

内在性レトロウイルスを抑え込む普遍的な仕組み

－ 抑制性ヒストン修飾の体細胞での機能を解明 －

理化学研究所（理研）眞貝細胞記憶研究室の加藤雅紀協力研究員（研究当時）、開拓研究本部眞貝細胞記憶研究室の眞貝洋一主任研究員と京都大学ウイルス・再生医科学研究所竹本経緯子助教らの共同研究チームは、哺乳動物の体細胞で内在性レトロウイルス（ERV）^[1]の発現を抑制する普遍的な仕組みを明らかにしました。

本研究成果は、ERVの発現が引き起こす自己免疫疾患^[2]などの原因解明に役立つと期待できます。

哺乳動物のゲノム中、ERV由来の配列は約10%存在します。ERVの異常な発現は、近傍遺伝子の発現への影響や、ERV由来RNAに対する免疫応答反応を引き起こします。体細胞におけるERVの抑制には、DNAのメチル化^[3]が重要な役割を果たしています。今回、共同研究チームは、ヒストンの9番目のリジンのトリメチル化（H3K9me3）修飾を担うヒストンメチル化酵素 *Setdb1* 遺伝子をさまざまな種類のマウス体細胞でノックアウト^[4]し、ERVの脱抑制を網羅的に検証しました。その結果、*Setdb1* ノックアウト体細胞ではERV領域のH3K9me3修飾が一様に低下するが、それぞれの細胞に特徴的なERVの種類が脱抑制することが明らかになりました。また、DNAのメチル化はERVの抑制には限定的であること、組織特異的な転写因子^[5]がERVの発現に重要であることが分かりました。本研究により、H3K9me3は従来の見解と異なり、どの細胞種においても普遍的な抑制エピゲノムとしてERVの抑制に寄与する可能性を提示しました。

本研究は、国際科学雑誌『*Nature Communications*』（4月27日付）に掲載されました。

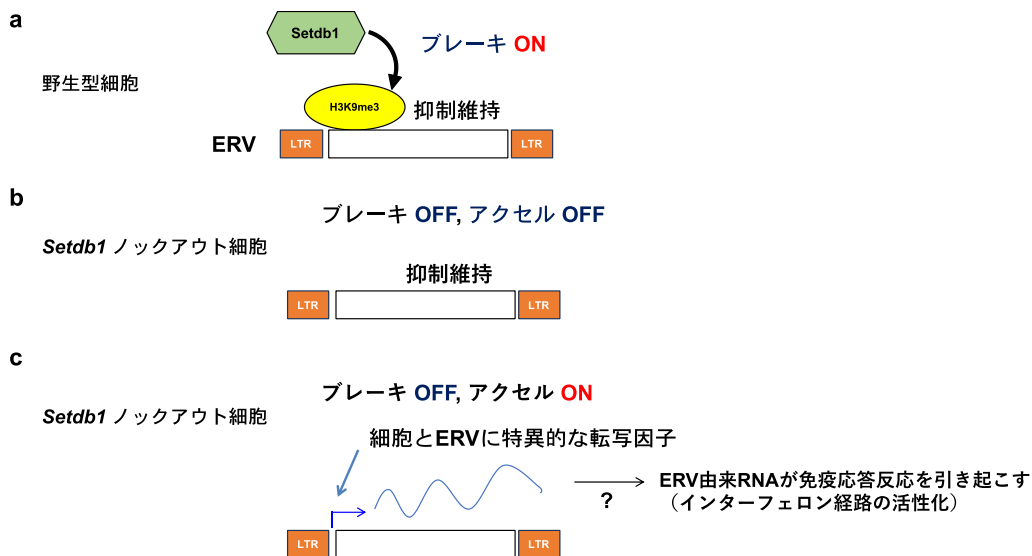


図 本研究で提唱したモデル

※研究支援

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）国際科学技術共同研究推進事業（戦略的国際共同研究プログラム「細胞移植治療の実現に向けた細胞アイデンティティ制御」）による支援を受けて行われました。

1. 背景

哺乳動物のゲノムの約半分は、動く遺伝子とも呼ばれるトランスポゾン^[6]由来の配列で占められています。なかでも内在性レトロウイルス（ERV）由来の配列は、ゲノムの約10%存在しています。ERVの異常発現は、近傍遺伝子の発現への影響やゲノムの不安定性、ERV由来RNAに対する免疫応答反応を引き起こすことが知られています。このため、エピジェネティック修飾^[7]と呼ばれるDNAのメチル化やヒストン修飾^[8]によって、ERVの発現は抑制されています。

DNAのメチル化は酵素Dnmt1によって維持されており、*Dnmt1*遺伝子のノックアウトマウスの胎児では、ERVの一種であるIAP（intracisternal A particles）の転写が劇的に上昇します^{注1}。このことから、体細胞におけるERVの抑制にはDNAのメチル化が重要であると考えられてきました。

一方、胚の発生初期や始原生殖細胞の発生時期には、DNAのメチル化が大きく低下します。そのため、DNAのメチル化に代わるバックアップ機構として、ヒストンH3の9番目のリジンのトリメチル化（H3K9me3）およびその修飾を行うヒストンメチル化酵素Setdb1が重要な役割を果たすことが報告されています^{注2}。

しかし、これまで体細胞のERV領域におけるH3K9me3修飾の役割については明らかになっていませんでした。

注1) Walsh C P, Chaillet J R & Bestor T H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet.* 20, 116–7. (1998)

注2) Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova I A, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz M C & Shinkai Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927–31. (2010)

2. 研究手法と成果

共同研究チームは、H3K9me3修飾を担うヒストンメチル化酵素の一つである*Setdb1*遺伝子をマウスES細胞^[9]およびさまざまな体細胞でノックアウトし、ERVが脱抑制するか、次世代シーケンサー^[10]を用いて網羅的に検証しました。その結果、ES細胞のみならず、体細胞においても、それぞれの細胞に特異的なERVの種類が脱抑制することが明らかになりました（図1）。

様々なERVの種類

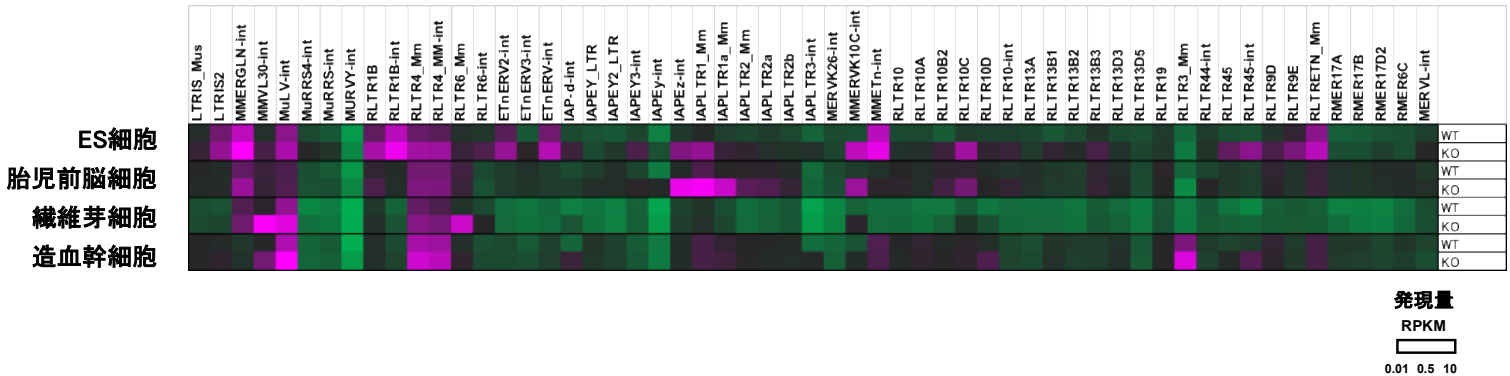


図1 *Setdb1* 遺伝子のノックアウトと ERV の脱抑制

いくつかのマウス細胞で *Setdb1* 遺伝子をノックアウトすると野生型細胞 (WT) に比べて ERV の発現量が上昇 (脱抑制) するものがある (マゼンタ色のほうが緑色に比べて発現量が高い)。どの種類の ERV が脱抑制するかはそれぞれの細胞で特徴を有する。

さらに、マウス線維芽細胞^[11]で *Setdb1* ノックアウト細胞を作製し、それぞれの ERV 領域における H3K9me3 の量を網羅的に検証したところ、ほぼ全ての ERV 領域で H3K9me3 の減少が見られました。ただし、マウス線維芽細胞では主に VL30 ファミリー^[12]に属する ERV のみが脱抑制することから、H3K9me3 はほぼ全ての ERV の発現を抑制しうるが、それに加えて発現を調節する仕組みが存在する可能性が考えられます。

共同研究チームは、この VL30 ファミリーに注目し、*Setdb1* ノックアウトマウス線維芽細胞では、LTR^[13]のクラスによって 4 種類ある中でもクラス 1 のみしか脱抑制しないことを見いだしました。マウスゲノム中に存在する VL30 クラス 1 は 71 コピーですが、コピーごとに脱抑制度合いが異なります。脱抑制の弱いコピーの DNA 配列に注目すると、MAPK 経路^[14]の下流に位置する転写因子の結合配列が破壊されていることから、MAPK 経路が VL30 クラス 1 の発現に重要であることが明らかになりました。

また、DNA のメチル化を担う酵素である Dnmt1 をマウス線維芽細胞でノックダウン^[15]したところ、予想に反してほとんどの ERV は脱抑制せず、IAP ファミリーのみ脱抑制することが明らかとなりました。また *Setdb1* のノックアウトによっても DNA のメチル化は減少しませんでした。これらの結果から、DNA のメチル化は ERV の抑制に対して限定的であること、ヒストン H3K9me3 がどの細胞種においても普遍的に ERV の抑制に寄与しうること、しかし ERV が脱抑制するためにはそれぞれの細胞種においてそれぞれの ERV に必須な転写因子の活性化が必要であることを示しています (図 2)。

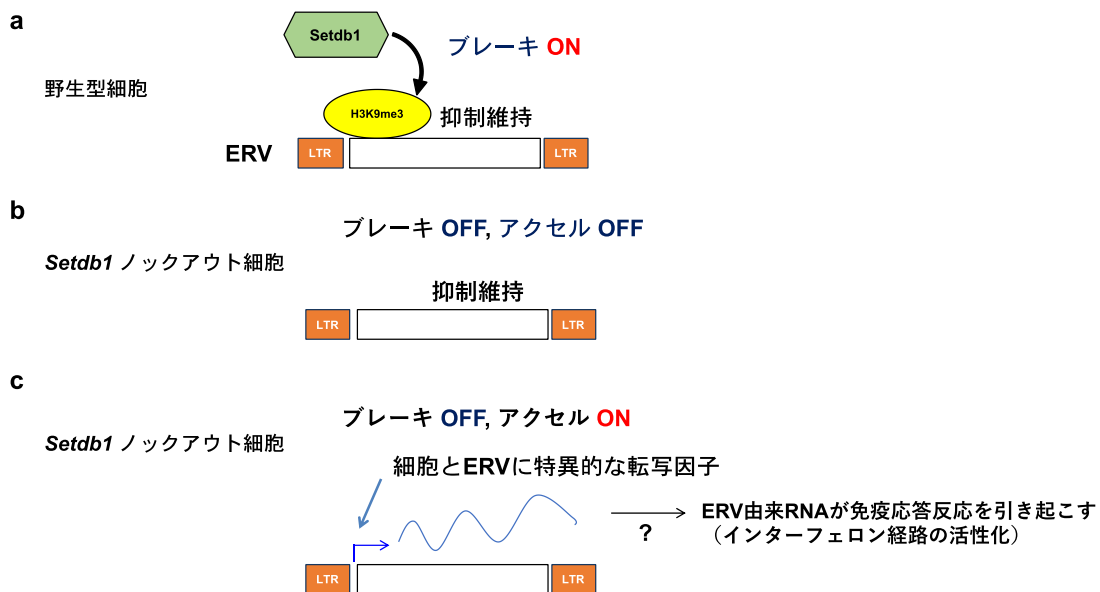


図 2 本研究で提唱したモデル

- 野生型の細胞では、ヒストンメチル化酵素 Setdb1 が ERV 領域にヒストン H3K9me3 修飾を入れることによってブレーキの役割を果たし、ERV の発現を抑制する。
- Setdb1 ノックアウト細胞では、H3K9me3 修飾がなくなりブレーキが外れる。ただし、アクセルとなるものがない場合、ERV の発現は誘導されないままである。
- Setdb1 ノックアウト細胞で、それぞれの ERV の発現に必要な転写因子がその細胞で発現もしくは活性化されているときのみ、ERV が脱抑制される。

3. 今後の期待

これまで、DNA のメチル化が体細胞においては一般的に ERV の発現抑制に重要であると考えられていましたが、本研究の結果から、ヒストン H3K9me3 修飾が ERV の抑制に普遍的な役割を持つ可能性が明らかとなりました。

ERV の異常な発現は自己免疫疾患を引き起こすことが示されており、ERV の抑制機構についての研究は、将来的には自己免疫疾患の発症メカニズムの解明につながると期待できます。

4. 論文情報

<タイトル>

A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing

<著者名>

Masaki Kato, Keiko Takemoto, Yoichi Shinkai

<雑誌>

Nature Communications

<DOI>

5. 補足説明

[1] 内在性レトロウイルス (ERV)

トランスポゾン的一种である。ゲノム中のおそらくレトロウイルス由来の配列であり、ヒトゲノム中の約 8%、マウスゲノムの約 10%を占めると考えられる。外来性レトロウイルスが生物に感染し、生殖細胞ゲノムに取り込まれ、次世代に受け継がれて生物ゲノム中に定着したもの。多くの ERV は内部の配列に変異を持つものが多く、トランスポゾンとしての活性を失っているものが多い。ERV は Endogenous Retroviruses の略。

[2] 自己免疫疾患

何らかの免疫異常によって自分の身体を構成する物質を異物のように認識し、自己抗体や自己に反応するリンパ球を作り、自分の組織を攻撃する疾患。代表的なものに関節リウマチなどがあるが、根本的な治療法は見つかっていない。

[3] DNA のメチル化

DNA を構成する塩基のシトシン (C) にメチル基を付加する反応。遺伝子の制御領域の高度なメチル化が、遺伝子発現を抑制すると考えられている。

[4] ノックアウト

目的の遺伝子を人為的に欠失させること。

[5] 転写因子

DNA に結合するタンパク質。遺伝子の発現量を調節する機能があり、発生や成長に重要な役割を担う。

[6] トランスポゾン

細胞内でゲノム上の位置を移動 (転移) することができる DNA の単位。動く遺伝子。ヒトゲノムの半分以上を占める。

[7] エピジェネティック修飾

遺伝情報を伝達する DNA の塩基配列自体には変更を加えず、DNA のメチル化やヒストン修飾などの化学修飾 (メチル基やアセチル基、リン酸基等が可逆的に付加されること) を介して、ゲノム DNA の機能に変化をもたらす修飾のこと。

[8] ヒストン修飾

ヒストンとは染色体を構成する主要なタンパク質である。染色体は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 のそれぞれ 2 分子からなる八量体に、DNA が左巻きに 1.65 回巻きついた複合体を基本単位 (ヌクレオソーム) として存在している。ヌクレオソームから各ヒストンのアミノ酸末端領域が突出しており、メチル化やアセチル化、リン酸化などの修飾を受けることにより、染色体構造に変化をもたらす、遺伝子発現の抑制や活性化を調節する。

[9] ES 細胞

脊椎動物の初期胚が持つ、全ての種類の体細胞へ分化する能力を多能性という。多能性を持ち、試験管内で培養して無限に増やすことができる細胞を多能性幹細胞という。ES 細胞は、哺乳類の着床前胚（胚盤胞）に存在する内部細胞塊から作製された多能性幹細胞。

[10] 次世代シーケンサー

サンガー法を利用した蛍光キャピラリーシークエンサーである「第一世代シークエンサー」と対比させて使われる用語。機種によるが、一度に $10^7 \sim 10^{10}$ (1,000 万～100 億) 個の DNA の配列を決定できる。以前はヒトのゲノム配列を決定するのに 14 年程度かかったが、次世代シークエンサーを用いると、数日で決定できる。

[11] 線維芽細胞

結合組織を構成する細胞の一つ。コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸といった真皮の成分を作り出す。核小体が明瞭な楕円形の核を有し、細胞質は塩基好性を示す。

[12] VL30 ファミリー

ERV のファミリーの一種。げっ歯類のみに存在する。

[13] LTR

ウイルスゲノムの両末端に存在する、数百塩基の長い繰り返し配列。ウイルスの転移活性に必要なほか、さまざまな転写調節配列が存在する。LTR は Long terminal repeat の略。

[14] MAPK 経路

MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 経路は細胞の増殖、分化、ストレス応答などに関わるセリン/セロニン プロテインキナーゼファミリーのシグナル伝達経路であり、真核生物のあいだで広く保存されている。

[15] ノックダウン

mRNA の分解促進でタンパク質の量を著しく低下させることにより、遺伝子の機能を大きく減衰させる方法。遺伝子破壊以外の操作により行う場合が多い。