

## リン酸化による UHRF1 の結合相手の制御の仕組みを解明

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（博士後期課程2年）、治面地智宏（2017年度博士前期課程修了）、生命情報科学研究室 池口満徳 教授、浴本 亨 助教授らの研究グループは、細胞分裂前後の形質維持に関わるタンパク質 UHRF1<sup>\*1</sup>が、自身のリン酸化<sup>\*2</sup>修飾によって、結合パートナーを制御する仕組みを構造生物学と計算科学を組み合わせた手法で明らかにしました。

本研究は、『Journal of Molecular Biology』に掲載されました。（6月1日オンライン）

### 研究成果のポイント

- UHRF1 の 298 番目のセリン残基のリン酸化修飾が細胞周期の G2/M 期に起こることを同定した。
- リン酸化修飾による UHRF1 の構造変化と、それに伴う結合因子の制御機構を明らかにした。

### 研究の背景

受精卵から細胞分裂を繰り返した細胞は、やがて専門の働きを持つ細胞へと分化します。ヒトでは、分化した細胞の種類は約 270 種類あると言われています。これらの細胞は同じゲノム情報を持っていますが、細胞によって使う遺伝子が異なるために固有の形質を持ちます。この遺伝子の使われ方を制御する因子の一つが DNA メチル化<sup>\*3</sup>です。哺乳類の DNA メチル化は一般的に CG 配列中のシトシン塩基の 5 位の炭素に起こります。ヒトゲノム中には約 3,000 万カ所の CG 配列が存在し、そのうち 60~70%がメチル化されています。分化した細胞はその形質を保ったまま増殖しますが、これは細胞分裂後も DNA メチル化パターンが正確に受け継がれることで成し遂げられます。DNA メチル化が継承されていく仕組みを「DNA 維持メチル化」と呼び、このプロセスの破綻は異常な遺伝子発現をもたらす、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。

DNA 維持メチル化には UHRF1 と維持型 DNA メチル化酵素 DNMT1 の 2 つのタンパク質が必須です。UHRF1 は DNA 複製後に生じた片鎖メチル化 DNA を認識し、DNMT1 を片鎖メチル化 DNA に呼び込む役割をします。UHRF1 は 5 つの機能ドメインからなり、そのうちの TTD ドメイン<sup>\*4</sup> (以下 UHRF1 TTD) は他の因子の結合の足場となる特徴的な「ペプチド結合溝」をもちます。この溝には UHRF1 分子内のリンカー領域である linker 2 や spacer、9 番目のリジンがトリメチル化されたヒストン H3<sup>\*5</sup> (H3K9me3) が結合します (図 1)。

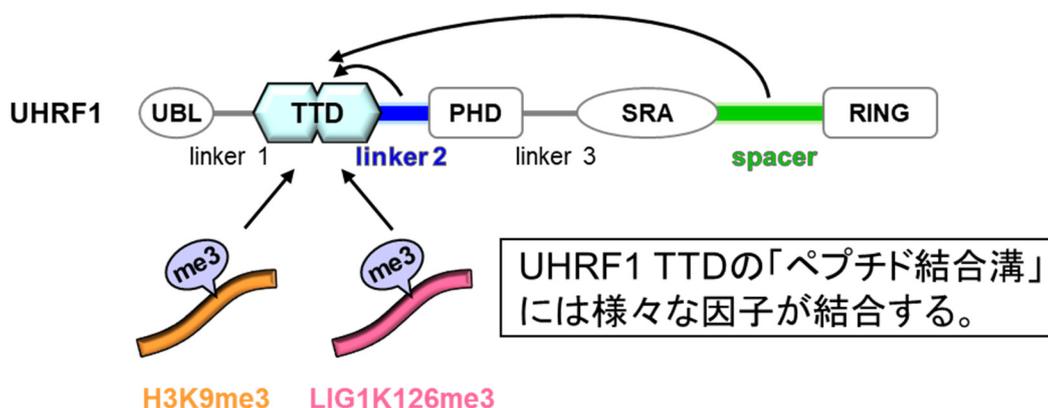


図 1. UHRF1 のドメイン構造

UHRF1 TTD は特徴的な「ペプチド結合溝」をもつ。UHRF1 分子内の linker 2 や spacer との分子内相互作用や、H3K9me3 や LIG1K126me3 と分子間相互作用し、結合の足場として働く。

本研究グループはまた、UHRF1 TTD の「ペプチド結合溝」に 126 番目のリジンがトリメチル化された DNA リガーゼ 1<sup>6</sup> (LIG1K126me3) が結合し、LIG1 が UHRF1 を複製部位に呼び込む働きを 2019 年 3 月に報告しています ([Structure 27, 485–496, March 5, 2019](#))。

これまでの研究で、これらの結合因子のうち、linker 2 が優先的に「ペプチド結合溝」に結合すること、そして linker 2 の領域内に存在する UHRF1 の 298 番目のセリン残基（以下セリン 298）のリン酸化によってその結合が弱くなることが明らかになっています。このことから UHRF1 のセリン 298 のリン酸化が、他の結合因子が「ペプチド結合溝」に結合するスイッチの役割を果たすと考えられています。細胞周期依存的な UHRF1 の翻訳後修飾はこれまでにいくつか報告されていますが、セリン 298 のリン酸化が起こる細胞周期のタイミングと、このリン酸化による適切な結合因子を選択する仕組みは不明でした。そこで本研究グループは、UHRF1 のセリン 298 がリン酸化される時期の同定と、リン酸化 UHRF1 の構造変化の解析や結合因子との結合様式の解析を行うことにより、UHRF1 のセリン 298 のリン酸化による結合因子の制御機構の解明に取り組みました。

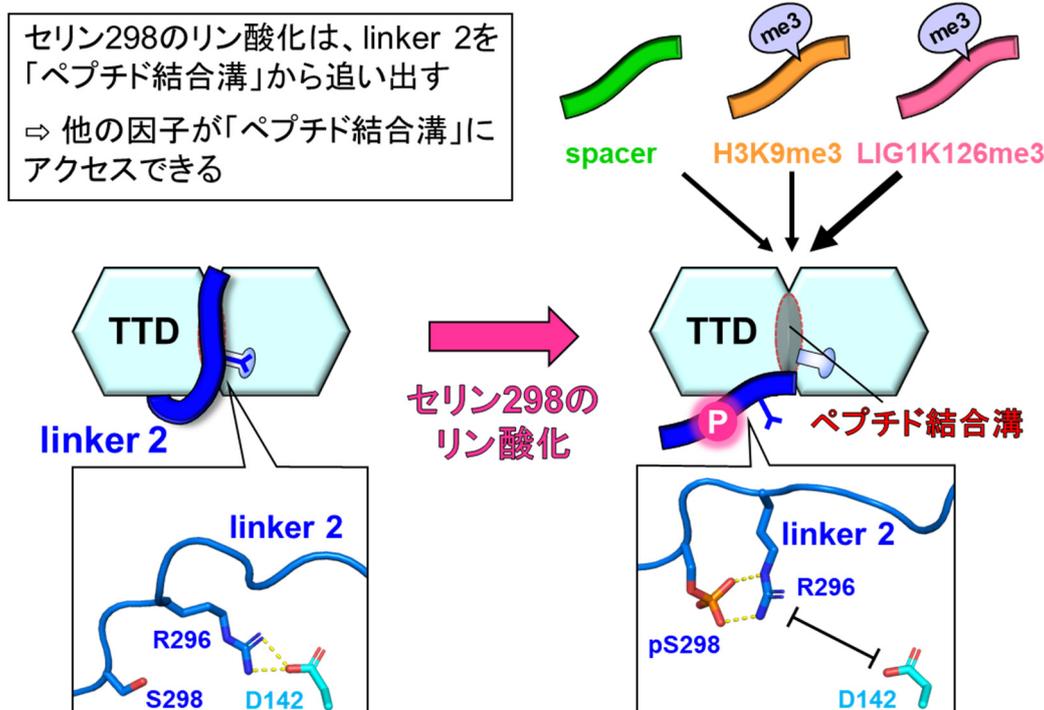
## 研究の内容

セリン 298 がリン酸化された UHRF1 を特異的に認識する抗体を作製し、哺乳類細胞中で UHRF1 のセリン 298 がいつリン酸化されるのかを調べました。その結果、細胞周期の G2（分裂準備）期から M（分裂）期にかけてセリン 298 がリン酸化された UHRF1 の量が増加することがわかりました。

次に、UHRF1 TTD ドメインのみと UHRF1 TTD から linker 2 までの領域 (UHRF1 TTD-L2) のタンパク質を調製して等温滴定カロリーメトリー<sup>7</sup> で結合因子との相互作用を解析しました。その結果、spacer や H3K9me3 は UHRF1 TTD ドメインのみのタンパク質には結合しましたが、UHRF1 TTD-L2 には結合できませんでした。しかし、この結合障害は UHRF1 TTD-L2 のセリン 298 がリン酸化されると解除されました。このことから、linker 2 が「ペプチド結合溝」に優先的に結合しており、セリン 298 のリン酸化は linker 2 をペプチド結合溝から追い出すことが考えられました。本研究グループは、2019 年 3 月の報告で、LIG1K126me3 は、「ペプチド結合溝」に結合している linker 2 を追い出すことで UHRF1 TTD-L2 に結合できることを明らかにしました。しかし、その結合の強さは UHRF1 TTD との結合に比べて約 17 倍弱く、セリン 298 のリン酸化によって結合の強さが回復することがわかりました。

さらに、セリン 298 のリン酸化が UHRF1 の構造に与える影響を解析しました。X 線溶液散乱測定<sup>8</sup> の結果、リン酸化していない UHRF1 TTD-L2 は UHRF1 TTD ドメインのみと同等の大きさであるのに対し、セリン 298 をリン酸化した UHRF1 TTD-L2 は分子の大きさが広がることがわかりました。また熱安定性実験からは、UHRF1 TTD ドメイン単独の方が、UHRF1 TTD-L2 よりも変性温度が低いことがわかりました。このことは、linker 2 が「ペプチド結合溝」に入り込むと TTD の熱安定性が上がることを示しています。セリン 298 をリン酸化した UHRF1 TTD-L2 の変性温度は、UHRF1 TTD ドメイン単独と UHRF1 TTD-L2 の中間を示しました。このことから、セリン 298 のリン酸化によって linker 2 が「ペプチド結合溝」から部分的に解離することが明らかになりました。

セリン 298 のリン酸化によって、linker 2 が「ペプチド結合溝」から出ていく過程の詳細を明らかにするために、分子動力学シミュレーション<sup>9</sup>を行いました。linker 2 の「ペプチド結合溝」への結合には、「ペプチド結合溝」のアスパラギン酸 142 (D142) と linker 2 のアルギニン 296 (R296) の相互作用が重要です。S298 をリン酸化した UHRF1 TTD-L2 のシミュレーションの結果では、リン酸化セリン 298 (pS298) のリン酸基がこのアルギニン 296 と相互作用し、アスパラギン酸 142 とアルギニン 296 との間の相互作用を阻害することが明らかになりました (図 2)。以上のことから、UHRF1 は 298 番目のセリン残基のリン酸化によって linker 2 が「ペプチド結合溝」から部分的に解離した構造状態へと変化し、他の結合因子がアクセスできるようになるという分子機構を明らかにしました。



**図 2. セリン 298 のリン酸化による UHRF1 の構造変化**

「ペプチド結合溝」に優先的に結合していた linker 2 が、セリン 298 のリン酸化によって解離し、他の結合因子がアクセスできる状態になる。

### 今後の展開

本研究成果は、DNA 維持メチル化に関わる UHRF1 と結合因子との結合が、セリン 298 のリン酸化修飾によって制御される分子機構を初めて解明しました。これは、UHRF1 TTD の「ペプチド結合溝」における複数の結合因子との結合とその制御の一端に関わる成果であり、翻訳後修飾を受けた UHRF1 の機能を理解する重要な知見です。

また、セリン 298 のリン酸化が細胞周期の G2/M 期で起こることを明らかにしました。非リン酸化体 UHRF1 は細胞周期の S (DNA 合成) 期で DNA 合成に働く LIG1 と結合して複製部位に呼び込まれ、一方で細胞周期 M (分裂) 期でリン酸化体 UHRF1 は H3K9me3 との結合を介して染色体上に局在するなどの、細胞周期に応じた機能の使い分けがリン酸化で制御される可能性が考えられます。今後、哺乳類細胞を用いた機能解析などを行うことで UHRF1 の 298 番目のセリン残基のリン酸化の生理学的機能の全容解明が期待されます。

### 用語説明

#### \*1 UHRF1

DNA 維持メチル化に必須なタンパク質。片鎖メチル化 DNA の認識や H3K9me3 との結合、ヒストン H3 のユビキチン化修飾などの様々な機能を持つ。

#### \*2 リン酸化

側鎖に水酸基を持つアミノ酸にリン酸基 (-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) が付加される反応のことで、タンパク質に起こる翻訳後修飾の一つである。

#### \*3 DNA メチル化

DNA のシトシン塩基の 5 位の炭素原子にメチル基 (-CH<sub>3</sub>) が付加される反応。ヒトでは主に CG 配列中のシトシン塩基のみがメチル化される。メチル化された DNA は遺伝子発現の抑制などに関与し、細胞の遺伝子発現パターンを決定する。

#### \*4 TTD ドメイン (UHRF1 TTD)

UHRF1 の機能ドメインの一つ。Tudor ドメインが 2 つ並んだ構造をとり、その間に結合因子の足場となる「ペプチド結合溝」が存在する。

#### \*5 ヒストン H3

核内で DNA を収納するヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質の一つ。ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化は、ヌクレオソームが凝集したヘテロクロマチン構造の形成に促し、遺伝子発現の抑制に関与する。

#### \*6 DNA リガーゼ 1

DNA 複製中に生じる短い DNA 複製断片である岡崎フラグメントを連結するタンパク質。DNA 複製部位に局在し、UHRF1 を複製部位に呼び込む働きをする。

#### \*7 等温滴定カロリメトリー

生体分子の結合に伴う熱量を計測し、相互作用を定量的に解析する手法。反応中の熱力学的パラメータを得ることができる。

#### \*8 X 線溶液散乱測定

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慣性半径や最大長など、分子の形に関する情報を得る構造生物学的な研究手法。

#### \*9 分子動力学シミュレーション

タンパク質を構成する原子について運動方程式を解くことで、タンパク質の動的な構造変化をコンピュータ上でシミュレーションする手法。

### 掲載論文

#### **Serine 298 Phosphorylation in Linker 2 of UHRF1 Regulates Ligand-Binding Property of its Tandem Tudor Domain**

Satomi Kori, Tomohiro Jimenji, Toru Ekimoto, Miwa Sato, Fumie Kusano, Takashi Oda, Motoko Unoki, Mitsunori Ikeguchi, Kyohei Arita

*Journal of Molecular Biology* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.05.006>

※本研究は、JSPS 科研費 (JP18H02392, JP19H05294, JP19H05741, JP19J22030)、JST さきがけ、武田科学振興財団、横浜市立大学戦略的研究推進事業などの助成を受けて行われました。



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・産学連携推進課長 山崎 理絵 TEL : 045-787-2510 E-Mail : kenkyupr@yokohama-cu.ac.jp