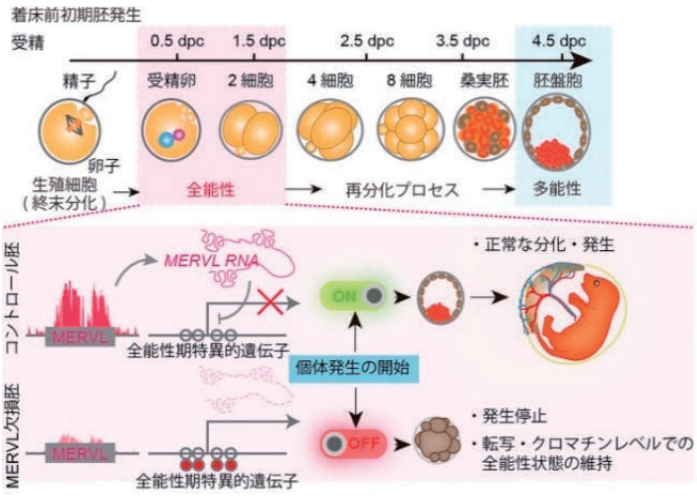
122　全能性制御における内在性レトロウイルスの役割	坂下　陽彦

【目的】全能性とは、あるひとつの細胞がいかなる細胞種へも分化でき、自律的に個体を形成できる能力であり、哺乳動物においては、受精卵のみが全能性を発揮できる唯一の細胞である。興味深いことに、生物進化の過程で宿主ゲノムに感染し組み込まれた内在性レトロウイルス（Endogenous Retroviruses：ERVs）の一種であるMERVLが、全能性期特異的に一過的に発現する。本研究では、ゲノム中に散在するERVsを含む転移因子を高効率に標的とする多コピー遺伝子解析技術を開発し、全能性期および再分化プロセスにおけるMERVLの機能的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】MERVLをターゲティングするアンチセンスオリゴ核酸（ASOs）ならびにsiRNAを*in silico*ならびに*in vitro*システムを用いて同定し、最もノックダウン（KD）効率の高い各オリゴ核酸をマウス受精卵へ顕微注入することでMERVL欠損胚を作製した。MERVL依存的な全能性制御ならびに個体発生制御機構を明らかにするため、MERVL-KD胚におけるトランスクリプトームおよびエピゲノム解析を実施した。

【結果】ASOsによるMERVL-KD胚では、初期発生過程において細胞分化やゲノム安定性の維持に異常が観られ、胚盤胞期より以前に胚性致死を呈すことが明らかになった。さらにRNA-seqおよびATAC-seqによる統合的オミクス解析を通じて、MERVL-KD胚では、本来厳密に制御を受けているはずの全能性期特異的遺伝子の発現やその転写開始点近傍のオープンクロマチン状態が発生の進行を経ても異所的に維持され続けていることが明らかになった。従って、ゲノム中に散在するMERVLの発現は、全能性獲得後の細胞分化ならびに個体発生の開始に必須であることが結論付けられた（図）。興味深いことに、同様のKD実験をASOsの代わりにsiRNAを使用して行ったところ、ASOsで観られたような胚発生の異常は生じなかった。また、MERVLのトランス作用性RNAのみをMERVL欠損胚に外部から誘導しても、胚発生障害はレスキューされなかった。これらのことは、全能性期における MERVL の本質的な機能はウイルス粒子をコードするタンパク質や核内に遊離しているトランス作用性RNAではなく、MERVL遺伝子座における転写自体もしくはそれに伴うクロマチン変化といったシス作用性因子により担保されていることが強く示唆された。実際、MERVL 遺伝子座のシス作用性を dCas9-KRAB-MeCP2融合タンパク質を用いたCRISPRiにより抑制すると、ASOsによるMERVL欠損胚と同様に、胚発生異常や異所的な全能性期特異的遺伝子の発現が観察された。加えて、MERVL転写欠損下における転写とクロマチン状態をゲノム広範囲に評価した結果、MERVL遺伝子座を中心とした近傍50 kbまでの転写やクロマチンアクセッシビリティが、MERVL欠損胚で減退していることを明らかにし、宿主細胞の再分化プロセスに おいて生じる大規模なクロマチン再構築にMERVLのシス作用性が必須であることを示した。

MERVL依存的なクロマチン再構築による分化制御機構



122. 全能性制御における内在性レトロウイルスの役割

坂下　陽彦

慶應義塾大学 医学部 分子生物学教室

Key words：全能性制御，個体発生，内在性レトロウイルス，シス作用性因子，クロマチン制御

緒　言

全能性とは、あるひとつの細胞がいかなる細胞種へも分化でき、自律的に個体を形成できる能力を指す。哺乳動物においては、終末分化した卵子と精子の受精によって誕生する「受精卵」のみが全能性を獲得し発揮できる唯一の細胞である。この全能性発揮のための重要なプロセスの一環として、受精卵や 2 細胞期胚では、胚性遺伝子の活性化（Zygotic gene activation：ZGA）が生じる。つまり、卵子に蓄えられていた母性因子による発生制御から、自身の遺伝子を用いたものに切り替わる。ZGA を薬剤処理により阻害すると正常な胚発生が行われないことから、哺乳動物の初期発生過程における全能性の獲得と発揮は、個体発生と長期的な種の保存にとって極めて重要な現象である［1］。しかしながら、全能性の概念が提唱されて 100 年以上経たのにも関わらず［2］、その性質や機能を担保する制御機構についての理解は不十分であり、未だ一概念の域を出ていない。多くの研究者が全能性制御を担うマスター転写因子の探索を行ってきたのにも関わらず未だ捕らえられずにいることから、全能性の実態は山中因子に代表される主要な転写因子の発現ではなく、受精後の極短い期間で生じるゲノム上の大規模なクロマチンの再構成にあると考えられる。そこで、提案者らは、大規模な宿主ゲノムのリプログラミングを駆動する候補因子としてゲノム上に散在し、ZGA に伴い大規模な転写変動が生じる内在性レトロウイルス（Endogenous Retroviruses：ERVs）の動態と機能に着目した。

ERVs は、生物進化の過程で宿主ゲノムに組み込まれた外来性レトロウイルス感染と転移の痕跡であり、宿主の進化および生物多様性の獲得に重要な機能を果たしていたと考えられている［3］。ERVs は宿主の転写機構を利用した転移活性を保有するため、ゲノム上の多数の箇所で同一の ERVs が点在している。この特性から ERVs は変異原としての性質を持ち、ほとんどの体細胞組織では抑制的エピゲノム修飾を介して強固な不活性化を受けている。一方で、生殖組織および胎盤組織といったある特定の組織では、ERVs の転写活性がむしろ亢進しており、細胞の分化・発達および機能維持に重要な役割を持つことが報告されている［4，5］。このことは、宿主ゲノムへの変異原性のため通常、抑制的エピゲノム修飾を介して不活性化されている ERVs が、特定の劇的な遺伝子発現パターン変動の場においては転写活性が亢進し、宿主ゲノムの制御に機能していることを示唆している。興味深いことに、ERVs の一種である MERVL の発現も上述の ZGA に伴い一過的に惹起される。また、通常全能性を有していないマウス ES 細胞においても、ごく一部の細胞集団（1%以下）で MERVL の発現が観られ、この ES 細胞をマウス胚盤胞へ移植することで胎盤組織を含む全ての細胞系列へ分化することが示されている［6］。この生理学的特性により、MERVL はその発現細胞が全能性を保有するかどうかを識別するためのマーカーとして繁用されてきた。その一方で、ゲノム中に数百～数千コピー存在する MERVL を標的とすることの困難さにより、その機能的意義の追求はこれまでほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、独自に開発した多コピー遺伝子解析技術を使用し、全能性期特異的な MERVL の発現が真に宿主の個体発生に機能的かどうかの検証を行い、MERVL の転写が全能性獲得後の細胞分化ならびに個体発生の開始に必須であることを明らかにした［7］。

方　法

1. MERVL-KD 胚の作製

公共データベースより MERVL 全長のコンセンサス配列を取得し、LGC Biosearch Technologies 社の「Stellaris Probe Designer」を用いて MERVL 配列へ相補的に結合する 50 セットのオリゴ核酸を合成した。RNase sensitivity assay［8］により MERVL RNA を最も強く抑制する上位 3 種類のオリゴ核酸を MERVL 標的アンチセンスオリゴ核酸（ASOs）として以降の実験に供試した。

KD 実験に使用した受精卵は、過排卵処理後に BDF1 雄マウスと自然交配した同系統の雌マウス（8 週齢、日本 SLC）から採取した。採卵後の前核期受精卵の雄性前核へ 20 μM MERVL ASOs を顕微注入し、MERVL-KD 胚を作出した。また、コントロール郡として、20 μM Scrambled ASOs の顕微注入も同様に行った。その後、構築したコントロール胚と MERVL-KD 胚を KSOM 培地に移し、37℃、5%CO_2の条件で体外培養を行った。

2. MERVL-KD 胚のトランスクリプトームならびにエピゲノム解析

酸性タイロード液を用いて 2、4、8 細胞期のコントロールならびに MERVL-KD 胚から透明帯を除去し、20～30 個の胚をプールしたものを 1 サンプルとして RNA-seq 解析および ATAC-seq 解析に供試した。RNA-seq ライブラリの構築は、SMART-seq Stranded Kit（Clontech）を用いて行い、実験手順はキット付属のプロトコルに準拠した。ATAC-seq ライブラリは既報の方法に従い［9］、Nextera XT DNA Library Preparation Kit 付属の Tn5 トランスポゼースを用いて作製した。各ライブラリ濃度を 10 nM に調製し、HiSeqX 次世代シークエンサー（150 bp、Paired-end）でシークエンスを行った。

結果および考察

1. 全能期特異的な MERVL の転写は宿主の初期発生に必須である

マウス初期発生過程における MERVL の機能的意義を明らかにするため、合成した MERVL 標的 ASOs をマウス受精卵へ顕微注入し、MERVL RNA の KD を行った（図 1a）。2 細胞期胚において MERVL の発現を、RNA FISH および免疫染色法によって検証した結果、MERVL-KD 群では RNA およびタンパク質レベルで MERVL の発現が強く抑制されていることを明らかにした（図 1b）。これにより、本研究で合成した MERVL 標的 ASOs が、ゲノム中に散在する MERVL（n＝1,426 loci）に対し強い KD 活性をもつことが裏付けられた。さらに、KD 後 4 日間の体外培養により MERVL-KD 胚の胚盤胞期までの発生率を評価した結果、大部分の MERVL-KD 胚は胚盤胞期より以前に異常卵割により発生を停止することが明らかになった（図 1c、d）。一方で、コントロール胚では 90%以上の胚が胚盤胞期へ発生を進めており、ASOs の導入による発生異常は観察されなかった（図 1c、d）。さらに、MERVL-KD 胚の生理学的表現型をより詳細に解析したところ、初期分化マーカーの発現レベルの低下、ゲノム不安定化の兆候（核の変性や微小核構造）ならびに割球のアポトーシスが、MERVL-KD 群において高頻度で観られた（図 1e～g）。これらの結果から、全能性期における MERVL の転写はその後の発生に伴う初期分化ならびにゲノム安定性の維持に必須の役割を持つことが明らかになった。

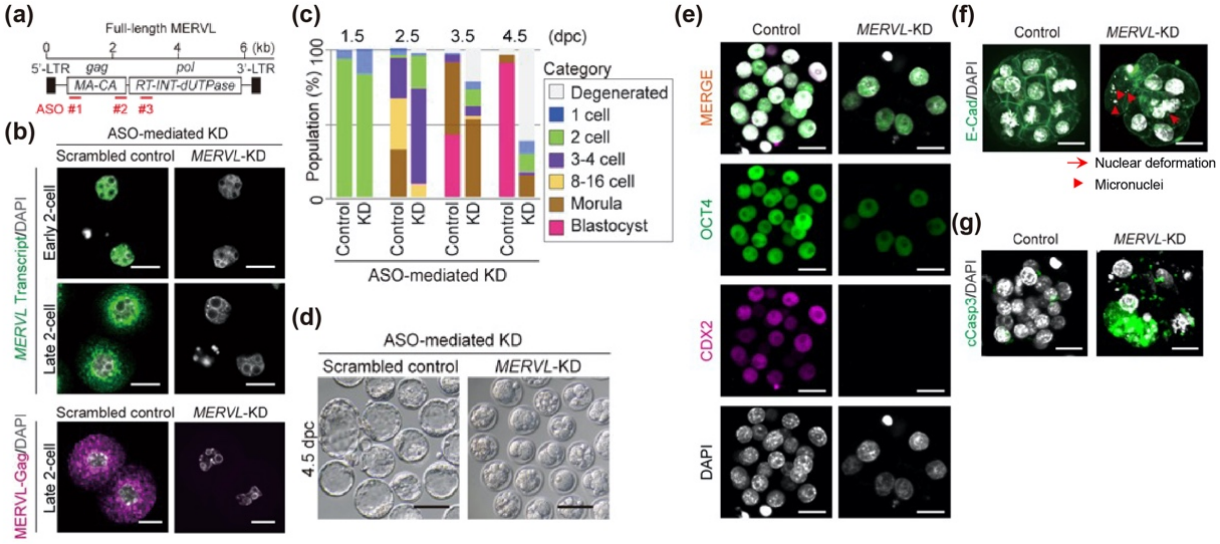


図 1. MERVL は初期発生過程における細胞分化ならびにゲノムの安定化に必須である

a) MERVL の全長配列と ASOs 標的領域。

b) smFISH（上段）と免疫染色（下段）による MERVL の発現解析。

c) 培養 4 日目までのコントロール胚ならびに MERVL-KD 胚の発生率の比較。

d) 培養 4 日目におけるコントロール胚ならびに MERVL-KD 胚の代表的顕微鏡像。
スケールバー：100 μm。

e) 免疫染色による初期分化マーカーの発現解析。スケールバー：20 μm。

f) MERVL-KD で観察されるゲノム不安定化の代表的な染色像。スケールバー：20 μm。

g) MERVL-KD で高頻度に観察されるアポトーシスの代表的な染色像。スケールバー：20 μm。

2. MERVL-KD 胚では全能性期様の遺伝子発現パターンならびにクロマチン状態が発生の進行を経ても異所的に維持され、正常な発生が妨げられる

ASOs による MERVL-KD 胚において初期発生障害を引き起こすその根本的な分子メカニズムを明らかにするため、まず初めに MERVL-KD 胚のトランスクリプトームに着目した。2、4、8 細胞期胚における Total RNA-seq 解析によりコントロールおよび MERVL-KD 胚間の遺伝子発現プロファイルを比較解析した結果、通常 2 細胞期特異的に発現する 2C 遺伝子と呼ばれる全能性期特異的遺伝子の発現が、MERVL-KD 胚では 4 細胞期以降の発生ステージにおいても異所的に維持されていることが明らかになった（図 2a、b）。さらに、ATAC-seq 解析により MERVL-KD 胚におけるクロマチン状態も同様に評価を行った。Total RNA-seq 解析の結果と一致して、2C 遺伝子の転写開始点近傍のように全能性期特異的にアクセッシブルな状態にし、その後はすぐにクローズドになるクロマチン領域が、MERVL-KD 胚では発生の進行を経てもオープンクロマチンのままになっていることが明らかになった（図 2c～e）。これらの結果から、MERVL-KD 胚は 2 細胞期様のトランスクリプトームならびにクロマチン状態を維持し、細胞分化や発生の進行が障害されていることが示唆された。

3. 全能性期において MERVL はシス作用性因子として機能する

ゲノム中に散在するMERVLの一部は、ウイルス粒子をコードする全長配列をもつため、MERVL遺伝子座で転写が生じるとセントラルドグマに沿ってMERVL mRNAおよびウイルスタンパク質が産生される。従って、MERVL遺伝子座の転写自体（シス作用性）、転写後mRNA（トランス作用性）ならびにウイルスタンパク質、いずれの遺伝子産物がMERVLの機能的本質を担うのかを検証した。

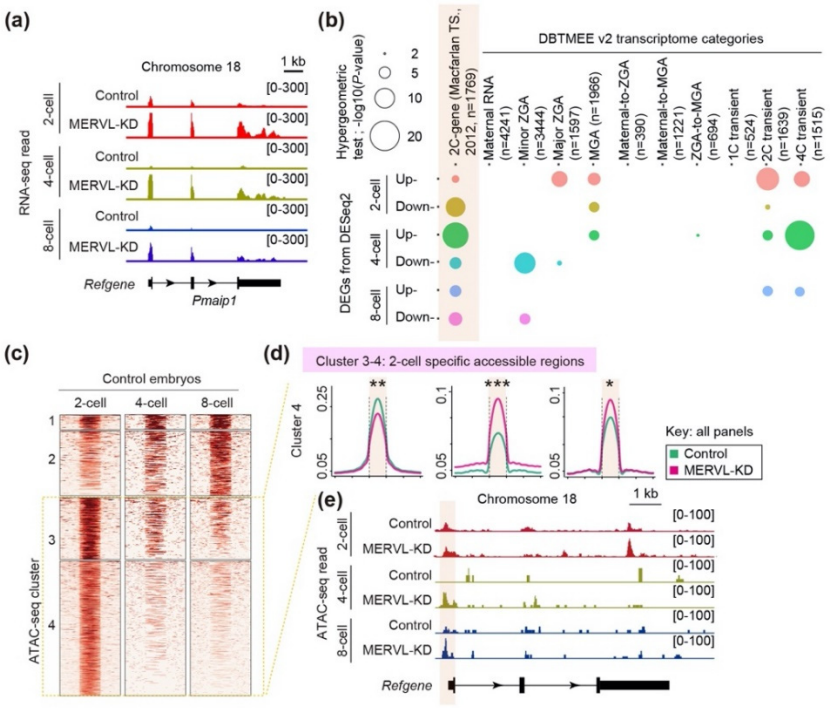


図 2. MERVL-KD 胚は全能性期様の遺伝子発現パターンとクロマチン状態を維持する

a) コントロールならびに MERVL-KD 胚における代表的な 2C 遺伝子の発現状態。

b) コントロールおよび MERVL-KD 胚間の発現変動遺伝子（DEGs）には有意に 2C 遺伝子が濃縮されている。$p<0.001$（Hypergemetric test）。

c) コントロール胚（2、4、8 細胞期）における ATAC-seq ピークのクラスタリング結果。

d) 2 細胞期特異的なオープンクロマチン領域におけるコントロールならびに MERVL-KD 胚の ATAC-seq リードエンリッチメント。*p＜0.05、**p＜0.01、***p<0.001（Wilcoxon rank sum test）。

e) コントロールならびに MERVL-KD 胚における代表的な 2C 遺伝子のクロマチン状態。赤色の領域は転写開始点近傍を示す。

まず初めに、MERVL がコードするウイルスタンパク質の機能を明らかにするため、細胞質に局在する Argonaute（Ago）依存的に標的 RNA を分解する siRNA を用いて MERVL の KD 実験を行った。合成した MERVL 標的 siRNAs をマウス受精卵へ顕微注入したところ、MERVL RNA の核内シグナルは残したまま、タンパク質発現のみを高効率に抑制することに成功した（図 3a）。興味深いことに、siRNA による MERVL-KD 胚では、ASOs で観られた発生異常は観察されず、胚盤胞期までの発生率はコントロール胚と同等であった（図 3b、c）。第二に、MERVL の転写後 RNA の機能性を明らかにするため、ASOs による KD と同時に、配列置換により ASOs に抵抗性をもたせた人工合成 MERVL RNA をマウス受精卵に導入し、MERVL-KD のレスキュー試験を行った。その結果、KD 胚における MERVL RNA の発現レベルは、外部からの MERVL RNA の導入によってコントロール胚と同程度まで回復するものの、発生障害の表現型はレスキューされなかった（図 3d～f）。これらのことは、MERVL 遺伝子座から産生されるトランス作用性 RNA やウイルスタンパク質ではなく、MERVL の転写自体がもつ何らかのシス作用性が初期発生過程において機能的に重要であることを示唆する。実際、全能性期における MERVL 遺伝子座のシス作用性を dCas9-KRAB-MeCP2 融合タンパク質を用いた CRISPRi システムにより抑制すると、ASOs による MERVL-KD 胚と同様に、初期胚における発生障害や 2C 遺伝子の調節不全が観察された（図 3g～j）。

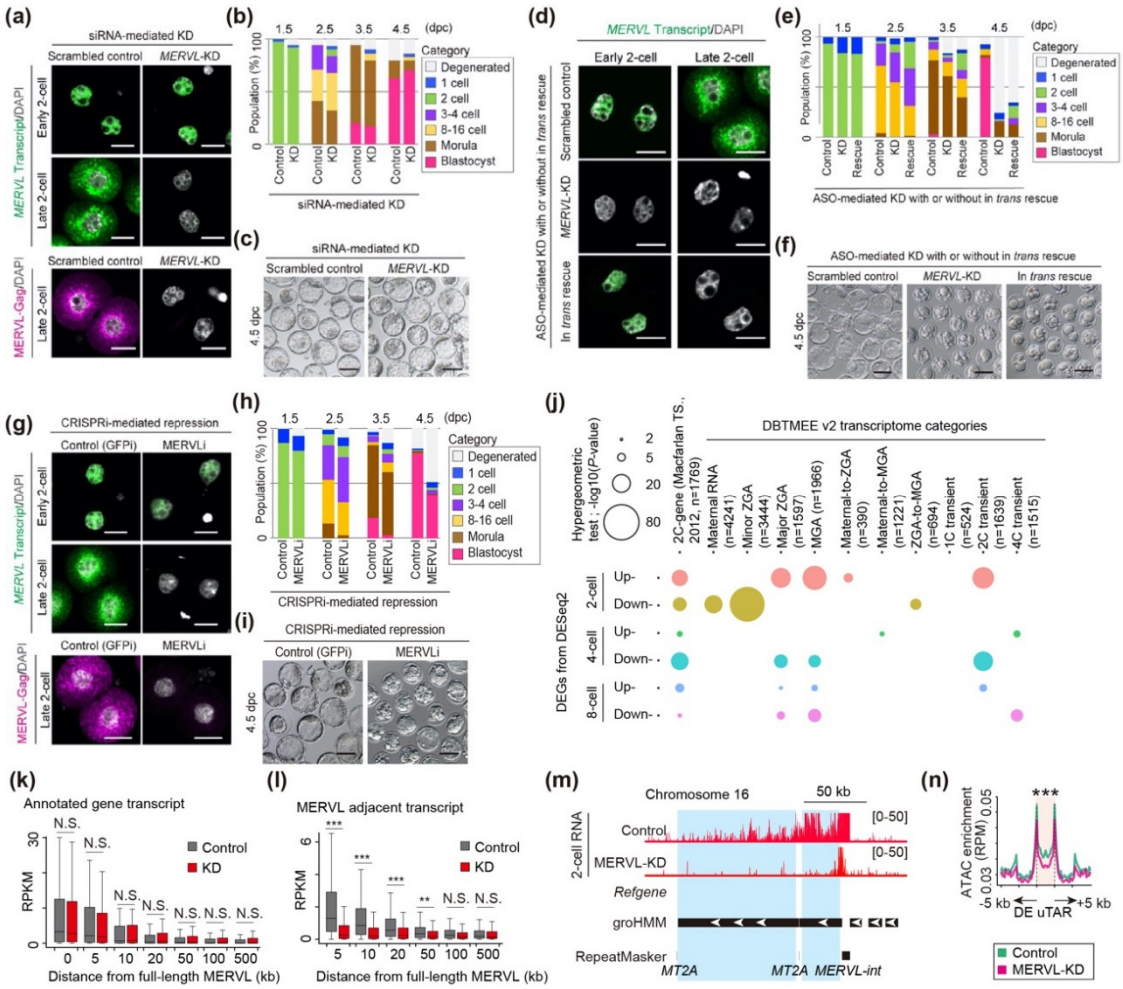


図 3. MERVL 転写のもつシス作用性がマウス初期発生に必須である。

a) siRNA-mediated MERVL-KD 胚における smFISH（上段）と免疫染色（下段）による MERVL の発現解析。

b) 培養 4 日目までのコントロール胚ならびに siRNA-mediated MERVL-KD 胚の発生率の比較。

c) 培養 4 日目におけるコントロール胚ならびに siRNA-mediated MERVL-KD 胚の代表的顕微鏡像。スケールバー：100 μm。

d) レスキュー試験群における smFISH による MERVL の発現解析。

e) 培養 4 日目までのレスキュー試験群の発生率。

f) 培養 4 日目におけるレスキュー試験群の代表的顕微鏡像。スケールバー：100 μm。

g) CRISPRi による MERVL 抑制胚における smFISH（上段）と免疫染色（下段）による MERVL の発現解析。

h) 培養 4 日目までのコントロール胚ならびに MERVL 抑制胚の発生率の比較。

i) 培養 4 日目におけるコントロール胚ならびに MERVL 抑制胚の代表的顕微鏡像。スケールバー：100 μm。

j) MERVL 抑制胚の RNA-seq 解析結果：コントロールおよび MERVL 抑制胚間の発現変動遺伝子（DEGs）には有意に 2C 遺伝子が濃縮されている。P＜0.001（Hypergemetric test）。

k、l) コントロール胚ならびに ASO-mediated MERVL-KD 胚における近傍領域の遺伝子発現レベルの比較。k：遺伝子領域、l：遺伝子間領域。

m) コントロールならびに MERVL-KD 胚における代表的な MERVL 近傍の遺伝子発現状態。

n) MERVL 近傍領域の遺伝子間領域におけるコントロール胚ならびに ASO-mediated MERVL-KD 胚の ATAC-seq エンリッチメント。

一般的に、ゲノム中に存在するシス作用性エレメントは、エンハンサーなどの遺伝子発現調節領域として機能し、近傍遺伝子の転写活性を制御している。MERVL の転写がゲノム上の距離依存的に近傍遺伝子の転写制御を担っているかどうかを検証するため、先に行ったコントロールならびに MERVL-KD2 細胞期胚の RNA-seq データを用いて遺伝子領域と遺伝子間領域を含むゲノム広範囲な包括的な転写レベルの解析を行った。その結果、遺伝子領域においては MERVL の距離依存的な転写制御は観察されない一方で、遺伝子としてのアノテーションが無い MERVL 近傍領域の転写量は上流 50 kb に渡って、MERVL-KD 胚で減退していることが明らかになった（図 3k～m）。さらに、これらの領域のクロマチン状態を ATAC-seq 解析によって検証したところ、有意にクロマチンアクセッシビリティが低下していた（図 3n）。従って、MERVL のシス作用性は、再分化プロセスにおいて生じる宿主ゲノムの大規模なクロマチン再構築に必須であることが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究成果の発表にむけてご助言いただいた大阪大学大学院医学研究科の林克彦先生、理化学研究所生命医科学研究センターの井上梓先生ならびに東京大学医学部附属病院の藍川志津先生に感謝申し上げます。

文　献

1） Abe K. et al. Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. Proc Natl Acad Sci U S A 2018 Jul 17;115(29):E6780-E6788. PMID: 29967139 doi: 10.1073/pnas.1804309115.
2） Lensch MW, Mummery C. From Stealing Fire to Cellular Reprogramming: A Scientific History Leading to the 2012 Nobel Prize. Stem Cell Rep. 2013 Jun 4;1(1):5-17. PMID: 24052937 doi: 10.1016/j.stemcr.2013.05.001.
3） Gifford RJ. et al. Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. Retrovirology 2018 Aug 28;15(1):59. PMID: 30153831 doi: 10.1186/s12977-018-0442-1.
4） Sakashita A. et al. Endogenous retroviruses drive species-specific germline transcriptomes in mammals. Nat Struct Mol Biol. 2020 Oct;27(10):967-977. PMID: 32895553 doi: 10.1038/s41594-020-0487-4.
5） Chuong EB. et al. Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta. Nat Genet. 2013 Mar;45(3):325-9. PMID: 23396136 doi: 10.1038/ng.2553.
6） Macfarlan TS. et al. ES cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. Nature 2012 Jul 5; 487(7405): 57-63. PMID: 22722858 doi: 10.1038/nature11244
7） Sakashita A. et al. Transcription of MERVL retrotransposons is required for preimplantation embryo development. Nat Genet 2023 Mar;55(3):484-495. PMID: 36864102 doi: 10.1038/s41588-023-01324-y.
8） Simon MD. et al. The genomic binding sites of a noncoding RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20; 108(51): 20497-20502. PMID: 22143764 doi: 10.1073/pnas.1113536108
9） Wu J. et al. Chromatin analysis in human early development reveals epigenetic transition during ZGA. Nature 2018 May;557(7704):256-260. PMID: 29720659 doi: 10.1038/s41586-018-0080-8