

## 特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

## エピジェネティクスによるレトロトランスポゾンの発現抑制機構

松井 稔 幸, 眞貝 洋 一

レトロトランスポゾンの転写抑制にはDNAのメチル化が重要であり、通常、LTR部分のDNAのメチル化レベルが低下するとレトロトランスポゾンの発現が上昇する。生殖系細胞では、DNAメチル化に加えてnon-coding RNAによる転写後調節がレトロトランスポゾンの発現抑制に寄与している。さらに、胚性腫瘍細胞 (embryonic carcinoma: EC) や胚性腫瘍細胞 (embryonic stem: ES) などのような発生初期の胚から樹立された細胞株では特別なプロウイルス発現抑制機構が存在し、この制御にはヒストンリジンメチル化が重要な役割を持つことが明らかになりつつある。本稿では、ヒストンリジンメチル化修飾による新規プロウイルス発現抑制機構をはじめとして、エピジェネティックなレトロトランスポゾンの制御機構に関する最近の知見を紹介する。

## 1. はじめに

高等多細胞生物は多種多様な性質を持つ細胞から形成されているが、一部の特殊な例外を除き、それらの細胞は原則同一のゲノムを有する。全く同一の情報源から、異なる機能を有する細胞を作り出すことができるのは、それぞれの細胞がゲノムに組み込まれている遺伝子のうち、必要な遺伝子を必要とときにだけ使うという、遺伝子発現制御機構を備えているからである。

真核生物にはRNAポリメラーゼI (Pol I), Pol II, Pol IIIと呼ばれる、三つのRNAポリメラーゼが存在する。Pol IはリボソームRNAを転写し、Pol IIはタンパク質をコードしている遺伝子の転写を行い、Pol IIIはtRNAなどのsmall RNAなどの転写を行う。したがって、Pol IIの活性を制御することによって、必要な遺伝子のみを転写することが可能であり、Pol IIの転写活性を制御することは多細胞生物における発生と恒常性の維持において、非常に重要

である。

哺乳類のように巨大なゲノムを抱える高等真核生物には、生物の生存に有効に機能する遺伝子をコードしているとは思えないDNA配列、いわゆるジャンクDNAと呼ばれるDNAがゲノムの大きな割合を占めている。特に転移因子はマウスの場合、ゲノム全体の40%近くを占め、レトロウイルス由来のDNAはゲノム全体の約10%近くを占める<sup>1-4)</sup> (図1)。

このようなDNAが生殖細胞系列で発現し転移すると、ゲノムに変異を起こしそれが次の世代に伝達される可能性がある。このようなゲノムの変化を引き起こす転移因子は、生物の進化に大きな影響を与え、時には有効に機能することもあると推測される。例えば、胎盤形成に関わる遺伝子にはレトロウイルス由来の遺伝子が複数存在することが判っており、哺乳類が現在の姿に進化するまでの過程においては、レトロトランスポゾンの寄与は多大である<sup>5)</sup>。

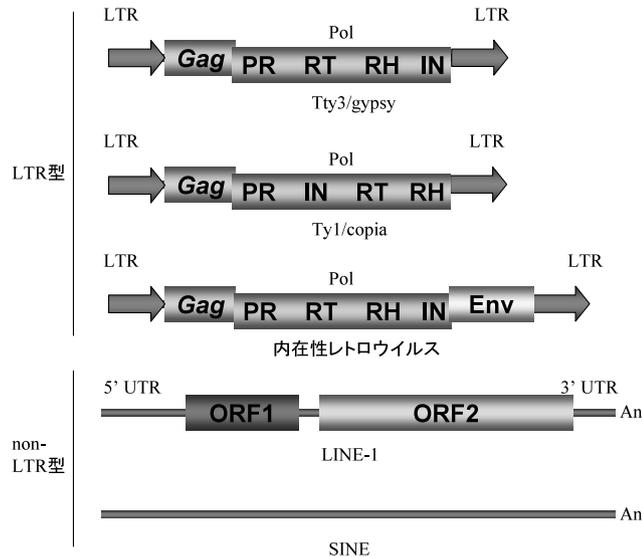
しかしながら、必須の遺伝子の領域に転移因子が挿入され変異が起これば、生物は生存できない。また、レトロトランスポゾンが体細胞においてがん化を引き起こす可能性が示唆されており<sup>6,7)</sup>、プロウイルスの発現を抑制しておくことは生物にとって非常に重要な問題である。

このため哺乳類ではレトロトランスポゾンの進入と増幅を阻止する様々な機構が存在する。哺乳類ではレトロウイルスが体内に入ると、自然免疫系、もしくは獲得免疫系の

京都大学ウイルス研究所ゲノム改変マウス研究領域 (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53 京都大学分子生物科学実験研究棟1F W104, W105, W106)  
The epigenetic silencing mechanism of retrotransposons  
Toshiyuki Matsui and Yoichi Shinkai (Experimental Research Center for Infectious Diseases, Institute for Virus Research, 53 Shogoin, Kawara-cho, Sakyo-ku Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan)

標的となり除外される。また、マウスの細胞においては、細胞表面のレセプターがグリコシル化されることにより、ウイルスの進入が妨げられることが報告されている<sup>8)</sup>。細

胞内にウイルスが進入した後もウイルスの増幅を防ぐ機構が存在する。APOBEC3Gはレトロウイルスの逆転写の際に、シトシンからウラシルへの変換を触媒し、ゲノムに挿入したものは結果的にグアニンからアデニンに変わる。さらに、感染能のあるウイルスがゲノムに挿入された後も、発現抑制機構によりウイルスの産生が阻止される。本稿ではこの遺伝子発現制御機構によるレトロトランスポソンの抑制に焦点を当てる。特に、レトロトランスポソンの抑制にはエピジェネティックな発現制御機構が重要である。はじめに、この調節に関わるDNAのメチル化、ヒストン化学修飾、non-coding RNAなどのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を紹介し、次にレトロトランスポソンの発現抑制におけるこれらの制御系に関して最近の知見を紹介する。

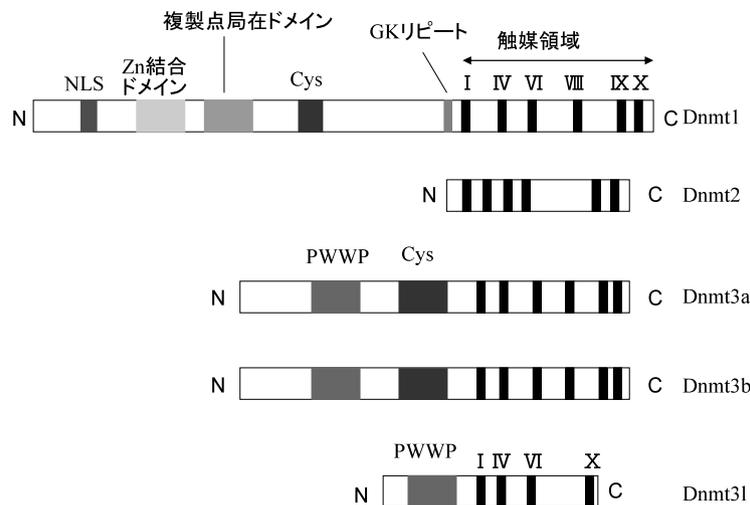


**図1** レトロトランスポソンの構成  
レトロトランスポソンは long terminal repeat を含む LTR 型と、long interspersed nuclear elements (LINE) や short interspersed nuclear elements (SINE) などのように LTR を持たない non-LTR 型に分類することができる。DNA トランスポソンは RNA を介さない cut & paste 型の方法で増幅されるが、レトロトランスポソンは RNA に転写されることが必要であり、ゲノムの挿入前にその RNA が逆転写される。このため、LINE は DNA 配列中に逆転写酵素を挿入する際に必要となるエンドヌクレアーゼをコードしている。LTR 型には、Ty1/copia, Ty3/gypsy, 内在性レトロウイルス (ERV) などが含まれる。(文献 2), 3), 4) を参照)  
Gag: group-specific antigen, Pol: polymerase, Env: envelope, PR: protease, RT: reverse transcriptase, RH: ribonuclease H, IN: integrase, An: polyA

**2. DNA のメチル化**

現在、DNA のメチル化酵素として、Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt2, Dnmt3l の五つが確認されている<sup>9)</sup>(図 2)。哺乳類の場合、DNA のメチル化は主に CpG 配列のシトシンで起きる現象であり、*de novo* メチル化活性を持つ Dnmt3a, Dnmt3b によって触媒される<sup>10,11)</sup>。このため哺乳類では DNA のメチル化は二本鎖 DNA に対して必ず対称に起こる。

また、二本鎖 DNA の複製の際には片方のシトシンのみがメチル化されている、いわゆるヘミメチル化 DNA が生じるが、維持型メチル化酵素である Dnmt1 によって常に両鎖がメチル化されているように維持される<sup>12)</sup>。Dnmt1 がどのようにしてヘミメチル化 DNA を認識しているのかは最近まで不明であったが、2007 年に Dnmt1 と結合する UHRF1/NP95 という SRA ドメインを持つ分子がヘミメチ



**図2** 哺乳類の DNA メチル化酵素  
NLS: 核移行シグナル, PWWP: DNA 結合ドメイン, Cys: システインリッチドメイン, I~X は保存性の高いドメイン (文献 9) を参照)

ル化DNAを認識し、Dnmt1を導いていることが示された<sup>13,14</sup>。さらに、2008年に三つのグループの結晶構造解析の結果より、UFRF1はフリップアウトした5-メチルシトシンを認識することが示された<sup>15-17</sup>。

ヒトとマウスにおいてDnmt2のDNAのメチル化活性はほとんど確認できないが、tRNAがDnmt2によってメチル化されることが報告されている<sup>18,19</sup>。ゼブラフィッシュではDnmt2をノックアウトするとDNAのメチル化レベルが低下し、発生に異常が生じることが報告されている<sup>20</sup>。

DNAのメチル化は遺伝子発現制御において、主に転写の抑制に寄与していると考えられているが、これはメチル化されたDNAを認識するタンパク質が脱アセチル化酵素を導き、転写の活性化を阻害するためだと一般的には考えられている。ところが、マウスにおいてメチル化DNAに結合するタンパク質をノックアウトしても転写の脱抑制がほとんど確認されないことから<sup>21-23</sup>、DNAのメチル化がどのように転写の抑制に寄与しているのかは未だにはっきりとは分かっていない。

### 3. ヒストン化学修飾

コアヒストンはH2A, H2B, H3, H4の四つのタンパク質から構成される。これらのタンパク質のうち、H2A-H2B, H3-H4が二量体を形成し、H3-H4の二量体はさらに四量体を作る。そして生体内でコアヒストンはH2A-H2Bの二量体の二つと、H3-H4の四量体一つから構成される八量体となって存在している。また、ヒストンはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化など様々な化学修飾を受けることが分かっている。Allisらによって2000年に、それらの修飾の組み合わせがヒストンコードを形成し、そのコードを読み取るイフェクター分子が生体内における機能を生み出すというヒストンコード仮説が提唱された<sup>24,25</sup>。

ヒストンがメチル化されることは古くから知られていたが、2000年にJenuweinらのグループが哺乳類でヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)をメチル化するSuv39h1, Suv39h2を同定して以来<sup>26</sup>、ヒストンリジンのメチル化の研究が精力的に行われるようになった。現在、様々なヒストンリジンメチル化の機能が明らかにされている。リジン残基のメチル化には、モノ、ジ、トリメチル化状態が存在し、それぞれの状態が異なる機能を持つことも示されている。例えば、H3K4のトリメチル化は基本転写因子TFIIDに含まれるTAF3のPHDフィンガーに認識され、転写を活性化へと導く<sup>27,28</sup>。また、この転写活性化機構はH3K9, H3K14のアセチル化により促進されるが、逆にH3R2のジメチル化により阻害されることが報告されている<sup>28</sup>。H3K27のトリメチル化は転写の抑制に寄与していると考えられている<sup>29,30</sup>、ES細胞においてH3K4のトリ

メチル化とH3K27のトリメチル化という互いに相反する効果を持つ修飾が同じ領域に存在することが示された。このように二つの修飾が同じ領域に存在するbivalentドメインは発生系の遺伝子の転写開始点に多く、未分化能の維持に関わっていると考えられる<sup>31</sup>。

メチル化修飾はエネルギー的に比較的安定な化学修飾のため、細胞の長期記憶に適する修飾であり、能動的なヒストンの脱メチル化機構は存在しないと予想されていた。しかし、2004年に初めて、ヒストンリジンの脱メチル化酵素が同定され、さらに2006年にJmjCドメインがヒストン脱メチル化活性を持つことが示され話題を集めた<sup>32,33</sup>。

さらに、最近AllisらによってヒストンH3のN末端がプロテアーゼの一つである、カテプシンによって切断を受けることが報告された。この切断はES細胞のレチノイン酸による分化誘導を行うと確認され、発生や分化の過程に重要な役割を果たしていることが予想されている<sup>34</sup>。

### 4. H3K9のメチル化について

Suv39h1, Suv39h2はペリセントロメアにおけるH3K9をトリメチル化するのに対し、G9aはユークロマチン部分のH3K9をジメチル化することが分かっている<sup>35</sup>。また、H3K9のメチル化はHP1に認識され、ヘテロクロマチンの形成と転写の不活性化に寄与すると考えられている<sup>36,37</sup>。さらに、H3K9とHP1の結合はH3S10のリン酸化によって阻害されることが報告されている<sup>38</sup>。

H3K9とDNAのメチル化との関係も報告されている。アカパンカビにおけるH3K9のメチル化酵素であるDIM-5をノックアウトすると、DNAのメチル化レベルが低下することが報告されている<sup>39</sup>。哺乳類では、Suv39h1, Suv39h2のダブルノックアウトES細胞ではペリセントロメア領域のDNAのメチル化レベルが低下することが確認されている<sup>40</sup>。同様に、G9aのノックアウトES細胞でもDNAのメチル化のレベルが低下することが確認されているが、興味深いことにヒストンリジンメチル化活性を失ったG9aの変異体をG9a欠損細胞に発現させても、DNAのメチル化レベルが野生型のES細胞と同程度まで回復することが報告されている<sup>41</sup>。

### 5. non-coding RNA について

RNAiとはsmall RNAによって特定の遺伝子が転写後遺伝子発現抑制を受ける現象で、1998年にFireとMelloらによって線虫で初めて見出された<sup>42</sup>。シユウジョウバエでは、short interfering RNA (siRNA)は二本鎖RNA(dsRNA)がDicerによって20-24ヌクレオチドに切断されることにより産生され、切断されたsiRNAはRNA-induced silencing complex (RISC)に取り込まれる<sup>43</sup>。RISCには標的RNAを切断するAGO2という酵素が含まれ、取り込まれた

siRNA と相補的な配列を持つ標的 RNA が切断される<sup>44)</sup>。

最近の研究により、non-coding RNA は転写後遺伝子発現抑制に働くだけでなく、ヘテロクロマチンの形成に関わることで、遺伝子の転写抑制に寄与することが明らかにされている。分裂酵母では H3K9 のメチル化酵素である Clr4 と HP1 のホモログである Swi6 の局在に siRNA の経路が関与していることが報告されている<sup>45)</sup>。ショウジョウバエでも、生殖幹細胞の維持に不可欠な遺伝子として同定された *Piwi* がコードするタンパク質が RNA 依存的に HP1 $\alpha$  と結合し、ヘテロクロマチン領域の H3K9 のメチル化と HP1 の局在に重要であることが報告されている<sup>46,47)</sup>。最近、マウスにおいても、インプリンティング遺伝子の一つである *Air* 領域への G9a の局在に、non-coding RNA が関与していることが報告されている<sup>48)</sup>。

## 6. プロウイルスの発現抑制機構

### 6-1. ERV の発現抑制に関する DNA メチル化酵素の役割

*Dnmt1* は前述したとおり、DNA のメチル化の維持に関わる酵素であり、*Dnmt1* のノックアウトマウスは体細胞において、DNA のメチル化レベルが著しく低下する。また、胎生 9.5 日前後に発生が停止し、intracisternal A particle (IAP) の発現が再活性化することが報告されている<sup>49)</sup>。ところが、*Dnmt1* ノックアウト ES 細胞に新規に Moloney murine leukemia virus (MLV) を感染させても、効率よく DNA がメチル化されることが確認されている<sup>50)</sup>。卵子では、*Dnmt1* のアイソフォームである *Dnmt1o* が発現しているが、*Dnmt1o* を除去した卵子の IAP における DNA のメチル化レベルは野生型のものとは変化がないことが報告されている<sup>10)</sup>。

*Dnmt3a* のノックアウトマウスは、生後 4 週間前後までに死亡し、クラス I の内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus: ERV) MLV と minor satellite repeats の DNA のメチル化が若干低下する<sup>50)</sup>。一方、*Dnmt3b* のノックアウトマウスは胎生致死で生まれてこない。また、体細胞において IAP と MLV の DNA のメチル化レベルが若干低下する<sup>50)</sup>。*Dnmt3a* と *Dnmt3b* のダブルノックアウトマウスは *Dnmt1* ノックアウトマウスとよく似た表現を示し、発生途中に異常が起きる<sup>50)</sup>。また、*Dnmt3a* と *Dnmt3b* の単独ノックアウト ES 細胞では DNA のメチル化はほとんど低下しないが、ダブルノックアウトの ES 細胞では長期培養により、クラス II ERV の IAP、MusD などで DNA のメチル化レベルが低下する<sup>51)</sup>。

*Dnmt3l* は DNA のメチル化活性が確認されていないが、*Dnmt3a* の構造に変化を与え *Dnmt3a* が DNA に結合しやすくするという報告がある<sup>52,53)</sup>。また、2007 年に *Dnmt3l* はメチル化されていない H3K4 と結合し、*Dnmt3a* を誘導し、DNA のメチル化に寄与しているとする報告がなされた<sup>54)</sup>。

雄の *Dnmt3l* ノックアウトマウスでは精原細胞から精母細胞への分化に異常が起こり、不妊になる。このマウスの精巣では、LTR 型と non-LTR 型の両方のレトロトランスポゾンでの DNA のメチル化レベルが劇的に低下し、再活性化が起こることが報告されている<sup>55)</sup>。ところが、インプリンティング遺伝子の DNA メチル化は影響を受けないことが分かっている。一方、雌の *Dnmt3l* ノックアウトマウスでは ERV の DNA のメチル化レベルには変化がないものの、インプリンティング遺伝子の DNA のメチル化が低下し発現に異常が起こる<sup>56)</sup>。

ショウジョウバエでは、発生初期に起こる DNA のメチル化に *Dnmt2* が重要で、*Dnmt2* をノックアウトすると ERV の DNA メチル化レベルと H4K20 のトリメチル化レベルが低下すること、ERV の再活性化が起こることが報告されている<sup>57)</sup>。

### 6-2. non-coding RNA による ERV の抑制機構

マウスでは Dicer の経路に依存して産生される small RNA が ERV の抑制に寄与することが報告されており、2 細胞期と、8 細胞期の胚で Dicer をノックダウンすると IAP の発現が上昇する<sup>58)</sup>。また、Dicer のコンディショナルノックアウトマウスを使った解析により、Dicer を卵母細胞で除去すると mouse transposon (MT), LINE-1, SINEB1, SINEB2 の発現が上昇することが確認されている<sup>59)</sup>。

2003 年には Tuschl らによってショウジョウバエで、転移因子に対応する repeat-associated small interfering RNA (rasiRNA) と呼ばれる small RNA が同定された<sup>60)</sup>。同様に 2006 年に、転移因子に対する新規の small RNA がマウスの精巣で確認された<sup>61-64)</sup>。この small RNA はショウジョウバエにおける、piwi-interacting RNA (piRNA) と同じ性質を持つものと考えられている。

ショウジョウバエの X 染色体には、piRNA が転写されていると考えられている flamenco locus と呼ばれる領域が存在し、この領域に変異を入れると ERV の再活性化が起こることが報告されている<sup>65,66)</sup>。マウスでは piwi のホモログである RNA の *MIWI2* と *MILI* をノックアウトすると精巣で IAP と LINE-1 の DNA のメチル化が低下し、それらの発現が上昇すると報告されている<sup>67)</sup>。このことから、piRNA による抑制機構は転写前発現抑制に寄与しているだけでなく、転写後の抑制にも関与していると考えられる。また、Tudor ドメインを持ち *Mili* と結合する *Tdrd1* という分子をノックアウトすると、精巣で LINE-1 の DNA のメチル化レベルが若干低下し、LINE-1 の再活性化が起こる<sup>68)</sup>。同様に、*Miwi2* と結合する *Tdrd9* のノックアウトマウスの精巣で LINE-1 の DNA のメチル化レベルが劇的に低下し、LINE-1 の発現が上昇する。

しかしながら、なぜ piRNA の形成に関わる分子をノッ

クアウトするとレトロトランスポゾンのDNAのメチル化が低下するのか、その詳しい機構は分かっていない。また、興味深いことに、*asiRNA*と*piRNA*の産生はDicerに依存しないと考えられており<sup>62)</sup>、small RNAによるレトロトランスポゾンの抑制機構の解析に加えて、これらのsmall RNAがどのように生み出されるのか、その詳細な機構についても今後の解析が期待される。

### 6-3. クロマチンリモデリング因子によるERVの抑制機構

*Lsh1*はクロマチンリモデリング関連因子の一つで、ATPの加水分解のエネルギーを使って、クロマチンの構造を変化させる<sup>69)</sup>。*Lsh1*のノックアウトマウスは腎臓とリンパ系の発育に異常が起こっており、出生後24時間以内に死ぬ<sup>70)</sup>。*Lsh1*を欠損させた繊維芽細胞において、IAPとmajor satelliteでのH3K4のジメチル化とトリメチル化のレベルが上昇する<sup>71,72)</sup>。また、DNAのメチル化レベルがゲノム全体で低下していることが確認されている。ところが、*Lsh1*を欠損させた繊維芽細胞ではペリセントロメアでのH3K9のトリメチル化とDNAのメチル化のレベルは野生型の細胞と変化がない<sup>73)</sup>。今のところ、*Lsh1*の標的遺伝子として単一遺伝子のものは見出されておらず、*Lsh1*は繰り返し配列の制御に関わっていると考えられる。

シロイヌナズナのクロマチンリモデリング因子である、*DDM1*をノックアウトすると、通常通り生育し形態も野生型のものほとんど変わらないが、DNAのメチル化が劇的に低下することが報告されている<sup>74)</sup>。さらにシロイヌナズナでは*DDM1*ノックアウト株において、レトロトランスポジションが起こり、ゲノムに変化を与えていることが示されている<sup>75)</sup>。

### 6-4. 幹細胞におけるMLVの発現抑制機構

DNAのメチル化がERVの抑制に重要であることは明らかであるが、幹細胞においてはDNAのメチル化に非依存的なレトロウイルスの抑制機構が存在することが古くから知られていた<sup>76)</sup>。繊維芽細胞などの分化した細胞に、MLVが感染すると、細胞中のゲノムウイルスDNAが挿入され、その後感染能のあるウイルスが産生されるようになる。

ところが、EC細胞やES細胞などの発生初期のマウスから得られた細胞株では、MLVを感染させてもゲノムへの挿入は通常通りに起こるが、ウイルスがほとんど産生されないことが分かっている<sup>77)</sup>。また、DNAの脱メチル化を誘導する薬剤である5-アザシチジン(5-azadC)を分化した細胞株に投与するとMLVの発現が上昇するが、未分化な細胞株に投与してもMLVの発現レベルはほとんど変化しない<sup>76)</sup>。我々もH3K9のメチル化酵素の一つである*G9a*のノックアウトES細胞でERVのDNAのメチルが低下しているにも関わらず、ERVの発現レベルは野生型のES細胞と変化がないことを確認している<sup>41)</sup>。

これらの現象の説明として、MLVのLTRに結合する転写因子がES細胞やEC細胞で発現していないためとする報告もあるが<sup>78)</sup>、その後の転写が幹細胞特異的な何らかの抑制機構によって抑えられているのか、あるいは全く別の原因によるものなのかは最近まで謎のままであった。ところが近年になり、LTR型のレトロウイルスのprimer binding site (PBS) と呼ばれる領域にZFP809という分子を介してKAP-1/Trim28が結合しレトロウイルスの抑制に寄与するということが報告された<sup>79-81)</sup>。

## 7. ES細胞におけるプロウイルスの発現抑制にはESETが必要である

### 7-1. ESET/Setdb1について

ESETはdouble tudorドメイン、methyl-CpG-binding domain (MBD)とSETドメインを持つ分子(図3)で、Zhangらによって2002年にERG転写因子に結合するヒストンのメチル化酵素として同定された<sup>82)</sup>。SETドメインはヒストンリジンのメチル化酵素において非常によく保存されており、ヒストンメチル化活性に重要なドメインである。このほぼ同時期にRauscherらによってESETがH3K9のメチル化酵素であり、KAP-1/Trim28と結合することが報告された<sup>83)</sup>。彼らはESETのSETドメインを大腸菌によって発現させた組換えタンパク質にはヒストンメチル化活性はなく、全長を昆虫細胞に発現させたもので*in vitro*で活性があると報告している。ESETは、先ほど述べたKAP-1に加えてDNAのメチル化を認識するMBD1という分子と結合し、DNAのメチル化に依存して標的に局在するという報告もある<sup>84)</sup>。また、*ESET*ノックアウトマウスは胎生5日前後で致死となり、ES細胞の生存にもESETが必須であることが報告されている<sup>85)</sup>。さらに、ヒトがん細胞における*ESET*のノックダウンの実験から、ES細胞だけでなくあらゆる細胞の生存に必須の遺伝子であるという可能性が示唆されている<sup>86)</sup>。

ごく最近、ESETがES細胞の全能性の維持に関与するというたいへん興味深い報告がなされた<sup>87-89)</sup>。Surani, Ng, Youngらは、ES細胞において*ESET*をノックダウンすると、ES細胞がtrophoblast stem (TS)細胞系に分化しやすくなることを示している。また、NgとYoungらのゲ

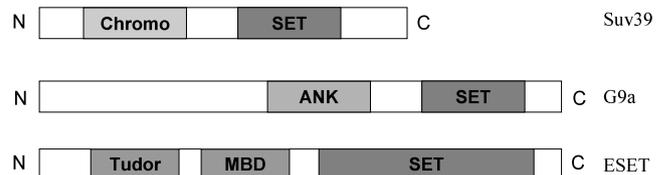


図3 H3K9のメチル化酵素の構造

Chromo: クロモドメイン, ANK: アンキリンリピート, SET: SETドメイン

ループは ESET の ChIP-Seq 解析を行い、ES 細胞における ESET の標的遺伝子を見出している。その中には、TS 細胞で発現の高い、*Cdx2*, *Gata2*, *Tcfap2a* が含まれており、ESET はこれらの遺伝子の発現を抑制することにより ES 細胞の未分化能の維持に関わっていると考えられる。さらに、Surani と Ng らは ESET が Oct4 と結合し、Oct4 によってこれらの標的遺伝子に ESET が導かれると報告している。

## 7-2. ESET ノックアウト ES 細胞において ERV の再活性化が起こる

KAP-1 が幹細胞で外来性レトロウイルス (XRV) の発現抑制に寄与しているという報告から<sup>79-81)</sup>、ESET がプロウイルス抑制機構に寄与していることが予想された。そこで筆者らは ESET のコンディショナルノックアウトマウスおよび ES 細胞を樹立し、ES 細胞における ESET によるプロウイルスの発現抑制機構について解析を行った (現在投稿中)。

その結果、ESET コンディショナルノックアウト (ESET CondKO) ES 細胞では、IAP, MusD, MLV の発現が著しく上昇していることが見出された (図 4)。また、ESET ノックダウン細胞の表現型<sup>86)</sup>と同様に、ESET を除去した

ES 細胞では数日後に細胞の増殖速度が急激に低下した。一方、*Dnmt1*, *3a*, *3b* トリプルノックアウト (*Dnmt* TKO) ES 細胞における ERV の発現レベルについても調べたが、若干の再活性化しか確認されなかった。逆に、non-LTR 型に分類される LINE-1 の発現については、ESET CondKO ES 細胞では若干の再活性化が確認されただけなのに対して、*Dnmt* TKO ES 細胞では強く発現が誘導されていた。

クロマチン免疫沈降法によって、IAP, MusD, MLV において KAP-1 と ESET の局在が確認され、ESET KO ES 細胞でこれらの ERV における H3K9 のトリメチル化のレベルが著しく減少していることが明らかとなった (図 5)。この結果は Bernstein らが ChIP-Seq 解析により明らかにした、ES 細胞とマウス繊維芽細胞における H3K9 メチル化状態の比較結果と酷似していた<sup>90)</sup>。さらに、H3K9 のトリメチル化と同様に、ERV では ESET 依存的に H4K20 のトリメチル化状態が亢進しており、これはすでに報告のあった H3K9 と H4K20 のトリメチル化の分布と一致していた<sup>91)</sup>。しかしながら、H4K20 のトリメチル化酵素である Suv4-20h1, Suv4-20h2 の両方を欠失したダブルノックアウト ES 細胞の解析の結果、これら二つの酵素と H4K20 のトリメチル化は ES 細胞における ERV の抑制に必ずしも

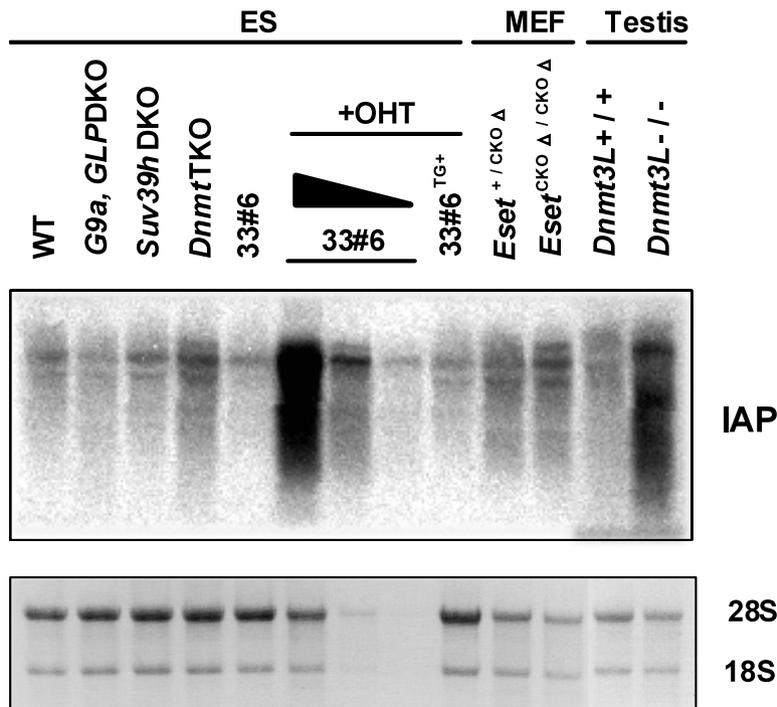


図 4 ESET Cond KO ES 細胞における ERV の発現解析

33#6 は ESET Cond KO ES 細胞であり、タモキシフェンを加えることにより、ESET が除去される。タモキシフェンを加えた 33#6 では野生型と比べて、およそ 25 倍程度、IAP の発現が上昇している。

WT: 野生型, DKO: ダブルノックアウト, TKO: トリプルノックアウト, 33#6 TG+: 33#6 に外来性 ESET を発現させた株, MEF: mouse embryonic fibroblast, OHT: タモキシフェン

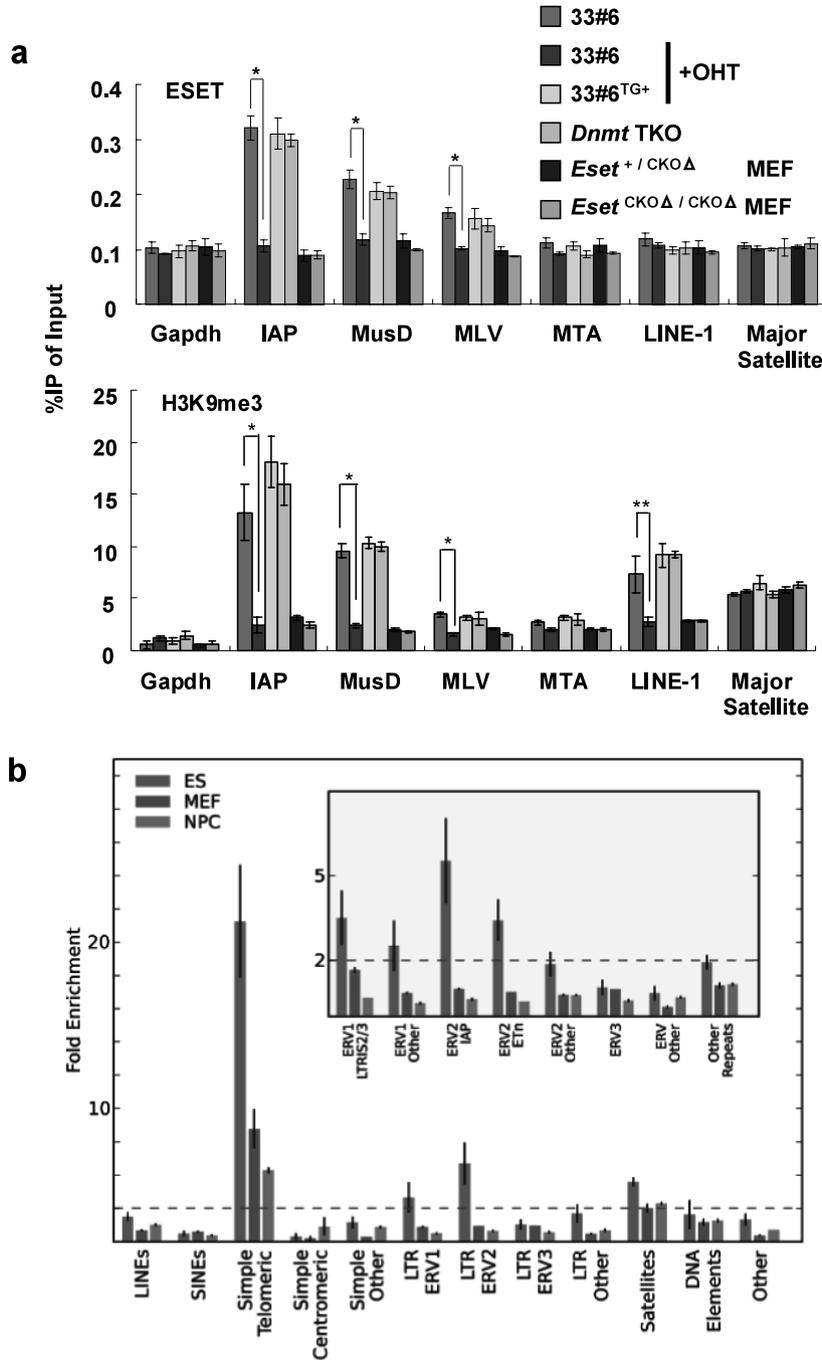


図5 ESETの局在とH3K9me3の状態  
 a) ESETの局在とH3K9me3の状態  
 b) BensterinらのH3K9me3のChIP-Seqの結果(文献90)より転載  
 H3K9me3: H3K9のトリメチル化

必須ではないことが分かった。

DNAのメチル化についても調べたところ、ESETを除去したES細胞ではMLVとMusDにおけるDNAのメチル化レベルが低下していたが、IAPについては野生型とほとんど変わらないレベルにあることが確認された。

### 7-3. なぜES細胞でESETがプロウイルスの発現抑制に関与するのか

以上の結果より、ESETがES細胞でプロウイルスの発現抑制に寄与していることが明らかとなったが、ESETが幹細胞においてだけプロウイルスの転写抑制機構に寄与することにどのような意味があるのかは不明なままである。一つの可能性として、生殖細胞へ分化する可能性のある多

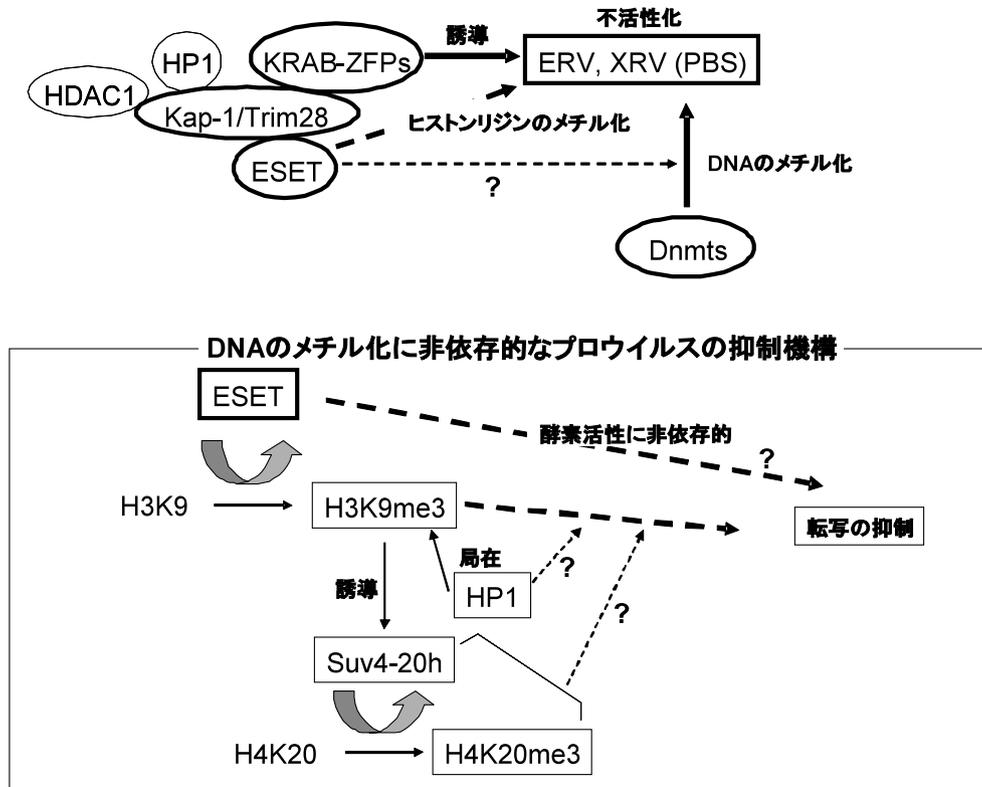


図6 ESETによるプロウイルスの発現抑制機構

能性細胞において、プロウイルスが転写された後に、別の領域へ挿入されることを防ぐことが考えられる。これはつまり、生殖系列細胞においてウイルスが増幅されて、世代を越えて遺伝してしまうことを防ぐためである。また、発生初期の細胞ではDNAの脱メチル化が起きていると考えられており、IAPのDNAのメチル化レベルも一時的に低下することが確認されている<sup>92-94</sup>。以上のことから、ESETはDNAのメチル化レベルが不安定な状態にある細胞でERVの転写抑制のバックアップ制御として機能している可能性も考えられる(図6)。

## 8. おわりに

本稿では主に哺乳類におけるエピジェネティックなレトロトランスポゾンの抑制機構について述べた。しかしながら、これまでの研究で種によってレトロトランスポゾンの抑制機構がかなり異なることが明らかになっている。また、マウスには現在も転移しているERVが存在していると考えられているが<sup>95</sup>、ヒトにおいてはほぼ全てのERVが不活性化していると考えられており<sup>96</sup>、なぜこのように種によってレトロトランスポゾンの抑制機構に違いが生まれたのかはほとんど分かっていない。

さらに、マウスでは現在確認されているだけでも、DNAのメチル化、ヒストン化学修飾、non-coding RNAと複数の抑制機構を細胞種によって使い分けていることが分

かっている。抑制機構を使い分けることにどのような意味があるのか、また他のレトロトランスポゾンの抑制機構は存在しないのか、今後の報告が期待される。

## 謝辞

本稿で取り上げた筆者らの研究報告はThe University of British ColumbiaのMatthew Lorincz博士のグループとの共同研究によるものであり、この場を借りてお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F. *et al.* (2002) *Nature*, **420**, 520.
- 2) Stocking, C. & Kozak, C.A. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3383.
- 3) Goodier, J.L. & Kazazian, H.H., Jr. (2008) *Cell*, **135**, 23.
- 4) Gogvadze, E. & Buzdin, A. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3727.
- 5) Suzuki, S., Ono, R., Narita, T., Pask, A.J., Shaw, G., Wang, C., Kohda, T., Alsop, A.E., Marshall Graves, J.A., Kohara, Y., Ishino, F., Renfree, M.B., & Kaneko-Ishino, T., (2007) *PLoS Genet.*, **3**, e55.
- 6) Callahan, R. & Smith, G.H. (2000) *Oncogene*, **19**, 992.
- 7) Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., & Eden, A. (2008) *Oncogene*, **27**, 404.
- 8) Eiden, M.V., Farrell, K., & Wilson, C.A. (1994) *J. Virol.*, **68**,

- 626.
- 9) Cheng, X. & Blumenthal, R.M. (2008) *Structure*, 16, 341.
  - 10) Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., & Li, E. (1996) *Development*, 122, 3195.
  - 11) Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998) *Nat. Genet.*, 19, 219.
  - 12) Jeltsch, A. (2006) *Epigenetics*, 1, 63.
  - 13) Bostick, M., Kim, J.K., Esteve, P.O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S.E. (2007) *Science*, 317, 1760.
  - 14) Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M., & Koseki, H. (2007) *Nature*, 450, 908.
  - 15) Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., & Shirakawa, M. (2008) *Nature*, 455, 818.
  - 16) Avvakumov, G.V., Walker, J.R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., Arrowsmith, C.H., & Dhe-Paganon, S. (2008) *Nature*, 455, 822.
  - 17) Hashimoto, H., Horton, J.R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S.E., & Cheng, X. (2008) *Nature*, 455, 826.
  - 18) Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., & Bestor, T.H. (2006) *Science*, 311, 395.
  - 19) Jurkowski, T.P., Meusburger, M., Phalke, S., Helm, M., Nellen, W., Reuter, G., & Jeltsch, A. (2008) *RNA*, 14, 1663.
  - 20) Rai, K., Chidester, S., Zavala, C.V., Manos, E.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., & Cairns, B.R. (2007) *Genes Dev.*, 21, 261.
  - 21) Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E., & Bird, A. (2001) *Nat. Genet.*, 27, 322.
  - 22) Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A., & Bird, A. (2001) *Genes Dev.*, 15, 710.
  - 23) Martin Caballero, I., Hansen, J., Leaford, D., Pollard, S., & Hendrich, B.D. (2009) *PLoS One*, 4, e4315.
  - 24) Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) *Nature*, 403, 41.
  - 25) Turner, B.M. (2000) *Bioessays*, 22, 836.
  - 26) Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., & Jenuwein, T. (2000) *Nature*, 406, 593.
  - 27) Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., & Lander, E. S. (2005) *Cell*, 120, 169.
  - 28) Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., & Timmers, H.T. (2007) *Cell*, 131, 58.
  - 29) Francis, N.J., Kingston, R.E., & Woodcock, C.L. (2004) *Science*, 306, 1574.
  - 30) Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Woringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., & Zhang, Y. (2003) *Science*, 300, 131.
  - 31) Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E. S. (2006) *Cell*, 125, 315.
  - 32) Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., & Casero, R.A. (2004) *Cell*, 119, 941.
  - 33) Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006) *Nature*, 439, 811.
  - 34) Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., & Allis, C.D. (2008) *Cell*, 135, 284.
  - 35) Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., & Shinkai, Y. (2002) *Genes Dev.*, 16, 1779.
  - 36) Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001) *Nature*, 410, 116.
  - 37) Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., & Grewal, S.I. (2001) *Science*, 292, 110.
  - 38) Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., & Allis, C.D. (2005) *Nature*, 438, 1116.
  - 39) Tamaru, H. & Selker, E.U. (2001) *Nature*, 414, 277.
  - 40) Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., & Peters, A.H. (2003) *Curr. Biol.*, 13, 1192.
  - 41) Dong, K.B., Maksakova, I.A., Mohn, F., Leung, D., Appanah, R., Lee, S., Yang, H.W., Lam, L.L., Mager, D.L., Schubeler, D., Tachibana, M., Shinkai, Y., Lorincz, M.C. (2008) *EMBO J.*, 27, 2691.
  - 42) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) *Nature*, 391, 806.
  - 43) Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. (2000) *Nature*, 404, 293.
  - 44) Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J. (2001) *Science*, 293, 1146.
  - 45) Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., & Nakayama, J. (2004) *EMBO J.*, 23, 3825.
  - 46) Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A., & Elgin, S.C. (2004) *Science*, 303, 669.
  - 47) Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C., & Lin, H. (2007) *Genes Dev.*, 21, 2300.
  - 48) Nagano, T., Mitchell, J.A., Sanz, L.A., Pauler, F.M., Ferguson-Smith, A.C., Feil, R., & Fraser, P. (2008) *Science*, 322, 1717.
  - 49) Walsh, C.P., Chaillet, J.R., & Bestor, T.H. (1998) *Nat. Genet.*, 20, 116.
  - 50) Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., & Li, E. (1999) *Cell*, 99, 247.
  - 51) Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., & Li, E. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 5594.
  - 52) Chedin, F., Lieber, M.R., & Hsieh, C.L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 16916.
  - 53) Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., & Jeltsch, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 13341.
  - 54) Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X., & Bestor, T.H. (2007) *Nature*, 448, 714.
  - 55) Bourchis, D. & Bestor, T.H. (2004) *Nature*, 431, 96.
  - 56) Bourchis, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., & Bestor, T.H. (2001) *Science*, 294, 2536.
  - 57) Phalke, S., Nickel, O., Walluscheck, D., Hortig, F., Onorati, M. C., & Reuter, G. (2009) *Nat. Genet.*, 41, 696.
  - 58) Svoboda, P., Stein, P., Anger, M., Bernstein, E., Hannon, G.J., & Schultz, R.M. (2004) *Dev. Biol.*, 269, 276.
  - 59) Murchison, E.P., Stein, P., Xuan, Z., Pan, H., Zhang, M.Q., Schultz, R.M., & Hannon, G.J. (2007) *Genes Dev.*, 21, 682.
  - 60) Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., & Tuschl, T. (2003) *Dev. Cell*, 5, 337.
  - 61) Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., & Carmell, M.A. (2006) *Nature*, 442, 199.
  - 62) Aravin, A.A., Hannon, G.J., & Brennecke, J. (2007) *Science*,

- 318, 761.
- 63) Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., & Imai, H. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1732.
- 64) Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z., & Lin, H. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1709.
- 65) Sarot, E., Payen-Groschene, G., Bucheton, A., & Pelisson, A. (2004) *Genetics*, **166**, 1313.
- 66) Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G.J. (2007) *Cell*, **128**, 1089.
- 67) Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., Hata, K., Li, E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H., & Nakano, T. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 908.
- 68) Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A., & Pil-lai, R.S. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 639.
- 69) Peterson, C.L. & Workman, J.L. (2000) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 187.
- 70) Geiman, T.M., Tessarollo, L., Anver, M.R., Kopp, J.B., Ward, J.M., & Muegge, K. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 211.
- 71) Yan, Q., Huang, J., Fan, T., Zhu, H., & Muegge, K. (2003) *EMBO J.*, **22**, 5154.
- 72) Huang, J., Fan, T., Yan, Q., Zhu, H., Fox, S., Issaq, H.J., Best, L., Gangi, L., Munroe, D., & Muegge, K. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5019.
- 73) Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q., & Muegge, K. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 2940.
- 74) Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., & Richards, E.J. (1993) *Science*, **260**, 1926.
- 75) Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., & Kakutani, T. (2009) *Nature*, **461**, 423.
- 76) Niwa, O., Yokota, Y., Ishida, H., & Sugahara, T. (1983) *Cell*, **32**, 1105.
- 77) Teich, N.M., Weiss, R.A., Martin, G.R., & Lowy, D.R. (1977) *Cell*, **12**, 973.
- 78) Linney, E., Davis, B., Overhauser, J., Chao, E., & Fan, H. (1984) *Nature*, **308**, 470.
- 79) Wolf, D. & Goff, S.P. (2007) *Cell*, **131**, 46.
- 80) Wolf, D., Cammas, F., Lossos, R., & Goff, S.P. (2008) *J. Virol.*, **82**, 4675.
- 81) Wolf, D. & Goff, S.P. (2009) *Nature*, **458**, 1201.
- 82) Yang, L., Xia, L., Wu, D.Y., Wang, H., Chansky, H.A., Schubach, W.H., Hickstein, D.D., & Zhang, Y. (2002) *Oncogene*, **21**, 148.
- 83) Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., Rauscher, F.J., 3rd (2002) *Genes Dev.*, **16**, 919.
- 84) Sarraf, S.A. & Stancheva, I. (2004) *Mol. Cell*, **15**, 595.
- 85) Dodge, J.E., Kang, Y.K., Beppu, H., Lei, H., & Li, E. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 2478.
- 86) Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G., & Zhang, Y. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 475.
- 87) Yeap, L.S., Hayashi, K., & Surani, M.A. (2009) *Epigenetics Chromatin*, **2**, 12.
- 88) Yuan, P., Han, J., Guo, G., Orlov, Y.L., Huss, M., Loh, Y.H., Yaw, L.P., Robson, P., Lim, B., & Ng, H.H. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2507.
- 89) Bilodeau, S., Kagey, M.H., Frampton, G.M., Rahl, P.B., & Young, R.A. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2484.
- 90) Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E. et al. (2007) *Nature*, **448**, 553.
- 91) Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., & Jenuwein, T. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1251.
- 92) Kim, S.H., Kang, Y.K., Koo, D.B., Kang, M.J., Moon, S.J., Lee, K.K., & Han, Y.M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 58.
- 93) Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., & Reik, W. (2003) *Genesis*, **35**, 88.
- 94) Reik, W. (2007) *Nature*, **447**, 425.
- 95) Dewannieux, M., Dupressoir, A., Harper, F., Pierron, G., & Heidmann, T. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 534.
- 96) Stoye, J.P. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, R914.
-