

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 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570136

研究課題名（和文） DNAメチル化模様の形成に、ヒストン分子の翻訳後修飾が果たす役割の生化学的解析

研究課題名（英文） Role of histone modifications on establishing DNA methylation patterns

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（和文）：

Dnmt3a はゲノムに新たにメチル化模様を描く酵素である。生殖細胞や初期胚では、N 末 219 アミノ酸残基を欠くアイソフォーム、Dnmt3a2 が高発現する。Dnmt3a に特異的な N 末端領域に、強い DNA 結合活性が存在し、これが細胞内での局在化や DNA メチル化活性に寄与することを示した。また、DNA 複製時にメチル化模様を維持する酵素のほぼ全長の立体構造を明らかにし、反応時に構造変化する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Dnmt3a creates DNA methylation patterns. Dnmt3a2, an isoform of Dnmt3a, lacks amino-terminal 219 amino acids of Dnmt3a and is highly expressed in germ cells and early embryo. We found that the amino-terminal 219 amino acids shows DNA binding activity and contributes for its localization and for DNA methylation activity. On the other hands, DNA methylation pattern once created is maintained by Dnmt1. We solved crystal structure of mouse Dnmt1 (291-1602 amino acids) at 1.3 Å resolution. Notably, in the absence of DNA, the amino-terminal domain responsible for targeting Dnmt1 to replication foci is inserted into the DNA-binding pocket, indicating that this domain must be removed during methylation reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムのシトシン塩基はメチル化修飾を受け、その修飾は遺伝情報発現に抑制的に働く。繊維芽細胞に DNA メチル化阻害剤を与えた場合、様々な種類の細胞に分化

転換する。これは、各体細胞ゲノム DNA の塩基配列は同一であっても、DNA メチル化による遺伝子発現抑制の膨大な数の組み合わせにより、細胞特有の遺伝子発現が行われ、固有の性質を示しうることを示している。従っ

て、ゲノム DNA 化修飾の調節機構を理解することは、細胞分化などの生理的現象を考える上で重要な課題となる。DNA メチル化が遺伝子発現抑制機構の 1 つとして機能するには、細胞特異的な遺伝子発現を保障する組織特異的な遺伝子の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 DNA にメチル基を書き込むこと、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一旦書き込まれた模様を消去することがある。

DNA にメチル基を導入する酵素 (Dnmt 群) には、ゲノム上に新たにメチル化模様を書き込む Dnmt3a と Dnmt3b、DNA 複製時に次世代の細胞にメチル化模様を正確に伝えるのに機能する Dnmt1 がある。これら Dnmt 群のいずれの遺伝子をノックアウトしても、マウスは致死となることから、これらの酵素の生理的重要性ならびに DNA メチル化修飾の重要性が確認されている。

2. 研究の目的

DNA メチル化の形成、維持機構に関与する Dnmt 群の性質を生化学的に解析すること、ならびに構造を明らかにすることにより、ゲノム DNA にメチル基が導入される際に、どのように制御があるかについて明らかにすることを目的とした。

また、これまで DNA メチル化とヒストン分子上の化学修飾に関連性があることが報告されているので、それについて、分子レベルで詳細に解析しようとするのも目的とした。

3. 研究の方法

1) Dnmt3a には、そのアイソフォームとして Dnmt3a2 が知られており、その発現時期が大きく異なっている。そのため、個別の機能を持っている可能性が高いが、これまでに詳細な解析はなされていなかった。本研究計画期間内では、各分子の機能を明らかにするために、Dnmt3a と Dnmt3a2 を比較して、Dnmt3a 特異的に存在する N 末端 219 アミノ酸の性質について、主として生化学的なアプローチから明らかにした。

2) Dnmt1 は、バクテリアのメチルトランスフェラーゼと比較して、N 末端に大きな領域を所有している。その意義を調べる目的で、これまでに様々な研究がなされてきたが、その性質は明らかになっていなかった。その大きな原因として、構造が不明であることが挙げられる。逆に言うと、どのようなドメイン構造をとっているのか、またドメイン構造の空間的配置がわかれば、触媒反応を理解する上で大きなブレークスルーとなると考え、X 線結晶解析を行うことにした。

3) DNA メチル化に関連するといわれている抑制性のヒストン修飾 (ヒストン H3K9 のトリメチル化) を試験管内で調製し、それを使ってヌクレオソームを再構成する。それを用いて、試験管内で DNA メチル化との関連性について調べた。

4. 研究成果

1) Dnmt3a に特異的に存在する N 末端 219 アミノ酸領域に、DNA 結合活性が存在し、その結合活性には、4 つの塩基性アミノ酸 (Lys⁵⁵¹, Lys⁵⁵³, Arg¹⁷⁷ and Arg¹⁷⁹) が重要であることを明らかにした (文献 2)。また、N 末端 219 アミノ酸領域を細胞内で発現させると核内に移行するのに対して、4 つの塩基性アミノ酸に変異をアラニンに置換した同領域は細胞質にもとどまることを見出し、細胞内でも 4 つの塩基性アミノ酸が局在化に寄与することを見出した。さらに、Dnmt3a の DNA メチル化活性の特性は、4 つの塩基性アミノ酸をアラニンに置換することにより、Dnmt3a2 の特性に変化することを見出した。つまり、Dnmt3a 特異的な N 末端部分は、生理的塩条件下で安定に活性を示すだけでなく、細胞内局在にも関与することを明らかにした (文献 2)。

2) これまでに、Dnmt1 の N 末端 248 アミノ酸領域は、独立な構造を持つことを、プロテアーゼ感受性により明らかにしていた (Suetake et al., 2006)。また、全長の Dnmt1 は、多量体を作りやすいこと、一方 N 末端 290 アミノ酸を欠いた Dnmt1 は、2 量体形成をし、比較的均一な状態をとることを見出していた (未発表)。今研究期間では、N 末端 290 アミノ酸を欠いた Dnmt1 (290-1602) を昆虫細胞で発現させ、精製し、結晶化に成功した (文献 3)。その結果、バクテリアから保存された触媒領域の C 末端領域 (1125-1620 アミノ酸) に、N 末端部分の複製点局在化シグナル領域が突き刺さるように組み込まれており、その状態では触媒ポケットに DNA が入り込めない構造であることがわかった。つまり、メチル化活性を示すには、何らかの形で N 末端部分が、触媒領域から外れる必要があることが予想された。その予想通り、N 末端領域 (291-601) の有無により、メチル化活性における活性化エネルギーが大きく変化することを見出した。

3) ヒストン H3 の K9 をほぼ均一にトリメチル化することに成功し、それをヌクレオソームを再構成した。ヒストン H3 の K9 メチル化に依存して Dnmt 群のメチル化活性が変化するか調べてみたが、調べた限りにおいて、直接的な関連性を見出すことができなかった。

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6件)

1. Horii T, Suetake I, Yanagisawa E, Morita S, Kimura M, Nagao Y, Imai H, Tajima S, and Hatada I. (2011) The Dnmt3b Splice Variant is Specifically Expressed in In Vitro-manipulated Blastocysts and Their Derivative ES Cells. *J. Reprod. Dev.* 57, 579-585. DOI; 10.1262/jrd.10-194A 査読有
2. Suetake I, Mishima Y, Kimura H, Lee Y, Goto Y, Takeshima H, Ikegami T, and Tajima S. (2011) Characterization of DNA-binding activity in the N-terminal domain of DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem. J.*, 437, 141-148. DOI; 10.1042/BJ20110241 査読有
3. Takeshita K, Suetake I, Yamashita E, Suga M, Narita H, Nakagawa A, and Tajima S. (2011) Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase (Dnmt1). *PNAS*, 108, 9055-9059. DOI; 10.1073/pnas.1019629108 査読有
4. Ross J, Suetake I, Tajima S, and Molloy PL. (2010) Recombinant mammalian DNA methyltransferase activity on model transcriptional gene silencing short RNA:DNA hybrid substrates. *Biochem. J.* 432, 323-332. DOI; 10.1042/BJ20100579 査読有
5. Yamashita 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, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, and Mano H. (2010) Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 29, 3723-3731. DOI; 10.1038/onc.2010.117 査読有
6. Sugiyama 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 1delta/epsilon. (2010) *Biochem J.* 427, 489-497. DOI; 10.1042/BJ20091856 査読有

[学会発表] (計19件)

1. Dnmt1によるDNA維持メチル化のin vivoにおける責任領域、長谷川 貴志、木村 博信、末武 勲、武藤 正弘、ジャファル シャリフ、古関 明彦、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. ポリコーム群蛋白質複合体 (PRC2) によるヒストンH3K27メチル化活性—Suz12の責任領域—、三島 優一、磯野 協一、古関 明彦、田嶋 正二、末武 勲、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

3. 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

4. 海洋無脊椎動物からのDnmt1阻害剤の探索、石上 進太郎、末武 勲、田嶋 正二、中尾 洋一、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

5. 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回生物物理学会年会 2011年9月16-18日 兵庫県立大学書写キャンパス

6. 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

7. 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

8. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA

methyltransferase 1、Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., Tajima, S., International Union of Crystallography (IUCr) 22-30 August 2011, Madrid Spain

9. 再構成ヌクレオソームに対するヘテロクロマチン蛋白質 1 の結合様式、三島優一、Chanika D Jayasinge、川上徹、大谷淳二、菊川雄介、白川昌宏、木村宏、相本三郎、田嶋正二、末武勲、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

10. Inhibitory effect of chromo shadow domain of heterochromatin protein 1 γ (HP1 γ) on its recognition of the trimethylated lysine 9 of histone H3 in nucleosome structure. Chanika Jayasinghe, Yuichi Mishima, Junji Otani, Yusuke Kikugawa, Masahiro Shirakawa, Shoji Tajima, and Isao Suetake、第 5 回エピジェネティクス年会、2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

11. 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、山下永樹、菅倫寛、成田宏隆、中川敦史、田嶋正二、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

12. Denovo 型 DNA メチル化酵素 Dnmt3a2 とコリプレッサー蛋白質 Trim28 の結合様式の検討、木村博信、末武勲、田嶋正二、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

13. Dnmt1 と Np95/Uhrf1 の機能的相互作用、ベルキュレク アハマト ジャン、竹谷和博、西尾チカ、末武勲、田嶋正二、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

14. Dnmt1 の活性にはたす複製フォーク標的化シグナル (RFTS) の役割、中村達郎、末武勲、田嶋正二、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

15. メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD4 による DNA 認識の構造的基盤、大谷淳二、有田恭平、有吉真理子、木村博信、末武勲、田嶋正二、白川昌宏、第 5 回エピジェネティクス年会 2011 年 5 月 19-20 日 KKR 熊本

16. Binding specificities of heterochromatin protein 1a, b, and g to the reconstituted nucleosomes containing tri-methylated lysine 9 histone H3. Yuichi

Mishima, Makoto Watanabe, Toru Kawakami, Yuko Aoki, Hiroshi Kimura, Saburo Aimoto, Osamu Nishimura, Shoji Tajima, Isao Suetake, JSPS Sweden-Japan joint colloquium "epigenetics -new horizon in Japan and Scandinavia", 6th-7th September 2010, nobel forum, karolinska institute, Stockholm

17. トリメチル化リシン 9 をもつ再構成ヌクレオソームに対する heterochromatin protein 1 の特異的な結合様式、三島優一、渡辺真、川上徹、青木優子、木村宏、相本三郎、西村紀、田嶋正二、末武勲、第 4 回 エピジェネティクス研究会、2010 年 5 月 28-29 日、米子市文化ホール

18. Histone H3K9 trimethylation stimulates the histone H3K27 methylation activity of PRC2 bypassing Eed. I Suetake; S Aimoto; Y Aoki; K Isano; T Kawakami; H Kimura; H Koseki; Y Mishima; O Nishimura; S Tajima; M Watanabe, Keystone symposium, Sagebrush Inn and Conference Center, Taos, New Mexico, January 17-22, 2010

19. ポリコーム群蛋白質複合体 PRC2 によるヒストン H3 メチル化活性に対する、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のトリメチル化修飾の影響、三島優一、田嶋正二、末武勲、第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会 2009 年 5 月 22-23 日、学術総合センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末武勲 (Isao Suetake)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：80304054