

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03153

研究課題名(和文) DNAメチル化を介したゲノム安定性制御の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms for Regulation of Genomic Stability via DNA Methylation

研究代表者

西山 敦哉 (Nishiyama, Atsuya)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50378840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNAメチル化の重要な制御因子であるE3ユビキチンリガーゼUHRF1と岡崎フラグメント連結を担うDNAリガーゼLIG1の相互作用に注目し、その意義と制御機構を明らかにする目的で行った。まず、岡崎フラグメント連結についてツメガエル無細胞系を用いた詳細な解析を行い、その制御不全がPARP1/HPF1によるADPリボシル化を誘導し、バックアップ機構であるLIG3/XRCC1経路を活性化することを見出し、報告した。また、UHRF1のLIG1結合が、これまで報告されていたPCNAとの相互作用とともに、岡崎フラグメントの効率的な連結に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、まず岡崎フラグメント連結のバックアップ機構として働くLIG3/XRCC1経路がPARP1/HPF1によるヒストンH3ADPリボシル化を介して活性化することを明らかにし報告した。また、DNAメチル化制御因子UHRF1がLIG1との相互作用を介して岡崎フラグメント連結を制御することを示す実験結果を得ている。PARP1やDNAメチル化酵素の阻害剤は、抗がん剤としても注目されており、上記の研究成果は、染色体安定性を制御する新たな分子機構の発見にとどまらず、新たなDNAメチル化阻害剤やPARP1阻害剤開発の重要な分子基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the interaction between the E3 ubiquitin ligase UHRF1, an important regulator of DNA methylation, and the DNA ligase LIG1, which is responsible for Okazaki fragment linkage, to clarify its significance and regulatory mechanism. First, we performed a detailed analysis of Okazaki fragment linkage using a cell-free system derived from *Xenopus* egg extracts and found that its dysregulation induces ADP-ribosylation by PARP1/HPF1 to activate the backup mechanism, the LIG3/XRCC1 pathway. We also showed that LIG1 binding of UHRF1, along with its previously reported interaction with PCNA, is important for the efficient linkage of the Okazaki fragment.

研究分野：DNAメチル化

キーワード：DNAメチル化 DNA複製 岡崎フラグメント ADPリボシル化

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は主に CpG 配列中のシトシン 5 位を標的とするエピジェネティックな修飾で、クロマチン構造の変換を介して転写制御、トランスポゾン抑制、X 染色体の不活性化、発生/分化など様々な生命現象に重要な役割を果たす。さらに、DNA メチル化はゲノム安定性を維持するためにも重要であることが示唆されている。染色体上の DNA メチル化パターンは、染色体複製に伴い DNA メチル化酵素 1 (DNMT1) を中心とする DNA 維持メチル化機構により、娘 DNA に正確に継承される。近年、我々は DNA メチル化維持の過程を試験管内で再現可能であるツメガエル卵抽出液を用いて、DNMT1 の DNA メチル化部位への局在が片鎖メチル化 DNA 結合タンパク質である E3 ユビキチンリガーゼ UHRF1 依存的なユビキチンシグナルによって制御されていることを明らかにしてきた。このように DNA メチル化維持の分子機構が理解されてきた一方、DNA メチル化がゲノム安定性をどのように制御するのかについては不明な点が多く残されている。

このような背景のもと、我々は UHRF1 と相互作用する因子として報告されていた DNA リガーゼ 1 (LIG1) に注目した。LIG1 は、DNA 複製時にラギング鎖における岡崎フラグメント連結を担っており、PCNA との相互作用を介して DNA 複製部位に局在すると考えられている。しかし、UHRF1 と LIG1 の相互作用が岡崎フラグメント連結にどのように関わるのかは明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、UHRF1 が LIG1 との相互作用を介して、岡崎フラグメント連結を制御する可能性、さらに DNA 複製時に岡崎フラグメント連結がどのように保証されているかを明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

ツメガエル卵抽出液由来の無細胞系を用いて、DNA 複製時の LIG1 のクロマチン局在、また岡崎フラグメント連結効率について様々な条件下で調べることにより、岡崎フラグメント連結を制御する分子機構について解析を行った。未連結の岡崎フラグメントは、抽出液から単離した複製時のゲノム DNA を Klenow 断片と放射線標識した核酸を用いてラベルしたものをアルカリ電気泳動することで検出した。

4. 研究成果

1. PARP1/HPF1 は LIG3/XRCC1 経路を活性化することで、LIG1 非存在下での岡崎フラグメント連結を保証する (Kumamoto et al., *Nucleic Acids Research*, 2021)。

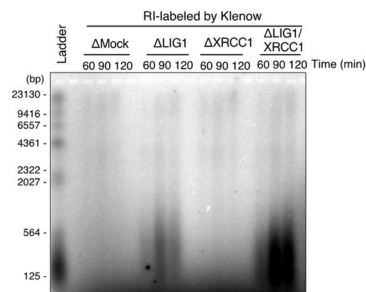
(1) ツメガエル卵抽出液は LIG1 依存的岡崎フラグメント連結を再現する

まず LIG1 に対して精製したリコンビナントタンパク質を抗原とした特異抗体を作成し、ツメガエル卵抽出液を用いて DNA 複製時のクロマチン結合、また岡崎フラグメント連結におけるその必要性を検討した。その結果、LIG1 は PCNA と相互作用するとともに DNA 複製依存的にクロマチンに結合することが分かった。また LIG1 を免疫除去した抽出液では、未連結の岡崎フラグメントが蓄積し、この効果は精製したリコンビナント LIG1 タンパク質を LIG1 除去抽出液に加え戻すことで回復した。以上の結果は、ツメガエル卵抽出液を用いて、LIG1 の DNA 複製依存的なクロマチン結合、および LIG1 依存的な岡崎フラグメント連結を再現可能であることを示している。また、興味深いことに LIG1 非存在下での未連結岡崎フラグメントの蓄積は一過的であり、S 期の進行とともに解消されることがわかった。この結果により卵抽出液においても、LIG1 非存在下で働くバックアップ機構が機能していることを強く示唆された。

(2) LIG1 非存在下では LIG3/XRCC1 がバックアップ機構として岡崎フラグメント連結を担う

次に、LIG1 経路のバックアップ機構として働くと考えられている LIG3/XRCC1 に注目して、さらに解析を行った。抽出液中で LIG3 は XRCC1 と複合体を形成しており、LIG3 は XRCC1 依存的なクロマチン結合を示した。そこで、LIG1 単独あるいは LIG1 と XRCC1 の二重除去した抽出液を調製し、各因子のクロマチン結合や岡崎フラグメント連結効率を調べた。その結果、LIG1 除去条件下では、LIG3 のクロマチン結合量が増加すること、また LIG1/XRCC1 二重除去抽出液では LIG3 のクロマチン結合が見られず、未連結の岡崎フラグメントが解消されないことが明らかになった(図 1)。これらの結果は LIG1 非存在下で、LIG3/XRCC1

図1: LIG3/XRCC1はLIG1非存在下で岡崎フラグメント連結を保証する



経路が活性化し、岡崎フラグメント連結を保証することを強く示唆するものである。

(3) LIG1 経路の不全は PARP1/HPF1 複合体によるヒストン H3 の mono-ADP リボシル化を誘起する LIG3/XRCC1 経路は一本鎖 DNA 損傷時においては、PARP1 による poly-ADP リボシル化によって活性化されることが以前に報告されている。一方、補助因子である HPF1 と複合体を形成した PARP1 は、Ser 残基を主な標的として mono-ADP リボシル化を触媒することが明らかとなってきた。そこで、LIG1 抑制時のクロマチン上の ADP リボシル化の変化について、ADP リボシル化認識試薬を用いて検討した。その結果、LIG1 非存在下のクロマチンでは PARP1 の自己 poly ADP リボシル化と思われるシグナルに加えて、約 15kDa の位置に強く ADP リボシル化による修飾を受けるバンドが検出された。以前の報告で、PARP1/HPF1 複合体はヒストン H3 を標的として mono-ADP リボシル化を行うことが報告されている。これと一致して、クロマチン結合タンパク質を MNase によって可溶化し、抗ヒストン H3 抗体で免疫沈降を行ったところ、ヒストン H3 が LIG1 除去に伴い ADP リボシル化を受けることが明らかになった(図2)。また、このシグナルは mono-ADP リボシル化タンパク質の脱リボシル化を触媒する ARH3 タンパク質を過剰に加えた抽出液中では抑制された。重要なことに、ヒストン H3 の ADP リボシル化は抽出液から HPF1 を免疫除去することで阻害され、精製したリコンビナント HPF1 タンパク質を添加することで回復した。一方、PARP1 との結合活性を欠いた HPF1 変異体は、ヒストン H3 ADP リボシル化を促進する活性を失っていた。以上の結果は、LIG1 経路の機能不全が HPF1 依存的なヒストン H3 の mono-ADP リボシル化を促進することを示唆している。

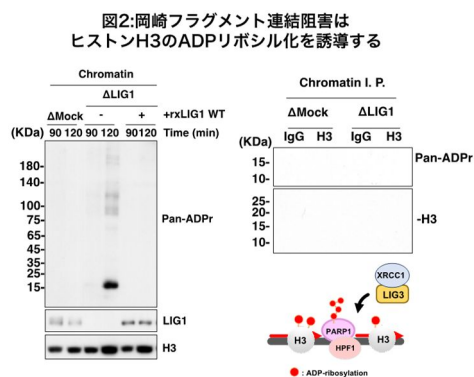
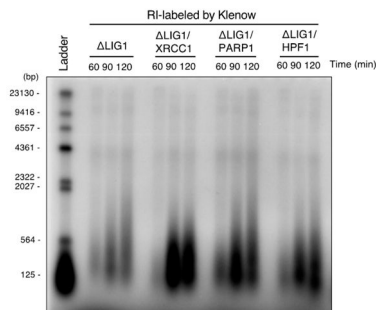


図2:岡崎フラグメント連結阻害はヒストンH3のADPリボシル化を誘導する

(4) LIG3/XRCC1 経路の活性化には PARP1/HPF1 活性が重要である。次に、PARP1 および HPF1 の岡崎フラグメント連結への必要性について検討した。抗 LIG1 抗体とともに PARP1 あるいは HPF1 に対する特異抗体を用いて二重除去を行い、LIG3/XRCC1 のクロマチン結合および岡崎フラグメント連結について解析を行った。その結果、LIG1 除去によって起こる LIG3/XRCC1 のクロマチン結合は、PARP1 や HPF1 の共除去により顕著に抑制されることが示された。また、これと一致して、未連結の岡崎フラグメントの解消も阻害されることが分かった(図3)。

図3: PARP1/HPF1は岡崎フラグメント連結を保証する

以上の結果から、1) LIG1 非存在下で LIG3/XRCC1 経路がバックアップ機構として働き、岡崎フラグメント連結を保証すること、2) LIG1 阻害に伴う岡崎フラグメント連結不全が PARP1/HPF1 による ADP リボシル化を活性化すること、3) LIG3/XRCC1 経路の活性化には PARP1/HPF1 が重要であることが明らかになった。しかしヒストン H3 の ADP リボシル化を読み取る Reader タンパク質やその制御機構など、詳細な分子機構は未だ不明であり、今後の重要な研究課題となる。



II. UHRF1 は LIG1 との相互作用を介して岡崎フラグメント連結を制御する

(1) UHRF1 の免疫除去により LIG1 のクロマチン局在が阻害される

これまで、LIG1 は G9a/GLP によるメチル化修飾を受けることで、UHRF1 の TTD ドメインと相互作用し、UHRF1 の複製部位局在を促進する役割を果たすことが報告されていた。まず、LIG1 を免疫除去した場合の DNA 維持メチル化の進行について解析を行った。しかし、予想に反して、LIG1 の免疫除去により UHRF1 やその下流で働く PAF15、そして DNMT1 のクロマチン結合に大きな影響は見られなかった。一方、意外なことに UHRF1 を免疫除去した抽出液では LIG1 のクロマチン結合が大きく低下することが分かった。以上の結果は、UHRF1 が LIG1 の上流因子としてそのクロマチン局在を制御していることを示している。

(2) LIG1 のクロマチン局在には UHRF1 の TTD ドメインと SRA ドメインが重要である。

UHRF1 は E3 ユビキチンリガーゼ活性に重要な RING ドメインに加えて、ヒストン H3 を認識する PHD ドメイン、メチル化タンパク質と結合する TTD ドメイン、ヘミメチル化 DNA に結合する SRA ドメインなど複数の機能ドメインを持つタンパク質である。そこで、これらの機能ドメインがどのように LIG1 のクロマチン局在を制御するのか検討した。UHRF1 を免疫除去した抽出液に精製したリコンビナント UHRF1 タンパク質あるいはその変異体を加えて、DNA 複製時のクロマチン結合タンパク質について解析を行った。その結果、UHRF1 の PHD ドメイン変異体を加えた場合には、PAF15 のユビキチン化、DNMT1 のリクルートが阻害された一方、LIG1 のクロマチン局在には影響は見られなかった。一方、TTD ドメイン変異体を加えた場合には DNA メチル化進行には影響を及ぼすことなく、LIG1 のクロマチン結合のみが特異的に阻害された。以上の結果は、UHRF1 依存的

な LIG1 のクロマチン結合には、TTD ドメインを介した UHRF1 との相互作用、また UHRF1 のヘミメチル化 DNA 結合が重要であることを示すものである。一方、DNA メチル化維持に必須な PHD ドメイン機能は必ずしも必要でなく、UHRF1 が DNA メチル化維持と LIG1 のクロマチン制御の 2 つの異なる役割を使い分けられていることが示唆された。

(3) UHRF1 は LIG1 による効率的な岡崎フラグメント連結に重要である

次に、UHRF1 の岡崎フラグメント連結における必要性について検討した。ツメガエル卵抽出液は過剰の LIG1 を有しているため、あらかじめ LIG1 を除去した抽出液にリコンビナント LIG1 を段階的に異なる濃度で加えた抽出液を用いて岡崎フラグメント連結の効率を調べた。その結果、UHRF1 存在下では、内在性 LIG1 の 10%に相当するリコンビナント LIG1 で岡崎フラグメント連結に十分であったのに対し、UHRF1 除去抽出液では 20-50%に相当するリコンビナント LIG1 を必要とすることが分かった。上記の結果は、UHRF1 が岡崎フラグメントの効率的な連結に重要であることを示唆している。

以上の結果は、UHRF1 が LIG1 と相互作用し、DNA メチル化部位に LIG1 をリクルートすることで岡崎フラグメント連結を保証している可能性を示唆している。現在、上記の分子機構が哺乳細胞でも保存されているか、UHRF1 および LIG1 に Auxin-inducible-degron を付加することで特異的および可逆的除去を可能にした細胞株を用いて検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyashita Ryota, Nishiyama Atsuya, Qin Weihua, Chiba Yoshie, Kori Satomi, Kato Norie, Konishi Chieko, Kumamoto Soichiro, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Kawasoe Yoshitaka, Tsurimoto Toshiki, Takahashi Tatsuro S, Leonhardt Heinrich, Arita Kyohei, Nakanishi Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 The termination of UHRF1-dependent PAF15 ubiquitin signaling is regulated by USP7 and ATAD5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.79013	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 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 -
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 Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto	4. 巻 37
2. 論文標題 Navigating the DNA methylation landscape of cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Genetics	6. 最初と最後の頁 1012 ~ 1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tig.2021.05.002	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 Kumamoto Soichiro, Nishiyama Atsuya, Chiba Yoshie, Miyashita Ryota, Konishi Chieko, Azuma Yoshiaki, Nakanishi Makoto	4. 巻 49
2. 論文標題 HPF1-dependent PARP activation promotes LIG3-XRCC1-mediated backup pathway of Okazaki fragment ligation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5003 ~ 5016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab269	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 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 -

1. 著者名 Nishiyama A, Mulholland C. B., Bultmann S, Kori S, Endo S, Saeki Y, Qin W, Trummer C, Chiba Y, Yokoyama H, Kumamoto S, Kawakami T, Hojo H, Nagae G, Aburatani H, Tanaka K, Arita K, Leonhardt H, Nakanishi M.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15006-4	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 西山敦哉	4. 巻 56 (1)
2. 論文標題 DNA維持メチル化機構を制御するユビキチンシグナル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.1_36	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西山 敦哉 宮下 諒太 千葉 祥恵 郡 聡実 加藤 修衣 河添 好孝 秦 裕子 尾山 大明 高橋 達郎 有田 恭平 中西 真
2. 発表標題 USP7とATAD5はUHRF1依存的なPAF15ユビキチンシグナルを制御する
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山 敦哉, 谷本 翔汰, 千葉 祥恵, 遠藤 彬則, 佐伯 泰, 中西 真
2. 発表標題 DNMT1-DNA架橋によって誘導されるSUMOシグナルとその制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山敦哉
2. 発表標題 DNAメチル化継承の分子機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山敦哉
2. 発表標題 The termination of UHRF1-dependent PAF15 ubiquitin signaling is regulated by USP7 and ATAD5
3. 学会等名 第15回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 隈本宗一郎、西山敦哉、千葉祥恵、宮下諒太、小西知恵子、東義明、中西真
2. 発表標題 DNAメチル化と岡崎フラグメント連結をリンクする分子機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuya Nishiyama, Akinori Endoh, Yoshie Chiba, Chieko Konishi, Ayane Kaketani, Tomomi Nagatani, Yasushi, Saeki, Makoto Nakanishi
2. 発表標題 Molecular mechanism of DNMT1-DNA cross-link repair
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下諒太、西山敦哉、秦 裕子、尾山 大明、千葉 祥恵、中西 真
2. 発表標題 DNAメチル化制御因子PAF15ユビキチン化の制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 敦哉、隈本 宗一郎、千葉 祥恵、中西 真
2. 発表標題 DNA複製に伴う岡崎フラグメント連結を保証する分子機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山 敦哉, Christopher B. Mulholland, Sebastian Bultmann, 郡 聡実, 遠藤 彬則, 千葉 祥恵, 隈本 宗一郎, 佐伯 泰, 有田 恭平, Heinrich Leonhardt, 中西 真
2. 発表標題 DNMT1のメチル化部位への局在を保證する2つの異なる分子機構
3. 学会等名 42nd MBSJ, Symposium " Crosstalk between epigenome replication, genome stability, and chromatin organization " (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隈本 宗一郎、西山 敦哉、千葉 祥恵、中西 真
2. 発表標題 The LIG3/XRCC1 complex ensures Okazaki fragment ligation in the absence of LIG1
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 隈本 宗一郎、西山 敦哉、千葉 祥恵、中西 真
2. 発表標題 Molecular mechanism of Okazaki fragment ligation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡崎フラグメントの連結を堅牢に保証する分子メカニズム https://non-genome.com/activities/2121/ 細胞記憶継承をDNA複製と協調するメカニズムの解明 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/press/page_00056.html</p>
--

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 分 担 者	有田 恭平 (Arita Kyohei) (40549648)	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授 (22701)	

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			
ドイツ	Ludwig-Maximilians-University Munchen			
米国	University of Kansas			