

# 分子動力学シミュレーションで解明する

## 維持メチル化酵素 (DNMT1) の活性化メカニズム

保田 拓 範

筑波大学大学院 理工情報生命学術院 生物学学位プログラム

### 1. はじめに

2021 年度 (前期) スーパーコンピューター若手・女性利用者推薦制度の採択課題「分子動力学シミュレーションで解明する維持メチル化酵素 (DNMT1) の活性化メカニズム」の研究成果を報告する。なお、本稿では概略のみを記載するため、詳細については Journal of Molecular Biology (JMB) 誌に掲載されている論文 (<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167371>) を参照して頂きたい。

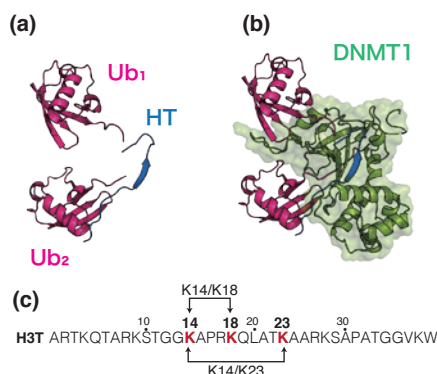
### 2. イントロダクション

すべての細胞は基本的に同一の DNA 配列を有しているものの、固有の性質を持つ。これは、**エピゲノム**と呼ばれる DNA 修飾が異なるためである。**DNA メチル化**は代表的なエピゲノムの一種で、組織や細胞で特異的な遺伝子発現を誘導することが知られている。そのため、細胞分化を始めとする様々な生体内のプロセスにおいて重要な役割を担っている。例えば、ゲノムインプリンティングや X 染色体の不活性化は、DNA メチル化によって引き起こされるイベントの代表例である [1]。この DNA メチル化は主に 2 種類存在することが知られている。1 つ目は **de novo メチル化**で、メチル化パターンの確立を担っている。より詳細には、初期胚形成の間に、両鎖ともメチル化されていない DNA 鎖をメチル化する役割を持つ。この過程により、メチル化パターンが確立されると、細胞分裂の間、そのメチル化パターンを維持することが必要になり、これが 2 つ目のメチル化機構にあたる**維持メチル化**である。具体的には、DNA 複製の際、新生鎖に DNA メチル化パターンをコピーし、エピゲノム情報を親細胞から娘細胞に引き継ぐという役割を担っている [2, 3]。一般に、このような DNA メチル化は DNA メチル化酵素ファミリー (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3A, Dnmt3B, Dnmt3L) により制御されている [4]。DNA メチル化酵素 (Dnmt) ファミリーをその機能により大分すると、Dnmt3A, 3B, 3L は主に *de novo* メチル化に関与し、Dnmt1 は主に維持メチル化に関与している [5]。本報告書のテーマでもある**維持メチル化酵素 1 (Dnmt1)**に着目すると、機能的にはヘミメチル化 DNA にメチル基を付加する酵素であるといえる。また、DNA メチル化パターンは遺伝子発現に影響するため、Dnmt1 は細胞の維持に不可欠な役割を担っており、細胞癌を始めとした様々な疾患と密接に関連していることが知られている [6]。

Dnmt1 の活性は DNA 複製時のみ要求されるため高度に制御される必要があり、結晶構造解析及び分子生物学的な実験により様々な活性制御メカニズムが報告されている。結晶構造解析では、複数の Dnmt1 の立体構造が決定され、約 1600 アミノ酸残基からなり、特徴的なドメインを持つことが明らかになってきた [7, 8]。着目すべき点として、**Replication Foci Targeting Sequence domain ドメイン (RFTS)** が Dnmt1 の触媒ドメインに入り込んでいることが明らかになった。つまり、DNA 複製時以外は Dnmt1 の DNA 結合部位が露出しておらず、活性がない。そのため、活性化には

Dnmt1 の大規模な構造変化が必要であると考えられてきた。一方, 分子生物学的な実験により, RFTS が Dnmt1 をヘミメチル化 DNA へと部位特異的にリクルートする役割を担っていることが明らかにされている [9, 10]. より詳細には, Ubiquitin like PHD and RING finger domains 1 (Uhrf1) がターゲット DNA の **Histone H3 tail (H3T)** を **ユビキチン化**する [11]. 更に, この Uhrf1 依存的なユビキチン化を, RFTS が認識することで DNMT1 がヘミメチル化部位にリクルートされることになる [12, 13]. このように, ヒストンのユビキチン化は Dnmt1 による部位特異的な DNA メチル化のマーカーとみなされている。さらに, 近年の実験的・計算科学的な研究により, 2 箇所モノユビキチン化された H3T が RFTS に結合し, RFTS は触媒部位から乖離, Dnmt1 が活性を持つことが明らかになった [14]. この際, Dnmt1 は複数のユビキチン化パターン (K14/K18, K14/K23, K18/23) を有する H3T と結合し, 活性化されることが明らかになっている。興味深いことに, 上述のユビキチン化パターンの違いは, Dnmt1 との結合親和性を変化させることも明らかになっている。具体的には, K14 および K18 の 2 箇所モノユビキチン化 H3T (K14/K18) は Dnmt1 に対して最も高い結合活性を示し, K14 および K23 の 2 箇所モノユビキチン化された H3T (K14/K23) は最も低い結合活性を示すが, H3T を結合していない 2 つのユビキチン分子 (Free Ubiquitin) は Dnmt1 にほとんど結合しない [14].

このような先行研究により, DNMT1 が 2 箇所モノユビキチン化された H3T により活性化され, ヘミメチル化部位で特異的に活性を持つというメカニズムが明らかになってきた。しかし, 活性化における H3T の役割を始めとした詳細な分子メカニズムやユビキチン化パターンの差により結合活性の差が生じるメカニズムについては不明であった。そこで, 本研究ではユビキチン化ヒストンによる Dnmt1 活性化メカニズムの解明を目的として, (1) K14 / K18 でモノユビキチン化された H3T (2) K14 / K23 でモノユビキチン化された H3T (3) H3T と結合していない 2 つのユビキチン, の 3 システムに関して全原子分子動力学計算 (MD) シミュレーションを実施した (図-1)。最終的に, H3T の構造的な柔軟性が 2 つのユビキチンの構造状態を制御しており, 2 つのモノユビキチン間の相互作用を阻害することで Dnmt1 との結合を促進する役割を持つことがわかった。

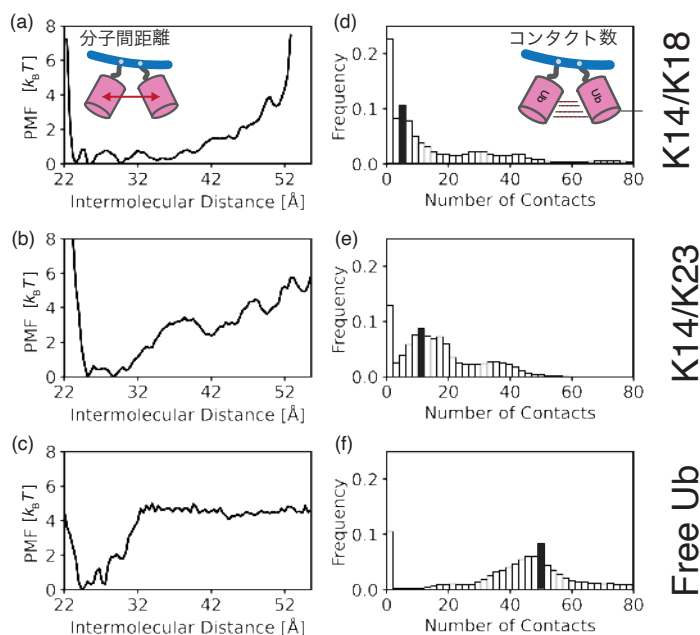


第 1 図: 計算で使用した構造およびヒストン H3 tail のアミノ酸配列

(a) K18/K23 の 2 箇所モノユビキチン化された H3T (青) と 2 つのユビキチン分子 (Ub<sub>1</sub>, Ub<sub>2</sub>, 赤) の複合体結晶構造 (PDBid: 5WV0) (b) Dnmt1 (緑) と 2 箇所モノユビキチン化された H3T の複合体結晶構造 (PDBid: 5WV0). (c) H3T のアミノ酸配列. 3 つのユビキチン化部位 (K14, K18, K23) はハイライト (赤色) で表示。

### 3. 結果

Dnmt1 の活性化メカニズムを分子レベルで解明するため, (1)K14/K18, (2)K14/K23 でモノユビキチン化された H3T, (3)H3T に結合していない2つのユビキチン分子 (Free ubiquitin) の3つのシステムについて全原子 MD シミュレーションを実施した. 解析の結果, H3T が存在する場合は, ユビキチン化パターンにより, 2つのユビキチンにおける, 分子間距離及びコンタクトが異なることが明らかになった. より詳細には, K14/K18 システムでは K14/K23 システムよりユビキチン間の分子間距離が長く, 分子間コンタクトが多くなっていた. 更に, Free ubiquitin の場合, K14/K18 および K14/K23 で H3T と結合したユビキチン分子に比べ, 分子間距離が短く, コンタクトが多くなることが明らかになった. (図-2) これらの結果から, 2つのユビキチン間における分子間相互作用は, ユビキチン化のパターンによって調節されていることが示唆された.

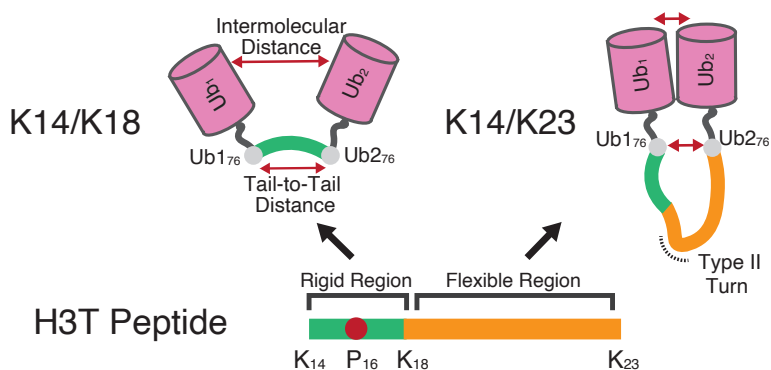


第2図: 異なるユビキチン化パターンにおけるユビキチン間の相互作用

(a-c) ユビキチン間の分子間距離における自由エネルギー地形(PMF). (d-f) ユビキチン分子間のコンタクト数についての頻度. (a, d) K14/K18 のモノユビキチン化 H3T. (b, e) K14/K23 のモノユビキチン化 H3T. (c, f) H3T と結合していない2つのユビキチン分子. (a-c) の各 PMF の値は  $k_B T$  でスケーリング. (d-f) では, コンタクト数がゼロの場合を除いて, 最も高いピークをハイライト (黒色) で表示.

続いて, ユビキチン化部位間の H3T の距離に着目すると, K14-K18 の方が K14-K23 と比べて長くなっていることが明らかになった. K14-K18 間の H3T は4残基であるのに対し, K14-K23 間は10残基あることを考慮すると非常に興味深い結果であり, ユビキチン化部位間における H3T の構造的な特徴がその差異を生んでいるのではないかと考察した. そのため, ユビキチン化部位間 (K14-K23) の H3T ペプチドについてのみ MD シミュレーションを実施した. その結果, K14 から K18 までの領域が構造的に硬く, K18 から K23 までの領域は柔らかいことがわかった. つまり, K14/K23 の

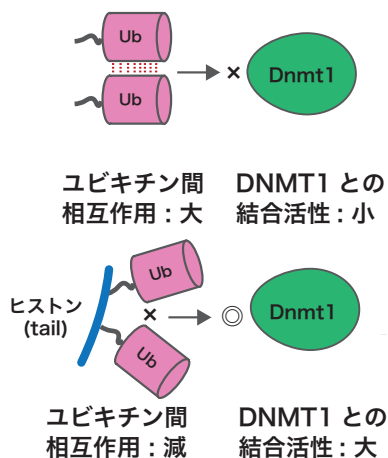
H3T のユビキチン化部位間の距離は、K14/18 のユビキチン化部位間の距離よりも構造上の性質から短くなり、これらのユビキチン化部位間の構造がユビキチン分子間相互作用を調節していることが示唆された(図-3).



第3図: H3T が2つのユビキチンに与える影響

H3T ペプチドの構造的な特徴により、2つのユビキチン分子 (Ub1, Ub2) の分子間距離にどのような影響を与えるかを示す模式図.

MD シミュレーションを実施した3つの系において、ユビキチン間の分子間相互作用は先行研究で測定された Dnmt1 に対する結合活性とよく一致した. 具体的には、実験的に得られた Dnmt1 に対する結合力は、計算で推定されたユビキチン分子間相互作用が強くなるにつれて弱くなることがわかった. 以上の解析から、H3T の構造的な柔軟性が2つのユビキチンの構造状態を制御しており、H3T はユビキチン間の分子間相互作用を阻害するスペーサーとして働くことで Dnmt1 への結合を促進していると結論づけた. (図-4)



第4図: ユビキチン間相互作用と DNMT1 との結合活性の関係

ヒストン H3T が存在しない場合、ユビキチン間の相互作用が大きくなり、DNMT1 との結合活性が小さくなる. 一方で H3T が存在する場合、相互作用が小さくなることで DNMT1 との結合が促進される.

#### 4. 謝辞

本研究は、東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」2021年度（前期）の採択課題として、Reedbush-H を利用して実施された。

#### 参考文献

- [1] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA Methylation in Genomic Imprinting. *Nature*. 1993;366:362-5.
- [2] Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010;11:204-20.
- [3] Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514.
- [4] Okano M, Xie SP, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19:219-20.
- [5] Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003;300:489-92.
- [6] Zhang ZM, Liu S, Lin K, Luo YF, Perry JJ, Wang YS, et al. Crystal Structure of Human DNA Methyltransferase 1. *J Mol Biol*. 2015;427:2520-31.
- [7] Song JK, Rechko O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation. *Science*. 2011;331:1036-40.
- [8] Takeshita K, Suetake I, Yamashita E, Suga M, Narita H, Nakagawa A, et al. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108:9055-9.
- [9] Easwaran HP, Schermelleh L, Leonhardt H, Cardoso MC. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *Embo Rep*. 2004;5:1181-6.
- [10] Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A Targeting Sequence Directs DNA Methyltransferase to Sites of DNA-Replication in Mammalian Nuclei. *Cell*. 1992;71:865-73.
- [11] Citterio E, Papait R, Nicassio F, Vecchi M, Gomiero P, Mantovani R, et al. Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol*. 2004;24:2526-35.
- [12] Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, et al. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature*. 2013;502:249-+.
- [13] Qin WH, Wolf P, Liu N, Link S, Smets M, La Mastra F, et al. DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res*. 2015;25:911-29.
- [14] Ishiyama S, Nishiyama A, Saeki Y, Moritsugu K, Morimoto D, Yamaguchi L, et al. 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*. 2017;68:350-60 e7.