

令和元年6月1日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21129

研究課題名(和文) 内在性レトロウイルスによる生物多様性の創出機構の解明

研究課題名(英文) Diversity and evolution of endogenous retroviruses in Domestic cat genome

研究代表者

下出 紗弓 (Shimode, Sayumi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：90772103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類のゲノムの約10%は内在性レトロウイルス(endogenous retrovirus, ERV)である。ERVは過去に生殖細胞に感染し、宿主ゲノムの一部として子孫に伝わってきたレトロウイルス由来の配列である。本研究課題ではイエネコのERVを新たに複数同定し、ERVを指標としてイネエコゲノムの多様性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、胚発生や神経での情報伝達など、宿主の生理機能におけるERVの役割に注目が集まっている。一方、同種内のERVの多様性についての解析は少ない。イエネコは約1万年前に家畜化されたものであるが、祖先であるリビアヤマネコに比して表現型は実に多様である。本研究課題は、ERVがイエネコの多様性を生む一因子となったのではないかと着想したものである。研究成果により、イエネコ系統間で異なるERV配列を同定し、その獲得時期および配列の変化を明らかにした。今後さらに研究を進めることにより、ERVがどのように宿主ゲノムの一部となり我々と共存するに至ったかを明らかにし、生物の誕生・進化過程を知ることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10% of mammalian genome sequences are comprised of endogenous retroviruses (ERVs). ERVs are remnants of ancient retroviral infections in host germline cells. In this study, several ERVs in domestic cat genomes are identified. Genetic diversity in breed and mongrel cats was revealed by using ERVs as genetic markers.

研究分野：内在性レトロウイルス

キーワード：内在性レトロウイルス ゲノム ネコ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

イエネコの家畜化の歴史は約1万年と短期間であるが、その間に100種類もの品種が生み出された。この多様性をもたらした原因遺伝子はほとんど明らかになっていない。真核生物のゲノムのうち約10%は内在性レトロウイルス（endogenous retrovirus, ERV）配列である。ERVは過去に宿主動物の生殖細胞に感染し、宿主ゲノムの一部として子孫に伝わってきたレトロウイルスのことである。研究代表者は現在までに、イエネコゲノム上にERVの一種であるRD-114ウイルス関連配列（RDRS）を複数同定し、これらが系統内で保持されていること、つまりイエネコが多様化する過程でRDRSを獲得したということを見出した。本研究課題では、このことからRDRSを含むERVが宿主ゲノムのダイナミックな変化をもたらし、多様性獲得の原動力となったのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究ではERVが宿主のゲノム・多様化に与える影響を明らかにすることを目的とし、イエネコを研究対象とし、ERV配列の同定・分離と機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) ERV配列（RDRS）の同定

イエネコゲノムにはERVの一つであるRD-114ウイルス関連配列（RDRS）が多数存在し、各品種や生息地域ごとに保有するRDRSが異なることを予備研究により明らかにしてきた。本研究課題ではさらなるRDRSの同定・分離を目的として研究を行った。

##### ① *in silico*解析によるRDRSの同定

2014年に新しく公開されたイエネコ（アビシニアン）の全ゲノムデータ（Felis\_catus\_8.0）を対象とし、RD-114ウイルスenv配列をqueryとして、RDRS配列情報を網羅的に探索した。

##### ② インバースPCRによるRDRSの同定

アビシニアン以外の複数品種に関して、RDRSの座位を特定・単離することを目的とし、RDRSのenv遺伝子を標的としたインバースPCRを行った。

#### (2) 各種イエネコにおけるRDRS検出

現在までの研究成果により、すべてのイエネコはC2染色体上に共通のRDRS（RDRS C2a）を保持し、その他の座位におけるRDRSの有無については品種・系統間で異なることがわかってきた。RDRS C2aはイエネコの共通祖先で獲得され、その他のRDRSはイエネコが各系統に分岐した後に獲得されたことが推測された。このことから、RDRS C2a以外のRDRSのことを「新しいRDRS」と総称する。

##### ① PCRの条件検討

RDRS C2aは特異的な15bpの挿入配列をもち、新しいRDRSはこれをもたないという特徴を利用し、ゲノムDNAのdifferential PCRを行うことにより、新しいRDRSの保有率を調査してきた。しかし、PCR酵素の生産工場の変更に伴い以前までのプロトコルではLot差がみられるようになってしまった。そのため、プロトコルの再検討を行った。陰性対照として新しいRDRSをもたないfcwf-4細胞（ネコ胎子由来株化細胞）のゲノムDNA、陽性対照として新しいRDRSを1コピーのみもつ3201細胞（ネコTリンパ球由来株化細胞）のゲノムDNAを利用した。

##### ② 国内外イエネコゲノムにおけるRDRS保有状況調査

日本国内に生息する純血種イエネコ167匹、アジア各国および日本国内に生息する雑種イエネコ191匹について、RDRSの保有の有無を調査した。

さらに、新しいRDRSが陽性であった純血種・雑種ネコにおいて、どの座位にRDRSをもつのかを座位特異的PCRにより明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) ERV配列（RDRS）の同定

##### ① ゲノムデータベース解析

C1染色体にほぼ完全長のRDRSのenv遺伝子配列を新たに同定した（RDRS C1bとする）。RDRS C1bはRD-114ウイルスと92%の相同性を示すほぼ完全長のenv遺伝子配列を有しており570アミノ酸をコードしている。現在までに同定したRDRSのうち、RDRS C2aのみがenv遺伝子配列内に15bpの挿入配列を有していることがわかってきたが、RDRS C1bはこの挿入配列から3bpを除いた12bpの挿入配列を有していた。RDRS C1b env遺伝子座位の周辺ゲノム配列より3' LTR配列を同定した。RD-114ウイルス、その他RDRSのLTR配列との比較を行ったところ、RDRS C2aと最も高い相同性（90%）を示し同じクレードに分類された。また、別座位にRDRS C2aと同じ15bpの挿入配列をもつenv配列を新たに同定した。この配列はSU領域のみを有しているが189アミノ酸と114アミノ酸の2つのオープンリーディングフレームをコードしている。今後これらRDRSの全長をクローニングする予定である。

##### ② インバースPCRによるRDRSの同定

先行研究に従いインバースPCRを行ったが、新たなRDRS同定には至らなかった。十分量のゲノムDNAを得られずサザンブロッティングは実施できていない。

(2) 各種イエネコにおける RDRS 検出

①PCR 条件検討

タッチダウン PCR を用いることで、特異的に新しい RDRS を検出する系を確立した。

②国内外イエネコゲノムにおける RDRS 保有状況調査

調査したすべてのイエネコが RDRS C2a を保有していた。

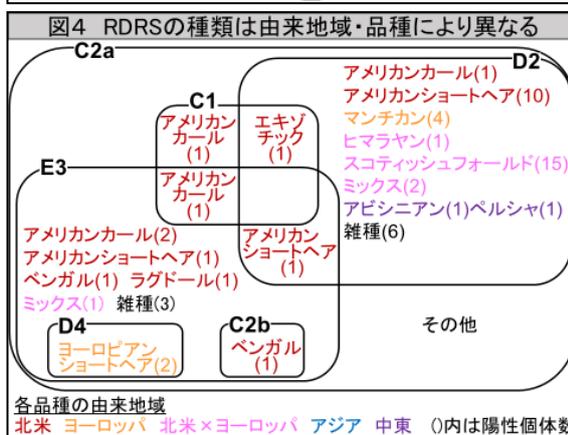
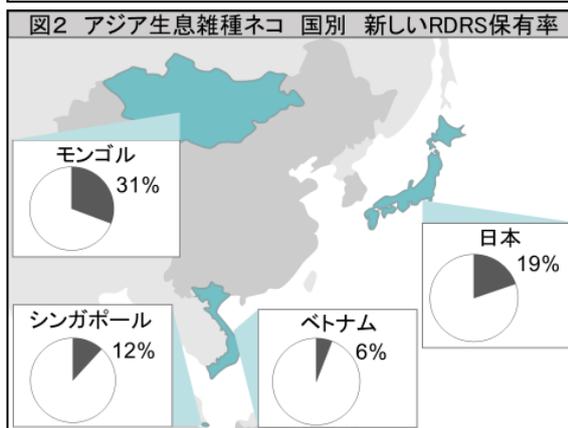
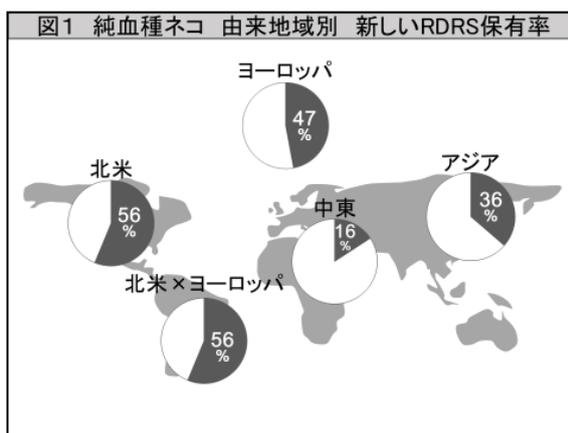
純血種ネコにおける新しい RDRS 保有率は 49%であったが、由来地域別にみると北米やヨーロッパでは約半数が陽性であったのに対し中東では陽性率が 16%にとどまり地域差がみられた (図 1)。

アジアに生息する雑種ネコにおける新しい RDRS の保有率は、北部に位置するモンゴルでは 31%だったが、南部に位置するシンガポールでは 12%、ベトナムでは 6%と陽性率が低く、日本では 19%であった (図 2)。日本国内においても沖縄 33%、中国地方 29%、関西地方 12%と地域差がみられた (図 3)。

日本へのイエネコの渡来は仏教伝来と同時期であったとされるが、それ以前の国内のイエネコの存在を示唆する遺跡が複数見つかっている。本研究結果により、日本国内に生息する雑種ネコでも新しい RDRS を保有する個体がみられ、アジア国間でも RDRS 保有率に差異があることがわかった。仏教伝来は北方ルート、南方ルートと 2 つの経路を介していたとされており、本研究結果は日本へのイエネコの到達経路が複数ある可能性を示唆した。RDRS 保有率の地域差については、サンプル数の少ない地域もあるため、さらなる調査が必要である。

座位特異的 PCR の結果、RDRS D2 の陽性率が最も高く、次に RDRS E3 の陽性率が高いことがわかった。RDRS D2、E3 と多くの品種で保持されていたことから比較的初期にイエネコゲノムに組み込まれたことが推察された。しかし、RDRS D2、E3 の両方を保持していたものは 1 匹のみであったことから、これらはまったく異なる集団に独立に獲得されたことが推測された (図 4)。イエネコは中東でヒトと暮らし始めた後、船乗りネコとしてヨーロッパへと向かう西回り、シルクロード伝いにアジアへと向かう東回りの二手に分かれたとされる。アメリカ大陸には元々野生ネコがおらず、メイフラワー号に乗ってヨーロッパから持ち込まれたネコが起源となりアメリカンショートヘアなどの品種が生まれた。RDRS E3 はアメリカ由来の複数品種およびヨーロッパンショートヘアで保持されていることから、西回りのネコに獲得されたものと推察される。座位特異的 PCR の結果、日本に生息する雑種ネコの中にも RDRS E3 を保有するものが複数みられた。近年の飼い猫はブリーダーやペットショップで購入した血統種のものも多く、これらが野生化あるいは野生ネコと交配し日本生息の雑種ネコに RDRS E3 が流入している可能性が示唆された。RDRS E3 の流入時期を特定するにはさらに複数地域・複数年代のゲノム DNA を調査する必要がある。

RD-114 ウイルスはヒヒの内在性レトロウイルス (BaEV) がイエネコ祖先に感染し別の ERV と組換え反応を起こしてできたものと考えられてきた。近年、イエネコゲノム中に RD-114 ウイルス様の env 配列を有する RDRS や gag、pol 配列を有する ERV が複数同定されており、これらの



間の組換え反応により、ネコの ERV は複雑な歴史を辿ってきたことが示唆されている。本研究で明らかにした新たな RDRS の存在は、ERV の進化過程をさらに明らかにするとともに、ERV を指標としたイエネコの進化の歴史を明らかにする一助となることを期待する。なお、本研究成果は未発表データも多いため、本報告書において結果を一部割愛した。今後、各 RDRS の機能解析を主に行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 査読あり

①宮沢孝幸、下出紗弓、中川草「RD-114 物語: ネコの移動の歴史を探るレトロウイルス (RD-114 virus story: from RNA rumor virus to a useful viral tool for elucidation the world cats' journey)」『ウイルス (Virus)』日本ウイルス学会. 66. pp21-30. 2016.  
doi: 10.2222/jsv.66.21.

(2) 査読なし

①下出紗弓、宮沢孝幸「レトロウイルス感染の痕跡から猫の旅路を探る」『Felis』アニマルメディア社. 9. pp147-151. 2016.

〔学会発表〕(計9件)

(1) 国際学会における発表

①○Sayumi Shimode, So Nakagawa, Takayuki Miyazawa 「Tracing the ancient cat's migration by analyzing retroviral integration sites」IUMS 2017 (International Union of Microbiological Societies) ポスター発表 Bayfront Avenue (シンガポール)、2017年

②○Sayumi Shimode, So Nakagawa, Jun Sugimoto, Takayuki Miyazawa 「Exaptation of endogenous retroviral envelope genes in the primate genomes」The 2nd Japan-Korea International Symposium for Transposable Elements ポスター発表 東京(日本)、2017年

③○Sayumi Shimode, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takayuki Miyazawa 「Establishment of the RD-114-free cell line for cvaccine production by TALEN-mediated genome editing technology」ISFM European Congress 2016 ポスター発表 セントジュリアン(マルタ共和国)、2016年

(2) 国内学会における発表

①宮沢孝幸、金村優香、坂口翔一、下出紗弓「国内におけるネコミトコンドリア DNA 型 (マイトタイプ) の地域偏在性」第10回 DNA 鑑定学会大会 口頭発表 東京、2017年

②○下出紗弓、中川草、金村優香、宮沢孝幸「内在性レトロウイルスによるイエネコゲノム多様性の評価」第160回日本獣医学会学術集会 口頭発表 神奈川、2017年

③○下出紗弓、中川草、金村優香、宮沢孝幸「内在性レトロウイルスを指標とした日本国内への欧米ネコ流入の評価」日本進化学会第19回大会 口頭発表 京都、2017年

④○下出紗弓、佐久間哲史、山本卓、宮沢孝幸「TALEN ノックアウト技術による内在性レトロウイルスの排除」第39回日本分子生物学会年会 ポスター発表 神奈川、2016年

⑤○下出紗弓、佐久間哲史、山本卓、宮沢孝幸「TALEN 技術を用いた感染性 RD-114 ウイルスフリー株化細胞の樹立とイヌネコ用生ワクチン製造への応用」第159回日本獣医学会学術集会 口頭発表 神奈川、2016年

⑥○下出紗弓、佐久間哲史、山本卓、宮沢孝幸「TALEN によるネコ内在性レトロウイルスノックアウトと生ワクチン製造への応用」日本ゲノム編集学会第1回大会 ポスター発表 広島、2016年

〔図書〕(計1件)

下出紗弓、宮沢孝幸(協力) Newton (2018年8月号)「猫の秘密」(2018年6月26日発行) 株式会社ニュートンプレス  
総ページ144 (pp. 64-65)

〔その他〕

(1) 報道関連情報

上記〔学会発表〕(2) ⑥の発表内容について、日本経済新聞(2016年9月19日 [15面])に掲載

(2) アウトリーチ活動

①兵庫県立小野高等学校科学総合コース「研究サポーター」(2017年10月30日~現在)

②「HANSHIN 健康メッセ」(主催:なるほど医学体験! HANSHIN 健康メッセ実行委員会 [構成: 神戸大学、兵庫医科大学、阪神電気鉄道株式会社]、大阪府大阪市、2016年8月、2017年8月、2018年8月)における実験教室の計画・主導、展示