

## 論文内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏名 畠間 真一

指導教官氏名 明石 博臣

### Molecular Biological Studies on Feline Foamy Virus

(ネコフォーミーウイルスの分子生物学的研究)

フォーミーウイルス (FV) は、レトロウイルス科・スプーマウイルス属に分類され、これまでにネコその他、ウシ、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、ヒヒ、アフリカミドリザル、アザラシ、ハムスターなど多くの動物種に、その存在が報告されている。ネコフォーミーウイルス (FFV) は、1969 年に喉咽頭癌のネコリンパ節初代培養細胞から初めて分離され、それ以来世界各国で分離報告がなされた。一般的な感染経路は、唾液や咬傷による個体間の水平感染と、胎盤を介した母子間での垂直感染である。ネコに対する病原性や他の病原因子との相互作用等は、これまでのところ報告されていない。FV に近縁のヒト内在性レトロウイルスの存在も報告されているが、ネコに存在するかは不明である。FFV は、ネコ腎臓由来株化細胞の CRFK 細胞に感染すると、合胞体形成、細胞の泡状化 (これが「フォーミー (泡)」の由来) など、細胞変性効果 (CPE) を誘導するが、その CPE から生き残る細胞も出現し、持続感染状態になる。このように *in vitro* では強力的に CPE を誘導し、*in vivo* では免疫系から終生排除されないにも関わらず病原性が見られないことは、FV の研究により、レトロウイルスの病原性発現機構を解明する上で、大きな手掛かりが得られると思われる。

近年、FV 研究は分子レベルで急速に進みつつあり、レトロウイルス属に分類される他の科と多くの点で違うことが明らかになってきた。レトロウイルス科のウイルスは通常、感染性ウイルス粒子中に RNA のゲノムを持つが、FV は RNA ゲノムではなく逆転写後の DNA ゲノムをも持つ。また FV はレトロウイルス属の中で、ゲノムサイズが一番大きく、構造遺伝子の他にいくつかの調節遺伝子を持ち、非分裂細胞にも感染するという特徴も持つ。一般に病原性が無

く、非分裂細胞にも感染するという特徴は、FV が新しいレトロウイルスベクターの候補として、卓越した安全性と利便性を備えていることを示している。本研究では、FFV の持続感染機構の解明と FFV を骨格とした新しいレトロウイルスベクターシステムを構築することを目指して、転写機構の解析および感染性遺伝子クローンの作製を行った。

## 第一部 脱アセチル化酵素阻害剤（トリコスタチン A）による FFV 持続感染細胞からのウイルスの再活性化

FFV は、生体内で持続感染しており、感染したネコからは終生ウイルスが分離できる。一方、*in vitro* においては、FFV 持続感染細胞株が樹立可能である。この持続感染機構を調べるために、FFV 持続感染細胞株において、FFV の複製に影響を及ぼす因子について、3 株(Coleman, S7801, Sammy-1)の FFV を用いて検討を行った。まずこれら 3 株を CRFK 細胞に感染させ、生細胞からそれぞれの株の持続感染細胞株を樹立した。これらを、ヒストンの脱アセチル化酵素特異的阻害剤であるトリコスタチン A (TA)と Sodium Butyrate、脱メチル化剤である 5-Azacytidine でそれぞれ薬剤処理したところ、TA 処理によって 3 種類の FFV 株の持続感染細胞のうち、Coleman 株持続感染細胞において CPE の誘導と、培養上清中へのウイルス産生量の濃度依存的増大が示された。一方、5-Azacytidine や Sodium Butyrate で処理した場合には、いずれのウイルス株にも目立ったウイルス産生の上昇は見られなかった。また、ヒトフォーミーウイルス (HFV) を持続感染させたハムスター腎臓由来細胞株 (BHK-21) に対しては、いずれの薬剤も効果を表さなかった。したがって、Coleman 株の再活性化には、TA 特異的なヒストンのアセチル化が影響することが確認された。さらにプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、FFV 3 株の内部プロモーター (IP) 領域には大きな違いは認められなかったが、LTR の U3 領域内にあるプロモーター領域(nt. 615-641)では、Coleman 株と比較して、S7801 株や Sammy-1 株に 17 塩基対の欠損が見つかった。TA による Coleman 株 LTR の特異的活性化は $\beta$ -Gal アッセイでも確認され、TA 特異的な Coleman 株のウイルス産生増強作用には、この領域の関与が示唆された。以上の結果から、FFV 持続感染細胞からウイルスの再活性化には、少なくともヒストンのアセチル化と U3 プロモーターの配列が影響していることが推察された。

## 第二部 FFV 急性感染および持続感染における遺伝子発現の比較

FFV 持続感染機構の更なる解明を目指して、急性感染、持続感染および TA による再活性

化状態での各遺伝子の発現パターンを比較した。これまでの報告 (Meiering et al., 2001) では、急性感染で LTR プロモーターおよび IP の両ウイルスプロモーターが活性化されているのに対し、持続感染では高い IP 活性を保持したまま LTR プロモーター活性だけが下がると考えられていた。これは、異なる細胞株を用いてプロモーター活性を比較した結果であるため、同じ細胞株 (CRFK) で急性感染細胞と持続感染細胞を作製し、転写産物の発現パターンを調べたところ、以前の報告とは異なる結果が得られた。LTR プロモーターに由来する 10.5、8.9、7.6 および 5.6kb の mRNA は、いずれの感染細胞でも強く発現していたが、IP に由来する 2.6、2.2 および 2.0kb の mRNA は、持続感染細胞での発現が抑えられていることが分かった。これは、持続感染では IP 活性が抑制されていることを意味している。また、TA による持続感染細胞からのウイルス発現の増強は、IP の活性化を特徴とした急性感染状態への移行ではなく、持続感染の RNA 発現パターンを維持したままゲノムに挿入された LTR プロモーターを直接活性化することによると考えられた。持続感染細胞では、IP に由来する遺伝子翻訳産物の発現も減少しており、このことから IP 活性の抑制が確認された。さらに、*pol*、*env* mRNA の発現パターンにも、急性感染と持続感染で違いが見られたことから、FFV の急性感染と持続感染では複製システムの違いがある可能性が示唆された。これら FFV の転写および翻訳パターンの違いは、*in vivo* における FFV の急性感染と、それに続く持続感染の複製システムの違いを表していると考えられる。

### 第三部 FFV 感染性クローン及び HFV との Env 組換えウイルスの作製と塩基配列の決定

FFV 複製システムの解明と、ウイルスベクターへの応用を目指して、感染性 FFV 遺伝子クローンの作製と塩基配列の決定を行った。FFV Coleman 株持続感染 CRFK 細胞から抽出した DNA をもとに、FFV 特異的プライマーペアを用いた LA-PCR を行い、5' LTR-*gag-pol*、*env-bel-3'* LTR および全長をコードする 3 種類の遺伝子をクローニングした (pSKY1.0、pSKY2.0 および pSKY3.0)。また FFV S7801 株全長をコードするプラスミドも同様に作製し (pSKY5.0)、全塩基配列を決定した。pSKY3.0 および pSKY5.0 は、11,694 および 11,660 塩基をコードし、予想される各遺伝子産物を FFV FUV 株と比較したところ、約 82~97 および 83~97% と高い相同性を示し、HFV-N 株とは約 18~60 および 34~60% であった。各プラスミドは CRFK 細胞に導入後、TA 処理を行うことで感染性ウイルスクローンを効率良く回収でき、pSKY1.0 と pSKY2.0 を同時に導入した場合、導入後 4 日目に  $10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml のウイルスクローンが回収された。一方、全長をコードする pSKY3.0 または pSKY5.0 を用いた場合には、導入後 3 日目に、 $>10^6$ 、 $>10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml の高力価のウイルスをそれぞれ回収することが出来た。さらに、pSKY3.0 の *env* および *bel-1* の 5' 側一部を含む領域を HFV の相同遺伝子

と組換えたプラスミド (pSKY4.0) を作製し、BHK-21 細胞でのウイルス発現を調べたところ、 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml のウイルスを回収できた。ウイルス発現は、培養細胞における CPE の他、PCR、ウエスタンブロッティングによっても確認した。SKY3.0 および SKY4.0 は、それぞれ CRFK、BHK-21 細胞でのみ明瞭な CPE を形成するが、*in vitro* での感染性は広い宿主域にわたることが示された。また SPF ネコに接種後 30 日で、血清中に Gag に対する抗体価と、末梢血リンパ球から *gag*、*env*、*bet-1* に対する特異的遺伝子が検出された。したがってこれらは、*in vivo* においても複製可能であることが示唆された。

本研究によって、ヒストンのアセチル化は、FFV Coleman 株持続感染細胞からのウイルス発現を増加させることが示された。また、FFV の急性感染システムおよび持続感染システムの違いは、FFV ゲノムに存在する 2 種類のプロモーター (LTR と IP) の活性化パターンに大きく表れていたが、TA を FFV 持続感染細胞に作用させた場合に、急性感染の複製システムへ復帰しないことが示された。一方、TA を用いることで FFV DNA クローンから効果的に感染性ウイルス粒子を回収することが可能となり、今後 FFV 転写システムの解明を行う上で有用なツールになると思われる。近年、FV による遺伝子導入用ベクターの高い潜在能力が報告されており、本研究がレトロウイルスベクターの安全性と利便性の向上にも大きく貢献できるものと考えている。