

眞貝細胞記憶研究室
Cellular Memory Laboratory

主任研究員 眞貝 洋一 (医博)
SHINKAI, Yoichi (Ph.D)



キーセンテンス：

1. 生命機能におけるエピジェネティクス制御の重要性を解明する
2. タンパク質リジンメチル化の新たな役割を解明する
3. 新たなモデル動物を作成し疾患の分子機構を解明する

キーワード：

エピジェネティクス、ヒストンメチル化、タンパク質翻訳後修飾、DNAメチル化、遺伝子ノックアウト、遺伝子発現制御、クロマチン、代謝、ゲノム、モデル動物

研究目的

当研究室は、エピジェネティクス制御の観点から生命現象を理解することを目標に研究を行っている。ヒストンの翻訳後修飾、特にヒストンリジン残基のメチル化制御は遺伝子の発現だけでなくDNAの修復さらにはクロマチンの構造や安定性にも重要な役割を持つ。この分子基盤を明らかにすることから、モデル動物を用いて生体内の様々な生命機能における役割を明らかにし、エピジェネティクス制御不全の視点から疾患を理解する。また、エピジェネティクス制御機構をコントロールする新たな手法の開発にも取り組んでいる。

ヒストンリジンメチル化酵素Suv39hとHP1による協調的ヘテロクロマチンの形成とその実態の解明 (村松、眞貝)

クロマチンはヘテロクロマチンとユウクロマチンから成る。ユウクロマチンはゆるく巻いた構造をとり、多くに遺伝子が存在しており、転写が活発に行われている領域である。一方、ヘテロクロマチンはきつく巻いた構造をとり、転写が抑制状態にある。ペリセントロメアというセントロメアの近傍領域は典型的なヘテロクロマチンであり、セントロメア形成の足場としての機能やゲノムの安定性に寄与する。マウスのペリセントロメアヘテロクロマチンのDNAは、A/Tに富んだメジャーサテライトと呼ばれる非常に長い繰り返し配列から成る。蛍光色素の一つDAPIはA/Tに富んだ領域に優先的に結合することから、ペリセントロメアヘテロクロマチンはDAPIに強く染まる領域として認識される。

この繰り返し配列に加えて、ペリセントロメアヘテロクロマチンは異なる組み合わせのエピジェネティックマーク、たとえばヒストンH3の9番目のリジン残基のトリメチル化(H3K9me3)、H4K20me3やDNAのメチル化、が存在する。Suv39h/KMT1Aは哺乳類のペリセントロメアヘテロクロマチン領域のH3K9me3を司る酵素で、Suv39hは種を超えて保存されている。また、Suv39hは間接的にH4K20me3やDNAのメチル化も制御していることから、これらのヘテロクロマチンエピジェネティックマークはSuv39hの欠損した細胞では消失あるいは減弱する。つまり、Suv39hはエピジェネティックに構築されているヘテロクロマチン構造の中心的制御因子の一つである。

これらエピジェネティックな化学修飾の重要な役割の1つは、特異的なクロマチン領域にその修飾の違いに応じて異なる機能分子を呼び込むことにある。それゆえ、ヘテロクロマチンでは、ヘテロクロマチン特異的なエピジェネティックマークにより様々な転写抑制に関わる機能分子が呼び込まれている。ヘテロクロマチンタンパク質1 (HP1)はそのような機能分子で、もともとショウジョウバエの斑入り位置効果を抑制する変異の1つとして同定された遺伝子である。HP1もSuv39hと同様に種間で高く保存された分子ファミリーで、カビ、植物から動物に至るまで複数のアイソフォームとして存在する。N末端側のクロモドメインはメチル化されたH3K9に高親和性を示すことで、HP1をヘテロクロマチン領域に局在させる。このクロモドメインを介したメチル化H3K9認識も高度に保存されている。さらに、この関係は相互に依存している。例えば、分裂酵母のHP1ホモログであるSwi6はSuv39hのホモログであるClr4のヘテロクロマチン局在並びにClr4によるH3K9メチル化に重要な役割を持つ。HP1とSuv39hは様々な種で物理的に会合していることから、一旦H3K9のメチル化が誘導されると、HP1/Swi6-Suv39h/Clr4による複合体のリクルートメントと

さらなるH3K9メチル化が自己完結的に回転することでヘテロクロマチン領域のH3K9メチル化並びにHP1局在の確立・広がり保証されていると、提唱されている。この概念は、哺乳類のペリセントロメアヘテロクロマチン形成に対しても提案されている。しかし、HP1がSuv39hのペリセントロメア局在並びにH3K9me3形成に如何に寄与しているか、実際にはほとんど検証されてこなかった。そこで、今回、HP1と会合しないSuv39h1を用いて、この問題にチャレンジした。

これまでのin vitro結合試験から、Suv39hのN末部分がHP1の結合に必須であることが示されていた。そこで、マウスSuv39h1のN末41アミノ酸を欠失したSuv39h1(Δ N)を作成し、HP1との結合をHEK293T細胞内で検討した。結果、 Δ NはHP1と会合しないことがわかった。次に、 Δ NをSuv39h欠損ES細胞に発現させ、この細胞が有するペリセントロメアヘテロクロマチン形成不全がどの程度相補されるか、検討した。その結果、 Δ NはHP1のペリセントロメア局在をほとんど回復させないにもかかわらず、Suv39h1(Δ N)局在並びにH3K9me3はほぼ回復することが分かった。さらに Δ Nは、低下していたメジャーサテライト配列DNAのメチル化も回復した。しかし、他のヘテロクロマチン局在マークあるいは分子であるH4K20me3並びにATRAXは回復しなかった。完全長のSuv39h1と Δ Nによって相補されたヘテロクロマチンが機能的にどのように違うかを検証するために、メジャーサテライト配列の転写活性を調べた。その結果、Suv39h欠損細胞で上昇したメジャーサテライト配列の転写の上昇は完全長Suv39h1ではwt細胞並みに抑制されたのに対して、 Δ Nで相補された細胞では不完全にしか転写が抑制されていなかった。これらの結果より、Suv39hのペリセントロメア局在とH3K9me3の形成にはHP1は必須の役割を持たないこと、しかし完成されたペリセントロメア形成にはSuv39hとHP1との会合並びにHP1の局在が重要であることが示唆された。現在、HP1には依存しない(たぶんH3K9のメチル化に依存した)Suv39hのペリセントロメア局在並びにH3K9me3形成のメカニズムの解明を進めている。

Key Sentence :

1. Studies for epigenetic regulation of biological processes
2. Biology of protein lysine methylation
3. Elucidation of molecular mechanisms of human diseases by utilizing novel animal models

Key Word :

epigenetics, histone methylation, protein post-translational modifications, DNA methylation, gene knockout, gene transcriptional regulation, chromatin, metabolism, genome, model animal

Purpose of Research :

Our laboratory's principal objective is to understand the molecular mechanism of epigenetic gene regulation and the role of epigenetics in health and disease. To address these topics, we take multidisciplinary approaches, including molecular biology, biochemistry, cell biology, structural biology and mouse molecular genetics.

Histone methyltransferase Suv39h and HP1 cooperatively organize epigenetically silent heterochromatin structure (Muramatsu and Shinkai)

Chromatin exists in two forms: euchromatin and heterochromatin. Euchromatin is the loosely packed form of chromatin that is rich in gene concentration and often undergoing active transcription. In contrast, heterochromatin is tightly packed and is in the transcriptionally repressed state. The pericentromere is a heterochromatic domain that provides a structural scaffold for centromere formation and plays a crucial role in genome stability. In mice, pericentric heterochromatin consists of AT-rich sequences of extremely long tandem arrays of major satellite repeats. Therefore, the fluorochrome DAPI, which preferentially intercalates with A/T-rich repeat sequences, can show mouse pericentromere heterochromatin as a DAPI-dense domain.

In addition to the repetitive sequences, the pericentric heterochromatin has a distinct combination of epigenetic marks such as histone H3 lysine 9 tri-methylation (H3K9me3), H4K20me3, and DNA methylation. Suv39h/KMT1A is the principal enzyme for the H3K9me3 of the pericentromere heterochromatin in mammals, which is evolutionarily conserved. Since Suv39h also indirectly regulates H4K20me3 and DNA methylation, these epigenetic marks are lost from or are in low

concentration in the pericentromere in *Suv39h*-deficient cells. Thus, Suv39h is one of the master regulators of epigenetically organized heterochromatin.

One of important roles of these epigenetic modifications is recruitment of different effector molecules to the specific chromatin loci. Therefore, at heterochromatin, various transcriptionally silent effector molecules are recruited by the heterochromatin-specific epigenetic marks. Heterochromatin Protein 1 (HP1) is such an effector molecule that was originally discovered in *Drosophila* as a dominant suppressor of position-effect variegation. Similar to Suv39h, the HP1 family is evolutionarily conserved, with members in fungi, plants, and animals, and has multiple isoforms within the same species. The amino-terminal chromodomain (CD) shows a high affinity to methylated H3K9 (highest affinity for H3K9me3), causing HP1 to be tethered to heterochromatin. This recruitment system is also highly conserved in different species. Furthermore, this regulation is interdependent. For example, HP1 homolog Swi6 in fission yeast is also crucial for Suv39h homolog Clr4 accumulation and Clr4-mediated H3K9 methylation to heterochromatin. HP1 homologs can physically interact with Suv39h homologs in various different species, sequential cycles of Swi6 binding and Clr4 recruitment/deposition of H3K9me have been proposed to explain the interdependent regulation of Clr4- and Swi6-mediated silent heterochromatin formation. A similar functional concept has been proposed for the Suv39h- and HP1-mediated heterochromatin formation in mammals. However, so far, it has not been validated experimentally much if the Suv39h-HP1 interaction is crucial for Suv39h-mediated heterochromatin formation. To address this question, we introduced HP1 binding-defective N-terminally truncated mouse Suv39h1 (Δ N) into *Suv39h*-deficient embryonic stem (ES) cells. Interestingly, pericentric accumulation of Δ N and Δ N-mediated H3K9me3 were observed to recover, but HP1 accumulation was only marginally restored. Δ N also rescued DNA methyltransferase Dnmt3a and 3b accumulation and DNA methylation of the pericentromere. In contrast, other pericentric heterochromatin features, such as ATRX association and H4K20me3 were not recovered. Finally, derepressed major satellite repeats were partially silenced by Δ N expression. These findings clearly showed that the Suv39h-HP1 binding is dispensable for pericentric H3K9me3 and DNA methylation, but this interaction and HP1 recruitment/accumulation is crucial for complete formation of heterochromatin. Currently, we are investigating the Suv39h recruitment/accumulation mechanism which is HP1-independent but H3K9me-dependent.

Principal Investigator

眞貝 洋一 Yoichi Shinkai

Research Staff

島津 忠広 Tadahiro Shimazu

山田 亜夕美 Ayumi Yamada

加藤 雅紀 Masaki Kato

白井 温子 Atsuko Shirai

Junior Research Associate

村松 大輔 Daisuke Muramatsu

Student

楊 嘉銘 Chia-Ming Yang

Technical Staff

福田 幹子 Mikiko Fukuda

Assistant

市橋 美香 Mika Ichihashi