

論文審査の結果の要旨

氏名：木庭 胤 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

審査委員：（主査） 教授 泉 對 博

（副査） 教授 花 澤 重 正 教授 遠 矢 幸 伸

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) 宿主側の防御因子を増強する手法や、2) 防御因子に競合するウイルス因子を阻害する手法の開発につながり、最終的にはレトロウイルス感染症の治療薬開発が期待できる。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。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解明を試みた。

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シングを行い、TRIM遺伝子と推測される個所の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により各TRIMの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と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とのホモログと高い相同性を示したが、ネコ TRIM25 は Coiled-coil ドメインと PRY-SPRY ドメインの間のアミノ酸残基が欠失しており、他の動物種のホモログと比較して 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ホモログと同様に細胞質に局在することが明らかとなった。

以上の結果、ネコ TRIM タンパクは他の動物種のホモログ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、ユビキチン非依存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。

上記した様に、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、そのうち複数種が 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存的にウイルス RNA やウイルスタンパクの減少に関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を示した。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 26年 1月 23日