

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062005

研究課題名（和文） ヒストンメチル化ダイナミクスの制御と生殖系列での機能

研究課題名（英文） Regulation and roles of histone methylation dynamics in germ-lineage cells

研究代表者

眞貝 洋一 (SHINKAI YOICHI)

独立行政法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・主任研究員

研究者番号：20211972

研究成果の概要（和文）：

1. ♂生殖細胞の発生段階では、H3K9 にメチル基を入れる酵素 GLP が転写後発現抑制を受け、結果として H3K9me2 が減弱することを明らかにした。
2. H3K9 メチル化酵素 G9a/GLP 複合体は、リジンメチル化と DNA メチル化(間接的)を誘導することで転写を負に制御することを明らかにした。
3. 30年来の謎であった、発生初期の胚から樹立された細胞株で観察される DNA のメチル化に非依存的なプロウイルスの発現抑制に、ヒストンリジンメチル化酵素 ESET が重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1. We discovered that GLP protein expression is posttranscriptionally regulated in murine embryonic male germ cells after sex determination and that low H3K9me2 level results from the absence of GLP (severe reduction of the G9a-GLP heteromeric complex).
2. We demonstrated that that H3K9 methyltransferase G9a/GLP complex suppresses transcription by independently inducing both H3K9 and DNA methylation.
3. We discovered that H3K9 methyltransferase ESET and ESET-mediated H3K9me3 play a crucial role in proviral silencing during the period early in embryogenesis when DNA methylation is dynamically reprogrammed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	0	8,500,000
2009年度	21,200,000	0	21,200,000
2010年度	21,200,000	0	21,200,000
2011年度	21,200,000	0	21,200,000
2012年度	21,200,000	0	21,200,000
総計	93,300,000	0	93,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、ヒストン、メチル化、エピジェネティクス、内在性転移因子、転写制御

1. 研究開始当初の背景

ヒストンのメチル化修飾研究は、2000年に動物細胞で初めてリジンのメチル化酵素の実体が

明らかにされたことから本格的にスタートする。その後、わずか数年の間に多くの重要な知見が報告され、転写制御研究分野のみならずヒスト

ンメチル化修飾が生命科学研究に与えたインパクトは計り知れない(総説、Jenuwein et al. *FEBS J* 273:3121-35, 2006)。その研究潮流の中、我々は新規のヒストン・リジンメチル化酵素G9aを独自に同定し(Tachibana et al. 2001)、リジンメチル化酵素の機能解析を精力的に行ってきた。近年、不可逆的と考えられてきた蛋白質メチル化修飾が、他の化学修飾と同様に可逆的で・積極的に外されることが細胞株を用いた実験で示された。今後、当該研究分野が明らかにすべき最も重要な課題の一つは、「どのようにしてヒストンメチル化修飾のダイナミズムが制御されているのか、そしてその制御が生命機能にどのようなインパクトを持つのか、を解き明かす」ことにある。

2. 研究の目的

今回提案した研究は、我々のG9aの研究から得られた成果を基盤にしている。特に、G9aが生殖系列の分化過程に決定的な役割を持つこと、また、生殖細胞の発生・分化過程ではメチル化を含むヒストンコードがダイナミックに変化することが明らかとなった。そこで、本研究課題では、以下の2点を明らかにすることを当初の目的とした。

a. マウスの生殖系列細胞で特異的にG9aを欠損させると、雌雄いずれの場合も生殖細胞は減数分裂の途中までしかほとんど発生・分化しない。このG9aならびにG9aとヘテロ複合体を形成しているもう一つのヒストンメチル化酵素GLPによって制御されている生殖細胞の発生・分化過程の分子基盤の詳細を明らかにする。

b. ヒストンメチル化酵素ならびにその修飾の機能とヒストンメチル化コードのダイナミズムの制御基盤の実体を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

a. G9a/GLP によって制御されている生殖細胞の発生・分化過程の分子基盤の解明

当初、TNAP-Creトランスジェニック(TG)マウスとG9a^{fllox}マウスを交配させて、生殖細胞特異的にG9aを欠失させた細胞を得ることを計画していた。しかし、TNAP-CreTGのCreの発現が生殖細胞以外でも顕著なため、TNAP-Cre⁺, G9a^{fllox}/fマウスを得ることができなかった(G9aノックアウト(KO)マウスは胎生致死)。そこで、解析手法を少し変え、まずはG9a, GLPの発現とG9a/GLPが制御しているヒストンH3の9番目のリジンのジメチル化(H3K9me2)の状態の変動を胎生期の生殖細胞で検討した。

b. ヒストンメチル化酵素ならびにその修飾の機能とヒストンメチル化コードのダイナミズムの制御基盤の解明

G9a/GLPヘテロ複合体によるH3K9メチル化

がどちらの酵素により制御されているか、さらにこれらのメチル化酵素の酵素活性が転写抑制にどの程度重要かを検証するために、G9a, GLPのKO及びダブル(D)KOの胎生幹(embryonic stem:ES)細胞に酵素活性のないG9a, GLPあるいは両方を発現させて、その表現系を解析した。

さらに、酵素活性のないG9a/GLPとは別のH3K9メチル化酵素ESET/Setdb1の機能を解析するために、Eset条件的KOマウスおよび細胞株を樹立し、その表現系を詳細に解析した。

4. 研究成果

a. 雄性生殖細胞の発生段階で観察されるH3K9me2消失の機能の解明

♂生殖細胞の発生段階では、G9aとヘテロ複合体を形成することでH3K9にメチル基を入れる酵素GLPが転写後発現抑制を受け、結果としてH3K9me2が消失していることが明らかとなった。この転写後制御の分子機構を明らかにする目的で、*Dicer*および*Nanos2*のKOマウスにおいてGLPの発現が♂胚性生殖細胞でどのようになっているか、解析した。その結果、*Nanos2*欠損マウスの♂胚性生殖細胞では、GLPのタンパク質発現が検出できることがわかった。さらに、このヒストンH3K9me2修飾のグローバルな抑制の生殖細胞発生における役割を明らかにする目的で、5'および3'非翻訳領域を持たない外来性GLP遺伝子を発現するTGマウスを作成した。解析の結果、このTGマウスの♂生殖細胞では、GLP(外来性)のタンパク質発現が検出され、H3K9me2のレベルも有意に上昇していることが判明した(Deguchi et al 2013)。

b. G9a/GLP複合体による転写抑制機構の解明

H3K9をメチル化するG9a/GLP酵素複合体は、リジンメチル化とDNAメチル化(間接的)を誘導することで転写を負に制御することを明らかにした(Tachibana et al 2008)。

c. ESET依存的な内在性レトロウイルス(ERVs)の転写抑制機構の解明

30年来の謎であった胚性腫瘍細胞や胚性幹細胞などのような発生初期の胚から樹立された細胞株で観察される、DNAのメチル化に非依存的な、特別なプロウイルスの発現抑制にヒストンリジンメチル化酵素ESETが重要な役割を持つことを明らかにした(Matsui et al 2010)。

次に、次世代シーケンサーを用いたコンディショナルEset KO ES細胞の転写産物の解析の結果、Eset KOにより発現が誘導される遺伝子の中には、発現が誘導されたERVsとの融合転写産物として発現しているものがいくつもあることを見出した。ERVsの発現が近傍の遺伝子の発現に影響することは知られているが、ヒストンメチル化がこのERVsによる近傍遺伝子の発現影響の制御に寄与していることが初めて示された

(Karimi et al 2011)。

さらに、ESET は胚性幹細胞だけでなく、post-mitotic neuron においても ERVs の発現抑制に寄与していること、ここでも *Eset* が消失すると複数の遺伝子が活性化した ERVs との融合転写産物として発現誘導されてくることが明らかとなった(Tan et al 2012)。

d. ヒストンリジンメチル化酵素 Suv39h によるペリセントロメアヘテロクロマチン構築の分子機構の解明

ヒストンリジンメチル化酵素 Suv39h1,2 はヘテロクロマチン領域の中心的 H3K9me3 酵素であり、*Suv39h1,2* の DKO 細胞ではペリセントロメア領域の H3K9me3 が消失し、♂KO マウスは精子形成不全で不妊となる。これまで、この Suv39h によるペリセントロメアの H3K9me3 の確立及び維持には、HP1 との会合と HP1 による H3K9me3 の認識が重要であると考えられてきた。しかし、実験的な検証はなされてこなかった。今回、HP1 による Suv39h 依存的ヘテロクロマチン形成に HP1 との会合が如何に重要かを検証するために、HP1 と会合しない Suv39h 欠損体(ΔN)がどこまで *Suv39h* DKO 細胞のヘテロクロマチン形成を相補できるか、検討した。解析の結果、ΔN は HP1 のペリセントロメア局在はほとんど回復させないにもかかわらず、HP1 と会合しない ΔN 自身のペリセントロメア局在と H3K9me3 をほぼ相補することがわかった。しかし、ペリセントロメア領域の major satellite repeats の転写は不完全にしか抑制されていなかった。今回の解析により、Suv39h のペリセントロメア局在には HP1 との会合は必須ではないものの HP1 のペリセントロメア局在が本来の機能的ペリセントロメアに重要であることが示された(Muramatsu et al 投稿中)。

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 24 件)

1. Deguchi, K. Nagamatsu, G. Miyachi, H. Kato, Y. Morita, S. Kimura, H. Kitano, S. Hatada, I. Saga, Y. Tachibana, M. and Shinkai, Y*. Posttranscriptional regulation of histone lysine methyltransferase GLP in embryonic male germ cells. *Biol. Reprod.*, 2013, **88**:1-8. 査読有り
2. Tan, S. Nishi, M. Ohtsuka, T. Matsui, T. Takemoto, K. Kamio-Miura, A. Aburatani, H. Shinkai, Y. and Kageyama, R*. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development*, 2012, **139**:3806-3816. 査読有り

3. Shinkai, Y*, and Tachibana, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev.* 2011, **25**:781-788. 査読有り
4. Karimi, M.M. Goyal, P. Maksakova, I.A. Bilenky, M. Leung, D. Tang, J.X. Shinkai, Y. Mager, D.L. Jones, S. Hirst M. and Lorincz, M.C*. DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements and chimeric transcripts in mouse ES cells. *Cell Stem Cell*. 2011, **8**:676-687. 査読有り
5. Matsui, T[#]. Leung, D[#]. Miyashita, H. Maksakova, I.A. Miyachi, H. Kimura, H. Tachibana, M. Lorincz, M.C*. and Shinkai, Y*. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 2010, **464**:927-931. 査読有り
6. Inagaki, T[#]. Tachibana, M[#]. Magoori, K. Kudo, H. Tanaka, T. Okamura, M. Naito, M. Kodama, T. Shinkai, Y*. and Sakai, Y*. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase *JHDM2a* deficient mice. *Genes to Cells*, 2009, **14**:991-1001. 査読有り
7. Tachibana M*. Matsumura Y. Fukuda M. Kimura H. and Shinkai Y*. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 2008, **27**:2681-2690. 査読有り

[学会発表] (計 30 件)

1. Shinkai Y.: ESET-mediated endogenous retrovirus silencing. **CSH-Asia meeting on "Epigenetics, Chromatin, and Transcription"** April 25, 2012, Suzhou, China
2. 眞貝洋一:「ESET-mediated endogenous retrovirus silencing」第34回日本分子生物学会年会シンポジウム、2011年12月16日、横浜
3. 眞貝洋一、松井稔幸:「ヒストンリジンメチル化酵素 ESET による内在性レトロウイルス抑制機構」日本遺伝学会第82回大会、札幌、2010年9月20日
4. Shinkai Y.: ESET/SETDB1 is essential for LTR-retroelement silencing in mouse

embryonic stem cells. **FASEB Summer Research Conferences, "Epigenetics, Chromatin & Transcription"**. July 12-17, 2009, Snowmass Village, Colorado, USA

5. Shinkai, Y.: Epigenetic Gene Silencing Mechanisms of the G9a/GLP Histone Methyltransferase Complex. **6th NIBB-EMBL joint Meeting**, March 17-19, 2008 at EMBL Heidelberg, Germany

[図書] (計 2 件)

1. 実験医学別冊 エピジェネティクス実験プロトコール 編/牛島俊和、眞貝洋一、羊土社、2008年
2. Mammalian epigenetics in biology and medicine' compiled and edited by Ishino F. Shinkai Y. and Whitelaw E. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* January 5, 2013; 368 (1609)

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_mem/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞貝 洋一 (SHINKAI YOICHI)

独立行政法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・主任研究員

研究者番号：20211972

(2) 研究分担者 (2008-2009 のみ)

立花 誠 (TACHIBANA MAKOTO)

国立大学法人京都大学 ウイルス研究所
感染症モデル研究センター ゲノム改変マウス研究領域・准教授

研究者番号：80303915

(3) 連携研究者

なし