

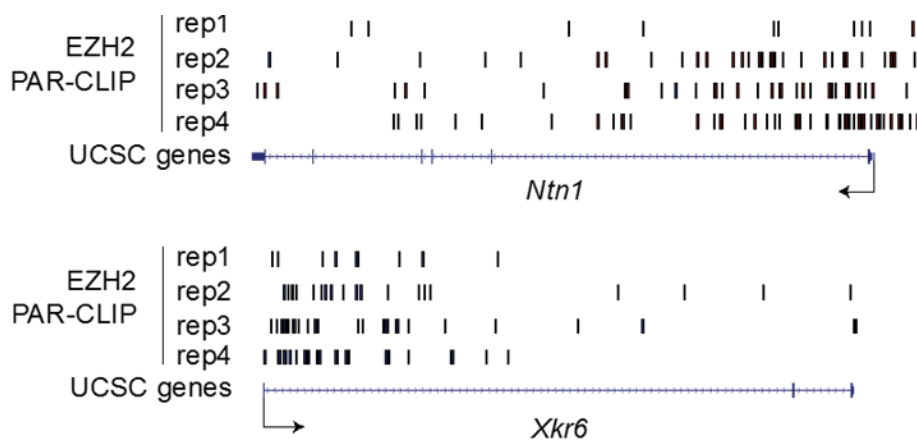
要 旨

ポリコーム抑制複合体 2 (PRC2)の遺伝子サイレンシング活性は、標的遺伝子の転写開始点付近のヒストン H3 のリジン 27 (H3K27) をトリメチル化する能力に依存している。生体内における機能の一つとして、幹細胞の初期の分化過程における、各組織の発生・発達を司る遺伝子群を制御するという極めて重要な役割を担っている。ポリコームタンパク質複合体の機能異常は、癌などの疾患を伴う表現型との関連が数多く示唆されており、次世代の分子標的治療薬の標的候補として、新薬開発が進められている。

一方で、近年のトランスクリプトーム解析により、ヒトゲノムの約 90%以上の領域から RNA が合成されていることが明らかとなり、これらの多くがタンパク質をコードしていない「ノンコーディング RNA」として同定された。さらに PRC2 の触媒活性を持つサブユニット (Ezh2) が数種類の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) と結合し、Ezh2 の機能に関与しているという報告はされていたものの、詳細は不明であった。

そこで我々は、Ezh2 に結合している RNA の網羅的解析を行う為、PAR-CLIP と呼ばれる方法を開発した。すなわち、培養液中に 4-thiouridine(4SU) を添加し、RNA をラベリングした後、結合しているタンパク質を長波長紫外線照射で共有結合させて、免疫沈降により RNA と共に精製するものである。この方法を用いて、Ezh2 が様々なノンコーディング RNA と結合しているだけでなく、Ezh2 が標的遺伝子における合成途中の RNA (pre-mRNA) と結合していることを世界で初めて見出した(図 1)。

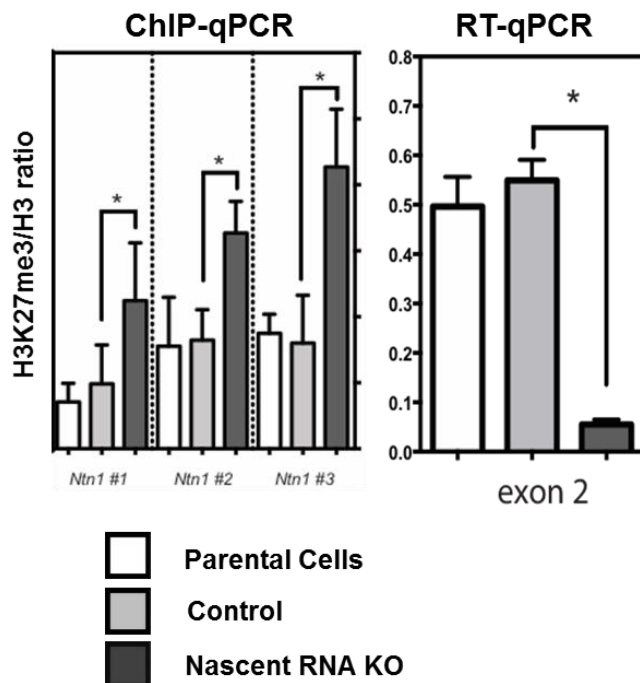
図 1 : Ezh2 に結合する Pre-mRNA の例



次に、Ezh2 が結合している pre-mRNA を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトした細胞株を作製し、機能解析を行った。驚いたことに、このノックアウト

細胞株において、標的遺伝子における PRC2 の活性が顕著に上昇し、それに伴って転写活性が低下することを見出した (図 2)。また、Ezh2 や H3K27me3 の ChIP-seq 解析および in vitro アッセイにおいても、RNA が PRC2 活性を阻害する仮説を支持する結果を見出した。

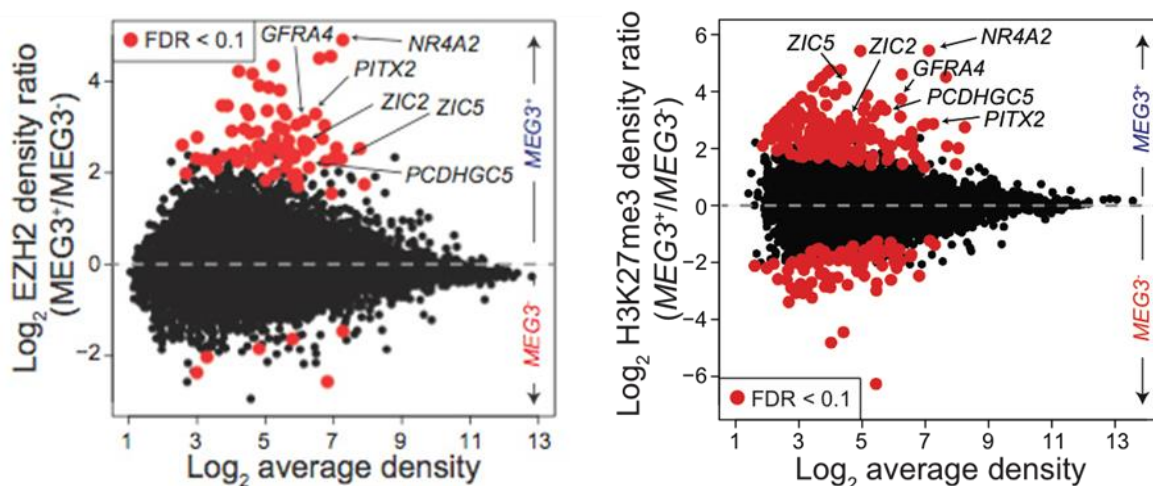
図 2: Ezh2 に結合している Pre-mRNA は PRC2 の活性を抑制する



さらに我々は、上記 PAR-CLIP 法で同定した、PRC2 に結合している Meg3 lncRNA の機能解析を定量的 ChIP-seq 法を用いて行った。すなわち、Meg3 lncRNA 発現細胞株群と非発現細胞株群を Ezh2 ChIP-seq 及び H3K27me3 ChIP-seq の定量的比較によって、Meg3 lncRNA に依存した PRC2 標的遺伝子の同定を行った (図 3)。

(次頁に続く)

図3： 定量的 Ezh2 ChIP-seq (左) と H3K27me3 ChIP-seq (右) の MA-plot 図



以上の結果は、Meg3 lncRNA が特定の遺伝子群の転写抑制に必要であることを示していた。

これらの研究結果は、実験バイアスのかかりにくい網羅的解析が、新たな RNA の機能を照らし出すことを示しているだけでなく、個々の標的遺伝子が、当初の予想より遥かに複雑な作用機序で制御されていることを、PRC2 という 1 つのエピジェネティック因子を例にして示していると考えている。

参考文献

1. [Kaneko S](#), Son J, Bonasio R, Shen SS, Reinberg D. Nascent RNA interaction keeps PRC2 activity poised and in check. *Genes Dev.* 2014; 28: 1983-1988.
2. [Kaneko S](#), Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D. Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin. *Mol Cell.* 2014; 53: 290-300.
3. [Kaneko S](#), Son J, Shen SS, Reinberg D, Bonasio R. PRC2 binds to active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 11: 1258-1264.