

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790290

研究課題名(和文) DNA維持メチル化におけるDNA複製装置の役割

研究課題名(英文) The role of DNA replication machinery in maintenance of DNA methylation

研究代表者

西山 敦哉(Nishiyama, Atsuya)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50378840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのメチル化は細胞固有の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしており、その維持機構の破綻は細胞のがん化や異常な発生・分化の原因となる。我々は、アフリカツメガエル卵抽出液を用いて、DNA複製に伴う維持DNAメチル化を試験管内で再現することに成功し、その分子機構について詳細な解析を行った。その結果、(1)DNAメチル化酵素Dnmt1のリクルーターであるUhrf1がDNA複製時特異的にヒストンH3をユビキチン化すること、(2)ユビキチン化H3がDnmt1をメチル化部位へ呼びこむプラットフォームとして機能していることを明らかにし、DNAメチル化維持機構について新たなモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Faithful propagation of DNA methylation patterns during DNA replication is critical for maintaining cellular phenotypes of individual differentiated cells. However, it is unclear how the maintenance of DNA methylation and DNA replication is coordinated. Using *Xenopus* egg extracts, we successfully reproduce maintenance DNA methylation in vitro. We found that Uhrf1 has an activity to ubiquitylate histone H3. Dnmt1, which converts hemi-methyl DNA to full-methyl DNA, preferentially associates with ubiquitylated histone H3 in vitro through a region previously identified as a replication foci targeting sequence. We also show that ubiquitin ligase activity of Uhrf1 is essential for Dnmt1 recruitment to DNA replication sites and maintaining DNA methylation in mammalian cultured cells. Our finding represents the first evidence of the mechanistic link between DNA methylation and DNA replication through histone H3 ubiquitylation.

研究分野：医歯薬学

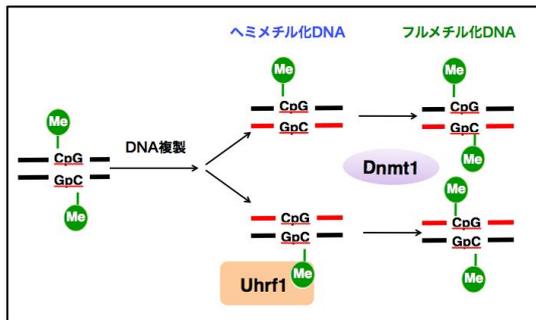
科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：DNAメチル化 ユビキチン化 DNA複製 試験管内系 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は、メチル化 DNA 結合タンパク質の働きを介して、転写の抑制やクロマチン構造の変換を行うことで、細胞固有の遺伝子発現を制御している。その維持機構の破綻は、異常な発生・分化のみならず、細胞のがん化や染色体不安定性を引き起こす。

DNA 複製に伴う DNA メチル化パターンの維持は、DNA メチル化酵素 Dnmt1 が DNA 複製によって一過的に生じる片鎖メチル化 DNA を両鎖メチル化 DNA に変換することで行なわれる。片鎖メチル化 DNA には、特異的結合タンパク質である Uhrf1 が結合し、Dnmt1 のメチル化部位へのリクルートに必須の役割を果たす (図 1)。



Uhrf1 は片鎖メチル化 DNA にその SRA ドメインを介して結合するが、その他にもヒストン H3 に結合する Tudor ドメインと PHD ドメイン、ユビキチンリガーゼ活性を担う Ring finger ドメインを持つ。しかしながら、DNA メチル化パターンの維持におけるその役割やユビキチンリガーゼの標的となる基質タンパク質については全く不明であった。

このように DNA メチル化の生物学的重要性が明らかとなってきたのと対照的に、その分子機構の理解は驚くほど進んでいない。その背景には遺伝学を用いた解析に優れた酵母やショウジョウバエでは DNA メチル化が見られないこと、また維持 DNA メチル化が DNA 複製を伴う複雑な反応であるため、生化学的な解析が困難である点などが挙げられる。これまで、維持 DNA メチル化の生化学的解析の試みとして、メチル化プラスミド DNA を基質とした SV40 試験管内複製系を用いた解析があったが、「染色体上のメチル化 DNA」の維持について試験管内で再現した例については、これまで報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究は、維持 DNA メチル化機構の詳細を明らかにするために、試験管内系を用いて DNA メチル化を評価できる実験系を構築すること、また確立した実験系を用いて、DNA メチル化維持機構と DNA 複製の関わりを分子レベルで明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

維持 DNA メチル化を試験管内で再現するため

に、確立した DNA 複製系であるアフリカツメガエル卵抽出液を用いた。ツメガエル未受精卵を遠心破碎して得られる卵抽出液は、基質である精子核 DNA を加える事で、DNA 複製、及びそれに伴う染色体上のイベントを試験管内で再現することが可能である。この反応系は、特異抗体による蛋白質の除去や、通常細胞を致死に至らしめる薬剤処理、蛋白質の過剰添加を容易に行うことができ、生化学的解析に非常に適している。

本研究では、まず維持 DNA メチル化機構の中心にある Dnmt1 及び Uhrf1 について、卵抽出液を用いた機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ツメガエル卵抽出液による維持 DNA メチル化の再現

ツメガエル卵抽出液に DNA メチル化を維持する活性があるかどうか調べるために、高度にメチル化を受けた精子核クロマチンを DNA 複製の基質として、メチル基ドナーである SAM を放射線標識したものと共に抽出液に加えた。その後、複製された精子 DNA を精製し、取り込まれた放射線のカウントを測定した。その結果、コントロールの抽出液では、放射線の有意な取り込みが計測され、DNA がメチル化を受けていることが示された。また、Uhrf1 を特異抗体で免疫除去、あるいは DNA 複製を阻害した場合には、この取り込みは完全に抑制され、DNA メチル化酵素である Dnmt1 のクロマチンへの結合も抑制されたことから、上記のメチル化が DNA 複製かつ Uhrf1 依存的なものであることが明らかになった。これは維持 DNA メチル化が卵抽出液を用いて再現できることを強く示唆している (図 2)。

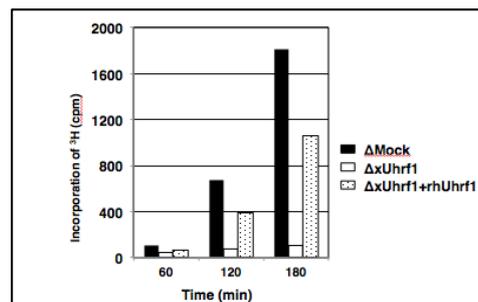


図 2: Uhrf1 は卵抽出液における複製依存的なメチル化に必要である Uhrf1 除去抽出液にバッファーあるいは精製したリコンビナント hUhrf1 蛋白質を加え、³H-SAM 存在下で精子核 DNA への³H の取り込みを指標に DNA メチル化活性を測定した。コントロールの抽出液についても同様に処理した。

(2) Uhrf1 依存的なヒストン H3 ユビキチン化次に無細胞系から、Dnmt1 を免疫除去した場合のクロマチン蛋白質の変動について解析を行った。その結果、Dnmt1 の免疫除去は Uhrf1 のクロマチン結合が顕著な亢進を促すことが分かった。これは、ヘミメチル化 DNA の蓄積によるものと考えられる。興味深いことに、この時同時にユビキチン化修飾を受けたヒストン H3 がクロマチン上で観察された。このユビキチン化は DNA 複製の阻害や Uhrf1 の免疫除去によって失われる一方、精製した

Dnmt1 を Dnmt1 除去抽出液に加え戻すことで消失した (図 3)。質量分析により、ユビキチン化部位を同定したところ、H3 の K23 が主要なユビキチン化部位であることが分かった。

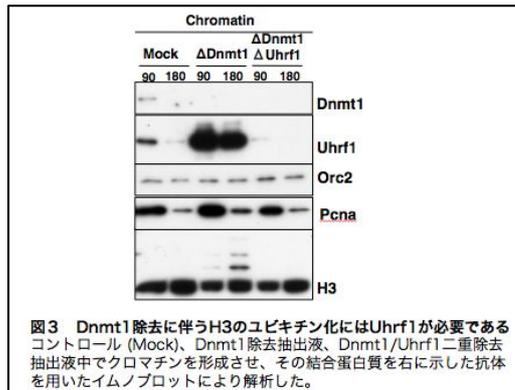


図3 Dnmt1除去に伴うH3のユビキチン化にはUhrf1が必要である
コントロール (Mock)、Dnmt1除去抽出液、Dnmt1/Uhrf1二重除去抽出液中でクロマチンを形成させ、その結合蛋白質を右に示した抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

(3)Dnmt1 とユビキチン化 H3 の結合
ヒストン H3 のユビキチン化の維持 DNA メチル化における役割を調べるために、その結合蛋白質の探索を行った。Dnmt1 除去抽出液、および対照の抽出液から得たクロマチン画分を MNase で可溶化、SDS で変性処理をした後、抗ヒストン H3 抗体を用いて免疫沈降を行うことにより、ユビキチン化の有無の違いを持つ H3 ビーズを作製した。これらのビーズを用いて、新たな抽出液からプルダウンアッセイを行ったところ、Dnmt1 がユビキチン化 H3 特異的に結合する活性を示すことが分かった (図 4)。この結合は、リコンビナント Dnmt1 により、ユビキチン化 H3 のみが特異的に pull-down されたことにより確認され、また変異体を用いた解析により、その結合が Dnmt1 の複製部位への局在に必須とされる Replication foci targeting sequence (RFTS) 領域を介して行なわれることが示された。この結果は、ユビキチン化 H3 と Dnmt1 の結合が、その複製部位へのリクルートに重要である可能性を示唆する。

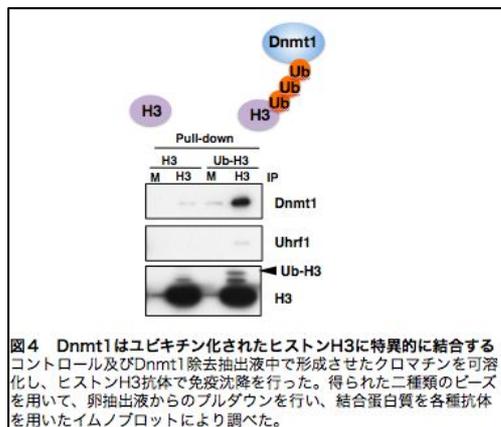
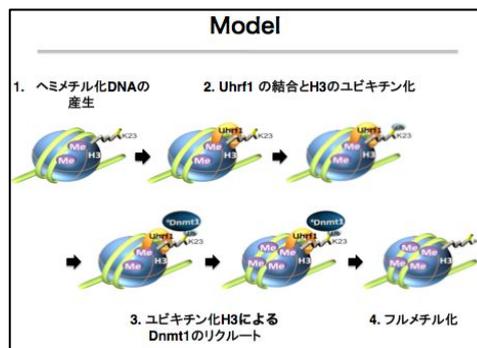


図4 Dnmt1はユビキチン化されたヒストンH3に特異的に結合する
コントロール及びDnmt1除去抽出液中で形成させたクロマチンを可溶化し、ヒストンH3抗体で免疫沈降を行った。得られた二種類のビーズを用いて、卵抽出液からのプルダウンを行い、結合蛋白質を各種抗体を用いたイムノブロットにより調べた。

(4)Uhrf1のユビキチンリガーゼ活性はDNAメチル化維持に重要である
(3)で得られた仮説を検証するために、Uhrf1コンディショナルノックアウト ES 細胞に野生型、ユビキチンリガーゼ活性を担う Ring

finger 部位に変異を導入した Uhrf1 をそれぞれ発現させ、DNA メチル化レベルを検証した。その結果、Ring 変異体では DNA メチル化レベルが大きく減少していることが明らかになった。

以上の結果から、ヘミメチル化 DNA に結合した Uhrf1 がヒストン H3 をユビキチン化することで、その結合蛋白質である Dnmt1 のリクルートを促進するという維持 DNA メチル化に対する新たなモデルを提唱することができた (図 5)。



現在、維持 DNA メチル化における DNA 複製装置の役割がヘミメチル化 DNA の産生に留まるのか、あるいはさらなるメチル化機構のカップリング機構があるのかについて、詳細な解析を進めている。

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 1 件)

Atsuya Nishiyama, Luna Yamaguchi, Jafar Sharif, Yoshikazu Johmura, Takeshi Kawamura, Keiko Nakanishi, Shintaro Shimamura, Kyohei Arita, Tatsuhiko Kodama, Fuyuki Ishikawa, Haruhiko Koseki, Makoto Nakanishi
Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication
Nature(査読有), 502(7470), 2013, 249-253
DOI: 10.1038/nature12488

[学会発表] (計 7 件)

Atsuya Nishiyama, Luna Yamaguchi, Makoto Nakanishi
Regulation of DNA methylation-coupled histone H3 ubiquitylation
Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity
2014年2月5日 京都
西山敦哉、山口留奈、Jafar Sharif, 城

村由和、川村猛、中西圭子、島村真太郎、
有田恭平、児玉龍彦、石川冬木、古関明
彦、中西真

Uhrf1 依存的なヒストン H3 のユビキチ
ン化を介した DNA 維持メチル化制御機
構

第 36 回分子生物学会年会

2013 年 12 月 6 日 神戸

西山敦哉

ヒストン H3 のユビキチン化と DNA 維持
メチル化制御

平成 25 年度遺伝研研究会「クロマチン
による遺伝情報のエピジェネティック
制御機構」

2013 年 10 月 18 日 三島

山口留奈、西山敦哉、城村由和、島村真
太郎、石川冬木、秋山昌広、真木寿治、
中西真

Uhrf1 依存的な PCNA のモノユビキチ
ン化を介した TLS ポリメラーゼと DNA 維持
メチル化の関わり

第 35 回分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日 博多

西山敦哉、山口留奈、城村由和、島村真
太郎、石川冬木、川村猛、Jafar Sharif、
古関明彦、中西真

ヒストン H3 のユビキチン化を介した
DNA 維持メチル化の監視機構

第 35 回分子生物学会年会

2012 年 12 月 11 日 博多

Yamaguchi L, Nishiyama A, Johmura Y,
Shimamura S, Ishikawa F, Hanaoka F,
Nakanishi M

Implication of TLS in maintaining
genome integrity under defective
maintenance DNA methylation through
Uhrf1-dependent PCNA ubiquitylation
The 8th 3R Symposium

2012 年 11 月 25 日 淡路

Nishiyama A, Yamaguchi L, Johmura Y,
Shimamura S, Ishikawa F, Sharif J,
Koseki H, Nakanishi M

Uhrf1-mediated histone H3
ubiquitylation couples DNA
methylation with DNA replication

The 8th 3R Symposium

2012 年 11 月 25 日 淡路

〔図書〕(計 1 件)

西山敦哉、山口留奈、中西真

羊土社

エピジェネティクスキーワード事典

2013 年 67-72 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 敦哉 (NISHIYAMA Atsuya)

名古屋市立大学・医学研究科・講師

研究者番号：50378840