

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25年3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370053

研究課題名（和文）ゲノムDNAのメチル模様維持機構に関する研究

研究課題名（英文）Mechanism of genome DNA maintenance methylation

研究代表者

田嶋 正二（TAJIMA SHOJI）

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50132931

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物ゲノムはしばしばメチル化修飾を受けている。DNAメチル化は、遺伝情報発現を抑制する要因の一つであり、発生・分化に欠くことができない。DNAメチル化模様は細胞が増殖するとき次世代の細胞に正確に伝えられる。このメチル化模様の正確な伝達にはDnmt1と呼ばれるDNAメチル化酵素の一つが働いている。研究では、Dnmt1が維持メチル化する機構と細胞内でメチル化模様の維持に必須な要因について、構造生物学的、生化学的考察を加えた。

研究成果の概要（英文）：

Vertebrate genome is often methylated. DNA methylation is one of the factors that suppresses gene expression, and is crucial for development. DNA methylation patterns of genome are inherited to next generation during replication. DNA methyltransferase called Dnmt1 is responsible for faithful propagation of DNA methylation patterns. In the project we have provided structural and biochemical insights into the maintenance methylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：DNAメチル化、DNAメチルトランスフェラーゼ、維持メチル化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、初期胚と生殖細胞形成期にゲノムDNAのメチル化模様は大きく書き換えられ、一旦形成されたDNAメチル化模様は、細胞系列特異的に維持される。DNAメチル化模様の維持は胚発生にとり必須であり、阻害されると多くの場合細胞や個体は死に至る。ゲノムに書き込まれたメチル化模様は、複製の過程で出

現する、片鎖だけがメチル化された（ヘミメチル化）DNAのCpG配列を選択的に認識してメチル化する酵素である、Dnmt1により維持されている。マウスDnmt1は1988年にcDNAが単離された、1,620アミノ酸残基からなる大分子である。その後さまざまな動物種から単離されているが、そのアミノ酸配列は良く保存されている。Dnmt1は複製フォークにPCNAと結合して

存在することから、細胞周期と連動していることが予想される。実際、Dnmt1は増殖期の細胞で高発現し、その蛋白質はS期に安定で、それ以外の細胞周期では半減期が短くなる。また、*Xenopus*初期胚でDnmt1の働きを阻害すると、細胞周期がG2-M期で停止する。このことは、Dnmt1が細胞周期のチェックポイント機構に深くかかわっていることを示している。しかし一方で例外的に、卵母細胞とニューロンでは、細胞が増殖していないにもかかわらず、高発現しており、しかも、細胞質に高濃度で存在する。いずれの細胞でも、細胞質はDnmt1を蓄える場となっていると考えられる。細胞質への局在化機構は不明であるが、申請時に我々は、Dnmt1のN末端と特異的に結合しリン酸化するキナーゼCDKL5を同定した。Dnmt1の、例えばリン酸化修飾などが細胞内での局在化に寄与している可能性が考えられる。Dnmt1の243 アミノ酸残基からなるN末端領域は独立の領域構造を形成しており、DNA結合モチーフ、PCNA結合部位、転写抑制因子DMAP1などを結合するプラットフォームとなっている。

Dnmt1は、ヘミメチル化DNAを特異的に認識してメチル化を入れ、それにより複製（あるいは修復された）DNAをフルメチル化して、メチル化模様を保持することが特徴であり、この性質のために維持型メチル化酵素であるとされている。このDnmt1の示す、ヘミメチル化DNAを認識してメチル基を導入する活性は、バクテリアから高等動物までの他のどのDNAメチル化酵素ももたない性質であり、そのヘミメチル化認識機構の解析は我々を含めて、多くの研究者の研究対象でありつづけている。しかしながらDnmt1は、C末端の触媒領域だけや、N末端調節領域を削り込んだものでは活性を示さないため、ヘミメチル化状態を認識する機構は酵素の発見以来ほとんど進んでいないといつてよい。生体内でDnmt1はヘミメチル化DNAを特異的にメチル化し、忠実にメチル化模様を維持している。着床前の胚体ではゲノム全体が脱メチル化を受けるが、メチル化インプリントを受けている遺伝子のメチル化模様は忠実に維持されることが知られている。以前、インプリント遺伝子の維持メチル化活性はDnmt1とは異なる酵素によるとの報告もあったが、申請時、このインプリント遺伝子のメチル化模様維持活性も、専らDnmt1だけによることを報告した。生体内でのDnmt1の忠実な維持メチル化活性に対して、組換えDnmt1を用いた試験管内の反応ではかなり高い*de novo*型のメチル化活性を示す。しかし、Dnmt1のメチル化活性は、生体内では新たなメチル化模様をゲノムに書き込まないとされている。

強いプロモーターの支配下にDnmt1を細胞内で発現させると、異常な*de novo*メチル化が誘導され、これにより細胞をトランスフォームさせる。また、筋芽細胞にDnmt1を発現させると*MyoD*遺伝子が高メチル化されることが観察される。さらに、核内でDnmt1はPCNAと結合して複製フォーク上を順次ヘミメチル化しながら移動していくと考えられているが、試験管内では、PCNA結合配列を欠くDnmt1でもDNA上をスライドして、順次ヘミメチル化DNAをメチル化していく。しかも、組換えDnmt1は20個のヘミメチル化CpG当たり1回メチル化を入れ損なう。これはDnmt1が生体内で、次世代の細胞に99%以上の信頼性でメチル化模様を伝えていることと大きな隔たりがある。2007年に我々は、生体内でメチル化模様を維持するにはNp95（別名Uhrf1）と呼ばれる因子が必須であることを明らかにした。Np95は分子内のSet and Ring associated (SRA) ドメインでヘミメチル化DNAに結合して、メチル化されたシトシン塩基を2重鎖DNAの外に引き出すことから、Dnmt1にヘミメチル化部位を確実に手渡す機能を担っている可能性が考えられる。しかし、その分子機構については明らかではない。このNp95によるヘミメチルDNA認識とDnmt1への引き渡しが細胞内での信頼性高いメチル化維持機構の実態である可能性が高い。

2. 研究の目的

脊椎動物ゲノムのCpG配列中のシトシン塩基は、しばしばメチル化修飾を受けている。シトシン塩基のメチル化は、遺伝情報発現に抑制的に働く“エピジェネティック”要因の一つであり、DNAのメチル化による遺伝情報制御は発生・分化に欠くことができない重要な役割を果たしている。メチル化模様は複製の過程で次世代の細胞に正確に伝えられる。この世代を超えたメチル化模様の伝達にはDnmt1と呼ばれるDNAメチル化酵素の一つが責任酵素として働いている。研究計画ではDnmt1について、ヘミメチル化（片鎖だけがメチル化された）DNAを認識する機構と、生体内でメチル化模様の維持に必須な因子であるNp95（別名Uhrf1）との共役について、構造生物学的、生化学的に明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

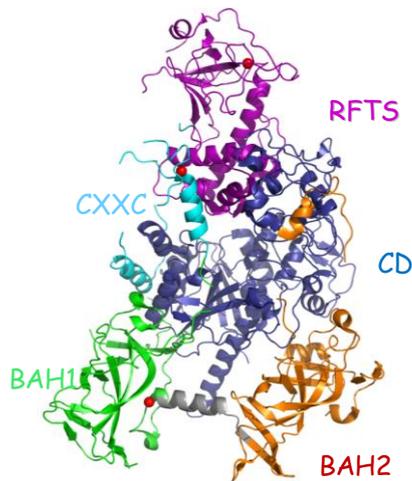
バキュロウイルス/昆虫細胞系で組換えDnmt1を発現、精製、結晶化し、SPring-8で回折データを収集する。2Å代の分解能のデータを収集できるまでこれを繰り返す。すでに得られた回折データと決定した位相から計算をおこない、Dnmt1の原子構造を決定する。構

造情報をもとにして、Dnmt1に部位特異的な変異、欠失を入れ、これら組換え体の試験管内での活性を解析するとともに、培養細胞内での維持メチル化活性への影響を解析、評価する。これによりDnmt1の維持メチル化活性に必要な領域と配列を同定する。また、Np95によるDnmt1のヘミメチル化DNAメチル化活性に対する影響を*in vitro*で解析し、ヘミメチル化DNAのNp95からDnmt1への受け渡し機構を明らかにする。

4. 研究成果

以前(2008年)報告したCDKL5キナーゼがDnmt1のN末プラットフォーム領域に結合し、結合部位をリン酸化することを報告したが、2010年には、カゼインキナーゼがこの領域に結合し、CDKL5よりも強いリン酸化をおこない、このリン酸化によってこの領域のDNA結合活性が阻害されることを見出した。

2011年度にマウスDnmt1のN末端のプラットフォーム領域を欠く、大きな断片(291-1620)のX線結晶構造を解くことに成功し、報告した(下図)。



得られた立体構造から以下の3つの新知見を得た。1) メチル基供与基質であるS-アデノシルメチオニンが触媒中心に結合することで、DNA結合非依存的に、メチル化標的シトシン塩基が結合すると予想される方向に触媒中心のシステイン残基側鎖が向くことを見出した。これは細菌の酵素で報告されているような、DNA結合に依存したシステイン残基の構造変化とは大きく異なる。2) 驚いたことに、Dnmt1を複製フォークにガイドするとされる標的化領域(TS)が、DNAが結合する触媒ポケットに嵌まり込んでいて、そのままでは基質DNAが触媒中心にアクセスできない配置となっていた。活性を発現するためには、このN末領域を触媒ポケットから排除する必要がある。この領域

は触媒領域とは4本の水素結合で固定されていた。3) 触媒領域の中心に位置する基質配列認識領域(TRD)の中のトリプトファン残基がメチル化されているシトシン塩基の近くに位置し、認識していることを予想した。この残基に変異を入れることによりDNAメチル化活性は失われた。以上得られた結果は、複製フォークでDnmt1がどのようにして標的のDNAをメチル化するのかについて、新知見を与えるものである。

ES細胞にDnmt1の各種欠失体を発現させ、その後内在的なDnmt1遺伝子をノックアウトさせ、ゲノム全体のメチル化状態と維持メチル化活性を解析したところ、ゲノムのメチル化模様維持にはPCNA結合配列は不要であり、TSは必要であった。また、TSがDnmt1の触媒ポケットに嵌まり込むことにより、ゲノムを異常なメチル化から守っていることを明らかにした。試験管内でDnmt1の活性に対するNp95の影響を解析し、Np95内のヘミメチル化を認識するSRA領域がTSと相互作用して、TSを触媒ポケットから取り除き、ヘミメチルDNAを触媒中心に供給していることを明らかにした。

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10件)

① Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., Ariyoshi, M., Shirakawa, M. Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4. *J. Biol. Chem.* **288**, 6351-6362, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.431098 (査読有)

② Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C. D., Otani, J., Kikugawa, Y., Shirakawa, M., Kimura, H., Nishimura, O., Aimoto, S., Tajima, S., and Suetake, I. Hinge and chromoshadow of HP1 α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **425**, 54-70 2013. doi: 10.1016/j.jmb.2012.10.018 (査読有)

③ Morita, S., Takahashi, R., Yamashita, R., Toyoda, A., Horii, T., Kimura, M., Fujiyama, A., Nakai, K., Tajima, S., Matoba, R., Ochiya, T., and Hatada, I. Genome-wide analysis of DNA methylation

and expression of microRNAs in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8259–8272, 2012. doi:10.3390/ijms13078259 (査読有)

④Horie, T., Suetake, I., Yanagisawa, E., Morita, S., Kimura, M., Nagao, Y., Imai, H., Tajima, S., and Hatada, I. The Dnmt3b splice variant is specifically expressed in *in vitro*-manipulated blastocysts and their derivative ES cells. *J. Reprod. Dev.* **57**, 579–585, 2011. (査読有)

⑤Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., and Tajima, S. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 9055–9059, 2011. doi: 10.1073/pnas.1019629108 (査読有)

⑥Suetake, I., Mishima, Y., Kimura, H., Lee, Y. H., Goto, Y., Takeshima, H., Ikegami, T., and Tajima, S. Characterization of DNA-binding activity in the N-terminal domain of the DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem. J.* **437**, 141–148, 2011. doi: 10.1042/BJ20110241 (査読有)

⑦Suzuki, K., Oneyama, C., Kimura, H., Tajima, S., and Okada, M. Down-regulation of the tumor suppressor C-terminal Src kinase (Csk)-binding protein (Cbp)/PAG1 is mediated by epigenetic histone modifications via the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 15698–15706, 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.195362 (査読有)

⑧Ross, J. P., Suetake, I., Tajima, S., and Molloy, P. L. Recombinant mammalian DNA methyltransferase activity on model transcriptional gene silencing short RNA-DNA heteroduplex substrates. *Biochem. J.* **432**, 323–332, 2010. doi: 10.1042/BJ20100579 (査読有)

⑨Yamashita, Y., Yuan, J., Suetake, I., Suzuki, H., Ishikawa, Y., Choi, Y. L., Ueno, T., Soda, M., Hamada, T., Haruta, H., Takada, S., Miyazaki, Y., Kiyoi, H., Ito, E., Tomoki Naoe, Tomonaga, M., Toyota, M., Tajima, S., Iwama, A., and Mano, H. Array-based genomic resequencing of human

leukemia. *Oncogene* **29**, 3723–3731, 2010. doi: 10.1038/onc.2010.117 (査読有)

⑩Sugiyama, Y., Hatano, N., Sueyoshi, N., Suetake, I., Tajima, S., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., and Kameshita, I. The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1 δ/ϵ . *Biochem J.* **427**, 489–497, 2010. doi: 10.1042/BJ20091856 (査読有)

[学会発表] (計 2 3 件)

①森田純代、マイクロ RNA とたんぱく質をコードする遺伝子のエピジェネティックな類似性と相違-次世代シーケンサーによる解析、第 35 回日本分子生物学会、2012. 12. 11、福岡国際会議場

②木村博信、*De novo* 型 DNA メチル化酵素 Dnmt3a2 とコリプレッサータンパク質 Trim28 の結合様式、第 35 回日本分子生物学会、2012. 12. 11、福岡国際会議場

③末武勲、H3K9me を含む再構成ヌクレオソームの調製と HP1 結合、蛋白研セミナー「エピゲノム解析の新技术とエピジェネティクス制御機構の新展開」 2012. 9. 28、大阪大学蛋白質研究所

④Shoji Tajima. Multi-step process of maintenance methylation. FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: From DNA and Histones to Disease, 2012. 8. 15, The Westin Conference Center, Snowmass Village, Colorado, USA. (招待)

⑤三島優一、ポリコーン群蛋白質複合体 (PRC2) によるヒストン H3K27 メチル化活性 -Suz12 の責任領域-、第 6 回日本エピジェネティック研究会年会、2012. 5. 15、学術総合センター (東京千代田区一ツ橋)

⑥末武勲、Dnmt1 による DNA 維持メチル化活性は領域の大きな再配置を伴う反応である、第 6 回日本エピジェネティック研究会年会、2012. 5. 15、学術総合センター (東京千代田区一ツ橋)

⑦長谷川貴志、Dnmt1 による DNA 維持メチル化の *in vivo* における責任領域、第 6 回日本エピジェネティック研究会年会、2012. 5. 14、学術総合センター (東京千代田区一ツ橋)

⑧石上進太郎、海洋無脊椎動物からの Dnmt1 阻害剤の探索、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012.5.14、学術総合センター（東京千代田区一ツ橋）

⑨竹下浩平、X線結晶構造から見る Dnmt1 のエピジェネティックマーク継承のメカニズム、第49回生物物理学会年会、2011.9.16、兵庫県立大学姫路書写キャンパス

⑩竹下浩平、X線結晶構造解析から考察する Dnmt1 による維持メチル化機構、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑪Ahmet C. Berkyurek、Dnmt1 と Np95/Uhrf1 の機能的な相互作用、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑫三島優一、ヘテロクロマチン蛋白質 1 α の再構成ヌクレオソームに対する結合の生化学的解析、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑬Chanika D. Jayasinghe、再構成ヌクレオソーム構造に対する HP1 γ の新規な結合様式、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑭木村博信 *De novo* 型 DNA メチル化酵素 Dnmt3a2 とコリプレッサータンパク質 Trim28 の結合様式の検討、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑮中村達郎、Dnmt1 の活性にはたす複製フォーク標的シグナル (RFTS) の役割、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑯大谷淳二、メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD4 による DNA 認識の構造基盤、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.5.1、KKR 熊本

⑰田嶋 正二、ゲノムメチル化模様の形成と維持、第1回フォーラム・イン・ドージン「エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ」、2010.11.26、熊本ホテルキャッスル

⑱田嶋正二、DNA メチル化の形成・維持機構、蛋白質研究所セミナー、「ゲノム機能の記憶の成立機序とその制御」2010.11.20、大

⑲ Isao Suetake, Binding specificity of heterochromatin protein 1 α , β , and γ to the reconstituted nucleosomes containing lysine 9 tri-methylated histone H3, JSPS Sweden-Japan Joint colloquium on Epigenetics, New Horizons in Japan and Scandinavia, 2010.9.6, Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

⑳畑田出穂、乳癌薬剤耐性がん細胞における microRNA 上流領域の DNA メチル化網羅的解析、第2回日本 RNAi 研究会、2010.8.27、グランドプリンスホテル広島

㉑堀居拓郎、体外操作胚や癌で特異的に発現する新規 Dnmt3b スプライシングバリエント、第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010.5.28、米子市文化ホール

㉒三島優一、リシン 9 をトリメチル化したヒストン H3 をもつ再構成ヌクレオソームに対する heterochromatin protein 1 α , β , γ の特異的な結合様式、第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010.5.28、米子市文化ホール

㉓末武勲、Heterochromatin Protein 1 アイソフォームの特異的な結合様式、第9回核ダイナミクス研究会、2010.5.27、ラフォーレ修善寺

[図書] (計1件)

①田嶋正二、編集、実験医学増刊「エピジェネティクスと疾患」、28巻18-25, 2010

[その他]

雑誌論文業績⑤について、その業績が発表雑誌同じ号にCommentaryとして取りあげられた。

Frauer, C. and Leonhardt, H. Twists and turns of DNA methylation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 8920, 2011

この業績については以下のホームページにも掲載された。

最新研究成果：ゲノムのメチル化模様維持を触媒する酵素の立体構造を解明

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/jpn/achievement/papers/structural-insight-into-maintenance.php>

ゲノムのメチル化模様維持を触媒する酵素の立体構造を解明—がん細胞を制御する創薬の開発につながる—

http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2011/110426

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 正二 (TAJIMA SHOJI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：50132931

(2) 研究分担者

中川 敦史 (NAKAGAWA ATSUSHI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：20188890

(3) 研究分担者

末武 勲 (SUETAKE ISAO)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：80304054