

令和元年6月20日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04602

研究課題名(和文)レトロウイルスの家畜化と宿主機能遺伝子への変化

研究課題名(英文)Domestication and co-option of endogenous retroviruses

研究代表者

西垣 一男(NISHIGAKI, KAZUO)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：20401333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：内在性レトロウイルス(ERV)は、ヒトや動物のゲノムに約10%存在する。ERVの機能解明のために、家猫をモデルに研究を行った。ERV-DCが自律増殖能を持ったウイルスとして染色体ゲノムに存在することを新たに発見し、組織における遺伝子発現・調節について解明した。抗ウイルス活性を示すERV由来のRefrex-1の出現メカニズムを解明した。さらに、ERV-gamma4というERVがネコ白血病ウイルスと組換えを起こし新たなウイルスの出現と、新たな病気発生のメカニズムの存在を発見し、X-regionと命名したERV-gamma4由来の遺伝子がヒト、霊長類、豚などのゲノムに存在していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内在性レトロウイルスは数万年～数百万年前に発生した古代レトロウイルス感染症の産物である。家猫は、他の動物とは異なって、とてもユニークなERVが存在することから、猫をモデルとした内在性ウイルスの機能の解明、病気の発生および生命進化について多くの新発見をすることができる。今日、現代のウイルスが動物や人類に甚大な病気を引き起こしており、人類や動物達がこれまでに経験してきた古代感染症の解明によって、現代に発生している感染症の制圧やそれらに向き合っていくための知恵やアイデアがこれらの研究を通して生み出される。

研究成果の概要(英文)：Endogenous retroviruses (ERV) are resident DNA copies that present around 10% in human and mammalian genomes. In order to elucidate the functions of ERV, we conducted researches into ERV in domestic cats as a model. In this study, we newly discovered existence of ERV-DC in the chromosomal genome as a virus with autonomous growth ability, and clarified gene expression in cat tissues and its regulation. We elucidated the mechanism of Refrex-1, which is an ERV-derived molecule exhibiting antiviral activity. Furthermore, ERV termed as ERV-gamma4 has been recombined with feline leukemia virus (FeLV) and produced a new recombinant virus. ERV-gamma4 derived gene designated as X-region is present in genomes of human, primate, pig, etc. Our discovery suggests the relationship between ERV function and potential diseases.

研究分野：感染症

キーワード：内在性ウイルス レトロウイルス 生命進化 病原性発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ERV (Endogenous Retrovirus 内在性レトロウイルス) は太古のレトロウイルス感染症の名残である。ERV は数百万年～数千万年前に動物や人に感染し宿主ゲノムに内在化を成し遂げた。ウイルスは内在化の後、ウイルス遺伝子の欠損・挿入により変異が蓄積し、もはやウイルスとしての粒子形成能は失活している。ERV は種特異的なウイルス遺伝子群を形成し、動物や人ではゲノムの約 6~10%を占める。近年、ERV の宿主遺伝子の機能が注目され、ウイルス感染抵抗性因子をはじめ、胎盤形成、細胞周期の調整、グロビン遺伝子の発現調節、iPS 細胞の誘導等、宿主に重要な働きをしていることが報告されている。ERV は宿主との進化的軍拡競争の結果、何らかの生理機能を獲得している可能性がある。一方、ウイルス粒子形成能のある「感染性のある自律増殖能」を保持した ERV が、生物では発見されている。これら ERV は生体内でウイルスが発現・増殖し、ウイルス粒子として放出されることで伝播可能であり、宿主に癌・リンパ腫・白血病等を発生させる場合がある。家猫のゲノムに ERV-DC (Endogenous retrovirus of domestic cat) と命名した ERV 群が存在し、C1q12-21 染色体に存在するレトロウイルス ERV-DC10 がウイルス粒子形成能を保持した「感染性のある自律増殖ウイルス」であることを発見した(穴井 2012 *J Virol*)。ERV はエピジェネティクスなどによる制御等、何らかのメカニズムで抑制されている。D4q14 染色体に存在する ERV-DC18 は ERV-DC10 の転座によって生じており(穴井 2012 *J Virol*)。レトロトランスポゾンのようにゲノムの間を移動している。

(2) ERV-DC は家猫に内在化し、ウイルスと共存している。ERV-DC 遺伝子座の中で ERV-DC7 と ERV-DC16 によって転写される分泌性蛋白質が抗ウイルス活性を持つことを発見し Refrex-1 と命名した(伊東, 2013 *J Virol*)。Refrex-1 は家猫に生まれながらに備わった特有の自然免疫因子であり、Refrex-1 は家猫の進化の原動力となっていることの証拠である。

(3) 猫白血病ウイルス (Feline leukemia virus、FeLV) は家猫のレトロウイルス感染症でリンパ腫や白血病などを引き起こす。ウイルスが体内で増殖すると、ウイルスの変異や組換えなどを引き起こしさまざまな変異ウイルスが出現する (Watanabe PLOS ONE 2013)。

2. 研究の目的

(1) ERV-DC のウイルス性状、内在化メカニズム、発現メカニズムを明らかにする。

(2) ウイルスと猫の共進化の中で出現した Refrex-1 の出現機構を解明する。

(3) 変異 FeLV の性状を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 自律増殖性を保持した新たな ERV (ERV-DC14) の発見と性状解析: ERV-DC14 プロウイルスの細胞への導入を行い、ウイルスの複製をウイルス学、分子生物学手法によって測定を行った。細胞内で増殖した ERV-DC14 は透過型電子顕微鏡によりウイルス粒子の形態の観察を行った。

(2) ERV-DC の定量系の樹立と組織における発現: ERV-DC の遺伝子型特異的に検出する PCR プライマーをデザインし、RT-PCR 法を用いてリアルタイム PCR による定量系を樹立した。家猫の血液や組織から RNA を抽出し、ERV-DC の発現量の比較を行った。

(3) ウイルスプロモーターの活性測定: ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の上流に ERV-DC 由来の 5' LTR 領域を挿入した LTR-Luc レポーター遺伝子を作成し、遺伝子の転写活性を制御するプロモーター/エンハンサーの活性をルシフェラーゼ遺伝子の産物による測定によって検討した。

(4) ERV-DC の CpG シトシンメチル化の解析: 染色体 DNA のバイサルファイト処理を行い、ERV-DC の各遺伝子座の 5' LTR を PCR 法により増幅を行い、その遺伝子断片のクローニングと塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列の結果をもとに DNA メチル化解析を行った。

(5) LacZ を用いたウイルス感染力価の測定: GPLac 細胞あるいは 293Lac 細胞を用いて LacZ を

保持したシュードタイプウイルスを作成した。これらウイルスに感染した細胞は LacZ 発現細胞を染色することによってウイルス感染力価の産出を行った。

(6)ウエスタンブロット分析、細胞免疫染色、遺伝子クローニング、RT-PCR、細胞培養：基本的な分子生物学、ウイルス学、微生物学分野で用いる技術は全て定法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 自律増殖性を保持した内在性レトロウイルス (ERV-DC14) の発見：

これまで ERV-DC10 および ERV-DC18 が家猫の自律増殖性のある内在性レトロウイルスであることを明らかにしてきた。本研究では ERV-DC14 が新たな自律増殖能を保持する内在性ウイルスである

ことを発見した。ERV-DC14 の遺伝子座は FISH 法によって C1q32 に同定した。ウイルスの感染指向性についてさまざまな種由来の細胞株を用いて調べたところ、ネズミとハムスター由来の細胞以外の細胞株には感染性を示した。また、ERV-DC10 との感染宿主域を比較したところ、2 つの ERV-DC は異なる感染宿主域を示し、ウイルスの受容体が異なることが示された (表 1)。透過型電子顕微鏡により、ERV-DC14 のウイルス粒子および、細胞からのウイルス出芽の確認を行い、形態的にタイプ C のレトロウイルスであることが判明した (図 1)。

Species	Cell line	Mean viral titer (IU/ml) ± SD	
		ERV-DC14TA	ERV-DC10
Human	HepG2	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^4$	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^4$
	HeLa	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^4$	$(7.4 \pm 0.0) \times 10^3$
	HEK293T	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^4$	$(4.4 \pm 0.5) \times 10^4$
	MCF7	$(9.0 \pm 1.4) \times 10^2$	6.7 ± 2.9
Cat	AH927	$(3.8 \pm 0.9) \times 10^3$	0
	CRFK	$(4.4 \pm 1.7) \times 10^3$	$(5.6 \pm 2.5) \times 10^1$
Monkey	Vero	$(6.0 \pm 2.5) \times 10^2$	$(1.4 \pm 1.0) \times 10^1$
	Cos7	$(3.3 \pm 0.7) \times 10^3$	2.0 ± 1.4
Mouse	NIH 3T3	0	0
	MDTF	0	0
Hamster	BHK21	0	0
Guinea pig	104C1	$(1.7 \pm 0.7) \times 10^3$	0
Dog	KwDM	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^4$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^4$
Cow	MDBK	$(5.3 \pm 1.9) \times 10^3$	0

表 1. ウイルス感染指向性の比較

(2) ERV-DC の組織における発現解析：

正常な家猫の血液や組織など 15 種の組織について ERV-DC の発現について解析を行ったところ、ERV-DC Genotype I (GI)、Genotype II (GII) および Genotype III (GIII) のいずれのウイルスも発現していることが判明した。定量 RT-PCR を樹立し、ERV-DC の発現を定量して調べた。その結果、Refrex-1 をコードする ERV-DC Genotype II の発現は全般的に検出され、特に血液における発現が高いことが判明した。Genotype I および Genotype III の発現は認められるが、限られた組織における発現パターンを示した。自律増殖能を示す ERV-DC10 などの遺伝子型 III では低い発現レベルが観察された。ERV-DC の遺伝子発現が、プロウイルスによって異なることが判明した (表 2)。



図 1. ERV-DC14 粒子 (電顕撮影)

(3) ERV-DC の発現調節メカニズム

ERV-DC の発現がどのように調節されているかを解明するために次の 3 つの実験を行った。

ERV-DC の 5' LTR について CpG シトシンメチル化による解析：

自律増殖性を示す ERV-DC10 および ERV-DC18 (Genotype III) は 5' -LTR は高度にメチル化されていた。一方、HEK293T 細胞における複製中の ERV-DC10 および ERV-DC18 ウイルスでは 5' -LTR のメチル化は観察されなかった。Refrex-1 をコードする遺伝子座である ERV-DC7 および DC16 (Genotype II) のメチル化レベルは極めて低かった。末梢血液では、Genotype I に分類される ERV-DC14 の 5' -LTR における CpG は部分的にメチル化されていた (37%)。遺伝子型 I の ERV-DC における CpG メチル化は、23~47% の範囲であった。5' -LTR のメチル化状態が血中の ERV-DC の発現レベルと一致することが示された (表 2)。

RV-DC の 5' LTR のプロモーター解析：

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて ERV-DC 5'-LTR のプロモーター活性を調べた。ERV-DC10/DC18(Genotype III)や Refrex-1 をコードする ERV-DC7, ERV-DC16 (GenotypeII) では高いプロモーター活性を示した。一方、ERV-DC14 では低いプロモーター活性を示した(表2)。

ERV-DC 5' LTR の 1 塩基多型によるプロモーター活性への影響： ERV-DC LTR のプロモーター活性の解析から、LTR の 280 番目の塩基が T (チミン) または A (アデニン) の一塩基多型が存在し、これがプロモーター活性に影響を及ぼしていることが判明した。LTR の 280 番目の塩基が T (チミン) の場合はプロモーター活性が極端に低下し、一方 A (アデニン)

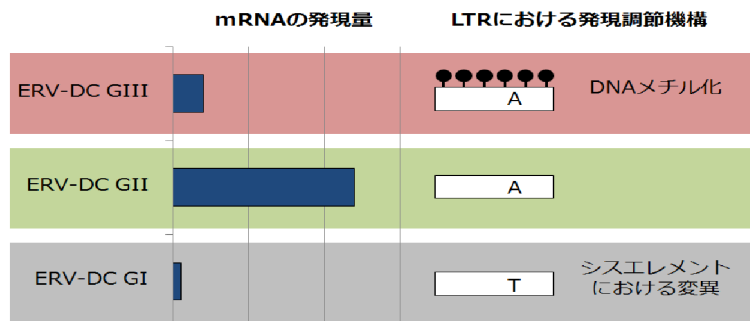


表2. ERV-DC GI と GIII は、GII と比較して mRNA の発現量が極めて低い。このような転写活性は、GI, GIII が感染性ウイルスを産生する能力を持っているのに対して、GII は抗ウイルス因子として機能しているという性質を反映していると考えられる。ERV-DC の発現量は、GI はシスエレメントにおける変異、GIII は DNA メチル化といった、genotype 特異的な発現調節機構に支配されている。

の場合はプロモーター活性が強く示された。それぞれの LTR を T-type LTR および A-type LTR と命名した。この配列は LTR の cis-エレメントであることが示唆される。

(4)家猫における ERV-DC の内在化メカニズム

家猫ゲノム中存在する ERVDC の 92 遺伝子座について T-type LTR および A-type LTR の頻度を調べた結果、プロモーター活性が極端に低下している T-Type LTR が有意にゲノム中に存在することが判明し、ウイルスの内在化メカニズムにおいて、ウイルスの不活性化が関連していることが示唆された。

(5)FeLV と FcERV-gamma4 の組換えウイルスの発見： FcERV-gamma4 と呼ばれる ERV の 5' -leader 配列 および Gag 遺伝子が FeLV に取り込まれ、組換えウイルスが出現していることを発見した。このトランスダクションをしている領域を X-region と呼び、X-region を持った FeLV は病原性が高いと考えられリンパ腫・白血病の発生について亢進することが判明した。X-region において、共通の配列である CS(commonly shared)-Sequence と命名した配列は、FcERV-gamma4 の 5' -leader 配列に相当し、ヒト、チンパンジー、霊長類、豚由来の特定の ERV に存在することを発見した。CS-sequence は猫の様々

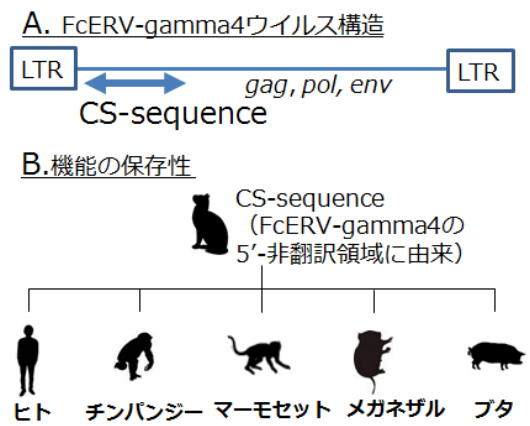


図 2. (A)FcERV-gamma4 の構造と CS-squence (B)CS-squence のさまざまな種のゲノムにおける存在と機能の保存性

な組織やヒトの培養細胞に発現していることが判明し、生体内で宿主機能遺伝子として振る舞っている可能性が示唆された(図 2A,B)。

(6)新規 FeLV の発見とそのウイルスの受容体発見

原因不明で死亡した猫白血病ウイルス(FeLV)陽性を示す 1 才猫 (症例 TG35) の末梢血液から、遺伝子単離された FeLV Env TG35-2 クローンについてウイルス感染実験およびウイルス干渉実

験を行った。ウイルスは FeLV Env 遺伝子を発現ベクターに挿入し、TG35-2 シュードタイプウイルスを作成した。感染実験の結果、既知の FeLV サブグループ A,B,C,D,T のいずれのウイルス干渉群とも異なる新規のウイルスサブグループであることが判明した。その後、症例 TG35 から全長の FeLV プロウイルスのクローニングを行い、感染性分子クローン FeLV TP2R を構築した。TG35-2 シュードウイルスの受容体について探索を行った。ハムスター・ヒト radiation hybrid 細胞株を用いて FeLV TG35-2 ウイルスの受容体は RFC(Reduced folate carrier)であることを発見した。

(7)細胞性癌関連遺伝子を持った FeLV の発見

FeLV-AKT ウイルスの発見:c-AKT が FeLV ヘトランスダクションを引き起こして出現した組換えウイルス FeLV-AKT を発見した。

FeLV-myc ウイルスの検出系の樹立と臨床応用:PCR 法による FeLV v-myc の検出系の樹立を行った。樹立された検出系を用いて、149例のリンパ腫・白血病症例について調べたところ14%において v-myc 遺伝子が検出された。それら腫瘍は T 細胞性腫瘍であった。

(8)ツシマヤマネコの保護管理

対馬ヤマネコの FeLV 感染状況およびウイルス感染リスクを評価した。ツシマヤマネコ 90 頭について FeLV 感染の有無を調査したところすべて陰性であった。ツシマヤマネコが棲む対馬の家猫について FeLV 感染の有無を調べたところ、FeLV は 6.4%の検出率であった。FeLV 感染家猫とツシマヤマネコの接触による感染が危惧される。

<参考文献>

- (1) Anai Y, Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. J Virol. 2012 86(16):8634-8644.
- (2) Watanabe S, Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. PLoS One. 2013 8(4):e61009.
- (3) Ito J, Refrex-1, a soluble restriction factor against feline endogenous and exogenous retroviruses. J Virol. 2013 87(22):12029-12040.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- (1) Miyake A^{*}, Kawasaki J^{*}, Ngo H^{*}, Makundi I, Muto Y, Khan AH, Smith DJ, Nishigaki K^{**}. The reduced folate carrier: an entry receptor for a novel feline leukemia virus variant. J Virol. 2019 pii: JVI.00269-19. doi: 10.1128/JVI.00269-19. 査読有
- (2) Makundi I, Koshida Y, Endo Y, Nishigaki K^{*}. Identification of *Felis catus* Gammaherpesvirus 1 in Tsushima Leopard Cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) on Tsushima Island, Japan. Viruss. 2018 10(7). pii: E378. doi: 10.3390/v10070378. 査読有
- (3) Kawasaki J, Nishigaki K^{*}. Tracking the Continuous Evolutionary Processes of an Endogenous Retrovirus of the Domestic Cat: ERV-DC. Viruses. 2018 Apr 6;10(4). pii: E179. doi: 10.3390/v10040179. Review. 査読有
- (4) Sumi R, Miyake A, Endo T, Ohsato Y, Ngo MH, Nishigaki K^{*}. Polymerase chain reaction-based detection of myc transduction in feline leukemia virus-infected cats. Arch Virol. 2018 Apr;163(4):1073-1077. doi: 10.1007/s00705-018-3721-1. 査読有
- (5) Kawasaki J, Kawamura M, Ohsato Y, Ito J, Nishigaki K^{*}. Presence of a Shared 5'-Leader Sequence in Ancestral Human and Mammalian Retroviruses and Its Transduction into

Feline Leukemia Virus. J Virol. 2017 Sep 27;91(20). pii: e00829-17. doi: 10.1128/JVI.00829-17. 査読有

- (6) Makundi I, Koshida Y, Kuse K, Hiratsuka T, Ito J, Baba T, Watanabe S, Kawamura M, Odahara Y, Miyake A, Yamamoto H, Kuniyoshi S, Onuma M, Nishigaki K*. Epidemiologic survey of feline leukemia virus in domestic cats on Tsushima Island, Japan: management strategy for Tsushima leopard cats. J Vet Diagn Invest. 2017 29(6):889-895. doi: 10.1177/1040638717725551. 査読有
- (7) Kawamura M, Umehara D, Odahara Y, Miyake A, Ngo MH, Ohsato Y, Hisasue M, Nakaya MA, Watanabe S, Nishigaki K*. AKT capture by feline leukemia virus. Arch Virol. 2017 162(4):1031-1036. doi: 10.1007/s00705-016-3192-1. 査読有
- (8) Kuse K*, Ito J*, Miyake A*, Kawasaki J, Watanabe S, Makundi I, Ngo MH, Otoi T, Nishigaki K*. Existence of Two Distinct Infectious Endogenous Retroviruses in Domestic Cats and Their Different Strategies for Adaptation to Transcriptional Regulation. J Virol. 2016 90(20):9029-45. doi: 10.1128/JVI.00716-16. 査読有
- (9) Miyake A*, Watanabe S*, Hiratsuka T, Ito J, Ngo MH, Makundi I, Kawasaki J, Endo Y, Tsujimoto H, Nishigaki K*. Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. J Virol. 2016 90(9):4832-7. doi: 10.1128/JVI.03229-15. 査読有
- (10) Ito J, Baba T, Kawasaki J, Nishigaki K*. Ancestral Mutations Acquired in Refrex-1, a Restriction Factor against Feline Retroviruses, during its Cooption and Domestication. J Virol. 2015 90(3):1470-85. doi: 10.1128/JVI.01904-15. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) 川崎純菜、河村麻紀、伊東潤平、西垣一男. 多様なホ乳類内在性レトロウイルスの 5' 非翻訳領域に共有された特徴的配列の発見と、その配列の猫白血病ウイルスへのトランスダクション 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017
- (2) 三宅在子、川崎純菜、西垣一男 猫白血病ウイルスの受容体発見 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017
- (3) Jumpei Ito, Takuya Baba, Junna Kawasaki and Kazuo Nishigaki. Ancestral Mutations Acquired in Refrex-1, a Restriction Factor against Feline Retroviruses, during its Co-option and Domestication. Cold Spring Harbor Retroviruses 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/members/nishigaki-p.html>

6 . 研究組織

研究分担者

(1)研究分担者 研究分担者氏名：三宅 在子 ローマ字氏名：MIYAKE Ariko 所属研究機関名：山口大学 部局名：共同獣医学部 職名：助教 研究者番号(8桁)：20548622

(2)研究分担者 研究分担者氏名：鳩谷 晋吾 ローマ字氏名：HATOYA Shingo 所属研究機関名：大阪府立大学 部局名：生命環境科学研究科 職名：准教授 研究者番号(8桁)：40453138

(3)研究分担者 研究分担者氏名：久末 正晴 ローマ字氏名：HISASUE Masaharu 所属研究機関名：麻布大学 部局名：獣医学部 職名：准教授 研究者番号(8桁)：80333144