

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310138

研究課題名(和文) ヒト内在性レトロウイルス発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of transcriptional repression mechanism for human endogenous retrovirus

研究代表者

眞貝 洋一 (Shinkai, Yoichi)

独立行政法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・主任研究員

研究者番号：20211972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,900,000円、(間接経費) 4,770,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック制御の観点から、ヒト内在性レトロウイルス(human endogenous retrovirus: HERV)の転写抑制機構の実体を明らかにし、その生物学的重要性を検討する。そのために、ヒトES/iPS細胞でヒストンメチル化制御因子の遺伝子をノックアウトした細胞の樹立を目指した。目的とする細胞の樹立にまでは至らなかったが、CRISPR/Cas9とガイドRNAを用いた系により、既にマウスのES細胞でERVの転写抑制に重要な役割を持つESET/ES/TDB1のゲノム改変が可能であることが確認出来た。今後、この系を使って、目的の解析を進めたい。

研究成果の概要(英文)：It is well known that DNA methylation and histone methylation suppress transcription of retrotransposons. In mouse embryonic stem cells (ESCs), histone H3 lysine 9 methylation (H3K9me) plays crucial roles for repression of endogenous retroviruses (ERVs), some of which are still active for transposition. Although human ERVs (HERVs) are not active for transposition, many of them are still transcriptionally active and reactivation of HERVs is linked with cell type specific gene expression or tumorigenesis. To elucidate how histone methylation including H3K9me is crucial for repression of HERVs, we tried to establish human iPS/ES cells deficient for H3K9 methyltransferase SETDB1. Using the CRISPR/Cas9 and guide RNA system, we confirmed that SETDB1 can be disrupted by the system. Once we obtain conditional SETDB1 KO human iPS cells, we would like to analyze how transcription of HERVs is regulated by SETDB1 and how SETDB1 is crucial for silencing of other types of retrotransposons in human.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム医科学

キーワード：ヒストンリジンメチル化酵素 ヒト 内在性レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとして哺乳類のゲノムの少なくとも50%以上の領域は、遺伝子をコードしない反復配列によって占められている。この反復配列のほとんどはゲノム中を飛び回る能力を持っていた転移因子に由来しており、内在性レトロウイルス(ERV)はその1つのグループを構成する long terminal repeat (LTR) 型のレトロ転移因子で、ヒトではゲノムの~8%を占める。マウスでは、ERVはまだ転移能を有したものが残っており、マウスの突然変異の~10%はERVの転移によると推察されている。このようないわゆる利己的な遺伝子の進入と増幅を防ぐために、生体には様々な転移因子に対する抑制機構が存在する。そのひとつにレトロ転移因子の遺伝子発現抑制機構があり、体細胞や生殖細胞においては宿主ゲノムに取り込まれたレトロウイルス(プロウイルス)の発現抑制にはDNAのメチル化が重要であり、LTR部分のDNAのメチル化レベルが低下すると、プロウイルスの発現が上昇する。ところが、マウスの胚性腫瘍(embryonic carcinoma:EC)細胞や胚性幹(embryonic stem:ES)細胞などのような発生初期の胚から樹立された細胞株では、DNAのメチル化に非依存性な、特別なプロウイルスの発現抑制機構が存在することが30年以上も前から知られていた。しかし、その詳細なメカニズムは良くわかっていなかった。

最近我々は、この発生初期の細胞で特異的に機能しているプロウイルスの発現抑制機構に、ヒストンリジンメチル化酵素 ESET が非常に重要な役割を持つことを明らかにした。ESET はヒストンの特異的なアミノ酸(ヒストン H3 の9番目のリジン残基: H3K9)をメチル化する活性を持ち、ESETをコードする遺伝子を条件的に欠失できるマウス ES 細胞の解析から、ESET を除去するとERVの発現レベルが著しく上昇した。そして、ERVのLTRプロモーター領域のH3K9はESET依存的にトリメチル化されていることも判明した。また、ESETはプロウイルスのLTR領域にKAP1と呼ばれる分子に依存して導かれることも明らか

にした。マウスES細胞におけるプロウイルスの発現抑制には、ESETのヒストンメチル化活性は重要であるものの、DNAのメチル化は必ずしも必要でないことが分かった。(Matsui et al. 2010 Nature)。以上のことから、マウスに於いて、ESETは、DNAのメチル化状態がダイナミックに変化する発生初期の細胞で、DNAのメチル化非依存的に、プロウイルスの発現抑制に寄与していることが示唆された。

先に述べたように、ヒトのERV(HERV)はゲノムの~8%を占めるものの、塩基配列解析の結果からは、HERVsには転移能を持つコピーは存在しないと推察されている。しかし、転写活性のあるコピーはまだいくつも存在し、組織特異的あるいはがん細胞特異的にHERVsの転写あるいはコードされているタンパク質が検出されており、ヒトの生命機能や病態(特にがん化との関連)におけるHERVsの重要性が示唆されている。

2. 研究の目的

エピジェネティック制御の観点から、ヒト内在性レトロウイルス(human endogenous retrovirus: HERV)の転写抑制機構の実体を明らかにし、その生物学的重要性を検討する。

3. 研究の方法

エピジェネティック制御の観点から、HERVsの転写抑制機構の実体を明らかにし、その生物学的重要性を検討する。そのために、以下のようなアウトラインの研究を計画する。

ア) ヒトES細胞ならびにiPS細胞を用いて、ヒストンリジンメチル化酵素およびDNAメチル化酵素のノックダウン系を確立する。

イ) ノックダウンES・iPS細胞におけるHERVsの発現とヒストン・DNAメチル化状態をRT-qPCR、ノザンプロット、ChIP-qPCR、bisulfite シークエンスならびに次世代シークエンサーで検討する。

ウ) 次世代RNAシークエンスデータの解析から、HERV近傍の遺伝子の発現への影響やHERV融合転写物が存在するかなどを、検討する。

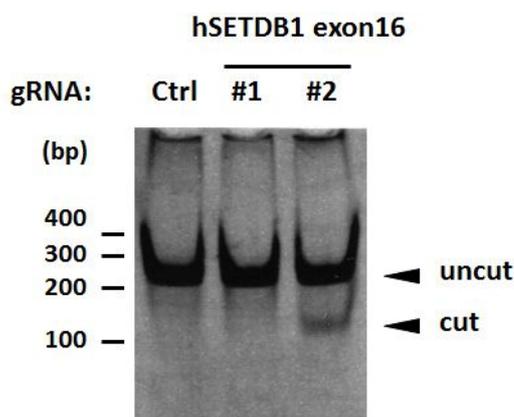
エ) ヒトES・iPS細胞を*in vitro*で種々の細胞に分

化誘導後、同上の実験を行う。

4. 研究成果

当初、ノックダウンでの検討を計画していたが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Zinc Finger Nucleases, ZFNs) によるゲノム改変技術が広く普及してきたこともあり、遺伝子ノックアウトすることを目指した。そのため、SIGMA社より購入した SETDB1 のノックアウトに使う ZFN ベクターを用いて、SETDB1 のターゲティングを試みてきた。しかし、残念ながら、陽性細胞の検出に至らなかった。そこで、新たな遺伝子破壊の方法として、CRISPR/Cas9 とガイド RNA を用いた遺伝子改変技術を導入した。予備実験として、K562 細胞を用いて、ノックアウト細胞の樹立が可能であるか検討したところ、目的とする遺伝子領域に有意に変異が誘導されていることが確認された(図1)。

図1. Cas9/gRNAを用いた
ヒトSETDB1ノックアウト効率の検討



hSETDB1のexon16に対するgRNAのコンストラクトを2つ作製しK562細胞を用いてCel-I assayを行った。#2のコンストラクトでは有意に切断されたバンドがみられることから#2のコンストラクトでは高効率でhSETDB1のゲノムにmutationがはいっていることがわかる。

次に、条件的にSETDB1遺伝子を欠損できるように、loxP配列で挟まれたSETDB1発現ベクターを作成し、それをトランスポゾンベースのベクターに組み込んだ。残念ながら、本課題はこの段階で研究期間終了となり、当初計画していた本来の目的の実験を開始するまでには至らなかった。しかし、目的とするSETDB1を含む遺伝子欠損iPS/ES細胞作製の為のシステムの構築にまでは到達したので、継続して設定した問題の解明に

迫りたい。

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1件)

1. Tan, S. Nishi, M. Ohtsuka, T. Matsui, T. Takemoto, K. Kamio-Miura, A. Aburatani, H. Shinkai, Y. and Kageyama, R. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development*, 2012, **139**:3806-3816. (査読有)
<http://dev.biologists.org/content/139/20/3806.long>

[学会発表](計5件)

1. 眞貝 洋一：“マウスLTR因子のエピジェネティック制御と近傍遺伝子への影響”国立遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能」(招待講演)、2013年10月10日、国立遺伝学研究所、三島
2. Yoichi Shinkai, “Pericentric heterochromatin generated by HP1 interaction-defective Suv39h1” Gordon Research Conference "epigenetics" 2013年8月4日 - 9日, Bryant University, Smithfield, RI, USA
3. 眞貝 洋一：“ヒストンリジンメチル化による生命機能制御”第56回日本腎臓学会学術総会(招待講演)、2013年5月12日、東京国際フォーラム、東京
4. Yoichi Shinkai, “ESET-mediated endogenous retrovirus silencing” 第35回日本分子生物学会大会(招待講演)2012年12月13日福岡国際会議場、(福岡)
5. Yoichi Shinkai, “ESET-mediated endogenous retrovirus silencing” CSH-Asia meeting on "Epigenetics, Chromatin, and Transcription" (招待講演)2012年04月25日 Suzhou

(China)

〔図書〕(計2件)

1. 眞貝 洋一:エピジェネティクス、282
(35-47)、化学同人、2013年
2. 眞貝 洋一:エピジェネティクスキーワード辞
典、315 (40-42)、羊土社、2013年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

眞貝 洋一 (SHINKAI YOICHI)

独立行政法人理化学研究所・震災細胞記憶研
究室・主任研究員

研究者番号：20211972