

2019年11月13日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

## iPS細胞誘導時にレトロウイルスの遺伝子発現を抑制する新しい機構の発見

### 研究成果のポイント

1. 我々独自の iPS 細胞誘導方法によって、レトロウイルス<sup>注1)</sup>からの遺伝子発現が、素早く高効率に抑制されることを発見しました。
2. レトロウイルスゲノム中の Primer-binding site (PBS)<sup>注2)</sup>が、この発現抑制に関与していることがわかりました。
3. iPS 細胞誘導によって発現が誘導された TAF-I $\alpha$ タンパク質<sup>注3)</sup>が PBS 周辺に結合し、その発現抑制の開始に関与していることを見出しました。
4. 内在性レトロウイルスの再活性化阻害による、ゲノムの安定性維持機構の理解に繋がることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 西村健准教授、久武幸司教授らの研究グループは、レトロウイルスからの遺伝子発現を抑制する新たな分子機構として、TAF-I $\alpha$ タンパク質が、レトロウイルスゲノム上の Primer-binding site (PBS)周辺に結合して、その発現抑制を起こすことを見出しました。

人工多能性幹細胞(iPS細胞)をレトロウイルスベクターを用いて誘導する際、その誘導過程でレトロウイルスからの遺伝子発現の抑制(サイレンシング)が起こることが知られています。また、ヒトゲノムの安定性を維持するためには、過去に感染したレトロウイルスの残骸である、内在性レトロウイルスのサイレンシングが重要です。これに関わる因子として、様々な分子が同定されてきていますが、その開始機構など、詳細な分子機構はまだ明らかになっていません。

本研究グループは、独自の遺伝子導入ベクター(SeVdpベクター<sup>注4)</sup>)を用いてiPS細胞誘導を行うと、誘導開始5日後という早い時期に、ほぼ全ての細胞でレトロウイルスサイレンシングが起きることを明らかにしました。そこで、このiPS細胞誘導系を用いて、レトロウイルスサイレンシングの分子機構の解析を行いました。その結果、レトロウイルスゲノム中のPBS配列がサイレンシングに重要であることや、iPS細胞誘導に用いる遺伝子のうち、OCT4、SOX2、c-MYCの3つが、このサイレンシング誘導に必要であることを明らかにしました。サイレンシング誘導時にPBS周辺に結合する分子を同定して、その機能解析を行った結果、TAF-I $\alpha$ タンパク質はiPS細胞誘導時に発現が誘導されてきて、PBS周辺に結合することによって、レトロウイルスのサイレンシングを引き起こすことを明らかにしました。

本研究成果は、内在性レトロウイルスの制御によってゲノム安定性を維持する機構のみならず、生体内の様々な遺伝子発現調節機構の理解につながることを期待されます。

本研究の成果は、2019年11月12日付「Cell Reports」誌で公開されました。

## 研究の背景

京都大学の山中教授らが人工多能性幹細胞(iPS細胞)を世界で初めて作成した際、レトロウイルスベクターを用い、4つの初期化誘導遺伝子(KLF4、OCT4、SOX2、c-MYC)を発現させてiPS細胞を誘導しました。iPS細胞を様々な細胞に分化させるためには、初期化誘導遺伝子の発現が抑制される必要があるため、レトロウイルスベクターからの遺伝子発現が抑制されていることが、良質なiPS細胞の指標の一つとされています。従来のレトロウイルスベクターを用いたiPS細胞誘導方法では、レトロウイルスベクターからの遺伝子発現抑制(サイレンシング)が誘導後期に起こると言われていますが、どのような機構でサイレンシングが起こるかは不明です。また、ヒトのゲノムDNA中には、太古の昔に人類に感染したレトロウイルスの残骸として、内在性レトロウイルスが存在します。そして、この内在性レトロウイルスからの遺伝子発現が起こり、ウイルスゲノムが増殖すると、ヒトゲノムの新たな場所にこのウイルスゲノムが挿入されるため、ヒトゲノムの安定性が脅かされます。そのため、内在性レトロウイルスのサイレンシングを維持し、再活性化させないことが、ゲノムの安定性を維持するために重要です。

このレトロウイルスのサイレンシングが起こる機構については、関連する因子が同定されてきてはいますが、どのようにしてサイレンシングが開始されるかなど、その詳細な分子機構は明らかになっていません。

## 研究内容と成果

本研究では、レトロウイルスを感染させた細胞に対して、我々独自の遺伝子導入ベクター(SeVdp ベクター)を用いて iPS 細胞誘導を行い、誘導過程で起こるサイレンシングを観察しました。その結果、iPS 細胞誘導開始 5 日後には、サイレンシングがほぼ全ての細胞で起きていました。このように、我々の iPS 細胞誘導方法では、サイレンシングを素早く高効率で誘導できた(図1)ことから、この方法を用いて、サイレンシング誘導機構の解析を行いました。

まず始めに、変異を挿入したレトロウイルスを用いてサイレンシング誘導の有無を解析した結果、レトロウイルスゲノムに存在する、Primer-binding site (PBS) の配列が、サイレンシング誘導に重要であることが分かりました。また、4つの初期化誘導遺伝子の中で、OCT4、SOX2、c-MYC の 3 つがサイレンシング誘導に必要であることも明らかになりました。

そこで次に、サイレンシングが起こる際に PBS 周辺に結合しているタンパク質の同定を試みた結果、TAF-I タンパク質が同定されました。TAF-I には TAF-I $\alpha$  と TAF-I $\beta$  の二つの異なる構造のタンパク質(アイソフォーム)が存在しますが、両者の発現を調べたところ、TAF-I $\alpha$  は iPS 細胞誘導に伴って発現が誘導されてくるのに対し、TAF-I $\beta$  は常に発現していました。そして、TAF-I $\alpha$  を過剰発現させることによって、より多くの細胞にサイレンシングを誘導できることも見出しました(図2)。

以上の結果から、iPS 細胞誘導時には、TAF-I $\alpha$  の発現が誘導され、それがレトロウイルスの PBS 周辺に結合することによってサイレンシングを誘導する(図3)という、新しいサイレンシング開始機構が明らかになりました。

## 今後の展開

ヒト遺伝子の発現調節において、レトロウイルスサイレンシングに働く分子と共通なものが数多く存在します。本研究をさらに進めて、TAF-I $\alpha$  を中心としたサイレンシング機構を明らかにすることによって、生体における遺伝子発現調節機構の理解を深めることにつながると考えられます。また、内在性レトロウイルスの再活性化を防ぎ、ゲノムの安定性を維持する分子機構の理解や応用にも、本研究成果が活かされることが期待されます。

参考図

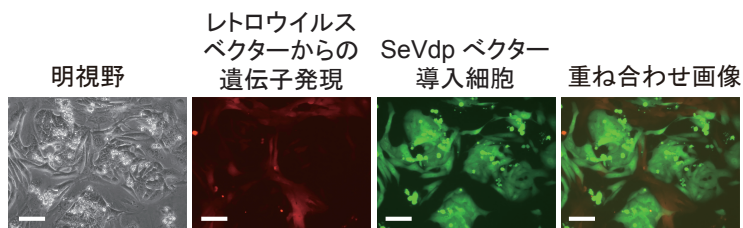


図 1: iPS 細胞誘導によるレトロウイルスサイレンシングの誘導

iPS 細胞誘導用 SeVdp ベクターを導入 5 日後に、レトロウイルスからの赤色蛍光タンパク質の発現を観察すると、SeVdp ベクター導入細胞では、レトロウイルスからの遺伝子発現が抑制されている。

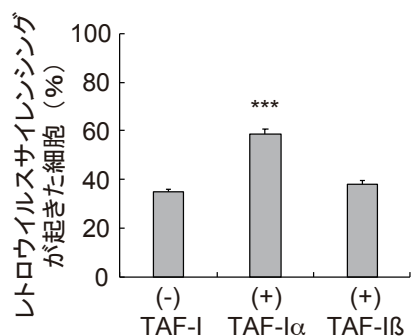


図 2: TAF-I $\alpha$  導入によるレトロウイルスサイレンシングの誘導

TAF-I $\alpha$  を過剰発現させることにより、より多くの細胞でレトロウイルスサイレンシングが誘導されるのに対し、TAF-I $\beta$  発現ではサイレンシングの促進は起きない。

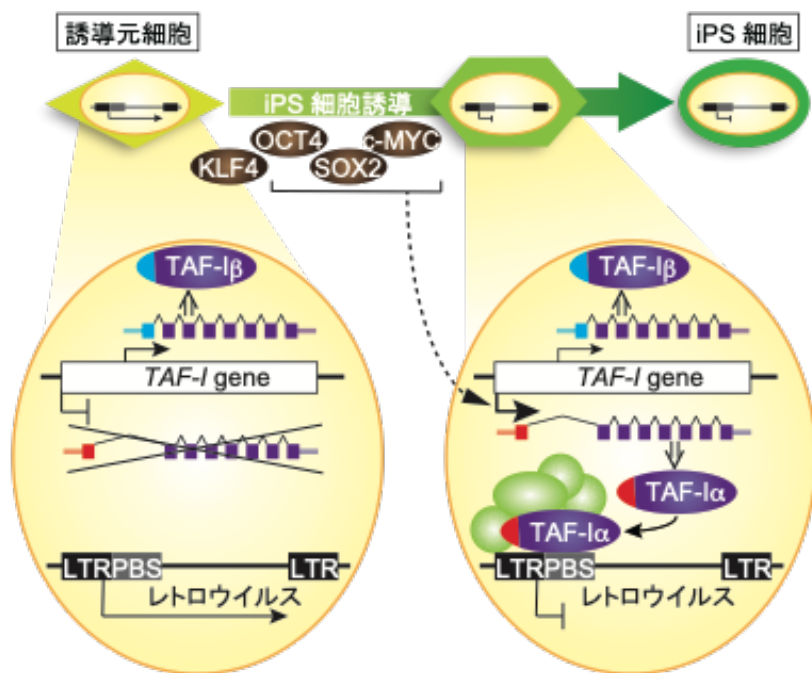


図 3: 本研究の概要

iPS 細胞誘導前には TAF-I $\beta$  のみが発現し、TAF-I $\alpha$  が発現していないが、iPS 細胞誘導によって TAF-I $\alpha$  の発現が誘導される。そして、TAF-I $\alpha$  はレトロウイルスの PBS に結合することによって、レトロウイルスからの遺伝子発現を抑制すると考えられる。

## 用語解説

### 注1) レトロウイルス

RNA をゲノムに持ち、そのゲノムを DNA に逆転写することによって、感染先の細胞の染色体 DNA 中にウイルスゲノムを挿入できる。ヒトに対する病原性はほとんど無い。この性質を利用して、持続的に遺伝子導入を行うことができる、レトロウイルスベクターが開発されている。また、ヒトの染色体内には、過去に感染したレトロウイルスが挿入された残骸として、内在性レトロウイルスが多く存在する。

### 注2) Primer-binding site (PBS)

レトロウイルスゲノム上に存在する、転写開始に重要なヌクレオチド配列。この配列に変異を入れると、レトロウイルスのサイレンシングが起きにくくなることが知られている。

### 注3) TAF-I $\alpha$ タンパク質

ヒストンへの結合、修飾等を介して、ヒトのみならず、ウイルスなど様々な生物種の遺伝子発現に関与する。転写開始部位が異なることによって、N 末端側のアミノ酸配列が異なる、TAF-I $\alpha$ 、TAF-I $\beta$  の二種類のタンパク質(アイソフォーム)が存在する。

### 注4) SeVdp ベクター

センダイウイルスの持続感染株を元に作製されたウイルスベクター。染色体挿入すること無く、持続的に遺伝子を発現させることが可能。SeVdp ベクターで iPS 細胞誘導遺伝子を細胞に導入すると、高効率で iPS 細胞が誘導される。参考文献)

## 参考文献

Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M: Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: a Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprogramming. *J. Biol. Chem.*, Vol. 286(6), 4760-4771, 2011

## 掲載論文

【題名】 Template Activating Factor-I $\alpha$  Regulates Retroviral Silencing during Reprogramming  
(TAF-I $\alpha$  は iPS 細胞誘導時のレトロウイルスサイレンシングを制御する)

【著者名】 Bui PL, Nishimura K, Seminario GM, Kumar A, Aizawa S, Murano K, Nagata K, Hayashi Y, Fukuda A, Onuma Y, Ito Y, Nakanishi M, Hisatake K

【掲載誌】 Cell Reports

## 問い合わせ先

西村 健(にしむら けん)

筑波大学 医学医療系 准教授

久武 幸司(ひさたけ こうじ)

筑波大学 医学医療系 教授