

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14422

研究課題名(和文) ヒト内在性レトロウイルスに由来する獲得遺伝子の探索

研究課題名(英文) Screening of domesticated genes from human endogenous retroviruses.

## 研究代表者

石野 知子(金児知子)(KANEKO-ISHINO, Tomoko)

東海大学・健康科学部・教授

研究者番号：20221757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムの8%は、内在性レトロウイルス(HERV:human endogenous retrovirus)で占められている。数千個におよぶHERVの大部分は突然変異によりレトロウイルスとしての機能を失っているが、変異により短い断片となった場合でも、ヒト、チンパンジー、ゴリラなどで、その構造が保存されるものは、遺伝子として働いている可能性があるため、ヒトゲノムに存在するHERV由来の候補遺伝子の網羅的探索を進めた。その中の脳で発現している候補遺伝子に対して抗体を作製し、ヒトの培養細胞HEK293、ヒトの脳・小脳・視床などでのタンパク質合成を確認し、獲得遺伝子としての機能を探索している。

研究成果の概要(英文)：Approximately 8% of the human genome consists of LTR retrotransposons and endogenous retroviruses (HERVs). Most are inactivated by heavy mutations and do not function as the retrotransposons nor retroviruses. However, substantial numbers of short open reading frames (ORFs) from their encoding proteins, such as Gag, Pol and Env, remain and exhibit high conservation among humans, chimpanzees and gorillas. Therefore, we hypothesize that some of such ORFs play some function in these species as Hominidae-specific genes. We screened such putative HERV-derived genes from human genome and made specific antibodies to some candidates. We have been trying to confirm their protein expression in a HEK293 cell line, cerebrum, cerebellum and thalamus.

研究分野：分子生物学

キーワード：レトロウイルス レトロトランスポゾン 獲得遺伝子 GAGタンパク質 脳

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、ゲノムインプリンティングの研究から LTR レトロトランスポゾンに由来する 2 つの父親性発現インプリント遺伝子 *Peg10*、*Peg11/Rtl1* が、それぞれ胎盤形成に重要な機能をもつこと (Ono *et al.* Nat Genet 2006, Sekita *et al.* Nat Genet 2008)、比較ゲノム解析からは *Peg10* が真獣類と有袋類に共通する獣類特異的遺伝子であること (Suzuki *et al.* PLoS Genet 2007) を明らかにした。一方で、*Peg11/Rtl1* は真獣類にのみに存在し (Edwards *et al.* PLoS Biol 2008)、その後同定された 28 個の LTR レトロトランスポゾン由来遺伝子も同様に真獣類特異的遺伝子であった (Ono *et al.* DNA Res 2011, Iwasaki *et al.* DNA Res 2013)。*Peg10*、*Peg11/Rtl1* は LTR レトロトランスポゾンの Gag と Pol の両者に相同性を示す 150 K、250 K の巨大タンパク質をコードする。一方、*Sirh7/Ldoc1* は Gag の一部に由来するわずか 17 K のタンパク質をコードするが、胎盤の細胞分化制御を介し胎盤ホルモン産生、分娩のタイミングや新生仔の離乳率に影響を与える重要な機能があることを、報告した (Naruse *et al.* Development 141, 4763-4771 (2014)) (図 1 参照)。

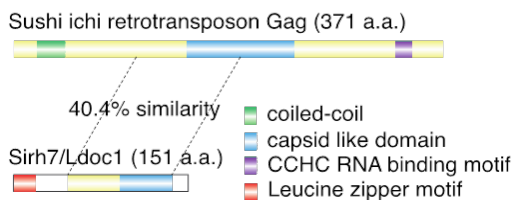


図 1 Sirh7/Ldoc1 構造図

これらの一連の実験事実から、「約 1 億 6 千万年前、亜綱(獣類)や下綱(真獣類、有袋類)レベルで起きたレトロトランスポゾンからの遺伝子獲得が、哺乳類の胎生進化に重要な影響を与えた」という新しい進

化の歴史が明らかになってきた。一方、ヒトゲノムに存在する数千個の HERV のうち完全長の ORF が保存されている Env 遺伝子の一部は、胎盤で機能する *SYNCYTIN* 遺伝子として機能していることが知られている (Mi *et al.* Nature 2000)。面白いことに、齧歯目など哺乳類の他の系統でも、別種の ERV に由来する *SYNCYTIN* 遺伝子が獲得されている (Dupressoir, *et al.* PNAS 2005, 2009, 2011)。しかし、多数の変異が入り、短い ORF をコードする大部分の Gag、Pol、Env 遺伝子の機能は注目されてこなかった。

### 2. 研究の目的

ヒトゲノムの 8% は、内在性レトロウイルス (HERV: human endogenous retrovirus) と LTR レトロトランスポゾンによって占められている。数千個におよぶ HERV の大部分は Gag、Pol、Env 遺伝子の突然変異によりレトロウイルスとしての機能を失っている。しかし、変異により短い ORF (open reading frame) となった場合でも、ヒト、チンパンジー、ゴリラなどで、その構造が高度に保存されるものは、新規の機能を獲得し遺伝子として機能している可能性があると考えた。この仮説が正しければ、高度に保存される HERV はヒトの個体発生だけでなく、ヒト以外の霊長類からの分岐・進化に関わる可能性が高いと考えられる。そこで、本申請課題ではヒトゲノムに存在する HERV 由来の新規候補遺伝子の網羅的探索を目指した。

### 3. 研究の方法

申請者は、LTR レトロトランスポゾン的一种である Sushi-ichi retrotransposon の Gag の一部に由来する 151 a.a. の小さなタンパク質をコードする *Sirh7/Ldoc1* 遺伝子が個体発生・生殖に機能をもつことを実験

的に証明し、本年、報告した (Development in press)。この結果は、HERV 由来の Gag, Pol, Env の一部からなる ORF であっても、ヒトだけでなく チンパンジー、ゴリラなど種を越えて保存されている場合には、それが遺伝子

として機能する可能性が高いことを示唆している。ヒトゲノムは少なくとも 20 種類以上の HERV が、それぞれ 10~1000 のオーダで含まれる。現在、これらの HERV は転写開始に用いられる tRNA の種類による分類が行なわれているが、同じ分類群には霊長類ゲノムへの挿入時期の異なる複数の由来のものが含まれる。これらは比較ゲノム解析により挿入時期による再分類が可能であり、ヒトゲノム GRCh37 および 38 においてゲノム中にマップされる HERV を対象に解析を行うことで、1 対 1 の対応関係を確認しつつ網羅的な解析が可能となる。具体的な方法は以下の通りである。

- (1) HERV の Gag 由来の候補遺伝子の探索には、それぞれの HERV の Gag の標準配列を query として NCBI の TBLASTN によりアミノ酸配列としてヒトゲノムを探索し、100 a.a. 以上のタンパク質をコードする ORF がとれる DNA 配列を抽出する。
- (2) この候補遺伝子について、霊長類でもよりヒトに近い真猿類における保存性を確認する。ヒト相同候補遺伝子がチンパンジー、ゴリラ、オラウータン、ヒヒ、マカクの相同遺伝子上に存在するかどうかで、ゲノムへの挿入時期を決定し、さらにこれら相同遺伝子コードするタンパク質の ORF の保存性を確認する。
- (3) これらのヒト候補遺伝子の各臓器における遺伝子発現の有無を、データベース上のマイクロアレイや次世代シーケンスによる遺伝子発現データも参考にしながら、RT-PCR により実際に発現の有無とそのレ

ベルを確認する。

- (4) 特に脳で発現している Gag 由来の候補遺伝子の特徴的な 20 アミノ酸からなるペプチドに対してウサギで抗体を作製した。
- (5) 作製した抗体を用いて、ヒトの培養細胞 HEK293 で Gag タンパク質の発現を調べた。また、作製した抗体を用いてヒトの脳・小脳・視床など各部分のタンパク質のウェスタンブロッティングとの免疫沈降を行った。

#### 4. 研究成果

HERV の Gag 由来の候補遺伝子のリストから脳での発現を中心にしぼり、候補遺伝子に対する抗体を作製してウェスタンブロッティングを行ったところ、ヒト脳タンパク質中に反応するタンパク質が見られた。候補遺伝子は mRNA レベルの発現だけでなく、タンパク質を合成し、遺伝子として働いている可能性を強く示唆するものであった。また HEK293 細胞で候補遺伝子の 1 つが DNA の 2 重鎖切断の損傷修復に関わる遺伝子産物と共沈する可能性がでてきた。ヒトの脳・小脳・視床などのタンパク質を用いた免疫沈降を行なった結果でも DNA の損傷修復に関わる遺伝子産物と共沈する可能性があることが示された。この Gag 由来のタンパク質の発現と DNA 修復との相関に関して現在解析を進めており、この戦略で HERV の由来の新規獲得遺伝子を発見できる可能性を実証できたと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

石野 知子（金児 知子）  
（ISHINO, Tomoko）（KANEKO, Tomoko）  
東海大学・健康科学部・教授  
研究者番号：20221757

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

石野 史敏（ISHINO, Fumitoshi）  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：60159754

李 知英（RI Ji y on）  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師  
研究者番号：20402860

(4)研究協力者

なし