

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870014

研究課題名(和文)ポリコーム複合体PRC2の多様性の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular basis of formation of polycomb repressive complex 2 (PRC2)

研究代表者

長尾 恒治 (Nagao, Koji)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60426575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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・維持を行います。しかしPRC2がどのように制御されているかはまだよくわかっていません。私たちは全PRC2構成因子に対して、免疫沈降による複合体精製とその質量分析器を使った解析を行い、PRC2構成因子間のタンパク質間相互作用ネットワークを明らかにしました。その結果、構成因子を使い分けることでいくつもの種類のPRC2複合体が形成されることがわかりました。

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. To define the entire composition of PRC2 in human, we performed a comprehensive proteomic analysis of all PRC2 components using by semi-quantitative mass-spectrometry. We established the protein interaction network between PRC2 components and found that distinct PRC2 complexes are formed in human cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム群複合体 PRC2 は、発生・分化の過程で決定される遺伝子発現パターンの維持に必要であり、ヒストン H3 の 27 番目のリジンをメチル化 (H3K27me) することで遺伝子発現が抑制されるヘテロクロマチンの確立、維持を行う。PRC2 による発現抑制の代表例には、HOX 遺伝子群の制御や X 染色体の不活性化が知られている。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全貌は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々が確立してきたクロマチン制御因子の網羅的探索手法を発展させて、PRC2 全構成因子の同定と各構成因子間の相互作用を明らかにすることで、PRC2 の複合体構築の全貌を明らかにすることを目指した。さらに各構成因子に対するモノクローナル抗体などの実験材料の整備を行い、それぞれの構成因子が PRC2 の複合体形成や活性にどのように関与しているのかを明らかにする土台を確立することで、PRC2 によるヘテロクロマチン形成の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PRC2 複合体の全構成因子の同定と、各構成因子間の相互作用ネットワークの解明。
Flag タグした PRC2 構成因子を安定に発現するヒト細胞株をそれぞれの PRC2 構成因子に対して樹立し、免疫沈降による複合体精製と質量分析器による同定を行う。この実験系を、PRC2 全構成因子をベイトとし、また再現性の確認のために少なくとも 2 回以上の解析をそれぞれの構成因子に対して行う。ここで得られた全結果を情報処理によってまとめあげること、PRC2 構成因子間の相互作用ネットワークを明らかにする。

(2) PRC2 構成因子に対する特異的抗体など実験材料の整備。
同定した PRC2 構成因子の分子機能を明らかにするためには、その挙動を追跡できるような特異性と感度の高い抗体が必要となる。組換えタンパク質を用いたモノクローナル抗体を、PRC2 のそれぞれの構成因子に対して作製し、各クローンをウエスタンブロットと免疫沈降の両方で評価することで、ChIP-seq 法などでそれぞれの PRC2 が機能するゲノム領域を明らかにできるようにする。また特異的抗体を用いて、RNAi によって PRC2 の各構成因子の機能阻害をするための最適な dsRNA を選択する。

4. 研究成果

(1) PRC2 複合体の全構成因子の同定と、各構成因子間の相互作用ネットワークの解明。
PRC2 の構成因子の一つ、SUZ12 を含む複合体の精製から、2 つの新規の PRC2 構成因子 (SUZBP1、SUZBP2 と名付けた) を同定した。この結果で PRC2 構成因子候補として考えられた残り 15 種類のタンパク質も加え、同様の免疫沈降と質量分析による解析をコントロール実験も含めて計 69 サンプル分を行った。PRC2 複合体にはアミノ酸配列のよく似たタンパク質も含まれるため、質量分析器による測定結果の解釈には、同定されたペプチド配列が、単一のタンパク質に帰属するかどうか、そうでない場合はどのタンパク質とどのタンパク質とを区別することができないかを注意深く解析する必要がある。このことを可能とする情報処理システムを作製し、質量分析器による解析結果を一つの表としてまとめあげ、PRC2 構成因子間の相互作用マトリックスを作製した。その結果、排他的に PRC2 複合体に含まれる構成因子と、必ず含まれる構成因子を見いだすことができ、構成因子を使い分けることで PRC2 複合体には少なくとも 6 種類存在することを見いだした。

(2) PRC2 構成因子に対する特異的抗体など実験材料の整備。

上記の異なる PRC2 複合体を見分けることができるように、各構成因子に対するモノクローナル抗体を作製した。免疫沈降、ウエスタンブロットそれぞれに適したモノクローナル抗体を得ることができた。これを用いて内在性の PRC2 複合体を免疫沈降によって精製し、その構成成分を調べたところ、(1) で得られた何種類もの PRC2 が存在するという知見が、内在性の PRC2 でも成り立っていることを確認した。また、クロマチン免疫沈降におけるクロマチン可溶化条件と適した抗体の選定を行い、ChIP-seq による解析を可能とする土台を作製することができた。

(3) PRC2 の不活性化 X 染色体における機能解析。

不活性化 X 染色体は、PRC2 による H3K27me3 修飾がもっとも見られるゲノム領域として知られている。また不活性化 X 染色体は、バー小体と呼ばれる凝縮したヘテロクロマチン構造をとる。PRC2 が不活性化 X 染色体のヘテロクロマチン形成にどのように関与しているかを明らかにするため、hTERT-RPE1 細胞において PRC2 構成因子の一つ SUZ12 に対して RNAi による機能阻害を行った。その結果、PRC2 は H3K27me3 修飾には必要であるが、凝縮したバー小体構造を維持するには必要でないことがわかった。一方、我々が別に発見した HBiX1-SMCHD1 複合体は、H3K27me3 修飾には必要ないが、凝縮した構造を維持するのに必要であることがわかった。本結果は、*Nat. Struct. Mol. Biol.*誌に発表し、不活性化

X染色体というヘテロクロマチンの代表例におけるPRC2の作用範囲を明らかにした成果である。

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5件)

Hayashi, T., Ebe, M., Nagao, K., Kokubu, A., Sajiki, K., and Yanagida, M. (2014) Schizosaccharomyces pombe centromere protein Mis19 links Mis16 and Mis18 to recruit CENP-A through interacting with NMD factors and the SWI/SNF complex. **Genes Cells**. 19, 541-554 doi: 10.1111/gtc.12152 査読あり

Saito, N., Qiao, H., Yanagi, T., Shinkuma, S., Nishimura, K., Suto, A., Fujita, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nakamura, H., Nagao, K., Obuse, C., Shimizu, H., and Abe, R. (2014) An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions. **Sci. Transl. Med.** 6, 245ra95 doi: 10.1126/scitranslmed.3008227 査読あり

Suzuki, S., Nagao, K., Obuse, C., Murakami, Y., and Takahata, S. (2014) A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. **Protein Expr. Purif.** 97, 44-49 doi: 10.1016/j.pep.2014.02.005 査読あり

Nozawa, R. S.*, Nagao, K.*, Igami, K. T.*, Shibata, S., Shirai, N., Nozaki, N., Sado, T., Kimura, H., and Obuse, C. (2013) Human inactive X chromosome is compacted through a polycomb-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 20, 566-573. doi: 10.1038/nsmb.2532 査読あり *筆頭著者

長尾恒治、野澤竜介、小布施力史 (2013) バー小体の正体 - HBiX1-SMCHD1 複合体によるヒト不活性化X染色体の凝縮 **実験医学** 31, 1771-1775. 査読なし

[学会発表](計7件)

長尾恒治、柴田幸子、野澤竜介、木村宏、佐渡敬、小布施力史「不活性化X染色体の凝縮に必要なSMCHD1-HBiX1複合体のマウスでの解析」X染色体研究会 2015 2015年3月26日 近畿大学(奈良県奈良市)

長尾恒治、柴田幸子、野澤竜介、木村宏、佐渡敬、小布施力史「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明」**第37回日本分子生物学会年会** 2014年11月26日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

長尾恒治、柴田幸子、野澤竜介、木村宏、佐渡敬、小布施力史「SMCHD1-HBiX1複合体によるヘテロクロマチンの凝縮」**第87回日本生化学会大会** 2014年10月18日 国立京都国際会館(京都府京都市)

長尾恒治、柴田幸子、野澤竜介、木村宏、佐渡敬、小布施力史「SMCHD1-HBiX1複合体による不活性化X染色体の凝縮」**BCC (Beyond the Chromatin Club) 5** 2014年9月18日 北海道大学(北海道札幌市)

Koji Nagao, Sachiko Shibata, Ryu-suke Nozawa, Masaaki Okuda, Hiroshi Kimura, Takashi Sado, and Chikashi Obuse「Role of Histone H3 lysine 9 trimethylation in mouse X chromosome inactivation」**2014 Keystone Symposia Conference, Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism** 2014年3月1日 Santa Fe (USA)

Koji Nagao, Sachiko Shibata, Ryu-suke Nozawa, Masaaki Okuda, Hiroshi Kimura, Takashi Sado, and Chikashi Obuse「Allele specific ChIP-seq profiling of inactive X chromosome in mouse」**BMB2013 第36回日本分子生物学会** 2013年12月3日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

長尾恒治「バー小体の正体 - SMCHD1-HBiX1複合体によるヒト不活性化X染色体の凝縮 -」**第26回インターゲノミクスセミナー** 2013年11月22日 神戸大学(兵庫県神戸市)

[図書](計1件)

長尾恒治、小布施力史 (2014) エピジェネティクスの産業応用 第編 解析法 第3章 次世代シーケンサーを用いた網羅的エピジェネティクス解析: ChIP-seq 法など、監修: 畑田出穂・久保田健夫、シーエムシー出版 pp120-128 ISBN: 978-4-7813-0933-0

[その他]

ホームページ等
女性の"働かない"X染色体の仕組みを解明 (<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infgen/nsmb2013>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 恒治 (NAGAO KOJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・講師

研究者番号: 60426575

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし