

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250039

研究課題名(和文) H3K9メチル化による転写抑制の実体の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of H3K9me-mediated transcriptional silencing

研究代表者

眞貝 洋一 (Shinkai, Yoichi)

国立研究開発法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・主任研究員

研究者番号：20211972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：H3K9メチル化酵素SETDB1により転写抑制されるレトロウイルスにGFP遺伝子を組み込んだウイルスをES細胞に感染させ、GFPの発現が抑制された細胞をレポーター細胞として、Cas9-CRISPRによるノックアウトスクリーニングを行い、レトロウイルスの転写抑制に寄与する因子の網羅的探索を行った。結果、SETDB1を筆頭としてレトロウイルスや内在性のレトロエレメントの転写抑制に寄与することが分かっていた因子が軒並み同定され、さらにいくつもの新規因子の同定にも成功した。新規に同定した因子の中では、SETDB1の上流で機能する因子と下流あるいは並行して機能する因子があることが見えてきた。

研究成果の概要(英文)：The Moloney murine leukemia virus (MLV)-based retroviral vector MSCV-GFP, which is repressed by the histone H3 lysine 9 methyltransferase SETDB1 pathway in mESCs was used as a reporter provirus, we performed a genome-wide CRISPR screen to advance our understanding of retroelement silencing in mESCs. We identified more than 80 genes involved in this process including not only already known retroelement silencing genes but also multiple novel ones. Among the characterized novel factors, we find that they seem to work for silencing in different layers, thus upstream and parallel or downstream of SETDB1.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 レトロエレメント 転写抑制 SETDB1 網羅的KOスクリーニング H3K9メチル化 ES細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

2003年のヒトゲノム計画の完了以降、様々な生物種の全ゲノムが解読されて来た。その結果明らかにされた共通する重要な知見の一つは、生物のゲノムは遺伝子よりもはるかに多くの転移因子に由来する配列によって占められているという点である。例えば、ヒトでは、遺伝子をコードする領域はわずか2%程度にしか過ぎないが転移因子に由来する配列は50%以上にわたる。つまり、生命は転移因子とともに進化してきたと言えるが、転移因子の転移はほとんどの場合宿主にとっては中立か不利益である。そのため、生物は転移因子に対して、様々な対抗する機構を備えてきた。一旦ゲノムに入り込んだ転移因子を抑える最初の抑制機構は、転移因子の転写を抑えることにある。DNAのメチル化は転移因子の転写抑制に重要な役割を果たしており、植物や哺乳類を始めとする多くの動物ではDNAのメチル化が低下すると転移因子が活性化し転移が誘導されることが分かっている。しかし、DNAのメチル化が存在しない生物も存在する(例えば分裂酵母)。近年の研究により、ヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)のメチル化によるエピジェネティクス制御機構が転移因子の抑制に重要な役割を果たしていること、この機構はDNAのメチル化以上に生物種で広く使われている転写抑制機構であることが明らかとなった。これまでの解析から、H3K9のジあるいはトリメチル化(H3K9me<sub>2,3</sub>)は転写抑制のエピゲノムマークとして機能し、このマークに親和性を示す共通した読み取り分子を呼び込むことが転写抑制のシグナル伝達に重要だと理解されている。実際、このマークが存在する生物種ではH3K9にメチル基を付加する酵素もH3K9me<sub>2,3</sub>に高親和性を示すクロモドメインをもつタンパク質であるHP1ファミリー分子も保存されている。しかし、HP1ファミリー分子がいかんして転写抑制を誘導するのか、はたまたHP1分子の呼び込みは転写抑制に(共通して)どのくらい重要なのか、実はよく分かっておらず、つまり“H3K9メチル化により誘導される転写抑制”の実体は、未だに十分に解明されていない。

#### 2. 研究の目的

H3K9me<sub>2,3</sub>は、種を超えて保存された転写抑制のエピジェネティックマークとして存在している。しかし、どのようにしてこのエピゲノム情報が転写を抑制するのか、その機構はまだよく理解されていない。そこで本研究では、H3K9メチル化による転写抑制の分子機構の実体の解明を試みる。

#### 3. 研究の方法

ヒストンH3K9メチル化酵素SETDB1/ESETは、内在性レトロウイルス(endogenous retrovirus (ERV))及び外来性のレトロウイ

ルスの転写抑制に寄与しており、*Setdb1*をノックアウトしたES細胞では抑制された状態のERVs並びにプロウイルス化した外来性レトロウイルスが脱抑制する(Matui et al Nature 2010)。そこで、マウスES細胞でSETDB1により転写が抑制される外来性レトロウイルスの5'LTRの下流にGFP遺伝子を組み込んだレポーターウイルスをES細胞に感染させ、その後GFPの発現が抑制された細胞をレポーター細胞として使い、Cas9-CRISPRによる遺伝子ノックアウトスクリーニングを行って、レトロウイルスの転写抑制に寄与するエピジェネティック因子の網羅的探索を行う。新規因子が同定されたら、それらの因子がどのようにしてレポーターウイルスの転写を抑制するのか、又どのような内在性レトロエレメントの転写抑制に寄与するのか、明らかにする。特に、H3K9メチル化の下流で転写抑制に寄与する可能性の因子に注目して研究を進める。

#### 4. 研究成果

スクリーニングした結果、SETDB1を筆頭としてこれまでレトロウイルスや内在性のレトロエレメントの転写抑制に寄与することが分かっていた因子が軒並み同定され、さらにいくつもの新規の因子の同定にも成功した(Fukuda et al. Genome Res. 2018)。新規に同定した因子の中では、SETDB1の上位で機能する分子と下流あるいは並行して機能する分子があることが見えてきており、現在さらなる解析を進めている。また、今回解析した新規因子の1つDRES1は、レトロエレメントの転写抑制だけでなく、インプリント遺伝子の発現制御にも寄与しており、DRES1ノックアウトマウスを作成し、生体内における役割を解明を現在進めている。

#### 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3件)\*責任著者

1. Fukuda K, Okuda A, Yusa K\*, Shinkai Y\*. A CRISPR knockout screen Identifies SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. *Genome Res.* 2018 May 4. pii: gr.227280.117. doi: 10.1101/gr.227280.117. 査読有

2. Kato M\*, Takemoto K+, Shinkai Y\*. A somatic role for the histone methyltransferase *Setdb1* in endogenous retrovirus silencing. *Nat Commun.* 2018 Apr 27;9(1):1683. 査読有  
doi:10.1038/s41467-018-04132-9.

3. Ferry L+, Fournier A+, Tsusaka T+,

Adelmant G, Shimazu T, Matano S, Kirsh O, Amouroux R, Dohmae N, Suzuki T, Filion GJ, Deng W, de Dieuleveult M, Fritsch L, Kudithipudi S, Jeltsch A, Leonhardt H, Hajkova P, Marto JA, Arita K, Shinkai Y\*, Defossez PA\*. Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP Recruits UHRF1 to Replicating DNA and Regulates DNA Methylation. Mol Cell. 2017 Aug 17;67(4):550-565.e5. doi:

10.1016/j.molcel.2017.07.012. 査読有  
〔学会発表〕(計 10 件)

1 . 眞貝洋一 : 「非ヒストンたんぱく質のリジンメチル化を介したエピゲノム複製の制御」, 生命科学系学会合同年次大会 2017、2017 年 12 月 8 日、神戸

2 . 加藤雅紀 : 「Atf7ip による外来性および内在性レトロウイルス抑制機構の解析」, 生命科学系学会合同年次大会 2017、2017 年 12 月 8 日、神戸

3 . Shinkai Y. Role and regulation of histone lysine-9 methylation. Japan-France EPIGENETICS WORKSHOP 2017, November 6-8, 2017, Paris - Diderot University, France

4 . 福田 溪 : 「A CRISPR Knockout Screen Identifies Provirus Silencing Factors in Embryonic Stem Cells」, 第 11 回エピジェネティクス研究会年会、2017 年 5 月 22 日、東京

5 . Shinkai Y. Epigenetic regulation of transposable element. 熊本大学リエゾンラボ研究会 / リーディングプログラム : HIGO プログラム最先端研究セミナー、2017 年 2 月 15 日、熊本

6 . 福田 溪 : 「CRISPR-Cas9 システムを用いた内在性ウイルス抑制因子の網羅的同定」, 日本遺伝学会第 88 回大会、一般公演口頭発表 2016 年 9 月 7 日、三島

7 . 津坂剛史, Alexandra Fournier, Laure

Ferry, 島津忠弘, Pierre-Antoine Defossez, 眞貝洋一 : 「非ヒストンタンパク質メチル化探索により得られた DNA メチル化維持機構に関する新知見」第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸、兵庫県

8 . Shinkai Y. Epigenetic regulation of transposable element. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, November.17-20 2015 Nara, Japan

9 . Shinkai Y. Function and regulation of H3K9 methyltransferases in mammals. SGC seminar, October 29, 2015, Toronto, Canada

10 . 加藤雅紀 : 「ヒストンメチル化酵素 Setdb1 によるレトロエレメントの抑制機構」, 日本遺伝学会第 87 回大会、ワークショップ口頭発表 2015 年 9 月 25 日、仙台

〔図書〕(計 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  
<http://shinkai.riken.jp/>

6 . 研究組織  
(1) 研究代表者  
眞貝 洋一 (SHINKAI Yoichi)

国立研究開発法人理化学研究所・真貝細胞  
記憶研究室・主任研究員  
研究者番号：20211972

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )