

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05741

研究課題名（和文）DNAメチル化とH3K9me3の確立と維持の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for establishment and maintenance of DNA methylation and histone H3K9me3

研究代表者

有田 恭平（Arita, Kyohei）

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：40549648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 62,000,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現抑制的な非ゲノム情報（DNAメチル化，H3K9me3）の確立と、細胞増殖に伴う維持の構造基盤の解明を目指した。H3K9me3の確立ではSETDB1に焦点をあて、ユビキチン化SETDB1の調製方法を確立した。DNA維持メチル化では、維持型メチル化酵素DNMT1の新規の活性制御機構を発見した。母性因子DPPA3によるUHRF1の機能阻害機構の構造基盤を溶液NMR法で解明した。クロマチンリモデラーHELLSの制御因子CDCA7がヘテロクロマチン領域独自の維持メチル化を制御する因子であることを明らかにした。本研究成果は、非ゲノム情報複製の新しい制御機構を提唱につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、非ゲノム情報であるDNAメチル化の維持機構を構造生物学的に明らかにして、DNAメチル化が個体の生涯を通して維持される生物学的に重要な分子機構の理解につながった。また、DNAメチル化の異常がもたらすがんの薬剤開発に向けて、DNA維持メチル化因子UHRF1の機能阻害剤の探索に成功した。今後の抗がん剤開発につながる研究成果を得た。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish a structural basis for the replication of non-genome, especially DNA methylation and H3K9me3. Regarding H3K9me3, we established the preparation of ubiquitinated SETDB1, which is an enzymatically activated form. Cryo-EM analysis revealed a novel activation mechanism of the maintenance methyltransferase DNMT1 in DNA maintenance methylation. The structural basis for the inhibition of UHRF1 function by the maternal factor DPPA3 was elucidated using solution NMR. As a developmental study, a combination of computational science and structural biology was used to search for functional inhibitors of UHRF1, and compounds that inhibit binding to LIG1 were successfully identified. These findings led to the proposal of a novel regulatory mechanism for replication of the non-genome.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 DNA維持メチル化 UHRF1 DNMT1 DPPA3 非ゲノム情報複製 cryo-EM X線結晶構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストンに起こるメチル化はわずかに+14 Da (トリメチル化: +42 Da) の質量変化にも関わらず、クロマチンの高次構造やダイナミクスを制御する重要な非ゲノム情報として働く。DNA メチル化と H3K9me3 は関連した機能を持ち、分化した細胞に不要な遺伝子、レトロトランスポゾン、反復配列からの遺伝子発現を抑制する。従って、DNA メチル化や H3K9me3 の遺伝子発現抑制的な非ゲノム情報は細胞分化の過程で正確に書き込まれ、多細胞形質体を維持するために体細胞では複製・分裂後も正確に継承される必要がある。

DNA 維持メチル化には、ユビキチン E3 酵素 UHRF1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 が必須である。申請者はその構造基盤を解明してきたが、近年 DNA 複製と連携した DNA 維持メチル化の新しい分子機構を解明しつつある。申請者は、岡崎フラグメントを連結する DNA ligase1 (LIG1) は、K126 のメチル化依存的に UHRF1 を複製サイトに呼び込むことを明らかにし、複製因子が DNA 維持メチル化を制御することを初めて報告した (Ferry, Mol Cell, 2017; Kori, Structure 2019)。さらに DNA クランプである PCNA に結合する複製因子 PAF15 の K15 と K24 は、UHRF1 によってマルチ-モノユビキチン化される。このユビキチン化 PAF15 は DNA 維持メチル化酵素 DNMT1 をヘミメチル化 DNA に呼び込むシグナルとして働き、DNA 維持メチル化を制御することを明らかにした (論文投稿中)。

興味深いことに PAF15 のユビキチン化サイトは PCNA の 3 量体リング構造の内側を通過し、複製が完了した back face に突き出ることが報告されている (図 1; De March, NAR, 2018)。このことから DNMT1 はユビキチン化 PAF15 によって、DNA 複製が完了しヘミメチル化 DNA に富む back face に呼び込まれ効率的に新生鎖をメチル化する新しい分子機構が存在すると考えられる。

SETDB1 は H3K9 をメチル化し、遺伝子サイレンシングやレトロトランスポゾンの不活性化に関与するヒストンメチル化酵素である。SETDB1 は N 末端から Triple tudor ドメイン, MBD ドメイン, ヒストンメチル化活性を有する SET ドメインから成る。様々なヒストンメチル化酵素の SET ドメインの構造解析例は多数あるが、SETDB1 の SET ドメインの立体構造は不明である。理由として、SETDB1 の SET ドメイン内の 300 残基に達する長い insertion による構造不安定化が考えられる。2016 年にこの insertion の K867 の E3 酵素非依存的なモノユビキチン化が、SETDB1 のヒストンメチル化活性を亢進することが報告された (Sun, Mol Cell, 2016)。一方で、ユビキチンのタンパク質間相互作用に重要な分子表面である I44 パッチの変異体は、SETDB1 のメチル化活性を促進しないことが明らかになった。これらより、ユビキチンが SETDB1 の構造形成を促す分子シャペロン様の働きを担っていることが考えられる。

DNA 維持メチル化には、DNA メチル化酵素 DNMT1 とその呼び込み因子 UHRF1 が必須である。DNA 複製後に一過的に生じたヘミメチル化 DNA を UHRF1 が認識し、近傍のヌクレオソーム中のヒストン H3 をユビキチン化する。我々は、2017 年に DNMT1 が RFTS ドメインでユビキチン化ヒストン H3 を認識し、片鎖メチル化 DNA へ呼び込まれることを報告した (Ishiyama et al., Mol Cell 2017)。さらに、ユビキチン化ヒストン H3 は、DNMT1 の酵素活性を促進することも明らかにしましたが、ユビキチン化ヒストン H3 の結合が DNMT1 の構造をどのようにダイナミックに変化させて活性化するのは不明であった。

卵子形成において、初期胚、始原生殖細胞、卵細胞で特異的に発現する母性因子 DPPA3 (Developmental Pluripotency Associated 3, 別名 Stella, PGC7) が UHRF1 の機能を阻害することが報告された (Li et al., Nature 2018)。DPPA3 は、卵子形成の過程で UHRF1 に結合し、UHRF1 をクロマチンから引き剥がして核外に輸送する。DPPA3 遺伝子をノックアウトしたマウスの卵母細胞では、UHRF1 は核内に局在し、DNMT1 と共に異常な DNA メチル化を起こす。その結果、卵母細胞は正常な機能を維持できず、その後の受精卵は最初の細胞分裂後である 2 細胞期までに死に至る。従って、卵母細胞における UHRF1 と DPPA3 の相互作用が、正常な卵子形成とその後の胚発生、つまり生命の誕生に必須である。しかし、卵子形成の過程で DPPA3 が UHRF1 のクロマチン結合をどのように阻害して、その働きを阻害しているかは不明であった。

DNA 維持メチル化が正常に働かなくなると、がんの抑制に働く遺伝子が発現しなくなったり、ゲノム全体の不安定化が起こる。その結果、細胞ががん化する。DNA 維持メチル化には、DNA メチル化酵素 DNMT1 とその働きを補助する UHRF1 タンパク質が必ず作用するが、様々ながん細胞においてこの UHRF1 タンパク質が過剰発現しており、がん細胞の異常増殖と関連することが報告されている。UHRF1 は 5 つの機能ドメインで構成され、我々は 2017 年に、UHRF1 の機能ドメインの一つである TTD ドメインが、リジン 126 がメチル化された LIG1 (LIG1K126me3) と結合し、これにより UHRF1 が DNA 複製サイトに呼び込まれることを報告した。2019 年には UHRF1-TTD ドメインと LIG1K126me3 との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析で決定した。この立体構造の解明から、TTD ドメインと LIG1 の結合には、TTD ドメインの「アルギニン結合溝」と名付けたポケットと LIG1 のアルギニン 121 の相互作用が重要であることが分かった。UHRF1 の機能を阻害するためにこのアルギニン結合溝に注目した。UHRF1 は DNA 維持メチル化の初期の過程で LIG1 と相互作用するので、LIG1 との結合を阻害する化合物はがん細胞での UHRF1 の機能を阻害し、がん細胞で見られる異常

な DNA メチル化の改善につながると期待した。

2. 研究の目的

【研究項目 1: ユビキチン化 PAF15 による processivity な DNA 維持メチル化の解明】PCNA : PAF15Ub2 : DNMT1 の 3 者複合体、または DNA を加えた 4 者複合体を再構成して、その複合体構造をクライオ電子顕微鏡を中心としたマルチスケールな構造生物学で解明する。DNMT1 が効率的に新生鎖をメチル化する機構を明らかにし、PCNA の back face で働く新しい生命現象を提唱する。

【研究項目 2: SETDB1 のモノユビキチン化による機能制御の構造基盤】ユビキチン化 SETDB1 を再構成して、その立体構造を X 線結晶構造解析や X 線溶液散乱と分子動力学計算を組み合わせた MD-SAXS 法で解析する。ユビキチン化が引き金となる、SETDB1 の立体構造形成 (folding) と酵素活性化の共役機構 (Coupled Folding and Activation 機構) を解明し、ユビキチン化と連携した H3K9me3 の複製と確立の分子機構を提唱する。

【研究項目 3: ユビキチン化 H3 による DNMT1 の活性化の構造基盤】ユビキチン化 H3 と DNMT1 の複合体を調製し、その構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析で決定する。ユビキチン化 H3 による DNMT1 の活性化を原子レベルの分解能で解析し、その詳細なメカニズムを明らかにする。

【研究項目 4: 母性因子 DPPA3 による UHRF1 の機能阻害の構造基盤】天然変性タンパク質 DPPA3 と UHRF1 の複合体構造を決定し、詳細な構造情報に基づいて DPPA3 の作用様式を明らかにする。これにより DPPA3 による DNA 脱メチル化の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

X 線結晶構造解析、Cryo-EM 単粒子解析、X 線溶液散乱、溶液 NMR、in vitro ユビキチン化実験、等温滴定型カロリメトリー (ITC)、in vitro DNA メチル化実験

4. 研究成果

1. PCNA-ユビキチン化 PAF15-DNMT1 の複合体構造解析に向けた試料調製とクライオ電子顕微鏡による構造決定

均一にユビキチン化された PAF15 を調製するために、PAF15 のユビキチン化されるリジン残基をシステイン残基に置換して、G76C ユビキチンとジスルフィド結合で連結させたユビキチン化 PAF15 アナログを調製した (PAF15-Ub2)。Native Gel Shift Assay で PCNA と DNA の結合は見られなかったが、PAF15 または PAF15-Ub2 を加えると PCNA が DNA に結合した。PCNA:PAF15-Ub2:DNA の 3 者複合体をクライオ電子顕微鏡で観察した。その結果、DNA の末端で PCNA が留まっている粒子像を再構成できた。しかし、PAF15 やユビキチンに相当する電顕マップは観測できず、PAF15-Ub2 が PCNA を DNA に係留させる機構はわからなかった。同じ電顕観察像から PCNA と PAF15 の複合体構造を 4.1 分解能で解析できた。PCNA の分子量は 9 万弱だが、PCNA の特徴的なリング構造が電顕画像からの粒子の抽出に有利に働いたと考えられた。上記 3 者複合体に DNMT1 を加えた 4 者複合体のクライオ電顕による構造解析を目指した。DNMT1 を昆虫細胞で発現させ、高純度に精製した。PCNA:PAF15ub2:DNA の 3 者複合体に DNMT1 を加えてその複合体構造をクライオ電子顕微鏡で観察した。その結果、4 者複合体から DNA が解離している分子が多いなどの問題点はあったが、DNMT1 と考えられる粒子が PCNA の片側のみに存在していることがわかった。このことは、PAF15-Ub2 によって DNMT1 は PCNA の片側に集積し、新生鎖をメチル化する機構を反映していると考えられる。しかし、DNA が解離している粒子が多い問題点が浮上した。そこで、DNA を安定的に複合体に留めるために DNA pol を加えた 5 者複合体の調製を行った。5 者を混ぜ合わせクライオ電顕で粒子を観察した。粒子ピッキングをし、2 次元クラス分けを行った。しかし、明確に 5 者複合体に相当する粒子像を選別できておらず、5 者複合体が不安定で解離していることが考えられた。

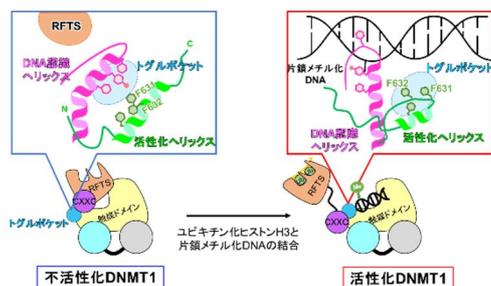
【2. ユビキチン化 SETDB1 の調製とクライオ電子顕微鏡による構造解析】

SETDB1 はヒストン H3 の 9 番目のリジン残基をトリメチル化する酵素であり、ヘテロクロマチン構造の形成を促進し、遺伝子発現または内因性レトロウイルスの転写を制御する。SETDB1 のヒストンメチル化活性は、C 末端にある保存された SET ドメインが担っており、SET ドメイン内には約 300 アミノ酸からなる長い insertion が存在し SET ドメインを分断する。SETDB1 の insertion 内の 867 番目のリジン (K867) がモノユビキチン化されることが、ヒストンメチル化活性に重要である。SETDB1 は初期の発生や細胞分化、またその他の細胞機能において重要な役割を果たす。また、SETDB1 の異常な発現は様々な疾患で見られ、特に癌において過剰発現している。SETDB1 は様々な疾患に関連し生体内で重要な役割を担っているにも関わらず、その酵素活性化機構は未だに明らかになっていない。SETDB1 は様々な疾患の治療標的であり、酵素活性化機構の解明は、SETDB1 の活性を阻害する創薬の応用に繋がる。

立体構造解析に向けて、大腸菌内でモノユビキチン化 SETDB1 を調製するために、大腸菌内ユビキチン化プラスミドを構築した。典型的なタンパク質のユビキチン化には、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3) の 3 つの酵素で段階的に行われる。しかし、SETDB1 のユビキチン化には E3 酵素を必要としないので、本研究では、E1、

UBE2E1 (E2), ユビキチンの 3 つの遺伝子をコードしたプラスミドを作製した。このユビキチン化プラスミドと、SETDB1 をコードする発現プラスミドを大腸菌内で共発現させた結果、部位特異的に SETDB1 の K867 のモノユビキチン化に成功した。また、未修飾の SETDB1 とモノユビキチン化 SETDB1 をそれぞれ精製し、MALDI-TOF/MS を用いて *in vitro* で SETDB1 ヒストン H3 メチル化活性を測定した。未修飾の SETDB1 ではヒストンメチル化活性は見られなかったが、モノユビキチン化 SETDB1 ではヒストンメチル化活性が見られた。このことから、大腸菌内ユビキチン化システムにより、酵素活性化型のモノユビキチン化 SETDB1 の調製に成功し、その有用性を示すことができた。精製タグ MBP を融合したユビキチン化 SETDB1 の構造解析を行うために、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析と X 線結晶構造解析を試みた。分散状態のよい電顕観察用のグリッドを作成し、加速電圧 300kV の Krios G4 を用いて観察を行った。その結果、MBP とユビキチン化 SETDB1 に相当すると考えられる 2 つの塊から成る 3 次元マップの構築に成功した。しかし、分子のフレキシビリティに起因して分解能が上がらず、ユビキチン化による SETDB1 の活性化の詳細なメカニズムの解析には至らなかった。また、並行して行った結晶化も、ユビキチン化 SETDB1 の良質な結晶が得られず構造解析に至らなかった。今後はヌクレオソームと SETDB1 の複合体を調製するなど、分子の大きさをかさ増ししたサンプルを調製して、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行う予定である。

【3. クライオ電子顕微鏡単粒子解析による DNMT1 の酵素活性化機構の解明】



クライオ電子顕微鏡でDNMT1の新しい活性化機構を解明

- DNMT1:H3ub2:ヘミメチル化DNAの3者複合体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析で決定
- N末端領域の活性化ヘリックスを発見
- 活性化ヘリックス中のF631・F632は哺乳類細胞でのDNAメチル化維持に重要である

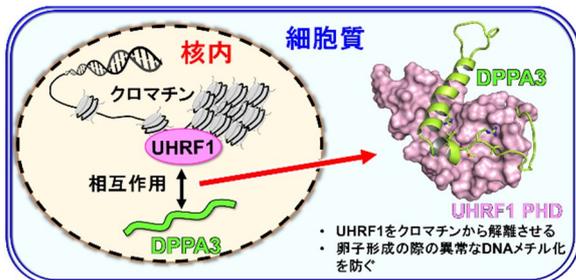
DNMT1-ユビキチン化ヒストン H3-ヘミメチル化 DNA 複合体の 3 者複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡で 2.5 Å の高分解能で決定しました。DNMT1 は 5 つの機能ドメインから成る。DNA やユビキチン化ヒストン H3 が結合していない DNMT1 では、アミノ末端に位置する RFTS ドメインが触媒ドメインの DNA 結合部位に入り込んでおり、自己活性阻害型の構造を形成する (Zang et al., JMB 2015)。本研究で決定した活性化型 DNMT1 の構造では、ユビキチン化ヒストン H3 とヘミメチル化 DNA の結合によって、RFTS ドメインは触媒ドメインから完全に解離していることがわかった。

さらに DNMT1 の RFTS ドメインと CXXC ドメインの間に活性化のカギとなるモチーフ (活性化ヘリックス) と、触媒ドメインに活性を制御する疎水性ポケット (トグルポケット) があることを発見した。DNMT1 の触媒ドメインには DNA の認識に働く DNA 認識ヘリックスがある。不活性化型 DNMT1 では、トグルポケットに DNA 認識ヘリックスが曲がった状態で入り込んでいることがわかった。一方で活性化型 DNMT1 では、トグルポケットに活性化ヘリックスが入り込んでいた。これにより、DNA 認識ヘリックスはまっすぐ伸びた状態になり、DNA に結合できる状態になることがわかった。つまりトグルポケットに入る領域が異なることで、DNMT1 の活性が制御されることが明らかになった。

DNMT1 のトグルポケットには、活性化ヘリックス中の 2 つのフェニルアラニン残基 (F631/F632) が入り込んでいた。そこで、活性化ヘリックス中の F631/F632 が DNMT1 の活性化に重要であると考え、フェニルアラニンをアラニンに置換した変異体 DNMT1 を作成して、その機能を評価した。試験管内で変異体 DNMT1 の機能を生化学的に検証した結果、変異体 DNMT1 はヘミメチル化 DNA への結合が著しく低下し、その結果 DNA メチル化活性が野生型 DNMT1 に比べて大幅に減少することがわかった。この変異体 DNMT1 の機能を、アフリカツメガエルと大腸がん細胞株 HCT116 を用いて評価した。その結果、変異体 DNMT1 は細胞内で DNA メチル化の維持ができなくなっていることがわかった。これらの結果により、クライオ電子顕微鏡による構造解析で同定した DNMT1 の新規の活性制御モチーフは、DNMT1 が細胞内で正常な機能を発揮するためにも重要であることがわかった。この活性化ヘリックス中の 2 つのフェニルアラニン残基は脊椎動物で高度に保存されており、活性化ヘリックスによる DNMT1 の活性化は種を超えた分子メカニズムであることが考えられる。

【4. DPPA3 による UHRF1 の機能阻害の構造基盤の解明】

DPPA3 が UHRF1 と相互作用するための必要最小限領域の同定を生化学的な研究手法で解明した。UHRF1 はアミノ末端から UBL, TTD, PHD, SRA, RING の 5 つのドメインから構成されるが、そのうちヒストン H3 や複製因子 PAF15 と相互作用する PHD ドメイン (302-372 アミノ酸残基、以下 UHRF1 PHD) が DPPA3 との相互作用を担う領域であることがわかった。一方で、DPPA3 は 150 アミノ酸残基から成る天然変性タンパク質であるが、カルボキシ末端領域の 76-127 アミノ酸残基 (以下 DPPA3c) が UHRF1 PHD との相互作用に必須であることがわかった。



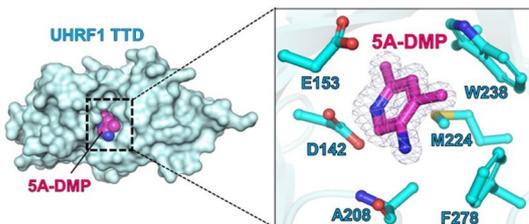
卵子や初期胚におけるDPPA3によるUHRF1の機能阻害の構造基盤を説明

- ・天然変性タンパク質DPPA3がUHRF1 PHD fingerに結合する様子を溶液NMRで説明
- ・DPPA3はヘリックス構造を誘起して強固にUHRF1と結合する
- ・UHRF1との相互作用を弱める変異体はUHRF1のクロマチン局在の阻害ができず、DNA脱メチル化も促進できない

これまでの研究から、UHRF1 PHD はヒストン H3 のアミノ末端の ART 配列や、PAF15 のアミノ末端の VRT 配列と結合することが知られていた。一方で DPPA3 は、88-90 番目のアミノ酸残基の VRT 配列に加えて、短い α ヘリックスと長い α ヘリックスも使って UHRF1 PHD と相互作用し、この広い相互作用面によって、DPPA3 は UHRF1 PHD にヒストン H3 や PAF15 よりも 70 倍も強い親和性で結合することがわかった。UHRF1 のクロマチンへの局在は、PHD ドメインによるヒストン H3 への結合が重要であるが、DPPA3 はヒストン H3 よりも強い親和性で UHRF1 と結合でき、DPPA3 は UHRF1 とヒストン H3 の結合を競合的に阻害することで、UHRF1 をクロマチンから解離させその機能を阻害することが考えられた

DPPA3 と UHRF1 PHD の相互作用の機能的な重要性を確認するため、相互作用界面に位置するアミノ酸残基に変異を導入した変異体 DPPA3 を作成して、アフリカツメガエルの卵抽出液やマウス ES 細胞を用いた解析を行った。UHRF1 PHD との相互作用面に存在する DPPA3 の VRT 配列、短い α -ヘリックスや長い α -ヘリックス中のアミノ酸残基に変異を導入した DPPA3 は、UHRF1 PHD との結合が弱くなる、または消失することを試験管内で確認した。さらに、ツメガエル抽出液を用いた実験から、これら変異体 DPPA3 は UHRF1 のクロマチンへの局在を抑制できないことがわかった。ツメガエル抽出液とマウス ES 細胞を用いて DNA メチル化解析を行ったところ、野生型 DPPA3 は UHRF1 をクロマチンから解離させるので、ゲノム DNA の脱メチル化が起こるが、変異体 DPPA3 では DNA の脱メチル化を起こせないことがわかった。構造生物学的に同定した UHRF1 と DPPA3 の相互作用が、細胞内における UHRF1 の機能阻害（クロマチン局在の阻害）に必須であることがわかった。

[その他]



UHRF1の機能阻害剤の探索に成功

- ・200,000化合物の中から、計算科学的に手法によりUHRF1のTTDに結合する化合物を同定
- ・X線結晶構造解析で化合物によるUHRF1の機能阻害様式を説明
- ・化合物がUHRF1の結合因子であるLIG1の結合を阻害し、PPI創薬につながる構造基盤を提唱

以下のように計算科学的な手法を用いて、約 20 万個の化合物ライブラリから UHRF1-TTD ドメインのアルギニン結合溝に結合する候補化合物を 130 個まで絞り込んだ。

- (1) 2019 年に報告した UHRF1-TTD ドメインと LIG1K126me3 の複合体の結晶構造を基に、ドッキングシミュレーションを実施
- (2) TTD ドメインのアルギニン結合溝に高い確率で結合すると予測された化合物に対しては、スーパーコンピュータ上で分子動力学計算を行い、水分子やタンパク質の構造の揺らぎも指標に加えて評価

(3) この分子動力学計算から TTD ドメインのアルギニン結合溝と化合物の間で形成された相互作用情報を抽出し、その種類や頻度を反映させた動的ファーマコフォアモデルを作成、当該モデルに当てはまる化合物をライブラリの中からさらに選出し、20 万個超の化合物を含む化合物ライブラリから、ドッキングシミュレーションと分子動力学シミュレーションを駆使して 44 個の候補化合物を選出した。分子動力学シミュレーションから得た構造揺らぎの情報から動的ファーマコフォアモデルを作成し、相互作用様式が似ている化合物を 86 個選出した。トータルで 130 個の化合物を計算科学的な手法で選出した。

TTD ドメインに 130 個の化合物をそれぞれ加えて熱安定性の変化を調べた結果、130 個の候補化合物の中から 2 個の化合物が TTD ドメインの熱安定性を向上させることを見出した。また、2 個の候補のうち、TTD ドメインの熱安定性を最も向上させた化合物である 5-amino-2,4-dimethylpyridine (5A-DMP) が TTD ドメインに結合することを、生体分子間の相互作用を解析する等温滴定型カロリメトリーで明らかにした。さらに、TTD ドメインと 5A-DMP の複合体を結晶化して、大型放射光施設 Photon Factory (PF) の BL-5A を用いて X 線回折実験を行い、その複合体構造を、1.45 Å 分解能で決定した。これにより、5A-DMP が TTD ドメインのアルギニン結合溝に入りこんでおり、5A-DMP はその構造のほぼすべての部分を使って TTD ドメインに結合していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arita Kyohei	4. 巻 175
2. 論文標題 Cryo-electron microscopy reveals the impact of the nucleosome dynamics on transcription activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 383 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rahayu Anisa Fitri, Hayashi Aki, Yoshimura Yuriko, Nakagawa Reiko, Arita Kyohei, Nakayama Jun-ichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Cooperative DNA-binding activities of Chp2 are critical for its function in heterochromatin assembly	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 371 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi Amika, Onoda Hiroki, Yamaguchi Kosuke, Kori Satomi, Matsuzawa Shun, Chiba Yoshie, Tanimoto Shota, Yoshimi Sae, Sato Hiroki, Yamagata Atsushi, Shirouzu Mikako, Adachi Naruhiko, Sharif Jafar, Koseki Haruhiko, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Defossez Pierre-Antoine, Arita Kyohei	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural basis for activation of DNMT1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34779-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hata Keiichi, Kobayashi Naohiro, Sugimura Keita, Qin Weihua, Haxholli Deis, Chiba Yoshie, Yoshimi Sae, Hayashi Gosuke, Onoda Hiroki, Ikegami Takahisa, Mulholland Christopher?B, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Leonhardt Heinrich, Konuma Tsuyoshi, Arita Kyohei	4. 巻 50
2. 論文標題 Structural basis for the unique multifaceted interaction of DPPA3 with the UHRF1 PHD finger	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12527 ~ 12542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac1082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kori Satomi, Shibahashi Yuki, Ekimoto Toru, Nishiyama Atsuya, Yoshimi Sae, Yamaguchi Kosuke, Nagatoishi Satoru, Ohta Masateru, Tsumoto Kouhei, Nakanishi Makoto, Defossez Pierre-Antoine, Ikeguchi Mitsunori, Arita Kyohei	4. 巻 52
2. 論文標題 Structure-based screening combined with computational and biochemical analyses identified the inhibitor targeting the binding of DNA Ligase 1 to UHRF1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116500 ~ 116500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Funya Tomoko, Kanemaru Yuka, Onoda Hiroki, Arita Kyohei	4. 巻 170
2. 論文標題 Preparation of the ubiquitination-triggered active form of SETDB1 in <i>Escherichia coli</i> for biochemical and structural analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 655 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Ayako, Maita Nobuo, Tabata Takanori, Nagano Hikaru, Arita Kyohei, Ariyoshi Mariko, Uchida Takayuki, Nakao Reiko, Ulla Anayt, Sugiura Kosuke, Kishimoto Koji, Teshima-Kondo Shigetada, Okumura Yuushi, Nikawa Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Crystal structure of inhibitor-bound human MSPL that can activate high pathogenic avian influenza	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Ayako, Walinda Erik, Arita Kyohei, Sugase Kenji	4. 巻 49
2. 論文標題 Structural dynamics of double-stranded DNA with epigenome modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1152 ~ 1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa1210	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kori Satomi, Jimenji Tomohiro, Ekimoto Toru, Sato Miwa, Kusano Fumie, Oda Takashi, Unoki Motoko, Ikeguchi Mitsunori, Arita Kyohei	4. 巻 432
2. 論文標題 Serine 298 Phosphorylation in Linker 2 of UHRF1 Regulates Ligand-Binding Property of Its Tandem Tudor Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 4061 ~ 4075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.05.006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mishima Yuichi, Brueckner Laura, Takahashi Saori, Kawakami Toru, Otani Junji, Shinohara Akira, Takeshita Kohei, Garvilles Ronald Garingalao, Watanabe Mikio, Sakai Norio, Takeshima Hideyuki, Nachtegael Charlotte, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Arita Kyohei, Nakashima Kinichi, Hojo Hironobu, Suetake Isao	4. 巻 25
2. 論文標題 Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 22 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jimenji Tomohiro, Matsumura Rumie, Kori Satomi, Arita Kyohei	4. 巻 516
2. 論文標題 Structure of PCNA in complex with DNMT1 PIP box reveals the basis for the molecular mechanism of the interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 578 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計29件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kyohei Arita
2. 発表標題 Structural basis for activation mechanism of DNMT1
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on REPLICATION of NON GENOME (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊地杏美香, 小野田浩宜, 山口幸佑, 郡聡実, 山形敦史, Defossez Pierre-Antoine, 有田恭平
2. 発表標題 DNMT1: ユビキチン化H3: DNA複合体構造によるDNA維持メチル化の活性化機構の解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舩生 智子、山形 敦史、有田 恭平
2. 発表標題 ユビキチン化によるSETDB1の酵素活性化機構の解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉見 早恵 小野田 浩宜 加藤 修衣 山形 敦史 有田 恭平
2. 発表標題 USP7によるユビキチン化ヒストンH3の脱ユビキチン化機構の解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 敷町 怜愛, 松澤 舜, 蛭田萌里, 小野田 浩宜, 山形敦史, 有田 恭平
2. 発表標題 エピジェネティック修飾ヌクレオソームに対するUHRF1の相互作用様式の検証
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蛭田 萌理, 松澤 舜, 敷町 怜愛, 有田 恭平
2. 発表標題 UHRF1によるマルチモノユピキチン化機構の構造生物学的研究
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有田恭平
2. 発表標題 DNA維持メチル化関連タンパク質の活性・クロマチン局在制御の構造基盤
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有田恭平
2. 発表標題 DPPA3によるUHRF1のクロマチン局在阻害の構造基盤
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有田恭平
2. 発表標題 Structural basis for activation of DNA methyltransferase.
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地杏美香, 小野田浩宜, 山形敦史, 有田恭平
2. 発表標題 グアニン四重鎖によるDNMT1の活性阻害機構の解明
3. 学会等名 第15回 日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舩生 智子、小野田 浩宜、山形 敦史、有田 恭平
2. 発表標題 大腸菌内ユビキチン化システムによる活性型 SETDB1 の調製と評価
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑圭一, 小沼剛, 杉村奎汰, 西山敦哉, 林剛介, 池上貴久, 中西真, 有田恭平
2. 発表標題 母性因子Stellaと維持メチル化因子UHRF 1 のNMRを用いた相互作用解析
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 敷町怜愛, 松澤舜, 小野田浩宜, 有田恭平
2. 発表標題 マルチモノユビキチン化機構の解明に向けたエピジェネティック修飾ヌクレオソームの調製
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地杏美香, 小野田浩宜, 山形敦史, 有田恭平
2. 発表標題 G-quadruplex構造によるDNMT1の活性阻害機構の解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舩生智子, 金丸由桂, 有田恭平
2. 発表標題 ユビキチン化依存的なSETDB1の酵素活性化機構解明に向けた、大腸菌内ユビキチン化システムの構築とその評価
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉見早恵, 小野田浩宜, 山形敦史, 有田恭平
2. 発表標題 USP7によるユビキチン化ヒストンH3の脱ユビキチン化機構の解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郡聡実, 柴橋佑希, 浴本亨, 西山敦哉, 吉見早恵, 長門石暁, 大田雅照, 津本浩平, 中西真, 池口満徳, 有田恭平
2. 発表標題 DNAメチル化を制御する薬剤の開発: 構造生物学と計算科学を組み合わせた維持メチル化因子UHRF1の機能阻害剤の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郡聡実, 柴橋佑希, 浴本亨, 西山敦哉, 吉見早恵, 長門石暁, 大田雅照, 津本浩平, 中西真, 池口満徳, 有田恭平
2. 発表標題 計算科学と構造生物学を組み合わせたスクリーニングによるDNAメチル化制御薬の開発
3. 学会等名 第12回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Kori, Yuki Shibahashi, Toru Ekimoto, Atsuya Nishiyama, Sae Yoshimi, Satoru Nagatoishi, Masateru Ohta, Kouhei Tsumoto, Mitsunori Ikeguchi, and Kyohei Arita
2. 発表標題 Development of UHRF1 inhibitor based on the structural study of the recognition of methylated DNA ligase 1 by UHRF1
3. 学会等名 PDBアジア地区50周年記念シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郡聡実, 柴橋佑希, 浴本亨, 西山敦哉, 吉見早恵, 長門石暁, 大田雅照, 津本浩平, 中西真, 池口満徳, 有田恭平
2. 発表標題 DNAメチル化制御薬の開発：維持メチル化因子UHRF1の機能阻害剤のリード化合物の同定
3. 学会等名 第49回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有田恭平
2. 発表標題 構造生物学から見たDNAメチル化が複製されていく仕組み
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Kori, Tomohiro Jimenji, Toru Ekimoto, Laure Ferry, Shohei Matano, Miwa Sato, Fumie Kusano, Motoko Unoki, Pierre-Antoine Defossez, Mitsunori Ikeguchi, Kyohei Arita
2. 発表標題 The proper timing phosphorylation of Ser298 selects UHRF1-binding partners
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satomi Kori, Tomohiro Jimenji, Toru Ekimoto, Miwa Sato, Fumie Kusano, Takashi Oda, Motoko Unoki, Mitsunori Ikeguchi, Kyohei Arita
2. 発表標題 Structural basis for the switching of binding partners by Ser298 phosphorylation in UHRF1
3. 学会等名 第20回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satomi Kori, Laure Ferry, Shohei Matano, Tomohiro Jimenji, Toru Ekimoti, Takashi Oda, Pierre-Antoine Defossez, Mitsunori Ikeguchi, Kyohei Arita
2. 発表標題 Conserved phosphorylation in UHRF1-binding partners regulates its binding to the peptide binding groove of UHRF1 TTD domain
3. 学会等名 16th Conference of the Asian Crystallographic Association: AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Jimenji, Satomi Kori, Kyohei Arita
2. 発表標題 Structural basis for recognition of DNMT1 PIP box by PCNA
3. 学会等名 16th Conference of the Asian Crystallographic Association: AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松澤舜, 若月誠, 柴野歩実, 郡聡実, 古川亜矢子, 西村善文, 西山敦哉, 中西真, 有田恭平
2. 発表標題 UHRF1によるヒストンH3のマルチプルモノユビキチン化機構
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴野歩実, 松澤舜, 郡聡実, 西山敦哉, 中西真, 有田恭平
2. 発表標題 複製因子PAF15のマルチプルモノユビキチン化シグナル形成機構
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arita Kyohei, Ishiyama Satoshi, Nishiyama, Atsuya, Defossez, Pierre-Antoine, Nakanishi, Makoto
2. 発表標題 Structural Study for Recognition of Ubiquitylated Histone H3 by DNA Methyltransferase
3. 学会等名 ECM32 32nd European Crystallographic Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satomi Kori, Laure Ferry, Shohei Matano, Noriyuki Koderu, Takashi Oda, Pierre-Antoine Defossez, Kyohei Arita
2. 発表標題 Crystal structure of UHRF1:LIG1 complex revealed structural change of UHRF1 and the key residues for high affinity binding
3. 学会等名 ECM32 32nd European Crystallographic Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学 生命医科学研究科 構造生物学研究室 有田グループ
<http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/xtal-mls/members/kyouhei/index.html>
メチル基1つでDNAの運動性が変わることを解明 ~運動性というDNA上の目印~
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/202012arita.html>
リン酸化によるUHRF1の結合相手の制御の仕組みを解明
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/202006arita.html>
DNA維持メチル化酵素の複製サイトへの呼び込みの仕組みの一端を解明
http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/news/20190712_arita.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西山 敦哉 (Nishiyama Atsuya) (50378840)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	
研究協力者	小野田 浩宜 (Onoda Hiroki) (30896874)	名古屋大学・あいちシンクロトロン・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	CNRS			