

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21602006

研究課題名（和文） ポリコーム群による胚性幹細胞および組織幹細胞のエピジェネティックな制御

研究課題名（英文） Epigenetic regulation of embryonic and somatic stem cells by Polycomb

研究代表者

遠藤 充浩 (ENDO MITSUHIRO)

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

研究者番号：40391883

研究成果の概要（和文）：

ポリコーム群 Ring1A/B のコンディショナルノックアウト(KO)胚性幹(ES)細胞を樹立し解析を行った結果、Ring1A/Bは発生制御遺伝子の転写抑制に寄与しており、ES細胞の未分化性維持に必須であることが分かった。またRing1A/BによるヒストンH2Aのモノユビキチン化活性が、転写抑制に重要な役割を担っていることを明らかにし、論文発表した。さらに6.5日胚由来のエピブラスト幹細胞の維持にもRing1A/Bのユビキチン化活性が必要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Analysis using Ring1A/B conditional knockout embryonic stem (ES) cells revealed that Ring1A/B contribute to maintain ES cell identity by repressing developmental regulators. We also reported that Ring1A/B-mediated mono-ubiquitination of histone H2A is an essential step for transcriptional repression of the target genes. Furthermore, we found that histone ubiquitination activity of Ring1A/B is also required for the maintenance of epiblast stem cells derived from a 6.5 dpc embryo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：ES細胞、幹細胞、エピジェネティクス、クロマチン、転写、発生、分化

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の中でも胚性幹(ES)細胞は、あらゆる

る組織の細胞へ分化する可能性を持つため、その分子基盤の解明は、再生医学の可能性を広げる上で重要と思われる。ES細胞の自己複製能・多分化能の維持には特異的に発現するOct3/4, Sox2, Nanogなど複数の転写因子が必要不可欠であり、その作用機序についてすでに多くの知見が報告されてきた。しかし、これらの転写因子がクロマチンに対して、どのような影響・変化をもたらすことによってES細胞の維持に寄与しているのかについては、よく分かっていない。

一方で近年、ES細胞のクロマチン構造は、将来の転写活性化に備えながら一時的にグローバルに転写抑制化されていることを示唆する構造をとっており、このグローバルな転写抑制化にポリコーム群が寄与していることが明らかになりつつある(Bernstein et al., 2006; 未発表データ)。

ポリコーム群は、ヒストン修飾を介してクロマチン構造の変化を引き起こすことにより、様々な標的遺伝子の発現抑制に関与する。またポリコーム群は、造血幹細胞や神経幹細胞の自己複製、さらにはガンの幹細胞の増殖にも関与していることが報告されている(Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003)。

我々は、未分化ES細胞において、PRC1の構成分子であるRing1Bが発生に関わる多くの標的遺伝子座に直接結合しており、Ring1A/B両遺伝子の欠損により、これらの標的遺伝子の多くが脱抑制し、未分化性を保てず自発的に分化することを明らかにしてきた(Endoh and Koseki, in revision)。

また、Oct3/4欠損やGata6過剰発現による分化過程において、ポリコームによる抑制がグローバルに解除されることも明らかにしてきた。しかし、Oct3/4, Sox2, Nanogなどの転写因子群とポリコーム群などによるクロマチン修飾との具体的な関係については未だよく分かっていない。ポリコーム群による転写抑制のメカニズムや、ヒストン修飾(モノユビキチン化H2A)の局在や役割についても不明な点が多い。

本研究では、ES細胞の自己複製能・多分化能の維持における、各ポリコーム群の役割・階層性および作用機序を明らかにし、また、前述のES細胞特異的な転写因子群とポリコーム群によるクロマチン修飾との関係を明らかにすることにより、幹細胞維持・分化に必要とされるクロマチン構造の制御メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

我々はES細胞においてPRC1複合体の構成分子Ring1AとRing1Bの両方を除去すると、多くの発生に関わる遺伝子の発現が上昇し、未分化性を保てなくなり自発的に分化することを見出ししている。またPRC1ポリコームによる抑制はES細胞特異的な転写因子ネットワークの下流に位置し、分化シグナルはPRC1ポリコームによる抑制をグローバルに解除することを明らかにし、それが新たな遺伝子発現を促す可能性を示唆してきた(Endoh et al., Development. 2008)。

しかし、ポリコームがどのようなメカニズムで標的遺伝子を認識し、転写を調節するのかについては依然よく分かっていない。本研究では、ポリコーム群Ring1A/Bに注目し、そのヒストン修飾活性と標的遺伝子への結合・転写抑制の関係を解明する。また、Oct3/4, Sox2, NanogなどのES細胞特異的な転写因子群やLIF/Stat3経路とポリコームによるエピジェネティックな転写制御の具体的な関係を明らかにすることを目指す。さらに、Ring1A/BのインタラクターであるRybpの機能についてもES細胞を用いて解析する。最終的には、ES細胞で得られた知見を基にして、組織幹細胞におけるポリコーム機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

各種ポリコーム群遺伝子のコンディショナル欠損ES細胞やエピプラスト幹細胞を樹立し、ポリコーム群遺伝子欠損時の表現型や発現プロファイルを調べる。また、各幹細胞におけるポリコーム群や付随するヒストン修飾の局在をゲノムワイドなクロマチン沈降実験(ChIP-on-chip)により明らかにする。さらに、ヒストンに対する修飾酵素活性を失った点変異ポリコーム群遺伝子コンストラクトを作成し、ヒストン修飾活性の役割について解析する。

4. 研究成果

申請者は、ポリコーム群が哺乳類初期発生をどの様に制御しているのかを明らかにするため、Ring1A/Bコンディショナルノックアウト(KO)胚性幹(ES)細胞を用いて解析を行ってきた。その結果、Ring1A/Bは数多くの発生制御遺伝子の転写を抑制することにより、ES細胞の未分化性維持に寄与していることを明らかにした。次に、Ring1A/Bによるヒスト

ンH2Aのユビキチン化の役割解明を目指した。具体的には、ユビキチン化酵素活性を失った点変異 Ring1B を作成し、それを Ring1A/B 欠損細胞に導入することにより、Ring1B タンパクは存在するがユビキチン化 H2A は存在しない ES 細胞株を作成した。その結果、Ring1B が標的遺伝子座へ結合する過程や標的クロマチンを凝集する過程には H2A ユビキチン化は必要無いが、標的遺伝子の転写を抑制するためには H2A ユビキチン化が不可欠であることが分かった。さらに、エピブラストにおけるポリコム群の機能を調べるため、Ring1A/B コンディショナル KO エピブラスト幹細胞を樹立し、同様の解析を行った。その結果、エピブラスト幹細胞の維持にもユビキチン化酵素活性を持った Ring1A/B が不可欠であることが明らかになった。PRC1 ポリコムによる標的遺伝子の転写抑制に H2A のユビキチン化が必要かどうかについてはこれまで議論が分かれていたが、本研究の成果は遺伝子発現や幹細胞維持における H2A ユビキチン化の必要性をはじめ明確にしたと言う点で学術的に重要な知見だと思われる。

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 7 件)

1. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, **Eskeland R**, **Bickmore WA**, Vidal M, Bernstein BE and Koseki H
Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1 dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity.
PLoS Genet. 2012 (in press) 査読有
2. Hisada K, Sánchez C, Endo T, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal M.
RYBP represses endogenous retroviruses, preimplantation- and germline-specific genes in mouse embryonic stem cells.
Mol Cell Biol. 32: 1139-1149, 2012 査読有
3. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi

M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, Iwama A.

The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis.

Blood. 118:2443-2453, 2011

査読有

4. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, Koseki H, Kyba M, Iwama A, Osawa M.
Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells.
Blood. 117:e142-150, 2011 査読有
5. Li X, Isono K, 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.
Mammalian polycomb-like Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate polycomb activity both at the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes.
Mol Cell Biol. 31: 351-364, 2011 査読有
6. Sharif J, Endoh M, Koseki H.
Epigenetic memory meets G2/M: to remember or to forget?
Dev Cell. 20:5-6, 2011 査読無
7. 遠藤充浩、古関明彦
ヒストン H2A のユビキチン化による遺伝子発現の制御
生体の科学 60 巻, 533-540, 2009 年
査読無

[学会発表] (計 12 件)

① 招待講演

- 1) 遠藤充浩 「クロマチン制御因子ポリコム群による哺乳類初期胚における幹細胞制御」京大放生研セミナー 2010 年 6 月 4 日 (京都大学放射線生物研究センター)

2) 遠藤充浩、遠藤高帆、古関明彦「ポリコーム群 Ring1A/B によるヒストン修飾を介した幹細胞制御」第 82 回日本生化学会大会（神戸国際会議場）2009 年 10 月 21 日～24 日

3) 遠藤充浩、遠藤高帆、古関明彦 “PRC1 suppresses ES cell differentiation programs through PRC2-dependent and PRC2-independent mechanisms.” 第 19 回日本数理生物学会年会（東京大学駒場キャンパス）2009 年 9 月 9 日～11 日

② 口頭発表

4) Endoh M and Koseki H. “H2A ubiquitination is an essential step to mediate PRC1 Polycomb silencing of differentiation genes in ES cells” 第 9 回幹細胞シンポジウム（泉ガーデンギャラリー、東京）2011 年 5 月 14 日

5) Endoh M, Endo TA, Endoh T, Vidal M, and Koseki H. ” PRC1 suppresses ES cell differentiation programs through PRC2-dependent and PRC2-independent mechanisms” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Cambridge, UK) September 2-6, 2009.

6) 遠藤充浩、古関明彦 “Roles of Polycomb group proteins Ring1A/B in mouse ES cells and TS cells.” 第 7 回幹細胞シンポジウム（学術総合センター）2009 年 5 月 16 日-17 日

③ ポスター発表

7) 遠藤充浩、遠藤高帆、磯野協一、古関明彦 「ポリコーム群 Ring1A/B によるヒストン H2A ユビキチン化の ES 細胞における局在と役割」第 6 回エピジェネティクス研究会（東京一ツ橋学術総合センター）2012 年 5 月 14 日～15 日

8) 遠藤充浩、遠藤高帆、磯野協一、古関明彦 「ユビキチン化ヒストン H2A の ES 細胞における局在と役割」第 5 回エピジェネティクス研究会（KKR ホテル熊本）2011 年 5 月 19 日～20 日

9) 遠藤充浩、遠藤高帆、古関明彦 「ポリコーム群は転写因子の抑制を介して栄養芽幹細胞の分化を促進する」第 43 回日本発

物学会（京都国際会議場）2010 年 6 月 20 日～23 日

10) 遠藤充浩、遠藤高帆、古関明彦 「ポリコーム群とコアな転写因子のクロストークによる栄養芽幹細胞の分化制御」第 4 回日本エピジェネティクス研究会（米子市文化ホール）2010 年 5 月 28 日～29 日

11) Endoh M, Endo TA, and Koseki H. “Polycomb temporally regulates trophoblast development by promoting stem cell differentiation” 第 8 回幹細胞シンポジウム（淡路夢舞台国際会議場）2010 年 5 月 13 日-15 日

12) 遠藤充浩、遠藤高帆、古関明彦 「ポリコーム群 Ring1A/B によるヒストン修飾を介した幹細胞制御」第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会（東京一ツ橋学術総合センター）2009 年 5 月 22 日-23 日

〔図書〕（計 1 件）

遠藤充浩、古関明彦
ヒストン H2A のユビキチン化による遺伝子発現の制御
生体の科学 60 巻, 533-540, 2009 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 充浩 (ENDO MITSUHIRO)

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

研究者番号：4 0 3 9 1 8 8 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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・グループリーダー

研究者番号：4 0 2 2 5 4 4 6