

m6A のメチル化による内在性レトロウイルス異常が精神疾患に 関与する可能性，関連する遺伝子について

仙名 瑛斗^{1,a)} 田口 善弘^{1,b)}

概要：レトロウイルスの異常発現が神経疾患に関係していることが示唆されている。本研究では m6A のメチル化によって内在性レトロウイルスに異常をきたし，結果として神経疾患を引き起こす可能性，およびその遺伝子の同定をテンソル分解を用いて行う。

Endogenous retroviral abnormalities due to methylation of m6A may be involved in psychiatric disorders, and related genes

1. 序論

初めにレトロウイルスとは，プラス鎖 RNA を遺伝情報として持ち，それをカプシドと呼ばれるタンパク質の殻に包まれているものである。RNA ウイルスであるが逆転写酵素を所有しているため宿主細胞に侵入した後，RNA を鋳型とし二本鎖 DNA (プロウイルス DNA) を合成する。宿主細胞にそれが取り込まれることによって宿主が感染する。その後プロウイルスを鋳型にし，ウイルスを複製し増殖していく [1]。

レトロウイルスは多くの生物が持っているもので，ヒトもまたその例外ではない。ヒトにおけるレトロウイルスへの理解は 1891 年に日本で成人 T 細胞白血病 (ALT) の原因ウイルス human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) が初めて発見され，HTLV-I のキャリアーに慢性進行性の癌性脊髄麻痺と関連し HTLV-I-associated myelopathy の疾患名で新たな疾患単位を提唱された。その後，1983 年に後天性免疫不全症候群エイズの原因となるウイルス human immunodeficiency virus (HIV) が発見された。

このレトロウイルス発見当時はエイズによる疾患は免疫低下による日和見感染が多岐にわたることが注目されていたが，後に注意力・記憶力・認知力の低下などの精神神経症状に注目が集まるようになり，運動障害と AIDS dementia

complex と呼ばれる臨床概念が形成される。HIV-1 による影響はリンパ組織の破壊による免疫不全だけではなく，脳に感染し認知障害，神経発達障害などの疾患を引き起こすことが示唆された [2]。

このようにレトロウイルスの異常発現は神経疾患および精神疾患のトリガーとなるという見解がなされている。今回の研究では m6A のメチル化による内在性レトロウイルスの異常に焦点を当て，神経疾患との関連可能性，および関連可能性が見つかった場合にその遺伝子の同定を行う。m6A (N6-methyladenosine) のメチル化とは RNA に影響を与えるとされているもので，m6A は最も多く存在する RNA 修飾の一つであり二次構造の形成，格外移動，翻訳，分解など様々な機能を持っている。この m6A がメチル化することで内在性レトロウイルス転写物，RNA の安定性や mRNA の翻訳，などの様々な過程で影響を与える [3]。

メカニズムとしてはメチル酵素に似た METTL3-METTL14 タンパク質の複合酵素によって触媒される。METTL3-METTL14 とそのサブユニットである WTAP と ZC3H13 を欠損させることで ERV にある mRNA のメチル化が阻害されることが分かっている。また METTL3-METTL14 と ZC3H13 を一緒に欠損させることで IAPs に関連する ERVK (ERV の一種) 要素の mRNA が増加することが分かっている。そして m6A のメチル化が失われると，レトロトランスポゾンの種類に応じて様々な影響を与え，特に IAP 関連の ERVK 要素にマイナスの影響がみられる。その他にも m6A に依存した制御は，ヒトの神経疾患で見られるヒト内在性レトロウイルス由来の RNA 種

¹ 中央大学 理工学部 物理学科
Chuo University

a) eiti1007senns@gmail.com

b) tag@granular.com

の免疫原生や炎症反応を引き起こすことへの関係性も示唆されている [4], [5].

2. 解析

2.1 準備

今回の解析に使用するデータはハツカネズミにおけるハイスループットシーケンシングによる発現プロファイリングを用いることで得た「m6A methylation regulates the fate of endogenous retrovirus transcripts」のデータである [3]. レトロウイルスが影響を与える過程は胚発生におけるレトロウイルス本来の役割, 外部刺激に対する反応など複雑なものである. 複雑な過程において動物モデルを利用することはヒトを対象とする研究ではアクセスが難しい脳領域の情報を得る, 出生前段階をより詳細に分析することができるなどの利点があるとされている.

ハイスループットシーケンシングとは遺伝子の機能, 形式について調べることができ, 特に疾患の判断において大きな作用を発揮する. 遺伝子発現解析に使用されるマイクロアレイは測定前にサンプルを調整する必要がありモデル生物以外の生物に適用しにくい. よってゲノム配列が事前がない場合に関しては配列を決定してから行う必要がある. それに比べハイスループットシーケンシングでは得られたリード配列から, 最も確率の高いゲノム配列を決定することができる利点を持っている [6].

2.2 解析

上記に示したデータ, 2020年4月13日に公開されている「m6A methylation regulates the fate of endogenous retrovirus transcripts:GSE145616」のうち10個のデータ (GSM4314580 GSM4314589) を R でテンソル分解を解析する. データにはそれぞれ遺伝子とそれに対応する m6A のメチル化による変化を相対的に表したものの 55292 組が表されている. 第一成分を遺伝子が m6A のメチル化によるサンプルへの変化を相対的に表したもの, 第二成分を遺伝子変化のサンプル, 第三成分に繰り返しによる解析の確かさを表したものとする 3次元のテンソル ($55292 \times 5 \times 2$) を array を用いて作成した. 3階テンソル A の (i,j,k) 要素を a_{ijk} とすると A は以下の様に表される.

$$A = a_{ijk}$$

$$(i = 1, 2, \dots, 55292; j = 1, 2, \dots, 5; k = 1, 2)$$

3階テンソルを higher order singular value decomposition を用いることでテンソル A をコアテンソルと正規直行列 3つの行列の積で以下の様に表すことができる.

$$A = C \times_1 U^{(1)} \times_2 U^{(2)} \times_3 U^{(3)}$$

$U^{(n)}$, ($n = 1, 2, 3$) は正規直行列を表し, C はコアテンソルを表している. コアテンソルを計算し, 値が大きい順に結果を見ていく. higher order singular value decomposition

を用いることで得ることができたサンプル依存性の特異値ベクトルは図1, 図2, 図3, 図4, 図5の様に表される. それぞれ5つのサンプルについて, 縦軸が影響の度合いを表し, 横軸がそれぞれのサンプルを表している.

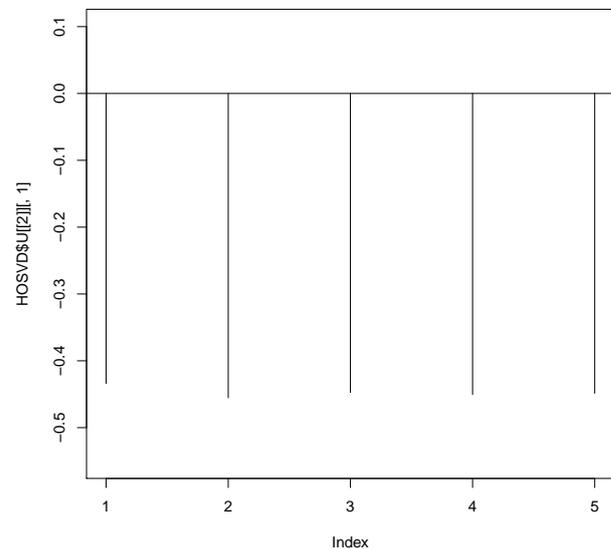


図1 HOSVD21

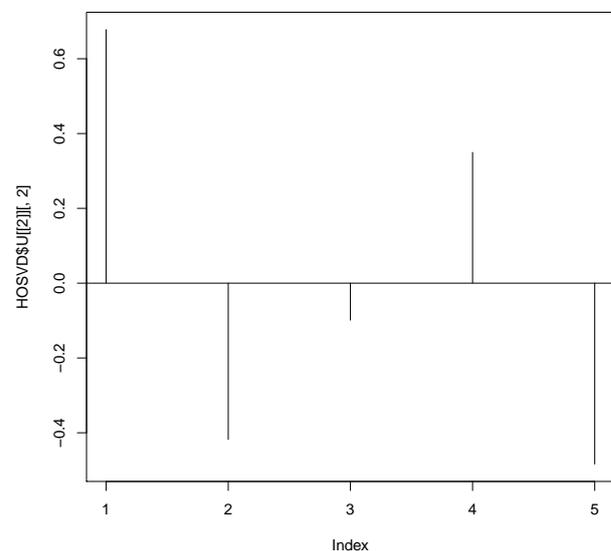


図2 HOSVD22

解析で得た正規直行列 $U^{(n)}$ が帰無仮説として正規分布していると仮定する. σ_n は $U^{(n)}$ の標準偏差とする. この帰無仮説に基づく P 値は χ 二乗分布を使って以下の様に与えられる.

$$P_i = P_{\chi^2} [> (\frac{U^{(n)}}{\sigma_n})^2]$$

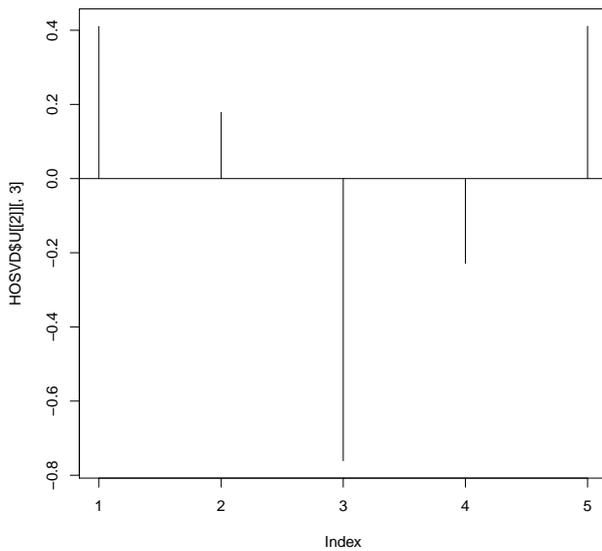


図 3 HOSVD23

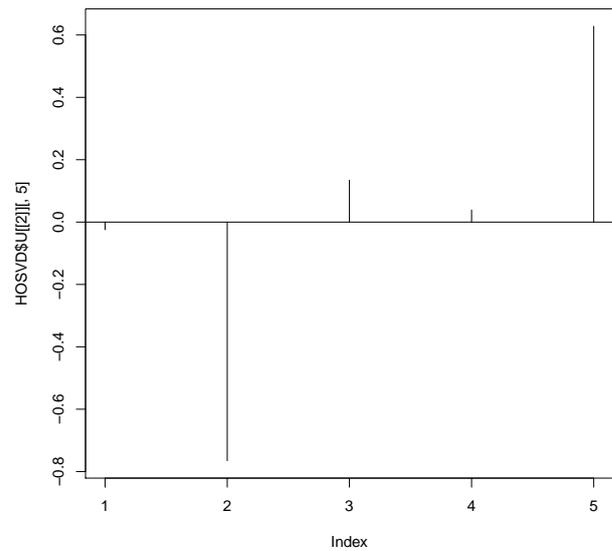


図 5 HOSVD25

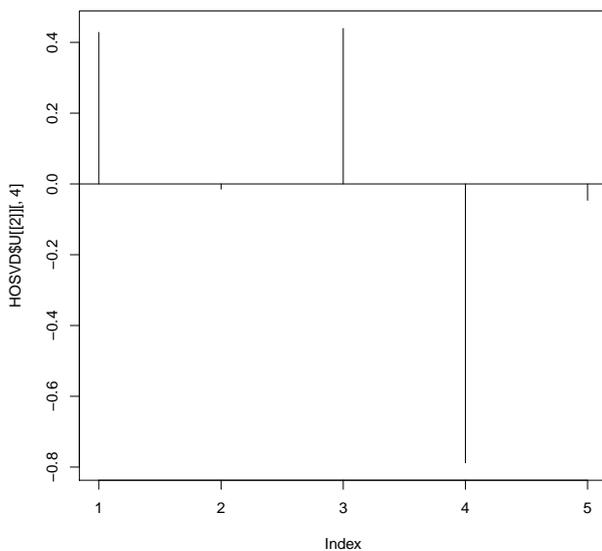


図 4 HOSVD24

今回は補正 P 値を 0.05 以下として i に付与する。補正 P 値が 0.05 以下のものが「 $U^{(n)}$ が正規分布している」という帰無仮説を棄却し、それに対応する遺伝子を抽出する。その後 Enrichr[7] に同定した遺伝子を入力することによって、エンリッチメント解析を行う。絶対値が大きな値をとるコアテンソルでは遺伝子間においてエンリッチメント解析では有意な補正 P 値を得ることができなかった。次に絶対値が大きな値をとるコアテンソルを使用した結果 255 個の遺伝子を同定することができた。得られた 255 個の遺伝子から、RP24-487F9.4 の様に遺伝子名に「-」が含まれるものを削除し、AC015800.4 の様に「。」が含まれる

ものは「。」以前の AC015800 の様に表し直した。

同定した遺伝子 179 個をエンリッチメント解析をした結果、補正 P 値が 0.05 以下のものを 67 項目確認することができた。表 1 に表された MGI Mammalian Phenotype Level 4 2021 を 2 項目、表 2 に表された Jensen TISSUES を 63 項目、表 3 に Jensen DISEASES を 2 項目、Jensen TISSUES の 63 項目は数が多いので補正 P 値が小さい順に 7 項目を示す。

表 1 エンリッチメント解析による MGI Mammalian Phenotype Level 4 2021

Name	Adjusted P-value
small hippocampus	0.03315
preweaning lethality, complete penetrance	0.03315

表 2 エンリッチメント解析による Jensen TISSUES

Name	Adjusted P-value
eye	6.345×10^{-7}
B-lymphocyte	6.809×10^{-6}
Intestine	9.849×10^{-6}
B-lymphoblastoid cell	4.216×10^{-5}
BTO	1.064×10^{-4}
Adipose tissue	1.500×10^{-4}
Lymph	3.391×10^{-4}
Dendritic cell	3.391×10^{-4}

表 3 エンリッチメント解析による Jensen DISEASES

Name	Adjusted P-value
Fragile X syndrome	0.03216
Chondrodysplasia punctata	0.03976

3. 考察

エンリッチメント解析の結果を考察していく。本研究では表1, 表2のエンリッチメント解析による MGI Mammalian Phenotype Level 4 2021 と Jensen TISSUES に注目して考える。eye, B-lymphocyte など表2で記した結果は内在性レトロウイルスが分化の役割を担っていることを示唆するものであると考えた。

これは iPS 細胞の樹立過程および分化能に内在性レトロウイルスの一種である HERV-H が深く関与していることからも妥当であると考えることができる。初期化では HERV-H の一過性の活性化 (HERV-H の両端の LTR7 が活性化) が必要であるが, HERV-H の活性化が活発すぎる場合に分化能が低下することが分かっている (klf4 と LTR の働きを抑えることによって HERV-H の発現が抑えられ, 分化が正常に機能する)[8]。

また, 表1の結果から small hippocampus と関連していることが分かる。海馬の縮小はアルツハイマー型認知症の早期にみられる障害であり, 認知症を含む精神障害と関連性があると考えた。内在性レトロウイルスの活性化が神経発達障害のサインになることが示唆されている。精神疾患は脳の発達障害によるものであり出生前に発現し成熟過程まで引き継がれるとされている。例えば自閉症スペクトラム障害 (ASD), 注意欠陥多動性障害 (ADHD), 統合失調症 (SCZ) などがある。これらの障害は遺伝的脆弱性, 環境的な危険因子の存在, 母親の免疫活性などが原因として考えられている [9]。

また神経発達の狂いの原因として「ヒトの胚発生における HERV の役割 (分化を含む)」、「外部刺激に対する HERV の対応, 炎症反応」, 「免疫系との相互作用」があるとされている。ERV の異常発現と神経発達障害に関与している直接的な証拠はないが, ERV の異常発現が患者とその親において神経発達障害に関連した生物学的特徴を表す可能性が示唆されていることから, 今回の解析の結果は妥当なものだと考えることができる。また世代間で同じ状態が発現されることもレトロウイルスの特徴であると考えることができる。エンリッチメント解析の結果から small hippocampus に関連する可能性がある遺伝子をいくつか同定することができたので, その遺伝子について考察する。

UBE3B 遺伝子 (ユビキチンタンパク質リガーゼ) について, これはユビキチンによるタンパク質の修飾は, 異常なタンパク質または短命のタンパク質を分解の標的にするための重要な役割を持つ遺伝子である。ヒトゲノムには約 600 から 700 の UBE3B が取り込まれており, このうちの約 13 % の遺伝子に異常があると神経疾患の原因になるとされている。また, UBE3B が継続的に作用することが, 大脳皮質回路の構築と新皮質の工事認識機能にとって必要なものであることから, 今回の解析で分かった精神疾患と

の関連性があると考えられる [10], [11]。

次に CLCN3 遺伝子 (塩化電位依存性チャンネル 3) について, 発達遅延や知的障害の遺伝的原因は多岐にわたるが, イオンチャンネルやトランスポーターの異常もその一つとされている。CLC ファミリーのエンドソーム, ライソソームの機能喪失型変異はマウスでも人でも病的症状を引き起こすとされている。発達遅延や知的障害など神経発達障害を発現している患者で CLCN3 に 9 個の変異が確認されている。また気分障害, 行動障害, 異形性, 脳の構造的異常, 発作にも関連している。ホモ接合型変異体では CLC3 機能を失わせ神経疾患を引き起こすことが分かっている。MRI では脳梁と白質の容積減少を伴う神経疾患の可能性を示唆されている。ヘテロ接合型変異体では脳梁の奇形, 回旋の増加などの神経発達障害を引き起こすことが分かっているため今回の解析と関係がある可能性があると考えた [12]。

次に BBS4 遺伝子 (バルデー・ビードル症候群 4) について, この遺伝子は重度の色素性網膜症, 肥満, 多指症, 腎臓奇形, 認知症などの特徴を持つ常染色体劣性遺伝子性の疾患と関係がある。PCM1 (ペリセントリオラー物質 1) が中心体において DIS1 や BBS4 と複合体を形成し精神疾患 (特に SCZ) の病態に関連する皮質形成に影響を与えるとされている。PCM1 と DIS1 または BBS4 を抑制することで病態が悪化することが判明している。このように中心体機能の乱れが SCZ の発症に寄与していることが示唆されている。SCZ は神経発達障害の典型的な症状であり今回の実験と関連がある可能性があると考えた [13]。

最後に NCALD 遺伝子 (ニューロカルシンデルタ) について, この遺伝子の減少が脊髄性筋萎縮症 (SMA) に対し未だ不明な点も多いが保護的な作用があるとされている。50 % の NCALD の減少が SMA 治療の安全策となるかについて研究されている。結果として海馬における NCALD と生体神経新成の間に MAP3K10-JNK 経路を介した新しい関連を明らかにした。SMA の治療オプションとして NCALD の減少を用いることが治療の安全策であることを強調する結果となっている。NCALD が海馬に影響を与えていることから今回の研究と関連している可能性があると考えた [14]。

以上の具体的な遺伝子の役割と結果から m6A のメチル化によるレトロウイルスの異常発現は遺伝子に何らかの影響を与え, その結果として精神疾患を引き起こす可能性があることが示唆された。

4. 結論

「m6A methylation regulates the fate of endogenous retrovirus transcripts:GSE145616」をテンソル分解を利用した解析をすることによってハツカネズミにおける m6A のメチル化がレトロウイルスに影響を与え, 遺伝子に関与

する可能性を示唆することができた。約2万ある遺伝子の中から m6A のメチル化によって影響を受ける遺伝子 179 個を同定することができた。

この 179 個の遺伝子をエンリッチメント解析で補正 P 値が 0.05 未満のものを見ると small hippocampus preweaning lethality, complete penetrance. そのほかに eye, B-lymphocyte, Fragile X syndrome などを含め、全部で 67 項目が該当するものであった。また同定した遺伝子の役割からも関連性を見つめることができた。

参考文献

- [1] T.A. Brown. ゲノム 第4版. メディカル・サイエンス・インターナショナル.
- [2] 出雲周二, 久保田龍二, Hing Hui Qin. レトロウイルス感染と神経疾患, 第58巻 of *Brain and Nerve*, pp. 595–604. 医学書院, 第7nd版, 2006.
- [3] Chelmicki Tomasz, Roger Emeline, Teissandier Aurélie, Dura Mathilde, Bonneville Lorraine, Rucli Sofia, Dossin François, Fouassier Camille, Lameiras Sonia, Bourc'his Deborah. m6a rna methylation regulates the fate of endogenous retroviruses. *Nature*, 2021.
- [4] Wong JJ Pinello N, Sun S. Aberrant expression of enzymes regulating m6a mrna methylation: implication in cancer. *Cancer Biol Med*, pp. 323–334, 2018.
- [5] m6a rna 調節, 2022. <https://www.cellsignal.jp/pathways/m6a-rna-regulatory-diagram>.
- [6] Jason A. Reuter, Damek V. Spacek, and Michael P. Snyder. High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*, Vol. 58, No. 4, pp. 586–597, 2015.
- [7] Zhuorui Xie, Allison Bailey, Maxim V. Kuleshov, Daniel J. B. Clarke, John E. Evangelista, Sherry L. Jenkins, Alexander Lachmann, Megan L. Wojciechowicz, Eryk Kropiwnicki, Kathleen M. Jagodnik, Minji Jeon, Avi Ma'ayan. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current Protocols*, 2021.
- [8] 初期化および分化において鍵となるヒト内在性レトロウイルスの働き, 2014. <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/140805-085017.html>.
- [9] Cipriani C Grelli S Ricceri L Calamandrei G Vallebona PS Balestrieri E, Matteucci C. Endogenous retroviruses activity as a molecular signature of neurodevelopmental disorders. *National Library of Medicine*, 2019.
- [10] Solmi Cheon, Kiran Kaur, Nadine Nijem, Islam Oguz Tuncay, Pooja Kumar, Milan Dean, Jane Juusola, Maria J. Guillen-Sacoto, Emma Bedoukian, Lynne Ierardi-Curto, Paige Kaplan, G. Bradley Schaefer, Prashant Mishra, and Maria H. Chahrouh. The ubiquitin ligase ube3b, disrupted in intellectual disability and absent speech, regulates metabolic pathways by targeting bckdk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 116, No. 9, pp. 3662–3667, 2019.
- [11] Harnett D Kawabe H Tarabykin V Ambrozkiwicz MC, Cuthill KJ. Molecular evolution, neurodevelopmental roles and clinical significance of hect-type ube3 e3 ubiquitin ligases. *National Library of Medicine*, 2020.
- [12] Gaitán-Peñas H Bertelli S VanNoy GE Grant PE O'Donnell-Luria A Valivullah Z Lovgren AK England EM Agolini E Madden JA Schmitz-Abe K Kritzer A Hawley P Novelli A Alfieri P Colafati GS Wiczorek D Platzer K Luppe J Koch-Hogrebe M Abou Jamra R Neira-Fresneda J Lehman A Boerkoel CF Seath K Clarke L; CAUSES Study van Ierland Y Argilli E Sherr EH Maiorana A Diel T Hempel M Bierhals T Estévez R Jentsch TJ Pusch M Agrawal PB Duncan AR, Polovitskaya MM. Unique variants in *clcn3*, encoding an endosomal anion/proton exchanger, underlie a spectrum of neurodevelopmental disorders. *National Library of Medicine*, 2021.
- [13] Atsushi Kamiya, Perciliz L. Tan, Ken-ichiro Kubo, Caitlin Engelhard, Koko Ishizuka, Akiharu Kubo, Sachiko Tsukita, Ann E. Pulver, Kazunori Nakajima, Nicola G. Cascella, Nicholas Katsanis, and Akira Sawa. Recruitment of PCMI to the Centrosome by the Cooperative Action of DISC1 and BBS4: A Candidate for Psychiatric Illnesses. *Archives of General Psychiatry*, Vol. 65, No. 9, pp. 996–1006, 09 2008.
- [14] Aaradhita Upadhyay, Seyyedmohsen Hosseinibarkooie, Svenja Schneider, Anna Kaczmarek, Laura Torres-Benito, Natalia Mendoza-Ferreira, Melina Overhoff, Roman Rombo, Vanessa Grysko, Min Jeong Kye, Natalia L. Kononenko, Brunhilde Wirth. Neurocalcin delta knock-out impairs adult neurogenesis whereas half reduction is not pathological. *frontiers*, 2019.