

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20390088

研究課題名(和文)

ポリコム群によるES細胞維持と分化の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) **Dissecting molecular mechanisms mediated by Polycomb group proteins in maintenance and differentiation of ES cells**

研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号： 40225446

研究成果の概要(和文)：

ポリコム群は、ヒストン H3K27 をメチル化するタンパク複合体 (PRC2) と H2A をモノユビキチン化する PRC1 のふたつの複合体の共同を介して、多くの発生関連遺伝子群に結合し、転写抑制に寄与する。しかしながら、ポリコム群がどのように標的遺伝子群を認識し、それらの転写抑制に寄与するのか明らかにされていない。本研究では、H2A モノユビキチン化が、転写抑制に必須であるものの、十分ではないことを実験的に示した。すなわち、いくつかの抑制メカニズムを相補的に用いて安定な抑制をひき起こしている可能性が示された。一方、標的遺伝子の認識についても、PRC2 によって媒介されるヒストン H3K27 トリメチル化に依存するメカニズムに加えて、依存しない経路が存在することを明らかにした。このような多様性があることにより、ポリコム群は様々な一次構造を持つゲノムに一様に対応することが可能になっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

Two distinct Polycomb complexes, PRC1 and PRC2, collaborate to maintain epigenetic repression of key developmental loci in embryonic stem cells (ESCs). Although the respective complexes catalyze mono-ubiquitination of histone H2A (H2Aub1) and trimethylation of H3 lysine 27 (H3K27me3), the extent which these modifications contribute to Polycomb repression remains controversial. To address this issue, we characterized PRC1 mutants that either lack the ability to catalyze H2Aub1 or ineffectively bind H3K27me3. We find that the catalytically-inactive PRC1 mutant maintains the ability to compact chromatin at the *Hox* loci, but is nonetheless essential to facilitate repression of target genes and to maintain ESCs in an undifferentiated state. We further show that PRC1 localization and H2Aub1 deposition at most but not all target loci depends on physical recognition of H3K27me3 by CBX2, a core PRC1 subunit. Our data suggest that heterogeneous mechanisms, including chromatin compaction and ubiquitination, as well as PRC2-dependent and PRC2-independent

recruitment modes underlie PRC1 function. Such diverse sensing mechanisms and effectors might be required for appropriate loading of PRC1 onto heterogeneous target loci, and/or to maintain a repressive state that is robust yet highly responsive to developmental cues during ES cell self-renewal and differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

### 1. 研究開始当初の背景

ポリコム群 (Polycomb group; PcG) タンパクは、ショウジョウバエにおいてホメオボックス (*Hox*) 遺伝子の転写が抑制された状態を維持するための分子機構として見出された。ほ乳類において、ポリコム群は *Hox* だけでなく多くの形態形成あるいは細胞増殖制御遺伝子の転写に寄与する。さらに、*ink4a* 遺伝子などのがん抑制遺伝子群の制御を介して、発がんや組織幹細胞の維持にも重要な役割を果たすことが明らかになってきている。

ポリコム群は、多くの発生、細胞周期制御、転写制御に関連する遺伝子座に結合し、それらの発現を抑制する。ポリコム群複合体がそれぞれの標的遺伝子座へ結合する過程は、ポリコム群が転写制御因子群やノンコーディング RNA によってガイドされ、トリメチル化ヒストン H3K27 を認識することで安定化することが今までに示唆されている。しかしながら、その全体像の多くは未知

のままである。一方、その作用発現機序についても、ヌクレオソームの凝縮、ヒストン修飾酵素群の標的クロマチンへのアクセシビリティの制御、ヒストン H2A のユビキチン化、基本転写装置の機能抑制などが生化学的な研究から明らかにされてきているものの、それぞれの生化学的な過程が生細胞の中でどのように反映されているのかは、全く理解されていない。

その一方で、我々は、ノックアウトマウスを用いた解析から、ポリコム群の細胞機能へのインパクトを解析し、細胞分化、増殖、パターン形成などに強く寄与する事を示してきた。特に、胚性幹細胞 (ES細胞) がポリコム群の生理的な機能を解析する上で、極めて有用な細胞系譜であることを証明した(投稿中)。Ring1A と Ring1B は、ポリコム群タンパク複合体の構成成分であり、ヒストン H2A モノユビキチン化の E3 リガーゼである。Ring1A と Ring1B とを薬剤依存的にノックアウトすると ES細胞としての形質は失われ、自律的に分化していくことを示した。さらに、この過程はポリコム群複合体によって抑制されている遺

伝子座におけるクロマチン構造の変換とそれら遺伝子群の脱抑制を伴う。

## 2. 研究の目的

これらの研究成果は、明らかにすべき重要な問題点を新たに提起した。ひとつは、分化シグナルによるポリコム群複合体のクロマチンからの解離がどのような分子メカニズムによって引き起こされるのかということであり、もうひとつは、ポリコム群の解離がどのようにクロマチン構造の変換を引き起こすかということである。

今まで、ポリコム群の機能は、我々を含むグループの解析から、複数の他のタンパク複合体との相互作用を介して制御されることが遺伝学的に示されてきた。酵素活性を担っている Ring1B が、ポリコム群だけではなく、それと機能的に拮抗するトリソラクス群複合体や E2F6 複合体などにも含まれている事は、相互作用を介した制御メカニズムが存在することと相反するものではない。今までの多くの観察から引き出されるひとつの作業仮説は、トリソラクス群複合体や E2F6 複合体のひとつの作用点が、ポリコム群をクロマチンから解離させることであるというものである。

実際、この仮説に立脚した予備実験として、E2F6 複合体のコンポーネントであり、Ring1B の結合タンパクでもある RYBP (Ring1B/YY1 binding protein) を E S 細胞で過剰発現させたところ、ポリコム群の標的遺伝子座への結合は著しく減弱した。また、E2F6 複合体のもうひとつのコンポーネントである MBLR (Mel18/Bmi1-like RING) を欠損させると、ポリコム群変異によって引き起こされたホメオティック変異が回復したことから、ポリコム群複合体と E2F6 複合体の機能的な拮抗が示唆された。

この仮説を検証するために、E2F6

複合体に焦点を絞り、それがどのようにポリコム群複合体に作用するか、ES 細胞の増殖能、未分化性、分化能、遺伝子発現、及び、ポリコム群の標的特異的クロマチン結合能を指標として解析を行う。また、そのような機能発現がそのような生化学的メカニズムを介して発露するのかユビキチン化及び SUMO 化に焦点を絞りながら解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ポリコム群複合体のクロマチン結合の制御メカニズム

現在までに、E2F6 複合体のコアは、Ring1A と Ring1B に加えて、同じく RING フィンガータンパクである MBLR (Mel18/Bmi1-like RING)、Zn フィンガータンパクである Yaf2 (YY1-associated factor 2) とそのホモログ RYBP、ユビキチン特異的タンパク分解酵素 7 (USP7) から構成されうること、MBLR を含む複合体の精製から明らかにしてきた。現在までに、これらの全てについて構成的、あるいは、コンディショナルな欠損アレルおよびコンディショナルな過剰発現アレルをマウスを用いて作成し、それらのマウスより変異 E S 細胞を作成してきた。今までの予備実験から Ring1A と Ring1B の両方をコンディショナルに欠失する E S 細胞 (Ring1A/B cdko)、MBLR、RYBP、あるいは、USP7 をコンディショナルに欠失 (cko) あるいは過剰発現する E S 細胞を用いて以下のように解析を行う。

現在までに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) とマイクロアレイ (Chip) を組み合わせた方法 (ChIP-on-Chip 法) により、E S 細胞における Ring1B のゲノムへの結合パターンおよびヒストン H3 リシン 4 および 27 のトリメチル化状態を系統的に明らかにしてきた (遠藤、遠藤と古関、投稿中)。

MBLR、RYBP、あるいは、USP7 をコンディショナルに欠失 (cko) あるいは過剰発現する E S 細胞において、欠失あるいは過剰発現の誘導前後における

Ring1B の標的クロマチンへの結合状態とヒストンH3 リシン4および27のトリメチル化状態をChIP-on-Chip法により明らかにする。

同時に、遺伝子発現状態についても、マイクロアレイ法により系統的に遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにする。それぞれの遺伝子座におけるRing1B結合パターンあるいはヒストン修飾パターンと発現を遠藤らが新たに開発したソフトウェア（遠藤、遠藤と古関、投稿中）を用いてゲノムワイドに比較し、どのような相関が存在するのかを解析する。

逆に、Ring1A/B cdko E S細胞を用いて、Ring1A/Bの有無が、MBLR、RYBP、あるいは、USP7のクロマチン結合にどのように影響を及ぼすかをChIP-on-Chip法を用いて明らかにする。この一連の解析により、Ring1A/BとE2F6複合体の構成成分のエピスタティックな相関をモデル化する。

## (2) ポリコム群複合体の作用発現メカニズムの解析

現在までにRing1A/Bは、ヒストンH2Aをモノユビキチン化するためのE3リガーゼ、あるいは、自己を非定型的にポリユビキチン化するためのE3として作用することが、生化学的に示されてきた。今までに、E2F6複合体とポリコム群複合体の遺伝学的な拮抗の分子基盤を明らかにするために、E2F6複合体の精製を行い、そのE3活性を明らかにしてきた。その結果、E2F6複合体もヒストンH2Aをモノユビキチン化しうることが示された。また、Ring1Bの自己ユビキチン化も観察された。一方、Mel18は、大腸菌内にSUMOとUbc9と共発現させると自己をSUMO化しうることを予備実験により示している。ここでは、MBLR/Ring1BあるいはMel18/Ring1B複合体に焦点を絞って、その機能的差異を明らかにする。

そのために、HEK293T細胞よりプルダウンにより精製したMBLR/Ring1BあるいはMel18/Ring1Bを試験管内でユビキチン化し、そのポリユビキチン化にユビキチン上のどのリシン残基が使われているかを質量分析によって明らかにする。また、E2によってその特異性が変化するかを明らかにする。

また、それぞれのリシン残基を置換した変異ユビキチンを用いて、MBLR/Ring1BあるいはMel18/Ring1B複合体によるポリユビキチン化で用いられるリシンの相違の有無を検証する。

MBLR、Mel18およびRing1BのそれぞれのRINGフィンガーに変異を導入し、それぞれを野生型あるいは変異型にした複合体を精製する。これにより、Ring1Bのユビキチン化がどのRINGフィンガーに依存しているのかを明らかにする。

## 4. 研究成果

H2Aモノユビキチン化が、転写抑制に必須であるものの、十分ではないことを実験的に示した。PRC1の触媒サブユニットであるRing1AとRing1Bをコンディショナルに二重欠損するES細胞(Ring1A/BdKO)を樹立し、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルとChIP-Chip法によるポリコム群のクロマチン結合、モノユビキチン化H2Aのゲノム上への分配を解析した。その結果、モノユビキチン化H2Aの分布とポリコム群による転写抑制の間に強い正の相関があることが示された。次に、モノユビキチン化H2Aの機能を明確にするために、Ring1A/BdKO ES細胞に、E3活性を失った変異型Ring1Bを導入し、転写抑制がどの程度回復するかを解析した。その結果、PRC1の標的遺伝子群への集積は回復し、クロマチンの凝縮も誘導されたものの、H2Aモノユビキチン化と転写抑制は回復しなかった。面白いことに転写抑制は一部の遺伝子では部分的な回復が見られたのに対し、別の一部では、全く回復が見られなかった。この

実験事実は、PRC1 は、いくつかのエフェクターメカニズムを相補的に用いて安定な抑制をひき起こしている可能性を示している。

また、標的遺伝子の認識についても、従来言われていた PRC2 によって媒介されるヒストン H3K27 トリメチル化を、PRC1 に含まれるクロモドメインを介した認識に依存する経路が存在することを明確に証明した。その一方で、PRC2 を欠損した ES 細胞においても、有意にモノユビキチン化 H2A が標的遺伝子座に集積していることを明らかにした。この経路の一部が、この経路は、Ring1B のリングフィンガーに結合するタンパクである Me118 と Bmi1 を介したヌクレオソーム結合に依存することを示した。Me118 と Bmi1 を介したクロマチン認識は、ヒストン H3K27 トリメチル化を必要としない。PRC1 の結合する遺伝子群は、有意に長い CpG アイランドを有していることが示されており、Me118 と Bmi1 はそれ自体あるいはそこに含まれる特有の配列を認識している可能性が示された。このようなエフェクターメカニズムと認識メカニズムの両方に多様性があることにより、ポリコム群は様々な一次構造を持つゲノムに一様に対応することが可能になっていると考えられる。

また、脱ユビキチン化酵素である USP7 が、PRC1 あるいは E2F6 複合体に構成的に会合していることを示した。E2F6 複合体は、試験管内では、構成的に自己ユビキチン化を起こすが、USP7 によりその自己ユビキチン化は顕著に抑制された。実際、USP7 を欠損させた ES 細胞では、Ring1B の発現が顕著に低下したものの、標的に結合した Ring1B の量には有意な変化は見られなかった。このことは、E2F6 複合体は、主にクロマチンに結合しない分面に

存在する Ring1B を保持していることを示している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Li X, Isono KI, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Otte AP, Casanova M, Kitamura H, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N, \*Koseki H. (2011) Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. **Mol Cell Biol**. 査読有り
- ② Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, Bruno L, Landeira D, Santos J, Banito A, Gil J, Koseki H, Merkenschlager M, \*Fisher AG. (2010) ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. **Cell Stem Cell**. 6:547-556. 査読有り
- ③ Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, \*Bernstein BE. (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. **PLoS Genet**. 4:e1000242. 査読有り
- ④ Endoh M., Endo T.A., Endoh T., Fujimura Y., Ohara O., Toyoda T., Otte A.P., Okano M., Brockdorff N., Vidal M., \*Koseki H. (2008) Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. **Development** 135:1513-1524. 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- ① Koseki H “遺伝現象におけるエピジェネティック制御とリプログラミング”, 第 62 回日本細胞生物学会大会, 大阪, 日本 (2010 年 5 月 19 日)
- ② Koseki H “プロモーターアレイを用いたポリコム群による ES 細胞維持メカニズムの解析”, 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会, 米子, 日本 (2010 年 5 月 22 日)
- ③ Koseki H “The role of Polycomb body to mediate Hox repression”, 東京大学分子細胞生物

学研究所 核内情報研究分野 シンポジウム、東京、日本 (2010年11月2日)

- ④ Koseki H “Polycomb-dependent regulation for differentiation programs of stem cells and progenitors”, 第16回国際分化学会国際会議, 奈良、日本 (2010年11月16日)
- ⑤ Koseki H “ES細胞におけるポリコム群の動き”, 第42回日本発生生物学会年会, 京都、日本(2009年5月29日)
- ⑥ Koseki H “HP1g links histone H3K9 methylation to homologous chromosome pairing during meiotic prophase”, the Epigenetics 2009 Australian Scientific Conference@Epigenetics and Development, Brisbane, Australia (2009年12月2日)
- ⑦ Koseki H, "Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the coretranscriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity", Shanghai Cancer Institute, Shanghai, China (2008年7月3日)
- ⑧ Koseki H, “Mouse development: embryogenesis”, EMBO Practical Course on Anatomy and Embryology of the Mouse, Zagreb, Croatia (2008年9月6日)
- ⑨ Koseki H "Polycomb repression mediates pluripotency of ES cells", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.(2008年10月31日)
- ⑩ Koseki H “Histone H2A ubiquitinylation subdivides bivalent genes into PRC1-dependent and -independent domains in ES cells”, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会、合同大会, 神戸, 日本(2008年12月9日)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 変異体FGF

発明者: 古関明彦

権利者: 国立大学法人千葉大学、独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願2008-081826

出願年月日: 平成20年3月26日

国内外の別: 国内

名称: ES細胞の製造方法

発明者: 古関明彦

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/058448

出願年月日: 平成23年4月1日

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・グループディレクター  
40225446

### (2) 研究分担者

#### (3) 連携研究者

遠藤 高帆 (TAKAHO ENDOH)

独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研究部門・研究員  
40384862

遠藤 充浩 (MITSUHIRO ENDOH)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ研究員  
40391883

信賀 順 (JUN SHINGA)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・研究員  
20334211

藤村 雄一 (YU-ICHI FUJIMURA)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・研究員  
60392099