



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1525号
学位記番号	第1096号
氏名	三崎 紀展
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>The Replication Foci Targeting Sequence (RFTS) of DNMT1 functions as a potent histone H3 binding domain regulated by autoinhibition (DNMT1 の RFTS 領域はヒストン H3 結合能を有し、その機能は分子内結合により抑制される)</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications (accept for publication)</p>
論文審査担当者	主査： 近藤 豊 副査： 岡本 尚, 中西 真

論文内容の要旨

DNA のメチル化はゲノムインプリンティング、X 染色体の不活化、レトロトランスポゾンのサイレンシング、そして組織特異的な遺伝子発現など、細胞の特性を規定する重要なエピジェネティクス修飾であり、DNA の複製時には新生鎖に塩基配列と共にそのメチル化パターンも正確に受け継がれる必要がある。この DNA メチル化パターンの継承は「DNA 維持メチル化機構」によって制御されており、その破綻は異常な発生・分化を引き起こすだけでなく、細胞のがん化やゲノムの不安定化の原因にもなる。DNA 維持メチル化には、DNA 複製時に生じるヘミメチル DNA に特異的に結合するタンパク質 Uhrf1(ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1)がヒストン H3 をユビキチン化することによって、Dnmt1(DNA methyltransferase 1)をリクルートすることが重要である。Dnmt1 はいくつかの機能的なドメイン構造から成り、N 末端領域には、DMAP1 (DNA methyltransferase-associated protein 1)や PCNA (proliferating cell nuclear antigen)と結合するドメイン、および RFTS(replication foci targeting sequence)があり、細胞内での Dnmt1 の局在を制御している。C 末端側には DNA メチル化酵素活性領域がある。RFTS は Uhrf1 によってユビキチン化されたヒストン H3 と直接結合し、Dnmt1 が DNA メチル化部位にリクルートされるのに必須の領域である。

最近、Dnmt1 分子内で RFTS は酵素活性領域と水素結合し、DNA メチル化活性を抑制していることが報告された。しかしながら、この結合が RFTS の機能に与える影響はわかっていない。我々は生化学的解析に優れたアフリカツメガエル卵抽出液を用いて、Dnmt1 分子内の RFTS 領域と酵素活性領域の結合が RFTS の機能に与える影響を調べた。

まず、Dnmt1 のいくつかの断片のリコンビナントタンパク質を作成し、ユビキチン化ヒストン H3 を用いてプルダウン実験を行ったところ、その他の領域の有無に関わらず RFTS 領域を含むものは、全長および断片の Dnmt1 タンパク質とユビキチン化ヒストン H3 の結合が見られた。また、ユビキチン化されていないヒストン H3 を用いて同様にプルダウン実験を行ったところ、全長のタンパク質では結合が見られなかったのに対して、RFTS 領域を含む N 末端断片では結合が見られた。さらに、この N 末端断片を用いて複製時のクロマチン結合状態をモニターすると、全長タンパク質は複製依存的にクロマチン上に結合し、複製の完了と共に離れていくのに対して、N 末端断片は複製依存的なクロマチン上へのリクルートを失い、クロマチン上に過剰に蓄積してしまうことがわかった。これらの結果より、RFTS 領域はユビキチン化されていないヒストン H3 にも結合する活性を持ち、この機能は Dnmt1 の C 末端領域によって抑制的に制御されている可能性が示唆された。次に、RFTS 領域と酵素活性領域間の水素結合を失うアミノ酸置換体の Dnmt1 を作成し、その表現型を調べた。全長 Dnmt1 のアミノ酸置換体では野生型では見られない、ユビキチン化されていないヒストン H3 への結合能を示した。さらに、置換体は複製時のクロマチン上に過剰に集積した。興味深いことに、神経変性疾患 ADCA-DN(autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy)の患者より原因として同定された Dnmt1 のアミノ酸変異部位は、水素結合に関連するアミノ酸残基の近傍に存在し、結晶構造解析の結果より同じ表面上に存在していることがわかっている。実際に、カエル卵抽出液を用いて、ADCA-DN 変異体 Dnmt1 はユビキチン化されていないヒストン H3 への結合能および、複製時のクロマチン上への過剰な集積が見られた。

以上の結果より、RFTS はユビキチン化ヒストン H3 だけでなく、新たにユビキチン化されていないヒストン H3 にも結合する活性を持つことがわかった。Dnmt1 分子内の RFTS 領域と酵素活性領域間の水素結合が、RFTS による非特異的なヒストン H3 との結合を抑制して、Dnmt1 の DNA メチル化部位への正確なリクルートを促進しているものと考えられる。また、ADCA-DN の原因となる Dnmt1 の変異は、RFTS 領域と酵素活性領域間の結合を抑制するように働き、DNA 維持メチル化機構が正確に働かないことで神経変性をもたらすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【緒言】

DNA メチル化は DNA 複製に伴い正確に受け継がれる必要がある。DNA 維持メチル化には、DNA 複製時に生じるヘミメチル化 DNA に特異的に結合するタンパク質 Uhrf1(ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1)がヒストン H3 をユビキチン化することによって、Dnmt1(DNA methyltransferase 1)がメチル化部位へリクルートされることが重要である。ユビキチン化ヒストン H3 の認識には Dnmt1 の N 末端にある RFTS(replication foci targeting sequence)領域が必要とされる。最近、Dnmt1 分子内の RFTS 領域と C 末端にある酵素活性領域間の水素結合によって Dnmt1 の DNA メチル化活性を抑制していることが報告された。しかし、この結合が RFTS の機能に与える影響はわかっていない。また、神経変性疾患 ADCA-DN の患者より原因として同定された Dnmt1 の変異は RFTS 領域内にあるが、この変異が Dnmt1 の機能に与える影響は解析されていない。

【方法】

Dnmt1 のドメイン構造に基づいて分けられた断片や分子内水素結合を失うアミノ変異体、ADCA-DN で同定された変異体のリコンビナントタンパク質を作成し、生化学的解析に優れたアフリカツメガエル卵抽出液の無細胞系を用いて解析を行った。抽出液内で作成したユビキチン化ヒストン H3 および、非ユビキチン化ヒストン H3 に対する Dnmt1 の結合能について、抗ヒストン H3 抗体ビーズを用いたプルダウン実験で調べた。さらに、抽出液に精子核を加える事で DNA 複製および DNA 維持メチル化を試験管内で再現し、Dnmt1 断片および、変異体のクロマチン上へのリクルートをウエスタンブロットティングにより観察した。

【結果】

RFTS 領域がユビキチン化ヒストン H3 との結合に必須の領域であり、さらに C 末端領域を欠き、RFTS を含む断片は非ユビキチン化ヒストン H3 に対して結合する活性を持つことが示された。RFTS と酵素活性領域間の水素結合を失う変異体ではヒストン H3 への結合能を示し、複製期のクロマチン上に過剰に蓄積した。ADCA-DN の原因として同定された変異部位は酵素活性領域と水素結合するアミノ酸残基の近傍に存在するが、ADCA-DN 変異体もヒストン H3 への結合能を示し、複製期のクロマチン上に過剰に蓄積した。

【考察】

Dnmt1 の RFTS 領域が非ユビキチン化ヒストン H3 に対しても結合能を持つことが示された。また、ADCA-DN の原因となる Dnmt1 の変異体は、RFTS 領域と酵素活性領域間の結合を抑制的に制御することで、DNA 維持メチル化機構の異常を引き起こし神経変性の原因となることが示唆された。

(審査の内容)

主査の近藤教授から、DNA メチル化が転写活性化に関わっているかどうか等 10 項目、第一副査の岡本教授から、RFTS と神経変性疾患で同定された変異との関連について等 14 項目、第二副査の中西教授から、なぜ DNA 維持メチル化酵素の変異が細胞分裂しない神経細胞で異常を生じるのか等 2 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 とユビキチン化ヒストン H3 との結合様式を詳細に解析することで、DNA 維持メチル化機構の理解を深めたものである。さらにヒトの遺伝性疾患の病態を理解する上で重要な知見を得たもので意義のある研究と言える。以上を持って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 中西真