

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) エピジェネティクスによるエンハンサー動態制御メカニズムの解明と細胞機能制御への応用
(英語) Elucidation of epigenetic mechanisms that limit enhancer activity and their application to control cellular functions

研究開発担当者 (日本語) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
免疫器官形成研究グループ グループディレクター 古関 明彦

所属 役職 氏名： (英語) Haruhiko Koseki, Group Director, Laboratory for Developmental Genetics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) エピジェネティクスによるエンハンサー動態制御メカニズムの解明と細胞機能制御への応用

開発課題名： (英語) Elucidation of epigenetic mechanisms that limit enhancer activity and their application to control cellular functions

研究開発分担者 (日本語) 神奈川科学技術アカデミー 未病改善食品評価法開発プロジェクト 近藤 隆
所属 役職 氏名： (英語) Takashi Kondo, Assistant Leader, Project on Health and Anti-aging, Kanagawa Academy of Science and Technology

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

我々は、異型ポリコム群のひとつである PCGF6-PRC1 複合体がマウスの胚性幹（ES）細胞や初期胚において果たす役割を明らかにしました。ポリコム群は主要なエピジェネティック因子のひとつで、その遺伝子産物はヒストン修飾活性を持った複合体を形成し、標的とする遺伝子群の発現制御に寄与します。我々は、ポリコム群 RING1A/B がヒストン H2A のモノユビキチン化修飾（H2AK119ub1）活性を介して発生や分化に関わる遺伝子群の転写抑制を行い、マウス ES 細胞の未分化性維持に関わることを発見して報告してきました（2008 年、2012 年）。しかしながら、RING1A/B がどうやって標的遺伝子を認識して結合するかについては部分的にしか解明されておらず、依然として不明な点が多く残っています。近年 RING1A/B は従来型 PRC1 の他に類似する複数の複合体を形成することが分かってきました。PCGF ファミリー遺伝子産物 PCGF1-6 のいずれか一つを含む 6 種類の PRC1 複合体が存在します。本研究では PCGF6 を含む PRC1 複合体（PCGF6-PRC1）の作用発現機序を明らかにするため、Pcgf6 遺伝子の欠損マウスと ES 細胞を作成し、PCGF6-PRC1 の生物活性や標的遺伝子の同定、および作用機構の解明を行いました。

まず PCGF6-PRC1 複合体がマウス ES 細胞においてどのようなゲノム領域に結合するかを明らかにするため、ChIP-seq 解析を行いました。その結果、従来型 PRC1 が強く結合する発生や分化に関わる遺伝子群には殆ど結合せず、生殖細胞に関連する遺伝子群に強く結合することが分かりました。次に PCGF6 の機能を調べるために、Pcgf6 遺伝子を欠損させたマウス ES 細胞を作成しました。その結果、Pcgf6 遺伝子を欠損させるとこれら生殖細胞関連遺伝子が脱抑制し、ES 細胞の増殖が阻害されることが分かりました。PCGF6 が標的遺伝子を認識する仕組みについて洞察を得るため、PCGF6 が結合する DNA 配列の特徴を調べたところ、bHLH 型転写因子が結合する配列（E ボックス）が高頻度に含まれることが分かりました。PCGF6 複合体に bHLH 型転写因子 MAX/MGA が含まれることから、我々は PCGF6 複合体による標的遺伝子の認識にこれらの転写因子が関与する可能性を検証しました。その結果、ES 細胞内で MAX または MGA の発現を低下させると、PCGF6 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りました。さらに、TetR-MAX 融合タンパク質を人工的に TetO 配列に結合させると、PRC1/PRC2 によるヒストン修飾活性（H2AK119ub1 および H3K27me3）が誘導されました。従って、PCGF6 は転写因子 MAX/MGA に依存して標的遺伝子を認識して結合することが明らかになりました。またこのような PCGF6-PRC1 複合体による生殖細胞関連遺伝子群の抑制は、ES 細胞由来の始原生殖細胞様細胞（PGC-like cell: PGCLC）への分化や、マウスの正常な胚発生に寄与することも分かりました。本研究により PCGF6-PRC1 複合体が他の PRC1 とは違ったユニークな分子機構によって標的を認識することが解き明かされました。生殖細胞関連遺伝子の転写開始点付近に MAX/MGA の認識配列が共通して存在すること、その遺伝子発現調節が生殖細胞ではない多能性幹細胞の増殖や胚発生に関わることも本研究が明らかにした重要なポイントです。

Polycomb group (PcG) proteins are evolutionarily conserved epigenetic repressors of developmental genes. PcG-mediated gene silencing involves at least two distinct enzymatic activities directed to histone tails: the first mediates Histone H2A mono-ubiquitination at K119 (H2AK119ub1) by the polycomb repressive complexes 1 (PRC1), while the second mediates H3 tri-methylation at K27 (H3K27me3) by the polycomb repressive complex 2 (PRC2). The molecular complexity underlying PcG-mediated gene silencing could be partly explained by the diversity of the PCGF factors (from PCGF1 to PCGF6) that directly associate with RING1A/B proteins. The ring finger protein PCGF6 (polycomb group ring finger 6) interacts with RING1A/B and E2F6 associated factors to form a non-canonical PRC1 (polycomb repressive complex 1) known as PCGF6-PRC1. Interestingly, PCGF6-PRC1 includes sequence-specific DNA binding proteins such as E2F6, MAX, MGA and TFDP1. This suggests that such DNA binding proteins could play a role in sequence specific recruitment of PCGF6-PRC1 to target loci; however, this notion has not been experimentally validated.

In this study, we therefore purified the PCGF6-PRC1 complex and examined the contribution of PCGF6 to ESC maintenance and embryonic development. We demonstrate that PCGF6 mediates repression of target genes by recruiting RING1B and facilitating H2AK119ub1. Taking advantage of a *Pcgf6* conditional allele, we show that PCGF6 and RING1B common targets are enriched for meiosis- and germ cell-related genes in ESCs, and that such genes are robustly de-repressed in the absence of PCGF6 (*Pcgf6*-KO). Importantly, silencing of germ cell-related genes by PCGF6 likely plays a role in proliferation and growth of ESCs. We further demonstrate that PCGF6 is involved in pre- and peri-implantation mouse development. Indeed, loss of *Pcgf6* leads to pleiotropic defects in vivo, including aberrant axial development and impaired placenta formation. We also reveal a unique recruitment mechanism amongst PRC1 complexes whereby PCGF6-PRC1 utilizes its MGA and MAX components as a heterodimeric DNA binding module to directly recognize and repress expression of germ cell- and meiosis-related genes to support ESC maintenance and embryonic development.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 8件)

1. Si S, Nakajima-Takagi Y, Aoyama K, Oshima M, Saraya A, Sugishita H, Nakayama M, Ishikura T, Koseki H, Iwama A. Loss of *Pcgf5* Affects Global H2A Monoubiquitination but Not the Function of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *PLoS One* 11, e0154561 (2016)
2. Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P, Brind'Amour J, Sun M-A, Sun Z, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y, Nakanishi M, Xie H, Lorincz MC, Koseki H. Activation of Endogenous Retroviruses in

- Dnmt1-/- ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA. *Cell Stem Cell* 19, 81-94 (2016)
3. Grijzenhout A, Godwin J, Koseki H, Gdula MR, Szumska D, McGouran JF, Bhattacharya S, Kessler BM, Brockdorff N, Cooper S. Functional analysis of AEBP2, a PRC2 Polycomb protein, reveals a Trithorax phenotype in embryonic development and in ESCs. *Development* 143, 2716-2723 (2016)
 4. Tsuchiya Y, Naito T, Tenno M, Maruyama M, Koseki H, Taniuchi I, Naoe Y. ThPOK represses CXXC5, which induces methylation of histone H3 lysine 9 in Cd40lg promoter by association with SUV39H1: implications in repression of CD40L expression in CD8+ cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 100, 327-338 (2016)
 5. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Aburatani H, Takayama KI, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T. Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1. *Mol Cell* 64, 176-188 (2016)
 6. Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program. *Genes Dev* 30, 2475-2485 (2016)
 7. Jullien J, Vodnala M, Pasque V, Oikawa M, Miyamoto K, Allen G, David SA, Brochard V, Wang S, Bradshaw C, Koseki H, Sartorelli V, Beaujean N, Gurdon J. Gene Resistance to Transcriptional Reprogramming following Nuclear Transfer Is Directly Mediated by Multiple Chromatin-Repressive Pathways. *Mol Cell* 65, 873-884.e8 (2017)
 8. Endoh M, Endo TA, Shinga J, Hayashi K, Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A, Klose RJ, Koseki H. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *Elife* 6. pii: e21064 (2017)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 形態形成のエピジェネティック制御, 口頭, 古関明彦, 秋田大学大学院医学系研究科・医学部セミナー, 2016/6/7, 国内
2. PCGF6-PRC1 to suppress premature activation of meiosis/germ cell related genes in ES cells, 口頭, 古関明彦, Basel Stem Cell Network, Freidrich Miescher Institute, 2016/6/23, 国外
3. PCGF6-PRC1 to suppress premature activation of meiosis/germ cell related genes in ES cells, 口頭, 古関明彦, Seminar at Trinity College, Oxford University, 2016/6/27, 国外
4. Polycomb in transcriptional phase transition of developmental genes, 口頭, 古関明彦, Mini Symposium, Genetic Control of Mouse embryonic Development at Hubrecht Institute, 2016/6/30, 国外

5. Regulation of promoter/enhancer interaction of Meis2 by KDM2B, 口頭, 古関明彦, Centro de investigaciones Biológicas (CSIC), 2016/11/7, 国外
6. The role of PRC1 variants during activation of Meis2, 口頭, 古関明彦, Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, 2016/11/11, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 三毛猫にsigmaがないわけ, 古関明彦, 理化学研究所科学講演会, 2017/2/25, 国内

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) エピゲノム成立の分子メカニズム解明と制御
(英語) Molecular mechanisms and manipulation of the epigenome
establishment

分担研究 (日本語) エピジェネティクスによるエンハンサー動態制御メカニズムの解明と細胞機
制御への応用

開発課題名： (英語) Elucidation of epigenetic mechanisms that limit enhancer activity and
their application to control cellular functions

研究開発分担者 (日本語) 神奈川科学技術アカデミー 未病改善食品評価法開発プロジェクト
近藤 隆

所属 役職 氏名： (英語) Takashi Kondo, Assistant Leader, Project for Development of Food
Functionality Assessment Methods, Kanagawa Academy of Science and
Technology

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：理化学研究所・統合生命医科学研究センター・古関明彦 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Shinozaki F, Abe T, Kamei A, Watanabe Y, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Arai S, Kumagai K, Kondo T, Abe K. Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species. *Genes Nutr* 11, 21 (2016)
2. Kamei A, Watanabe Y, Shinozaki F, Yasuoka A, Shimada K, Kondo K, Ishijima T, Toyoda T, Arai S, Kondo T, Abe K. Quantitative deviating effects of maple syrup extract supplementation on the hepatic gene expression of mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* 61,15 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Enhancer action on a developmental regulatory gene repressed by Polycomb, 口頭, 近藤隆、近藤香、梶下紘貴、伊藤伸介、阿部啓子、古関明彦, 秋田大学大学院医学系研究科・医学部セミナー, 2016/6/7, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

なし