

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460379

研究課題名(和文)ポリコーム群リクルートメント後の遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Study for stable recruitment of Polycomb-repressive complex-1 on its target loci

研究代表者

磯野 協一 (Isono, Kyoichi)

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：90323435

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)：幹細胞特性に関わるクロマチン作用因子ポリコーム群複合体PRC1(Cbx2、Ring1b、Me118、Phc2)がどのように自身の標的遺伝子を認識し、安定的にそこに留まるかは十分に理解されていない。遺伝子改変マウスを用いた本研究結果は、PRC1成分のCbx2が持つDNA結合モチーフAT-hookがヒストン修飾因子Ring1bの局在化に重要であるばかりでなく、PRC1による遺伝子抑制にも必要であることを示唆した。この発見は、幹細胞研究の発展に貢献すると信じている。

研究成果の概要(英文)：Polycomb-repressive complex-1 (PRC1) including Cbx2, Ring1b, Me118, and Phc2 are a chromatin regulator that plays central roles in stem cell identities. Little is known about the mechanisms of how PRC1 is stably recruited to its target gene loci. Cbx2 has an amino acid sequence typical to a DNA-binding motif AT-hook, suggesting a key player for PRC1 recruitment. Using mouse genetic approach, we here show that Cbx2 AT-hook is responsible for not only stable recruitment of Ring1b to target genes but also PRC1-mediated gene repressions. Our findings would provide new insights into stem cell regulations.

研究分野：発生生物学、分子生物学、エピジェネティクス

キーワード：発現制御 ヒストン修飾 ポリコーム

### 1. 研究開始当初の背景

細胞由来の複合体解析や *in vitro* 系の解析から、4つの PRC1 成分 Cbx2、Ring1b、Mell18、Phc2 は、化学量論的に複合体形成するとされていた。Cbx2 は抑制的ヒストンマーカー H3K27me3 を認識する活性を持つことから、Cbx2 が PRC1 の標的遺伝子への局在に重要であると考えられていた。しかしながら、近年の ChIP 解析から得られるクロマチン上の 4 分子の比率は化学量論的ではないことが示唆されていた。とりわけ、Ring1b が他の 3 分子より多く検出されていた。

### 2. 研究の目的

PRC1 の標的遺伝子座への局在化は、従来から知られている化学量論的タンパク質間結合を介する様式とそれとは異なる様式が介在していると推察される。前者は、Cbx2 の N 末端にあるクロモドメインと呼ばれるアミノ酸配列が H3K27me3 を認識するという事実で説明されているが、後者は未同定である。Cbx2 には、クロモドメインの直ぐ下流に DNA 結合モチーフ AT-hook に似た配列がある。この AT-hook が別様式で PRC1 局在化に関与している可能性がある。本研究では、Cbx2 AT-hook の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Cbx2 AT-hook の DNA 結合活性の検証： リコンビナント AT-hook およびその点変異型を大腸菌での発現系を使って精製する。それらタンパクの DNA および RNA への結合性をゲルシフトアッセイで確認する。

(2) AT-hook 点変異によるクロモドメイン-H3K27me3 結合への影響を調査： Cbx2 クロモドメインと AT-hook を含むリコンビナント GST 融合タンパクと標識された H3K27me0-3 ペプチドとの GST プルダウンアッセイをおこなう。

(3) Cbx2 AT-hook 点変異型マウスの作製： ES 細胞を介する従来法により目的の点変異

マウスを作製する。AT-hook 点変異型 Cbx2 が正規発現しているかを確認するためにマウス胚を使った免疫沈降法/ウエスタン解析をおこなう。

(4) PRC1 による遺伝子抑制への影響を評価 (mRNA 発現解析)： ポリコム群変異マウスのほとんどは、Hox 遺伝子の脱抑制とそれに伴う背骨形成異常を発症する。加えて、Cdkn2a 遺伝子の脱抑制による細胞早期老化を引き起こす。そのような表現型が起こっているかを調査する。

(5) 標的遺伝子座に局在する PRC1 レベルの調査 (ChIP 解析)： マウス胚の頭部 (PRC1 による Hox 抑制アリ) と尾部 (PRC1 による Hox 抑制ナシ) を使って PRC1 成分に対しての ChIP 解析をおこなう。

(6) 核質画分およびクロマチン画分における Cbx2-Ring1b 相互作用の評価： マウス胚核抽出物を核質画分 (可溶性) とクロマチン画分 (不溶性) とに分ける。クロマチン画分は超音波処理によって可溶化する。各画分を使って Cbx2 抗体による免疫沈降をおこない、Ring1b 抗体でウエスタン解析する。

### 4. 研究成果

(1) リコンビナント AT-hook は DNA にも RNA にも結合したが、AT-hook 点変異型はどちらにも結合しなかった。したがって、Cbx2 AT-hook は DNA のみならず RNA にも結合することが判明した。さらに Poly(dI-dC) および tRNA を用いた競争阻害実験から Cbx2 AT-hook 結合は、DNA よりもむしろ RNA に高い優位性を示した (図 1)。

(2) GST-クロモドメイン+AT-hook タンパクとその AT-hook 点変異型は、どちらも H3K27me3 に結合した。またその結合は RNA が反応液に存在していたとしても影響を受けなかった。したがって、AT-hook の機能は H3K27me3 認識とは独立しているようである。

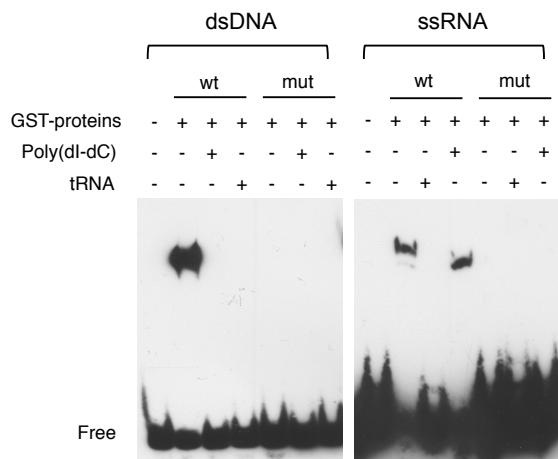


図1 GST-AT-hook融合分子のゲルシフトアッセイ  
AT-hook (wt) はDNA(左)とRNA(右)に結合するが、そのDNAへの結合は過剰量のtRNAによってさえ解除される。一方、RNA結合はDNA結合阻害物Poly(dI-dC)によっては損なわれない。この結果は、AT-hookとRNAのより高い親和性を示唆している。

(3) Cbx2 AT-hook 点変異マウスを作製した。作製したヘテロ変異マウスからホモ個体を得た。ホモ個体は雄雌ともに生殖能力があることから、生命維持に関わる重篤な異常を呈さないことがわかった。AT-hook 点変異型 Cbx2 は適正に発現していることも確認した。

(4) マウス 10.5 日胚の頭部と尾部から RNA を精製し、Hoxb 遺伝子の発現レベルを定量解析した。点変異型でそれら遺伝子の脱抑制を確認した。新生仔の骨標本を作製したところ、点変異型で 100%の背骨形成異常を確認した。この表現型は Hoxb 遺伝子の発現異常で説明可能である。マウス 12.5 日胚から繊維芽細胞を樹立し、細胞増殖度と Cdkn2a 遺伝子の発現を調べた。点変異型細胞では、Cdkn2a の発現上昇とそれによって引き起こされる早期老化現象を呈した。以上の結果から、Cbx2 AT-hook はポリコーン群による遺伝子抑制機能に必要であることが明らかとなった。

(5) AT-hook 点変異が機能不全となる原因を調べるために Hoxb および Cdkn2a 領域へのリクルートメントをマウス 10.5 日胚頭部で ChIP 解析した。まず Cbx2 と点変異型とに違いがなかった。同複合体成分の Phc2 も違いが見られなかった。しかし、Ring1b の局在量は点変異型で有意に減少していた。こ

の Ring1b 減少が遺伝子の脱抑制の原因の一つであることが示唆された。

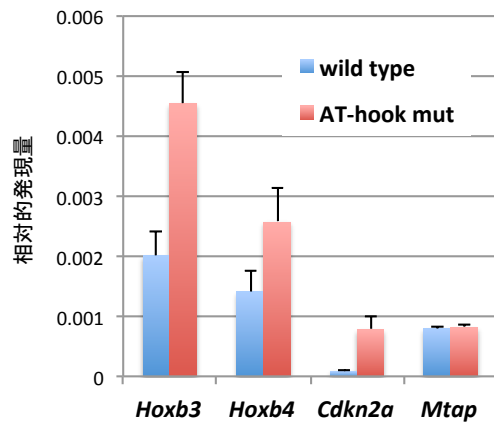


図2 マウス胚頭部での発現解析(RT-qPCR法)  
AT-hook点変異マウスでは、ポリコーン群標的遺伝子Hoxb3、Hoxb4、Cdkn2aが脱抑制している。Mtapは非標的遺伝子である。データはActb発現量で補正。

(6) Ring1b は Cbx2 の C 末領域に結合する。標的遺伝子座上での Ring1b 減少が、Cbx2-Ring1b 結合能の異変によるものかを調べるために、9.5 日胚を使った免疫沈降法をおこなった。まず全細胞抽出物を使った実験では、野生型と点変異型とで Cbx2 と結合している Ring1b 量に違いがなかった。ついで、核質画分とクロマチン画分とに分けて同様の実験をおこなった。その結果、Cbx2 結合性 Ring1b は点変異型クロマチン画分で半減していた。一方、核質画分では違いはなかった。これら結果を考察すると、Cbx2 点変異型と Ring1b とのタンパク質間結合は正常であるにも関わらず(核質画分の結果から)、クロマチン上では Cbx2 点変異型-Ring1b 相互作用が損なわれていることになる。すなわち、標的遺伝子座上に特異的な Cbx2-Ring1b 間接的相互作用を示唆している。では何が Cbx2-Ring1b 相互作用の架け橋となっているか? 上述したように AT-hook は RNA 結合性であることから、その有力な候補分子である。RNA の関与を検証するために、RNase 処理した核質およびクロマチン画分を免疫沈降した。しかしながら、現在までにその効果による変化を確認することができていない。目的の仲介分子の同定を今後の課題とし

て、引き続き RNA に注目していくとともに、クロマチン高次構造も視野に入れるべきだと考える。

ポリコーム群による遺伝子抑制は幹細胞機能に不可欠である。この事実はポリコーム群機能の状況依存性とそれを可能にする多様なポリコーム群の機能発現様式を強く示唆している。ポリコーム群の標的遺伝子座局在もその1つであり、決して全か無かの法則ではなく、弾力的な抑制レベルを発揮できるように段階的調節あるいはバッファリングシステムが介在していると考ええる。本研究成果は、Cbx2 による Ring1b の標的遺伝子座局在が従来のタンパク質間結合とは別の様式でなされていることを示唆している。したがって、本研究をさらに発展されることで、幹細胞の分化や多能性およびホメオスタシス維持に働く“fine-tuning”機構を正確に理解したいと思う。これは再生医療やがん治療に貴重な情報を与えると信じている。

#### 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 2 件)

① Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K et al. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program. Genes Dev, 査読有り, 30, 2475-2485, 2016.

② Kondo T, Isono K et al. Polycomb potentiates Meis2 activation in midbrain by mediating interaction of the promoter with a tissue-specific enhancer. Dev Cell, 査読有り, 28, 94-101, 2014.

[学会発表] (計 3 件)

① 磯野協一、遺伝毒性ストレスによって誘導されるポリコーム群リン酸化の DNA 修復への関与、日本分子生物学会年会・日本生化学会年会、2015 年 12 月 4 日、神

戸ポートアイランド・神戸

② 磯野協一、Hox コリニアリティーを支える分子メカニズム、日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜・横浜

③ Isono K, A step toward understanding the Hox gene collinearity. Mouse Molecular Genetics Meeting, 30th Sep 2014, Pacific Grove, USA.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野 協一 (ISONO KYOICHI)

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 : 90323435