

ポリコーム複合体による転写抑制機構と細胞分化や発生における役割

梶下 紘貴^{1,2}, 古関 明彦¹

1. はじめに

我々の体は、同じゲノムDNAを持つさまざまな種類の細胞から構成されている。これは、もともとは受精卵という一つの細胞を起源とし、細胞分裂と細胞分化を繰り返すことでさまざまな組織を構成する細胞種が産生されるからである。同じゲノムDNAを持つ細胞から異なる性質の細胞を産み出すプロセスを理解する上で重要なのが、細胞種ごとに発現する遺伝子のON・OFFの制御をつかさどるエピジェネティックな転写制御機構である。転写のON・OFFの制御はDNAメチル化やヒストン修飾とそれに関連するクロマチン因子などによってノンゲノミックな機構で制御されている。

ゲノムDNAはヒストンに巻きついたヌクレオソーム構造をとっており、ヒストンがアセチル化、メチル化、ユビキチン化などさまざまな修飾を受けることでクロマチンの構造が変化し、転写因子などのクロマチン因子の接近のしやすさが変化することで遺伝子の発現制御が起こる。ヒストンのアセチル化は修飾自体がヌクレオソームに電荷の変化を与えることで転写の活性化に関わっているとされる。一方、ヒストンのメチル化は、その修飾を受けるアミノ酸残基の位置によって関係するクロマチン因子の種類が異なる

ため、発現制御に与える影響もさまざまである。たとえば、ヒストンH3の4番目のリシン残基のトリメチル化(H3K4me3)はトライソラックス群タンパク質によって修飾され、転写の活性化と関連することが知られている。本稿で焦点を当てるポリコーム複合体はヒストンH3の27番目のリシン残基のトリメチル化(H3K27me3)の修飾と認識に関わり、これは抑制に関わることが知られている。

2. ポリコーム群タンパク質と転写制御

ポリコーム群タンパク質(PcG)は、ポリコーム複合体(Polycomb repressive complex: PRC)として作用し、特に分化・発生関連遺伝子群の転写抑制に重要な役割を担う。ポリコーム複合体は哺乳類ではDNA配列特異性がないが、CpGアイランドと呼ばれる保存性の高いCpGリッチな領域に集積し、ヒストンの翻訳後修飾などを介して転写抑制に寄与すると考えられている。哺乳類の遺伝子の50~70%程度がプロモーター領域にCpGアイランドを持つとされ、これには多くの分化・発生関連遺伝子が含まれる。

ポリコーム複合体はその構成因子によって大きくPRC1、PRC2の2種類に区分される(図1)。PRC1とPRC2は標的とする遺伝子座に対してそれぞれが異なる修飾をヒストンに付加する役割を持つ。PRC1の活性中心因子であるRING1はヒストンH2Aの119番目のリシンにモノユビキチン(H2AK119ub1)を付加する活性を持ち、PRC2は活性中心因子のEZHがヒストンH3の27番目のリシンにトリメチ

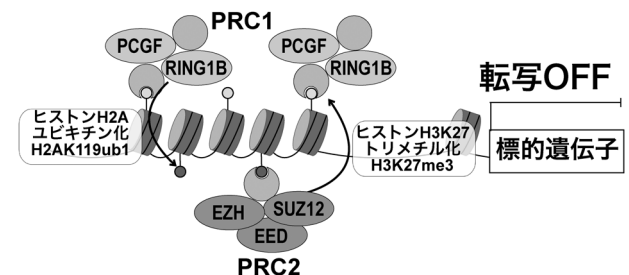


図1 ポリコーム複合体 (PRC1, PRC2) による転写抑制
ポリコーム複合体は抑制性ヒストン修飾 (H3K27me3, H2AK119ub1) の修飾活性因子を構成因子として含む。また、他方のPRCによるヒストンの修飾を認識する因子も持ち、相互にリクルートし合って抑制する遺伝子プロモーター上に集積する。

¹理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チーム (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-11 理化学研究所 北棟N504A)

²東京大学国際高等研究所ニューロインテリジェンス国際研究機構 (WPI-IRC) 後藤研究室 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学薬学部本館3階分子生物学教室 (333-338号室))

The role of Polycomb repressive complex upon cellular differentiation

Hiroki Sugishita^{1,2} and Haruhiko Koseki¹ (¹Laboratory for Developmental Genetics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, N504A, RIKEN, Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan, ²International Research Center for Neurointelligence (IRCIN), Institutes for Advanced Study, The University of Tokyo, Main Bldg. 3F No. 333-338, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940594

© 2022 公益社団法人日本生化学会

ル (H3K27me3) を付加する活性を持つ¹⁾。また、それぞれの複合体はさらにその抑制性ヒストン修飾を認識して結合する機能も有し、たとえばPRC1は構成因子であるCBXがクロモドメインによってH3K27me3を認識して結合し、PRC2はJARID2を介してH2AK119ub1に結合する²⁾ことが報告されており、PRC1とPRC2は互いに他方のヒストンの修飾を認識することで協調的に働き染色体上に集積していると考えられている。

ポリコームが結合する代表的な遺伝子として、発生で体軸を制御するHox遺伝子、各組織で特異的に発現する遺伝子 (脳ではNeurog1など) などがあげられるが、これらの発生関連遺伝子を時期や領域特異的に抑制することで、その細胞に必要な遺伝子だけを発現できるように働いている。発生時期依存的な転写調節の例として、ES細胞ではニューロン分化に必要なSox4やSox11遺伝子はポリコームによって発現抑制状態にあるが、神経前駆細胞ではH3K27me3が外れて発現するようになる。このように、ポリコームは発生関連遺伝子の転写を一時的に抑制することで細胞の分化による遺伝子発現の変化を調節している。

3. ポリコーム複合体のバリエーションとその機能

PRC1やPRC2はその構成因子によってさらに複数のバリエーションに分類される (図2)。PRC1は共通因子RING1と結合するPCGFファミリーの種類 (PCGF1~6) によってPRC1.1からPRC1.6の6種類のサブタイプに分類され、それぞれ特徴的なコファクターを構成因子として含む³⁾。PRC2も構成因子の違いによりPRC2.1とPRC2.2に分類され、機能的な違いがあることが示唆されている。

このようにポリコーム複合体には機能的に異なるさまざまなバリエーションが存在するが、これらがどのようなシチュエーションで機能的な使い分けがあるのか、不明であった。

PRC1の活性中心因子であるRINGはES細胞で遺伝的

に欠損させると標的遺伝子の脱抑制を引き起こす⁴⁾。しかし、6種類のバリエーションにそれぞれ固有に保持されるPCGF因子を単独で欠損させても、ポリコーム群複合体による転写抑制は大きな影響を受けないことが知られていた⁵⁾。また、PCGF1~6をすべて欠損させるとRINGの欠損と同等に標的遺伝子の脱抑制を引き起こす。このことからそれぞれのPRC1バリエーションは遺伝子抑制において補完的に働くことが示唆される。

一方、マウス個体においてそれぞれのPCGF因子を欠損させると、胚性致死、四肢の奇形などそれぞれのPCGFごとに異なる影響を生じる^{6,7)}。このことから、それぞれのPRC1バリエーションには発生や細胞分化の過程においては優位に働くシチュエーションがある可能性が考えられた。しかしそれぞれのPRC1バリエーションがどのようにして細胞分化や発生に関わる遺伝子の転写制御に寄与しているのか、そのメカニズムについて多くは知られていなかった。

筆者らは最近、分化に伴った新規の遺伝子抑制ドメインの確立にはPCGF1を含むPRC1 (PRC1.1) が重要であることを発見した⁸⁾。

細胞分化や発生の際、分化先の細胞で必要になる遺伝子を新規にONにし、不要になる遺伝子を新規にOFFにするという転写状態の変化が起こる。筆者らはPCGF因子がこの転写状態の変化時に特異的に作用する可能性を考え、ES細胞から胚葉体 (embryoid body: EB) に細胞分化を行ったときに「分化により新しく抑制される遺伝子」 (つまりES細胞で発現していて、胚葉体になると抑制される遺伝子) に注目し、それぞれのPCGFを欠損させたときにこの抑制に影響を与えるか解析を行った。

Pcgl1~6のそれぞれを欠損させたマウスES細胞を作製し、胚葉体に分化させ、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) を行ったところ、Pcgl1欠損ES細胞のみで「分化により新しく抑制される遺伝子」の転写抑制が十分に起こらないことを見いだした。次にPCGF1が新しく抑制される遺伝子の発現抑制にどのよう

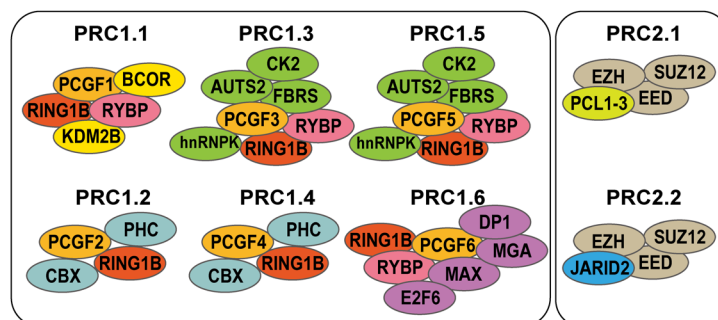


図2 ポリコーム複合体のバリエーション (PRC1.1~1.6, PRC2.1, PRC2.2)

H2AK119ub1 化活性を持つ PRC1 には 6 種類のバリエーションが、H3K27me3 活性を持つ PRC2 にも 2 種類のバリエーションが存在する。それぞれ特徴的な機能のある因子が存在し、特定のシチュエーションで機能すると考えられている。

に寄与するのかを調べるために、胚様体への分化時に転写抑制されてくる遺伝子群におけるポリコーム群タンパク質の結合の変化を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) で解析した。正常のES細胞では、胚様体への分化に伴い新しく抑制される遺伝子はポリコームの集積が起こるのに対し、Pcgfl欠損細胞ではPRC1.1だけでなくPRC2や他のPRC1の集積も大きく障害された。

細胞分化にはさまざまな環境刺激が加わり、環境刺激に依存した間接的な影響を捉えている可能性があった。そこで、細胞分化に伴う二次的な影響を排除し、より直接的にプロモーターの不活性化とポリコーム複合体の結合の関係を調べるために、人工的にサイレンシング (遺伝子発現の抑制) を起こす「ドキシサイクリン (Dox) 誘導性遺伝子抑制システム」を独自に開発した。このシステムでは、ドキシサイクリン (Dox) 誘導性マーカー遺伝子上の薬剤 (Dox) 応答性プロモーターの上流に、ポリコーム複合体への結合領域を組み込むことで転写不活性化に伴うポリコームの集積を誘導することができる。このシステムをPcgfl欠損マウスES細胞に導入し、薬剤誘導的にサイレンシングを起こしたところ、細胞分化で得られた知見と同様に、別のポリコーム複合体であるPRC1.2やPRC2の結合量が大きく減少した。

このことから、ポリコーム複合体PRC1のサブタイプの一つであるPRC1.1 (PCGF1複合体) は転写の不活性化に伴い、クロマチン状態が抑制状態に遷移する際に他のポリコーム複合体 (PRC1.2とPRC2) の集積を促進する役割があることが明らかになった (図3)。つまり、Pcgflが分化により新しく抑制される遺伝子を作り出すのに重要であることが示された。

Pcgflの欠損が発生や細胞分化に与える影響としては、PcgflをノックダウンしたES細胞を分化させると神経系への誘導に影響が出る⁹⁾ ことや全身ノックアウトではE8前後で発生が止まってしまう⁸⁾ こと、ゼブラフィッシュにおいてもPcgflを欠損させると頭部が形成し終脳が形成されないこと¹⁰⁾ などが報告されている。つまりPcgflは細胞の定常状態ではなく、発生や分化というクロマチン状態が遷

移するときに機能することが示唆され、これらのPcgfl欠損による表現型はPRC1.1が新規の抑制ドメインを作り出すことができないことによると考えている。

また、ポリコーム複合体にはポリコームによって修飾されたヒストン (H3K27me3, H2AK119ub1) を認識する機構があり、すでにポリコームが集積している場所にリクルートされる。すなわち細胞分裂などによってヒストン修飾が希釈 (1回の分裂によって細胞のヒストン修飾は半分になる) されたとしても、修飾が残っていればポリコームは集まることが可能である。このことから定常状態の細胞では影響が小さいものであると考えられる。

しかし、修飾の入っていない場所にポリコームを新規にリクルートするためには別の分子機構が必要である。PRC1.1は非メチル化CpGに結合するCXXCドメインを有するKDM2Bを構成因子として持つ¹¹⁾。そのため、PRC1.1が最初に修飾を入れるきっかけになる要素であるのは合理的であるといえるだろう。また、新しく修飾を入れる遺伝子の選択性についてはいまだに明らかになっていないことが多いが、少なくともES細胞から胚様体への分化で新規に抑制される遺伝子にポリコームが集積するのは、積極的にポリコームがくることで抑制されるというよりは、プロモーターが不活性化することが引き金となりポリコームが集まってくるようである^{8,12)}。

PRC1.1以外にもポリコーム複合体にはさまざまなバリエーションがあり、さらにそれぞれがユニークな機能を有する。PRC1.2/1.4はクロモドメインを持つCBXや、クロマチンのコンパクションに関わるPHCなどを特徴的な構成因子として複合体を形成する。PRC1.3/1.5はリボヌクレオタンパク質を構成因子とし、RNA依存的にクロマチン上に結合することが示唆されている¹³⁾。また、PRC1.6は配列特異的な転写因子であるMAXやMGAを構成因子とし、典型的なポリコームの標的とは異なる遺伝子座にもポリコームをリクルートする⁶⁾。

さらにPRC1バリエーションにもさらにホモログが存在する。これらのホモログすべての組み合わせが可能だとすると、約180通りもの種類のポリコーム複合体が存在するこ

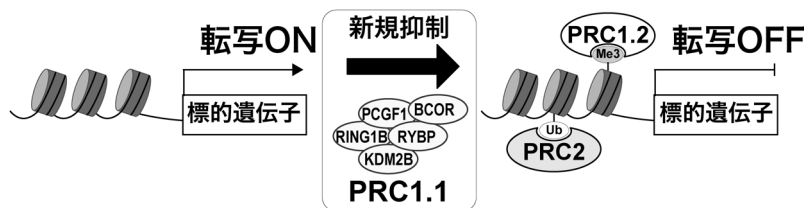


図3 PRC1.1は分化に伴う新規の抑制ドメインの形成時に重要である

筆者らは最近、ES細胞の分化時に起こる新規の抑制ドメインの形成にPRC1.1が重要であることを示した (Sugishita et al. *Nat. Commun.* 2021)⁸⁾。PRC1.1が足場となることで他のPRC (PRC1.2やPRC2) を呼び込み、安定的なサイレンシングをもたらす。

となる。たとえば、PRC1.2やPRC1.4の特徴的構成因子であるPHCにはPHC1, PHC2, PHC3がある。また、CBXにもCBX2, CBX4, CBX6, CBX7, CBX8があるが、それらは機能的ドメインの有無によって異なっており、同じバリエーションに区分されるポリコームの複合体の中でもさらに性質が異なる可能性がある。しかし、ポリコームの数多くの構成因子がどのように制御されるか、どのような特徴的な機能があるかはいまだに明らかになっていないことが多い。これらのポリコーム複合体の構成因子を切り替えるメカニズムとして考えられるものとして、それぞれのポリコーム群タンパク質自体の遺伝子発現があげられる。一部の構成因子は細胞種ごとに発現パターンが異なることが知られており、そのような因子は発現の高い細胞種で影響が出ることが多い。たとえばPCGF5は心臓で特に発現が高く、逆説的にES細胞を用いた心筋への分化誘導系でPcgf5を欠損させると心筋細胞への成熟が促進される¹⁴⁾。また、Pcgf6はES細胞で発現が高い因子であるが、胚性線維芽細胞においてPcgf6をノックダウンし、山中4因子を用いてリプログラミングを行うとiPS細胞へのリプログラミングが阻害されることも報告されている¹⁵⁾。これらのことは細胞の性質を決定する上でそれぞれの細胞種特異的なポリコーム群タンパク質が適切に発現することの重要性を示唆している。

4. おわりに

ポリコームは多くの重要な役割を担っていることがわかるが、実際にどのようにして選択的に遺伝子を抑制し、細胞の性質を決定づけるのかはいまだに明らかになっていない。細胞種や標的遺伝子座ごとにポリコーム複合体としての構成が異なることで遺伝子の発現調節を制御する可能性も考えられる。今後もそれぞれポリコーム群タンパク質の固有の機能の解明、標的の選択性、細胞分化や発生との関わりなどの研究が進むことで転写制御がどのように行われているかの理解が深まることを期待している。

文 献

- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., & Khorasanizadeh, S. (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.*, **17**, 1870–1881.
- Cooper, S., Grijzenhout, A., Underwood, E., Ancelin, K., Zhang, T., Nesterova, T.B., Anil-Kirmizitas, B., Bassett, A., Kooistra, S.M., Agger, K., et al. (2016) Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nat. Commun.*, **7**, 13661.
- Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., & Reinberg, D. (2012) PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol. Cell*, **45**, 344–356.
- Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A.P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., et al. (2008) Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development*, **135**, 1513–1524.
- Fursova, N.A., Blackledge, N.P., Nakayama, M., Ito, S., Koseki, Y., Farcas, A.M., King, H.W., Koseki, H., & Klose, R.J. (2019) Synergy between variant PRC1 complexes defines polycomb-mediated gene repression. *Mol. Cell*, **74**, 1020–1036.
- Endoh, M., Endo, T.A., Shinga, J., Hayashi, K., Farcas, A., Ma, K.W., Ito, S., Sharif, J., Endoh, T., Onaga, N., et al. (2017) PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *eLife*, **6**, e21064.
- Yakushiji-Kaminatsui, N., Kondo, T., Hironaka, K.I., Sharif, J., Endo, T.A., Nakayama, M., Masui, O., Koseki, Y., Kondo, K., Ohara, O., et al. (2018) Variant PRC1 competes with retinoic acid-related signals to repress *Meis2* in the mouse distal forelimb bud. *Development*, **145**, dev166348.
- Sugishita, H., Kondo, T., Ito, S., Nakayama, M., Yakushiji-Kaminatsui, N., Kawakami, E., Koseki, Y., Ohinata, Y., Sharif, J., Harachi, M., et al. (2021) Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes. *Nat. Commun.*, **12**, 5341.
- Yan, Y., Zhao, W., Huang, Y., Tong, H., Xia, Y., Jiang, Q., & Qin, J. (2017) Loss of polycomb group protein Pcgf1 severely compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Sci. Rep.*, **7**, 46276.
- Li, X., Ji, G., Zhou, J., Du, J., Li, X., Shi, W., Hu, Y., Zhou, W., & Hao, A. (2020) Pcgf1 regulates early neural tube development through histone methylation in zebrafish. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 581636.
- Farcas, A.M., Blackledge, N.P., Sudbery, I., Long, H.K., McGouran, J.F., Rose, N.R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T.W., et al. (2012) KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *eLife*, **1**, e00205.
- Riising, E.M., Comet, I., Leblanc, B., Wu, X., Johansen, J.V., & Helin, K. (2014) Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol. Cell*, **55**, 347–360.
- Almeida, M., Pintacuda, G., Masui, O., Koseki, Y., Gdula, M., Cerase, A., Brown, D., Mould, A., Innocent, C., Nakayama, M., et al. (2017) PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science*, **356**, 1081–1084.
- Meng, Y., Liu, Y., Dakou, E., Gutierrez, G.J., & Leys, L. (2020) Polycomb group RING finger protein 5 influences several developmental signaling pathways during the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Growth Differ.*, **62**, 232–242.
- Zdziebło, D., Li, X., Lin, Q., Zenke, M., Illich, D.J., Becker, M., & Müller, A.M. (2014) Pcgf6, a polycomb group protein, regulates mesodermal lineage differentiation in murine ESCs and functions in iPS reprogramming. *Stem Cells*, **32**, 3112–3125.

著者寸描**●梶下 紘貴 (すぎした ひろき)**

東京大学国際高等研究所ニューロインテリジェンス国際研究機構 (WPI-IRCIN) 後藤研究室特任助教. 博士 (医学).

■**略歴** 2014年星薬科大学薬学部創薬科学科卒業. 20年千葉大学大学院医学薬学府 (医学領域) 先端医学薬学専攻修了. 14年より理化学研究所生命医科学研究センターで研修生, 大学院生リサーチアソシエイト, 特別研究員を経て, 20年より現職.

■**研究テーマと抱負** 「ポリコームの発現ダイナミクスと分化ポテンシャルの関係」というテーマで研究に取り組んでおり, 遺伝子が『ONにならないようにしておく』原理を理解することで, 細胞の個性の獲得機構を解明したい.

■**趣味** 釣り, カラオケ.