

令和元年6月3日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07451

研究課題名(和文)ポリコムサイレンシングを制御する新規タンパク質複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel protein complexes that regulate Polycomb silencing

研究代表者

西岡 憲一 (NISHIOKA, KENICHI)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80370120

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)：これまでに新規のポリコムサイレンシング制御因子を複数同定した。Mbf1はこれまでストレス関連遺伝子を活性化する核内コアクチベーターとして知られていたが、主な局在である細胞質における機能は分かっていなかった。細胞質Mbf1はポリコムサイレンシングの中心的な役割を担うE(z) mRNAに結合し、これをRNA分解酵素であるPacmanの攻撃から守ることで、ポリコムサイレンシングの堅牢性を維持していた。他にもMbf1はストレス関連遺伝子mRNAに結合していることがわかり、ひとつのタンパク質が局在を変えて異なるメカニズムで類似の生物学的機能を示すことは大変興味深い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mbf1はこれまでストレス関連遺伝子を活性化する核内コアクチベーターとして知られていたが、主な局在である細胞質における機能は分かっていなかった。一方で、Pacmanが絡む5'側のRNA分解制御メカニズムについてはこれまでほとんどわかっていなかった。もうすこし詳細な生化学的実験が必要であるが、当該制御メカニズムについて新たな知見が得られたこととなる。また、本論文の報告をもって遺伝子スクリーニング方法の妥当性を証明できたことも特筆すべき点である。

研究成果の概要(英文)：Several candidate genes for Polycomb silencing regulators have been identified in previous our study.

Mbf1, known as a nuclear coactivator that regulates stress response genes, is localized mainly in cytoplasm although function of cytoplasmic Mbf1 is not known. The cytoplasmic Mbf1 binds to E(z) mRNA encoding a catalytic subunit of PRC2, thereby protecting the mRNA from the attack by Pacman, 5'-to-3' exoribonuclease, and which contribute to maintain robustness of Polycomb silencing. Mbf1 also binds to mRNAs derived from many stress response genes. Our study elucidates a unique feature of Mbf1 in that Mbf1 demonstrates different biochemical activity according to its subcellular localization although both activities contribute a similar biological function.

研究分野：エピゲノム制御

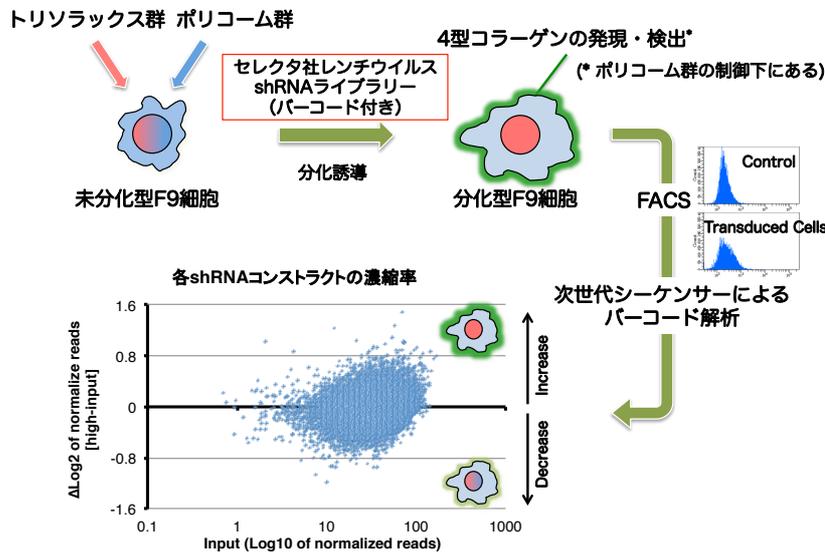
キーワード：エピゲノム制御 ポリコムサイレンシング Mbf1 Pacman

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いた再生医療が実用化に入り、幹細胞機能の制御メカニズムの解明がますます重要になっている。一方、この制御メカニズムにおいて重要な役割を担う遺伝子群として、ポリコム群遺伝子と呼ばれる多細胞生物に特有な一連の遺伝子群が存在することが知られている。ポリコム群遺伝子産物による転写抑制機構、すなわちポリコムサイレンシングは、ヒトの癌においてもその発生や進行に強く関連していることから、再生医学・癌研究分野のクロストークのキーワードとして注目度が高い。応募者はこれまでにポリコムサイレンシングのコア部分の基本的メカニズムを解明してきたが (Kuzmichev, Nishioka, et al., Genes Dev., 2002)、まだ全容が明らかになったわけではない。とりわけポリコムサイレンシングそのものの制御については、発生の各段階や各組織・細胞においてそれぞれ特異な制御様式が存在することが示唆されているが、ほとんどわかっていない。

そのような考えのもと、今回応募者は次世代型スクリーニング技術を応用してこれまでのスクリーニング法の問題点を克服し、ポリコムサイレンシングを制御する新規のマウス幹細胞機能制御因子群を特定した (図1に方法の概要を示した)。これまでの問題点とは、簡単に言うとポリコム群タンパク質をノックダウンすると、特に幹細胞では分化誘導と同時に細胞周期が停止してしまうので、「これまでのようなコロニー形成でスクリーニングする方法では目的の遺伝子が採れない」、ということである。今回、定量的 shRNA スクリーニングを行うことによってコロニー形成を回避し、一方で特定した各因子をランキング化できるようになったため、多数の新規因子が特定

図1 次世代型遺伝子スクリーニングの概要

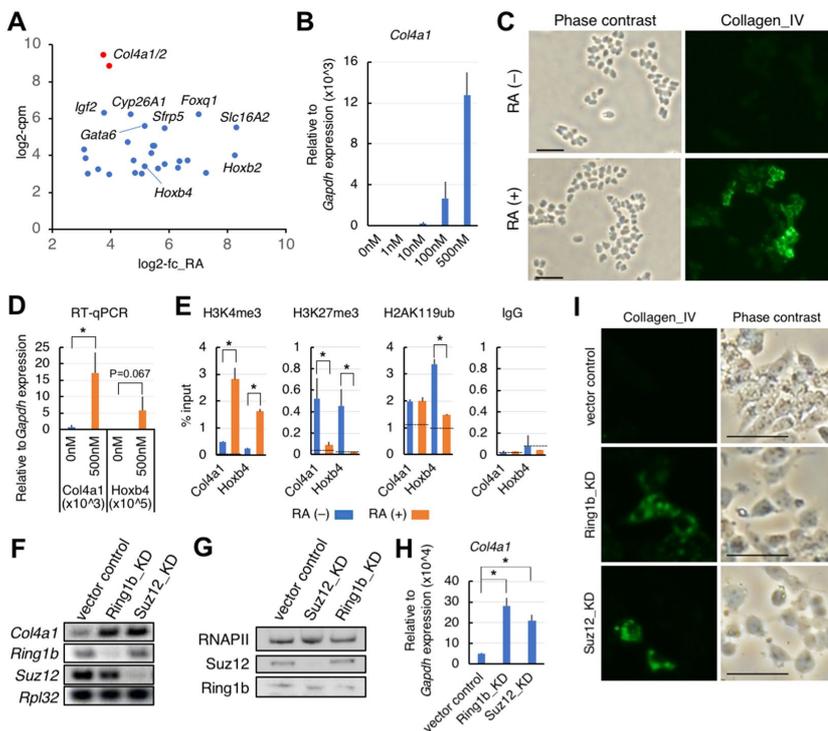


できたのである (2013年日本 RNAi 研究会で招待講演、コスモバイオニュース100号特別企画)。

2. 研究の目的

ポリコムサイレンシングを制御する新規因子をスクリーニングできる方法確立して候補遺伝子を同定する。また、一部については詳細な解析を行い、新たなポリコムサイレンシング制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法



FACS による細胞分離と次世代シーケンサーを組み合わせることで定量的 shRNA スクリーニングを行うことにより、コロニー形成を回避し、一方で特定した各遺伝子をランキング化できるようになった。

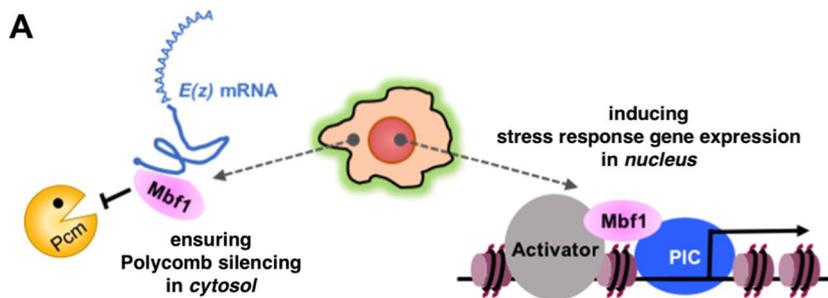
具体的には、ポリコム標的遺伝子でレンチノイン酸応答遺伝子でもある4型コラーゲン遺伝子 (Col4a1/2) をレポーター遺伝子として用いた (左図 A-C)。また、ポリコム遺伝子ノックダウンのコントロール実験でも4型コラーゲンの脱抑制が認められた

(左図 D-I)。得られた有意な結果は F9 細胞と ES 細胞で発現している遺伝子として選別し、さらに GO term によって細胞質や核局在で分類した。

#### 4. 研究成果

開発した方法によりポリコームサイレンシングを制御する新規候補遺伝子を多数同定することができた。具体的には、細胞質のみに局在するものとして 68 遺伝子、核のみに局在するものとして 230 遺伝子、両方に局在するものとして 136 遺伝子を同定した。また、既知のポリコーム群遺伝子とその関連遺伝子のおよそ半数を有意差を持って同定することができていた。過去の類似スクリーニングではほとんど同定できていなかったことと比較すると目覚ましい結果であった。

このうち Mbf1 についてショウジョウバエを用いて詳細に解析した。Mbf1 はこれまでストレス関連遺伝子を活性化する核内コアクチベーターとして知られていたが、主な局在である細胞質における機能は分かっていなかった。細胞質 Mbf1 はポリコームサイレンシングの中心的な役割を担う E(z) mRNA に結合し、これを RNA 分解酵素である Pacman の攻撃から守ることで、ポリコームサイレンシングの堅牢性を維持していた (下図)。他にも Mbf1 はストレス関連遺伝子 mRNA に結合していることがわかり、ひとつのタンパク質が局在を変えて異なるメカニズムで類似の生物学的機能を示すことは大変興味深い。



一方で、Pacman が絡む 5' 側の RNA 分解制御メカニズムについてはこれまでほとんどわかっていなかった。もう少し詳細な生化学的実験が必要であるが、当該制御メカニズムについて新

たな知見が得られたこととなる。また、本論文の報告をもって遺伝子スクリーニング方法の妥当性を証明できたことも特筆すべき点である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Nishioka K.\*, Miyazaki H., & Soejima H. Unbiased shRNA screening, using a combination of FACS and high-throughput sequencing, enables identification of novel modifiers of Polycomb silencing. *Sci Rep.* 8, 12128. (2018)
2. Nishioka K.\*, Wang X.F., Miyazaki H., Soejima H., & Hirose S.\* Mbf1 ensures Polycomb silencing by protecting E(z) mRNA from degradation by Pacman. *Development.* 145, dev162461. (2018)

〔学会発表〕 (計 1 件)

西岡憲一\*、宮崎仁美、副島英伸 FACS と次世代シーケンサーを用いた shRNA ライブラリースクリーニングによるポリコームサイレンシング制御因子の探索 第 41 回日本分子生物学会年会 横浜 2018

〔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：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (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。