

DNA脱メチル化に関する Tet タンパク質の機能解析

[1] 組織

代表者：伊藤 伸介

(理化学研究所免疫アレルギー科学総合
研究センター)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費40万円

[2] 研究経過

エピジェネティック修飾のひとつであるDNAのメチル化は、DNAメチル基転移酵素がCGジヌクレオチド内のシトシンの5位の炭素にメチル基を付加することによって起こり、多種の生物において遺伝子発現抑制やゲノム安定性を維持する上で必要不可欠である。先行研究によりDNAメチル化の解析は詳細に行われているが、DNAのメチル基を消去するDNA脱メチル化酵素、および、その分子基盤は不明な点が多いのが現状である。

近年、DNA脱メチル化酵素として機能する可能性をもつTetタンパク質ファミリーが同定され、Tetタンパク質がメチル化シトシン(5mC)を水酸化して5-ヒドロキメチルシトシン(5hmC)を合成することが報告された。加えて、Tetタンパク質は、5hmCのみならず、連続的酸化反応によって5-フォルミルシトシン(5fC)、5-カルボキシルシトシン(5CaC)を合成することが示された。また、これらの5mCの酸化産物は生体内で検出できることが確認されている。これらの事象は、Tetファミリー依存的に5mCから5hmCへの変換のみならず、5fCと5CaCを合成する経路が生体内に存在し、DNA脱メチル化機構の一部であることを示唆された。しかしながら、Tetタンパク質ファミリーの活性制御機構も含めて、生体内で如何にしてDNA脱メチル化が起こっているか依然として不明であると言える。

本研究課題では、Tetタンパク質ファミリーの中でも解析の進んでいないTet3に焦点を当て、Tet3タンパク質複合体を精製することによって、Tet3に相互作用する因子を網羅的に解析する。更に、Tet3タンパク質複合体の機能解析を行い、Tetタンパク

質ファミリーの活性制御機構及び、DNA脱メチル化機構を解明することを本研究の目的とする。

以下、研究活動状況の概要を記す。ヒトTet3タンパク質複合体を精製するために、FLAGタグを付加したTet3を発現するベクターを理化学研究所にて構築し、東北大学加齢医学研究所にてHEK293にトランスフェクションして、FLAG-Tet3をドキシサイクリン誘導性に発現するHEK293細胞を樹立した。樹立した細胞を大量培養し、細胞より抽出液を調製後、FLAG抗体を用いてアフィニティー精製を行い、Tet3複合体を精製した。Tet3に結合するタンパク質を東北大学加齢医学研究所にてマスマスペクトロメトリー(LC-MS/MS)により網羅的に同定を試みた。研究計画に関しては、必要に応じて電子メールによって進捗状況を報告し、実験の方向性を確認した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、FLAG-Tet3を安定発現するHEK293細胞を樹立し、タンパク質複合体の精製を行った。興味深いことに、Tet3は染色体メチル化DNAを基質とするにも関わらず、核ではなく、主に細胞質に局在することが明らかになった。これまでの報告から、マウスTet3は卵子では細胞質に局在し、受精直後に核に移行することが示唆されており、Tet3は時期あるいは細胞条件特異的に局在を変化させる可能性がある。この局在を制御するメカニズムに関して今後検討していく。

第2に、精製したタンパク質複合体の構成因子の同定をマスマスペクトロメトリー(LC-MS/MS)により行った。その結果、構成因子の一つとしてUDP-N-acetylglucosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase (OGT)を同定した。OGTはヒストンH2Bを含め様々なタンパク質をグリコシル化し、転写や複数の生命現象を制御することが報告されている。また、代表者はマウスES細胞において、Tet1の結合因子としてOGTを同定していたため、OGTとTetファミリータンパク質の結合が普遍的なものであることが示唆された。そこで、

Tet タンパク質による 5mC の酸化活性と、OGT のグリコシル化活性が転写制御において同じ経路で機能しているのではないかと考えている。この点に関して、5hmC のヒドロキシル基が OGT によってグリコシル化されるか検討を行ったが、DNA のグリコシル化を支持する結果は現在までに得られていない。Tet-OGT の結合に関して、標的遺伝子座へのリクルートにおける相互依存性を現在検討中である。

第 3 に、樹立したドキシサイクリン誘導性に FLAG-Tet3 を発現する HEK293 細胞を用いて、染色体 DNA の 5hmC レベルを制御するシステムを構築した。ドキシサイクリンを細胞に添加して Tet3 を発現誘導することによって、染色体 DNA 内の 5hmC を蓄積させることができる。この 5hmC がその後どのように処理されるか 5hmC の抗体を用いたプルダウンを行うことによって解析をおこなった。

(3-2) 波及効果と発展性など

DNA 脱メチル化機構の詳細は、未だに不明な点が多く、本研究課題である Tet ファミリータンパク質の活性制御機構を明らかにすることは非常に重要である。また DNA 脱メチル化は Tet による 5mC のメチル基の連続的酸化後、塩基除去修復機構等の DNA 修復機構が関与する事が示唆されている。そのため、DNA 修復分野にて第一線で活躍される安井教授と共同研究し議論したことによって、今後一層の研究の発展が期待される。

[4] 成果資料

本研究の成果は論文投稿へ向けて研究を進めている。

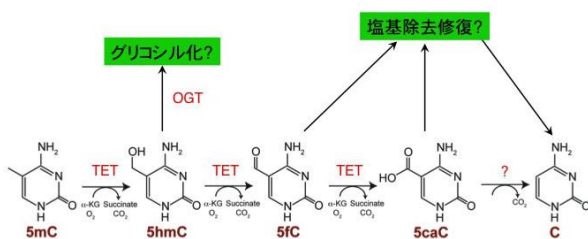


図 推測される能動的DNA脱メチル化機構