

京都大学	博 士（理 学）	氏名	木崎 誠一朗
論文題目	Chemical Biology Study on DNA Epigenetic Modifications (DNAエピジェネティック修飾に関するケミカルバイオロジー研究)		
(論文内容の要旨)			
DNA methylation plays a role to impart additional information to DNA. In eukaryotic cells, DNA methylation mainly occurs at C5 position of cytosine. Cytosine methylation is mostly observed on CpG dinucleotide context, and about 70-80% of all CpGs are methylated in mammalian genome. DNA methyltransferase (DNMT) family proteins catalyze the methyl transfer reaction from <i>S</i>-adenosylmethionine to cytosine, forming 5-methylcytosine (mC). Generally, cytosine methylation leads to suppression of gene expression. DNMT1 is a maintenance DNA methyltransferase, which acts on hemimethylated CpG to form full-methylated CpG. DNMT3A and DNMT3B are <i>de novo</i> DNA methyltransferase. Although DNA methylation is a relatively stable epigenetic modification compared with histone modifications, demethylation is observed in early embryonic development and gametogenesis. DNA demethylation can occur either passively or actively. Passive demethylation is achieved by DNA replication in the absence or under suppression of maintenance DNA methyltransferase DNMT1. It is known that genome-wide active demethylation occurs in primordial germ cells and zygote, and locus-specific active demethylation takes place in neurons and T lymphocytes. However, the precise mechanism of active demethylation has yet to be revealed. In 2009, TET family proteins were discovered to possess the activity to oxidize the methyl group of mC to form 5-hydroxymethylcytosine (hmC). Furthermore, in 2011 stepwise oxidation of hmC to 5-formylcytosine (fC) and 5-carboxycytosine (caC) by TET proteins was revealed. Currently, these oxidized derivatives of mC are considered to be intermediates for active demethylation. 1. To evaluate the ability of TET proteins to oxidize mC, 20-mer or longer DNAs containing mC have been incubated with TET protein, followed by enzymatic digestion, and TLC, mass spectroscopy, or liquid chromatography analysis. However, these methods require many steps and are time-consuming. In this study, we presented a simple and versatile method for the assessment of iterative oxidation of mC by TET protein. We demonstrated that 4- to 6-mer DNAs can be substrates of TET protein. In particular, 6-mer DNAs were much more reactive than conventional 20-mer DNAs. Although there is a report about the effects of substrate length on AlkB, ABH2, and ABH3 proteins, this is the first study which has shown the effect of substrate length on TET protein. By using 6-mer DNA (5'-dCGmCGCG-3'), it is possible to readily			

observe the oxidation of mC to hmC, fC, and caC with no enzymatic digestion. We also demonstrated that TET protein favors single-stranded DNA over double-stranded DNA.

2.Details of the oxidation reaction of mC by TET proteins are still poorly understood. Evaluation of genomic-level epigenetic changes by TET protein requires unbiased identification of the highly selective oxidation sites. In this study, we used high-throughput sequencing to investigate the sequence specificity of mC oxidation by TET1. A 6.6×10^4 -member mC-containing random DNA sequence library was constructed. The library was subjected to TET-reactive pulldown followed by high-throughput sequencing. Analysis of the obtained sequence data identified the TET1-reactive sequences. We identified mCpG as a highly reactive sequence of TET1 protein. The sequence specificity of the oxidation reaction was lost when we use higher concentration of TET1 protein.

3.The wrapping and unwrapping of the nucleosome, which is a fundamental packing unit of chromatin, are tied to the regulation of gene expression. The accessibility of DNA within nucleosomes is controlled not only by chromatin-remodeling molecules, but also by chemical modifications of histones and DNA. Understanding the structural changes of a nucleosome during epigenetic modifications is a key to unravel the mechanisms of gene regulation. In this study, we reconstituted nucleosomes using methylcytosine- or hydroxymethylcytosine-substituted DNA, and analyzed their morphological features by atomic force microscopy (AFM). Our results indicate that cytosine methylation induces overwrapping of the DNA around the histone octamer, whereas cytosine hydroxymethylation has a lesser effect on the over- wrapping of the DNA. These results suggest that two types of DNA modification yield different wrapping states of nucleosomes, which may contribute to the compaction and relaxation of the chromatin structure.

4.In this study, we reconstituted positioned mononucleosomes using CpG-methylated 382 bp DNA containing Widom 601 sequence and recombinant histone octamer, and subjected the nucleosome to treatment with TET1 protein. The sites of oxidized methylcytosine were identified by bisulfite sequencing. We found a significant difference in the activity of TET proteins toward mCs located in the core and linker DNA regions. In cells, the activity of TET proteins should be stringently regulated. The inefficient oxidation by TET protein of the core DNA region may be important for preventing aberrant DNA demethylation. During the reprogramming process, mCs in CpG islands are demethylated in a wide region of the genome. The assistance of chromatin remodeling factors to enable the access of TET protein to DNA seems essential for this process.

(論文審査の結果の要旨)

5-メチルシトシン (mC) は核酸塩基の一つであるシトシンがDNAメチル基転移酵素 (DNMT) の働きによってメチル化されたもので、エピジェネティック修飾として、遺伝子発現の制御に関わっていることが知られている。2009年にTETタンパク質ファミリーに、この5-メチルシトシンを5-ヒドロキシメチルシトシン (hmC) へと変換する活性があることが発見された。2011年にはTETタンパク質ファミリーは5-ヒドロキシメチルシトシンを更に酸化して、5-ホルミルシトシン (fC) と5-カルボキシシトシン (caC) へと変換することも報告された。

申請者は5'-dCGmCGCG-3' という配列を持つ六量体DNAを作成し、このDNAを用いることで、TETタンパク質の活性を簡便に評価することができることを示した。また、申請者は様々な塩基配列の四量体、五量体、六量体DNAを作成し、それぞれのDNAのTETタンパク質による酸化反応の反応性の違いの検討を行った。その結果、TETタンパク質は酸化反応のために、mCの3'側に最低3塩基(アデニンを除く)が必要であることを明らかにした。

次に申請者は、TETタンパク質によるmC酸化反応の配列選択性を網羅的に調べるために、次世代シーケンサー(NGS)を用いた研究を行った。この研究では、mCの両側の4塩基がランダム化されたDNAを作成し、TETタンパク質による反応を行い、抗hmC抗体を用いて酸化されたDNAだけをプルダウンして、NGSによるシーケンシングを行った。その結果、TETタンパク質はその濃度が低いときはmCpGという配列を選択的に酸化するのに対し、その濃度が高いときはどのような塩基配列でも酸化するということが明らかにした。

続いて申請者はmCやhmCといったエピジェネティック修飾塩基がヌクレオソームの構造に与える影響について評価を行うために、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた研究を行った。初めに、601配列と呼ばれる、ヌクレオソームを形成しやすい塩基配列を持つ382塩基対のDNAをPCRによって作成した。この際、すべてのシトシンがmC或いはhmCに置き換わったDNAも作成した。これら3種類のDNAを用いてヌクレオソーム再構成を行い、AFMによる観察を行った。その結果、mCはヌクレオソームの構造をよりコンパクトにするのに対し、hmCはその構造を少し緩めるということが明らかになった。

最後に申請者は、ヌクレオソーム上におけるTETタンパク質の反応性の評価を行った。この研究においても、601配列を含む382塩基対のDNAを作成し、メチル化酵素によりCpG配列のシトシンのメチル化を行い、このDNAを用いてヌクレオソーム再構成を行った。これをTETタンパク質と反応させて、どのmCが酸化されたかを調べた。その結果、TETタンパク質はリンカーの部分に存在するmCを選択的に酸化することが明らかになった。

以上、本論文では、ケミカルバイオロジーの手法を用いて、TETタンパク質の反応性について検討を行った。一連の研究は、エピジェネティック修飾で注目されているTETタンパク質の反応性の分子レベルでの理解に貢献したと考えられる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成29年1月17日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降