

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。

Suv39h1を介したヘテロクロマチン形成には自身の持つ核酸結合能とメチル化H3K9結合能が協調的に寄与する (白井、眞貝)

我々のゲノム情報の本体である DNA は、ヒストンとヌクレオソーム構造を形成し、さらにヒストン以外の様々な核内分子と複合体を形成し、クロマチンとして核内に存在している。核内の DNA を染色すると濃く染まる部分と薄く染まる部分があることから、それぞれはヘテロクロマチン、ユウクロマチンと呼ばれている。ヘテロクロマチンは、ユウクロマチン部分に比べて高い凝集性を示すことから濃く染色されるだけでなく、様々なヘテロクロマチン特異的な分子や翻訳語修飾が集積している。その結果、遺伝子の発現は抑制状態となっている。細胞分裂の際に紡錘糸が付着するセントロメア領域の周辺 (ペリセントロメア領域) は典型的なヘテロクロマチンで、Suv39h というメチル化酵素によりヒストン H3 の 9 番目のリジン残基が高度にトリメチル化(H3K9me3)されている。その結果、このエピゲノム情報である H3K9me3 を認識するヘテロクロマチンたんぱく質 HP1 が集積し、さらに別のヒストン修飾やエピゲノム読み取り分子が集積することで、機能的なヘテロクロマチン構造が形成されている。

このような機能的ヘテロクロマチン構造は種を超えて保存されており、これまでの解析から、分裂酵母やショウジョウバエなどでは、ヘテロクロマチンの確立や維持に非コード RNA が重要な役割を持つことが示されている。一方、哺乳類では、ヘテロクロマチン形成に非コード RNA が関与するかはよくわかっていなかったが、今回の解析の結果、ヘテロクロマチン領域で転写される非コード RNA が Suv39h1 のヘテロクロマチン形成に寄与することを見出した。

Suv39h1 には、自身が付加する H3K9me3 を認識するクロモドメインがあるが、このクロモドメイン内には別に核酸と結合する部分があること、この核酸結合能は DNA よりも RNA により高い値を示すこと、この核酸結合能には塩基配列の特異性は見いだせないこと、が分かった。次に、Suv39h を欠損し機能的ヘテロクロマチンが壊れペリセントロメア領域の H3K9me3 や HP1 の集積が消失している細胞に、WT あるいは核酸結合能あるいは H3K9me3 認識・結合能を失った変異体の Suv39h1 を相補することで、H3K9me3 や HP1 の集積がどれほど回復するか検討した。その結果、WT の Suv39h1 と比べていずれの変異体も H3K9me3、HP1 の集積といったエピジェネティックなヘテロクロマチン情報の回復が不全になることがわかった。さらに、H3K9me3 や HP1 の集積が見られるようになった相補細胞においては Suv39h1 自身のヘテロクロマチン集積が観察できるが、WT に比べるといずれの変異体もペリセントロメア領域に係留する時間が短くなっていることが分かった。最後に、Suv39h1 は核酸結合能依存的にペリセントロメア領域か

ら転写されている major satellite repeat 非コード RNA と核内において結合していること、この非コード RNA をノックダウンすると、Suv39h1 のペリセントロメア領域における係留時間が減弱することが分かった。

以上の結果より、哺乳類において、クロマチンの非コード RNA が Suv39h1 を介したヘテロクロマチン形成に寄与すること、また Suv39h1 のヘテロクロマチン形成には様々なエピゲノム読み取り機構が総合的に機能していることも明らかとなった。

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.

Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly (Shirai and Shinkai)

Heterochromatin, a highly condensed chromatin structure, can be divided into two classes: invariably constitutive heterochromatin (CH), and developmentally controlled facultative heterochromatin. CH generally consists of repetitive DNA and is transcriptionally silent, and its higher-order chromatin structure can spread, causing the heritable inactivation of genes adjacent to the CH. The establishment of CH is tightly correlated with changes in posttranslational histone-tail modifications. The trimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9me3), which is a hallmark of CH, creates specific binding sites for H3K9me3 reader molecules such as HP1 proteins, and these epigenetic states are maintained throughout replication. CH is critical for functional chromosomal domains such as the pericentromere, and epigenetic pericentromere layers are important for accurate chromosome segregation in mitosis and for genome stability. SUV39H (1 and 2), an H3K9me3 methyltransferase in mammals, targets CH domains and intact transposons. H3K9me3 in the pericentric regions is mainly catalyzed by SUV39H. Therefore, in *Suv39h1/2* double-knockout (*Suv39h* dn) cells, the H3K9me3 levels over the pericentromere are severely diminished and HP1 proteins do not accumulate.

The nature of CH and its epigenetic machineries are well conserved in various species, including fission yeast and flies. In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), the RNA interference (RNAi)-dependent pathway is essential for pericentric heterochromatin formation and maintenance, and the process of pericentric transcription is coupled with the targeting of the SUV39H homologue Clr4 to chromatin. In the *Drosophila* ovary, a similar small-RNA-mediated process promotes transcriptional silencing by H3K9me3 and by HP1A, an HP1-family protein in flies. However, it is not clear whether the RNAi-dependent pathway (or another RNA-based mechanism) is involved in the process of establishing and maintaining heterochromatin in mammals, such as in creating target specificities for SUV39H and SUV39H-mediated H3K9me3 formation.

SUV39H recognizes H3K9me3 via its chromodomain (CD), and enriched H3K9me3 allows SUV39H to target specific chromosomal regions. However, the detailed targeting mechanisms, especially for naïve chromatin without preexisting H3K9me3, are poorly understood. Here we show that Suv39h1's CD (Suv39h1-CD) binds nucleic acids, and this binding is important for its function in heterochromatin assembly. Suv39h1-CD had higher binding affinity for RNA than DNA, and its ability to bind nucleic

acids was independent of its H3K9me3 recognition. Suv39h1 bound major satellite RNAs in vivo, and knockdown of major satellite RNAs lowered Suv39h1 retention on pericentromere. Suv39h1 mutational studies indicated that both the nucleic acid-binding and H3K9me-binding activities of Suv39h1-CD were crucial for its pericentric heterochromatin assembly. These results suggest that chromatin-bound RNAs contribute to creating SUV39H's target specificity.

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

Part-timer

西村 佳也子 Kayako Nishimura

志村 知古 Chikako Shimura