



平成 31 年 1 月 11 日

研究企画・産学連携推進課

UHRF1 と LIG1 の複合体構造解析 ～阻害剤開発の基盤となる相互作用部位を同定～

～『Structure』に掲載（1月10日オンライン）～

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 構造生物学研究室 有田恭平准教授、郡聡実（博士前期課程）、Centre national de la recherche scientifique（CNRS; フランス国立科学研究センター） Pierre-Antoine Defossez グループディレクターの国際共同研究グループは、DNA リガーゼ LIG1^{*1} と UHRF1^{*2} の複合体の立体構造を決定し、DNA メチル化^{*3} の継承機構の基盤を解明しました。

研究成果のポイント：

- DNA メチル化の世代継承に必須な因子の複合体構造を決定、その結合に重要な相互作用部位を同定するとともに、機能制御に関わる高次構造変化の構造基盤を解明した。
- 結合の阻害により DNA メチル化の世代継承を正常化する薬剤の可能性が示された。

研究の背景

ヒトの体を構成するおよそ 200 種類以上の細胞は、同じ遺伝子のセットを持つにもかかわらず形や機能が異なります。これは、各細胞で使われる遺伝子が異なるためです。その使われ方を決める因子の一つが DNA メチル化です。細胞では分裂の前に DNA が正確に複製され親細胞から娘細胞に受け継がれますが、DNA メチル化も同様です。この「DNA 維持メチル化」とよばれるプロセスが正常でないと、細胞のがん化など様々な不具合が生じるので、DNA メチル化パターンの厳密な制御と継承が必要です。

DNA 維持メチル化には UHRF1 と DNA 維持メチル化酵素 DNMT1 の 2 つのタンパク質が必須の役割をします。UHRF1 は DNA 複製後に生じた片鎖メチル化 DNA を認識し、ここに DNMT1 を呼び込む働きをします。有田准教授らは、この呼び込みはリジン 126 がメチル化された DNA リガーゼ 1（LIG1K126me3）によることを 2017 年 8 月に報告しました（Molecular Cell 67, 550-565, August 17, 2017）。

UHRF1 には 5 つの機能ドメインがあり、そのうち特徴的な「ペプチド結合溝」をもつ TTD ドメイン^{*4}（以下 UHRF1 TTD）が LIG1K126me3 と結合します。この溝は他にも、9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3^{*5}（H3K9me3）や、UHRF1 の分子内にあるリンカー領域が結合しますが、興味深いことに、LIG1K126me3 の UHRF1 TTD への結合は他の結合因子に比べ 180 倍以上も強いことが知られています。この UHRF1 と LIG1 の高親和性の結合が、UHRF1 を正確に複製サイトに呼び込むために必要と考えられますが、その結合をもたらす仕組みは不明でした。また、複数の機能ドメインから成る UHRF1 は、基質の結合が高次構造を変化させその機能を制御していることが考えられますが、UHRF1 の高次構造の変化はよくわかっていませんでした。そこで本研究グループは、UHRF1 と LIG1 の複合体の構造と、UHRF1 の高次構造の変化の解析を行うことにより、DNA 維持メチル化の機構解明に取り組みました。

研究の内容

まず、UHRF1 TTD と LIG1K126me3 ペプチド複合体の立体構造を大型放射光施設 Photon Factory (PF) の BL-17A を用いて X 線結晶構造解析法で決定しました。その結果、LIG1K126me3 は UHRF1 TTD のペプチド結合溝に結合していました。そして、その TTD と LIG1K126me3 との間には重要な相互作用部位が 3 か所あることがわかりました (図 1)。

1 つめは LIG1 のトリメチル化されたリジン 126 と TTD の芳香族アミノ酸の側鎖から成る籠との相互作用です。2 つめは、LIG1 のスレオニン 123 と UHRF1 TTD との間での水素結合です。この LIG1 のスレオニン 123 にリン酸化が起こると、TTD との結合が消失することがわかり、LIG1 のリン酸化が UHRF1 との結合を制御するスイッチの役割をしていることを明らかにしました。3 つめは、LIG1 のアルギニン 121 と TTD の「アルギニン結合洞」と名付けたポケットとの間の相互作用です。別の UHRF1 結合タンパク質であるヒストン H3 と比較すると、LIG1 のアルギニン 121 に相当するアミノ酸はヒストン H3 ではリジン 4 でした。このヒストン H3 のリジン 4 をアルギニン残基に変異させたところ、UHRF1 TTD への親和性が LIG1 とほぼ同じになり、LIG1 のアルギニン 121 と UHRF1 TTD のアルギニン結合洞との相互作用が高親和性を決める重要なポイントであることがわかりました。そして、立体構造解析から明らかにした UHRF1 TTD と LIG1K126me3 の相互作用に重要と考えられるアミノ酸残基に部位特異的な変異を導入すると、実際に結合が大幅に減少することを生化学と哺乳類細胞を用いた相互作用解析 (CNRS, Pierre-Antoine Defossez 氏) により明らかにしました。

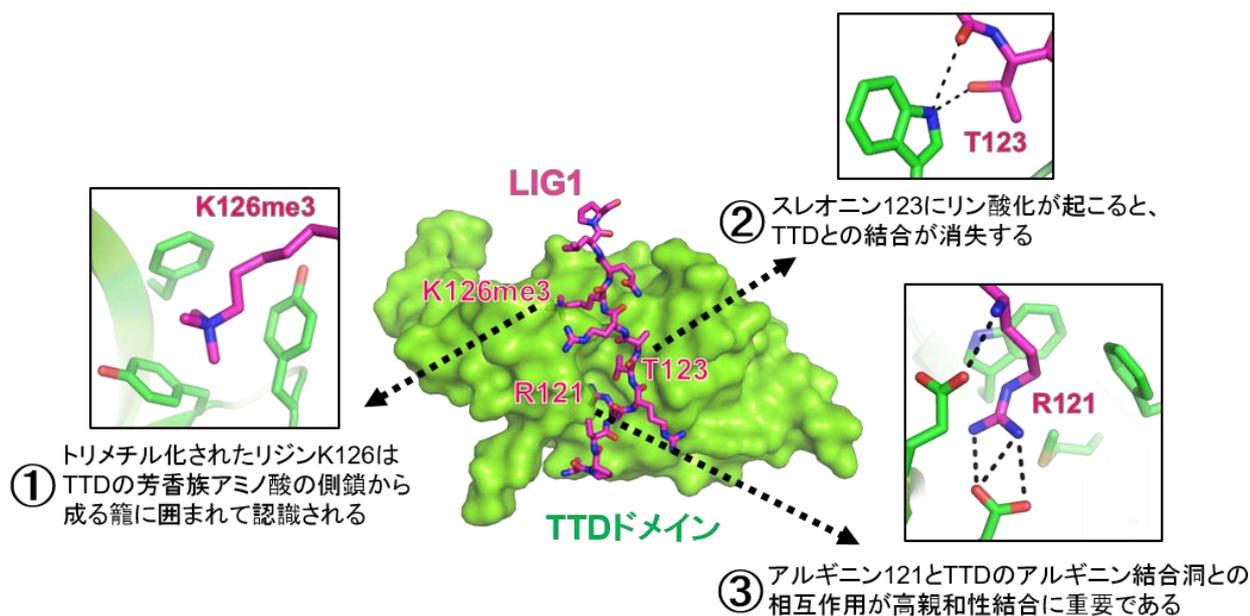


図 1. UHRF1 TTD と LIG1K126me3 複合体の立体構造

UHRF1 TTD を緑色の表面モデル、LIG1K126me3 をピンク色のスティックモデルで示す。

UHRF1 TTD と LIG1K126me3 との間に存在する重要な 3 か所の相互作用部位を拡大して示す。

さらに、LIG1K126me3 の結合による UHRF1 の高次構造の変化を X 線溶液散乱^{*6} (PF BL-10C) や高速原子間力顕微鏡^{*7} (金沢大学バイオ AFM 先端研究センター) を用いて解析しました。UHRF1 単体では、TTD のペプチド結合溝には UHRF1 分子内のリンカー2 が結合しており、閉じたコンパクトな構造をとります (図 2 左)。しかし、LIG1K126me3 が TTD のペプチド結合溝に結合すると、リンカー2 はペプチド結合溝から追い出され、その結果 UHRF1 は開いたフレキシブルな構造に変わることが本研究で初めて明らかになり、この高次構造の変化が UHRF1 の機能制御に重要であることが示唆されました (図 2 右)。



図 2. LIG1K126me3 の結合による UHRF1 の高次構造の変化の模式図

単独で閉じたコンパクトな構造をとる UHRF1 が、LIG1K126me3 の結合によって開いたフレキシブルな構造に変化する。図中の灰色の図形は UHRF1 の他のドメインを模式的に示した。

今後の展開

本研究成果は、DNA 維持メチル化に関わる UHRF1 がどのようにして複製因子 LIG1 により複製の起きている場所に連れてこられるかを構造生物学的な観点から初めて解明しました。DNA 維持メチル化と複製の連携については今まさに研究が始まったばかりであり、本研究はこの研究分野の先駆的な成果となります。

DNA 維持メチル化の異常は、がんや精神疾患などの様々な病気との関連が報告されています。UHRF1 は DNA メチル化を維持する重要な因子であるとともに、様々ながん細胞で高発現して異常な増殖に関与することから、薬剤の標的分子になると考えられています。本研究の X 線結晶構造解析から、LIG1 のアルギニン 121 が UHRF1 TTD の「アルギニン結合洞」に入ることが高親和性結合を実現する重要な相互作用であることがわかりました。つまり、TTD の「アルギニン結合洞」に結合する化合物は UHRF1 の TTD の機能を強力に阻害し、がん細胞で過剰に発現した UHRF1 の働きを抑えられると考えられます。今回の研究成果は DNA 維持メチル化の生物学的な意義を明らかにするとともに、この分野の応用への寄与が期待されます。

用語説明

*1, LIG1

DNA 複製中のラギング鎖で生じた岡崎フラグメントを連結する酵素。複製が起きている場所に局在しており、UHRF1 を複製されている場所に呼び込む働きも持つ。

*2, UHRF1

DNA メチル化維持に必須の役割をするタンパク質。片鎖メチル化 DNA に結合したり、9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 に結合したり、ヒストン H3 をユビキチン化するなど様々な機能を発揮することで、DNA メチル化パターンの複製を誘導する。がん細胞で過剰発現しており、異常な細胞増殖に関与する。

*3, DNA メチル化

DNA に含まれるシトシン塩基にメチル基 (-CH₃) が付加される反応。ヒトでは CG 配列中のシトシン塩基のみがメチル化される。DNA メチル化により、遺伝子の発現が抑制されると考えられている。生物の体（多細胞の形質）を形成するために必須である。

*4, TTD ドメイン (UHRF1 TTD)

UHRF1 が有する機能ドメイン。Tudor ドメインがタンデムに 2 つ並んだ構造をとり、その間に形成されるペプチド結合溝で、ヘテロクロマチン形成の指標である H3K9me3 や、UHRF1 分子内のリンカーと相互作用する。

*5, ヒストン H3

ゲノム DNA はヒストン H2A, H2B, H3, H4 から成るヒストン 8 量体に巻き付いてヌクレオソームという構造体を取り、コンパクトに折りたたまれて核の中に収納される。ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のトリメチル化はヌクレオソームの高度な凝縮に関与している。

*6, X 線溶液散乱

溶液中のタンパク質に X 線を照射し、得られた散乱強度データからタンパク質の構造情報を得る手法。低分解能であるが溶液中のタンパク質の平均構造がわかり、タンパク質の構造変化を解析できる。

*7, 高速原子間力顕微鏡

先端を尖らせた探針を用いて、タンパク質の表面をなぞるように動かす走査型顕微鏡。タンパク質一分子の構造と動態をリアルタイムで観察することができる。

※本研究は、『Structure』に掲載されました。(1 月 10 日付オンライン)

YCU
横浜市立大学

お問い合わせ先

(研究内容に関するお問い合わせ)

大学院生命医科学研究科 構造生物学 准教授 有田恭平
TEL : 045-508-7227 E-mail : aritak@yokohama-cu.ac.jp

(取材対応窓口、資料請求など)

研究企画・産学連携推進課長 渡邊 誠
TEL : 045-787-2510 E-Mail : kenkyupr@yokohama-cu.ac.jp