

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23810035

研究課題名（和文） ポリコーン転写抑制複合体に結合するRNA分子の網羅的解析とその機能解明

研究課題名（英文） Genome-wide analysis for PRC1-bound RNA molecules.

研究代表者

増井 修 (MASUI OSAMU)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・研究員

研究者番号：30579305

研究成果の概要（和文）：

ポリコーン転写抑制複合体（PRC1/2）はゲノムからの転写を抑制する蛋白質複合体である。PRC1の構成蛋白質である Ring1B に対する抗体を用いて PRC1 に結合する RNA を免疫沈降し、次世代 DNA シークエンサーで解析した結果、これらの Ring1B/PRC1 に結合している RNA 分子群の中には PRC1 の構成因子であるポリコーン群蛋白質の mRNA が有意に濃縮されていた。このことから、PRC1 自身をコードする mRNA 上に PRC1 が結合するという、これまでに知られていなかった新規のメカニズムを介して、細胞内の PRC1 の蛋白質量が調節を受けている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Polycomb repressive complexes (PRC1 and PRC2) are important protein complexes, which carry out epigenetic gene silencing by adding post-translational modifications to Histone proteins. PRC1 and PRC2 have been proposed to execute their transcriptional silencing function through binding with RNA molecules. Using RNA immunoprecipitation combined with next-generation DNA sequencer (RIP-seq) against Ring1B protein, a component of PRC1, we have recently identified those RNA molecules in a genome-wide manner.

Surprisingly, transcripts of many components of PRC1 are included in the Ring1B-bound RNA fractions. These results suggest that the amount of PRC components may be controlled by PRCs themselves, providing a fine-tuning mechanism to maintain constant expression level of PRCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：ポリコーン転写抑制複合体、RNA、RIP

## 1. 研究開始当初の背景

ポリコーン転写抑制複合体（PRC1/2）による標的遺伝子の転写抑制は、ヌクレオソーム構造を過密化することやヒストン蛋白質への翻訳後修飾導入によって為されるエピジェネティックな転写抑制現象の代表的な例であり、ショウジョウバエからヒトにわたる多くの生物種で保存されている。PRC1/2 は標的遺伝子の転写抑制を、細胞特異的に、また細胞分裂を超えて安定に維持することにより、発生段階での各細胞の分化や運命決定に関わっている。

研究代表者らは以前に PRC1 の機能に RNA 分子が関与する事を示していたが、その実体はよく分かっていなかった。それらの RNA 分子群の間で一次塩基配列上または立体構造上のどういった共通点があるのか、それらの RNA 分子が PRC1 をゲノム上の特定部位へ結合させることに重要な役割を果たしているのか、またそれらの RNA 分子が PRC1 の複合体形成や、PRC1 による転写抑制機能に関わっているのか、などは明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では PRC1 に結合するこれらの RNA 分子を解析し、それらの一次構造（塩基配列）を大規模に同定し、それらの RNA

分子に共通する特徴を明らかにする。これにより、PRC1 がゲノム上の特定の標的部位にリクルートされ、近傍に存在する遺伝子の転写抑制を行うメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では RNA immunoprecipitation (RIP) assay と次世代 DNA シークエンサーを組み合わせることにより、マウス ES 細胞において PRC1 に結合する RNA を大規模に同定する。それらの得られた RNA の塩基配列情報に対してバイオインフォマティクス解析を行い、どのような RNA が含まれるのか解析する。それらの RNA の内からいくつかに対してノックダウン実験を行い、PRC1 標的遺伝子への影響を調べることで、それらの RNA の PRC1 に対する役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

2011年度は RIP の実験条件を詳細に検討し、至適条件を決定した。2012年度は、前年度に決定した実験条件下で、PRC1 の構成蛋白質である Ring1B に対する抗体を用いて RIP を行った。Ring1B 欠損 ES 細胞をコントロールとして用いた。得られた Ring1B/PRC1 結合 RNA を HiSeq 2000

DNA シークエンサーで解析し、その情報をさらに統計学的に詳しく分析した結果、これらの Ring1B/PRC1 に結合している RNA 分子群の中には、PRC1 を構成する各ポリコーム群蛋白質の mRNA が有意に濃縮されていることが明らかになった。現在、これらの結果を確かめるための検証実験を行っている。

これらの結果から、PRC1 の構成因子であるポリコーム群蛋白質は自身の転写産物に PRC1 をリクルートしている可能性が示唆された。このことにより、PRC1 はネガティブフィードバック的に自身の過度な転写を抑制することで、細胞内での PRC1 の蛋白質量を一定に保っているのではないかと考えられる。この転写レベルでの PRC1 の細胞内量の調節というメカニズムは、これまでに報告のない全く新しいメカニズムであり、現在、このモデルを検証するための更なる実験を遂行中である。

今後、これらの RNA と PRC1 の細胞内での結合を確認した後に、RNA 側と PRC1 側のそれぞれの結合部位、RNA 側の結合塩基配列に共通する RNA 塩基配列の決定、などを行っていく予定である。

## 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 O' Loghlen A., Muñoz-Cabello A.M., Gaspar-Maia A., Wu H.A., Banito A., Kunowska N., Racek T., Pemberton H.N.,

Beolchi P., Laval F., Masui O., Vermeulen M., Carroll T., Graumann J., Heard E., Dillon N., Azuara V., Snijders A.P., Peters G., Bernstein E., Gil J.

MicroRNA regulation of Cbx7 mediates a switch of Polycomb orthologs during ESC differentiation.

Cell Stem Cell. 2012, vol. 6, 33-46.

(査読有り)

② 増井 修、古関明彦

ポリコーム複合体と染色体・核内構造

細胞工学 2012. vol. 31. 887-893.

(査読無し)

[学会発表] (計 1 件)

① 増井修、Live-cell imaging of X-chromosome inactivation in differentiating ES cells: visualisation of X-inactivation centre locus and Xist RNA、2012 Mouse Molecular Genetics Conference、2012年10月2-6日、Pacific Grove (USA)

〔その他〕（計1件）

- ① 受賞：Genetics Society of America Poster Award.  
(1st position). Mouse Molecular Genetics Conference.  
2012年10月6日、Pacific Grove (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増井 修 (MASUI OSAMU)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研  
究グループ・研究員

研究者番号：30579305

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし