



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1577号
学位記番号	第1132号
氏名	山口 留奈
授与年月日	平成29年3月24日
学位論文の題名	Role of the PCNA-interacting protein box of Dnmt1 in the maintenance of DNA methylation (Dnmt1 PIP box の DNA 維持メチル化における役割) Nagoya Medical Journal
論文審査担当者	主査： 近藤 豊 副査： 岡本 尚, 道川 誠

論文内容の要旨

高等真核生物において、DNA のメチル化は、発生や細胞分化、X 染色体の不活化やレトロトランスポゾンの転写抑制などに重要な役割を果たす。分化した細胞は、細胞固有の DNA メチル化パターンを持っており、この確立と維持は、Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b という三つの DNA methyltransferase 酵素が担うことが知られている。中でも Dnmt1 は DNA メチル化の維持において主要な酵素であり、ヘミメチル化 DNA への特異性を持ち、DNA 複製が起こる S 期に Dnmt1 の N 末領域を介して複製部位へと集積する。これまでに我々は、Dnmt1 の複製部位への集積と DNA メチル化の維持が、Uhrf1 によるヒストン H3 のユビキチン化を介して制御されていることを報告している。しかしながら、DNA 複製と DNA メチル化の分子間のカップリングの詳細については未だ不明な点が多い。我々は生化学的な解析に優れるアフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞解析系により、このカップリングの分子機構についてさらに検討を行った。

DNA メチル化と DNA 複製進行の同調について調べたところ、いずれも複製開始から 30 分で DNA メチル化や複製が始まり 90 分でプラトーに達した。この結果より、DNA 複製と DNA のメチル化の間にカップリングする何らかのメカニズムが存在することが示唆された。

Dnmt1 は N 末領域に DNA 複製の足場となる PCNA との結合に必要な PIP box と、ユビキチン化 H3 との結合に必要な RFTS ドメインを持つ。近年、RFTS ドメイン内にユビキチンと結合する機能を持つ UIM モチーフが存在することが報告された。UIM のユビキチン化 H3 との結合における役割を調べるために、UIM 内の保存されたアミノ酸残基をアラニン置換した変異体を作製した。その結果、UIM 変異体はユビキチン化された H3 及び GST ユビキチン融合タンパク質との結合を失うことが分かった。また多くのユビキチン結合ドメインとの結合に重要なユビキチンの 44 番目のイソロイシンの変異体は、野生型の Dnmt1 との結合を示さないことから、Dnmt1-UIM はユビキチンの I44 を含む疎水性パッチを介して結合していると考えられた。

PCNA と Dnmt1 の結合について検討したところ、予想された通り Dnmt1 の N 末断片は PCNA との結合を示し、この結合は RFTS ドメインの欠損による影響を受けなかった。一方、PIP box の変異体である Δ PIP においてはいずれの断片においても PCNA との結合が失われた。これは RFTS ドメインでなく、PIP box を介して Dnmt1 と PCNA が結合することを示していると考えられた。

Dnmt1 の DNA 複製とカップルしたクロマチンへの集積における UIM と PIP box の役割について検討を行った。ウサギ網状赤血球を用いて調製した Dnmt1 の野生型と Δ PIP タンパク質を卵抽出液に加え、クロマチン結合を調べたところ、 Δ PIP では Dnmt1 のクロマチン結合が失われた。この変異体はユビキチンとの結合能を持ち、ユビキチン化した H3 とも結合を示した。すなわち PIP box は Dnmt1 のクロマチンへの集積には必須であるが、ユビキチン化 H3 との結合とは独立したものであると考えられた。また、 Δ UIM 変異体のクロマチンへのリクルートも Δ PIP 同様に失われていたが、これはユビキチン化 H3 との結合能の欠損によると考えられる。

以上の結果より、DNA メチル化維持における Dnmt1 の DNA 複製にカップルしたクロマチンへの集積には PIP box および UIM モチーフの両方が必要であり、これらは独立かつ協調的に働くことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【発表の内容】

高等真核生物において、DNA のメチル化の確立と維持は、Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b という三つの DNA methyltransferase 酵素が担うことが知られており、発生や細胞分化、X 染色体の不活化やレトロトランスポソンの転写抑制などに重要な役割を果たす。中でも Dnmt1 は DNA メチル化の維持において主要な酵素であり、ヘミメチル化 DNA への特異性をもち、DNA 複製が起こる S 期に Dnmt1 の N 末領域を介して複製部位へと集積する。これまでに Dnmt1 の複製部位への集積と DNA メチル化の維持は Uhrf1 によるヒストン H3 のユビキチン化を介して制御されることを報告してきたが、DNA 複製と DNA メチル化の分子間のカップリングの詳細については未だ不明な点が多い。今回アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞解析系により検討を行った。

DNA メチル化と DNA 複製進行の同調について調べたところ、いずれも複製開始から 30 分で DNA メチル化や複製が始まり 90 分でプラトーに達した。この結果より、DNA 複製と DNA のメチル化の間にカップリングする何らかのメカニズムが存在することが示唆された。

Dnmt1 は N 末領域に DNA 複製の足場となる PCNA との結合に必要な PIP box と、ユビキチン化 H3 との結合に必要な RFTS ドメインを持つ。さらに RFTS ドメイン内にユビキチンと結合する機能を持つ UIM モチーフが存在する。UIM のユビキチン化 H3 との結合における役割を調べるために、UIM 内の保存されたアミノ酸残基をアラニン置換した変異体を作製した。その結果、UIM 変異体はユビキチン化された H3 及び GST ユビキチン融合タンパク質との結合を失った。またユビキチン結合ドメインとの結合に重要なユビキチンの 44 番目のイソロイシンの変異体は、野生型の Dnmt1 との結合を示さないことから、Dnmt1-UIM はユビキチンの I44 を含む疎水性パッチを介して結合していると考えた。

さらに PCNA と Dnmt1 の結合について検討したところ、予想された通り Dnmt1 の N 末断片は PCNA との結合を示し、この結合は RFTS ドメインの欠損による影響を受けなかった。一方、PIP box の変異体である ΔPIP においてはいずれの断片においても PCNA との結合が失われた。以上より RFTS ドメインでなく PIP box を介して Dnmt1 と PCNA が結合すると考えた。

次に Dnmt1 の DNA 複製とカップルしたクロマチンへの集積における UIM と PIP box の役割について検討を行った。ウサギ網状赤血球を用いて調製した Dnmt1 の野生型と ΔPIP タンパク質を卵抽出液に加えクロマチン結合状態を調べたところ、ΔPIP では Dnmt1 はクロマチンへの結合が失われた。この変異体はユビキチンとの結合能は保たれ、ユビキチン化した H3 と結合した。すなわち PIP box は Dnmt1 のクロマチンへの集積には必須であるが、ユビキチン化 H3 との結合とは独立したものであると考えた。また、ΔUIM 変異体のクロマチンへのリクルートも ΔPIP 同様に失われていたが、これはユビキチン化 H3 との結合能の欠損によるものと考えた。

以上の結果より、Dnmt1 の DNA 複製にカップルしたクロマチンへの集積には、PIP box および UIM モチーフの両方が必要であり、これらは独立かつ協調的に働き DNA 維持メチル化に関わることが示唆された。

(審査の内容)

主査の近藤教授から、本研究の背景、維持メチル化の機序、実験系の再現性等 11 項目、第一副査の岡本教授から、DNA 複製と DNA メチル化のタイミング、Dnmt1 の結晶構造解析等について 11 項目、第二副査の道川教授から、専門用語、Figure legend に関わる 4 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、細胞生化学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、Dnmt1 の 2 つの領域とクロマチン結合様式を解析することで、DNA 維持メチル化機構の理解を深めたものである。以上より本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 近藤 豊

副査 岡本 尚 道川 誠