

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370093

研究課題名（和文） Dnmt1によるDNAメチル化継承機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of DNA methylation inheritance by Dnmt1

研究代表者

岡野 正樹 (OKANO MASAKI)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類エピジェネティクス研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50360863

研究成果の概要（和文）：

哺乳類 DNA メチル化酵素 Dnmt1 は、細胞分裂時に DNA メチル化継承を行う主要酵素である。細胞内において、細胞周期依存的に、DNA 複製領域へ局在するが、その詳細な分子機構は十分に理解されていない。Dnmt1 の保存ドメインへ網羅的にアミノ酸変異を導入することによって、Dnmt1 細胞内局在調節に関与する機能ドメインを同定した。Dnmt1 分子内相互作用が Dnmt1 局在調節に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) plays an important role in the inheritance of genomic DNA methylation in mammals. Dnmt1 localizes to DNA replication foci in a cell-cycle-dependent manner. However, it remains elusive which domains of Dnmt1 are required for this process and how this process is regulated. By scanning mutagenesis, we identified several domains required for the regulation of Dnmt1 localization. Our results suggest that the intra-molecular interaction is important for Dnmt1 localization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	8,800,000	2,640,000	11,440,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス、DNAメチル化、Dnmt1、DNA複製、細胞核、維持メチル化

1. 研究開始当初の背景

シトシン5位におけるDNAメチル化修飾は、さまざまな真核生物で重要な役割を果たすエピジェネティクス機構の一つであり、クロマチン調節機構と協調的に作用すること

によって、遺伝子発現抑制の安定な維持に機能すると考えられている。哺乳類では、正常なゲノムDNAメチル化パターンの形成・維持は、ゲノムインプリンティングやX染色体不活性化、トランスポゾン抑制、胚発生に必

須である。一方、DNA メチル化パターンの異常は、多くのヒト疾患、特にがんの病因・悪性化に密接に関わることが明らかにされている。DNA メチル化継承機構は、同じ DNA メチル化パターンをもつ細胞の増殖を保証する分子機構であり、DNA メチル化によるエピジェネティック制御の基盤となる。

哺乳類において、Dnmt1 は DNA メチル化継承を行う主要な DNA メチル化酵素であり、増殖する全ての体細胞で発現する。Dnmt1 ノックアウトマウスはゲノム DNA のメチル化修飾を維持することができず、胎生致死となる。1,620 アミノ酸残基からなる Dnmt1 蛋白質は、単体としてメチル基転移酵素活性を示すことができ、酵素基質としてはメチル化未修飾 DNA よりもヘミメチル化 DNA に対して高い酵素活性をもつというユニークな生化学的特徴をもつ。また、細胞生物学的特徴として、細胞周期依存的に DNA 複製領域に局在する。したがって、Dnmt1 による DNA メチル化継承は、i) 細胞核内における作用領域への局在と、ii) メチル基を転移すべき塩基配列の選別、の二つの異なるレベルの調節が重要と考えられる。本研究では、i) の局在調節機構に焦点をしばった。

Dnmt1 の複製領域局在機構の研究は長らく混乱が続いていた。Dnmt1 の DNA 複製領域局在が報告された時、Dnmt1 の N 末端領域に「複製領域標的配列(RFT)」が同時に報告された[Cell 71, 865 (1992)]。しかしその後、RFT ドメインは Dnmt1 の正常な細胞局在に必要なが、RFT ドメイン単独では当初主張されていたようには複製領域に局在しなかった。その後、RFT ドメインに隣接する部位に DNA 複製補助因子 PCNA 結合ドメイン(PBD)が発見され、PBD ドメイン単独で複製領域に局在することが示された[Science 277, 1996 (1997)]。その後十年間近く、Dnmt1 の複製領域局在は PCNA 結合依存的であると信じられてきた。しかし、PBD ドメインを欠失した Dnmt1 蛋白質のみを発現するヒト培養細胞の解析から、PCNA 結合は Dnmt1 の複製領域局在を促進するが必須ではないことが示され[PNAS 103, 14080 (2006)]、複製領域への局在には別の分子機構が存在することが明らかになった。

我々は、ゲノム DNA 上のヘミメチル化標識依存的に DNA 複製領域へ Dnmt1 が局在すること[Mol Cell Biol 27, 8243 (2007)]、また共同研究者とともに、この局在には SRA ドメイン蛋白質 Np95/Uhrf1 が必須であることを明らかにした[Nature 450, 908 (2007)]。一方、米国のグループは、Np95/Uhrf1 の SRA ドメインがヘミメチル化 DNA に特異的に結合することを生化学的に示し、同様の結論を導いた[Science 317, 5845 (2007)]。以上の結果は、半保存的 DNA 複製の結果生じたヘミ

メチル化 DNA が、Dnmt1 を複製領域に局在させる主要なシグナルであることを明らかにした。

しかしながら、Dnmt1 の複製領域局在がどのようにして分子レベルで制御されているのか、その詳細は依然として不明であった。もっとも単純なモデルは、ヘミメチル化 DNA に結合した Np95/Uhrf1 が、蛋白質—蛋白質相互作用により Dnmt1 を複製領域にリクルートすることである。もし、この「正の制御」モデルが正しいと仮定すると、Np95/Uhrf1 結合ドメインを含む Dnmt1 部分蛋白質は、Np95/Uhrf1 と同様にメチル化標識依存的に複製領域に局在することが予想される。しかし、我々はそのような挙動を示す Dnmt1 ドメインを見つけることができていない。一方、我々は、様々な Dnmt1 部分欠失変異体を DNA メチル化酵素変異細胞に導入する実験から、i) Dnmt1 が複製領域に局在する機構の中で、すくなくとも DNA メチル化非依存的な素過程が含まれること、ii) Dnmt1 の局在調節ドメインは複数存在すること、を示唆する結果を得ていた[Mol Cell Biol 27, 8243 (2007)]。Dnmt1 の生化学的解析や酵素速度論的解析によって、Dnmt1 の N 末端と C 末端領域が相互作用していること、Dnmt1 は基質結合によってコンフォメーション変化が起こるアロステリック型酵素であることが知られていた。これらの結果から、我々は、Dnmt1 の細胞核内局在調節には、Dnmt1 の複数のドメイン同士の分子内相互作用や蛋白質コンフォメーション変化が重要な役割を果たすことを想定した。

2. 研究の目的

哺乳類 DNA メチル化酵素 Dnmt1 は、DNA メチル化継承を行う主要酵素であり、DNA 複製期において、半保存的に合成された娘鎖 DNA へ、親鎖 DNA のメチル化パターンを鋳型としてメチル基を導入する。細胞内では、Dnmt1 は DNA 複製領域へ局在するが、その詳細な分子機構は十分に理解されていない。これまで Dnmt1 の細胞内局在調節シグナルを同定する様々な試みはおこなわれてきたが、多くの矛盾した結果が報告されてきた。従来の Dnmt1 機能解析は、比較的大きなアミノ酸領域の欠失や、単離ドメインの挙動から結論がだされており、蛋白質構造異常による二次的影響、あるいはドメイン間相互作用の欠如を反映していた可能性がある。本研究では、Dnmt1 の細胞内局在調節シグナルの再検討のため、蛋白質構造への影響を最小にしながら特異的機能欠損が期待できる単一アミノ酸置換による点変異によって、細胞内局在調節に関与する Dnmt1 機能ドメインを同定し、複製領域局在に必要な素過程・分子機構を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Dnmt1 変異体作製と細胞核内解析

Dnmt1 の DNA 複製領域局在に関する調節ドメインを、出来る限り偏向なく明らかにするため、また二次的構造変化の影響を最小限にとどめるため、Dnmt1 蛋白質に1アミノ酸点変異を導入した。我々は、これまでに、蛍光蛋白質 YFP を融合した Dnmt1 の細胞核内局在の挙動が、内在性 Dnmt1 蛋白質と一致することを確認している [Mol Cell Biol 27, 8243 (2007)]。YFP-Dnmt1 をコードした cDNA 発現プラスミドをもとに、Dnmt1 全領域の保存ドメインを中心に、荷電アミノ酸、親水性アミノ酸に着目し、それぞれのアミノ酸をアラニンに置換した YFP-Dnmt1 変異体を系統的に作製した。変異を導入した YFP-Dnmt1 をマウス ES 細胞に発現させ、YFP-Dnmt1 の細胞内局在挙動変化を観察した。

(2) in vitro 酵素活性測定

バキュロウイルスによる昆虫細胞発現系を用い、組換え体 Dnmt1 蛋白質および変異蛋白質を作製した。N-末端領域に 6xHis タグを付加した Dnmt1 蛋白質あるいは変異蛋白質を昆虫細胞 Sf9 で発現させ、金属アフィニティレジンにより His タグ融合 Dnmt1 蛋白質を精製する。in vitro DNA メチル化酵素活性は、[3H]-S-アデノシルメチオニオンを用い、polydIdC を基質として、[3H]-メチル基の基質への取り込みを放射活性により測定する。

(3) in vivo における DNA メチル化維持機能測定

Dnmt1 あるいは Dnmt1 変異体を Dnmt1^{-/-}ES 細胞に発現させ、細胞レベルにおける DNA メチル化継承機能をレスキューできるかどうか検証した。CAG プロモーター制御 Dnmt1 cDNA 発現ベクターを Dnmt1^{-/-}ES 細胞にトランスフェクション、安定導入株を複数株取得した。Dnmt1 蛋白質の局在、発現量は、抗 Dnmt1 抗体による細胞免疫染色、ウエスタンブロット解析により確認した。各細胞株の DNA メチル化状態は、ゲノム全体の DNA メチル化状態を反映すると考えられるタンデム型反復配列 (pericentromeric major satellite) および分散型反復配列 (IAP レトロトランスポゾン) のサザン解析およびバイサルファイト解析により行なった。

(4) Dnmt1 分子内相互作用解析

細胞内における Dnmt1 ドメイン間の分子内相互作用を検討するため、動物細胞に発現させた2種類の Dnmt1 ドメイン部分ペプチド間の結合を免疫沈降により解析した。FLAG タグを融合した Dnmt1 部分ドメインと、YFP を融合させた別の Dnmt1 部分ドメインを 293T 細

胞に共発現させ、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降の後、抗 GFP 抗体 (YFP を認識) を用いたウエスタンブロット解析により蛋白質間相互作用を検証した。

試験管内における、Dnmt1 ドメイン間の分子内相互作用を検討するため、大腸菌による組換え蛋白質を用いた GST-プルダウン実験を行なった。大腸菌発現系を用いて、GST あるいは MBP タグを付加した Dnmt1 部分ドメインの組換え蛋白質を作製、精製した。GST プルダウン実験および抗 MBP 抗体を用いたウエスタンブロット解析により蛋白質間相互作用を検証した。

(5) 生化学的細胞核-クロマチン分画

YFP-Dnmt1 あるいは FLAG タグ融合 Dnmt1 部分ドメインを発現させた ES 細胞を低張溶液で処理し、高密度ショ糖溶液に重層、遠心することによって、細胞質画分と細胞核に分離する。単離した細胞核を、塩溶液によって核質画分を抽出、DNA 分解酵素処理によってクロマチン画分を抽出、界面活性剤によって核マトリックス画分を抽出する。

4. 研究成果

内在性蛋白質と同じ細胞内局在挙動を示す YFP-Dnmt1 へ、保存されたドメインを中心に、1アミノ酸点変異を導入し、合計 399カ所のアミノ酸置換変異体を作製した。これらの YFP-Dnmt1 変異体を ES 細胞に導入し、YFP シグナルを蛍光顕微鏡下で観察することによって、Dnmt1 の細胞内局在が異常となる変異体をスクリーニングした。その結果、複数の細胞内局在異常変異体が得られ、細胞内局在の挙動に基づき、3つに分類された (タイプ I, II, III)。

タイプ I 変異をもつ YFP-Dnmt1 は、細胞核のヘテロクロマチン領域に集積することができず、細胞核全体に分散状に分布した。生化学的細胞分画により、タイプ I 変異領域を含む Dnmt1 部分ドメインはクロマチン結合能があること、タイプ I 変異によってそのクロマチン結合能を欠損させることがわかった。タイプ I 変異をもつ Dnmt1 蛋白質は、in vitro の酵素活性は保持しているが、Dnmt1^{-/-} ES 細胞の DNA メチル化レベルをレスキューする活性は大きく低下していた。したがって、Dnmt1 のクロマチン結合能は in vitro の酵素活性には必須ではないが、in vivo での維持メチル化機能には重要であることがわかった。

タイプ II 変異をもつ Dnmt1 は細胞質に滞留した。免疫沈降実験によって Dnmt1 分子内相互作用を調べたところ、N 末端側ドメインと、C 末端側の酵素触媒ドメインが相互作用すること、タイプ II 変異はその相互作用を低下させることがわかった。タイプ II 変異

領域は核移行シグナルとは一致しなかった。Dnmt1 の分子内相互作用が、Dnmt1 の核移行／細胞質滞留に関与することが示唆された。

タイプ III 変異は、Dnmt1 が細胞核全体に分散状に分布する条件下において、細胞核内でヘテロクロマチン領域に斑状に集積することがわかった。生化学的細胞分画でも、タイプ III 変異をもつ Dnmt1 は、通常よりも効率よくクロマチン画分に結合しうることがわかった。この結果は、タイプ III 変異領域が、タイプ I 変異領域のもつクロマチン結合能を抑制する機能をもつことが示唆された。

本研究において、我々は、Dnmt1 の細胞内局在に関与する機能領域を同定し、その生化学的性質を明らかにした。また、Dnmt1 分子内相互作用が細胞内局在に重要な役割を果たすことが示唆された。最近複数のグループから報告された Dnmt1 三次元構造の知見と考え合わせ、Dnmt1 蛋白質高次構造変化は、細胞内局在を含む、Dnmt1 の様々な機能発現に重要であることが示唆される。これらの結果は、現在、投稿準備中である。

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 1 件)

①Sakaue, M. *, Ohta, H. *#, Kumaki, Y., Oda, M., Sakaide, Y., Matsuoka, C., Yamagiwa, A., Niwa, H., Wakayama, T., and Okano, M. # (2010). DNA Methylation Is Dispensable for the Growth and Survival of the Extraembryonic Lineages. *Curr Biol* 20, 1452-1457. (*Contributed equally, #Co-corresponding), 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

①阪上守人、マウス胚体および胚体外細胞系列における DNA メチル化の役割(Role of DNA methylation in the embryonic and extra-embryonic lineages.)、日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会、2010 年 5 月 28 日-29 日、米子市文化ホール (米子)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 正樹 (OKANO MASAKI)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類エピジェネティクス研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50360863

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田村 尚 (TAMURA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類エピジェネティクス研究チーム・研究員

研究者番号：20372659

(4) 研究協力者

松岡 智沙 (MATSUOKA CHISA)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類エピジェネティクス研究チーム・テクニカルスタッフ

山際 晶子 (YAMAGIWA AKIKO)

独立行政法人理化学研究所・哺乳類エピジェネティクス研究チーム・テクニカルスタッフ