

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。このエピジェネティクスに関わる分子基盤を明らかにし (1)、それらエピジェネティクス因子の生体内の様々な生命機能における役割をモデル動物を用いて明らかにし (2)、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 (3)。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。

内在性レトロウイルスを抑え込む普遍的な仕組みの解明 (Kato and Shinkai)

マウス胚性幹(ES)細胞では、ヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)をトリメチル化する酵素Setdb1が不活化すると内在性レトロウイルス(ERV)の一部が脱抑制する。しかし、IAPを含むこれら脱抑制したERVの多くは、ESから分化誘導された細胞においては、Setdb1が欠損していても発現上昇が見られない。一方、DNAメチル化維持に必須の役割を持つメチル化酵素Dnmt1が欠損していると、ESから分化誘導した細胞でIAPが顕著に発現上昇する。それゆえ、分化した体細胞においては、Setdb1を介したH3K9me3ではなく、DNAのメチル化が主にERVの抑制に重要であると言われてきた。しかしながら、最近のいくつかの研究では、Setdb1が欠損すると、分化した体細胞においてもいくつかのERVが脱抑制してくることが報告されている。そこで我々は、ERV抑制におけるSetdb1のより普遍的な役割、特に分化した細胞での重要性に関して再検討を行った。既存のH3K9me3 ChIP-seqのデータを基に解析したところ、ES細胞においてSetdb1が(直接)転写抑制しているERV領域でのH3K9me3の局在は、分化した様々な種類の細胞でも維持されていることが分かった。そして、マウス胎児線維芽細胞(MEF)でSetdb1を欠損させると、それらのERVでのH3K9me3局在はおしなべて減弱すること、その中の一部のERVが有意に脱抑制してくることが分かった。Setdb1欠損MEFで脱抑制してくるVL30クラスのERVを調べたところ、この脱抑制はLTRを標的とする細胞種特異的な転写因子に依存していることが分かった。これらの解析結果より、Setdb1はERV抑制に関してこれまで考えられてきた以上に普遍的な役割を持ち、H3K9me3修飾を常に施すことでERVが脱抑制しないように、いつもブレーキの役割を果たしていることが示された。(Kato et al, *Nat Commun* 2018)

リジンメチル化酵素 G9a/GLP による LIG1 のメチル化は UHRF1 の複製点へのリクルートメントを制御する (Tsusaka, Shimazu and Shinkai)

リジンメチル化酵素 G9a と GLP はヘテロ複合体を形成し、H3K9 のメチル化酵素として機能している。これらの因子は、ヒストン以外のたんぱく質をメチル化することも知られているが、非ヒストンたんぱく質のメチル化の役割はほとんどわかっていない。我々は、G9a と GLP の両方がノックアウト(KO)された細胞の抽出液を基質として、SAM 類縁体 ProSeAM を使った G9a と GLP の新たな基質の同定を試み、合計で 59 種類の基質候補蛋白質を同定した。候補因子を絞り込むために、標的候補たんぱく質のアミノ酸一次配列から、G9a, GLP がメチル化する H3K9 の前後の H3 配列と類似した配列を有するたんぱく質を調べたところ、上位にランクされた基質候補にそのような配列を有するものがいくつも存在することが分かった。

研究年報

その中の1つ、DNA ligase 1 (LIG1)は G9a, GLP の両方のスクリーニングで最もランキングの高かったたんぱく質で、DNA 複製の際に岡崎フラグメントのライゲーションを行う DNA 複製因子として知られている。生化学的解析の結果、LIG1 の H3 類似配列内の H3K9 に対応するリシン(LIG1K126)が G9a, GLP によって主にジメチル化されること、G9a, GLP を欠損した細胞では K126 のメチル化が消失することが分かった。さらに、DNA メチル化酵素 Dnmt1 の機能を制御する UHRF1 たんぱく質が LIG1 と会合していること、この会合には K126 のメチル化が必須の役割を持つことを突き止めた。これまでの研究から、UHRF1 は tandem tudor domain (TTD)を介して K9 がメチル化された H3 に高親和性を示すことが知られており、K126 メチル化された LIG1 に対しても TTD を介して高親和性を示すことが明らかとなった。さらに UHRF1 の TTD は、in vitro でメチル化された LIG1K126 に対してメチル化された H3K9 よりも一桁高い親和性を示した。DNA 複製時に、LIG1 は PCNA を介して複製点に集積することが分かっている。今回の解析により、DNA 複製時に、UHRF1 が LIG1 を介して複製点に集積すること、LIG1K126A 変異体しか発現していない細胞、あるいは K126 のメチル化が消失する G9a, GLP の両方が KO されている細胞では、複製時における UHRF1 の複製点（ペリセントロメアヘテロクロマチン領域での）への集積がほとんど消失することが分かった。これまでの研究から、UHRF1 は複製時に複製後の DNA に Dnmt1 をリクルートすることで、Dnmt1 による DNA ヘミメチル化からフルメチル化反応の触媒を助けていることが考えられてきた。そこで、LIG1K126A 変異体しか発現しない細胞では、Dnmt1 が複製時に複製点へ十分にリクルートされず、その結果 DNA のメチル化維持が減弱していることが推察された。解析の結果、LIG1K126A 変異体しか発現しない細胞では、確かに Dnmt1 の複製点への集積が減弱していること、さらに DNA のメチル化レベルが有意に低下していることが明らかとなった。

今回の研究により、G9a/GLP の新規メチル化基質として LIG1 を同定し、G9a/GLP を介した LIG1 のメチル化は UHRF1 の複製点へのリクルートメントを誘導することで、Dnmt1 による維持メチル化を助け、細胞複製を超えたエピゲノムの維持に寄与していることを明らかにした。(Ferry et al, *Mol Cell* 2017)

ミトコンドリア蛋白質のメチル化による代謝制御 (Shimazu and Shinkai)

哺乳類のメチル化活性を有することが予想されるたんぱく質の中で、約 40 種類はミトコンドリア標的シグナル配列を持っていることから、これらの因子はミトコンドリアに局在してミトコンドリアに存在するたんぱく質をメチル化し、それらの標的たんぱく質の機能制御に働いていることが推察されている。今回、そのようなメチル化酵素の1つで、seven-beta-strand 型のメチル化酵素 Mettl20 に焦点を絞って研究を行った。まず、Mettl20 のメチル化基質を同定するために、HeLa 細胞のミトコンドリア画分の抽出液を基質とし、Mettl20 と ProSeAM を用いて Mettl20 の基質蛋白質の同定を行った。その結果、Mettl20 は脂質の beta 酸化に寄与する electron transfer flavoprotein beta subunit (ETF_B) をメチル化すること、ETF_BK200 と K203 がメチル化されることを明らかにした。Mettl20 による ETF_B のメチル化の役割を明らかにするために、Mettl20 KO マウスを作成した。Mettl20 KO マウスでは ETF_BK200,203 のメチル化が完全に消失すること、メチル化されなくなった ETF_B は酵素活性が亢進していることが分かった。その結果、脂肪食給餌環境下では、Mettl20 KO マウスは酸素消費と熱産生が亢進していた。また、絶食 24 時間後に低温耐性試験を行うと、Mettl20 KO マウスは体温維持が亢進していることも分かった。以上の結果より、Mettl20 によるミトコンドリア蛋白質 ETF_B のメチル化は、エネルギー産生制御に関わることを明らかとなった。(Shimazu et al, *Sci Rep* 2018)

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.

Setdb1-mediated ERV silencing in differentiated cells (Kato and Shinkai)

In mouse embryonic stem cells (mESCs), subsets of endogenous retroviruses (ERVs) are derepressed by the inactivation of *Setdb1*, which catalyzes histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3). Most of those ERVs, including IAPs (intracisternal A particles), are not reactivated by *Setdb1* knockout (KO) in further differentiated embryonic cells, but the same IAPs are significantly derepressed by *Dnmt1* KO. Therefore, it is generally recognized that DNA methylation, not *Setdb1*-mediated H3K9me3, dominantly contributes to ERV silencing in differentiated somatic cells. However, several recent studies have revealed that some ERVs are also derepressed in differentiated somatic cells lacking *Setdb1*. We re-evaluated the general role of *Setdb1* in ERV silencing, especially in differentiated cells. A bioinformatics analysis of ChIP-seq data revealed that H3K9me3 enrichment on ERVs targeted and repressed by *Setdb1* in mESCs is maintained in differentiated cells. H3K9me3 enrichment is mostly diminished in mouse embryonic fibroblasts lacking *Setdb1*, but only a subset of them are significantly derepressed. We focused on VL30-class ERVs which are derepressed in *Setdb1* KO MEFs and we revealed that this derepression is dependent on cell type-specific transcription factors that target LTR elements. These data suggest a more general role for *Setdb1* in ERV silencing, which provides an additional layer of epigenetic silencing through the H3K9me3 modification. (Kato et al, *Nat Commun* 2018)

G9a/GLP mediated LIG1 methylation regulates recruitment of UHRF1 to replication loci (Tsusaka, Shimazu and Shinkai)

G9a and GLP are a methyltransferase complex that methylates histone H3 on lysine 9 (H3K9). They also target several non-histone proteins, but most of the functional consequences of non-histone protein methylation remain unknown. By using cellular extracts from G9a/GLP double-knock out (DKO) cells as a source, we performed ProSeAM-based substrate screening for G9a and GLP, and identified 59 candidates in total. To narrow-down the candidates, we looked at primary sequences of the candidates and found a histone H3 mimic sequence within several high-ranked candidates. Among them, we further focused our attention on DNA ligase 1 (LIG1), which is a DNA replication factor and responsible for joining Okazaki fragments produced during DNA replication. LIG1 contains a histone H3-like sequence at its N-terminus region, and its H3K9-like lysine was shown to be mostly di-methylated in human and mouse cell lines. We further showed that both G9a and GLP methylate LIG1 at the H3K9-like lysine in vitro, and that depletion of G9a and GLP or inhibition of G9a/GLP's enzymatic activity abolish the LIG1 methylation in cells. These results established that LIG1 is a new substrate for G9a/GLP methyltransferase complex and it is methylated at its H3K9-like lysine.

By performing mass spectrometric analysis, we found UHRF1 to be a LIG1 binding protein, and we showed that UHRF1 binds to LIG1 via its tandem tudor domain (TTD) in a LIG1-methylation dependent manner. UHRF1 is well-known for its function in inheritance of DNA methylation; it recognizes hemi-methylated DNA produced just after DNA replication and recruits a DNA methyltransferase DNMT1 so as to re-methylate the newly synthesized DNA. This UHRF1-mediated maintenance of DNA methylation is an important process to inherit DNA methylation pattern from parent cell to daughter one, but it remained unclear how UHRF1 itself is recruited to DNA replication sites. To test hypothesis that methylated LIG1 recruits UHRF1 to DNA replication sites, we examined UHRF1 localization at replication sites in *Lig1* mutant cells that lack the histone mimic-containing exon within *Lig1* gene. The result demonstrated that the histone mimic of LIG1 is essential for UHRF1 recruitment to DNA replication sites. Moreover, we examined UHRF1 localization in G9a/GLP DKO cells and found that UHRF1 is hardly detected at DNA replication sites in the absence of G9a and GLP. These data indicate that methylated LIG1 recruits UHRF1 to DNA replication sites.

If UHRF1-mediated maintenance of DNA methylation is disturbed, DNA methylation levels should be decreased at genome-wide. We therefore examined a global DNA methylation level in *Lig1*-mutant cells. Our results showed that the *Lig1* mutant cells showed a decrease in DNA methylation at genome-wide, which is a partial phenocopy of UHRF1 KO cells. Overall, our results established that methylated LIG1 by G9a/GLP recruits UHRF1 to DNA replication sites, and this mechanism is an effective way for inheritance of DNA methylation during cell division. (Ferry et al, *Mol Cell* 2017)

Mitochondrial protein methylation and metabolism (Shimazu and Shinkai)

There are about 40 MTase genes which may have a role for mitochondria functions since the encoded proteins

contain mitochondrial targeting signal sequences. However, only small part of those genes has been characterized so far. *Mettl20* is a seven-beta-strand methyltransferase (MTase) which localized in the mitochondria and tri-methylates electron transfer flavoprotein beta subunit (ETF_B) at lysine 200 and 203. It was shown that METTL20 decreases the ability of ETF to extract electrons from MCAD and glutaryl-CoA dehydrogenase in vitro. We performed a proteomic substrate screening for METTL20 in mitochondria from cultured cells using ProSeAM, and found that ETF_B is a major substrate which is consistent with previous reports (J Biol Chem. 2014 Aug 29;289(35):24640-51., J Biol Chem. 2015 Jan 2;290(1):423-34.). To address the biological function of METTL20 mediated ETF_B methylation, we established *Mettl20* KO mice and characterized the phenotypes related to metabolism. Loss of ETF_B-methylation in the KO mice was confirmed with anti-methylated lysine antibodies or MALDI-MS analysis. Calorimetric analysis revealed that the *Mettl20* KO mice had higher oxygen consumption and heat production under ketogenic diet (KD). Subsequent cold tolerance test after 24 h fasting demonstrated that the *Mettl20* KO mice have a better ability to maintain their body temperature in cold environment. (Shimazu et al, *Sci Rep* 2018)

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

福田 溪 Kei Fukuda

Technical Staff

福田 幹子 Mikiko Fukuda

事柴 芳 Kaoru Kotoshiba

Assistant

市橋 美香 Mika Ichihashi

Student

津坂 剛史 Takeshi Tsusaka

朴 ジウン Jieun Park

Part-timer

西村 佳也子 Kayako Nishimura

志村 知古 Chikako Shimura