

PCNA と Dnmt1 の相互作用の解析

飯田 哲生

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座

(加藤 順也 教授)

平成17年1月6日提出

目次

第1章 序論

第2章 PCNA と Dnmt1 の結合の特異性と PCNA 上の Dnmt1 の相互作用領域の解析

2-1 序

2-2 材料と方法

2-3 結果

2-4 考察

第3章 DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 の結合性とその活性への影響

3-1 序

3-2 材料と方法

3-3 結果

3-4 考察

第4章 PCNA 上での PCNA 結合蛋白質の結合の競合

4-1 序

4-2 材料と方法

4-3 結果

4-4 考察

第5章 総合考察

謝辞

参考文献

資料

「PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA.」Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T. *Genes Cells*. 2002 Oct;7(10):997-1007.

第1章

序論

増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, 以下PCNA)は自己免疫疾患の抗原蛋白質として見出され、S期細胞の核内に特異的に凝集することが知られていた。1987年、SV40 DNAのin vitro複製反応の解析で必須の複製因子であることが示された (Prelich et al.,1987)。この蛋白質は29kDのサブユニットからなる3量体で、リング状の構造をとる (Krishna et al.,1994)。この蛋白質はDNAを包み込む形で結合し、さらに自由にその上を滑ることから同様の構造と機能を持つDNAポリメラーゼのサブユニットとともにDNAスライディングクランプと呼ばれる (Kuriyan and O'Donnell.,1993)。DNA鎖伸長反応の際には、もう一つの複製因子RFCがPCNAのローダーとして働き (Tsurimoto and Stillman.,1989)、PCNAと複合体を形成後、ATP結合と加水分解に伴ってそのリング構造に切れ目を入れてDNAにローディングする (Shiomi et al.,2000, Bowman et al.,2004)。さらに、DNA上にローディングされたPCNAとpolymerase (以下pol)が相互作用し、長いDNA鎖の合成が行われる (図1-1)。

この本来の結合パートナーに加え、PCNAには細胞周期制御因子CDK/cyclin (Xiong et al.,1992, Matsuoka et al.,1994)、細胞周期制御因子CDK/cyclinの阻害因子p21 (Waga et al.,1994, Gulbis et al.,1996, Oku et al.,1998)、DNA修復関連因子 (Smith et al.,1994, Umar et al.,1996, Gary et al.,1997)、DNA損傷乗り越えポリメラーゼ (Haracska et al.,2001a, Haracska et al.,2001b, Haracska et al.,2002)などが相互作用する。このことからPCNAは細胞周期の制御、DNA修復にも関わっていると考えられている。さらに複製後、ヌクレオソームを集合させる因子CAF1 (chromatin assembly factor1)、染色体接着に関与する因子Chl12 (Shiomi et al.,2004)およびDNAのメチル化を担うDNA methyltransferase 1 (以下Dnmt1)とも相互作用することから、PCNAは新生DNAの修飾、ヌクレオソームの再編および染色体接着にも機能していることが示唆された。私は複製後のPCNAの役割、特にPCNAとDnmt1の相互作用に着目した (表1-2)。

脊椎動物のゲノムでは、CpG配列のシトシンの約80%がメチル化されており、正確に次世代に伝えられる (Stein et al.,1982, Wolffe.,1994)。このメチル化は遺伝子発現の制御 (Nan et al.,1997)、X染色体の不活化 (Sado et al.,2000)、ゲノムのインプリンティング (Li et al.,1993)など、染色体レベルのゲノム転写の活性領域および不活性領域の構築に深く関与する。さらにこのDNAメチル化は発生、分化 (Li et al.,1992)、細胞のガン化 (Baylin et al.,1991, Jones.,1996, Lengauer et al.,1997)にも深く関与していると考えられる。

原核生物の大腸菌ではDamやDcmと呼ばれる酵素が新生DNA鎖のアデニンやシトシンのメチル化を行うのに対し (Marinus and Morris.,1973, Palmer and Marinus.,1994)、脊椎動物ゲノムのメチル化を行う酵素、DNA methyltransferase (Dnmt)は、現在Dnmt1

(Bestor et al.,1988, Yen et al.,1992)、Dnmt2 (Yoder et al.,1998)、Dnmt3A、Dnmt3B (Okano et al.,1998)、Dnmt3L (Aapola et al.,2000)の5つのタイプが発見されている (表1-3)。

Dnmt2は細菌型シトシンメチルトランスフェラーゼと相同のモチーフを持つ分子量47kDの蛋白質である。このヒト型はCpG配列を (Hermann et al.,2003)、またショウジョウバエで見つかりその胚で特異的に発現するDnmt2様蛋白質は、CpA配列とCpT配列を (Kunert et al.,2003)をメチル化すると言われているが、いずれもin vitroで見い出された弱い活性で生理的な機能については未知である。Dnmt3A、Dnmt3Bは分子量約100kDの蛋白質で、in vitroで非メチル化またはヘミメチル化されたCpG配列を区別しないでメチル化することからde novo型の酵素であることが知られている (Gowher et al.,2001, Aoki et al.,2001)。これらはマウス発生段階の新規のメチル化に参与し、またこれらの遺伝子を欠失したES細胞では外来のレトロウィルスをメチル化できないこと (Okano et al.,1999)、Dnmt3B遺伝子は脱メチルによりセントロメアの脱凝集を伴うICF症候群の原因遺伝子であること (Hansen et al.,1999)などから、in vivoでもDNAメチル化パターンを作出することが知られている。Dnmt3LはDnmt3AとDnmt3Bのファミリー蛋白質で、その触媒活性に関わる配列は保存されておらずメチル化活性は持たないが、Dnmt3AとDnmt3BのN末領域に共通して存在するCysに富む領域はお互いに保存されている。Dnmt3Lはゲノムインプリンティングが起こる生殖細胞で高い発現を示し、その遺伝子を欠失したマウスの卵から発生した胚では卵母細胞に付加されるはずのインプリント遺伝子のメチル化が消失していることからインプリンティング遺伝子のメチル化制御に深く関わっている (Bourc'his et al.,2001)。

これに対してDnmt1はin vitroではヘミメチルDNA特異的に働き (Bestor.,1992, Araujo et al.,2001)、複製時のDNAのメチル化パターンの保存に参与する (Leonhardt et al.,1992)ことから維持型のDNA methyltransferaseとも呼ばれている。Dnmt1はC末端側にDNAのメチル化活性ドメインを持つ分子量約180kDの蛋白質で、N末端側領域にはDnmt1 associated protein 1 (DMAP1)結合領域 (Rountree et al.,2000)、核移行シグナル、PCNA結合領域 (Chuang et al.,1997)、複製点局在化配列 (Leonhardt et al.,1992)、Zn結合配列 (Chuang et al.,1996)、Polybromo-1蛋白質のホモログ配列 (Nicolas and Goodwin.,1996)、ヘミメチル化DNA認識領域 (Araujo et al.,2001)、Retinoblastoma (RB)結合領域 (Pradhan and Kim.,2002)が存在し、C末端側のメチル化活性領域を制御すると考えられている (図1-4)。in vivoでもDnmt1遺伝子ノックアウトマウスでは着床後8.5日で致死となることからDnmt1によるゲノムDNAの維持は生理的に重要である (Li et al.,1992)。

近年、ある種のヒトがん細胞ではDNAのメチル化の維持にはDnmt1だけでなくDnmt3Bが必要であること (Rhee et al.,2002)、またES細胞でもDnmt1に加えてDnmt3AとDnmt3Bが必要であることも報告されており (Chen et al.,2003)、Dnmt1によるDNAの半保存的なメチル化に対してDnmt3AとDnmt3Bが補助的に働くことが示唆されている。しかしながら、それらの詳細な分子メカニズムに関しては依然として不明のまま

である。

1997年Chuang らはDnmt1は多くのPCNA結合蛋白質で保有される典型的なPCNA結合モチーフ-Q--L/I--FF--を保有しており (図1-4)複製因子PCNAと直接相互作用すること、またこの相互作用がp21の合成ペプチド断片により阻害されることを報告した。このことから細胞周期において細胞内のp21の存在量依存的にPCNA-Dnmt1間の相互作用が制御され、その結果複製時のゲノムのメチル化の度合いが制御される可能性を示唆した (Baylin.,1997)。しかしながら、このモデルの基になるPCNA-Dnmt1間の相互作用がDnmt1のメチル化活性の促進するという直接の証拠は示すことができなかった。したがってPCNA-Dnmt1間の相互作用が意味する生理的な機能は依然として不明のままである。本研究ではChuangの報告では見出せなかったPCNAによるDnmt1活性の制御メカニズムを詳細に解析することを目的とした。

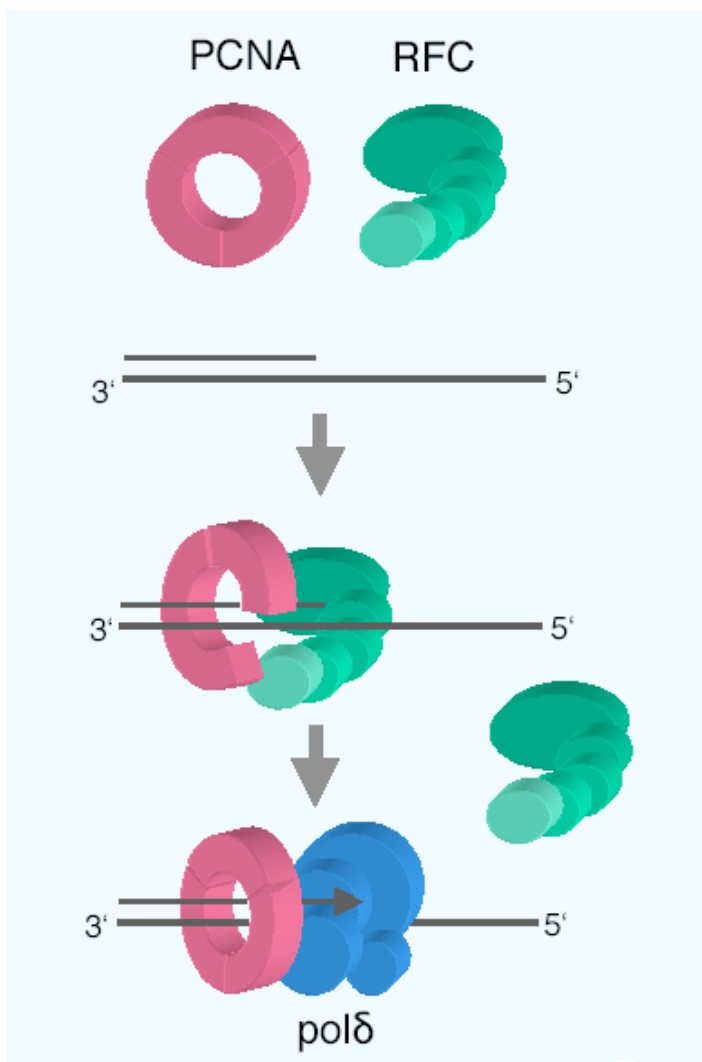


図 1-1 DNA 複製時における RFC、PCNA および pol の機能の関係

クランプローダーである RFC は PCNA と複合体を形成した後、DNA の 3' 末端を指標として ATP 依存的に PCNA を DNA 上へローディングする。pol は PCNA との結合を介して PCNA 依存的に長い DNA 鎖の合成を行う。

PCNA結合因子	機能
DNAポリメラーゼ δ DNAポリメラーゼ ϵ	DNA合成
RFC	クランプローダー
DNAリガーゼ I	DNA結合
FEN1	岡崎フラグメントの プロセッシング
MSH3、MSH6 UNG2	DNA修復
p21	細胞周期制御
Dnmt 1	DNAメチル化
CAF-1	クロマチン集合

表 1-2 PCNA 結合蛋白質とその機能

複製因子 PCNA は同じ複製因子である RFC、pol と結合する以外に、DNA 修復関連因子、細胞周期制御に関わる因子、新生 DNA の修飾およびヌクレオソームの再編に関わる因子などとも結合し、機能していると考えられている。

Mammalian DNA methyltransferases

機能






	Dnmt1	複製DNAのメチル化保持
	Dnmt2	機能未知
	Dnmt3A	発生時における新規のメチル化
	Dnmt3B	
	Dnmt3L	インプリント遺伝子のメチル化に関与

表 1-3 哺乳動物の methyltransferase の構造とその機能

哺乳動物では図で示すように5つのタイプの methyltransferase が発見されている。図中に methyl transferase 間で保存されている Cys-rich 領域および触媒モチーフを示した。Dnmt2 はメチル化触媒モチーフを保有するにも関わらず、そのメチル化活性はほとんど検出されず機能未知である。逆に Dnmt13L は触媒モチーフは保有しないが、インプリント遺伝子のメチル化に関与する。Dnmt3A、Dnmt3B が発生時における新規のメチル化を行うのに対し、Dnmt1 は pol によって複製された DNA のメチル化の保持に関与するので維持型のメチルトランスフェラーゼとも呼ばれている。

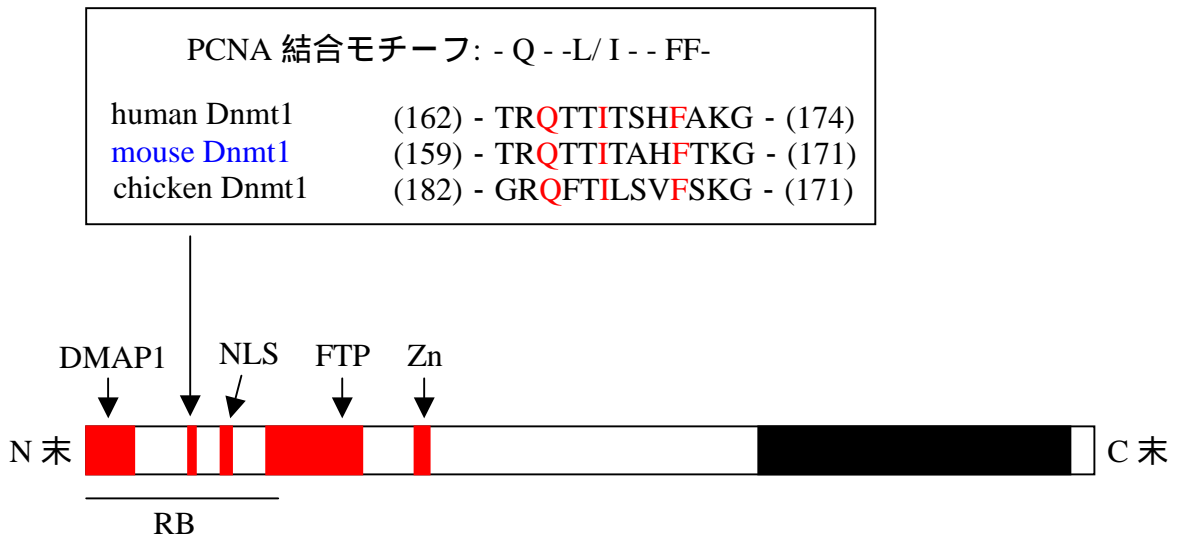


図 1-4 Dnmt1 の機能領域と PCNA 結合モチーフ

代表的な Dnmt1 の機能領域 (赤塗部または下線部)およびメチル化活性領域 (黒塗部)を示す。また Chuang らによって報告されている human、mouse、chicken Dnmt1 の PCNA 結合モチーフを示した。

Dnmt1 associated protein1 (DMAP1)結合領域 (DMAP1: アミノ酸番号 1-126)、PCNA 結合モチーフ、核移行シグナル (NLS: アミノ酸番号 194-213)、複製点局在配列 (FTP: アミノ酸番号 320-567)、Zinc finger 様モチーフ (Zn: アミノ酸番号 653-691)、Retinoblastoma (RB)結合領域 (RB: アミノ酸番号 1-336)は Dnmt1 の N 末端側に存在し、C 末端側の触媒ドメインを制御すると考えられている。

第 2 章

PCNA と Dnmt1 の結合の特異性と PCNA 上の Dnmt1 の相互作用領域の解析

2-1 序

PCNA が pol の補助因子としてだけでなく、複製後も CAF-1 や Dnmt1 の DNA 修飾に参与する因子と相互作用し機能していることが示唆されている。例えば、CAF1 依存的なクロマチン凝集は DNA に結合した PCNA が起点となり起こることが報告されている (Shibahara and Stillman.,1999)。しかし PCNA と Dnmt1 は相互作用するものの、今だその活性制御のメカニズムは明らかにされていない。これまでにいくつかの PCNA 結合蛋白質の PCNA 上での相互作用領域が同定されている。例えば pol、RFC、p21、CAF1 との結合には、PCNA のリング上の C 末端が位置する面 (以下 C 面と呼ぶ) に露出した共通のループが必要とされる。このことは PCNA がこれら蛋白質が機能する足場となっておりと同時に、お互いが PCNA への結合を競合し、活性を調節し合う機構も考えられる。実際、in vitro において PCNA 依存的な pol の DNA 合成活性および RFC の ATPase 活性の促進は p21 添加により阻害される (Waga et al.,1994, Oku et al.,1998)。このように PCNA と Dnmt1 の結合の特異性を解析することは、PCNA と Dnmt1 の活性調節機能を推測する上で有力な情報になる。この章では PCNA と Dnmt1 の結合の特異性、特に PCNA 上での Dnmt1 の相互作用領域を明らかにすることを目的とした。

2-2 材料と方法

Dnmt1 発現プラスミド pDn1-159、pDn51-255W、pDn51-255M および、バキュロウイルス bHis-DnFL の作製

野生型マウス Dnmt1 の N 末端領域をコードする cDNA 2 種類を大阪大学蛋白質研究所田嶋正二博士により供与された (Takagi, H et al.,1995)。その一つは 159 番目から 171 番目の PCNA 結合モチーフが正常なもので、もう一つはその領域の 167 番目のヒスチジンがアルギニンに変わった変異型である。これらを用いて以下の Dnmt1 断片を発現するプラスミドおよびバキュロウイルスを得た。

pDn1-159 (野生型 Dnmt1 アミノ酸番号 1-159 断片発現プラスミド)

pDn51-255W (野生型 Dnmt1 アミノ酸番号 51-255 発現プラスミド)

pDn51-255M (変異型 Dnmt1 アミノ酸番号 51-255 発現プラスミド)

bHis-DnFL (完全長 Dnmt1 発現バキュロウイルス)と表記する。

pDn51-255W (野生型)および pDn51-255M (PCNA 結合配列の変異型)はマウス Dnmt1 の cDNA 153~765 塩基対領域を EcoR -BamH 部位で切り出し、GST 融合発現ベクター-pGEX4T-1 (Amersham Biosciences)の Eco R -Xho 部位に挿入して得た。この際、Dnmt1 の cDNA 側の BamH 切断部位および、PGEX4T-1 の Xho 切断部位は T4 DNA polymerase (TAKARA)で平滑末端化した。

また pDn1-159 は 2 種のプライマー

5'-CCCGGATCCATGCCAGCGCGAACAGCTCC-3' と 5'-CCTAGGTCTGTCTCTTCGTT-3' (Sawaday)を用いた PCR によりマウス Dnmt1 cDNA の 1~477 塩基対領域を増幅した。BamH -Sal で切断後、pGEX4T-1 の BamH -Sal 部位に挿入して得た。

bHis-DnFL は、完全長マウス Dnmt1 の cDNA を pFastBacHTb (Invitrogen)の BamH と平滑末端化された Xho 部位間に挿入したプラスミドをもとに作成したものを大阪大学蛋白質研究所田嶋正二博士より供与された。

Dn1-159、Dn51-255W、Dn51-255M および His-DnFL の調製

本研究には以下の 4 種類の Dnmt1 の発現蛋白質をそれぞれ調製し用いた。

Dn1-159 (野生型 GST 融合 Dnmt1 アミノ酸番号 1-159)

Dn51-255W (野生型 GST 融合 Dnmt1 アミノ酸番号 51-255)

Dn51-255M (変異型 GST 融合 Dnmt1 アミノ酸番号 51-255)

His-DnFL (野生型 His 融合完全長 Dnmt1)と表記する。

まず Dn1-159、Dn51-255W および Dn51-255M 蛋白質の調製に関して、pDn1-159、pDn51-255W または pDn51-255M を保持した大腸菌 BL21 それぞれを、2L の LB (Luria-Bertani)培地 (polypeptone 20g、yeast extract 10g、NaCl 20g)に添加した。30 で OD (600)=0.4 まで菌体を培養し、IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyraoside) 0.4mg を添加した。この後さらに 10 時間培養し Dn1-159、Dn51-255W または Dn51-255M の発現を誘導した。菌体は遠心 (6000rpm、7 分)で回収した後、40ml の lysis buffer (25mM Tris-HCl pH 7.9、0.1% Nonidet P-40、1mM EDTA、0.1M NaCl)に懸濁し、超音波により破碎、さらに超遠心 (33000rpm、30 分)して上清を回収して蛋白質抽出液を得た。

得られた蛋白質抽出液 (Dn1-159: 総蛋白質量 1050mg、Dn51-255W: 総蛋白質量 550mg、Dn51-255M: 総蛋白質量 630mg)は 4 下、30ml の lysis buffer で平衡化した 3ml の GSH セファロース 4B (Amersham Biosciences)に添加した。カラムを 30ml の lysis buffer で洗浄した後、いったん室温状態に戻して 30ml の 5mM ATP を含んだ lysis buffer で洗浄した。この操作は GSH セファロースにクロスコンタクトする大腸菌由来のヒートショック蛋白質を除去する目的で行った。再度カラムを 4 下に戻し、さらに 30ml の 3M NaCl を含んだ lysis buffer で洗浄した後、10mM glutathione を含んだ lysis

PCNA および flag-PCNA の調製

ヒト PCNA とヒト-出芽酵母キメラ PCNA、ヒト PCNA C 未変異体、単一アミノ酸置換 PCNA 変異体は九州大学染色体機能学研究室釣本グループのストックを使用した。変異 PCNA 発現プラスミドは Fukuda らによって (Fukuda et al.,1995)、ヒト-出芽酵母キメラ PCNA 発現プラスミドは Ikeda らによって (Ikeda 修論)作製されたものを使用した。

flag-ヒト、マウス、出芽酵母 PCNA、flag-ヒト-出芽酵母キメラ PCNA、flag- 254 は、発現プラスミドを保有した大腸菌 (BL21)を 100ml の LB 中 30 で培養し、OD600=0.4 となった所で IPTG 20ug 添加により 10 時間蛋白質を発現誘導した。菌体を遠心 (6000rpm、7 分)で回収した後、3ml の 125mM Tris-HCl pH 7.9、0.01% Nonidet P-40、1mM EDTA、25mM NaCl に懸濁した。超音波で菌体を破碎した後、超遠心 (33000rpm、30 分)で上清を分離して蛋白質抽出液を得た。

これらそれぞれ総蛋白質量 30mg 程度の蛋白質抽出液は 4 下、bufferA (25mM Tris-HCl pH 7.9、1mM EDTA、10% glycerol、0.01% NP40、300mM NaCl)で平衡化した Q sepharose (Amersham Biosciences)に添加した。同じ buffer でカラムを洗浄した後、bufferA (600mM NaCl)で 200ul ずつ溶出した。flag-PCNA の存在する分画を bufferA で平衡化した Sephacryl S-300 HR (Amersham Biosciences)に添加し 300ul ずつ溶出した。flag-PCNA の存在する分画をそれぞれ最終産物 250ug/ml (275ul)程度とした。

蛋白質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と染色

試料に等量の 2 × SDS gel loading buffer (100mM Tris-HCl pH 6.8、200mM dithiothreitol、4% SDS、0.2% bromophenol blue、20% glycerol)を加え、95 で 5 分加熱後 12.5% ポリアクリルアミドゲルあるいは 4-20% ビスアクリルアミドゲル (テフコ)を用いて 40mM、55 分間の条件で電気泳動した (Laemmli.,1970)。泳動後ゲルを fixer (50% メタノール、10% 酢酸)で固定した後、ラピットステイン CBB staining kit (nacalai tesque)、または 2D-silver stain daiichi kit (Daiichi Pure Chemicals)で染色した。

ウェスタンブロットティング

SDS-PAGE の泳動後のゲル中の蛋白質は、転写バッファー (0.1M Tris-HCl、0.2M glycine) を用いたセミドライ転写装置により 30 分間、4mA/cm² の条件で Hybond-P 膜 (PVDF 膜: Amersham Biosciences) に転写した。1% ドライミルク (雪印) を含む TBS (30mM Tris-HCl pH 7.4、0.2M NaCl) で膜をブロッキング後、1 次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。次に、同じ buffer で膜を 3 回洗浄後、HRP 標識された抗ウサギまたはマウス IgG 抗体 (Bio-Rad) を添加し、室温でさらに一時間インキュベートした。TBS による 3 回の洗浄後、抗体が結合した蛋白質は化学発光を利用した ECL 検出 kit (Amersham Biosciences) を用いて X 線フィルム (Fuji film) に露光し可視化した。

蛋白質定量

蛋白質はブラッドフォード法を適用した protein assay Kit (Bio-Rad)を用いて、付属の BSA をスタンダードとして検量線を作成し定量した。またゲル上で染色された蛋白質は、ゲル画像上のバンド強度を KODAK image analysis system Ver.3.5 (Eastman Kodak Company)ソフトウェアにより測定し、スタンダード BSA のバンド強度と比較することにより定量した。

Biacore 2000 を用いた Dnmt1 と PCNA の結合性の解析 (図 2-1)

SPR (表面プラズモン共鳴)による実験はランニングバッファとして HBS (10mM HEPES-NaOH pH 7.4、3.4mM EDTA、0.05% Tween 20、150mM NaCl、50ug/ml BSA)を使用し、Biacore 2000 (Biacore AB)により行った。flag-ヒト PCNA (1×10^3 resonance units)は抗 flag モノクローナル抗体 (1.0×10^4 resonance units、Sigma)との結合を介して予め CM5 センサーチップ (Biacore AB)に固定化した。反応速度的な実験は図 2-1 で示した濃度の Dnmt1 断片 (His-DnFL, Dn51-255W, Dn51-255M, Dn1-159) 25ul を 25 、 5ul/min の条件でインジェクトした。Dnmt1 断片注入時のセンサーグラムはヒト PCNA が結合したフローセルとブランクのフローセルのシグナルの差として求めた。解離定数 (K_D)は BIA_{EVALUATION} 3.0 software (Biacore AB)の steady state affinity モードで算出した。

pull down assay による PCNA と Dnmt1 の結合性の解析(図 2-2、図 2-5、図 2-7、図 2-9)

Dnmt1 断片に融合した GST タグを利用した解析では、150ng の GST 融合 Dnmt1 断片 (図 2-2 A-1, A-2: Dn51-255W, Dn51-255M, Dn1-159、 図 2-5 B, 図 2-7, 図 2-9: Dn51-255W)、20ul ベッドボリユームの GSH sepharose 4B (Amersham Biosciences)を 50ul の bufferA (Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA、10% glycerol、0.01% NP40、100mM NaCl)中、4 で 1 時間インキュベートして結合させた。それに対して 500ng の PCNA (図 2-2 A-1: ヒト PCNA、 図 2-2 A-2: 出芽酵母 PCNA、 図 2-5 B: ヒト-出芽酵母キメラ PCNA、 図 2-7: ヒト PCNA C 未変異体、 図 2-9 ヒト PCNA 単一アミノ酸置換変異体)を添加し、4 でさらに 3 時間インキュベートした。反応後のビーズは 100ul の bufferA で 3 回洗浄し、Dnmt1 断片に結合した PCNA を 20ul の $1 \times$ SDS gel loading buffer で溶出した。そのうちの 10ul は電気泳動後、抗ヒト PCNA モノクローナル抗体 (5A10; MBL)または抗出芽酵母 PCNA ウサギ抗血清 (大阪大学 A.Sugino 博士より供与)によるウエスタンブロッティングまたは銀染色法で検出した。

PCNA に融合した flag タグを利用した解析では、1.8ug の抗 flag モノクローナル抗体 (M2: Sigma)、1ug の flag-PCNA (図 2-2 B-1: flag-ヒト PCNA、 図 2-2 B-2: flag-ヒト、マウス、出芽酵母 PCNA、 図 2-5 A: flag-ヒト-出芽酵母キメラ PCNA)および 10ul ベッドボリユームの proteinA sepharose (Amersham Biosciences)を 50ul の bufferA (pH 8.0)中、4 で 30 分間インキュベートした。反応後のビーズを 100ul の同じ buffer で 4 回洗浄

すると、抗 flag 抗体には約 100ng の flag-PCNA が捕捉された。ここに図 2-2 B、図 2-5 A で示した Dnmt1 断片を添加し、4 でさらに 3 時間インキュベートした。反応後のビーズは 100ul の同じ buffer で 4 回洗浄し、flag-PCNA に結合した Dnmt1 断片を 20ul の 1×SDS gel loading buffer で溶出した。そのうちの 10ul は電気泳動後、抗 His モノクローナル抗体 (Qiagen) によるウエスタンブロットティングまたは銀染色法で検出した。

2-3 結果

ヒト PCNA とマウス Dnmt1 の結合の特異性

Chuang らはヒトまたはマウス Dnmt1 上での PCNA の相互作用に必要な領域はアミノ酸番号 159-171 であると報告した (Chuang et al.,1997)。PCNA と Dnmt1 の相互作用について、まずこれらの結合の特異性を調べるために、Biacore2000 を用いた SPR (表面プラズモン共鳴) の手法によりヒト PCNA とマウス His-DnFL、Dn51-255W、Dn51-255M および Dn1-159 の結合性を定量比較した (図 2-1)。

Biacore2000 のセンサーチップに抗体を介して 1×10^3 resonance units のヒト PCNA を固定化し、それぞれ図 2-1 で示した濃度のマウス由来の Dnmt1 断片を注入して結合性をみた結果、マウス Dn51-255W を注入した場合はその濃度依存的にセンサーグラムの値が上昇し、これとヒト PCNA の結合定数は K_D 値 $= 3.3 \times 10^{-7} M$ と比較的安定な結合を示す値を得た (図 2-1 B)。これに対して PCNA 結合領域に変異があるマウス Dn51-255M を注入した場合は、より高濃度の試料を注入してもわずかなセンサーグラムの上昇しかみられず K_D 値 $= 3.8 \times 10^{-5} M$ (図 2-1 C) と弱い結合しかしないことを示した。さらに PCNA 結合領域を持たないマウス Dn1-159 のセンサーグラムはバックグラウンドレベルでありヒト PCNA との結合を示さなかった (図 2-1 D)。さらに、マウス His-DnFL は PCNA 結合領域を完全に含むにもかかわらず K_D 値 $= 1.3 \times 10^{-5} M$ (図 2-1 A) と弱い結合性しか示さなかった。以上よりマウス Dn51-255W はヒト PCNA と特異的に結合し、その結合には PCNA 結合部位の一定のアミノ酸配列が必要であった。しかし、マウス His-DnFL は Dn51-255W と同じ PCNA 結合モチーフを保有するにもかかわらずヒト PCNA との直接の結合が弱いことが解った。

この結果を GST タグによる pull down により検証した (図 2-2 A-1)。それぞれ 20ul の GSH ビーズあたり 150ng の Dn51-255W、Dn51-255M、Dn1-159 およびコントロール GST を結合させて、500ng のヒト PCNA を混合して結合性をみた結果、ヒト PCNA は正常な PCNA 結合モチーフを保有するマウス Dn51-255W と結合するが、コントロール GST、マウス Dn51-255M および Dn1-159 との結合は検出限界以下だった。

さらに flag タグによる免疫沈降によって、flag-ヒト PCNA に対するマウス His-DnFL、Dn51-255W、Dn51-255M の結合性を比較した (図 2-2 B-1)。10ul のプロテイン A ビーズに抗体を介して約 100ng のヒト PCNA を結合させて、それぞれ 3.3pmol のこれら Dnmt1 断片を混合して結合性をみた結果、マウス Dn51-255W は添加量の 9.1% がヒト PCNA と結合した。しかし、マウス His-DnFL と Dn51-255M は PCNA 依存的に結合するものの、モル換算でそれぞれ Dn51-255W の 1/6 (添加量の 1.5%) と 1/11 (添加量の 0.8%) の結合性を示した。これらの結合性の傾向は SPR の結合定数で示される結合性の違いと一致した。

PCNA と Dnmt1 の結合の種特異性

PCNA と Dnmt1 の結合の種特異性を調べるためにヒト、マウス、出芽酵母 PCNA とマウス Dnmt1 断片の結合性を調べた (図 2-2 A-2、図 2-2 B-2)。

まず GST タグによる pull down によって、マウス Dnmt1 由来の Dn51-255W、Dn51-255M、Dn1-159 およびコントロール GST への出芽酵母 PCNA の結合性を比較した。それぞれ 20ul の GSH ビーズあたり 150ng のこれら GST 融合マウス Dnmt1 断片を結合させ、500ng の出芽酵母 PCNA を混合して結合性をみた結果、マウス由来の Dn51-255W、Dn51-255M、Dn1-159 に対する出芽酵母 PCNA の結合はいずれも検出限以下だった (図 2-2 A-2)。

また flag タグによる免疫沈降を用いて、flag-ヒト PCNA、flag-マウス PCNA、flag-出芽酵母 PCNA に対するマウス由来の His-DnFL または Dn51-255W の結合性を比較した。10ul のプロテイン A ビーズに抗体を介して約 100ng の flag-ヒト、マウスまたは出芽酵母 PCNA を結合させて、それぞれに対して 400ng のマウス His-DnFL または 100ng の Dn51-255W を混合して結合性をみた。その結果、flag-出芽酵母 PCNA に対するマウス由来の His-DnFL または Dn51-255W の結合は非常に弱いのにに対し、flag-マウス PCNA、flag-ヒト PCNA それぞれに対するマウス His-DnFL または Dn51-255W の結合性はほぼ同程度だった (図 2-2 B-2)。以上より、マウス由来の His-DnFL、Dn51-255W とともに出芽酵母 PCNA に対してはほとんど結合しないという特異性を持つにもかかわらず、ヒト PCNA とマウス PCNA に対しては種間を越えてほぼ同程度結合した。

ヒト-出芽酵母キメラ PCNA 変異体および PCNA C 末端変異体と Dnmt1 の結合性

PCNA 上で Dnmt1 が結合する領域を調べるためにマウス Dnmt1 由来の His-DnFL、Dn51-255W とヒト-出芽酵母キメラ PCNA 変異体 (図 2-3、図 2-4 A, B) および C 末欠失ヒト PCNA 変異体 254 (ヒト PCNA のアミノ酸番号 254-261 を欠失: 254 と表記する) との結合性を調べた (図 2-5)。

まず flag タグによる免疫沈降を用いて、flag-キメラ PCNA および flag- 254 に対するマウス His-DnFL の結合性を解析した。10ul のプロテイン A ビーズに抗体を介して約 100ng のキメラ PCNA または C 末欠失ヒト PCNA を結合させて、それぞれ 400ng のマウス His-DnFL を混合して結合性をみた。その結果、野生型ヒト PCNA とマウス His-DnFL の結合と比べて、変異型の region2 は 7%、ID loop は 1%、region6 は 22%、region7 は 19%、254 は 3% の結合量しか示さなかった (図 2-5 A)。その他の変異体に関しては野生型のヒト PCNA と比べて、結合が 66% 以上であった。

次に GST タグによる pull down によって、マウス Dn51-255W に対するキメラ PCNA および 254 の結合を解析した。それぞれ 20ul の GSH ビーズあたり 150ng のマウス Dn51-255W を結合させて、500ng のキメラ PCNA または C 末欠失ヒト PCNA を混合して結合性をみた。その結果、マウス Dn51-255W と野生型ヒト PCNA の結合と比べ

て region2 は 50%、ID loop は 26%、region6 は 43%、region7 は 59%の結合量を示し、254 は検出以下であった (図 2-5 B)。その他の変異体に関しては野生型のヒト PCNA と比べて、結合が 66%以上であった。この 2 種類の解析を比較すると、His-DnFL、Dn51-255W とともに野生型ヒト PCNA と比べて region2、ID loop、region6、region7、254 との結合性が 66%未満であった (図 2-5 C)。したがって、マウス His-DnFL および Dn51-255W いずれの場合もヒト PCNA との結合には PCNA のリング上の region2、ID loop、region6、region 7、C 末端側領域の 5 ケ所の領域が必要であることが示された。この中で region6 はこれまでに報告されている PCNA 結合蛋白質の結合に必要な領域としては表れておらず、Dnmt1 の結合に特異的であった (表 2-10、図 2-11)。

更に PCNA の C 末領域は報告されている大部分の PCNA 結合蛋白質の結合に必要な領域であることがこれまでに報告されているため、マウス Dn51-255W とヒト PCNA C 末領域の結合性を GST タグによる pull down によって詳細に調べた (図 2-7)。解析にはヒト PCNA の C 末領域の配列を中性アミノ酸アラニンに置換した変異体および、C 末からアミノ酸を削除した変異体を用い、その変異部位は表 2-6 に示した。それぞれ 20ul の GSH ビーズあたり 150ng のマウス Dn51-255W を結合させて、500ng のヒト PCNA C 末変異体を混合して結合性をみた。その結果、マウス Dn51-255W に対する野生型ヒト PCNA の結合量と比べて 254-261、255-261、257-261 は検出限界以下、K254AI255A は 30%、K254AI255AE256A は 23%、E256AD257AE258AE259A は 19% の結合量しか示さなかった。その他の変異体に関しては野生型のヒト PCNA と比べて、結合が 66%以上であった (図 2-7)。以上より、マウス Dn51-255W との結合にはヒト PCNA の C 末領域ループ上の一定のアミノ酸配列が必要であった。

アラニン置換 PCNA 変異体と Dnmt1 の結合性

PCNA の荷電型アミノ酸および PCNA の 3 量体保持に必要と考えられている領域の疎水性アミノ酸をアラニンに置換したヒト PCNA の変異体 (図 2-8)とマウス Dn51-255W の結合性を GST タグによる pull down によって調べた (図 2-9)。それぞれ 20ul の GSH ビーズあたり 150ng のマウス Dn51-255W を結合させて、500ng のアラニン置換ヒト PCNA 変異体を混合して結合性をみた。その結果、野生型ヒト PCNA の結合量と比べて、region2 の隣に位置するアミノ酸 D41A の結合が 50%、サブユニットの interface 領域にある I78A、I154A、I180A、L182A との結合がそれぞれ 58%、28%、58%、52%の結合量を示した (図 2-9 A)。D97A は一見結合性が低下しているように見えるが、このアミノ酸は用いた抗ヒト PCNA モノクローナル抗体 (5A10)のエピトープにあたりと考えられ、別途抗ヒト PCNA ポリクローナル抗体を用いて検出を行うとほとんど野生型と同じ結合性を示す結果を得た (図 2-9 B)。その他の変異体に関しては野生型の PCNA と比べて、結合が 66%以上であった。以上より、Dn51-255W との結合には PCNA 上の D41 が重要である。また I78、I154、I180、L182 は PCNA サブユニット間のインターフェイスにある疎水性アミノ酸で、いずれも 3 量体構造をとらな

いことが示されている (Ikeda 修論)。これらがいずれも Dnmt1 断片との結合性を低下させたことは、PCNA の 3 量体構造が Dnmt1 との結合に重要であることを意味する。この PCNA と Dnmt1 の結合に必要な領域を他の PCNA 結合蛋白質である RFC、pol および p21 (C 末断片)のものと比較し表 2-10 にまとめた。

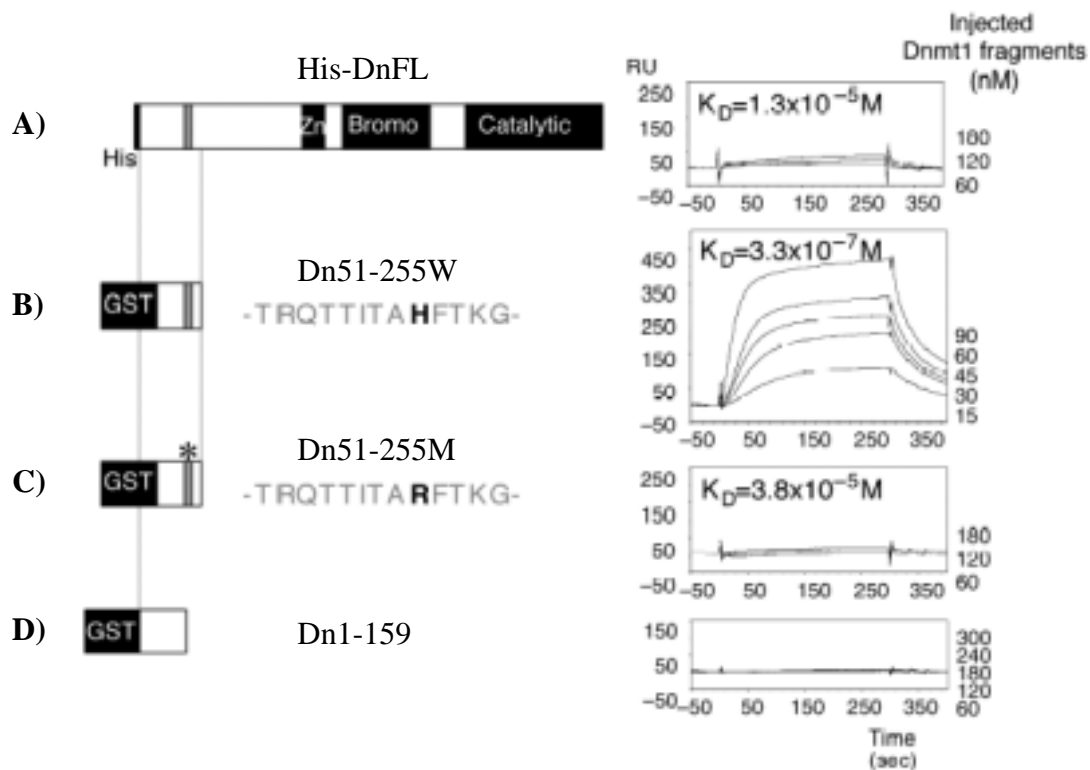
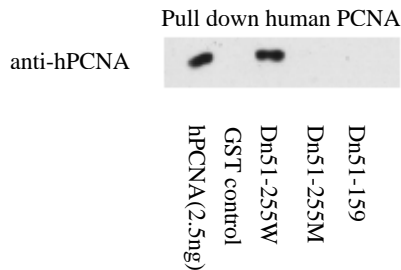
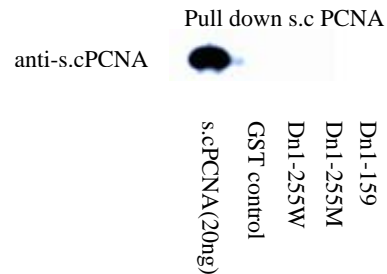
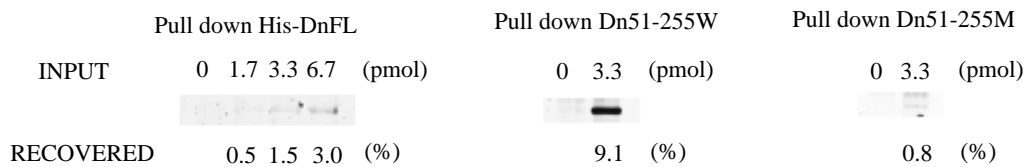


図 2-1 実験に使用したマウス Dnmt1 および Dnmt1 断片とそのセンサーグラム

PCNA 結合モチーフ（灰色部）を含む既に報告されている Dnmt1 の代表的なモチーフおよび、タグが付加された Dnmt1 断片を左のパネルに示した。A) His-DnFL : His タグが付加された完全長 Dnmt1。B) Dn51-255W : GST タグが付加された N 末端側の断片。このペプチドは図中に示したような野生型 PCNA 結合モチーフ(アミノ酸番号 159 Thr から 171 Gly)を含む Dnmt1 の 51 から 255 番目のアミノ酸配列を有する。C) Dn51-255M : GST タグが付加された N 末端側の断片。このペプチドは Dn51-255W と比べて、PCNA 結合モチーフ(*)の 167 番目の His が Arg(太字)に変異した以外は同じアミノ酸配列を有する。D) Dn1-159 : Dnmt1 の 1-159 番目のアミノ酸配列を有する N 末端側フラグメント。PCNA 結合モチーフの直前までの配列を持つ。

右のパネルはこれら Dnmt1 断片を PCNA が固定化されたセンサーチップにインジェクトして得られたセンサーグラム。インジェクトした Dnmt1 断片の濃度はセンサーグラムの右に示し、実験から計算された K_D 値はセンサーグラムの中に示した。

A-1)**A-2)****B-1)****B-2)****図 2-2 pull down assay による PCNA と Dnmt1 の相互作用の解析**

- A) GST-マウス Dnmt1 断片 150ng が結合したグルタチオンビーズに 500ng の PCNA を添加した際の、結合した PCNA 量。GST、Dn51-255W、Dn1-159 に対するヒト PCNA(hPCNA)(A-1)、出芽酵母 PCNA(s.cPCNA)(A-2)の結果。hPCNA は抗ヒト PCNA モノクローナル抗体、s.cPCNA は抗出芽酵母ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットングで検出した。比較として量のわかっている精製 PCNA を泳動した。
- B) flag 抗体ビーズに flag-PCNA 約 100ng を固定し、そこにマウス Dnmt1 断片を添加した際の、結合した Dnmt1 断片量。B-1. flag-hPCNA に対する His-DnFL、Dn51-255W、Dn51-255M の pull down assay の結果。上に反応系に添加した Dnmt1 断片量、下に添加した Dnmt1 に対する hPCNA への結合量の割合(%)を示した。B-2.反応系に 400ng の His-DnFL または 100ng の Dn51-255W を添加し、flag-ヒト、マウス、出芽酵母 PCNA100ng に結合したマウス Dnmt1 断片量を比較した。Dnmt1 断片はそれぞれ銀染色で検出した。

		βA_1	αA_1	βB_1	βC_1	βD_1	
Human		MPEARLVQGS	ILKKVLEALK	DLINACWDI	SSSGVNLQSM	DSSHVSLVQL	
Rice		MLELRLVQGS	LLKKVLEAIR	ELVTDANFDC	SGTGFSLQAM	DSSHVALVAL	
Drosophila		MPEARLQAT	ILKKILDALK	DLLEATFDC	SDSGIQLQAM	DNSHVSLVSL	
Yeast		MLEAKFEEAS	IFKRIIDGFK	DCVQLVNFQC	KEDGIIAQAV	DDSRVLLVSL	50
		βE_1	βF_1	αB_1	βG_1		
Human		TLRSEGFDTY	RCDRNLAGMV	NLTSMKILK	CAGNEDIITL	RAEDNADTLA	
Rice		LLRSEGFPHY	RCDRNLSMGM	NLNNMAKMLR	CAGNDEIITI	KADDGSHVTV	
Drosophila		TLRSEGFDFK	RCDRNLSMGM	NLGSMAKILK	CANNEDNVTM	KAQDNADTVT	
Yeast		EIGVEAFQEY	RCDHPVTLGM	DLTSLSKILR	CGNNTDTLTL	IADNTPDSII	100
		βH_1	βI_1		βA_2	αA_2	
Human		LVFEAPNQEK	VSDYEMKLM	LQVEQLGIPE	QEYSCVVKMP	SSEFARICRD	
Rice		FMFESPNQDK	IADFEMKLM	LDSEHLGIPD	SEYQAIVRMP	SSEFSRICKD	
Drosophila		IMFESANQEK	VSDYEMKLMN	LDQEHGLIPE	TDFSCVVRMP	AMEFARICRD	
Yeast		LLFEDTKKLR	IAEYSLKLM	LDADFLKIEE	LQYDSTLSLP	SSEFSKIVRD	150
		βB_2	βC_2	βD_2		βE_2	
Human		LSHIGDAVVI	SCAKDGVKFS	ASGELGNGNI	KLSQTSNVDK	EEEAVTIEMN	
Rice		LSSIGDTVII	SVTKEGVKFS	TAGDIGTANI	VCRQNKTVDK	PEDATIEMQ	
Drosophila		LAQFSESVVI	CCTKEGVKFS	ASGDVGTANI	KLAQTGSVEK	EEEAVIEMQ	
Yeast		LSQLSDSINI	MITKETIKFV	ADGDIGSGSV	IIKPFVDMKH	PETSIKLEMD	200
		βF_2	αB_2	βG_2	βH_2	βI_2	
Human		EPVQLTFALR	YLNFFTRATP	LSSTVTLSMS	ADVPLVVEYK	IADMGHLYK	
Rice		EPVSLTFALR	YMNSFTRASP	LSEQVTISLS	SELPLVVEYK	IAEMGYIRFY	
Drosophila		EPVTLTFACR	YLNFTTRATP	LSTQVQLSMC	ADVPLVVEYA	IKDLGHIRYY	
Yeast		QFVDLTFGAR	YLLDIINGSS	LSDRVGIKLS	SEAPALFQFD	LKS-GFLQFF	250
Human		LAPKIEDEEG	S				
Rice		LAPKIEDEE	MKS				
Drosophila		LAPKIEENET					
Yeast		LAPKFNDEE					

図 2-3 ヒト、米、ショウジョウバエ、出芽酵母 PCNA のアミノ酸配列

本研究で使用したヒト、出芽酵母 PCNA のアミノ酸配列を Fukuda et al.,1995 より引用した。PCNA の種間で保存されている塩基性アミノ酸(リジン、アルギニン)は黒塗で、酸性アミノ酸(グルタミン酸、アスパラギン酸)は灰色で示した。シート、ヘリックスに対応する領域(A1 ~ I2、 A1 ~ B2)を図中に示した。

A)

ヒト-出芽酵母キメラPCNA	置き換えられたヒトPCNAのアミノ酸配列	導入された出芽酵母PCNAのアミノ酸配列
region1	22-INEA-27	22-VQLV-27
region2	41-SSH-45	41-DSR-45
region3	67-MGVN-72	67-LGMD-72
region4	120-LDVEQLGIPEQE-133	120-IDADFLKIEELQ-133
ID loop	152-HIGDA-158	152-QLSDS-158
region5	171-SGELGN-178	171-DGDIGS-178
region6	207-AL-210	207-GA-210
region7	230-ADV-234	230-SEA-234

B)

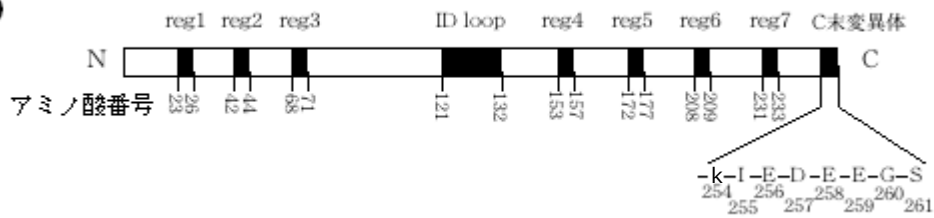


図 2-4 実験に使用したヒト-出芽酵母キメラ PCNA

- A) ヒト PCNA から出芽酵母 PCNA に置換されたアミノ酸配列。
- B) ヒト-出芽酵母キメラ PCNA のヒトから出芽酵母に置換されたアミノ酸配列の部位。黒で塗りつぶされた部分はヒト PCNA の変異が導入された領域。

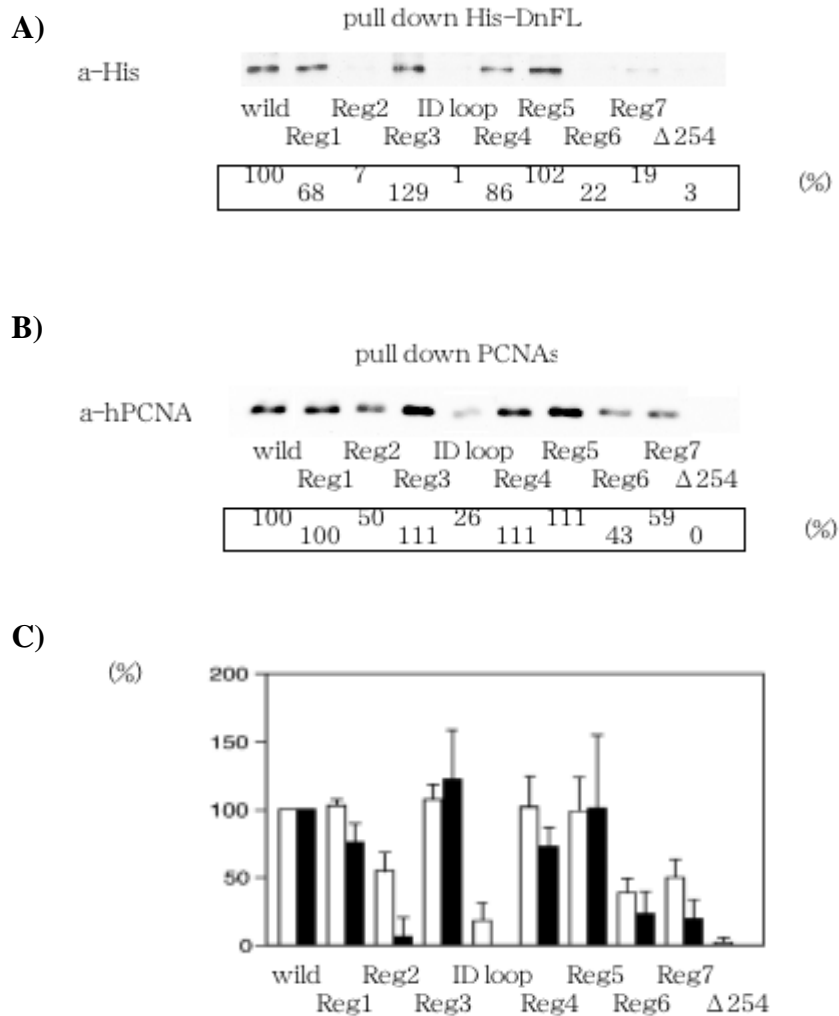


図 2-5 pull down assay によるヒト-出芽酵母キメラ PCNA、 $\Delta 254$ と Dnmt1 の相互作用の解析

- A) flag 抗体ビーズに flag-ヒト PCNA、flag-ヒト-出芽酵母キメラ PCNA、flag- $\Delta 254$ 約 100ng を固定し、そこに 400ng の His-DnFL を添加した際の、結合した His-DnFL 量。His-DnFL は抗 His モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。パネル下の数字は flag-wild ヒト PCNA に対する His-DnFL の結合量を 100% とした相対値(%)。 $\Delta 254$ はヒト PCNA の C 末から 9 アミノ酸を欠失した変異体を示す。
- B) Dn51-255W 150ng が結合したグルタチオンビーズに 500ng のヒト PCNA、ヒト-出芽酵母キメラ PCNA、 $\Delta 254$ を添加した際の、結合した PCNA 量。各 PCNA は抗ヒトモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングで検出した。パネル下の数字は Dn51-255W に対する wild ヒト PCNA の結合量を 100% とした相対値(%)。
- C) A と B の定量のグラフ。白棒：PCNA と結合した His-DnFL、黒棒：Dn51-255W に結合した PCNA を示す。

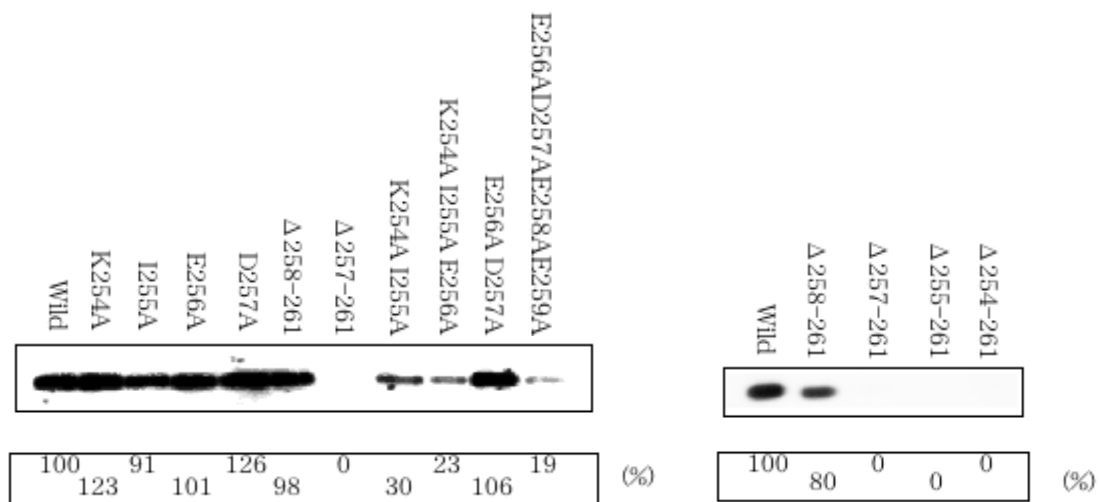


図 2-7 pull down assay によるヒト PCNA C 末変異体と Dn51-255W の相互作用

Dn51-255W 150ng が結合したグルタチオンビーズに 500ng のヒト PCNA C 末変異体を添加した際の、結合した PCNA 量。各 PCNA は抗ヒト PCNA モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。パネル下の数字は wild PCNA の結合量を 100% とした相対値。

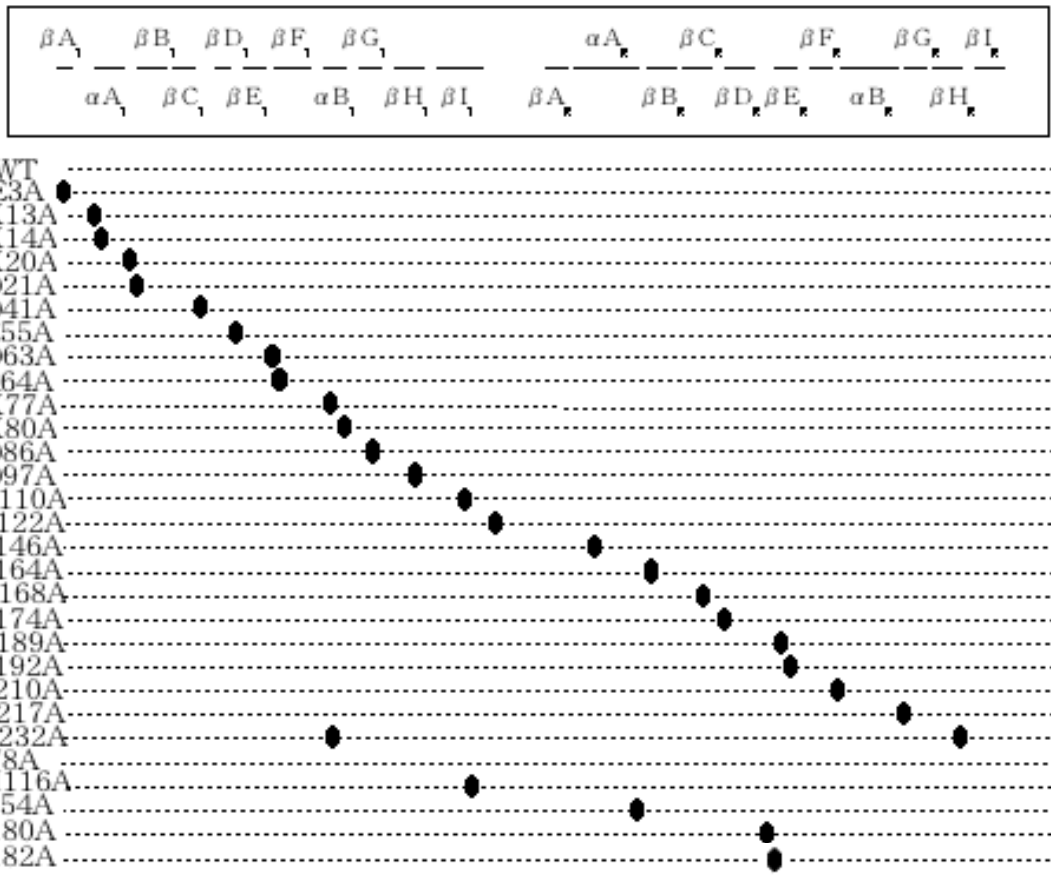


図 2-8 実験に使用したヒト PCNA 単一アミノ酸置換変異体の変異部位

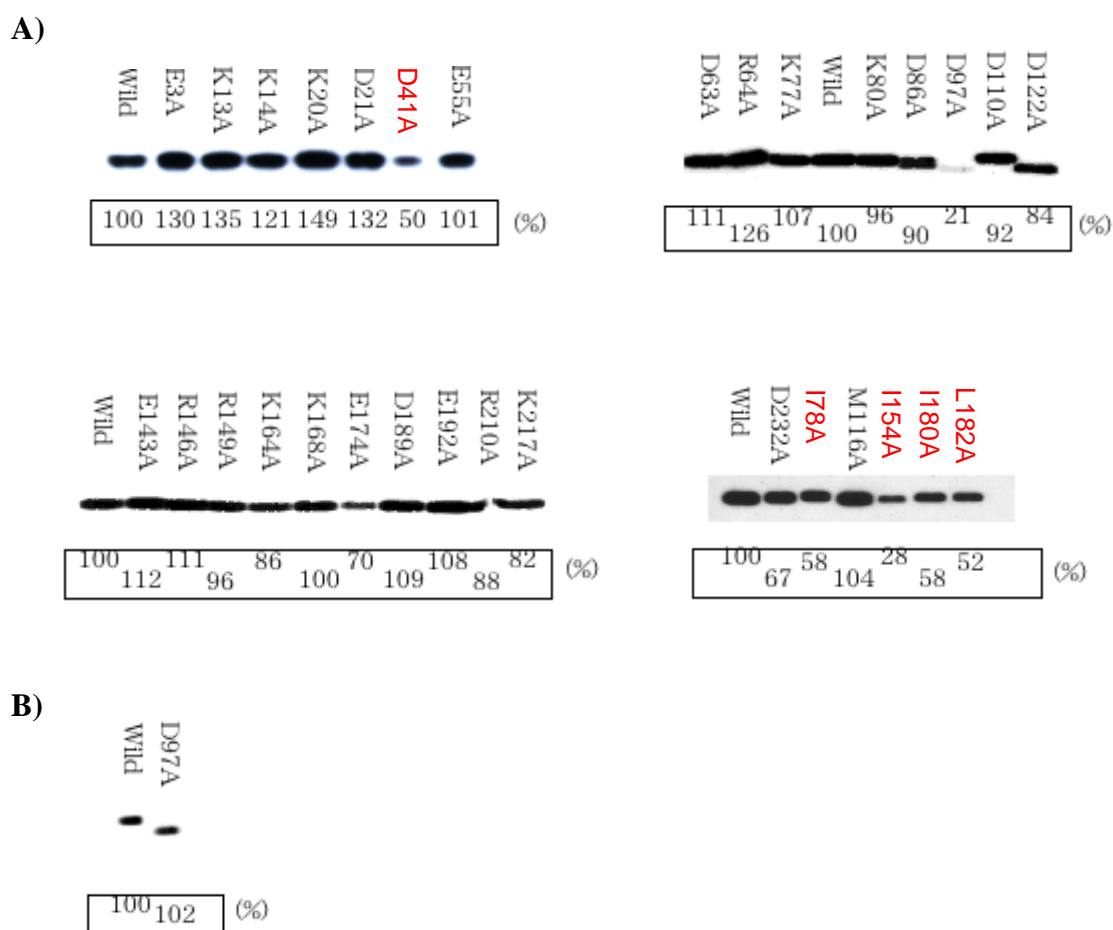


図 2-9 pull down assay によるヒト PCNA 単一アミノ酸置換変異体と Dn51-255W の相互作用の解析

Dn51-255W 150ng が結合したグルタチオンビーズに対し 500ng のヒト PCNA 単一アミノ酸置換変異体を添加した際の、結合した PCNA 量。A) 各 PCNA は抗ヒト PCNA モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティングで検出した。数字は wild PCNA の結合量を 100%とした相対値。B) PCNA の D97 は抗ヒト PCNA モノクローナル抗体のエピトープにあたり、D97A は別途抗ヒト PCNA ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティングで検出した。

PCNA	RFCのATPase 活性の促進	pol δ のDNA 合成活性の促進	p21C末部位 との結合	Dnmt1-255W との結合	Hba-DnFL との結合
Wtd	+++	+++	++	+++	+++
E3A	+++	+++	++	+++	ND
K13A	+++	-	++	+++	ND
K14A	+++	-	++	+++	ND
K20A	+++	-	++	+++	ND
D21A	+++	+++	++	+++	ND
D41A	-	+	-	++	ND
E55A	+++	+++	++	+++	ND
D63A	+++	+++	++	+++	ND
R64A	+++	++	++	+++	ND
K77A	+++	-	++	+++	ND
K80A	+++	+	++	+++	ND
D86A	+++	+++	++	+++	ND
D97A	++	+++	++	+++	ND
K110A	+++	-	+	+++	ND
D122A	+++	++	++	+++	ND
E143A	+++	+++	++	+++	ND
R146A	+++	-	++	+++	ND
R149A	+++	-	++	+++	ND
K164A	+++	+++	++	+++	ND
K168AE	+++	++	++	+++	ND
I74A	+++	+++	++	+++	ND
D189A	+++	+++	++	+++	ND
E192A	+++	+++	++	+++	ND
R210A	+++	+	++	+++	ND
K217A	+++	-	++	+++	ND
D232A	+++	+++	++	+++	ND
K254A	+++	+++	++	+++	ND
I255A	+	+++	+	+++	ND
E256A	+++	+++	++	+++	ND
D257A	+++	+++	++	+++	ND
E256-D257/A	+++	+++	+	+++	ND
K254-I255/A	+	+++	-	+	ND
K254-E256/A	-	+++	-	+	ND
Δ 250-261	-	-	-	ND	ND
Δ 254-261	-	+++	-	-	+
Δ 255-261	+	+++	-	-	ND
Δ 257-261	+++	+++	+	-	ND
Δ 258-261	ND	ND	ND	+++	ND
Region1	+++	+++	++	+++	+++
Region2	-	+	+	++	+
Region3	++	++	++	+++	+++
ID loop	+++	+	-	+	+
Region4	++	++	++	+++	+++
Region5	+++	+++	++	+++	+++
Region6	+++	+++	++	++	+
Region7	+++	+++	-	++	+
SC	-	-	-	-	+
SP	+++	+	++	ND	ND
mouse	ND	ND	ND	+++	+++

表 2-10 PCNA の機能領域

PCNA 変異体による RFC ATPase 活性、pol δ の DNA 合成活性および p21(C 末断片)との結合への影響は既に報告されている Oku et al.1998 を引用した。また本研究の pull down assay の結果、Dnmt1 断片と野生型 PCNA の結合を 100% として、66%以上を + + +、33%以上 60%未満を + +、33%未満を +、検出不可を - で示した。

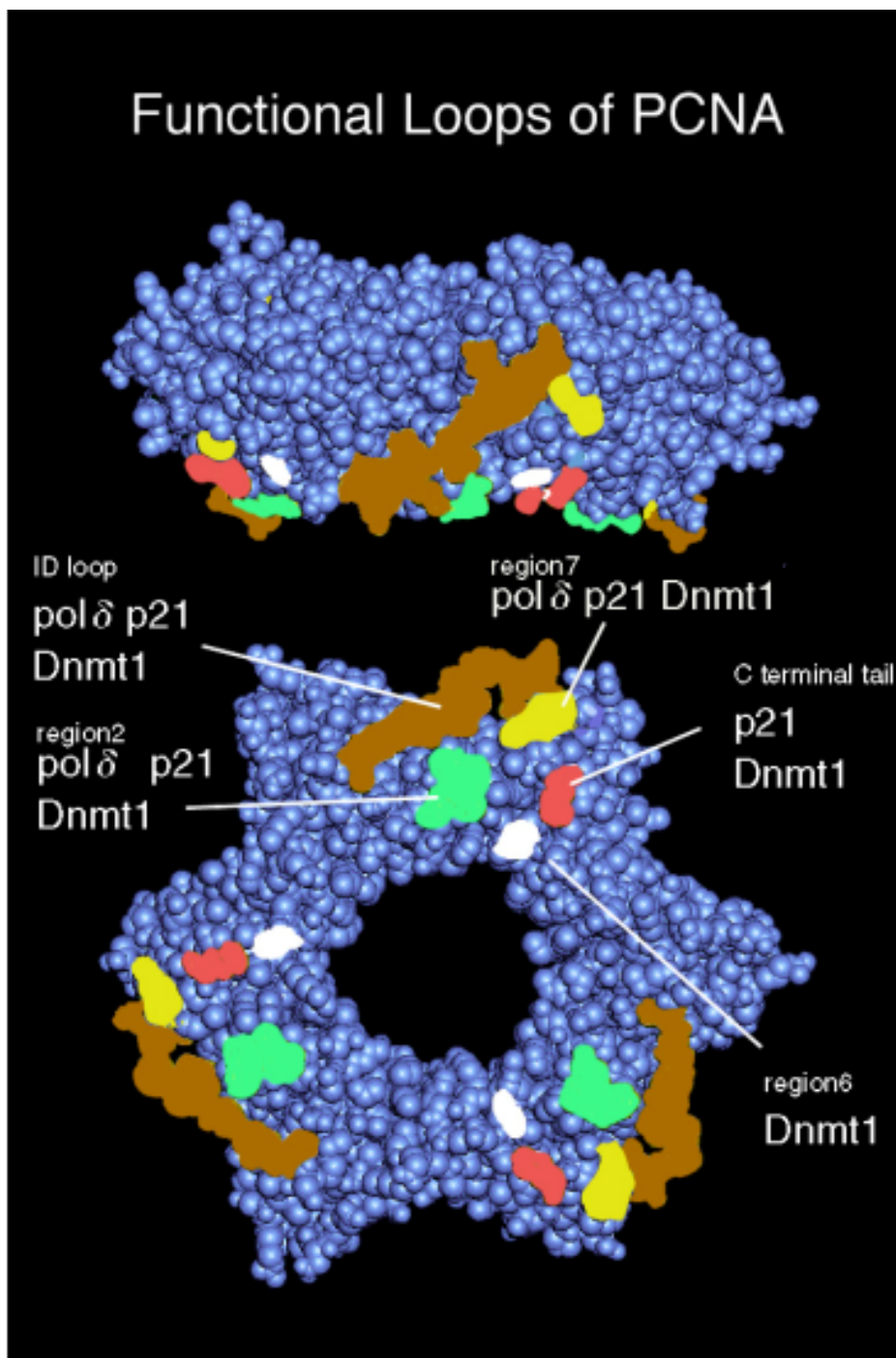


図 2-11 PCNA の機能領域の模式図

すでに X 線結晶解析で解析されている PCNA の立体構造に対して、Dnmt1 を含めた PCNA 結合蛋白質が PCNA に相互作用する領域を比較した。上図は PCNA を横から見た模式図、下図は PCNA を正面から見た模式図を示した。

2-4 考察

1. PCNA と Dnmt1 の結合性

Dnmt1 と PCNA の相互作用を研究するにあたり、まず SPR または pull down assay によってそれらの結合の特異性を解析した。SPR による解析では、報告されているマウス Dnmt1 由来の PCNA 結合モチーフのアミノ酸配列 TRQTTITAHFTKG (図 1-4) を持つ Dn51-255W はヒト PCNA と高い親和性 ($K_D=3.3 \times 10^{-7} \text{M}$ 、図 2-1 B) を示した。このモチーフ内の 167 番目の His が Arg に置換されると著しくその親和性が損なわれ 1/100 程度になることから ($K_D=3.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、図 2-1 C)、この結合はこの結合モチーフ特異的である。興味深いことに同様に PCNA 結合モチーフを完全に保有するマウス Dnmt1 全長の His-DnFL とヒト PCNA の親和性は Dn51-255W と比べると約 1/50 程度の結合性しかなかった ($K_D=1.3 \times 10^{-5} \text{M}$ 、図 2-1 A)。同様の結果が pull down assay による解析でも見られ、マウス Dn51-255W は添加量の 9.1% がヒト PCNA と結合したが、マウス His-DnFL と Dn51-255W は PCNA 依存的に結合するものの、モル換算でそれぞれ Dn51-255 の 1/6 と 1/11 の結合性しかなかった (図 2-2 B-1)。これらの結果から、Dnmt1 のアミノ酸番号 51-255 以外の領域すなわち C 末端側の領域が N 末端側の PCNA モチーフを構造的にマスクし、PCNA との結合を抑制していると推測される。

もちろんこの現象はマウス Dnmt1 とヒト PCNA という解析に用いた蛋白質がお互いに由来する種が違うため、その違いによる影響の可能性はある。しかし、ヒトとマウス PCNA のアミノ酸の相同性は 97% であり、図 2-2 B-2 よりヒト PCNA へのマウス Dnmt1 の結合性はマウス PCNA への結合性とほぼ同程度である。このことから、ヒト PCNA とマウス Dnmt1 間の相互作用は同種間の相互作用と同等と見なすことができる。したがって、以降の実験に用いたヒト由来の PCNA およびマウス由来の Dnmt1 について、必要のない限りこれらを同種の結合とみなすことにする。また本研究では His または GST タグが付加された 2 種類の Dnmt1 断片のサンプル用いて相互作用を解析しているため、このタグの違いが結合性に影響している可能性がある。しかしこれまでに PCNA とその結合蛋白質の相互作用でこれらを含めいくつかのタグを使用してきたが、これらのタグペプチドの違いによって結合性が大きく変化することは見られなかった (結果不掲載)。このことから His タグが阻害的に働いて His-DnFL の結合性が低くあらわれたと言う可能性も排除できる。

したがってこの結果が示すのは、それぞれのタンパク質固有の特性として完全長 Dnmt1 が PCNA 配列を保有するにもかかわらず、フリーの PCNA との結合性が Dnmt1 の N 末端側の断片と比べて 1/50 程度しかないと考えることができる。それではこのような弱い結合性が機能的意味を持つのであろうか。この点を考える上でこれら蛋白質はいずれも実際には DNA 上で機能する点を考慮する必要がある。具体的には Dnmt1 は DNA/PCNA 複合体に対してメチル化を行う場合を考える必要がある。したがって第 3 章では DNA 上の PCNA と Dnmt1 の結合性を明らかにし、その結合が Dnmt1

のメチル化活性にどのように関わっているかを解析した。

2. Dnmt1 が相互作用する PCNA 上のループ構造

次にこれら Dnmt1 と PCNA の結合のモードを解析するために、PCNA 上の Dnmt1 相互作用部位を 8 個のヒト-出芽酵母キメラ変異体 (図 2-5)、特に Dn51-255W に対してはさらに 12 個の C 末変異 PCNA (図 2-7)、31 個の PCNA 単一アミノ酸置換変異体 (図 2-9) を用いてマッピングした。

まず Dnmt1 とヒト-出芽酵母キメラ変異体との結合性を pull down assay により解析した (図 2-5)。マウス Dnmt1 断片はヒト PCNA には特異的に結合するが、出芽酵母 PCNA に対してはほとんど結合しない (図 2-2 A-2、図 2-2 B-2)。このことから、キメラ変異体の中で Dnmt1 との相互作用に必要なヒト PCNA の領域が出芽酵母のものに置換されているとその相互作用が弱められることが期待された。解析の結果、Dn51-255W および His-DnFL は結合性が異なるにもかかわらず、いずれも PCNA 上の region2、ID loop、region6、region7、C 末領域の 5 箇所ループ領域が必要であり、特に region6 は他の PCNA 結合蛋白質と比べて Dnmt1 特異的であった (この意義については第 5 章 総合考察参照)。

また Dn51-255W と PCNA の荷電性アミノ酸をアラニンに置換した変異体との相互作用の解析の結果、そのほとんどは野生型の PCNA と比べてほぼ同等の Dnmt1 結合性を示すのに対し、region2 に隣接する D41 のアラニン置換体は野生型と比べて 50% と Dnmt1 との結合性が弱められた (図 2-9)。

このように Dn51-255W および His-DnFL との結合に必要とされる PCNA 上のループ構造の要求性がほぼ一致することは、両者の結合とも PCNA 結合モチーフが主な役割を果たし同じ結合様式によって行われていることを示している。言い換えれば His-DnFL で結合性が弱くなるのは結合様式が Dn51-255W とまったく異なっているためであるという可能性を排除できる。

3. Dnmt1 が相互作用する PCNA の C 末の構造

Dn51-255W を用いて PCNA の C 末領域との結合を pull down assay により詳細に解析すると、Dn51-255W と 257-261、K254AI255A、K254AI255AE256A との結合は著しく損なわれるが、258 とは野生型と同等の結合性を持った (図 2-7)。このことから PCNA C 末のアミノ酸番号 254 から 257 にある配列 KIED が Dn51-255W との結合に重要であると考えられる (表 2-6)。しかし、この配列の変異体である E256AD257A とは Dn51-255W は野生型 PCNA と同等の結合性を示した。したがって単純に KIED という配列が必要と言うわけではない。おそらく近接するマイナス電荷を持つアミノ酸ストレッチが結合に必要で、アミノ酸番号 256、257 番目の変異の場合は隣接する同じ酸性アミノ酸のペアである E258E259 が Dn51-255W との結合に十分機能したと考えられる。実際、PCNA のアミノ酸番号 256 から 259 の酸性アミノ酸を同時に Ala に

変換した変異体 E256AD257AE258AE259A は Dn51-255W との結合性が著しく損なわれ、このマイナス電荷のストレッチの内、少なくとも2個が Dn51-255W との結合に必要なであると言える (表 2-6)。この点を考慮して C 末の Dnmt1 との結合に必要な配列は -KI-(E_{or}D)₂- と表すことができる。

4. Dnmt1 の PCNA への結合と PCNA の 3 量体構造との関係

Dn51-255W と PCNA 単一アミノ酸置換変異との相互作用の解析の結果、PCNA サブユニット間のインターフェイス領域に存在し、PCNA3 量体保持に関わる疎水性アミノ酸 I78、I154、I180、L182 がアラニンに置換されると Dnmt1 との結合が損なわれた (図 2-9)。このことから Dnmt1 との結合には PCNA 3 量体の構造の保持が必要であった。PCNA は同じ構造を持つ 3 量体であることから、PCNA の別々のサブユニット間に存在する Dnmt1 結合モチーフを Dnmt1 が協調的に利用することによって安定に結合できる機構が存在することが考えられる。また別の解釈として、PCNA への Dnmt1 の結合は PCNA C 末領域の荷電性のアミノ酸ストレッチが重要であることを先に示した。C 末ループとインターフェイスが比較的近い位置にあることから、PCNA3 量体の構造が壊れることにより露出した PCNA サブユニット間のインターフェイス領域の疎水的アミノ酸群が、このような荷電性アミノ酸を利用した Dnmt1 との結合に対して阻害的に働いたという可能性も考えられる。

5. まとめ

Dnmt1 は PCNA 上の region2、ID loop、region6、region7、C 末領域を含む形で結合することが明らかとなった。PCNA 上でこれらの領域はともに一方の側面 (C 面) に位置したループ構造に相当し (図 2-11)、PCNA 依存的に新生 DNA の合成反応を行なう pol γ 、PCNA を DNA 上にローディングする RFC、また PCNA 上で pol γ と競合的に結合し DNA 合成活性を阻害する p21、複製後ヌクレオソームを集合させる因子 CAF1 も同じループのいくつかと相互作用することが報告されている (Fukuda et al.,1995, Moggs et al.,2000)。このように PCNA の特定の結合領域が様々な PCNA 結合蛋白質が機能する場となっていることは、PCNA とこれら因子の相互作用がそれぞれの活性の制御を行っているとともに、結合因子間の PCNA 上での干渉という新しい要素もこれらの因子の機能制御に関与することが考えられる。第 4 章では C 面上での PCNA 結合蛋白質、特に細胞周期制御因子 p21 および PCNA の主要パートナーである pol γ に着目し、結合の競合という観点から解析を行った結果を示した。

第3章 DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 の結合性とその活性への影響

3-1 序

第2章では PCNA と Dnmt1 間の結合を詳細に解析してきた。しかし、これらの結合がどのように Dnmt1 の機能に関与しているのかは重要な問題である。第2章より PCNA との特異的結合モチーフを保有するにもかかわらず Dnmt1 全長と PCNA の直接の結合は弱いことから、一見これらの結合は Dnmt1 の機能にあまり寄与していないように見受けられる。しかしながらこれら2つの蛋白質は実際には DNA 上で機能しており、この状況を考慮に入れることは重要である。具体的には PCNA は DNA 複製終了後、DNA に結合したスライディングクランプとして機能状態であり、その DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 の相互作用が DNA のメチル化反応に寄与する可能性が考えられる。そこで RFC を用いて PCNA を環状 DNA 上へローディングして複製後の DNA を模倣した PCNA/DNA 複合体を作製し、それに対する Dnmt1 の結合性および活性への影響を検討した。

3-2 材料と方法

ヒト RFC の調製

ヒト RFC は SV40 の DNA 合成活性を促進することを指標に、Shiomi らの方法で調製した (Shiomi et al.,2000)。Sf9 細胞を 10%FBS を含むグレース昆虫細胞培地 (GIFCO) で 27 °C で培養した。1.5 × 10⁷ Cells/150mm dish の細胞密度に対して、RFC の 5 サブユニットを発現するようにアレンジされたバキュロウイルスを共感染させ、27 °C で 60 時間培養した。150mm dish 10 枚から感染した細胞を回収し、第2章「His-DnFL の調製」と同じ方法で蛋白質抽出液を得た。

得られた蛋白質抽出液 (総蛋白質量: 124mg) を 25mM HEPES pH 7.5、1mM EDTA、1mM DTT、10% glycerol、0.01% NP40、0.1M NaCl、1mM DTT、0.1mM PMSF、2ug/ml leupeptin で平衡化した 15ml の SP セファロース (Amersham Biosciences) に添加し、同じバッファーで洗浄後、50mL の同組成のバッファー中の 0.1-0.6M の NaCl 濃度勾配で溶出し、1mL ずつ分画した。RFC が含まれる 1mL の分画から 100ul 分を 2mL の同じ組成のバッファー中の 15-35% のグリセロール濃度勾配に添加し、50000rpm、4 °C で 14 時間超遠心した後 100ul ずつ分画した (グリセロール密度勾配遠心法)。RFC が含まれる分画はプールして、YM-10 (MILLIPORE) により遠心濃縮 (4 °C、10000rpm) を行った。量のわかった RFC を指標に電気泳動ゲル上のバンド定量を行うと、約 35ug/ml (100ul) 程度の RFC が得られた。

一本鎖環状 DNA、二本鎖閉環状 DNA の作製

大腸菌 JM109 および DH5⁻ に pUC118 (3162 bp: TAKARA) を保持させたものより一本鎖および閉環状二本鎖 pUC118 DNA を Sanger et al., 1980, Messing., 1983 の方法で調製した。pUC118 DNA は Col E1 型の複製起点とバクテリオファージ M13 の遺伝子配列を持つ環状のファージミドで通常はプラスミドとして存在するが、F 因子を保有する JM109 の場合 F-pili と呼ばれる繊毛を持ち、M13 系の M13KO7 ヘルパーファージが大腸菌に感染すると優先的に一本鎖 DNA が産出される。

まず一本鎖環状 pUC118 の調製を行った。JM109 大腸菌株は F 因子にプロリン代謝関連遺伝子があるが、ゲノムではそのプロリン代謝遺伝子が欠失している。したがって、プロリンを含まないような最少栄養培地で培養すると F 因子を保有する大腸菌のみを増やすことができる。まず二本鎖 pUC118 を保有する大腸菌 (JM109) を、最少栄養培地: M9 Glucose プレート (Na₂HPO₄ · 7H₂O 1.7g, KH₂PO₄ 0.45g, NaCl 0.075g, NH₄Cl, Agar 0.15g, H₂O op/ 75ml に 300ul の 0.5M thiamine, 150ul の 1M MgSO₄, 150ul の 0.1M CaCl₂, 150ul の CaCl₂, 1.5ml の glucose を添加したものに植え付け、37 °C で 30 時間培養することにより F 因子を保有する大腸菌を選択した。

得られた F 因子および二本鎖 pUC118 を保有する大腸菌 (JM109) は 5ml の YT 培地 (Polypeptone 2.4g, Yeast extract 1.5g, NaCl 1.5g, H₂O op / 300ml: pH 7.6 に 1/3000 容量の 100mg/ml ampicilin を添加したもの) 中、37 °C で一晩培養した。1ml のプレカルチャーは 800ml の YT 培地に移植後 OD (600)=0.15 まで菌体を培養し、520ul の M13KO7 ヘルパーファージ (6.0 × 10¹¹ pfu/ml: TAKARA) を添加してさらに 37 °C で 30 分間培養した。ここに 280ul の 20mg/ml kanamycine を添加しさらに 19 時間培養した。この間に産生された一本鎖 pUC118 DNA を含むファージは細胞外へ吐き出され、主に培地中に存在する。遠心 (8000rpm、5 分間) により上清を回収して、160ml の PEG-NaCl 溶液 (20% 平均分子量 6000 のポリエチレングリコール、2.5M NaCl) を添加した後、十分に攪拌した。遠心 (8000rpm、5 分間) により上清に含まれるファージの沈殿を得た。十分に上清を除いた沈殿に 10ml の TE (10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA-2Na pH 8.0) を加えて懸濁した後、ファージ外皮蛋白質と大腸菌由来の RNA を破壊するために、500ul の 20% SDS、200ul の 0.5M EDTA、4ul の 150mg/ml RNase A を添加して 37 °C で 30 分間インキュベートし、さらに 20ul の 50mg/ml の protenase K (promega) を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。この溶液に対して等容量の 80% フェノールを添加して十分に攪拌した後、遠心 (3000rpm、15 分) を行った。一本鎖 pUC118 DNA を含む上層を回収し、1/10 容量の NH₄OAc と 2 倍容量のエタノールを添加し、-20 °C で 30 分間インキュベートした。遠心 (15000rpm、10 分間) により沈殿を回収して、960ul の 25mM NaHPO₄ (25mM Na₂HPO₄:25mM NaH₂PO₄ = 1:1) に懸濁した。この段階で 3.2mg の総 DNA 量が得られたが、この中には一本鎖 pUC118 DNA の他に二本鎖 pUC118 DNA も若干混入しており、hydroxyapatite (Bio-Rad) を用いたカラムクロマトグラフィ

ーによりさらに精製した。

そのためこのサンプルを 25mM NaHPO₄ (25mM Na₂HPO₄:25mM NaH₂PO₄ = 1:1)溶液で平衡化した 3.5ml ベッドボリュームの hydroxyapatite に添加した。同じバッファでカラムを洗浄した後、同じリン酸バッファの濃度 175mM、225mM、275mM、325mM を添加し各 1ml ずつ溶出した。一本鎖 pUC118 は 175mM、225mM のリン酸バッファ濃度で溶出されてこれらをプールした。得られたプールは 10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA-2Na pH 8.0、0.1% SDS、0.1M NaCl で平衡化した 10ml ベッドボリュームの Sepharose CL4B (Amersham Biosciences)に添加して脱塩した。得られた 5ml の DNA プールは 2-burtanol 抽出により 500ul まで濃縮した後エタノール沈殿を行い、3.0mg/ml の一本鎖 pUC118 DNA の TE 溶液 200ul を得た。

閉環状二本鎖 pUC118 DNA の調製は、二本鎖 pUC118 を保有した大腸菌 (DH5⁺) を 250ml の LB 中 37[°] で一晩培養した菌体より Molecular Cloning (A LABORATORY MANUAL: Chapter1)に従って調製した。その結果、4.4mg/ml の閉環状二本鎖 pUC118 DNA の TE 溶液 250ul を得た。

非メチル化 DNA、ヘミメチル化 DNA、完全メチル化 DNA の作製

ニックの入った pUC118 二本鎖非メチル化 DNA は、DNase (0.01U: Boehringer Mannheim)と 15ug の閉環状二本鎖 pUC118 DNA を 50uL の TE (10mM Tris-HCl pH 7.4、1mM EDTA)中、37[°] で 3 分間反応することにより調製した。反応後、DNA をフェノール/クロロホルム(1:1)により抽出し、エタノール沈殿により回収した後 50uL の TE に懸濁した。この条件下では約半分の分子が開環状二本鎖 DNA となり、本章「DNA 上への PCNA ローディングと PCNA/DNA 複合体に対する Dnmt1 の結合」の解析に用いた。

環状ヘミメチル化 DNA の調製ではまず、5ug の一本鎖 pUC118 DNA に対し 40U の Sss^I methylase (New England Biolabs)を 200ul の 50mM Tris-HCl (pH 7.8)、1mM EDTA、1mM dithiothreitol (DTT)、5% glycerol、50ug/ml bovine serum albumin (BSA)、0.16mM S-adenosyl-L-methionine 中で 37[°] で一晩反応させ、CG 配列のシトシンをメチル化した一本鎖 DNA を作成した。この反応に用いた Sss^I methylase は植物病原菌 Spiroplasma 由来で一本鎖 DNA 上でも CpG 配列に対して de novo のメチル化活性を持つことが知られている (Hoffman.,1986)。得られたメチル化一本鎖 DNA をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿で回収し 30ul の TE に溶かした。これに対して、それぞれ 10pmol の 4 つのプライマー (5'-AGCGGATGCCGGGAGCAGAC-3'、5'-GCCACTGGCAGCAGCCACTG-3'、5'-GGAAAACCCTGGCGTTACCC-3'、5'-CTTCGGTCCTCCGATCGTTG-3')をアニールさせ、4U の rTaq polymerase (Takara)を用いて 120ul の rTaq 反応液中で 72[°] で 1 時間反応させて DNA 鎖を伸長させ二本鎖化した。反応産物は QIA quick PCR purification Kit (Qiagen)により精製すると、50ng/ul

の環状ヘミメチル化 DNA の EBbuffer (10mM Tris-HCl pH 8.5)溶液 100ul を得た。Hpa (TAKARA)は CCGG 配列を認識して CpG 間を切断するが、CpG 配列のシトシンがメチル化されていると切断できないという特異性を持つ制限酵素である。この酵素を用いて、作製したヘミメチル DNA のメチル化の程度を調べたところ、全体の CpG 配列の 25-50%が Hpa 切断に耐性なヘミメチル化 DNA が得られた。

メチル化されていない環状 pUC118 DNA は最初のメチル化反応のステップを削除した同様の方法で得た。完全にメチル化された DNA はメチル化されていない環状 pUC118 DNA 1ug あたり 0.5 unit の Sss methylase を 10mM Tris-HCl pH 7.9、10mM MgCl₂、1mM EDTA、50mM NaCl、160uM S-adenosyl-L-methionine 中で 37 で一晩反応させてメチル化することにより得た。これら DNA は第 4 章「Sss メチレーズおよび Dnmt1 のメチル化活性の測定」および本章「PCNA/ヘミメチル化 DNA 複合体に対する Dnmt1 のメチル化活性の測定」に用いた。

DNA 上への PCNA ローディングと DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 の結合 (図 3-1、図 3-2)

解析のスキームを図 3-1 に示した。RFC は DNA の 3'末端を指標に PCNA を DNA 上に ATP 依存的に DNA 上へローディングすることが知られている (Shiomi et al.,2000)。RFC、PCNA およびニックの入った DNA をインキュベートし、反応液に対してサイズ排除クロマトグラフィーを行った。DNA はフリーの蛋白質と比べて十分に分子量が大きいので、DNA が含まれる分画すなわち DNA/PCNA 複合体が単離される。このように調製した DNA/PCNA 複合体をさらに Dnmt1 断片と反応させ、同様に反応液に対してサイズ排除クロマトグラフィーを行った。得られた溶液を SDS-PAGE に供与することによって、DNA/PCNA 複合体に結合した Dnmt1 断片量を定量的に解析した。

まず最初の PCNA ローディング反応は、10mM HEPES (pH 7.5)、0.2mM EDTA、10mM MgCl₂、0.05% Tween 20、150mM NaCl、2mM ATP、非メチル化開環状 pUC118 DNA 600ng、PCNA 8ug、RFC 250ng を含む 20ul の反応系で、25 で 15 分インキュベートして行った。ここに 20ul の HBS を加え 40ul 容量とした PCNA/DNA 複合体溶液は、図 3-1 に示すような小型カラム容器につめた 0.3mL ベッドポリュームの HBS 平衡化 Sepharose CL4B (サイズ排除クロマトグラフィー : Amersham Biosciences)に添加し、遠心 (1500rpm、30 秒)を行った。同じ操作をもう一度繰り返すと DNA 1 分子あたり約 6 個の PCNA が結合した DNA/PCNA 複合体がフリーの蛋白質から単離された。得られた PCNA/DNA 複合体分画約 35ul の内 1/10 量を 10mM HEPES (pH 7.5)、0.2mM EDTA、10mM MgCl₂、0.05% Tween20、150mM NaCl、図 3-2 に示した量の His-DnFL または Dn51-255W を含む 40ul の反応液中で、25 で 15 分インキュベートした。先に示したサイズ排除クロマトグラフィーを行い、DNA 上にリクルートされた Dnmt1 断片は 2 回目の CL4B スピンカラムクロマトグラフィーにより回収した。35ul 容量のろ液が回

収され、その内の 25ul を 12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。ろ液に含まれていた Dnmt1 断片は GST モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech) によるウエスタンブロッティング (Dn51-255W) または銀染色 (His-DnFL) により検出した。

PCNA/ヘミメチル DNA 複合体に対する Dnmt1 のメチル化活性の測定(図 3-3、図 3-4、図 3-5)

PCNA/ヘミメチル DNA 複合体は、上記の反応液の組成を 250ng の開環状ヘミメチル pUC118 DNA、PCNA 1ug、RFC 200ng に変えた 30ul の反応系で、37 °C で 10 分間インキュベートすることにより調製した。この複合体は 50mM Tris-HCl (pH 7.8)、1mM EDTA、1mM DTT、5% glycerol で平衡化した CL4B (0.2ml) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを 2 回行うことにより単離した。約 30ul のろ液が回収され、その内の 1/4 量を以下のメチル化反応に添加した。

Dnmt1 によるメチル化反応は 50mM Tris-HCl (pH 7.8)、1mM EDTA、1mM DTT、100ug/ml BSA、5% グリセロール、12uM S-adenosyl-L-[methyl-³H] methionine (Amersham Biosciences)、図 3-3、図 3-4、図 3-5 で示した量の Dnmt1、PCNA-ヘミメチル化 pUC118 複合体 (図 3-3: 約 40ng DNA、図 3-4: 約 25ng DNA、図 3-5: 約 15ng DNA 基質)、図 3-4、図 3-5 で示した量の完全メチル化 pUC118 DNA を含む 10ul の反応系で、37 °C で 60 分間インキュベートして行った。DNA のメチル化の程度は反応物を DE81 (Whatman) にスポットし、0.5M Na₂HPO₄ で洗浄した後、トルエン PPO を加えてシンチレーションカウンターで DE81 に吸着した ³H のカウントとして測定した。

3-3 結果

Dnmt1 の PCNA/DNA 複合体へのリクルート

DNA を介した PCNA と Dnmt1 の相互作用を解析するために、まず DNA 1 分子あたり約 6 個 PCNA がロードされたニック入り pUC118 DNA を調製した (図 3-1)。この DNA/PCNA 複合体に対する His-DnFL または Dn51-255W それぞれ等モル量 (2pmol) を添加した場合の結合性を解析した (図 3-2)。その結果、PCNA が結合していない場合も DNA 分画にいずれの蛋白質も回収され (His-DnFL: 0.15pmol、Dn51-255W: 0.05pmol)、His-DnFL は Dn51-255W より約 3 倍結合した。しかしその回収量は PCNA が DNA 上に存在することにより、His-DnFL で約 3 倍 (PCNA + : 0.42pmol、PCNA - : 0.15pmol)、Dn51-255W で約 6 倍 (PCNA + : 0.30pmol、PCNA - : 0.05pmol) 上昇した。His-DnFL と Dn51-255W の回収量を比較すると His-DnFL のほうが Dn51-255W よりも 1.3 倍と同等以上の効率で DNA/PCNA 上にリクルートされた。

PCNA クランプによる Dnmt1 活性の促進

Dnmt1 活性に対する PCNA の影響を見るために DNA 1 分子あたり約 8 個の PCNA が結合した、またはしてないヘミメチル化 DNA (基質 DNA 約 40ng) に対する Dnmt1 のメチル化活性を Dnmt1 量を変化させて比較した。その結果ヘミメチル化 DNA のみ存在する条件では、基質 DNA 上の PCNA の有無は、解析に用いた Dnmt1 量の範囲内の Dnmt1 メチル化活性に対してほとんど影響しなかった (図 3-3)。この実験系では基質 DNA としてヘミメチル DNA のみを用いたが、期待された PCNA による促進効果が見られなかった理由として、十分にヘミメチル化 DNA が存在している場合は PCNA の助けなしで十分に Dnmt1 単独で基質 DNA にアクセスできるためと考えられる。この点は S 期の核内のゲノムが複製状態になり、大過剰の DNA の中に限られた量の複製直後のヘミメチル化 DNA が存在するという状態を考えても想定できる。

そこで競合 DNA としてまったくメチル化が起きない完全メチル化 DNA を加えて DNA 1 分子あたり約 7 個の PCNA が結合した、またはしてないヘミメチル化 DNA (基質 DNA 約 25ng) に対する Dnmt1 のメチル化活性を比較した (図 3-4)。その結果、競合 DNA 非添加時には DNA 上に PCNA が存在することによる Dnmt1 のメチル化活性の違いは図 3-3 の結果と同様にみられなかった (競合 DNA/ヘミメチル化 DNA = 0)。しかし競合 DNA を添加するに従って、いずれの場合もメチル化活性の阻害が見られたが、PCNA-DNA 複合体のほうがその阻害の程度がより弱められることが観察された。そこでヘミメチル DNA 基質に対して 6 倍量の完全メチル化 DNA を加えた条件で、DNA 1 分子あたり約 8 個の PCNA が結合した、またはしてないヘミメチル化 DNA (基質 DNA 約 15ng) に対する Dnmt1 のメチル化活性を Dnmt1 の濃度を変えることにより比較した (図 3-5)。その結果、基質 DNA に PCNA が結合していることで明らかに Dnmt1 の活性の促進が見られ、特に Dnmt1 の濃度が低い時 (10ng/10 μ l 反応液) に最大

10 倍程度の Dnmt1 活性が促進され、Dnmt1 濃度が増加することでその差が減少することが観察された。

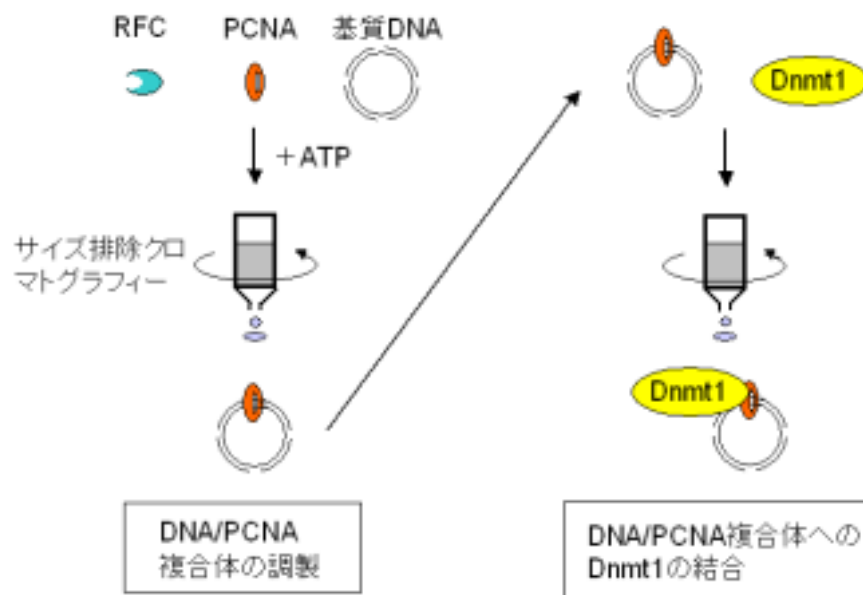


図 3-1 DNA/PCNA 複合体と Dnmt1 断片の結合の解析方法

RFCはDNAの3'末端を指標にPCNAをATP依存的にDNA上へローディングすることが知られている。まずRFC、PCNAおよびニック入りDNAの反応物に対しサイズ排除クロマトグラフィーを行いDNA/PCNA複合体を単離した。このDNA/PCNA複合体をさらにDnmt1断片とインキュベートし同様にサイズ排除クロマトグラフィーを行うことにより、DNA/PCNA複合体に結合したDnmt1断片量を解析した。

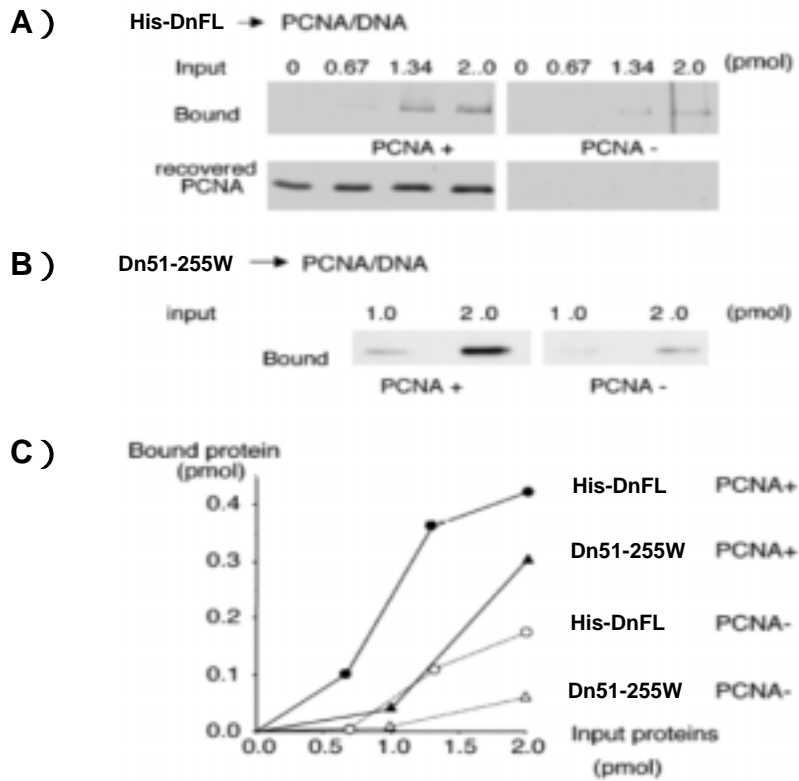


図 3-2 PCNA がロードされた DNA にリクルートされた Dnmt1 断片の解析

図に示した量の His-DnFL(A)または Dn51-255W(B)は 25ng の PCNA-DNA 複合体とインキュベートした。DNA に結合した蛋白質の分画は Sepharose CL4B のサイズ排除クロマトグラフィーによって回収した。回収された蛋白質は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ウエスタンブロットングまたは銀染色で検出した。蛋白質のバンド強度はすでにわかっている Dnmt1 の量を基準に定量した(結果不掲載)。(A)下図では、回収された分画にはほぼ等量の PCNA が存在する。回収された DNA または PCNA を電気泳動により定量すると、DNA 1 分子あたり約 6 個の PCNA3 量体が結合していた。C) A)および B)の定量結果の比較。縦軸は DNA/PCNA 複合体が存在する分画に回収された Dnmt1 量(pmol)、横軸は反応系に添加した Dnmt1 量(pmol)を示す。

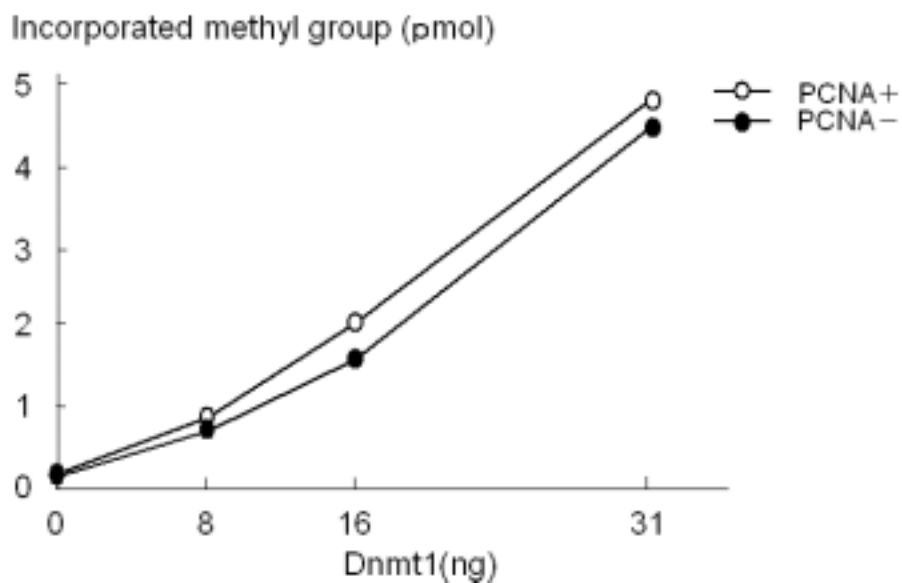


図 3-3 Dnmt1 のメチル化活性の PCNA 依存性

上パネルは Dnmt1 活性測定の反応スキームを示した。Dnmt1 のメチル化活性は、基質 DNA である環状ヘミメチル DNA、Dnmt1 およびメチル基の基質となる S-アデノシル-L メチオニンを反応させ、ヘミメチル DNA のシトシンピリミジン環の 5 位に導入されたメチル基量を測定した。

下パネルは Dnmt1 のメチル化活性の PCNA 依存性を示した。PCNA(8 分子/pUC118 DNA)がロードされたまたはされていないヘミメチル化 DNA(pUC118 約 40ng)、³H ラベルされた SAM、図示した量の His-DnFL を加えた反応系で 37 °C で 60 分間インキュベートした。縦軸は基質 DNA に取り込まれた ³H-メチル基(pmol)量、横軸は反応系に添加した Dnmt1 量を示す。

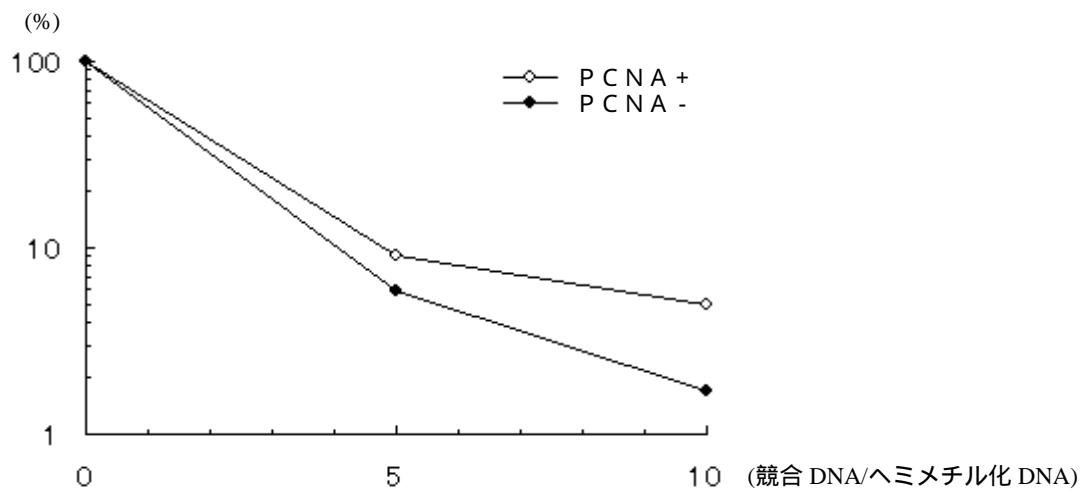
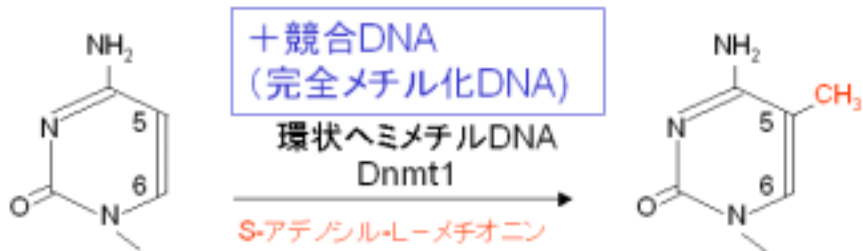


図 3-4 競合 DNA 存在下における Dnmt1 のメチル化活性の PCNA 依存性

PCNA(7 分子/pUC118 DNA)がロードされたまたはされていないヘミメチル化 DNA(pUC118 約 25ng)、³H ラベルされた SAM、20ng の His-DnFL、さらに図示した量の完全にメチル化された競合 pUC118 DNA を加えた反応系で 37 で 60 分間インキュベートした。縦軸には競合 DNA によって抑制された Dnmt1 活性の程度(対数：%)、横軸には基質 DNA に対する添加した競合 DNA の比を示した。

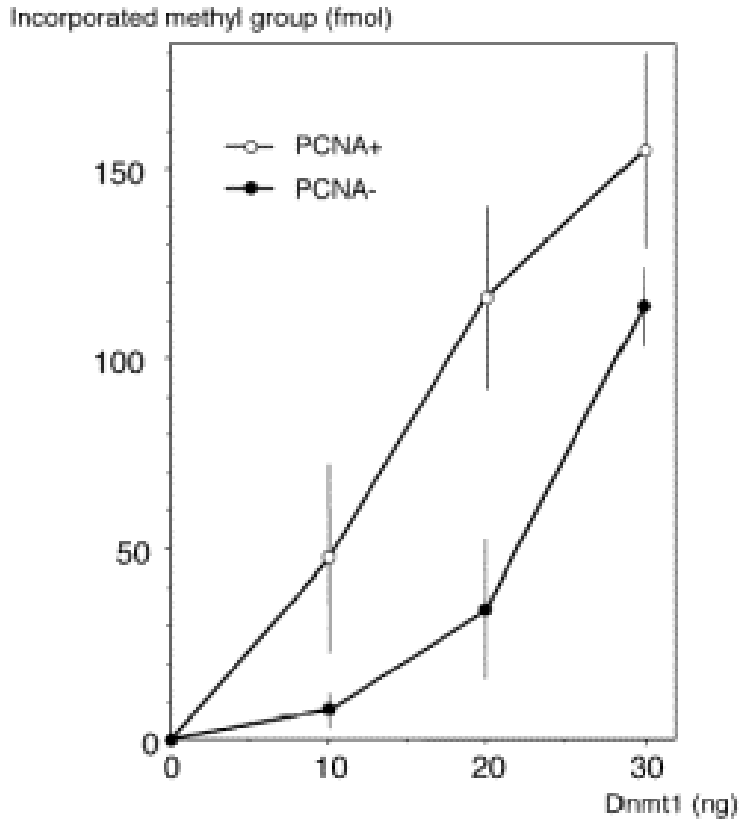


図 3-5 競合 DNA 存在下 PCNA による Dnmt1 活性のメチル化活性の促進

PCNA(8 分子/pUC118 DNA)がロードされたまたはされていないヘミメチル化 DNA(pUC118 約 15ng)、³H ラベルされた SAM および 100ng の完全にメチル化された競合 pUC118 DNA を加えた反応系で、示された Dnmt1 存在下、37 で 60 分間インキュベートした。縦軸は 2 つの独立した実験から得られた取り込まれた ³H-メチル基(fmol)量の平均、横軸は反応系に添加した Dnmt1 量を示す。

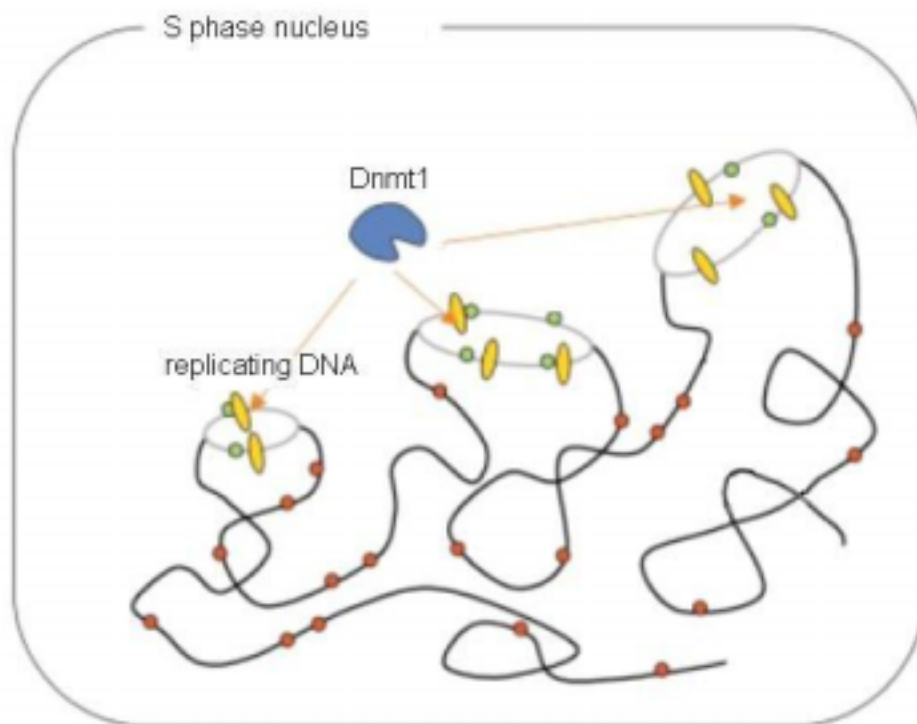


図 3-6 S 期の核内のゲノム DNA の模式図

S 期核内のゲノム領域には限られた量のヘミメチル DNA の他に、大過剰の未複製または複製が完了した DNA が存在する。高等真核生物はこのような DNA の CpG 配列のシトシンの 80% 程度がメチル化されている。赤点はメチル化 DNA 部位、緑点は複製に伴ってヘミメチル化 DNA に変わった部位、オレンジの楕円は複製 DNA 上に残された PCNA、青は Dnmt1 を示す。

3-4 考察

1. DNA と Dnmt1 の結合

DNA に対する Dnmt1 断片の結合性をサイズ排除クロマトグラフィーにより DNA/Dnmt1 複合体として回収して解析した (図 3-2 A, B)。その結果、His-DnFL および Dn51-255W とともに DNA の分画に回収され、それぞれ単独で DNA と結合することが示された。この結果を定量すると、His-DnFL は Dn51-255W より約 3 倍多く非メチル化環状 DNA に結合した (図 3-2 C)。これに関して Fatemi et al.,2001 らは、N 末側の Dn51-255W を含むアミノ酸配列の領域、Zn 結合配列を含む領域および C 末側のメチル化活性領域を含む領域がそれぞれ独立して非メチル化 CpG 基質 DNA に結合することを報告している。したがって、Dn51-255W、His-DnFL とともにこれらの領域の非メチル化 DNA への親和性に従って、ヘミメチル化 DNA 非特異的に結合したと考えられる。実際、これら非メチル化 DNA 結合領域を全部含む His-DnFL は、N 末側の結合領域しか持たない Dn51-255W よりも高い親和性を持って結合した。

2. DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 の結合性

同じサイズ排除クロマトグラフィーにより、DNA/PCNA 複合体に対する Dnmt1 断片の結合性を解析した (図 3-2 A, B)。その結果、非メチル化 DNA 上に PCNA が結合していることにより His-DnFL は約 3 倍、Dn51-255W は約 6 倍効率良く DNA 上にリクルートされ、DNA 上でも PCNA と Dnmt1 の相互作用が観察された (図 3-2 C)。このように、DNA 上に PCNA が存在することにより Dnmt1 は効率良く DNA 上へリクルートされるということは、実際にそのメチル化活性の効率をも促進することが期待された。実際にヘミメチル DNA/PCNA 複合体を基質として Dnmt1 のメチル化活性の PCNA 依存性を図 3-3、図 3-4、図 3-5 で解析し、予想通り PCNA による活性促進を示すことができた。

3. DNA による Dnmt1 の構造変化の可能性

第 2 章では、完全長 Dnmt1 である His-DnFL は PCNA 結合モチーフを保有するにもかかわらず、フリーの PCNA との結合性は N 末端側の断片である Dn51-255W と比べて 1/50 程度しかないことを示した。このことから、Dnmt1 の C 末端領域が PCNA 結合モチーフを構造的にマスクすることにより PCNA との結合を阻害している可能性を示唆した。

しかし、興味深いことに His-DnFL は、DNA/PCNA 複合体に対しては Dn51-255W に対して 1.3 倍と同等以上の効率でリクルートされた (図 3-2 C)。この結果は、フリーの蛋白質同士の結合時には C 末端側領域の影響で PCNA に対する親和性が下がっていた全長 Dnmt1 が、PCNA/DNA 複合体に対しては N 末側にある PCNA 結合領域と同等以上の効率でリクルートされることを示している。したがって、DNA または

DNA/PCNA 複合体との相互作用によって Dnmt1 の構造変化が生じ、C 末端側領域による PCNA 結合モチーフのマスキングが解除されて DNA/PCNA 複合体と高い親和性をもつようになったと推測される。

4. PCNA による Dnmt1 のメチル化活性の促進

ヘミメチル化された CpG 配列特異的に反応する Dnmt1 に対し、本研究では基質となるヘミメチル化環状 DNA を作製し実験に用いた。第 4 章 図 4-4 の結果から、作製した 40ng の非メチル化 DNA およびヘミメチル化 DNA それぞれに対して無差別に de novo のメチル化を行う SssI メチレーズ 0.25 unit を反応させた場合では、ヘミメチル化 DNA に対して 8.6pmol、非メチル化 DNA に対しては 12.9pmol のメチル基がそれぞれ取り込まれた。よってその差から、ヘミメチル化 DNA の片側の CpG 配列がすべてメチル化された場合を 100%として、調製したヘミメチル化 DNA はその 33%程度がヘミメチル化されていることが計算された。また非メチル化 CCGG 配列の CpG 配列特異的に切断する制限酵素である HpaI 切断部位の約 25-50%が HpaI 耐性になっていることも加味すると、本実験で作製したヘミメチル化基質 DNA 上の CpG 配列の 33%程度がヘミメチル状態であると考えられる。また primer 伸長によって 2 本鎖化されたこの基質 DNA は RFC による PCNA ローディングに必要な 4 つのニックを持ち、本章の図 3-2「Dnmt1 の PCNA/DNA 複合体へのリクルート」の実験で用いた DNaseI で作製したニック入り DNA と同じ効率で PCNA をロードした (結果不掲載)。

このヘミメチル化 pUC118 DNA を用いて DNA 上に PCNA が存在する、またはしない DNA 基質を調製し、精製 Dnmt1 によるメチル化の程度を比較した (図 3-3)。その結果、競合 DNA が無い場合には DNA 上の PCNA の有無に関わらず Dnmt1 活性に違いはほとんど見られなかった。したがって、精製 Dnmt1 はヘミメチル化部位を含む基質 DNA が十分に存在する時は、単独で基質 DNA に良くアクセスしメチル化を行うと考えられる。しかし、細胞内でのヘミメチル DNA の存在濃度はバルク DNA に対して十分に低いと考えられ (図 3-6)、その状態では Dnmt1 と PCNA の相互作用が有効に働くと予想して競合 DNA を反応系に添加した場合を解析した。

そのためメチル基の取り込みのない完全メチル化 DNA を競合 DNA として添加した条件で、ヘミメチル化 DNA 上の PCNA の有無による Dnmt1 活性の違いを比較した (図 3-4)。その結果、競合 DNA 非添加時にはヘミメチル化 DNA 上の PCNA の有無による違いはみられなかった Dnmt1 のメチル化活性は、競合 DNA を添加するに従ってメチル化活性の阻害を受け、それに従って PCNA が基質 DNA 上に存在することによる違いが顕著に観察された。さらに Dnmt1 濃度を变化させた実験では、ヘミメチル化 DNA 上に PCNA がロードされていることにより Dnmt1 の濃度が低いほど PCNA による活性の促進の程度が高くなった (図 3-5)。したがって Dnmt1 に対して十分量の非特異的 DNA が存在する場合には、Dnmt1 の非特異的 DNA 結合活性により非基質 DNA に結合して、そのヘミメチル DNA に対するメチル化活性が強い阻害を受けることが

わかった。さらにこのような状況でも Dnmt1 の PCNA/DNA 複合体に対する選択的結合性は機能し、結果的に PCNA がロードされた DNA に対して高い特異性を持ったメチル化を行ったと考えられる。

以上、DNA/PCNA 複合体-Dnmt1 の相互作用の特異性および PCNA 依存的な Dnmt1 メチル化活性の促進の生物学的な意義については第 5 章 総合考察で考察する。

第4章 PCNA 上での PCNA 結合蛋白質の結合の競合

4-1 序

第2章では、PCNA 上の Dnmt1 の結合に必要な領域は pol γ 、p21 の結合に必要な領域と重複し、特に p21 のものとはほぼ一致した。このことから、これら PCNA 結合蛋白質が PCNA 上で結合を競合することによってお互いが制御し合っていることが示唆された。実際 Waga らは simian virus 40 の DNA 複製系を用いて *in vitro* で p21 が PCNA 依存的な pol γ の DNA 合成活性を阻害することを示し、DNA の複製または修復の制御に関わっていることを示した (Waga et al., 1994)。また Oku らは、p21 は PCNA 依存的な pol γ の DNA 合成活性、RFC の ATPase 活性の促進を阻害するが、DNA の 3' 末端における PCNA-RFC の結合は阻害しないことを生化学的手法により示した (Oku et al., 1998)。これらのような PCNA 上での p21 に機能に対して、Chuang らは Dnmt1 と p21 の PCNA 結合モチーフが類似していることに注目して、PCNA に対して 1000 倍程度の p21C 末ペプチドの添加より PCNA と Dnmt1 の結合が阻害されることを示した。また細胞内での PCNA-Dnmt1 の相互作用は p21 の発現量と逆相関していることから、p21 が Dnmt1 の PCNA との結合を利用したメチル化の制御に対して関与していることを示唆している (Chuang et al., 1997)。実際、第3章では競合 DNA 存在下、PCNA が Dnmt1 のメチル化活性を促進することを示したが、おそらく p21 がこの反応を阻害的に制御していることが推測される。この章では、PCNA 結合蛋白質として p21、pol γ および Dnmt1 に着目し、PCNA 上での相互作用様式を詳細に解析した。またこれらが PCNA-Dnmt1 の結合にどのように関わっているかを考察した。

4-2 材料と方法

p21 の調製

His-完全長ヒト p21 (以下 His-p21FL) の発現プラスミドは大阪大学生命機能研究科和賀祥博士より供与された。発現には大腸菌 BL21 (His-p21FL) を sorbitol 508g、betaine 2.4g を加えた 4L の LB 液体培地中で、30℃ で培養し、OD₆₀₀=0.4 となったところで最終濃度が 0.8M となるように IPTG を添加、さらに 10 時間培養して蛋白質を発現誘導した。菌体を遠心 (6000rpm、7 分) で回収した後、30ml の lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 7.9、0.5M NaCl、5mM イミダゾール) に懸濁し、菌体を超音波破碎した後、超遠心 (33000rpm、30 分) で上清を分離し蛋白質抽出液を得た。

得られた蛋白質抽出液 (総蛋白質量: 675mg) は、除核酸を目的に lysis buffer で平衡化した 5ml の DEAE セファローズ (Amersham Biosciences) に添加した。この時 - 荷電しているゲノム DNA などの核酸は陰イオン交換性樹脂に保持されることから、蛋白質が含まれる素通り分画を回収した。これを lysis バッファーで平衡化した 5ml の

Ni-NTA Resin (Novagen)に添加した。25ml の同じバッファーによる洗浄後、イミダゾール濃度を 60mM にした lysis buffer 25ml で 1mL ずつ分画した。その後さらに 1M イミダゾールを含む lysis buffer 25ml で 500ul ずつ分画した。His-p21 は 1M イミダゾールの溶出分画に含まれる。このプールを 0.1M KPO_4 pH 6.9、1mM EDTA、10% グリセロール、0.01% NP40 で平衡化した 20ml の G25 脱塩カラム (Amersham Biosciences)に添加し、同じバッファーで 1ml ずつ溶出してバッファー置換を行った。His-p21 が含まれる分画をプールして、同じバッファーで平衡化した 10ml の monoS カラム (Amersham Biosciences)に添加した。同じバッファーによる洗浄後、5ml のリン酸バッファー濃度グラディエント (0.1M-0.6M、pH 6.9、1mM EDTA、10% グリセロール、0.01% NP40)、さらに連続して 3ml のリン酸濃度を 0.6M にした同じバッファーで 100ul ずつ溶出した。p21 が含まれる分画はリン酸濃度 0.6M 付近に溶出した。これをプールして、濃縮を目的として 20mM Tris-HCl pH 7.9、5mM イミダゾール、0.5M NaCl で平衡化した 100ul の Ni-NTA Resin に添加した。イミダゾールの濃度を 60mM にした同じバッファーで洗浄した後、イミダゾールの濃度を 1M にした同じバッファーで 50ul ずつ溶出した。脱塩を目的として、His-p21 が含まれる分画は 25mM Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA、10% グリセロール、0.01% NP40、50mM NaCl で平衡化した Fast Desalting PC 3.2/10 カラム (Amersham Biosciences)添加し、同じバッファーで溶出することによりバッファー置換を行った。最終産物として 650ug/ml (50ul)の His-p21FL を得た。

pol

仔牛胸腺由来の pol は、Tsurimoto らの方法 (Tsurimoto and Stillman.,1991)に従って調製された九州大学染色体機能学研究室釣本グループのストックを使用した。

PCNA と Dnmt1 の結合に対する p21 添加の影響の解析 (図 4-1、図 4-2)

ヒト PCNA - Dn51-255W の結合に対するヒト p21 添加の影響は Dn51-255W に融合された GST タグを利用した pull down assay により解析した (図 4-1)。またヒト PCNA - His-DnFL の結合に対する p21 添加の影響は抗 flag 抗体に対する flag-ヒト PCNA の親和性を利用した pull down assay (図 4-2)により解析した。

GSH sepharose 4B を用いた pull down assay (図 4-1)は 50ul の反応液 (bufferA:Tris-HCl pH 7.5、1mM EDTA、10% glycerol、0.01% NP40、100mM NaCl)中で 150ng の Dn51-255W を 20ul ベッドボリュームの GSH sepharose 4B (Amersham Biosciences)と 4 下で 1 時間インキュベートして結合させた。PCNA と Dn51-255W の結合後に p21 を競合させる場合は、32ng の PCNA を添加して 3 時間インキュベートした後に、図 4-1 に示した量の p21 を添加して 30 分間インキュベートした。これに対して PCNA と Dn51-255W の結合前に p21 を競合させる場合は、ここに図 4-1 に示した量の p21 を添加して 30 分間インキュベートした後、32ng の PCNA を添加しさらに 4 下で 3 時間インキュベート

した。反応後のビーズは 100ul の同じバッファーで 3 回洗浄し、その後 Dn51-255W に結合した PCNA を 30ul の 1×SDS ローディングバッファーで溶出し、その内の 10ul を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで分離した。PCNA の検出には抗ヒト PCNA モノクローナル抗体 (5A10; MBL) によるウエスタンブロッティングを行った。

flag 抗体を用いた免疫沈降による解析 (図 4-2) では、0.45ug の抗 flag モノクローナル抗体 (M2; Sigma) と 250ng の flag-PCNA および 5ul ベッドポリリユームの proteinA sepharose (Amersham Biosciences) を 50ul の bufferA (pH 8.0) 中で、4 で 30 分間インキュベートし、その後 100ul の同じ buffer で 2 回ビーズを洗浄した。この条件下で抗 flag 抗体には約 25ng の PCNA が捕捉された。この状態のビーズに図 4-2 に示した量の p21 を添加して 30 分間インキュベートした後、1.2ug の His-DnFL を添加しさらに 4 で 3 時間インキュベートした。反応後のビーズは 100ul の同じ buffer で 3 回洗浄した後、結合した蛋白質を 20ul の 1×SDS ローディングバッファーで溶出し、その内の 18ul を 4-20% ポリアクリルアミドゲル (テフコ) で分離した後、銀染色法で検出した。

Dnmt1 添加による PCNA 依存的な pol の DNA 合成活性への影響 (図 4-3)

PCNA 依存的 pol の DNA 合成活性の測定は poly (dA) / oligo (dT) を鋳型プライマーに用いて Fukuda らの方法 (Fukuda et al, 1995) に従った。まず PCNA 2ng、250pmol poly (dA) / oligo (dT) (20:1)、30mM HEPES-NaOH pH 7.5、7mM MgCl₂、0.5mM DTT、100ug/ml BSA、0.05mM [³²P] dTTP (Amersham Biosciences)、および図 4-3 に示した量の p21 または Dnmt1 断片を 4 で 15 分間プレインキュベートした。ここに最終反応液容量が 5ul となるように pol を添加し、37 、30 分間インキュベートして行った。反応後、反応液の 1.5ul 分をジエチルアミノセルロース DE ペーパー (Whatman) にスポットし、0.5M Na₂HPO₄ で洗浄した後、鋳型 DNA に取り込まれた ³²P-TMP の放射活性をチェレンコフ計測で定量した。

Sss メチレーズおよび Dnmt1 のメチル化活性の測定 (図 4-4、図 4-5)

基質 DNA (非メチル化、ヘミメチル化、完全メチル化 pUC118 DNA) は第 3 章「DNA の作成」に従って調製した。Sss は New England Biolabs から購入した。Sss および Dnmt1 によるメチル化反応は、12uM S-adenosyl-L-[methyl-³H] methionine (Amersham Biosciences) をメチル基の基質とし、50mM Tris-HCl (pH 7.8)、1mM EDTA、1mM DTT、100ug/ml BSA、5% グリセロール、図 4-4、図 4-5 に示した量の Sss または Dnmt1、約 40ng の基質 DNA (非メチル化 DNA、ヘミメチル化 DNA、完全メチル化 DNA) を含む 10ul の反応系で 37 で 30 分間インキュベートして行った。DNA のメチル化は反応物を DE81 (Whatman) にスポットし、0.5M Na₂HPO₄ で洗浄した後、トルエン PPO を加えてシンチレーションカウンターで DE81 に吸着した ³H のカウントとして測定した。

4-3 結果

p21 添加による PCNA と Dnmt1 の相互作用の阻害

Chuang らは PCNA 単量体に対して約 1000 倍量の p21C 末ペプチド (RQTSMTDFYHISK)の添加より PCNA と Dnmt1 の結合が阻害されることを示した (Chuang et al.,1997)。ここでは細胞内で実際に起きていることを再現するため、短い C 末ペプチドではなく p21 全長の添加による PCNA と Dnmt1 間の相互作用への影響を調べた。PCNA - Dn51-255W の結合に対する p21 添加の影響は Dn51-255W に融合された GST タグを利用した pull down assay (図 4-1) で、また PCNA - His-DnFL の結合に対する p21 添加の影響は抗 flag 抗体に対する flag-PCNA の親和性を利用した pull down assay (図 4-2)により解析した。

まず PCNA - Dn51-255W に対する p21 添加による影響では (図 4-1)、GSH ビーズに固定化した 150ng の Dn51-255W と 32ng の PCNA の結合後に p21 を添加させる場合および結合前に p21 を添加する場合の 2 通りの方法で PCNA の結合性をみた。これらの結果、PCNA と Dn51-255W の結合後に p21 を添加した場合は、PCNA 単量体に対して 9 倍程度の p21 添加により PCNA - Dn51-255W の結合が 95% 阻害された (図 4-1 A, B)。これに対して PCNA と Dn51-255W の結合前に p21 を添加した場合は、PCNA 単量体に対して 6 倍程度の p21 添加により PCNA - Dn51-255W の結合がほぼ 100% 阻害された (図 4-1 A, B)。

次に PCNA - His-DnFL に対する p21 添加による影響を調べた (図 4-2)。5ul のプロテイン A ビーズに抗体を介して約 25ng の PCNA を結合させた。図 4-2 A に示した量の p21 は先に添加してインキュベートした後に、1.2ug の His-DnFL を混合して PCNA への His-DnFL の結合性をみた。このように PCNA と His-DnFL の結合前に p21 を競合させた結果、PCNA 単量体に対して 6 倍程度の p21 に添加により PCNA - His-DnFL の結合が 80% 近く阻害された (図 4-2 A, B)。

PCNA 依存的な pol の DNA 合成活性の Dnmt1 添加による影響

PCNA 依存的な pol の DNA 合成時に Dnmt1 を添加することによる DNA 合成活性の影響を解析した (図 4-3)。pol の DNA 合成反応は poly (dA) / oligo (dT) = 20:1 を鋳型とした時の、TMP の取り込み量として測定した。反応は PCNA と Dnmt1 断片または p21 を先に混合して 15 分間インキュベートした後に、pol を加えて DNA 合成を 30 分間行った。その結果、PCNA 単量体に対する p21 のモル比 4 倍程度で 80% 以上阻害される pol の DNA 合成反応は、6 倍の Dn51-255W 添加によっても 30% 程度、また 4 倍の His-DnFL 添加により 25% 程度までの阻害しか示されなかった (図 4-3)。

Dnmt1 の de novo メチル化活性

もし Dnmt1 が十分にヘミメチル DNA 特異的であれば PCNA による促進や p21 による制御がなくても複製した DNA を特異的にメチル化することが可能である。したがって、その必要性を考えるには Dnmt1 の特異性の程度を理解する必要がある。そこで Dnmt1 の DNA 基質 (非メチル化 DNA、ヘミメチル化 DNA、完全メチル化 DNA) に対する特異性を詳細に解析した(図 4-4、図 4-5)。解析には第 3 章で用いた実験系と同様に、メチル基の基質として S-アデノシル-L-メチオニンを用いて、これらメチレーズによる DNA のシトシンピリミジン環の 5 位へのメチル基の導入量を測定した。

まず第 3 章で示す方法で作製したヘミメチル化および非メチル化 DNA それぞれ約 40ng に対し、CpG 配列に対して無差別にメチル化を行う Sss^I メチレーズのメチル化量を比較して、それを基に調製したヘミメチル DNA のメチル化の程度を検討した (図 4-4)。もし作製したヘミメチル DNA の CpG 配列が理想的にすべてヘミメチル化されていると、非メチル化 DNA に対して 1/2 量のメチル基の導入が期待される。解析の結果、Sss^I メチレーズの濃度を上げるに従ってこれら基質 DNA へのメチル基の導入量は比例的に上昇した。しかし、非メチル化 DNA に対するヘミメチル DNA へのメチル基の導入量は 1/2 にはならず、0.25 unit の Sss^I メチレーズを添加した条件で、ヘミメチル化 DNA に対して 8.6pmol、非メチル化 DNA に対しては 12.9pmol のメチル基が取り込まれた。よって、その差からヘミメチル化 DNA の CpG 配列の 33%程度がヘミメチル化されていることが計算された (図 4-4)。

これら非メチル化 DNA、33%ヘミメチル化 DNA および完全にメチル化した DNA それぞれ 40ng に対し、図 4-5 に示した量の Dnmt1 を反応させて、これら基質 DNA へのメチル基の導入量を比較した (図 4-5)。その結果、完全にメチル化した DNA ではその活性がほとんど検出できないのに対し、33%がヘミメチル化された DNA に対しては 180ng の Dnmt1 により 0.77pmol のメチル基の取り込みが見られた。これに対して非メチル化 DNA でいわゆる de novo メチル化活性を見たところ、同じ条件で 0.25pmol の取り込みがあった (図 4-5)。

したがって、実際にはかなりの程度の de novo メチル化活性が検出された。33%がヘミメチル化された DNA のメチル化に対して約 1/3 の効率で de novo のメチル化が見られたことから、精製 Dnmt1 はヘミメチル化 DNA の CpG 配列の 1/10 程度の効率で de novo のメチル化をすることが明らかとなった (図 4-5)。

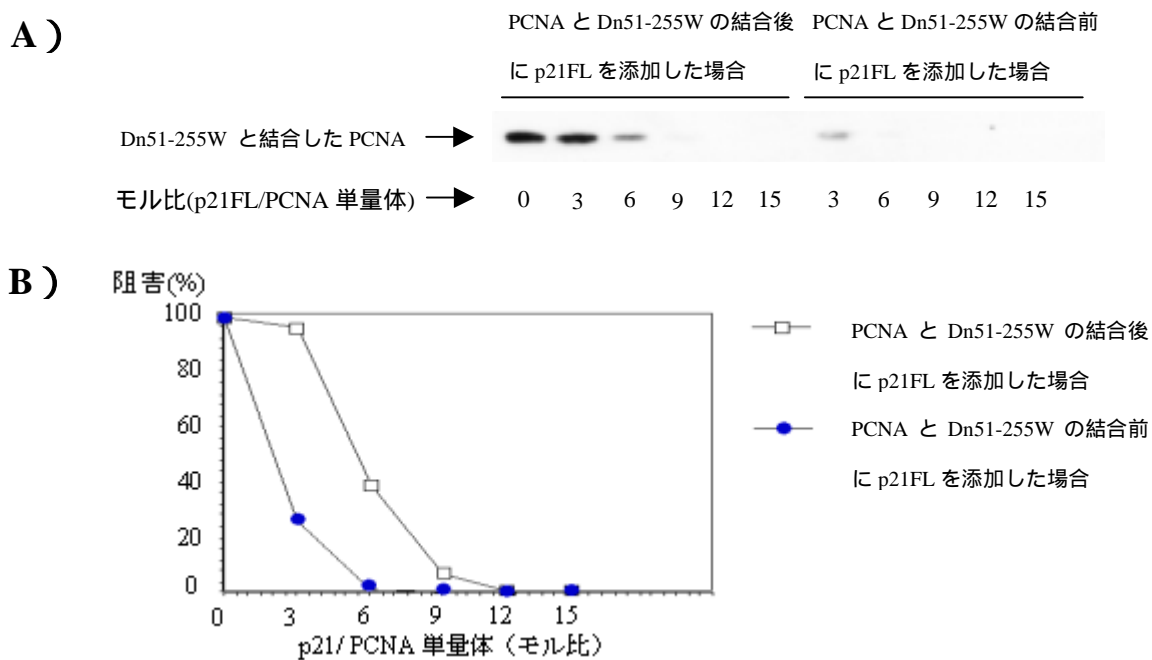


図 4-1 p21FL による PCNA と Dn51-255W の相互作用の阻害

A) GSH セファロース 4B を用いた pull down assay。150ng の Dn51-255W と 32ng の PCNA の結合前または後に p21FL を添加して解析した結果を示す。Dn51-255W に結合した PCNA は抗ヒト PCNA モノクローナル抗体によるウエスタンブロッティングで検出した。パネル下の数字は反応系に添加した p21 の PCNA 単量体に対するモル比を示した。

B) p21 を添加しないときのそれぞれの PCNA のバンド強度を 100%とした相対値としてグラフに表した。

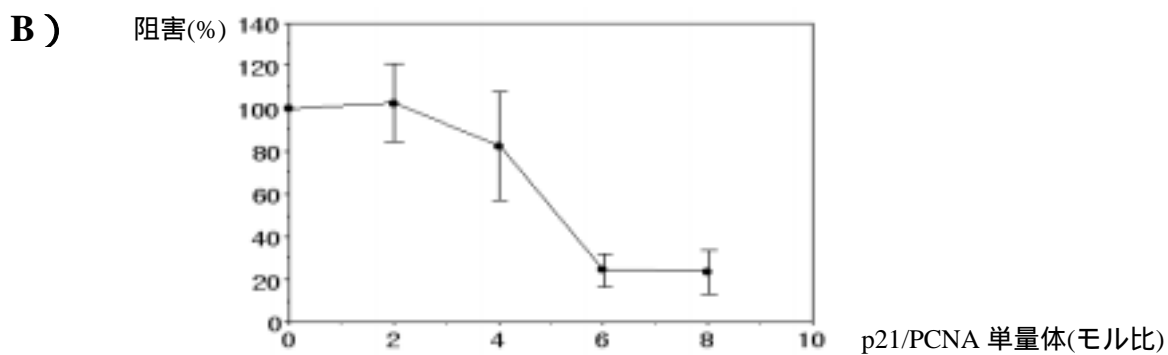
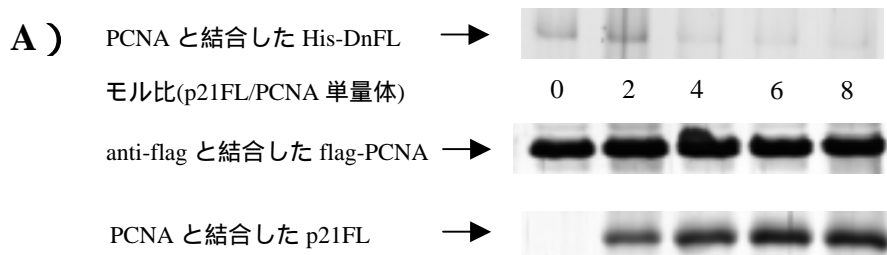


図 4-2 p21FL による PCNA と His-DnFL の相互作用の阻害

A) flag 抗体を用いた免疫沈降による pull down assay。25ng の flag-PCNA と p21 をあらかじめインキュベートした後、1.2ug の His-DnFL を添加して解析した結果を示す。flag-PCNA、p21FL および PCNA に結合した His-DnFL は銀染色により検出した。また反応系に添加した p21 の PCNA 単量体に対するモル比をパネル二段目に示した。

B) A)の結果を p21 を添加しないときのそれぞれの His-DnFL のバンド強度を 100%とした相対値としてグラフに表した。

阻害(%)

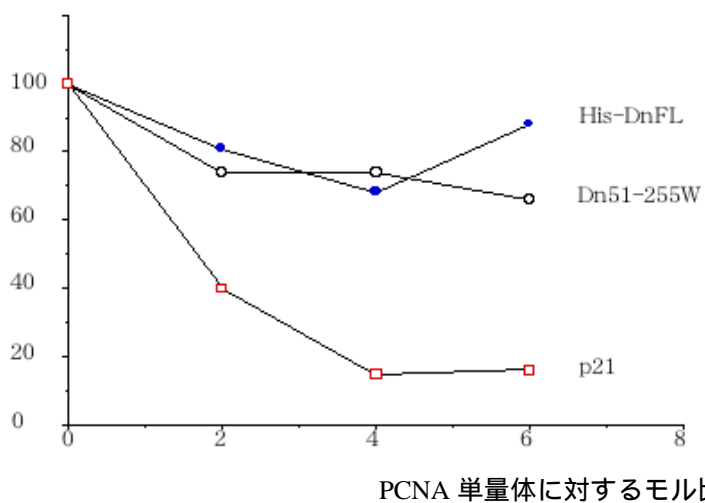


図 4-3 Dnmt1 添加による PCNA 依存的 pol DNA 合成活性への影響

PCNA (2ng)依存的な仔牛胸腺由来の pol の DNA 合成活性に対する Dnmt1 断片または p21 添加による阻害を示した。縦軸には Dnmt1 断片または p21 不添加時の合成活性を 100% (19pmol)としたときの各モル比における合成活性の相対値を%で、横軸には反応系に添加した Dnmt1 または His-p21FL の PCNA 単量体に対するモル比を示した。

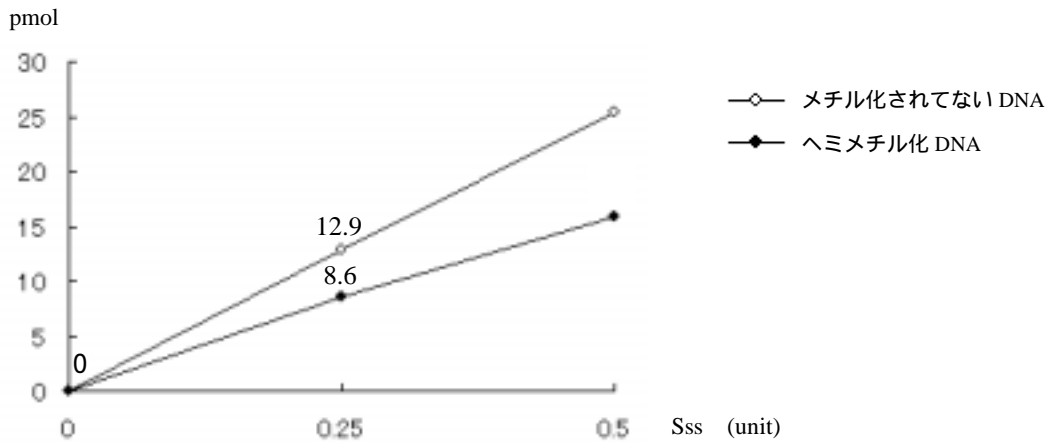


図 4-4 SssI メチレーズによるメチル化量の検討

SssI メチレーズを用いて、メチル化されていない DNA を基準としたヘミメチル化された基質 DNA (40ng) のメチル化の程度を検討した。縦軸には基質 DNA に取り込まれた ^3H メチル基の量 (pmol)。横軸には反応系に添加した SssI 量を示した。図中の数字は 0.25 unit の SssI による基質への ^3H メチル基の取り込み量 (pmol) を示した。

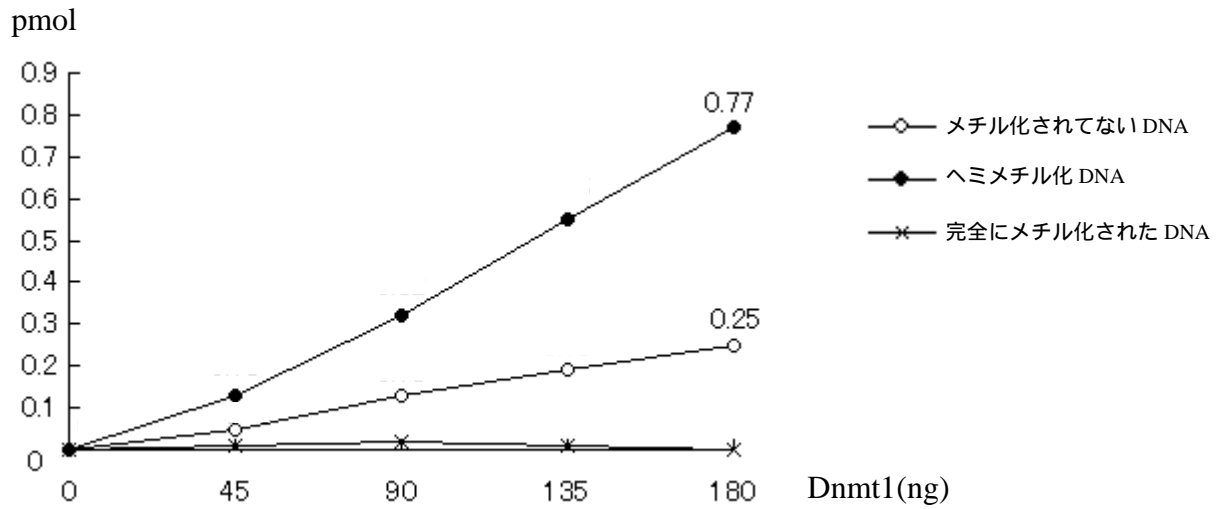


図 4-5 Dnmt1 の de novo メチル化活性

Dnmt1 単独による非メチル化、ヘミメチル化、および完全にメチル化された基質 DNA (40ng)へのメチル化の程度を比較した。縦軸には基質に取り込まれた ^3H メチル基の量 (pmol)。横軸には反応系に添加した Dnmt1 量を示した。図中の数字は 180ng の Dnmt1 によるヘミメチル化およびメチル化されていない DNA への ^3H メチル基の取り込み量 (pmol)を示した。

4-4 考察

1. p21 による PCNA-Dnmt1 の相互作用の影響

Chuang らは、PCNA 単量体に対し約 1000 倍の p21 の C 末ペプチド (RQTSM TDFYH SK) の添加により PCNA と Dnmt1 の相互作用が完全に阻害されること、また細胞内での PCNA-Dnmt1 の結合は p21 の発現量と逆相関することを報告している (Chuang et al., 1997)。また第 2 章より、PCNA 上の Dnmt1 の結合領域はすでに同定されている p21 結合領域 (Oku et al., 1998) とほぼ一致することを示した。これらから Dnmt1 の PCNA に対する結合は p21 の結合と競合することが推測される。この点をより詳細に解析するために、完全長ヒト p21 添加による PCNA と Dnmt1 の結合への影響を解析した。その結果、図 4-1、図 4-2 に示されるように PCNA と Dnmt1 の結合は p21 の PCNA への結合量が増加するにしたがって減少し、さらに C 末ペプチドと異なり PCNA に対して 6 倍程度の p21 添加により効率良く阻害された。このことから、完全長 p21 は PCNA 上で Dnmt1 と結合部位を競合し、C 末ペプチドよりも効率良く Dnmt1 の結合を阻害している。p21 と PCNA の結合を直接解析した場合も C 末ペプチドよりさらに長い p21 C 末端側半分の断片がより安定に PCNA と結合することが知られており (Oku et al., 1998)、同様に p21 の C 末領域以外の領域が PCNA-Dnmt1 間の結合に対して効率の良い制御に関わっていると考えられる。また核内で p21 の存在量が多量の場合では PCNA とほぼ等量と言われており (Li et al., 1996)、ここで見た p21 による阻害の程度は十分に p21 が PCNA と Dnmt1 の結合を制御する機能を有していることを示している。この点は第 5 章 (総合考察) で考察する。

2. p21 および Dnmt1 による PCNA 依存的 pol 活性の影響

前章では PCNA 上で Dnmt1 との結合に必要な領域いくつか、pol との結合にも必要であることも示した。このことから Dnmt1 の PCNA への結合が PCNA 依存的な pol の DNA 合成活性を阻害する可能性が示唆された。しかし図 4-3 に示されるように、PCNA に対して 4 倍程度の p21 添加によって 80% 以上阻害される pol の DNA 合成活性は 4 倍程度の Dnmt1 添加によっても 25% 程度の阻害しか見られなかった。

これには 2 つの可能性が考えられる。一つは PCNA は同じ構造をもつ 3 つのサブユニットから構成されることから、Dnmt1 と pol が単一 PCNA 複合体内の別々のサブユニットに結合することが考えられる。この場合は、これら蛋白質が同時に PCNA を足場として pol は DNA 合成を、Dnmt1 はメチル化を行うと考えられる。もう一つは、pol がより強い親和性で PCNA に結合し、Dnmt1 では pol と PCNA 間の結合をあまり阻害しない場合が考えられる。しかし現在これらを区別する証拠は得られていない。今後一つの PCNA 上での、これら PCNA 結合蛋白質の競合的な結合の詳細を明らかにする必要がある。

3. Dnmt1 の de novo メチル化活性

図 4-4 および図 4-5 で示されるように Dnmt1 はヘミメチル化 DNA 特異的にメチル化するが、1/10 程度の効率でメチル化していない DNA も de novo にメチル化する。このことから、もし S 期になって Dnmt1 が発現誘導される際に核内で Dnmt1 が十分に高い活性を常に発揮すると、pol によって新規に伸長されたヘミメチル化 DNA 部位とは関係のない DNA もメチル化されてしまう。この状況は DNA のメチル化の制御に好ましくない。これを回避するために Dnmt1 のレベルは低めに設定され、その状況では PCNA による複製された DNA への Dnmt1 のリクルートが有効に働き、またそれを抑制する p21 はこの PCNA による Dnmt1 の活性促進の制御に十分に機能していると推測される。実際、p21 の発現量が高い S 期初期に複製され多くの遺伝子の転写開始領域である CpG island は厳格にメチル化から守られているが、p21 が欠損したガン化細胞では CpG island の異常なメチル化パターンが観察されている (Counts and Goodman.,1995)。このことから G1 期から蓄積している p21 の濃度に応じて S 期それぞれの時期の Dnmt1 によるメチル化のレベルが、複製される DNA のメチル化の程度に対応するように適切に制御するしくみが想定できる。

第5章 総合考察

1. PCNA と Dnmt1 の相互作用の特異性とその生理的な意義

Dnmt1 は典型的な PCNA 結合領域をその N 末端領域に保有しており (Chuang et al.,1997)、本研究でもその配列が PCNA と Dnmt1 の物理的結合に主要な役割を果たすことが確認された。まず表面プラズモン共鳴またはプルダウンアッセイによる解析により、その一つのアミノ酸置換により PCNA との結合効率が著しく減少することから、Dnmt1 のアミノ酸番号 159-171 の配列 TRQTTITAHFTKG がその結合の中心になっていることを示した。さらに PCNA とこの結合領域を含む N 末端側断片との親和性は比較的高いが、完全長 Dnmt1 は N 末端側断片と比べて 1/50 程度の親和性しかないことを示した (図 2-1、図 2-2 B-1)。これらの結果から Dnmt1 の N 末端側以外の領域、すなわち触媒ドメインを含む C 末端側領域が PCNA との結合に立体障害となっていると推測した。同様の現象が PCNA と p21 の相互作用において p21 の PCNA 結合領域に近接した領域により生じることが報告されており (Chen et al.,1996、Oku et al.,1998)、これら PCNA 結合蛋白質はその立体構造の変化により PCNA への親和性が制御されていることが示唆される。

興味深いことに PCNA/DNA 複合体に対しては、逆に完全長 Dnmt1 は N 末側断片よりも同等またはそれ以上の効率で相互作用した (図 3-2)。このことは、Dnmt1 と PCNA および DNA が協調的に相互作用するか、あるいは DNA と Dnmt1 の相互作用によって Dnmt1 の構造に変化が生じ PCNA 結合領域が露出され、その結果効率の良い PCNA との相互作用が可能になったと考えられる。実際 Dnmt1 の N 末端領域と C 末端の活性領域が物理的に相互作用し、またこれらの領域は CpG を含むまたは含まない非特異的 DNA に対して異なる親和性を示すことが報告されている (Fatami et a.,2001)。このことから PCNA/DNA 複合体に対し Dnmt1 が高い親和性で結合するメカニズムが Dnmt1 自身の構造変化により説明することができる。この点は前述の SPR または pull down assay による相互作用の解析に DNA を添加した実験を行えば実証可能である。

Dnmt1 との相互作用に必要な PCNA ループの中で、Reg6 は他の PCNA 結合蛋白質の PCNA 相互作用領域と比べて Dnmt1 特異的であった (図 2-11)。このことはこのループが PCNA-Dnmt1 の相互作用に対して機能的に重要な役割を果たしていることを示唆する。このループは PCNA の C 面に位置しているが他の相互作用ループとはわずかに離れており、結合する DNA に近い PCNA リングの内側に位置している。上記で示唆したように Dnmt1 は DNA、PCNA と協調的に複合体を形成することから、このループはそのような協調的複合体形成に対し機能していることが推測される。

以上のように、DNA 上にロードされた PCNA は明らかに DNA と Dnmt1 の親和性を促進した。このことはヘミメチル上に PCNA が存在すると Dnmt1 のメチル化活性をも促進されることが示唆された。Dnmt1 のメチル化活性そのものは PCNA には依存

せず (Chuang et al.,1997)、その PCNA 結合モチーフを欠損させてもメチル化活性を保持することが知られている (Bestor et al.,1992)。このように両者の結合は Dnmt1 活性に直接的に必須のものではなく、そのメチル化の効率を促進させる意味を持つ。実際もしヘミメチル DNA のみを基質とした場合、PCNA 有無による Dnmt1 活性に大きな影響の違いは見られなかったが (図 3-3)、さらに基質の競合物質として完全にメチル化された DNA を実験系に添加し Dnmt1 活性を 10%以下に抑えた条件では、DNA 上に PCNA が存在することにより最大で 10 倍程度の Dnmt1 活性の効率の促進された (図 3-4、図 3-5)。この実験系は限られた量のヘミメチル DNA と大過剰のメチル化されてないまたは完全にメチル化された DNA が混在している S 期の核内を模倣しており、そのような条件下で PCNA と Dnmt1 の相互作用がメチル化活性の制御に機能していると考えられる。なお競合物質として完全にメチル化された DNA を実験系に添加したのは、Dnmt1 が非メチル化 DNA に対しては 1/10 程度の効率でメチル基を転移しバックグランドとなるため (図 4-5)、メチル化が導入されない DNA として加えた。また高等真核生物ゲノムの CG 配列の約 80%がメチル化されており、このことから完全メチル化 DNA を実験系に添加することが S 期核内の状況を模倣していると考えられる。

以上の結果をまとめたモデルを図 5-1 に示す。S 期の核内において複製フォークの進行に伴いメチル化 DNA 部位はヘミメチル化 DNA に変わる。PCNA は複製フォークの一員としてまず新規に複製された DNA にロードされ、さらに複製終了後、一定の期間 DNA 上に保持されて Dnmt1 の主要なターゲットとなる。このように周囲に大過剰の未複製または複製が完了された DNA が混在する中、PCNA は Dnmt1 を複製直後の DNA (ヘミメチル DNA)上へ選択的にリクルートし、そのメチル化活性の効率を促進する。このモデルの重要な点は Dnmt1 は PCNA がロードされた DNA 特異的に集積され、その結果複製 DNA 上のヘミメチル DNA 特異的なメチル化を行うことである。この複製直後の DNA での PCNA と Dnmt1 の相互作用は、S 期の核中で PCNA と Dnmt1 が foci として共局在するという Leonhardt らの報告 (Leonhardt et al.,1992)とよく対応する。

逆に DNA を介さないフリーの PCNA と Dnmt1 の直接の相互作用は Dnmt1 の立体障害で弱くなることはどんな意味があるのだろうか。DNA 複製時には、PCNA は RFC によって DNA 上にローディングされ、pol は PCNA と結合することによって DNA 合成反応を行う。もし PCNA と Dnmt1 の結合が常に強固なものであれば、Dnmt1 は核内の大多数のフリーの PCNA と複合体を形成し続け、これ故 RFC による DNA 上への PCNA ローディングが妨げられる。このように、本来あるべき PCNA の複製因子としての機能の他、多様な PCNA の機能が阻害を受けることになる。この状況は S 期核内での DNA 複製などの PCNA の機能制御に好ましくなく、Dnmt1 は PCNA がロードされた DNA にだけアクセスして効率の良いメチル化反応を行う機能を発展させたと推測される。

2. p21 による PCNA 依存的な Dnmt1 のメチル化活性の制御

PCNA 上で同じ領域が Dn51-255W と His-DnFL との相互作用に必要であった (図 2-5)。したがって両者の結合は同じ結合モチーフを介して行われている。Dnmt1 は典型的な PCNA 結合モチーフを持つことより (図 1-4)、Dnmt1 との結合に必要な PCNA の構造は同じモチーフを持つ他の PCNA 結合蛋白質とほとんど同じであることが推測された。実際、PCNA の C 面に位置する同じループ領域 (Jonsson and Hubscher 1997, Tsurimoto.,1999) が p21 と Dnmt1 両方の相互作用に不可欠であった (図 2-11)。この結合部位の重複は PCNA と Dnmt1 の相互作用に対して p21 が競合的に働くことを示唆しており、実際 PCNA 依存的な pol の活性を阻害するのと同様に、PCNA と Dnmt1 の相互作用は約 6 倍程度の p21 により効率良く阻害された (図 4-1、図 4-2)。このように Dnmt1 と pol の両者は PCNA 上の同じ領域に対する親和性に従って、細胞周期の調節因子である p21 により制御されていると考えられている。

細胞周期の進行に合わせて、これまで p21 はその核内での存在量が G1 期で最も多く、S 期の進行に従って減少することが知られている。またこれに関連して S 期初期には多くの遺伝子の転写開始点である CpG island と呼ばれる低メチル化ゲノム領域が、S 期後期には転写活性が低い高メチル化ゲノム領域が複製されることも知られている (Baylin.,1997)。これら複製 DNA のメチル化機構を考察するモデルを図 5-2 に示す。まず核内に p21 がほとんど存在せず高メチル化ゲノム領域が複製される S 期後期は図 5-1 で示したモデルが当てはまる。このモデルに従って、大過剰の未複製または複製が完了された DNA が混在する中、PCNA は Dnmt1 を複製直後の DNA (ヘミメチル DNA) 上へ選択的にリクルートし、その結果、そのメチル化活性の効率を促進すると考えられる。これに対して S 期の初期には p21 は核内に比較的多く存在する。したがって、p21 による制御は S 期初期の DNA のメチル化に重要である。例えば図 4-5 に示すように、Dnmt1 はヘミメチル DNA に対する活性の 1/10 程度の効率でメチル化されていない DNA も de novo にメチル化を行った。このような in vitro における Dnmt1 の de novo のメチル化活性は他のグループでも報告されている (Glickman et al.,1997, Pradhan et al.,1999, Fatami et al.,2001, Vilkaitis et al.,2005)。おそらく p21 は S 期初期において低メチル化領域が複製した後に、PCNA によってリクルートされて Dnmt1 が非特異的な de novo のメチル化をあやまって行ってしまふことを適度に制御していると考えられる。Easwaran らは S 期を通じて Dnmt1 は核 foci に局在し、またその局在には PCNA 結合モチーフが必要であることを報告している。しかし彼らの結果では S 期中期になっても Dnmt1 の核 foci への局在は S 期後期に比べてほとんど観察されず、S 期後期に両者が有効な相互作用するというモデルとよく一致している。また Dnmt1 は G2/M 期にもヘテロクロマチン領域に局在するが、これは PCNA との結合を介さない機構を利用していることが報告されている (Easwaran et al.,2004)。以上より PCNA-Dnmt1 間の相互作用は、ヒト細胞において特に S 期後期の複製 DNA (ヘミメチル DNA) のメチル化に重要な役割を果たす。また S 期初期において p21 は PCNA と

Dnmt1の結合を適当に阻害し、複製DNA(非メチル化DNA)へのde novoメチル化活性を抑制していると推測される。

それではp21がS期初期にPCNA-Dnmt1の相互作用に阻害的に働く時、PCNAとpolの相互作用はどうなっているのだろうか。この時期にpolが十分に活性を持つことは明らかである。このことから予想できるのは、Dnmt1とPCNA間の結合を阻害するレベルのp21ではpol-PCNA間の結合を阻害しないという点である。おそらくS期初期のp21濃度では、もはやpol活性の阻害には不十分になっていると思われる。このようにp21はいくつものPCNAとその結合因子間の結合の制御を行っているが、それぞれに対する有効濃度が微妙に規定されていることが考えられる。

3. 今後の展望

精製蛋白質を用いた生化学的手法による本研究によって、複製DNAのメチル化に対しPCNAとDnmt1の相互作用が重要な意味を持つことを示した。しかしながらDnmt1、PCNAおよびDNA三者の協調的な複合体形成の分子メカニズムの詳細はまだ明らかでなく今後の機能の検証も必要である。そのためには相互作用を欠損するような変異Dnmt1またはPCNA蛋白質の発現系を用いた解析、およびDnmt1のDNAに対する特異性の解析を行っていく必要があるだろう。近年、ある種のヒトがん細胞ではDNAのメチル化の維持にはDnmt1だけでなくDnmt3Bが必要であること(Rhee et al.,2002)、またES細胞でもDnmt1に加えてDnmt3AとDnmt3Bが必要であることが報告されており(Chen et al.,2003)、Dnmt1によるDNAの半保存的なメチル化に対してDnmt3AとDnmt3Bが補助的に働くことが示唆されている。またDnmt1は複製因子PCNAと相互作用する以外に、細胞周期を制御する因子Retinoblastoma (RB) (Robertson et al 2000)、転写を抑制する因子であるDnmt1 associated protein (DMAP1) (Rountree et al 2000)、ヘテロクロマチン化の引き金となるヒストンデアセチラーゼ (Fuks et al.,2000, Rountree et al 2000)、ヒストンH3Lys9メチルトランスフェラーゼおよびヘテロクロマチン蛋白質HP1 (heterochromatin protein1)とも相互作用し (Fuks et al.,2003)、細胞周期や転写制御にも機能することが示唆されている。これらのような他の因子によるDnmt1の機能制御に対し、PCNAとp21がどのように関与しているのかを今後明らかにしていくことも重要である。

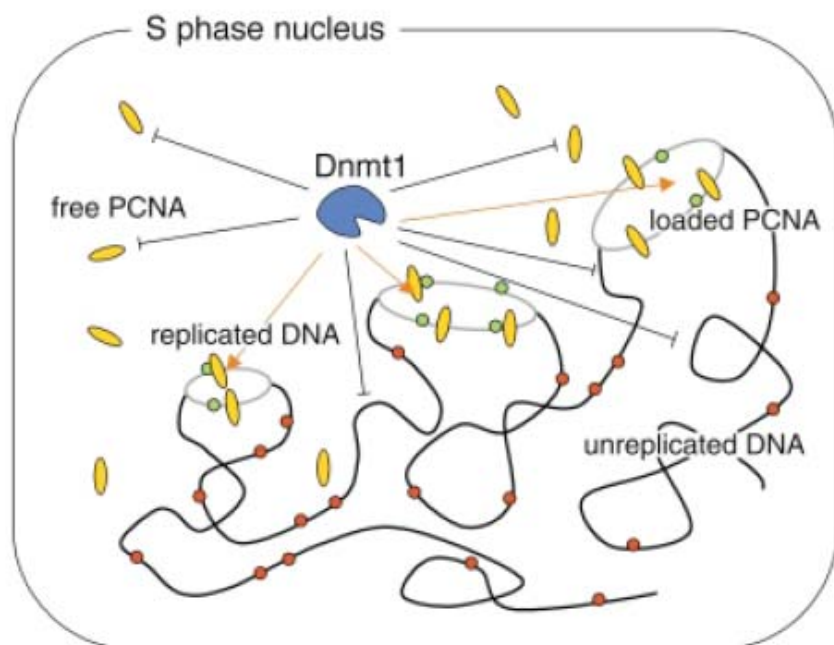


図 5-1 DNA 上の PCNA と Dnmt1 の相互作用による複製されたヘミメチル DNA への選択的メチル化のモデル
 S 期の核内においてメチル化 DNA 部位(赤点)は DNA の複製に伴いヘミメチル化 DNA(緑点)になる。複製された DNA 上に残された PCNA(オレンジの楕円)は効率良く Dnmt1(青)をリクルートし、その活性の効率を促進させることで周囲にある未複製の DNA の中から複製部位の特異性の高いヘミメチル DNA のメチル化を行う。p21 は S 期の進行に合わせて初期には PCNA と Dnmt1 の相互作用を適当に抑え不必要な非特異的メチル化活性を抑制している。逆に DNA と結合していないフリーの PCNA は Dnmt1 との相互作用が抑制されている。

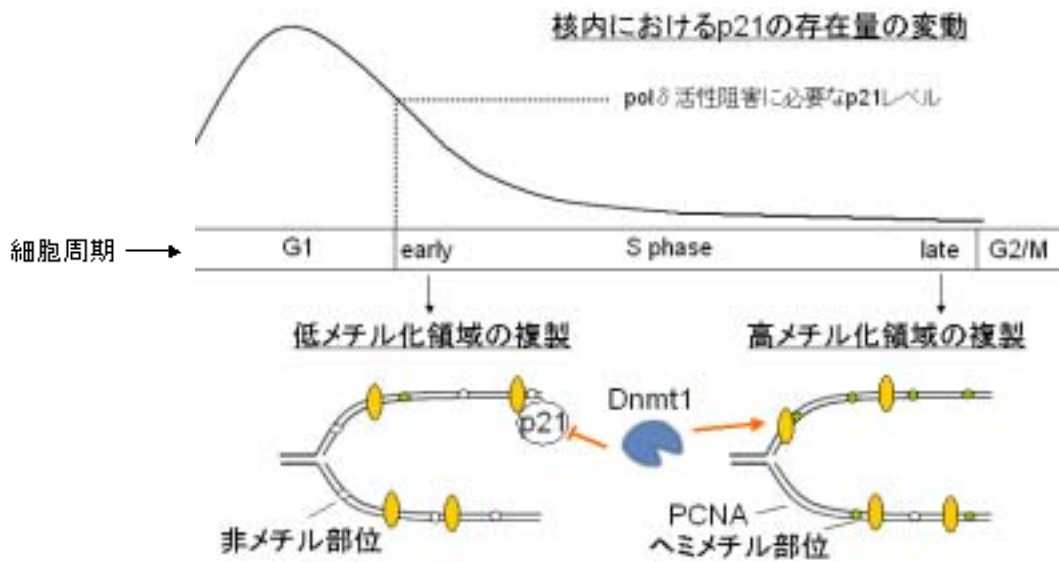


図 5-2 p21 による PCNA 依存的 Dnmt1 メチル化活性の制御のモデル

細胞周期の進行に合わせて p21 は核内での存在量が G1 期にもっとも多く、S 期の進行に従って減少していく。またそれに連動して低メチル化領域は S 期初期に、高メチル化領域は S 期後期に複製され、それぞれ非メチル化領域、ヘミメチル化領域を多く含む DNA 領域に変わる。核内に p21 があまり存在しない S 期後期には図 5-1 のモデルに従って PCNA は Dnmt1 を複製 DNA(ヘミメチル DNA)上に選択的にリクルートし、メチル化活性を促進する。これに対して、核内に比較的 p21 が存在する S 期初期には、p21 は複製 DNA(非メチル化 DNA)上の PCNA への Dnmt1 の結合を適度に抑制し、その de novo メチル化活性を制御している。また想定される pol の DNA 合成活性の阻害に必要な p21 レベルを示してある。

謝辞

精製 RFC を提供して頂いた塩見泰史博士、サイドから実験をサポートしてくれた太田聡博士をはじめ研究生生活の苦楽を共にした奈良先端化学技術大学院大学動物分子遺伝学講座のメンバー皆様に感謝致します。Dnmt1 の cDNA を提供して頂いた大阪大学蛋白研究所田島正二教授に感謝致します。また的確な実験アドバイスを頂いた奈良先端科学技術大学院大学加藤順也教授、JT 生命誌研究館顧問吉川寛元教授、京都大学小布施力史助教授に感謝致します。最後に長年に渡り粘り強くご指導を賜りました九州大学釣本敏樹教授に深く感謝致します。

参考文献

Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*. 2000 May 1;65(3):293-8.

Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, Tajima S. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*. 2001 Sep 1;29(17):3506-12.

Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hajopoulos M, Szyf M. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):6930-6.

Baylin SB, Makos M, Wu JJ, Yen RW, de Bustros A, Vertino P, Nelkin BD. Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells*. 1991 Oct;3(10):383-90.

Baylin SB. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science*. 1997 Sep 26;277(5334):1948-9.

Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol*. 1988 Oct 20;203(4):971-83.

Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J*. 1992 Jul;11(7):2611-7.

Bowman GD, O'Donnell M, Kuriyan J. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):724-30.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2536-9.

Chen J, Peters R, Saha P, Lee P, Theodoras A, Pagano M, Wagner G, Dutta A. A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator p21 is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication in vivo. *Nucleic Acids Res.* 1996 May 1;24(9):1727-33.

Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5594-605.

Chuang LS, Ng HH, Chia JN, Li BF. Characterisation of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N terminus of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase: modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs. *J Mol Biol.* 1996 Apr 19;257(5):935-48.

Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):1996-2000.

Counts JL, Goodman JI. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell.* 1995 Oct 6;83(1):13-5.

Easwaran HP, Schermelleh L, Leonhardt H, Cardoso MC. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep.* 2004 Dec;5(12):1181-6.

Fatemi N, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol.* 2001 Jun 22;309(5):1189-99.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet.* 2000 Jan;24(1):88-91.

Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003 May 1;31(9):2305-12.

Fukuda K, Morioka H, Imajou S, Ikeda S, Ohtsuka E, Tsurimoto T. Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1995 Sep 22;270(38):22527-34.

Gary R, Ludwig DL, Cornelius HL, MacInnes MA, Park MS. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem.* 1997 Sep 26;272(39):24522-9.

Glickman JF, Flynn J, Reich NO. Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jan 13;230(2):280-4.

Gowher H, Jeltsch A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol.* 2001 Jun 22;309(5):1201-8. Erratum in: *J Mol Biol* 2001 Jul 20;310(4):951.

Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):297-306.

Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):247-57.

Haracska L, Kondratieck CM, Unk I, Prakash S, Prakash L. Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol Cell.* 2001a Aug;8(2):407-15.

Haracska L, Johnson RE, Unk I, Phillips BB, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S. Targeting of human DNA polymerase iota to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001b Dec 4;98(25):14256-61.

Haracska L, Unk I, Johnson RE, Phillips BB, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S. Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase kappa by PCNA. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):784-91.

Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31717-21.

Hoffman JL. Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry.* 1986 Jul 29;25(15):4444-9.

Ikeda S (1996)ヒト-出芽酵母キメラ体を用いた PCNA (増殖細胞核抗原) の機能領域の解析 北海道大学薬学部 修士論文

Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2463-7.

Jonsson ZO, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays.* 1997 Nov;19(11):967-75.

Kunert N, Marhold J, Stanke J, Stach D, Lyko F. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development.* 2003 Nov;130(21):5083-90.

Krishna TS, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1233-43.

Kuriyan J, O'Donnell M. Sliding clamps of DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1993 Dec 20;234(4):915-25.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lengauer C, Issa JP. The role of epigenetics in cancer. DNA Methylation, Imprinting and the Epigenetics of Cancer--an American Association for Cancer Research Special Conference. Las Croabas, Puerto Rico, 12-16 1997 December. *Mol Med Today.* 1998 Mar;4(3):102-3.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 1992 Nov 27;71(5):865-73.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992 Jun 12;69(6):915-26.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature.* 1993 Nov 25;366(6453):362-5.

Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr Biol.* 1996 Feb 1;6(2):189-99.

Marinus MG, Morris NR. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1973 Jun;114(3):1143-50.

Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A. D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11030-6.

Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 1983;101:20-78.

Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Hubscher U, Becker PB, Almouzni G. A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2000 Feb;20(4):1206-18.

Molecular Cloning (A LABORATORY MANUAL) : www.MolecularCloning.com

Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):471-81.

Nicolas RH, Goodwin GH. Molecular cloning of polybromo, a nuclear protein containing multiple domains including five bromodomains, a truncated HMG-box, and two repeats of a novel domain. *Gene.* 1996 Oct 10;175(1-2):233-40.

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998 Jul;19(3):219-20.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):247-57.

Oku T, Ikeda S, Sasaki H, Fukuda K, Morioka H, Ohtsuka E, Yoshikawa H, Tsurimoto T. Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells.* 1998 Jun;3(6):357-69.

Palmer BR, Marinus MG. The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene.* 1994 May 27;143(1):1-12.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):33002-10.

Pradhan S, Kim GD. The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity. *EMBO J*. 2002 Feb 15;21(4):779-88.

Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*. 1987 Apr 2-8;326(6112):517-20.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):552-6.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):338-42.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):269-77.

Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol*. 2000 Sep 15;225(2):294-303.

Sanger F, Coulson AR, Barrell BG, Smith AJ, Roe BA. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol*. 1980 Oct 25;143(2):161-78.

Shibahara K, Stillman B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*. 1999 Feb 19;96(4):575-85.

Shiomi Y, Usukura J, Masamura Y, Takeyasu K, Nakayama Y, Obuse C, Yoshikawa H, Tsurimoto T. ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp-loader protein, replication factor C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14127-32.

Shiomi Y, Shinozaki A, Sugimoto K, Usukura J, Obuse C, Tsurimoto T. The reconstituted human Chl12-RFC complex functions as a second PCNA loader. *Genes Cells*. 2004 Apr;9(4):279-90.

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*. 1994 Nov 25;266(5189):1376-80.

Stein R, Gruenbaum Y, Pollack Y, Razin A, Cedar H. Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jan;79(1):61-5.

Takagi H, Tajima S, Asano A. Overexpression of DNA methyltransferase in myoblast cells accelerates myotube formation. *Eur J Biochem*. 1995 Jul 15;231(2):282-91.

Tsurimoto T, Stillman B. Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication in vitro. *Mol Cell Biol*. 1989 Feb;9(2):609-19.

Tsurimoto T, Stillman B. Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis. *J Biol Chem*. 1991 Jan 25;266(3):1961-8.

Tsurimoto T. PCNA binding proteins. *Front Biosci*. 1999 Dec 01;4:D849-58.

Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*. 1996 Oct 4;87(1):65-73.

Vilkaitis G, Suetake I, Klimasauskas S, Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J Biol Chem*. 2005 Jan 7;280(1):64-72.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994 Jun 16;369(6481):574-8.

Wolffe AP. Inheritance of chromatin states. *Dev Genet*. 1994;15(6):463-70.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*. 1992 Oct 30;71(3):505-14.

Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el-Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, Baylin SB. Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1992 May 11;20(9):2287-91.

Yoder JA, Bestor TH. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet.* 1998 Feb;7(2):279-84.

資料

「PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA.」Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T. *Genes Cells*. 2002 Oct;7(10):997-1007.