

論文の内容の要旨

論文発表者氏名：蜂屋佑磨

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機能に関する研究

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。

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 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* 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* 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* 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* 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）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-time PCR (SYBR-Green 法) にて *HSP* 発現解析を行った。対象とした遺伝子は *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* の相対発現量を調べた。その結果、発症牛における各 *HSP* 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* 上流に多数存在している。人免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus-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 <tTTcccGAAa> 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 HSE 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* 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。同様にして FLK-BLV 細胞の BLV から Tax 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 Lipofectamine LTX 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的であり、*HSF1* によって LTR 転写活性化され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* および *HSP90* 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* の単独発現では 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 LTR 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 単独発現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) 遺伝子を持つ 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。

本研究で EBL 発症牛において *HSP* の上昇が認められたものの、腫瘍化によってその発現が上昇したのか、*HSP* により腫瘍化が進行したのかは不明である。しかしながら、BLV の LTR は Tax 非存在下でも宿主由来の転写因子である HSF1 単独で活性化され、さらに HSP70 や HSP90 によっても影響を受けることが示された。BLV の LTR 活性化にはウイルス由来の因子である Tax の関与が大きい、一方で *in vivo* におけるウイルス由来タンパク質の発現は宿主免疫による BLV 感染細胞の排除を招くとの報告もあり、病態後期では Tax の発現が抑えられていることや、Tax の発現は EBL の病態進行に必須ではないとも考えられている。本研究では、HSF1 は Tax と比較すると低レベルではあるが BLV の遺伝子発現を変化させる可能性が示された。また、本研究において国内で初めて分離した BFV は、BLV の LTR の転写活性化は起こさないと考えられる。BFV は病原性を示さないと考えられているが、BFV の感染機序や、BFV の遺伝子発現における HSF1 や HSP の役割などの性状を明らかにすることにより、BLV のみならず様々なレトロウイルスについての理解が深まると考える。