

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249015

研究課題名(和文)ポリコム群抑制クロマチン形成における CpG 配列認識の意義の解明

研究課題名(英文)The role of CpG dinucleotides to generate PcG-repressive genomic domains

研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI, HARUHIKO)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：40225446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円

研究成果の概要(和文)：CpGアイランド(CGI)は、エピジェネティック制御のためのプラットフォームとなっている可能性がある。本研究では、CGIがどのように認識されて抑制クロマチンを樹立するのか、CpG配列のメチル化状態を読み取りうる構造であるCXXCモチーフとSRAドメインに焦点を絞った解析を開始した。特に、SRAタンパクであるNP95/UHRF1に焦点を絞った解析により、CpG配列のヘミメチル化にはヒストンH3K9のメチル化状態を制御する役割があることを新たに実証した。この機能により、胎盤での内因性レトロトランスポゾンの活性化が引き起こされていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Here, we reveal that protracted binding of NP95 to hemimethylated sites has an unexpected role for disrupting transcriptional silencing of CpG-rich proviral sequences in the mouse genome. Exploiting conditional deletions of Dnmt1 and Np95, we show that in Dnmt1-ablated cells undergoing passive demethylation, NP95 is required for activation of endogenous retrotransposons (ERVs), while, in Np95-ablated cells, the same ERVs remain silenced, despite acute demethylation. Furthermore, we demonstrate that in the absence of NP95, the H3K9 methyltransferase SETDB1 maintains ERV silencing, while in the absence of DNMT1, prolonged binding of NP95 to hemimethylated DNA disrupts SETDB1-dependent deposition of H3K9me3. Taken together, our observations reveal that the fidelity of histone methylation-dependent proviral silencing is dependent upon timely maintenance DNA methylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ポリコム群 CpG配列 クロマチン エピジェネティクス マウス

## 1. 研究開始当初の背景

### ポリコム群標的遺伝子の特徴

ポリコム群は、エピジェネティック制御の一翼を担う遺伝子群であり、多細胞生物に広く保存されている。ポリコム群が媒介する生化学的な過程は、①ヒストン H3K27 トリメチル化 (H3K27me3)、②クロモドメインを介したそれらの認識、③ヒストン H2AK119 モノユビキチン化などであり、この過程を介して抑制性のクロマチンドメインを樹立する。哺乳類においてポリコム群は、Hox 遺伝子群の抑制を介した前後軸形成、Ink4a 遺伝子座の抑制を介した細胞老化制御、様々な転写因子の抑制を介した幹細胞の維持に寄与することが、我々を含むいくつかのグループの研究から明らかになってきた。一方、ES 細胞を用いたゲノムワイドなクロマチン免疫沈降実験により、ポリコム群の標的遺伝子群の特徴が明らかになってきた。特に、我々はモノユビキチン化したヒストン H2AK119 (以下、uH2A) のゲノムワイドな分布を解析することにより、ES 細胞における中核的なポリコム群の標的遺伝子群を初めて明らかにした (古関、遠藤・投稿中)。ポリコム群標的遺伝子の特徴は、①発生や分化に重要な役割を果たす転写制御因子である、②1 kb 以上の長い CpG アイランドを転写開始点 (以下、TSS) 前後に伴っている、③低 DNA メチル化状態を維持していることである。

### エピジェネティック制御のプラットフォームとしての CpG アイランド

CpG 配列は、温血脊椎動物では、TSS 付近に偏在し、CpG アイランド (以下、CGI) を構築する。これは、ゲノム領域全体に CpG 配列が平均的に分布するショウジョウバエ等の無脊椎動物とは強い対象をなす。特に、ヒト、マウスなどの哺乳類では、約半数のプロモーター領域は CGI と重なっている。面白いことに、CGI の長さはその遺伝子の機能とリンク

する。1 kb 以上の長い CGI を持つ遺伝子群には、発生・分化に寄与する転写制御因子やクロマチン因子が有意に多く含まれる一方、1 kb 未満の短い CGI を持つ遺伝子群には、ストレスや環境刺激への応答に寄与する遺伝子群が多く含まれ、それらは刺激によって急激に誘導される傾向がある (Sharif et al. 2010, 図 1)。これらは、CGI には、進化的に保存された一定の機能が賦与されているという可能性を示す。その一方、CGI+遺伝子群は様々なクロマチン状態をとりうるということが知られる。たとえば、ES 細胞における CGI は、①ヌクレオソームを構成しづらい、②転写因子 Sp 1 の結合、③低 DNA メチル化、④H3K4 メチル化 (H3K4me2/3) の亢進を一般的特徴とする。にもかかわらず、前述のように、1 kb 以上の CGI+遺伝子群は、ES 細胞においては例外なくポリコム群の標的となり、DNA メチル化がほとんどおこらないのに対し、1 kb 未満の CGI+遺伝子群には、uH2A の結合はほとんどおこらず、軽度の DNA メチル化を受けているものを多く含む。また、細胞がん化に伴い、CGI+遺伝子群の DNA メチル化レベルは一樣に亢進することも示されている。

すなわち、CGI には進化的に保存された機能があるものの、CGI であることが単一の分子メカニズムとのリンクを反映するわけではないことが推論される。CGI が、細胞の状況に応じて、ランダムではないもののいくつかのクロマチン状態をとりうるという状況は、CGI はいくつかのエピジェネティック制御のためのプラットフォームとして作用する可能性を示す。その長さ、DNA メチル化状態、細胞種 (転写制御因子群の発現状態)、おそらくその他の複合的要因によって、そのクロマチン状況が決定されるのかも知れない。

### CpG アイランドを認識する分子メカニズム

この仮説のひとつの裏付けとして、CpG 配列を、そのメチル化状態に応じて認識するの構

造が存在することが今まで生化学的に明らかにされてきた。MBD ドメイン、SRA ドメイン、CXXC モチーフは、それぞれフルメチル化、ヘミメチル化、あるいは、メチル化されていない CpG 配列を一定の特異性を持って認識する。これらの一次構造を有するタンパク群はそれぞれ複数存在し（図 2）、エピジェネティック制御に強い影響を与えうることが、我々を含むいくつかのグループによるノックアウト解析から明らかになってきている。たとえば、Np95/Uhrf1 は、複製によって生じるヘミメチル化 CpG を認識し、そこに維持メチレーズである Dnmt1 をリクルートしてフルメチルへと変換しヘテロクロマチンの維持に寄与する (Sharif et al., 2007)。また、我々は今までに MBD1 と Np95/Uhrf1 をポリコム群結合因子として同定し、ポリコム群の機能に一定のインパクトを与えうることが明らかにした (古関・未発表)。これらの実験事実は、CGI の長さやメチル化状態の認識が、その領域におけるエピジェネティック制御の選択性に寄与するという仮説を支持する。

## 2. 研究の目的

CpG アイランド (CGI) は、哺乳類では、転写開始点付近に集中的に局在している。ES 細胞を用いたゲノムワイド解析から、1 kb 以上の長い CGI は DNA メチル化を受けづらく、エピジェネティック制御因子のひとつであるポリコム群による制御を受け易い一方、短い CGI (特に 0,5kb 以下) は軽度の DNA メチル化を受け、メチル化依存的な制御を受ける。これらの観察は、CGI がエピジェネティック制御のためのプラットフォームとなっていること、そして、その長さや DNA メチル化状態がエピジェネティック制御の選択性を決定する因子となっている可能性を示している。本研究では、CGI がどのように認識されてポリコム群による抑制クロマチンを樹立するのか、CpG 配列のメチル化状態を読み取り

る構造である CXXC モチーフと SRA ドメインの役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

CXXC モチーフあるいは SRA ドメインを有する全ての遺伝子について、薬剤誘導的にノックアウトしうるコンディショナル変異アリルを持った ES 細胞を作製する。最初に、それぞれの変異 ES 細胞を用いて、各遺伝子産物のポリコム群のクロマチン結合、及び、DNA メチル化へのインパクトをゲノムワイドに解析し、ポリコム群結合と DNA メチル化のバランスを制御する候補タンパクの抽出を行う。その後、候補遺伝子産物が、CpG 配列の認識を介して作用するのか、また、どのような核内複合体を構成して作用するのかを明らかにし、CpG 配列認識のメカニズムを明らかにする。

CXXC モチーフを有するタンパク群は、機能的に少なくとも 4 クラスに分別されうる (図 2)。①ヒストン脱メチル化活性とリンクするグループ (Jhdm1b/Cxxx2、Kdm2a/Cxxc8)、②ヒストンメチル化活性とリンクするグループ (Mll4/Wbp7、Mll1/Cxxc7、Cfp1/Cxxc1)、③DNA メチル化とリンクするグループ (Mbd1/Cxxc3、Dnmt1/Cxxc9)、及び、④既知の生化学的活性とはリンクしないグループ (Cxxc5、Cxxc4、Fbx119) が、データベースから抽出される。一方、SRA ドメインを有するタンパク群は、相互に類似性の高い Np95/Uhrf1 と Np97/Uhrf2 が存在する。

本研究では、これらの CXXC 及び SRA 因子群が、ポリコム群の標的へのリクルートメント、DNA メチル化にどのように影響するか、さらには、どのように転写制御に寄与するのかを、それぞれの変異 ES 細胞、あるいは、複合変異 ES 細胞を用いて明らかにする。また、影響が見られた場合には、その生化学的なメカニズムの解明を試みる。

現在までに、前述の CXXC モチーフあるいは SRA ドメインを有する全ての遺伝子について、コンディショナル変異アリルを持った ES 細胞の作製を終了し、そのうち 8 遺伝子については生殖細胞系列への変異の導入を確認している。現在、それぞれの変異をホモ接合体にすると同時に、タモキシフェン依存的に活性化する CRE リコンビナーゼ (ERT2-CRE) を発現するトランスジーンを導入を行うための交配を行っている。それぞれの Flox アリルをホモに有し、ERT2-CRE を持つ胚盤胞より ES 細胞を樹立し、第 1 ラウンドの実験を行う。

#### 4. 研究成果

##### ① KDM2B

CXXC タンパクである KDM2B 機能発現メカニズムを ES 細胞をモデルとして明らかにした。KDM2B は、PRC 1 のバリエーションである PCGF1-PRC1 複合体に含まれていることが明らかになり、ポリコム群による転写抑制メカニズムの一部となっていることを明らかにした。従来ポリコム群による転写抑制は、ヒストン H3K27 トリメチル化→カノニカル PRC 1 という経路を介したクロマチンの凝縮やヒストン H2A モノユビキチン化によって媒介されると考えられてきた。新たに見出された Kdm2B 複合体に強いヒストン H2A モノユビキチン化活性を見出し、さらに、遺伝学的に Kdm2B 複合体が、ヒストン H3K27 トリメチル化→カノニカル PRC 1 という経路の上流にあることを見出した。これにより、ポリコム群による転写抑制は、ヒストン H2A モノユビキチン化→ヒストン H3K27 トリメチル化→カノニカル PRC 1 による凝縮という経路によることを、ふたつの異なる実験系を用いて新たに示した。また、ES 細胞から胚様体への分化過程において、発現が誘導的に抑制される遺伝子において KDM2B やそれと複合体を形成する PCGF1 が必要であることを示した。また、

その過程はポリコム群複合体のリクルートメントを介するものであることを明らかにした。

##### ② CXXC1

CXXC モチーフをコードする *Cxxc1* はエンハンサー領域とプロモーター領域に結合する。すでに活性化された遺伝子においては、プロモーターに結合し、Set1 複合体の一部として H3K4 メチル化維持に必須であることが示された。一方、ES 細胞における転写抑制を受けているバイバレントな遺伝子群においては、むしろエンハンサー領域に集積する傾向が観察され、そこではむしろ転写に対し抑制的に作用することが示された。また、また、*Cxxc1* を強制的に、遺伝子砂漠領域に結合させるとその領域で転写が誘導されることが示された。以上の結果は、*Cxxc1* の機能のひとつはエンハンサーとプロモーターの機能をリンクする可能性が示されてきた。

##### ③ NP95/UHRF1

NP95/UHRF1 は、CpG 配列のヘミメチル化に SRA ドメインを介して結合する。*Dnmt1* および *Np95* のノックアウトマウスや ES 細胞を作製し、IAP の転写抑制における DNA メチル化因子の役割を解析した。*Dnmt1* ノックアウトマウスおよび ES 細胞では、既報されているように、IAP が劇的に転写されるが、*Dnmt1* ノックアウトと同様に、DNA メチル化が低下する *Np95* ノックアウトでは、IAP の転写の上昇は見られなかった。さらに、*Dnmt1* および *Np95* の両因子ともをノックアウトしたマウスおよび ES 細胞でも、IAP の転写活性化がみられなかったことから、IAP の転写活性化は DNA 脱メチル化に依存しないと考えられ、さらに、NP95 が IAP の転写に何らかの役割を持っていることが示唆された。*Dnmt1* ノックアウトマウス細胞では DNA メチル化が破綻するため、遅延性のヘミメチル DNA が出現し、こ

のような遅延性のヘミメチル DNA に NP95 が “通常よりも長く結合する” ことにより、下流の H3K9me3 の蓄積が阻害されることを見出した。ヒストンメチル化酵素の SETDB1 は、IAP を含む ERV 領域への H3K9me3 蓄積を媒介するが、*Np95* ノックアウト ES 細胞では、この「SETDB1-H3K9me3 経路」によって IAP の転写が抑制されることを明らかにした。すなわち、NP95 と SETDB1 との間に阻害的な関係が存在することが考えられた。

マウスの体細胞や胎児では、IAP を含む ERV 配列が DNA メチル化や H3K9me3 化などの複数のエピジェネティック機構によって転写抑制されていることが、過去の研究から明らかになっている。ERV の転写はゲノムの安定性に悪影響を及ぼすため、DNA メチル化や H3K9me3 などの修飾は細胞防御システムの一環として、ERV の転写を抑制すると考えられている。一方、胎盤などの胚体外組織では IAP が高いレベルで転写される。この過程に、今回明らかにした制御が寄与している可能性を示した。

## 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 13 件)

1. Amouroux R, 他 14 名 13 番目. De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat Cell Biol.* 2016. 18, 225-33. doi: 10.1038/ncb3296. 査読有
2. Yakushiji-Kaminatsui N, 他 7 名 8 番目. RING1 proteins contribute to early proximal-distal specification of the forelimb bud by restricting Meis2 expression. *Development.* 2016. 143, 276-85. doi: 10.1242/dev.127506.

査読有

3. Chiacchiera F, 他 8 名 8 番目. Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/ $\beta$ -Catenin Transcriptional Activity. *Cell Stem Cell.* 2016. 18, 91-103. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.019. 査読有
4. Calés C, 他 7 名 7 番目. Role of Polycomb RYBP in Maintaining the B-1-to-B-2 B-Cell Lineage Switch in Adult Hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2015. 36, 900-12. doi: 10.1128/MCB.00869-15. 査読有
5. Schoenfelder S, 他 21 名 19 番目. Polycomb repressive complex PRC1 spatially constrains the mouse embryonic stem cell genome. *Nat Genet.* 2015. 47, 1179-86. doi: 10.1038/ng.3393. 査読有
6. Blackledge NP, 他 16 名 16 番目. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell.* 2014. 157, 1445-59. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.004. 査読有
7. Obata Y, 他 21 名 21 番目. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2014. 15, 571-9. doi: 10.1038/ni.2886. 査読有
8. Kondo T, 他 6 名 7 番目. Polycomb potentiates meis2 activation in midbrain by mediating interaction of the promoter with a tissue-specific enhancer. *Dev Cell.* 2014. 28, 94-101. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.021. 査読有

9. Nishiyama A, 他 11 名 11 番目. Uhrfl-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature*. 2013. 502, 249-253. doi: 10.1038/nature12488. 査読有
10. Isono K, 他 9 名 10 番目. SAM Domain Polymerization Links Subnuclear Clustering of PRC1 to Gene Silencing. *Dev Cell*. 2013. 26, 565-577. doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.016. 査読有
11. Endoh M, 他 12 名 13 番目. Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLoS Genet*. 2012. 8, e1002774 doi: 10.1371/journal.pgen.1002774. 査読有
12. Hisada K, 他 7 名 7 番目. RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2012. 32, 1139-49. doi: 10.1128/MCB.06441-11. 査読有
13. Takada Y, 他 14 名 15 番目. HP1 $\gamma$  links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development*. 2011. 138, 4207-17. doi: 10.1242/dev.064444. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Koseki H. Activation of polycomb-repressed genes. Seminar at Ecole polytechnique federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland. January 27, 2014.

2. Koseki H. Activation of polycomb-repressed genes. The 42nd Annual meeting of Japanese Society for Immunology, Makuhari Messe, Chiba, Chiba, Japan. December 11, 2013.
3. Koseki H. DNA methylation in T cells and gut immune homeostasis. 3rd McGill-RIKEN Workshop, Montreal, Canada. June 21, 2013.
4. Koseki H. Polycomb potentiates Meis2 activation in midbrain by mediating precursory interaction of promoter with tissue-specific enhancer. Seminar at A\*STAR Institute of Medical Biology, Singapore, Republic of Singapore. February 13, 2013.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.riken.jp/research/labs/ims/dev\\_genet/](http://www.riken.jp/research/labs/ims/dev_genet/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI, Haruhiko)

国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター グループディレクター

研究者番号: 40225446

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし