

文部科学記者会、科学記者会 同時発表

2022年11月24日
横浜市立大学

細胞運命を決定するタンパク質 DNMT1 の活性制御機構を解明 ～立体構造解析に基づくがん・老化の新治療薬開発に期待～

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 菊地 杏美香さん（博士前期課程1年）、小野田 浩宜特任助教（現名古屋大学助教）、有田 恭平教授らを中心とした研究グループは、DNA メチル化の維持に関わるタンパク質 DNMT1*¹ とその活性化因子であるユビキチン化*²されたヒストン*³H3、片鎖メチル化 DNA*⁴の複合体構造をクライオ電子顕微鏡*⁵で決定しました。本成果は、DNMT1 の新規の活性化機構の分子メカニズムを解明し、DNA メチル化の維持の破綻で生じるがんをはじめとした疾患に対する新たな薬剤開発の基盤となります（図1）。

本研究成果は、「Nature Communications」に掲載されました。（2022年11月21日）

研究成果のポイント

- 活性化状態の DNMT1 の構造をクライオ電子顕微鏡で解明した。
- 立体構造情報から、DNMT1 の活性を制御する新たな部位を発見した。
- DNMT1 による細胞の形質を維持する分子メカニズムの解明と、がんや老化などの新たな治療薬の開発の貢献に期待できる。

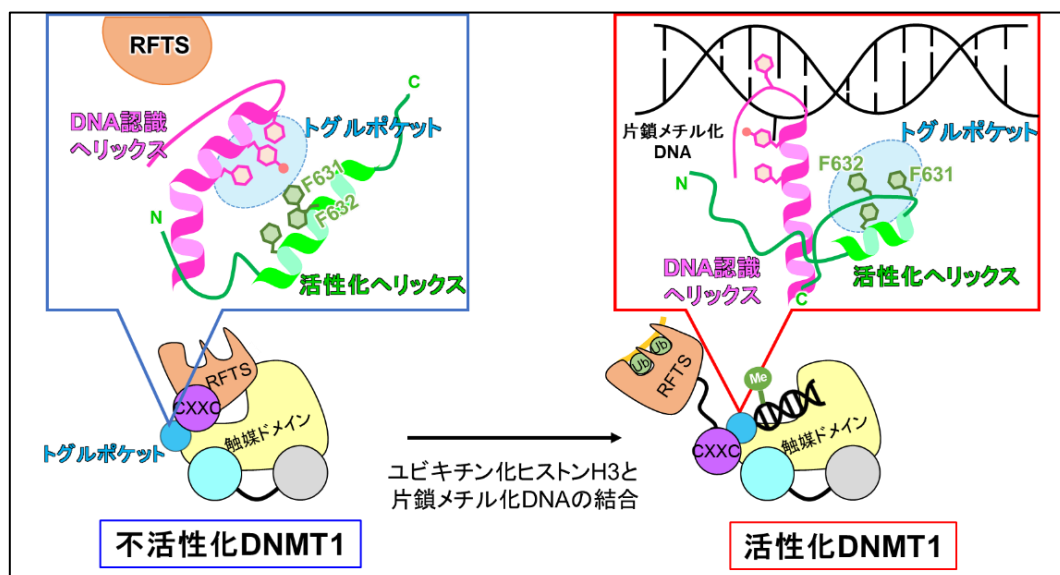


図1: DNMT1 の活性化機構の概略図

左：不活性化状態の DNMT1 のトグルポケット近傍の模式図。DNA 認識ヘリックスがトグルポケットに入り込む。右：活性化状態の DNMT1 のトグルポケット近傍の模式図。活性化ヘリックスがトグルポケットに入り込むことが DNMT1 の活性化に必須。

研究背景

生物は目や腕などを形づくるために必要な「設計図」を持っています。この設計図は細胞中の DNA が担い、DNA 配列中に生物の形や性質（形質）を決める遺伝情報（遺伝子）が書き込まれています。ヒトの体は約 270 種類の細胞で構成されますが、たった 1 個の受精卵から細胞分裂してできているため、我々の身体の細胞は基本的に同じ遺伝情報を持ちます。なぜ同じ遺伝情報を持つにも関わらず、多種多様な細胞が存在するのでしょうか？これは、細胞が様々な働きを持つ細胞へと変化するにつれて、細胞ごとに使わない遺伝子に目印が付けられ、使う遺伝子が決定されるからです。この DNA 上に目印をつけて遺伝子を使わないようにする現象を、「DNA メチル化」といいます。

哺乳類の DNA メチル化は、CG 配列中のシトシン塩基に DNA メチル化酵素がメチル基 (-CH₃) を付加する現象です。細胞が一旦獲得した DNA メチル化の情報は、細胞の形質を維持するために生涯を通して、つまり DNA 複製・細胞分裂後も正確に受け継がれます。これを DNA 維持メチル化といいます。DNA 維持メチル化の破綻は、がんをはじめ精神疾患や代謝疾患に関与することが知られています。

DNA 維持メチル化には、DNA メチル化酵素 DNMT1 とその呼び込み因子 UHRF1*⁶ が必須です。DNA 複製後、新生鎖はメチル化されないため、片鎖がメチル化された DNA（片鎖メチル化 DNA）が一過的に生じます。UHRF1 は片鎖メチル化 DNA を認識し、近傍のヌクレオソーム中のヒストン H3 をユビキチン化します。我々は、2017 年に DNMT1 が RFTS ドメインでユビキチン化ヒストン H3 を認識し、片鎖メチル化 DNA へ呼び込まれることを報告しました (Ishiyama et al., Moll Cell 2017: [2017 年 10 月記者発表: 細胞固有の性質が遺伝する仕組みを解明](#))。さらに、ユビキチン化ヒストン H3 は、DNMT1 の酵素活性を促進することも明らかにしました。しかし、ユビキチン化ヒストン H3 の結合が DNMT1 の構造をどのようにダイナミックに変化させて活性化するのは不明でした。また、このようなダイナミックな構造変化を伴う活性化機構を既存の構造生物学的な手法で解析するのは困難であることが予想されました。そこで本研究ではクライオ電子顕微鏡で、ユビキチン化ヒストン H3 と片鎖メチル化 DNA が結合した活性化状態の DNMT1 の立体構造を決定し、DNMT1 の酵素活性化機構の解明を目指しました。

研究内容

【クライオ電子顕微鏡による構造決定】

DNMT1-ユビキチン化ヒストン H3-片鎖メチル化 DNA 複合体の分子量（約 170,000 Da）と、予想される構造柔軟性を考慮してクライオ電子顕微鏡で 3 者複合体の立体構造の決定を試みました。DNMT1 は、18 番目と 23 番目のリジン残基 (K18, K23) がユビキチン化されたヒストン H3 を特異的に認識します。本研究では K18, K23 の以外のリジン残基をアルギニン残基に置換したヒストン H3 を作成し、試験管内ユビキチン化反応で K18, K23 が特異的にユビキチン化されたヒストン H3 を調製しました。また、DNA が結合した反応中間体の DNMT1 の構造を観察するため、メチル化が起こるシトシンを 5-フルオロシトシンに

置換した片鎖メチル化 DNA を調製しました。これらの試料調製を基に、加速電圧 300 kV のクライオ電子顕微鏡を用いて、3 者複合体の構造を 2.5 Å の高分解能で決定しました。

【DNMT1 の新規の酵素活性化の分子メカニズムの解明】

DNMT1 は 5 つの機能ドメイン*7 から成ります (図 2)。DNA やユビキチン化ヒストン H3 が結合していない DNMT1 では、アミノ末端に位置する RFTS ドメインが触媒ドメインの DNA 結合部位に入り込んでおり、自己活性阻害型の構造を形成することが知られています (Zang et al., JMB 2015)。今回研究グループが決定した活性化型 DNMT1 の構造では、ユビキチン化ヒストン H3 と片鎖メチル化 DNA の結合によって、RFTS ドメインは触媒ドメインから完全に解離していることがわかりました。クライオ電子顕微鏡を用いることで、活性化に伴う DNMT1 のダイナミックな構造変化を明らかにできました。

さらに DNMT1 の RFTS ドメインと CXXC ドメインの間に活性化のカギとなるモチーフ (活性化ヘリックス) と、触媒ドメインに活性を制御する疎水性ポケット (トグルポケット: トグルはスイッチの意味) があることを発見しました (図 2)。DNMT1 の触媒ドメインには DNA の認識に働く DNA 認識ヘリックスがあります。不活性化型 DNMT1 では、トグルポケットに DNA 認識ヘリックスが曲がった状態で入り込んでいることがわかりました。これにより DNA 認識ヘリックスは、たとえ DNA が結合しても DNA に到達できず、その機能が阻害されていることがわかりました。一方で活性化型 DNMT1 では、トグルポケットに活性化ヘリックスが入り込んでいました。これにより、DNA 認識ヘリックスはまっすぐ伸びた状態になり、DNA に結合できる状態になることがわかりました。つまりトグルポケットに入る領域が異なることで、DNMT1 の活性が制御されることが明らかになりました (図 3)。

【アフリカツメガエルや哺乳類細胞を用いた変異体 DNMT1 の機能解析】

DNMT1 のトグルポケットには、活性化ヘリックス中の 2 つのフェニルアラニン残基 (F631/F632) が入り込んでいました。そこで、活性化ヘリックス中の F631/F632 が DNMT1 の活性化に重要であると考え、フェニルアラニンをアラニンに置換した変異体 DNMT1 を作成して、その機能を評価しました。

試験管内で変異体 DNMT1 の機能を生化学的に検証した結果、変異体 DNMT1 は片鎖メチル化 DNA への結合が著しく低下し、その結果 DNA メチル化活性が野生型 DNMT1 に比べて大幅に減少することがわかりました。この変異体 DNMT1 の機能を、アフリカツメガエル (東京大学 中西 真 教授、西山 敦史 准教授との共同研究) と大腸がん細胞株 HCT116 を用いて評価しました (パリ・デイドロ大学 Pierre-Antoine Defossez 教授、山口 幸佑博士 研究員との共同研究)。その結果、変異体 DNMT1 は細胞内で DNA メチル化の維持ができなくなっていることがわかりました。これにより、クライオ電子顕微鏡による構造解析で同定した DNMT1 の新規の活性制御モチーフは、DNMT1 が細胞内で正常な機能を発揮するためにも重要であることがわかりました。この活性化ヘリックス中の 2 つのフェニルアラニン残基は脊椎動物で高度に保存されています。したがって、活性化ヘリックスによる DNMT1 の活性化は種を超えた分子メカニズムであることが考えられます。

今後の展開

我々の細胞が持つ DNA メチル化の情報は、DNMT1 の働きによって正確に受け継がれていきます。これにより細胞は、その形質を保ったまま正常に増殖できます。今回発見した DNMT1 の新たな活性制御機構の発見は、DNMT1 が忠実にメチル化を維持する分子メカニズムを解明し、DNA 維持メチル化に新しい生物学的知見をもたらしました。

DNA メチル化の異常は様々ながん細胞で報告されており、立体構造情報を基に、DNA メチル化異常の改善を目指した薬剤開発が行われています。例えば、アメリカ食品医薬品局 (FDA) で承認されている骨髄異形成症候群の薬である 5-アザシチジンは、DNA メチル化酵素の DNA 結合部位を標的としています。しかし、この薬剤は副作用が大きくその使用は限定的です。DNA メチル化の制御はがんの薬剤開発につながるため、本研究で発見した DNA メチル化酵素の新規の活性制御部位は、既存の薬剤とは異なる作用機序で DNA メチル化を制御できる可能性があり、今後の創薬開発への展開が期待されます。また、最近の研究で、DNA メチル化レベルは組織や細胞の老化具合と相関があることが明らかとなり、老化の原因となることも示唆されています。したがって、本研究の成果は、老化が生じるメカニズムの解明への貢献や、加齢性疾患への新たな治療法および予防法の創出にも期待できます。

研究費

本研究は、JSPS 科研費 新学術領域「多様かつ堅牢な細胞形質を支える非ゲノム情報複製機構(19H05741)」(JSPS 科研費: 18H02392, 19H05294, 19H05285, 21H00272) をはじめ、武田科学振興財団 (1871140003)、横浜市立大学 (学長裁量事業) 戦略的研究推進事業などの助成を受けて行われました。

論文情報

タイトル: Structural basis for activation of DNMT1

著者: Amika Kikuchi†, Hiroki Onoda†, Kosuke Yamaguchi, Satomi Kori, Shun Matsuzawa, Yoshie Chiba, Shota Tanimoto, Sae Yoshimi, Hiroki Sato, Atsushi Yamagata, Mikako Shirouzu, Naruhiko Adachi, Jafar Sharif, Haruhiko Koseki, Atsuya Nishiyama, Makoto Nakanishi, Pierre-Antoine Defossez, Kyohei Arita

†: equal contribution in this work.

掲載雑誌: Nature Communications

DOI: 10.1038/s41467-022-34779-4

参考

用語説明

*1 DNMT1 :

片鎖メチル化 DNA を基質とし、DNA 中のシトシン塩基にメチル基を転移する反応を触媒する酵素。DNA 維持メチル化に必須のタンパク質であり、その機能の異常は細胞のがん化に関わるため創薬のターゲットとなっている。

*2 ユビキチン (化) :

76 個のアミノ酸からなる球状タンパク質で、基質となるタンパク質のリジン残基に共有結合を介して付加される翻訳後修飾因子。基質に付加されたユビキチンのリジン残基には、さらにユビキチンが数珠状に付加されることがあり、タンパク質分解やシグナル伝達、DNA 損傷修復などの様々な生命現象を制御する。

*3 ヒストン :

真核生物の染色体を構成するタンパク質で、H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類が存在する。このうち、H2A、H2B、H3、H4 を 2 分子ずつ含む 8 量体はヒストンコアとよばれ、これにゲノム DNA が巻き付くことでヌクレオソームという構造体を形成する。ヒストンはメチル化やユビキチン化などの様々な化学修飾を受け、遺伝子発現の調節に関与する。

*4 片鎖メチル化 DNA :

哺乳類の DNA メチル化は CG 配列中におこるので、2 重鎖 DNA の両鎖に対称的にメチル化が起こる。DNA 複製の過程では、DNA ポリメラーゼはメチル化の情報を新生鎖 DNA に継承できないため、親鎖のみがメチル化された片鎖メチル化 DNA が一過的に生じる。

*5 クライオ電子顕微鏡 :

凍結した生体分子に電子線を照射し、試料の観察を行う手法。試料の結晶化が不要なため、複合体等の大きな分子量のタンパク質の動的な構造解析が可能になる。

*6 UHRF1 :

DNA メチル化維持に必須の役割をするタンパク質。片鎖メチル化 DNA への結合や、9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 への結合、ヒストン H3 や複製因子 PAF15 のユビキチン化など様々な機能を発揮することで、DNA メチル化パターンの複製を誘導する。がん細胞では過剰発現しており、異常な細胞増殖に関与する。

*7 ドメイン :

タンパク質中に存在する特定の立体構造と機能を持つ領域。

図、画像、表

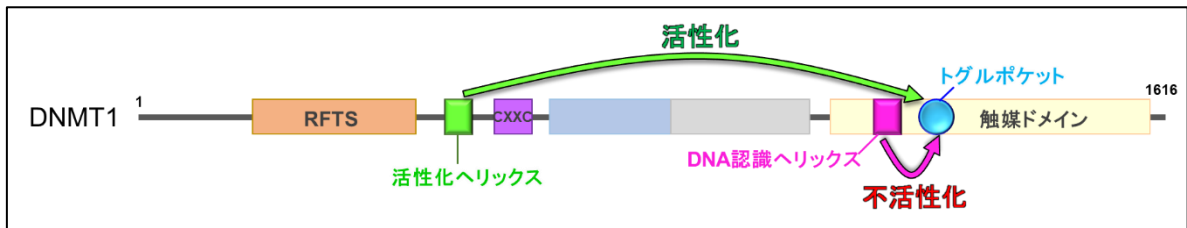
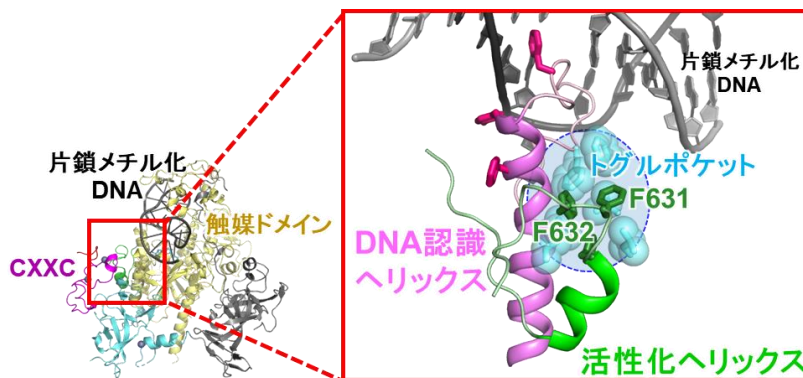


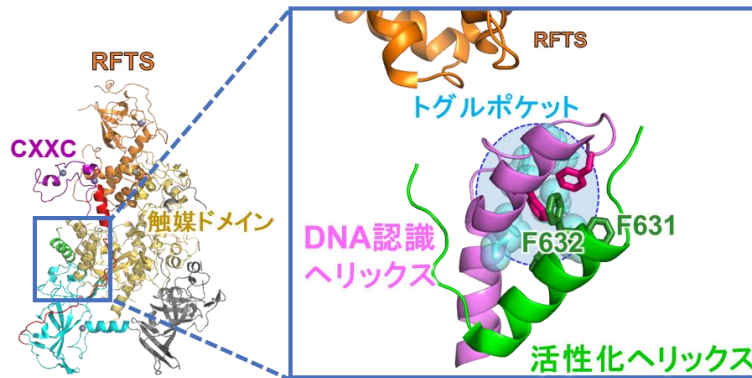
図2：DNMT1のドメイン構造

活性化型 DNMT1 では活性化ヘリックスがトグルポケットに入り込むが、不活性化型 DNMT1 では DNA 認識ヘリックスがトグルポケットに入り込む。



活性化型DNMT1のトグルポケットの構造

DNMT1-ユビキチン化ヒストンH3-片鎖メチル化DNA複合体構造
(本研究で明らかにした構造)



不活性化型DNMT1のトグルポケットの構造

DNMT1単体の構造 (PDB ID: 4WXX)

図3：活性化型 DNMT1（上）と不活性化型 DNMT1（下）のトグルポケットの構造

緑:活性化ヘリックス、ピンク:DNA 認識ヘリックス、水色: トグルポケット。本研究で活性化ヘリックス中のフェニルアラニン 632 と 632 (F631, F632) がトグルポケットに入り込むことが DNMT1 の活性化に必須であることが明らかになった。トグルポケットに結合する薬剤は、DNMT1 がん関連する病気の治療薬になると期待される。

参考文献など

Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance

Ishiyama *et al.*, 2017, *Molecular Cell* 68, 350-360

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.037>

Crystal Structure of Human DNA Methyltransferase 1

Zhang *et al.*, 2015, *Journal of Molecular Biology* 427, 2520-2531

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283615003411?via%3Dihub>