

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250027

研究課題名(和文) DNA維持メチル化の破綻による発ガン機構

研究課題名(英文) Tumorigenesis by aberrant maintenance DNA methylation

研究代表者

中西 真 (Nakanishi, Makoto)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40217774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：Dnmt1に結合するユビキチン化ヒストンH3はヒストンH3K18Ub/K23Ub、K14Ub/K18Ub、あるいはK14Ub/K23Ubであることがわかった。Dnmt1とヒストンH3K18Ub/K23Ubペプチドとの結合は、全く新規の構造であった。また、Dnmt1とヒストンH3K18Ub/K23Ubとの結合は、Dnmt1構造全体の変化を誘導した。実際この結合は、Dnmt1のDNAメチル化活性を強く活性化した。一方、DNA低メチル化はDNA複製プログラムの異常を誘導し、ゲノム不安定化を引き起こしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dnmt1 specifically binds to two mono ubiquitylated histone H3 such as H3K18Ub/K23Ub, K14Ub/K18Ub, and K14Ub/K23Ub. The crystal structure of the replication foci targeting sequence (RFTS) of Dnmt1 in complex with H3-K18Ub/23Ub reveals striking differences to the previously identified ubiquitin-recognition structures. The binding of H3-K18Ub/23Ub results in spatial rearrangement of two lobes in the RFTS, suggesting the opening of its active site. Actually, incubation of Dnmt1 with H3-K18Ub/23Ub increases its catalytic activity in vitro. DNA hypomethylation by Dnmt1 knockdown results in an aberrant DNA replication program, leading to genomic instability.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：DNAメチル化 ゲノム不安定性 DNA複製

## 1. 研究開始当初の背景

エピゲノム修飾は多細胞生物体における細胞多様性を生み出す本体であり、その情報は比較的安定に維持されていると考えられている。エピゲノム修飾のうち DNA メチル化は、最も古くから研究が進められており、ガン細胞においてゲノムワイドに DNA 低メチル化が認められることからガンの発症あるいは悪性化との関連が報告されている。興味深いことに、DNA メチル化異常は前ガン状態の細胞においても広範に検出され、また特定遺伝子のプロモーター領域においては DNA メチル化がむしろ亢進しており、遺伝子発現を抑制していることも分かってきた。これらの知見は、DNA メチル化異常は遺伝子変異と同等に発ガン過程に寄与していることを示しており、如何なる原因で DNA メチル化異常が誘導されるのかその分子基盤の解明は“ガン撲滅”に必要不可欠である。ガン細胞における DNA メチル化異常は、DNA 複製と共役した DNA メチル化 (DNA 維持メチル化) の不全から生じると考えられるが、DNA 維持メチル化の分子機構についてはほとんど理解されておらず、とりわけ発ガンのきっかけとなる感染、DNA 損傷、あるいはガン遺伝子活性化による過増殖刺激によりどのような障害されるか全く分かっていない。Dnmt1 は DNA 複製により生じたヘミメチル化 DNA からフルメチル化 DNA への変換を触媒する活性を持っているが、如何なる分子機構で DNA 複製部位に集積するのかについてほとんど分かっていなかった。申請者らは世界に先駆け、アフリカツメガエル卵母細胞抽出液を用いて DNA 維持メチル化を試験管内において再現することに成功した。このシステムを用いて、**Dnmt1 が DNA 複製部位へ集積するのにヘミメチル化結合タンパク質である Uhrf1 による H3K23 のユビキチン化が必要であることを**

**見出した (Nature, 2013)**。この集積は Dnmt1 が直接ユビキチン化ヒストン H3 に結合することによることも分かった。これらの知見は、H3K23 のユビキチン化と拮抗するアセチル化、あるいはメチル化といった他の修飾や、脱ユビキチン化により DNA 維持メチル化が制御を受けることを強く示唆している。実際ゲノムワイドな解析から H3K23 はアセチル化、およびメチル化を受けることが分かっている。

## 2. 研究の目的

申請者らはツメガエル卵細胞抽出液を用いて既に DNA 維持メチル化を試験管内で再構成できる系を確立しており、さらに様々な DNA 損傷応答シグナルを解析できる細胞系を樹立している。これらの系、さらには結晶構造解析技術、哺乳動物培養細胞系を用いて、本研究期間内に

### 1) **Dnmt1 が認識するヒストン H3 ユビキチン化シグナルの本体**

### 2) **Dnmt1 とユビキチン化ヒストン H3 複合体の立体構造**

### 3) **Dnmt1 不全による DNA 低メチル化状態が誘導するゲノム不安定化機構**

を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) **Dnmt1 が認識するヒストン H3 ユビキチン化シグナルの本体**

アフリカツメガエル卵母細胞抽出液に UbVS 処理することで、DNA 維持メチル化時におけるユビキチン化ヒストン H3 を調製する。マウス Dnmt1 と結合する調整したユビキチン化ヒストン H3 を Ubiquitin-AQUA/PRM 解析、及び Shotgun MS により Dnmt1 に結合するユビキチン化ヒストン H3 を同定する。

### 2) **Dnmt1 とユビキチン化ヒストン H3 複合体の立体構造**

Dnmt1 分子のユビキチン化ヒストン H3 結

合領域である Replication foci targeting sequence (RFTS)と、合成ヒストン H3K18Ub/K23Ub ペプチドとの複合体を精製し、結晶化したのちに3次元構造解析を行う。

### 3) Dnmt1不全によるDNA低メチル化状態が誘導するゲノム不安定化機構

Dnmt1 コンディショナルノックダウン MEFs 細胞を作製し、細胞増殖率、細胞生存率、DNA複製スピード、DNA複製起点の発火率、及びDNA複製異常について解析を行った。

#### 4. 研究成果

### 1) Dnmt1 が認識するヒストン H3 ユビキチン化シグナルの本体

Dnmt1 に結合するユビキチン化ヒストン H3 を SDS-PAGE で解析したところ、ヒストン H3 一分子に対して、ユビキチン二分子が結合していることがわかった。Ubiquitin-AQUA/PRM 解析の結果、Dnmt1 に結合するユビキチン化ヒストン H3 はダイマーではなく、2分子のモノマーが結合していることがわかった。さらに Shotgun MS で正確な構造を決定したところ、ヒストン H3K18Ub/K23Ub、K14Ub/K18Ub、あるいは K14Ub/K23Ub であることがわかった。実際、ヒストン H3 変異体 K14R/K18R/K23R は DNA 維持メチル化の過程でユビキチン化されないことがわかった。

### 2) Dnmt1 とユビキチン化ヒストン H3 複合体の立体構造

Dnmt1 の RFTS とヒストン H3K18Ub/K23Ub ペプチドとの複合体を精製し、結晶化したのちに3次元構造を解析したところ、これまでにない全く新規のユビキチン化タンパク質認識機構であることがわかった。具体的には、K18Ub と K23Ub は独立して RFTS 内の2つのポケット内に結合し、ユビキチン同士は全く結合せず、ユビキチン分子間に RFTS の一部が入り

込んでいることがわかった。さらにヒストン H3分子のアミノ末端側が RFTS とユビキチン分子との間に結合していることも明らかとなった。最も重要なことに、RFTS とヒストン H3K18Ub/K23Ub との結合は、活性部位の開口を示す Dnmt1 構造全体の変化を誘導した。このことは Dnmt1 とユビキチン化ヒストン H3 との結合が DNA メチル化酵素活性を活性化することを示している。実際、ヒストン H3K18Ub/K23Ub は Dnmt1 のメチル化活性を強く活性化した。

### 3) Dnmt1不全によるDNA低メチル化状態が誘導するゲノム不安定化機構

Dnmt1 を MEFs からコンディショナルにノックダウンすると細胞増殖が強く抑制された。この時、DNA複製の後期起点からの発火タイミングに異常が生じていた。以上のことから、DNA低メチル化はDNA複製プログラムの異常を誘導し、ゲノム不安定化を引き起こしていることが強く示唆された。

#### 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 9件)

Yamaguchi L, Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, Nakanishi M.

Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation.

*Sci Rep.* 2017 Dec;7(1):55. doi: 10.1038/s41598-017-00136-5. Epub 2017 Mar 3. 査読-有

Negishi Y, Miya F, Hattori A, Johmura Y, Nakagawa M, Ando N, Hori I, Togawa T, Aoyama K, Ohashi K, Fukumura S, Mizuno S, Umemura A, Kishimoto Y, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Nakanishi M, Saitoh S.

A combination of genetic and

biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. *BMC Med Genet.* 2017 Jan 13;18(1):4. doi: 10.1186/s12881-016-0363-6. 査読-有

Wu W, Togashi Y, Johmura Y, Miyoshi Y, Nobuoka S, Nakanishi M, Ohta T. HP1 regulates the localization of FANCD1 at sites of DNA double-strand breaks. *Cancer Sci.* 2016 Oct;107(10):1406-1415. doi: 10.1111/cas.13008. Epub 2016 Sep 1. 査読-有

Johmura Y, Nakanishi M. Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance. *Cancer Sci.* 2016 Nov;107(11):1550-1555. doi: 10.1111/cas.13060. Epub 2016 Nov 4. Review. 査読-有

Shimada M, Nakanishi M. Aurora B twists on histones for activation. *Cell Cycle.* 2016 Dec 16;15(24):3321-3322. doi: 10.1080/15384101.2016.1224758. Epub 2016 Aug 25. No abstract available. 査読-有

Johmura Y, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi K, Nakanishi M. Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation. *Sci Rep.* 2016 Aug 10;6:31194. doi: 10.1038/srep31194. 査読-有

Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M.

Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nat Commun.* 2016 Jul 8;7:12059. doi: 10.1038/ncomms12059. 査読-有

Kono K, Al-Zain A, Schroeder L, Nakanishi M, Ikui AE. Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jun 21;113(25):6910-5. doi: 10.1073/pnas.1523824113. Epub 2016 Jun 7. 査読-有

Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P, Brind'Amour J, Sun MA, Sun Z, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y, Nakanishi M, Xie H, Lorincz MC, Koseki H. Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1(-/-) ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA. *Cell Stem Cell.* 2016 Jul 7;19(1):81-94. doi: 10.1016/j.stem.2016.03.013. Epub 2016 Apr 14. 査読-有

〔学会発表〕(計 3件)

中西 真  
ヒストンユビキチン化・脱ユビキチン化によるDNA維持メチル化制御  
第39回 日本分子生物学会年会  
2016年 12月1日 「パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)」

中西 真  
Cell Cycle Control in Disease  
The Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB)  
2016年 10月13日 「COEX ソウル市 韓国」

中西 真  
DNA damage response and repair in cancer.

Essential role of auto-activation  
circuitry on Aurora B-mediated  
H2AX-pS121 in mitosis.

第75回 日本癌学会学術総会

2016年 10月6日 - 10月8日「パシフ

イコ横浜(神奈川県横浜市)」

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 真 (Makoto Nakanishi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 40217774

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )