

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07372

研究課題名(和文)ポリコーム群PRC1複合体による着床前胚細胞運命と可塑性の制御

研究課題名(英文) Regulation of preimplantation embryonic fate and plasticity by the PRC1 Polycomb group complex

研究代表者

遠藤 充浩 (Endoh, Mitsuhiro)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：40391883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非典型的PRC1ポリコーム複合体PCGF6-PRC1が、転写因子Mga/Maxを介して生殖関連遺伝子群に結合してこれらの転写を抑制すること、ナイーブ型多能性幹細胞の増殖維持に必要であること、マウスの正常な胚発生・胎盤形成に必要であることを明らかにして、以上の成果を論文発表した。さらにPRC1.6が転写因子Duxの直接抑制を介して2細胞胚遺伝子群の発現を抑制することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリコーム群PRC1.6が他のPRC1とは異なり転写因子Mga/Maxに依存して標的遺伝子を認識すること、生殖関連遺伝子群および2細胞胚遺伝子群の新規エピジェネティック制御機構であることが明らかになった。グローバルなDNA脱メチル化を受けるナイーブ型の多能性幹細胞に特有のエピジェネティック機構であると考えられ、初期発生やエピジェネティックリプログラミングの分子基盤の理解に繋がる重要な発見と言える。

研究成果の概要(英文)：PCGF6 (polycomb group ring finger 6) interacts with RING1A/B and E2F6 associated factors to form a non-canonical PRC1 (polycomb repressive complex 1) known as PCGF6-PRC1. Here, we demonstrate that PCGF6-PRC1 plays a role in repressing a subset of PRC1 target genes by recruiting RING1B and mediating downstream mono-ubiquitination of histone H2A. PCGF6-PRC1 bound loci are highly enriched for promoters of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells (ESCs). Conditional ablation of Pcgf6 in ESCs leads to robust de-repression of such germ cell-related genes, in turn affecting cell growth and viability. We also find a role for PCGF6 in pre- and peri-implantation mouse embryonic development. We further show that a heterodimer of the transcription factors MAX and MGA recruits PCGF6 to target loci. PCGF6 thus links sequence specific target recognition by the MAX/MGA complex to PRC1-dependent transcriptional silencing of germ cell-specific genes in pluripotent stem cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピジェネティクス 発生 哺乳類 多能性幹細胞 転写 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では受精直後の胚において DNA 脱メチル化がゲノム全体で生じることが知られ、このような現象 (エピゲノムリプログラミング) は主に遺伝子発現様式をリセットするために必要な過程と解釈されている。ゲノム全体の DNA 脱メチル化を受けて、マウス 2 細胞期胚では一部の内因性レトロトランスポゾン (MERVL 等) とその近傍の遺伝子 (Zscan4 等) が一過性に発現することが分かっており (図 1)、ES 細胞の一部 (~5%) においてもこれら 2 細胞期胚遺伝子が一過性に発現することが報告されている (Zalzman M et al. Nature, 2010; 図 2)。しかしながら、そのような動的な遺伝子発現の制御機構や生物学的意義については未だ不明な点が多い。我々はこれまでマウスと ES 細胞を用いて、クロマチン制御因子ポリコーム群による細胞分化制御の研究を行ってきた。そしてポリコーム群 PRC1 複合体の中心的な構成因子であり E3 コピキチンライゲースである Ring1A/B が、ヒストン H2A モノユビキチン化修飾を介して発生分化に関わる遺伝子群の転写抑制を行い、ES 細胞の未分化性維持に寄与することを明らかにした (Endoh et al. Development, 2008; Endoh et al. PLoS Genetics, 2012)。また我々は Ring1A/B 欠損 ES 細胞において、発生分化関連遺伝子群のみならず、内因性レトロトランスポゾン MERVL や Zscan4 等の 2 細胞期胚遺伝子群も脱抑制することを見つけた。Ring1A/B は従来の PRC1 複合体の他に、Pcgf6 と結合して非典型的な PRC1 複合体 (Pcgf6-PRC1) を形成することが分かっている。Pcgf6 を欠損した ES 細胞においては、発生分化関連遺伝子群の脱抑制はあまり起こらない一方で、2 細胞期胚遺伝子が強く脱抑制する。以上の予備的知見に基づき、本課題ではポリコーム群 PRC1 複合体による 2 細胞期胚遺伝子の発現制御機構の全容を明らかにする。そしてその生物学的意義を調べるため、マウス着床前胚の細胞分化や運命維持、可塑性に注目した解析を行い、分化全能性を賦与する分子機構の学術的理解を目指す。

2. 研究の目的

分化全能性を有するマウス 2 細胞期胚において内因性レトロトランスポゾン (MERVL) とその近傍遺伝子 (Zscan4 等) が一過性に発現し、胚性幹 (ES) 細胞の一部においてもこれらの遺伝子群が一過性に発現することが知られるが、そのような動的発現の制御機構や生物学的意義については未だ不明な点が多い。申請者はこれまでにクロマチン制御因子ポリコーム群 PRC1 複合体が ES 細胞において発生分化関連遺伝子群の転写抑制に寄与し、さらに 2 細胞期胚遺伝子群の抑制にも関わることを見出してきた。本研究ではポリコーム群 PRC1 複合体による発生分化関連遺伝子群および 2 細胞期胚遺伝子群の制御機構の全容を明らかにする。またその生物学的意義を調べるため、マウス着床前胚の細胞分化や運命維持、可塑性に注目した解析を行い、分化多能性および分化全能性の背景となる分子機構の学術的理解を目指す。

3. 研究の方法

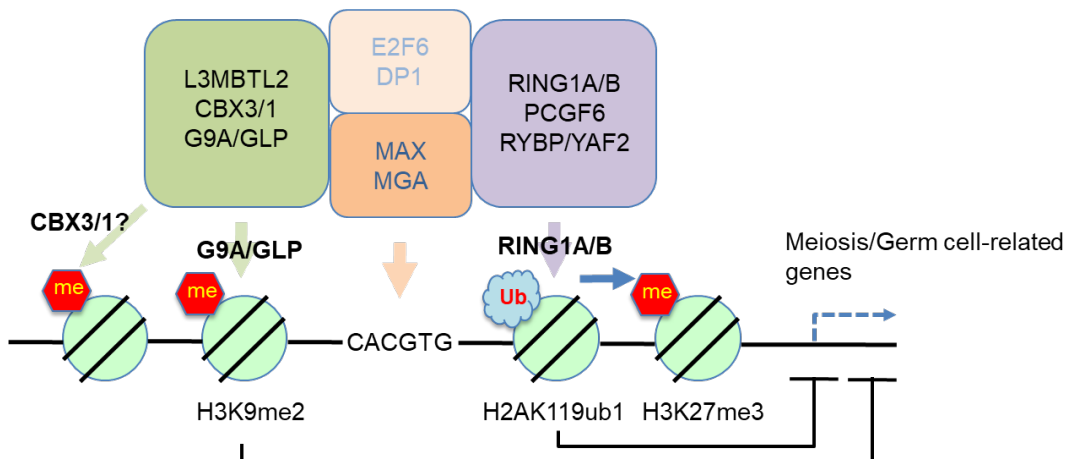
(1) ヒストン H2A に対するモノユビキチン化修飾活性を有するポリコーム群 PRC1 複合体のうち、従来型 PRC1 (Canonical PRC1) および Pcgf6 を含む非従来型 PRC1 複合体 (Pcgf6-PRC1) の作用機序に注目する。具体的には Canonical PRC1 特異的な構成因子 Me118/Bmi1 の欠損 ES 細胞、Pcgf6-PRC1 特異的な構成因子 Pcgf6/Rybp/L3mbtl2 の欠損 ES 細胞、両方の複合体の構成因子 Ring1A/Ring1B の欠損 ES 細胞株を用い、発生分化関連遺伝子と 2 細胞期胚遺伝子の発現制御機構の解明を目指して以下 4 点の解析を行う。(1-a) RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析を用いて、標的遺伝子の同定と比較検討を行う。また各構成因子の欠損による標的遺伝子のクロマチン状態の変化について ChIP-seq 解析を行い、ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御の仕組みを明らかにする。(1-b) Zscan4 レポーター等を用いて、2-cell-state 動態の解析を行う。(1-c) DNA メチル化機構との関係を調べる。(1-d) 始原生殖細胞等への分化能の解析を行う。

(2) Pcgf6 欠損マウスの表現型解析を行い、遺伝子発現様式の変化との関係を調べる。Zp3-Cre マウスと交配して母性・zygotic 両方の Pcgf6 を欠損したマウスを作成し、母性 Pcgf6 の役割を明らかにする。

4. 研究成果

ナイーブ型多能性幹細胞における PCGF6 複合体の精製を行った結果、構成因子として RING1A/B、RYBP/YAF2、L3MBTL2 などのクロマチン因子に加え、転写因子 MGA を同定した。ナイーブ型多能性幹細胞において PCGF6 は減数分裂・生殖細胞関連遺伝子群の転写開始点周辺に結合することが分かった。またこれらの PCGF6 標的遺伝子の配列には E ボックス配列が含まれ、転写因子 MGA/MAX ヘテロダイマーがこれを認識して結合し、PRC1.6 複合体をリクルートすることが分かった。ナイーブ型多能性幹細胞で PCGF6 を欠損させると、細胞の増殖及び生存が低下し、減数分裂・生殖細胞関連遺伝子群への RING1B/RYPB の結合及び H2AK119ub1/H3K27me3 修飾が消失して、これら遺伝子群が脱抑制した。さらに、これら遺伝子群の転写抑制は、RING1B が媒介する H2AK119ub1 修飾を介して起こることも分かった。一方プライム型の多能性幹細胞 (エピプラスト幹細胞) では、PRC1.6 複合体は減数分裂・生殖細胞関連遺伝子群へ結合せず、これら遺伝子群の抑制に寄与しないことが分かった。PCGF6 (zygotic) 欠損マウスは胚発生の過程で死亡する確率が野生型に比べて有意に高く、着床前胚から死亡し始めること、着床後胚の胎盤形成に異常があることも分かり、以上の研究成果を国際科学雑誌 eLife で発表した (下図)。Zp3-Cre マウスとの交配により得られた母性 PCGF6 欠損卵母細胞を用いて野生型精子との体外受精・試験

管内発生を行ったところ、大半の胚で発生遅延・異常が起こり正常な胚盤胞まで発生しないこと、これらの胚で2細胞期胚遺伝子群が脱抑制していることが分かった。以上に加え、多能性幹細胞において PRC1.6 複合体が転写因子をコードする Dux 遺伝子の直接転写抑制を介して、2細胞胚特異的遺伝子群の発現抑制に寄与することも分かった。PRC1.6 複合体の標的遺伝子群はプライム型でフルに DNA メチル化され、ナイーブ型では不完全な DNA メチル化状態であることから、本研究は、この複合体が不完全な DNA メチル化を受ける遺伝子領域の E ボックスに結合して、補完的に転写抑制を担う仕組みである可能性を示唆している。



5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 4 件)

1). Baba M[#], **Endoh M^{*}**, Ma W[#], Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M, Suda T^{*}. ([#]These authors contributed equally to this work)
Folliculin Regulates Osteoclastogenesis Through Metabolic Regulation.
J Bone Miner Res. 33, 1-14 (2018) 査読有り

2). Noguchi S, Arakawa T, Fukuda S, Furuno M, Hasegawa A, Hori F, Ishikawa-Kato S, Kaida K, Kaiho A, Kanamori-Katayama M, Kawashima T, Kojima M, Kubosaki A, Manabe RI, Murata M, Nagao-Sato S, Nakazato K, Ninomiya N, Nishiyori-Sueki H, Noma S, Saijyo E, Saka A, Sakai M, Simon C, Suzuki N, Tagami M, Watanabe S, Yoshida S, Arner P, Axton RA, Babina M, Baillie JK, Barnett TC, Beckhouse AG, Blumenthal A, Bodega B, Bonetti A, Briggs J, Brombacher F, Carlisle AJ, Clevers HC, Davis CA, Detmar M, Dohi T, Edge ASB, Edinger M, Ehlund A, Ekwali K, **Endoh M**, Enomoto H, Eslami A, Fagiolini M, Fairbairn L, Farach-Carson MC, Faulkner GJ, Ferrai C, Fisher ME, Forrester LM, Fujita R, Furusawa JI, Geijtenbeek TB, Gingeras T, Goldowitz D, Guhl S, Guler R, Gustincich S, Ha TJ, Hamaguchi M, Hara M, Hasegawa Y, Herlyn M, Heutink P, Hitchens KJ, Hume DA, Ikawa T, Ishizu Y, Kai C, Kawamoto H, Kawamura YI, Kempfle JS, Kenna TJ, Kere J, Khachigian LM, Kitamura T, Klein S, Klinken SP, Knox AJ, Kojima S, Koseki H, Koyasu S, Lee W, Lennartsson A, Mackay-Sim A, Mejhert N, Mizuno Y, Morikawa H, Morimoto M, Moro K, Morris KJ, Motohashi H, Mummery CL, Nakachi Y, Nakahara F, Nakamura T, Nakamura Y, Nozaki T, Ogishima S, Ohkura N, Ohno H, Ohshima M, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov DA, Passier R, Patrikakis M, Pombo A, Pradhan-Bhatt S, Qin XY, Rehli M, Rizzu P, Roy S, Sajantila A, Sakaguchi S, Sato H, Satoh H, Savvi S, Saxena A, Schmidl C, Schneider C, Schulze-Tanzil GG, Schwegmann A, Sheng G, Shin JW, Sugiyama D, Sugiyama T, Summers KM, Takahashi N, Takai J, Tanaka H, Tatsukawa H, Tomoiu A, Toyoda H, van de Wetering M, van den Berg LM, Verardo R, Vijayan D, Wells CA, Winteringham LN, Wolvetang E, Yamaguchi Y, Yamamoto M, Yanagi-Mizuochi C, Yoneda M, Yonekura Y, Zhang PG, Zucchelli S, Abugessaisa I, Arner E, Harshbarger J, Kondo A, Lassmann T, Lizio M, Sahin S, Sengstag T, Severin J, Shimoji H, Suzuki M, Suzuki H, Kawai J, Kondo N, Itoh M, Daub CO, Kasukawa T, Kawaji H^{*}, Carninci P, Forrest ARR, Hayashizaki Y.
FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples.
Sci Data., 4, 170112 (2017) 査読有り

3). **Endoh M^{*}**, Endo TA, Shinga J, Hayashi K, Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H^{*}.
PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by

regulating germ cell-related genes.
Elife, 6, e21064 (2017) 査読有り

4). Ikawa T*, Masuda K, Endo TA, **Endo M**, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H*.
Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program.
Genes Dev., 30, 2475-2485 (2016) 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) **Mitsuhiro Endoh**, Masaya Baba, Tamie Endoh, Ayako Ishizu, Toshio Suda. “ FLCN-TFE3 Feedback Loop Prevents Lysosomal Storage and BHD Tumorigenesis. ” FRONTIERS IN CANCER SCIENCE 2018 (国際学会) 2018 年
- 2) **Mitsuhiro Endoh**, Masaya Baba, Tamie Endoh, Yang Chong, Toshio Suda. “ Loss of FLCN induces activation of hemophagocytic macrophages through the GABARAP-associated autophagy-lysosome process. ” Frontiers in Cancer Science (FCS) 2017 年 (国際学会) 2017 年
- 3) **Mitsuhiro Endoh**, Masaya Baba, Yong-Mei Guo, Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Naoto Takahashi, Ken-ichi Sawada, Laura S. Schmidt, Toshio Suda. “ The FLCN-TFE3 axis regulates macrophage activation through cellular metabolism. ” International Society for Experimental Hematology (ISEH) 46th Annual Scientific Meeting (国際学会) 2017 年
- 4) **遠藤 充浩** “ ポリコーム群遺伝子 Pcgf6 による生殖細胞特異的遺伝子の発現および胚発生の制御 ” 千葉大学大学院医学研究院 (招待講演) 2017 年 03 月 31 日 千葉大学大学院医学研究院
- 5) **遠藤 充浩**、遠藤 高帆、林 克彦、須田 年生、古関 明彦 “ ポリコーム群 PCGF6-PRC1 複合体は生殖細胞系列遺伝子の抑制を介して胚性幹細胞の未熟な分化を抑制する ” 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 01 日 パシフィコ横浜

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：須田 年生
ローマ字氏名：Toshio Suda
所属研究機関名：熊本大学
部局名：国際先端医学研究機構
職名：卓越教授
研究者番号（8桁）：60118453

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。