



Title	Correlation between structural stability and substrate specificity of DNMT1
Author(s)	金田, 健作
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/67050
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (金 田 健 作)	
論文題名	Correlation between structural stability and substrate specificity of DNMT1 (DNMT1の構造安定性と基質特異性との相関)
論文内容の要旨 哺乳動物のDNAメチル化修飾は、シトシンとグアニンが並ぶCpG配列のシトシンの5位で起こり、遺伝子発現制御を担うため、組織特異的に継承される必要がある。ゲノムメチル化模様は、胚発生初期や配偶子形成過程で<i>de novo</i>メチル化酵素であるDNMT3AとDNMT3Bによって構築される。DNA複製反応で5-メチルシトシンは複製されず、複製直後に片鎖のみがメチル化されたヘミメチルDNAが現れる。維持メチル酵素であるDNMT1はヘミメチルDNAを特異的にメチル化し、次世代細胞へゲノムメチル化模様を継承する。<i>DNMT1</i>のノックアウトマウスは、胚発生後9.5日目に致死するため、DNMT1による維持メチル化反応は生命の維持に不可欠である。 DNMT1のX線結晶構造解析によると、DNMT1を複製フォークに局在化させるReplication foci targeting sequence (RFTS)ドメインは、水素結合を介してメチル化触媒領域のDNA結合ポケットに嵌った配置となっている。ヘミメチルDNAが結合するために、これらの水素結合が切断されて、RFTSドメインの配置変化が必要となる。また、触媒領域に結合したヘミメチルDNAの5-メチル基は、Target recognition domain (TRD)の疎水性アミノ酸残基から構成される基質認識ケージによって特異的に認識されて、その相補鎖はTRDから離れた触媒中心でメチル化される。以上より、DNMT1による絶妙な構造安定性を伴う基質認識機構の存在が示唆されるが、DNMT1の物性には不明な点が多かった。本研究では、DNMT1の維持メチル化反応機構の理解を目的として、RFTSドメインの構造変化からTRDの基質認識に関わる残基の機能解析を行った。 DNMT1の構造安定化に関与する相互作用を同定するために、RFTSドメインと触媒領域との間の水素結合を切断させたマウスDNMT1変異体のDNA結合活性を調べた。これらの変異はRFTSドメインを開きやすくするため、野生型よりも結合活性が上昇したが、RFTSドメインのL593と触媒領域のT1505の水素結合を切断するT1505A変異体の結合活性は野生型よりも低下していた。基質認識ケージを構成し、維持メチル化活性に必須であるW1512の側鎖とも、T1505は水素結合を形成しているため、結合活性の低下の原因はむしろTRDの基質認識異常にあることが示唆された。T1505A変異体の維持メチル化活性を評価したところ、37℃で反応が停止した。さらに、熱安定性評価からT1505A変異体の構造が生体温度付近で不安定になることが明らかとなった。 また、30℃未満の比較的低温でT1505A変異体を結晶化して、分解能3.26 Åの回折強度データを取得し、構造を決定した。野生型と全体構造に大きな変化はなく、T1505とW1512との間の水素結合が消失した状態で、W1512の配置やTRDの基質認識ケージ構造も維持されていた。さらに、低温下で維持メチル化活性を保持していることが確認されたため、T1505がDNMT1の生体温度での基質認識に不可欠であることが明らかとなった。 本研究により、T1505とW1512との間の水素結合がDNMT1の構造安定化の役割を担うとともに、基質認識に影響を与えることを見出した。これまで報告されてきた疎水性相互作用による基質認識機構に加えて、DNMT1の構造安定化を介した維持メチル化活性機構が明らかとなった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (金 田 健 作)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	中川 敦史
	副 査	教授	栗栖 源嗣
	副 査	教授	昆 隆英

論文審査の結果の要旨

哺乳動物の DNA メチル化修飾は、CpG 配列のシトシンの 5 位で起こり、遺伝子発現制御を担うため、組織特異的に継承される必要がある。DNA 複製反応で 5-メチルシトシンは複製されず、複製直後に片鎖のみがメチル化されたヘミメチル DNA が現れる。維持メチル酵素である DNMT1 はヘミメチル DNA を特異的にメチル化し、次世代細胞へゲノムメチル化模様を継承する。*DNMT1* のノックアウトマウスは、胚発生後 9.5 日目に致死するため、DNMT1 による維持メチル化反応は生命の維持に不可欠である。

従来からの DNMT1 の X 線結晶構造解析によると、DNMT1 を複製フォークに局在化させる Replication foci targeting sequence (RFTS) ドメインは、水素結合を介してメチル化触媒領域の DNA 結合ポケットに嵌った配置となっている。ヘミメチル DNA が結合するために、これらの水素結合が切断されて、RFTS ドメインの配置変化が必要となる。また、触媒領域に結合したヘミメチル DNA の 5-メチル基は、Target recognition domain (TRD) の疎水性アミノ酸残基から構成される基質認識ケージによって特異的に認識されて、その相補鎖は TRD から離れた触媒中心でメチル化される。以上より、DNMT1 による絶妙な構造安定性を伴う基質認識機構の存在が示唆されるが、DNMT1 の物性には不明な点が多かった。

このような背景の下、本論文では、DNMT1 の維持メチル化反応機構の理解を目的として、RFTS ドメインの構造変化から TRD の基質認識に関わる残基の機能解析を行った。DNMT1 の構造安定化に関与する相互作用を同定するために、RFTS ドメインと触媒領域との間の水素結合を切断させたマウス DNMT1 変異体の DNA 結合活性を調べた。これらの変異は RFTS ドメインを開きやすくするため、野生型よりも結合活性が上昇したが、RFTS ドメインの L593 と触媒領域の T1505 の水素結合を切断する T1505A 変異体の結合活性は野生型よりも低下していた。基質認識ケージを構成し、維持メチル化活性に必須である W1512 の側鎖とも、T1505 は水素結合を形成しているため、結合活性の低下の原因はむしろ TRD の基質認識異常にあることが示唆された。T1505A 変異体の維持メチル化活性を評価したところ、37 °C で反応が停止した。さらに、熱安定性評価から T1505A 変異体の構造が生体温度付近で不安定になることが明らかとなった。また、30 °C 未満の比較的低温で T1505A 変異体の結晶化を行い、分解能 3.26 Å の構造を決定した。野生型と全体構造に大きな変化はなく、T1505 と W1512 との間の水素結合が消失した状態で、W1512 の配置や TRD の基質認識ケージ構造も維持されていた。さらに、低温下で維持メチル化活性を保持していることが確認されたため、T1505 が DNMT1 の生体温度での基質認識に不可欠であることが明らかとなった。

本研究により、T1505 と W1512 との間の水素結合が DNMT1 の構造安定化の役割を担うとともに、基質認識に影響を与えることを見出した。これまで報告されてきた疎水性相互作用による基質認識機構に加えて、DNMT1 の構造安定化を介した新しい維持メチル化活性機構が明らかとなった。

以上、本論文では、DNA メチル化酵素 DNMT1 の構造安定化機構と維持メチル化活性機構の解明につながる研究成果を挙げ、本分野に対して重要な貢献を行ったと判断する。

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。