

# 論文内容の要旨

申請者氏名 飯田 哲生

脊椎動物の DNA-(Cytosine-5)Methyltransferase(以下 Dnmt1)は新しく複製された DNA 上のヘミメチル CG 配列のシトシンの 5 位をメチル化し、ゲノム DNA のメチル化パターンの維持に重要な役割をはたす。DNA のメチル化は遺伝子の発現制御に深く関わるので、Dnmt1 の機能制御は発生、分化、細胞のがん化を考える上で重要である。本研究では、Dnmt1 と DNA polymerase  $\delta$  (pol  $\delta$ )の補助因子である PCNA (proliferating cell nuclear antigen)との相互作用を詳細に解析し、これがどのように DNA のメチル化に関わるかの解明を目的とした。

Dnmt1 の N 末端領域 (アミノ酸番号 51-255) は PCNA 結合配列を有し  $K_D=3.3 \times 10^{-7} M$  の高い親和性を示すのに対し、この配列内の一アミノ酸置換により PCNA との結合性が  $K_D=3.8 \times 10^{-5} M$  と著しく減少した。また、Dnmt1 全長(アミノ酸番号 1-1616)は、 $K_D=1.3 \times 10^{-5} M$  と N 末断片と比べて 1/50 の PCNA 結合能しかなかったが、DNA/PCNA 複合体に対しては効率良く相互作用し、Dnmt1 の N 末断片とほぼ同等の結合性があった。したがって Dnmt1 が PCNA および DNA と協調的に相互作用するか、あるいは DNA との相互作用により生じる構造変化により PCNA に対する親和性が増加すると考えられる。つまり、通常 Dnmt1 はフリーの PCNA にはほとんど結合せず、PCNA の複製因子としての機能を阻害しないが、複製された DNA 上の PCNA に対しては特異的に結合し、この酵素の DNA メチル化活性を促進することが示唆される。

この可能性を検証するためヘミメチル DNA を作成し、結合した PCNA の有無による Dnmt1 活性の違いを検討した。その結果、PCNA/ヘミメチル DNA 複合体に Dnmt1 を加えた場合、それだけでは大きな活性の促進は見られなかったが、これに競合 DNA を加え Dnmt1 の活性が抑制された状態では、PCNA の存在により最大で 10 倍程度のメチル化活性の促進が見られた。この状態は、S 期核内でゲノム中の一部の DNA が複製しヘミメチル状態になることに対応し、複製した DNA 上の PCNA が Dnmt1 の効率のよい DNA メチル化に重要な役割を果たすことがよく説明できる。

また PCNA 変異体を用いて PCNA 上の Dnmt1 結合部位のマッピングを行った結果、Dnmt1 との相互作用を弱める変異領域が PCNA の一方の側面(C 面)の特徴的なループ上に位置することを見いだした。これらは pol  $\delta$  や細胞周期制御因子 p21(Waf1/Cip1) が PCNA に結合する部位とほぼ一致した。このことは Dnmt1/PCNA の結合がこれらの結合と干渉する可能性を示している。実際に PCNA に対するモル比 6 倍の p21 の添加により Dnmt1 との結合が阻害された。したがって PCNA を介した複製 DNA の効率のよいメチル化は p21 の制御下にあることを示している。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 飯田 哲生

脊椎動物の DNA-(Cytosine-5)Methyltransferase(以下 Dnmt1)は新しく複製された DNA 上のヘミメチル CG 配列のシトシンの 5 位をメチル化し、ゲノム DNA のメチル化パターンの維持に重要な役割をはたす。DNA のメチル化は遺伝子の発現制御に深く関わっていることから、Dnmt1 の機能制御は発生、分化、細胞のがん化を考える上で重要な要素であるが、その具体的な機構は明らかになっていない。

申請者は、Dnmt1 が DNA polymerase  $\delta$  (pol  $\delta$ )の補助因子である PCNA (proliferating cell nuclear antigen)と相互作用することに着目し、この相互作用を表面プラズモン共鳴やプルダウンアッセイにより詳細に解析し、以下のことをあきらかにしている。

1) Dnmt1 の N 末端領域(アミノ酸番号 51-255)には PCNA 結合配列が存在し、 $K_D=3.3 \times 10^{-7}M$  の高い親和性を示す。この配列内の一アミノ酸置換により PCNA との結合性が  $K_D=3.8 \times 10^{-5}M$  と著しく減少する。

2) 全長の Dnmt1 (アミノ酸番号 1-1616)は、 $K_D=1.3 \times 10^{-5}M$  と N 末断片と比べて 1/50 の PCNA 結合能しか示さないが、DNA/PCNA 複合体に対しては効率良く相互作用し、Dnmt1 の N 末断片とほぼ同等の結合性を示す。これは、Dnmt1 が PCNA および DNA と協調的に相互作用するか、あるいは DNA との相互作用により生じる構造変化により PCNA に対する親和性が増加する事を示す。

3) PCNA/ヘミメチル DNA 複合体に Dnmt1 を加えた場合は、それだけでは大きな活性の促進は見られないが、競合 DNA の存在下で、Dnmt1 の活性が抑制された状態では、PCNA の存在により最大で 10 倍のメチル化活性の促進を示す。この状態は、S 期核内でゲノム中の一部の DNA が複製しヘミメチル状態になることに対応し、複製した DNA 上の PCNA が Dnmt1 の効率のよい DNA メチル化に重要な役割を果たすことをよく説明する。

4) PCNA 変異体を用いた解析により、Dnmt1 結合部位が PCNA の一方の側面(C 面)の特徴的なループ上に位置する。これは、pol  $\delta$  や細胞周期制御因子 p21(Waf1/Cip1)が PCNA に結合する部位とほぼ一致する。

5) モル比 6 倍の p21 の添加により Dnmt1 と PCNA の結合が阻害される。

以上のように、本論文は、Dnmt1 と PCNA の相互作用がどのように DNA のメチル化に関わるかを明らかにするモデルを構築したもので、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。