

# DNA 甲基化与组蛋白甲基化的关系

李建许, 刘红林

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

**摘要:**在真核生物基因组及基因组以外,存在着多种共价修饰,其中,DNA 和组蛋白的甲基化都与基因的沉默存在着联系,DNA 和 H3K9 的甲基化在调节基因过程中具有协同作用,并拮抗 H3K4 的甲基化。近来的研究显示,两种甲基化机制之间似乎还存在着联系,即 DNA 的甲基化可能依赖于 H3K9 的甲基化,但在哺乳动物中,两种甲基化的关系可能更复杂。

**关键词:**DNA; 组蛋白; 甲基化; 甲基转移酶

中图分类号:Q953

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)02-0267-04

## The Relationship of DNA Methylation and Histone Methylation

LI Jan-Xu, LIU Hong-Lin

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**In and out of the eukaryotic genomes, there exist many covalent modifications, of which are the methylation of DNA and histones, and they are both involved in genes silencing, in which the methylation of DNA and H3K9 are synergistic, but the methylation of H3K4 is antagonistic to them. The recent studies show that these two methylations are correlated, that is, DNA methylation is dependent on the methylation of H3K9. However, the relationship of these two methylations is more complicated in mammals than in lower eukaryotes and plants.

**Key words:**DNA; histones; methylation; methyltransferase

长期以来,基因组 DNA 都是生物学家们研究的中心,但是,研究过程中出现的许多现象似乎都与基因本身无关,例如,在哺乳动物中,编码功能蛋白的基因仅占整个基因组的一小部分,而基因以外的区域却存在着大量的非编码序列,例如内含子、重复序列和转座子等,那么,哺乳动物是如何有效地保持这些非编码序列长期的保持沉默,以实现基因的准确表达的;在一些细胞内,为什么肿瘤抑制基因并未发生突变却失活,并导致癌变的可能。深入的研究发现,答案可能存在于基因组外的一些修饰作用,这些修饰包括 DNA 的甲基化和组蛋白尾部的多种共价修饰(乙酰化、磷酸化、甲基化、泛素化和 ADP-核糖体化)<sup>[1]</sup>,并且,各种修饰方式之间并不是孤立的起作用,而是存在着某种内在的联系。已证明,DNA 的甲基化与组蛋白的乙酰化之间存在着拮抗作用<sup>[2]</sup>。最新的研究资料显示,DNA 的甲基化与组蛋白的甲基化之间似乎也存在着某些关系,这里我们就此进行探讨。

### 1 DNA 的甲基化及其作用

50 多年前,在小牛的胸腺中首次发现了 DNA 的甲基化。真核生物中 DNA 的甲基化主要发生于胞嘧啶核苷的嘧啶环上,在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下,嘧啶环第 5 位的氢被一个甲基基团所取代,从而生成 5-甲基胞嘧啶。无论是在植物中还是在动物界,DNA 甲基化都扮演着双重的角色:一方面,它能够使入侵 DNA、营寄生性的转座子元件及其同源序列沉默,从而保持整个基因组的稳定;另一方面,DNA 的甲基化具有调节基因表达的作用,在真核生物的基因组内,有些区域为 CpG 的高频区,称为 CpG 岛(CpG island),约占整个基因组的 1%~2%。CpG 岛多位于基因的启动子区,据资料显示,基因组印记、X 染色体的失活、许多肿瘤相关基因的失活都与基因启动子区 CpG 岛的甲基化有关<sup>[3,4]</sup>。其具体的作用机制目前

收稿日期:2003-05-29;修回日期:2003-09-28

作者简介:李建许(1978-),男,河南人,硕士研究生,研究方向:分子遗传学

通讯作者:刘红林(1966-),男,江苏人,教授,研究方向:动物遗传育种。E-mail:ggcpc@njau.edu.cn

还不清楚,推测可能是 DNA 的甲基化直接抑制了转录起始因子与启动子的结合,或者是 DNA 甲基化所招募的转录阻抑复合物与转录因子竞争启动子上的结合位点,从而阻止转录的起始,进而导致基因的沉默<sup>[2,5]</sup>。需要指出的是,并不是所有的基因都受 DNA 甲基化的调节,一个典型的特例就是植物的 5SrRNA 基因,其序列中的所有胞嘧啶甲基化的有无,都不会对其转录产生影响<sup>[6]</sup>。

## 2 组蛋白的甲基化及其功能

在真核生物中,基因组 DNA 与组蛋白和非组蛋白共同装配形成核小体,核小体以更有序的状态折叠、组装成染色质。组成核小体的组蛋白由一个球形结构域和一个具有延展性并带电荷的突出于核小体的氨基尾巴组成。组蛋白在翻译完成后,其氨基尾巴会发生多种共价修饰,这些修饰方式共同构成了“组蛋白密码”,并调控基因的表达。甲基化就是其中的修饰方式之一,甲基化位点多位于 H3、H4 的赖氨酸和精氨酸残基上,组蛋白 H3 氨基尾段上的 K4 和 K9 便是其中的两个甲基化的常发位点<sup>[1]</sup>。不同位点上甲基化,由不同的酶所负责。例如,在人类中,SUV39H1 特异性的使组蛋白 H3 上的 K9 发生甲基化<sup>[7]</sup>,而 SET7/9 却选择性的催化 K4 位点甲基化的发生<sup>[8,9]</sup>。不同真核生物中催化组蛋白发生甲基化的酶也有所相同,尽管如此,大部分的组蛋白甲基转移酶都含有一个保守的 SET 结构域<sup>[10]</sup>。近几年的研究发现,H3K9 的甲基化与基因的沉默有关,而 H3K4 的甲基化却可以使基因活化,并且,H3K9 的甲基化可招募 HP1(heterochromatin proteins)或其同源物与之结合,从而使基因所在部位异染色质化,这表明,组蛋白的甲基化可能与异染色质的形成有关<sup>[11~13]</sup>。

## 3 DNA 甲基化与组蛋白的甲基化在基因调控中的相关性

早在 1993 年,Vongs 等就从 3 个 DNA 超低甲基化的拟南芥突变群体中分离到一个新的基因座,并命名为 *DDM1* (decrease in DNA methylation)。在 *ddm1* 突变体中,DNA 的甲基化水平比正常个体降低了 70%,一些转座子和重复序列基因由于发生超低甲基化而被激活<sup>[14]</sup>,在发育过程中,突变个体还表现出许多表型畸形,例如,花、叶子某些结构的缺陷<sup>[15]</sup>。但是 *DDM1* 本身并没有甲基转移酶的活性,而是一个类似于 SWI2/SNF2 的染色质重塑因子,其在 DNA 甲基化中的作用机制目前还不清楚,有可能是 *DDM1* 通过改变染色质的结构,从而影响 DNA 甲基转移酶能否接近目的 DNA<sup>[16]</sup>。Gendrel 等于 2002 年发现,*DDM1* 同样也影响组蛋白的甲基化,*DDM1* 的突变虽然不能改变整条染色体上组蛋白的甲基化水平,但是,在异染色质区组蛋白 H3 的甲基化从 K9 残基切换到 K4 残基上。利用 RT-PCR 和 ChIP (chromatin immunoprecipitation) 技术,他们对突变个体

内组蛋白的甲基化以及基因的表达情况进行了检测,并与正常个体进行了对比,在所检测的 52 个序列中,突变个体内有 26 个序列超表达;剩下的 26 个序列在两类个体之间或表达相同或都不表达,在超表达的 26 个序列中,有 20 个序列 H3K9 的甲基化水平降低,或者 H3K4 的甲基化水平升高,或者两者同时出现<sup>[17]</sup>。

Kondo 等于 2003 年选取了 3 种肿瘤细胞系 HCT116、RKO 和 SW48,在 3 种肿瘤细胞系中,3 个肿瘤抑制基因 *P16*、*MLH1* 和 *MGMT* 的启动子的 CpG 岛都因不同程度地发生了超甲基化而不能表达。他们用 TSA(trichostatin A) 抑制组蛋白的脱乙酰化,发现沉默基因座 H3K9 的乙酰化水平有所升高,但对 H3K4 和 K9 的甲基化却没有影响,基因也几乎仍然处于沉默状态。而当用 5Aza-dC (5-aza-2'-deoxycytidine) 阻抑 DNA 甲基转移酶的作用时,H3K9 的甲基化水平大大的降低,而 H3K4 的甲基化水平显著的升高,3 种细胞中原来沉默的癌基因都被重新激活表达<sup>[18]</sup>。

上述试验结果表明,H3K9 的甲基化与 DNA 的甲基化在基因的沉默机制中具有协同作用,而 H3K4 的甲基化拮抗 DNA 甲基化所产生的基因沉默。

## 4 DNA 甲基化与组蛋白甲基化在发生机制上的关系

在雌性哺乳动物中,有一条 X 染色体于胚胎发生的早期失活,并以此状态稳定地遗传下去。Csankovszki 等于 2001 年用 5Aza-dC 阻抑 DNMT1 的活性或者令 *DNMT1* 突变使其失活后,处于沉默状态的 X 染色体又被重新激活。由此可见,DNA 的甲基化在维持 X 染色体的失活中起着非常重要的作用<sup>[19]</sup>。Heard 等<sup>[20]</sup>、Mermoud 等<sup>[21]</sup> 研究发现,在 *Xist* RNA 引发 X 染色体失活的同时,H3K9 也发生甲基化,并形成一个失活中心,随后由 *Xist* RNA 扩展到整个 X 染色体,紧接着,失活的 X 染色体上才会出现 DNA 的甲基化、H4 的低乙酰化等现象,并最终导致 X 染色体的失活,这表明在 X 染色体失活的早期,组蛋白的甲基化也参与了此过程。另外 X 染色体的失活过程似乎传递着这样一条信息:在发生的顺序上,组蛋白的甲基化早于 DNA 的甲基化。那么在甲基化的发生机制上,两者是否也存在着某种联系呢?

在粗糙脉孢菌的基因组中,大约有 1.5% 胞嘧啶发生了甲基化,而且与动物和植物不同的是, DNA 的甲基化对于维持其生长和发育并不是必需的,因此非常适合于研究 DNA 甲基化的调控机制。在研究的过程中,人们分离了多个 DNA 甲基转移酶基因,其中 *DIM-2* (defective in methylation) 的突变可导致整个基因组的去甲基化,而 *DIM-3* 的突变仅引起 50% 的胞嘧啶发生去甲基化。Tamaru 和 Selker 于(2001 年)又偶然得到一种缺乏 DNA 甲基化的粗糙脉孢菌,并且这一突变株的纯合子还表现出部分的表型变异。研

究结果表明, *DIM-5* 的一个位点突变抑制了 DNA 的甲基化, 遗传作图和 DNA 序列分析表明, 染色体上 *DIM-5* 所处的区域包含一个组蛋白甲基转移酶的同源基因, 在酵母、果蝇和哺乳动物中此基因编码的酶与异染色质的形成有关。PCR 扩增突变的 *dim-5* 基因和对阅读框架的测序发现, *dim-5* 第 216 位编码丝氨酸的碱基发生了错义突变, 而此位点正好位于其所编码蛋白的 SET 结构域。前面我们已经提到过, 绝大多数组蛋白甲基转移酶也具有一个 SET 结构域, 那么 *DIM-5* 所编码的 SET 结构蛋白是否也能催化组蛋白的甲基化呢? 为了回答这个问题, 他们将重组的 *DIM-5* 与组蛋白和  $H^3$  标记的  $CH_3$ -AdoMet 共育, 发现组蛋白 H3 被特异性的甲基化了, 但具体的位点不清楚, 接着, 他们突变了粗糙脉孢菌组蛋白 H3 的第 9 位赖氨酸残基, 从而使该位点不能发生甲基化, 结果表明突变所产生的影响与 *DIM-5* 基因突变产生的相同, 由此他们推断, DNA 的甲基化可能依赖于 H3K9 的甲基化<sup>[22]</sup>。

在植物中, *CMT3* (chromomethylase3) 主要负责使 CpNpG 中的胞嘧啶发生甲基化, 在 *cmt3* 突变的拟南芥个体中, CpNpG 的甲基化水平显著的降低, 同时还激活一个逆转座子亚类和 *SUP*、*PAI2* 基因的表达<sup>[23~25]</sup>。Jackson 等于 2002 年在拟南芥中又发现了一个新的基因座, 此基因座含有 3 个等位基因, 他们将此基因命名为 *KYP* (kryptonite), 通过克隆发现, *KYP* 编码一个含有 SET 结构域的蛋白甲基转移酶, 此蛋白特异性的使 H3K9 发生甲基化。试验中, 他们观察到 *KYP* 突变使 CpNpG 的甲基化水平大大降低, 并同时激活 *SUP* 基因的表达, 这恰好与 *CMT3* 突变所产生的影响相同, 这一现象引起了他们极大的兴趣, 起初, 他们推测 *CMT3* 可能与组蛋白 H3 上甲基化的第 9 位赖氨酸直接作用并指导 CpNpG 的甲基化, 这一推测的依据是, 与 HP1 类似, *CMT3* 也含有一个溴域。然而, 重复的试验结果表明, *CMT3* 并不能与甲基化的 K9 结合。那么第二种可能的解释就是, *CMT3* 与 LHP1 (拟南芥菜中 HP1 的同源物) 作用并在 LHP1 的介导下使 CpNpG 发生甲基化, 经过对 LHP1 和 GST-*CMT3* 进行“pull-down”分析, 他们发现 LHP1 确能与 *CMT3* 结合, 由此他们推测 CpNpG 甲基化的机制可能是 H3K9 的甲基化招募 HP1 与之结合, *CMT3* 通过与 LHP1 的作用导致 CpNpG 的甲基化<sup>[26]</sup>。

综上所述, 对于 DNA 的甲基化与组蛋白的甲基化, 我们可以做出如下的推论: H3K9 在组蛋白甲基转移酶作用下发生甲基化, H3K9 的甲基化招募 HP1 或者其同源物与其结合, DNA 甲基化转移酶通过与 HP1 的作用从而使 DNA 发生甲基化(图 1)。但是, Fahrner 等于 2002 年却提出了与之相反的假设, 他们在肿瘤细胞中所做的试验结果与 Kondo 等于 2003 年的相同, 然而, 他们在试验中还发现, 用 5Aza-dC 阻抑 DNA 甲基转移酶的活性时, 首先发生的是 CpG 的去甲基化, 接着基因被激活表达, 最后才出现组蛋白

共价修饰的完全逆转, 由此他们提出了一种 DNA 甲基化与组蛋白甲基化之间新的作用模式, 与以上的假设相反, 组蛋白的甲基化需要在 DNA 甲基化的指导下才能完成<sup>[27]</sup>。Fuks 等于 2003 年的试验结果似乎也证实并进一步丰富了这一假设, 他们的试验结果显示, DNA 甲基结合蛋白 MeCP2 的氮端还能与组蛋白甲基转移酶结合, 从而指导 H3K9 发生甲基化<sup>[28]</sup>。这一试验结果也正好解释了为什么用 TSA 阻抑组蛋白脱乙酰化酶的活性时仅能部分或不能使沉默的基因表达<sup>[20, 29]</sup>, 组蛋白的甲基化可能是基因沉默的另一个通路。这种方式为动物所特有, 在植物中, DNA 的甲基化好像并不能控制 H3K9 的甲基化<sup>[30]</sup>。所以, 哺乳动物中, 两种甲基化的关系可能更为复杂。

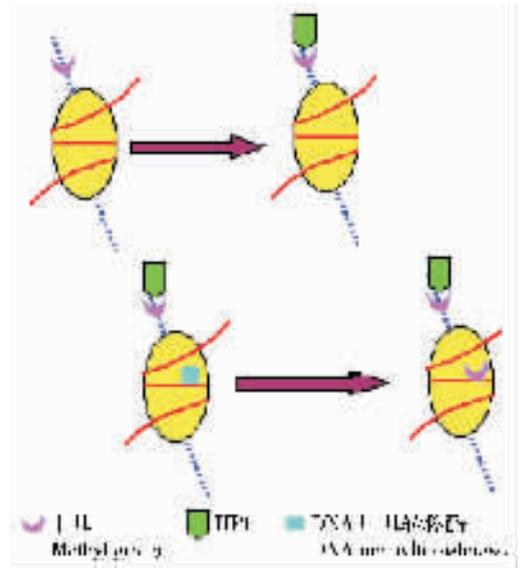


图 1 两种甲基化在发生机制上的关系

Fig. 1 The relationship of these two methylations on occurring mechanisms

## 5 展望

DNA 的甲基化和组蛋白的甲基化在基因转录过程中都起着很重要的调节作用。关于两种甲基化的发生机制, 目前还没有弄清楚。深入的阐明两种甲基化的关系, 将有助于我们进一步了解基因的调控机制, 特别是对于癌症的治疗起到很大的帮助作用。

## 参考文献(References):

- [1] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code. *Science*, 2001, 293:1074~1080.
- [2] Attwood J T, Yung R L, Richardson B C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Lif Sci*, 2002, 59:241~257.
- [3] LIU Hong-Lin. Recent advance in genome "imprint" in mam-

- malian. *Hereditas(Beijing)*, 2000,22(4):269~272.
- 刘红林. 哺乳动物的基因组“印记”研究进展. *遗传*, 2000, 22(4):269~272.
- [4] ZHENG Zhi-Hong, SUN Xiu-Ju, MA Ming-Chao, HAO Dong-Mei, LIU Yan-Hou, SUN Kai-Lai. Studies of promoter methylation status and protein expression of *E-cadherin* gene in associated progression stages of gastric cancer. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(2):103~108.
- 郑志红, 孙秀菊, 马鸣超, 郝冬梅, 刘言厚, 孙开来. 胃癌发展相关阶段中 *E-cadherin* 基因启动子甲基化及蛋白表达的研究. *遗传学报*, 2003, 30(2):103~108.
- [5] Finnegan E J, Kovac K A. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, 2000, 43:189~201.
- [6] Mathieu O, Yukawa Y, Sugiura M, Picard G, Tourmente S. 5SrRNA genes expression is not inhibited by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 29(3):313~323.
- [7] Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl B D, Sun Z W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting, Chris P, Allis C D, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 2000, 406(6796):593~599.
- [8] Wang H B, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine4-specific methyltransferase. *Mol Cell*, 2001a, 8:1207~1217.
- [9] Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis C D, Tempst P, Reinberg D. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*, 2002a, 16:479~489.
- [10] Yeates T D. Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferase make their mark. *Cell*, 2002, 111:5~7.
- [11] Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 2001, 410:116~120.
- [12] Bannister A J, Zegerman P, Partridge J F, Miska E A, Thomas J O, Allshire R C, Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo-domain. *Nature*, 2001, 410:120~124.
- [13] Rong W, David M, Gilber W S. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animal. *Chromosoma*, 2002, 111:22~36.
- [14] Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddml* mutation. *Plant cell*, 2000, 12(3):357~368.
- [15] Kakutani T, Jeddelloh J A. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22):12406~12411.
- [16] Jeddelloh J A, Stokes T L, Richards E J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genet*, 1999, 22(1):94~97.
- [17] Gendrel A V, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R A. Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene *DDMI*. *Science*, 2002, 297:1871~1873.
- [18] Kondo Y, Shen L, Issa J P. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1):206~215.
- [19] Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of XistRNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*, 2001, 153:773~783.
- [20] Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis C D, Spectator D L. Methylation of histone H3 at lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*, 2001, 107:727~738.
- [21] Mermoud J E, Popova B, Peters AHFM, Jenuwein T, Brockdorff N. Histone H3 lys 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Bio*, 2002, 12(3):247~251.
- [22] Tamaru H, Selker E U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 2001, 414:277~283.
- [23] Lindroth A M, Cao X F, Jackson J P, Zilberman D, McCalum C M, Henikoff S, Jacobsen S E. Requirement of CHROMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 2001, 292:2077~2080.
- [24] Bartee L, Malagnac F, Bender J. *Arabidopsis* cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev*, 2001, 15:1753~1758.
- [25] Kato M, Miura A, Bender J, Kakutani T. Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposon in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2003, 13(5):421~426.
- [26] Jackson J P, Lindroth A M, Cao X F, Jacobsen S E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416:556~560.
- [27] Fahrner J A, Eguchi S, Herman J G. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res*, 2002, 62(24):7213~7218.
- [28] Fuks F, Hurd P J, Wolf D, Nan X S, Bird A D. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 2003, 278(6):4035~4040.
- [29] Shaker S, Bernstein M, Momparler L F, Mmomparker R L. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res*, 2003, 27(5):437~444.
- [30] Johnson L M, Cao X F, Jacobsen S E. DNA Methylation and Histone H3 Lysine 9 Methylation. *Curr Biol*, 2002, 12(16):1360~1367.