

DNMT1 RFTS ドメインによるマルチプルにモノユビキチン化されたヒストン H3 の認識機構

有田恭平^{1,2}

¹横浜市立大学・生命医科学研究科, ²JST・さがけ

Structural basis for recognition of multiple mono-ubiquitylated histone H3 by DNMT1 RFTS domain

Kyohei ARITA^{1,2}

¹Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, ²JST, PRESTO

Abstract

次世代の細胞に引き継がれる情報であるゲノム DNA のメチル化パターンは、細胞に固有の遺伝子発現を定義づける重要な役割を果たす。DNA メチル化酵素 DNMT1 と、その集積にかかわるユビキチンリガーゼ UHRF1 は DNA 維持メチル化において必須の役割をする。筆者らは、UHRF1 によって 2 か所のリジン残基がモノユビキチン化されたヒストン H3 が DNMT1 RFTS ドメインによって認識される機構を X 線結晶構造解析で明らかにした。さらに、ユビキチン化ヒストン H3 による DNMT1 の新規の酵素活性化機構を解明し、DNA 維持メチル化の新しい分子機構を提唱した。

1. はじめに

1-1. DNA メチル化

たった 1 個の受精卵が DNA 複製・細胞分裂を繰り返した結果、約 60 兆個もの細胞が人の身体を形成していると言われている。従って、免疫系の細胞などの一部の例外を除いてどの細胞も同じゲノム情報、つまり同じ遺伝子のセットを持つことになる。しかし、人では約 230 種類の細胞が固有の形質を持ち続け生命活動が行われる。なぜ、同じ遺伝情報を持つのに、細胞は多種多様な形質を発揮し、その形質が維持され続けるのだろうか？これには、DNA に起こる化学修飾であるメチル化が重要な働きをしている。真核生物の DNA はヒストン 8 量体に巻き付きヌクレオソーム構造を形成し、この構造を基盤として高次のクロマチン構造が形成される。ゲノム DNA の 5'-CpG 配列中のシトシン塩基はメチル化修飾を受ける。一般的に DNA メチル化が起こる領域はヘテロクロマチンが形成され、その領域の遺伝子発現は抑制される。DNA メチル化は分化多能性を持つ胚盤胞の状態から、細胞が分化していく過程で確立する。従って、DNA メチル化パターンは細胞の種類によって異なり、細胞の種類に特有の遺伝子発現パターンが DNA メチル化によって決定づけられる。重要なことに、分化した細胞の DNA メチル化パターンは、塩基配列と同様に、細胞分裂を経て次世代の細胞に正確に受け継がれていく。この DNA 維持メチル化機構により、細胞はその形質を維持し続けることができる。DNA メチル化の維持機構の破綻は、異常な発生や分化に加えて、細胞のがん化や染色体の不安定化を引き起こす原因となる [1]。様々ながん細胞では DNA メチル化パターンの異常によりがん抑

制遺伝子の発現が正常に行われなくなることが分かっており、DNA メチル化の情報が正しく引き継がれていくことがいかに重要であるかがわかる。

1-2. DNA メチル化パターンの継承の分子機構

DNA メチル化パターンの継承では、維持型 DNA メチル化酵素 DNMT1 と、ユビキチンリガーゼ活性を有する UHRF1 が必須の因子として働く。DNMT1 は、複製サイトへの局在に関与する RFTS ドメイン、非メチル化 CpG DNA に結合する CXXC ドメイン、それに続く BAH1-BAH2 ドメイン、DNA メチル化活性を有する触媒ドメインからなる (Fig. 1) [2]。DNMT1 は、RFTS ドメインが触

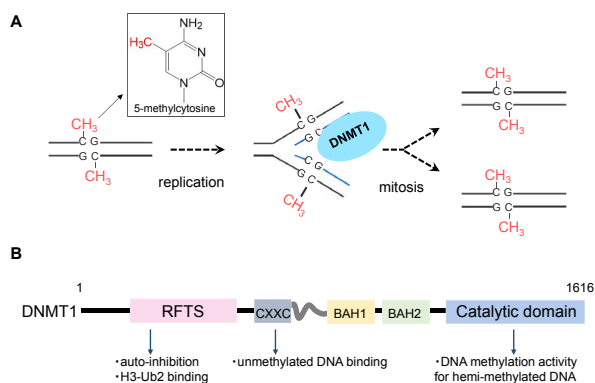


Figure 1 Domain structure and its function of DNMT1. A), Schematic view of maintenance of DNA methylation. After each cycle of DNA replication, cytosines in a newly synthesized strand are methylated by DNMT1. B), Domain structure and function of DNMT1.

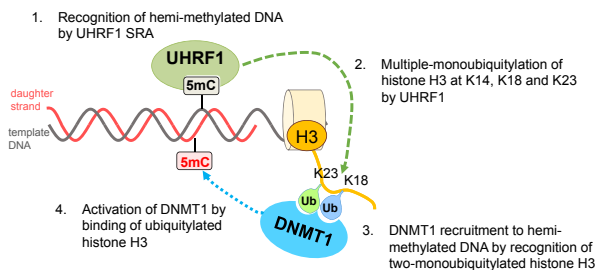


Figure 2 Molecular mechanism of DNA methylation maintenance.

媒ドメインの活性部位に入り込み、自己活性阻害の高次構造をとることが知られている [3-4]。一方で、UHRF1 はユビキチン様ドメイン、ヒストン H3 のメチル化リジン 9 を認識する tandem tudor domain、ヒストン H3 のアミノ末端を認識する PHD ドメイン、片鎖メチル化 DNA (親鎖 DNA のみがメチル化されている状態) を認識する SRA ドメイン、ユビキチン化活性を有する RING ドメインからなる [5]。DNMT1 と UHRF1 が関与する DNA 維持メチル化の分子機構は次のように考えられている (Fig. 2)。UHRF1 は、DNA 複製ののちに一時的に生じる片鎖メチル化 DNA と特異的に結合する [6-8]。その後、UHRF1 は近傍のヒストン H3 をユビキチン化する [9-10]。このユビキチン化ヒストン H3 を DNMT1 の RFTS ドメイン (以下 RFTS) が認識することにより DNMT1 が片鎖メチル化サイトに呼び込まれ、片鎖メチル化 DNA が両鎖メチル化 DNA に変換されることで DNA 維持メチル化が完了する (Fig. 2) [11]。これまでに、UHRF1 SRA ドメインによる片鎖メチル化 DNA の認識機構や [6-8]、DNMT1 による DNA メチル化機構に関する構造生物学的な研究は行われてきた [3-4, 12-13]。しかし、UHRF1 がどのような形状のユビキチン鎖をヒストン H3 に付加するのか、DNMT1 はユビキチン化されたヒストン H3 をどのように認識するのか、そして、その結合が DNMT1 の活性化にどのような役割をもつのかは不明であった。本稿では、DNMT1 RFTS とユビキチン化ヒストン H3 の X 線結晶構造解析により明らかにした、DNA 維持メチル化機構の詳細について紹介する。

2. DNMT1 RFTS によるユビキチン化ヒストン H3 の認識機構

2-1. UHRF1 はヒストン H3 の K14, K18, K23 の複数のリジン残基をユビキチン化する

UHRF1 によるヒストン H3 のユビキチン化に関して、アフリカツメガエルの無細胞系を用いた研究からは K23 がユビキチン化されることが報告されている一方で、哺乳類細胞を用いた研究からは K18 がユビキチン化されるといふ一見相反する報告がされていた [9-10]。そこで、我々は UHRF1 によるヒストン H3 のユビキチン化サイトを同定するために、*in vitro* での DNA 維持メチル化の再現が可能な染色体複製系であるアフリカツメガエルの卵抽出液を用いた。間期の卵抽出液を脱ユビキチン化酵素の不可逆的な阻害剤であるユビキチンビニルスルホンで処理し、

ユビキチン化ヒストン H3 を高度に含むクロマチン抽出液と組換え DNMT1 を用いて結合実験を行った。すると、DNMT1 は、2 分子のユビキチンが付加されたヒストン H3 と特異的に結合することがわかった。さらに、ユビキチン化されたヒストン H3 を抗ヒストン H3 抗体で免疫沈降し、質量分析法によりユビキチン鎖を絶対定量した結果、ポリユビキチン鎖は全体のわずか 5% しか存在しないことがわかった。さらに解析を進めることにより、ヒストン H3 はよく知られていたポリユビキチン化ではなく、K14, K18, K23 の複数のリジン残基がマルチプルにモノユビキチン化されることがわかった。

2-2. DNMT1 RFTS による K18 と K23 がモノユビキチン化された H3 の認識機構

DNMT1 RFTS によるマルチプルモノユビキチン化 H3 の認識機構を解明するために、ユビキチン化ヒストン H3 の調製を行った。酵素反応で部位特異的に均一にヒストン H3 をユビキチン化するのは困難である。そこで、ユビキチン化の標的となるリジン残基をシステイン残基に置換したヒストン H3 (1-37 残基) と、C 末端の Gly76 をシステイン残基に置換したユビキチンをジスルフィド結合で結合させたユビキチン化 H3 アナログを作製した [14]。等温滴定型カロリメトリーを用いた解析から、RFTS は K18 と K23 がモノユビキチン化されたヒストン H3 (以下 H3-K18Ub/K23Ub) と解離定数 17 nM で結合し、その化学量論比は 1:1 であった。また、K18 および K23 の 1 か所のみがモノユビキチン化された H3 とは 1:1 の特異的な結合を示さず、さらにユビキチン単体とはまったく結合しなかった。

RFTS と H3-K18Ub/K23Ub の複合体をゲルろ過カラムで調製し、複合体を結晶化した。得られた結晶の X 線回折強度データの収集は Photon Factory BL-1A で行い 2.0 Å 分解能のデータを得た。回折強度データの位相決定には、ユビキチン (PDB ID; 1UBQ) と RFTS 単体の構造 (PDB ID; 3EPZ) をサーチモデルにして分子置換法で行った。RFTS は β 構造から成る N-lobe と α ヘリカル構造の C-lobe から成る。RFTS 単体をサーチモデルにして分子置換を行ったが、N-lobe の電子密度は明瞭に観測されたものの、C-lobe の電子密度はモデルと一致せず解釈ができなかった。このことから lobe 間の配向に変化が起きていると考え、それぞれの lobe をサーチモデルにして分子置換を再度行ったところ、RFTS 全体の電子密度がモデルとフィットする解が得られた。

K18 および K23 に付加されたユビキチン (以下、Ub18, Ub23) は、RFTS の N-lobe のみと相互作用していることがわかった。RFTS の 387-403 番目の領域は全長 DNMT1 や RFTS 単体の構造では disorder していたが、H3-K18Ub/K23Ub と結合することによりループ構造が誘起されていた (Fig. 3A)。興味深いことにこのループ構造は、Ub18 と Ub23 を物理的に完全に隔てる役割をしていた。以下のこのループをユビキチン認識ループと呼ぶ。ユビキチンは他

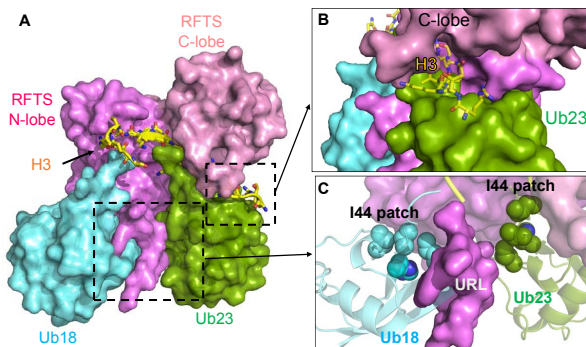


Figure 3 Structure of RFTS in complex with H3-K18Ub/K23Ub. A) Overall structure of RFTS in complex with H3-K18Ub/K23Ub. N- and C-lobe of RFTS, Ub18 and Ub23 are depicted as pink, light-pink, cyan and green surface model, respectively. Histone H3 is shown as yellow stick model. B) Recognition of histone H3 N-terminal tail sandwiched by RFTS C-lobe and K23-linked ubiquitin. C) L8, I44, H68 and V70 in I44 patch are shown as sphere model.

の分子と相互作用する際に、いくつかの分子表面を使うことが知られている。最も有名なのは L8, I44, V70 から成る I44 パッチであるが、Ub18 の I44 パッチは既に報告されていた RFTS の UIM (ubiquitin interacting motif, 381-395 番目のアミノ酸残基) と相互作用していた (Fig. 3C)。一方で、Ub23 の I44 パッチは RFTS の別の疎水性の分子表面と相互作用していることがわかった。さらに、RFTS のユビキチン認識ループは Ub18 と Ub23 と親水性の相互作用をしていた。Ub18 では I36 パッチや 9-11 番目のアミノ酸で構成される flexible loop が認識されていた (Fig. 3C)。興味深いことに Ub23 は flexible loop に加えて、これまで報告されていなかった新たな分子表面が RFTS のユビキチン認識ループによって認識されていることがわかった。ユビキチンの I44 パッチと相互作用する RFTS のアミノ酸残基に変異を入れると、アフリカツメガエルの無細胞系においてクロマチンへの DNMT1 の局在が阻害されたことから、RFTS によるユビキチン化 H3 の認識が重要であることが示された。

一方で、ヒストン H3 の構造に着目すると、Arg2-Leu20 までの広範囲の電子密度が観測された。ヒストン H3 は RFTS の N-lobe と C-lobe の間からなる酸性の溝に入り込んで認識されていた。H3 の Arg2-Lys9 は RFTS の C-lobe によって認識され、さらに Ser10-Lys14 は β 構造を形成し、 β 構造に富む N-lobe と分子間 β シートを形成していた。H3 の Ala15-Arg17 は N-lobe と水素結合を形成していた。興味深いことに、H3 の Arg2-Lys9 は RFTS の C-lobe のみならず、Ub23 によっても認識されていた (Fig. 3B)。つまり付加されたユビキチンが H3 の認識に関与するという極めて珍しい認識機構であることがわかった。

2-3. ユビキチン化 H3 による DNMT1 の活性化機構

DNMT1 の全長に近い構造解析から、DNMT1 の RFTS は触媒ドメインの活性部位に入り込み自己活性阻害型の

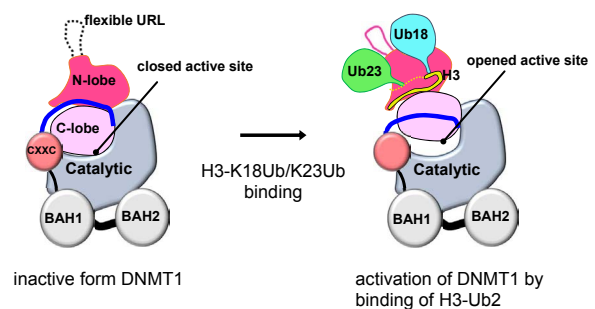


Figure 4 Schematic model of activation of DNMT1 by binding of H3-K18Ub/K23Ub. RFTS domain is inserted into the active site of catalytic domain in apo-form DNMT1, resulting in auto-inhibition of its DNA methylation activity (left). Binding of ubiquitylated H3 leads to the domain rearrangement in which RFTS dissociates from the active site, resulting in active site opening (right).

構造をとることが知られている [3-4]。in vitro の生化学的な実験においても、全長 DNMT1 の DNA メチル化活性は低く抑えられていることが知られている。しかし、本研究での生化学的な実験により H3-K18Ub/K23Ub の結合が DNMT1 の DNA メチル化を大幅に促進することがわかった。この酵素活性の促進はユビキチンのみ、ヒストン H3 のみを加えても起こらなかった。DNMT1 全長構造では、RFTS の C 末端領域の 596-600 番目のアミノ酸が lobe 間の溝に入り込んでいる。しかし、上述の様に H3-K18Ub/K23Ub が結合すると、lobe 間の溝にはヒストン H3 が入り込み RFTS の C 末端領域は追い出され、さらに lobe 間の配向が大きく変化することがわかった。我々は、H3-K18Ub/K23Ub の結合による DNMT1 の酵素活性の促進機構は、lobe 間の構造変化によって RFTS が活性部位から抜け出ていくことにあると考え、分子動力学計算による分子モデリングを行った。すると、100 nsec のシミュレーションにより、H3-K18Ub/K23Ub の結合により RFTS と触媒ドメインの間の重要な水素結合が消失していくことがわかり、RFTS が活性部位から解離していく最初の過程を再現することに成功した。このことから、ユビキチン化 H3 は DNMT1 を働く場に呼び込むだけでなく、酵素の活性化にも寄与することが明らかになった (Fig. 4)。

3. おわりに

本研究結果は、マルチプルモノユビキチン化という非常にユニークなユビキチン修飾を認識する機構を解明し構造生物学的な観点から興味深い結果を得た。タンパク質のユビキチン化は linkage 依存的なポリユビキチン鎖がシグナルとなって、タンパク質分解、DNA 修復、炎症応答など幅広い生物学的現象を制御する [15]。また、ユビキチンシグナルの基本単位となるポリユビキチン鎖中のダイユビキチンと、それを認識するユビキチン結合タンパク質との構造解析例は多数報告されている [16]。しかし、DNA 維持メチル化におけるユビキチンシグナルは予想に反して、基質上 (ヒストン H3) の複数のリジン残基がモノユビキチ

化されるという、マルチプルモノユビキチン化であった。DNMT1 の RFTS は基質上の 2 つのモノユビキチンを同時に認識する機能をもつドメインである。筆者が知る限り、マルチプルモノユビキチンを認識するタンパク質の構造解析は本例が初めてである。一般的に、ダイユビキチンとユビキチン結合タンパク質の結合は数 μM の解離定数であるが、RFTS とユビキチン化 H3 の結合は $K_d = 17 \text{ nM}$ であり、まさしく桁違いに強い相互作用である。この強い親和性が DNMT1 を働く場に正しく呼び込み、DNA 維持メチル化の堅牢性が保たれている仕組みであると考えられる。また、本研究ではユビキチン化 H3 の結合が DNMT1 のメチル化活性を促進することを明らかにした。これまで、ユビキチン化 H3 の役割は DNMT1 を正確に適切な場所に呼び込むためのマークであると考えられていたが、本研究により DNMT1 のヘミメチル化 DNA への呼び込みと DNMT1 の活性化がカップリングして起こることが明らかになり、DNA 維持メチル化の新しい分子機構を提唱した。

RFTS は哺乳類では DNMT1 しか持たない固有のドメインである。興味深いことに、神経変性疾患と関連する DNMT1 の突然変異のほとんどは、RFTS ドメイン内のアミノ酸置換をもたらす変異であることが知られている [17]。従って、RFTS とユビキチン化 H3 の結合を阻害するような低分子化合物のスクリーニング系を今後構築していくことは、DNMT1 の立体構造情報に基づいた上記疾患の治療薬の開発につながる重要な課題の一つになると考える。
(掲載論文: *Ishiyama S, *Nishiyama A et al., **Suetake I, **Arita K, **Nakanishi M. Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance. *Mol Cell* 68 350-360, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.037>)

謝辞

本研究は東京大学医科学研究所 中西真教授、西山敦哉講師、および現甲子園大学末武勲教授らとの共同研究である。この場を借りて深く御礼を申し上げます。また、X線回折強度データの収集では、PF のビームラインスタッフの皆様が大変お世話になりましたことを重ねて御礼申し上げます。本稿の図の作成・校閲に協力をいただいた郡聡実氏に感謝いたします。

引用文献

- [1] Z. D. Smith and A. Meissner, *Nature Reviews Genetics* **14**, 204 (2013).
- [2] A. Jeltsch and R. Z. Jurkowska, *Nucleic acids research* **44**, 8556 (2016).
- [3] Z.-M. Zhang, S. Liu, K. Lin, Y. Luo, J. J. Perry, Y. Wang, and J. Song, *Journal of Molecular Biology* **427**, 2520 (2015).
- [4] K. Takeshita, I. Suetake, E. Yamashita, M. Suga, H. Narita, A. Nakagawa, and S. Tajima, *PNAS* **108**, 9055 (2011).

- [5] H. Sidhu and N. Capalash, *Tumor Biology* **39** (2017).
- [6] K. Arita, M. Ariyoshi, H. Tochio, Y. Nakamura, and M. Shirakawa, *Nature* **455**, 818 (2008).
- [7] G. V Avvakumov, J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith, and S. Dhe-Paganon, *Nature* **455**, 822 (2008).
- [8] H. Hashimoto, J. R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S. E. Jacobsen, and X. Cheng, *Nature* **455**, 826 (2008).
- [9] W. Qin, P. Wolf, N. Liu, S. Link, M. Smets, F. La Mastra, I. Forné, G. Pichler, D. Hörl, K. Fellinger, F. Spada, I. M. Bonapace, A. Imhof, H. Harz, and H. Leonhardt, *Cell research* **25**, 911 (2015).
- [10] A. Nishiyama, L. Yamaguchi, J. Sharif, Y. Johmura, T. Kawamura, K. Nakanishi, S. Shimamura, K. Arita, T. Kodama, F. Ishikawa, H. Koseki, and M. Nakanishi, *Nature* **502**, 249 (2013).
- [11] M. G. Goll and T. H. Bestor, *Annual Review of Biochemistry* **74**, 481 (2005).
- [12] J. Song, O. Rechkoblit, T. H. Bestor, and D. J. Patel, *Science* **331**, 1036 (2011).
- [13] J. Song, M. Teplova, S. Ishibe-Murakami, and D. J. Patel, *Science* **335**, 709 (2012).
- [14] J. Chen, Y. Ai, J. Wang, L. Haracska, and Z. Zhuang, *Nature Chemical Biology* **6**, 270 (2010).
- [15] R. Yau and M. Rape, *Nature Cell Biology* **18**, 579 (2016).
- [16] C. Alfano, S. Faggiano, and A. Pastore, *Trends in biochemical sciences* **41**, 371 (2016).
- [17] J. Winkelmann, L. Lin, B. Schormair, B. R. Kornum, J. Faraco, G. Plazzi, A. Melberg, F. Cornelio, A. E. Urban, F. Pizza, F. Poli, F. Grubert, T. Wieland, E. Graf, J. Hallmayer, T. M. Strom, and E. Mignot, *Human Molecular Genetics* **21**, 2205 (2012).

(原稿受付日: 2018 年 1 月 12 日)

著者紹介

有田恭平 Kyohei ARITA

横浜市立大学 生命医科学研究科 准教授

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

TEL: 045-508-7301

FAX: 045-508-7365

e-mail: aritam@yokohama-cu.ac.jp

略歴: 2006 年横浜市立大学生体超分子システム科学専博士課程修了, 2010 年京都大学工学研究科助教, 2013 年横浜市立大学生命医科学研究科准教授 博士 (理学)。

最近の研究: DNA 維持メチル化の分子機構の解明。

趣味: 学生と腕相撲勝負。