

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2014～2015
 課題番号：26870847
 研究課題名(和文) Mechanistic link between DNA methylation and H3K9 trimethylation in mammalian cells mediated by two novel SRA proteins- Np95 and Np97
 研究課題名(英文) Mechanistic link between DNA methylation and H3K9 trimethylation in mammalian cells mediated by two novel SRA proteins- Np95 and Np97
 研究代表者
 SHARIF JAFAR (SHARIF, JAFAR)
 国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員
 研究者番号：00577968
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、NP95と呼ばれるタンパク質が、転写を抑制するメチル化DNAと転写を活性化する非メチル化DNAの中間状態である「ヘミメチルDNA」に結合することにより、抑制型のH3K9ヒストン修飾を解除し、内在性レトロウイルス(ERV)配列の転写を誘導することを解明した。ヘミメチルDNAによる転写制御モデルの発見により、メチル化DNAと非メチル化DNAを中心とした転写制御の従来モデルが大きく見直された。

研究成果の概要(英文)：In the present project, I investigated the role of the mammalian SRA proteins NP95 and NP97 for regulation of H3K9me3, a repressive epigenetic mark, in mammalian cells. I found that protracted binding of NP95 to hemimethylated DNA sites (cytosine methylation in only one strand of the CpG dyad) leads to transient disruption of H3K9me3-dependent transcriptional silencing. I showed that NP95 binding to naturally occurring hemimethylated sites in the placenta gives rise to dramatic activation of a specific class of CpG-rich endogenous retroviruses (LTR containing DNA sequences) via disruption of H3K9me3 mediated silencing. This pathway is inactive in the embryo proper due to the high fidelity of the NP95-DNMT1 mediated maintenance methylation pathway (Sharif et al, Nature, 2007), which prevent accumulation of hemimethylated DNA. I recently reported these observations in a scientific paper (Sharif et al., Cell Stem cell, 2016).

研究分野：Epigenetics; Transcription; Tetrotransposons

キーワード：NP95 Hemimethylated DNA SETDB1 H3K9me3 Endogenous retroviruses IAP Placenta Development

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾は、胚発生や細胞の運命決定に深く関わっている。細胞分裂を経て、親細胞から娘細胞に DNA メチル化のパターンが複製されますが、SRA タンパク質 [7] の「NP95」はこの過程において中心的な役割を担っている注 1、2)。NP95 は SRA ドメインを介してヘミメチル DNA を認識し、さらに DNA メチル化酵素の「DNMT1」を連れてくることにより、DNA メチル化を忠実に維持する。

このように、DNA メチル化機構は NP95 および DNMT1 によって構成されているため、Np95 または Dnmt1 のどちらの遺伝子を欠損しても、DNA メチル化が低下する。実際に、Dnmt1 を欠損した発生中期のマウス(胎児)では、IAP という「内在性レトロウイルス (ERV)」が劇的に転写活性化する注 3)。しかし不可解なことに、長期間培養した Dnmt1 ノックアウト ES 細胞では、IAP の転写がほとんど起こらない注 4)。長期培養後の Dnmt1 ノックアウト ES 細胞では、“H3K9 メチル化による抑制型クロマチン修飾が、DNA メチル化の代わりに IAP の転写を阻止している”というモデルが、その後提唱されている注 5)。

注 1) 2007 年 11 月 30 日プレスリリース「エピジェネティックな遺伝情報発現の制御機構を発見」

http://www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2007/20071130_1/20071130_1.pdf

注 2) Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M & Koseki H. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 450, 908-12. (2007)

注 3) Walsh C P, Chaillet J R & Bestor T H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 20, 116-7. (1998)

注 4) Hutnick L K, Huang X, Loo T C, Ma Z & Fan G. Repression of retrotransposal elements in mouse embryonic stem cells is primarily

mediated by a DNA methylation-independent mechanism. *J Biol Chem*. 285, 21082-91. (2010)

注 5) Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova I A, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz M C & Shinkai Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927-31. (2010)

注 6) Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M & Shirakawa M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 12950-5. (2012)

2. 研究の目的

IAP の転写を抑制するエピジェネティック経路が、どのようにして DNA メチル化依存的なものから H3K9me3 依存的なものに切り替わるのか、詳しいメカニズムは分かっていない。NP95 は DNA メチル化および H3K9me3 注 6) の両方ともを認識するため、IAP 転写に重要な役割を持つ可能性がある。そこで、本研究では、NP95 に着目し、IAP の転写抑制における DNA メチル化および H3K9me3 の相互作用の解析に挑みました。

3. 研究の方法

本研究では、Dnmt1 および Np95 のノックアウトマウスや ES 細胞を作製し、IAP の転写抑制における DNA メチル化因子の役割を解析した。Dnmt1 ノックアウトマウスおよび ES 細胞では、既に報告されているように、IAP が劇的に転写されていた。しかし驚くべきことに、Dnmt1 ノックアウトと同様に、DNA メチル化が低下する Np95 ノックアウトでは、IAP の転写がほとんど上昇しなかった(図 1)。さらに、Dnmt1 および Np95 の両因子ともをノックアウトしたマウスおよび ES 細胞でも、IAP の転写活性化がみられ

なかった。これらの結果から、IAP の転写活性化は DNA 脱メチル化に依存しないと考えられ、さらに、NP95 が IAP の転写に何らかの役割を持っていることが示唆された。

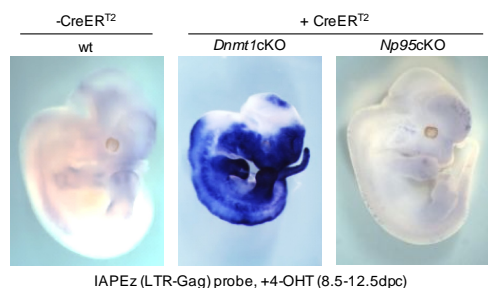


図1 *Dnmt1*、および *Np95* ノックアウトマウス胎児における IAP 転写

左：野生型のマウス胎児
 中：*Dnmt1* ノックアウトマウス胎児。劇的な IAP 転写（青色で標識）が起きている。
 右：*Np95* ノックアウトマウス胎児。DNA メチル化が同様に低下するにも関わらず、IAP 転写が起きない。

Dnmt1 ノックアウトマウス細胞では DNA メチル化が破綻するため、遅延性のヘミメチル DNA^[8] が出現する。本研究は、このような遅延性のヘミメチル DNA に NP95 が “通常よりも長く結合する” ことにより、下流の H3K9me3 の蓄積が阻害されることを発見した。ヒストンメチル化酵素の SETDB1 は、IAP を含む ERV 領域への H3K9me3 蓄積を媒介するが、*Np95* ノックアウト ES 細胞では、この「SETDB1-H3K9me3 経路」によって IAP の転写が抑制される。実際に、*Np95* と *Setdb1* の両遺伝子を同時にノックアウトすると、予想通り、IAP が劇的に転写活性化したことから、NP95 と SETDB1 との間に阻害的な関係が存在することが考えられる（図2）。

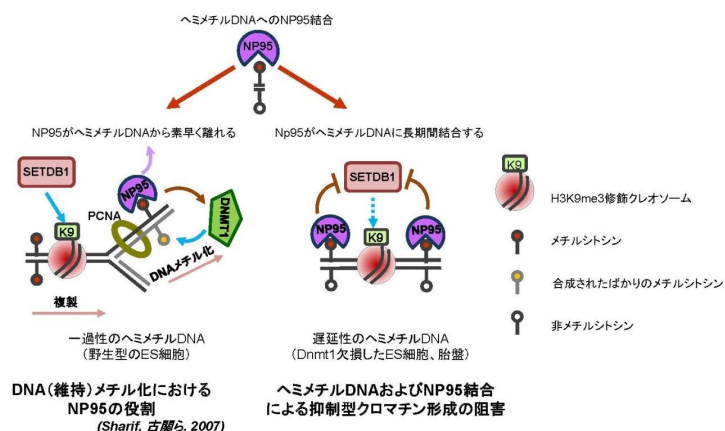


図2 一過性と遅延性のヘミメチル DNA への NP95 の結合及びその生物学的な意義

一過性のヘミメチル DNA への NP95 の結合は、DNMT1 を介してフルメチル化（2 鎖 DNA の両方の鎖がメチル化された）状態を誘導する（左）。一方、遅延性のヘミメチル DNA に NP95 が結合すると、SETDB1-H3K9me3 による抑制型のクロマチン修飾が阻害される（右）。

これらの結果をまとめると、*Dnmt1* をノックアウトした初期段階の細胞では、DNA メチル化機構の破綻により、大量のヘミメチル DNA が出現するが、ヘミメチル DNA に NP95 が結合することによって IAP が転写される。しかし、長期培養後の *Dnmt1* ノックアウトマウス細胞では、ヘミメチル DNA がなくなるのに伴い、NP95 の結合が減少するため、SETDB1-H3K9me3 機構によって IAP の転写が抑制される。つまり、IAP の転写抑制における分子メカニズムにおいて、DNA メチル化依存的な機構から SETDB1-H3K9me3 依存的な機構へと移行するためには、ヘミメチル DNA および NP95 結合がなくなることが必要である。

マウスの体細胞や胎児では、IAP を含む ERV 配列が DNA メチル化や H3K9me3 化などの複数のエピジェネティック機構によって転写抑制されていることが、過去の研究が

ら明らかになっている。ERVの転写はゲノムの安定性に悪影響を及ぼすため、DNAメチル化やH3K9me3などの修飾は細胞防御システムの一環として、ERVの転写を抑制すると考えられている。本研究から、胎盤などの胚体外組織ではIAPが高いレベルで転写されていることが発見されている。これは、胎盤はERV転写を許容していることを意味し、さらに、胎盤の発生や正常な機能にはERV転写の必要性があることを示唆している。興味深いことに、Np95をノックアウトしたマウスの胎盤ではIAPの転写が減少する。つまり胚体外組織では、ヘミメチルDNAへのNP95の結合がIAPなどの配列からの転写活性化を制御していると思われる。

4. 研究成果

本研究は、「NP95」と呼ばれるタンパク質が、転写を抑制するメチル化DNAと転写を活性化する非メチル化DNAの中間状態である「ヘミメチルDNA」に結合することにより、抑制型のH3K9ヒストン修飾^[3]を解除し、内在性レトロウイルス(ERV)配列の転写を誘導することを解明した。ヘミメチルDNAによる転写制御モデルの発見により、メチル化DNAと非メチル化DNAを中心とした転写制御の従来モデルが大きく見直された。

ヒトを含むほ乳類ゲノムの約10%は、ERV由来の配列から構成されている。しかし、ERVの異常な転写はゲノムの安定性を揺るがす危険性を伴うため、通常、DNAメチル化やH3K9メチル化などのエピジェネティック修飾によって厳密に抑制されている。これまでの研究により、DNAメチル化機構は、NP95とDNMT1と呼ばれる酵素によって構成されることが知られている。実際にNp95またはDnmt1のどちらの遺伝子をノックアウトしても、DNAメチル化は抑制され、Dnmt1ノックアウトマウスではERVの1種

のIAP(intracisternal A particles)の転写が活性化されることが分かっている。一方、長期培養したDnmt1ノックアウト胚性幹(ES)細胞では、IAPの転写が起こらないという不可解な現象が起こる。このことからIAPの転写抑制は、DNAメチル化依存的な機構からH3K9メチル化依存的な機構に切り替わることが示唆されていたが、詳しいメカニズムは不明であった。

本研究では、Dnmt1およびNp95のノックアウトマウスやES細胞を作製し、IAPの転写抑制におけるDnmt1とNp95の役割を調べた。その結果、Dnmt1ノックアウトマウス細胞の初期段階では、DNAメチル化機構が破綻し、大量のヘミメチルDNAが出現することがわかった。これらのヘミメチルDNAにNP95が結合することによって、IAPが転写されるという興味深い現象が明らかになった。一方、長期培養後のDnmt1ノックアウト細胞では、ヘミメチルDNAがなくなるに伴い、NP95の結合が減少し、下流の「SETDB1-H3K9me3経路」によって、IAPの転写が抑制されることがわかった。つまり、IAPの転写抑制における分子メカニズムにおいて、DNAメチル化依存的な機構からSETDB1-H3K9me3依存的な機構への移行には、ヘミメチルDNAおよびNP95結合がなくなることが必要であることがわかった。

本研究は、ヘミメチルDNAおよびNP95を介した新たなエピジェネティック機構を明らかにした。この機構は、胎盤特異的な遺伝子の転写活性化に寄与している可能性があるため、胎盤機能の異常による流産や不妊の分子メカニズムの解明に役立つと考えられる。

今後の期待

本研究は、ヘミメチルDNAおよびNP95を介した新たなエピジェネティック機構を明らかにした。この機構は、胎盤特異的な遺伝

子の転写活性化に寄与している可能性があるため、胎盤機能の異常による流産や不妊の分子メカニズムの解明に役立つと思われる。

同様のエピジェネティック機構は、5-Aza-dC などの低分子化合物の持つ、がん抑制効果にも寄与している可能性がある。5-Aza-dC は、DNA の維持メチル化を阻害するため、遅延性のヘミメチル DNA の蓄積を誘導する。これらのヘミメチル DNA に NP95 が結合すると標的ゲノム領域からの転写が活性化されると予想される。

さらに、NP95 と SETDB1 との阻害的な関係は、初期発生において重要な機能を持っていると思われる。ほ乳類の受精卵や 2 細胞胚などでは、NP95 のほとんどが細胞質に輸送されており、核内では「*Np95* 欠損」に類似した状況に置かれている。この時期には、ゲノムが低 DNA メチル化状態になっているが、H3K9me3 機構が DNA メチル化の代わりに ERV を抑制していることが、近年の研究から明らかになっている。NP95 が核外に輸送されていることで、H3K9me3 による円滑な IAP 抑制が起きている可能性が示唆され、ほ乳類の初期発生におけるエピゲノム制御を理解するための重要な知見となる。

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 1 件)

著者名

Jafar Sharif, Takaho A. Endo, Manabu Nakayama, Mohammad M. Karimi, Midori Shimada, Kayoko Katsuyama, Preeti Goyal, Julie Brind'Amour, Ming-An Sun, Zhixiong Sun, Tomoyuki Ishikura, Yoko Mizutani-Koseki, Osamu Ohara, Yoichi Shinkai, Makoto Nakanishi, Hehuang Xie, Matthew C. Lorincz and Haruhiko Koseki

論文標題

Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1-/- ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95

Binding to Hemimethylated DNA

雑誌名

Cell Stem Cell

査読の有無

有

巻

Eprint ahead of publication.

発行年

2016 (西暦)

ページ

Eprint ahead of publication.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 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(なし)

6 . 研究組織

(1) SHARIF JAFAR

(SHARIF JAFAR)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員

研究者番号 00577968

(2)研究分担者:なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者:なし

()

研究者番号: