

**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) Establishment and phenotype analysis of mutant mice expressing enzymatically inactive G9a/GLP complex: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI

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. 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*. To elucidate how lysine methyltransferase activity of G9a and GLP are important for *in vivo* H3K9 methylation and transcriptional silencing, we established ES cells expressing mutant G9a or/and GLP protein, which possess amino acid replacement or deletion in

their SET-domains. We investigated in detail the effects of the mutant G9a/GLP complexes upon transcription and revealed two-novel facts, i.e., 1) enzymatic activity of the G9a subunit is important for *in vivo* H3K9 methylation and 2) the G9a/GLP complex deposits not only H3K9 methylation but also DNA methylation which is lysine methyltransferase independent, to establish transcriptionally silencing status (Tachibana et al. *Embo j.* 2008). To examine the contribution of enzymatic activity of the G9a/GLP complex on mice development, we generated knock-in mice which express enzymatically inactive G9a/GLP complex (G9a-CA mice). We could not find G9a-CA homozygous pups which were delivered by crossing heterozygous females with males, suggesting that G9a-CA mice are embryonic lethal. We further examined the lethality of the G9a-CA embryos and revealed that these embryos can survive until embryonic day 11.5 (E11.5). Since it was shown that simple *G9a*-KO mice die around E9.5, we concluded that enzymatically inactive G9a/GLP complex could rescue the lethal phenotype of *G9a*-KO mice in part. (M. TACHIBANA and Y. SHINKAI)

2) Cell lineage-specific transcriptional regulation by G9a/GLP complex: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI

We previously identified *mage-a* and *wfdc15a* as the target-genes of G9a/GLP complex, by searching the genes specifically up-regulated in G9a-KO ES cells. However, we did not know which genes were regulated by the complex in the other cell-types than ES cells. To gain insight into the transcriptional control of developmentally regulated genes by G9a/GLP complex *in vivo*, we isolated RNA from embryo proper and trophoblast of wild-type and G9a-KO litters. We then introduced them into microarray analysis to examine the differences of expression profiles between them. Subsequently, it was revealed that specific *Hox* family genes (reproductive homeobox: *Rhox*) were ectopically reactivated in G9a-KO construct. *Rhox* genes, which were located on X-chromosome, were novel *Hox*-family genes characterized recently (*Cell*, 120 p369, 2005). It was shown that *Rhox* genes were expressed predominantly in reproductive tissues (testis and ovary) and placenta. *Rhox* genes display temporal and quantitative co-linear pattern of expression, however, the molecular basis which contribute the establishment and maintenance of these unique expression. Interestingly, it was revealed that transcriptional suppression of some *Rhox* genes were achieved by DNA methylation. Furthermore, the DNA methylation-dependent silencing is occurred in a lineage-specific manner (specifically occurred in embryo proper-lineage) (*Genes Dev.*, 20, p3382, 2006). Regarding this notion, we speculated that H3K9 methylation machinery and DNA methylation machinery may cooperatively regulate colinear expression of *Rhox* genes. We are now going to set up chromatin immunoprecipitation analysis on *Rhox*-loci using embryo proper and trophoblast. (M. TACHIBANA and Y. SHINKAI)

3) Distinct role for telomere structure and lengthening: K. OKAMOTO and Y. SHINKAI

Telomere functions as maintenance of genomic integrity and stability by comprising nucleoprotein complex. Six proteins (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1, RAP1) localizing at telomere and forming a shelterin complex are essential for such telomere functions which regulate telomere length and protect chromosomal ends from DNA damage and repair responses. We previously established mouse TRF1 conditional knockout (TRF1-condKO) ES cells to analyze its function. As a result, TRF1 deficient ES cells showed following four phenotypes: (1) reduction of cell growth rate, (2) accumulation of γ H2AX at telomeres, (3) abnormal telomere signals of metaphase chromosome ends by FISH analysis and (4) disappearance or reduction of telomeric localization of other telomere proteins, TIN2, TRF2, TPP1 and POT1. To investigate the reason and relationship of other telomeric proteins for these phenotypes in details, we introduced various TRF1 mutants in TRF1-condKO ES cells and analyzed those TRF1 deficient phenotypes. As a result, It was showed that reduction of cell growth rate and accumulation of γ H2AX at telomere were derived from disappearance of POT1 telomeric localization whereas abnormal telomere signals in metaphase chromosomes by FISH analysis was dependent on defect of TRF1 itself. In addition, the analysis of function for telomere length regulation indicated that TRF1 had two pathways; one is mediated by the recruitment of the TIN2-TPP1-POT1 complex to telomeres and another is independent of their recruitment. These data suggest that TRF1 regulates telomere structure and function (telomere protection and length regulation) by at least two mechanisms; in one TRF1 acts through the recruiting/tethering of other shelterin components to telomeres, and in the other TRF1 seems to play a more direct role. (K. OKAMOTO and Y. SHINKAI)

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

- Rathert R. Dhayalan A. Murakami M. Zhang X. Tamas R. Jurkowska R. Komatsu Y. Shinkai Y. Cheng X. and Jeltsch A*. Identification of new non-histone targets of human G9a protein lysine methyltransferase using peptide arrays. *Nat Chem Biol.*, 2008, **4**:344-346.
- Kato, Y. Kato, M. Tachibana, M. Shinkai, Y. and Yamaguchi, M*. Characterization of *Drosophila* G9a in vivo and identification of genetic interactions. *Genes to Cells*, 2008, **13**:703-722.
- Thomas, L.R. Miyashita, H. Cobb, R.M. Pierce S. Tachibana, M. Hobeika, E. Reth, M. Shinkai, Y. and Oltz, E.M*. Functional Analysis of Histone Methyltransferase G9a in B and T Lymphocytes. *J.Immunol.*, 2008, **181**:485-493.
- Okamoto K. Iwano T. Tachibana M. and Shinkai Y*. Distinct roles of TRF1 in the regulation of

telomere structure and lengthening. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**:23981-23988.

Tachibana M*. Matsumura Y. Fukuda M. Kimura H. and Shinkai Y*. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 2008, **27**:2681-2690.

Dong K.D. Maksakova I.A. Mohn F. Leung D. Appanah R. Lee S. Yang H.W. Mager D. Schübeler D. Tachiana M. Shinkai Y. and Lorincz M.C*. DNA methylation of retrotransposons in stem cells requires the histone-methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *EMBO J.* 2008, **27**:2691-2701.

Epsztejn-Litman, S. Feldman, N. Abu-Remaileh, M. Shufaro, Y. Gerson, A. Ueda, J. Deplus, R. Fuks, F. Shinkai, Y. Cedar, H*. and Bergman, Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol.*, 2008, **15**:1176-1183.

眞貝洋一：「ヒストン修飾解析ナビ」エピジェネティクス実験プロトコール、羊土社、2008年10月発行（編集/眞貝洋一、牛島俊和）

眞貝洋一：「ヒストン化学修飾によるクロマチン構造・機能制御と生命機能」実験医学、Vol. 26:1322-1326、羊土社、2008。（特集「ヒストン化学修飾による生命機能の制御」企画）

駒井 妙, 眞貝 洋一「転写制御の分子生物学 ―ゲノムデコードに向けて―」南山堂、2008

立花 誠「ヒストン修飾抗体を用いたウエスタンブロット解析」実験医学別冊、エピジェネティクス実験プロトコール、2008年10月発行

Shinkai Y.: Histone methylation and epigenetic gene regulation. **International Symposium 「Decoding Epigenetic Code」**, December 15-16, 2008, Tokyo, Japan

Shinkai Y.: Function and regulation of histone lysine methylation. **The 15th Asia Joint Conference on Biomedical Research**, July 20-23, 2008, Seoul, Korea

Shinkai, Y.: Function and regulation of histone lysine methylation. **The 21st Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA[I]**, June 24-27, 2008, Yamanashi, Japan

Shinkai, Y.: Epigenetic Gene Silencing Mechanisms of the G9a/GLP Histone Methyltransferase Complex. **6th NIBB-EMBL joint Meeting**, March 17-19, 2008 at EMBL Heidelberg, Germany

立花 誠：ヒストンメチル化酵素複合体による転写調節機構、特定領域研究2領域合同公開シンポジウム、東京、2008年1月

立花 誠：ヒストンメチル化酵素複合体による転写制御機構、第31回日本分子生物学会大会、第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム、神戸、2008年12月

眞貝洋一：Function and regulation of histone lysine methylation、第31回日本分子

生物学会大会、第 81 回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム、神戸、2008 年 12 月

2008年、当研究室では新たなメンバーとして4月より2名の大学院生（大学院生命科学研究科修士課程1年）出口勝彰君、村松大輔君を、5月からは台湾からの研究生として楊嘉銘さんを迎えた。一方、修士課程に在籍していた谷口弘樹君が3月で卒業し、技術補佐員として立花准教授の研究をサポートしてくれていた松村泰子さんが11月中旬から京都大学再生医科学研究所山中研究室のテクニカルスタッフとなった。12月からは、松村さんの後任として、旭節夫さんが技術補佐員として加わった。さらに、博士後期過程に在籍していた岡本啓治君がPh.D.を取得し9月16日より当研究室の特定助教となった。その結果、研究室はスタッフ3名、大学院生6名、研究生1名、技術補佐員2名、事務補佐員1名の13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) 酵素活性を欠損させた G9a/GLP 複合体を発現するマウスの樹立と表現型の解析

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。遺伝学的な解析により、G9a は生体内でドミナントな H3K9 メチル化酵素であることが分っている。また、哺乳類には G9a にドメイン構造がよく似た分子、GLP が存在する。GLP も G9a 同様に試験管内で H3K9 メチル化酵素の活性を発揮する。生体内では G9a と GLP は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が分かっている。我々は生体内での G9a/GLP 複合体による転写調節を調べるべく、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 ES 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、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見出した。さらに、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 CpG メチル化を入れることで、転写の抑制状態を作り上げていることも見出した。(Tachibana et. al., *embo j.* 2008). この知見を踏まえ、さらに G9a/GLP 複合体がどのようにマウスの個体発生を調節しているのかを調べようと考えた。この目的のため、ヒストンメチル化活性を欠損した G9a を発現するノックインマウス (G9a-CA マウス) を作成した。このヘテロ接合型の G9a-CA マウス同士の交配からは、ホモ接合型のマウスが生まれなかったことから、G9a-CA ホモ接合型マウスは胚性致死であると決論した。さらにより詳細に致死性を調べた結果、G9a-CA ホモ接合型胚は胎生期 11.5 日まで生存可能であった。G9a 欠損胚はおおよそ胎生期 9.5 日で致死である。よって、H3K9 メチル化活

性欠損 G9a は、G9a 欠損胚の致死性を部分的に相補することが分かった。(立花、眞貝)

2) G9a/GLP 複合体による、細胞系譜特異的な転写調節

以前我々は、G9a ノックアウト ES 細胞で特異的に転写が上昇する遺伝子を調べることにより、*Mage-a* と *Wfdc15a* という 2 つの遺伝子を G9a/GLP 複合体の標的として同定した。しかし ES 細胞以外の細胞ではこういった遺伝子がこの複合体によって発現調節を受けているのか明らかになっていない。個体の発生や分化に伴い発現が動く遺伝子の発現調節に G9a/GLP 複合体がどのように関わっているのかを明らかにする目的で、我々は野生型或いは G9aKO 胚 (胎生期 9.5 日目) から胚本体と栄養外胚葉を単離し、RNA を精製した。これを用いてマイクロアレイ解析を行い、G9a によって制御されている遺伝子を網羅的に解析した。その結果、あるホメオボックス遺伝子 (Reproductive homeobox: *Rhox*) 遺伝子が G9a 欠損によって異所的に発現が亢進していることを見出した。*Rhox* 遺伝子群は X 染色体にマップされる、最近同定された新規の *Hox* 遺伝子である (*Cell*, 120 p369, 2005)。この *Rhox* 遺伝子は精巣や卵巣などの生殖器官と胎盤特異的に発現する。さらに、時間的にも量的にも共線性の発現パターンを示すが、その発現の制御のメカニズムは不明である。興味深いことに、DNA メチル化酵素の欠損により、胚本体特異的に *Rhox* 遺伝子クラスターの特異的なサブセットが異所的に発現亢進することが見出されている (*Genes Dev.*, 20, p3382, 2006)。これらの知見から、*Rhox* の極めてユニークな発現パターンの確立や維持には H3K9 のメチル化と DNA のメチル化とが協調して働いていることが予想される。これを確かめるべく、現在胎生期 9.5 日目の胚を用いたクロマチン免疫沈降の予備実験を開始している。(立花、眞貝)

3) テロメア構造・機能及びテロメア長制御における TRF1 の役割

テロメアは、DNA 反復配列とそこに局在するタンパク質で構成された核タンパク質複合体であり、ゲノム安定性を維持するために必要とされている。そのためのテロメアの機能としては、テロメア長の維持と染色体末端の DNA 損傷応答・修復反応からの保護という二つが知られており、テロメア領域に局在する 6 つのタンパク質 (TRF1、TRF2、TIN2、TPP1、POT1、RAP1) がこれらの機能に非常に重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で分かってきている。我々はそのうちの 1 つであるテロメア二本鎖 DNA 直接結合タンパク質 TRF1 に着目し、TRF1 コンディショナルノックアウト (TRF1-condKO) ES 細胞を樹立しその機能解析を行ってきた。その結果、TRF1 欠損 ES 細胞では (1) 細胞増殖速度の低下や (2) γ H2AX のテロメアへの集積、(3) FISH によるテロメアシグナルの異常が起きていることが (立花、眞貝) わかった。このとき同時に TRF2、TIN2、TPP1、POT1 のテロメア局在が著しく低下していることが示された (Iwano et al., JBC, 2004)。これらの表現型の原因および TRF1 とその他のテロメアタンパク質との相互関係について詳細に調べるために、さまざまな TRF1 変異体を TRF1-condKO ES 細胞に導入発現し、解析を行った。その結果、細胞増殖速度の低下及び γ H2AX のテロメアへの集積は、TRF1 欠損による POT1 のテロメア局在の消失が原因であることが判明した。その一方で、FISH によるテロメアシグナルの異常は TRF1 の欠損に依存したものであることが示された。また、TRF1 のテロメア長制御としての機能について調べた結果、TRF1 には、

これまで言われてきていた TRF1-TIN2-TPP1-POT1 複合体によるテロメラーゼ依存的なテロメア長制御機構だけでなく、TIN2-TPP1-POT1 のテロメア局在に依存しない新規のテロメア長制御機構が存在する可能性を示唆する結果が得られた。以上の結果より、TRF1 は、TIN2 などのテロメアタンパク質の局在に依存した機構と、それに依存しない TRF1 独自の機構によってテロメア構造や機能の維持に働いていることが示唆された。(岡本、眞貝)

