

## 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25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22687008

研究課題名（和文） タンパク質間相互作用によるエピジェネティクス制御機構の構造生物学的基盤

研究課題名（英文） Structural basis for the epigenetic regulation by UHRF1 interacting proteins.

研究代表者 有田 恭平 (Kyohei Arita)  
京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40549648

## 研究成果の概要（和文）：

本研究ではエピジェネティクスに關与する重要な因子である UHRF1/2 タンパク質に注目し、UHRF1 と相互作用するタンパク質との構造生物学的からエピジェネティクスの制御機構の解明を目指した。本申請の成果により、UHRF1 と相互作用するタンパク質の同定、および UHRF2 による DNA の認識機構の詳細を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this proposal, we focused UHRF1/2 proteins, which are key molecules of epigenetics regulation. To obtain the fundamental role of epigenetics, we performed the structural and biochemical study of UHRF1 interacting proteins and UHRF2. We revealed the function of UHRF1 interacting proteins and the mechanism of complex formation, and also showed the DNA binding property of UHRF2.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
平成23年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学、X線結晶構造解析、エピジェネティクス、タンパク質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA はヒストン 8 量体に巻きつきヌクレオソーム構造を形成している。このヌクレオソームはさらに凝集してクロマチン構造をとる。クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソーム中の DNA やヒストンタンパク質は様々な翻訳後修飾を受ける。DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾はエピジェネティックな現象の主要な因子であ

り、真核生物の発生や細胞分化、遺伝子発現の制御に極めて重要な働きをしている。エピジェネティックな情報は細胞の分化状態の維持と密接に關与している。事実、分化多能性を持ち、再生医療への応用が期待されている iPS (induced pluripotent stem cell) 細胞では、体細胞が獲得した DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな情報が消失している (リプログラミング) こと

報告されている。このことからエピジェネティクスな情報の継承や情報の発現機構の制御を解明することは、生命現象の根本的な原理を知ることのみならず、医療や創薬への応用が期待される。本研究では DNA メチル化の維持とヒストン認識に関与する UHRF1 タンパク質とそれに相互作用するタンパク質因子、および UHRF1 のホモログである UHRF2 に焦点を当てる。

UHRF1 は遺伝子発現抑制的なヒストン修飾であるヒストン H3K9me3(トリメチル化リジン9)を認識する tandem tudor domain と PHD finger を持つ。さらにメチル化 DNA を認識する SRA domain をもつことから、DNA メチル化とヒストン修飾の2種類のエピジェネティクスな情報を統合するカギとなる因子であると考えられている。UHRF1 は様々なクロマチン関連タンパク質と相互作用してエピジェネティクスな現象を制御することが報告されており、UHRF1 を介したタンパク質-タンパク質相互作用を構造生物学、生化学的手法により解析していくことは極めて重要な知見の創出に繋がると考えられる。本申請では UHRF1 が DNA のメチル化やヒストンの修飾を行なうクロマチン関連タンパク質と複合体を形成することによって、どのようにエピジェネティクスな機構を調節して生命現象を制御しているかを X 線結晶構造解析を主体とした構造生物学的な観点から明らかにする。

## 2. 研究の目的

### (1) 維持型 DNA メチル化酵素 Dnmt1 との複合体構造解析

体細胞では DNA メチル化の情報は DNA 複製、細胞分裂を経て次世代の細胞に正確に継承されていく。UHRF1 の SRA domain は複製後に生じた片鎖(ヘミ)メチル化サイトを認識するドメインで、DNA メチル化維持に必須のタンパク質である。UHRF1 はヘミメチル化 DNA を認識後、維持型 DNA メチル化酵素である Dnmt1 をヘミメチル化サイトにリクルートしてくることによる DNA メチル化維持が行われる。申請者はこれまでに UHRF1 の SRA domain が、ヘミメチル化 DNA 中のメチル化シトシンのフリップアウトを伴って結合することを明らかにした。さらに SRA domain と Dnmt1 の触媒ドメインが同時にヘミメチル化 DNA に結合できないことを明らかにし、塩基の連続したフリップアウトによる UHRF1 から Dnmt1 の触媒ドメインへのヘミメチル化 DNA の受け渡しモデルを提唱した (Arita *et. al.*, Nature. **455**. pp818 (2008))。UHRF1 の SRA domain と Dnmt1 の触媒ドメインの N 末端領域が直接相互作用することが報告されている (Achour *et. al.*, Oncogene. **27**. pp2187 (2007))。この相互作用が Dnmt1 のヘミメチ

ル化サイトへのリクルート機構に重要であり、DNA メチル化の維持には Dnmt1 と UHRF1 の相互作用が必須であると考えられる。しかし、DNA メチル化の維持機構の構造学的な情報を基盤とした分子機構は不明な点が多い。そこで本申請では DNA 複製後に起こる UHRF1 から Dnmt1 へのヘミメチル化 DNA の受け渡し機構、DNA メチル化の維持機構の解明を目指す。

### (2) UHRF1 のリン酸化酵素 Plk1 との複合体構造解析

UHRF1 の Tudor domain と PHD finger 間の linker 領域は高次構造を形成しており、1 分子のヒストン H3 の N 末端領域に存在する複数の化学修飾の状態を認識するのに重要な役割をすることを明らかにしている(論文投稿中)。事実、linker 内に存在する Ser298 番目のリン酸化は、ヒストン H3 との 1:1 な特異的な結合を消失させることを明らかにしている。つまり UHRF1 の linker 領域は UHRF1 のエピジェネティクスな情報の読み取り機構に重要な役割をしていることが分かる。さらにこの linker に存在する Ser287 は Plk1 (Polo-like kinase 1) によってリン酸化修飾され、Plk1 の C 末端領域に存在する polo-box domain (PBD domain) と相互作用することが示唆されている (Dephoure *et. al.*, PNAS. **105**. pp10762 (2008))。Plk1 は細胞周期の進行に重要な役割を担っていることから、Ser287 のリン酸化は UHRF1 の細胞周期に依存した機能変換に重要な役割をしていることが予測される。これまでに UHRF1 は細胞周期の制御に関与している報告がされているが、それは UHRF1 自身のリン酸化修飾による機能変換機構が関与していることが推測される。そこで、リン酸化 Ser287 を含む UHRF1 と Plk1 の PBD domain の複合体の X 線結晶構造解析を行ない、細胞周期に依存した UHRF1 の Ser287 のリン酸化が、UHRF1 の DNA メチル化維持とヒストン認識を介した転写制御の2つのエピジェネティックな機能をどのように変換させているのかを解明する。

### (3) ヒストン修飾酵素 JMJD6 との複合体構造解析

UHRF1 は多くの核内タンパク質と相互作用することが報告されている (Sharif *et. al.*, Nature. **450**. pp908 (2007))。共同研究者らのグループは UHRF1 がヒストンリジン脱メチル化酵素のファミリーに属する JMJD6 (Jumonji domain-containing 6 protein) と相互作用することを見出している(未発表データ)。JMJD6 はヒストン H3, H4 のメチル化アルギニンを脱メチル化する活性を持つことが示されている一方で (Chang *et. al.*,

Science. **318**. pp444 (2007)), スプライシングに関与する核内タンパク質のリジン残基を水酸化する活性を持つことが報告されている (Webby *et al.*, Science. **325**. pp90 (2009)). 本研究では JMJD6 単体、および UHRF1 との複合体の X 線結晶構造解析を行い、JMJD6 による基質認識機構、リジン残基の水酸化またはヒストンアルギニン残基の脱メチル化の反応機構の詳細を明らかにする。

#### (4) UHRF2 SRA domain による DNA 認識機構の解明

ヒトを含む哺乳類ではゲノム DNA 中の CpG 配列のメチルシトシン (5mC) は酸化されることによりヒドロキシメチル化 (5hmC) されることが近年報告されている。この 5hmC は、近年 DNA の脱メチル化に関与する DNA 修飾であると考えられ世界的な注目を集めている (Ito *et al.* Nature 2010)。DNA の脱メチル化機構のメカニズムは受動的経路と能動的な経路が考えられているが、5hmC はそのどちらにも関与していることが考えられる。UHRF2 は UHRF1 のホモログで非常に高いアミノ酸配列の相同性を有するが、その機能はよくわかっていない。また UHRF2 は SRA domain を有している。これまでの申請者の先行研究から、UHRF2 の SRA domain が 5mC に加えて、5hmC にも結合することが示唆されている。一方で UHRF1 の SRA domain は 5hmC に対しては結合活性を示さない。そこで UHRF2 と 5mC、および 5hmC 複合体の結晶の調製を行い、X 線結晶構造解析によって原子レベルの分解能で構造を決定することにより、UHRF2 SRA domain による DNA 結合特性を明らかにする。また 5hmC のさらなる酸化誘導体であるホルミルシトシン (foC) やカルボキシシトシン (caC) との結合能を評価する。これらの酸化誘導体のシトシンも DNA の脱メチル化経路に関与すると考えられている (Ito *et al.*, Science 2011)。

得られた構造学的、物理化学的なデータから UHRF2 の SRA domain による DNA 認識機構の詳細を明らかにする。

#### 3. 研究の方法

構造解析法として下記の手法を適用した：

- ・ X 線結晶構造解析法
- ・ X 線小角 (溶液) 散乱法
- ・ NMR 解析

分子間相互作用解析には下記の手法を適用した：

- ・ EMSA (electrophoresis mobility shift assay)、
- ・ 等温滴定型カロリメトリー (ITC)
- ・ NMR 解析
- ・ 蛍光偏光解消法

・ 分析ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

#### 4. 研究成果

##### (1) 維持型 DNA メチル化酵素 Dnmt1 との複合体構造解析

ヒト由来 UHRF1 とヒト由来 Dnmt1 の発現系の構築を行った。UHRF1 と Dnmt1 が直接相互作用することは報告されている。しかし相互作用に必要な領域に関しては相反する報告がされていたが (Achour *et al.*, Oncogene. **27**. pp2187 (2007) : Bostick *et al.*, Science. **317**. pp1760 (2007))、本成果により UHRF1 の SRA domain と Dnmt1 の RFTS (replication foci target sequence) が相互作用することが明らかになった。UHRF1 SRA domain と Dnmt1 の RFTS domain との結合を等温滴定型カロリメトリーで定量した。その結果、解離定数が約 3  $\mu$ M であることが分かり、タンパク質間相互作用としては一般的な親和性で結合することを明らかにした。また、SRA:RFTS の結合を分析ゲルろ過カラムで解析したところ、1:1 の化学量論比で結合することが明らかになった。さらに SRA domain を  $^{15}$ N で標識して  $^1$ H- $^{15}$ N の相関 NMR スペクトルを解析した。HSQC スペクトル、さらには TROSY による測定では、RFTS を  $^{15}$ N-SRA domain に滴下することによりスペクトルが消失した。これは複合体の分子量が大きく、溶液中での運動性の低下によると考えられる。スペクトルの消失から両者が相互作用していることは認められたものの、アミノ酸残基レベルでの相互作用解析は行えなかった。

SRA domain と RFTS が結合することが明らかになったので、SRA:RFTS の複合体を調製して、市販のスクリーニングキットを用いて様々な条件で結晶化を行った。いくつかの条件で結晶は得られたものの、X 線回折実験を行い構造解析を行うと、結晶中には SRA domain 単体のみが含まれていることが分かった。これは SRA domain と RFTS の相互作用が弱く、結晶化の過程で解離してしまった (結晶化における SRA domain 同士の会合量の方が強い) ことが原因であると考えられる。さらに溶液の塩濃度を下げて SRA domain と RFTS の結合を強くするような条件で結晶化条件の探索を行ったが複合体の結晶は得られなかった。結晶が得られなかった理由として UHRF1 SRA domain と Dnmt1 RFTS の結合が遷移的なものである可能性が考えられる。今後は溶液中での UHRF1 と Dnmt1 の相互作用の構造学的な知見を得るために低分解能で構造解析、X 線小角散乱、高速 AFM 等の解析を行う予定である。また、UHRF1 と Dnmt1 の相互作用領域に関して新たな領域を本申請では見出した。今後の研究への波及が見込まれる。

## (2) UHRF1 のリン酸化酵素 P1k1 との複合体構造解析

P1k1 の PBD domain の大腸菌で発現系を構築し、精製を行った。

報告されている文献に従い UHRF1 のリン酸化 Ser287 を含むペプチドと P1k1 の PBD domain を混合し、結晶化条件の検索を行った。その結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤として用いた時に結晶が得られた。得られた結晶の X 線回折強度データの収集を大型放射光施設 Photon Factory で行い、2.0 Å 分解能の反射を得た。得られた回折データの位相計算は、P1k1 PBD domain 単体の構造をサーチモデルとして分子置換法で行った。構造解析の結果、非対称単位に 4 分子の PBD domain が含まれていた。しかし、UHRF1 の Ser287 リン酸化ペプチドが結合すると予測された PBD domain の領域 (His538, Lys540) には、リン酸化ペプチドに相当する電子密度が観測されず、P1k1 に結合していないことが分かった。また、UHRF1 Ser287 リン酸化ペプチドと P1k1 PBD domain との結合を ITC を用いて解析したが、結合に伴う反応熱は観測されず結合は確認できなかった。

In vivo で報告されている結合と、試験管内での結合が一致しないことは、細胞内では UHRF1 は多種多様なタンパク質と相互作用することが報告されているので、他のタンパク質因子が UHRF1 と PBD domain の結合を強くすることに関与している可能性が考えられる。また UHRF1 の Ser 287 を含むリンカー領域のみでは結合が不十分であることも考えられるので、今後さらなる相互作用領域の検討を必要とする。

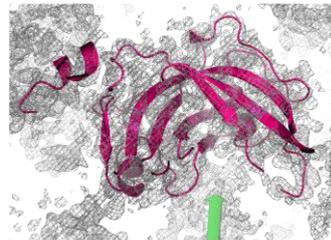
## (3) ヒストン修飾酵素 JMJD6 との複合体構造解析

JMJD6 の大腸菌での発現系を構築し、精製を行った。共同研究者が発見した基質タンパク質の JMJD6 結合領域を含むペプチドとの複合体を調製し結晶化条件の探索を行った。しかし、結晶は得られなかった。また、JMJD6 はアミノ酸配列に基づく 2 次構造予測から、C 末端領域が立体構造を取っていないことが予測された。そのような領域はタンパク質分子が一定のコンフォメーションを形成するのに阻害的に働き、結晶化能を著しく低下させる。そこで、この C 末端領域を削除した JMJD6 を調製し、上記と同様に基質ペプチドと複合体を形成させ結晶化を行った。しかし、JMJD6 の結晶は得られていない。これは精製の過程で JMJD6 全長または C 末端欠失体が自己会合を起し非特異的に凝集している傾向を示しており、それが結晶化を妨げている原因として考えられる。今後精製条件のさらなる

検討を要する。さらに、基質ペプチドと JMJD6 の結合が遷移的であるために結晶が得られなかった可能性も考えられる。今後は、物理化学的手法による詳細な相互作用解析を行う必要がある。また JMJD6 の水酸化活性を消失させた部位特異的変異体を作成し、基質との結合をより強固にした状態で結晶化を行っていくなどの改善策が必要である。

## (4) UHRF2 SRA domain と DNA との複合体構造解析

UHRF2 の SRA domain が 5mC を含む DNA に加えて、5hmC を含む DNA にも結合することを新たに解明した。一方で UHRF1 の SRA domain は 5hmC を含む DNA に対しては結合を示さないことがわかり、UHRF1 と UHRF2 で SRA domain の基質特異性が大きく異なることが明らかになった。さらにメチル化シトシンの酸化誘導体である 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシシトシンにも UHRF2 の SRA domain が結合できることをゲルシフトアッセイによって新たに見出した。しかし、UHRF2 SRA domain のこれらの DNA への結合は非常に弱いことが競合阻害剤を用いた DNA 結合実験で明らかになった。さらに UHRF2 の SRA domain と 5hmC を含む DNA との複合体を調製し結晶化に成功した (下図)。UHRF2 の SRA domain の構造は



UHRF2 SRAドメインの構造電子密度図。  
DNA結合領域に、ヒドロキシルメチル化DNA  
由来の電子密度が観測されなかった。

UHRF1 ととてもよく似ていることが分かった。しかし、X 線結晶構造解析によって得られた結晶構造中には DNA 分子が含まれていなかった。また UHRF2 SRA

domain のメチルシトシン結合ポケットの構造を見ると、このポケットを形成するアミノ酸残基が一定のコンフォメーションを取っていないことが分かった。つまりメチルシトシン結合ポケットの構造が運動性に富んでいることが予想される。このような運動性の高さが、様々な修飾が入った DNA を認識できる一方で、その認識が厳密でないため弱い結合として観測されたと考えられる。UHRF2 SRA domain のこのような DNA への結合特性が、UHRF1 の SRA domain の機能とどのように使い分けられて細胞内の機能を制御しているのかを今後明らかにしていく予定である。また UHRF2 SRA domain とヘミメチル化 DNA、および未修飾の DNA との解離定数を蛍光偏光解消実験で行ったところ  $K_d$  が約 1.7  $\mu\text{M}$  であることが分かった。DNA との結合を定量的に比較できる系を確立できたので、今後 5hmC, 5foC, 5caC の酸化誘導体 DNA との結合を定量的に解析していく。

また、UHRF2 は UHRF1 同様にヒストン認識に関与する Tudor-PHD domain を持つ。UHRF1 の Tudor-PHD は特異的にヒストン H3K9me3 と 1:1 で結合することを明らかにしている。UHRF2 の Tudor-PHD の領域を大腸菌内で発現させ、精製し、ヒストン H3K9me3 との結合を ITC により解析した。UHRF2 の Tudor-PHD は UHRF1 とは違ってヒストン H3 に 1:1 で結合しないことが明らかになった。UHRF1 と UHRF2 は高いアミノ酸相同性を持ち同じ構造ドメインを持つものの、各々のドメインの基質認識機構が大きく異なっていることが示唆される。今後は、このような UHRF1 と UHRF2 の機能の違いが何に起因するのか、基質特異性の違いが、細胞内の機能にどのように影響するのかを構造生物学的、分子生物学的な手法を用いて明らかにしていく予定である。

本研究により明らかになった点

- ・ DNA メチル化維持に関わる UHRF1 と Dnmt1 の相互作用領域を同定し、その相互作用を定量的に解析した。
- ・ UHRF1 と Dnmt1 の相互作用が遷移的である可能性を明らかにした。
- ・ UHRF1 と Dnmt1 の新たな相互作用領域の同定を行った。
- ・ UHRF2 の DNA 結合特性を明らかに、様々な修飾の入った DNA と結合することを明らかにした。

今後は、UHRF1 と Dnmt1 の相互作用解析から DNA メチル化維持機構の分子基盤を構築することを目的に研究を進める。本申請で得られた、UHRF1 と Dnmt1 の相互作用領域の解析は今後の研究の進展に波及すると考えられる。また UHRF2 に関してはメチル化 DNA やその酸化体 DNA との結合能を定量的に比較する実験系を確立したので、今後詳細に DNA 結合能を解析していく予定である。また、UHRF2 のヒストン認識機構と DNA 認識機構がどのようにカップリングしていくかを構造生物学的な観点から解明していく予定である。

## 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 2 件)

Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin. (査読あり)  
Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J, Sou YS, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M, Tochio H.  
Journal of Biochemistry, **286**, 31864-31872 2011.

Structural basis for recognition of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45. (査読あり)

Sekiyama N, Arita K, Ikeda Y, Hashiguchi K, Ariyoshi M, Tochio H, Saitoh H, Shirakawa M.  
Proteins, **78**, 1491-1502 2010.

[学会発表] (計 6 件)

Structural basis for maintenance of DNA methylation and recognition of histone modifications by UHRF1.

有田恭平 (白川昌宏代理).

第 34 回日本分子生物学会. 2011/12/15.

Structural basis for recognition of epigenetic marks by UHRF1.

Kyohei Arita, Kazuya Sugita, Motoko Unoki, Ryuji Hamamoto, Shin Isogai, Mariko Ariyoshi, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa.

第 11 回日本蛋白質科学会年会. 2011/6/7.

Structural basis for recognition of histone modifications by UHRF1.

Kyohei Arita.

構造エピゲノム研究会第3回ワークショップ.  
2011/4/25

Structural basis for recognition of epigenetic modifications by UHRF1.

Kyohei Arita.

新学術領域「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第1回国際シンポジウム. 2011年1月27日.

UHRF1 によるエピジェネティックマークの読み取り機構の構造生物学的基盤.

有田 恭平, 杉田 和也, 鶴木 元香, 浜本 隆二, 有吉 真理子, 朽尾 豪人, 白川 昌宏.  
BMB2010. 2010年12月10日.

UHRF1 タンパク質によるヘミメチル化 DNA とヒストン修飾の認識機構.

有田恭平, 杉田和也, 有吉真理子, 鶴木元香, 朽尾豪人, 中村祐輔, 白川昌宏.

第 4 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2010 年 5 月 29 日

[図書] (計 1 件)

Non coding RNA in plants (Springer 出版).  
Cytosine Methylation to Histone Modification in Arabidopsis thaliana.  
Arita K., Kanno T., Yoshikawa M., and Habu Y. 2011

[その他]

ホームページ等

[http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng\\_01/](http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有田恭平 (Kyohei Arita)

京都大学 工学研究科・助教

研究者番号：40549648