

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03152

研究課題名（和文）内在性レトロウイルス依存性の宿主因子機能と機能変更による腫瘍化

研究課題名（英文）Physiological function of endogenous retroviruses in the host and tumorigenesis by altering their function.

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） 12,500,000円

研究成果の概要（和文）：Refrex-1はFeLV-Dおよび家猫のERV-DCに対する制限因子である。これらウイルスの侵入受容体として銅トランスポーターCTR1を同定した。Refrex-1は、侵入受容体CTR1との競合を介してウイルス感染を阻止した。この効果はCTR1依存的に侵入する霊長類ERVにも及んだ。さらに、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、カニクイザル、アカゲザルのゲノムで見つかった欠損型ERV Envはネコや霊長類のレトロウイルスによる感染も阻止した。分泌性Envが種の境界を越えてレトロウイルス感染を抑制できることを示し、ウイルス拡散を制御する機能を有していた。この抗ウイルス機構は収斂進化によって出現していた。

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（ERV）は、古代のウイルス感染の名残であり、ヒトや哺乳類ゲノムの数%を占めている。ERV由来の分泌性エンベロープ蛋白質が、ウイルス感染に関して制御因子として機能していることが明らかとなり、同様のメカニズムで生じている抗ウイルス機構が、様々な動物において認められた。このことはERVによる抗ウイルス機構の出現は、収斂進化によることが示された。本研究はERVのゲノムにおける存在意義の一つとして解明したと考えられる。明らかになった抗ウイルス機構をヒントに、感染症の分野において新たな切り口で感染防御方法を開発することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Refrex-1 is a restriction factor against FeLV-D and ERV-DC. It is encoded by a subset of ERV-DC loci with truncated envelope genes. We identified the copper transporter CTR1 as the entry receptor for these viruses. We also identified CTR1 as a receptor for primate ERVs, which were newly found in a search of intact envelope genes capable of forming infectious viruses. Refrex-1 counteracted infection by FeLV-D and ERV-DCs via competition for the CTR1; the antiviral effects extended to primate ERVs with CTR1-dependent entry. Truncated ERV envelope genes found in chimpanzee, bonobo, gorilla, and macaque genomes could also block infection by feline and primate retroviruses. These results indicated that soluble envelope proteins could suppress retroviral infection across species boundaries, suggesting that they function to control retroviral spread. Several mammalian species acquired antiviral machinery from various ancient retroviruses, leading to convergent evolution for host defense.

研究分野：感染免疫学

キーワード：内在性レトロウイルス ウイルス進化 受容体 共進化 抵抗性因子 ERV-DC FeLV Retrovirus

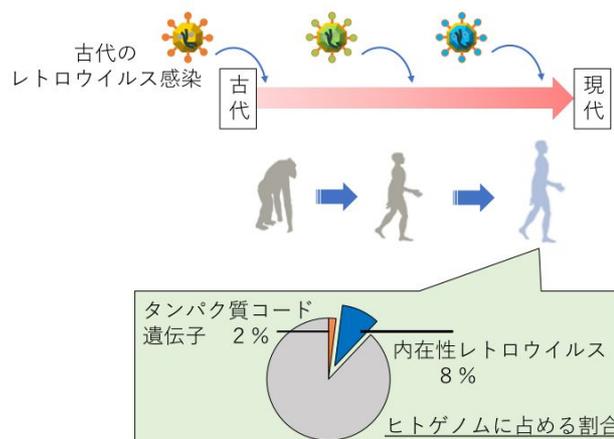
## 1. 研究開始当初の背景

内在性レトロウイルス(ERV)は数万～数千万年前に動物に感染し宿主ゲノムに内在化した。これら ERV は親から子へと遺伝し、人や動物のゲノムの約 10%を占める膨大で種特異的な遺伝子群を形成している(下図)。ERV は宿主への感染後、ウイルス遺伝子は欠損・挿入により変異が蓄積し、もはやウイルスの感染性や粒子形成能は失活している。ERV の生体内における発現は、エピジェネティック制御により調節されるものや、ウイルスプロモーターの遺伝子変異によって失活していることが知られ、一般には ERV は外来の遺伝子であり、その発現は抑制されていると考えられてきた。しかし、近年、ERV の発現産物が動物の生理機能を示すことが相次いで発見されている。感染症に関連して、自然免疫では ERV はインターフェロン応答遺伝子の発現に必須であることや、獲得免疫では我々が発見した Reflex-1 等の抗ウイルス分子が存在する(伊東 2013 J Virol)。このようにウイルス発現による動物の生理機能を担っていることが明らかになりつつある。また人で、ERV 粒子の形成が引き金となって抗ウイルス活性が誘導され、生殖細胞を感染から保護するような生命現象など、ERV 発現が機能的な生物カスケードの誘導や分子間ネットワークを形成して生命現象を示す可能性が推察される。一方

で、ERV の発現異常が神経疾患、自己免疫疾患、多発性硬化症、癌、腫瘍などの発症原因と関連していることが次第に知られるようになってきた。このように、ERV の種類が多種であり、様々な生理機能を担うため、その発現異常に起因する疾患の多様性が認められると推察される。

### 内在性レトロウイルス(ERV)とは

古代のレトロウイルス感染症の名残りで、ヒトや動物は進化の過程で、複数回のウイルス感染を受け、私たちのゲノムには約8%の膨大なウイルス遺伝子が存在します。



## 2. 研究の目的

ERV にウイルスとしての機能(例えば、RNA やタンパク発現、感染性など)が保存されている場合には、それらが生体内で生理機能をしているのではないか? それらの発現異常が疾病発症の可能性があるのでないか? 膨大な ERV 情報量の中から、生命進化や重要な機能をしている ERV を見出すことが出来ないか? ERV に関連した疾病の同定、疾病の新分類、新たな診断法の開発、あるいは予防法や新たな治療法についての発見や新規提案の可能性を見出せないか? さらに、ERV が生命進化の原動力となっている証拠への切り口とならないか? といった学術的な「問い」を着想している。「ERV の生理機能とその破綻による疾病発症」についての学術的問いの解明を目指す。特に本研究では、ERV に由来する Reflex-1 という抗ウイルス活性を示す分子の機能を中心に抗ウイルス機構の解明と生命における進化的役割を追求する。ネコに存在する Reflex-1 として知られる分子は、ネコの ERV の一種である ERV-DC のエンベロープ遺伝子に由来する。今から 280 万年前に ERV-DC がネコの祖先に感染し、そのあと共進化によって Reflex-1 が生まれたと考えらる。この分子はウイルスのエンベロープに由来するが、変異によって短縮型となり、細胞の外へ放出される、いわゆ

る分泌性のタンパク質という特徴を持つように進化した。Refrex-1 はウイルスの感染に必須の受容体に結合することによって、ウイルスの細胞への侵入を阻止すると考えられる。この感染防御機構の詳細なメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Feline Leukemia virus subgroup D (FeLV-D) および Endogenous retrovirus of domestic cat (ERV-DC) のウイルス受容体の単離同定

HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来) cDNA ライブラリーを、ウイルスに非感受性である MDTF 細胞 (マウス線維芽細胞) へ導入する。cDNA を導入した MDTF 細胞にウイルスを感染させ、ウイルスが感染した細胞に導入された cDNA を PCR 法によって単離した。

#### (2) 霊長類ゲノムにおける感染性内在性レトロウイルス (ERV) の探索

遺伝子データベースを用いて、霊長類 (チンパンジー、ボノボ、カニクイザル、アカゲザル) に存在する完全長の ERV 由来エンベロープ (Env) 遺伝子を探索し、それらの人工遺伝子合成を行った。Env 遺伝子はマウス白血病ウイルスをもとにしたシュドタイプウイルスを作成し培養細胞を用いた感染実験を行った。

#### (3) 霊長類 (チンパンジー、ボノボ、カニクイザル、アカゲザル) に存在する Refrex-1 と同じ機能を有する分子の同定

遺伝子データベースを用いて、霊長類 (チンパンジー、ボノボ、カニクイザル、アカゲザル) に存在する欠損型 Env 遺伝子を探索し、遺伝子は人工合成によって得た。タンパク質は HEK293T 細胞へ遺伝子を導入することによって得た。

### 4. 研究成果

#### (1) ウイルス受容体の単離

cDNA ライブラリーを発現した MDTF 細胞から、ウイルス感染を指標にウイルス受容体候補を単離した。その結果、銅イオンを輸送する Human CTR1 (Copper transporter1, SLC31A1) が単離された。Feline CTR1 (feCTR1) の遺伝子の単離も行い、Human CTR1 (HuCTR1) の遺伝子を含め、CTR1 発現 MDTF 細胞株 (MDTF-feCTR1 細胞および、MDTF-huCTR1 細胞) を作成し感染実験を行った。その結果、FeLV-D 株および ERV-DC 遺伝子型 1 に由来する ERV-DC8 および ERV-DC14 は感染した。しかし、ERV-DC 遺伝子型 3 に由来する ERV-DC10 はこれら細胞に感染しなかった。さらに HEK293T 細胞において CTR1 の RNAi によるノックダウンを行い、ウイルス感染を行って見たところ FeLV-D、ERV-DC8 および ERV-DC14 の感染は抑制された。以上から FeLV-D 株および ERV-DC 遺伝子型 1 (DC8、DC14) のウイルス受容体は銅イオンを輸送する CTR1 (SLC31A1) であることを証明した。

#### (2) Refrex-1 による抗ウイルス効果のメカニズム解明

ネコの ERV-DC に由来する Refrex-1 は欠損型エンベロープタンパク質であり、細胞から放出される分泌性タンパク質である。Refrex-1 は細胞表面上に存在する CTR1 に結合し、レトロウイルス感染に対して物理的に競合することによってウイルスの感染を阻止することが明らかになった (下図)。

#### (3) CTR1 をウイルス受容体を持つ感染性のある霊長類由来エンベロープ遺伝子の発見

霊長類のゲノムデータベースから、カニクイザルおよびマカクザルの完全長 ERV エンベロープ遺伝子配列を同定し、4 つの ERV のエンベロープ遺伝子 (RmRV1, CmRV, CmRV1\_1, CmRV1\_2) についてウイルス粒子の形成と感染性を発見した。これら霊長類由来 ERV は CTR1 をウイルス受容体として用いることを明らかにした。

#### (4) ネコ由来 Refrex-1 はネコのレトロウイルスのみならず、霊長類由来のウイルスに対

## しても抗ウイルス効果を示す

Refrex-1 はネコの健康を守る抗ウイルス分子であり、イエネコのレトロウイルスに対して感染抑制効果を示している。本研究では Refrex-1 はチンパンジー由来のレトロウイルス (CERV2) およびマカクザル由来のレトロウイルス (RmRV1, CmRV, CmRV1\_1, CmRV1\_2) の感染に対しても感染抑制効果を示すことが明らかとなった。Refrex-1 はウイルスの種内伝播のみならず種間伝播に対しても抑制効果を示すことが明らかになった。

## (5) 霊長類において欠損型エンベロープ(Env)蛋白質の発見と、それらがレトロウイルスの感染を抑制する

欠損型 Env 遺伝子に由来する抗ウイルス機構は霊長類にも存在する (すなわち、ネコの Refrex-1 に限定されない) という仮説を検証するために、TM 領域を欠いた RmRV1 関連 Env の SU ドメインのみをコードする遺伝子の配列検索を行った。その結果、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジー、ボノボ、ゴリラのゲノムに複数の欠損型 Env [ CmRV-trunc1, RmRV-trunc1, PNRC2-ChrV, PNRC2-BoRV, BoRV-7, GoRV-trunc1 ] が見つかった。これら遺伝子由来の欠損型エンベロープタンパク質はネコや霊長類のレトロウイルスの感染を特異的に阻止した。以前の研究で、Refrex-1 はネコの様々な組織で発現しており、血液で最も発現量が多いことが報告されている。チンパンジー、カニクイザル、アカゲザルから収集した RNA-seq データを用いて、霊長類の Env 遺伝子の発現レベルを解析した。欠損型 Env 遺伝子は胸腺や骨髄を含む様々な組織において豊富な発現を同定した。一方、完全長 Env 遺伝子の発現レベルは極めて低い値を示した。これらの結果は、欠損型 Env 遺伝子が霊長類において本質的に抗ウイルス因子として機能していることを示唆している。完全長の Env 遺伝子ではなく、欠損型 Env 遺伝子の発現は、宿主にとって進化的に重要な意味を持つ。

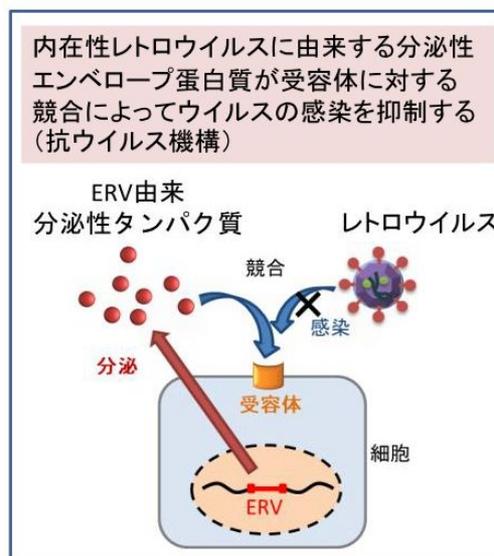
## (6) ネコと霊長類の ERV の遺伝学的解析

ネコ ERV と霊長類 ERV の進化的関係を遺伝子解析によって調べた。Gag 遺伝子と Pol 遺伝子を用いて系統樹を作成したところ、ネコおよび霊長類ウイルスは同じクレードに位置することが示された。しかしながら、Env 遺伝子は異なったクレードに分類された。これらの結果は、ネコ ERV と霊長類 ERV のバックボーンは共通の祖先に由来するが、Env 遺伝子は異なる起源を持つことを示唆している。

## ERVに由来する抗ウイルス機構の出現:収斂進化

### まとめ

- 水平伝播するレトロウイルスやERVの感染拡大の抑制
- 抗ウイルス機構はそれぞれの動物種において独立して出現 (収斂進化による出現)
- ヒトや動物に存在するERVの存在意義の解明
- 研究発表:  
米国科学アカデミー紀要 2022年



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 三宅在子, Minh Ha Ngoa, Shelly Wulandaria, 下島正幸, 中川草, 川崎純菜, 西垣一男	4. 巻 119
2. 論文標題 Convergent evolution of antiviral machinery derived from endogenous retrovirus truncated envelope genes in multiple species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)	6. 最初と最後の頁 2114441119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114441119	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 -

1. 著者名 Loai AbuEed, Isaac Makundi, 三宅在, 川崎純菜, 越田雄史, 西垣一男	4. 巻 15
2. 論文標題 Feline Foamy Virus Transmission in Tsushima Leopard Cats ( <i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i> ) on Tsushima Island, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v15040835.	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 西垣一男
2. 発表標題 内在性レトロウイルス：毒を以て毒を制す
3. 学会等名 北海道大学;学低温科学研究所・共同研究拠点研究集会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 在子, Ngo Ha, Wulandari Shelly, 下島 昌幸, 中川 草, 川崎 純菜, 西垣 一男
2. 発表標題 内在性レトロウイルス由来分泌性・短縮型エンベロープ蛋白質による抗ウイルス機構の収斂進化
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中美優、三宅在子、川崎純菜、西垣一男
2. 発表標題 猫白血病ウイルスと組換えウイルスを形成する内在性レトロウイルスFcERV-gamma4の遺伝的多様性について
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島津陽 武藤祐太郎 三宅在子 西垣一男
2. 発表標題 感染性と自律増殖性を示す新たなネコ内在性レトロウイルスの発見
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 在子、Ngo Ha、Wulandari Shelly、下島 昌幸、中川 草、川崎 純菜、西垣 一男
2. 発表標題 内在性レトロウイルス由来短縮型エンベロープ蛋白質による抗ウイルス機構の収斂進化
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Didik Pramono, 西垣一男
2. 発表標題 The diverse roles of endogenous retrovirus involved during endogenization in domestic cats
3. 学会等名 第5回 Association of Japan-Indonesia Veterinary Education(AJIVE) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shelly Wulandari、西垣一男
2. 発表標題 Molecular Diagnosis of B- and T-Cell in Feline Lymphoma: Relation to Feline Leukemia Virus-Infected Cats, Gender, Age, and Lymphoma Form
3. 学会等名 第5回 Association of Japan-Indonesia Veterinary Education(AJIVE) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 NGO MINH HA, 西垣一男
2. 発表標題 Analysis of Feline Leukemia Virus Subgroup D-Infected Cats
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西垣一男
2. 発表標題 Presence of a shared 5' -untranslated sequence in ancestral human and mammalian retroviruses and its transduction into feline leukemia virus
3. 学会等名 第5回 Association of Japan-Indonesia Veterinary Education(AJIVE) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担者	三宅 在子  (Miyake Ariko)  (20548622)	山口大学・共同獣医学部・准教授    (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中川 草  (Nakagawa So)  (70510014)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	
研究分担者	久末 正晴  (Hisasue Masaharu)  (80333144)	麻布大学・獣医学部・教授    (32701)	

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			
タンザニア	Sokoine University of Agriculture			