

Title	DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin
Author(s)	柏木, 克信
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58124">https://hdl.handle.net/11094/58124</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【141】

氏名	かしか ぎ かつ のぶ 栢 木 克 信
博士の専攻分野の名称	博士 (医 学)
学位記番号	第 24802 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin (DNAメチル基転移酵素Dnmt3bのクロマチン高次構造特異的な結合)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 竹田 潤二

### 論文内容の要旨

#### [ 目 的 ]

ほ乳類のゲノムでは、CpG配列のシトシンの5位炭素原子でメチル化修飾を受ける。ゲノムDNAのメチル化パターンは発生の初期において劇的に変化し、体細胞ではおよそ70~80%のCpG配列がメチル化されている。DNAのメチル化はX染色体やレトロトランスポソンの不活性化などのエピジェネティックな遺伝子の発現抑制と深く関わっており、これまで、ほ乳類で活性を持つDNAメチル基転移酵素(DNA methyltransferase, Dnmt)をコードする遺伝子、*Dnmt1*、*Dnmt3a*、そして*Dnmt3b*が同定されている。いずれの*Dnmt*遺伝子も、マウスの正常な発生に必須であることが報告されているが、どのようにDnmtが核の中で標的となるCpG配列を認識してメチル基を転移するかというDNAメチル化制御機構に関しては未だに不明である。そこで、我々はマウスES細胞および、*in vitro*クロマチン再構成系を用いて、Dnmt3bが認識して結合するクロマチンのヒストン修飾状態および高次構造の特性を生化学的に明らかにし、DNAメチル化の制御機構を解明することを研究目標とした。

## 〔 方法ならびに成績 〕

*de novo*型DNAメチル基転移酵素の制御機構を解析するために、*Dnmt3a*や*Dnmt3b*遺伝子が発現しているES細胞を用いて、*Dnmt3b*の細胞内局在を生化学的な分画法で解析した。その結果、*Dnmt3b*は*Dnmt3a*や*Dnmt3b*と協調的に働いてメチル化活性を増強すると報告されている*Dnmt3L*や*Dnmt3a*のアイソフォームである*Dnmt3a2*と共にクロマチン分画に多く含まれている事が明らかとなった。さらに、ES細胞より単離した核をMicrococcal nuclease (MNase)で処理すると、*Dnmt3b*はHistone H1を含む転写不活性領域に存在していた。

次にFLAG-*Dnmt3b*を恒常的に発現するES細胞株を作成し、*Dnmt3b*と相互作用している因子の同定を免疫沈降法により試みた。その結果、*Dnmt3b*は*Dnmt3a2*、*Dnmt3L*およびHistone H1を含むクロマチンと相互作用していることが明らかとなった。

さらに我々は、*Dnmt3b*の結合しているクロマチンに特異的なヒストン修飾が存在するか、FLAG-*Dnmt3b*を発現するES細胞株を用いて免疫沈降法により検証を行なった。その結果、遺伝子発現の抑制と深く関わっているHistone H3 K9のトリメチル化(H3K9me3)やH4K20me3、H3K27me3などのヒストン修飾の濃縮は*Dnmt3b*の結合しているクロマチンに、ほとんど見出すことはできなかった。これに対して遺伝子発現の活性化と深く関わっているH3K4me3や、クロマチンの高次構造を緩める働きがあると報告されているアセチル化Histone H4K16が*Dnmt3b*の結合しているクロマチンから排除されていた。また、興味深いことに*Dnmt3b*とクロマチンとの相互作用は高濃度のMNaseで処理することで解消され、*Dnmt3b*は特定のヒストン修飾よりも高次クロマチン構造を認識してクロマチンに結合することが示唆された。そこで様々な高次構造のクロマチン基質を再構成して、*Dnmt3b*の結合能を比較した。その結果、クロマチンの長さ、及びヒストンH1によるクロマチン高次構造形成に依存して*Dnmt3b*の基質結合能は上昇していた。これに対し、高アセチル化したクロマチンに対する*Dnmt3b*の結合能は有意差を持って低下していた。この結果と合致してES細胞において*Dnmt3b*はヒストン脱アセチル化酵素の一つであるSirT1と強固に相互作用していた。以上の結果から*Dnmt3b*はクロマチンの高次構造を認識して凝集したヘテロクロマチン領域に取り込まれ、メチル基をゲノムDNAに転移していると推測された。

## 〔 総括 〕

以上の結果は、*Dnmt3b*が単にDNAに結合するのではなく、クロマチンの高次構造を特異的に認識してメチル基を転移する可能性を示唆している。今後、*Dnmt3b*の基質特異的結合が、DNAメチル基転移酵素活性と結びつくのか検証を行なってゆく予定である。

## 論文審査の結果の要旨

DNAのメチル化は、X染色体やレトロトランスポゾンの不活性化などのエピジェネティックな遺伝子発現調節と深く関わっている。ほ乳類で複数のDNAメチル基転移酵素(Dnmt)が同定されたが、DNAのメチル化調節機構は未だに不明である。そこで、本研究では、ES細胞で特異的に発現する*Dnmt3b*が結合するクロマチンの特性を、マウスES細胞および、*in vitro*クロマチン再構成系を用いて生化学的に解析した。その結果、*Dnmt3b*は、Histone H1を含むクロマチンと相互作用したが、*Dnmt3b*の結合しているクロマチンに遺伝子発現の抑制と関わる特定のヒストン修飾の濃縮は観察されなかった。また、クロマチンの高次構造を緩める働きがあると報告されている、アセチル化Histone H4K16が*Dnmt3b*の結合しているクロマチンから排除されていたことや、高アセチル化クロマチンに対する*Dnmt3b*の基質結合能が低下した結果から、*Dnmt3b*は特定のヒストン修飾を認識してクロマチンに結合するのではなく、クロマチンの高次構造を認識して結合し、ゲノムDNAにメチル基を転移する可能性が示唆された。今回得られた結果は、発生・分化および細胞の癌化におけるDNAメチル化の調節機構を解明する新たな糸口となり得るものであり、学位に値すると考える。