

論文審査の結果の要旨

氏名：蜂屋 佑磨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：牛白血病ウイルスの宿主由来因子による転写活性化機能に関する研究

審査委員：（主査） 教授 泉對 博

（副査） 教授 遠矢 幸伸

教授 伊藤 琢也

地方病性牛白血病（**Enzootic bovine leukosis : EBL**）は、レトロウイルス科デルタレトロウイルス属に分類される牛白血病ウイルス（**Bovine leukemia virus : BLV**）によって起こるB細胞の腫瘍である。BLVは他のレトロウイルスと同様に、ゲノムの両末端に末端反復配列（**Long terminal repeat : LTR**）を持ち、宿主ゲノムにプロウイルスとして組み込まれる。BLVが持つTaxタンパクによる転写活性化因子の働きや、宿主細胞のがん原遺伝子近傍にBLVゲノムが挿入されることによる転写活性化などにより、細胞の形質転換が生じ、腫瘍化することが示唆されている。宿主側の転写活性化因子が関与することも考えられているが、EBLの発症機序は未だ不明な点が多い。

哺乳類の細胞は様々なタンパク質と相互作用を行う熱ショックタンパク（**Heat shock protein : HSP**）を持つ。HSPは変性したタンパク質の修復や正常な折り畳み構造の維持に重要な役割を担っているが、一方で細胞内タンパク質の安定化やアポトーシスの回避によるがん細胞の保護機能や、ウイルス由来タンパク質との相互作用が報告されている。HSP遺伝子の上流に位置するプロモーター領域には**Heat shock element (HSE)**と呼ばれる塩基配列が存在する。これらのHSEに特定の**Heat shock factor1 (HSF1)**が結合することでHSP遺伝子の転写が開始される。そこで、本研究ではEBLにおけるHSPの関与を解析するために、EBL発症牛におけるHSP遺伝子の発現解析を行った。また、HSF1によるBLVの転写活性化の機序を解析し、ウイルス由来タンパク質と相互作用するHSPの特定を試みた。

また、牛フォーミーウイルス(**Bovine Foamy Virus : BFV**)はBLVと同じくレトロウイルス科のウイルスである。BFVはBLVと同様にシンシチウム形成能を持ち、シンシチウム形成能を利用したBLV検査の障害や誤診の原因になる可能性がある。そこで、本研究によって本邦で初めて分離したBFVを使用し、BFVがBLVのLTRの転写活性化を起こす可能性を解析した。

研究1. EBL牛の腫瘍組織におけるHSP遺伝子発現解析

HSPは細胞が高温暴露や放射線照射などによる細胞障害を受けた際に誘導されるタンパク質の総称であり、その分子量ごとにHSP90、HSP70、HSP27などと呼称される。人のHSP90は、BLVの近縁ウイルスである人T細胞性白血病ウイルス（**Human T-cell leukemia virus-1 : HTLV-1**）が発現するTaxの核内移行を制御するとの報告がある。更に、アデノウイルスでは宿主細胞のHSP70を発現誘導することや、熱刺激によって**c-fos**、**c-jun**といったがん原遺伝子の転写活性が上昇することが明らかにされており、HSPのウイルスやがん遺伝子への関与についての重要性が認識されつつある。

本研究では、関東地方の食肉検査所でEBLと病理診断された牛の腫瘍組織8検体からtotal RNAを抽出し、相補DNA合成を行い、**Real-timePCR (SYBR-Green法)**にてHSP遺伝子発現解析を行った。対象としたHSP遺伝子はHSP70、HSC70、HSP60、HSP90と、それらの転写促進因子であるHSF1である。内部標準にはGAPDHを使用し、補正した値を非発症牛の組織と比較して各HSP遺伝子の相対発現量を調べた。

その結果、発症牛における各HSP遺伝子の発現量はいずれも高値を示し、特にHSF1の発現量が高いことが明らかになった。

研究2. BLV-LTRにおけるHSE配列の同定

BLVはLTRのU3領域内に様々な転写活性を促進する領域を含んでいる。代表的なものにTaxが反応するTax応答領域 (Tax response element : TxRE) 領域がある。BLVにおいてはLTR領域がプロモーターとして、下流に存在するウイルス遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしている。またHSEは<nGAAn>の2回以上の繰り返し配列からなり、HSP遺伝子上流に多数存在している。人免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus-1 : HIV-1) のLTR領域にはHSE配列が存在し、宿主由来の転写活性因子であるHSF1によって転写制御されることが報告されている。

本研究においては、EBL腫瘍組織18検体よりDNA抽出を行い、5'側LTRをnested PCRで増幅し、BLV-LTR領域のシーケンスを行い、BLV-LTR配列中に含まれるHSE配列の解析を行った。その結果、5'側より126~135番目に繰り返し配列である<tTcccGAAa>という10塩基のHSE配列が確認され、それらの配列は今回調査した18検体すべてにおいて保存されていた。この配列はTxREなどの既存の転写活性領域とは異なる位置に存在していたことから、HSF1と結合しプロモーターとして機能することが予想された。

研究3. 宿主由来HSF1によるBLV-LTR転写活性機能解析

牛のHSF1は525アミノ酸残基からなり、恒常的に発現している。不活性型は単量体で、HSP70やHSP90を始めとするHSPと結合しているが、細胞内に変性したタンパク質が生じるとHSPから離れ、3量体を形成して活性型となる。活性型のHSF1は、DNA結合領域を介してHSEと結合することで、下流の遺伝子を活性化させる。本研究においては、研究2において確認したBLV-LTR中のHSEに対して、牛のHSF1が転写活性化能を有するかをルシフェラーゼアッセイにより検討した。研究1で高率な発現が確認されたHSF1遺伝子のクローニングを行い、HSF1発現ベクターを作製した。HSE配列を含んだLTR領域は、BLVが持続感染している羊胎児腎由来株化細胞 (FLK-BLV細胞) よりクローニングし、pGL3-Basicのルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込むことでLTRレポーターベクターを作製した。同様にFLK-BLV細胞のBLVからTax遺伝子をクローニングし発現ベクターを作製した。作製したベクターを猫腎由来株化細胞 (CC81細胞) にLipofectamineLTXを用いて導入した。その結果、HSF1導入細胞においてルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。Taxを導入した際と比較するとその強度は1/10以下ではあるが、導入プラスミド濃度依存적であり、LTR転写活性化はHSF1によることが示唆された。HSF1がHSEと反応したことを確認するために、HSF1-DBD欠損ベクター、HSE欠損レポーターベクター、HSE塩基配列をランダム生成し、その順番を変えたHSE-Junkレポーターベクターを作製し、同様のレポーターアッセイを行った。すると、いずれにおいてもHSF1による転写活性の著しい減少が認められた。以上のことから、牛HSF1はHSEを介してBLV-LTRの転写活性を上昇させることが強く示された。

研究4. HSP-Tax相互作用機能解析

シグナル経路においてHSPはHSF1の下流に位置し、常に相互作用をすることでその発現や転写活性が調整されている。本研究においては、TaxとHSPの相互作用によるウイルス転写活性の変化を明らかにするために、Tax発現状態におけるレポーターアッセイを行った。

EBL組織からHSP70遺伝子およびHSP90遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作製した。LTRレポーターベクターとTax発現ベクターは研究3と同様のものを使用し、CC81細胞におけるLTR活性の変化を測定した。その結果、HSP70またはHSP90を単独で導入した際にはLTRの転写活性化は認められなかったが、Taxと共発現した際にHSP90でその転写活性が上昇する傾向が見られた。一方、HSP70とTaxではその転写活性はTax単独と比較して抑制される傾向が認められた。この傾向はTaxの代わりにHSF1との共発現を試みた際にも認められた。これらのことから、HSP70はTaxやHSF1によるLTR転写活性を抑えるように働き、逆にHSP90はその転写活性を間接的に高める働きをすることが示唆された。

研究5. 牛レトロウイルスの分離とLuSIA法による性状解析

牛末梢血からの牛白血病ウイルスの分離や、ウイルス感染効率を調べる際にはシンシチウムアッセイ (Syncytia inhibition assay : SIA) が一般的である。しかし、シンシチウムはBLV非感染細胞でも形成されることがあり、他のシンシチウム形成ウイルスとの鑑別も重要である。BLVと同じレトロウイルスであり、シンシチウム形成能をもつBFVは、わが国において分離されておらず、そのウイルス感染状況についても不明であった。近年SIAの改良法として、Luminescence syncytium infectivity assay (LuSIA) 法が報告された。これはBLV-LTRのU3領域をプロモーターとして、その下流に緑色蛍光タンパク (Green fluorescent protein : GFP) 遺伝子の改変型のEnhanced GFP (EGFP) を持つCC81-BLU3G細胞を使用した方法である。CC81-BLU3G細胞にBLVが感染し、Taxが発現すると下流のEGFPが発現することを利用した、旧来のSIAとは異なるBLV特異的なシンシチウムを検出する方法である。本研究においては、未だ不明な点の多いシンシチウム形成ウイルスであるBFVの分離を試み、LuSIA法を用いてBFVがBLVのLTR転写活性機能を持つか、ウイルス性状解析を行った。

臨床症状からは異常の認められない牛の末梢白血球を牛胎児筋肉由来細胞 (Bovine fetal muscle : BFM) 細胞と共培養していたところ、細胞の空胞化を伴うシンシチウムを形成するウイルスが分離された。分離ウイルスは電子顕微鏡観察と遺伝子解析を元にBFVであると同定した。分離されたBFVを感染させたBFM-BFV細胞をCC81-BLU3G細胞と4日間共培養し、シンシチウム形成能とEGFPの発現を観察した。BFM-BFV細胞との共培養ではシンシチウム形成は確認されたが、EGFPの発現は認められなかった。一方で、FLK-BLV細胞とCC81-BLU3G細胞との共培養ではシンシチウムの形成とEGFPの発現が認められ、ウイルス感染によるLTRの転写活性化が生じていることが示された。

本研究により、未解明であったEBL発症牛における熱ショックタンパク (HSP) 関連遺伝子を明らかにし、宿主由来のタンパク質であるHSF1によってBLV-LTR転写活性を促進することを明らかにした。宿主由来のタンパク質を利用した複製機構はウイルスの持つ宿主免疫回避機構の一端であるとも考えられる。HSF1やHSPによるBLV-LTR転写活性の変化はEBLの病態進行における新たな知見であり、BLVのみならず他のウイルスにおいてもHSPと発症の関連性を明らかにする上で貢献して行くと考えられる。

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 31年 2月 21日