

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06695

研究課題名(和文) 転写抑制因子ポリコーム群による幹細胞のゲノム情報を維持する機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism by which the transcriptional repressor Polycomb-group protein complex maintains genome integrity in stem cells

研究代表者

磯野 協一 (Isono, Kyoichi)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・准教授

研究者番号：90323435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチン修飾因子かつ転写抑制因子であるポリコーム群(PcG)複合体は細胞分化や細胞増殖に関わる多くの遺伝子を可逆的に抑制することで幹細胞の分化や自己複製を調節している。その一方で、近年、PcG複合体のDNA損傷応答への関わりが示唆されているが、その分子機構は不明である。本研究では、PcG複合体成分PHC2がDNA損傷誘導的にATMによってリン酸化され、そのリン酸化はDNA修復の場に適した微小環境となるゲノム高次構造変換に寄与していることを発見した。さらに当該の機能異常はがん発症リスクを高めることも示した。本成果はDNA損傷応答におけるPcG複合体の明確な役割を新規分子モデルによって提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでポリコーム群複合体がどのようにDNA修復イベントに貢献しているのかは不明瞭であった。本研究では、PHC2がDNA損傷シグナルを直接的に受信するという新規証拠に加え、ポリコーム群によるDNA修復貢献の分子基盤の一端を初めて明らかにした。ポリコーム群複合体は転写抑制のみならずDNA修復機能によって、幹細胞の多能性、自己複製能、およびゲノム完全性に寄与することが示唆された。したがって幹細胞研究や再生医療への波及が期待される。さらにポリコーム群機能は重要ながん治療標的となっていることから、本研究が創薬開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Polycomb-group (PcG) complex, a chromatin modifier and transcriptional repressor, regulates stem cell differentiation and self-renewal by reversibly repressing many genes for cell differentiation and cell proliferation. On the other hand, the involvement of PcG complex in DNA damage response has been suggested in recent years; however, its molecular mechanism remains debated. In this study, we show that PHC2, a component of PcG complex, is phosphorylated by ATM in a DNA damage-induced manner, and that this phosphorylation contributes to organizing higher order structured-chromatin which creates a microenvironment suitable for DNA repair. Furthermore, the point-mutated mice for the corresponding phospho-residue of PHC2 increases the risk of developing cancer. This study provides a distinct role for PcG complex in the DNA damage response along with a novel molecular model.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ポリコーム群 DNA損傷修復 幹細胞 ゲノム高次構造 がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は「自己複製能」と「多能性」によって定義される。それら特性にはポリコーム群複合体による多数の細胞周期関連遺伝子および分化制御遺伝子の転写抑制が必要である。申請者はポリコーム群複合体成分 PHC2 の自己重合活性を介したクロマチン凝集による転写抑制メカニズムを報告した (Isono et al., *Dev Cell* 2013)。さらに申請者らはポリコーム群複合体や PHC2 が血球幹細胞の DNA 複製や移動性にも重要な役割を担っていることを示した (Bae et al., *Nat Commun* 2019; Takano et al., *Nat Commun* 2022)。その一方で、ポリコーム群複合体と DNA 損傷応答との関わりを示唆する報告が蓄積しており、ポリコーム群複合体の多面的機能もまた注目すべき研究課題であった。しかしながら DNA 損傷応答におけるポリコーム群複合体の役割、意義、そして分子機構はほとんど理解されていなかった。研究開始当初、申請者は既述の PHC2 が DNA 損傷応答キナーゼ ATM によってリン酸化されることを発見していた。さらに当該のリン酸化部位に対する点変異マウスを作製し、そのマウス胎仔由来の神経幹細胞を用いた実験から、リン酸化 PHC2 は DNA 修復に貢献していることが示唆されていた。

2. 研究の目的

- (1) リン酸化 PHC2 がどのように DNA 修復に貢献するのか、その分子機構を解明することを主要目的とした。これにより DNA 損傷応答におけるポリコーム群複合体の役割に関する明確かつ確固たる証拠を提示することができる。またポリコーム群複合体は幹細胞に「自己複製能」、「多能性」に加えて、「ゲノム完全性」をも付与しているという幹細胞ホメオスタシスの基盤因子であることを提唱する。
- (2) PHC2 リン酸化の生理学的意義を追究する。

3. 研究の方法

- (1) PHC2 リン酸化はポリコーム群抑制機能に影響するか否かを調査するために、胎仔由来神経幹細胞の野生型および点変異型を次世代シーケンス法および定量的 PCR 法によりポリコーム群標的遺伝子のクロマチン状態および発現状態を解析した。
- (2) DNA 損傷部位とポリコーム群集積部位との物理的相互作用を調査するために、上記神経幹細胞を DNA 損傷マーカー γ H2AX とポリコーム群との蛍光免疫染色実験を実施し、各蛍光シグナルの共局在頻度を画像解析した。
- (3) 研究期間中に次のモデルが報告された。DNA 損傷部位では直ちにコヒーシンの loop extrusion 作用によりゲノム 3 次元構造 topological associating domain (TAD) が変化し、損傷修復に適した場を作り上げることが示された (Arnould et al., *Nature* 2021)。そこで PHC2 リン酸化と TAD 構造との関係を調査するために、上記神経幹細胞の Hi-C 法による立体構造解析を実施した。また誘導型コヒーシン欠失胚性幹細胞を用いて、PHC2 リン酸化はコヒーシンの影響を受けるか否かの調査を実施した。
- (4) DNA 損傷修復のエラーはがん発症の主要要因として知られている。PHC2 リン酸化の意義を調査する一環として、皮膚発がんモデルで検証した。

4. 研究成果

- (1) ガンマ線照射および非照射した神経幹細胞をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析した。通常培養における PHC2 および他ポリコーム群 RING1B の局在パターンは野生型と点変異型とで同様であった。放射線照射後に野生型において標的遺伝子座上で PHC2 のリン酸化を検出したが、PHC2 自体および RING1B の局在パターンは影響されなかった。点変異型でも同様の結果であった (リン酸化 PHC2 は検出されず)。これに矛盾しないように、ポリコーム群標的遺伝子の発現状態は野生型と点変異型、並びに損傷誘導前後において顕著な違いは検出されなかった。これらの結果は PHC2 リン酸化がポリコーム群抑制機能には影響しないこと、すなわちリン酸化 PHC2 の DNA 修復貢献は遺伝子発現制御とは独立して起こることを示唆している。
- (2) DNA 損傷修復ドメインは γ H2AX 染色領域で表される。損傷誘導後、 γ H2AX ドメインとポリコーム群染色ドメインとのオーバーラップは野生型でより高頻度で起こることが観察された。これらの結果から、DNA 損傷部位へのポリコーム群複合体エントリーは野生型で起こりやすくなっており、効率的な損傷修復を可能にしていると判断した。
- (3) 上記免疫染色実験の結果は、損傷部位で起こる loop extrusion に付随すると考えた。そ

ここで、放射線照射前後の野生型および点変異型神経幹細胞から精製したゲノムをHi-C法によるTAD解析に供した。その結果、多くのポリコム群標的遺伝子間で起こるクロマチン相互作用は放射線照射後の野生型では強固になるのに対して点変異型ではそれが観察されない、すなわち、PHC2点変異型が存在するとDNA損傷誘導性の適正なTADを形成できないことが判明した(図1)。次に、CreERT2; SMC3-floxed胚性幹細胞を使った免疫沈降法およびChIP-シーケンス法を行った。その結果、コヒーシン枯渇時での損傷誘発的PHC2リン酸化の低下を確認することができた(図2)。以上から、次の分子解釈に至った。PHC2を含むポリコム群複合体はDNA損傷部位にアンカーされたコヒーシンによるloop extrusionによって損傷部位に引き寄せられ、コヒーシンリングを通り抜けるタイミングでリン酸化され、そして適正なTADが構成される。しかし点変異型が結合したヌクレオソームはコヒーシンリングを越えることができない。その結果として、DNA修復に適正な場が提供されず、DNA修復が非効率になる(図3)。

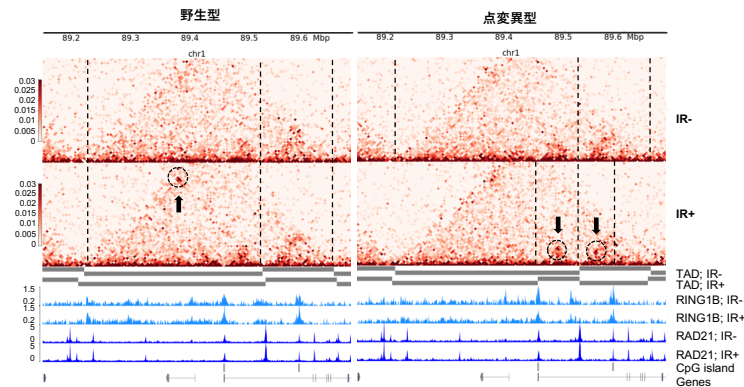


図1 Hi-C法によるTAD解析の代表例
放射線照射(IR+)と非照射(IR-)した細胞からの解析図。下段にはRING1BとRAD21の局在が示されている

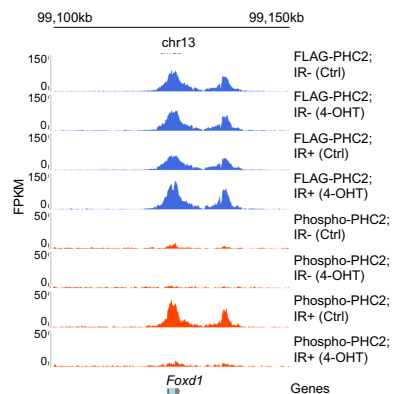


図2 コヒーシン枯渇条件下でのChIP-seq結果の代表例
放射線照射(IR+)、非照射(IR-)、コヒーシン存在(Ctrl)、枯渇状態(4-OHT)でのPHC2レベルは変化しないが、PHC2リン酸化レベルはコヒーシン枯渇条件下では上昇していない。

(4) PHC2リン酸化とがん発症との関連性を調べるために、DMBA/TPA多段階皮膚がんモデルを適用した。DMBAはDNA損傷を誘導すると報告されている(Muqbil et al., FEBS Lett 2006)。その結果、点変異型マウスで有意に多発する乳頭腫を確認した。したがって、PHC2リン酸化にはがん抑制効果があることが示唆された(図4)。

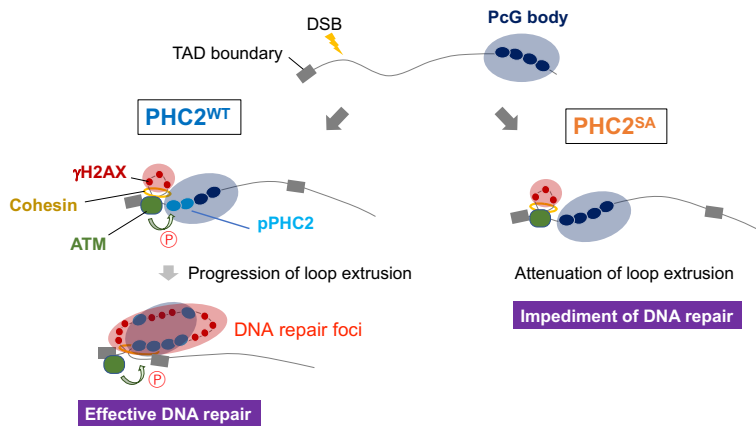


図3 DNA修復におけるPHC2リン酸化の貢献に関する分子モデル
ゲノム切断(DSB)部位では即座に始まるコヒーシンによるloop extrusionとDSB部位に局限するATMによってγH2AXドメインが構築される。Loop extrusionにより近傍に位置するポリコム群複合体(PCG body)は引き寄せられる。PHC2がATMによりリン酸化されるとポリコム群を含む修復に適した場(DNA repair foci)が完成する。非リン酸化型PHC2が結合するヌクレオソームはloop extrusionの弊害となる。(※) loop extrusionは切断箇所の両側で起こるが、簡素化のため片側のみ表示した。

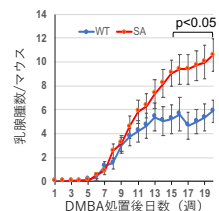


図4 野生型(WT)と点変異型(SA)マウスでの皮膚がん頻度

本研究期間において、DNA損傷修復におけるPHC2リン酸の役割とその分子機構を提示することができた。この成果はポリコム群複合体の機能の多面性を実証するものであり、幹細胞の運命決定や恒常性維持に関する研究およびがん研究へと波及していくと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takano Junichiro, Ito Shinsuke, Dong Yixing, Sharif Jafar, Nakajima-Takagi Yaeko, Umeyama Taichi, Han Yong-Woon, Isono Kyoichi et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 PCGF1-PRC1 links chromatin repression with DNA replication during hematopoietic cell lineage commitment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34856-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Bae Joonbeom, Choi Sang-Pil, Isono Kyoichi, Lee Ji Yoon, Park Si-Won, Choi Chang-Yong, Han Jihye, Kim Sang-Hoon, Lee Han-Hyoung, Park Kyungmin, Jin Hyun Yong, Lee Suk Jun, Park Chung-Gyu, Koseki Haruhiko, Lee Young Sik, Chun Taehoon	4. 巻 10
2. 論文標題 Phc2 controls hematopoietic stem and progenitor cell mobilization from bone marrow by repressing Vcam1 expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-11386-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯野協一、木村弥生、公文麻美、遠藤高帆、古関明彦
2. 発表標題 クロマチン作用因子ポリコーム群複合体のDNA修復機能による癌抑制
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯野協一
2. 発表標題 DNA損傷応答キナーゼATMからポリコーム群PHC2へのシグナル伝達は転写抑制機能とは独立してDNA修復に働く
3. 学会等名 エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------