

令和 3 年 4 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15989

研究課題名（和文）ウシ内在性レトロウイルスK1由来エンベロープの受容体分子の探索

研究課題名（英文）Screening of molecules that activate Fematrin-1-mediated cell-to-cell fusion

研究代表者

仲屋 友喜（Nakaya, Yuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：00713562

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）：受容体スクリーニングに必要な試料を揃えた。BERV-K1 EnvをシュードタイプしたVSVを作製するため、まずBERV-K1 Envのin vitroでの発現を試みたところ、Cos-7細胞で発現しやすいベクター系であることが確認できた。VSVへのシュードタイプ効率化に重要であると思われることから、BERV-K1 EnvのC末端をHERV-K型に改変した遺伝子発現ベクターを作製した。BERV-K1 EnvシュードタイプVSVを作製するための実験について、研究機関内での許可が降りなかったことから、以降のスクリーニングには到達せずに研究期間が終了した。

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が生体内で役割を担うことはわかりつつあるが、多くの場合その分子メカニズムが明らかではない。本研究は、ウシの妊娠成立に重要な役割を担う内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質が、機能を発揮するために必要な分子メカニズムを明らかにするものである。当該成果が得られれば、ウシの繁殖に関して社会問題となっている、人工授精時における着床率の低下を抑制するための手段を見出すことにつながり、着床率向上への大きな足がかりとなる。スクリーニングまでは至らなかったが、下準備が整ったため、今後の進展に大きな期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：Cos-7 cells were chosen as the best cell line for expression of BERV-K1 Env. The principal investigator prepared a BERV-K1 Env replaced with the amino acid sequences of HERV-K at the C-terminus for the efficient pseudotyping of VSV.

研究分野：ウイルス学、獣医生理学

キーワード：内在性レトロウイルス エンベロープ 受容体 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスは一本鎖 (+鎖) RNA をゲノムとして有し、外側を脂質二重膜であるエンベロープで覆われている。エンベロープ上にはウイルス由来のエンベロープタンパク (Env) が存在し、宿主細胞膜上に発現する受容体に結合することで、エンベロープと細胞膜との融合を起こし、ウイルスの細胞内への侵入を促進させる。宿主細胞へ侵入したレトロウイルスは、逆転写酵素によって自らのゲノムを二本鎖 DNA へ変換し、宿主ゲノムに組込むことで感染を成立させる。この性質から、卵子や精子の元となる生殖細胞へ感染したレトロウイルスは、遺伝によって子孫へ伝播され、宿主ゲノムの一部として振る舞うようになる。このようなレトロウイルスを内在性レトロウイルス (ERV) と定義する。すべての脊椎動物はそれぞれ異なる ERV を保有しており、ヒトやマウスなどの哺乳類においては、ゲノム DNA のおよそ 1 割を占めることが明らかとなっている。多くの ERV は変異や欠失によって感染性ウイルスや機能性タンパクの産生能を失っているが、一部のものは保存され、宿主の生理機能を担うことが知られている。

胎盤は動物種によりその形態が大きく異なる。ウシの胎盤は結合上皮絨毛性胎盤と呼ばれる組織像を有し、主に胎子栄養膜細胞由来の単核細胞 (MTC)、二核細胞 (BNC)、母体由来の子宮内膜細胞 (bEMC) から構成される (図 1)。このうち、BNC は様々な妊娠期特異的成長因子を産生し、胎子の成長や妊娠の維持を行っている。産生された因子の一部は母体に輸送される必要があるため、BNC は bEMC と細胞融合を行い、結果として三核細胞 (TNC) を形成することで、その目的を果たす。研究代表者はこれまでに、ウシ内在性レトロウイルス K1 (BERV-K1) の Env に由来する分子を同定し、Fematrín-1 と命名した (Baba and Nakaya et al, J Virol, 2011; Nakaya et al, J Virol, 2013)。Fematrín-1 は BNC で特異的に発現する膜タンパクで、bEMC 膜上の受容体分子と結合することで、BNC と bEMC の融合を促進することが示唆された (Nakaya et al, J Virol, 2013) (図 1)。

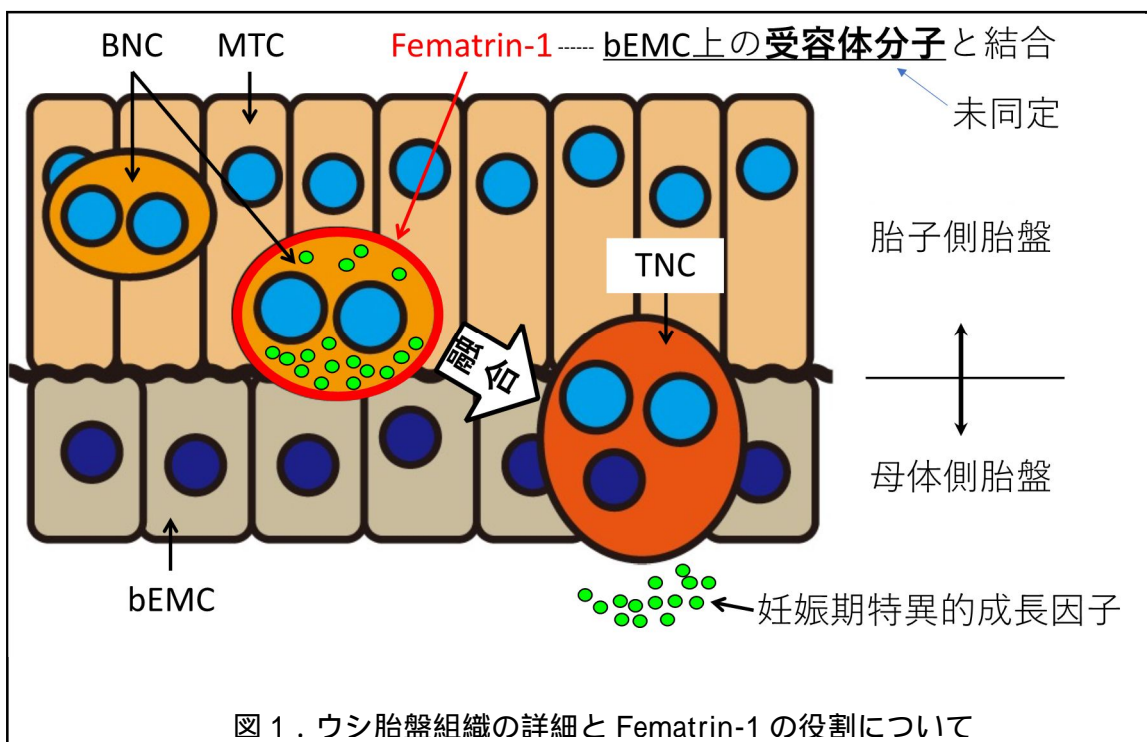


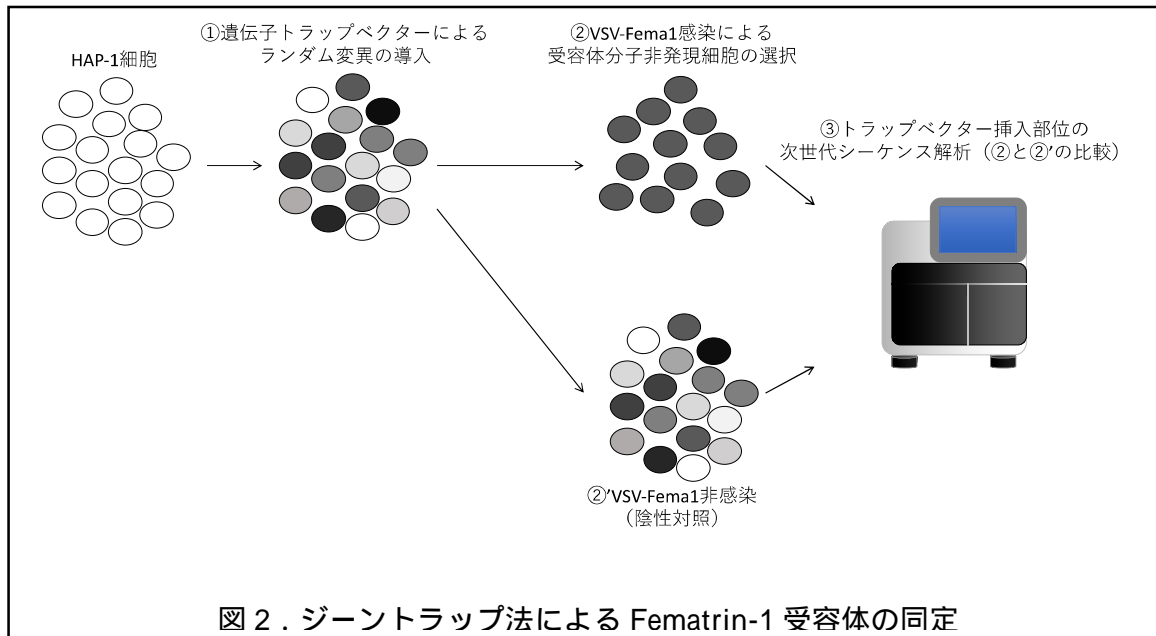
図 1. ウシ胎盤組織の詳細と Fematrín-1 の役割について

2. 研究の目的

Fematrín-1 が bEMC と融合することを確証づけるためには、Fematrín-1 受容体が bEMC に特異的に発現していることを示す必要がある。しかし、Fematrín-1 の受容体は同定されておらず、その検証が難しい。そこで、本研究では Fematrín-1 受容体を同定し、Fematrín-1 が bEMC との細胞融合に必須のタンパク質であることを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

図2に示すように、HIV ジーントラップベクターによって、遺伝子の一部を欠損した細胞株に対し、Fematin-1 をシュードタイプした水疱性口炎ウイルス (VSV) を感染させ、当シュードタイプウイルスが感染しなくなる細胞を単離培養する。その細胞から、ジーントラップによって破壊された遺伝子を同定し、Fematin-1 受容体候補遺伝子として選定する。その後は、候補遺伝の有無による Fematin-1 細胞融合能の違いなどを細胞培養によって調べ、Fematin-1 受容体遺伝子として確定する。



4. 研究成果

eHAP1 細胞と HIV ジーントラップベクターを用いて、ジーントラップ実験系を立ち上げることに成功した。加えて、現時点で詳細を掲載することはできないが、Fematin-1 シュードタイプ VSV の作製に先立ち、Fematin-1 の C 末端の一部配列を、HERV-K Env のものに置き換えたタンパク質発現ベクターを作製した。これにより、Fematin-1 が VSV に取り込まれる効率向上が見込める。この改変型 Fematin-1 を用いて、シュードタイプ VSV を作製する予定であったが、当該シュードタイプウイルスを作製するための機関申請に対する承認が降りず、研究実施期間が終了した。今後、本手法を用いたスクリーニングに進展が見られれば、ウシの胎盤形成における内在性レトロウイルスの詳細な機能や役割に対する知見を深めることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masato Yasuura, Koji Ueno, Hiroki Ashiba, Yuki Nakaya, and Makoto Fujimaki	4. 巻 32
2. 論文標題 Waveguide-mode Sensor Chip with Si/SiO ₂ /SiO _x Structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1567-1576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakaya Yuki, Fukuda Takashi, Ashiba Hiroki, Yasuura Masato, Fujimaki Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Quick assessment of influenza a virus infectivity with a long-range reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-020-05317-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲屋友喜, 福田隆史, 芦葉裕樹, 安浦雅人, 藤巻真
2. 発表標題 紫外線ランプによるインフルエンザウイルス殺菌効果の迅速評価手法（2/
3. 学会等名 電気学会光・量子デバイス研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 P C Rでインフルエンザウイルスの感染	発明者 仲屋友喜, 福田隆史, 藤巻真	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-054331	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------