

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22118003

研究課題名(和文) 幹細胞分化におけるクロマチン修飾を介したエピジェネティクス制御機構

研究課題名(英文) Mechanisms underlying epigenome regulation by chromatin modifications during stem cell differentiation

研究代表者

中西 真(Nakanishi, Makoto)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40217774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 169,400,000円

研究成果の概要(和文)：1. DNA維持メチル化機構の解明 ヘミメチルDNAに結合したUhrf1はヒストンH3リジン23をユビキチン化し、Dnmt1はこのユビキチン化ヒストンH3と結合することにより、DNA複製部位に集積してヘミメチルDNAからフルメチルDNAへの変換を触媒することが分かった。
2. 細胞老化誘導機構の解明 細胞老化過程についてタイムラプスイメージングで解析を行ったところ、老化細胞はG2期細胞が細胞分裂期を回避してG1期に移行した結果生じた4倍体G1期細胞であることを明らかにした。この分裂期回避にはp53が必須の役割を果たしていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：1. Molecular mechanisms underlying maintenance DNA methylation. Using *Xenopus* egg extracts, we successfully reproduced maintenance DNA methylation in vitro. Dnmt1 depletion resulted in a dramatic accumulation of Uhrf1-dependent ubiquitylation of histone H3 at lysine 23. Dnmt1 preferentially associated with ubiquitylated H3 in vitro. In mammalian cells, we also found Uhrf1-dependent ubiquitylation of H3 specifically during S phase. The RING finger mutant of Uhrf1 failed to recruit Dnmt1 to DNA replication sites and maintain DNA methylation in mammalian cultured cells.
2. Molecular mechanisms underlying senescence induction. Normal human diploid fibroblasts (HDFs) exposed to various senescence-inducing stimuli undergo a mitosis skip before entry into permanent cell cycle arrest. This mitosis skip is mediated by both p53-dependent premature activation of APC/CCdh1 and pRb family protein-dependent transcriptional suppression of mitotic regulators.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ゲノム シグナル伝達 発現抑制 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

細胞分化は個体内において多くの場合一方方向性の形質転換であり、分化誘導後に獲得された形質は“細胞記憶”として維持され、分化誘導非刺激下においても細胞分裂を超えて安定に維持される(細胞運命決定)。恒久的な形質維持のエピジェネティック制御の分子基盤はDNAのメチル化と考えられているが、細胞分化に伴うDNAメチル化制御についてはほとんど理解されていない。包括的なDNAメチル化の解析から、分化細胞の形質を規定する遺伝子群のプロモーター領域のDNAメチル化の程度は、分化に伴い段階的に減少することが示され、受動的DNA脱メチル化が細胞分化の普遍的原理を制御していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分化の普遍的原理と考えられる“分化形質を維持する遺伝子群のプロモーター領域の受動的脱メチル化”制御機構の本体と、“分化誘導シグナルによるエピジェネティック制御の本体”を明らかにする。とりわけ、分化細胞増殖過程におけるDNA維持メチル化機構の解明と、分化シグナルによるその制御、および分化誘導シグナルによるエピジェネティック制御を解析する有用な細胞モデル系を確立することを目指す。

3. 研究の方法

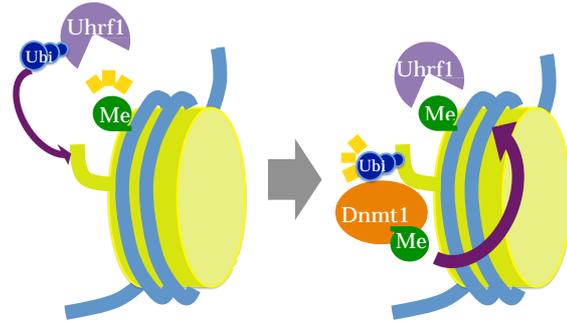
DNA維持メチル化機構の解析については、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた無細胞系試験管内アッセイ系を用いて行った。得られた知見については随時哺乳動物細胞を用いた実験系において再検証した。一方、分化誘導によるエピジェネティック制御を解析する細胞系の確立については、正常線維芽細胞を用いた老化形質誘導をモデルとして確立することを予定した。

4. 研究成果

(1) DNA維持メチル化機構の解明

DNA維持メチル化と受動的DNA脱メチル化機構を明らかにする目的で、カエル卵抽出液を用いて解析を行った。DNA複製により生じたヘミメチルDNAを認識してUhrf1がクロマチンに結合する。結合したUhrf1はヒストンH3リジン23をユビキチン化し、Dnmt1はこのユビキチン化ヒストンH3と結合することにより、DNA複製部位に集積してヘミメチルDNAからフルメチルDNAへの変換を触媒することが分かった。興味深いことにDnmt1はヒストンH3分子のリジン23を含む2カ所のモノユビキチンを認識して結合すること、またDnmt1によるヘミメチル化DNAからフルメチル化DNAへの変換に、Dnmt1と複合体を形成するUsp7の脱ユビキチン化が必要であることも分かった。さらにUhrf1はPCNAもユビキチン化し、TLSポリメラーゼをヘミメチルDNA部位へ集積することが分かった。これらの知見は、受動的DNA脱メチル化時にはヘミ

メチルDNAがある程度長期にわたり存在することから、ヒストンH3リジン23のユビキチン化が受動的DNA脱メチル化の新たなヒストンマーカーとして利用可能であることを示している。また、TLSポリメラーゼがDNA損傷応答を介した受動的DNA脱メチル化に關与している可能性がある。

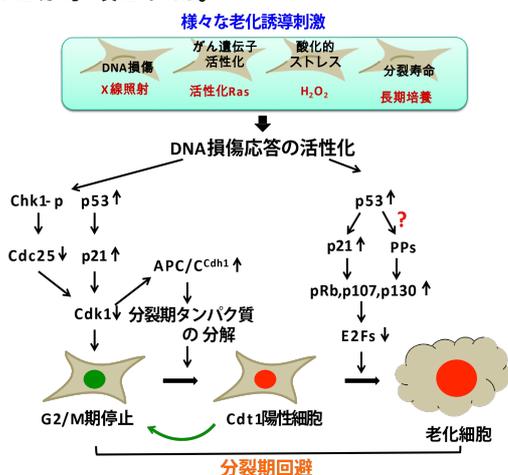


Uhrf1によるH3Lys23のユビキチン化

ユビキチン化H3との相互作用を介したDnmt1のメチル化部位へのリクルート

(2) 細胞老化は恒久的な増殖停止を特徴とする細胞形質変換で、安定的な形質変換を担保するエピジェネティック制御機構を解析する最も優れた系の1つであると考えられている。しかしながら、細胞老化誘導刺激によりどのような機構により恒久的増殖停止が誘導されるのかについてほとんど分かっていない。細胞老化過程についてFucciシステムを用いたタイムラプスイメージングで解析を行ったところ、老化細胞はG2期細胞が細胞分裂期を回避してG1期に移行した結果生じた4倍体G1期細胞であることを明らかにした。この分裂期回避にはp53が必須の役割を果たしていること、p53はp21の発現誘導による早期のAPC/CCdh1の活性化と、pRb/p107/p130による転写抑制促進することで、サイクリンB1を始めとする様々な分裂期制御因子タンパク質の発現を強く抑制することにより分裂期回避を誘導していることも明らかとなった。我々は細胞老化誘導刺激で活性化される2つのDNA損傷応答(ATR-Chk1経路とATM-p53-p21経路)活性化の時間差が老化誘導に重要な働きをしていると考えた。早いDNA損傷応答反応であるATR-Chk1経路の活性化時間を外的に制御したところ、同じ低レベルのDNA損傷であってもATR-Chk1経路の活性化時間を延長させると分裂期回避が促進され、老化誘導が促進されること、またこの経路の活性化時間を短縮させると高レベルのDNA損傷であっても老化誘導が抑制されることが分かった。重要なことに、ほとんどの早老症の患者においてはDNA修復機能不全の結果、ATR-Chk1経路活性化時間が延長しており、細胞老化誘導が促進されていることが分かった。これらの結果から、老化誘導刺激はDNA損傷応答を時空的に制御することで分裂期回避を介して細胞老化を誘導していること、またこれらの制御機構は早老症患者

者の老化促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 33 件)
(全て査読有)

- Murata K, Sato S, Haruta M, Goshima T, Chiba Y, Takahashi S, Sharif J, Koseki H, Nakanishi M, Shimada M. Physical interaction between MPP8 and PRC1 complex and its implication for regulation of spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 458, 2015, 470-5. doi:10.1016/j.bbrc.
- Yokoyama, A. Molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *International journal of hematology.* 101, 2015, 352-361. doi:10.1007/s12185-015-1774-4.
- Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping Analysis for the 46 C/T Polymorphism of Coagulation Factor XII and the Involvement of Factor XII Activity in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. *PLoS One.* 9, 2014, e114452. doi:10.1371/journal.pone.0114452.
- Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, Ohtani N, Hara E, Nakamura M, Morita A, Takahashi S, Nakanishi M. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *MolCell.* 55, 2014, 73-84. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.003.
- Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura Y, Haruta M, Tahara H, Takeyama H, Nakanishi M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res.* 74, 2014, 3880-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3604.
- Oseto K, Suzumori N, Nishikawa R, Nishikawa H, Arakawa A, Ozaki Y, Asai H, Kawai M, Mizuno K, Takahashi S, Shirai T, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Kajiyama H, Kikkawa F, Sugiura-Ogasawara M. Mutational analysis of FOXL2 p.C134W and expression of bone morphogenetic protein 2 in Japanese patients with granulosa cell tumor of ovary. *J Obstet Gynaecol Res.* 40, 2014, 1197-204. doi:10.1111/jog.12324.
- Goshima T, Shimada M, Sharif J, Matsuo H, Misaki T, Johmura Y, Murata K, Koseki H, Nakanishi M. Mammal-specific H2A variant, H2ABbd, is involved in apoptotic induction via activation of NF-κB signaling pathway. *J Biol Chem.* 289, 2014, 11656-66. doi:10.1074/jbc.M113.541664.
- Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A. MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* 42, 2014, 4241-56. doi:10.1093/nar/gkt1394.
- Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature.* 502, 2013, 249-53. doi:10.1038/nature12488.
- Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, Nakanishi M, Saitoh S. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One.* 8, 2013, e75137. doi:10.1371/journal.pone.0075137
- Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *IntJOncol.* 42, 2013, 1951-60.

- doi:10.3892/ijo.2013.1899
12. Nishigaki M, Kawada Y, Misaki T, Murata K, Goshima T, Hirokawa T, Yamada C, Shimada M, Nakanishi M. Mitotic phosphorylation of MPP8 by cyclin-dependent kinases regulates chromatin dissociation. *Biochem Biophys Res Commun.* 432, 2013,654-9.doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.027.
 13. Shimada M, Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? *FrontOncol.*3,2013,8.doi:10.3389/fonc.2013.00008
 14. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Hatanaka C, Kitabayashi I, Cleary ML. MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing. *PLoSOne.*2013,8,e73649.doi:10.1371/journal.pone.0073649.
 15. Liu N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, Nakanishi M, Niida H, Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBOJ.*31,2012,2365-77.doi:10.1038/emboj.
 16. Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Nakanishi M, Wakita T, Ogura Y, Yatabe Y, Shirai T. Histone H1 expression in human prostate cancer tissues and cell lines. *Pathol Int.* 62, 2012, 84-92.doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02755.x.
 17. Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin M, Nakanishi M. TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 2012, E177-86.doi:10.1073/pnas.1119296109.
 18. Ogawa K, Murasaki T, Sugiura S, Nakanishi M, Shirai T. Organ differences in the impact of p27(kip1) deficiency on carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *J Appl Toxicol.* 33, 2011, 471-9.doi:10.1002/jat.1770.
 19. Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic variation of the IL-28B promoter affecting gene expression. *PLoSOne* 6, 2011, e26620.doi:10.1371/journal.pone.0026620
 20. Nakanishi M. Cell cycle. *Rinsho Ketsueki.* 52, 2011,1660-8. <http://doi.org/10.11406/rinketsu.52.1660>
 21. Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 41, 2011, 936-945. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00859.x.
 22. Harada N, Watanabe Y, Yoshimura Y, Sakumoto H, Makishima F, Tsuchiya M, Nakanishi K, Nakanishi M, Aoki Y. Identification of a checkpoint modulator with synthetic lethality to p53 mutants. *Anticancer Drugs.* 22, 2011, 986-94. doi:10.1097/CAD.0b013e328349dd43.
 23. Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, Goshima N, Inagaki M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J.CellSci.*124,2011,2113-9.doi:10.1242/jcs.086488.
 24. Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. *Hum Reprod.* 26, 2011, 1259-66.doi:10.1093/humrep/der035.
 25. Sugiyama M, Tanaka Y,Nakanishi M, Mizokami M. Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: Genetic variation in IL-28B is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C. *J Pharmacol Sci.* 115, 2011, 263-9. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/115/3/115_10R15FM/_article
 26. Yokoyama A. Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias. *Rinsho Ketsueki.* 52, 2011, 679-85. Review. Japanese. <http://doi.org/10.11406/rinketsu.52.679>
 27. Yokoyama A, Ficara F, Murphy MJ, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, Cleary ML. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci.* 124, 2011, 2208-19. doi:10.1242/jcs.080523.
 28. Shimada M., Haruta M., Niida H., Sawamoto K., and Nakanishi M. Protein phosphatase 1γ is responsible for

- dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage.
EMBO rep. 11, 2010, 883-889.doi: 10.1038/embor.2010.152.
29. Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., and Nakanishi, M. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells.
Cancer Sci. 11, 2010, 883-889.
doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01719.x
30. Niida, H., Murata, K., Shimada, M., Ogawa, K., Ohta, K., Suzuki, K., Fujigaki, H., Khaw, A.K., Banerjee, B., Hande, P.M., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Shirai, T., Motoyama, N., Delhase, M., Appella, E., and Nakanishi, M. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo.
EMBO J. 29, 2010, 3558-3570.doi: 10.1038/emboj.2010.218.
31. Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., and Murakami-Tonami, Y. Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. Cell Cycle 9, 2010, 3233-3242.
doi:10.4161/cc.9.16.12599
32. Sakai, S., Ohoka, N., Onozaki, K., Kitagawa, M., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Dual mode of regulation of cell division cycle 25A protein by TRB3.
Biol Pharm Bull. 33, 2010, 1112-1116.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/7/33_7_1112/_article
33. Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., Tashiro, S., and Nakanishi, M. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase.
Genes and Dev. 24, 2010, 333-338.
doi:10.1101/gad.1863810.

[学会発表](計 23 件)

横山 明彦

Reading epigenetic marks and activating transcription by MLL fusion proteins

The 9th 3R Symposium

平成 26 年 11 月 17 日 ~ 21 日

「御殿場高原ホテル時之栖(静岡県御殿場市)」

横山 明彦

Mechanisms of aberrant self-renewal

caused by MLL fusion oncoproteins,
4th Global Cancer Genomics Consortium Symposium

平成 26 年 11 月 14 日 ~ 15 日「京都大学(京都府京都市)」

中西 真

Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. Fusion Conferences DNA Replication as a Source of DNA Damage.

30 Sep 14 - 03 Oct 2014

El Jadida, (Morocco)

中西 真

A time lag between activations of 2 distinct DNA damage response determines senescence induction.

第 73 回日本癌学会学術総会

平成 26 年 9 月 26 日「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

中西 真

Regulation of maintenance DNA methylation by ubiquitylation of histone H3 at lysine 23.

BENZON SYMPOSIUM No. 60

Nuclear regulation by ubiquitin August 18-21, 2014

Copenhagen, (Denmark)

中西 真

Molecular mechanisms underlying induction of cellular senescence.

37th JSBG シンポジウム

平成 26 年 6 月 26 日「長寿研(愛知県大府市)」

横山 明彦

The molecular mechanisms of MLL fusion-dependent leukemic transformation.

5th JSH International Symposium

平成 26 年 5 月 24 日 ~ 25 日「アクトシティ浜松(静岡県浜松市)」

中西 真

Regulation of maintenance DNA methylation by histone H3ubiquitylation.

2014KSBMB Annual Meeting.

平成 26 年 5 月 15 日「ソウル市(韓国)」

中西 真

Molecular coupling between DNA replication and maintenance DNA methylation.

IIAS conference 2014in Kyoto, Japan

平成 26 年 5 月 13 日「国際高等研究所(京都府木津川市)」

中西 真

Ubiquitylation/deubiquitylation circuit of histone H3 at K23 couples maintenance DNA methylation with DNA

第 3 回日仏がんワークショップ

平成 25 年 11 月 20 日 ~ 23 日

「トゥールーズ(フランス)」

横山 明彦
MLL 白血病の分子メカニズム
第 7 回先進血液学レクチャー
平成 25 年 10 月 25 日「東京ドームホテル(東京都)」

中西 真
Uhrf1-dependent ubiquitination of histone H3 at lysine 23 couples maintenance DNA methylation and DNA replication.
The 10th Nikko International Symposium 2013 Translational Epigenomics
平成 25 年 10 月 17 日
「栃木県自治医科大学(栃木県下野市)」

横山 明彦
Molecular Mechanism of MLL-associated leukemia.
第 72 回日本癌学会学術総会
平成 25 年 10 月 5 日
「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

横山 明彦
Molecular mechanism of MLL fusion-dependent transformation.
2013 USA-Japan Science Conference 日米造血器腫瘍セミナー
平成 25 年 3 月 24-26 日、「Hawaii,(USA)」

中西 真
Novel histone modifications couple maintenance DNA methylation with DNA replication.
日仏がん学会
平成 24 年 11 月 29 日~30 日「グランドエクシブ鳴門(徳島県鳴門市)」

中西 真
Role of DNA damage responses in induction of premature senescence. 3R シンポジウム
平成 24 年 11 月 25 日~28 日
「淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)」

中西 真
Maintaining the integrity of genomic information by cell cycle checkpoints.
第 71 回日本癌学会学術総会「ロイトン札幌(北海道札幌市)」
平成 24 年 9 月 18 日~21 日

中西 真
Role of DNA damage responses in induction of premature senescence.
Hallym-NCGG-ExtendedSymposium
平成 24 年 4 月 26 日~28 日「Anyang 市(韓国)」

横山 明彦
MLL 白血病と転写制御 三重先端がんフォーラム
平成 24 年 4 月 7 日「三重大学医学部(三重県津市)」

横山 明彦

- 平成 23 年度 第 3 次対がん 10 か年総合戦略(平成 16 年~25 年度)・文部科学省がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 合同公開シンポジウム MLL 白血病の発症メカニズム
平成 24 年 1 月 30 日~31 日「学術総合センター 一橋記念講堂(東京都)」
- 21 中西 真
Molecular mechanisms of dNTPs supply at DNA damage sites in mammals.
第 70 回日本癌学会総会
平成 23 年 10 月 3 日~5 日
「名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)」
- 22 中西 真
Chk1-GCN5 と PP1g-HDAC3 複合体によるヒストンバイナリーコードの変換は DNA 損傷による E2F 標的遺伝子の発現を抑制する。
2010 日本分子生物、生化学会合同会議シンポジウム
平成 22 年 12 月 10 日
「神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)」
- 23 中西 真
癌と細胞周期
第 69 回日本癌学会
平成 22 年 9 月 22 24 日
「大阪国際会議場(大阪府大阪市)」

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: DNA 二重鎖切断を誘導するがん療法の抗がん作用増強剤のスクリーニング方法
発明者: 中西 真
権利者: 公立大学法人名古屋市立大学
種類: 特許
番号: 特願 2014-85206
出願年月日: 平成 26 年 4 月 17 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
なし

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
中西 真 (NAKANISHI, Makoto)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40217774
- (2) 研究分担者
横山 明彦 (YOKOYAMA, Akihiko)
京都大学・医学研究科・特定 准教授
研究者番号: 10506710