

## ポリコーン群が構成する核内機能ドメインの機能発現機序

●古関 明彦

千葉大学大学院医学研究院発生生物学

### 〈研究の目的と進め方〉

ポリコーン群タンパク質はホメオチック (Hox) 遺伝子座上で複合体を形成し、体軸に沿ったHox遺伝子の発現抑制に関与することが知られている。しかしながら、近年のマウスポリコーン群の研究は、Hox遺伝子への関与のみならず細胞増殖、免疫系、器官分化、X染色体不活化など様々な細胞内機能に重要な役割を果たしていることを示している。これは種々の遺伝子座がポリコーン群の標的になっていること、そして特定の核内機能ドメインに相互作用していることを示唆している。本研究期間では哺乳類ポリコーン群がどのように複合体を形成し、そしてその複合体がどのような核内機能ドメインおよび標的遺伝子座と相互作用するかを明らかにする。進め方としては、①生化学的および遺伝学的手法を駆使し、ポリコーン群複合体に相互作用するタンパク質を網羅的に探索・同定する。②各ポリコーン群タンパク質の標的遺伝子座への結合様式をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- 1 酵母two-hybridスクリーニング法により、ポリコーン群に結合するタンパク質を同定する。その中から機能的且つ構造的に興味深いものを選別する。その選別されたタンパク質の評価は、物理学的相互作用(マウスモノクローナル抗体を作製し免疫共沈殿法などを行う)および遺伝学的相互作用(その遺伝子のノックアウトマウスを作製し、表現型解析とポリコーン群変異への影響を調べる)によってなされる。
- 2 各ポリコーン群タンパク質の標的遺伝子座への結合様式をクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。

### 〈研究期間の成果〉

- ① ポリコーン群Mell18, Ring1b, Edr2に結合する候補遺伝子として、スプライシング必須因子Sf3b1、リン酸化酵素遺伝子Hipk1, Hipk2, Hipk3を同定し、全てにおいてノックアウトマウスおよびモノクローナル抗体を作製した。Sf3b1とポリコーン群タンパク質の物理学的相互作用を見いだした。Sf3b1, Hipk1, Hipk2ノックアウトマウスはポリコーン群変異と同様の表現型(背骨の後方化異常)を示した。
- ② HoxB8遺伝子に焦点を絞って、ポリコーン群タンパクの結合パターンを、染色体免疫沈降法を用いた解析を行った。Rnf2 (Ring1B), Edr1 (Rae28/Mph1), Ring1 (Ring1A) とCbx2 (M33)に対する抗体を用いて、HoxB7 からHoxB9にわたる領域を解析した結果、Edr1とCbx2は転写の状態に関係なく結合していたが、Rnf2とRng1は転写が抑制されている場合に、その転写調節領域に強く結合していることが示された。このことは、ポリコーン群は、転写の状態に関連なくHox遺伝子座に結合しえ、抑制されている領域ではより完全な複合体が形成されていることを示している。また、転写が抑制されている領域においても、ヒストン

H3K9は顕著にアセチル化されていたことから、ショウジョウバエで観察されたのと同様に転写にコンピテントな領域において、ポリコーン群は転写抑制に寄与していることが示された。このようなエピジェネティックなタグは、8.5日胚では顕著に見られず、9.5日胚以降に見られる。(Fujimura et al., submitted)

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

Sf3b1, Hipk1, Hipk2, Hipk3抗体について、いくつかの研究室に分与した。Hipkノックアウトマウスについては国内の独立した2研究室と共同研究を行っている。新たに開発したマウス初期胚組織を用いたクロマチン沈降法は、きわめて汎用性が高く多くの共同研究を行っている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

クロマチン沈降法をマウス組織に対して用いる場合、抗体を用いた方法では様々な限界があることが明らかになった。今後、ビオチンタグをノックインするなどの方法を開発していく必要があることを痛感した。

### 〈今後の課題〉

ポリコーン群のクロマチン結合をゲノムワイドに行うために、ゲノムタイリングアレイを用いた解析に移行する必要がある。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

(論文)

1. Isono, K., Abe, K., Tomaru, Y., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Koseki, H. (2001) Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for the U2 snRNP component of spliceosome. *Mammalian Genome*.12:192-198
2. .Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. (2001) The role of Presenilin1 during somite segmentation. *Development*.128:1391-1402
3. .Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. (2001) Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes Mell18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development*.128:1587-1597
4. . Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H. and Nakayama, T. (2001) Regulation of Th2 Cell Differentiation by mel-18, a Mammalian Polycomb Group Gene. *Immunity*.15:275-287