

## 転移因子L1のゲノム編集を制御する宿主因子の解明

京都大学大学院生命科学研究科 細胞周期学分野 石川冬木研究室  
三好 知一郎

### 研究目的

Long Interspersed Element-1 (LINE-1またはL1) は、転写された自身のRNAをcDNAに逆転写することでゲノム上を移動するレトロトランスポゾンである。通常体細胞ではLINE-1の転写が抑制されているが、生殖細胞、初期胚や老化細胞のほか、多くの腫瘍細胞で発現抑制が解除され、転移によって遺伝子破壊、染色体欠失や転座などゲノム不安定化を引き起こす。近年では遺伝性自己免疫疾患や老化組織において、LINE-1の高発現が誘導され、組織の機能低下につながる慢性炎症を促すことが分かってきた。しかしLINE-1蛋白質が翻訳された後、自身のRNA情報をゲノムに挿入するまでの過程とその制御因子はよく分かっていないため、そのゲノム不安定化や炎症促進のメカニズムも分かっていない。本研究の目的は、これまでに同定したLINE-1蛋白質と相互作用する宿主因子の中から転移に重要な因子を絞り込み、そのゲノム侵入過程を明らかにすることである。LINE-1の転移制御機構を明らかにすることで、将来的には転移を人為的に制御する手法の開発や、LINE-1が関与する疾患・ゲノム不安定化の抑制にむけた応用研究にもつながることが期待される。

### 背景・結果

LINE-1は、転移に必要なORF1とORF2の2つの蛋白質をコードしている。LINE-1の転移ステップは、転写後、まず①RNA結合蛋白質であるORF1が細胞質でLINE-1 RNAに結合して複合体を形成することから開始され、その後、②逆転写酵素ORF2を伴い核内に移行し、最終的にゲノム内に侵入すると考えられている(図1)。下記のように、細胞質と核内を標的とした互いに補完する2つのプロテオミクス解析により、網羅的にLINE-1相互作用因子を同定することにより、得られた候補因子の機能を解析し、宿主細胞による転移制御機構の詳細を明らかにする。

①のステップでは、ORF1-RNAの複合体形成による初中間体が、細胞質で特徴的な顆粒状の局在パターンとして観察される。このLINE-1の細胞質顆粒を標的とする宿主因子を捉えるために、ORF1-RNA複合体を形成することができない変異型ORF1の作成し、これを野生型のORF1-RNA複合体との比較対象とした。HeLa細胞に野生型のLINE-1 ORF1-RNA複合体と、変異型のLINE-1 ORF1複合体を発現させ、両者のORF1複合体を精製し、質量分析によって各構成因子の同定を試みた。その結果、変異型のORF1複合体に比べて野生型の複合体にはインターフェロン応答遺伝子産物(=自然免疫応答遺伝子産物)が複数濃縮されていることが確認された(図2)。これはLINE-1の発現上昇に伴って、炎症性サイトカインの増幅が見られるという知見と

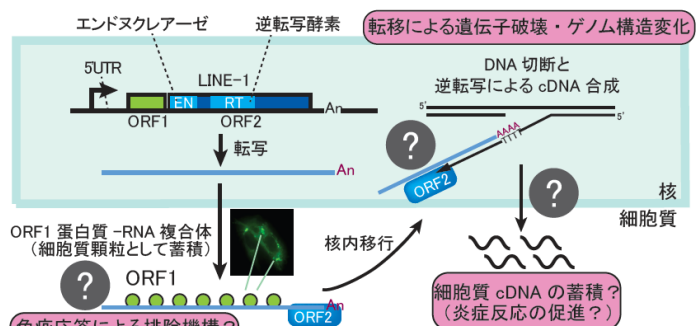


図1. LINE-1の転移によるゲノム不安定化と炎症反応の促進モデル  
LINE-1は細胞質でORF1蛋白質-RNA複合体を形成し、これは顆粒状の局在パターンを示す。これが免疫応答により排除されると考えられているが実体はよく分かっていない。核内では、ゲノムDNAの切断と自身のRNAの逆転写を行いゲノムに侵入すると考えられている。さらに逆転写されたcDNAは未知の分子機構で細胞質に蓄積し、細胞質DNAセンサーによって免疫応答が引き起こされるらしい。自己免疫疾患や老化組織ではこれが慢性炎症の原因になると考えられている。いずれのステップも正負両者の制御因子が存在すると思われる。

質量分析によって各構成因子の同定を試みた。その結果、変異型のORF1複合体に比べて野生型の複合体にはインターフェロン応答遺伝子産物(=自然免疫応答遺伝子産物)が複数濃縮されていることが確認された(図2)。これはLINE-1の発現上昇に伴って、炎症性サイトカインの増幅が見られるという知見と

無関係ではなく、おそらく抗ウイルス様防御機構がLINE-1複合体にも直接作用して、これを抑制するというモデルが予想された。実際、LINE-1をHEK293T細胞に過剰発現すると、インターフェロン応答が亢進していることが認められた。このインターフェロン応答の上昇は、逆転写酵素活性を失活した変異型LINE-1やORF1-RNA複合体を形成することができない変異型（RBM変異）LINE-1の発現においても観察されたことから、転移時のDNA損傷や転移過程におけるORF1-RNA複合体形成がこの応答を促進しているのではなく、LINE-1 RNA自身がインターフェロン応答を促進する免疫原として作用することが示唆された。

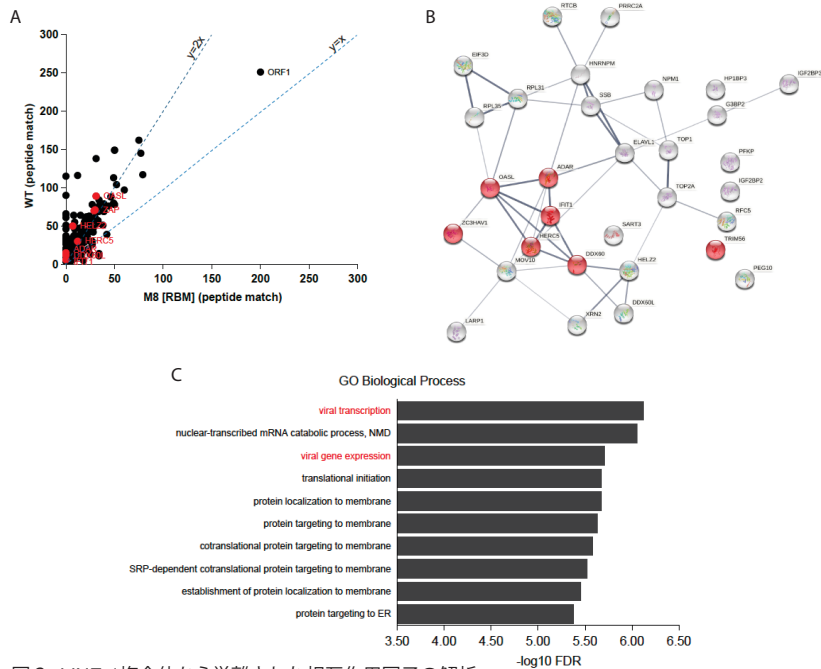


図2. LINE-1複合体から単離された相互作用因子の解析

- 質量分析によって野生型のLINE-1 ORF1複合体とRNAとの結合活性を失った変異型LINE-1 ORF1 (RBM)複合体の構成因子の比較。野生型LINE-1 ORF1複合体では変異型に比べて赤丸で示したインターフェロン応答遺伝子産物が多く濃縮されていることがわかった。
- 野生型LINE-1 ORF1相互作用因子をString databaseによって既知の相互作用因子ネットワークと照合した結果、赤丸で示すインターフェロン応答遺伝子産物間での相互作用が示唆された。
- 質量分析によって同定した野生型LINE-1 ORF1相互作用因子をGO termオントロジー解析に供したところ、赤字で示したようにウイルス関連因子が多く含まれていることがわかった。

を精製したところ、この蛋白質は3'-5'方向のRNase活性を有することがわかった。このRNaseドメインに変異を導入した変異型HELZ2を作成し、これを細胞内に遺伝子導入したところ、LINE-1の転移抑制能が部分的に失われることがわかった。さらにHELZ2のRNAヘリカーゼ活性に変異を導入すると、LINE-1 RNA量の減少のみならずその転移頻度の抑制能がほぼ完全に失われていた。すなわちHELZ2のRNase活性とRNAヘリカーゼ活性が共役してLINE-1 RNAを分解し、その転移を抑制することが示唆された。また、LINE-1によるインターフェロン応答の亢進もHELZ2の過剰発現によってほぼ完全に消失することが観察されたことから、HELZ2は免疫応答の抑制にも寄与していることが明らかとなった。次に、HELZ2がLINE-1 RNAを分解する分子機構について解析したところ、LINE-1 RNAの5'非翻訳領域を標的としてHELZ2がRNA分解を行っていることもわかった。LINE-1の5'非翻訳領域がどのようにHELZ2によって認識されるのか、そのメカニズムの解明が今後の課題である。

上記のようにLINE-1抑制因子が存在する一方で、自己の利己性を保障するために、LINE-1は宿主DNA修復経路を利用してゲノムに侵入することを報告した (Miyoshi et al., Molecular Cell. 2019)。そこで次に、

LINE-1と質量分析によって同定されたインターフェロン応答遺伝子産物を共発現させると、顕著にLINE-1 RNA量と蛋白質量が減少し、かつ転移頻度の低下も観察された (図3)。これらのインターフェロン応答産物には、ウイルス蛋白質の分解を担うことが知られているHERC5の他に、その抗ウイルス作用機序がよく分かっていないRNAヘリカーゼであるHELZ2という因子も含まれていた。構造予測解析を行ったところ、HELZ2には、RNA干渉との機能関連が予測されるRNaseドメインが新たに見つかった。HELZ2蛋白質

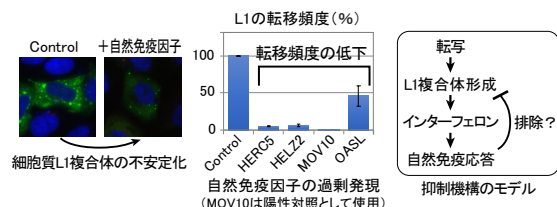


図3. L1転移を抑制する自然免疫因子

②のゲノム侵入過程を制御する因子を新たに同定することを目的として、既に報告した逆転写酵素ORF2と相互作用する因子群をsiRNAによりノックダウンし、LINE-1転移頻度を測定することで重要な宿主因子の絞り込みを行った。本研究では、その中でもノックダウン処理によってLINE-1転移頻度が約80-90%低下するHUWE1ユビキチンリガーゼに着目してその機能解析を進めた。HUWE1による転移の促進には、蛋白質分解に関わるユビキチンリガーゼ活性が必須であることが分かった。そこで、HUWE1ノックダウン細胞において蛋白質量が特異的に増加する因子をSILAC法（定量的質量分析手法）によって探索した結果、複数のDNA修復因子がHUWE1によって不安定化されることがわかった。これらの因子がHUWE1の直接の基質となり分解制御を受け、LINE-1転移に関与するか否かについては、なお解析を継続する必要がある。

## 考察

LINE-1の転移ステップは、①RNA結合蛋白質であるORF1が細胞質でLINE-1 RNAに結合して複合体を形成し、その後、②逆転写酵素ORF2を伴い核内に移行し、最終的にゲノム内に侵入すると考えられている（図1）。本研究において、LINE-1の細胞内での挙動を理解するために、LINE-1蛋白質-RNA複合体について精密な解析を試み、既知のLINE-1阻害因子だけでなく、その機能が未知である因子も含め、インターフェロン応答因子すなわち自然免疫応答に関与する多くの蛋白質がLINE-1と相互作用することを見出した。さらに、LINE-1を強発現するとインターフェロン応答が上昇することもわかった。まだ確定的な証拠はないが、LINE-1 RNAが細胞内では免疫応答を惹起する内因性の免疫原として作用しうる可能性が最も有力であることもわかった。興味深いことに、本研究で解析を行ったHELZ2はRNAヘリカーゼ活性とRNase活性を有する蛋白質であり、LINE-1 RNAの5'非翻訳領域を標的としてRNAを分解に導き、さらにLINE-1の高発現によるインターフェロン応答も抑制することが明らかとなった。LINE-1の5'非翻訳配列は生物種によって保存性に乏しい領域ではあるが、自然免疫応答因子を引きつける何らかの特殊な高次構造を形成するのか、あるいは自然免疫応答因子と相互作用する未知の因子が結合しているのかもしれない。今後もLINE-1 RNAの高次構造や相互作用因子に着目して、インターフェロン応答を誘導するメカニズムを明らかにしたいと考えている。

近年、ウイルス感染を伴わない場合においても自然免疫応答が活性化され、炎症反応から慢性炎症疾患へと症状が悪化するケースが報告されている。このような病状を示す自己免疫疾患患者のゲノム解析から、その原因となる遺伝子変異として様々な細胞内核酸代謝経路に関与するものが単離されている。これらの遺伝子産物はウイルス感染に対抗する機能を持つことが知られていると同時に、レトロトランスポゾンの転移を阻害する機能を有することが明らかとなりつつある。今回単離した自然免疫応答因子の変異が原因となる自己免疫疾患の報告はまだないが、将来的にそのような臨床研究の接点が見いだせるのではないかと予想している。仮定ではあるが、自然免疫は本来内在性のゲノム不安定化因子であるレトロトランスポゾンの活性を抑えるために発達しつつ、同時に外来からのウイルス応答への防御機能を洗練させる共進化を経て宿主恒常性の維持に貢献してきたのかもしれない。LINE-1のRNAがどのようなメカニズムでのぞましくない核酸、すなわち「非自己」として認識されているのか？正常な組織においてはLINE-1の高発現はどのような影響を周囲の細胞にもたらすのか？など解明すべき課題は多く残されている。