

文部科学記者会、科学記者会
 京都大学記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ
 神戸市政記者クラブ、神戸民間放送記者クラブ
 同時発表

2022年11月25日
 横浜市立大学
 理化学研究所

卵子形成に必須なタンパク質 DPPA3 による UHRF1 の 機能阻害の分子機構を解明 —NMR 法による DPPA3 と UHRF1 の複合体構造解析—

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 畑 圭一さん（2021年度博士前期課程修了）、有田 恭平教授、同研究科 構造エピゲノム研究室 小沼 剛助教、池上 貴久教授、理化学研究所 生命機能科学研究センター 小林 直宏上級研究員らを中心とした研究グループは、DNA メチル化の維持に関与するタンパク質 UHRF1^{*1} と母性因子 DPPA3^{*2} の複合体構造を溶液 NMR 法^{*3} で決定しました。本成果は、卵子形成において DPPA3 が UHRF1 の機能を阻害する分子機構を解明し、正常な卵子形成や受精、胚発生の基礎的なメカニズムに関する知見をもたらします。

本研究成果は、「Nucleic Acids Research」に掲載されました。（2022年11月24日）

研究成果のポイント

- 溶液 NMR 法で UHRF1 と DPPA3 の複合体構造を決定
- DPPA3 が UHRF1 の様々な分子表面を使って相互作用することを発見
- DPPA3 と UHRF1 の相互作用が細胞内での UHRF1 の機能阻害に重要であることを解明

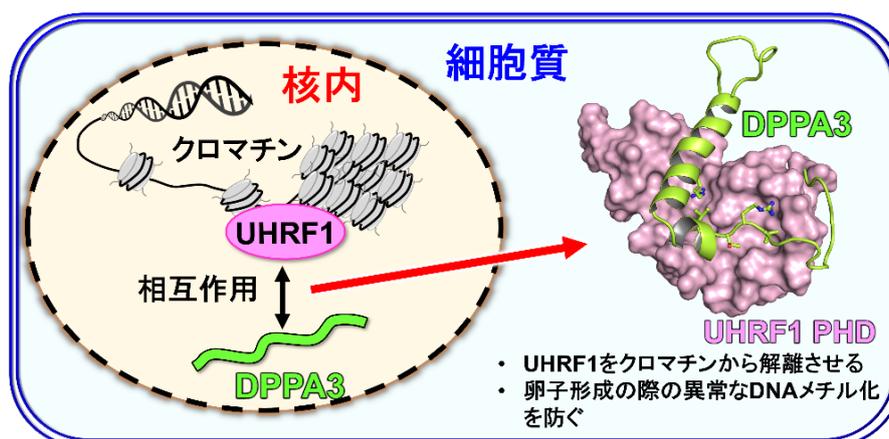


図1 卵母細胞における母性因子 DPPA3 による UHRF1 の機能阻害のモデル図。UHRF1 は DNA メチル化の維持に関与する。体細胞では UHRF1 は核内で働き、卵母細胞では DPPA3 との結合によりクロマチンから解離し核外に移行する。これにより卵子形成の際の異常な DNA メチル化が防がれ、正常な卵子形成が起こる。本研究では、DPPA3 による UHRF1 の機能阻害機構を構造生物学的な研究で解明した。

研究背景

ヒトの体は約 37 兆個もの細胞で構成され、その種類は筋肉細胞、神経細胞、血液細胞など約 270 にも及ぶといわれています。たとえば、血液細胞のひとつである白血球としての構造と機能を個々の細胞に持たせるためには、それに相当する遺伝子の発現が必要になります。この遺伝子の発現を制御しているのが DNA メチル化であり、DNA メチル化パターンの違いによって様々な細胞の種類が決まっています。すなわち、DNA メチル化がヒトの生涯を通して維持されることで、細胞はその働きや形を保ったまま正常に増殖することができます。これを DNA 維持メチル化といいます。UHRF1 は DNA メチル化酵素 DNMT1 と協調して働き、細胞の DNA メチル化状態の維持を制御します。

近年、卵子形成において、初期胚、始原生殖細胞、卵細胞で特異的に発現する母性因子 DPPA3 (Developmental Pluripotency Associated 3, 別名 Stella, PGC7) が UHRF1 の機能を阻害することが報告されました (Li et al., Nature 2018)。DPPA3 は、卵子形成の過程で UHRF1 に結合し、UHRF1 をクロマチン⁴ から引き剥がして核外に輸送することがわかりました。DPPA3 遺伝子をノックアウトしたマウスの卵母細胞では、UHRF1 は核内に局在し、DNMT1 と共に異常な DNA メチル化を起こします。その結果、卵母細胞は正常な機能を維持できず、その後の受精卵は最初の細胞分裂後である 2 細胞期までに死に至ります。従って、卵母細胞における UHRF1 と DPPA3 の相互作用が、正常な卵子形成とその後の胚発生、つまり生命の誕生に必須です。しかし、卵子形成の過程で DPPA3 が UHRF1 のクロマチン結合をどのように阻害して、その働きを阻害しているかは不明であったため、その相互作用メカニズムの解明が望まれていました。また、DPPA3 は天然変性タンパク質⁵ であり、その構造柔軟性が複合体構造決定のボトルネックとなっていました。そこで本研究グループは、UHRF1 と DPPA3 の複合体の立体構造を溶液 NMR 法で決定しました。得られた立体構造から DPPA3 が大きな構造変化を伴って、UHRF1 の多数の分子表面と相互作用していることを明らかにし、この相互作用が UHRF1 の機能を阻害する分子基盤であることがわかりました。

研究内容

【相互作用領域の同定】

DPPA3 が UHRF1 と相互作用するための必要最小限領域の同定を生化学的な研究手法で解明しました。UHRF1 はアミノ末端から UBL, TTD, PHD, SRA, RING の 5 つのドメインから構成されています。そのうち、ヒストン H3⁶ や複製因子 PAF15⁷ と相互作用する PHD ドメイン (302-372 アミノ酸残基、以下 UHRF1 PHD) が DPPA3 との相互作用を担う領域であることがわかりました。一方で、DPPA3 は 150 アミノ酸残基から成りますが、全体に渡って特定の立体構造をとらない天然変性タンパク質として知られています。DPPA3 のカルボキシ末端領域の 76-127 アミノ酸残基 (以下 DPPA3c) が UHRF1 PHD との相互作用に必須であることがわかりました。

【溶液 NMR による構造決定】

天然変性タンパク質である DPPA3 の構造柔軟性や複合体の分子量の低さ（約 14,000）を考慮し、溶液 NMR 法による UHRF1 PHD と DPPA3c の複合体について構造決定を試みました。さらに NMR 信号を効率的に解析するため、UHRF1 PHD のカルボキシ末端と DPPA3c のアミノ末端を連結したキメラタンパク質を作成して複合体構造の解析に取り組みました。各種 NMR 測定には、横浜市立大学 鶴見キャンパスに設置されているブルカー社製の 950 MHz と 800 MHz、500 MHz の NMR 装置を用いました。これらの高磁場 NMR 装置使用は、良質な NMR スペクトルの収集に貢献し、本研究成果に必須でした。また、理化学研究所の小林直宏上級研究員が開発したソフトウェア MagRO が、従来法では半年以上を要する NMR スペクトルの解析を 2 か月ほどに短縮し、構造決定に重要な役割を果たしました。

【UHRF1 PHD と DPPA3c の複合体構造】

UHRF1 PHD は pre-PHD と core-PHD の 2 つの領域から成る構造をしています。UHRF1 PHD への結合に伴って DPPA3c に特徴的な構造誘起が起こることがわかりました。DPPA3c は中央領域で短い α ヘリックス構造*8 を形成し、その直後に‘L 字’の形をとるように約 90 度曲がり、長い α ヘリックスを形成します（図 1）。この長い α ヘリックスが、pre-PHD と core-PHD の間の溝に入り込んで UHRF1 PHD と結合していました（図 1）。短い α ヘリックスのアミノ末端側にある VRT（バリナーアルギニン-スレオニン）配列は UHRF1 PHD の core-PHD と相互作用していました。これまでの研究から、UHRF1 PHD はヒストン H3 のアミノ末端の ART（アラニン-アルギニン-スレオニン）配列や、PAF15 のアミノ末端の VRT（バリナーアルギニン-スレオニン）配列と結合することが知られていました。一方で DPPA3 は、88-90 番目のアミノ酸残基の VRT 配列に加えて、短い α ヘリックスと長い α ヘリックスも使って UHRF1 PHD と相互作用します。この広い相互作用面によって、DPPA3 は UHRF1 PHD にヒストン H3 や PAF15 よりも 70 倍も強い親和性で結合することがわかりました。UHRF1 のクロマチンへの局在は、PHD ドメインによるヒストン H3 への結合が重要です。DPPA3 はヒストン H3 よりも強い親和性で UHRF1 と結合できます。従って、DPPA3 は UHRF1 とヒストン H3 の結合を競合的に阻害することで、UHRF1 をクロマチンから解離させその機能を阻害すると考えられます。

【アフリカツメガエル卵抽出液やマウス ES 細胞を用いた機能解析】

DPPA3 と UHRF1 PHD の相互作用の機能的な重要性を確認するため、相互作用界面に位置するアミノ酸残基に変異を導入した変異体 DPPA3 を作成して、アフリカツメガエルの卵抽出液やマウス ES 細胞を用いた解析を行いました（東京大学 中西真 教授、西山敦哉 准教授、ミュンヘン大学 Heinrich Leonhardt 教授との共同研究）。

まず、UHRF1 PHD との相互作用面に存在する DPPA3 の VRT 配列、短い α -ヘリックスや長い α -ヘリックス中のアミノ酸残基に変異を導入した DPPA3 は、UHRF1 PHD との結

合が弱くなる、または消失することを試験管内で確認しました。さらに、ツメガエル抽出液を用いた実験から、これら変異体 DPPA3 は UHRF1 のクロマチンへの局在を抑制できないことがわかりました。最後にツメガエル抽出液とマウス ES 細胞を用いて DNA メチル化解析を行いました。野生型 DPPA3 は UHRF1 をクロマチンから解離させるので、ゲノム DNA の脱メチル化が起こります。しかし、変異体 DPPA3 では DNA の脱メチル化を起こせないことがわかりました。これらのことから、構造生物学的に同定した UHRF1 と DPPA3 の相互作用が、細胞内における UHRF1 の機能阻害（クロマチン局在の阻害）に必須であることがわかりました。

今後の展開

本研究では、卵子形成に必要な UHRF1 と DPPA3 の相互作用メカニズムについて、溶液 NMR 法を用いた構造生物学的な観点から解明しました。この成果からは、正常な卵子形成や受精、胚発生に関する基礎生物学的な分子メカニズムの知見を得ることが期待できます。また、興味深いことに、UHRF1 PHD の pre-PHD と core-PHD の間の溝が DPPA3 との相互作用に使われていることが明らかになりました。この溝は UHRF1 PHD に結合する他の因子(ヒストン H3 や PAF15) との結合には使われていません。従って、UHRF1 PHD の溝に結合する化合物があれば、DPPA3 との結合のみを特異的に阻害できる可能性があります。近年、肝細胞癌で高発現した DPPA3 が UHRF1 の局在の異常を引き起こすことが報告されています。今後は、UHRF1 PHD の溝を標的にした化合物を探索し、肝細胞癌の薬剤の基盤となる研究への展開が期待できます。

研究費

本研究は、JSPS 科研費 新学術領域「多様かつ堅牢な細胞形質を支える非ゲノム情報複製機構(19H05741)」(JSPS 科研費: 18H02392, 19H05294, 19H05285, 21H00272)をはじめ、JST さきがけ、武田科学振興財団(1871140003)、横浜市立大学(学長裁量事業) 戦略的研究推進事業などの助成を受けて行われました。

論文情報

タイトル: Structural basis for the unique multifaceted interaction of DPPA3 with the UHRF1 PHD finger

著者: Keiichi Hata[#], Naohiro Kobayashi[#], Keita Sugimura, Weihua Qin, Deis Haxholli, Yoshie Chiba, Sae Yoshimi, Gosuke Hayashi, Hiroki Onoda, Takahisa Ikegami, Christopher B. Mulholland, Atsuya Nishiyama, Makoto Nakanishi, Heinrich Leonhardt, Tsuyoshi Konuma*, Kyohei Arita*

[#]: equal contribution in this work, *: co-corresponding authors.

掲載雑誌: Nucleic Acids Research

DOI: 10.1093/nar/gkac108

用語説明

*1 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 への結合や、9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 への結合、ヒストン H3 や複製因子 PAF15 のユビキチン化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。がん細胞では過剰発現しており、異常な細胞増殖に関与する。

*2 DPPA3 :

母親由来の遺伝子から発現する母性因子であり、卵子形成に重要な働きをする。卵子形成の過程で UHRF1 に結合して、クロマチン局在の抑制と異常な DNA メチル化を防ぐ働きをする。

*3 溶液 NMR 法 :

核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 法は、強い磁場中に置かれた原子核から発せられる信号 (NMR 信号) を観測し、分子の構造を解析する手法。本研究では溶液中に存在するタンパク質分子を研究対象としていたため、溶液 NMR 装置を用いた。

*4 クロマチン :

真核生物の細胞核内では、DNA はヒストンタンパク質に巻き付いてヌクレオソーム構造を形成する。ヌクレオソームがさらに集まった構造体をクロマチンと呼ぶ。

*5 天然変性タンパク質 :

特定の立体構造を形成しないタンパク質の事を天然変性タンパク質と呼び、結合相手の形に合わせて自身の構造を変化させて結合する。DPPA3 は UHRF1 PHD に結合する際に α -ヘリックス構造を誘起する。

*6 ヒストン H3 :

ヌクレオソームの構成タンパク質。アミノ末端の ART(アラニン-アルギニン-スレオニン)のアミノ酸で UHRF1 PHD に結合し、UHRF1 のクロマチンへの局在に寄与する。

*7 PAF15 :

DNA ポリメラーゼを複製鎖に留める役割をする PCNA に結合する DNA 複製因子。アミノ末端の VRT (バリン-アルギニン-スレオニン) のアミノ酸で UHRF1 PHD に結合する。

*8 α ヘリックス :

タンパク質中の局所的な構造体で、左巻きのらせん状の構造を形成している領域。