

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06942

研究課題名(和文)ポリコーム複合体PRC2の使い分けによって可能となるエピゲノムパターン

研究課題名(英文)Epigenomic landscapes governed by distinct PRC2s

研究代表者

長尾 恒治(Nagao, Koji)

大阪大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60426575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコーム群複合体PRC2は、ヒストンH3の27番目のリジンをメチル化することで、発生・分化の過程で決定される遺伝子発現パターンの確立・維持を行う。しかし多種多様な遺伝子領域を見分けて制御するのか、また他のクロマチン制御因子とどのように協調しているのかなど、PRC2がどのように制御されているかの詳細な分子メカニズムはまだよくわかっていない。本研究では、昆虫細胞を用いた再構成系によりPRC2構成因子間の分子的相互作用の実体を明らかに、どのようにPRC2複合体が形成されるのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polycomb repressive complex 2 (PRC2) play a key role in silencing developmentally regulated genes to establish and maintain facultative heterochromatin. The core PRC2 complex comprises four components (EZH1/2, SUZ12, EED and RBBP4/7) and methylates histone H3 at Lys 27 through its enzymatic subunit EZH1/2. In addition, five regulatory components have been identified in mammalian PRC2. However, how mammalian PRC2 regulates various genomic sites and collaborates with other chromatin modulators remains unclear. Reconstitution of PRC2 in Sf9 insect cells using intact or truncated components resulted in subunit organization of PRC2.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞種に特異的な遺伝子の発現パターンは、ヒストン修飾などによるエピゲノムパターンを基軸として作り出されるクロマチン構造によって決定・維持されている。このエピゲノムパターンは、修飾それぞれがどのような制御を受ける酵素によって書き込まれ、消去され、維持され、または読み取られているのかを知らなければ、本来の意味を読み解くことはできない。ヒストン修飾を担う酵素のうち、ポリコーム群複合体 PRC2 は、ヒストン H3 の 27 番目のリジンをメチル化 (H3K27me) し、遺伝子発現が抑制されるヘテロクロマチンの確立、維持をおこなっている。PRC2 による発現抑制の代表例には、X 染色体の不活性化や、HOX 遺伝子群の制御が知られている。しかし、PRC2 がどのように多種多様な遺伝子領域を見分けて制御するのか、また他のクロマチン制御因子とどのように協調しているのかなど、PRC2 制御の分子メカニズムの詳細については、依然不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

先行して遂行した若手研究 B では、免疫沈降と質量分析器を組み合わせたプロテオミクス解析を、既知の全 PRC2 構成因子をベイトとして行い、PRC2 と相互作用する因子を網羅的に同定した。その結果、新規構成因子 SUZBP1, SUZBP2 を同定し、さらに PRC2 には構成因子の組み合わせが異なるいくつかのサブタイプがあることを見いだした。この知見を基に、どのような分子メカニズムで異なるサブタイプの PRC2 が形成されるのか、またそれぞれの PRC2 の機能はどのようなものであるかを、PRC2 構成因子の機能解析を通して明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

バキュロウイルスと昆虫細胞を用いた発現系を用いることで、任意の組み合わせでヒト PRC2 構成因子を大量発現させ再構成するこ

とのできる系を構築する。この時、発現する因子すべてには His タグを、そのうち一つだけにさらに FLAG タグを付加しておき、昆虫細胞抽出液から FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、His タグ抗体、各構成因子に対する抗体を用いて検出することで、発現させた PRC2 構成因子間の結合状態を評価する。

また PRC2 サブタイプを特徴づける構成因子について特異的抗体を用いた ChIP-seq 解析を行うことでヒト細胞における PRC2 サブタイプそれぞれのゲノム上での結合位置を決定する。

## 4. 研究成果

まず PRC2 の酵素活性に必要なコア構成因子 4 種を昆虫細胞内で再構成し、そこから精製した PRC2 がヒストン H3K27 をメチル化する活性を有していることを確認した。またコア構成因子の中から 2 つずつを発現させ、それぞれの間の直接的な結合の有無を調べたところ、既知の知見と一致した。これらのことから、構築した昆虫細胞による再構成系が機能していることがわかり、網羅的に各構成因子間の相互作用を調べることができるようになった。

PRC2 サブタイプを特徴づける構成因子が、PRC2 コア構成因子にどのように結合しているかを、それぞれを 1 対 1 で発現させ上記の系を用いて解析したところ、サブタイプ特異的因子はすべてコア構成因子の単一の因子に結合することが明らかとなり、PRC2 にはプラットフォームとなる因子が存在することがわかった。サブタイプ特異的因子間の協調性、排他性はヒト細胞内で見られていた結果と一致した。

サブタイプ特異的因子間の排他性がどのように起こっているのかを明らかにするため、プラットフォームとなるコア因子や、サブタイプ特異的因子について、一部の領域だけを持つ部分欠損変異型を作成し、それぞれの結合に必要な最小領域を決定した。この知見に基づき、さまざまな点変異を導入した構成因子を作成し、ヒト細胞内でどのような PRC2 が形成されるか調べたところ、プラッ

トフォーム内のアミノ酸残基には、ある種の特異的構成因子との結合に必要であるものといずれの特異的構成因子との結合に必要であるものがあることがわかり、PRC2 サブタイプが構成される分子メカニズムが明らかとなった。

PRC2 のヒト細胞におけるゲノム上での ChIP-seq 法の条件検討を行った。ChIP 法の超音波処理によるクロマチン断片化に対して不安定な因子が存在したが、超音波処理の代わりに DNA を断片化する酵素で処理することで、標的となる因子を安定に ChIP 条件下で精製する手法を確立した。

#### 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 9 件)

1. Isobe S.Y., Nagao K., Nozaki N., Kimura H., and Obuse C. (2017) Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. **Cell Rep.** 20, 297-307. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.056. 査読有り

\*Contributed equally

2. Sakata Y.\*, Nagao K.\*, Hoki Y., Sasaki H., Obuse C., and Sado T. (2017) Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast. **Development** 144, 2784-2797. doi: 10.1242/dev.149138. 査読有り
3. Takahashi A., Okada R., Nagao K., Kawamata Y., Hanyu A., Yoshimoto S., Takasugi M., Watanabe S., Kanemaki M. T., Obuse C., and Hara E. (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. **Nat. Comm.** 8, 15287. doi: 10.1038/ncomms15287. 査読有り

4. Iwamoto M., Osakada H., Mori C., Fukuda Y., Nagao K., Obuse C., Hiraoka Y., and Haraguchi T. (2017) Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in ciliate Tetrahymena. **J Cell Sci.** 130, 1822-1834 doi: 10.1242/jcs.199398. 査読有り
5. Yamaguchi L., Nishiyama A., Misaki T., Johmura Y., Ueda J., Arita K., Nagao K., Obuse C., and Nakanishi M. (2017) Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. **Sci Rep.** 7, 55. doi: 10.1038/s41598-017-00136-5. 査読有り
6. Inoue H., Sugimoto S., Takeshita Y., Takeuchi M., Hatanaka M., Nagao K., Hayashi T., Kokubu A., Yanagida M., and Kanoh J. (2017) CK2 phospho-independent assembly of the Tel2-associated stress signaling complexes in *S. pombe*. **Genes Cells** 22, 59-70 doi: 10.1111/gtc.12454. 査読有り
7. Suzuki S., Kato H., Suzuki Y., Chikashige Y., Hiraoka Y., Kimura H., Nagao K., Obuse C., Takahata S., and Murakami Y. (2016) Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. **Nucleic Acids Res.** 44, 4147-4162. doi: 10.1093/nar/gkw008. 査読有り
8. Kaimori J. Y., Maehara K., Hayashi-Takanaka Y., Harada A., Fukuda M., Yamamoto S., Ichimaru N., Umehara T., Yokoyama S.,

Matsuda R., Ikura T., Nagao K., Obuse C., Nozaki N., Takahara S., Takao T., Ohkawa Y., Kimura H., and Isaka Y. (2016) Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. **Sci Rep.** 6, 24318. doi: 10.1038/srep24318. 査読有り

9. Hamanaka K., Goto K., Arai M., Nagao K., Obuse C., Noguchi S., Hayashi Y. K., Mitsuhashi S., and Nishino I. (2016) Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with SMCHD1 mutations. **Neuromuscul Disord.** 26, 300-308. doi: 10.1016/j.nmd.2016.03.001. 査読有り

[学会発表](計 9 件)

1. 長尾恒治 「Smchd1-Hbix1 依存的な不活性化 X 染色体の区画化」**2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)** 2017 年
2. 長尾恒治 「Smchd1-Hbix1 依存的な不活性化 X 染色体の区画化」**第 5 回 X 染色体研究会** 2017 年
3. 長尾恒治 「アリル特異的 ChIP/RNA-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体のクロマチン動態の解析」**第 39 回日本分子生物学会年会** 2016 年
4. 長尾恒治 「ChIP-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体のクロマチン動態の解析」**新学術領域「クロマチン動構造」若手ワークショップ** 2016 年
5. 長尾恒治 「次世代シーケンサーを使った X 染色体のアリル特異的な解析」**第 4 回 X 染色体研究会** 2016 年

6. 長尾恒治 「アリル特異的 ChIP-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体のクロマチン動態の解析」**第 1 回北大・部局横断シンポジウム「生体防御 システムとその破綻」** 2016 年

7. 長尾恒治 「アリル特異的 ChIP-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体のクロマチン動態の解析」**第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会** 2015 年

8. 長尾恒治 「質量分析器と次世代シーケンサーを駆使したクロマチン研究」**日本内分泌学会 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー** 2015 年 招待講演

9. 長尾恒治 「Evolutionary conserved chromatin states of the inactive X chromosome between human and mouse」**第 40 回内藤コンファレンス** 2015 年

[その他]

研究成果データベース

<https://scholar.google.com/citations?user=ZQM6UbsAAAAJ&hl=en>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長尾恒治 (NAGAO, Koji)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60426575

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし