

# 牛白血病ウイルスの宿主由来因子による 転写活性機能に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

蜂屋佑磨

2018

## 目次

第1章 緒論-----	1
第2章 EBL 発症牛の腫瘍組織における HSP 遺伝子発現解析-----	4
2.1 序論-----	5
2.2 材料および方法-----	7
2.2.1 サンプルおよび total RNA 抽出と cDNA 合成	
2.2.2 Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)	
2.3 結果-----	9
2.3.1 各 HSP 遺伝子の mRNA 発現量	
2.4 考察-----	10
第3章 BLV-LTR における HSE 配列の同定-----	14
3.1 序論 -----	15
3.2 材料および方法-----	17
3.2.1 サンプルおよび DNA 抽出	
3.2.2 Nested PCR	
3.2.3 ダイレクトシーケンス法と塩基配列解析	

3.3 結果-----	19
3.3.1 BLV-LTR における HSE 配列の決定	
3.3.2 BLV-LTR における塩基配列解析	
3.4 考察-----	21
第4章 牛由来 HSF1 による BLV-LTR の転写活性機能解析-----	24
4.1 序論-----	25
4.2 材料および方法-----	26
4.2.1 株化細胞と細胞培養	
4.2.2 遺伝子クローニングと発現ベクターの作製	
4.2.3 Luciferase レポーターベクターの作製	
4.2.4 Luciferase reporter assay	
4.3 結果-----	30
4.3.1 HSF1 導入濃度による LTR 転写活性の変化	
4.3.2 HSF1- $\Delta$ DBD における LTR 転写活性の変化	
4.3.3 $\Delta$ HSE レポーターベクターにおける LTR 転写活性の変化	

4.3.4 HSE 変異体レポーターベクターによる LTR 転写活性の変化	
4.4 考察	33
第 5 章 Tax-HSP の相互作用機能解析	42
5.1 序論	43
5.2 材料および方法	44
5.2.1 株化細胞および細胞培養	
5.2.2 HSP70、HSP90 遺伝子クローニングと発現ベクターの作製	
5.2.3 Luciferase reporter assay	
5.3 結果	45
5.3.1 Tax-HSP 相互作用における LTR 転写活性の変化	
5.3.2 HSF1 および Tax 発現時における HSP の機能解析	
5.4 考察	46
第 6 章 牛フォーミーウイルスの分離と LuSIA 法による性状解析	50
6.1 序論	51
6.2 材料および方法	53

6.2.1 株化細胞および細胞培養	
6.2.2 血液サンプルとウイルス分離	
6.2.3 光学顕微鏡および電子顕微鏡による細胞観察	
6.2.4 DNA 抽出と nested-PCR	
6.2.5 ダイレクトシーケンスによる塩基配列解析	
6.2.6 LuSIA 法	
6.3 結果	57
6.3.1 分離ウイルスの形態観察	
6.3.2 分離ウイルスの同定ならびに分子系統解析	
6.3.3 LuSIA 法によるウイルス性状解析	
6.4 考察	59
第 7 章 総括	68
謝辞	73
引用文献	74

# 第 1 章

## 緒論

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 感染牛の多くは無症状であるが、約 30%の牛は持続性リンパ球増多症(persistent lymphocytosis)を呈し、感染牛のうち数%のみが白血病やリンパ腫を発症する EBL 牛となる(14)。

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(11、19、20)。BLV はがん原遺伝子を持たず、BLV の感染による EBL 発症機序は未だ不明な点が多い。BLV がもつ Tax 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(61、62)。一方で、宿主免疫や宿主遺伝子、転写活性機能を持つそのほかの宿主由来因子などが腫瘍の発生やその存続に関与することも報告されている(31、34)。

哺乳類の細胞に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質(heat shock protein : HSP) がある。HSP は変性したタンパク質の修復や、正常な折りたた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(30)。HSP 遺伝子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

る塩基配列が存在し、これらの HSE に特定の heat shock factor 1 (HSF1)が結合することで下流の遺伝子の転写が開始される(44、52、64)。

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 遺伝子発現量の解析を行なった。また、BLV-LTR 中における HSE 配列の同定を試み、さらに HSF1 による転写活性機能や、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。さらに、BLV と同様にシンシチウム形成能を持つレトロウイルスである牛フォーミーウイルス(Bovine foamy virus : BFV)の分離を試み、BFV が BLV の LTR 転写活性化を起こす可能性を解析した。



## 第 2 章

### EBL 発症牛の腫瘍組織における HSP 遺伝子発現解析

## 2.1 序論

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、1962 年にショウジョウバエにおける熱ショック応答によって確認され、その後、原核生物から哺乳類まで類似した機能を持つタンパク質が同定された(48、49、54)。

HSP はその分子量ごとに HSP27、HSP70、HSP90 などと呼称されており、HSP は分子シャペロンとしてタンパク質を正しい立体構造に折りたたむことで、タンパク質機能を正常に維持する上で中心的な役割を担っている(9、12、13)。通常、非ストレス環境下では細胞における発現は認められないか、極めて低いレベルで制御されているが、熱や酸化ストレスなどの環境変化による刺激で発現誘導される。分子シャペロンとして機能する HSP は、変性したタンパク質やミスフォールドしたタンパク質の蓄積を防ぎ、強い細胞保護効果をもたらすとされている。しかしながら、正常細胞とは対照的に、ヒトにおけるがん細胞では HSP の構成的な高発現が報告されており、がんの発症や悪化に関与すると言われている(1、47、50)。HSP70 の作用として、アポトーシス促進タンパク質である Bax のミトコンドリアへの移行、アポトソームでのアポトーシスプロテアーゼ活性化因子 1(Apaf-1)やプロカスペアーゼ 9 などの多段階的なアポトーシス経路の抑制、がん抑制タンパク質 p53 による細胞老化の阻害などが報告されている(65)。さらに、Heat shock cognate (HSC) 70 は、HSP70 とよ

く似た構造を示しており、がん細胞で特異的にリソソーム膜に局在してリソソーム膜の安定化を介してオートファジー経路を活性化することで、がん細胞の生存にとって有利に働くと考えられている(33)。HSP90 は、BLV の近縁ウイルスである T 細胞性白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus-1) が発現する Tax と結合してプロテアソーム系から回避することで、核内への Tax の移行を促進するとの報告がある(32)。さらにアデノウイルスでは宿主細胞の HSP70 発現を誘導することが報告され、HSP のウイルスやがん遺伝子に対する作用の重要性が認識されつつある(55)。

牛白血病に関しては、BLV 感染牛では非感染牛と比較して HSP70 が高発現しているとの報告や(58)、BLV-LTR を活性化する変異型 Tax によってストレス関連遺伝子が高発現していることがマイクロアレイによって判明している(6、56)。しかしながら、牛白血病における BLV と HSP との発病の関連性の全容については未解明である。そこで本研究では、関東地方の食肉衛生検査所で EBL と病理診断された牛の腫瘍組織から total RNA を抽出し、HSP の遺伝子発現量を測定し、健康牛と比較した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 サンプルおよび total RNA 抽出と cDNA 合成

関東地方の食肉衛生検査所から提供された牛白血病の腫瘍組織 8 検体および正常牛のリンパ節組織 2 検体を約 10mg 使用し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて指示書に従い total RNA 抽出を行った。RNA の総量を 1  $\mu$ g に調整し、PrimeScript 1st strand cDNA synthesis Kit (Takara Bio) を使用して、逆転写反応を行った。

### 2.2.2 Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR は Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム(Thermo Fisher Scientific)を用いた。*HSP70*、*HSC70*、*HSP60*、*HSP90*、*HSF1* をターゲットとし、内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(*GAPDH*)を測定した。使用したプライマーセットは表 2-1 に示した。qRT-PCR は 2.2.1 で抽出し作製した cDNA を鋳型とし、95 度の熱反応で活性化するポリメラーゼを含んだ SYBR Green Supermix (Bio Rad Laboratories)を用いた。反応条件は、95 度で 2 分の熱処理後、95 度で 30 秒間の熱変性、58 度で 30 秒のアニーリング、および 72 度で 30 秒間の伸長反応の工程を 1 サイクルとし、45 サイクルまで行った。全ての反応が終わった後に、それぞれの特異性を評価するために

融解曲線を作成するプログラムを追加した。qRT-PCR で得られた Ct 値を、 $\Delta\Delta\text{CT}$  法に基づいて *GAPDH* の発現量との比で標準化し、各 HSP 関連遺伝子の相対発現量を算出した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 各 HSP 遺伝子の mRNA 発現量

各遺伝子発現量は *GAPDH* によって補正をした。正常牛と比較して、EBL 発症牛の HSP70 の相対遺伝子発現量は 2.89 倍( $p<0.05$ )、HSC70 は 3.38 倍( $p<0.02$ )、HSP60 は 15.0 倍( $p<0.02$ )、HSP90 は 2.8 倍( $p<0.05$ )となり、いずれも有意に発現量が上昇していた。HSF1 については正常牛よりも 456.4 倍( $p<0.02$ )と特に高い相対発現が確認された(図 2-1)。

## 2.4 考察

本研究において EBL 発症牛における HSP 関連遺伝子発現量を実測したところ、*HSP70*、*HSC70*、*HSP60*、*HSP90* はいずれも有意な発現上昇が認められた。また、*HSF1* の相対発現量は正常牛と比較して特に高い値を示し、EBL 発症牛において重要な役割を持っていると考えられる。*HSF1* は HSE を介して HSP の発現を上昇させる働きを持っていることから、*HSF1* の発現上昇に伴って、活性化経路の下流に位置する *HSPs* の発現が上昇したことが推察される(45、52、62)。*HSP70* と *HSC70* は構成的に発現していることが知られており(21)、本研究においても、それぞれの相対発現量に大きな差は認められなかった。また、*HSP70* と *HSP90* に関しては個体差も大きく、正常牛と同程度の遺伝子発現量を示す EBL 発症牛もあった。

*HSF1* 遺伝子のノックアウトマウスにおいて、*p53* に変異があるにも関わらず、悪性リンパ腫が抑制され、細胞の形質転換が抑えられるとの報告があり、*HSF1* はがん細胞の発生に重要であることが示唆されている(51)。さらにヒトのがんにおいては *HSF1* や *HSP* が高発現しており、その発現量が予後や生存率に関連するとの報告がある(16、17、41)。本研究においては、非発症牛と発症牛で *HSF1* および *HSP* で一時点の発現量を比較しているのみであり、これらの因子が EBL 発症の起因となるかは未だ不明である。しかしながら、これら

HSP 関連遺伝子の発現量を指標として EBL の悪性度を評価できる可能性があり、今後は各病態ステージに沿った遺伝子の経時的な変化を調査する必要がある。



表 2-1 qRT-PCR で使用したプライマー

Target	Primer(5'-3')	Product size	Accession No.
<i>HSP70</i>	TCATCAACGACGGAGACAAGCCTA TTCATCTTGGTCAGCACCATCGAG	103	GU_183097.1
<i>HSC70</i>	CACCACCATGAAGGGCCAATGTTT CGGTGATGCAGCAAAGAACCAAGT	133	NM_174345.3
<i>HSP60</i>	ACTGGCTCCTCATCTCACTC GTTCAATAATCACTGTCCTTCC	148	NM_001166609.1
<i>HSP90</i>	GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC GTCCTTCTTCTCTTCCTCCTCTTC	190	NM_001012670.1
<i>HSF1</i>	ACATAAAGATTCGCCAGGAC GAGATGAGGAACTGGATGAG	198	GQ396661.1
<i>GAPDH</i>	GGGTCATCATCTCTGCACCT GGTCATAAGTCCCTCCACGA	218	NM_001034034.2

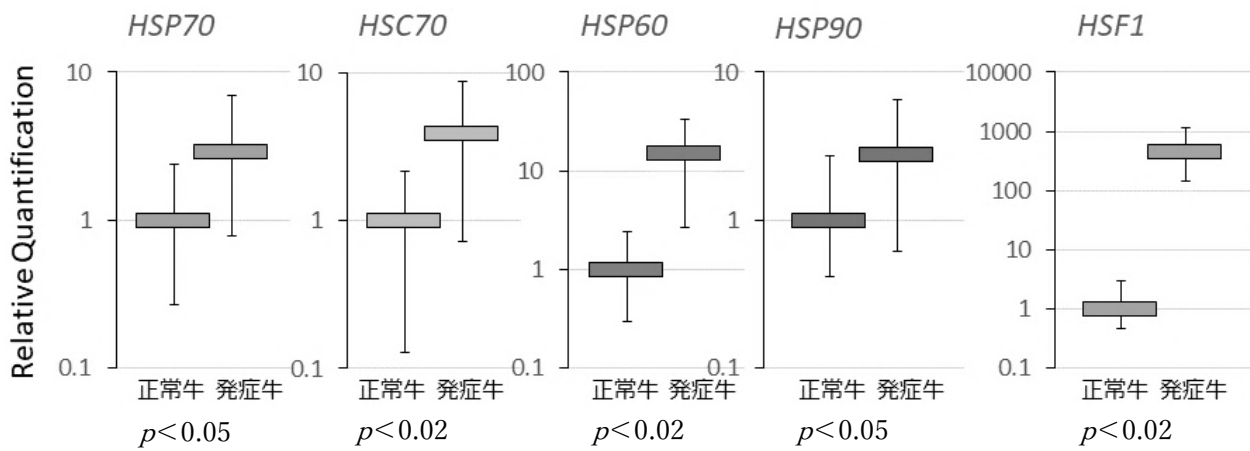


図 2-1 正常牛と発症牛における各 HSP 関連遺伝子の相対発現量の比較

各遺伝子は GAPDH により補正した。いずれの HSP 関連遺伝子も発症牛は正常牛と比較すると発現量は高い傾向にあり、特に HSF1 の遺伝子発現量は高値を示した。

## 第 3 章

### BLV-LTR における HSE 配列の同定

### 3.1 序論

レトロウイルスはゲノム両末端に long terminal repeat (LTR)領域をもち、LTR 領域はさらに U3、R、U5 の 3 領域より構成されている(19、20)。LTR は逆転写されたウイルス cDNA が宿主ゲノム中へプロウイルスとして組み込まれることを媒介する他、転写活性領域をもち、ウイルス遺伝子や下流の宿主遺伝子のプロモーターとして機能する(43)。BLV においては U3 領域内に様々な転写活性を促進する領域を含んでおり、代表的なものに Tax が反応する 21 塩基の Tax 応答領域(Tax response element : TxRE)があり、その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(59)。

HSE は<nGAAn>の 2 回以上の繰り返し配列からなり、HSP 遺伝子の上流に多数存在している(64)。現在では HSP 遺伝子のみならず、様々な遺伝子の上流にも HSE 配列が確認され、転写活性が調整されていることが明らかにされてきた(57)。ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus -1 : HIV-1)の LTR 領域には HSE 配列が存在することが明らかにされ、宿主の HSF1 によってその転写が制御されることが知られている (23、25、46)。

本研究においては、EBL 発症牛、BLV 感染非発症牛、ならびに BLV 持続感染株化細胞の BLV ゲノムにおける LTR 配列を解析し、LTR 中に HSE 配列の有無を確認するとともに、

特徴的な変異パターンの比較解析を行った。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 サンプルおよび DNA 抽出

関東の食肉衛生検査所から提供された 20 頭の牛から採取した 18 検体の腫瘍サンプル (No.1~18) および BLV 感染未発症牛白血球 (No.19、20)、さらに BLV 持続感染株化細胞 (BL2M3) (No.21) ならびに BLV 持続感染羊腎由来株化細胞 (FLK-BLV) (No.22) の合計 22 サンプルを用いた。なお、BL2M3 細胞は発症牛由来腫瘍化 B 細胞であり、BLV 非産生細胞株である。これらのサンプルから DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を用いて、DNA 抽出を行った。

### 3.2.2 Nested PCR

PCR に用いたプライマーは 5'側 LTR に設計した。使用したプライマーの詳細は表 3-1 に示した。1stPCR の鋳型には抽出した DNA を用いて、BLV-LTR F1 プライマーと R559 プライマーを用いた。PCR 反応条件は 95 度で 2 分間の熱処理後、95 度で 30 秒の熱変性、55 度で 30 秒のアニーリング、72 度で 30 秒の伸長反応の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。全てのサイクル終了後、72 度で 7 分間の最終伸長反応を行った。得られた反応溶液 1 $\mu$ l を鋳型に BLV-LTR F1 プライマーと R531 プライマーを用いて 2nd PCR を行った。

反応条件は 1st PCR と同条件で行った。得られた PCR 反応産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって目的の増幅断片長である 531bp の PCR 産物が得られていることを確認した。

### 3.2.3 ダイレクトシーケンス法と塩基配列解析

3.2.2 の nested PCR で得られた反応産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いてゲルから精製を行った。ダイレクトシーケンスは精製した PCR 産物を鋳型として、2nd PCR で用いたプライマーを使用し、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。

得られた塩基配列は GENETYX (Genetyx Ver.13)ソフトウェア上で Clustal W によってアライメントを行った。FLK-BLV(Accession No.EF600696)の LTR を元にして各検査材料中の BLV-LTR の塩基配列を比較解析した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 BLV-LTR における HSE 配列の決定

PCR の結果、調査した 22 検体全てで BLV LTR が増幅され、BLV プロウイルスの存在を確認した。FLK-BLV の LTR 領域について HSF1 のコンセンサス配列である HSE 配列を探索したところ、5'側から 126-136nt に 10 塩基の<gTTCccGAAa>からなる HSE 配列を同定した。この領域は LTR U3 領域に位置し、TxRE や GRE などの転写活性領域とは重複していないことが確認された。R 領域や U5 領域には HSE 配列は確認されなかった。

#### 3.3.2 BLV-LTR における塩基配列解析

HSE 配列を含めて、本研究で得た BLV-LTR を FLK-BLV の LTR 配列をもとに比較をしたところ、FLK-BLV を除いた 21 検体中 14 検体に少なくとも 1 塩基以上の一塩基多型 (SNPs)を確認した。7 検体については FLK-BLV の LTR 配列と一致していた。SNPs を確認したサンプルのうち U3 領域(1-211)に変異箇所を確認したものが 14 検体、R 領域(212-440)に変異箇所を認めたものが 5 検体、U5 領域(441-531)に変異を認めたものが 2 検体であった。U3 領域では、TxRE1 に変異が認められた検体は 2 検体、GRE に変異を認め



たものは1検体、TATA boxに変異を認められたものは4検体であった。それぞれのLTR転写活性に関与する領域におけるSNPsのタイプは、1つずつである特徴が認められた。これら転写活性に関わる領域以外の変異が認められたものは10検体で、SNPsは5タイプ存在した。本研究において同定したHSE配列については、塩基配列解析を行った22検体いずれでも変異は認められず、安定的に保存された領域であることが確認された(表3-2)。

### 3.4 考察

本研究では、EBL 発症牛由来腫瘍細胞、非発症牛由来白血球、および培養細胞中の BLV-LTR 配列について解析を行ったところ、LTR U3 領域内に HSF 1 のコンセンサス配列である HSE 配列(126-135nt)が同定された。126-135nt における塩基配列は発症牛や非発症のいずれのサンプルについても変異が認められず安定的に保存されており、この結果は他の LTR 配列に関する既報とも一致していることが確認された(43、66)。しかしながら、BLV-LTR における HSE 配列に関する報告は無く、Sp1/PU-1 の近傍や NF $\kappa$ -B 結合領域の一部としての報告のみであった(10、18)。HIV では、HSE を介して HSF1 による転写が制御されることが報告されている(45)。さらに潜伏感染している HIV-1 の再活性化において HSF1 が必要となることが明らかにされており(42)、レトロウイルスの病態後期や発症において、宿主側の機構である HSF1-HSE 反応系を利用したウイルス転写が行われている。BLV に関しても、HSE を介した HSF1 による転写活性の有無を明らかにする必要がある。

また、発症牛(No.1~18)、非発症牛(No.19、20)、BL2M3(No.21)においては BLV の変異パターンに特徴は確認されなかったことにより、発症—非発症を決定する LTR の特異的変異は確認できなかった。

表 3-1 LTR のプライマー配列

Target	Primer	Sequence (5'-3')
BLV-LTR	F1	TGTATGAAAGATCATGCCGA
	R531	TGTTTGCCGGTCTCTCCTGGC
	R559	GAGTTGTTAGGGTTCCGGG

表 3-2 検査材料中の BLV-LTR と FLK-BLV LTR の塩基配列の比較

Sample	U3 (1-211)					R (212-440)	U5 (441-531)
	TxRE1 (48-69)	HSE (126-135)	GRE (139-151)	TATA box (169-175)	Other		
1	-	-	-	T175C	-	-	-
2	-	-	-	-	A117C	-	-
3	-	-	-	T175C	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	C27A	A315G	T448C
6	-	-	-	-	-	-	-
7	G66A	-	-	-	A117C	-	-
8	-	-	-	T175C	A208G	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	C113G	A424G	-
11	-	-	-	-	A117C	-	C486T
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	A117C	-	-
15	C66A	-	-	-	A117C	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	G148A	-	-	C245T	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	T175C	-	-	-
20	-	-	-	-	A208G	A376G	-
21	-	-	-	-	C46A	A315G	-

No.1~18 は EBL 発症牛由来の腫瘍細胞、No.19 および 20 は BLV 感染非発症牛の末梢白血球、No.21 は BLV 持続感染株化細胞 BL2M3 を示す。No.22 である FLK-BLV(Accession No.EF600696)と比較して変異のあった箇所と塩基を示した。ハイフン(-)は FLK-BLV と同一配列を示す。

## 第 4 章

### 牛由来 HSF1 による BLV-LTR の転写活性機能解析

## 4.1 序論

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。HSF1 のドメイン構造は N 末端より DNA 結合領域(DNA binding domain : DBD)、ヘプタッドリピート A および B (Heptad repeat A/B : HR-A/B)、抑制ドメイン(Regulatory domain : RD)、ヘプタッドリピート C (Heptad repeat C : HR-C)と続き、C 末端はトランス活性ドメイン(Trans-activation domain : TAD)で構成されている(4)。HSF1 は活性型と不活性型の状態があり、不活性型は単量体で、HSP70 や HSP90 などの 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、3 量体を形成して活性型となる(4)。活性型の HSF1 は DBD を介して HSE と結合することで下流の遺伝子の転写促進を行う(4)。下流の HSP が転写促進されることで、再び HSP-HSF1 複合体を形成し負のフィードバックが働くことが知られている(2、51)。

本研究においては第 3 章で同定した BLV-LTR 中の HSE 配列に対して牛由来の HSF1 が転写活性機能を有するかをルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 株化細胞と細胞培養

CC81 細胞(猫腎由来株化細胞)は 5%牛胎子血清(FCS)および 0.3% tryptose phosphate broth (TPB)添加 Eagle's MEM で培養した。

### 4.2.2 遺伝子クローニングと発現ベクターの作成

臨床的に無症状である牛の白血球より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。その後 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis Kit (Takara)の指示に従い、cDNA を合成した。ここで得た cDNA を鋳型として表 4 -1 に示すプライマーを用いて PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara)を使用して HSF1 遺伝子を増幅し、さらに得られた PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を用いてゲル精製した。これを鋳型として PCR により開始コドンの直前には増幅配列である Kozak 配列 (GCCACC)を、終止コドンの前には Flag 配列を、さらに制限酵素配 *Not* I と *EcoR* I の認識配列を各末端に加えた配列を作製した。得られた PCR 産物は pCR2.1-TOPO ベクターへ TOPO-TA cloning Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて TA クローニングを行った。得られたプラスミドベクターを DH5α 大腸菌へ導入し、LD 培地で増殖し、目的の遺伝子が組み

込まれていたクローンのみを選別した。プラスミドは Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)で回収し、得られたプラスミドは *NotI* -*BamHI* で切断し、pIRESneo3 ベクターへサブクローニングし、これを HSF1 発現プラスミドベクター (pHSF1)とした。HSF1 が CC81 細胞で発現されていることは抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。HSF1 の DNA 結合領域欠損体である pHSF1- $\Delta$ DBD については pHSF1 ベクターを鋳型として、表 4-1 に示した HSF1- $\Delta$ DBD プライマーセットを用いて PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara)を使用して作製した。

Tax 発現ベクターは FLK-BLV から total RNA を抽出し、HSF1 クローニングと同様の手順によりクローニングを行い、これを Tax 発現ベクター(pTax)とした。使用したプライマーは表 4-1 に示した。反応条件は 98 度 10 秒の熱変性、52 度 15 秒のアニーリング、72 度 10 秒の伸長反応を 35 サイクル行った。

#### 4.2.3 Luciferase レポーターベクターの作製

FLK-BLV (Accession No.EF600696)の BLV-LTR 5'側の 531bp を第 3 章 3.2.1 と同様の手法の PCR によって増幅し、さらに制限酵素 *BamHI* と *NotI* 認識配列を両末端に添加した。得られた PCR 産物を制限酵素 *BamHI* -*NotI* で切断し、pGL3-Basic ベクター (Promega)へサブクローニングすることで BLV-LTR をプロモーターとしてもつ Firefly ル



シフェレースを発現するレポーターベクターを作製した。さらに表 4-2 に示したプライマーを用いて、LTR 中の HSE 配列(5'-tTTCccGAAa-3')を欠損した pΔHSE レポーターベクター、TxRE2 を欠損した pΔTxRE2 レポーターベクター、HSE の 10 塩基のうち 5'側の 5 塩基だけを使用した pΔHSE-half-5'(5'-tTTCc-3')、3'側を残した pΔHSE-half-3'(5'-cGAAa-3')、さらに塩基除去による転写活性の変化を考慮し、HSE 塩基配列の塩基組成を維持したままその順番を統計ソフト R を用いてランダムに変えた pHSE-junk を作製した。加えて、HSE 配列を重複して組込んだ pHSE-2repeat(5'- tTTCccGAAa tTTCccGAAa-3')、pHSE-3repeat(5'- tTTCccGAAa tTTCccGAAa tTTCccGAAa-3')を作製し、Luciferase reporter assay に使用した。

#### 4.2.4 Luciferase reporter assay

CC81 細胞を  $2 \times 10^4$  個/well の細胞濃度で 96 穴マルチプレートで培養し、培養 12 時間後に作製した HSF1 発現ベクターならびに Tax 発現ベクターと各 LTR レポーターを 100ng/well に調整し、Lipofectamine LTR with Plus Reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し co-transfection した。補正のために Renilla ルシフェレースを発現する pRL-TK ベクター(Promega)をコントロールとして導入し、Firefly、Renilla ルシフェレースの発光強度を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて Centro

LB960 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)によって測定した。

測定は、全ての条件で4回以上行っており、得られた Firefly の発光強度は Renilla で補正

し、LTR 転写活性強度として評価した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 HSF1 導入濃度による LTR 転写活性の変化

CC81 細胞に pHSF1 を 0ng、25ng、50ng、100ng/well ずつ導入し、濃度依存的な HSF1 導入による LTR 転写活性能を 12 時間後、24 時間後それぞれで測定した。pHSF1 導入後 12 時間には 100ng/well で有意な LTR 転写活性の上昇が認められ、24 時間後には濃度依存的な LTR 転写活性が認められた (図 4-1)。この結果を基準とし、各実験において 12 時間以降 24 時間以内で得られた値を LTR 転写活性の評価に使用した。

### 4.3.2 HSF1- $\Delta$ DBD における LTR 転写活性の変化

LTR 転写活性の上昇が HSF1 によるものであることを明らかにするため、HSF1 の DBD 領域を欠損させた pHSF1- $\Delta$ DBD による LTR 転写活性を測定したところ、HSF1 発現時と比較してその活性は有意に低下した ( $p < 0.02$ )。また、Tax 発現時における LTR 転写活性は、HSF1 の有無に関わらず上昇したが、HSF1 が共発現することで更に LTR 転写活性が増強した。一方、HSF1- $\Delta$ DBD 発現時にはその傾向は確認されず、むしろ Tax 単独発現の場合よりも大きく LTR 転写活性能を低下させた。(図 4-2)

#### 4.3.3 $\Delta$ HSE レポーターベクターにおける LTR 転写活性の変化

HSF1 による LTR 転写活性が HSE を介した反応であることを確認するため、LTR レポーターベクターのうち、HSE 配列を欠損させた p $\Delta$ HSE を用いたレポーターアッセイを行ったところ、HSF1 発現時における LTR 転写活性が有意に減少した(p<0.02)。p $\Delta$ TxRE2 による転写活性も HSF1 単独発現時と比較すると減少する傾向が認められた。また、Tax 発現時における LTR 転写活性は p $\Delta$ TxRE2 において有意に減少しており(p<0.02)、また p $\Delta$ HSE においても半減していることが確認された。(図 4-3)

#### 4.3.4 HSE 変異体レポーターベクターによる LTR 転写活性の変化

これらの HSF1-HSE 反応、Tax-TxRE 反応に関して HSE 配列の役割をより詳細に解明するため、HSE 配列の 2 倍体(pHSE-2repeat)、3 倍体(pHSE-3repeat)、半数体(pHSE-half-5'/3')、塩基置換体(pHSE-junk)を加えて再び LTR 転写活性機能を評価した。HSF1 発現時には、HSE-3repeat、HSE-2repeat の HSE 配列数の順に LTR 転写活性が有意に上昇していた(p<0.02)。一方で p $\Delta$ HSE、p $\Delta$ HSE-half -5'/3'における転写活性機能の上昇は確認されなかった(図 4-4)。Tax 発現時における LTR 転写活性は HSF1 発現時のような HSE 依存的な転写活性は確認されず、pHSE-2repeat、pHSE-3repeat においてはむしろ減少する傾向にあった。また、4.3.4 の結果と同様に、p $\Delta$ TxRE2 における LTR 転写活性

は大きく減少していた(図 4-4)。

#### 4.4 考察

HSF1 は HSE に特異的に結合し、下流の転写活性を促進することが知られている(52)。

牛白血病において Tax は LTR に結合し、強い転写活性機能を持つことが報告されているが(19、20)、病態後期では発現がほとんど認められなくなっている(44、40)。Tax 非依存的なウイルス転写活性はウイルスの再活性化や最初の転写活性開始などにおいて必要であり、病態進行や宿主免疫を回避する上で重要な役割を担っていると考えられる。本研究において同定した BLV-LTR における HSE 配列を元に、発症牛で高発現していた牛 HSF1 をクローニングし、HSE を介した LTR 転写活性の解析を行ったところ、Tax 非依存的な活性が認められた。更に HSF1 の導入濃度と時間経過に伴って LTR 転写活性機能は上昇していくことから、BLV-LTR に保存されている HSE は HSF1 応答性を持つことが明らかにされた。さらにその活性は HSF1 の DNA 結合部位の欠損や HSE 配列の部分的な欠損によって活性が低下したことから、BLV の LTR 転写活性は HSF1-HSE 依存的な反応であることが示唆された。

興味深いことに、HSF1-HSE を介した LTR 転写活性は、そのいずれかを欠損することによって Tax による LTR 転写活性機能も減少させ、HSF1 共発現によって増強されたことから、HSF1-HSE の反応は Tax における LTR 転写活性へも影響を与える可能性が示唆され

た。

表 4-1 クローニングに用いたプライマー塩基配列

Primer	Sequence (5'-3')	Accession No.
<i>HSF1</i>	ATGGATCTGCCCGTGGG CGAGACAGTGGGGTCCTTGG	NM 001076809.1
<i>tax</i>	ATGCCCAAAGAACGACGGTC AGTTGTTCCAGGGAAGAAGG	NC 001414.1



表 4-2 変異導入プライマー塩基配列

Primer	Sequence (5'-3')	Base
pHSF1- $\Delta$ DBD	CAACGTCGTGACCAGTGTGTCCACT CTGGTCACGACGTTGCTGGGCCCCGC	pIRESneo3
p $\Delta$ HSE	CTTCCCAATCCACACCCTGAGCTG TGTGGATTGGGGAAGTTGGGGAGGTA	pGL3basic
p $\Delta$ HSE-half-5'	CCCCTTTCcAATCCACACCCTGAGCT TGGATTgGAAaGGGGAAGTTGGGGA	pGL3basic
p $\Delta$ HSE-half-3'	ACTTCCCCcGAAaAATCCACACCCTG TTtTTCgGGGGAAGTTGGGGAGGTA	pGL3basic
pHSE-3repeat	AATTTCCCGAAAAATCCACACCCTGAGCTG ATTTTTCGGGAAATTTTCGGGAAATTTTCGGGA	pGL3basic
pHSE-2repeat	AAATTTCCCGAAAAATCCACACCCTGAGCTG ATTTTTCGGGAAATTTTCGGGAAAGGGGAAGT	pGL3basic
pHSE-junk	CCcATCagACTtAATCCACACCCTGAGCTG TTaAGTctGATgGGGGAAGTTGGGGAGGTA	pGL3basic
p $\Delta$ TxRE	TGCCAGAAGGCTAGAATCCCCGTACC TCTAGCCTTCTGGCAGCTGACGTCT	pGL3basic

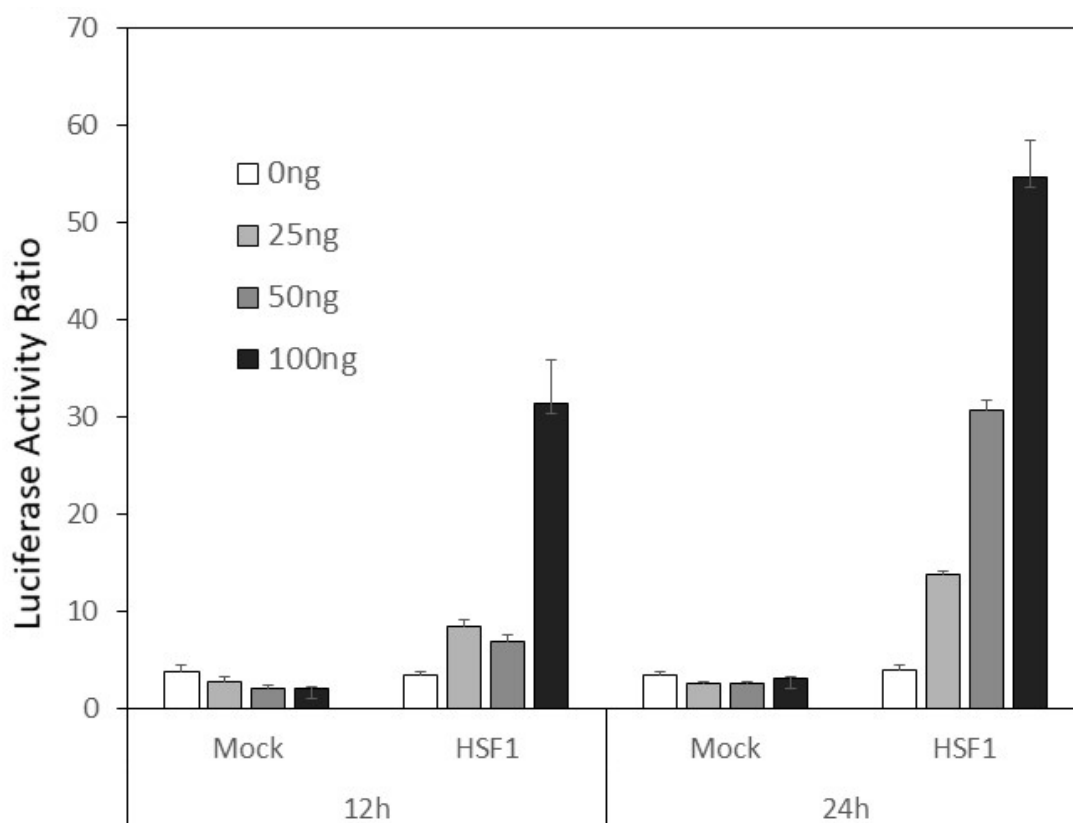


図 4-1 HSF1 導入による LTR 転写活性の変化

CC81 細胞へ HSF1 発現ベクターと LTR レポーターベクターを導入し、pHSF1 の導入濃度別の LTR 転写活性機能を示した。12 時間後、24 時間後のいずれも HSF1 の導入濃度に応じて LTR 転写活性の上昇が認められた。

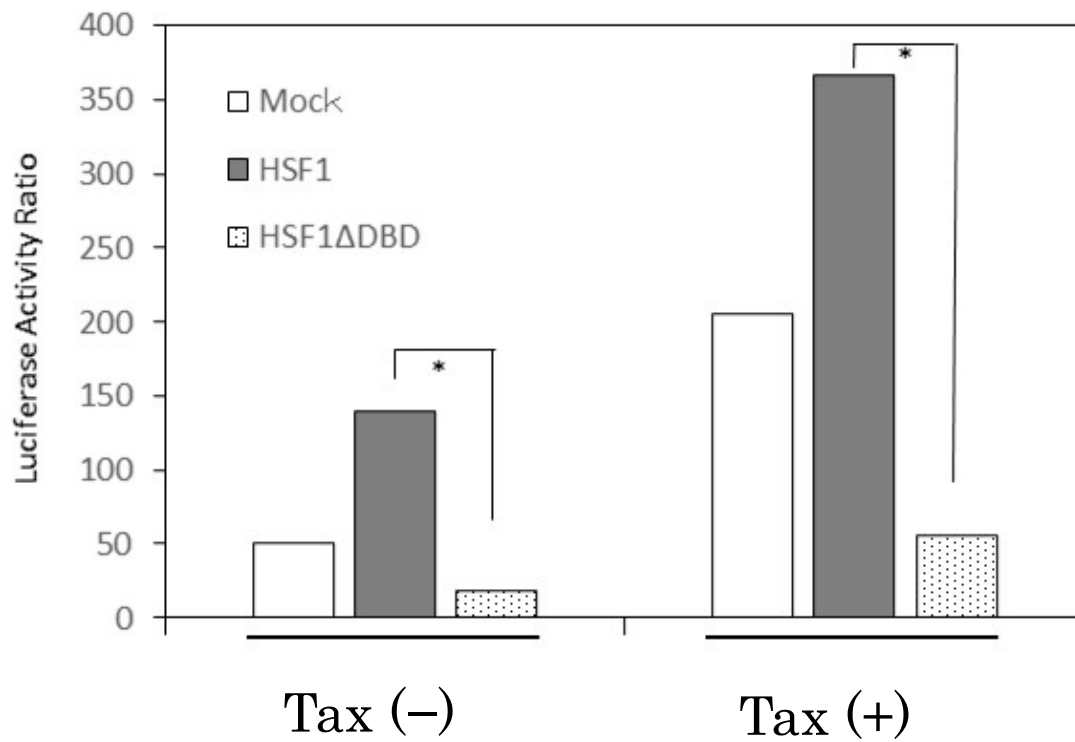


図 4-2 pHSF1- $\Delta$ DBD による LTR 転写活性の変化

Tax 導入、非導入時の pHSF1- $\Delta$ DBD による LTR 転写活性の変化を示す。HSF1 $\Delta$ DBD によって HSF1、Tax による LTR 転写活性は大きく減少した。また Tax は HSF1 との共発現により LTR 転写活性を増強させた。

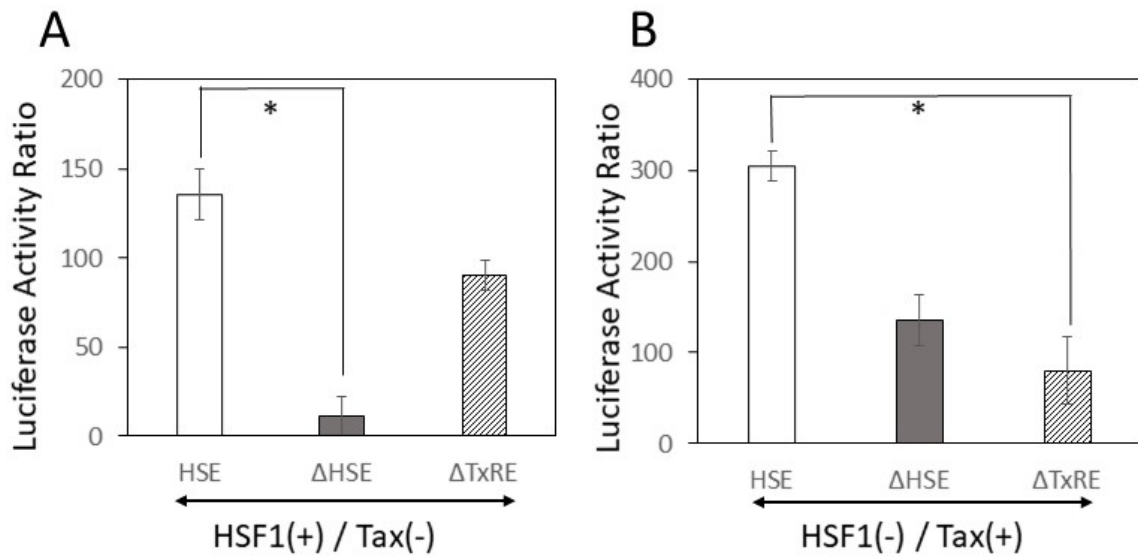


図 4-3 pΔHSE レポーターベクターによる LTR 転写活性の変化

A: HSE 配列の欠損によって HSF1 導入による LTR 転写活性機能は大きく減少した。

B: Tax 発現時において、TxRE の欠損によって LTR 転写活性機能は減少したが、HSE の欠損によっても転写活性は減少した。

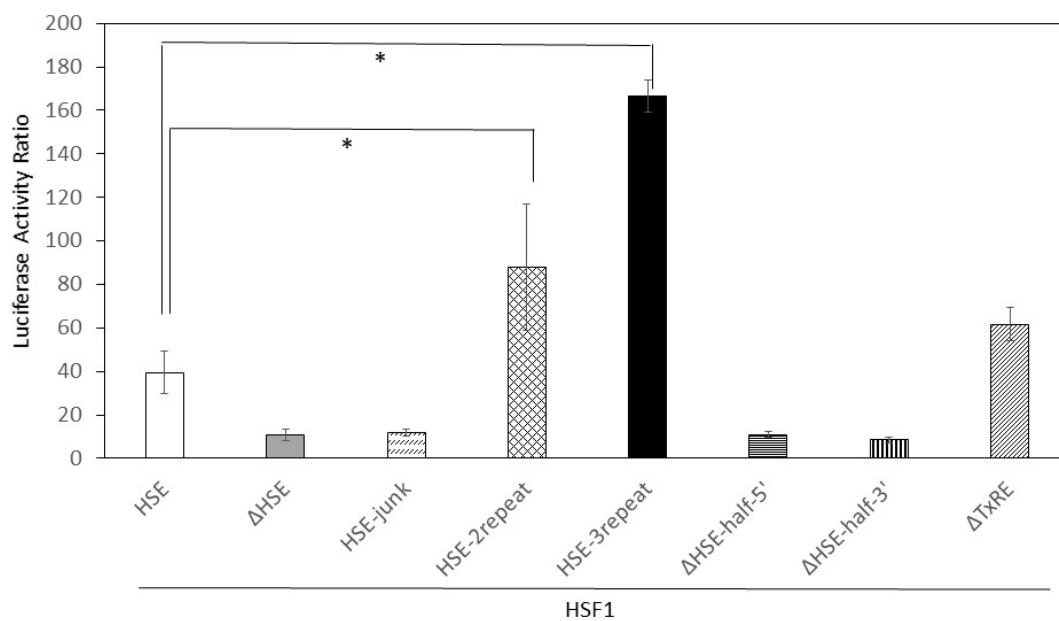


図 4-4 HSF 1 発現時の LTR 転写活性機能の変化

HSE 配列の繰り返しによって HSF1 の LTR 転写活性機能は増加した。部分的な欠損や、塩基の置換がある HSE では LTR 転写活性機能の変化は認められなかった。

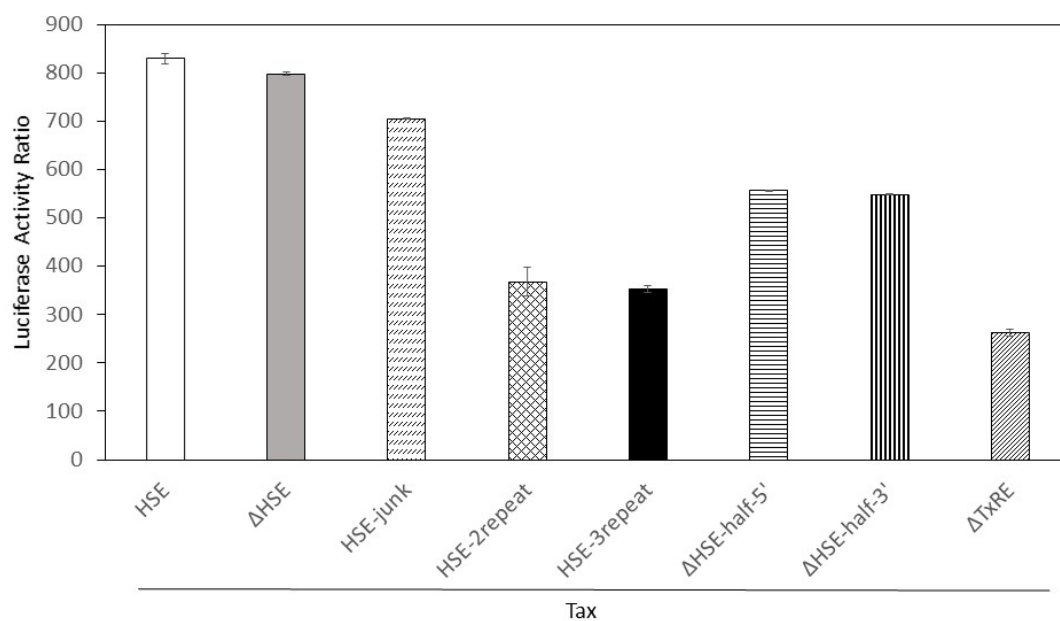


図 4-5 Tax 発現時の LTR 転写活性機能の変化

Tax 発現時には HSF1 発現時で認められた HSE 配列数に応じた LTR 転写活性は認められず、むしろ減少する傾向にあった。

## 第 5 章

### Tax-HSP の相互作用機能解析

## 5.1 序論

シグナル伝達経路において、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節されている(44、52、65)。BLV と同じデルタレトロウイルス属に分類される HTLV-1 は Tax が LTR 転写活性に重要な役割を果たしているが(15)、HSP90 が Tax と相互作用し、局在や転写活性に影響を及ぼすことが報告されている(4、32)。牛白血病に関して、BLV 感染牛では非感染牛と比較して HSP70 が高発現しているとの報告(58)や、BLV-LTR を活性化する変異型 Tax によってストレス関連遺伝子が高発現していることがマイクロアレイによって明らかにされている(6、56)。しかしその後、継続的な研究報告はなく、BLV に関する HSP の役割については未だ不明なことが多い。第 4 章において、HSF1 によるウイルス LTR 転写活性機能を明らかにしたが、HSF1 は HSP の転写も活性化しており、発現が誘導された HSP による直接的あるいは間接的な LTR 転写活性も検討する必要がある。

本研究において、Tax と HSP の相互作用によるウイルス転写活性の変化をさらに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 HSF1 発現時、非発現時のそれぞれで検討した。



## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 株化細胞および細胞培養

4.2.1 と同様の細胞を使用した。細胞の維持は同一の手法で行った。

### 5.2.2 HSP70、HSP90 遺伝子クローニングと発現ベクターの作製

4.2.2 と同様の手法で HSP70 および 90 の発現プラスミドベクター(pHSP70、pHSP90)を作製した。使用したプライマーは(表 5-1)に示す。

### 5.2.3 Luciferase reporter assay

発現ベクターに pHSP70 と pHSP90 を加えて第 4 章 4.2.4 と同様の手法で行った。

## 5.3 結果

### 5.3.1 Tax-HSP 相互作用における LTR 転写活性の変化

HSP70、もしくは HSP90 の単独発現では LTR 活性は認められなかった。Tax による LTR 転写活性機能は HSP70 との共発現によって抑制され、HSP90 との共発現により有意に増強された( $p < 0.002$ )(図 5-1)。

### 5.3.2 HSF1 および Tax 発現時における HSP の機能解析

HSF1 発現時の HSP70、HSP90 による LTR 転写活性機能を経時的に解析したところ、Tax 発現時に見られた際の変化と同様に、HSP70 の発現によって LTR 転写活性は抑制され、HSP90 の発現によって LTR 転写活性機能が増強することが確認された。特に HSP90 による LTR 転写活性の増強効果は著しく、最大で 5 倍以上転写活性の上昇が認められた(図 5-2)。

## 5.4 考察

HSP70、HSP90 それぞれは単独では LTR 転写活性機能を示さなかったが、HSF1 あるいは Tax による転写活性機能に変化を及ぼすことが示された。この結果は HSF1 が HSP を介さず、直接的に HSE と反応することを示唆しているとともに、HSF1 と Tax による LTR 転写活性は HSP を介した共通の反応経路が存在することを示唆している。HSP90 については HTLV-1 で報告されている Tax の転写活性機能を増強する作用と類似した結果が得られ、BLV においても類似した作用を持っている可能性が考えられる(32)。

また、HSF1 単独の発現と比較すると HSP の共発現では全体的な LTR 転写活性は減衰しており、転写活性のピークも 20 時間前後でありその後は減少する傾向も認められた。HSF1 は HSP と複合体を形成し不活性型になるため、HSP の産生に伴って不活性型 HSF1 が増加していったことが転写活性減衰の原因と考えられる。

表 5 - 1 クローニングに用いたプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Accession No.
<i>HSP70</i>	ATGGCGAAAAACATGGCTAT ATCCACCTCCTCAATGGTGG	NM 203322.2
<i>HSP90</i>	ATGAGGGCCCTGTGGGTGC TTCATCTTTTTCAGCTGTAG	NM 174700.2

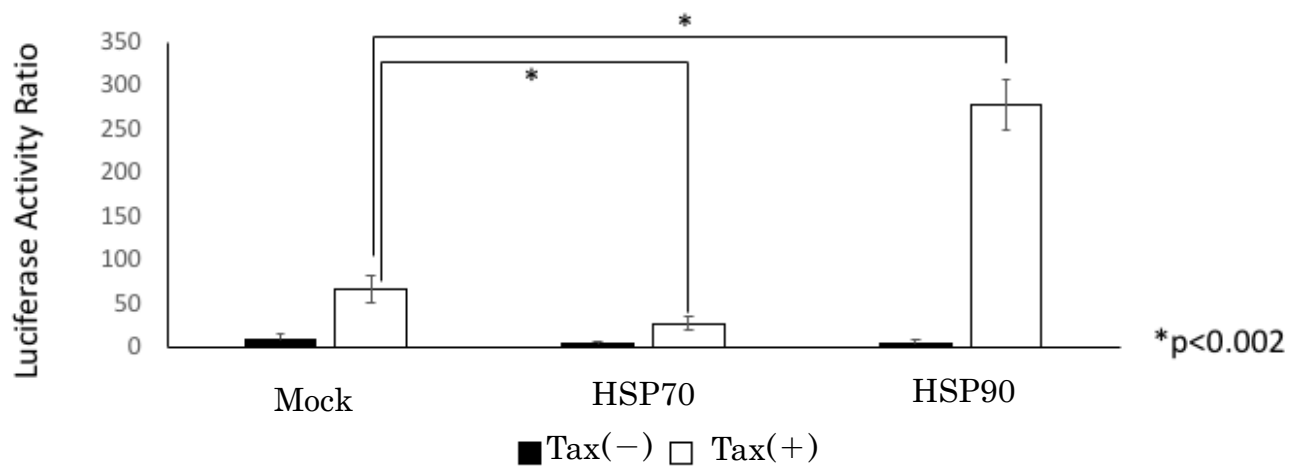


図 5-1 pTax 導入、非導入時における HSP70、HSP90 による LTR 転写活性の変化。

それぞれ単独での発現では LTR 転写活性を示さないが、Tax との共発現によって活性を変化させた。

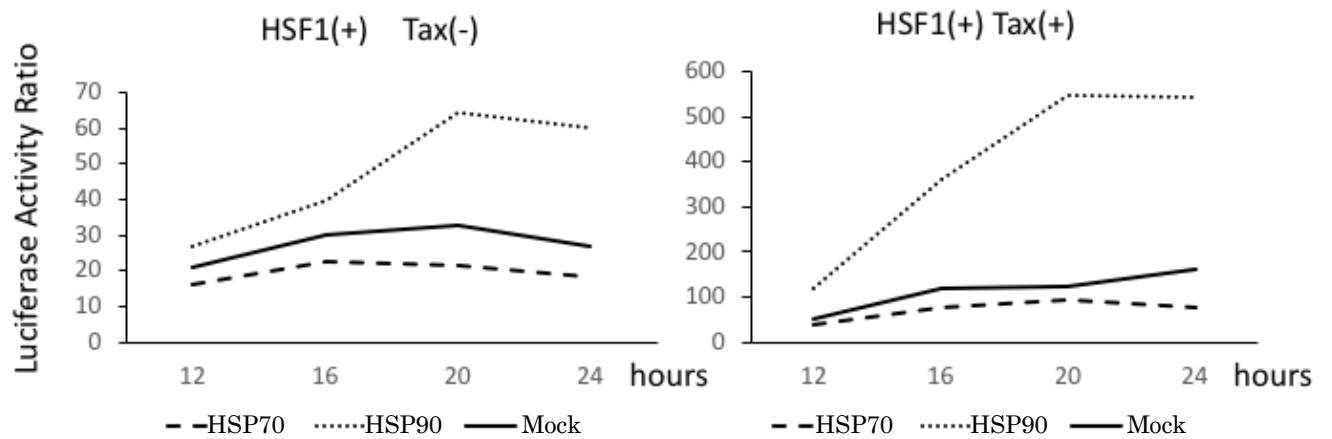


図 5-2 HSF1 発現時の HSP による LTR 転写活性機能

HSF1 発現時において、LTR 転写活性機能は、Tax による LTR 転写活性の有無に関わらず、HSP70 の発現時に抑制され、HSP90 の発現時には増強された。

## 第 6 章

### 牛フォーミーウイルスの分離と LuSIA 法による性状解析

## 6.1 序論

フォーミーウイルスは *Retroviridae Spumavirus* 属に分類される(36)。Bovine foamy virus (BFV)は 1969 年に臨床症状的に無症状の牛から分離が成功されており、その後も世界各地の牛から分離報告がある(3、5、7、26-28、37、63)。受容体は明らかとなっていないが、感染牛の様々な組織からウイルス分離がされており、ヒト(HEK293T 細胞、HeLa 細胞)、アフリカミドリザル(CV-1 細胞)、ハムスター(CHO 細胞、BHK-21 細胞)由来の細胞株にも感染することが報告されている(38)。BFV は分離当初リンパ肉腫を引き起こす可能性が疑われていたが(39)、現在では単独感染では疾病との関連性はないと考えられている(8)。しかしながら、ウイルスが宿主ゲノム中にプロウイルスとして挿入されることによって、感染個体の健康状態に影響を与える可能性が示唆されている(22、35)。

牛末梢血からの BLV 分離や、BLV の感染効率を調べる際には syncytia infectivity assay (SIA)が広く用いられている(26)。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持つ BFV は、日本国内において分離されておらず、感染状況についても不明であるため、BLV 研究の障害となっている可能性がある。近年、新たな BLV 特異的な検出方法として Luminescence syncytium infectivity assay (LuSIA)が



開発された(53)。この手法は、BLV の LTR-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)遺伝子の改良型の Enhanced GFP (EGFP) 遺伝子を持つ CC81-BLU3G 細胞を使用している。LuSIA 法は 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検出法である。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 の分離と同定を試み、さらに LuSIA 法を用いて BFV が BLV の LTR 転写活性機能を持つかを検討した。

## 6.2 材料および方法

### 6.2.1 株化細胞および細胞培養

FLK-BLV 細胞および牛胎子筋肉由来 (BFM) 細胞は 5%FCS 添加 Eagle's MEM で、CC81-BLU3G 細胞は 5%FCS および 0.3%TPB 添加 Eagle's MEM で培養を行った。

### 6.2.2 血液サンプルとウイルス分離

神奈川県内の同一農場内で飼育されている、臨床上健康である牛 57 頭の尾静脈より EDTA 採血管を用いて血液を採取した。得られた血液は、0.01% EDTA 含有の 0.83%NH<sub>4</sub>Cl を 2 倍量加えることで溶血させ、PBS で 3 回洗浄後、1000rpm 10 分間の遠心分離を行い、末梢血リンパ球(PBL)を分離した。分離した PBL は  $1 \times 10^7$  個/ml に調整し、6 穴プレートにて  $1.5 \times 10^5$  個の BFM 細胞 1ml と共培養を行い、ウイルスの分離を試みた。培養 48 時間後に、培養細胞を Eagle's MEM で洗浄し、新たな培養液を加え 1 週間以上培養を行った。細胞変性効果(CPE)が観察されなかった場合、培養上清を新たに BFM 細胞に加える方法と、培養細胞をトリプシン処理して継代培養する方法の 2 通りで継代を行った。

### 6.2.3 光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察

CPE が観察された場合、BFM 細胞はギムザ染色を行い、細胞形態の変化を観察した。電子顕微鏡による観察は、感染細胞を 2.5%グルタルアルデヒド含有 PBS で固定後、遠心沈殿によってペレットとし、1%酸化オスミウム(0.1M phosphate buffer に溶解)処理を行った。段階的にエタノールで脱水後、LUVK-812 樹脂に封入し、超薄切片試料を作製した。ウラン・鉛染色を施した後、透過型電子顕微鏡(H-7500, Hitachi high-technologies 社)にてウイルスの形態観察を行った。

### 6.2.4 DNA 抽出と nested-PCR

CPE が生じた BFM 細胞を PBS で 2 回洗浄後  $2 \times 10^5$  個に調整し、DNeasy Blood & Tissue kit(Qiagen)を用いて genomic DNA の抽出を行った。ウイルスが分離された牛の PBL を再度採取し、 $1 \times 10^6$  個に調整して DNA を抽出した。

得られた DNA サンプルを用いて BFV-*env* をターゲットに Go Taq green Master Mix (Promega)を用いて nested-PCR を実施した。使用したプライマーは表 6-1 に示す。1st PCR では BFV-*env*-F1 と BFV-*env*-R1 プライマーを使用し、反応条件は 95 度で 2 分間熱処理した後、95 度で 30 秒の熱変性、55 度で 30 秒のアニーリング、72 度で 80 秒の伸長反応の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。2nd PCR では BFV-*env*-F2 と

BFV-env-R2 プライマーを使用し、得られた PCR 反応溶液 1 $\mu$ l を鋳型とした。PCR の反応条件は 95 度で 2 分間熱処理した後、95 度で 30 秒の熱変性、55 度で 30 秒のアニーリング、72 度で 60 秒の伸長反応の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。得られた PCR 反応産物は 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により確認を行った。

#### 6.2.5 ダイレクトシーケンスによる塩基配列解析

得られた PCR 産物は Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean Up System (Promega)によってゲル精製を行った。ダイレクトシーケンスは精製した PCR 産物を鋳型として、2nd PCR で用いたプライマーを使用し、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

得られた塩基配列は MEGA6 ソフトウェア上で Clustal W によってアライメントを行った。更に National Center for Biotechnology Information (NCBI) が運営する BLAST を用いてデータベースと比較解析した。DNA Data Bank of Japan (DDBJ) より近縁なウイルス株の塩基配列を得て、部分的な BFV *env* 塩基配列の相同性解析ならびに Tamura-Nei モデルに基づいた最尤法によって塩基配列の系統解析を行った。

### 6.2.6 LuSIA 法

BLV LTR U3 をプロモーターとして下流に EGFP 遺伝子を保有するプラスミドを CC81 細胞に導入し、G418 薬剤選択を行った。限界希釈法でクローン選択を行い、pBLU3-EGFP 安定発現細胞株を樹立し、CC81-BLU3G 細胞とした。BFV が感染した BFM 細胞 (BFM-BFV) または FLK-BLV 細胞 5000 個と CC81-BLU3G 細胞  $5 \times 10^4$  個/ml を 12 穴プレートで共培養した。2 日～4 日後にホルマリン固定を施し、PBS で洗浄した後に各細胞のシロチウム形成および EGFP 発現を蛍光顕微鏡において観察した。核は蛍光色素の 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI) で染色した。

## 6.3 結果

### 6.3.1 分離ウイルスの形態観察

PBL を接種した BFM 細胞は、2 回目の細胞継代を行ったところ、2 検体にて CPE が確認された。ギムザ染色でシンシチウムの観察を行ったところ、周囲に空胞変性を伴う特徴的な多核巨細胞が認められた (図 6-1)。このような CPE は PBL を接種した BFM 細胞の培養上清を BFM 細胞に接種して継代した場合には確認されなかった。ウイルス粒子の電子顕微鏡観察により、分離ウイルスはエンベロープを有しており、50-100nm 粒子であることが確認された(図 6-2)。

### 6.3.2 分離ウイルスの同定ならびに分子系統解析

分離ウイルスを、BFV *env* 特異的プライマーにより解析した結果、1st PCR では 1248bp, 2nd PCR では 915bp の PCR 産物が検出された (図 6-3)。一方、BLV や牛免疫不全ウイルス、羊型悪性カタル熱ウイルスなど他のウイルス遺伝子は検出されなかった。

得られた PCR 産物と DDBJ に登録されている既報の BFV の塩基配列を比較したところ、分離ウイルスの塩基配列(LC365690)は BFV reference strain (NC\_001831)と 98.9%の相同性を示した(図 6-4)。さらにこの配列を元に、他の Foamy virus や BFV 株を含めた分子系

統樹を作製し、分離株間の比較を行ったところ、中国での BFV 分離株(AY134750)、ならびにアメリカでの BFV 分離株(NC001831)と非常に近縁であることが確認された(図 6-5)。以上の解析結果より、分離ウイルスは *Retroviridae Spumavirus* 属に分類される Bovine foamy virus (BFV) であると同定され、日本国内における初の分離報告となった。

### 6.3.3 LuSIA 法によるウイルス性状解析

シンシチウム形成能を持つウイルスが分離された際に、BFV と BLV を鑑別が可能か、また BLV-LTR の転写活性機能に BFV が影響を及ぼすかを明らかにするため、BFV を用いた LuSIA 法を実施した。BFM-BFV 細胞または FLK-BLV 細胞を接種した CC81-BLU3G 細胞は 4 日後に明瞭なシンシチウムの形成が観察された。しかし、蛍光顕微鏡による EGFP の発現を確認したところ、FLK-BLV 細胞を接種した CC81-BLU3G 細胞においてはシンシチウム形成部位と一致した EGFP 発現が確認されたが(図 6-6 下段)、BFM-BFV 細胞を接種した CC81-BLU3G 細胞では EGFP の発現は確認されなかった(図 6-6 上段)。

## 6.4 考察

本研究では、臨床上健康な牛からシンシチウム形成能を有するウイルスの分離に成功し、塩基配列の解析によって *Retroviridae Spumavirus* 属に分類される BFV であることが同定された。BFV は世界各国で分離されているが(7、24、27、60)、日本国内における分離は初の報告となった。BFV は多くの細胞や組織への感染が報告されているが、感染細胞からウイルス粒子の放出が少なく、感染の成立には細胞間での接触が重要であると考えられる(29)。本研究においても、培養上清を接種した BFM 細胞では CPE が発現しなかったことより、感染の成立には感染細胞の直接的な接触が重要であることが示唆される。

本研究においては、分離ウイルスは米国や中国で分離された BFV 株と近縁なものであったが、その由来については不明であり、今後は他の BFV 遺伝子を含めた解析や、他の国内農場における BFV 感染率や過去に遡った遺伝子解析を通じて明らかにしていくことが期待される。BFV は病原性が無いと考えられているが、BLV と同様の感染形式を持つと考えられ、宿主ゲノム中にプロウイルスとして組み込まれる。免疫系の細胞にも感染が成立することから、免疫力の低下や他のウイルスとの混合感染によって症状の悪化も懸念される。本研究によって分離したウイルスの性状解析や日本国内における BFV の感染状況の解明によって新たな知見が得られると考えられる。



また、本研究により LuSIA 法によって BLV と BFV の鑑別が可能であることが示された。

LuSIA 法では BLV の LTR をプロモーターとすることで BLV 特異的な診断が可能とされていたが、牛に感染する他のレトロウイルスにより反応が起こるかの確認は未調査であった(53)。SIA 法による誤診の可能性についてはかねてより指摘があったが(53)、LuSIA 法による BLV の病原診断では同じレトロウイルスである BFV 感染による誤反応はなく、改めて BLV に高い特異性を持つことが示された。BFV が産生するタンパク質や宿主因子により BLV-LTR の転写活性が誘発される可能性は低いと考えられる。

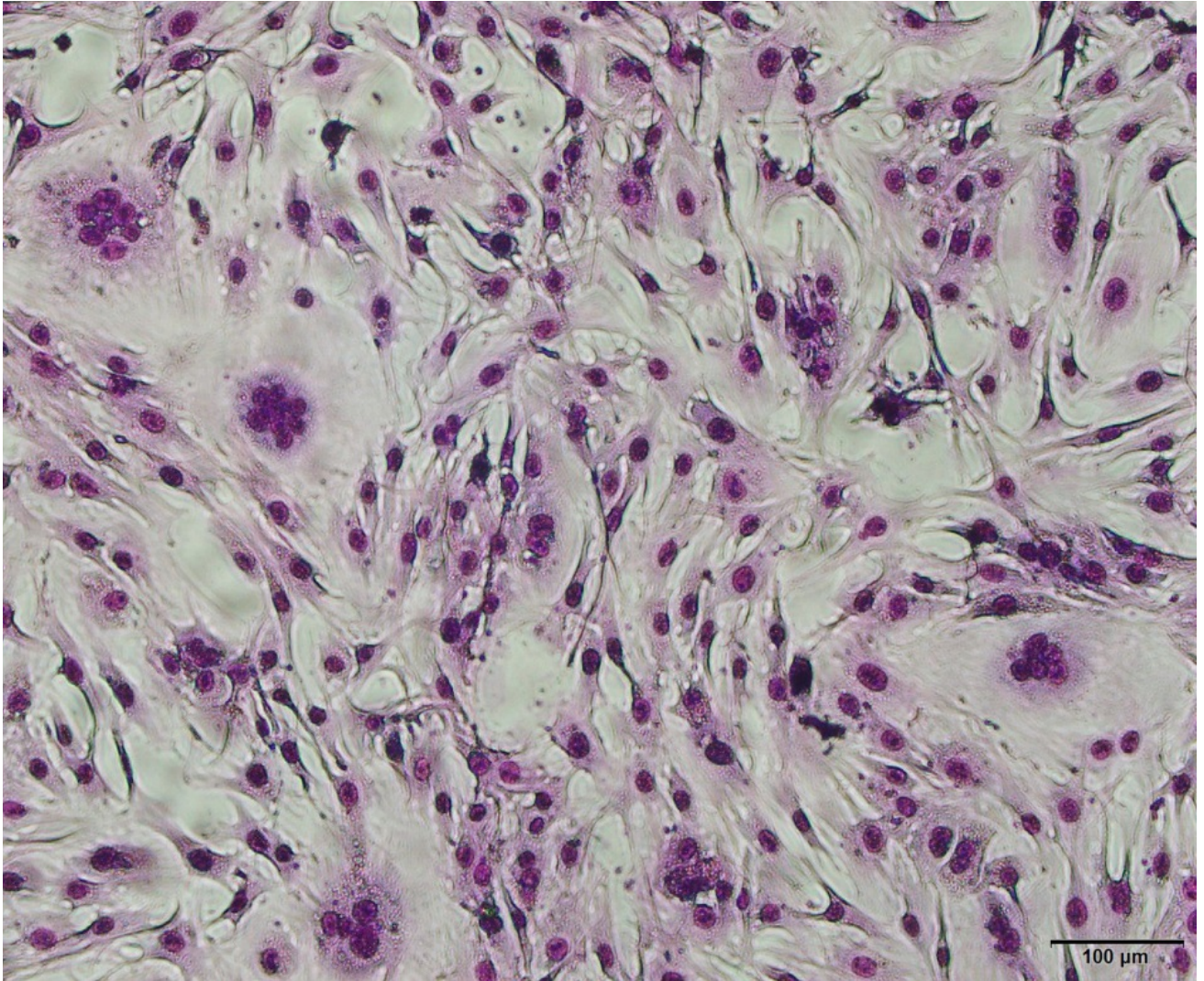


図 6-1 分離ウイルスを接種した BFM 細胞 (ギムザ染色)

周囲に空胞変性を伴うシンシチウム形成が多数確認された。

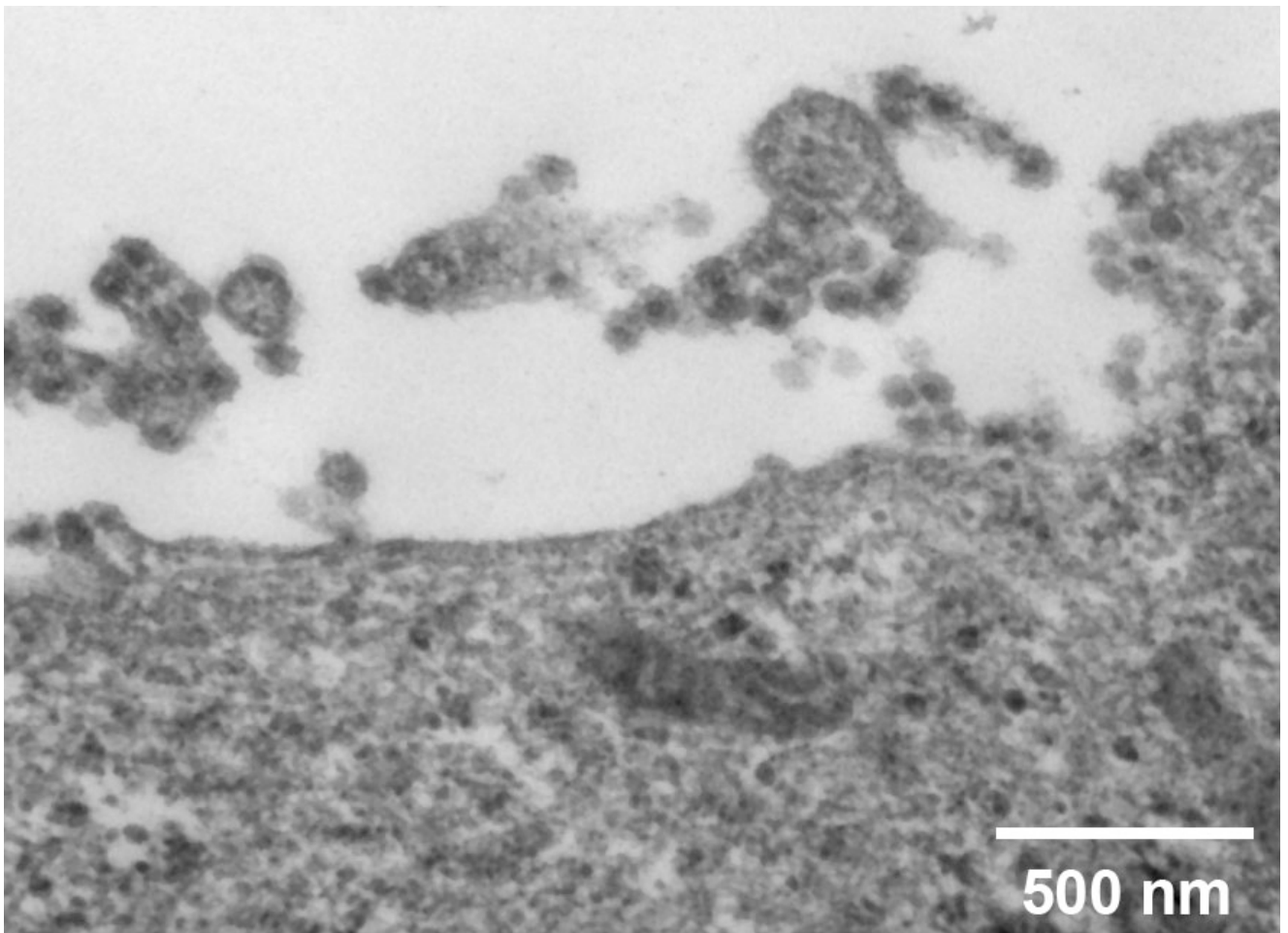


図 6-2 分離ウイルスの透過型電子顕微鏡像

80-100nm のエンベロープを有するウイルス粒子が観察された。

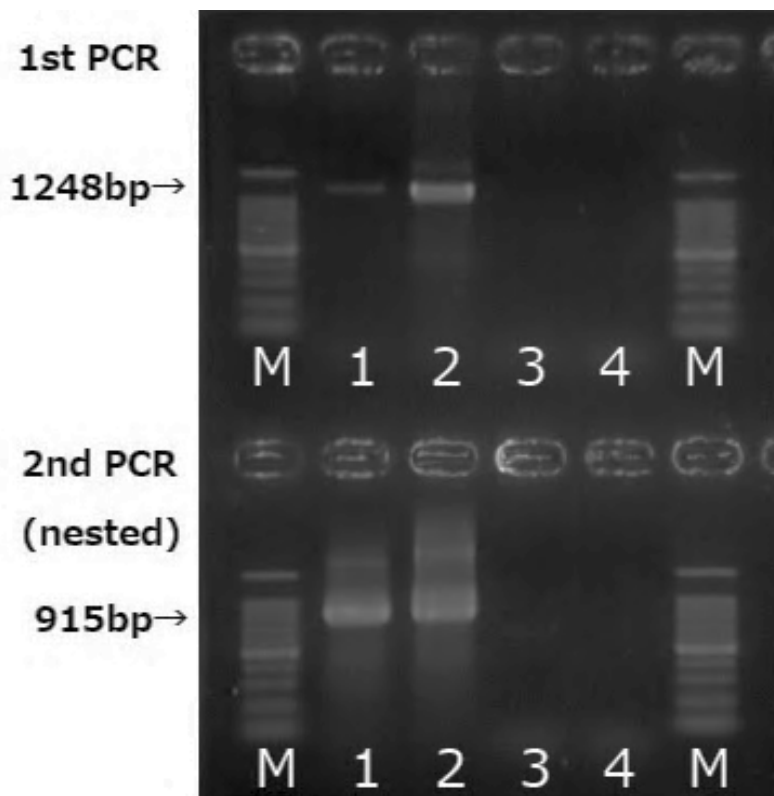


図 6-3 BFV のプライマーを用いた分離ウイルスの PCR

1:ウイルス分離牛の末梢白血球。2:ウイルス感染 BFM 細胞。3:ウイルス未接種 BFM 細胞。4:陰性対照(蒸留水)。ウイルスが分離された牛の末梢白血球から抽出した DNA は nested PCR で明瞭な陽性となった。

```

Isolated from Japan (LC365690) 1 TTGTCATTAGAGSACTTCAGGAAGTATAATATTAGTAATAATGGTTCTAGATATGAAGCCTATAGGCTGCCCTTGCAGACCAAGATAGGGCTGTAGCCCTTCTGTAGCCC 110
Reference from US (NC001831) 1 C.....GA....T..... 110
BFV 3026 from China (AY134750) 1 C.....GA....T..... 110
BFV-Riems from Germany (JX307862) 1 C.....C.....G.....A....A..... 110
BFV100 from Poland (JX307861) 1 C.....G.....C.....T..... 110

Isolated from Japan (LC365690) 111 TACCCATATACCTCCTCTGGTGAATTACACACAAAGTAGCAGAGAAAGAGAGGGAATTATTCCGACGCAAGTTAGAAACCTTCTTAATCCACAGACTGGCTGCCTTAACC 220
Reference from US (NC001831) 111 .....G..... 220
BFV 3026 from China (AY134750) 111 .....G..... 220
BFV-Riems from Germany (JX307862) 111 .....T.....A.....G..C....A..... 220
BFV100 from Poland (JX307861) 111 .....A.....G..C....A..... 220

Isolated from Japan (LC365690) 221 CCGAGGCACCTCCAGGAACCTGGCACACTCTAGGAAAAAGGTGAATGGTTTGTAGAGATCTAACACATATGACTTTTGCAGAAACCAGAGGCCGCTTTGGATTAAATAAG 330
Reference from US (NC001831) 221 .....C..... 330
BFV 3026 from China (AY134750) 221 .....C..... 330
BFV-Riems from Germany (JX307862) 221 ..T.....T.....A.....G.....T.....A..... 330
BFV100 from Poland (JX307861) 221 ..T.....T.....A.....G.....A..... 330

Isolated from Japan (LC365690) 331 ACTTATTATAGCTGGTCAITTTGGGAAGGAGACTGTGGAGACAAAGGAATGACACTCAGGACTATCCACCAGAAATGTCGGAATTATGAGAAAAAGGATGGAGTACACGT 440
Reference from US (NC001831) 331 .....G..... 440
BFV 3026 from China (AY134750) 331 .....C..... 440
BFV-Riems from Germany (JX307862) 331 .....G.....A.....G.....C..... 440
BFV100 from Poland (JX307861) 331 .....G.....G.....A.....G.....C..... 440

Isolated from Japan (LC365690) 441 CTATGGTTGCAGGTATTGAGAGAACCTATTCTCAACAGCCCATACCCAGACAAAGTGAAGTTGTATCTGTGCAAGACTATTGTCTGTTCCAAACCAAAATGGGACAGTG 550
Reference from US (NC001831) 441 .....C..... 550
BFV 3026 from China (AY134750) 441 .....C..... 550
BFV-Riems from Germany (JX307862) 441 .....AT.....C.C.....T..... 550
BFV100 from Poland (JX307861) 441 .....AT.....C.C..... 550

Isolated from Japan (LC365690) 551 CTGAAATTAGATCTGATTTAGGTTAATTTGGCCTAATTTAGGAGCCTTTCCAGCCCAATTTGTATTGAGGCAGGAAITTAACATGATCAGGATTATAAGGTTACATCTATC 660
Reference from US (NC001831) 551 ..... 660
BFV 3026 from China (AY134750) 551 ..... 660
BFV-Riems from Germany (JX307862) 551 ..G.....C.....A.....T.....A.....A.....T 660
BFV100 from Poland (JX307861) 551 ..G.....C.....A.....A..... 660

Isolated from Japan (LC365690) 661 TATGCTGAGTGTGTAAGCAAGGGAAGCAATATGATATTATAGATGTAACACGTCAACTGACCAAGCAAGCTCACCCGAGAGGGGGTCTTCTTGGGGACCTACCTGCAGA 770
Reference from US (NC001831) 661 .....G..... 770
BFV 3026 from China (AY134750) 661 .....G..... 770
BFV-Riems from Germany (JX307862) 661 .....GC.....T.....G.....A.....G..... 770
BFV100 from Poland (JX307861) 661 .....GC.....T.....G.....A..... 770

Isolated from Japan (LC365690) 771 CCGAGCCTTCTCCCTCCTGACTGACTTCTCGCTCCAGACAGTTATCAGAATAAAACGGCAGGACGGAAAGTCTGTTCAGTAAAAGAACCGGAGAGAGTATAA 880
Reference from US (NC001831) 771 .....C..... 880
BFV 3026 from China (AY134750) 771 .....C..... 880
BFV-Riems from Germany (JX307862) 771 .....T.....G.....C.....G.....G.....C.....G..... 880
BFV100 from Poland (JX307861) 771 .....T.....G..T.....C..G.....G.....G..... 880

Isolated from Japan (LC365690) 881 ATRAACTGGGAGAGGCTCCAGATAGCAGGACAAATCA 915
Reference from US (NC001831) 881 .....A..... 915
BFV 3026 from China (AY134750) 881 .....A..... 915
BFV-Riems from Germany (JX307862) 881 .....G..... 915
BFV100 from Poland (JX307861) 881 .....G..... 915

```

図 6-4 分離ウイルスと他の BFV との比較

分離ウイルス(最上段)と各地で分離された BFV の *env* 領域の一部の比較。ドット(.)は同一の塩基であったことを示す。

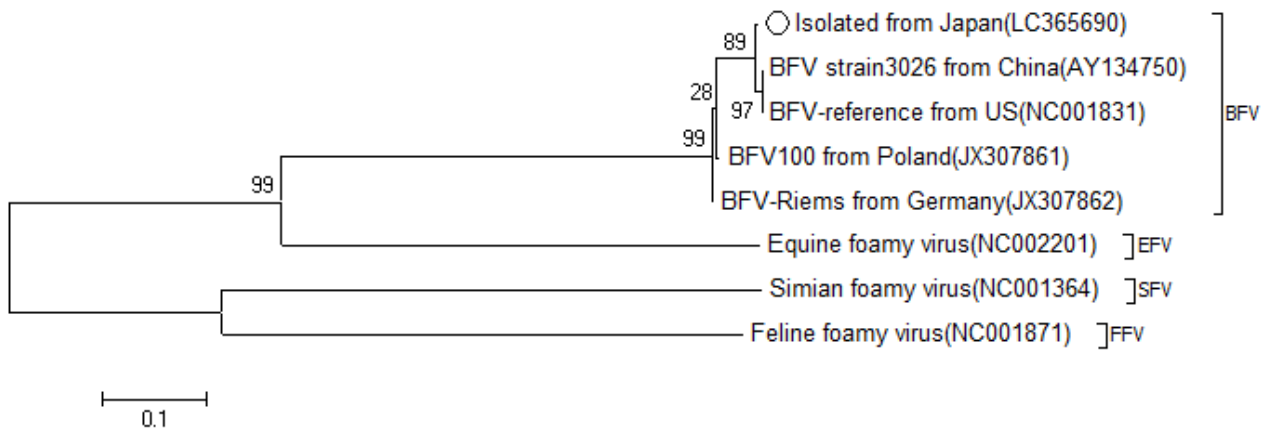
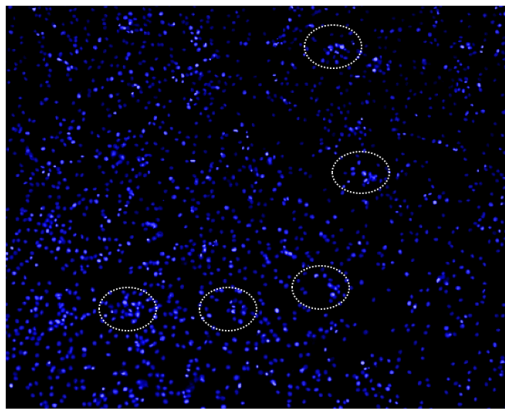


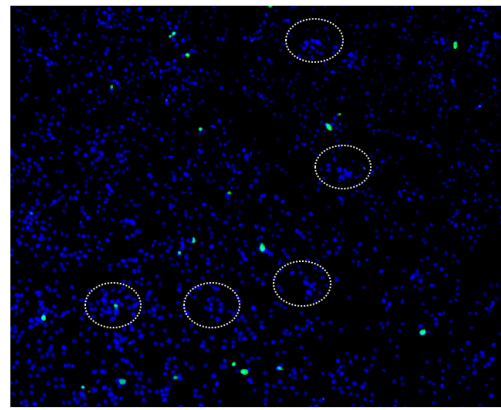
図 6-5 分離ウイルスと各地で分離された BFV の系統解析

Tamura-Nei モデルに基づいた最尤法で系統樹を作製。分離ウイルス（最上段）は、中国分離株（AY134750）と US 株(NC001831)と近縁な種であった。

CC81-BLU3G / BFM-BFV

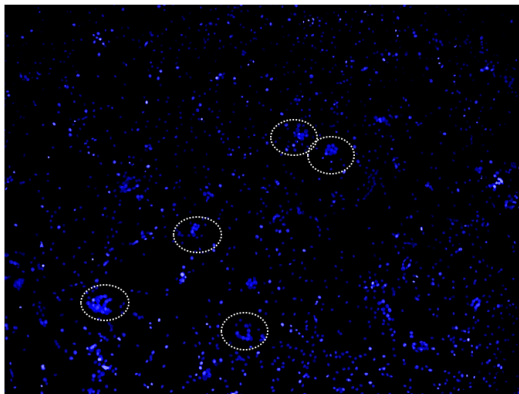


DAPI

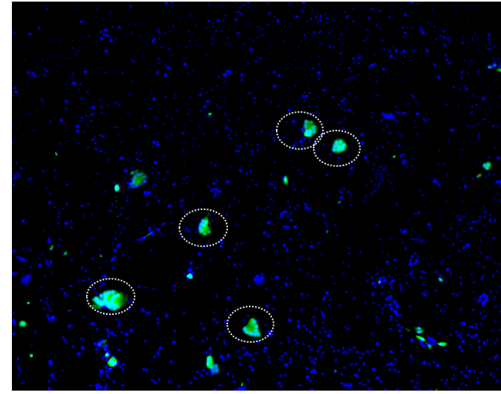


DAPI+EGFP

CC81-BLU3G / FLK-BLV



DAPI



DAPI+EGFP

図 6-6 LuSIA 法による BLV の検出 (蛍光顕微鏡像)

円で示した個所にシンシチウムが形成されている。CC81-BLU3G と FLK-BLV との共培養ではシンシチウムが形成された部分に EGFP の発現が確認されたが(右下)、BFM-BFV の共培養では EGFP の発現は確認できなかった(右上)。

表 6 - 1 使用したプライマー配列

Primer	Sequence (5'-3')
BFV-env-F1	TGGACTCTAGTAGTCTCACC
BFV-env-R1	CTTAGAAAGCGTGGTAATGGC
BFV-env-F2	TGTCATTAGAGGACTTCAGG
BFV-env-R2	TTGATTGTCCTGCTATCTGG



## 第7章

### 総括

本研究により、EBL 発症牛において HSP 関連遺伝子発現量が上昇することを確認し、特に HSF1 の発現量が上昇していること、さらに BLV-LTR 中に HSF1 のコンセンサス配列として HSE 配列を同定し、牛 HSF1 を用いて同定した HSE 配列には BLV-LTR 転写活性機能があることを明らかにした。加えて、分離した BFV を用いた LuSIA 法により、BFV によって BLV の LTR 転写活性に直接的な影響がないことを確認し、BFV 感染牛と BLV 感染牛の鑑別が可能であることを示した。新たに明らかとなった EBL 発症牛における宿主側の転写活性機能の概要を以下に総括する。

#### 7.1 牛白血病発症牛における HSP 関連遺伝子解析

牛白血病発症牛において、腫瘍組織から得たサンプルを用いた qRT-PCR 解析により、*HSP60*、*HSP70*、*HSC70*、*HSP90*、*HSF1* が健康牛のリンパ組織と比較して高い発現量を示すことを明らかにした。腫瘍発生部位において HSP 関連遺伝子の高発現はヒトの腫瘍において多く報告されていたが、BLV 感染による腫瘍についても同様な遺伝子の発現が確認され、*HSF1* が発症において役割を持つ可能性が示唆された。しかしながら、一部の腫瘍組織に関して正常牛と同等の遺伝子発現量を示すものもあり、また各病態期に関する調査を行っていないため、今後より詳細な遺伝子解析を行い、腫瘍の形成と遺伝子の発現の関係性を明らかにしていく必要がある。

## 7.2 BLV-LTR における HSE の保存性と LTR 転写活性機能

HSF1 は HSP の発現を上昇させる転写促進因子としてのみならず、宿主中の様々な遺伝子のマスター制御因子としての機能を持つことが明らかにされつつある。HIV-1 などの一部のウイルスでは、HSF1 を介した反応を利用し、HSF1 がウイルス遺伝子の転写や再活性化に関与している報告がある。BLV に関しては HSP や HSF1 の関与は未報告であったが、本研究の BLV-LTR のダイレクトシーケンスを行い、5'側 LTR より 126-135 番目に HSE 配列を同定した。また、牛由来の HSF1 によって下流遺伝子の転写活性化が生じること、HSE 配列の欠失に夜転写活性が大きく減少することを Luciferase reporter assay によって明らかにした。一方で HSE 配列の繰り返し数の増加により転写活性は上昇することから、HSE 配列の保存性は BLV-LTR において重要な役割を持つことが確認された。さらに HSF1 は Tax による LTR 転写活性も増強させる働きをもち、また HSF1-HSE 反応経路の欠失によって Tax による LTR 転写活性が減少する傾向があることより、HSF1-HSE 反応系は Tax の転写活性機能にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。その機能解析の一端として、HSF1 の下流に位置する HSP90、HSP70 を発現した状態で Tax の LTR 転写活性機能を評価したところ、HSP70 発現時には Tax による LTR 転写活性機能は抑制され、HSP90 発現時には逆に増強されることが確認された。なお HSF1 の共発現によっても同様の結果が得られた。変異型 Tax の発現により HSP70 遺伝子の発現が上昇することが他の研究グループ

のマイクロアレイ解析により明らかにされており、今後の詳細な研究が必要とされる。

### 7.3 BFV 感染牛のウイルス分離と BLV-LTR 転写活性機能

日本国内において BFV の感染状況は調査されておらず、その感染状況については不明であった。牛末梢血に含まれる BLV の感染性の評価で SIA が行われているが、BFV や他のシんシチウム形成ウイルスの混同による誤診の可能性や研究への妨げも指摘されており、より特異性の高い BLV 病原診断法として LuSIA 法が開発された。本研究では、日本国内で初の BFV 分離を行い、分離ウイルスを用いて LuSIA 法を検証することで BFV は BLV-LTR への転写活性機能を持たないことを明らかにし、BLV と鑑別可能であることを示した。現在のところ、BFV は病原性を持たないウイルスとして考えられているが、BFV は宿主ゲノム中に組み込まれるので、免疫力の低下など、宿主側のウイルス感受性へ影響を及ぼす可能性がある。BFV に感染している牛における各種ウイルスの重複感染による病原性の変化などについては明らかにされていない。今後は BFV の宿主ゲノム中への組み込み位置や、他のウイルスとの重複感染による変化を調査する必要がある。本研究の BFV ウイルス分離によってそれらの実験を実施可能にした。

本研究により、未解明であった EBL 発症牛における 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。

## 謝辞

本研究を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本大学大学院獣医学研究科教授 泉對 博 博士 ならびに同准教授 小熊 圭祐 博士に深甚なる謝意を表しますとともに、論文をまとめるにあたり有益なご助言を賜った獣医衛生学研究室 教授 伊藤 琢也 博士、また獣医微生物学研究室 教授 遠矢 幸伸 博士ならびに同研究室 助手 木庭 隼 達 博士に謹んで感謝いたします。本研究を実施する上で牛白血病発症牛の組織検査材料を提供していただきました茨城県西部食肉衛生検査所の皆様、飼育牛から研究材料を採材するにあたり御協力を賜りました獣医産業動物臨床学研究室 専任講師 住吉 俊亮 博士ならびに同研究室助教 大野 真美子 博士、獣医臨床繁殖学研究室 教授 堀北 哲也 博士に心より感謝申し上げます。さらには実験の一部を担当してくださった獣医伝染病学研究室の学部生 諸氏に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、BFV の電子顕微鏡撮影にご協力賜りました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 病理ユニット上級研究員 木村 久美子 博士 に深く感謝申し上げます。LuSIA 法の実施にあたりまして、CC81-BLU3G 細胞を快く提供してくださった国立研究開発法人 理化学研究所 分子ウイルス学研究分野 伊藤 ナノ医工学研究室 研究員 間 陽子 博士ならびに技術指導を賜りました同研究室研究員 佐藤 洋隆 博士に篤く御礼申し上げます。

最後に、私に研究の機会を与え、終始暖かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Afanasyeva EA, Komarova EY, Larsson LG, Bahram F, Margulis BA, Guzhova IV. (2007) Drug-induced Myc-mediated apoptosis of cancer cells is inhibited by stress protein Hsp70. *Int J Cancer*. 121:2615-21.
2. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11: 545-555.
3. Amborski GF, Lo JL, Seger CL. (1989). Serological detection of multiple retroviral infections in cattle: bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine visna virus. *Vet Microbiol*. 20: 247-253.
4. Anckar J, Sistonen L. (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem*. 80: 1089-1115
5. Appleby RC. (1979). Antibodies to bovine syncytial virus in dairy cattle. *Vet Rec*. 105: 80-81.
6. Arainga M, Takeda E, Aida Y. (2012) Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC genomics*. 13: 121.
7. Bansal MP, Singh KP. (1980) Detection of antibodies of bovine syncytial virus among



cattle and buffaloes in India. *Indian J Microbiol.* 20: 198-200.

8. Boothe AD, Van der Maaten MJ, Malmquist WA. (1970) Morphological variation of a syncytial virus from lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Arch Gesamte Virusforsch.* 31: 373-384.
9. Boroughs LK, Antonyak MA, Johnson JL. (2011) A unique role for heat shock protein 70 and its binding partner tissue transglutaminase in cancer cell migration. *J. Biol. Chem.* 286: 37094-37107.
10. Brooks PA, Nyborg JK and Cockerell GL. (1995). Identification of an NF-kappa B binding site in the bovine leukemia virus promoter. *J Virol.* 69: 6005-6009
11. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. (1987) Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49: 347-356
12. Buchberger A, Bukau B, Sommer T. (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol. Cell* 40: 238-252.
13. Bukau B, Weissman J, Horwich A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125: 443-451.
14. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988) Bovine leukemia: facts and hypotheses

- derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med.* 32:149–170.
15. Cann AJ, Rosenblatt JD, Wachsman W, Shah NP, Chen IS. (1985) Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation. *Nature* 318: 571-574.
  16. Ciocca DR, Calderwood SK. (2005) Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10: 86–103.
  17. Dai C, Whitesell L, Rogers AB. (2007) Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.* 130: 1005-10018
  18. Dekoninck A, Calomme C, Nizet S, de Launoit Y, Burny A, Ghysdael J, Van Lint C. (2003) Identification and characterization of a PU.1/Spi-B binding site in the bovine leukemia virus long terminal repeat. *Oncogene* 22: 2882–2896
  19. Derse D. (1987) Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J Virol.* 61: 2462-2471.
  20. Derse D. (1988) Trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *J Virol.* 62: 1115-1119.
  21. Dworniczak B, Mirault ME. (1987) Structure and expression of a human gene coding

for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 15: 5181-5197.

22. German AC, Harbour DA, Helps CR, Gruffydd-Jones TJ. (2008) Is feline foamy virus really apathogenic? *Vet Immunol Immunopathol.* 123: 114-118.
23. Hashimoto K, Baba M, Gohnai K, Sato M, Shigeta S. (1996) Heat shock induces HIV-1 replication in chronically infected promyelocyte cell line OM10.1. *Arch Virol.* 141: 439-447.
24. Hechler T, Materniak M, Kehl T, Kuzmak J, Löchelt M. (2012) Complete genome sequences of two novel European clade bovine foamy viruses from Germany and Poland. *J Virol.* 86: 10905-10906.
25. Ignatenko NA, Gerner EW. (2003) Regulation of the HIV1 long terminal repeat by mutant heat shock factor. *Experimental Cell Research.* 288: 1-8.
26. Itohara S, Takatori I. (1982) Syncytia infectivity assay of bovine leukemia virus *Natl Inst Anim Health* 22: 147-153.
27. Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB, Jefferson B. (1995) A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res.* 59: 271-278.

28. Johnson RH, de la Rosa J, Abher I, Kertayadnya IG, Entwistle KW, Fordyce G, Holroyd RG. (1988) Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol.* 16: 25-33.
29. Johnson RH, Oginnusi AA, Ladds PW. (1983) Isolations and serology of bovine spumavirus. *Aust Vet J.* 60: 147.
30. Jolly C, Morimoto RI. (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 92: 1564-1572.
31. Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. (2001) Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci.* 6: 703-708.
32. Kunihiro M, Fujii H, Miyagi T, Takahashi Y, Tanaka R, Fukushima T, Ansari AA, Tanaka Y. (2016) Heat shock enhances the expression of the human T cell leukemia virus type-I (HTLV-I) trans-activator (Tax) antigen in human HTLV-I infected primary and cultured T cells. *Viruses.* 8, 191.
33. Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. (2009) A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell.* 36: 15-27.
34. Lewin HA, Russell GC, Glass EJ. (1999) Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunol Rev.*

167:145-158.

35. Linial M. (2000) Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* 8: 284-289.
36. Linial ML, Fan H, Hahn B, Löwer R, Neil J, Quackenbush S, Rethwilm A, Sonigo P, Stoye JP, Tristem M. (2005) Retroviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy*. Elsevier Academic Press; London, UK: pp. 421-440.
37. Lucas MH, Roberts DH, Parker BN, Wibberley G. (1986) Spread of bovine syncytial virus in a dairy herd over a two year period. *Res Vet Sci.* 40: 259-263.
38. Ma Z1, Hao P, Yao X, Liu C, Tan J, Liu L, Yang R, Geng Y, Chen Q, Qiao W. (2008) Establishment of an indicator cell line to quantify bovine foamy virus infection. *J Basic Microbiol.* 48: 278-283.
39. Malmquist WA, Van der Maaten MJ, Boothe AD. (1969) Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* 29: 188-200.
40. Merimi M, Klener P, Szynal M, Cleuter Y, Bagnis C, Kerkhofs P, Burny A, Martiat P, Van den Broeke A. (2007) Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy: observations in

Bovine Leukemia Virus-infected sheep. *Retrovirology*. 4, 51.

41. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M. et al. (2012) Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp. Cell Res.* 318: 1946-1958.
42. Pan XY, Zhao W, Zeng XY, Lin J, Li MM, Shen XT, Liu SW. (2016) Heat Shock Factor 1 Mediates Latent HIV Reactivation. *Sci Rep.* 6: 26294.
43. Pluta A, Rola-Łuszczak M, Douville RN, Kuźmak J. (2018) Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *J Virol.* 15: 165.
44. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. (1991) Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 6906-6910.
45. Rawat P, Mitra D. (2011) Cellular heat shock factor 1 positively regulates human immunodeficiency virus-1 gene expression and replication by two distinct pathways. *Nucleic Acids Res.* 39:5879-5892.
46. Re MC, Furlini G, La Placa M.(1989) Rapid detection of HIV-1 in clinical samples by co-culture with heat-shocked cells.*J Virol Methods.* 26: 313-317.
47. Ren A, Yan G, You B, Sun J.(2008) Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer

- cells. *Cancer Res.* 68: 2266-2274.
48. Ritossa F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
49. Ritossa F. (1963) Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 35: 601-607.
50. Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, Schnitt SJ, Whitesell L, Tamimi RM, Lindquist S, Ince TA. (2011) High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 108: 18378-18383.
51. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol.* 13: 1392-1407.
52. Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI. (1991) Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* 5: 1902-1911.
53. Sato H, Watanuki S, Murakami H, Sato R, Ishizaki H, Aida Y. (2018) Development of

a luminescence syncytium induction assay (LuSIA) for easily detecting and quantitatively measuring bovine leukemia virus infection. *Arch Virol.* 163(6):1519-1530.

54. Schlesinger MJ, Ashburner M, Tissieres A. (1982) *Heat Shock from Bacteria to Man.* Cold Spring Harbor Lab, New York.
55. Simon MC, Kitchener K, Kao HT, Hickey E, Weber L, Voellmy R, Heintz N, Nevins JR. (1987) Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. *Mol Cell Biol.* 8: 2884-2890.
56. Tajima S, Aida Y. (2000) The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. *J Virol.* 74: 10939-10949.
57. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. (2004) The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell.* 15: 1254-1261.
58. Ungar-Waron H, Brenner J, Paz R, Moalem U, Trainin Z. (1996) Gamma delta T-lymphocytes and anti-heat shock protein reactivity in bovine leukemia virus



- infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 51: 79-87.
59. Van den Broeke A. (1988) Even transcriptionally competent proviruses are silent in bovine leukemia virus-induced sheep tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 9263-9267.
60. Van der Maaten MJ, Malmquist WA, Cheville NF. (1972) Susceptibility of calves to bovine syncytial virus given by different inoculation routes. *Am J Vet Res.* 33: 1157-1160.
61. Willems L, Gegonne A, Chen G, Burny A, Kettmann R, Ghysdael J. (1987) The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *EMBO J.* 6: 3385-3389.
62. Willems L, Grimonpont C, Kerkhofs P, Capiiau C, Gheysen D, Conrath K, Roussef R, Mamoun R, Portetelle D, Burny A, Adam E, Lefèbvre L, Twizere JC, Heremans H, Kettmann R. (1998) Phosphorylation of bovine leukemia virus Tax protein is required for in vitro transformation but not for transactivation. *Oncogene.* 16: 2165-2176.
63. Woode GN. (1972) Isolation of bovine syncytial virus in Britain. *Vet Rec.* 91: 363.
64. Wu C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11: 441-469.

65. Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. (2007) High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res.* 67: 2373-2381.
66. Zhao X, Jimenez C, Sentsui H, Buehring GC. (2007) Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: evidence for selection pressures in regulatory sequences. *Virus Res.* 124: 113-124.