

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25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：2010～2012

課題番号：22590278

研究課題名（和文）哺乳類ポリコーム群による安定的遺伝子抑制に必要な遺伝子座記憶機能に関する研究

研究課題名（英文）Recruitment of Polycomb-group complex for stable repressions

研究代表者

磯野 協一（ISONO KYOICHI）

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・上級研究員

研究者番号：90323435

研究成果の概要（和文）：細胞分裂を超えたポリコーム群複合体(PRC1)による遺伝子座記憶を理解するためにイメージング手法を用いた。H3K27me3 化酵素 Ezh2 の誘導欠損実験から H3K27me3 は PRC1 の主要リクルーターでないことが示唆された。過去の FRAP 解析は約 20% の PRC1 分子がクロマチン固定であることを示していた。この固定画分が分裂期を超えて残り、記憶タグとなっている可能性があると考え、その検証に着手した。

研究成果の概要（英文）：To better understand recruitment mechanisms of PRC1, we focused on subnuclear domains consisting of PRC1. To data H3K27me3 is known to be one of factors for PRC1 recruitment. Conditional deletion experiments of Ezh2 however did not support that H3K27me3 was a critical recruiter of PRC1. On the other hand, FRAP analysis showed that about 20% of PRC1 component was immobile on chromatin, implying that such an immobile fraction becomes a memory tag of PRC1 beyond cell division. We thus have been addressing this hypothesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：ポリコーム，発現制御

1. 研究開始当初の背景

クロマチン作用因子であるポリコーム群は様々な分化制御・増殖制御遺伝子を抑制状態に固定することで細胞の運命決定に貢献している。ヒト培養細胞の免疫染色実験はポリコーム群の分裂期染色体からの解離を示していた。この結果は分裂期後にポリコーム群が標的遺伝子座上に舞い戻り、抑制状態を維持しつづけることを示している。しかしな

がら、ポリコーム群の遺伝子座記憶の仕組みは十分に理解されていなかった。

2. 研究の目的

ポリコーム群の遺伝子座記憶（リクルートメント）は抑制機能の上流にあり、ポリコーム群にとって極めて重要な機能である。したがって、本研究は本質的なポリコーム群記憶タグの同定を目的とした。

3. 研究の方法

これまでの我々のマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた研究からポリコーム群複合体 PRC1 から構成される核内構造体 (PRC1 body) は標的遺伝子座上に一致することが示されていた (図 1). したがって, PRC1 body をポリコーム群リクルートメントの判断基準とし, いくつかの条件で細胞イメージングをおこなった. 細胞材料として, 野生型 MEF 以外に PRC1 遺伝子 *Me118* に GFP 遺伝子がノックインされたマウス (*Me118gfp/gfp*) 由来の MEF も利用した.

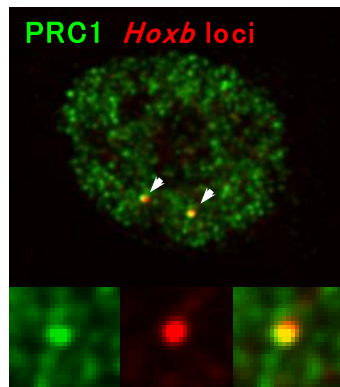


図1 *Me118gfp/gfp*マウス由来MEFにおけるPRC1の核内局在 (Immuno-DNA-FISH実験). GFP抗体によって検出された核内Mel18-GFPは多数の微小斑点構造体 (PRC1 body) を形成する (緑). 任意の PRC1 body (矢じり) はポリコーム群標的Hoxbゲノム領域 (赤) に一致する (1つの拡大で表示). *

4. 研究成果

(1) PRC1 成分 Cbx ファミリーは H3K27me3 と結合可能なクロモドメインを持っている. したがって, クロモドメインによる H3K27me3 認識が PRC1 リクルートに必要であると信じられている. その検証のために, H3K27me3 化酵素 Ezh2 のコンディショナル欠損マウスを作製し, 最終的に *ERT2Cre; Ezh2fl/fl* マウス由来の MEF を樹立した. タモキシフェン添加 72 時間後に免疫染色により PRC1 body を確認した. 添加細胞での H3K27me3 シグナルは著しく減少していたが, PRC1 body は未添加と同程度のシグナル強度を維持していた (図 2). この結果は少なくとも PRC1 body 形成には H3K27me3 は重要でないことを示しており, PRC1 リクルートメントを再考させる重要証拠となった. 残念ながら, 本実験では H3K27me3 消失後に細胞周期がまわったかを証明できていないので, PRC1 の遺伝子記憶については考察できない. 誘導後の細胞増殖は確認しているもののその事象は直接的ではない. 最近, H3K9 アセチルやメチルのライブイメージングの成功を耳にしているので, H3K27me3 のライブイメージングが可能になった時, *ERT2Cre; Ezh2fl/fl; Me118gfp/gfp*

MEF (作成済み) と合わせることで遺伝子記憶と H3K27me3 との関係を示したいと思う.

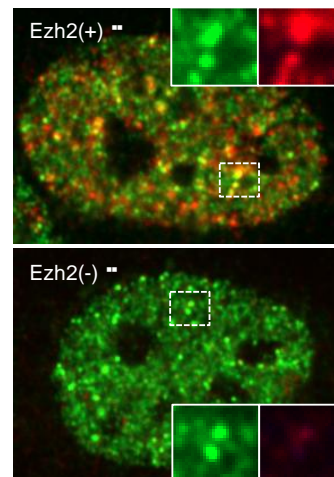


図2 Ezh2遺伝子欠損によるH3K27me3減少と安定なPRC1 body.

Ezh2触媒によるH3K27me3 (赤)とPRC1 body (緑)のシグナルは重なり合う (写真). タモキシフェン添加によりEzh2遺伝子を欠失させるとH3K27me3シグナルは著しく低下するが, PRC1 bodyは安定に存在している (下写真). 点線で囲まれた領域は拡大表示されている.

(2) 上記の結果を考慮すると, PRC1 リクルートメントは H3K27me3 だけで説明できるものではなく, もっと別の要因も絡んでいると考えるべきである. すでに我々は不活性化 X 染色体上の *Me118-GFP* 分子は絶えず分子交換する画分 (>70%) と非交換的な画分 (~20%) とに分かれることを示していた. この結果に立ち返り, 非交換的な画分は分裂期染色体からも離れることなく標的遺伝子座の記憶タグとして残るという作業仮説を立てた. その証明のために Cyan-to-green photoconvertible fluorescent protein (PS-CFP2) の利用を考えた. PS-CFP2 は通常は青色であるが, 405nm レーザー照射により緑色へと不可逆的に変換する. PS-CFP2 により青色を呈している PRC1 body に 405nm 照射すると緑色に変換するが, ほとんどはすぐに分子交換され元の青色へと戻る. しかしながら, 非交換的な画分は緑色のまま残る. もし分裂期染色体で緑色のスポットが観察されれば我々の仮説を支持するものとなる. 現在, PRC1 成分 *Ring1b-PS-CFP2* ノックインマウスを作製したところである. MEF の PRC1 body は小さすぎてそれを対象にするのは困難が予想される. まずは雌型 3.5 日胚の不活性化 X 染色体で検証してみたいと思う.

(3) 多くの転写制御因子において DNA 配列は重要なリクルートメント要素であるが, 哺乳類ポリコーム群が好む特異的 DNA 配列は未だに同定されていない. その一方で, 驚くべきことに, いくつかの Cbx ファミリーのクロモドメインは非特異的 DNA および RNA 結合活

性を持っていることが数年前に報告された。そこで直接的な DNA/RNA 結合も PRC1 リクルートメントの重要要因であると推測した。しかし、一連の解析の中でクロモドメインの DNA/RNA 結合能と H3K27me3 結合活性を区別するのは難しいと考えた。Cbx2 クロモドメインは DNA/RNA 結合活性を有しないが、そのすぐ下流に DNA 結合モチーフとして知られている AT-hook を持つ。もし AT-hook が DNA 結合活性を持っていれば、H3K27me3 認識活性と区別可能である。したがって、本研究の追加プロジェクトとして Cbx2 AT-hook を調査した。

まず Cbx2 AT-hook の核酸結合活性をゲルシフトアッセイによって調べたところ、確かにそれは DNA および RNA に非特異的結合することがわかった。ついで、核酸結合性を失った AT-hook 点変異型はクロモドメインによる H3K27me3 結合を正常に保っていることを確認した。リクルートメントへの貢献を的確に調査するために、Cbx2 AT-hook 点変異ノックインマウスを作製した。期待通りにそのノックインマウスはポリコム群変異と同様の体幹形成異常を示したことから、AT-hook は機能的であることがわかった。体幹形成異常はマウス胚前方部でのポリコム群標的ホメオティック (*Hox*) 遺伝子の脱抑制によるものである。そこでマウス胚頭部から MEF を作成し、*Hox* 遺伝子領域上の PRC1 body を Immuno-DNA-FISH 法により調査した。期待に反して、AT-hook 点変異型 MEF の *Hox* ゲノム領域上で PRC1 body は正常に形成されていた。すなわち Cbx2 AT-hook は PRC1 リクルートメントおよび PRC1 body 形成に重要でないという結果となった。しかし同様にこの結果は新しい機能的側面を提示している。それはポリコム群抑制機能の階層性である。遺伝子抑制を発揮するにはポリコム群が標的遺伝子にリクルートされるだけでは不十分であり、その後には何かする必要がある。その何かを Cbx2 AT-hook が担っていると示唆される。この事象は記憶メカニズムとは離れているが、今後追求すべき重要課題である。

(4) 総括すると、本研究期間内ではポリコム群の本質的記憶タグを同定することはできなかった。しかし、これまで広く信じられている H3K27me3 が絶対的なリクルーターでないことを提示できたことはポジティブな成果である。可能ならば H3K27me3 の代替を示すことで 1 つの論文に仕上げたいと思っているが、例えば (2) 案、難しいと判断したときは、H3K27me3 の役割でまとめたいと思う。

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 3 件)

- ① 磯野協一, ポリコム群による遺伝子抑制とエピジェネティック治療への貢献, 遺伝子医学 MOOK, 査読なし, 25 号, 2013 (印刷中)
- ② Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K et al., Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. PLoS Genet, 査読あり, 8, e1002774, 2012. (doi:10.1371/journal.pgen.1002774)
- ③ Li X, Isono K et al., 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, 査読あり, 31, 351-364, 2011.

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. 磯野協一, 遺伝子サイレンシングにおけるポリコム群 Phc2 リン酸化の役割, 日本分子生物学会, 2012 年 12 月 14 日, 博多
2. 磯野協一, Gene silencing by the in vivo dynamics of Polycomb repressive complex PRC1, Mouse Molecular Genetics Conference, 4 Oct 2012, Pacific Grove, USA
3. 磯野協一, Roles of Phc2 polymerization in Polycomb repressive functions, International Society for Stem Cell Research, 2012 年 6 月 15 日, 横浜
4. 磯野協一, Gene silencing by the dynamics of Polycomb-group protein complexes, 日本発生物学会, 2011 年 5 月 19 日, 沖縄
5. 磯野協一, Mechanisms of repressive chromatin condensations by Polycomb-group proteins, 日本分子生物学会, 2010 年 12 月 8, 9 日, 神戸
6. 磯野協一, 生細胞イメージングに最も適した材料はマウス遺伝子工学によって得られる, 日本遺伝学会, 2010 年 9 月 22 日, 札幌
7. 磯野協一, Gene silencing by an intrinsic inter-assembly of Polycomb-group protein complexes, Cold Spring Harbor Asia Conference, 18 May 2010, Suzhou, China

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野 協一 (ISONO KYOICHI)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・上級研究員

研究者番号：90323435

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：