

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840025

研究課題名(和文)メチル化DNAを含むヌクレオソームの構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structural analysis of nucleosome containing methylated DNA

研究代表者

越阪部 晃永(Osakabe, Akihisa)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：70632107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、DNAのメチル化がクロマチンの高次構造へ与える影響を構造生物学的手法によって明らかにすることである。これまでの報告により、様々ながん細胞におけるDNAメチル化の異常とヘテロクロマチン構造の不安定性が示されたが、その詳細は明らかにされていなかった。そこで、本研究を遂行するために、肝臓がん細胞における低メチル化が報告されているサテライト2配列に着目し、メチル化DNAを含むヌクレオソームを再構成した。再構成ヌクレオソームを用いた生化学的解析およびX線結晶構造解析を行った結果、DNAのメチル化はヌクレオソームのポジションおよびDNA末端領域の運動性に影響を与えることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the mechanism how DNA methylation affects the chromatin structure. To this end, we reconstituted the nucleosome containing methylated DNA, and performed the biochemical and structural analyses of reconstituted nucleosomes. We determined the crystal structure of the nucleosome containing methylated DNA, and found that DNA methylation does not affect the intrinsic DNA wrapping property of the nucleosome. Furthermore, we found that the DNA methylation affects the translational position of the nucleosome and the flexibility of DNA ends of the nucleosome.

研究分野：分子生物学、生化学、構造生物学

キーワード：メチル化DNA ペリセントロメア ヘテロクロマチン ヒストン ヌクレオソーム クロマチン

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、細胞核内のタンパク質群とクロマチンを形成して高次に折りたたまれ細胞核内に収納されている。ヌクレオソームはクロマチンの基盤構造であり、各 2 分子のコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) からなるヒストン 8 量体におよそ 150 塩基対の DNA が左巻きに巻きついた円盤状の構造体である【文献 1】。

CpG ダイヌクレオチドのシトシン塩基のメチル化は、真核生物で古くから報告されている塩基修飾の 1 つである。DNA のメチル化が発生や分化をエピジェネティックに制御する遺伝子群の発現調節に深く関与することが知られている。そのためゲノム DNA のメチル化機構は、エピジェネティクス研究分野において極めて重要であると考えられている。さらに、DNA のメチル化の異常ががん細胞で検出されていることから、DNA のメチル化はゲノム DNA の恒常性維持に重要であることが近年の報告により指摘されている【文献 2, 3】。これまでに、ある種のがん細胞で、セントロメア近傍のペリセントロメア領域におけるサテライト DNA のメチル化レベルの減少と、それに伴うヘテロクロマチン構造の不安定化が報告された【文献 4-7】。しかし、DNA のメチル化がクロマチンの構造へ与える影響は未だ不明であった。

<引用文献>

Luger, K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at $\square 2.8 \text{ \AA}$ resolution. *Nature* 389, 251–260 (1997).

Huang, T. H. *et al.* Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 8, 459 – 470 (1999).

Tsou, J. A. *et al.* DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 21, 5450 – 5461 (2002).

Li, J. *et al.* The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE* 9, e106290 (2014).

Saito, Y. *et al.* Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 33, 561 – 568 (2001).

Kokalj-Vokac, N. *et al.* Specific induction of uncoiling and recombination by azacytidine in classical satellite-containing constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 63, 11 – 15 (1993).

Jeanpierre, M. *et al.* An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2, 731 – 735 (1993).

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNA メチル化がクロマチンの高次構造形成に与える影響を明らかにすることである。そこで本研究では、肝臓がんにおいてメチル化レベルの低下が報告されているサテライト 2 DNA 配列に着目し、クロマチンの基盤構造であるヌクレオソームを試験管内で再構成し、生化学および構造生物学的手法によって、DNA メチル化のヌクレオソーム構造への影響を明らかにすることを目的とした。本研究の達成により、DNA のメチル化によるクロマチン構造変換

を介した、がんや神経発生などにみられるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明に重要な知見を与えることが期待される。

3. 研究の方法

本研究を遂行するために、サテライト 2 DNA 配列中の CpG ダイヌクレオチドを原核生物由来の M.SssI DNA メチル基転移酵素によってメチル化した。精製したメチル化サテライト 2 DNA と精製ヒストンタンパク質を用いて、塩透析法によってヌクレオソームを試験管内で再構成した。本研究では、再構成に用いるヒストンは、研究代表者らが確立した手法によって精製したりコンビナントタンパク質を使用した【文献 8】。

DNA のメチル化がヌクレオソームのポジションへ与える影響を明らかにするために、再構成したヌクレオソームに対してマイクロコッカルヌクレアーゼを添加し、ヌクレオソームの形成によって保護された DNA 断片の配列を次世代シーケンサーによって網羅的に解析した。

DNA のメチル化がヌクレオソームの構造へ与える影響を明らかにするために、メチル化 DNA を含むヌクレオソームを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。そして、得られた単結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 および Photon Factory にて X 線回折実験を行った。取得した回折データから、メチル化 DNA を含むヌクレオソームの立体構造を分子置換法によって決定した。

また、DNA のメチル化がヌクレオソーム中の DNA の運動性へ与える影響を明らかにするために、再構成ヌクレオソームのマイクロコッカルヌクレアーゼに対する感受性を評価した。

Tachiwana, H. *et al.* Structural basis of instability of the nucleosome containing a

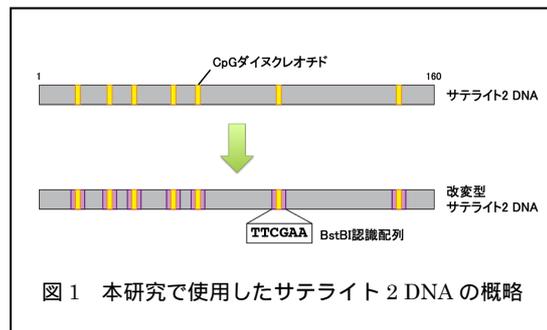
testis-specific histone variant, human H3T.

□ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107,

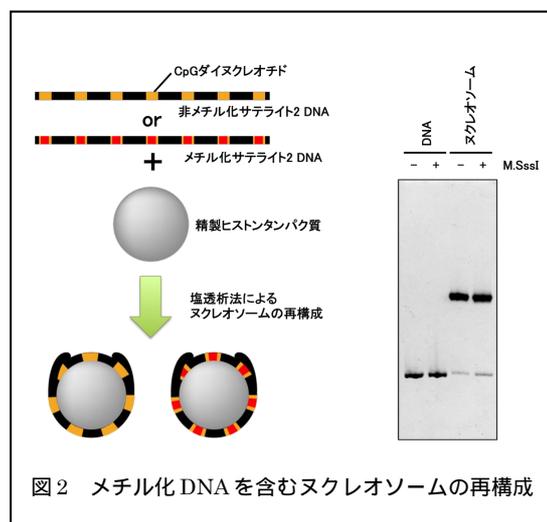
10454–10459 (2010). □

4. 研究成果

本研究では、肝臓がんでの低メチル化が報告されているサテライト 2 DNA 配列に着目した。メチル化されたサテライト 2 DNA を高純度を得るために、サテライト 2 DNA 配列中に存在する 7 箇所全ての CpG を、非メチル化 CpG を含む配列を切断する BstBI 制限酵素の認識配列に置換した(図 1)。これにより、M.SssI DNA メチル化転移酵素によってサテライト 2 DNA のメチル化反応を行ったのち BstBI を添加することで、7 箇所全てがメチル化されたサテライト 2 DNA を得ることが可能となった。



そして、このようにして得られたメチル化 DNA と精製ヒストンタンパク質を用いて、メチル化 DNA を含むヌクレオソームを塩透析法によって試験管内で再構成した(図 2)。



これまでの報告により、DNA のメチル化

とヌクレオソームのポジションに相関があることが示されていた。そこで、DNA のメチル化によるヌクレオソームのポジションの変化を明らかにするために、サテライト 2 DNA を含む再構成ヌクレオソームに対してマイクロコッカルヌクレアーゼを添加し、ヌクレオソームの形成によって保護された DNA 断片を次世代シーケンサーによって網羅的に解析した。その結果、DNA のメチル化によってヌクレオソームのポジションが変化することが明らかになった。

さらに、ヌクレオソームの構造に対するメチル化 DNA の寄与を明らかにするために、メチル化 DNA を含むヌクレオソームの結晶化を行い、X 線結晶構造解析を行った。なお、メチル化 DNA を含むヌクレオソームの結晶化を行うために、次世代シーケンサーによってヌクレオソームの形成が確認された 146 塩基対程度の DNA 断片を新たに大量調製した。再構成ヌクレオソームの X 線結晶構造解析の結果、DNA のメチル化はヌクレオソームの構造に大きな変化を与えないことが明らかになった。

次に、溶液中におけるヌクレオソームの DNA 末端の運動性が DNA のメチル化によって変化するかを、マイクロコッカルヌクレアーゼを用いた生化学的解析によって評価した。その結果、各ポジションに依存して、ヌクレオソームの DNA 末端の運動性が異なることが示唆された。そして、各ポジションにおけるヌクレオソーム DNA 末端の運動性の違いは、DNA のメチル化によって均一化されることが明らかになった。これらのことから、DNA のメチル化は、ヌクレオソームのポジションの違いによる DNA の運動性の差異を解消することによって、安定かつ均一なクロマチン構造を形成することが考えられた(図 3)。以上の成果は、研究代表者が第一著者として Open Biology 誌に掲載された。

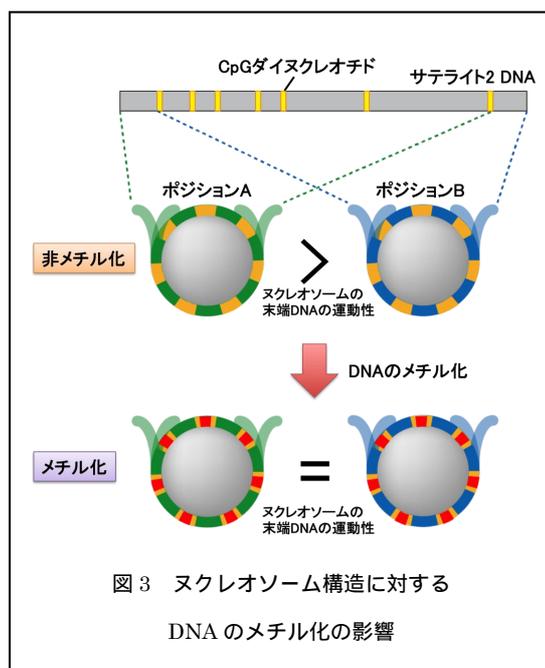


図 3 ヌクレオソーム構造に対する DNA のメチル化の影響

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 1件)

査読あり。*コレスポンディングオーサー

1. Osakabe, A., Adachi, F., Arimura, Y., Maehara, K., Ohkawa, Y., and *Kurumizaka, H. (2015) Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA. *Open Biology*, 5(10), 150128. DOI: 10.1098/rsob.150128.

[学会発表](計 2件)

1. Osakabe, A., Adachi, F., Arimura, Y., Horikoshi, N., Ohkawa, Y., and Kurumizaka, H. Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing methylated DNA. EMBO Workshop: Histone Variants (2014年6月2-4日, Strasbourg, France)
2. 越阪部晃永, 足立風水也, 有村泰宏, 堀越直樹, 大川恭行, 胡桃坂仁志 メチル化 DNA を含むヌクレオソームの生化学

的・構造生物学的機能解析 第8回日本
エピジェネティクス研究会年会(2014年
5月25-27日、東京)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kurumizaka.sci.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越阪部 晃永 (OSAKABE, Akihisa)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：70632107