

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871129

研究課題名(和文)ポリコーム群によるヒストンH2Aユビキチン化の局在と役割

研究課題名(英文)Role and localization of Polycomb-mediated histone H2A ubiquitination

研究代表者

遠藤 充浩 (Endoh, Mitsuhiro)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：40391883

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)：ヒストンH2AのE3ユビキチンリガーゼであるポリコーム群Ring1A/Bが、標的遺伝子をどのように認識して結合するかについて、PRC1複合体とMBLR複合体に注目した研究を行った。PRC1複合体については、PRC2複合体によるヒストンH3-K27トリメチル化修飾を認識するクロモドメイン蛋白質Cbx2/7とRing1A/Bが相互結合することによって発生制御遺伝子へリクルートされることが分かった。一方、MBLR複合体については転写因子Max/Mgaに依存して減数分裂関連遺伝子の転写開始点周辺へリクルートされ、Ring1A/BのH2Aモノユビキチン化活性を介して転写抑制に寄与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is still unclear how Polycomb group proteins Ring1A/B, E3 ubiquitin ligases for histone H2A, recognize and bind to their target genes. In this study, we focused on Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and MBLR complex, both of which include Ring1A/B. We found that the physical interaction of Ring1B with chromo-domain proteins Cbx2/7, which have an affinity for PRC2-mediated trimethylated histone H3-K27, is essential for PRC1 recruitment to the developmental regulator genes. On the other hand, MBLR complexes recognize and bind to genes related to meiosis dependently on transcription factors Max/Mga, and repress those target genes through Ring1A/B-mediated H2A monoubiquitination.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 クロマチン 転写制御 遺伝子発現 胚性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

DNA が巻き付くヒストンは、アセチル化・メチル化・ユビキチン化など様々な化学修飾を受けており、遺伝子の発現制御においてこれらの化学修飾が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。これら化学修飾の作用メカニズムを解明することにより、細胞の増殖・分化・ガン化など様々な生命現象を制御する技術創出へ資することが期待されている。しかしながら、ヒストンが受ける化学修飾は非常に多岐にわたっており、その分子メカニズムや各生命現象における役割の全容解明にはまだ至っていないのが現状である。

ポリコーム群は元来ショウジョウバエにおいて体の前後軸や体節を決定するホメオティック遺伝子の発現抑制状態を維持する働きをもつ遺伝子として同定された。ポリコーム群遺伝子にコードされる蛋白質は主要な 2 つの複合体、すなわち 1~2MDa の PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) と約 600 kDa の PRC2 を形成する。これらは固有のヒストン修飾活性を持ち、PRC2 は E(z) / Ezh2 を介してヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) を、PRC1 は dRing / Ring1A/B を介して H2A の 119 番目のリジン残基のモノユビキチン化(H2AK119u1)を行う。

これまでに応募者は、PRC1 に含まれるヒストンユビキチン化酵素 Ring1A/B のコンディショナル欠損マウスや ES 細胞を作成し、発生初期にポリコーム群の機能解析を行ってきた。その結果、Ring1A/B が数多くの発生制御遺伝子の転写抑制に関与し、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)。さらに Ring1A/B による H2A ユビキチン化がこれら標的遺伝子の転写抑制に必須のステップであることも明らかにした (Endoh et al., *PLoS Genetics*, 2012)。これまで PRC1 の標的結合は PRC2 による H3K27me3 修飾に依存するとされてきたが、PRC2 欠損 ES 細胞においても Ring1A/B による標的部位の H2A ユビキチン化が起こることが最近明らかになり (未発表データ、Tavares L et al., *Cell*, 2012)、Ring1A/B がゲノム上の標的部位をどうやって認識してユビキチン化するのかについては依然不明である。また、ユビキチン化 H2A が遺伝子の転写抑制をどのようにして行うのかについてもよく分かっていない。

応募者は Ring1B のタンパク質複合体の解析結果から、Ring1A/B が PRC1 複合体だけでなく E2F6 複合体や Bcor-Fbx110 複合体にも含まれることを見出しており、Ring1B に結合するいくつかの分子についてはすでにコンディショナル欠損マウスや ES 細胞の作成を進めている。さらに Ring1B のアミノ酸配列のうち標的結合に必要な部位をすでに明らかにし (図 1) その部位へ結合する分子の同定も進めている (図 2)。本研究ではこれらの

解析をさらに進めることにより、ポリコーム群 Ring1A/B のヒストンユビキチン化活性の制御メカニズムや、ユビキチン化 H2A の局在・役割の解明を目指す。

2. 研究の目的

ポリコーム群は、胚の前後軸形成、細胞の増殖・分化・ガン化など様々な生命現象に関わるクロマチン制御因子である。我々はマウスポリコーム群 Ring1A/B がヒストン H2A のユビキチン化を介して、発生関連遺伝子の転写抑制に関わることを報告した。しかし、Ring1A/B がヒストンユビキチン化の標的遺伝子をどうやって見つけるのか、またユビキチン化 H2A がどのように遺伝子の転写抑制に寄与するのかについては、よく分かってない。本研究では、Ring1A/B に結合するタンパク質に注目し、Ring1A/B の局在やユビキチン活性を制御する仕組みを明らかにする。さらに、ユビキチン化 H2A を認識して結合する分子の同定を行い、ポリコーム群による遺伝子発現制御におけるユビキチン化 H2A の作用機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Ring1A/B の C 末部位が標的遺伝子への結合に必須であることが分かっている。本研究では Ring1B の C 末部位に結合する分子を同定し、C 末部位を欠損した Ring1B との融合タンパク質を作成することによって、どの分子が Ring1B 機能のリクルートに関与し得るのかについて解析を行う。

(2) Ring1A/B が含まれる PRC1 複合体もしくは MBLR 複合体のそれぞれを欠損した ES 細胞を準備して、各複合体が標的としている遺伝子の同定や Ring1A/B を標的遺伝子へリクルートする分子機構の解析を行う。

4. 研究成果

(1) PRC1 複合体の構成因子のうち、Cbx2 と Cbx7 が Ring1B の C 末部位へ結合することを確認した。そこで、Cbx2/7 と C 末部位を欠損した Ring1B[Ring1B(dC)] の融合蛋白質 Cbx2/7-Ring1B(dC) の発現ベクターを作成し、これを Ring1A/B コンディショナル欠損 (Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; Rosa26::CreERT2) ES 細胞へ導入して安定発現株を樹立した。コントロールとして Cbx2/7, Ring1B(dC) をそれぞれ単独で発現する細胞株も樹立した。タモキシフェン投与により内在性の Ring1B を除去すると、Cbx2/7, Ring1B(dC) はいずれも単独では標的とする発生制御遺伝子へ結合できなかったが、Cbx2-Ring1B(dC) と Cbx7-Ring1B(dC) は標的遺伝子へ結合して転写抑制に寄与することが出来ることが分かった。また Cbx2-Ring1B(dC) に比べて Cbx7-Ring1B(dC) の方が標的遺伝子への結合能力が高いことも分かった。さらに、Ring ドメイン内の点変異により酵素活性を失った Ring1B(dC/I53S) と Cbx7 の融合蛋白質

Cbx7-Ring1B(dC/I53S)を発現する細胞株を樹立して同様の実験を行った結果、Cbx7-Ring1B(dC/I53S)は標的遺伝子へ結合することは出来るものの、転写抑制に寄与することが出来ないことも分かった。以上よりPRC1複合体については、ヒストンH3の27番目のリジン残基のトリメチル化修飾(H3K27me3)を認識するクロモドメインを有するCbx2/7とRing1A/Bが相互結合することによって発生制御遺伝子へリクルートされることが分かった。

(2)ヒストンH2Aに対するモノユビキチン化酵素活性を有するポリコム群遺伝子産物Ring1A/Bが、標的遺伝子をどのように認識して結合するかを明らかにするため、Ring1A/Bと結合してPRC1複合体を形成するMel18/Bmi1(PcGF2/4)、Ring1A/Bと結合して固有の複合体を形成するMBLR(PcGF6)のそれぞれを欠損したES細胞を準備し、Ring1Bの標的遺伝子への結合状態についてChIP-seq解析を行った。野生型ES細胞においてMel18は数多くの発生関連遺伝子へRing1Bと共に結合しており、Mel18/Bmi1重欠損ES細胞では、これらMel18結合遺伝子へのRing1B結合レベルが大きく低下していることが分かった。一方、MBLRは減数分裂に関連する遺伝子の転写開始点周辺へRing1Bと共に結合し、MBLRをコンディショナルに欠損させると、これらMBLR結合遺伝子におけるRing1B結合とH2Aモノユビキチン化修飾が殆ど消失することが分かった。さらに、H3K27me3修飾を行う活性を有するPRC2複合体を欠損させたES細胞(Eed欠損ES細胞)において同様の解析を行った結果、PRC2欠損によりMel18結合遺伝子へのRing1B結合レベルが低下する一方で、MBLR結合遺伝子へのRing1B結合は影響を受けないことが分かった。以上の結果から、Ring1Bをリクルートする仕組みとしてPRC2-PRC1経路とMBLR経路の少なくとも2通りが存在し、それぞれ固有の標的遺伝子を制御していることが明らかになった。MBLR経路の分子機構をさらに追究するため、MBLRが結合するDNA配列の特徴を調べたところ、Eボックスが高頻度に含まれることが分かった。また、MBLR複合体には転写因子MaxとMgaが含まれており、これらのいずれかをノックダウンさせるとMBLRの標的遺伝子への結合レベルが大きく低下することが分かった。すなわち、MBLR複合体はその構成因子である転写因子Max/Mgaに依存して標的遺伝子の配列を認識して結合し、Ring1BによるヒストンH2Aモノユビキチン化を介して転写抑制に寄与することが示唆された。以上によりRing1BのヒストンH2Aモノユビキチン化修飾活性を標的遺伝子へリクルートする新規の分子機構の存在とその詳細が明らかになった。

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2件)

- (1) Arner E, Daub CO, Vitting-Seerup K, Andersson R, Lilje B, Drabløs F, Lennartsson A, Rønnerblad M, Hrydziuszko O, Vitezic M, Freeman TC, Alhendy AM, Arner P, Axton R, Baillie JK, Beckhouse A, Bodega B, Briggs J, Brombacher F, Davis M, Detmar M, Ehrlund A, Endoh M, Eslami A, Fagiolini M, Fairbairn L, Faulkner GJ, Ferrai C, Fisher ME, Forrester L, Goldowitz D, Guler R, Ha T, Hara M, Herlyn M, Ikawa T, Kai C, Kawamoto H, Khachigian LM, Klinken SP, Kojima S, Koseki H, Klein S, Mejhert N, Miyaguchi K, Mizuno Y, Morimoto M, Morris KJ, Mummery C, Nakachi Y, Ogishima S, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov D, Passier R, Patrikakis M, Pombo A, Qin XY, Roy S, Sato H, Savvi S, Saxena A, Schwegmann A, Sugiyama D, Swoboda R, Tanaka H, Tomoiu A, Winteringham LN, Wolvetang E, Yanagi-Mizuochi C, Yoneda M, Zabierowski S, Zhang P, Abugessaisa I, Bertin N, Diehl AD, Fukuda S, Furuno M, Harshbarger J, Hasegawa A, Hori F, Ishikawa-Kato S, Ishizu Y, Itoh M, Kawashima T, Kojima M, Kondo N, Lizio M, Meehan TF, Mungall CJ, Murata M, Nishiyori-Sueki H, Sahin S, Nagao-Sato S, Severin J, de Hoon MJ, Kawai J, Kasukawa T, Lassmann T, Suzuki H, Kawaji H, Summers KM, Wells C; FANTOM Consortium, Hume DA, Forrest AR, Sandelin A, Carninci P, Hayashizaki Y. Gene regulation. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science*. 347:1010-1014.(2015) doi: 10.1126/science.1259418. 査読有り
- (2) FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJ, Haberle V, Lassmann T, Kulakovskiy IV, Lizio M, Itoh M, Andersson R, Mungall CJ, Meehan TF, Schmeier S, Bertin N, Jørgensen M, Dimont E, Arner E, Schmidl C, Schaefer U, Medvedeva YA, Plessy C, Vitezic M, Severin J, Semple C, Ishizu Y, Young RS, Francescato M, Alam I, Albanese D, Altschuler GM, Arakawa T, Archer JA, Arner P, Babina M, Rennie S, Balwiercz PJ, Beckhouse AG, Pradhan-Bhatt S, Blake JA, Blumenthal A, Bodega B, Bonetti A, Briggs J, Brombacher F, Burroughs AM, Califano A, Cannistraci CV, Carbajo D, Chen Y, Chierici M, Ciani Y, Clevers HC, Dalla E, Davis CA, Detmar M, Diehl AD, Dohi T, Drabløs F, Edge AS, Edinger M, Ekwall K, Endoh M,

Enomoto H, Fagiolini M, Fairbairn L, Fang H, Farach-Carson MC, Faulkner GJ, Favorov AV, Fisher ME, Frith MC, Fujita R, Fukuda S, Furlanello C, Furino M, Furusawa J, Geijtenbeek TB, Gibson AP, Gingeras T, Goldowitz D, Gough J, Guhl S, Guler R, Gustincich S, Ha TJ, Hamaguchi M, Hara M, Harbers M, Harshbarger J, Hasegawa A, Hasegawa Y, Hashimoto T, Herlyn M, Hitchens KJ, Ho Sui SJ, Hofmann OM, Hoof I, Hori F, Huminiecki L, Iida K, Ikawa T, Jankovic BR, Jia H, Joshi A, Jurman G, Kaczowski B, Kai C, Kaida K, Kaiho A, Kajiyama K, Kanamori-Katayama M, Kasianov AS, Kasukawa T, Katayama S, Kato S, Kawaguchi S, Kawamoto H, Kawamura YI, Kawashima T, Kempfle JS, Kenna TJ, Kere J, Khachigian LM, Kitamura T, Klinken SP, Knox AJ, Kojima M, Kojima S, Kondo N, Koseki H, Koyasu S, Krampitz S, Kubosaki A, Kwon AT, Laros JF, Lee W, Lennartsson A, Li K, Lilje B, Lipovich L, Mackay-Sim A, Manabe R, Mar JC, Marchand B, Mathelier A, Mejhert N, Meynert A, Mizuno Y, de Lima Morais DA, Morikawa H, Morimoto M, Moro K, Motakis E, Motohashi H, Mummery CL, Murata M, Nagao-Sato S, Nakachi Y, Nakahara F, Nakamura T, Nakamura Y, Nakazato K, van Nimwegen E, Ninomiya N, Nishiyori H, Noma S, Noma S, Noazaki T, Ogishima S, Ohkura N, Ohimiya H, Ohno H, Ohshima M, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov DA, Pain A, Passier R, Patrikakis M, Persson H, Piazza S, Prendergast JG, Rackham OJ, Ramilowski JA, Rashid M, Ravasi T, Rizzu P, Roncador M, Roy S, Rye MB, Saijyo E, Sajantila A, Saka A, Sakaguchi S, Sakai M, Sato H, Savvi S, Saxena A, Schneider C, Schultes EA, Schulze-Tanzil GG, Schwegmann A, Sengstag T, Sheng G, Shimoji H, Shimoni Y, Shin JW, Simon C, Sugiyama D, Sugiyama T, Suzuki M, Suzuki N, Swoboda RK, 't Hoen PA, Tagami M, Takahashi N, Takai J, Tanaka H, Tatsukawa H, Tatum Z, Thompson M, Toyodo H, Toyoda T, Valen E, van de Wetering M, van den Berg LM, Verado R, Vijayan D, Vorontsov IE, Wasserman WW, Watanabe S, Wells CA, Winteringham LN, Wolvetang E, Wood EJ, Yamaguchi Y, Yamamoto M, Yoneda M, Yonekura Y, Yoshida S, Zabierowski SE, Zhang PG, Zhao X, Zucchelli S, Summers KM, Suzuki H, Daub CO, Kawai J, Heutink P, Hide W, Freeman TC, Lenhard B, Bajic VB, Taylor MS, Makeev VJ, Sandelin A, Hume DA, Carninci P, Hayashizaki Y. A promoter-level mammalian expression atlas.

Nature.507:462-470.(2014) doi:
10.1038/nature13182. 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

遠藤充浩、信賀順、遠藤高帆、古関明彦
MBLR-PRC1 ポリコム複合体による減
数分裂遺伝子のエピジェネティック制御
第 37 回日本分子生物学会年会(パシフィ
コ横浜、神奈川県横浜市) 2014 年 11 月
27 日

遠藤充浩、信賀順、遠藤高帆、古関明彦
Role of an atypical Polycomb Repressive
Complex 1 (PRC1) involving MBLR and
Mga/Max in repressing meiosis-related
genes in mouse ES cells 第 12 回幹細胞シ
ンポジウム(九州大学医学部百年講堂、
福岡県福岡市) 2014 年 05 月 30 日-31 日

遠藤充浩、信賀順、遠藤高帆、古関明彦
MBLR-assembled atypical Polycomb
Repressive Complex 1 (PRC1) is directed to
meiosis-related genes by Max/Mga and
drives PRC2 recruitment 第 8 回日本エピジ
ェネティクス研究会年会(伊藤国際学術
研究センター、東京都文京区) 2014 年 05
月 25 日-27 日

遠藤充浩「ヒト iPS 細胞を用いた低線量
放射線影響の研究」第 148 回原医研セミ
ナー(広島大学原爆放射線医科学研究所)
2014 年 2 月 5 日

遠藤充浩、信賀順、遠藤高帆、古関明彦
Max/MBLR axis recruits atypical Polycomb
Repressive Complex 1 (PRC1) to repress
germ cell-related genes in mouse ES cells
NGS 現場の会第三回研究会(神戸国際
会議場) 2013 年 9 月 4 日~5 日

遠藤充浩、信賀順、遠藤高帆、古関明彦
Max/MBLR axis recruits atypical Polycomb
Repressive Complex 1 (PRC1) to repress
germ cell-related genes in mouse ES cells
第 61 回 NIBB コンファレンス "Cellular
Community in Mammalian Embryogenesis"
(岡崎コンファレンスセンター) 2013 年
7 月 10 日~12 日

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/ims/dev_genet/

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤充浩 (MITSUHIRO ENDOH)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・客員研究員

研究者番号：40391883

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：