 部位によって生じるミスマッチの認識、の分子機構を構造生物学的な観点から解明することを目的とした。具体的には下記の研究課題を設定し、DNA メチル化・脱メチル化の構造基盤研究を行った。

- ① 維持メチル化因子である UHRF1 と DNMT1 の機能相関および相互作用解析を行った。また、UHRF1 と DNMT1 は PCNA に結合し、複製マシナリーと DNA 上で会合していることが視されている。そこで複製マシナリー中での UHRF1 役割を明らかにするため、その DNA 結合ドメインの非特異的な DNA 結合モードの解析を行った。
- ② UHRF1 のヒストン認識機構を明らかにするためそのヒストン結合ドメインの構造機能解析を行った。
- ③ 特に、塩基認識に重点をおいて、ミスマッチ塩基修復酵素である MBD4 の DNA 結合ドメインの構造機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

- ① 片鎖メチル化 DNA 結合たんぱく質 UHRF1 の SRA ドメイン ( $SRA_{UHRF1}$ ) と DNMT1 の相互作用を等温滴定熱量計 (ITC) 測定や蛍光分光法を用いて解析した。 $SRA_{UHRF1}$  と片鎖メチル化 DNA、メチル化 DNA、非メチル化 DNA との結合を等温滴定熱量計により解析し、結合の熱力学的パラメーターを求めた。また、NMR 法を用いて各 DNA との結合状態を調べた。
- ② UHRF1 のヒストン結合ドメインである Tandem Tudor ドメインと PHD domain (TTD -  $PHD_{UHRF1}$ ) を含む領域とヒストン H3 の N 末領域由来ペプチドの複合体の結晶構造を決定した。結晶の回折データを放射光実験施設の X 線を用いて収集し、分子置換法により結晶構造を決定した。更に、安定同位体ラベルを導入したヒストン H3 N 末ペプチドを調製し、TTD -  $PHD_{UHRF1}$  結合時および非結合時のヒストンの構造を NMR 法により検証した。
- ③ ITC を用いて、MBD4 の DNA 結合ドメイン ( $MBD_{MBD4}$ ) とメチル化 DNA および TG ミスマッチを含む DNA との結合実験を行った。また、 $MBD_{MBD4}$  と DNA の複合体の結晶化を行った。得られた結晶を用いて単波長異常分散法により位相決定を行い、結晶構造を決定した。

## 4. 研究成果

- ① UHRF1 による片鎖メチル化 CpG 部位へのメチル化酵素 DNMT1 のリクルート機構を明らかにするため、DNMT1 の N 末領域と  $SRA_{UHRF1}$  の相互作用解析を GST-プルダウン法や等温熱量計法 (ITC) を用いて行った。その結果、 $SRA_{UHRF1}$  のみでは DNMT1 と安定な複合体を形成せず、他の機能ドメインを連結するリンカー領域が複合体形成に重要である事を明らかにした。この結果は、今後、 $SRA_{UHRF1}$  - DNMT1 複合体の結晶化の鍵を握る重要な知見である。

NMR 法と ITC 測定法を用いて、 $SRA_{UHRF1}$  の非特異的な DNA 結合モードの存在を明らかにした。この結果とモデルビルディングのアプローチを用いて、UHRF1 が複製因子とともに DNA 上をスライディングし、片鎖メチル化部位を認識、結合し、DNMT1 に基質を受け渡すモデルを提唱した。

- ② TTD-PHD $_{UHRF1}$  と H3 ペプチドの複合体の結晶構造から、UHRF1 が 2 つのヒストン修飾状態、非修飾状態の H3R2 とメチル化 H3K9 を組み合わせとして認識していることを明らかにした (図 1) (論文投稿中)。その認識において構造をとっていないヒストン H3 の N 末領域に  $\alpha$ -helix 構造が誘起されることを NMR 解析に基づいて明らかにした (図 1 右)。本知見は、同一ヒストン上の複数のエピジェネティック状態を同時にコードとして認識していることを明確に示す希少な結晶構造の一つであり、このことは国際的なエピジェネ

ック研究の観点から見ても重要な意義を持つ。また、UHRF1 の DNA 結合活性がヒストン結合ドメインにより制御されうること示した。この知見は、DNA メチル化とヒストン修飾の機能相関を示すものであり、エピジェネティック制御の最も重要な部分をあきらかにするためにも今後の研究の発展が期待されるものである。

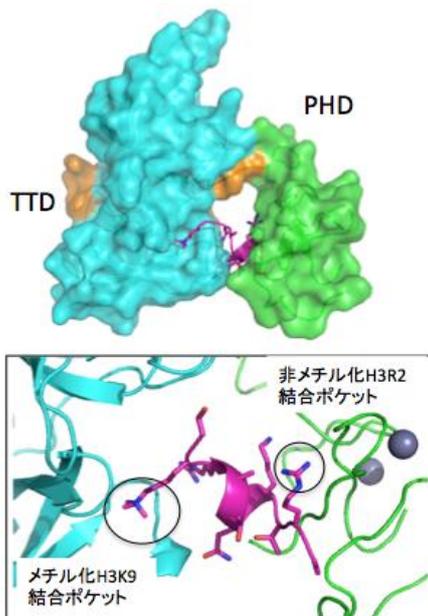


図1 TTD-PHD<sub>UHRF1</sub>:メチル化ヒストンH3複合体の結晶構造

③メチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) をもつたんぱく質ファミリーの一員である MBD4 は、MBD に加え、T/G ミスマッチ中のチミン塩基を切除する酵素ドメインを持ち、DNA ミスマッチ修復酵素として働く。MBD4 の MBD (MBD<sub>MBD4</sub>) は、メチル化 DNA に加え、T/G ミスマッチ塩基対を認識できることが知られているが、どのように多様な基質を認識するのかは不明である。そこで本研究では X 線結晶構造解析法を用いて、MBD<sub>MBD4</sub> による基質認識機構を明らかにすることを目指した。

MBD<sub>MBD4</sub> と、各種配列を含む DNA 断片との相互作用を定量するため、ITC により相互作用解析を行った。この実験より MBD<sub>MBD4</sub> は両鎖メチル化 (5mCG/5mCG)、その脱アミノ化産物である T/G ミスマッチ (5mCG/TG) を含む DNA 断片と、それぞれ解離定数 97.5 nM、98.8 nM と、同等の親和性で結合できることが明らかになった。対照実験として、同じく MBD ファミリーたんぱく質である MBD1 の MBD (MBD<sub>MBD1</sub>) を用いて同様の実験を行うと、T/G ミスマッチとの結合親和性はメチル化 DNA との親和性の 1/10 程度であり、多様な基質認識は、MBD4 に特有の機能であることが確認された。

MBD4 による多様な基質認識機構を原子レ

ベルで明らかにするため、X 線結晶構造解析法を用いて、MBD<sub>MBD4</sub> と 5mCG/5mCG、5mCG/TG を含む DNA 断片との複合体の立体

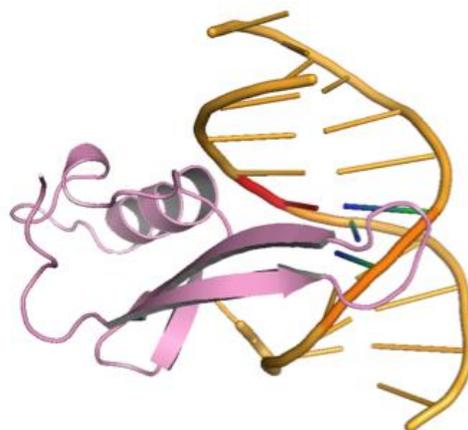


図2 MBD<sub>MBD4</sub>:DNA複合体の結晶構造

構造を決定した (図2)。得られた結晶構造を立体構造既知の他のファミリーたんぱく質の MBD の構造と比較すると、たんぱく質の骨格構造はよく保存されていた。しかし、DNA 結合表面のアミノ酸側鎖の配置に違いがあり、水和水のネットワークが形成されるなど、MBD4 の DNA 結合表面は他の MBD と比較して、柔軟な性質を持ち、5mCG/5mCG、5mCG/TG の両配列を、効率よく認識できることが明らかになった (図3)。このような水を介した多様な DNA 塩基認識機構は一般的なたんぱく質-DNA 相互作用研究においても興味深い新規の知見であり、さらに MBD4 が 5-メチルシトシンの酸化産物である 5-ヒドロキシメチルシトシン、5-カルボキシシトシン、5-ホルミルシトシンに結合する可能性を示唆している。これら 5-メチルシトシンの酸化産物が DNA 脱メチル化の中間体、あらたな DNA 上のエピジェネティックマークとして注目されている国際的な状況を考えると、今回得られた構造知見は、今後の DNA メチル化・脱メチル化制御の分子機構研究に新たな展開を与えるものと考えられる。

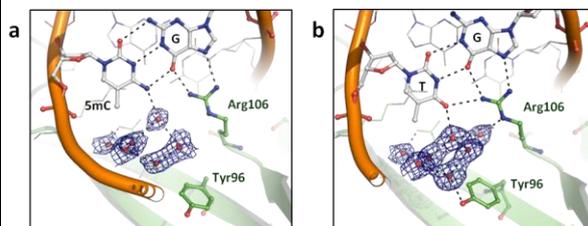


図3 MBD<sub>MBD4</sub>による5mCG/5mCG (a) およびMBD<sub>MBD4</sub>-5mCG/TG (b) の認識

Blue mesh: 水分子周囲の $2mF_o-DF_c$  電子密度 (1.0  $\sigma$ )  
Black dot line: 水素結合

## 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7件)

- ① Sekiyama, N., Jee, J., Isogai, S., Akagi, K.I., Huang, T.H., Ariyoshi, M., Tochio, H., Shirakawa, M., NMR analysis of Lys63 -linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80. *Journal of biomolecular NMR*, 査読有, vol. 52(4) pp. 339-350 (2012), DOI:10.1007/s10858-012-9614-9
- ② Isogai, S., Morimoto, D., Arita, K., Unzai, S., Tenno, T., Hasegawa, J., Sou, Y.S., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M., Tochio, H., Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 査読有, vol. 286(36) pp. 31864-74(2011), DOI:10.1074/jbc.M111.259630
- ③ Sekiyama, N., Arita, K., Ikeda, Y., Hashiguchi, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H. and Shirakawa, M., Structural basis for regulation of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45, 査読有, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78, pp. 1491-1502(2010), DOI:10.1002/prot.22667
- ④ Jee, J.-G., Mizuno, T., Kamada, K., Tochio, T., Chiba, Y., Yanagi, K., Yasuda, G., Hiroaki, H., Hanaoka, F. and Shirakawa, M. Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable to identify the key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins. *Journal of Biological Chemistry* 査読有, vol. 285(21) pp. 15931-40(2010), DOI:10.1074/jbc.M109.075333
- ⑤ Morimoto, D., Isogai, S., Tenno, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Ariyoshi, M., Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of Lys48-linked polyubiquitin chains. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 査読有, vol. 66(Pt7), pp. 834-7(2010), DOI: 10.1107/S1744309110018804
- ⑥ 有吉真理子、白川昌宏、エピジェネティ

ック制御における分子認識：DNA メチル化制御の構造生物学、*実験医学増刊*、査読なし、Vol. 28(15), pp. 107-114, (2010)

- ⑦ Isogai, S., Kanno, S., Ariyoshi, M., Tochio, H., Ito, Y., Yasui, A. and Shirakawa, M. Solution structure of a zinc-finger domain that binds to poly-ADP-ribose. *Genes to Cells*, 査読有、Vol. 15, pp. 101-110 (2010), DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01369.x

[学会発表] (計2件)

- ① 有田恭平, 杉田和也, 鶴木元香, 浜本隆二, 有吉真理子, 朽尾豪人, 白川昌宏、第33回分子生物学会年会、第83回日本生化学会年会、合同大会、H22年12月10日、神戸ポートアイランド
- ② Masahiro Shirakawa, Structural biology of epigenetic regulations and NMR observation of proteins in eukaryotic cells, A PRU research symposium, H22年11月24日、Kyoto University, Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 昌宏 (Shirakawa Masahiro)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：00202119

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

有吉 真理子 (Ariyoshi Mariko)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特任准教授  
研究者番号：80437243