

研究報告書

「細胞運命に関わるポリコーム群制御の切り換え機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 磯野 協一

1. 研究のねらい

ポリコーム群と呼ばれるクロマチン作用タンパク質因子は、発生やがん化など様々な細胞系譜の決定に深く関わっている。ポリコーム群の機能は遺伝子発現に対して抑制的で、ヒストン H3K27トリメチル化 (H3K27me3) やヒストン H2A モノユビキチン化 (H2Aub1) を触媒することやクロマチン高次構造変換を誘導することが知られている。次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析では、ポリコーム群が発生・分化や細胞増殖に関わる遺伝子群を標的とし、それを“可逆的”に抑制していることが示された。このことは、適正なシグナルに応答して遺伝子発現が切り換わるようにポリコーム群の機能が制御されていることを示している。しかしながら、ポリコーム群による遺伝子抑制とその可逆性についての分子メカニズムは解明されていない。確かに、ゲノムワイド解析は不活性化遺伝子座上でのポリコーム群および H2Aub1、H3K27me3 の存在を表しているが、その一方で、活性化状態の遺伝子座上でもそれらは有意に検出されている。したがって、ポリコーム群の遺伝子座への局在は抑制のための必要条件ではあるが十分条件ではない。

我々はポリコーム群が細胞核内で形成する PcG body と呼ばれる構造体に注目してきた。一連の解析により、マウス胚繊維芽細胞 (MEF) において PcG body は、不活性化状態の標的遺伝子座上に存在し、クロマチン凝集と遺伝子抑制に重要であること示していた。PcG body 形成は、その構成成分 Phc2 の持つ自己重合活性に依存することも突き止めていた。さらに興味深いことに、PcG body 形成と Phc2 のリン酸化が相関していることにも気づいた。これらの結果にもとづいて、PcG body 形成の促進とその解体が、ポリコーム群標的遺伝子の発現スイッチングに直結し、それにはリン酸化シグナルが関与していると推察した。したがって、ポリコーム群による細胞の運命コントロールを理解する一環として本研究では、まず PcG body による遺伝子制御の普遍性を明示し、そして PcG body 形成を制御する分子機構を解明することを目的とした。加えて、PcG body のサイズ制御も調査した。

2. 研究成果

(1) 概要

ポリコーム群遺伝子抑制機能に作用するシグナル制御を解明するために PcG body を実験対象とした3つの研究テーマ、A「PcG body 制御モデルの普遍性の証明」、B「リン酸化によるポリコーム群機能制御の解明」、C「PcG body のサイズ制御の解明」を提案した。テーマ A では、胚発生過程においても PcG body が重要な役割を果たしていることを示した。テーマ B では、Phc2 のリン酸化部位を同定し、その意義を調査しているところである。テーマ C でサイズ制御に関わると期待していた Phc2 の HD1 ドメインからはポジティブな結果は得られなかったが、PcG body の安定化と遺伝子抑制に重要であることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ A「PcG body 制御モデルの普遍性の証明」

培養細胞レベルで PcG body 形成による遺伝子抑制モデルを提唱していた。このモデルの普遍性を検証するために胚発生過程の組織を使って、PcG body 形成と *Hoxb* 遺伝子領域のクロマチン状態との関係を調査した。まず発生 9.5 日胚において *Hoxb* クラスターの 3' 側にある *b3* や *b4* 遺伝子は頭部では発現していないが尾部では発現している、一方、5' 側に位置する *b13* 遺伝子は胚全体で不活性的であることを定量的 PCR によって確認した。この結果はこれまでの報告に一致する。これら発現状態と PcG body との相関を調べるために発生 9.5 日胚の頭部間充織と尾部間充織の Immuno-DNA-FISH 解析をおこなった。DNA-FISH 用プローブとして *b3/4* を含む領域と *b13* 領域を用い、Ring1b 抗体によって PcG body を検出した。3 次元画像解析の結果、頭部領域では PcG body、*b3/4* 領域、*b13* 領域は共局在しており、尾部では *b3/4* 領域と *b13* 領域は離れた位置にあり、*b13* 領域にのみ Ring1b シグナルが重なっていた。一方、PcG body 形成不全となる Phc2-SAM 点変異マウス胚の頭部領域では、*b3/4* 領域と *b13* 領域との 2 点間距離は野生型と比べ大きくなっていったが、尾部では同程度であった(図 1)。発現に関して、*b4* および *b13* は点変異型頭部で脱抑制していたが、尾部では変化していなかった。これらの結果は、PcG body 形成が *Hoxb* 領域のクロマチン凝集と発現抑制にリンクしていることを示した。したがって、PcG body 制御モデルは細胞レベルのみならず胚発生過程の遺伝子制御にも適用されていることが明らかとなった。なお、尾部で *b13* が抑制されているのは、PcG body 制御とは別の分子機構に依存していると考えられる。この結果の一部は、非公開データとして論文に記載された(Isono et al., Dev Cell 2013)。

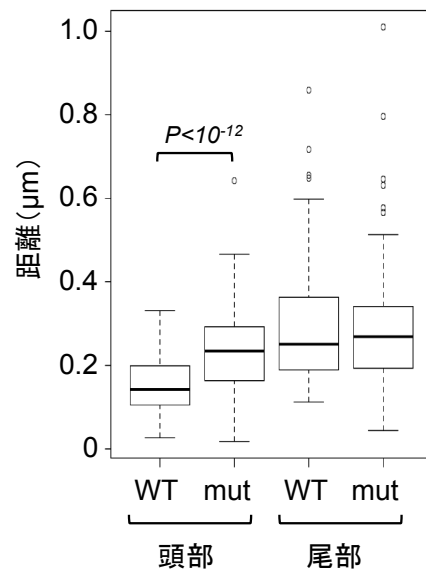


図1 *Hoxb3/4*と*b13*領域との2点間距離
野生型(WT)とPhc2-SAM点変異型(mut)
の9.5日胚切片で計測した。

研究テーマ B「リン酸化によるポリコーム群機能制御の解明」

PcG body 形成不全となる Phc2-SAM 点変異型細胞では、Phc2 の脱リン酸化が確認されていた。そこで Phc2 リン酸化とポリコーム群機能は相関関係にあると考えた。その調査のためにヒト培養細胞で安定的あるいは一過的に強制発現させたマウス Phc2 のリン酸化部位を同定した(横浜市立大学・木村弥生先生との共同研究)。その結果として合計 8 カ所のリン酸化部位を決定したが、当該部位の点変異型 Phc2 を用いた実験からどのリン酸化部位も PcG body 形成には不必要であることがわかった。そこで別角度から Phc2 リン酸化の意義を追求した。

一般的に刺激応答的に起こるリン酸化に生理学的意義が見いだされている。そこで安定発現した Phc2 ではリン酸化されていないが、細胞にとってストレスである一過的強制発現した Phc2 でリン酸化される部位に着目した。配列コンセンサスから 1 つのリン酸化部位が DNA 損

傷応答に関わる ATR/ATM/DNA-PK の標的であることが示唆された。最近、DNA 損傷応答とポリコーン群との関係が報告されている。それは DNA 損傷部位にポリコーン群が集積するという現象であるが、その意義はまだ明らかにされていない。Phc2 リン酸化がその解明の端緒となると考え、調査を進めた。期待通り、新規に作成した Phc2 リン酸化部位特異的抗体を用いた実験から Phc2 は DNA 損傷誘導的に活性化される ATM によってリン酸化されることが示唆された(図 2A)。またそのリン酸化 Phc2 は PcG body にも検出されることから、ポリコーン群機能に影響を与える可能性が示された(図 2B)。Phc2 リン酸化の役割をより良く理解するために、当該アミノ酸部位の点変異マウスを作製した。点変異ホモマウスは、メンデルの法則に従って生まれるため少なくとも胚発生は正常であると考えられる。このことは ATM ノックアウトマウスでさえ生存可能であることから予想された結果である。しかし ATM ノックアウトマウスは不稔性であることから Phc2 点変異マウスの稔性については確認する必要がある。生殖は DNA 損傷との闘いである。Phc2 点変異マウスの生殖組織での異常は十分に考えられる。現在、Phc2 リン酸化のポリコーン群遺伝子抑制機構および DNA 修復機構への貢献を調査しているところである。

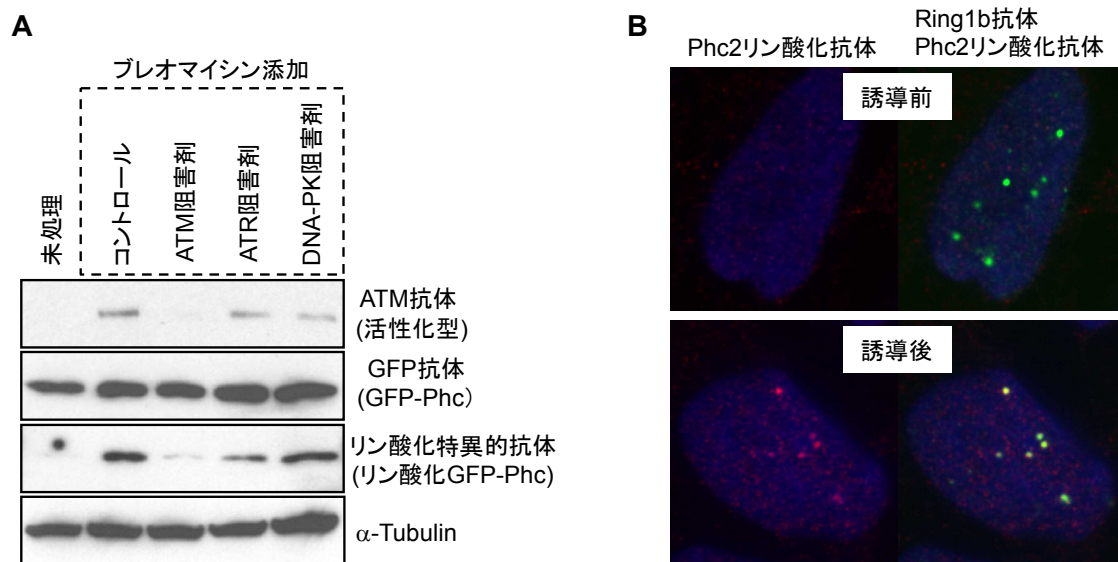


図2 DNA損傷誘導によるPhcリン酸化

(A) GFP-Phc発現HeLa細胞にDNA損傷誘導剤プレオマイシンを添加。30分後に表示の抗体によるウエスタン解析。阻害剤処理はプレオマイシン添加の2時間前から。

(B) U2OS細胞の抗体免疫染色実験。プレオマイシン添加後30分でリン酸化Phc2がPcG body (Ring1b抗体で標識)で検出されるようになる。

本件の別アプローチとして、キナーゼ siRNA ライブラリを持ち用いたスクリーニングをおこなった。そのスクリーニングでは、GFP-Phc2 を発現するヒト培養細胞での PcG body 形態を指標とした1次スクリーニングに続き、2次スクリーニングとしてMEFにおけるポリコーン群標的遺伝子 *Cdkn2a* 遺伝子の発現変化を追跡した。その結果として、細胞周期関連およびエネルギー代謝系のキナーゼが顕著に同定された。この結果の重要性は十分に認識しているが、時間配分の関係で本研究をここで一時的に中断した。

研究テーマ C「PcG body のサイズ制御の解明」

Phc2-SAMドメインの重合は'head-to-tail'型であるが、それを反映したPcG bodyは一定の大きさで存在している。この事実は、SAM重合度合いが適切に制御されていることを示唆している。Phc2のN末にある保存配列HD1ドメインを欠いた変異型を発現させると、PcG bodyが巨大化することから(図3A)、HD1がSAM重合にネガティブに働いていると期待した。またHD1ドメインのコード領域を含まないPhc2転写産物もデータベース登録されており(AK128821)、さらにそれに相当する分子量のPhc2を免疫沈降法によってマウス胚から検出することができた。その低分子Phc2はHD1領域を認識する抗体ではウエスタン検出できないことから、確かにそれはHD1欠損型と判断した。したがって、Phc2 HD1欠損型は生理的条件下で存在し、HD1を含む完全型と競合あるいは協調しながらPcG bodyのサイズを適切にしていると考えた。この仮説を証明するために完全型Phc2の開始コドンに変異を入れたノックインマウスを作製した。ホモマウス胚の免疫沈降実験から、完全型は消失し、HD1欠損型は残っていることを確認した(図3B)。ホモマウス個体は、ポリコム群機能不全に特徴的な背骨後方化異常を示した。ホモ胚由来MEFのPcG bodyを免疫蛍光染色により可視化してみたところ、期待に反してPcG bodyの巨大化は起こっておらず、むしろ*Phc2*^{-/-}細胞と同じくPcG bodyの縮小が観察された(図3C)。このPcG bodyの縮小は、その成分バランスが崩れたことが原因であると考えられる。なぜならHD1はRing1bやMel18との直接的な結合ばかりでなくRing1b/Cbx2相互作用にも重要であるからである(図3B; Isono et al., Dev Cell 2013のFig. S3)。したがって、HD1ドメインはPcG bodyを安定化させることで遺伝子抑制に貢献していることが示唆された。Phc2 HD1欠損型の役割は不明であるが、少なくともポリコム群による遺伝子抑制には必ずしも必要でないことがわかった。本研究結果は、当初の仮説に従うものではなかったがHD1ドメインの機能的重要性については示すことができた。Phc2にはもう一つの保存配列であるFCSドメインが存在するが、その点変異型はPcG body形成に影響しなかった。したがって、SAM重合には自己制御能はなく、他の因子によって制御されていると考えられる。

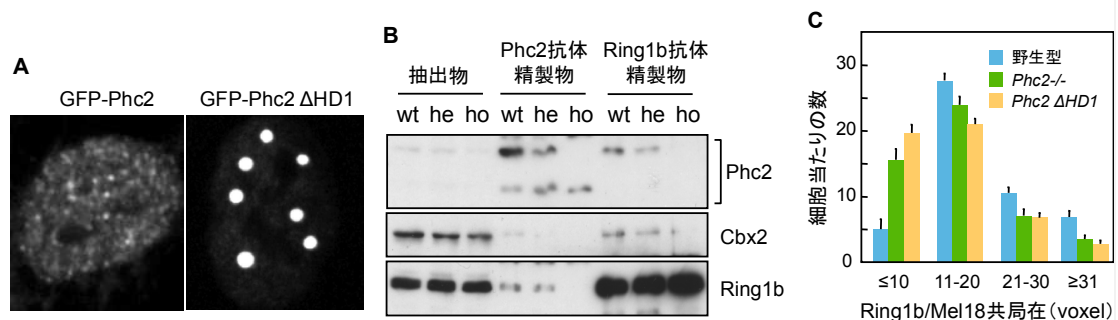


図3 Phc2 HD1ドメインの機能解析

(A) GFP-Phc2およびそのHD1欠損型を安定に発現したHeLa細胞のライブ画像。

(B) 野生型(wt)、*Phc2* ΔHD1ヘテロ(he)、ホモ(ho)胚の免疫沈降実験。Phc2およびRing1b免疫沈降産物からPhc2、Cbx2、Ring1bをウエスタン検出。Phc2バンドの上段は完全型Phc2、下段はHD1欠損型Phc2を表す。ホモ胚では完全型Phc2(上段バンド)が欠失している。

(C) PcG bodyにおけるRing1b/Mel18共局在の3次元画像解析。野生型、*Phc2*^{-/-}、*Phc2* ΔHD1ホモ細胞(各n=13)においてRing1bとMel18が共局在する領域のトップ50の体積を算出した。*Phc2*^{-/-}、*Phc2* ΔHD1細胞では共局在レベルが下方にシフトしている。

3. 今後の展開

研究テーマ A

Phc2-SAM 点変異由来 MEF では PcG body はほぼ完全に消失する。しかしながら、本研

究で観察した胚組織切片では、PcG body と言えるほどの大きさの Ring1b foci を多数検出した。この foci は Phc2 非依存的に形成される構造体として 4 次元環境下では維持されるのかもしれない。最近、Ring1b は Cbx2/4 や Phc1/2 を含まないが RYBP を含む複合体としても存在することが報告されている。Phc2-SAM 変異で観察された Ring1b foci はそのような Ring1b-RYBP 複合体を表しているのかもしれない。もしそうなら、この発見は現在理解されていない“Ring1b/Cbx/Phc 複合体と Ring1b-RYBP 複合体の機能的相違”の説明に役立つと考える。また、なぜ Ring1b-RYBP 複合体が SAM 重合を介さずに PcG body 様構造体をとれるのかも興味深い。今後は、この観点から Phc2-SAM 点変異マウスを有効活用していきたい。

研究テーマ B

DNA 損傷応答機構にポリコーム群がどのように貢献しているか？ これは DNA 情報維持とエピジェネティクスとのコラボレーションの1つとして世界的に注目されている。本研究で発見した DNA 損傷誘導的な Phc2 リン酸化を解析することで DNA 損傷応答におけるポリコーム群の役割を解明できると信じている。また DNA 損傷部位でのポリコーム群集積も一種の PcG body である。この集積に Phc2 リン酸化が関与することも期待される。

キナーゼ siRNA スクリーニングから得られたエネルギー代謝に関わるキナーゼは、ポリコーム群によるがん化のメカニズムに関与している可能性がある。今後は、この観点から研究を再開したいと思う。

研究テーマ C

PcG body のサイズ調節、言い換えれば、Phc2-SAM 重合の制御には、Phc2 HD1 ドメインによって自己制御されているという仮説を立て解析を進めたが、その仮説は否定された。したがって、他のポリコーム群あるいは非ポリコーム群分子によって制御されていると考えられる。研究テーマ B で実施したキナーゼ siRNA スクリーニングによって同定されたキナーゼは、その目的因子となるかもしれない。この観点から研究を進めたいと思う。

本研究では、Phc2 HD1 ドメインが PcG body の安定化を介してポリコーム群抑制機能に貢献しているということを遺伝学および生化学的に示すことができた。この成果を論文にまとめたいと思う。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、PcG body 形成を介した遺伝子発現制御を主流として位置づけ、その分子メカニズムを PcG body 形成に関わるシグナルや因子の同定によって説明しようとした。まだ直接的な証拠を掴んでいないが、その候補となるリン酸化部位やキナーゼを同定することができた。今後の展開次第で、目的を達成することもできるし、さらに当該リン酸化の生理学的意義も示すことができると信じている。特に、DNA 損傷応答する Phc2 リン酸化やポリコーム群機能に関与すると期待されるエネルギー代謝系キナーゼの同定は、がん治療の観点からも非常に興味深い。発生学的に PcG body による遺伝子制御を再現できたこと、その解析から Phc2-SAM 非

依存的な PcG body 様構造体の可能性を示したこと、また、Phc2 HD1 ドメインの重要性を提示できたことも評価に値すると思う。反省すべき点は、結果的に 3 つの研究テーマを関連づけられなかったことである。時間配分と重要度を考慮し取舍選択をしていれば、本研究期間内に「PcG body 形成を介した遺伝子発現制御」の本質に迫れたかもしれない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ポリコーム群が細胞核内で形成するポリコムボディー(PcG body)と呼ばれる構造体に着目し、PcG body による遺伝子抑制の普遍性とそれに作用するシグナル制御の解明を試みた。その結果、PcG body 制御モデルが細胞レベルのみならず個体発生レベルでも普遍的に適用されることが分かった。ついでポリコーム群 Phc2 のリン酸化は PcG body 形成には影響しなかったが、リン酸化の遺伝子抑制ならびに DNA 修復機能への関与の可能性を示した。

ポリコーム群による遺伝子発現の抑制機構として、PcG body 制御モデルの普遍性を明らかにした功績は大きい。さらに DNA 損傷に応答した Phc2 リン酸化およびそのリン酸化が抑制的効果を発揮し得るという結果は、遺伝情報維持とエピジェネティック制御の機能的リンクの端緒を開くものであり、今後の分子メカニズムの解明を期待する。その一方、PcG body 形成を制御する分子機構は未解決のままであり、分化やがん化などでの遺伝子発現スイッチングの仕組みを明らかにするためにもその解明は急務である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Kondo T, <u>Isono K</u> , Kondo K, Endo TA, Itohara S, Vidal M, Koseki H. RING1 activates Meis2 by mediating interaction of its promoter with a tissue-specific enhancer. <i>Dev Cell</i> (in press) |
| 2. <u>Isono K</u> , Endo TA, Ku M, Yamada D, Suzuki R, Sharif J, Ishikura T, Toyoda T, Bernstein BE, Koseki H. SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. <i>Dev Cell</i> 26, 565–577 (2013). |
| |
| |
| |

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

磯野協一 「Role of Phc2 phosphorylation in PcG-mediated gene repressions」、日本エピジェ

ネティクス研究会、奈良(2013年6月)

磯野協一 「遺伝子サイレンシングにおけるポリコーム群 Phc2 リン酸化の役割」、第35回日本分子生物学会、博多(2012年12月)

Isono K. “Gene silencing by the in vivo dynamics of Polycomb repressive complex PRC1” The 25th Mouse Molecular Genetics Meeting, Pacific Grove, CA(2012年10月)

Isono K. “Roles of Phc2 polymerization in Polycomb repressive functions” The 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama (2012年6月)

磯野協一 「Gene silencing by the dynamics of Polycomb group complexes」、第44回日本発生生物学会、沖縄(2011年5月)

著作物

磯野協一 「ポリコーム群による遺伝子抑制とエピジェネティック治療への貢献、遺伝子医学MOOK、25、37-42 (2013)

プレスリリース

「細胞の運命を左右する新しい分子メカニズムの一端を解明」

2013年10月1日 理化学研究所発表