

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770145

研究課題名(和文)ゲノムDNAのメチル化模様継承を調節する酵素の構造生物学的分子基盤研究

研究課題名(英文)Structural study of maintenance methylation by Dnmt1

研究代表者

竹下 浩平 (Takeshita, Kohei)

大阪大学・たんぱく質研究所・招へい研究員

研究者番号：80346808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAのシトシン塩基のメチル化は遺伝子発現を抑制するエピジェネティックな機構である。DNA複製直後の新生鎖上のシトシンは非メチル化状態であるヘミメチル化DNAとなっている。Dnmt1はヘミメチル化DNAを認識し完全なメチル化状態へと修復する。我々はマウスDnmt1のX線結晶構造解析に成功し、その構造情報をもとに基質複合体の結晶構造解析に取り組み、基質複合体の調製に成功した。また完全長Dnmt1の結晶構造解析にも取り組み、約3.8 Åでの結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：The methylated cytosine in genome is epigenetic regulation of gene expression. After the end of DNA replication, newly DNA double strand chain has become hemimethylated state, these cytosine bases in daughter chain is undermodification. Dnmt1 modifies hemimethylated DNA to complete methylated DNA, then Dnmt1 maintain methylated cytosine pattern in genome. In the research project, we aimed to reveal the molecular mechanism of the maintenance methylation by Dnmt1. we succeeded to prepare Dnmt1 and substrate complex protein. Also, we succeeded to determine a full-length Dnmt1 at 3.8 angstrom.

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メチルトランスフェラーゼ1 X線結晶構造解析 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA のシトシン塩基のメチル化は塩基配列を変化させることなく遺伝情報発現に抑制的に働くエピジェネティックな機構の1つである。多くの場合、DNA のメチル化位置は複製後に親 DNA 鎖のメチル化位置が娘 DNA 鎖へコピーされることにより継承される。このコピー反応は DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (Dnmt1) が、DNA 複製直後の親鎖のみがメチル化された片方メチル化状態 (ヘミメチル化状態) を特異的に認識してメチル基を導入する“ヘミメチル化反応”によって行われる (Siedlecki P et al. 2006, *Acta Biochimica Polonica*)。このヘミメチル化反応によるメチル化模様の継承は高等生物にとって必須な反応であり、Dnmt1 をノックアウトさせたマウス (Dnmt1^{-/-}) は初期胎生致死である。さらに Dnmt1 はがん細胞で活性が亢進していて新規抗がん剤のターゲットになっており (Stresemann C et al. 2006, *Cancer Research*)、最近では Dnmt1 の活性を抑制すると iPS 細胞の生産効率が上がるという報告もある (Mikkelsen TS et al. 2008 *Nature*)。

このように Dnmt1 の酵素反応機構の詳細を明らかにすることは様々な応用研究に重要な基礎的情報となることは疑いないが、Dnmt1 のヘミメチル化反応に関する基質特異性や活性化機構については詳細に分かっていないところが多い。一般的にシトシンメチルトランスフェラーゼ (C5-MTase) は DNA の CG 配列のシトシンの 5 位に特異的に新規にメチル基を入れる。この新生メチル化酵素はバクテリアから高等生物で数多く見つかっており、特にバクテリアの C5-MTase である HhaI は生化学的研究や X 線結晶構造解析から詳細にその反応機構が理解されている。したがって Dnmt1 の反応機構についても HhaI 研究を基礎として、例えば構造モデリングを行うことで反応機構が議論されているが、何故、Dnmt1 のみがヘミメチル化状態の DNA を特異的に認識できるのか、明確に理解されていない。

ごく最近になって、我々はマウス Dnmt1(mDnmt1)の X 線結晶構造解析に成功し、その構造が既知の HhaI の構造と大きく異なることを見出した (研究開始当時は論文準備中)。HhaI の構造と重ね合わせると、触媒領域の活性中心は非常に良く似た構造であったものの、触媒中心と対称位置に大きく張り出した新たなドメイン構造が存在していることが分かり、これがヘミメチル化 DNA (hMe-DNA) のメチル化シトシンの認識ドメインであることが示唆された (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では DNA メチルトランスフェラー

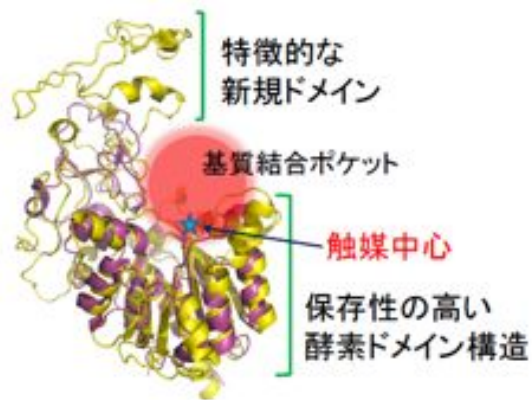


図 1 : Dnmt1(黄)と HhaI(紫)の酵素ドメインの構造重ね合わせ図。基質結合ポケットをはさんで触媒中心(☆)と対称位置に他のメチルトランスフェラーゼでは見られない新規ドメイン構造が存在する。

ゼ 1 (Dnmt1) の基質特異性を中心とした酵素反応機構に迫る。メチル化反応は主に新生メチル化と維持 (継承) メチル化の 2 つに大別され、Dnmt1 は後者を触媒する高等動物に必須の生体分子である。維持メチル化反応は DNA 複製後に生じる娘鎖がメチル化されていない状態である片一方メチル化状態の DNA (ヘミメチル化状態) へ、親鎖と同じ位置にメチル基を修飾する反応である。

申請者は本研究課題開始後に発表したマウス Dnmt1 の X 線結晶構造解析結果と、その構造情報基盤から、Dnmt1 とヘミメチル化 DNA との複合体の結晶構造を明らかにすることで、Dnmt1 の基質特異性を中心とした酵素反応機構を明らかにする。

よって本研究では mDnmt1 の結晶構造結果を基盤にして、最適な長さで配列の hMe-DNA を設計し、mDnmt1/hMe-DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行う戦略で哺乳類 Dnmt1 の hMe-DNA の認識機構を明らかにし、ヘミメチル化反応の分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mDnmt1/hMe-DNA 複合体の調製

結晶化に成功しているマウス由来 Dnmt1 (N 末端の 290 番目までのアミノ酸配列は欠損させた試料、291-mDnmt1 と呼ぶ) をはじめとして、合成 hMe-DNA との複合体の結晶構造解析を目指す。291-mDnmt1 をはじめとするリコンビナント Dnmt1 は昆虫細胞発現系より得ることができる (Suetake I, et al. 2006 *JB*)。我々が明らかにした mDnmt1 の結晶構造の触媒ポケットのサイズ (35-40Å) から hMe-DNA の長さは最低でも 10bp は必要であると考えられた (図 2)。さらに HhaI と DNA の複合体の既知構造から 15bp ~ 25bp の長さの hMe-DNA を使うことが妥当であることも考慮し設計した。ヘミメチル化状態の基質を調製するために、一方の合成オリゴはシトシン塩基がメチル化されたもの

を準備する。合成基質の配列に関しては様々な MTase や関連性のある構造解析の成功例を参考にした。具体的なには、生体内で Dnmt1 と共役してヘミメチル化反応に必須である Np95 の hMe-DNA との複合体の結晶構造解析例をもとに配列設計を行う (Arita K et al. 2008, *Nature*)。

準備した 291-mDnmt1 と基質である hMe-DNA を溶液中で混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーで複合体のみを単離することで mDnmt1/hMe-DNA 複合体を調製する。

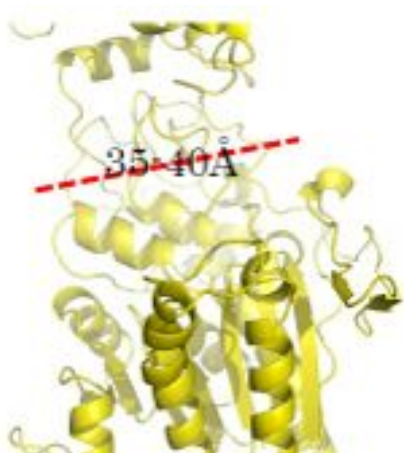


図 2 : Dnmt1 の触媒ポケットは約 40Å であり、およそ 10bp の DNA の長さに相当する

(2) 特異的に hMe-DNA と複合体を形成させるための Dnmt1 の設計

291-mDnmt1 の結晶構造から触媒ポケットは N 末端側のドメイン (図 3 : 赤色の構造, Replication foci target sequence; RFTS) によってプラグ様にキャップされていることが明らかとなった。実際に、結晶化につかった試料は試験管内でヘミメチル化反応活性を示すことが証明されており、従って hMe-DNA が結合するときは RFTS が触媒ポケットから外れると考えられる。しかし RFTS のプラグ様構造が外れるための活性化エネルギーが、安定に hMe-DNA を結合するために不利に働く可能性もあるため RFTS を欠損させた Dnmt1 (delRFTS) を調製し複合体形成を検討する。さらに DNA 結合モチーフである CXXC モチーフも触媒ポケットの脇に隣接している (図 2 : 水色の構造)。よって非特異的な DNA の結合が考えられ、均一な複合体を形成できない可能性が考えられる。よってこの CXXC まで欠損させた Dnmt1 (delRFTS-CXXC) を調製し複合体形成条件を探索する。これらの 3 種類の Dnmt1 (291-mDnmt1, delRFTS, delRFTS-CXXC) を調製し hMe-DNA と複合体を形成させる。delRFTS と delRFTS-CXXC の発現系の構築に関しては結晶構造解析に成功している 291-mDnmt1 の発現系を参考に行う。

(3) 複合体の調製

複合体の単離はゲルろ過クロマトグラフィーで行うが、準備した 3 種類の mDnmt1 と hMe-DNA の結合力が弱い場合、ゲルろ過カラムに流すあいだに分離してしまうことも考えられる。この場合の対応として pH の検討やイオン強度を下げるといった方法で安定な複合体を調製することを検討する。それでも複合体を形成しない場合は mDnmt1 と hMe-DNA を高濃度で、1:1 モル比で混合し、その混合溶液を使って結晶化スクリーニングを行う。

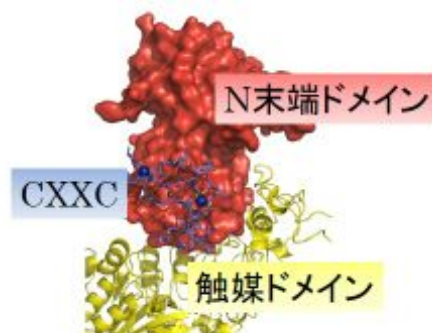


図 3 : 触媒ポケット(黄)に Dnmt1 の N 末端側ドメイン RFTS (赤)がプラグ様にはまり込んでいる。さらにその脇には CXXC モチーフ (青) が存在しており触媒ドメインの周辺の構造は複雑である。

(3) X 線回折データ収集と構造解析

所内に設置されてる室内線源および、大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県播磨市) に設置されている大阪大学蛋白質研究所の生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU) を使用する。特に BL44XU の高輝度な放射光を使うことで、高分解能で良質な回折データを収集する。構造解析については既に明らかとなっている Dnmt1 の構造をもとに分子置換法で構造決定を行う。

4. 研究成果

(1) 291-mDnmt1 の結晶構造

本研究課題の申請時には 291-mDnmt1 の結晶構造解析には成功していたが、論文投稿準備中であったため、まず簡単に論文に受理された研究内容を説明する必要がある。我々は 291-mDnmt1 の結晶構造を分解能 2.85Å で決定した (図 4)。結晶構造解析の結果から、触媒ポケットに RFTS が結合して hMe-DNA の結合ポケットと競合していること、メチル基供与体 AdoMet が結合することで、触媒中心であるシステイン残基が基質結合ポケット側を向くことが分かった。この結晶構造から Dnmt1 はメチル化模様を次世代細胞に継承する反応は多段階的なステップによって達成される複雑な反応系であり、この複雑さが正確な維持メチル化機構を実現していると考えられた (Takeshita K et al, 2011*Proc Natl Acad Sci U S A*)。基質であ

る hMe-DNA との複合体の結晶構造を明らかにするためには、この RFTS が触媒ポケットから遊離した状態であることが望ましいと考えられた。

(2) 複合体実験

hMe-DNA 複合体を形成させるために、既に結晶構造解析に成功している 291-mDnmt1 と RFTS 欠損体 (delRFTS, 601-1620 残基) ならびに RFTS と CxxC モチーフ欠損体 (delRFTS-CXXC, 710-1620 残基) の 3 種類の蛋白質を調製した。また、片方メチル化 DNA を基質とするために、二本鎖のうち片方の合成 DNA のみにメチル基を導入し、メチル基を導入していない相補鎖 DNA とアニールすることで hMe-DNA を調製した。基質である hMe-DNA として 12, 19, 24, 42 塩基長の合成 DNA を準備した。複合体形成は蛋白質と基質を、20mM HepesNa, 50mM NaCl (pH7.0) バッファー中で、2 倍モル比で混合することで行い、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 GL, GE healthcare) にて複合体形成の評価を行ったが、複合体を検出することはできなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーによって複合体が解離している可能性も否定できなかったため、蛋白質と基質の混合溶液を用いて結晶化スクリーニングを行った。蛋白質試料として 291-mDnmt1 と delRFTS を用い、基質として 19, 24mer の hMe-DNA を用いた。結晶化スクリーニングには微量結晶化システム TOPAZ (Fluidigm Corporation) を用いた。結果、六方形の結晶を得ることができたため、大型放射光施設 SPring-8 の BL44XU ビームラインにて回折実験を行った。回折パターンより、この結晶は基質である hMe-DNA の結晶である可能性が高いことが判明した。結果、通常の hMe-DNA を基質として用いた試験管内で Dnmt1 と hMe-DNA の複合体の結晶化試料を得ることができなかった。

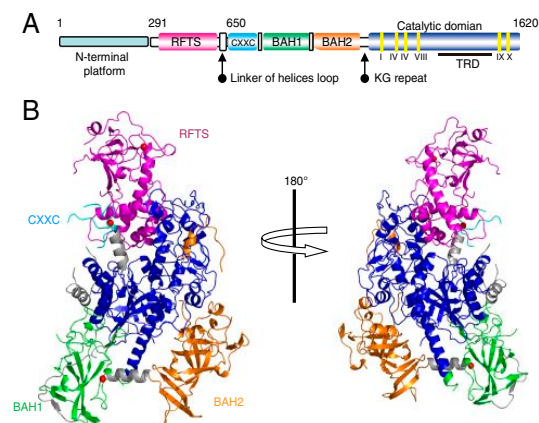


図 4: 291-mDnmt1 のドメイン構造 (A) と結晶構造 (B)。

(2) 共有結合性 DNA 基質を用いた複合体形成実験ならびに回折実験

複合体を調製できなかった理由として hMe-DNA の Dnmt1 に対する結合力の問題が考えられた。そこで共有結合性の hMe-DNA を用いて安定な複合体を形成させることを試みた。共有結合性の基質とは、メチル化シトシン鎖の相補鎖側のシトシンを 5-fluoro-deoxycytosine とすることで、Dnmt1 の触媒残基のシステイン残基と共有結合を形成させることができる基質である。この基質を F オリゴと呼ぶ。F オリゴはメチル化合成 DNA (5'-GCAATCC*GGTAG-3', C*: メチル化シトシン) と、5-fluoro-deoxycytosine を導入した F-DNA (5'-CTACFGGATTGC-3', F: 5-fluoro-deoxycytosine) をアニールすることで調製した。291-mDnmt1, delRFTS, delRFTS-CXXC と F オリゴの複合体をそれぞれ調製した。F オリゴと共有結合させるためにメチル基供与体 AdoMet を添加し、20°C で一晩静置することで複合体形成反応を行った。複合体形成評価はゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200 GL, GE healthcare) にて行った。クロマトチャートを見てみると、F オリゴを加えていない 291-mDnmt1 に比べ、delRFTS の場合は核酸の最大紫外吸収波長である 260nm の紫外吸収が増加していた (図 5)。

このことから F オリゴが結合することで 260nm の吸収の増加が見られたと考えられ、delRFTS と F オリゴの複合体を調製できたと判断した。また、delRFTS-CXXC への結合が確認されなかったことから CXXC は hMe-DNA への結合に何らかの影響を及ぼしていることが推測される。さらに 291-mDnmt1 への結合も確認されなかったことは RFTS が触媒ポケットに入り込み基質の結合が阻害されていることが予測される。

精製した delRFTS-F オリゴ複合体の結晶化スクリーニングを行った。結晶化スクリー

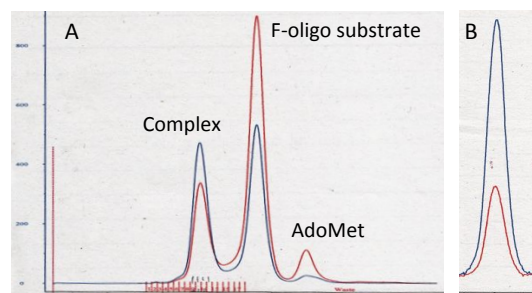


図 5: delRFTS と F オリゴのゲルろ過クロマトグラフィー精製 (青線: 280nm, 赤線: 260nm)。F オリゴを加えていない Free の delRFTS のクロマトチャート (B) に比べ、複合体のピーク (A, Complex) の 260nm/280nm の比率が高い。F オリゴが delRFTS へ結合した影響であると考えられる。

ニングには市販のスクリーニングキットを用い、約 2000 条件の結晶化スクリーニングを行った。結果、微結晶と思われる結晶を得ることが出来たが回折実験において回折斑点を確認することはできなかった。

我々が delRFTS-F オリゴ複合体の結晶構造解析を行っていた同時期に、Dnmt1 と hMe-DNA との複合体の結晶構造が報告された (Song J et al. 2012, Science)。Song らも F-オリゴを用いて結晶構造を明らかにしていた。また F-オリゴが結合していない Free の Dnmt1 をヘパリンカラムを用いることで除去し、高純度の複合体試料を調製していたため、結晶構造解析に成功したと考えられる。

(4) 完全長 Dnmt1 の結晶構造解析

Song らによって Dnmt1 とヘミメチル化 DNA の結晶構造が明らかにされ基質認識機構についての知見が得られたが、1 つ大きな問題が残っている。それは我々の結晶構造の知見により得られた、触媒ポケットに RFTS がはまり込んでいるということである。基質である hMe-DNA が結合するときには RFTS が触媒ポケットから遊離する必要がある。実際に、本研究課題において 291-mDnmt1 と基質となる様々な合成 DNA の複合体を調製することはできていない。したがって Dnmt1 によるメチル化模様維持反応と RFTS による基質結合における自己阻害の共役機構を明らかにする必要があると考えられた。そこで生体内で機能している完全長の Dnmt1 として卵母細胞に特異的に発現する Oocyte-type の完全長 Dnmt1 (oDnmt1) の結晶構造解析

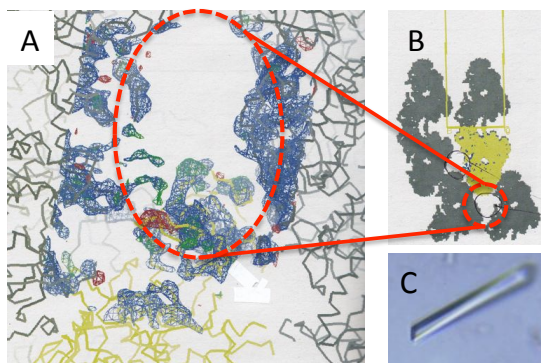


図 6 : oDnmt1 の結晶構造。oDnmt1 の N 末端側の領域である 119-291 番目領域が入ると考えられる空間を赤点線円で示す (A, B)。oDnmt1 の結晶 (C)。

を試みた。oDnmt1 は Dnmt1 の N 末端が 118 残基分だけ欠損したものと同じ配列である。大量発現、精製は 291-mDnmt1 と同じ方法で精製を行った。結晶化スクリーニングは同様に市販の結晶化スクリーニングキットを使用した。その結果、一軸が長い斜方形の結晶を得ることに成功した (図 6 C)。得られた結晶を SPring-8 の BL44XU ビームラインにて回折実験を行ったところ、約 3.8Å 分解能の回折データの取得に成功した。すでに我々が

明らかにした 291-mDnmt1 の結晶構造 (PDB ID:3AV4) をテンプレートとして分子置換法によって構造決定を行った (図 6 A)。得られた結晶構造を見てみると、N 末端の電子密度が鮮明ではなく完全にモデルを置くことはできなかった。結晶中の分子パッキングから、おそらく N 末端側は図 6 B の点線円内に存在していると考えられる。

(4) RFTS と hMe-DNA の競合的な結合

2011 年に報告した Dnmt1 の結晶構造の共著者である田嶋正二教授らは、RFTS と Np95 の維持メチル化反応の協調性についての報告している (Berkyurek AC et al, 2014, J. Biol. Chem.)。この報告では、RFTS を触媒ポケットから遊離させる分子として Uhrf1 (Np95) のヘミメチル化 DNA 認識ドメイン (SRA) と RFTS との相互作用解析によって、SRA が RFTS を触媒ポケットから放り出し、基質ヘミメチル化 DNA が触媒ポケットに近づくことができることを示している。この生化学的な実験から RFTS を触媒ポケットから引っ張り出すために Np95 が必要であることが示唆される。したがって RFTS を含む Dnmt1 と基質あるヘミメチル化 DNA との複合体を形成させるためには、Np95 の添加が必要であると考えられる。現時点で人為的な欠損領域のない完全長の Dnmt1 として oDnmt1 を得る事ができていないため、その oDnmt1 を中心として Np95 を共存させた環境において基質 DNA を添加すれば、RFTS を含む Dnmt1 の基質認識機構を原子レベルで解明できると考えられ、今後の課題となると考えられる。

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Berkyurek AC, Suetake I, Arita K, Takeshita K, Nakagawa A, Shirakawa M, Tajima S. The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger-associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA. *J Biol Chem.* 2014 Jan 3;289(1):379-86. doi:10.1074/jbc.M113.523209. Epub 2013 Nov 19. (査読あり)
- ② Takeshita K, Suetake I, Yamashita E, Suga M, Narita H, Nakagawa A, Tajima S. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 31;108(22):9055-9. doi:10.1073/pnas.1019629108. Epub 2011 Apr 25. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 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。末武 勲、中村 達郎、ベルキュレク アハメ

トジャン、竹下 浩平、中川 敦史、田嶋 正二、第 6 回 日本エピジェネティクス研究会 年会、2012 年 5 月 14-15 日、学術総合センター

② Dnmt1 の X 線結晶構造から考察する維持メチル化機構. 竹下浩平 「神経科学と構造生物学の融合」(大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会) 2011 年 11 月 21 日, 22 日 (岡崎コンファレンスセンター)

③ 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. 竹下浩平、末武勲、山下栄樹、菅倫寛、成田宏隆、中川敦史、田嶋正二 第 49 回生物物理学学会 年会 2011 年 9 月 16-18 日 兵庫県立大学 書写キャンパス

④ Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1. Takeshita K, Suetake, I., Yamashita, E., Suga, Narita, H., Nakagawa, A., Tajima S., International Union of Crystallography (IUCr) 22-30 August 2011, Madrid Spain

⑤ Dnmt1 によるメチル化模様維持機構に関する構造生物学的研究. 竹下浩平、末武勲、山下栄樹、菅倫寛、成田宏隆、中川敦史、田嶋 正二、第 11 回日本蛋白質科学会年会 2011 年 6 月 7-9 日 ホテル阪急エキスポパーク

⑥ X 線結晶構造から考察する Dnmt1 による維持メチル化機構. 竹下浩平、末武勲、山下栄樹、菅倫寛、成田宏隆、中川敦史、田嶋正二、第 5 回日本エピジェネティクス研究会 年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

[その他]

大阪大学蛋白質研究所・最新研究成果 (2011)
Structural insight into maintenance methylation by mouse Dnmt1

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/jpn/achievement/papers/the-dna-methyltransferase-dnmt.php>

大型放射光施設 SPring-8 プレスリリース・トピックス (2011)

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ーがん細胞を制御する創薬の開発につながるー (プレスリリース)

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹下 浩平 (TAKESHITA Kohei)

大阪大学蛋白質研究所・超分子構造解析学研究室・招へい研究員

研究者番号：80346808