

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES LABORATORY OF MOUSE MODEL

Our research objective is to understand the molecular mechanisms that control chromatin function and genome diversity & stability in mammals. To address this question, we are currently analyzing functional molecules which are expressed in the nucleus.

1) Biochemical and Genetic Analysis of Euchromatic Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases: M. TACHIBANA, H. MIYASHITA, and Y. SHINKAI

a. Biochemical analysis of G9a/GLP histone methyltransferase complex

Histone H3 lysine 9 methylation (H3K9me) is a crucial epigenetic mark for transcriptional silencing. Targeted deletion of the *G9a* gene in mouse leads drastic loss of euchromatic dimethyl H3K9 (H3K9me₂), suggesting that G9a is a dominant H3K9 methyltransferase. However, there is a highly G9a-related protein, termed GLP/Eu-HMTase, in mammals. The KO phenotype of *GLP* was quite similar to that of *G9a*-KO, in several points such as loss of H3K9me_{1/2}, reactivation of the G9a targeted genes, and period of embryonic lethality. Moreover, our biochemical analysis indicated that G9a and GLP form a stoichiometric complex in many cell types in mouse and human. Taken collectively, the complex formation of G9a and GLP is essential for exerting enzymatic activity *in vivo*.

To assess the enzymatic character of G9a/GLP complex more detail, we introduced amino acid point mutations in the catalytic SET-domain of G9a or GLP, which domain is also essential for dimerization. The mutant G9a or GLP molecules were introduced into *G9a*- or *GLP*-KO cells respectively, and analyzed their H3K9me status. We found that several G9a mutants could not revert H3K9me_{1,2}, while the corresponding mutants of GLP could. The serial rescue experiments using these G9a/GLP mutants indicated that G9a catalytic activity is more responsible for *in vivo* H3K9 methylation than that of GLP. In addition, we unexpectedly found that the G9a/GLP double mutant complex without enzymatic activities still suppressed their target gene expression. Now we are analyzing the silencing mechanism(s) of the enzymatically inactive form of G9a/GLP mutant complex. (M. TACHIBANA)

b. Genetic analysis of G9a for germ cell development

Genetic study in mice had shown that G9a or GLP is essential for proper embryogenesis, that is, each mutant embryo dies around E9.5. To address the potential roles of G9a HMTase in the post-term animals, we have established mice carrying mutated *G9a*-allele (Floxed *G9a* allele, *G9a*^{F/F}). Then, we crossed *G9a*^{F/F} mice with TNAP-Cre mice which express Cre-recombinase in a germ cell specific manner. Adult male of germ cell specific *G9a*-KO mice were infertile, accompanied with the complete lack of mature sperm. Adult female of those were also mostly

sterile, accompanied with drastic loss of mature eggs.

To access further the cause of germ cell defect in germ cell specific *G9a*-KO mice, we dissected juvenile gonads of both sexes. We especially focused on meiosis, since some HMTases play important roles in meiotic progression. The development of *G9a*-KO germ cells until the zygotene stage of meiosis seems to be intact in both sexes. However, spermatocytes at the pachytene stage onwards were missing and oogenesis was also impaired around the pachytene stage. We also found that H3K9me1/2 were severely reduced in the KO germ cells until zygotene and that multiple genes were reactivated in *G9a*-deficient testicular cells. These results emphasize a crucial function of *G9a*-mediated H3K9 methylation in controlling germ cell development, especially in meiotic-prophase progression. (M. TACHIBANA)

c. Genetic analysis of *G9a* for T cell development and functions

To investigate a role of *G9a* in T cell development and function, we crossed the *G9a*^{F/F} mice with Lck-Cre mice which express Cre-recombinase in a T cell specific manner. *G9a* catalyzes mono- and di-methylation of H3K9me of euchromatin. In the T cell specific *G9a*-deficient mice, we observed ~25% reduction of H3K9me1 and 2 in thymocytes and peripheral T cells, and ~50% reduction of them in the activated T cells. These results are consistent with the total amount of *G9a* protein in T cells (activated T cells possess higher amount of *G9a* than thymocytes or resting T cells). Although we confirmed that *G9a* contributes to H3K9 methylation in T-lineage cells, we could not see any defects of T cell development in thymus and CD3-mediated proliferation. Taken collectively, *G9a* and *G9a*-mediated H3K9 methylation is dispensable for T cell development and the CD3-mediated proliferation activity. (H. MIYASHITA AND M. TACHIBANA)

d. Establishment of *ESET/SETDB1* deficient mouse and ES cells

H3K9 HMTase, *SETDB1* is essential for peri-implantation development in mice. Therefore, it was impossible to investigate the function of mouse *SETDB1* after implantation. To overcome this problem, we tried to establish *SETDB1* conditional knockout mice and obtained the chimeric mice. Currently, we are crossing them with C57BL/6 mice for germline transmission. We are also trying to establish conditional *SETDB1* knockout ES cells by a sequential gene targeting. We could not obtain *SETDB1*-deficient ES cells by an infection of Cre expressing Adenovirus to the ES cells carrying one floxed and one inactivated *SETDB1*-allele (*SETDB1*^{F/Δ}). This result suggests that *SETDB1* is also essential for cell growth and/or survival of ES cells. Currently, we are establishing hormone-inducible *SETDB1* knockout ES cells (*MerCreMer*⁺, *SETDB1*^{F/Δ}). (H. MIYASHITA AND Y. SHINKAI)

2) Functional analysis of *Prdm8*, a brain-specific PR domain-containing protein: T. KOMAI and Y. SHINKAI

PR domain family proteins are attractive candidates for studying the epigenetic gene regulation. PR domain is related to SET domain, a highly conserved domain in histone lysine methyltransferases. Previous studies have shown that several members of PR domain family have histone methyltransferase activity. PR domain family proteins also have zinc finger motifs, suggesting their possibility to recognize specific genomic loci. Importantly, recent studies have demonstrated that some members are key regulators of tissue-specific gene regulations during development. We, therefore, thought that PR domain family proteins might be involved in histone modifications during development and cell differentiation. Expression analysis in various mouse tissues showed that one of the PR domain genes, *Prdm8* is specifically expressed in the mouse brain. Further analysis revealed that *Prdm8* expression is limited to neurons in the embryonic brain. We are now trying to generate *Prdm8* deficient knock-out mice to analyze its impact on the neural development and brain functions. (T. KOMAI)

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

- Oka, S. Masutani, H. Liu, W. Kwon, Y.W. Hirata, H. Shinkai, Y. Yamada, S. Nishinaka, Y. Nakamura, H. and Yodoi, J*. Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *The FASEB Journal*, 2006, 20:121-123.
- Feldman, N. Gerson, A. Fang, J. Li, E. Zhang, Y. Shinkai, Y. Ceder, H. and Bergman, Y*. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2006, 8:188-194.
- Sendai, Y*. Sawada, T. Urakawa, M. Shinkai, Y. Kubota, K. Hoshi, H. and Aoyagi, Y. [alpha]1,3-Galactosyltransferase-Gene Knockout in Cattle using a Single Targeting Vector with loxP Sequences and Cre-Expressing Adenovirus. *Transplantation*. 2006, 81:760-766.
- Ueda J. Tachibana, M. Ikura, T. and Shinkai, Y*. Zinc finger protein Wiz links G9a/GLP histone methyltransferases to the co-repressor molecule CtBP. *J. Biol. Chem.* 2006, 281:20120-20128.
- Chen, H. Yan, Y. Davidson, T.L. Shinkai, Y. and Costa, M*. Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells. *Cancer Research*. 2006, 66:9009-9016.
- Akiyama, K. Yusa, K. Hashimoto, H. Poonepalli, A. Hande, M.P. Kakazu, N. Takeda, J. Tachibana, M. and Shinkai, Y*. Rad54 is dispensable for the ALT pathway. *Genes to Cells*, 2006, 11:1305-1315.
-

- Ueda, J. Tachibana, M. and Shinkai, Y.: Wiz, a novel transcriptional co-repressor, links G9a/GLP histone methyltransferase to CtBP co-repressors. Keystone Symposia "Epigenetics and Chromatin Remodeling in Development", Keystone, Colorado, USA, January 19-24, 2006
- Shinkai, Y.: H3K9 methylation and germ cell development. The 3rd Abcam meeting "Chromatin Structure & Function", Punta Cana, Dominica, December 5-8, 2006
- 眞貝洋一：細胞記憶の維持と破綻、千里ライフサイエンスセミナー「クロマチン・ダイナミクスと高次生命現象」、豊中、2006年3月15日
- 眞貝洋一：ヒストンのメチル化修飾とエピジェネティックな遺伝子発現制御、新適塾「千里神経懇話会」第78回「タンパク質アルギニンメチル化を介した細胞機能の調節」、豊中、2006年10月3日
- 眞貝洋一：ヒストンメチル化修飾と疾患の世界、第57回日本電気泳動学会総会シンポジウム「エピジェネティクスとRNAワールド」、浜松、2006年10月27日
- 眞貝洋一：ヒストンメチル化と生命機能制御、第22回Wakoワークショップ「新たな生命科学、エピジェネティクスの可能性」、東京、2006年11月24日
- 立花誠：G9a ヒストンメチル化酵素複合体による転写制御機構、コスモバイオ学術ミーティング、クロマチンフロンティアーズ、ジャパン、名古屋、2006年12月4日
- 立花誠：ヒストンのメチル化による生殖細胞の分化制御、日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006年12月5-7日
- 橋本秀春、園田英一郎、高見恭成、中山健男、武田俊一、眞貝洋一： Linker Histone H1 is involved in Homologous Recombination repair pathway. 日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006年12月5-7日

2006年度、当研究室では新たなメンバーとして1名の大学院生（大学院生命科学研究科修士課程1年）谷口弘樹君、非常勤職員として宮田真理子さんを迎えた。一方、大学院博士後期過程に在籍していた上田潤君、秋山康一君が Ph. D. を取得し、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターおよび東海大学医学部のポスドクとなった。その結果、研究室はスタッフ2名、大学院生8名、技術補佐員1名、事務補佐員1名の構成となった。

引き続き、当研究室では哺乳類における染色体機能の調節、遺伝情報の普遍性および多様性をコントロールしている分子機構を明らかにすることを目指して研究を行っている。特に「細胞記憶」「エピジェネティック制御と生命現象」「核構造の機能」などをキーワードに研究を展開しており、新たな発見に遭遇すべく日々研究に励んでいる。

1) 哺乳類ヒストン H3 リジン 9 メチル化酵素の機能解析

ア. G9a/GLP ヒストンメチル化酵素(HMTase)複合体の生化学的解析

ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化修飾は、転写の抑制とリンクした重要なエピジェネティックなマークの1つである。遺伝学的解析によって、我々は哺乳類の G9a というタンパク質が、生体内で H3K9 のメチル化酵素として重要な機能を担っていることを明らかにしてきた。すなわち、G9a 遺伝子破壊マウス細胞においてジメチル H3K9 が殆どなくなることから、生体内では G9a がドミナントな H3K9 メチル化酵素であることが分かっている。しかし反面、哺乳類には G9a にはそのドメイン構造がよく似た分子、GLP が存在する。*In vitro* の活性測定系では GLP は G9a 同様に H3K9 のメチル化活性を示す。我々は *in vivo* での GLP の機能を解析すべく GLP 遺伝子破壊マウスを作成し解析を行った。GLP 欠損の表現型は、H3K9me の低下、特異的遺伝子の転写抑制解除、胎児致死の時期など、調べた限りの点で G9a 欠損の表現型と酷似していた。さらに生化学的な解析と合わせ、G9a は常に GLP とヘテロ二量体として存在し、その二量体構造が酵素活性の発揮に必須であることを突き止めた (Tachibana M. et al, Genes Dev 2005)。

現在、G9a 及び GLP の活性触媒部位にアミノ酸置換を施した変異遺伝子をそれぞれの遺伝子破壊細胞に再導入し、G9a/GLP ヘテロ二量体の生体内活性のモニタリングを行っている。その結果、いくつかのメチル化活性の無い G9a を導入した細胞では生体内 H3K9 メチル化レベルは回復しないのに対し、同じ変異を導入した GLP 導入株ではメチル化レベルが回復することが分った。この事実は、生体内で G9a/GLP 二量体がヒストンメチル化酵素として機能するには G9a の活性が重要であることを意味している。さらに予期しなかったことに、ある変異 G9a/GLP 複合体では H3K9me が回復しないにもかかわらず、転写抑制の機能が保持されていた。現在、G9a/GLP 複合体の H3K9me 非依存的な転写抑制機能の解析を行っている。(立花、眞貝)

イ. 生殖細胞の発生・分化に G9a が果たす役割の解明

G9a 及び GLP はその遺伝子破壊マウスが胎生致死 (E9.5 付近) であることから、様々な組織や器官の発生や機能と G9a/GLP との関わりはいまだ未知のままである。我々は G9a 遺伝子が Cre 組み換え酵素によってのみ欠損するマウスを作成した。次に生殖細胞特異的に Cre を発現するマウスとの交配によって、生殖細胞特異的 G9a 欠損マウス (Germ cell conditional KO, GcKO マウス) を樹立した。GcKO マウスは雌雄共に不妊であった (雌のごく一部は妊娠可能であるが、産仔数が著しく少ない)。成体雄の精巣を調べたところ、成熟精子は全く観察されなかった。雌でも、成体卵巣での卵子総数が 1-2 桁減少していた。

さらに、不妊性の原因を突き止めるべく、若い雌雄 (雌の場合は胎児) の生殖腺の発生を解剖学的に解析した。いくつかの HMTase はすでに減数分裂の進行に必須であることが分かっているため、それらとの比較の意味で、減数分裂期の生殖細胞に特に着目した。その結果、雌雄共に合糸期間での生殖細胞は特に顕著な表現型が見えなかった。それに対し、GcKO 精巣では太糸期の細胞が見当たらず、さらに KO 卵巣も太糸期の細胞が激減していた。これら GcKO 生殖細胞では大幅に H3K9me1,2 が減少しており、さらに KO 精巣ではいくつかの遺伝子の転写抑制が解除されていた。以上の結果は、G9a による H3K9 のメチル化が生殖細胞の分化、特に第一減数分裂の進行に重要な役割を果たしていることを示すものであった。(立花、眞貝、阪大微研・野崎正美)

ウ. T 細胞得意的 G9a ノックアウトマウスの解析

上記 G9a コンディショナルノックアウトマウスと T 細胞特異的に Cre を発現する lck-CreTG マウスとの交配によって、T 細胞特異的 G9a 欠損マウス (T-cell conditional KO, TcKO マウス) を樹立した。G9a は H3K9 をモノ、ジメチル化 (H3K9me1,2) する酵素であるが、TcKO マウスの胸腺細胞ならびに脾臓より分離した末梢 T 細胞では、H3K9me1,2 がコントロールマウスの T 細胞の 50-75% 程度に減少していた。しかし、TcKO マウスの胸腺内における T 細胞の発生・分化、胸腺細胞数、脾臓における T 細胞の数・割合に関して、コントロールマウスと有意な差を認めなかった。さらに、TcKO マウスの末梢 T 細胞は抗 CD3+CD28 抗体による刺激により、コントロールマウスの T 細胞と同様に細胞増殖した。以上の結果より、G9a ならびに G9a を介した H3K9 のメチル化修飾は、T 細胞の発生・分化や細胞増殖には必須の役割を持っていないことが明らかとなった。(宮下、立花、眞貝)

エ. ESET/SETDB1 のコンディショナルノックアウト細胞・マウスの樹立と表現型の解析

ESET/SETDB1 は H3K9 を特異的にメチル化する酵素である。リジンのメチル化には、モノ、ジ、トリメチル化の 3 種類があるが、SETDB1 は、これと結合するタンパク質 MCAF1 と協調して機能し、トリメチル化特異的な活性を示す。これまでの解析から、SETDB1 ノックアウトマウスは胚発生 3.5-5.5 日の着床期前後で致死であることが明らかとなっている。結果、SETDB1 は発生において重要な役割を果たすことが示唆されたが、ノックアウトマウスが胎生致死であるため、SETDB1 のマウス成体における役割について解析することは不可能であった。そこで SETDB1 の生命機能における役割を明らかにする目的で、SETDB1 のコンディショナルノックアウトマウスの作製を試みた。現在、SETDB1 がヘテロでコンディショナルにノックアウトされている ES 細胞から得られたキメラマウスの交配を行っており、この遺伝

形質の germline transmission を試みている。

また、*SETDB1* をコンディショナルにノックアウトできる ES 細胞株の樹立も検討している。予備実験として、Cre の発現により *SETDB1* 遺伝子をノックアウトできる ES 細胞株に Cre 発現アデノウイルスを感染させたが、*SETDB1* を欠損した ES 細胞株を分離できなかった。この結果は、*SETDB1* が ES 細胞においても細胞の増殖や生存に必須の役割を持つことを示唆している。現在は、エストロゲンレセプターと Cre の融合蛋白質 (MerCreMer) 依存的に *SETDB1* をノックアウトできる ES 細胞の樹立を試みている。(宮下、眞貝)

2) 神経特異的 PR ドメインタンパク質 Prdm8 の機能解析

PR ドメインタンパク質はヒストンリジンメチル化酵素で保存された SET ドメインと相同性のある PR ドメインに加え、DNA 結合ドメインとして知られる亜鉛フィンガーモチーフを合わせ持つタンパク質である。実際にいくつかの PR ドメインタンパク質はヒストンメチル化活性を持つことがわかっている。また近年では PR ドメインタンパク質が特定の組織の発生や分化の過程に必須であることも報告されており、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御を担う、重要なタンパク質ファミリーではないかと注目される。我々はその PR ドメインファミリーの 1 つ、Prdm8 がマウス脳で特異的に発現していることを見出した。マウス胚を用いたさらなる解析により、Prdm8 が胎生期の脊髄と大脳皮質において神経特異的に発現していることが明らかとなった。これまでに Prdm8 のヒストンメチル化活性は確認できていないが、Prdm8 の生体内での機能を解析するため、現在ノックアウトマウスの作製を試みている。(駒井、眞貝)

