

研究報告書

「DNAメチル化・脱メチル化によるエピジェネティック制御の分子基」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 有吉真理子

1. 研究のねらい

哺乳動物において、CpG配列中のシトシン塩基のメチル化は唯一DNA上のエピジェネティックマーカーであり、細胞分化と分化状態の維持に密接に関わっている。細胞種に特有なDNAメチル化パターンは、新規DNAメチル化によって形成され、維持型DNAメチル化によって細胞分裂を経ても忠実に維持される。一方、発生初期の胚細胞におけるエピジェネティックなリプログラミング過程や分化した細胞における特定のゲノム領域の周期的なメチル化様式の変化においては、DNA脱メチル化がおこることが明らかになってきた。本研究では、ダイナミックなDNAメチル化制御機構の分子基盤を理解するため、DNA維持メチル化に関わるUHRF1たんぱく質とDNAメチル化領域のDNA修復に関わるMBD4に注目し、X線結晶解析および核磁気共鳴法(NMR)などの構造生物学的手法を用いて、これらたんぱく質のメチル化DNA認識機構やDNAメチル化とヒストン修飾の構造機能相関を原子レベルで明らかにする。このような原子レベルでの構造知見は、DNAメチル化・脱メチル化を制御するための低分子化合物の探索、設計およびたんぱく工学的アプローチの確立に貢献するものと考えられる。また、DNAメチル化・脱メチル化は修飾されたヒストンを含むクロマチンの高次構造のコンテキストで起こる現象であり、個々のたんぱく質因子の構造解析だけでは全貌を明らかにすることはできない。本研究では、X線結晶解析を用いた原子レベルでの構造解析に加え、クロマチン構造を視野に入れたより細胞内状態に近い状態でのDNAメチル化制御因子の挙動を捉えることを試みる。そのためにX線結晶解析とその相補的な解析手段であり、分子の動的解析が可能な磁気共鳴計測手法であるNMRや一分子解析の技術を併用する。これらの測定技術とクロマチン再構成系を組み合わせることでクロマチンの高次構造の動的挙動を視野にいれた構造機能解析を行い、より高次のDNAメチル化制御機構を理解する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、構造生物学的手法を用いて、DNAメチル化・脱メチル化制御の分子基盤の解明に向け、DNA維持メチル化因子であるUHRF1[研究テーマA]および能動的DNA脱メチル化への関与が示唆されていたミスマッチ除去修復酵素MBD4[研究テーマB]の構造機能解析を行った。X線結晶解析と*in vitro*分子間相互作用実験法による構造機能相関研究及びクロマチン再構成系を組み合わせることでクロマチンの高次構造の動的挙動を視野にいれた構造機能解析を行った。

[研究テーマA]については、UHRF1のヒストン結合領域の結晶構造解析と生化学的な相互作用解析から、UHRF1による2つのヒストン残基上のエピジェネティックマークをコードとして読み取っていることが明らかになった。また、リン酸化によるUHRF1のヒストン認識モードの変換機構があきらかとなった。また、再構成モノヌクレオソームを用いた相互作用解析の結果から、UHRF1とヌクレオソームの結合には、ヒストン結合ドメインだけではなく、DNA結合ドメインであるSRAドメイン

が必要であることが明らかになった。この結果は、ヒストン結合ドメインと片鎖 CpG 結合ドメインのクロマチン上での協調的な機能発現を示唆するものである。

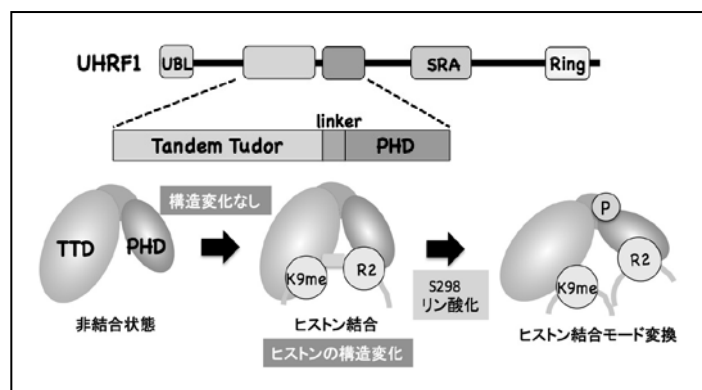
5-メチルシトシンは哺乳動物における DNA 上のエピジェネティックマークであるが、能動的脱メチル化過程においては、5-メチルシトシンの酸化もしくは脱アミノ化によって生じる修飾塩基の能動的DNA脱メチル化への関与が注目されている。[研究テーマ B]においては、MBD4 のメチル化 CpG 結合ドメインの構造機能解析を行い、MBD4 がこれら修飾塩基に対して寛容な結合能を示すことを明らかにした。本研究結果に基づき、ダイナミックに変化する DNA メチル化様式の制御における MBD4 の役割を検証した。

(2) 詳細

研究テーマA 受動的DNA脱メチル化の制御機構:UHRF1 の構造機能解析

1) 維持型 DNA メチル化制御因子 UHRF1 のヒストン認識機構

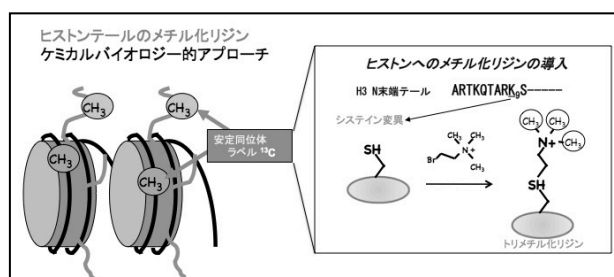
UHRF1 は、DNA複製時の維持メチル化の最初のステップにおいて、片鎖メチル化CpG部位とヒストンH3 の修飾状態を認識し、メチル化維持と受動的脱メチル化を決定する重要な因子である。UHRF1 には、片鎖メチル化CpG (5^mCG/CG) 部位との結合を担うSRAドメインとともにヒ



ストン結合ドメインであるTandem Tudorドメイン(TTD)およびPHDドメイン(TTD-PHD_{UHRF1})が存在する。TTD-PHD_{UHRF1}とヒストンH3 のN末端テールの複合体の結晶構造を決定し、TTDとPHDのドメイン間の領域のリン酸化によってUHRF1 のヒストン認識モードが制御されていることを明らかにした。また、UHRF1 がジメチルもしくはトリメチル化されたH3K9 (H3K9me_{2/3})を特異的に認識することは既に報告されていたが、今回の解析結果からH3K9me_{2/3} と非修飾状態のH3R2 を組み合わせとして認識することが明らかになった。さらに、立体構造と生化学的な実験結果から、H3S10 のリン酸化によるネガティブなUHRF1:ヒストンH3 結合制御の可能性が示唆され、H3K9me_{2/3} 単独ではなく、複数のヒストン残基の修飾状態がDNAメチル化様式の形成に関わっていると考えられる。

2) H3K9me₃を含む再構成ヌクレオソームと UHRF1 の相互作用解析

UHRF1 が認識するヒストンH3K9 をシステイン残基に置換し、メチル化リジンアナログ(H3K9Cme₃)を導入した再構成ヌクレオソームの大量調製系を確立した(右図)。H3K9Cme₃-モノヌクレオソームとUHRF1 のヒストン結合ド



メインを含む様々な領域のフラグメントを用いてヌクレオソームとの結合実験を行った。その結果、TTD-PHD_{UHRF1}だけでは、モノヌクレオソーム上のH3K9me2/3との安定な結合はみられなかった。TTD-PHD_{UHRF1}を含む様々な領域のUHRF1フラグメントとH3K9Cme3-モノヌクレオソームの相互作用を検証した。その結果、UHRF1とヌクレオソームの結合が、ヒストン結合ドメインだけではなく、DNA結合ドメインであるSRADドメインが必要であることが明らかになった。この結果は、ヒストン結合ドメインと片鎖CpG結合ドメインのクロマチン上での協調的な機能発現を示唆するものである。

研究テーマB 能動的脱メチル化の制御機構:MBD4の構造機能解析

1) メチル化 CpG 結合たんぱく質 MBD4 の寛容な基質認識の構造基盤

メチル化CpG結合ドメイン(MBD)タンパク質ファミリーのメンバーであるMBD4は、MBDに加え、T/Gミスマッチ中のチミン塩基を切除するglycosylaseドメインを持ち、メチル化CpG配列に生じたミスマッチ塩基を除去する修復酵素として機能する。MBD4のMBD(MBD_{MBD4})は、メチル化DNAに加え、T/Gミスマッチ塩基対を認識できることが知られていたが、どのように多様な基質を認識するのかは不明であった。本研究では、生化学的な実験とX線結晶構造解析法を用いて、MBD_{MBD4}による基質認識機構を明らかにした。

まず、MBD_{MBD4}と^{5m}CG/^{5m}CG、^{5m}CG/TGを含むDNA断片との複合体の結晶構造を決定した。立体構造既知の他のファミリータンパク質のMBDに比べると、MBD4のDNA結合表面には広範な水和水のネットワークが存在し、柔軟な構造的な特徴を持つことがわかった。そのため^{5m}CG/^{5m}CG、^{5m}CG/TG、両方の配列を効率よく認識できると考えられる。MBD_{MBD4}の可塑的なDNA結合面の構造から、^{5m}Cの5位のメチル基がさらに酸化を受けたヒドロキシメチルシトシン(^{hm}C)、ホルミルシトシン(^{fo}C)、ヒドロキシメチルウラシル(^{hm}U)との結合も可能であると推測された。実際に、等温滴定カロリーメトリーやEMSAを用いた定量的なDNA結合実験の結果から、MBD_{MBD4}が酸化塩基を含むDNAとも結合することが示され、MBD4の寛容な基質認識が明らかになった。さらに、MBD_{MBD4}と^{hm}Cを含むDNAの複合体結晶構造解析により、MBD_{MBD4}のDNA結合表面の隙間に存在する水和水のネットワーク構造が柔軟に変化することによって、^{hm}Cを含むDNAとの結合が可能になっていることが明らかになった(図1)。

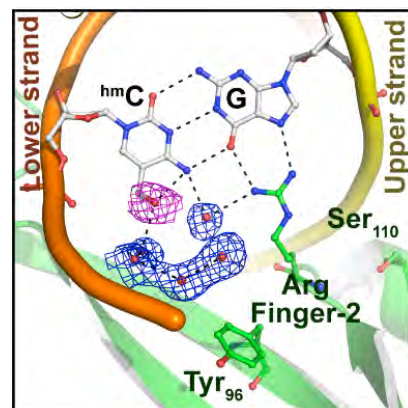


図1 MBD4のMBDによる5-ヒドロキシメチルシトシンの認識

2) MBD4の基質認識と塩基除去活性

MBD4との結合が確認された^{5m}Cの酸化や脱アミノ化によって生じる修飾塩基は、塩基除去修復を介したDNAの脱メチル化過程に関わる可能性が示唆されており、これらの修飾塩基に対するMBD4の塩基除去活性の解析を行った。その結果、MBD4はシトシンもしくはメチル化シトシンの脱アミノ化生成産物であるチミンや^{hm}U特異的な塩基除去活性を示したが、^{hm}Cなどの酸化修飾塩基に対する活性は有していなかった。一方、同様にDNA脱メチル化経路に関与

するとされる塩基除去修復酵素、チミンDNAグリコシラーゼ(TDG)においては、¹⁴Cやカルボキシシルシトシンに対する塩基除去活性が報告されている。これらのことから、MBD4 がTDGとは異なる脱メチル化経路に関与している可能性が示唆される。MBD4の酸化修飾塩基への寛容な基質認識の役割については、^{5m}Cの酸化・脱アミノ化をエピジェネティックシグナルとして認識している可能性が考えられるが、さらなる検証が必要である。

また、高速 AFM(原子間力走査型顕微鏡)による全長 MBD4 の構造解析、変異体解析の結果、基質 DNA が基質認識ドメインである MBD から glycosylase 活性ドメインへと効率的に受け渡される機能モデルを提唱した。

3. 今後の展開

本研究で明らかにしたUHRF1によるヒストン修飾認識およびMBD4によるメチル化DNAと脱アミノ化、酸化誘導体認識の原子レベルでの構造知見は、細胞内機能の解析の足がかりとなるとともに細胞内のDNAメチル化の人為的制御につながる低分子化合物の探索やたんぱく工学的アプローチの確立のための構造基盤となりうる。今回の研究期間中では、有意な結果を得るに至らなかったが、UHRF1のSRAドメインやTTD-PHDを標的とした低分子、またはペプチド性阻害剤の探索を継続して行っていく。UHRF1の^{5m}CG/CG結合阻害剤が得られれば、受動的DNA脱メチル化経路の分子機構研究、人為的制御に有効であると考えられる。また、今回確立したH3K9Cme3-ヌクレオソームの大量調製系を用いて、UHRF1やその他のエピジェネティック因子との複合体の構造機能解析に発展させていくことが可能であると考えている。

4. 自己評価

X線結晶解析、NMR法および生化学的実験手法を用いて、DNAメチル化制御の要となるたんぱく質UHRF1およびMBD4の構造基盤を明らかにすることができた。本研究結果は、DNA上のエピジェネティックマークであるシトシンの修飾読み取り機構を明らかにし、DNAメチル化・脱メチル化制御の分子基盤解明に貢献できたと考える。より細胞内に近い状態での構造機能解析として、再構成ヌクレオソームを用いた構造機能解析を試みた。これに関しては、当初の目的であるクロマチン上の機能反映を定量的な構造情報として解析するには至っていないが、生化学的な手法を用いた解析からは有用な知見を得られており、今回の研究を今後発展させることは十分可能であると考ええる。

5. 研究総括の見解

ダイナミックなDNAメチル化の制御機構の分子基盤を明らかにするために、DNAメチル化維持に関与するUHRF1タンパク質とDNAメチル化領域のDNA修復に関わるMBD4に着目し、構造生物学的手法を用いてDNAメチル化やヒストン修飾を認識する複数の重要なドメインの構造解析に成功した。UHRF1に関しては、複数のヒストン修飾を認識することを見いだした。MBD4に関して、MBDドメインが寛容性を示す基質認識の構造的基盤を明らかにしたことは、ミスマッチ修復、脱メチル化の機構解明の基礎となる。

目標達成にはまだ残されている課題が多くあり、引き続きメカニズム解明に資する構造解析と、低分子化合物のスクリーニングに取り組んで欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., **Ariyoshi, M.*** and 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.** in press doi/10.1074/jbc.M112.431098.
2. Arita, K., Isogai, S., Oda, T., Unoki, M., Sugita, K., Sekiyama, N., Kuwata, K., Hamamoto, R., Tochio, H., Sato, M., ***Ariyoshi, M.** and *Shirakawa, M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2012, Vol. 109, 12950-12955
3. Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., *Inamoto, S., ***Ariyoshi, M.** and *Shirakawa, M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNMT3A ADD domain. **EMBO report**. 2009, Vol. 10, 1235-1241.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **Ariyoshi, M.**, Arita, K., Isogai, S., Tochio, H. and Shirakawa, M.: Structural insight into epigenetic marker readout by UHRF1. 第6回ナノメディシン国際シンポジウム(2012年11月 松江) 招待講演
2. **Ariyoshi, M.**, Otani, J., Kinoshita, M. and Shirakawa, M. : Structure basis for regulation of DNA methylation. 第34回分子生物学会年会, Workshop “Molecular basis of gene regulation and genome maintenance in chromosomes” (2011年12月 横浜)
3. **Ariyoshi, M.**, Otani, J., Kinoshita, M. and Shirakawa, M. : Structural Basis of versatile DNA recognition of MBD4. XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography (Mini Symposium “Nucleosome Processing and Epigenetics”), (2011年8月 Madrid, Spain)
4. **Ariyoshi, M.**, Arita, K., Kikugawa, Y., Tochio, H. and Shirakawa, M. : Structural Insight into hemi-methylated CpG DNA recognition by SRA domain of human NP95 (poster presentation) Gordon Research Conference “Chromatin Structure & Function”, (2010年7月 Bryant University, USA)

総説



1. 有吉真理子 白川昌宏 (2011) エピジェネティクス制御におけるメチル化DNAの認識。生物物理 Vol. 51 124-127
2. 有吉真理子 白川昌宏 (2010) エピジェネティクス制御における分子認識: DNAメチル化制御の構造生物学。実験医学 9月増刊号「疾患解明とその基盤としてのエピジェネティクス」Vol. 28