

科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」 研究概要
〔令和6年度事後評価用〕

令和6年6月30日現在

機関番号：12601

領域設定期間：令和元年度～令和6年度

領域番号：7103

研究領域名（和文） 多様かつ堅牢な細胞形質を支える非ゲノム情報複製機構

研究領域名（英文） Mechanisms underlying replication of non-genomic codes that mediate plasticity and robustness for cellular inheritance

領域代表者

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（領域設定期間全体）：（直接経費）1,164,800,000 円

研究成果の概要

非ゲノム情報の複製制御の理解に向けた研究は、“細胞機能を規定する情報の複製”という根源的に重要な学問領域の中核である。しかしながら、(1)非ゲノム情報が単純な核酸の塩基配列とは異なり、多様なレベルでの修飾情報や高次構造、さらにはそれらの相互干渉によりコードされる多元的、空間的、かつ、動的な情報であること、(2)それらが時間軸に沿っても展開される非ゲノム情報の「複製」は、さらに大きな複雑性を内包する過程であること、(3)ゲノム情報と異なり、非ゲノム情報は細胞種ごとに異なるものとなるため、複雑性はさらに大きくなることなどからその実態はほとんど解明されていない。本領域では、異分野とりわけ生化学を代表とする無細胞系解析と、マウスなどのモデル動物を用いた遺伝学的解析、細胞分化／自己複製研究などの細胞形質評価のモデルシステムを持つ研究者、さらには微量・高感度に非ゲノム情報コードやクロマチン高次構造を解析できる先端技術、データを統合し時空間的なモデルを構築する技術を持つ研究者を結集して融合的な学問体系を構築することにより、複雑性を持つ非ゲノム情報複製機構の概要を明らかにし、これらが制御する発生・腫瘍・再生・加齢などの“多細胞生物学”の解明に寄与する。

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：DNA メチル化、ヒストン修飾、高次クロマチン構造、転写因子ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は細胞分裂に際して、基本的に同じ形質を維持しながら倍加する。細胞形質の遺伝は、ゲノム情報と非ゲノム情報によって規定される。非ゲノム情報もゲノム情報同様に、一定の堅牢性を賦与された遺伝情報として働く。しかしながら、ゲノム情報に比較すると不安定であり、発生シグナルや外的ストレスなどにより変化し、分化などの細胞応答の惹起にも寄与する。非ゲノム情報の持つ堅牢性と可塑性により、多細胞生物体は同じゲノム情報を持ちながら多様な形質を持つ細胞種を生み出す。このように非ゲノム情報の複製は、多細胞生物体を構成する分子基盤の最も重要なものである。それに関わらず、非ゲノム情報の複製を制御する分子機構については、その多階層性と複雑性のためにほとんど分かっていない。これまで、本領域計画研究メンバーにより細胞増殖過程における DNA メチル化複製機構の概要が解明された。一方、ヌクレオソームの階層的制御機構の解明においても、世界的な貢献を続けてきている。さらに、形態形成シグナルや組織特異的エンハンサーが H3K27me3 の複製機構を抑制すること、T 細胞分化において DNA メチル化や H3K27me3 の複製機構が、直接分化系列を規定していること、造血幹細胞の研究から H3K27me3 や H3K4me3 の複製と、自己複製および分化との関連を明らかにしてきた。以上、本領域メンバーはこれまでに非ゲノム複製機構解明

に向けて世界をリードする研究実績を重ねてきた。さらに、その予備的研究成果から、今まさに非ゲノム情報複製機構解明のための知識と経験、さらには *in vitro*、細胞、生体レベルでの解析系とそれらを統合する数理的技術が揃ったと判断し、本領域設立を着想した。

2. 研究の目的

遺伝情報は、ゲノム情報だけでなく、DNA メチル化やヒストン修飾などの共有結合修飾性コード、高次クロマチン構造、広義の転写因子ネットワーク、さらには非コード RNA を含めた“非ゲノム情報”により構成される。非ゲノム情報は、各階層における化学修飾などの多様性だけでなく、階層間の相互作用によってコードされる。しかしながら、このような非ゲノム情報がどのように複製され、生命現象を制御するのか、その理解に向けた取り組みは端緒に付いたばかりである。本研究領域は、非ゲノム情報が複製される機構の概要を明らかにし、それらが細胞分裂や減数分裂に伴って起こる細胞の分化や自己複製などの生命現象をどのように制御するかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

非ゲノム情報の複製機構と、それらにより制御される多細胞形質を俯瞰的、かつ体系的に理解するために、本研究領域に A01:非ゲノム情報の基本的複製機構と、A02:非ゲノム情報複製機構による細胞機能制御の各項目を設けて推進する(図1)。研究項目 A01 では、DNA メチル化、ヒストン修飾 (H3K27me3、H3K9me3)、非コード RNA および高次クロマチン構造、広義の転写因子ネットワークがどのように複製されるのかの基本分子機構や、それらの構造的基盤を解明する。さらに、一細胞、あるいは微量・高感度での解析を可能にする技術開発も目指す。ヒストン修飾の複製機構については、最終的には無細胞系での解析システムの確立を目標とする。研究項目 A02 では非ゲノム情報複製機構による細胞機能制御、とりわけ細胞分化、幹細胞自己複製・幹細胞性維持を中心に研究を推進する。多様な非ゲノム情報複製機構が、相互干渉的に制御されると考えられるので、各複製機構の解析から得られたビッグデータを統合して解析できる技術の開発を行う。

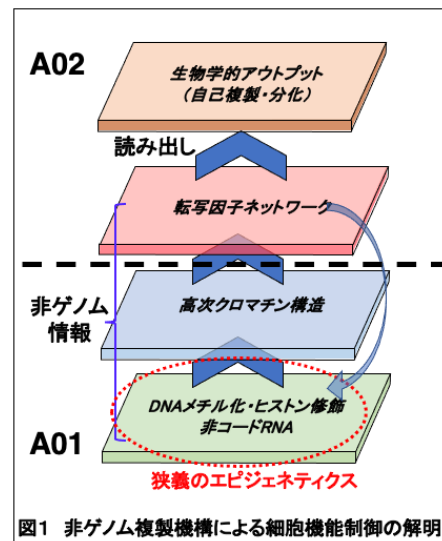


図1 非ゲノム複製機構による細胞機能制御の解明

図1 非ゲノム複製機構による細胞機能制御の解明

4. 研究の成果

研究項目 A01 では、DNA メチル化、ヒストン修飾 (H3K27me3、H3K9me3)、および高次クロマチン構造複製の分子機構解析、構造的基盤の解明を中心に、これらを一細胞、あるいは微量・高感度での解析を可能にする技術開発を含めて推進した。このため、下記の3項目の研究内容を中心に研究を推進した。研究項目 A02 では非ゲノム情報複製機構による細胞機能制御、とりわけ細胞分化、幹細胞自己複製・幹細胞性維持の解明を目指して研究を進めた。

具体的な研究成果としては、原著欧文論文数 390 報、そのうち IF10 以上の論文数は 144 報であり、総論文数における割合は 37 %であった。領域内共同研究による論文数は 31 報であった。代表的な研究成果としては、

- ・ヘテロクロマチン領域の DNA 維持メチル化に CDC7A のヘミメチル化 DNA 結合を介した HELLS のクロマチンリモデリングが重要であることを見出した。
- ・MEIOSIN の標的遺伝子の解析から減数分裂の制御に重要な役割を果たす新規因子を複数同定するなど、減数分裂の素過程の解明に貢献した。
- ・老化細胞蓄積が加齢に伴う膀胱がん発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。
- ・DNA 維持メチル化終結機構に USP7 が関わっていることを明らかにした。
- ・老化細胞からミスフォールドタンパク質をユビキチン化する酵素 LONRF2 を同定し、神経変性疾患発症にかかわることを明らかにした。
- ・加齢に伴う老化細胞の蓄積に PD-L1-PD-1 経路が重要で、抗 PD-1 抗体投与により老化細胞が

免疫除去され、加齢病態が改善することを明らかにした。

- ・植物において非 CpG メチル化の新規構築の際には CpG メチル化とのクロストークが必要であることを明らかにした。

- ・卵子形成や初期胚で特異的に発現する DPPA3 による維持メチル化因子 UHRF1 の機能阻害の構造基盤を溶液 NMR 法で明らかにした。

- ・岡崎フラグメント連結に UHRF1 により集積する LIG1 が主に作用するが、このバックアップ機構として LIG3-XRCC1 複合体が機能すること、その際に HPF1 依存的な PARP1 活性化による ADP リボシル化が重要な働きを果たしていることを明らかにした。

- ・DPPA3 が UHRF1 分子の PHD 及び SRA ドメインに結合し、ヘミメチル化 DNA 結合活性やユビキチン化活性を抑制することで受動的 DNA 脱メチル化を制御していることを明らかにした。

- ・個体内の老化細胞に対して、一細胞レベルで非ゲノム情報等について解析した。

- ・UHRF1 が PAF15 を dual モノユビキチン化し、DNMT1 を集積して活性化することを明らかにした。また、PAF15 が DNA 複製早期、ヒストン H3 が後期に主に作用することも示した。

- ・個体内の老化細胞を除去可能な代謝経路を同定し、老化症状を改善することに成功した。

- ・植物遺伝子内の抑制的 DNA メチル化確立に関わる新規機構の存在を明らかにした。

- ・体細胞分裂から減数分裂へのスイッチに決定的な役割を果たす減数分裂開始因子 MEIOSIN を世界に先駆けて同定した。

- ・脂肪細胞分化過程において NFIA が脂肪分化や筋分化に関わる遺伝子群を異なる経路で発現誘導することで脂肪細胞分化を制御していることを明らかにした。

- ・初期胚発生におけるゲノムの 3 次元的組織化と遺伝子発現の複雑な動態を明らかにした。

- ・Auxin によるタンパク質分解誘導系よりさらに急速な On-Off を可能にした新たな技術を確立した。この技術開発により DNA 複製機構の多くの未解決問題が解決された。

- ・ゲノムワイドな ATAC-seq スクリーニングにより転写因子 TFDP1 がグローバルなクロマチンへのアクセシビリティを制御する因子であることを同定した。

- ・STREAMING-tag を開発し、転写制御因子と転写活性との関連を生細胞で明らかにした。

- ・複製される非ゲノム情報として分裂酵母のサブテロメア領域のゲノム構造を完全に決定し、株によってバリエーションに富んでいることを明らかにした。

- ・DNA メチル化阻害剤の耐性に関わる分子として、ユビキチンリガーゼ TOPORS を同定した。

- ・細胞分化で抑制される遺伝子群の CpG アイランドにトリメチル化 H3K27 が誘導的に集積する過程で PCGF1-PRC1 がメヂエーターとして作用することを示した。

- ・原始内胚葉幹細胞を樹立し、これが初代原始内胚葉の性質を再現できることを示した。

- ・老化した造血幹細胞を若いマウスの骨髄ニッチに移植しても若返りが限定出来であることを明らかにした。

- ・ヒト免疫不全症患者から同定した Aiolos 転写因子のミスセンス変異によるリンパ球分化障害が新たな発症機序となり得ることを示した。

- ・転写因子 Runx が 2 つのエンハンサー領域を拮抗的に制御することで CCL5 の発現を制御し、免疫細胞の機能や抗腫瘍活性に影響を与えることを明らかにした。

- ・変異型 ASXL1 が Akt/mTOR 経路の活性化を介して加齢に伴う特徴的な造血幹細胞の拡大を誘導することを明らかにした。

- ・HHEX が変異型 ASXL1 と協調して骨髄細胞の形質転換を促進することを見出した。

- ・Hippo シグナル伝達経路を阻害すると、肝細胞は上皮と間葉のハイブリッド表現型に脱分化し、Vimentin 依存的な増殖を示すことを明らかにした。

- ・CENP-C のキューピンドメインのオリゴマー化が、CENP-C の機能、CCAN のセントロメア局在化、セントロメアクロマチン組織化に必要であることを発見した。

- ・安全なゲノム編集のために sgRNA の 5'末端にシトシンストレッチを付加したセーフガード sgRNA 戦略を確立した。

- ・完全長の MERVL 転写産物が、着床前発生における宿主のトランスクリプトームとクロマチ

ン状態の正確な制御に必須であることを明らかにした。

- ・受精後に確立される H19 ICR のインプリンテッドメチル化には、118bp 配列内の異なる配列モチーフへの特異的因子の結合が関与していることを示した。

- ・膜を持たないオルガネラが混じり合わずに独立して存在できる分子基盤を解明した。

- ・Mycl の誘導のみによって機能的な膵臓β細胞集団が拡大することを示して、新たなβ細胞の再生戦略を提供した。

- ・大脳が形成される時に、大脳皮質などを産生する背側神経幹細胞と、大脳基底核などを生み出す腹側神経幹細胞が分化する初期のメカニズムを明らかにした。

5. 主な発表論文等（受賞等を含む）

本領域全体の令和元~6 年度 6 月 1 日現在までの総欧文論文数（査読あり）は 390 報であり、そのうち IF10 以上の論文数は 144 報であった。また *Nature*, *Science* などの特筆すべき論文は 13 報であり、全体論文のうち、領域内共同研究による論文数は 31 報であった。

- ・ Meguro S, *Nakanishi M. Pre-existed senescent fibroblasts in aged bladder create tumor-permissive niche via CXCL12 secretion. *Nature Aging* in press (17/17 番目)

- ・ Katoh M, Nakanishi M, Aburatani H. Vaccine therapy for heart failure targeting the inflammatory cytokine Igfbp7. *Circulation* in press (30, 33/34 番目)

- ・ Yoshimura S, *Ishiguro K. Atypical heat shock transcription factor HSF5 is critical for male meiotic prophase under non-stress conditions. *Nature Commun* in press (9/9 番目)

- ・ Li D, *Nakanishi M. LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits. *Nature Aging* 3, 1001-1019 (2023) (31/31 番目)

- ・ Shimada R, Niwa H, *Ishiguro K. STRA8-RB interaction is required for timely entry of meiosis in mouse female germ cells. *Nature Commun* 14, 6443 (2023) (7, 9/9 番目)

- ・ Wang TW, *Nakanishi M. Blocking PD-L1-PD-1 improves senescence surveillance and ageing phenotypes. *Nature* 611, 358-364 (2022) (13/13 番目)

- ・ Kikuchi A, Nakanishi M, *Arita K. Structural basis for activation of DNMT1. *Nature Commun* 13, 7130 (2022) (16, 18/18 番目)

- ・ *To TK. Local and global crosstalk among heterochromatin marks drives DNA methylome patterning in Arabidopsis. *Nature Commun* 13, 861 (2022) (1/7 番目)

- ・ Hata K, Nakanishi M, *Arita K. Structural basis for the unique multifaceted interaction of DPPA3 with the UHRF1 PHD finger. *Nucleic Acids Res* 28, 12527-12542 (2022) (13, 16/16 番目)

- ・ Johmura Y, *Nakanishi M. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* 371, 265-270 (2021) (23/23 番目)

- ・ Horisawa-Takada Y, Niwa H, *Ishiguro K. Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis. *Nature Commun* 12, 3184 (2021) (14, 20/20 番目)

- ・ Kumamoto S, *Nakanishi M. HPF1-dependent PARP activation promotes LIG3-XRCC1-mediated backup pathway of Okazaki fragment ligation. *Nucleic Acids Res* 49, 5003-5016 (2021) (7/7 番目)

- ・ Omori S, Yamada Y, *Nakanishi M. Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16^{high} Cells In Vivo. *Cell Metab* 32, 814-828 (2020) (20, 33/33 番目)

- ・ *Nishiyama A, Aburatani H, Tanaka K, *Arita K, *Leonhardt H, *Nakanishi M. Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nature Commun* 11, 1222 (2020) (15, 17, 18, 19/19 番目)

- ・ Mulholland CB, Nakanishi M, *Leonhardt H. Recent evolution of a TET-controlled and DPPA3/STELLA-driven pathway of passive DNA demethylation in mammals. *Nature Commun* 11, 5972 (2020) (22, 24/24 番目)

- ・ *Ishiguro K, Niwa H. MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells. *Dev Cell* 52, 429-445 (2020) (1, 13/13 番目)

- ・ Collombet S, Nagano T (co-first author). Parental-to-embryo switch of chromosome organization in early embryogenesis. *Nature* 580, 142-146 (2020) (3/13 番目)

- *To TK. RNA interference-independent reprogramming of DNA methylation in Arabidopsis. *Nature Plants* 6, 1455–1467 (2020) (1/9 番目)
- Ishii S, *Miyanari Y. Genome-wide ATAC-seq screening identifies modulators of global chromatin accessibility. *Nature Genet*, 56, 473–482 (2024) (10/10 番目)
- Lim Y, Kanemaki MT. In silico protein interaction screening uncovers DONSON's role in replication initiation. *Science* 381, eadi3448 (2023) (13/15 番目)
- Liu W, Kanemaki MT. RAD51 bypasses the CMG helicase to promote replication fork reversal. *Science* 380, 382–387 (2023) (5/7 番目)
- Park DS, Kanemaki, MT. High-throughput Oligopaint screen identifies druggable 3D genome regulators. *Nature* 620, 209–217 (2023) (17/21 番目)
- Ohishi H, *Ochiai H. STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity, *Nature Commun* 13, 7672 (2022) (12/12 番)
- Yesbolatova A, *Kanemaki M. The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. *Nature Commun* 11, 5701 (2020) (14/14 番目)
- Kaito S, Nakanishi M, *Iwama A. Inhibition of TOPORS ubiquitin ligase augments the efficacy of DNA hypomethylating agents through DNMT1 stabilization. *Nature Commun* in press. (34, 35/35 番目)
- Rizq O, *Iwama A. UTX inactivation in germinal center B cells promotes the development of multiple myeloma with extramedullary disease. *Leukemia* 37, 1895–1907 (2023) (27/27 番目)
- Itokawa N, *Iwama A. Epigenetic memories inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells. *Nature Commun* 13, 2691 (2022) (12/12 番目)
- *Ohinata Y, *Koseki H. Establishment of mouse stem cells that can recapitulate the developmental potential of primitive endoderm. *Science* 375, 574–578 (2022) (11/11 番目)
- Sugishita H, *Koseki H. Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes. *Nature Commun* 9, 12 (2021) (13/13 番目)
- Fujino T, *Kitamura T. Mutant ASXL1 induces age-related expansion of phenotypic hematopoietic stem cell through activation of Akt/mTOR pathway. *Nature Commun* 12, 1826 (2021) (22/22 番目)
- Miura S, *Suzuki A. Hepatocytes differentiate into intestinal epithelial cells through a hybrid epithelial/mesenchymal cell state in culture. *Nature Commun*, in press (10/10 番目)
- *Kawamata M, *Suzuki A. Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs. *Nature Biomed Eng* 7, 672–691 (2023) (4/4 番目)
- Takakuwa H, *Hirose T. Shell protein composition specified by the lncRNA NEAT1 domains dictates the formation of paraspeckles as distinct membraneless organelles. *Nature Cell Biol* 25, 1664–1675 (2023) (11/11 番目)
- Hara M, *Fukagawa T. Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization. *Mol Cell* 83, 2188–2205.e13. (2023) (9/9 番目)
- Sakashita A. Transcription of MERVL retrotransposons is required for preimplantation embryo development. *Nature Genet* 55, 484–495 (2023) (1/8 番目)
- Hirano M, *Yamada Y. MYCL-mediated reprogramming expands pancreatic insulin-producing cells. *Nature Metab* 4, 254–268 (2022) (15/15 番目)
- Sato K, *Sengoku T. Structural basis of the regulation of the normal and oncogenic methylation of nucleosomal histone H3 Lys36 by NSD2. *Nature Commun* 12, 6605 (2021) (12/12 番目)
- Taguchi J, *Yamada Y. DMRT1-mediated reprogramming drives development of cancer resembling human germ cell tumors with features of totipotency. *Nature Commun* 12, 5041 (2021) (20/20 番目)
- Miura H, *Takebayashi S I. Mapping replication timing domains genome wide in single mammalian cells with single-cell DNA replication sequencing. *Nature Protocols* 15, 4058–4100 (2020) (9/9 番目)

受賞 24 件 中西：令和 5 年度 科学技術分野文部科学大臣表彰、岸：令和 3 年度 科学技術分野文部科学大臣表彰若手科学者賞、北村：第 8 回日本血液学会賞 など

ホームページ等

領域 HP <https://non-genome.com>

領域 Slack <https://w1589449115-rlo171249.slack.com>