



Title	Role of the RFTS domain of Dnmt1 in maintenance DNA methylation
Author(s)	Garvilles, Ronald Garingalao
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56075
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Ronald Garingalao Garvilles)	
Title	Role of the RFTS domain of Dnmt1 in maintenance DNA methylation (DNAの維持メチル化に果たすDnmt1のRFTS 領域の役割)
Abstract of Thesis In mammals, DNA methylation plays important roles in embryogenesis and terminal differentiation through the regulation of transcription-competent chromatin state. The methylation patterns are propagated to next generation during replication by maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1, in co-operation with Uhrf1. In the N-terminal regulatory region, Dnmt1 contains proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding and replication foci targeting sequence (RFTS) domains, which are thought to contribute to maintenance methylation during replication. To determine the contributions of the N-terminal regulatory domains on the maintenance DNA methylation during replication, Dnmt1 lacking the RFTS and/or PCNA-binding domains were ectopically expressed in embryonic stem cells (ESC), and then the effects were analyzed. Deletion of both the PCNA-binding and RFTS domains did not significantly affect the global DNA methylation level. However, replication-coupled maintenance DNA methylation of the differentially methylated regions (DMRs) of three imprinted genes <i>Rasgrf1</i>, <i>Peg3</i> and <i>Kenq1ot1/Lit1</i> was impaired in the cells expressing the Dnmt1 deleted both the PCNA-binding and RFTS domains, but not the PCNA-binding domain alone. I concluded that the RFTS domain is necessary and sufficient, and the PCNA-binding domain is dispensable for the replication-coupled maintenance DNA methylation. On the other hand, in the absence of Uhrf1, which is a prerequisite factor for maintenance DNA methylation, the ESC expressing Dnmt1 deleted both the PCNA-binding and RFTS domains apparently maintained global DNA methylation level, whilst those expressed with full-length and the RFTS domain-containing Dnmt1 could not. This clearly indicates that the Dnmt1 lacking the PCNA-binding and RFTS domains could add DNA methylation to genome in replication-independent manner, which means adding aberrant DNA methylation. The addition of DNA methylation by the Dnmt1 lacking the PCNA-binding and RFTS domains was dependent on the DNA methylation activity of Dnmt1 as well as the presence of <i>de novo</i>-type DNA methyltransferase. I propose that the RFTS domain works as a safety valve by protecting the genome from replication-independent DNA methylation.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Garvilles, Ronald Garingalao)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	田 嶋 正 二
	副 査	教 授	吉 川 和 明
	副 査	教 授	篠 原 彰
	副 査	准教授	末 武 勲
	副 査	助 教	木 村 博 信

論文審査の結果の要旨

ゲノム DNA 内の CpG 配列のシトシン塩基はしばしばメチル化修飾を受けており、哺乳類では CpG 配列の 60-80%がメチル化されていることが報告されている。メチル化修飾は、ゲノムに含まれるレトロトランスポゾン、繰り返し配列、組織特異的な遺伝子で発現していない組織で密にメチル化されている。このメチル化修飾は遺伝情報の活性化や転写抑制に寄与し、正常な胚発生には正しいメチル化模様の樹立と維持が必須である。ゲノムのメチル化模様は、着床胚でゲノム全体に新規にメチル化模様を書き込む酵素 Dnmt3a と Dnmt3b により樹立され、その後は組織ごとに維持型メチル化酵素 Dnmt1 によって継承される。Dnmt1 分子内の N 末端側領域に位置する proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 結合領域と複製領域標的化シグナル (RFTS) 領域は、ゲノムのメチル化模様維持が複製と共役するうえで重要な役割を担っていると考えられている。しかし一方で、Dnmt1 の PCNA 結合活性は試験管内における維持メチル化活性には不要であることも報告されている。RFTS 領域は、Dnmt1 の X 線結晶構造によると、触媒領域を覆うように位置し、そのままの配置では基質 DNA が触媒中心に近づけない配置となっている。

本論文では、PCNA 結合領域と RFTS 領域が細胞内での維持メチル化にどのように寄与しているのかを明らかにするために、それぞれの領域を欠く Dnmt1 を内在的な Dnmt1 を欠失させた胚性幹 (ES) 細胞に発現させ、維持メチル化がどのように影響を受けるのかを解析した。その結果、複製に共役した維持メチル化に RFTS 領域は必須であるが、PCNA 結合領域は必要ないことを明らかにした。また、触媒領域を覆っている RFTS 領域は、複製期以外の時期に Dnmt1 がゲノムに異常なメチル化を入れないようにしていること、すなわち、Dnmt1 が複製と厳密に共役するために保護的な機能を担っていることを明らかにした。

以上の成果は、Dnmt1 の PCNA 結合領域と RFTS 領域という、これまで複製と共役してゲノムのメチル化模様を維持するうえで重要であることが提唱されていた 2 つの N 末端領域のうち、PCNA 結合領域は必ずしも必要ないこと、また、RFTS 領域が複製領域への標的化シグナルとして機能していることに加えて、ゲノムを異常なメチル化から守る機能も担っていることを明らかにした点で、ゲノムのメチル化機構の解明に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。