

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析
(英語) Molecular mechanism for maintenance of pluripotency of stem cells and three-dimensional analyses of genome structures

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院工学研究科 教授 白川 昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Graduated School of Engineering, Kyoto University
Professor Masahiro Shirakawa

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、ES, iPS 細胞などの幹細胞が持つ多分化能性維持とリプログラミングの分子機構を明らかにし、メチローム・デメチロームの三次元およびゲノムマッピングの結果に基づき、幹細胞を特徴づけるエピゲノム状態を解明することを目的とする。タンパク質工学、ケミカルバイオロジー、最先端光学を複合的に組み合わせて、そのための新規の基盤手法の開発を行った。リプログラミングや幹細胞の分化誘導に関する基盤的知見を得るために、1) 立体構造に立脚した DNA 脱メチル化の分子機構の解明、2) 脱メチル化を誘起するヒドロキシメチル化部位のゲノムおよび核内一次元ならびに三次元マッピング、3) 幹細胞表現型マーカーとしての細胞粘弾性の計測、の三つの項目の手法開発および基盤研究を行った。特に顕著な成果として、以下の 3 点が挙げられる。

1. (白川グループ (京都大学工学研究科)、古久保グループ (横浜市立大学)、末武グループ (大阪大学蛋白質研究所))

維持メチル化、受動的脱メチル化に関与する UHRF1、Dnmt1、ヒストン H3 テールにおいて分子間、分子内相互作用を解析した。それらの結果から、マルチドメインタンパク質である UHRF1 の分子内ドメイン間相互作用による複数のエピジェネティックマーカーの読み取り機構、及び UHRF1 による

Dnmt1 の DNA メチル化自己阻害解除機構の新たな分子基盤の知見を得た。さらに、UHRF1 によるヒストンのユビキチン化修飾を介した Dnmt1 のリクルート機構に関して、定量的な相互作用解析から、Dnmt1 の RFTS ドメインとユビキチン化ヒストンの結合特異性を明らかにした。また、ヒストン H3 の N 末端領域に依存した新たな Dnmt1 のメチル化活性制御機構を示唆する生化学的データを得た。このような複数のエピジェネティックマーカーによる階層的な制御機構に関する知見は未だ限られており、新たな DNA メチル化・脱メチル化制御機構の理解に貢献すると考える。

2. (末武グループ、白川グループ、菊地グループ (大阪大学工学研究科)、Carlton グループ (京都大学生命科学研究科))

ヒト神経前駆細胞のプロモーター領域におけるメチル化シトシンとヒドロキシメチル化シトシンの分布の詳細な解析から、メチル化シトシンまたはヒドロキシメチル化シトシンの両者が同時に認められるプロモーターが存在することがわかった。さらにその分布から、ヒドロキシメチル化シトシンがメチル化シトシンの上流に存在する場合、高い発現量を示すことを見出すことができた。プロモーター近傍の、ヒドロキシメチル化またはメチル化の位置関係が発現に重要な影響を与えるという新たな制御機構を提案する知見である。メチル化・水酸化メチル化部位の核内 3 次元マッピングについても行った。

3. (白川グループ、菊地グループ)

ナノダイヤモンド内の電子対を量子センサーとして用いるナノジャイロスコープとして光検出磁気共鳴 (ODMR) 顕微鏡を作製した。これは 1 電子対の電子スピン共鳴スペクトルを測定しうるほど高感度検出が可能である。ジャイロスコープとしては、数十 nm オーダーのプロブの向きを 3 次元で 3 度以内の精度で決定しうる。その応用として、①分子マター F1-ATPase の回転、②生きた線虫の腸内におけるダイヤモンド粒子の動態、③生細胞膜の粘弾性、の一粒子計測を行なった。回転方向のみならず、水平方向の精度にも優れ、温度、活性酸素ラジカル、電場・磁場の検出も可能である。プロブは任意のタンパク質等へ付加でき、細胞毒性もないので、生細胞内の種々のパラメータの計測に応用できるポテンシャルを持つ。

In this study, we aimed to reveal the molecular mechanisms of maintenance of multi-puripotencies of stem cells such as ES and iPS cells, and clarify the epigenomic states, which characterize stem cells by genome mappings of methylome and demethylome, and by three dimensional visualization of methyl- and hydroxyl-methyl cytosines. For these purposes, we developed novel basic technologies by combining protein engineering, chemical biology and advanced photonics. In order to obtain, fundamental knowledge concerning reprogramming and differentiations of cells, we performed the following studies: 1) revelation of molecular mechanisms of DNA demethylation by means of structural biology, 2) on-genome and three-dimensional nuclear mappings of hydroxyl-methylated DNA sites, which lead to demethylation, on genome and nuclear spaces.

3) measurements of viscoelasticities of cytosols and membranes of stem and differentiated cells.

Three remarkable results of the studies are:

1) We analyzed intra- and inter-molecular interactions between UHRF1, Dnmt1 and the N-terminal tail of histone H3, which are involved in maintenance methylation and passive demethylation. From the results, we obtained novel knowledge that UHRF1 has a pivotal role in recognition of plural epigenetic markers under the regulations achieved by intramolecular domain-domain interactions of this multi-domain protein, and that the molecular basis of activation of the auto inhibited DNA methylation activity of Dnmt1 by UHRF1. Regarding to the recruitment of Dnmt1 to DNA, enhanced by histone H3 ubiquitinated by UHRF1, the quantitative analysis revealed the specific interaction between RFTS domain of Dnmt1 and histone H3 ubiquitinated by UHRF1. Thus, it seems that

through this interaction recruits Dnmt1 to DNA at the sites where the ubiquitinated histone H3 are located. (Kokubo, Suetake and Shirakawa groups)

2 Detailed analyses of distributions of methylated or hydroxy-methylated cytosines in the promoter regions of neural stem cells, there exist promoter regions harboring both methylated and hydroxy-methylated cytosines. And transcription analysis showed the promoters in which clustered regions of hydroxy-methylated cytosines are located at upstream of those of methylated ones tend to appear high transcription levels. This result provides a novel finding that the transcription levels are affected by not only methylated- but also hydroxy-methylated cytosines in promoter regions. In addition, we developed methods for three dimensional visualizations of methyl- and hydroxyl-methyl cytosines (Suetake, Carlton and Kikuchi groups)

3. We constructed microscopes to observe optically detected magnetic resonance (ODMR) signals of electrons at nitrogen-vacancy centers located in nanodiamond particles. This systems are highly sensitive, so that an ESR spectrum of a pair of electrons in an NVC can be measured. The devices can be nano gyroscope: the three-dimensional orientation of NVC in nanodiamond with a diameter of several tens nm could be detected within errors of 3 degrees. As demonstrations, we showed

- 1) the rotations of molecular motor F1-ATPase,
- 2) the movement of particles in the lumen of intestine of *C. elegans*, and
- 3) the viscosity of plasma membrane of human cells,

can be observed using the system.

(Shirakawa and Kikuchi groups)

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Genjo T, Sotoma S, Tanabe R, Igarashi R, Shirakawa M, “A Nanodiamond-peptide Bioconjugate for Fluorescence and ODMR Microscopy of a Single Actin Filament. ” *Anal Sci.* 32(11), pp.1165-1170, 2016
2. Sotoma S, Ryuji Igarashi, Masahiro S, “Moderate plasma treatment enhances the quality of optically detected magnetic resonance signals of nitrogen-vacancy centres in nanodiamonds. ” *applied physics A* . 122(5), pp.522 ,2016
3. Sotoma S, Imura J, Igarashi R, ;Hirosawa KM, Ohnishi H, Mizukami S, Kikuchi K, Fujiwara TK, Shirakawa, M, Tochio H, “Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes. ” *NANOMATERIALS*, 6(4), pp.56, 2016
4. Walinda E, Morimoto D, Nishizawa M, Shirakawa M, Sugase K. “Efficient identification and analysis of chemical exchange in biomolecules by R1 ρ relaxation dispersion with Amaterasu.” *Bioinformatics*. 32(16), pp.2539-41 2016, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「光検出時期共鳴法による細胞・生体の高分解能イメージング」,口頭, 白川昌宏,大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学蛋白質研究所, 2016/4/28, 国内
2. 「ダイヤモンド粒子の窒素-空孔中心(NVC)を用いた生体・細胞のナノジャイロセンシング手法の開発」,口頭, 白川昌宏, 第 15 回日本蛋白質化学会年会, あわぎんホール(徳島市), 2016/6/26, 国内

3. “Cell Biology Using Nanogyroscope by Optically Detected Magnetic Resonance (ODMR) Spectroscopy”, 口頭, Shirakawa Masahiro, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 京都国際会館, Aug.21-26, 2016, 国内
4. “光検出磁気共鳴法を使った高分解能イメージング”, 口頭, 白川昌宏, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016.12.1, 国内
5. “生細胞または生体における生体分子の量子センシング”, 口頭, 白川昌宏, ミニシンポジウム 生命科学・量子技術・ナノエレ・研究の融合 Interdisciplinary field: 「Life science」 - 「Quantum technology」 - 「Nano electronics」 東京工業大学 大岡山キャンパス 2017.2.28, 国内
6. “ダイヤモンド NV 中心を使った量子センシングの分子・細胞生物学への応用”, 口頭, 白川昌宏, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横, 2017.3.15, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析
(英語) Molecular mechanism for maintenance of pluripotency of stem cells and three-dimensional analyses of genome structures

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院工学研究科 教授 白川 昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Kyoto University
Professor Masahiro Shirakawa

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 超解像度顕微鏡によるメチローム・デメチロームの解析
開発課題名： (英語) High-resolution microscopy analysis of the methylome and demethylome

研究開発分担者 (日本語) 大学院生命科学研究科
准教授 ピーター・カールトン
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Biostudies,
Associate professor Peter Carlton

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：京都大学・大学院工学研究科・白川昌宏 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析
(英語) Molecular mechanism for maintenance of pluripotency of stem cells and three-dimensional analyses of genome structures

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院工学研究科 教授 白川 昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Kyoto University
Professor Masahiro Shirakawa

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) DNA 脱メチル化の解析技術開発と機構解明
開発課題名： (英語) Molecular mechanism for DNA demethylation

研究開発分担者 (日本語) 蛋白質研究所 准教授 末武勲
所属 役職 氏名： (英語) Institute for protein research,
Associate professor Isao Suetake

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：京都大学・大学院工学研究科・白川昌宏 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 6 件）

1. Kanada K, Takeshita K, Suetake I, Tajima S, Nakagawa A. Conserved threonine 1505 in the catalytic domain stabilizes mouse DNA methyltransferase1 (2017) J. Biochem in press.
2. Synthesis of Ubiquitylated Histone H3 Using a Thiirane Linker for Chemical Ligation. Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, Suetake I. J Pep Sci 2017 in press doi: 10.1002/psc.2976.
3. A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at single base resolution. Kawasaki Y, Kuroda Y, Suetake I, Tajima S, Ishino F, Kohda T. Nucl. Acids Res. 2017, 45, e24
4. Simple and accurate single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine by catalytic oxidative bisulfite sequencing using micelle incarcerated oxidants. Fukuzawa S, Takahashi S, Tachibana K, Tajima S, Suetake I. Bioorg. Med. Chem.. 2016, 24, 4254-4262
5. A linker for the isopeptide mimetics by the peptide ligation. Kawakami T, Mishima Y, Kinoshita M, Lee, Y.H, Suetake I. Tetrahedron Letters 2016, 57, 2112–2115
6. 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. Kafer GR, Li X, Horii T, Suetake I, Tajima S, Hatada I, Carlton PM. Cell Rep. 2016, 14, 1283-92.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Isoform-specific binding properties of Heterochromatin protein 1. 口頭発表 Isao Suetake, Yuichi Mishima, Shuhei Watanabe, Masahiro Shimizu, and Shoji Takada (2016) The 4th Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented, AWEST2016, June 19 – 22, 2016, 国内
2. Dnmt1 の新制御 口頭発表 末武勲 (2016) 第 1 回 エピジェネティック修飾読み手分子の構造と生命機能をつなぐ会」九州大学 生体防御医学研究所、9 月 13 日, 国内
3. DNA 脱メチル化制御機構の解析 口頭発表、高橋沙央里、末武勲 (2016) 第 16 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ、6 月 9 日、福岡国際会議場、国内
4. HP1 のクロマチンに対する結合様式、口頭発表、末武勲、三島優一、高田彰二 (2016) 蛋白研セミナー 生命システムを支配するエピジェネティクス、大阪大学蛋白質研究所セミナー、12 月 21 日、国内
5. 維持型メチル化酵素 Dnmt1 のメチル化維持活性は、ヌクレオソーム構造により阻害される、ポスター/口頭発表、末武勲、三島優一、川上徹、北條裕信 (2016)、生化学会、9 月 25-27 日、仙台国際センター、国内
6. ライゲーション法によるイソペプチド類似構造を介したヒストンペプチドのユビキチン化、川上徹、三島優一、木下岬、李映昊、末武勲 ポスター発表 (2016) 第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター、国内
7. 維持型メチル化酵素 Dnmt1 による再構成ヌクレオソーム内のヘミメチル DNA のメチル化特性、ポスター発表、三島優一、岡翔太、田嶋正二、末武勲 (2016) 第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター、国内
8. ES 細胞の多能性には Tet による Nr2f2 プロモーター領域の脱メチル化が必要である、ポスター発表、堀居拓郎、森田純代、木村美香、寺脇直美、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、畑田出穂、(2016) 第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター、国内
9. 1.5-ヒドロキシメチル化シトシンの 1 塩基レベルでの検出法の開発、ポスター発表、福沢世傑、高橋央里、橘和夫、田嶋正二、末武勲、(2016) 第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター、国内

- 10.T1505 は W1512 を支えることにより Dnmt1 の触媒中心のメチル化シトシンの認識に寄与している、ポスター発表、金田健作、竹下浩平、末武勲、Ronald Garvilles, 木村博信、田嶋正二、中川敦史、(2016) 第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター、国内
- 11.ゲノムメチル化模様を次世代細胞に継承する Dnmt1 の正確なメチル化反応に関する構造生物学的知見、ポスター発表、金田健作、竹下浩平、末武勲、Ronald Garvilles, 木村博信、田嶋正二、中川敦史(2016)、第 16 回日本蛋白質科学会、6 月 9 日、福岡国際会議場、国内
- 12.A preparation of isopeptide mimetics by the peptide ligation using a thiirane linker. ポスター発表 Toru Kawakami, Yuichi Mishima, Misaki Kinoshita, Young-Ho Lee, Isao Suetake (2016) 第 53 回ペプチド討論会 10 月 26 -28 日、京都、国内
- 13.A preparation of isopeptide mimetics by the peptide ligation using a thiirane linker. ポスター発表,Toru Kawakami, Yuichi Mishima, Misaki Kinoshita, Young-Ho Lee, Isao Suetake (2016) 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、9 月 7-9 日、金沢、国内
- 14.チイランリンカーを用いる急ペプチド類似構造を介したヒストンペプチドのユビキチン化、ポスター発表、川上徹、三島優一、木下岬、李 映昊、末武勲、(2016)、生化学会、9 月 25-27 日、仙台国際センター、国内
- 15.維持型 DNA メチル化酵素、Dnmt1、のメチル化活性のヌクレオソーム構造による阻害様式、ポスター発表、三島優一、川上徹、北條裕信、末武勲 (2016)、第 39 回分子生物学会 11 月 30 日—12 月 2 日、パシフィコ横浜、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析
(英語) Molecular mechanism for maintenance of pluripotency of stem cells and three-dimensional analyses of genome structures

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院工学研究科 教授 白川 昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Kyoto University
Professor Masahiro Shirakawa

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 化学アプローチを用いたエピゲノム解析ツール開発
開発課題名： (英語) Development of chemical tools for epigenome analyses

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科 教授 菊地 和也
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Osaka University
Professor Kazuya Kikuchi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：京都大学・大学院工学研究科・白川昌宏 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Hirayama, S., Hori, Y., Benedek, Z., Suzuki T., Kikuchi, K. “Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking”, *Nature Chem. Biol.*, 2016, 12 (10), 853–859.
2. Mizukami, S., Kashibe, M., Matsumoto, K., Hori, Y., Kikuchi K. “Enzyme-triggered compound release using functionalized antimicrobial peptide derivatives”, *Chem. Sci.* 2017, 8, 3047–3053

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches”, 口頭, Kikuchi, K. *Molecular Sensors & Molecular Logic Gate 2016*, Bath, U.K., 2016, Jul 24–28. 国外
2. 「DNA 結合性蛍光プローブによる HDAC 活性検出手法の開発」、口頭、藪島維文、立松結花、松本哲明、菊地和也、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、京都、H28 年 6 月 15 日～17 日、国内
3. 「PYP タグラベル化技術を応用したメチル化 DNA の発蛍光イメージング」、ポスター、西田会友子、堀雄一郎、菊地和也、第 25 回バイオイメージング学会学術集会、名古屋、H28 年 9 月 5 日～6 日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析
(英語) Molecular mechanism for maintenance of pluripotency of stem cells and three-dimensional analyses of genome structures
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院工学研究科 教授 白川 昌宏
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Kyoto University
Professor Masahiro Shirakawa
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) Chromosome Conformation Capture (3C)法によるメチル化・脱メチル化部位の核内三次元マッピングと反応場構築に關与する転写因子群の機能解析
開発課題名 (英語) Functional analysis on transcription factors that are involved in DNA methylation or demethylation and three-dimensional mapping of methylated or demethylated sites in the genomic DNA using the chromosome conformation capture (3C) method
- 研究開発分担者 (日本語) 大学院生命医科学研究科 教授
古久保 哲朗
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medical Life Science,
Professor Tetsuro Kokubo

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：京都大学・大学院工学研究科・白川昌宏 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Kasahara K, Higashino A, Unzai S, Yoshikawa H, Kokubo T, Oligomerization of Hmo1 mediated by box A is essential for DNA binding in vitro and in vivo. Genes Cells. 2016 21(12), 1333-1352.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ATP/ADP 結合型 RecA による E. coli /T4 DNA Ligase の DNA 末端結合活性促進の生化学的特性／ポスター発表／此村直人, 新井直人, 古久保哲朗, 柴田武彦／日本分子生物学会第 39 回年会, 横浜／2016 年 11 月 30 日／国内
2. 基本転写因子 TFIID のサブユニットである TAF8 における天然変性領域の機能解析／ポスター発表／高井直樹, Ehmed Ekrem, 櫻井堅介, 大山良文, 古久保哲朗／日本分子生物学会第 39 回年会, 横浜／2016 年 12 月 2 日／国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
なし