

2. レトロウイルスのジーンサイレンシング —ウイルス学はエピジェネティクスの分子機構の解明を担う—

伊庭 英夫, 山道-仁科 光恵, 水谷 壮利

ヒトのゲノムとレトロウイルス/レトロトランスポゾン

ヒトゲノムを俯瞰すると感染性レトロウイルスと相同な配列を持つ retrovirus-like element (内在性レトロウイルス) が全ゲノムの約8%を占めていることに気づく (図1)¹⁾. これに SINE (short interspersed transposable element) や LINE (long interspersed transposable element) 等のレトロトランスポゾンを含めるとこれらは全ゲノムの40%を超える (図1)¹⁾. このなかには, 数は少ないが自己転移能をもった LINE²⁾ や, おそらく感染性をもつ内在性レトロウイルス^{1,3,4)} の存在も知られるようになってきた. 従って, ヒトゲノムにはこれまで絶えずレトロウイルスやトランスポゾンが侵入し, 宿主細胞の系を使って増殖してその配列が進化の過程で蓄積されてきたことが推察される. これらの外来の配列が宿主に挿入されると, 内在性遺伝子が破壊されたり異常な発現をするようになるばかりか, 多コピーが増えてくると相同組み換えの頻度も著しく高まる. そのためこれらの外来転写ユニットの増加はゲノムの安定性に大きな負荷を与える²⁾. プロウイルスの挿入が内在性遺伝子の機能の多様化に貢献していると考えられるまれな例も示されているが³⁾, 宿主にとってレトロウイルス・レトロトランスポゾンは大きな脅威となっており, 宿主は本質的に細胞核内にこれに対するゲノム防衛機構を内蔵しているものと考えられる. 宿主はゲノム内への

これら寄生体ゲノムであるレトロウイルスの侵入を認識しその発現をまず抑制する (ジーンサイレンシング). やがて寄生体ゲノムの配列内にある CpG 配列中のシトシン残基は, ほとんどがメチル化を受けようになり⁵⁾ さらに長い進化の過程ではこうした5メチルシトシン残基はゆるやかにチミンへと変換され, 外来遺伝子は pseudogene 化して化石としてゲノム内に残されているのである.

ヒト細胞に内蔵されるレトロウイルスの発現抑制機構

このように組み込まれた直後のレトロトランスポゾン, レトロウイルスに対する宿主のゲノム防御は, まずその発現を抑制することから開始する. 挿入された DNA 配列はそのまま複製して娘細胞に分配されるが, そこでも発現の抑制状態は持続されるのである. ポストゲノム時代を迎えた今日, エピジェネティクス (DNA 配列によらずに子孫に伝搬可能な情報) を支える分子機構の知識の導入がウイルス学によいよ必要となってくる. 宿主が内蔵しているゲノム防衛機構の重要性と, これをかいぐって存在し続けるウイルスのしたたかさを考えると, 我々はこの問題に積極的に挑み, 「ウイルス学こそ, エピジェネティクスを解明していく最良の研究分野である」という視点に立って研究を推進していく時期が来たと考えたい.

これまでにヒトのエピジェネティクスを支える分子基盤として, ①DNA のメチル化 (主として CpG メチル化) ②ヒストンコード (ヒストンタンパク質の N 領域のアセチル化, メチル化, リン酸化) ③クロマチン構造変換, の3者が重要だとされている. この①~③の分子機構は互いに密接に影響を与えながら, 情報の子孫への伝搬をより確かなものとしていて, いずれの1つかが他に対して主導的な位置を占めるようなヒエラルキーはないと考えられる^{6,7)}.

我々は, ③の機能を担い, ①や②の過程とも密接に関係していると考えられるヒトの代表的なクロマチン構造変換因子, SWI/SNF 複合体に焦点をあててレトロウイルスのジーンサイレンシングの解析を進めている. この複合体は, 10種のタンパク質から構成されていて (図2)^{8,9)}, AT-Pase サブユニットとして, Brm と BRG1 の2種のタンパ

東京大学医科学研究所・感染免疫大部門
宿主寄生体学研究分野
(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

Retroviral gene silencing—Virology as a field for elucidating molecular mechanisms of Epigenetics—
Hideo Iba, Mitsue Yamamichi-Nishina, Taketoshi Mizutani

Department of Microbiology and Immunology Division
of Host-Parasite Interaction Institute of Medical Science
University of Tokyo

4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639

TEL: 03-5449-5730

FAX: 03-5449-5449

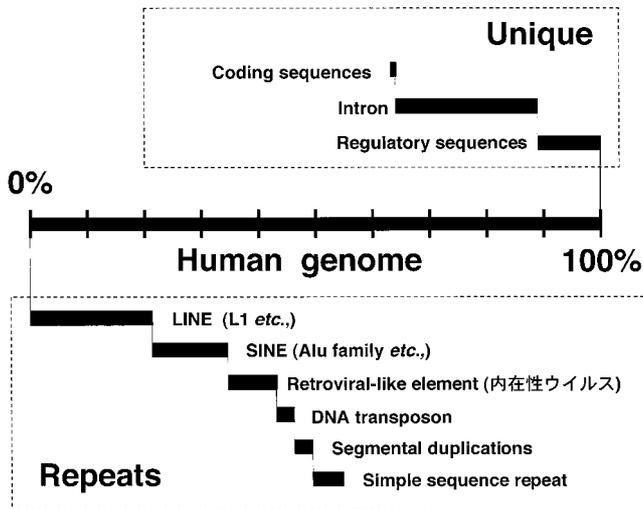


図1 ヒトゲノム構成の概念図
1コピーしかない (unique) 配列と、繰り返し (repeated) 配列に2分した。

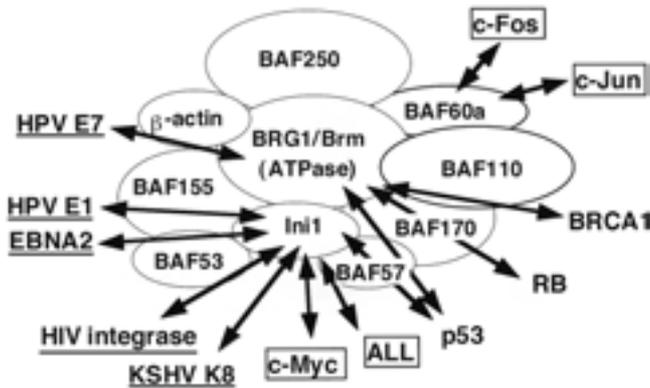


図2 ヒトのクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の構造
SWI/SNF 複合体は代表的なクロマチン構造変換因子複合体の一つで、ヒトでは10種類のタンパク質サブユニットから構成される。各複合体は ATPase 活性を持つ触媒サブユニットとして BRG1 か Brm のいずれかを一分子有するが、両者を同時に持つことはない。このような分子構成の違いによりこの複合体はいくつかのサブファミリーに分けられるものと考えられる。矢印で示すとおり、この複合体のサブユニットは種々のウイルスタンパク質 (アンダーライン)、癌遺伝子産物 (ボックスで囲む)、癌抑制遺伝子産物等と各種のサブユニットのいろいろな接面を使って結合しうる。

ク質がある。おのおのの SWI/SNF 複合体にはこれら両タンパク質のうち一方が一分子のみ存在して両者が同じ複合体にあることはない。

MLVに見られる急激なジーンサイレンシングの現象

我々はこれまでに MLV を基盤とした VSV-G シュードタイプレトロウイルスを安定して産生させる系を作製し、これがほとんどのヒト腫瘍由来細胞に高い効率で遺伝子導入できることを示してきた¹⁰⁻¹³⁾。しかし、一部のヒト培養

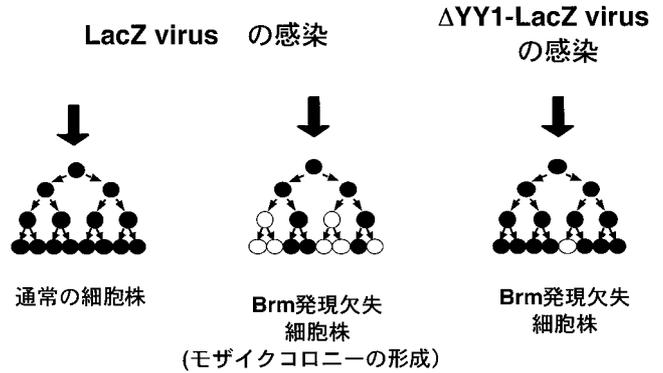


図3 いくつかのヒト細胞株で見出されたレトロウイルスのジーンサイレンシングの様式
レトロウイルスを感染して (矢印) 1日おいて integration が終了した後に、細胞を少数まいてコロニーを形成させる。通常の細胞 (上段) では感染を受けた細胞のクローンは、コロニー中すべてウイルス遺伝子の発現を行う。しかし Brm の発現のない細胞株ではウイルス遺伝子の発現は stochastic なジーンサイレンシングを受けてモザイクコロニーを形成する。(黒丸は発現細胞, 白丸は非発現細胞を示す)

細胞株では、ベクターを導入後ただちに外来遺伝子の発現が誘導されるものの、その後急速に stochastic (確率的) なジーンサイレンシングを受けることを見出した (図3)¹⁴⁾。各細胞での発現レベルがそろって徐々に低下するのではなく、同一の感染細胞クローン内にありながら全く発現をしない細胞が徐々にあらわれ、その比率が増加していくことが注目になる。我々は内在性の Brm タンパク質の発現を欠く細胞株は例外なしにこの性質を持つが、BRG-1 の発現の有無とこのジーンサイレンシングとは全く相関しないことを明らかにして、さらに以下のような結果を得た^{14,15)}。

- 1) Brm の発現を欠く細胞株に Brm 遺伝子を発現するレトロウイルス (Brm ウイルス) を導入すると、そのジーンサイレンシングは対照ウイルスや BRG1 ウイルスと比べて著しく解除されて発現が維持されるようになる。
- 2) Brm の発現が見られない細胞に Brm ウイルスまたは対照ウイルスを感染してから4日後に、5'-LTR (long terminal repeat) 近傍に動員されるクロマチン結合タンパク質をクロマチン免疫沈降法により解析した。Brm ウイルス感染細胞では対照ウイルス感染細胞に比べ5'-LTR 近傍にあるヌクレオソーム内のヒストン H4 の特定のリジン残基 (Lys-5, Lys-8) が特異的にアセチル化を受けていた。一方対照ウイルス感染細胞内では転写制御因子 YY1, ヒストン脱アセチル化酵素群 (HDAC-1, HDAC-2) といったタンパク質を含む複合体が5'-LTR 中にある YY1 結合部位に効率よく動員されていた。
- 3) このような Brm 発現欠失細胞株でもジーンサイレン

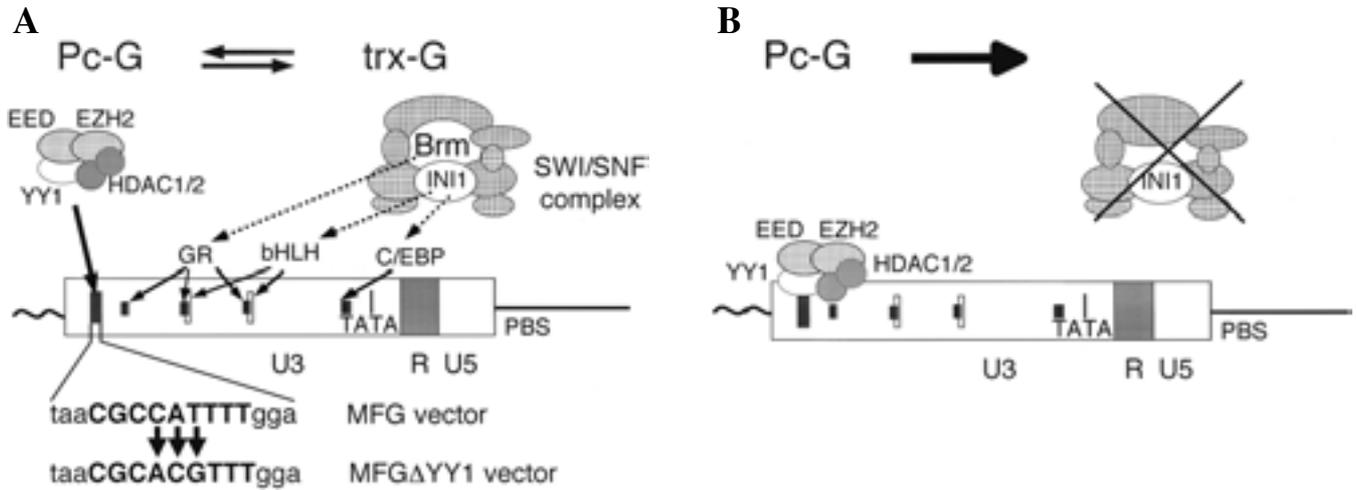


図4 プロウイルスのLTRからの遺伝子発現にかかわる分子機構のモデル

正常細胞では、Brm型SWI/SNF複合体(trx-G)がYY1, HDACs等からなるPc-G複合体(PCR2)と拮抗している(A)。SWI/SNF複合体のクロマチン構造変換機能によりLTR近傍のヌクレオソームではヒストンH4の特定リジン残基(Lys-5, Lys-8)がアセチル化されていてクロマチンは活性型に維持されている。一方Brmの発現がない細胞中ではPCR2複合体はYY1によってYY1結合配列に動員されLTR上に安定して存在することになる(B)。この複合体中のHDACの酵素活性により、近傍にあるヌクレオソームのアセチル化ヒストンは脱アセチル化を受け、その結果プロウイルスの発現は激しいジーンサイレンシングを受ける。EZH2はヒストンH3のLys27をメチル化する酵素活性をもち、この修飾もクロマチンの不活性化に貢献すると考えられる。このモデルから予想されるとおり、YY1結合配列を破壊したMFGΔYY1ベクターでは、ジーンサイレンシングが強く抑制された。

シングをおこさない他細胞株の場合と同様に、レトロウイルスを感染しても1週間以内にはCpGまたはCpXpGにおけるシトシン残基のメチル化はLTR近傍でほとんど観察されなかった(渡部ら未発表)。

以上のような成果から我々は染色体への組み込み後のレトロウイルスの発現について以下のようなDNAメチル化に依存しないモデルを考えている(図4)^{14,15}。

「正常細胞では、Brm型SWI/SNF複合体が転写を正に制御する、YY1, HDACs等からなる抑制性の複合体と拮抗してそのLTR上への動員を抑制している。SWI/SNF複合体により5'-LTR近傍ではクロマチン構造の変換が起こりその結果としてLTR近傍のヌクレオソーム内のヒストンH4では特定リジン残基(Lys-5, Lys-8)がアセチル化されてクロマチンは活性型に維持される(図4A)。一方Brmの発現がない細胞中ではこの抑制性複合体はYY1結合配列を介してLTR上に安定して存在することになる。この複合体中のHDACの酵素活性により、近傍にあるヌクレオソームのアセチル化ヒストンは脱アセチル化を受け、その結果プロウイルスの発現は激しいジーンサイレンシングを受ける(図4B)。」

細胞の記憶を担う trithorax (トライソラックス) 複合体と Polycomb (ポリコム) 複合体

以上の結果は、レトロウイルスが宿主のどのような機構を使ってその発現を維持していると解釈したらよいのだろうか。個体の発生・分化の過程に注目すると、おのおの

の分化細胞は細胞分裂を繰り返しても、それぞれ特異的な内在性遺伝子の発現様式を維持している。このような個体発生で見られる現象を「細胞の記憶(Cellular Memory)」と呼ぶことがあるが、それはどのようなエピジェネティクスの機構により担われているのであろうか。ショウジョウバエさらにはマウスの個体レベルでの遺伝学により、この問題の解明が最近大きく進展した。Hox遺伝子など細胞の個体発生で位置情報を担う重要な遺伝子群においては、これらの遺伝子の発現維持には互いに相反する機能をもつPolycomb-Group(Pc-G)とtrithorax-Group(trx-G)の2つの遺伝子群によるエピジェネティカルな制御が必要であることが知られている¹⁶⁻¹⁸。発現していない遺伝子を抑制状態に保つのがPc-Gであり、活性化遺伝子の発現を維持するのがtrx-Gである。これらはその遺伝子の転写開始には一切かわらないが、両遺伝子グループの産物はそれぞれ複合体を形成して互いに拮抗して働き、それ以前に確立した染色体上の各ドメインの活性化状況を細胞分裂を経ても維持することにより「細胞の記憶」を担っているものと考えられている。

前節で提出したジーンサイレンシングのモデルを考える上で重要なことは、BrmとBRG1は、trx-Gに属するショウジョウバエのBrahma遺伝子のヒトのhomologueに相当することである¹⁶。またYY1のショウジョウバエのhomologueはpleiophomeoticと呼ばれるPc-Gに属する遺伝子の産物である。我々は前述したレトロウイルスのジーンサイレンシングでは、Brm型SWI/SNF複合体はレト

表1 SW13(vim-) と SW13(vim+) の表現型の比較

	SW13(vim-)	SW13(vim+)	SW13(vim-) +HDAC inhibitor
mRNA 発現 の有無*	<i>BRG1</i>	-**	+
	<i>Brm</i>	-**	+
	<i>vimentin</i>	-	+
	<i>collagenase</i>	-	+
	<i>c-met</i>	-	+
	<i>CD44</i>	-	+
レトロウイルスの ジーンサイレンシング	+	-	-

* この表内では、例外なしに mRNA 発現の有無はタンパク質の発現の有無と一致していた。

** これらの遺伝子の転写の開始と伸長は SW13(vim+) と同程度おきている。

ロウイルスの発現維持を担う trx-G 複合体ととらえるべきであって、これが機能を失うとこれと拮抗してきた Pc-G が優勢となってジーンサイレンシングが引き起こされているのであろうと考えている^{14,15)} (図4)。一方 Brm 型 SWI/SNF 複合体と拮抗する複合体は YY1 と PRC2 (Polycomb repressing complex 2; HDAC-1, HDAC-2, EED, EZH2, Su(z) 12等を含む) から構成されるのではないかと考えていて、現在これを検証中である。従って図3に見られる stochastic なジーンサイレンシングは、2つのタンパク複合体の拮抗作用により all-or-none にあらわれる染色体の不活性化の結果を反映しているものと考えられる。最近になって PRC2 中に存在する EZH2 には、ヒストン H3 の Lys-27 をメチル化する酵素活性が検出された¹⁹⁾。これもクロマチン構造の不活性化に貢献するものと考えられる。実際に我々は Brm 非存在下では LTR 近傍にあるヒストン H3 では、この Lys 残基が確かにトリメチル化されていることを見出している (伊藤ら、未発表)。このようなヒストンのメチル化、アセチル化、さらにはリン酸化によるエピジェネティカルな転写制御はいろいろな生命現象で明らかにされつつありジェネティクスにおける遺伝子コードになぞらえ「ヒストンコード」²⁰⁾ と命名されている。この LTR 上でのヒストン修飾の動態の詳細を今後解析していくことにより、ヒストンコードの解読を推進したい。

宿主細胞では、*Brm* 遺伝子の発現は どのように制御されているのか？

これまでの我々の成果から、宿主細胞内の Brm タンパク質の有無が MLV 型のレトロウイルスの発現を維持するのか抑制するのか(ジーンサイレンシング)を決定する重要な因子の1つとなっていることが示された。それでは、この *Brm* 遺伝子は、宿主細胞内でどのように制御されているのであろうか。我々はヒト副腎腺癌由来の SW13細胞株に注目した。この細胞内では Brm と BRG1 両タンパク質の発現が検出されないと報告されている。このエピジェネ

ティクスを担う重要な SWI/SNF 複合体が機能しないことから、SW13細胞ではレトロウイルスの発現の維持能はもとより「細胞の記憶」も損なわれていて、遺伝子発現がエピジェネティカルに不安定になっている可能性がある。この細胞株には、細胞内フィラメントである vimentin を発現している細胞 (SW13(vim+)) と発現していない細胞 (SW13(vim-)) が混在していること、それらは限界希釈法によるクローニングによって分けることが可能であることがすでに報告されている²²⁾ ことに我々は興味を持った。

vimentin 遺伝子はそのプロモーター領域に AP-1 結合配列を持ち、転写制御因子 AP-1 によりその転写が活性化されることが知られている。AP-1 は種々の Fos ファミリータンパク質と Jun ファミリータンパク質間で形成されるダイマーから構成されていて、細胞の増殖や癌化等に関与している。我々はその構成成分の中でも特に c-Fos/c-Jun ダイマーが SWI/SNF 複合体のサブユニットの一つである BAF60a と高い親和性で結合することをすでに示している。不活性化染色体上の AP-1 結合部位に結合した c-Fos/c-Jun ダイマーは SWI/SNF 複合体全体を動員してその領域のクロマチン構造を変換して転写を誘導するものと考えられる²²⁾。従って AP-1 による転写活性化には SWI/SNF 複合体の存在が必要とされることから、*vimentin* 遺伝子の発現が検出される SW13(vim+) では、Brm または BRG1 タンパク質の発現が回復しているのではないかという仮説を立てた(表1)²³⁾。RT-PCR, Northern Blotting, Western Blotting により解析した結果、SW13(vim-) クローンでは *Brm* と *BRG1* 遺伝子の発現が検出されなかった。しかし SW13(vim+) ではいずれのクローンでもこれらの発現が認められ仮説は支持された。さらに、AP-1 の制御下にある他の遺伝子として *collagenase* (*MMP-1*), *c-met*, *CD44* 遺伝子を選び、その発現を RT-PCR で解析したところ SW13(vim-) ではどの遺伝子も発現が全く見られず、SW13(vim+) ではこれらの遺伝子の発現がすべての細胞で検出された。また、SW13(vim-) では Brm を発現しないことから予想されるとおり、レトロウイルス

の急激なジーンサイレンシングがおきる。一方 SW13(vim+) では、これがかなり解除されていて、レトロウイルスの発現が持続するようになるのである (表 1)。

SW13(vim-) において、*Brm* と *BRG1* 遺伝子の発現が抑制されている原因としては、この細胞が SW13(vim+) とは遺伝的に異なっていてこれらの遺伝子が欠失している可能性と、両細胞は遺伝的には違いはないが SW13(vim-) ではエピジェネティカルな遺伝子の発現抑制が起こっている可能性が挙げられる。そこでこれらの可能性を検証するために、エピジェネティカルな制御に関わる薬剤を SW13(vim-) に添加した。その結果、CHAP31等の HDAC 阻害剤の添加により処理された SW13(vim-) 細胞はすべて両遺伝子の発現をタンパク質レベルで回復し、これらの発現は薬剤を除いた後にも安定して長期間維持された²³⁾。SW13(vim-) ではこれらの遺伝子には変異があるわけではなく、エピジェネティカルな抑制がかかっていることがわかる。また予想どおりこの薬剤処理した SW13(vim-) では、レトロウイルスの発現抑制がかなり解除された。また、AP-1 により制御される *vimentin*, *collagenase*, *c-met*, *CD44* といった遺伝子群の発現も一括して回復した (表 1)²³⁾。

HDAC 阻害剤が作用したことから、我々は当初この *Brm* や *BRG1* 遺伝子にみられるエピジェネティカルな抑制は、転写レベルでおきていると考えていた。しかし細胞核抽出物を run-on トランスクリプション法で調べたところ、SW13(vim+), SW13(vim-) とともに、両遺伝子では高い頻度で転写が開始され、しかも全遺伝子領域で伸長反応が進行していることが判明した。これらのことから、SW13(vim-) においては *BRG1*, *Brm* 遺伝子が転写を行った後に負に制御 (post-transcriptional suppression) を受けていると考えられる²³⁾。この宿主細胞における *Brm* 遺伝子の post-transcription レベルでのジーンサイレンシングが、レトロウイルスのジーンサイレンシングを引き起こしているのである。なぜ *Brm* の発現抑制が HDAC 阻害剤によって解除されるのか等を含め、この分子機構の詳細を検討中である。ヒト癌由来の樹立細胞株を数多く検索したところ、これまでに10数株で *Brm* タンパク質が検出されない。こうした細胞株にはヒト胚性癌細胞株 (たとえば PA-1) 等の幹細胞が含まれているが、我々はこうした細胞株も多くは SW13と同様の機構で *Brm* 遺伝子が抑制されていることを観察している (山道ら未発表)。

レトロウイルスのジーンサイレンシングに対する 現実的対処法

Brm 発現欠失細胞には幹細胞が含まれることもあって、こうした細胞内でもレトロウイルスベクターが外来遺伝子を効率よく発現しかつそれを長期間維持することは重要である。こうした場合、どのような対処法がありうるであろうか。1つは機能的 *Brm* 型 SWI/SNF 複合体がない

細胞内で Polycomb-G 複合体が LTR に動員されることを抑制する方法が考えられる。我々は LTR 上の YY1 結合配列に変異を導入した ΔYY1 ベクター (図 4) を作製したが、これによりジーンサイレンシングは実際はかなり解除される¹⁶⁾ (図 3)。また SW13細胞で見たように *Brm* 発現欠失細胞を HDAC 阻害剤で一時的に処理すれば、その後も *Brm* の発現が維持されるので、そこでウイルスを導入する方法論も広く適用可能であることがわかってきた (山道ら、未発表)。

終わりに

本稿では、SWI/SNF 複合体を、クロマチン構造変換を介した転写活性化の側面から紹介し、触媒サブユニットが *Brm* か *BRG1* で大きくその機能が異なることも明らかにした。この複合体のサブユニットの分子構成は細胞内ではおそらく動的に変動し、その機能も多様であると考えられる。事実 SWI/SNF 複合体のサブユニットの1つ INI1 は HIV の integrase と相互作用することが知られ²⁴⁾、細胞内に侵入した preintegration complex に対し INI1 が核近傍の細胞質で結合し核内への侵入を防ぐ可能性も指摘されている²⁵⁾。さらに、この INI1 が HIV の形態形成に関与するばかりでなく²⁶⁾、HPV の DNA 複製に関与する E1²⁷⁾、さらには EBV 感染後の転写標的遺伝子群を決定するアダプタータンパク質、EBNA2とも結合することも知られてきた^{28,29)}。INI1 がこれらの機能を発揮する時に通常の SWI/SNF 複合体のサブユニットとして挙動しているのか、または分子構成を大きく変動させるのかを含め、各種のウイルスの複製で果たすこの複合体の役割は今後詳しく解析されるべきであろう。

また本稿では、ヒト細胞に対する MLV の感染に局限して話を進めてきた。たとえばヒト EC 細胞 (PA-1 細胞) では MLV は発現を開始するが、それは長く続かず激しいジーンサイレンシングを受けた。MLV の自然宿主であるマウスの場合どうであろうか。マウスの ES 細胞株では *Brm* の発現が見られないものがある³⁰⁾。MLV はこれに感染して染色体中に組み込まれても、発現開始すらできない (箕口ら、未発表)。これは、ヒト細胞に感染直後には高いレベルでの発現を開始はするがその後激しいジーンサイレンシングを受ける現象と大きく異なる。マウスの幹細胞核内には、MLV の転写開始を阻害する又は支持しない^{31,32)} ような、ヒト細胞では見られない状況があると考えられる。一方マウスの ES や EC 細胞で発現が許容されるように MuLV LTR 上や tRNA 結合部位に数多くの変異をいれたウイルスベクター (例えば MSCV³²⁾) が開発されているが、このベクターでもヒト *Brm* 欠失細胞内でのジーンサイレンシングを防ぐことができない (山道ら未発表)。このような種差こそ宿主-ウイルス相互作用を考える上で、もう一つの重要な視点であり、またその比較研究から本稿

の成果の普遍性と種特異性を明らかにしたい。

植物、線虫、ショウジョウバエ等の他種生物でウイルス、外来遺伝子、トランスポゾン等の発現を抑制する機構として post-transcriptional gene silencing (PTGS) (より一般的に RNA silencing とよばれる), という現象が注目を集めている³³⁻³⁵⁾。こうした生物種の細胞質においては aberrant なウイルス等の外来性遺伝子の転写産物が dsRNA 化された後に代謝されて 21ヌクレオチドの short interfering (si) RNA が生成することが知られる。やがてアンチセンスの siRNA を含む RISC (RNA induced silencing complex) が形成され, その触媒作用によりこれと相補配列をもつ mRNA は高い特異性で切断を受けるのである。植物ウイルスの中には, この阻害経路を抑制してウイルス増殖を可能とするためのタンパク質をコードしている例も多く知られてきた³⁶⁻³⁹⁾。さらに植物⁴⁰⁾や線虫のトランスポゾンや *Schizosaccharomyces pombe* のセントロメア (トランスポゾン様の構造を持つ)⁴¹⁾等では, この領域の転写産物から細胞質中で生成する siRNA の一部が細胞核内へと移行し, これと相同な DNA 配列の近傍に働き, ヒストンメチル化やクロマチン構造変換を誘導してヘテロクロマチン化してこの染色体領域の遺伝子発現抑制へと結びつく場合が知られる。我々はこの経路内の必須因子の一つでクロマチン変換因子として機能するシロイナズナの *DDM1* の遺伝子産物⁴²⁾がヒトの SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット (Brm と BRG1) と類縁であること⁴³⁾に注目している。DDM1 に変異のある植物では, レトロトランスポゾンの発現が活性化することも知られる⁴⁴⁾。ヒト細胞においても人工的に合成したり, ベクターにより産生させた siRNA による阻害効果は明らかであり, その機構は不明ながら感染症征圧にも大いに期待が持たれている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。植物の PTGS に相当する機構がどの程度ヒト細胞でも内蔵されているのか, またこれが本来ウイルスに対する防御機構として機能しているのかを解明することは, 動物ウイルス学者が取り組むべき今後の大きな課題である。

謝 辞

本研究の共同研究者であり未発表のデータを提供してくれた宿主寄生体学研究分野の山道信毅君, 渡部博貴君, 伊藤太二君, 箕口 滋君に感謝いたします。

文 献

- 1) Griffiths, D. J. (2001). Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome biology*, **2**, R1017. 1-1017. 5.
- 2) Symer, D. E., Connelly, C., Szak, S. T., Caputo, E. M., Cost, G. J., Parmigiani, G. and Boeke, J. D. (2002). Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability *in vivo*. *Cell*, **110**, 327-338.
- 3) Stoye, J. W. (2001). Endogenous retroviruses: Still active after all these years? *Current Biology*, **11**, R914-R916.
- 4) Nelson, P. N., Carnegie, P. R., Martin, J., Davari Ejtchadi, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J. and Murray, P. G. (2003). Demystified... human endogenous retroviruses. *J. Clin. Pathol. : mol. Pathol.*, **56**, 11-18.
- 5) Yoder, J. A., C. P. Walsh, and T. H. Bestor. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, **13**, 335-340.
- 6) Geiman, T. M. and robertson, K. D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications and DNA methylation-how does it all fit together?. *J. Cell. Biochem.* **87**, 117-125.
- 7) Wang, W. (2003). The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodeling factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **274**, 143-169.
- 8) Yan, Q., Huang, J., Fan, T., Zhu, H. and Muegge, K. (2003) Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J.* **22**, 5154-5162.
- 9) Martens, J. A. and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/ Snf complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 136-142.
- 10) Arai, T., Matsumoto, K., Saitoh, K., Ui, M., Ito, T., Murakami, M., Kanegae, Y., Saito, I., Cosset, F.L., Takeuchi, Y. and Iba, H. (1998). A new system for stringent, high-titer VSV-G pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable "pre-packaging" cell lines. *J. Virol.*, **72**, 1115-1121.
- 11) Arai, T., Takada, M., Ui, M. and Iba, H. (1999). Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts. *Virology*, **260**, 109-115.
- 12) Ui, M., Takada, M., Arai, T., Matsumoto, K., Yamada, K., Nakahata, T., Nishiwaki, T., Furukawa, Y., Tokino, T. Nakamura, Y. and Iba, H. (1999). Retrovirus vectors designed for efficient transduction of cytotoxic or cytostatic genes. *Gene Ther.*, **6**, 1670-1678.
- 13) Iba, H., Arai, T. and Ui, M. (2000). Efficient production of VSV-G-pseudotyped retrovirus vectors using stable packaging cell lines In *Viral vectors? Basic science and gene therapy* (Bio Techniques Books, Eaton Publishing, Natic, MA), pp401-411.
- 14) Mizutani, T., Ito, T., Nishina, M., Yamamichi, N., Watanabe, A., and Iba, H. (2002). Maintenance of integrated proviral gene expression requires Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15859-15864.
- 15) Iba, H., Mizutani, T. and Ito, T. (2003). SWI/SNF chromatin remodeling complex and retroviral gene silencing. *Rev. Med. Virol.*, **13**, 99-110.
- 16) Gebuhr, T. C., Bultman, S.J., and Magnuson, T. (2000). Pc-G/trx-G and the SWI/SNF Connection: Developmental gene regulation through chromatin remodeling. *Genesis*, **26**, 189-197.

- 17) Simon, J. A. and Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin : mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 210–218.
- 18) Valerio orland. (2003). Polycomb, Epigenomes, and control of cell identity. *Cell*, **112**, 599–606.
- 19) Kuzmichev, A., nishioka, K., Erdjument–Bromage, H., Tempest, P. and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multi-protein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes. Dev.*, **16**, 2893–2905.
- 20) Jenuwein T. and Allis, C. D. Translating the histone code. (2001) *Science*, **293**, 1074–1080.
- 21) Hedberg, K. K., and Chen, L. B. (1986). Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. *Exp. Cell Res.*, **163**, 509–517.
- 22) Ito, T., Yamauchi M., Nishina, M., Yamamichi, N., Mizutani, T., Ui, M., Murakami, M., and Iba, H. (2001). Identification of SWI/SNF complex subunit BAF60a as a determinant of transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2852–2857.
- 23) Ymamichi–Nishina, M., Ito, T., Mizutani, T., yamamichi, N., watanabe, H. and Iba, H. (2003). SW13 cells can transition between two distinct subtypes by switching expression of BRG 1 and Brm genes at the post-transcriptional level. *J. Biol. Chem.*, **278**, 7422–7430.
- 24) Kalpana, GV., Marmon, S., Wang, W. and Crabtree, GR. (1994). Binding and stimulation of HIV–1 integrase by a human homology of yeast transcription factor SNF 5. *Science*, **266**, 2002–2006.
- 25) Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Manageat, B., Klages, N. and Evance R. (2001). Cytoplasmic recruitment of INI 1 and PML on incoming HIV preintegration complexes : interference with early steps of viral replication. *Mol Cell*, **7**, 1245–1254.
- 26) Landau, NR. (2002). A cellular cofactor in HIV–1 assembly : INI 1 is also an ‘outtie’. *Trends Pharmacol Sci.*, **23**, 252–253.
- 27) Lee, D., Sohn, H., Kalpana, GV. and Choe, J. (1999). Interaction of E 1 and hSNF 5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*. **399**, 487–491.
- 28) Wu, DY., Kalpana, GV., Goff, SP. And Schubach, WH. (1996). Epstein–Barr virus nuclear protein 2 (EBNA 2) binds to a component of the human SNF/SWI complex, hSNF 5 /Ini 1. *J Virol.*, **70**, 6020–6028.
- 29) Wu, DY., Krumm, A. and Schubach, WH. (2000). Promoter-specific targeting of human SWI/SNF complex by Epstein–Barr virus nuclear protein 2. *J Virol.*, **74**, 8893–8903.
- 30) LeGouy, E., Tompson, E. M., Muchardt, C., and Renard, J–P. (1998). Differential preimplantation regulation of two mouse homologues of the yeast SWI 2 protein. *Developmental Dynamics*, **212**, 38–48.
- 31) Loh, T. P., L. L. Sievert, and R. W. Scott. (1990). Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4045–4057.
- 32) Cherry, S. R., Biniszkiwicz, D., van Parijs, L., Baltimore, D. and Jaenisch, R. (2000). Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7419–7426.
- 33) Vaucheret, H. and Fagard, M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants : targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, **17**, 29–35.
- 34) Vaucheret, H., beclin, C. and Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell. Sci.*, **114**, 3083–3091.
- 35) Pal–Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J. A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell.*, **9**, 315–327.
- 36) Waterhouse, P. M., Wang, M–B. and Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. (2001). *Nature*, **411**, 834–842.
- 37) Vance, V. and Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants–defence and counterdefense. *Science*, **292**, 2277–2280.
- 38) Rovere, C. V., Vas, M. D. and Hopp, H. E. (2002). RNA-mediated virus resistance. *Curr. Opin. Biotech.*, **13**, 167–172.
- 39) 西口正通, 園田昌司, 田中良和, 霜野真幸. (2000). 植物におけるジーンサイレンシングとウイルス. *ウイルス*, **50**, 243–250.
- 40) Dawe, RK. RNA interference, transposons, and the centromere. (2003). *Plant Cell*, **15**, 297–301.
- 41) Hall, IM., Norma, K. and Grewal, SI. (2003). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **7**, 193–198.
- 42) Gendrel, A. V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. and Martienssen, R. (2001). Dependence of heterochromatic histone H 3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM 1. *Science*, **297**, 1871–1873.
- 43) Bourc’ his, D. and Bestor, T. H. (2002). Helicase homologues maintain cytosine methylation in plants and mammals. *Bioessays*, **24**, 297–299.
- 44) Hirochika, H., Okamoto, H., & Kakutani, T. (2000). Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the ddm 1 mutation. *The Plant Cell*, **12**, 357–368.
- 45) Jacque, J. M., Triques, K. and Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV–1 replication by RNA interference. *Nature*, **418**, 435–438.
- 46) Carmichael, G. G. (2002). Medicine : silencing viruses with RNA. *Nature*, **418**, 379–380.
- 47) 箕島 弘, 須山英悟, 川崎広明, 多比良和誠. (2003). RNAiによる遺伝子機能阻害とそのウイルス感染症治療への応用. *ウイルス*, **53**, 7–14.