

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570130

研究課題名（和文） DNA メチル化酵素の構造と機能に関する研究

研究課題名（英文） Study for structure and function of DNA methyltransferase

研究代表者 末武 勲（SUETAKE ISAO）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：80304054

## 研究成果の概要：

本研究では、ゲノムDNA上のメチル化模様の形成機構を生化学的に理解することを目指し、DNAメチル化酵素(Dnmt)の性質を再構成したヌクレオソームを基質にして詳細に試験管内で解析を行った。その結果、DNA上に新規なメチル化模様を書き込むタイプのDnmt3aは、ヌクレオソームの高次構造に依存したメチル化活性を示すという新たな知見が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：(1) DNA メチル化

(2) DNA メチルトランスフェラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の受精卵（胚）が正常な発生をするためには、親から受け継いだ DNA 塩基配列に書きこまれた遺伝情報だけでなく、塩基配列の変化（突然変異や組み換えなど）を伴わない“エピジェネティック”な要因が大きく関与することが近年明らかになっている。このエピジェネティックな調節機構にはいくつかあるが、その1つにDNAのメチル化修飾がある。

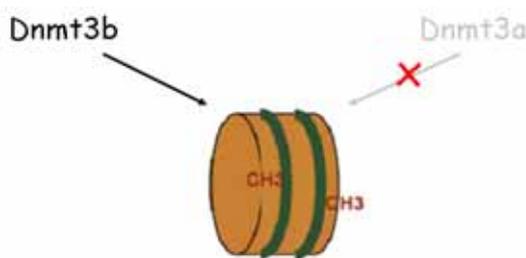
脊椎動物では、DNAメチル化修飾は生理的な条件の下で CpG 配列中シトシン塩基の5位の炭素が受け、その結果遺伝情報の発現抑制を惹起する。DNAメチル化が遺伝子発現抑制

機構の1つとして機能するためには、細胞系列に特異的な遺伝子発現を保障するメチル化模様の確立が必須である。それには、3つの概念的なステップ、つまり特異的な遺伝子領域にメチル化模様を書き込むこと、細胞が増殖する過程で書き込まれた模様を維持すること、さらには分化転換などの際にメチル化模様を消去することが必要である。新たにメチル化模様を形成する遺伝子として、*Dnmt3a* と *Dnmt3b* が同定されている。これら2つの酵素遺伝子のいずれをノックアウトしてもマウスは致死となることから、DNAメチル化修飾の重要性が確認されている。

*Dnmt3a* と *Dnmt3b* のノックアウトマウスの表現型が異なること、マウス初期胚において

これら遺伝子の発現時期は異なっていることから、Dnmt3a、Dnmt3bの機能の違いが示唆されていた。しかしながら、裸の2本鎖DNAを用いる限りにおいては、Dnmt3aとDnmt3bの間に、生化学的性質に大きな差が見出すことが出来なかった。

近年、私たちは、核内でDNAがとっている高次構造であるヌクレオソームを試験管内でヒストンと再構成させ、酵素反応の基質とすることで、Dnmt3aとDnmt3bの間に酵素学的な違いを見出すことが出来た。具体的には、Dnmt3aは2本鎖DNAに比べて、ヌクレオソームを形成した場合、メチル化活性は強く阻害される。一方、Dnmt3bはDnmt3aより阻害がかからずヌクレオソーム構造に対してもメチル化能を示した。この結果は、Dnmt3bがマウス初期胚の着床期でゲノム全体のDNAメチル化レベルが急激に亢進する時期に発現すること、Dnmt3aは細胞の分化方向がすでに決まりDNAメチル化の大きな変化がない後期胚で高発現する発現様式をよく説明する。



なお、Dnmt3aについては、ヌクレオソームから、はみ出でたDNA領域に対しては、裸のDNAと同様の高いメチル化活性を示すことも明らかにしている。

## 2. 研究の目的

ゲノムのメチル化模様の形成に焦点をあてて、Dnmt3aがどのような機構で標的のゲノム領域にメチル化模様を形成できるのかを生化学的に明らかにすることを目的とし、解析を進めた。

これまでに、Dnmt3aはヌクレオソーム形成により、そのメチル化活性は阻害されることを見出したため、ヌクレオソーム形成またはヌクレオソームの構造変化により、Dnmt3aのDNAメチル化活性が調節される可能性を示した。生体内では、ゲノムDNAが全てヌクレオソーム領域となっているわけではなく、ヌクレオソーム間にはリンカーDNA領域が存在する。Dnmt3aは、ヌクレオソームに比べ、2本鎖DNAを良い基質とすること、またゲノム上において必ずしも固定の位置にヌクレオソームが存在しないことをあわせ考えると、

Dnmt3aは時間経過とともにゲノム全体をメチル化していくことが可能となる。しかしながら、Dnmt3aが発現している体細胞において、DNAメチル化レベルが大きく亢進することは無い。

このことは、Dnmt3aは、生体内でなんらかの機構により、その活性が負に調節されていることを示唆している。本研究では、その機構について、生化学的にアプローチすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

これまで、私たちはDnmt3群のメチル化反応に関して、試験管内で解析してきた。というのも、試験管内では反応時のパラメーターを、実験の目的に応じて容易に変動させることができるため、Dnmt3群の詳細な性質を明らかにできるという利点があるからである。

本研究では、これまでの実験系をさらに発展させて、より生理的な基質を用い、より細胞内に近い条件でのDnmt3aのメチル化能の解析を試みた。Dnmt3aの基質は、大腸菌で発現した組み換えヒストンと既知の塩基配列をもつDNAからヌクレオソームを試験管内で再構成して用意した。これまでに、ヌクレオソームからはみ出した2本鎖DNA領域に対しては、高い活性を示すことが分かっているが、生体内ではそのような構造を持たず、ヌクレオソームとヌクレオソームが連続して存在している。そこで、モデル系として、リンカーDNA領域を含むように2つのヌクレオソームが直列に並んだジヌクレオソームヌクレオソームDNAを再構成に用い、基質にした。

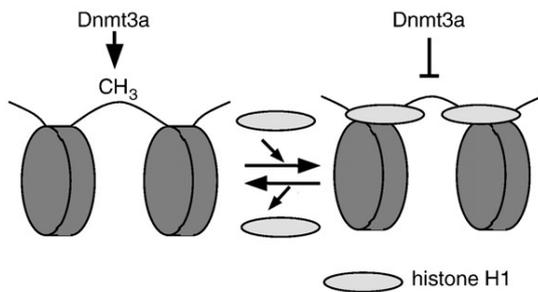
このジヌクレオソームに対するDnmt3aのメチル化能を検討する際に、細胞核内では、リンカーDNAに存在するといわれているヒストンH1が、どのようにDnmt3aのメチル化活性に影響を与えるかについても試験管内で調べた。

## 4. 研究成果

まず、基質となるジヌクレオソームの調製の条件設定を行った。DNA配列は、Richmondらがヌクレオソーム構造のX線結晶解析を行ったDNA配列を基盤にした。Richmondはヌクレオソーム領域が4回繰り返したDNA配列を使っているが、私はモデル系として2回繰り返し配列に配列を短くするとともに、Dnmt3aがメチル化するCpG配列を導入しメチル化反応を解析しやすい基質を作成した。新しく準備したDNA配列と組換えヒストンを用いて、ヌクレオソームが安定に2つ存在するように再構成できるかについて、制限酵素の感受性やマイクロコッカルヌクレアーゼの耐性により確認した。試験管内で再構成したヌクレオソームを基質にしてDnmt3aのメチル化

活性を解析した結果、Dnmt3a は、ヌクレオソーム上の DNA をほとんどメチル化せず、ヌクレオソームとヌクレオソームの間に存在するリンカーDNA 部分を優先的にメチル化することを、明らかにした。

次に、ヌクレオソーム間に存在するリンカーDNA に結合するといわれているヒストン H1 が Dnmt3a のメチル化活性に与える効果を調べた。ヒストン H1 の組換え体を用意し、ヒストン H1 とジヌクレオソームと混合し、ジヌクレオソーム上にヒストン H1 を配置させた。この基質を用いて、Dnmt3a のメチル化活性を調べたところ、リンカーDNA に対する Dnmt3a のメチル化活性はヒストン H1 により阻害されることを明らかにした (Takeshima et al., *J. Mol. Biol.* **383**, 810-821. (2008))。



ここで用いたヒストン H1 は、H1.3 という型であるが、生体内にはこれ以外に複数の型が存在する。さらに、ヒストン H1 は、リン酸化などの翻訳後修飾を受けることが知られている。これらの因子が Dnmt3a のリンカーDNA に対する活性に与える効果を調べるため、培養細胞 (HeLa 細胞) からヒストン H1 を精製し、それを再構成ジヌクレオソームに添加して、先ほどと同様の実験を行った。その結果、培養細胞由来のヒストン H1 も、組換え型ヒストン H1 と同様に、リンカーDNA に対するメチル化活性の阻害効果を確認することができたので、ヒストン H1 の効果は翻訳後修飾などに依存しないことが分かった。

ヒストン H1 の分子構造は、N 末端、および C 末端に構造を持たない領域をもち、分子中央にヘリックスからなる globular domain (GD) を持つことが知られている。リンカーDNA に対する Dnmt3a のメチル化活性を阻害するのに、ヒストン H1 のどの領域が重要であるかを調べる目的で、大腸菌を用いて、各部分領域の組換え体を用意した。各部分領域を再構成ジヌクレオソームに添加して、Dnmt3a の活性を調べた結果、分子中央の GD と C 末端の構造をとらない領域が、リンカーDNA への Dnmt3a のメチル化活性阻害に必要であり、N 末端部分の構造をとらない領域は必

要でないことが分かった。

以上の結果は、生体内では Dnmt3a の高発現が単純にゲノムの高メチル化につながらないことを意味しており、生体内で Dnmt3a がゲノム DNA をむやみにメチル化しないことをよく説明する。同時に、DNA メチル化模様が変化には、ヒストン H1 の存在状態の変化が関与するという新たな概念を提案することができた。

これまでに、ヒストン H1 の核内の動態については、ヒストン H1 に GFP などの蛍光蛋白質をつなげ、顕微鏡下において調べられている。核内の特定エリアに強いレーザー光を当てて蛍光褪色させ、褪色させていない領域からの蛍光蛋白質の移動による蛍光の回復を画像化する方法により、ヒストン H1 は、同じところに約 3 分しかいないことが分かっている。一方、コアヒストンは、数時間同じ場所にいるため、ヒストン H1 は、相対的に非常に速く核内で動いている (Catez et al., *Nat Struct. Mol. Biol.* **13**, 305-310. (2006))。このことは、ヒストン H1 が、Dnmt3a のメチル化活性を調節して、メチル化される DNA 領域を決定する可能性があることを支持する。今後、ヒストン H1 の局在を変化させる機構を理解することが、部分的にはあるが、DNA メチル化の形成機構を理解することに繋がることになると思われる。

## 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 3 件)

1. Takashima S, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Okano M, Hata K, Suetake I, Nakatsuji N, Miyoshi H, Tajima S, Tanaka Y, Toyokuni S, Sasaki H, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Abnormal DNA Methyltransferase Expression in Mouse Germline Stem Cells Results in Spermatogenic Defects. *Biol Reprod.* 2009 Feb 18. [Epub ahead of print] 査読有
2. Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, Sugiyama Y, Hatano N, Suetake I, Tajima S, Sueyoshi N. Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1162-1167. (2008) 査読有
3. Takeshima H., Suetake I, and Tajima

S. Mouse Dnmt3a preferentially methylates linker DNA and is inhibited by histone H1. *J. Mol. Biol.* **383**, 810-821. (2008) 査読有

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 三島 優一、未武 勲、田嶋 正二 9 番目のLys残基をメチル化修飾したヒストンH3 の調製とそれを含む再構成ヌクレオソームの作製 第1回日本エピジェネティクス研究会年会 (2007)

2. 三島 優一、未武勲、渡辺真、川上徹、西村紀、相本三郎、田嶋正二 ヒストンH3K9をメチル化修飾したヌクレオソームの再構成 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (2007)

3. 未武勲、竹島秀幸、三島優一、田嶋正二 Dnmt3a2 とDnmt3aによる再構成ヌクレオソームDNAメチル化 活性の異同 第2回日本エピジェネティクス研究会年会 (2008)

〔図書〕(計 3 件)

田嶋正二、未武勲 (2008) 組換えタンパク質のデザインと発現pp. 71-106、たんぱく質をつくるー抽出・精製と合成長谷俊治、高尾敏文高木淳一編、化学同人

未武勲、田嶋正二(2008) エピジェネティクス実験プロトコール、DNAメチル化酵素の活性測定 放射性化合物を用いた活性測定 pp.104-112 牛島俊和、眞貝洋一 編、羊土社

未武勲、田嶋正二 (2008) ゲノムDNAのメチル化修飾の形成と維持の機構、蛋白質核酸酵素 6月号、pp. 823-829、共立出版

6. 研究組織

(1)研究代表者

未武 勲 (SUETAKE ISAO)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：80304054