

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25503004

研究課題名(和文) RNA 分子を介したポリコーム複合体作用機構の解明

研究課題名(英文) Role of RNA molecules in the polycomb complex, PRC1

研究代表者

増井 修 (Masui, Osamu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：30579305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、我々は RNA 分子がポリコームタンパク質複合体 (PRC1) を介して標的遺伝子の転写を抑制するメカニズムの解明に取り組んだ。PRC1 構成因子の Ring1B タンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降解析を行い、(1) PRC1 は Xist RNA 及び PRC1 構成因子をコードする mRNA と強く結合する、(2) PRC1 と RNA の結合は Ring1B や Cbx タンパク質を介したのではなく分子量 120 kDa の未知のタンパク質を介する、ことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to address how Polycomb repressive complex 1 (PRC1) suppresses its target genes via RNA molecule(s). We performed the RNA immuno-precipitation (RIP) assay using the antibody against Ring1B protein that is a catalytic subunit of PRC1, and discovered (1) PRC1 (Ring1B) binds to Xist RNA and mRNAs that code components of PRC1 itself, and (2) the binding between PRC1 and these RNAs is not mediated by Ring1B or Cbx proteins but an unknown 120 kDa protein.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ポリコーム複合体 RNA Xist

1. 研究開始当初の背景

ポリコム複合体 (Polycomb repressive complex 1/2: PRC1/2) は、ゲノム上の標的部位に結合して周辺クロマチン構造を変換し、標的遺伝子の転写を抑制するエピジェネティックな転写制御因子である。申請者は研究開始当初までに不活性 X 染色体をモデルとしてポリコム複合体に関する研究を行ってきており、ポリコム複合体 PRC1 の構成因子である Cbx タンパク質が RNA 分子を介して PRC1 のクロマチンへの結合に重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。しかし、どのような RNA 分子種が PRC1 のクロマチンへの結合を媒介しているのかということは明らかになっておらず、それらの詳細を明らかにすることが、ポリコム複合体による転写抑制メカニズムの理解に必須であると考えられていた。

2. 研究の目的

本研究申請では、それらの PRC1 結合 RNA 分子群の詳細を明らかにし、その特徴を解析し、それらの RNA 分子がポリコム複合体による転写抑制機構に果たす役割を明らかにする。近年の報告からヒトやマウスのゲノム DNA はその大部分が何らかの RNA を転写していることが明らかになり、それらの多くは近傍遺伝子の転写を調節する機能を持つと考えられている。本研究では、それらの RNA によるポリコム複合体を介したゲノム DNA の遺伝子転写調節機構の全体像を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PRC1 の構成因子である Ring1B タンパク質に対する抗体を用いた native RIP を行い、PRC1 に結合する RNA を解析する。材料としてマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いる。転写抑制に関わる既知のノンコーディング RNA に対する qRT-PCR を行いそれらの PRC1 への結合を定量解析するほか、次世代シーケンサーを用いてゲノム全体に対する RIP-seq のデータを取得し、それらのスペクトルを解析する。

(2) Native RIP をさらに発展させる形で、紫外線を用いて細胞内で RNA-タンパク質の複合体を架橋固定した後に抗 Ring1B 抗体で沈降する PAR-CLIP 法を行う。PAR-CLIP 法ではより強い洗浄条件を用い

て非特異的結合を減らし、PRC1 に直接結合する RNA 分子種を同定することができる。これを用いて RNA-タンパク質複合体を架橋固定した後に放射性同位元素で RNA を標識し、電気泳動によりタンパク質を分離することで RNA が結合しているタンパク質の分子量を解析する。

4. 研究成果

(1) ポリコム複合体 (PRC1/2) はヒストンの化学修飾を介して標的遺伝子の転写を抑制するエピジェネティックな転写抑制装置である。この機能に RNA 分子が重要な役割を果たしていることが、我々や他のグループのこれまでの研究成果などから強く示唆されている。本研究課題ではポリコム複合体 PRC1 に対する抗体を用いて PRC1 に結合する RNA を免疫沈降する実験 (RNA immune-precipitation: RIP) を行い、これらの機能性 RNA 分子を同定してその役割を明らかにすることを目標とする。実験条件検討の簡便さから、我々はまずタンパク質-RNA 間の化学架橋形成過程を伴わない native RIP の方法を採用し、材料にはマウス ES 細胞を用いた。RIP には PRC1 の構成因子である Ring1B タンパク質に対する IgG 抗体 (抗 Ring1B IgG 抗体) を用い、比較対照としてはマウス正常 IgG を使った RIP を行った。RIP で沈降させた RNA 分子に対して、定量的逆転写 PCR 法 (qRT-PCR) による解析を行い、転写抑制に関与する幾つかの既知のノンコーディング RNA (ncRNA) について調べた結果、哺乳類のメスにおいて不活性 X 染色体の形成過程に必須の ncRNA である Xist RNA が抗 Ring1B 抗体で共沈降されることが明らかとなった (図 1)。このことから、Xist RNA が直接または間接的に Ring1B タンパク質と結合していることが強く示唆された。

我々はさらに native RIP により抗 Ring1B 抗体と共沈降する RNA に対して次世代シーケンサーによる解析 (RIP-seq) を行い、PRC1 (Ring1B) に結合する RNA 分子群をゲノムワイドに同定しようと試みた。その結果、Mga、Tet2、Pcgf1、Pcgf2、Pcgf6、Phc1、Ring1B などの mRNA が、抗 Ring1B 抗体と共沈降する画分に濃縮されていることが明らかとなった (未発表データ)。興味深いことに、上記のうち後ろの 5 つの mRNA はいずれ

もポリコーム複合体 PRC1 を構成するタンパク質をコードしている。我々はこれらのうち Ring1B mRNA についてさらに解析を行い、抗 Ring1B タンパク質抗体で共沈降する画分には、比較対象のマウス正常 IgG 沈降画分に比べて 40 倍程度の Ring1B mRNA の濃縮が見られることを定量的逆転写 PCR 法 (qRT-PCR) による解析で確かめた (図 2)。

このことから、PRC1 がこれらのポリコーム複合体構成因子の mRNA に結合して、それら mRNA の転写や翻訳を調節し、その結果として PRC1 タンパク質の量を一定に保つような働きを行っている可能性が考えられる。現在、この仮説を検証する実験を計画しており、その結果と合わせて論文として発表する予定である。

(2) 次に我々は、PRC1 を構成するどのタンパク質が RNA と結合しているのかを調べるための実験を行った。Ring1B タンパク質には既知の RNA 結合配列が存在していないことから、PRC1 を構成する Ring1B 以外のタンパク質が RNA と直接結合している可能性も考えられる。実際に native RIP では抗 Ring1B 抗体によって PRC1 のタンパク質複合体全体が共沈降することから、他の PRC1 構成タンパク質を介した間接的な RNA との結合の可能性が排除できない。そこで我々は、より直接的な結合を検出できる PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) 法を用いて、PRC1 タンパク質複合体中の RNA 結合因子の同定を試みた。PAR-CLIP は紫外線照射によりタンパク質と RNA の間を架橋させた後に、標的タンパク質に対する抗体を使って結合 RNA を沈降させる実験方法であり、これにより PRC1 と RNA 分子群の直接結合を検出できると期待された。我々は抗 Ring1B 抗体を用いた PAR-CLIP で沈降される RNA を放射性同位元素 (RI) で標識した後に SDS-PAGE で解析を行った。その結果、RI 標識した RNA を含むタンパク質の電気泳動バンドは 120 kDa 付近にのみ検出され、Ring1B の分子量である 40 kDa 付近や以前に RNA との結合が示されている Cbx タンパク質の分子量付近には検出されなかった。このことは RNA と結合する PRC1 内のタンパク質が Ring1B や Cbx では無く、120 kDa の分子量を持つタンパク質であることを強く示唆した。分子

量 120 kDa のタンパク質は PRC1 の構成因子としてはこれまでに報告されていないことから、この分子量を有する未知の PRC1 構成タンパク質が存在し、そのタンパク質を介して RNA 分子が PRC1 に結合することが示唆された。今後、このタンパク質の同定を行いその性状を明らかにしていく予定である。

図 1 抗 Ring1B 抗体を使った RIP 画分中の ncRNA の量を qRT-PCR で解析した

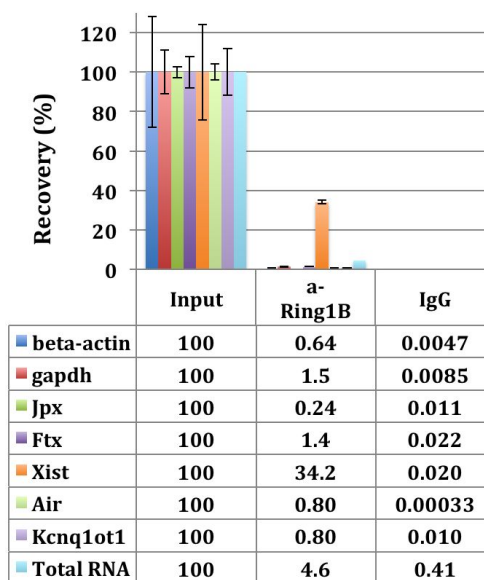
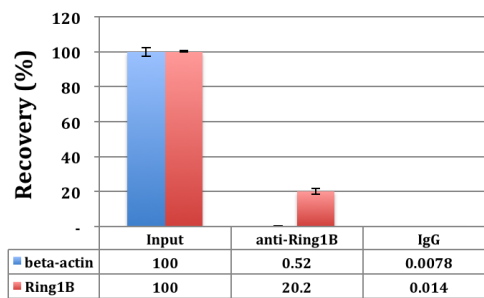


図 2 抗 Ring1B 抗体を使った RIP 画分中の Ring1B mRNA の量を qRT-PCR で解析した



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)

A Pooled shRNA Screen Identifies Rbm15, Spen, and Wtap as Factors Required for Xist RNA-Mediated Silencing. Moindrot B, Cerase A, Coker H, Masui O, Grijzenhout A, Pintacuda G, Schermelleh L, Nesterova TB, *Brockdorff N.

Cell Rep. 2015 vol. 12, 562-72. (査読有)
doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.053.

Cdyl, a New Partner of the Inactive X Chromosome and Potential Reader of H3K27me3 and H3K9me2.
Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Spruijt CG, **Masui O**, Renaud O, Smits AH, Margueron R, *Vermeulen M, *Heard E.
Mol Cell Biol. 2013 vol. 33, 5005-5020.
(査読有)
doi: 10.1128/MCB.00866-13.

〔学会発表〕(計3件)

EMBO|EMBL Symposium
Seeing is believing – Imaging the Processes of Life
EMBL (Heidelberg, Germany)
ポスター発表
2015年10月9日

第53回日本生物物理学会大会
金沢大学(石川県金沢市)
企業共催ランチョンセミナー
招待講演(口頭発表)
2015年9月15日

第66回日本細胞生物学会大会
Symposium “The nucleus; structure, function and physiological roles”
奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
招待講演(口頭発表)
2014年6月11日

〔図書〕(計3件)

増井 修

羊土社
実験医学別冊「超解像イメージングができる！」
2016、1-11

増井 修

羊土社
実験医学増刊号「ノンコーディング RNA テキストブック」
2015、216-222

増井 修 他

メディカル・サイエンス・インターナショナル
「一目でわかる臨床遺伝学」
2014、1-228

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 修 (MASUI, Osamu)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・研究員
研究者番号：30579305