

課題番号 28

発生・分化を制御する DNA メチル化制御因子結合蛋白質の探索

[1] 組織

代表者：西山 敦哉

(東京大学医科学研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：なし

研究費：物件費 34 万 3 千円

[2] 研究経過

世界一の長寿国である我が国では、認知症等の原因となる神経変性疾患への予防・治療戦略の確立は重要な課題である。ADCA-DN (autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy) は過眠症、難聴、認知症などを伴う神経変性疾患の一つであり、その原因遺伝子の一つとして DNA メチル化酵素の DNMT1 が同定されている。しかし、増殖をしない神経細胞において DNMT1 がどのような役割を果たしているのか、またその異常がどのようにして疾患を引き起こすのかは全く不明である。申請者は、これまでツメガエル卵抽出液由来の無細胞系と哺乳細胞を用いて、UHRF1 がヒストン H3 のユビキチン E3 リガーゼとして働くこと、またユビキチン化されたヒストン H3 が DNMT1 と直接相互作用することで、そのメチル化部位へのリクルートに重要な役割を果たすことなどを明らかにしてきた。本研究は、共同研究者の安井博士によって確立された GST 融合タンパク質をもちいた細胞抽出液からのアフィニティスクリーニング法による蛋白質複合体の同定を実験手法として、がん細胞や神経細胞における DNMT1 および UHRF1 と相互作用する因子の網羅的探索とその機能解析を行うことで、DNMT1 を制御する新たな分子機構とその解明を目的として行った。

研究打ち合わせは H28 年度染色体ワークショップにて本研究の対応者である安井明博士と研究計画について議論した。その後メールの交換をすることでその詳細を決定した上で研究を実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究により、以下に示す研究成果を得た。

1) Uhrf1 結合因子の探索と機能解析

GST-Uhrf1 を用いて細胞核抽出液中の特異的結合因子の探索を行うことにより、複数の結合因子候補を得た (図 1)。

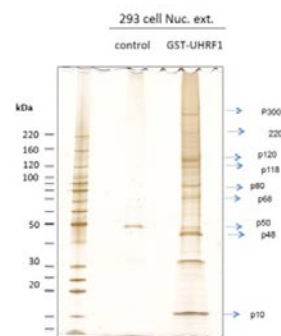


図1 GST-Uhrf1を用いた核抽出液からの結合蛋白質アフィニティ精製

その中でも、クロマチン構造を制御する活性を持つ PARP1 に着目した。抗アフリカツメガエル PARP1 抗体とツメガエル卵無細胞系を用いて、DNA 複製や DNA メチル化と PARP1 との関わりについて検討したところ、PARP1 は DNA 複製時のクロマチンに結合していたものの、DNMT1 や Uhrf1 とは異なりそのクロマチン結合は DNA 複製への依存性を示さなかった。また Uhrf1 や Dnmt1 も PARP1 のクロマチン結合に必ずしも必要でないことが示された。以上の結果は、PARP1 は通常時においては DNA メチル化の主なる制御因子ではないことを示している。

また DNMT1 に結合する因子を探索する目的で同様の実験を試みたが、リコンビナント DNMT1 を効率よく発現・精製することが困難であったため、結合因子の同定には至らなかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により DNA メチル化のマスター制御因子である Uhrf1 の結合因子が複数明らかになった。その中でも PARP1 や DNA-PK など DNA 修復に関わる因子が目立った。これまでゲノム DNA の損傷は DNA 修復経路や損傷チェックポイントを活性化することが明らかとされているが、DNA 損傷に伴うエピゲノムの制御についてはほとんど知見が得られていない。本研究を足場として、DNA 損傷に伴うエピゲノム制御という新しい研究領域の開拓 (萌芽的研究の発見) に結びつく可能性があり、今後の発展を期待している。

[4] 成果資料

論文発表なし