

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ESETによる内在性レトロウイルスの発現抑制 (眞貝)

ヒトをはじめとして哺乳類のゲノムの少なくとも50%以上の領域は、遺伝子をコードしない反復配列によって占められている。この反復配列のほとんどはゲノムを飛び回る能力を持っていた転移因子に由来しており、内在性レトロウイルスはその1つのグループを構成する long terminal repeat (LTR) 型のレトロ転移因子で、ヒトではゲノムの~8%を占める。マウスでは、レトロ転移因子はまだ活発に活動しているものが残っており、マウスの突然変異の10%までは内在性レトロウイルスの転移によると言われている。このようないわゆる利己的な遺伝子の進入と増幅を防ぐために、生体には様々な抑制機構が存在する。そのひとつにレトロ転移因子の遺伝子発現抑制機構があり、体細胞や生殖細胞においては宿主ゲノムに取り込まれたレトロウイルス(プロウイルス)の発現抑制にはDNAのメチル化が重要であり、LTR部分のDNAのメチル化レベルが低下すると、プロウイルスの発現が上昇する。ところが、胚性腫瘍(embryonic carcinoma:EC)細胞や胚性幹(embryonic stem:ES)細胞などのような発生初期の胚から樹立された細胞株では、DNAのメチル化に非依存的な、特別なプロウイルスの発現抑制機構が存在することが30年以上も前から知られていた。しかし、その詳細なメカニズムは良くわかっていなかった。

我々は最近、この発生初期の細胞で特異的に機能しているプロウイルスの発現抑制機構に、ヒストンリジンメチル化酵素 ESET/SETDB1 が非常に重要な役割を持つことを明らかにした [T. Matsui, *et al. Nature* 2010, 464, 927]。ESETはヒストンの特異的なアミノ酸(ヒストンH3の9番目のリジン残基: H3K9)をメチル化する活性を持ち、ESETをコードする遺伝子を条件的に欠失できるES細胞の解析から、ESETを除去すると内在性レトロウイルスの発現レベルが著しく上昇した。そして、内在性レトロウイルスのLTRプロモーター領域のH3K9はESET依存的にトリメチル化されていることも判明した。また、ESETはプロウイルスのLTR領域にKAP1と呼ばれる分子に依存して導かれることも明らかとなった。さらに、ES細胞におけるプロウイルスの発現抑制には、ESETのヒストンメチル化活性は重要であるものの、DNAのメチル化は必ずしも必要でないことが分かった。以上のことから、ESETは、DNAのメチル化状態がダイナミックに変化する胚発生初期の細胞で、DNAのメチル化非依存的に、プロウイルスの発現抑制に寄与していることが示唆された。

次世代シーケンサーを用いたRNAseq解析により、さらに興味ある知見が得られた [MM. Karimi, *et al. Cell Stem Cell* 2011, 8, 676]。ESET欠失マウスES細胞では、内在性レトロウイルスの発現誘導に伴い、近傍の遺伝子の発現にも影響を与え、内在性レトロウイルスとの融合転写産物が幾つも発現してくること

が明らかとなった。つまり、ESETによるエピジェネティック制御は、内在性レトロウイルスによる二次的な影響を抑え込むためにも働いていることが示された。

-----  
**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 ESET silences endogenous retrovirus (Shinkai)**

Repetitive sequences that do not code for genes make up at least 50% of the genome of mammals, including humans. Most repetitive sequences are derived from transposable elements that can move around within the genomes and endogenous retroviruses (ERVs) are retrotransposable elements with long terminal repeats (LTRs), a family of transposable elements, and account for up to 8% of the human genome.

Some mouse retrotransposable elements are still active and transposition of ERVs induces approximately 10% of mutations in mice. Organisms have various inhibiting mechanisms to prevent these selfish genes from entering and amplifying. Transcriptional repression of ERVs is one of such mechanisms. DNA methylation plays an important role in the silencing expression of ERVs incorporated into the host's genome (proviruses) and proviral expression increases when LTR DNA methylation decreases. On the other hand, in cell lines derived from early embryos including embryonic carcinoma (EC) and embryonic stem (ES) cells, it was found 30 or more years ago that these cells had a specific DNA-methylation-independent mechanism for silencing proviral expression. However, the details of the mechanism remain unclear.

We showed that histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase ESET/SETDB1 plays a very important role in the proviral silencing mechanism that functions specifically in cells of the early embryogenesis [T. Matsui, *et al. Nature* **2010**, *464*, 927]. ESET has the activity of methylating a specific histone amino acid (H3K9). Analysis using ES cell system in which genes coding for ESET were selectively knocked out (KO) showed that ERV expression was significantly increased by ESET deletion. It was also shown that H3K9 in LTR-promoter regions of ERVs were ESET-dependently trimethylated. It was confirmed that ESET was introduced to proviral LTR regions by a molecule named Kruppel-associated box protein 1 (KAP1). Furthermore, it was shown that proviral silencing in ES cells was associated with the activity of ESET histone methylation but not always required DNA methylation. Based on the above, it was suggested that ESET was involved in proviral silencing independently of DNA methylation in cells of the early embryogenesis, in which DNA methylation drastically changes. Furthermore, we performed deep RNA sequencing analysis of ESET KO ES cells and found that ~15% of upregulated genes in ESET deficient ES cells were induced in association with derepression of promoter-proximal ERVs, half in the context of “chimeric” transcripts that initiated within these retroelements and spliced to genic exons [MM. Karimi, *et al. Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 676]. Thus, SETDB1 plays a previously unappreciated yet critical role in inhibiting aberrant gene transcription by suppressing the expression of proximal ERVs.

***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

***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