

論文の内容の要旨

氏名：木庭 隼達

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：ネコ TRIM 遺伝子の性状解析と抗レトロウイルス活性の検討

レトロウイルス感染症はヒトや家畜に広く流行し、医学や獣医学領域において古くから問題となっている。哺乳動物が普遍的にもつ抗レトロウイルス因子について解明することは、1) 防御因子の増強を図る戦略、2) 防御因子に競合するウイルス因子を阻害する戦略などによる新たな治療薬の開発につながると考えられる。近年、多くの抗レトロウイルス因子が同定されており、その1つとして TRIM タンパクが注目されている。

TRIM タンパクは N 末端側に RBCC モチーフと称される 3 つのドメインを有し、ヒトやマウスにおいて 70 種類以上が同定されているファミリー分子である。保存性の高い RBCC モチーフに対して C 末端のドメインは多様性に富んでおり、その種類によって 11 のクラスターに分類される。これらは細胞増殖や分化、アポトーシスなどの生体維持に関与している。また、多くの TRIM がインターフェロン (IFN) 応答性を有し、ウイルス感染を制御する抵抗性因子としても注目されている。特に HIV をはじめとするレトロウイルスの複製制御には、複数の TRIM が深く関連する。ヒトやマウスではこれら TRIM を中心としたレトロウイルス感染症の病態解明に向けた研究が盛んに行われている。

一方、レトロウイルス感染症のモデル動物として使用されているネコ科動物では、多くの TRIM 遺伝子が同定されておらず、ネコ TRIM タンパクのレトロウイルス感染制御機構には不明な点が多い。そこで本研究では、ネコにおける TRIM 遺伝子の同定と性状解析を行うとともに、抗レトロウイルス活性とそのメカニズムの一端を解明した。

1. ネコ TRIM 遺伝子の発現解析

過去に同定されたネコ TRIM 遺伝子は 1 因子のみである。そこで、ヒトおよびマウスにおいて IFN 応答性や抗ウイルス作用を示す 8 因子 (TRIM8, 19, 20, 21, 25, 32, 38, 62) を選択し、ネコにおけるホモログ遺伝子の単離と IFN 応答性の検討を行なった。

ネコ株化細胞由来の cDNA を鋳型として RT-PCR およびダイレクトシーケンスを行い、部分配列を決定した。得られた部分配列からプライマーを設計し、幼ネコおよび成ネコの臓器 (肝臓・脾臓・腎臓・心臓・リンパ節・胸腺) 由来の cDNA を鋳型として半定量 PCR により組織発現解析を行なった。その結果、免疫系のみならず広範な組織において多くの TRIM の発現が認められた。各 TRIM の発現の程度は低いものから高いものまで組織によって様々であった。続いて、IFN 応答性を検討するために、4 種のネコ由来株化細胞 (CRFK, Fcwf-4, Fet-J, FL74) を I 型 IFN 存在下で一定時間培養し、リアルタイム PCR による定量解析を行なった。IFN 刺激により複数の TRIM 遺伝子の発現が誘導され、特に TRIM19, 21, 25 はすべての細胞株で高い発現の誘導が認められた。TRIM38 は CRFK, Fet-J, FL74 において発現の上昇を示したが、Fcwf-4 では発現の変化は認められなかった。TRIM5 は FL74 のみで発現の上昇を示した。

生体内の多様な臓器において TRIM mRNA が発現していることや IFN 応答性を有することから、ネコ TRIM 遺伝子は他の動物種のホモログと同様の発現動態を示すことが推察された。

2. ネコ TRIM タンパクの性状解析

前章で部分配列を決定した TRIM 遺伝子のうち TRIM21, 25, 32, 38, 62 の 5 因子を選出し、これらのタンパク翻訳領域 (CDS) 全長を決定した。前述の方法により部分配列決定を行い、CDS 末端領域の決定には RACE 法を用いた。

決定した推定アミノ酸配列のドメイン構造検索を行ったところ、いずれも RBCC モチーフや C 末端のドメインが高度に保存されていた。また、同定したネコ TRIM タンパクの RING ドメインには、ユビキチンリガーゼとして機能する上で重要な規則性をもったシステインリッチ配列 (C3HC4) を有していた。系統樹解析

と相同性解析の結果、多くのネコ TRIM タンパクが他の動物種のアミノ酸残基が欠失しており、他の動物種のアミノ酸残基と比較して30アミノ酸ほど短いことが明らかとなった。

次に、これら5つのTRIMのタンパク発現ベクターを構築し、細胞内局在解析を行った。CRFK細胞にTRIM発現ベクターを導入し、24時間後に免疫組織化学染色を行った。その結果、全てのTRIMタンパクは他の動物種のアミノ酸残基と同様に細胞質に局在することが明らかとなった。

以上のことから、ネコ TRIM タンパクは他の動物種のアミノ酸残基に相当する性状を備えていることが示された。

3. 抗レトロウイルス活性の検討

研究2で同定したネコ TRIM タンパクの抗レトロウイルス活性について検討した。HEK293T細胞にTRIM発現ベクターとネコ白血病ウイルス (FeLV) 感染性クローンを共導入した。導入から48時間後に培養液を回収し、RNA抽出とcDNAの合成を行い、リアルタイムPCRによりウイルス産生量を解析した。その結果、TRIM21, 32, 38, 62ではウイルス産生量の低下が認められなかったのに対し、TRIM25はウイルス産生量を有意に低下させた。この抗ウイルス作用はTRIM25の量依存的に認められ、ウイルス産生量は約1/10にまで減少した。

次に、TRIM25による抑制作用がウイルス複製のどの過程に関与するかを明らかにするために、FeLVプロモーター (LTR) の活性、細胞内ウイルスRNA量、細胞内ウイルスタンパク量について解析した。プロモーター活性は、HEK293T細胞にTRIM25発現ベクターとLTRルシフェラーゼベクターを共導入し、導入から24時間後にルシフェラーゼアッセイを行うことで測定した。細胞内ウイルスRNA量の測定と細胞内ウイルスタンパクの検出は、TRIM25とFeLV感染性クローンを共導入したHEK293T細胞からcDNAと細胞抽出液を得た後、リアルタイムPCRおよびWestern blotにより行った。Western blotではEnvおよびGagタンパクであるgp80とp27を検出した。その結果、LTRの活性に変化は認められなかったのに対し、細胞内のウイルスRNA量とウイルスタンパク量は減少した。ウイルスRNAの減少がTRIM25の量非依存的であったのに対し、ウイルスタンパクの減少は量依存的に認められ、特にp27において顕著であった。

前述のように、ネコ TRIM25はFeLVの複製を抑制した。TRIMタンパクの抗ウイルス作用にはRINGドメインのユビキチンリガーゼ活性が重要と考えられているが、マウス白血病ウイルスに対するTRIM25の抗ウイルス活性はユビキチン非依存的であることが報告されている。そこで、ネコ TRIM25の抗FeLV作用におけるユビキチン依存性を検討するために、RINGドメインを欠損させたネコ TRIM25 (ΔR) を作製し、FeLV複製に対する効果を調べた。その結果、 ΔR はWild Typeと同程度の抗ウイルス活性を示し、ウイルス産生量は約1/10に減少した。細胞内のウイルスタンパク量は ΔR の量依存的に減少し、Wild typeと同様にp27において顕著であった。細胞内のウイルスRNA量は ΔR を20 ng/wellで導入した場合はWild Typeと同程度の減少を示したが、100 ng/wellで導入した場合は有意な変化は認められなかった。以上の結果から、TRIM25による抗FeLV活性はウイルスRNAやEnvおよびGagタンパクの減少に関与し、ユビキチン非依的に機能していることが示唆された。

これまでの報告から、TRIMによる抗レトロウイルス作用には炎症性シグナルの誘導が重要と考えられ、活性化される転写因子としてAP-1およびNF κ Bが知られている。そこでネコ TRIM25も同様の機能を示すことを考え、これら転写因子の活性化について検討を試みた。AP-1およびNF κ Bのレポーターベクターを使用してルシフェラーゼアッセイを行った結果、ネコ TRIM25はAP-1活性を1.5倍、NF κ B活性を1.2倍上昇させた。これらの転写活性の誘導は微弱であることから、TRIM25による抗レトロウイルス活性には、AP-1・NF κ B非依存的な機構が存在することが推察される。

総括

本研究はネコ TRIM 遺伝子の組織発現と IFN 応答性、タンパク一次構造、細胞内局在、抗レトロウイルス活性について解析した。単離したネコ TRIM 遺伝子は様々な組織において発現し、そのうち複数が IFN 応答性を有することが明らかとなった。また、同定した因子にはすべて TRIM タンパクに認められる特徴的なドメインが保存され、これらはすべて細胞質に局在することが明らかとなった。さらに、TRIM25 が抗 FeLV 活性を有することを示し、その機序としてユビキチン非依的にウイルス RNA やウイルスタンパクの減少

に關与する可能性が示唆された。ヒトやマウスの TRIM25 が持つ抗レトロウイルス活性は、本研究で対象にしたネコにおいても保存されていたことから、TRIM25 は哺乳類に普遍的に存在する宿主防御因子である可能性が高いと考えられる。