

平成21年6月1日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19880018  
 研究課題名（和文） 胎盤における内在性レトロウイルスエンベロープ蛋白の生理学的機能  
 研究課題名（英文） Physiological function of the endogenous retrovirus envelope protein in placenta.  
 研究代表者  
 馬場 健司（BABA KENJI）  
 山口大学・農学部・助教  
 研究者番号： 90452367

研究成果の概要：2種類のウシ内在性レトロウイルス(ERV)由来エンベロープ(env)遺伝子を新規に同定し、胎盤を含む様々な臓器におけるこれらの遺伝子の発現状況を明らかにした。さらに、これらの遺伝子からは、env蛋白とは異なるアクセサリ蛋白(orf-A)が発現されることを見出し、その発現調節および細胞内局在に関する検討を行った。これまでに、ウシのERV由来蛋白に関する報告はなされておらず、本研究の成果は、今後のウシのERVに関する研究の有用な知見となるものと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード： 内在性レトロウイルス、エンベロープ蛋白、胎盤、ウシ

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類はそのゲノムの約1割がレトロウイルス由来の配列、すなわち内在性レトロウイルス(ERV)で占められている。そのほとんどは長い年月の間に点変異や欠失変異などを受け不活化されているが、一部のオープンリーディングフレーム(ORF)は保存されており、実際に蛋白として発現しているものがある。近年、ヒト、マウス、ヒツジにおいて、ERV由来蛋白が胎盤形成に関与していることが明らかとなってきた。染色体に組み込まれているERVは動物種によって異なっているにも

関わらず、いずれも胎盤の形成に関与しているという事実から、哺乳類において胎盤とERVが共進化してきた可能性が考えられる。また、ERV由来蛋白の胎盤形成における生理学的機能の詳細は明らかにされていないが、流産や妊娠中毒症などの疾病との関与も示唆されている。これまでにウシのERVは同定されていないが、上記の動物種同様に胎盤形成および流産などの疾病との関与が予想される。

## 2. 研究の目的

ウシの ERV (Bovine ERV; BERV) を同定し、その胎盤における発現および生理学的機能を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

(1) BERV のバイオインフォマティクス解析: 既知のレトロウイルスエンベロープ蛋白のアミノ酸配列をもとに NCBI のウシゲノムデータベースの BLAST サーチを行い、ORF が維持された ERV の *env* 遺伝子を探した。同定した *env* 遺伝子から予想されるアミノ酸配列を用いて、近接結合法により分子系統樹解析を行った。

(2) BERV *env* 遺伝子の正常組織における発現とクローニング: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて正常組織における BERV mRNA の発現状況を検討し、得られた増幅断片の塩基配列を解析した。

(3) BERV *env* 蛋白の発現と抗 BERV *env* ペプチド抗体の作製: His タグ融合 BERV *env* (SU 領域) 発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、イムノブロット法により発現蛋白を検出した。また、予想されるアミノ酸配列をもとに作製した 2 種類の合成ペプチドをウサギに免疫し、抗 BERV *env* ペプチド抗体の作製を試みた。

(4) 3' LTR 領域の BERV *orf-A* 蛋白の発現に対する影響: HA タグ融合 BERV *orf-A* 発現プラスミド (3' LTR; +/-) を 293T 細胞に導入し、その発現をイムノブロット法により検討した。

(5) BERV *orf-A* 蛋白の細胞内局在: GFP 融合 BERV *orf-A* 発現プラスミドをヒト、ウシ、ブタ由来の細胞に導入し、その細胞内局在を蛍光顕微鏡観察により検討した。

### 4. 研究成果

(1) BERV のバイオインフォマティクス解析により、ORF が保持された 2 種類の *env* 遺伝子を同定した。これらの遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列を用いて分子系統樹解析を行った結果、同定した 2 種類の BERV (BERV- $\beta$ 1, BERV- $\beta$ 2) *env* 遺伝子は、どちらもベータレトロウイルス属に分類された (図 1)。同定された BERV エンベロープは、ヒツジの胎盤形成に必須であることが示唆されている endogenous jaagsiekte sheep

retrovirus (enJSRV) のエンベロープと最も類似していることが明らかとなった。

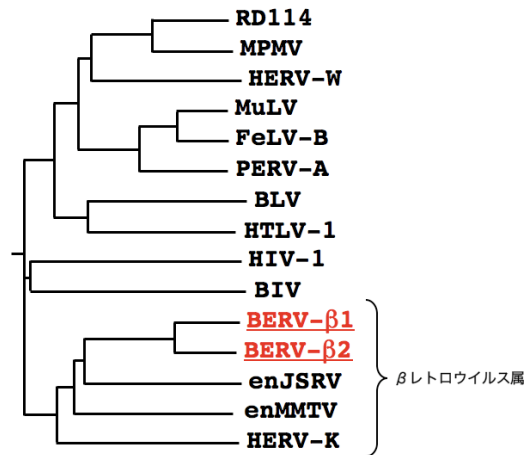


図1 系統樹解析 (N-J法)

(2) BERV- $\beta$ 1, BERV- $\beta$ 2 の *env* 遺伝子特異的なプライマーを作製し、正常組織における mRNA の発現を解析した結果、胎盤、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、皮膚、乳腺で BERV *env* mRNA の発現が確認された (図 2)。

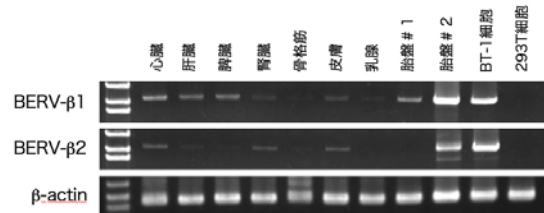


図2 正常組織における BERV mRNA の発現

得られた増幅断片をクローニングし、塩基配列を決定した。BERV- $\beta$ 1 *env* は、713 アミノ酸残基、BERV- $\beta$ 2 *env* は 712 アミノ酸残基をコードしており、予想されるアミノ酸配列には、レトロウイルスの *env* に特徴的なモチーフがすべて保存されていた。さらに、胎盤においては、全長 cDNA のほかに約 550bp の cDNA 断片も増幅された (図 3)。

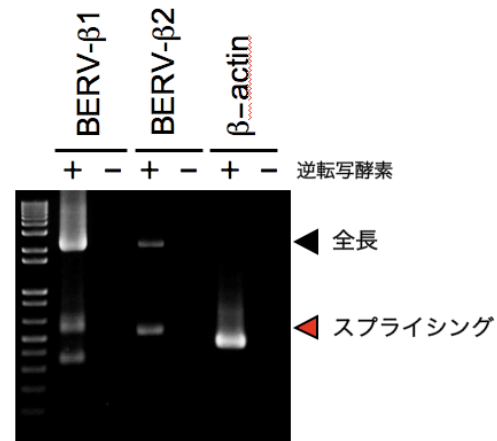


図3 スプライシングを受けた mRNA の発現

これらの増幅断片の塩基配列を解析した結果、*env* mRNA がスプライシングを受けることによって別の蛋白(*orf-A*)をコードする mRNA が発現することが明らかになった。また、*orf-A* には、核移行シグナル(Nuclear Localisation Signal; NLS)および核外移行シグナル(Nuclear Export Signal; NES)が存在することがそのアミノ酸配列から予想された(図4)。

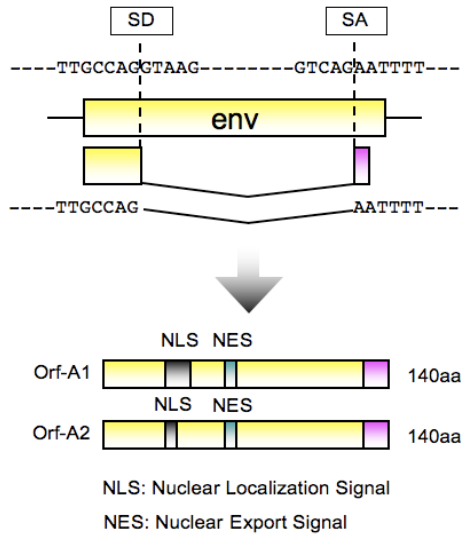


図4 *env* mRNAのスプライシングによって発現する*orf-A*蛋白の模式図

(3) His タグ融合 BERV *env* (SU) 蛋白は、約 50kDa の分子量として検出された(図5)。

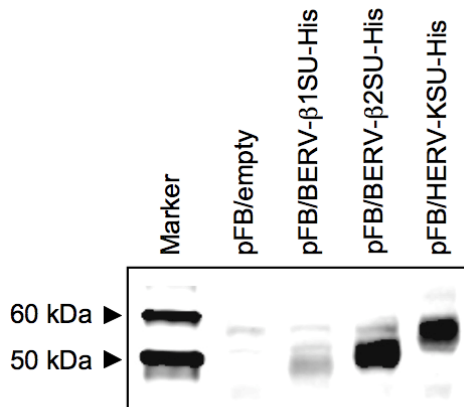


図5 BERV SU蛋白の発現

また、抗 BERV *env* ペプチド抗体の作製を試みたが、残念ながら BERV *env* (SU) 蛋白を特異的に認識する抗血清は得られなかった。

(4) HA タグ融合 BERV *orf-A* 蛋白は、*env* ORF の下流に 3' LTR が存在する場合、ほとんど発現が認められなかったが、*env* ORF のみの発現プラスミドからは、約 24kDa の蛋白として発現が認められた(図6)。

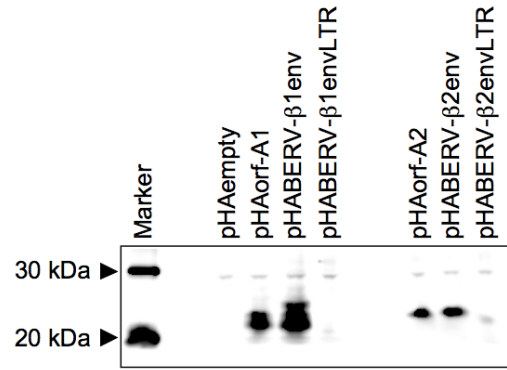


図6 *orf-A* 蛋白の発現に対する3'LTRの影響

また、3' LTR を *env* ORF の下流に有する発現プラスミドを 293T 細胞に導入した場合、*orf-A* mRNA はほとんど発現せず、逆に *env* ORF のみの発現プラスミドを導入した場合には、*env* mRNA は発現せず、*orf-A* mRNA だけの発現が認められた(図7)。

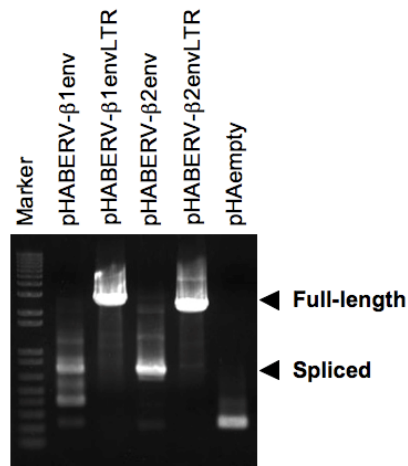


図7 *orf-A* mRNAの発現に対する3'LTRの影響

これらの結果から、3' LTR 領域に *env* mRNA のスプライシングを抑制するエレメントが存在し、*orf-A* 蛋白の発現が制御されていることが示唆された。

(5) GFP 融合 *orf-A* 蛋白は、ウシ由来細胞(MDBK)またはブタ由来細胞(PK-15)では核内に局在し、ヒト由来細胞(293T)では細胞質に局在することが明らかになった(図8)。

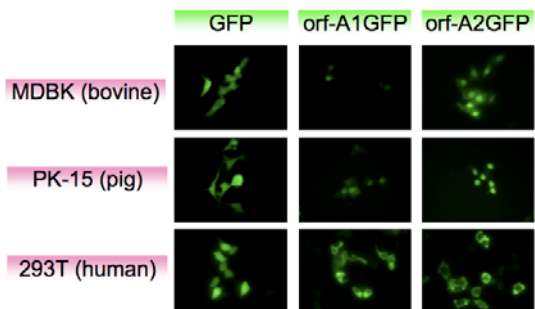


図8 *orf-A* 蛋白の細胞内局在

これらの orf-A の特徴は、ベータレトロウイルス属の human endogenous retrovirus-K の rec や mouse mammary tumor virus の rem といったウイルス蛋白の発現を制御するアクセサリ蛋白と類似しており、BERV の orf-A も同様の機能を有する可能性が示唆された。

以上に示した通り、本研究では、胎盤を含めた様々な臓器で発現する複数の BERV 由来蛋白を同定し、そのいくつかの特徴を明らかにした。しかし、特異的抗体の作製に成功しなかったため、組織における BERV 由来蛋白の発現状況を明らかにすることはできなかった。また、本研究課題期間では、当初予定していた BERV エンベロープ蛋白の胎盤における生理学的機能や疾病との関与を明らかにするには至らなかった。しかし、これまでにウシの ERV 由来蛋白に関する報告はなされておらず、本研究の成果は今後のウイルス学、生理学、病理学など様々な分野におけるウシの ERV に関する研究の有用な知見となるものと考えられた。

#### 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 1 件)

① 宮沢孝幸、岡田雅也、馬場健司、内在性レトロウイルスとワクチン、獣医畜産新報、60(9)、p722-730、2007、査読なし

[学会発表] (計 1 件)

① 馬場健司、ウシ内在性レトロウイルスエンベロープ遺伝子の同定と特性解析、第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 27 日、岡山市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

馬場 健司 (BABA KENJI)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：9 0 4 5 2 3 6 7

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし