

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580357
 研究課題名（和文）牛白血病発症牛におけるプロウイルス遺伝子の組込み部位とその変異に関する研究
 研究課題名（英文）Study on bovine leukemia virus integration site and genomic mutations in cattle that develop leukemia.
 研究代表者
 泉對 博（SENTSUI HIROSHI）
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：10355167

研究成果の概要（和文）：白血病発症牛において、牛白血病ウイルス（BLV）のプロウイルスが組込まれている領域を、48 個体から得た 90 例の腫瘍組織を用いて、Inverse PCR により解析した。BLV プロウイルスの 43.6%が遺伝子上に組込まれており、62.5%が宿主ゲノムの転写方向と一致していた。遺伝子に組込まれた BLV プロウイルスは 1ヶ所の組込み位置を除いて全てイントロンへ組込まれていた。転写開始点近傍や CpG アイランドへ優先的に組込まれることはなかった。BLV プロウイルスは BLV の産生が抑制される位置に組込まれ、宿主側の免疫応答を回避していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The integration sites of bovine leukemia virus (BLV) in leukemic cells were analyzed using 90 tumor tissues from 48 of leukemic cattle. Although the integration sites were not located in a particular chromosome, the BLV provirus was integrated into transcription units at a frequency of 43.6% and the transcriptional direction of the provirus was in accordance with that of the integrated host genes in 62.5%. The integration sites were located in introns of the host gene, excluding only one site. BLV provirus did not favor integration near transcription start sites and CpG islands. It is suggested that the integration site of the BLV provirus in leukemic cells is related to the suppression of viral gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：家畜衛生、遺伝子、ウイルス、癌、細胞・組織、獣医学、牛白血病

1. 研究開始当初の背景

国内の牛白血病発生数は近年急増し、2008年の発生数は800頭を越えている。その大部分は牛白血病ウイルス (BLV) 感染によるウイルス性白血病で、牛における BLV 感染の拡大が懸念されている。BLV はリンパ球に感染し、長い潜伏期間を経て牛に B 細胞由来の白血病を発症させるウイルスで、レトロウイルス科デルタレトロウイルスに分類され、ヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) と類似している。BLV の腫瘍化機序は不明であり、家畜衛生および食の安全の両面からその解明が求められている。

宿主細胞染色体に組込まれる BLV プロウイルスに関する研究は、これまでにサザンブロットによる解析が行われており、BLV プロウイルスは特定の染色体に組込まれることはなく、その位置もランダムであると報告されている。しかしこれらの研究は組込み部位の宿主側遺伝子を詳しく調べたものではない。一方、同じデルタレトロウイルス属の HTLV-1 では、ダイレクトシーケンスを用いて組込み位置の塩基配列が解析され、発症者では宿主側遺伝子の転写開始部位付近に組込まれる傾向があることが報告されている。その他のレトロウイルスでも、宿主遺伝子の特定部位に組込まれることや癌原遺伝子の上流に組込まれることが腫瘍化の原因となることが報告されている。

BLV は癌遺伝子を保有してないため、腫瘍化の機序は不明である。特定の宿主遺伝子部位に BLV プロウイルスが挿入することやプロウイルスの遺伝子変異が宿主細胞の活性化および白血病発症に関与していることが明らかになれば、BLV の発病機序の解明に結びつく。また、類似したヒト成人型白血病の腫瘍化機序の解明や発病制御の研究にも貢献できる。

2. 研究の目的

腫瘍を引き起こすレトロウイルスは一般的に感染後 2~3 週間と短期間で発症するものと長い期間を経て発症するものに分けることができ、その差は発病機序に依存する。発病期間が短いウイルスには癌遺伝子がコードされており、ウイルス由来の癌遺伝子が宿主ゲノムに組込まれることによる比較的単純な機序で腫瘍発症に至る。一方、癌遺伝子をコードしていないレトロウイルスはウイルス側の因子のみでなく宿主側の因子も関与している場合があり、発病までに長い期間を必要とする。その発病機序は複数存在するが、(1) ウイルス由来の因子による trans-activation、(2) 組込まれたウイルスの long terminal repeat (LTR) による cis-activation、(3) ウイルス由来エンベロープの発現の 3 つに大別できることが示唆されている。そしてさらにこれらの因子に加え、宿主のジェネティックあるいはエピジェネティックな要因によって発病するものもあり、癌遺伝子をコードするウイルスと比較して発病機序は複雑である。

本研究は腫瘍細胞に組込まれている BLV プロウイルス遺伝子の解析を行うとともに、宿主側染色体の組込み位置の解析を行い、腫瘍化に関与する特定の法則をプロウイルスの変異および宿主遺伝子への組込状態の両面から解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) サンプルおよび DNA 抽出

関東の食肉検査場から提供された 48 頭の牛から採取した 90 の腫瘍サンプルおよび BLV 持続感染株化細胞 2M3 を用いた。2M3 細胞は白血病発症牛由来腫瘍化 B 細胞であり、感染ウイルス非産生細胞株である。また、この株化細胞はサザンブロット法により BLV プロウイルスの組込みは 1 コピーのみであることが

わかっているが、そのゲノムの位置は特定されていない。そのため、2M3 細胞は BLV 感染後ウイルス粒子を産生しない生体内の細胞と類似している。組込み位置を特定するために用いる各々のサンプルの DNA は PURGENE (Gentra systems Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いて説明書に従い抽出した。

(2) Polymerase chain reaction (PCR)

PCR に用いたプライマーは LTR 領域に設計した。そのオリゴヌクレオチド配列は表 1 に示す。PCR 反応には 95°C で 2 分間熱処理した後、95°C で 30 秒間の熱変性、59°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 30 秒間の伸長反応の工程を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。また、すべてのサイクル終了後、72°C で 4 分間の最終伸長反応を行った。

表 1. PCR および IPCR に使用したプライマー

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Position	Sense	Use
LTR-F	GTATGAAAGATCATGCCGACC	2-22	+	PCR
LTR-R	TTATAGGAGGGGGAATTTCC	631-650	-	PCR
Bcl-F	CAGAAGCGTTCCTCTCCTGAGA	210-231	+	IPCR
Bcl-R	TTATCAGCAGGTGAGGTCAGCA	152-173	-	IPCR
Pst-F	GGGTTCGCAAGTAAGGATAC	1047-1066	+	IPCR
Pst-R	ATTGAGCCTTTGCGCGCTTT	695-714	-	IPCR
BBM-F	TACTTTCTGTTTCTCGCGG	460-478	+	IPCR
BBM-R	GACGTCTCTGCTGGTTTAC	42-61	-	IPCR

(3) Inverse PCR (IPCR) およびダイレクトシーケンス法

BLV プロウイルスの組込み位置に隣接したウシゲノム配列を決定するために、本研究では IPCR により BLV プロウイルス 5' 末端とそれに隣接するウシゲノム配列の増幅を行った。抽出したゲノム DNA 1 μ g を制限酵素 (*Bcl* I, *Bss* HII, *Mfe* I, *Pst* I) で処理し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて精製後、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いてセルフライゲーションさせ環状化 DNA を作製した。環状化 DNA は上記と同様の方法で精製後、PCR Master Mix (Promega) を用いた IPCR の鋳型として使用した。本研究で用い

たプライマーは表 2-1 に示す。*Bcl* I および *Pst* I プライマーはそれぞれ *Bcl* I および *Pst* I で処理した鋳型に用いた。また、BBM プライマーは *Bcl* I, *Bss* HII および *Mfe* I で処理した鋳型に用いた。IPCR 反応は 95°C で 5 分間熱処理した後、95°C で 1 分間の熱変性、61°C で 1 分間のアニーリングそして 72°C で 3 分間の伸長反応の工程を 1 サイクルとして 45 サイクル行った。また、すべてのサイクル終了後、72°C で 10 分間の最終伸長反応を行った。それぞれのサンプルの IPCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲルからの精製を行った。精製した IPCR 産物および IPCR に用いたプライマーは、それぞれダイレクトシーケンスの鋳型およびプライマーとして用いた。それぞれの IPCR 産物のシーケンスは ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Norwalk, CT, U. S. A) および ABI PRISM Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を説明書に従って使用し、塩基配列の決定を行った。

(4) 組込み位置の解析

BLV プロウイルスゲノムは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) が運営する BLAST version 2.2.18 を用いてウイルスのデータベースと比較解析した。組込み位置は National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) が運営する BLAST、Map Viewer、Nucleotide、University of California-Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>) が運営する Cow BLAT Search を用いてウシゲノム (2007 年 10 月公表配列) を対象とし、相同性の高い配列の探索を行った。そして、① BLV 5'LTR の 5'末端の隣接部位であること、② LTR に隣接した配列が 95%以上ウシゲノム配列に一致すること、③ BLAST の初期設定

条件でウシゲノムに最も高い適合率である配列を選別し、BLV プロウイルスの組込み位置として決定した。プロウイルスの隣接配列が予測された遺伝子であった場合、ウシの expressed sequence tag を対象とした DDBJ が運営する BLAST および UCSC が運営する Genome Browser Reference Sequence (RefSeq) Genes track を用いて、その配列が転写されている配列であるかを確認した。また、UCSC が運営する Cow Genome Browser Gateway を用いて CpG アイランドへの組込みや近傍への組込みが起きているかを調べた。繰返し配列および回文配列に組込み込まれているかどうかは、それぞれ UCSC が運営する Cow Genome Browser Gateway および GENETYX Ver.10 (Genetyx, Tokyo, Japan) を使用し解析を行った。

4. 研究成果

(1) BLV 感染および組込み位置の決定

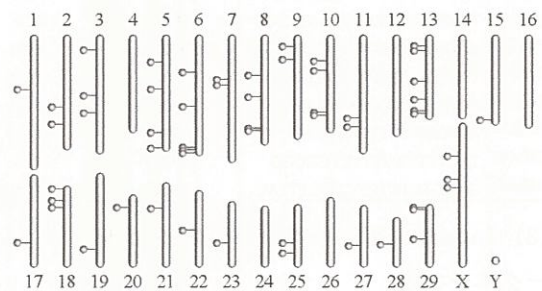
48頭の白血病発症牛はPCRにより診断し、その結果から成牛型白血病の発症牛であると確認できた。全てのサンプルにおいてBLVプロウイルスの組込みが確認できたため、それら白血病発症牛のサンプルと2M3細胞においてIPCRを行った。BLVゲノムの組込み位置に隣接したウシゲノム配列を62の腫瘍サンプルおよび2M3細胞の計63サンプルで決定できた。同一個体由来のものは、異なった組織のサンプルにおいても同一の組込みであるものが多かった。しかしながら、同一個体から異なる2箇所の組込み位置を決定できたものも存在した。最終的に48個体90サンプルおよび2M3細胞から55の異なる組込み位置を決定することができた。

(2) BLV プロウイルス組込み位置

BLVプロウイルスは他のレトロウイルスと同様に特定の染色体に組込まれてはいなかった(図1)。次にBLVプロウイルス組込み位置

が転写ユニットへ組込まれるかどうか調べるために、NCBI Map Viewer and Nucleotide を用いて宿主ゲノムの解析を行った。本研究においては mRNA に転写される領域に BLV プロウイルスが組込まれていた場合を転写ユニットに組込まれていると判定した。その転写ユニットへの組込みは24サンプル(43.6%)であり、T5およびT7においては偽遺伝子に組込まれていた。また、T22の1サンプルのみがエクソン領域に組込まれていたが、ストップコドンの下流に組込まれていたため、coding sequence (CDS)へ組込まれていたサンプルは1つも存在しなかった。転写ユニットに組込まれたBLVプロウイルスおよび宿主遺伝子の転写方向が一致したサンプルは15サンプル(62.5%)で、9サンプル(37.5%)において転写方向は一致していなかった。

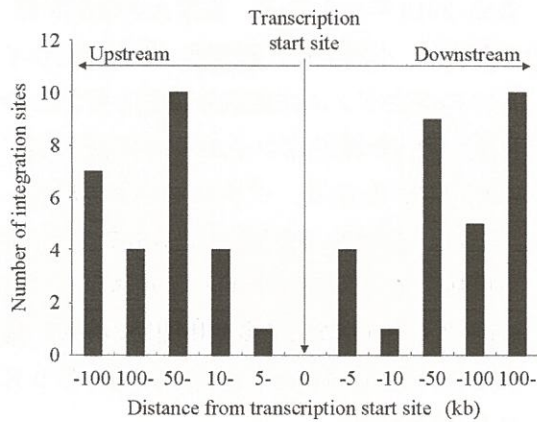
図1 BLV プロウイルスの各染色体への組込み位置。数字は各染色体番号を示す。



(3) 転写開始点およびCpGアイランド近傍への組込み位置

転写開始点5kb以内の組込みは4サンプル(7.3%)で認められた(図2)。さらに、多くのプロモーター領域にコードされているCpGへの組込みは1サンプル(1.8%)のみで、CpGアイランドから5kb以内の組込みは6サンプル(10.9%)であった。したがって、転写開始点およびCpGアイランド近傍へ組込まれる確率は低く、転写開始点近傍に組込まれる確率の高いMLVとは異なる結果となった。

図2 転写開始点から BLV プロウイルスまでの距離。



(4) BLV プロウイルス組込み位置の隣接塩基および隣接配列

次に、BLV の PIC が宿主ゲノムの特定の塩基および配列を認識しているかどうかを決定するために、NCBI Nucleotide および GENETYX Ver.10 を用いて宿主ゲノムの隣接配列の解析を行った。BLV プロウイルスに隣接した塩基で最も多かったものは C (47.3%)で、次に G (23.6%)が多かった。また、BLV プロウイルスの回文配列への組込みは 6 サンプル(10.9%)のみで、低い確率であった。ウシゲノムは多くの繰返し配列をコードしており、いくつかのレトロウイルスで繰返し配列へ組込まれる傾向があるため、繰返し配列と BLV プロウイルスの組込み位置の関係を探索した。繰返し配列への組込みは 19 サンプル(34.4%)であった。また、ヒトゲノムと同様ウシゲノムで最もよく認められる非 LTR 型レトロトランスポゾンである長鎖散在反復配列(LINE)および短鎖散在反復配列(SINE)への組込みを RepeatMasker により解析した。その結果、BLV プロウイルスの LINE および SINE への組込みは 8 サンプル(14.5%)ずつであった。BLV プロウイルスの組込み位置とそれぞれのレトロトランスポゾンの相関関係を Fisher の正確確率により算出したところ、相関関係は認められなかった($P>0.05$)。また、SINE の 1 種である Alu element はヒトゲノ

ム上では遺伝子が多くコードされた領域に認められるレトロトランスポゾンで、HIV-1 ではその Alu element に組込まれることが多い。しかしながら、Alu element はウシゲノム上には存在しないため、ウシゲノム上の遺伝子が多くコードされる領域に存在する mammalian interspersed repeats (MIR)と遺伝子があまりコードされていない領域に存在する RNA transport elements (RTE)への BLV プロウイルスの組込みを解析した。その結果、BLV プロウイルスの MIR および RTE への組込みは認められなかった。

(5) 考察

本研究において、BLV プロウイルスの組込みにおいて HIV-1 や MLV 等のように優先的に組込まれる領域は特に認められなかったが、遺伝子に組込まれる際はイントロンへ優先的に組込まれていた。このことはランダムに組込まれる傾向にある HTLV-1 やマウス乳腺腫瘍ウイルス(Mouse mammary tumor virus; MMTV)といった他のレトロウイルスと異なる点である。BLV プロウイルスの組込まれる位置の塩基配列に特定の傾向は認められないが、腫瘍細胞における組込み位置はウイルス産生に不利な領域であると考えられる。ウイルス産生は免疫反応を惹起し BLV の病態発症に不利に働くため、腫瘍細胞において BLV プロウイルスがウイルス産生に不利な位置に組込まれていることは、BLV にとって生存の可能性が高まる。また、BLV 感染腫瘍細胞におけるウイルス産生の抑制力は PL 時より強いため、PL 時の細胞では腫瘍細胞より BLV のプロウイルスがウイルスの産生に有利な領域に組込まれている可能性がある。また、腫瘍細胞においてはウイルス感染から長期に亘って免疫応答から逃れているので、BLV プロウイルスが転写に不利な領域に組込まれた細胞は生き残り、腫瘍化したとも予測できる。しかし、PL やキャリアー牛における組込み位

置の探索を行っていないので、今後は他の病態の組込み位置と比較することにより、BLV プロウイルスの組込み位置と病態との関連性について明らかになると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Miyasaka T, Sentsui H, Aida Y. (他5名7番目) Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. Tissue Antigens 査読有 81, 2013, 72-82.
2. Miyasaka T, Takeshima S-N, Sentsui H, Aida Y. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. J. Dairy Sci. 査読有 95, 2012, 420-431.
3. Murakami H, Yamada T, Suzuki M, Nakahara Y, Suzuki K, Sentsui H. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. Virus Research. 査読有 156, 2011, 107-112.
4. Miyasaka T, Ishibashi K, Sentsui H, Aida Y. (他6名8番目) The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. Gene 査読有 472, 2011, 42-49.
5. Murakami H, Kuroiwa T, Suzuki K, Miura Y, Sentsui H. Analysis of Syk expression in bovine lymphoma and persistent lymphocytosis induced by bovine leukemia virus. J Vet Med Sci. 査読有 73, 2011, 41-45.

[学会発表] (計5件)

1. 宮坂卓、小熊圭祐、泉對博. 牛白血病ウ

イルスの各病態における宿主ゲノム内組込み位置の分布. 第155回日本獣医学会学術集会. 2013年3月29日. 東京大学教養学部.

2. 宮坂卓、小熊圭祐、泉對博. 牛白血病ウイルスの宿主ゲノム内組込み位置と病態との関連. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13日. グランキューブ大阪.
3. 宮坂卓、泉對博、間陽子. (他5名7番目) 牛白血病ウイルス(BLV)プロウイルスロードとBoLAクラスII遺伝子多型相関性の解析. 第21回日本組織適合性学会大会. 2012年9月16日. 明治大学.
4. 宮坂卓、竹嶋伸之輔、泉對博、間陽子. 新規ウシ主要組織適合抗原(MHC)クラスII遺伝子ハプロタイプの同定とその分布. 第21回日本組織適合性学会大会. 2012年9月15日. 明治大学.
5. 村上裕信、福井大介、鈴木和彦、泉對博. 牛白血病発症牛及び持続性リンパ球増多症発症牛におけるLyn発現量の解析. 第150回日本獣医学会学術集会. 2010年9月16日. 帯広畜産大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

泉對博 (SENTSUI HIROSHI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10355167

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

村上 賢二 (MURAKAMI KENJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・上席研究員

研究者番号：10355141

鈴木 和彦 (SUZUKI KAZUHIKO)

東京農工大学・農学部・講師

研究者番号：00366626