

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06621

研究課題名(和文) ユビキチン-プロテアソーム系を介したCpGアイランドの制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulation mechanisms of CpG islands via Ubiquitin-proteasome system

研究代表者

伊藤 伸介 (Ito, Shinsuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50612115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PRC1のサブ複合体の一つであるPRC1.1は、Fboxタンパク質KDM2B、SCFユビキチンリガーゼの構成因子SKP1、RINGフィンガータンパク質RING1-PCGF1をもつE3リガーゼを形成する。これまでにPRC1.1にSKP1が存在する意義、およびPRC1.1のE3リガーゼの標的分子は不明であった。我々は、PRC1.1が非ヒストンタンパク質のユビキチン化基質を同定し、その基質分解を介したCpGアイランドのエピゲノム制御、及び転写活性化に寄与することを見出した。研究成果は、論文投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ポリユビキチン化を介したポリコームノ分解という独自の概念を導入し、抑制された遺伝子がどのようにして活性化されるのかの解明に繋がる成果と考えている。本研究からPRC1.1がゲノム上のCGIをスキャンニングして、適切な場所では結合が維持され、不適切な場所では自己によるポリユビキチン化後にプロテアソームにより分解されるという適材適所の選択圧がかかっている事が示唆された。とりわけ、細胞が発生・分化のように状態を大きく変化する時、このPRC1.1のポリユビキチン化機能が重要になると考えている。

研究成果の概要(英文)：Variant PCGF1-PRC1 (PRC1.1) that contains PCGF1, KDM2B, SKP1, BCOR, PCGF1, RING1A/B, and RYBP has been reported to contribute to the initiation of PcG silencing by recognizing CpG islands (CGIs) by the CXXC domain of KDM2B and mediating H2AK119ub1 by the RING1B/PCGF1 dimer. Notably, SKP1 associates with the F-box of KDM2B, potentially forming an SCF (SKP1A/CULLIN/F-box) ubiquitin ligase complex. These apparent biochemical properties of PRC1.1 suggest that there may be additional modes of action involving ubiquitin-related regulatory systems such as the proteasome. Here, we thus set out to explore the possibility that PRC1.1 could utilize proteasome-dependent pathways to regulate the expression of PcG target genes. Indeed, we identified non-histone protein as substrates for poly-ubiquitination by PRC1.1, which lead to degradation of protein and subsequent activation of repressed genes. We have prepared manuscript for submission.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ポリコーム 遺伝子発現制御 CpGアイランド プロテアソーム ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類ゲノムの転写開始点付近に多く存在する CpG アイランド (CGI) は、エピジェネティック修飾のプラットフォームとして寄与して遺伝子発現制御を担っている。しかしながら、CGI を読み取り、エピジェネティック修飾を適切に導入する機構は不明な点が多い。CGI を認識する CXXC ドメインを含有する KDM2B は、マウス ES 細胞において CXXC ドメインを介してほぼ全ての CGI に結合し、相互作用因子であるポリコーム転写抑制複合体 PRC1.1 の構成因子 RING1B, BCOR, PCGF1 を特定の CGI (PcG (+) CGI) にリクルートする。KDM2B-PRC1.1 は H2Aub を CGI に導入し転写抑制を行う。一方で、興味深い事に約 80% の CGI は、KDM2B が存在するにも拘らず、PRC1.1 の結合しない CGI (PcG (-) CGI) として存在する。申請者の予備実験から、PRC1.1 の持つユビキチンリガーゼ活性とプロテアソームによる分解メカニズムを CGI に導引するか否かによって、PRC1.1 の CGI への結合が決定されることが示唆されている。本研究課題では、KDM2B が選択的に 20% の CGI に PRC1.1 をリクルートするメカニズム、一方で残りの 80% の CGI から PRC1.1 を排除するメカニズムを解析し、CGI エピゲノム制御のメカニズムを解明することを目指した。

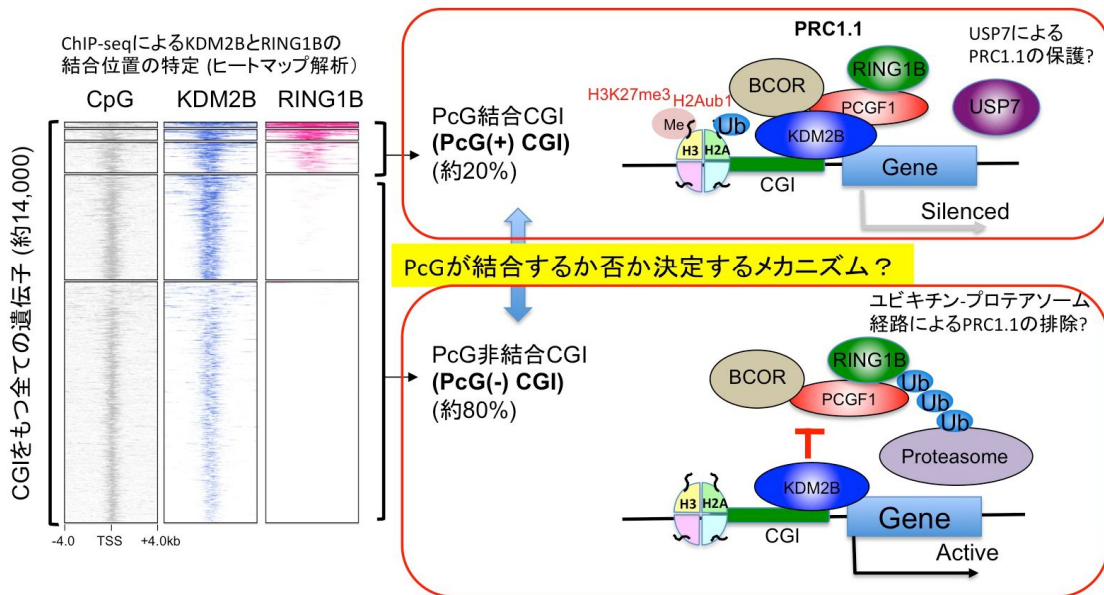
## 2. 研究の目的

我々は、これまでに CGI に結合する CXXC ドメインをもつタンパク質 (CXXC タンパク質) が、エピジェネティック修飾因子を CGI にリクルートしエピジェネティック修飾を確立し、転写制御をおこなっていることを報告してきた。これらの観察から、CGI は複数の CXXC タンパク質をリクルートすることによって CGI に特徴的なエピジェネティック修飾を確立させるプラットフォームとして機能することが推測された。

他方、ポリコーム群 (PcG) は、エピジェネティック制御を介して発生、分化過程において細胞系譜の決定に重要な役割を果たす遺伝子発現抑制複合体である。ポリコーム群が媒介する遺伝子発現抑制は、主に 2 つのタンパク質複合体によって樹立される。1) PRC2 複合体によるヒストン H3 の 27 番目のリジン (K27) のトリメチル化 (H3K27me3) と 2) PRC1 複合体によるヒストン H2A の K119 のユビキチン化 (H2Aub1) である。我々は、CXXC タンパク質の一つである KDM2B が CXXC ドメインを介して CGI に結合し、PRC1 の異性型 PRC1.1 をリクルートし、標的とする CGI (PcG (+) CGI) に H2Aub1 を樹立して転写抑制に寄与することを報告した (Blackledge, NP. *et al.*, *Cell*, 157: 1-15, 2014)。この解析から更なる疑問点が浮上した。ChIP-seq 法による KDM2B のゲノム全体の結合解析では、KDM2B はほぼ全ての CGI に結合していることが明らかになった (図)。KDM2B はポリコーム因子 RING1B、PCGF1、BCOR を含む PRC1 蛋白質複合体 (PRC1.1) を形成して、一部の CGI にポリコーム因子をリクルートすることによって H2Aub を誘導して転写抑制に寄与する (図)。即ち、KDM2B は、全ての CGI に結合するにも拘わらず、一部の CGI (PcG (+) CGI) にのみポリコーム因子をリクルートして転写抑制しているのである。疑問としては、KDM2B がポリコーム因子をリクルートするか否か、その選択性をもたらすメカニズムが何かである。我々の予備実験から、細胞をユビキチン-プロテアソームシステム (Ubiquitin-Proteasome System: UPS) の阻害剤である MG132 処理することにより、本来ポリコームの結合しない CGI (PcG (-) CGI) へのポリコームの結合が観察されたことから、PRC1.1 のクロマチンへの結合が再編成されることが示唆されており、PRC1.1 の CGI への結合の選択性が UPS により制御されていることが推測された。即ち、CXXC ドメインを介して KDM2B が CGI に結合し、KDM2B がプラット

フォームとして作用し、その上に PRC1.1 が集積する。PRC1.1 が安定に結合するかどうかは UPS が作用するかには依存するという作業仮説を立てた(図)。そこで、本研究課題では、UPS によるポリコーム結合の特異性決定のメカニズムの解明に挑戦することを目的とした。

図. 本研究課題の概要



### 3. 研究の方法

#### (1) プロテアソーム阻害剤 MG132 によるクロマチン結合への影響

PRC1.1 の自己ユビキチン化が直接的に PRC1.1 の CGI への結合に機能しているかどうか実験的に検証するために、PRC1.1 の構成因子であり、RING Finger ドメインを持つ PCGF1 のコンディショナルノックアウト (PCGF1 cKO) ES 細胞 を用いて、PCGF1 KO における BCOR と RING1B の抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。

#### (2) PRC1.1 によるポリユビキチン化基質の探索

RING1A/B と SKP1 の持つポリユビキチン化活性の生物学的意義を明らかにするためには、その標的となるポリユビキチン化されたタンパク群を系統的に同定していく必要がある。しかし、これまでの研究では、ポリユビキチン化されたクロマチン結合タンパク質を濃縮し、網羅的に同定する実験系が確立されていない。この課題に挑戦すべく、我々は、ユビキチン化タンパク質を捕捉するユビキチン鎖結合プローブ (TUBE: tandem ubiquitin-binding entity と GST の融合タンパク質)を用いた実験系を導入した。具体的に、大腸菌から精製したりコンビナント TUBE を、哺乳類細胞抽出液に添加し、細胞内でユビキチン鎖が結合した基質を保護しながらグルタチオン樹脂ビーズを用いて濃縮できることを検証した。このシステムを用いて PRC1.1 によるポリユビキチン化基質の探索を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) プロテアソーム阻害剤 MG132 によるクロマチン結合への影響

マウス ES 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で 3 時間処理することにより、KDM2B のクロマチンへの結合に変化が無い一方で、PRC1.1 の構成因子 RING1B 及び BCOR の結合が PcG(-) CGI にて増強した。加えて、PRC1.1 の構成因子である RING1B-PCGF1 は RING Finger ドメインを持つユビキチンリガーゼであり、これまでに生化学的に PRC1.1 を再構成した *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、KDM2B-PRC1.1 はヌクレオソームの H2A ユビキチン化のみならず、PRC1.1 の構成因子の強いユビキチン化を促進した。これらの結果から、PcG(-) CGI への PRC1.1 の結合が PRC1.1 の自己ユビキチン化とプロテアソームによる分解により制御されていることが示

唆された。そこで、PRC1.1の自己ユビキチン化が直接的に PRC1.1の CGI への結合に機能しているかどうか実験的に検証するために、PRC1.1の構成因子であり、RING Finger ドメインを持つ PCGF1 のコンディショナルノックアウト (PCGF1 cKO) ES 細胞を用いて、PCGF1 KO における BCOR と RING1B の抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。その結果、BCOR の PcG (-)CGI への蓄積が観察され、PCGF1 による PRC1.1 の自己ユビキチン化が PcG (-)CGI から排除するメカニズムである可能性が示唆された。加えて、PRC1.1 の CGI 結合に対して MG132 処理によっても BCOR の増強が観察され、PCGF1 による自己ユビキチン化とプロテアソーム経路との関係性が明らかになった。これらの実験により、PCGF1 の自己ユビキチン化活性が BCOR の PcG (-) CGI からの排除に寄与していることが明らかになった。

## (2) PRC1.1 によるポリユビキチン化基質の探索

TUBE によるポリユビキチン化タンパクを濃縮するシステム、ユビキチン化タンパクを同定する質量分析システムを構築し、機能することを実証した。SKP1KO ES 細胞のクロマチン分画を調製し、GST-TUBE を用いてプルダウンし、結合タンパク質を質量分析解析により調査した。その結果、多くのクロマチン結合タンパク質を同定し、SKP1 依存性のタンパク質に焦点を当てて解析を進めた。SKP1 KO 細胞では基質タンパク質の分解が抑制されていることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeo Narita, Shinsuke Ito, Yoshiki Higashijima, Wai Kit Chu, Katrin Neumann, Jonas Walter, Shankha Satpathy, Tim Liebner, William B Hamilton, Elina Maskey, Gabriela Prus, Marika Shibata, Vytautas Iesmantavicius, Joshua M Brickman, Konstantinos Anastassiadis, Haruhiko Koseki, Chunaram Choudhary	4. 巻 21
2. 論文標題 Enhancers are activated by p300/CBP activity-dependent PIC assembly, RNAPII recruitment, and pause release	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 S1097-2765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2021.03.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fursova NA, Blackledge NP, Nakayama M, Ito S, Koseki Y, Farcas AM, King HW, Koseki H, Klose RJ.	4. 巻 74
2. 論文標題 Synergy between Variant PRC1 Complexes Defines Polycomb-Mediated Gene Repression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1020-1036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2019.03.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroki Sugishita, Takashi Kondo, Shinsuke Ito, Manabu Nakayama, Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Eiryu Kawakami, Yoko Koseki, Yasuhide Ohinata, Jafar Sharif, Mio Harachi, Neil P. Blackledge, Robert J. Klose, Haruhiko Koseki	4. 巻 12
2. 論文標題 Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 5341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24894-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤伸介
2. 発表標題 Polycomb-proteasome axis shapes the epigenetic landscape of CpG islands
3. 学会等名 エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------