

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570153

研究課題名(和文)維持型DNAメチル化酵素の構造を基盤とした機能解析

研究課題名(英文) Study of maintenance DNA methylation based on the structure of DNA methyltransferase

研究代表者

末武 勲 (Suetake, Isao)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：80304054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAにメチル基が導入される際、それがどのように制御されるかを理解することは、細胞分化、癌化の分子機構を明らかにするうえで重要なことである。なかでも、一旦形成されたDNAのメチル化模様は、細胞分裂を超えて、正確に維持されないと、癌化などの異常を引き起こすことが知られている。DNAメチル化模様を維持する酵素、Dnmt1、のC末端には触媒領域があり、N末端側には機能が解明されていない領域がある。そのN末端の機能解析をした結果、Dnmt1のN末端に存在するRFTS領域に依存して、その活性が制御されることをみいだした。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation of cytosine is a key epigenetic modification and crucial for normal development of mammals. DNA methylation patterns were maintained by Dnmt1. Mouse Dnmt1 is composed from multiple domains; the replication foci targeting sequence (RFTS), catalytic domain, and so on. From three-dimensional structure of mouse Dnmt1 lacking the N-terminal platform domain, a striking feature that the RFTS plugs the catalytic pocket is observed. Substrate DNA cannot gain access to the catalytic center unless the RFTS is removed from the catalytic pocket. Uhrf1 is reported to be a prerequisite factor. The SRA domain of Uhrf1 specifically recognizes hemi-methylated CpG. In the present study, I have demonstrated that the direct interaction between the SRA of Uhrf1 and Dnmt1 contributes to the removal of the RFTS from the catalytic pocket to allow access of the substrate hemi-methylated DNA to the catalytic center. I elucidated one of the mechanisms to regulate maintenance methylation.

研究分野：生化学

キーワード：Dnmt DNA methylation epigenetics

## 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 のメチル化模様を積極的に消去する機構として、これまでにいくつか提案されているが、生体内でどのように機能するかについては不明で、今後の研究が待たれるところが大きい。一方、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。また、Dnmt1 に関しては、それを潰すと ES 細胞を分化誘導すると致死になること、また体細胞でも細胞周期に異常が出るということが知られており、Dnmt1 は生体内で重要な役割を果たしていることがうかがえる。

これまでに、Dnmt1 は、部分発現体を解析することやホモロジー検索により、マルチドメイン構造をとっていることが示唆されてきた。よくわかっているものでは、N 末端から、DNA 複製点に局在化するのに必要とされてきた RFTS 領域、2 価金属を配位する Zincフィンガー (CXXC) 領域、BAH 領域、最後にバクテリアから保存された活性領域である。しかし、各ドメインの配置については、3 つのグループが独立に立体構造を報告するまで明らかになっていなかった。なかでも、私たちが明らかにした構造は、291-1620 アミノ酸領域と、最も長く、分子内のほぼ全ての領域の配置を明らかにした (Takeshita et al., *PNAS* 2011)。本研究では、この構造を基にし、Dnmt1 の機能構造連関について明らかにしたい。

## 2. 研究の目的

真核細胞では、DNA 塩基配列に依存しない遺伝様式がある。その制御には、DNA のメチル

化、ヒストンの化学修飾、低分子 RNA などが関与することが知られている。DNA のメチル化模様はゲノムに一旦形成されると、その模様は、細胞分裂を超えて、安定に受け継がれていく。受け継がれない場合は、細胞分裂異常や癌化などを引き起こす。DNA 複製時に、メチル化模様を維持する酵素に Dnmt1 がある。本研究では、これまでに明らかにした構造を基盤として Dnmt1 の触媒反応機構を解析すること、ならびに結合因子による機能調節機構を解明するのを目的とする。

## 3. 研究の方法

Dnmt1 や Dnmt3 の結合因子などの組換え体を用意する。種々の因子が試験管内で Dnmt1 のメチル化活性に与える効果、さらに変異が与える効果について調べた。この際、メチル基受容基質として合成オリゴヌクレオチド、メチル基供与体基質として放射ラベルした S-アデノシルメチオニンを用いた。メチル化反応後に、DNA に取り込まれる放射活性の量を定量することで、DNA メチル化活性をモニターした。

## 4. 研究成果

Dnmt1 の N 末端に存在する RFTS 領域の存在に依存して、Dnmt1 の酵素学的性質に違いが現れることを見いだした (Berkyurek et al., *J. Biol. Chem.* 2014)。具体的には、人工的ではあるが、非常に短い 12 bp の DNA を基質とした際、RFTS を含む Dnmt1 (Dnmt1(291-1620)) は活性を示さないが、RFTS 領域を欠いた Dnmt1 (Dnmt1(620-1620)) は、有意な活性を示すことを見出した。これは、結晶構造から、触媒領域に RFTS 領域が刺さりこんでいるため、DNA が認識しにくいのではないかと考え、RFTS 領域と触媒領域との間で水素結合を担うアミノ酸に変異を入れたところ、RFTS 領域を含む Dnmt1(291-1620)でも、期待通り Dnmt1(620-1620)に近い性質を示すようになった。

一方、DNA メチル化の維持に必須である Uhrf1 分子内部の SRA ドメインはヘミメチル化 DNA を認識することが知られている。SRA は、Dnmt1 の RFTS と結合すること、また SRA の添加により、Dnmt1(291-1620)は短い DNA に対して活性を示すことから、2 者の相互作用が触媒活性の制御に関与することを示すことができた。なお、SRA のヘミメチル化 DNA 認識に必須のアミノ酸に変異を入れても、Dnmt1(291-1620)の活性促進が認められたため、SRA の DNA 結合能は、Dnmt1 の活性制御には直接関与しないことも示すことができた。

これらのことから、ヘミメチル化 DNA を認識し結合することが知られている SRA が、その DNA 結合を介さず、Dnmt1 の RFTS 領域を触媒領域から乖離させ、基質 DNA が触媒領域にアクセスできるように制御をかけると提案することができた。

得られた成果は、よく似た研究展開をしているドイツのグループと比べ、一步前をいくものであるとともに、現段階では国内に同等の研究を行っているグループはなく、オリジナリティーが高いといえる。今後は、この実験系をさらに発展させることで、Dnmt1の変異の中でも神経疾患と関連がある変異について、その性質を調べ、疾患の分子機構を明らかにすることができるのではないかと考えている。

#### 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6件)

- 1 Mizushima R, Kim JK, Suetake I, Tanaka H, Takai T, Kamiya N, Takano Y, Mishima Y, Tajima S, Goto Y, Fukui K, Lee YH. (2014) NMR Characterization of the Interaction of the Endonuclease Domain of MutL with Divalent Metal Ions and ATP *PLoS One*. **9**, e98554.
2. Berkyurek AC, Suetake I, Arita K, Takeshita K, Nakagawa A, Shirakawa M, Tajima S. (2014) The DNA Methyltransferase Dnmt1 Directly Interacts with the SET and RING Finger Associated (SRA) Domain of the Multifunctional Protein Uhrf1 to Facilitate Accession of the Catalytic Center to Hemi-methylated DNA. *J Biol Chem*. **289**, 379-386.
- 3, Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi R, Kimura H, Suetake I, Ohata H, Okamoto K, Tajima S, Ochiya T, Abe Y, and Hatada I. (2013) Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. *PeerJ*, **1**, e230.
- 4, Otani J, Kimura H, Sharif J, Endo TA, Mishima Y, Kawakami T, Koseki H, Shirakawa M, Suetake I, Tajima S. (2013) Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl Cytosine in mouse embryonic stem cells. *PLoS One*. **8**, e82961.
5. Otani J, Arita K, Kato T, Kinoshita M, Kimura H, Suetake I, Tajima S, Ariyoshi M, Shirakawa M. (2013) Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4. *J Biol Chem*. **288**, 6351-62.
6. Mishima Y, Watanabe M, Kawakami T, Jayasinghe CD, Otani J, Kikugawa Y, Shirakawa M, Kimura H, Nishimura O, Aimoto S, Tajima S, and Suetake I\*. (2013) Hinge and chromoshadow of HP1 $\alpha$  participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **425**, 54-70. (\*; corresponding author)

[学会発表](計28件)

1. Suetake I. Novel mechanism for reading an

epigenetic mark. The 2nd Awaji International Workshop on Electron Spin Science and technology: Biological and Materials Science Oriented Applications, 2nd AWEST 2014, June 15-17, at Awaji Yumebutai, 2014.

2. Kawakami T, Yoshikawa R, Fujiyoshi Y, Hojo H, Tajima S, Suetake I, Synthesis of histone by the use of Cys-Pro ester (CPE) ligation, 33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria, Aug 31-Sep 5, 2014.

3. 末武勲、ヘテロクロマチンタンパク質、HP1 アイソフォームによるヌクレオソーム内のヒストン H3K9me3 の認識、第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 15 日、京都国際会議場

- 4.川上徹、吉川諒、藤吉佑樹、北條裕信、田嶋正二、末武勲、組換えペプチドを C 末端側合成ブロックとして用いた Cys-Pro エステル (CPE) ライゲーション法によるヒストンタンパク質の合成、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27~30 日、名古屋大学 東山キャンパス

5. 三島優一、川上徹、大谷淳二、木村博信、白川昌宏、田嶋正二、末武勲 HP1 によるヌクレオソーム構造依存的なヒストン H3K9me3 の認識機構、第 37 回 日本分子生物学会、2014 年 11 月 25-27 日第 37 回 日本分子生物学会 パシフィコ横浜

6. 高橋沙央里、末武勲、Jan Engelhardt、幸田尚、田嶋正二、組換え DNMT1 を用いたヒドロキシメチルシトシンの一塩基解像度の検出方法の開発 第 37 回 日本分子生物学会、2014 年 11 月 25-27 日第 37 回 日本分子生物学会 パシフィコ横浜

7. 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、畑田出穂、CRISPR/Cas 法により樹立した Tet トリプルノックアウト ES 細胞の特性、第 37 回 日本分子生物学会、2014 年 11 月 25-27 日第 37 回 日本分子生物学会 パシフィコ横浜

8. 川上徹、吉川諒、藤吉佑樹、北條裕信、田嶋正二、末武勲、組換えペプチドを C 末端側合成ブロックとして用いた Cys-Pro エステル (CPE) ライゲーション法によるヒストンの合成、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、伊藤国際学術研究センター (東京大学構内)

9. 末武勲、白川昌宏、田嶋正二、組換え DNMT1 を利用したヒドロキシメチル化シトシンの 1 塩基レベルの新規解析方法の開発、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、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

10. 三島優一、川上徹、大谷淳二、木村博信、白川昌宏、田嶋正二、末武勲、HP1 $\gamma$  はヒストン H3K9me3 修飾とヌクレオソームの高次構造を同時に認識している、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、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

11. 木村博信、末武勲、遠井紀江、川上徹、饗庭一博、中辻憲夫、田嶋正二、プロモーター領域でのヒドロキシメチルシトシンのメチルシトシンに対する相対位置は遺伝子発現と相関する、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、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

12. アーメット・キャン・ベルキュレック、末武勲、有田恭平、竹下浩平、中川敦史、白川昌宏、田嶋正二、Dnmt1 (RFTS) と Uhrf1 (SRA) の相互作用により DNA は触媒中心に近づけるようになる、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、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

13. ロナルド・G・ガルピレス、木村博信、アーメット・キャン・ベルキュレック、末武勲、田嶋正二、遺伝性知覚神経疾患の原因となる Dnmt1 の RFTS 内の変異が DNA 維持メチル化に及ぼす影響、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、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

14. Kawakami T, Akai Y, Yoshikawa R, Suetake I, Tajima S, Aimoto S. Total Chemical Synthesis and Semi-synthesis of Histone H3 and H4 by the Use of Cys-Pro Ester Auto-activating Unit for the Thioester. 4th Asia-pacific International peptide symposium, 50th Japanese Peptide symposium Nov 6-8th, Hankyu Hotel Suita, Osaka, Japan, Nov 6-8, 2013

15. 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、安部由美子、田嶋正二、落谷孝広、畑田出穂、CRISPR/Cas9 システムによる哺乳類半数体 ES 細胞のゲノム操作第36回分子生物学会、12月3-6日、神戸ポートアイランド

16. 堀居拓郎、森田純代、木村美香、田村大樹、小林遼平、山崎美帆、家坂直子、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、峯岸敬、伊藤理廣、安部由美子、畑田出穂、小分子 RNA 配列と相補的な DNA を切断する CRISPR/Cas9 ヌクレ

アーゼを用いた高効率ゲノム編集第5回日本 RNAi 研究会 8月29-31日 広島市 グランドプリンスホテル広島

17. 西村泰介、山本章子、Broger Larissa, 山口勝司、末武勲、三島優一、加藤悦子、富田洋子、田嶋正二、重信秀治、Paszkowski Jerzy、シロイヌナズナ SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月30~31日、奈良県新公会堂

18. Suetake I. Study of the molecular mechanisms underlying epigenetics, The 1st Awaji International Workshop on Electron Spin Science and technology: Biological and Materials Science Oriented Applications, 1st AWEST 2013, June16-18, at Awaji Yumebutai, 2013.

19. Tajima S, Takeshita K, Suetake I, Nakagawa A. Multi-step process of maintenance methylation. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Science Research Conference. Biological methylation: From DNA and histone to disease, Aug 12-17, at the sivertree Hotel, snowmass Village, Colorado, 2012.

20. 西村泰介、山本章子、Broger Larissa, 山口勝司、末武勲、三島優一、加藤悦子、富田洋子、田嶋正二、重信秀治、Paszkowski Jerzy、シロイヌナズナ SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月30~31日、奈良県新公会堂

21. 川上徹、吉川諒、相本三郎、田嶋正二、末武勲、ケミカルライゲーションによる修飾ヒストン合成法の開発：K20 トリメチル化ヒストン H4 の合成とテトラソームの再構成、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月30~31日、奈良県新公会堂

22. アーメット・キャン・ベルキュレック、有田恭平、竹下浩平、中川敦史、白川昌宏、末武勲、田嶋正二、DNA 鎖長と Np95 の SRA 領域は Dnmt1 の RFTS を触媒ポケットから除去するステップに寄与する、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月30~31日、奈良県新公会堂

23. ロナルド G. ガルピレス、長谷川貴志、木村博信、ジャファル シャリフ、古関明彦、末武勲、田嶋正二、Dnmt1 の RFTS と触媒領域間の水素結合の DNA メチル化に果たす役割、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月30~31日、奈良県新公会堂

24. 三島優一、渡辺真、川上徹、大谷淳二、木村宏、白川昌宏、西村紀、相本三郎、田嶋

正二、末武勲、ヘテロクロマチン蛋白質 1□  
によるヌクレオソーム内の K9 メチル化ヒス  
トン H3 の選択的認識機構の解析、第7回日  
本エピジェネティクス研究会年会、2012年5  
月30～31日、奈良県新公会堂

25.岡翔太、ラウラ ブルックナー、三島優一、  
末武勲、田嶋正二、ヘミメチル化 DNA によ  
るヌクレオソーム再構成と Dnmt1 によるメ  
チル化、第7回日本エピジェネティクス研究  
会年会、2012年5月30～31日、奈良県新公  
会堂

26. 木村博信、大谷淳二、川上徹、白川昌宏、  
末武勲、田嶋正二、マウス ES 細胞における  
ヒドロキシメチルシトシンの産生と消去、第  
7回日本エピジェネティクス研究会年会、  
2012年5月30～31日、奈良県新公会堂

〔図書〕(計 1 件)

末武勲、DNA メチル化、遺伝子医学 MOOK  
25号「エピジェネティクスと病気」、佐々木  
裕之 監修、pp.24 -30、メディカル ドゥ、大  
阪、2013

〔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

## 6. 研究組織

### (1)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