

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, Y. MATSUMURA and Y. SHINKAI

a. Biochemical analysis of the G9a/GLP histone methyltransferase complex and a transcriptional silencing mechanism

Histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation is a repressive epigenetic mark for heterochromatin formation and transcriptional silencing. Two related SET-domain containing lysine methyltransferases, G9a/Ehmt2 and GLP/Ehmt1, share same substrate specificity for H3K9 *in vitro*. Furthermore, G9a and GLP form a stoichiometric heteromeric complex and loss of either G9a or GLP leads drastic reduction of H3K9me2, indicating that this complex is crucial for H3K9 methylation *in vivo* (Tachibana et al. 2005). To elucidate how lysine methyltransferase activity of G9a and GLP are important for *in vivo* H3K9 methylation and transcriptional silencing, we established G9a/GLP double KO ES cells expressing mutant G9a or/and GLP, which possess amino acid replacement or deletion in their SET-domains. Analysis for the complex formation and global H3K9 methylation *in vivo* confirmed that G9a/GLP heteromeric-complex formation is essential for global H3K9 methylation. While methyltransferase activity of GLP is dispensable for *in vivo* H3K9 methylation, G9a's enzymatic activity seems to be important. Interestingly, G9a/GLP DKO ES cells expressing inactive form of G9a (G9aM) and wt GLP still suppress expression of G9a negative target gene, *Mage-a*. H3K9 mono-. di-methylation at the promoter region of *Mage-a2* was significantly reduced, but DNA of this region was still hypermethylated. DNA methyltransferase inhibitor, 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza-dC) treatment induced full *Mage-a* gene expression in the ES cells complemented with G9aM, but not with wtG9a. These data suggest that the G9a/GLP complex deposits not only H3K9 methylation but also DNA methylation which is lysine methyltransferase independent, to establish transcriptionally silencing status. (M. TACHIBANA and Y. SHINKAI)

b. Characterization of H3K9 demethylase JHDM2A deficient mice and ES cells

Histone methylation can be reversibly regulated by methyltransferase and demethylase. We have described that H3K9me1,2 were replication independently diminished in the male pachytene spermatocytes during meiotic prophase progression. Since JHDM2A which is one of H3K9me1,2 demethylases, was reciprocally expressed in this male pachytene spermatocytes, we hypothesized

JHDM2A is responsible enzyme for this H3K9 demethylation. To examine this possibility, we established *JHDM2A* deficient mice and ES cells. While *JHDM2A* deficient females are fertile, *JHDM2A* deficiency induced male sterility and there were no germ-lineage cells after the elongated spermatid stage. Currently, we are investigating whether JHDM2A deficiency impacts on the pachytene stage specific H3K9me1,2 demethylation. Also, we are examining how JHDM2A is critical for self-renewal of ES cells. (Y. MATSUMURA, M. TACHIBANA and Y. SHINKAI)

c. ChIP-chip analysis of H3K9 methyltransferase, *ESET/SETDB1*


Histone post-translational modification on chromatin and DNA methylation are involved in transcription regulation. For example, acetylation of histone H3 and H4 and methylation of H3 lysine 4 (H3K4) correlate with active gene expression, while H3K9 and H3K27 methylation are associated with gene repression. DNA methylation is required for mammalian development and has important roles in the regulation of genome stability, X chromosome inactivation and allele-specific expression of imprinted genes. ESET / SETDB1 is H3K9 methyltransferase, and represses transcription. ESET is also associated with MBD1, which recognizes methylated DNA. Therefore, ESET can be recruited to chromatin, depending on DNA methylation. It has been reported that ESET knockout mice are embryonic lethal and knockdown in human cancer cell lines result in cell death.

To investigate molecular function of ESET, we established conditional *ESET* knockout ES cells. Consequently, we confirm that *ESET* deficient ES cells are lethal. Therefore, it is difficult to analyze the ESET function. Thus, we tried to analyze localization of ESET over entire genome by the ChIP-on-chip analysis and succeeded in finding a few of ESET target genes. Among them, some were categorized as mono-allelic expression genes, including *U2af1-rs1*, *Gnas*, *PEG5 / Nnat*, and *Pgk1*. *U2af1-rs1* is an imprinted gene and paternal allele is only expressed. At *U2af1-rs1* gene locus, DNA of maternal allele is only methylated. Additionally, at paternal allele of this gene, histone H3 and H4 is acetylated and H3K4 is methylated. Conversely, at maternal allele, Histone H3 and H4 are hypoacetylated and H3K9 is methylated. Similarly, it is known that at *Pgk1*, which is mapped to X chromosome, the active allele of H3K4 is methylated, but the inactive allele has methylated H3K9.

Above results, we expect that ESET is involved in the regulation of mono-allelic repression, and now trying to confirm whether or not ESET localizes mono-allele specifically, depending on DNA methylation. In the future, we want to examine whether mono-allelic expression of these genes are disrupted in *ESET* conditional KO mice. (T. MATSUI, H. MIYASHITA and Y. SHINKAI)

2) Histone H1-Deficient Vertebrate Cells Exhibit Proper Mitotic Chromatin Dynamics But Increased Chromosomal Instability: H. HASHIMOTO and Y. SHINKAI

Linker histone H1 functions as a critical component for chromatin condensation and global transcriptional

repression *in vitro*. However, H1 (or H1-like protein) deletional studies in unicellular organisms showed that histone H1 is mostly dispensable for these functions. Higher eukaryotes express multiple variants of histone H1, with six H1 variants in chicken. However, a single histone H1 variant is sufficient for both cell growth and intact  al chromatin structure in the chicken B lymphocyte line DT40. Here we generated and analyzed the phenotype of histone H1 complete deficient DT40 cells. The H1 null cells show proper mitotic chromatin dynamics, but chromosomal instabilities are elevated and a continuous growth defect accompanied with increased cell death is observed. Furthermore, the chromatin exhibits increased micrococcal nuclease sensitivity and decreased nucleosome repeat length. Array analysis reveals that the transcription of multiple genes is affected in the histone H1 null cells, but most of these are downregulated. This report describes the first histone H1 complete knock-out cells in vertebrates, and suggests that linker histone H1 is dispensable for mitotic chromatin condensation and as a global repressor component in higher eukaryotes, but is important for genome integrity.

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

- Ikegami, K. Iwatani, M. Suzuki, M. Tachibana, M. Shinkai, Y. Tanaka, S. Greally, J.M. Yagi, S. Hattori, N. and Shiota, K*. Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 2007, 12:1-11.
- Tachibana, M*. Nozaki, M. Takeda, N. and Shinkai, Y*. Functional Dynamics of H3K9 Methylation During Meiotic Prophase Progression. *EMBO J.* 2007, 26:3346-3359.
- Seki, Y. Yamaji, M. Yabuta, Y. Sano, M. Shigeta, M. Tachibana, M. Matsui, Y. Saga, Y. Shinkai, Y. and Saitou, M*. A cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in primordial germ cells in mice. *Development*, 2007, 134:2627-2638.
- Hashimoto, H. Sonoda, E. Takami, Y. Kimura, H. Nakayama, T. Tachibana, M. Takeda, S. and Shinkai, Y*. Histone H1 variant, H1R is involved in DNA damage response. *DNA repair*, 2007, 6:1584-1595.
- Nishida, M. Kato, M. Kato, Y. Sasai, N. Ueda, J. Tachibana, M. Shinkai, Y. and Yamaguchi M*. Identification of ZNF200 as a novel binding partner of histone H3 methyltransferase G9a. *Genes to Cells*, 2007, 12:877-888.

Tachibana, M. Nozaki, M. Takeda, N. and Shinkai, Y.: Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *CDB Symposium 2007 「Germ Line versus Soma: Towards Generating Totipotency」*, March, 2007

Shinkai, Y.: Functional dynamics of H3K9 methylation in germ cell development. *EMBO*

Conference on “Chromatin and Epigenetics”, EMBL Heidelberg, Germany, May 3-6, 2007

立花 誠：ヒストンのメチル化による生殖細胞の分化制御、特定領域研究「性分化機構の解明」第2回 冬のワークショップ、御殿場、2007年2月

眞貝洋一：ヒストンメチル化コードの機能とその制御、大阪バイオサイエンス研究所セミナー、2007年6月1日

眞貝洋一：ヒストンメチル化コードの機能とその制御、第1回日本エピジェネティクス研究会年会、大阪、2007年6月15 - 16日

立花 誠：ヒストンのメチル化によるエピジェネティック制御機構、第28回、日本炎症、再生医学会ワークショップ「Epigenetic Control of Stem Cells」、東京、2007年8月

眞貝洋一：ヒストンリジンメチル化の機能とその制御、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、東京、2007年7月13日

眞貝洋一：細胞記憶の維持と生命機能制御、第5回最先端動物遺伝育種セミナー、山梨県北杜市、2007年年8月4 - 5日

眞貝洋一：生殖細胞形成におけるヒストンリジンメチル化調節酵素の役割、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11 - 15日

立花 誠：ヒストンメチル化控訴複合体によるクロマチン構造変換、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年12月11 - 15日

2007 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）奥野周蔵君、9 月から非常勤職員の孝橋奈美さん（宮田真理子さんの後任）を迎えた。一方、修士課程に在籍していた宮下広樹君が卒業後北海道の企業に就職し、博士後期過程に在籍していた橋本秀春君が Ph.D. を取得し 10 月より米国エモリー大学にポスドクとして留学した。その結果、研究室はスタッフ 2 名、大学院生 6 名、技術補佐員 2 名、事務補佐員 1 名の構成となった（2007 年 12 月末時点）。

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)。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た。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 H3K9 メチル化レベルは回復しないのに対して、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 の活性がより重要であることを意味した。興味あることに、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、G9a により発現が負に制御されている *Mage-a* 遺伝子の転写は抑制された。DNA メチル化酵素阻害剤である 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza-dC) を処理すると、*Mage-a* 遺伝子の発現は、wtES 細胞では誘導されないのに対して、この H3K9me の回復が起こらない細胞では G9a 欠

損細胞並みに誘導されてくる事がわかった。この細胞では、5-Aza-dC 処理前では、*Mage-a2* プロモーター部分の H3K9 のメチル化はしていないものの、DNA のメチル化は wtES と同等に高メチル化を受けていた。以上の結果から、G9a/GLP 複合体は、標的遺伝子領域のヒストンに H3K9 メチル化と DNA に CmG メチル化(リジンメチル化或いはリジンメチル化活性非依存的)を入れることで、転写抑制状態を作り上げている事が示唆された。(立花、眞貝)

イ．H3K9me1,2 脱メチル化酵素 JHDM2A/jmjd1a の機能解析

近年、ヒストンリジンのメチル化を外す酵素がいくつも報告されている。これらの多くは、Jmjc ドメインをその触媒ドメインとして持っている。その Jmjc ドメインファミリー分子の一つ JHDM2A は、H3K9 のモノ、ジメチル化(H3K9me1,2)を特異的に脱メチル化する酵素である。これまでの生殖細胞特異的 G9a ノックアウトマウスの解析から、オス特異的減数分裂前期のパキテン期の細胞で、H3K9me1,2 特異的な脱メチル化が観察される。この脱メチル化反応に JHDM2A が重要な役割を果たしているか、明らかにする目的で、JHDM2A ノックアウトマウスを作成した。その結果、JHDM2A ノックアウトマウスは、メスの生殖細胞の発生は正常で生殖能力もあったのに対して、オスノックアウトマウスは不妊で、成熟した精子形成は観察されなかった。現在、JHDM2A がオスのパキテン期特異的 H3K9me1,2 の脱メチル化に寄与しているのか、検討しているところである。また、JHDM2A ノックアウト ES 細胞を用いて、JHDM2A が ES 細胞の自己複製能に重要な役割を持つのかも調べている。(立花、眞貝、阪大微研・野崎正美)

ウ．ChIP-chip 解析による ESET/SETDB1 標的遺伝子の同定

ESET/SETDB1 は G9a, GLP, Suv39h1,2 と同様に、哺乳類のヒストン H3 の 9 番目のリジンにメチル基を入れる酵素である。これまでの解析から、ESET は、転写コリプレッサーの KAP1 やメチル化 DNA 結合因子 MBD1 と結合し、それらの因子の転写抑制に寄与していると考えられている。しかし、ESET のノックアウトマウスは非常に早期の胎生致死であること、ESET のノックダウンは細胞死を誘導することから、その重要性は示されたものの、ESET の有する機能の詳細はほとんど明らかにされていない。ESET のが標的としている遺伝子或いはクロマチン領域を調べるため、ESET に対する抗体を用いた ChIP-chip 解析を行った。その結果、複数の単一アリアル発現をする遺伝子領域に ESET が局在している事が明らかとなった。特に、いくつかの遺伝子は、インプリントする事がわかっている遺伝子であったことから、片親性発現制御に ESET が重要な役割を持っていることが推察された。現在、これらの遺伝子の単一アリアル発現に ESET が重要な役割を担っているかどうかを、検証している。(松井、宮下、眞貝)

2) リンカーヒストン H1 完全欠損 DT40 細胞株の樹立とその表現型の解析

リンカーヒストン H1 は、*in vitro*における生化学的解析により、global な転写抑制とクロマチンの凝縮に重要な役割を持つ事が示唆されてきた。しかし、単細胞生物を用いた、リンカーヒストン(或いはリンカーヒストン様分子)の欠損株の解析からは、転写抑制、

クロマチンの凝縮には必須の役割を持たない事が示されてきた。一方、多細胞生物、とくに高等脊椎動物においては、リンカーヒストンサブタイプが複数存在することも 1 つの理由として、リンカーヒストン完全欠損体の確立、ならびにその表現型の解析の報告は無い。

我々は、宮崎大学の山中、高見博士らとの共同研究により、ニワトリ B 細胞株 DT40 において、6 種類あるリンカーヒストンサブタイプのうち 5 種類を欠損させた細胞株を用いて、完全リンカーヒストン H1 欠損株の樹立を試みた。Lox 配列と Mer-Cre-Mer による、エストロゲンホルモン誘導系によるコンディショナル遺伝子組み換え系を用いることで、H1 完全欠損 DT40 細胞株を樹立した。この細胞は、細胞分裂はするものの、細胞死による強い増殖阻害を受けており、染色体の不安定性が亢進していた。分裂期には、WT 細胞と変わらない染色体の凝縮、分配像が観察されたが、MNase 処理により得られるヌクレオソームラダーの間隔が有意に短くなること、MNase に対するクロマチンの感受性も亢進している事が判明した。発現アレイ解析により、完全 H1 欠損 DT 細胞では複数の遺伝子の発現が変化していたが、多くのものは転写が上昇するのではなく抑制する事がわかった。以上の結果より、高等脊椎動物においても、リンカーヒストン H1 は減数分裂期の染色体凝縮やグローバルな転写抑制には必須ではない事が示された。しかし、MNase に対するクロマチンの感受性やヌクレオソームの間隔が短くなっていたことから、クロマチンの高次構造に H1 が何らかの重要な役割をしている事が示された。(橋本、眞貝)

