

UHRF1 TTD ドメインと DNA Ligase 1 の複合体が明らかにした UHRF1 の構造変化

郡聡実, 有田恭平
横浜市立大学 生命医科学研究科

Structure of UHRF1 TTD Domain Bound to Methylated DNA Ligase 1 Reveals the Conformational Change of UHRF1

Satomi KORI, Kyohei ARITA

Structural Biology Laboratory, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Abstract

DNA 維持メチル化に必須の因子である UHRF1 は、メチル化された DNA ligase1 (LIG1K126me3) と強い親和性で結合し、DNA 複製サイトへ呼び込まれる。筆者らは、UHRF1 TTD ドメインと LIG1K126me3 の複合体の X 線結晶構造解析から、高親和性結合に重要なアミノ酸残基を同定した。さらに、LIG1K126me3 の結合によって UHRF1 の構造はコンパクトな構造からフレキシブルな構造へと変化することを明らかにした。本研究成果は UHRF1 の阻害剤開発に向けた重要な知見を提唱している。

1. はじめに

1-1. DNA メチル化

ヒトの体は約 220 種類もの異なる形質をもつ細胞で構成されている。これらの細胞は 1 つの受精卵から増殖したものである。これらに例外を除いて全く同じ遺伝情報を有する。それにもかかわらず、細胞の種類によってその形質が異なるのは、細胞ごとに発現する遺伝子が異なるためである。この細胞固有の遺伝子発現パターンを規定しているのが DNA メチル化である。DNA メチル化は 5'-CpG 配列中のシトシン塩基の 5 位の炭素に起こり、ヘテロクロマチンの形成を促すことで細胞に不必要な遺伝子の抑制に関与する。細胞固有の DNA メチル化パターンは、分化多能性をもつ胚盤胞から細胞が分化する過程で確立する。重要なことに、分化した細胞の DNA メチル化パターンは、塩基配列と同様に細胞分裂を経て次世代の細胞へと正確に受け継がれていく。この DNA 維持メチル化機構によって細胞は脱分化が抑制され、その形質を維持することができ

る。DNA 維持メチル化機構の破綻は、細胞のがん化・異常増殖、精神・神経疾患、代謝異常などさまざまな疾患に関与することから、DNA メチル化パターンの正確な継承が重要である [1]。

1-2. DNA 維持メチル化の分子機構

DNA 維持メチル化には、ユビキチン E3 リガーゼ UHRF1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 の 2 つのタンパク質が必須の因子として働く (Fig. 1)。UHRF1 は DNA 複製後に生じる親鎖のみがメチル化されたヘミメチル化 DNA を認識し [2-4]、その後近傍のヒストン H3 の複数のリジン残基をモノユビキチン化する [5-6]。このユビキチン化ヒストン H3 を DNMT1 が認識し、ヘミメチル化 DNA へ呼び込まれることで新生鎖がメチル化される [7]。DNA 維持メチル化は DNA 複製の直後に起こるが、複製に関わる因子がどのように維持メチル化を制御しているかは不明であった。近年、我々は DNA クランプである PCNA と相

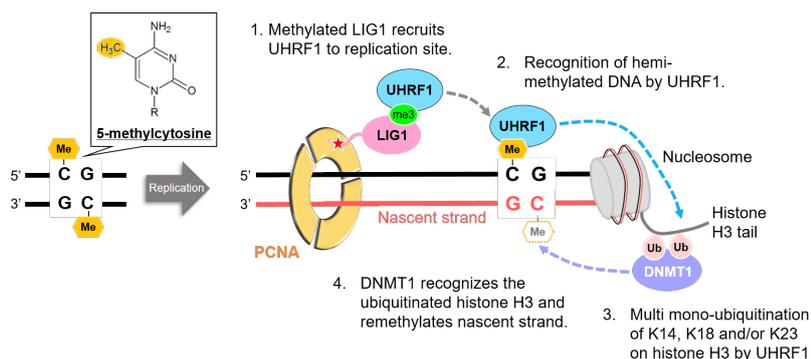


Figure 1
Molecular mechanism of DNA methylation maintenance. UHRF1 and DNMT1 are essential for DNA methylation maintenance to uphold cell identity.

相互作用し、岡崎フラグメントの連結を担う複製因子 DNA Ligase 1 (LIG1) が UHRF1 を複製サイトに呼び込むことを報告した [8]。これは、複製と連携した DNA 維持メチル化の分子機構の解明に向けた先駆的な研究成果である。

1-3. UHRF1TTD と LIG1 は強い親和性で結合する

UHRF1 は UBL ドメイン、TTD ドメイン、PHD ドメイン、SRA ドメイン、RING ドメインの 5 つの機能的なドメインからなる (Fig. 2)。SRA ドメインはヘミメチル化 DNA を認識する。RING ドメインはユビキチン E3 リガーゼ活性を有し、ヒストン H3 の K14, K18, K23 の複数のリジン残基をモノユビキチン化する。このユビキチン化活性には、N 末端の UBL ドメインが関与している [9-10]。TTD ドメインと PHD ドメインは協調的に働き、9 番目のリジン残基がトリメチル化されたヒストン H3 (H3K9me3) を認識する [11]。PHD ドメインはヒストン H3 の N 末端の 1-4 番目のアミノ酸を認識し、TTD ドメインは 3 つの芳香族アミノ酸からなる aromatic cage によってトリメチル化リジンを認識する。さらに、TTD ドメインは peptide binding groove と呼ばれる特徴的な溝を持ち、この領域で H3K9me3 の他に UHRF1 のリンカー領域である linker 2 や spacer と相互作用する [12-13]。

我々は共同研究者 Pierre Antonine-Defossez 氏らと共に K126 がメチル化された LIG1 が TTD ドメインと相互作用すること明らかにし、これが UHRF1 を複製サイトに呼び込む働きをすることを報告した [8]。LIG1 のフレ

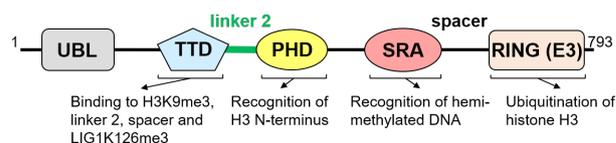


Figure 2 Domain structure and function of UHRF1.

キシブルな N 末端領域はヒストン H3 と類似した配列を持ち、H3K9 に相当する K126 がメチル化される。さらに、H3K9me3 と TTD ドメインの結合は解離定数 1620 nM であったのに対し、K126 がトリメチル化された LIG1 (LIG1K126me3) の TTD ドメインへの結合は解離定数 9.1 nM と、H3K9me3 と比較して 180 倍も強く結合することが分かった。この UHRF1 と LIG1 の高親和性の結合が複製サイトへの UHRF1 の正確な呼び込みに重要であり、DNA 維持メチル化の堅牢性に寄与していると考えられる。しかし、H3K9me3 と LIG1K126me3 は同じような配列を持つにも関わらず、LIG1K126me3 が TTD ドメインと強く結合できる機構は明らかではなかった。また、マルチドメインタンパク質である UHRF1 は基質の結合によってその高次構造を変化させ、機能が制御されることが考えられているが、LIG1K126me3 の結合による UHRF1 の高次構造の変化は不明であった。本稿では、TTD ドメインと LIG1K126me3 ペプチドの複合体の X 線結晶構造解析によって明らかにした高親和性結合のメカニズムと UHRF1 の高次構造の変化について紹介する。

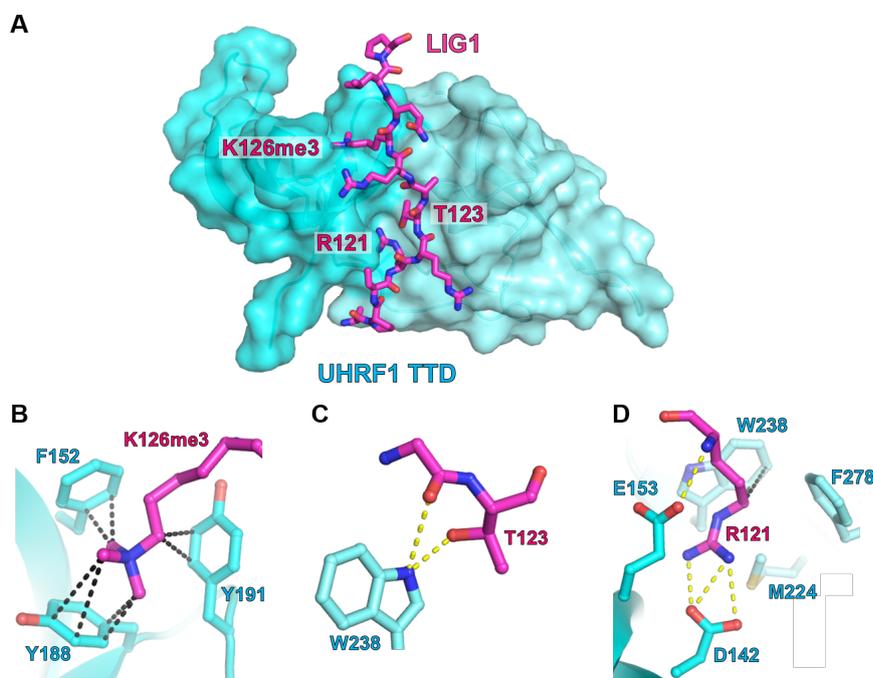


Figure 3 Crystal structure of UHRF1 TTD in complex with LIG1K126me3 peptide. A), Overall structure of UHRF1 TTD in complex with LIG1K126me3 peptide. TTD is shown as a cyan surface model and LIG1K126me3 peptide is shown as a magenta stick model, respectively. LIG1K126me3 peptide bound to the peptide binding groove of UHRF1 TTD. B), The recognition of trimethylated K126 of LIG1 by aromatic cage of UHRF1 TTD, C), T123 of LIG1 by W238 of UHRF1 TTD, and D), R121 of LIG1 by Arg-binding cavity of UHRF1 TTD. Black and yellow dash lines indicate the CH- π interactions and hydrogen bonds, respectively.

2. UHRF1 TTD による LIG1K126me3 の認識機構

2-1. UHRF1 TTD と LIG1K126me3 の高親和性結合に寄与するアミノ酸残基の同定

TTD ドメインによる LIG1K126me3 の認識様式を明らかにするために、TTD ドメインと LIG1K126me3 ペプチドの複合体の結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折強度データの収集は Photon Factory BL-17A で行い、2.65 Å 分解能のデータを得た。回折強度データの位相決定には、TTD ドメイン単体の構造 (PDB: 5YYA) をサーチモデルにして分子置換法で行った。

得られた立体構造から、LIG1K126me3 は TTD ドメインの peptide binding groove に結合していることを明らかにした (Fig. 3A)。LIG1 の K126me3 は、H3 の K9me3 と同様に TTD ドメインの aromatic cage によって認識されていた (Fig. 3B)。また、立体構造の情報をもとに結合に関与するアミノ酸残基に変異を導入し、等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いた相互作用解析を行った。その結果、LIG1 の 2 つのアミノ酸残基が TTD ドメインとの相互作用に重要であることがわかった。

1 つめは、T123 である (Fig. 3C)。TTD ドメインとの相互作用因子である H3K9me3、UHRF1 の linker 2 ならびに spacer において T123 に相当する位置のアミノ酸は、側鎖に水酸基をもつアミノ酸が保存されている。さらに、H3K9me3、linker 2、spacer のこの位置のアミノ酸のリン酸化は、TTD ドメインとの結合を阻害することが報告されている [11, 13–15]。そこで、123 番目のスレオニンをリン酸化させた LIG1K126me3 ペプチドと TTD ドメインとの結合を ITC によって解析すると、K126 がトリメチル化されているにもかかわらず、LIG1 と TTD ドメインの結合は非常に弱くなった ($K_d > 104,500$ nM)。このことから、LIG1 の T123 のリン酸化が TTD ドメインとの結合をオフにするスイッチの役割をしていることが示唆された。

2 つめは、R121 である (Fig. 3D)。LIG1 の R121 側鎖は、TTD ドメインの peptide binding groove にある Arg-binding cavity に入りこみ、TTD ドメインの D142 と相互作用していた。この R121 に相当するヒストン H3 のアミノ酸残基

はリジン残基 (K4) であった。H3 の K4 をアルギニン残基に置換した H3K4R/K9me3 と TTD ドメインの相互作用を ITC で解析すると、解離定数 22.2 nM であった。これは LIG1K126me3 と TTD ドメインの結合とほぼ同等の親和性である。したがって、TTD ドメインの Arg-binding cavity と LIG1 の R121 との相互作用が、高親和性の結合に重要であることが強く示唆された。

2-2. LIG1K126me3 の結合は UHRF1 の高次構造をフレキシブルな構造に変化させる

UHRF1 の TTD ドメインから PHD ドメインまでの領域 (TTD-PHD) は、TTD ドメインと PHD ドメインの間に存在する linker 2 が TTD ドメインの peptide binding groove に結合し、高次構造を形成する [11]。この時、Arg-binding cavity には linker 2 の R296 が入り込んでいる。H3K9me3 は PHD ドメインと TTD ドメインが協調的に働くことで TTD-PHD に結合できる。一方で、LIG1K126me3 は TTD ドメインにのみ結合し、PHD ドメインには結合しないことが分かった。そこで、LIG1K126me3 の結合部位である peptide binding groove に linker 2 が結合している TTD-PHD に対し、LIG1K126me3 が結合できるかを ITC によって解析した。その結果、LIG1K126me3 と TTD-PHD は解離定数 124 nM で結合した。さらに、熱力学的パラメータを比較すると、TTD-PHD への H3K9me3 の結合はエンタルピー駆動であったのに対し、LIG1K126me3 の結合はエントロピー駆動であった。H3K9me3 の結合がエンタルピー駆動であるのは、TTD-PHD の高次構造を壊すことなく結合できることを意味し、これは既知の TTD-PHD と H3K9me3 の複合体の結晶構造と一致する。LIG1K126me3 の結合は、peptide binding groove に結合している linker 2 を追い出す過程がエントロピー駆動として表れたと考えられる。

LIG1K126me3 の結合による TTD-PHD の高次構造の変化を明らかにするために、TTD-PHD と LIG1K126me3 ペプチドの複合体のゲルろ過 X 線溶液散乱 (SEC-SAXS) を行った (Fig. 4)。X 線散乱強度データの収集は Photon

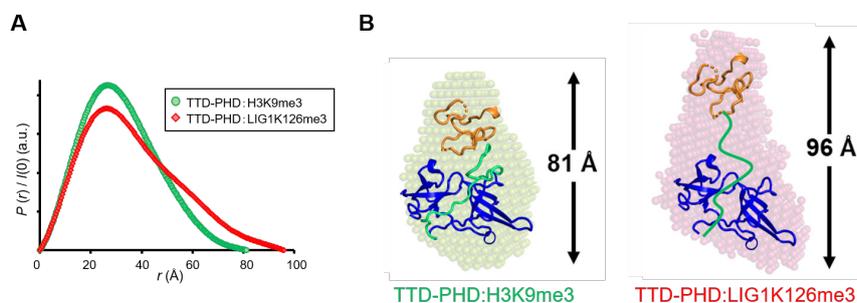


Figure 4 Conformational change of TTD-PHD by binding LIG1K126me3. A), $P(r)$ functions are shown for TTD-PHD in complex with H3K9me3 (green) and LIG1K126me3 (red). B), Low-resolution *ab initio* beads model of the TTD-PHD in complex with H3K9me3 (green) and LIG1K126me3 (red) derived from SAXS data. The ribbon model indicates the crystal structure of TTD-PHD; TTD, linker 2 and PHD are shown as a blue, green and orange, respectively (PDB: 3ASK). The ribbon model in the right panel is manually modified to fit the *ab initio* beads model.

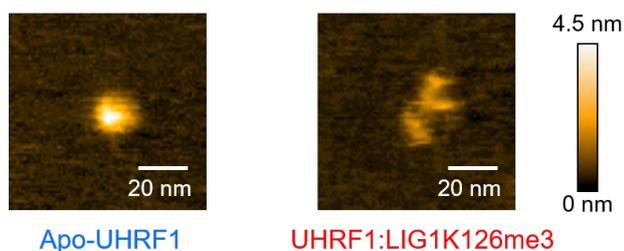


Figure 5 High-speed AFM images showing representative molecular shape of full length apo-UHRF1 (left) and its complex with LIG1K126me3 (right). Right bar represents Z-scale ranging 0 to 4.5 nm

Factory BL-10C で行った。TTD-PHD 単体と比較して、H3K9me3 の結合による慣性半径 (R_g) や分子の最大長 (D_{max}) に大きな変化はなく、SAXS データから構築した低分解能ビーズモデルはコンパクトな構造を示した。一方で、LIG1K126me3 との複合体の TTD-PHD は R_g と D_{max} が増加し、低分解能ビーズモデルは開いた構造へと変化した (Fig. 4B)。以上の結果から、LIG1K126me3 の結合は linker 2 を TTD ドメインの peptide binding groove から追い出し、コンパクトな TTD-PHD の構造を開いた構造に変化させることが明らかとなった。

高速原子間力顕微鏡を用いた全長 UHRF1 と LIG1K126me3 の複合体の解析からも SEC-SAXS と関連したデータが得られ、コンパクトで閉じた構造をとる全長 UHRF1 が、LIG1K126me3 の結合によってフレキシブルな開いた構造に変化した (Fig. 5)。TTD-PHD でみられた局所的な構造変化が、全長 UHRF1 の高次構造変化に影響を及ぼしたと考えられる。

3. おわりに

UHRF1 は様々なタンパク質と相互作用するハブタンパク質として機能する。ユビキチン化ヒストン H3 の脱ユビキチン化を担う USP7 は UHRF1 の spacer に結合し、この相互作用が USP7 の脱ユビキチン化活性に必須である [16]。また、メチル化酵素 G9a は UHRF1 の SRA ドメインから RING ドメインの領域に結合し、がん抑制遺伝子 *p21* のプロモーター活性を阻害することが報告されている [17]。LIG1K126me3 の結合による UHRF1 の高次構造の変化は、UHRF1 と相互作用因子との結合に変化をもたらし、UHRF1 の機能を制御することが考えられる。今後、UHRF1 の高次構造変化の意義を解明することは、UHRF1 の機能制御の理解につながる一つの課題となるだろう。

さらに、本研究成果は、DNA 維持メチル化に関与する UHRF1 が複製因子 LIG1 によってどのように複製サイトへ呼び込まれるかを構造生物学的な観点から初めて解明した。UHRF1 は DNA 維持メチル化に必須の因子である一方で、様々ながん細胞で高発現し、異常な DNA メチル化やがん抑制遺伝子の発現抑制を引き起こすことが知られている。したがって、UHRF1 は薬剤開発の標的分子になると考えられている。本研究の X 線結晶構造解析から、TTD

ドメインの Arg-binding cavity と LIG1 の R121 との結合が高親和性結合に重要であることを同定した。つまり、TTD ドメインの Arg-binding cavity に結合する低分子化合物は TTD ドメインの機能を強力に阻害し、がん細胞で過剰発現した UHRF1 の機能を抑制できると考えられる。

謝辞

本研究は Paris Diderot 大学の Pierre-Antoine Defossez 氏、Laure Ferry 氏らとの共同研究である。この場をお借りして深く御礼申し上げます。また、本研究の放射光実験は、放射光共同利用実験 (課題番号: 2017G161, 2017G146) として、X 線回折実験では BL-17A、X 線溶液散乱では BL-10C を利用してデータ収集を行いました。PF ビームラインスタッフの皆様大変お世話になりましたことを重ねて御礼申し上げます。

引用文献

- [1] E. Li and Y. Zhang, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a019133, (2014).
- [2] K. Arita, M. Ariyoshi, H. Tochio, Y. Nakamura, and M. Shirakawa, *Nature*, **455**, 818, (2008).
- [3] G. V. Avvakumov, J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith, and S. Dhe-Paganon, *Nature*, **455**, 822, (2008).
- [4] H. Hashimoto, J. R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S. E. Jacobsen, and X. Cheng, *Nature*, **455**, 826, (2008).
- [5] W. Qin, P. Wolf, N. Liu, S. Link, M. Smets, F. La Mastra, I. Forné, G. Pichler, D. Hörl, K. Fellinger, F. Spada, I. M. Bonapace, A. Imhof, H. Harz, and H. Leonhardt, *Cell Res.*, **25**, 911, (2015).
- [6] A. Nishiyama, L. Yamaguchi, J. Sharif, Y. Johmura, T. Kawamura, K. Nakanishi, S. Shimamura, K. Arita, T. Kodama, F. Ishikawa, H. Koseki, and M. Nakanishi, *Nature*, **502**, 249, (2013).
- [7] S. Ishiyama, A. Nishiyama, Y. Saeki, K. Moritsugu, D. Morimoto, L. Yamaguchi, N. Arai, R. Matsumura, T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, S. Shimamura, F. Ishikawa, S. Tajima, K. Tanaka, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, M. Ikeguchi, A. Kidera, I. Suetake, K. Arita, and M. Nakanishi, *Mol. Cell*, **68**, 350–360, (2017).
- [8] L. Ferry, A. Fournier, T. Tsusaka, G. Adelmant, T. Shimazu, S. Matano, O. Kirsh, R. Amouroux, N. Dohmae, T. Suzuki, G. J. Filion, W. Deng, M. de Dieuleveult, L. Fritsch, S. Kudithipudi, A. Jeltsch, H. Leonhardt, P. Hajkova, J. A. Marto, K. Arita, Y. Shinkai, and P. A. Defossez, *Mol. Cell*, **67**, 550, (2017).
- [9] B. M. Foster, P. Stolz, C. B. Mulholland, A. Montoya, H. Kramer, S. Bultmann, and T. Bartke, *Mol. Cell*, **72**, 739, (2018).
- [10] P. A. DaRosa, J. S. Harrison, A. Zelter, T. N. Davis, P. Brzovic, B. Kuhlman, and R. E. Klevit, *Mol. Cell*, **72**, 753,

(2018).

- [11] K. Arita, S. Isogai, T. Oda, M. Unoki, K. Sugita, N. Sekiyama, K. Kuwata, R. Hamamoto, H. Tochio, M. Sato, M. Ariyoshi, and M. Shirakawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 12950, (2012).
- [12] N. Nady, A. Lemak, J. R. Walker, G. V. Avvakumov, M. S. Kareta, M. Achour, S. Xue, S. Duan, A. Allali-Hassani, X. Zuo, Y.-X. Wang, C. Bronner, F. Chédin, C. H. Arrowsmith, and S. Dhe-Paganon, *J. Biol. Chem.*, **286**, 24300, (2011).
- [13] J. Fang, J. Cheng, J. Wang, Q. Zhang, M. Liu, R. Gong, P. Wang, X. Zhang, Y. Feng, W. Lan, Z. Gong, C. Tang, J. Wong, H. Yang, C. Cao, and Y. Xu, *Nat. Commun.*, **7**, 11197, (2016).
- [14] K. A. Gelato, M. Tauber, M. S. Ong, S. Winter, K. Hiragami-Hamada, J. Sindlinger, A. Lemak, Y. Bultsma, S. Houliston, D. Schwarzer, N. Divecha, C. H. Arrowsmith, and W. Fischle, *Mol. Cell*, **54**, 905, (2014).
- [15] S. B. Rothbart, B. M. Dickson, M. S. Ong, K. Krajewski, S. Houliston, D. B. Kireev, C. H. Arrowsmith, and B. D. Strahl, *Genes Dev.*, **27**, 1288, (2013).
- [16] Z.-M. Zhang, S. B. Rothbart, D. F. Allison, Q. Cai, J. S. Harrison, L. Li, Y. Wang, B. D. Strahl, G. G. Wang, and J. Song, *Cell Rep.*, **12**, 1400, (2015).
- [17] J. K. Kim, P.-O. Estève, S. E. Jacobsen, and S. Pradhan, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 493, (2009).

(原稿受付日：2019年6月21日)

著者紹介

郡聡実 Satomi KORI

横浜市立大学 生命医科学研究科

博士後期課程1年

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29

TEL: 045-508-7301

FAX: 045-508-7365

e-mail: w195502g@yokohama-cu.ac.jp

最近の研究：複製と連携したDNA維持メチル化の構造生物学的研究。

趣味：二郎系ラーメン食べ歩き。

有田恭平 Kyohei ARITA

横浜市立大学 生命医科学研究科 准教授

e-mail: aritak@yokohama-cu.ac.jp

略歴：2006年横浜市立大学生体超分子システム科学専攻博士課程修了，2010年京都大学工学研究科助教，2013年横浜市立大学生命医科学研究科准教授 博士（理学）。

最近の研究：DNA維持メチル化の分子機構の解明。

趣味：カフェ巡り。ランニング。