

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05602

研究課題名（和文）CXXCタンパク質によるエピジェネティック修飾の階層性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of an epigenetic hierarchy mediated by CXXC proteins

研究代表者

伊藤 伸介（ITO, SHINSUKE）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50612115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,100,000円

研究成果の概要（和文）：CpGアイランドはエピジェネティック修飾のプラットフォームとして寄与し、転写制御の中心であるが、そのエピジェネティック修飾を忠実に導入するメカニズムは不明な点が多い。本研究課題においてはCpGアイランドを認識して結合するCXXCファミリータンパク質であるCXXC1とKDM2Bに着目して、エピジェネティック制御が如何に誘導されるか検証する研究をおこなった。その結果、CXXC1とKDM2Bは特異的なタンパク質複合体をCpGアイランドにリクルートし、特徴的なエピジェネティック修飾を導入すること、また、タンパク質複合体を自己制御することによって、修飾導入の特異性を呈することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック修飾は、個体発生・分化の過程において時空間的に厳格な遺伝子発現制御を行う上で重要な役割を果たしている。このエピジェネティック修飾は、その重要性故に、エピジェネティック修飾の破綻は、様々な疾患の発症に繋がるため、エピジェネティック修飾が如何に導入されるかを詳細に理解することは極めて重要である。とりわけ、CpGアイランドのエピジェネティック修飾の異常が様々な疾患やがんにて報告されている。したがって、本研究成果は、エピジェネティック修飾の忠実に導入するメカニズムの一端を明らかにするものであり、その異常が疾患発症の原因になる可能性をもつとかがえる。

研究成果の概要（英文）：The majority of mammalian gene promoters are associated with specialized genomic regions called CpG islands (CGI) that contribute to regulation of gene expression by attracting specific histone modifying enzymes. However, the precise mechanisms by which how CXXC domain-containing proteins, CXXC1 and KDM2B specifically recognize their target CGIs remain poorly understood. Therefore, in this project, we aim to understand the detailed mechanisms to establish epigenetic modifications at specific loci. Here, by using biochemical approach combined with a mice genetic study, we demonstrated CXXC1 and KDM2B specifically recruit associated complex and induce epigenetic modifications. We also revealed Polycomb-proteasome axis could play a critical role in specification of recruitment of CXXC-associated complexes. Therefore, ubiquitin-proteasome system is involved in polycomb-mediated transcriptional regulation and could serve as a gatekeeper for ensuring a proper epigenetic landscape of CGI.

研究分野：ゲノム動態

キーワード：エピジェネティクス CpGアイランド 遺伝子発現抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック修飾は、個体発生・分化の過程において時空間的に厳格な遺伝子発現制御を行う上で重要な役割を果たしている。このエピジェネティック修飾は DNA のメチル化とヒストンの多彩な化学修飾 (ユビキチン化、メチル化等) によって構成され、修飾酵素、脱修飾酵素、あるいは修飾を認識するタンパク質が密接に連携することによって確立されて機能する。それぞれの修飾は、ヌクレオソームに単一に存在するわけではなく、複数の修飾がヌクレオソームに混在して、各修飾同士が密接にクロストークすることによってクロマチンドメインを構築し、遺伝子発現を始めとする複数の生命現象を制御している。その重要性故に、エピジェネティック修飾の破綻は、様々な疾患の発症に繋がるため、エピジェネティック修飾が如何に導入されるかを詳細に理解することは極めて重要である。近年、遺伝子発現制御の根幹を成す転写開始点 (TSS) 付近のエピジェネティック修飾と転写活性の関係性に注目が集まっている。

CpG アイランド (CGI) とエピジェネティック修飾

DNA メチル化は、DNA メチル基転移酵素が CpG ジヌクレオチド内のシトシンにメチル基を付加することによって起こる。哺乳動物のゲノムでは約 80% の CpG がメチル化修飾を受けている一方で、DNA メチル化を受けていないゲノム領域、CpG アイランド (CGI) が存在する。CGI は、平均して 1,000 塩基長の DNA 中に高い GC 含量、高密度の CpG ジヌクレオチドをもつ。興味深いことに CGI は、現在までに注釈のついた遺伝子の約 80% の TSS 前後に存在してプロモーターとしての機能をもち、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている (Deaton, AM., and Bird, A., *Genes Dev.*, **25**:1010-1022, 2011)。DNA 配列を俯瞰すると単に GC に富んだ領域であるため、CGI のプロモーターとしての体系的な理解を阻むが、エピジェネティック修飾が巧妙に遺伝子発現制御を担っていることが示唆されている。しかしながら、CGI を読み取り、エピジェネティック修飾を適切に導入する機構は理解されていない。

2. 研究の目的

CXXC ドメインは、Zn フィンガードドメインの一種であり、メチル化されていない CpG 配列を特異的に認識、結合する。これまでに 10 種類の CXXC ドメインをもつタンパク質 (以降 CXXC タンパク質) が報告されている (CXXC1-10)。CGI は一般的に DNA メチル化を受けていない事のみならず、特有のエピジェネティック修飾を備えているが、この修飾パターンの確立には、CXXC タンパク質が貢献していることが複数の報告から示唆されている。例を挙げると、申請者らはメチル化シトシンのメチル基を酸化して 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) を合成する酵素 Tet1 (Cxxc6) が CXXC ドメインを介して CGI に結合して DNA 低メチル化状態の維持に貢献すること、更にポリコーム群転写抑制複合体 PRC2 をリクルートする事を報告した (Wu, H. *et al.*, *Nature*, **473**:389-393, 2011)。加えて、申請者らは、Kdm2b (Cxxc2) による CGI へのポリコーム群転写抑制複合体 PRC1 のリクルート、近傍クロマチンへ H2A ユビキチン化 (H2Aub) の導入、その後の PRC2 のリクルート及び H3K27me3 修飾の導入という、エピジェネティック修飾の階層性を報告した (Blackledge, NP. *et al.*, *Cell*, **157**: 1-15, 2014)。これらの観察から、CGI は複数の CXXC タンパク質をリクルートすることによって CGI に特徴的なエピジェネティック修飾を確立させるプラットフォームとして機能すること、また修飾の階層性が存在することが示唆され、CXXC タンパク質の CGI における普遍的な機能が推測された。本研究課題では、CXXC タンパク質に焦点を当てて解析して、これらの作業仮説にタックルし、エピ

ジェネティック修飾の階層性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

当研究グループにて、CXXC ドメイン有する全ての遺伝子 (Cxxc1-10) について、タモキシフェン依存的に遺伝子破壊する変異アリルを持ったマウス ES 細胞 (cKO) を作製した。これらの cKO ES 細胞をタモキシフェン処理して CXXC タンパク質をノックアウトして、経時的なエピジェネティック修飾 (H3K27me3、H2Aub、H3K4me3、H3K36me3、5hmC 等) の変化を ChIP 後に次世代シーケンサーを用いて (ChIP-seq) ゲノムワイドに解析する。また、転写活性の変化を RNA-seq 法により明らかにして、修飾の変化との相関を追究する。本研究課題では CXXC タンパク質を網羅的に解析することによって、エピジェネティック修飾の階層性を解明する。

4. 研究成果

本研究課題では、CXXC1 と KDM2B (Cxxc2) を中心に解析を行った。

(1) CXXC1

CXXC1 は CXXC ドメインを介して CpG アイランドに結合して、Setd1 複合体をリクルートして H3K4me3 を導入する。H3K4me3 が転写活性化に重要なことは既に明らかであるが、実際に CXXC1-Setd1 複合体及び H3K4me3 がどのように転写活性化に寄与するか不明である。薬剤 (タモキシフェン) 依存性 Cxxc1 を機能欠損させたマウス ES 細胞 (cKO) は、H3K4me3 を著しく減少するにもかかわらず、興味深い事に転写活性化状態を維持していることを見出した。一方で、CXXC1 cKO 細胞を神経系へ分化誘導した細胞は、神経細胞のマーカー Meis2 の誘導に欠損を示した。これらの観察から、CXXC1 は定常状態 (この場合、ES 細胞) では転写活性化状態の維持には不要であり、遷移状態 (ES 細胞から分化誘導した細胞) の転写活性化の確立に必要であることが示された。そこで、CXXC1 がどのように Meis2 の活性化に寄与するのか、神経分化誘導系を用いた解析を行ってきた。Meis2 は、胚様体 (EB) 形成後にレンチニン酸処理して 2 時間後には誘導が始まる最初期遺伝子の一つである。CXXC1 野生型 EB は RA に応答して迅速に Meis2 を誘導するのに対し、CXXC1 KO EB においては Meis2 の発現誘導が著しく損なわれていた。CXXC1 KO のレスキュー実験により、Meis2 発現誘導には CXXC1 の CXXC ドメイン (CGI の認識)、PHD ドメイン (ヒストン H3K4 メチル化の認識)、及び H3K4 メチルトランスフェラーゼ SET1 の結合ドメインが重要であることが明らかになった。すなわち、CXXC1 が Meis2 の CGI プロモーターに結合し、SET1 をリクルートして H3K4me を誘導し、転写活性化することが推測される。事実、CXXC1 は Meis2 の CGI に EB 形成後に結合を開始し、RA 処理後に H3K4me をプロモーターに導入した一方で、CXXC1 KO EB は CGI への H3K4me3 の誘導がみられなかった。興味深いことに、Meis2 のエンハンサー領域の活性化 (H3K4me1+H3K27Ac) は WT でも CXXC1 KO EB でも起こっているため、CXXC1 KO EB ではエンハンサーからの活性化シグナルを CGI プロモーターが受け取ることができない為に転写活性化に欠損をもつことが示唆された。そこで、Meis2 プロモーターを bait とした 4C-Seq 解析を行い、プロモーターと相互作用するゲノム領域を探索し、プロモーターとエンハンサーの相互作用を検討した。その結果、ES 細胞にてプロモーターと結合する約 500kb 上流のゲノム領域 (5' RBS) を同定した。この領域は RING1B も結合しており、プロモーターと相互作用することにより遺伝子発現抑制に寄与していると考えられる。CXXC1 WT ES 細胞を EB に分化誘導する 5' RBS はプロモーターから解

離するのに対し、CXXC1 KO EB ではプロモーターと 5' RBS は相互作用したままであった。これらの結果から、CXXC1 はプロモーターから RING1B を排除すること、5' RBS をプロモーターから解離することによりエンハンサーのリクルートを介して転写活性化に寄与することが示唆された。更に、プロモーターとエンハンサーの相互作用は、CXXC1 KO EB にて減少していることがわかった。これらの結果は、転写活性化に際し、CXXC1-SET1 のプロモーターへの結合がポリコーム(RING1B)の排除とゲノム構造の変化を引き起こし、エンハンサーとプロモーターの相互作用を促進することを示唆するものである。この研究結果は、エンハンサーからの活性化シグナルが伝達される際のプロモーター側の準備状況の重要性を明らかにするものであり、プロモーターへの CXXC1-SET1 の結合、あるいは H3K4me3 は、活性化エンハンサーのアクセプターとして寄与することも考えられる。

(2) KDM2B (Cxxc2)

ポリコーム群 (PcG) は、エピジェネティック制御を介して発生、分化過程において細胞系譜の決定に重要な役割を果たす遺伝子発現抑制複合体である。ポリコーム群が媒介する遺伝子発現抑制は、主に 2 つのタンパク質複合体によって樹立される。1) PRC2 複合体によるヒストン H3 の 27 番目のリジン (K27) のトリメチル化 (H3K27me3) と 2) PRC1 複合体によるヒストン H2A の K119 のユビキチン化 (H2Aub1) である。我々は、CXXC タンパク質の一つである KDM2B が CXXC ドメインを介して CGI に結合し、PRC1 の異性型 PRC1.1 をリクルートし、標的とする CGI (PcG (+) CGI) に H2Aub1 を樹立して転写抑制に寄与することを報告した (Blackledge, NP. *et al.*, *Cell*)。この解析から更なる疑問点が浮上した。ChIP-seq 法による KDM2B のゲノム全体の結合解析では、KDM2B はほぼ全ての CGI に結合していることが明らかになった。KDM2B はポリコーム因子 RING1B、PCGF1、BCOR を含む PRC1 蛋白質複合体 (PRC1.1) を形成して、一部の CGI にポリコーム因子をリクルートすることによって H2Aub1 を誘導して転写抑制に寄与する。即ち、KDM2B は、全ての CGI に結合するにも拘わらず、一部の CGI にのみポリコーム因子をリクルートして転写抑制しているのである。

この特異性のメカニズムを明らかにするために、PRC1.1 複合体をバキュロウイルス発現系にて再構成した。PRC1.1 の構成因子である RING1B-PCGF1 は RING Finger ドメインを持つユビキチンリガーゼであり、*in vitro* ユビキチン化アッセイにより、KDM2B-PRC1.1 はヌクレオソームの H2A ユビキチン化のみならず、PRC1.1 の構成因子の強いユビキチン化を促進した。他方、マウス ES 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で 3 時間処理することにより、KDM2B のクロマチンへの結合に変化が無い一方で、PRC1.1 の構成因子 RING1B 及び BCOR の結合が CGI にて増強した。これらの結果から、PcG(-) CGI への PRC1.1 の結合が PRC1.1 の自己ユビキチン化とプロテアソームによる分解により制御されていることが示唆された。そこで、PRC1.1 の自己ユビキチン化が直接的に PRC1.1 の CGI への結合に機能しているかどうか実験的に検証するために、PRC1.1 の構成因子であり、RING Finger ドメインを持つ PCGF1 のコンディショナルノックアウト (PCGF1 cKO) ES 細胞を用いて、PCGF1 KO における BCOR と RING1B の抗体を用いて ChIP-seq 解析を行い、確かに PCGF1 KO にて BCOR の結合が増強する遺伝子グループを検出した。よって、PCGF1 による PRC1.1 の自己ユビキチン化が PcG(-) CGI から排除するメカニズムであることが示唆された。RNA-seq 解析に

より BCOR 結合が増強した遺伝子座では遺伝子発現が抑制された。これらの結果は、PRC1.1 の CGI への結合の特異性が自己ユビキチン化により制御されており、エピジェネティック修飾を特定の領域に制限するメカニズムを明らかにするものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Fursova NA, Blackledge NP, Nakayama M, Ito S, Koseki Y, Farcas AM, King HW, Koseki H, Klose RJ*. Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene Repression. *Mol. Cell*. 2019 June 6: 74, 1–17 (査読有り)
2. Conway E, Jerman E, Healy E, Ito S, Holloch D, Oliviero G, Deevy O, Glancy E, Fitzpatrick DJ, Mucha M, Watson A, Rice AM, Chammas P, Huang C, Pratt-Kelly I, Koseki Y, Nakayama M, Ishikura T, Streubel G, Wynne K, Hokamp K, McLysaght A, Ciferri C, Di Croce L, Cagney G, Margueron R, Koseki H, Bracken AP*. A Family of Vertebrate-Specific Polycombs Encoded by the LCOR/LCORL Genes Balance PRC2 Subtype Activities. *Mol. Cell* 70, 408-421.e8 (2018) (査読有り)
3. Brown DA, Di Cerbo V, Feldmann A, Ahn J, Ito S, Blackledge NP, Nakayama M, McClellan M, Dimitrova E, Turberfield AH, Long HK, King HW, Kriaucionis S, Schermelleh L, Kutateladze T2, Koseki H, Klose RJ*. The SET1 Complex Selects Actively Transcribed Target Genes via Multivalent Interaction with CpG Island Chromatin. *Cell Rep*. 20, 2313-2327 (2017) (査読有り)
4. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. Endoh M*, Endo TA, Shinga J, Hayashi K, Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H*. *eLife* 6:e21064 (2017) (査読有り)
5. Polycomb in Transcriptional Phase Transition of Developmental Genes. Kondo T¹, Ito S¹, Koseki H*. (¹Co-First)*Trends Biochem. Sci.* 41:9-19 (2016) (査読無し)
6. Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. Ito S*, Kuraoka I*. (*Co-corresponding) *DNA Repair* 32, 52-57 (2015) (査読無し)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. ポリコーム複合体 PRC1.1 による CpG アイランドのエピゲノム制御、伊藤伸介
第 2 回ユビキチン研究会 (東京) 2019 年 1 月 (口頭発表)
2. ポリコーム複合体 PRC1.1 による CpG アイランドのエピゲノム制御、伊藤伸介
第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ (横浜) ワークショップ、
2018 年 11 月(口頭発表)
3. Role of SKP1 in the regulation of CGI Epigenome, Shinsuke Ito
West Lake Symposium on Epigenetics (Hangzhou, China), 2018 April (口頭発表)
4. Role of SKP1 in the regulation of CGI Epigenome_
Shinsuke Ito, Marika Shibata, Hiroki Sugishita, Takashi Kondo and Haruhiko Koseki
Cold Spring Harbor Asia on Chromatin, Epigenetics, and Transcription (Suzhou, China),
2018 April
5. ポリコーム複合体によるエピゲノム制御、伊藤伸介
第 16 回日本蛋白質科学会 (福岡) ワークショップ、2016 年 6 月(口頭発表)

6. Role of CXXC1 in transcriptional regulation and cell-fate decision
Shinsuke Ito, Marika Shibata, Hiroki Sugishita, Takashi Kondo and Haruhiko Koseki
EMBL Conference: Transcription and Chromatin 2016-08-27

7. Role of CXXC1 in transcriptional regulation and cell-fate decision
Shinsuke Ito, Marika Shibata, Hiroki Sugishita, Takashi Kondo and Haruhiko Koseki
Kick-off symposium in Nagoya City University 2016
Nagoya City University Hospital 2016-02-29

〔図書〕(計 1件)

1. ポリコーム複合体によるエピゲノム制御

伊藤伸介, 古関明彦,
細胞工学 (秀潤社)、9、847-851、2015年

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。