

エピゲノム情報の統合機構の構造生物学的基盤

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 構造生物学研究室
有田 恭平

1. はじめに 目的

ヒストン修飾やDNAメチル化はクロマチン構造を制御するエピジェネティックな情報として働く重要な翻訳後修飾である。ヒストン修飾はヌクレオソーム構造から飛び出たフレキシブルなN末端領域に起こる。DNAはCpG配列中のシトシン塩基がメチル化される。DNAメチル化はクロマチン構造を凝縮し、遺伝子発現の制御・X染色体の不活性化・ゲノムインプリンティングなどの重要な生命現象に関与する。DNAメチル化パターンは胚発生や生殖細胞の形成時にダイナミックに変動するが、分化した細胞では正確に次世代の細胞に受け継がれることにより細胞の形態や機能が維持される。

体細胞におけるDNAメチル化パターンの維持にはUHRF1とDnmt1が必須である。UHRF1タンパク質はヒストン修飾を認識するtandem Tudor domain (TTD), PHD fingerとヘミメチル化DNAを認識するSRA domain, ヒストンH3をユビキチン化するRING fingerを持つ。このことからUHRF1はエピジェネティックな現象を根本的に制御する重要な因子であると考えられている。申請者はこれまでに、TTD-PHDによるヒストンH3K9me3の認識機構、SRA domainによるヘミメチル化DNAの認識機構を解明してきた^{1,2)}。しかし、UHRF1のヒストン修飾とヘミメチル化DNAの認識の2つのエピジェネティックな情報の読み取りがどのように協調的に行われているのかは不明であった。本研究では、UHRF1のエピジェネティックマークの認識に関与する機能ドメイン (TTD-PHD-SRA)の高次構造の形成機構と変換機構を構造生物学的な観点から行い、UHRF1によるエピジェネティックな情報の統合、およびDNAメチル化維持の分子機構の解明を目指す。

2. 方法

1, タンパク質調製

ヒト由来UHRF1 TTD-PHD domain (123-366アミノ酸: TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆), SRA domain (399-655アミノ酸: SRA₃₉₉₋₆₅₅), TTD-PHD-SRA domain (123-655アミノ酸: TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅)の領域を大腸菌で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより高純度に精製した。

2, Native gel electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

タンパク質間相互作用解析、ヒストンH3K9me3ペプチドとの結合は泳動bufferにTris-Borate(pH8.8), 泳動ゲルに和光純薬社のSuperSep 5-20% gradient gelを用いた。binding bufferに10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerolを用いた。ヘミメチル化DNAとの結合は泳動bufferにTris-Acetate-EDTA、泳動ゲルに和光純薬社のSuperSep 7.5%を用いた。試料を調製後、4°Cで30分間インキュベーションした後に、4°Cで電気泳動を行った。

3, X線溶液散乱: Small angle X-ray scattering (SAXS)

TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独とTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅:ヘミメチル化DNA:H3K9me3複合体のX線溶液散乱データの測定はSPRing-8 BL-45XUで行った。波長は1.0000 Åでカメラ距離は3494mmで行った。複合体

の調製はゲル濾過カラムクロマトグラフィーの溶出画分をそのまま測定試料として用いた。測定 buffer は 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 mM L-Arginine を用いた。

3. 結果 研究成果

1, TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅の相互作用解析

UHRF1のエピジェネティックな情報を読み取るTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅の間に直接的な相互作用を評価するためにNative EMSAを行った。TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆にSRA₃₉₉₋₆₅₅を加えていくと濃度依存的にTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆:SRA₃₉₉₋₆₅₅複合体に相当するバンドが検出された。このことから、TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅が直接的に相互作用することが明らかになった。

TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆:SRA₃₉₉₋₆₅₅複合体にH3K9me3ペプチドを加えるとTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆:H3K9me3ペプチド複合体に相当するバンドが検出され、TTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅の複合体が解離することが明らかになった。同様にヘミメチル化DNAを加えると単独のTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅:ヘミメチル化DNA複合体のバンドが検出された。

まとめると、UHRF1のTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆とSRA₃₉₉₋₆₅₅は直接的に相互作用することから、TTD-PHD-SRAのエピジェネティックな情報を読み取る領域は高次構造を形成する。この高次構造がヘミメチル化DNAやH3K9me3のエピジェネティックマークの認識により変換することが考えられる。

2, TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅のヘミメチル化DNA結合能とH3K9me3の結合能の評価

TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅の領域のヘミメチル化DNAへの結合能をNative EMSAで評価した。TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独に比べて、H3K9me3ペプチドが結合した状態のTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅の方が薄い濃度でヘミメチル化DNAとの複合体のバンドが検出されたことから、ヘミメチル化DNAへの親和性が高いことがわかった。この親和性を蛍光ラベルしたヘミメチル化DNAを用いて蛍光偏光解消法で定量的に解析したところ、H3K9me3ペプチド存在下の方がヘミメチル化DNAへの結合が約10倍も強いことがわかった。同様にTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅のH3K9me3ペプチドへの結合を評価した。TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独はNative-EMSAではH3K9me3ペプチドへの結合が見られなかったが、ヘミメチル化DNAが存在すると安定な3者複合体に相当するバンドが検出された。蛍光ラベルしたH3K9me3ペプチドを用いて蛍光偏光解消実験を行ったところ、ヘミメチル化DNA存在下の方がTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅のH3K9me3ペプチドへの結合が約3倍強いことがわかった。

まとめると、TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅はヘミメチル化DNAまたはH3K9me3それぞれ単独のエピジェネティックマークへの結合は弱いですが、2つのエピジェネティックマークを同時に認識することによって、両者への結合が相乗的に強くなることがわかった。

3, X線溶液散乱によるTTD-PHD-SRAの高次構造の形成と変換機構の評価

上記の実験でTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅が高次構造を形成し、その構造がエピジェネティックマークの相乗的な認識により変化することが考えられた。そこでTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独とTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅:ヘミメチル化DNA:H3K9me3ペプチド3者複合体のX線溶液散乱測定を行った。TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独と複合体の距離分布関数 $P(r)$ を比較すると、その分布が大きく異なることがわかった。TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独ではピークが一つの分布を示すものの、複合体ではピークが2つある分布を示した。このことはTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅単独では比較的コンパクトな一つの構造状態をとるものの、複合体ではエピジェネティックマークの認識によってTTD-PHDとSRAの分子内の相互作用が解離し、高次構造が開いた状態に変換することを意味している。

まとめると、UHRF1のTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅の領域は、通常はヒストン修飾やメチル化DNAへの結合が抑制されたコンパクトな高次構造をとるが、2種類のエピジェネティックマークの同時認識によってその高次構造が大きく開いた状態に変換することが考えられる。

4. リン酸化修飾によるTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅の機能制御機構

リン酸化酵素PKAによるTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆のSer298のリン酸化がTTD-PHD₁₂₃₋₃₆₆のH3K9me3への結合を阻害することを明らかにしている¹⁾。Ser298のリン酸化がTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅の領域で起こるとヘミメチル化DNAへの結合能がどのように変化するかを評価した。TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅とPKAを大腸菌内で共発現させることによってリン酸化TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅（以下S298ph TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅）を調製した。野生型のTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅と比較してS298ph TTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅のDNA結合能が著しく低下していることがわかった。Ser298をAlaに置換したSer298にリン酸化が起こらないTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅はヘミメチル化DNA結合能を維持していたことから、Ser298のリン酸化がTTD-PHD-SRA₁₂₃₋₆₅₅のDNA結合能を制御するリン酸化であることが明らかになった。

4. 考察 まとめ

本研究結果により 1) UHRF1のTTD-PHDの領域とSRA domainが直接的に相互作用し、高次構造を形成すること、2) 高次構造がヒストンH3K9me3およびヘミメチル化DNAそれぞれ単独のマークに対する結合を抑制すること、3) H3K9me3とヘミメチル化DNAの両方を同時に認識することにより相乗的に結合が強まこと、4) エピジェネティックマークの認識により高次構造が変換することを解明した。これによりUHRF1によるエピジェネティックマークの協調的な認識機構を解明できた。

UHRF1はさらにUBL domainとRING fingerを持つ。このTTD-PHD-SRAによるH3K9me3とヘミメチル化DNAのコード認識がUHRF1のユビキチン化活性にどのような影響を及ぼすかどうか、今後さらに研究を進めることによりDNA維持メチル化の分子基盤を構築できると考える。

また本研究ではUHRF1のリン酸化修飾がUHRF1の機能制御をしている可能性を示した。実際にUHRF1は多数のリン酸化サイトを有する。またUHRF1は細胞周期のG1-S期の転移に関与していることが示されている。これらのことから細胞周期依存的なUHRF1のリン酸化がUHRF1のエピジェネティックな機能を制御している可能性が考えられる。リン酸化サイトSer298はTTDとPHD fingerの間にあり、1次配列上はSRA domainからは遠く離れている。このような遠位の効果によってどのようにSRA domainのDNA結合能を制御しているのか、UHRF1の高次構造の変換が起こっていることを示唆しており、構造生物学的に大変興味深い。さらにリン酸化されたUHRF1はエピジェネティックな情報の認識を欠失していることから、機能ドメインの結合部位を標的とした既存の阻害剤開発の戦略とは異なり、不活性な状態の高次構造を維持するスタビライザーの開発により新たなUHRF1を標的にした阻害剤開発の可能性を示せたと考える。

UHRF1の複雑な機能とその協調性、高次構造との相関を明らかにするためには、今後は全長UHRF1に近い領域のタンパク質を用いて解析を行っていく必要がある。そのためには今回用いたX線溶液散乱や電子顕微鏡による解析は強力なツールとなり得ると考える。

5. 発表論文、参考文献

1), Arita K, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 12950 (2012).

2), Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Nakamura Y, Shirakawa M. *Nature* **455**, 818 (2008)

本研究結果はKusano F. *et al.*, Arita K.*として論文投稿中 (*:corresponding author)。