

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780302

研究課題名（和文） 感染性牛白血病ウイルスの新規高感度検出法の開発

研究課題名（英文） Development of high sensitivity Bovine Leukemia Virus detection method

研究代表者

竹嶋 伸之輔 (TAKESHIMA SHIN-NOSUKE)

独立行政法人理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット・基幹研究所研究員

研究者番号：60342812

研究成果の概要（和文）：

本研究では、転写活性化因子 Tax の高活性型変異株を用いてシンシチウムアッセイ用高感度標的細胞の開発を行った。高活性型 Tax 発現ベクターを構築し、HeLa 細胞に導入して細胞内局在、細胞周期の G1 期停止およびアポトーシス誘導能が野生型と変わらないことを確かめた。加えて網羅的発現解析により Tax 発現がアポトーシス、細胞周期、転写活性化、細胞増殖、免疫関連の遺伝子の発現を制御していることを確かめた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we try to develop the new high-sensitivity BLV detection system using high-activity transactivation Tax protein. We construct High-Tax expression vector, and introduced to HeLa cells, and confirmed that the functions such as localization, G1 arrest, apoptosis inducing, did not changed for wild type and high-tax. Additionally, we performed cDNA microarray analysis and determined that Tax protein controlled cell cycle, transactivation, cell proliferation and immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：高活性型 Tax 蛋白質、マイクロアレイ、ウイルス蛋白質、牛白血病ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

牛白血病ウイルス(BLV)感染は近年拡大の一途を辿っており、それに伴い BLV が生乳や生肉などの畜産物やウシ由来の生物製剤、

ワクチンなどへ迷入するリスクは非常に高くなっている。感染細胞や感染性ウイルス粒子が、このような環境中へ拡散した場合は、大きな社会問題となることは疑いないが、現時点で高感度に環境中の感染性 BLV を検出

する方法は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが発見した BLV 転写活性化遺伝子 *tax* の高活性型および開発したリアルタイム PCR 法による高感度 BLV 検出法を駆使して、環境中に迷入した微量な感染性 BLV を検出・定量可能な方法を新しく確立する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

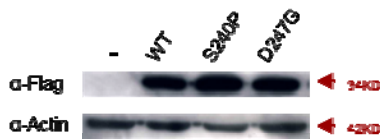
野生型 *Tax* 遺伝子 (*TaxBLV-WT*)、低活性型 *Tax* 遺伝子 (*TaxBLV-S240P*) および高活性型 *Tax* 遺伝子 (*TaxBLV-D247G*) の N 末端に Flag 配列を導入し、pCAGGS ベクターに導入したプラスミドを作成した。これらを HeLa 細胞に導入し、*Tax* の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

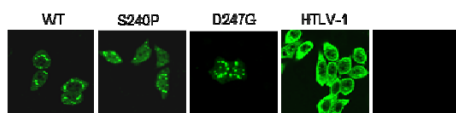
はじめに、高活性型 BLV 転写活性化遺伝子 *tax* (*TAX D247G*) を HeLa 細胞に導入した。



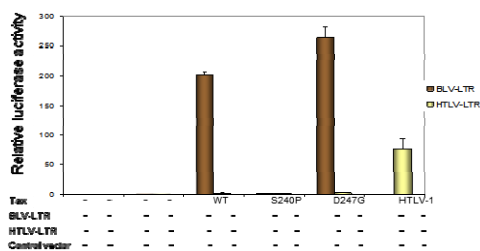
その発現を Flag-tag を用いて確認した。



続いて、*Tax* 蛋白質の局在を確認したところ、野生型、高活性型、低活性型いずれも同じ局在を示した。

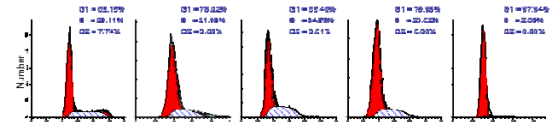


続いて Luc assay により、Wild type より *Tax D247G* が高い転写活性化能を有する事を確認した。

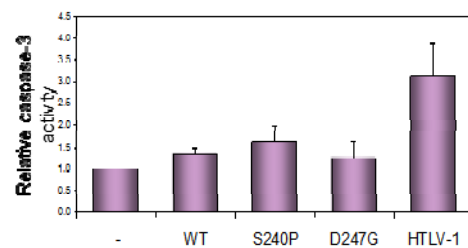


また、*Tax* は細胞を G1 期で停止する事が知られているため、高活性型および低活性型の G1 期停止能を調べたところ、高活性型、低

活性型ともに、野生型と同程度の G1 期停止能を有する事が明らかとなった。



*Tax* 蛋白質は高いアポトーシス活性を有することが知られており、安定発現株に困難が伴うことが予想された。そこで、*Tax* 遺伝子のアポトーシス能を Caspase-3 の測定により検出したところ、高活性型 *D247G Tax* は野生型と同程度のアポトーシス誘導能を有していることがわかった。

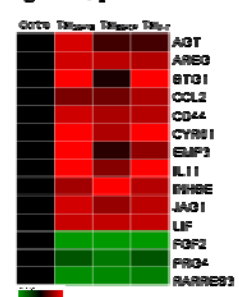


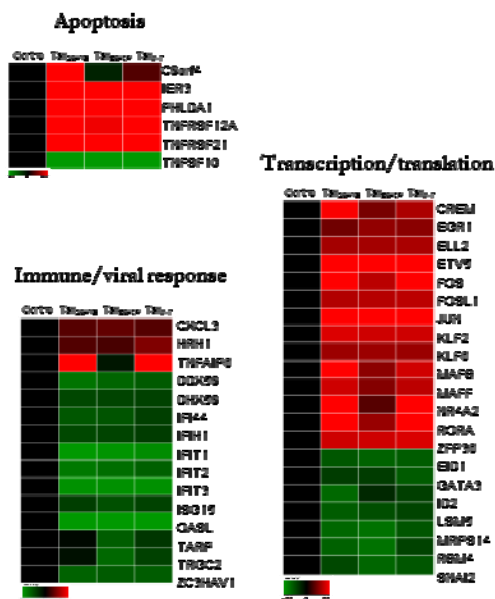
次に、BLV *Tax* による遺伝子発現解析を網羅的に行った。当研究室の先行研究において見出された、BLV LTR に対して野性型より高い転写活性化を有する *D247G* 変異型、転写活性化能を消失した *S240P* 変異型および野性型 *Tax* を組み込んだ発現ベクターを構築して、これらの *Tax* によって発現が変化する宿主因子をマイクロアレイにより比較した。発現が 2 倍以上変化する遺伝子として、野性型で 122 個、*S240P* で 118 個、*D247G* で 139 個の遺伝子を同定した。発現上昇遺伝子には、転写活性化、細胞増殖、細胞周期制御、細胞輸送、リン酸化、アポトーシスおよびストレス機能に関連する遺伝子が含まれていた。また、これらの遺伝子は、*S240P* に比較して、*D247G* および野性型 *Tax* による誘導されたものが多かった。一方、発現低下遺伝子には、免疫応答に関連する遺伝子が最も多く、*D247G* および野性型ではなく *S240P* により誘導されたものが多かった。

### Signal transduction

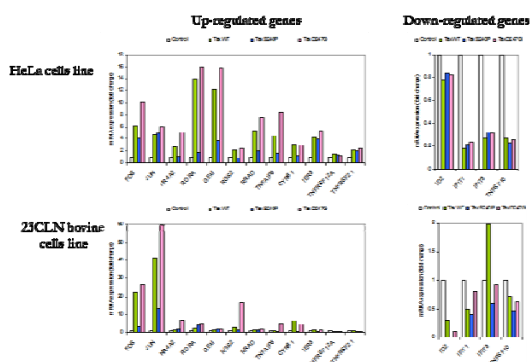


### Cell growth/proliferation





マイクロアレイ解析により得られた結果の再現性を HeLa 細胞とウシ 23CLN 細胞で確認した。発現が上昇した遺伝子として転写活性化に関与する FOS、JUN、NR4A2、RORA、GEM、RGS2 および RRAD、免疫応答に関与する TNFAIP6、細胞増殖に関与する CYR61、およびアポトーシスに関与する IER3、TNFRSF12A および TNFRSF21 を、発現が低下した遺伝子として転写活性化に関与する ID2、インターフェロン関連遺伝子 IFIT1、IFIT3 および OASL、アポトーシス関連遺伝子である TNFSF10 を選択し、リアルタイム PCR およびウエスタンブロット解析を行ったところ、ヒトおよびウシ細胞の両者においてほぼ良好な再現性が確認された。



これらの結果により Tax の安定発現株の基盤となる情報をえることができた。本情報に基づき、高活性型 Tax 安定発現株を作成することにより、高感度感染性 BLV 検出のための有用な細胞株が作成可能となった。

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 6 件)

- ① Takeshima SN, Panei CJ, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H, Matoba K, Aida Y: **Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR.** *BMC veterinary research* 2013, **9**:95. (査読あり)
- ② Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsuhashi T, Sentsui H, Aida Y: **Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle.** *Tissue Antigens* 2013, **81**(2):72-82. (査読あり)
- ③ Giovambattista G, Takeshima SN, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LA, Saito H, Onuma M, Aida Y: **Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds.** *Gene* 2013, **519**(1):150-158. (査読あり)
- ④ Miyasaka T, Takeshima SN, 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* 2012, **95**(1):420-431. (査読あり)
- ⑤ Jimba M, Takeshima SN, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsuhashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y: **BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status.** *BMC veterinary research* 2012, **8**(1):167. (査読あり)
- ⑥ Baltian LR, Ripoli MV, Sanfilippo S, Takeshima SN, Aida Y, Giovambattista G: **Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina.** *Mol Biol Rep* 2012, **39**(7):7215-7220. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 竹嶋ら、南米大陸におけるウシ MHC クラス IIDRB3 遺伝子の頻度調査、日本動物遺伝育種学会第 13 回大会、2012/10/6-10/7、仙台市
- ② 竹嶋ら、フィリピン固有品種におけるウシ MHC クラス IIDRB3 およびミトコンドリア DNA D-loop 領域の解析、第 21 回日本組織適合性学会大会、2012/9/15-9/17、千代田区

- ③ 宮坂ら、牛白血病ウイルス (BLV) プロウウイルスロードと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、2012/9/15-9/17、千代田区
- ④ 小原ら、牛白血病ウイルス感染牛における乳汁中ウイルス遺伝子の検出、第154回日本獣医学会学術集会、2012/9/14-9/16、盛岡
- ⑤ 竹嶋ら、「招待講演」 *in silico* およびナノ粒子を用いた新しい牛白血病ワクチン開発、動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会、2012/9/14、盛岡市
- ⑥ Shin-nosuke Takeshima, Jiyun Kim, Kyoji Hagiwara, Yuki Matsumoto, Takashi Ohmori, Tetsuo Nunoya, Kazuhiro Matoba, and Yoko Aida, Novel Th epitope of bovine leukemia virus detected in disease susceptibility cattle determined by BoLA-DRB3 allele. 33rd Conference of the International Society for Animal Genetics, 2012/7/15-7/20, Carins, Australia

[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]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹嶋 伸之輔 (TAKESHIMA SHIN-NOSUKE)  
独立行政法人理化学研究所・分子ウイルス学  
特別研究ユニット・基幹研究所研究員  
研究者番号：60342812

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし