

学 位 論 文 要 旨

氏名 河村 麻紀

題 目：ネコ白血病ウイルス (FeLV) *gag* 遺伝子における組換え現象

論文要旨：

ネコ白血病ウイルス (FeLV) は、レトロウイルス科ガンマレトロウイルス属に分類され、5' -LTR-*gag-pol-env*-LTR-3' のゲノム RNA をコードするウイルスである。ネコに感染が成立すると、ウイルスゲノムの RNA は、逆転写酵素を用いて DNA に変換し、宿主細胞の染色体へ組込まれ、その宿主の個体の中で生涯固定、保持される。FeLV は、リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群や貧血など、多様な悪性疾患を引き起こす病原性ウイルスとして問題となっている。ウイルスの組込み挿入変異による癌遺伝子の発現異常およびウイルス遺伝子による癌遺伝子や内在性 FeLV (enFeLV) との組換えウイルスの出現が、FeLV 感染症の病理発生に関与している。病原性発現を規定するウイルス側の要因については、LTR と *env* 遺伝子に関する解析が進められてきた。多様な病気を引き起こすメカニズムは、はっきりと解明されておらず、いまだ FeLV 感染症の制圧には至っていない。

本研究では、これまで注目されていなかった FeLV *gag* 遺伝子に着目した。レトロウイルスの *gag* 遺伝子は、ウイルスの組立て、出芽、放出および宿主のウイルス抵抗因子との相互作用が知られている。FeLV のみならず、ガンマレトロウイルスの *gag* 遺伝子に関する遺伝的多様性を解析した研究報告はほとんど知られていない。そこで、近年日本で蔓延している FeLV *gag* 遺伝子について、遺伝的多様性とその特徴および病原性との関連性を探る目的で研究を行った。

第一章は、FeLV *gag* 遺伝子の遺伝的多様性を明らかにし、enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV を発見したことを報告する。第二章では、FeLV *gag* 遺伝子において、癌遺伝子の *c-AKT1* との組換え FeLV を発見し、その構造を明らかにしたことを報告する。

第一章：日本の FeLV 陽性家ネコの末梢血液から抽出したゲノム DNA を用いて、FeLV *gag* 遺伝子の分子クローニングを行い、塩基配列を決定した。FeLV *gag* 遺伝子の多重配列を作成後、phyML 法を用いて分子系統樹を作成した。分子系統樹の解析により、FeLV を Genotype I ~ III に分類し、遺伝子型を決定した。そして、FeLV *gag* 遺伝子が、enFeLV *gag* 遺伝子と組換えを生じていることが判明した。Hypermot2.0 および RDP3 のソフトウェアを用いて詳細に組換え FeLV の解析を行った。enFeLV が持つ制限酵素部位 *kasI* および 15bp の繰り返し配列を目印に、組換えの元の FeLV と enFeLV を単離し、組換え FeLV の構造を明らかにした。

FeLV *gag* 遺伝子の組換え部位が、同じ遺伝子型グループのクローン間で一致した組換えパターンが認められ、enFeLV *gag* 遺伝子を持つ組換え FeLV は、水平伝播する可能性が示された。FeLV *gag* 遺伝子における組換え現象が、ウイルスの進化に大きく関与していることを明らか

にした。

第二章：FeLV では、しばしば宿主の癌関連遺伝子 (cellular oncogene; *c-onc*) を取り込む現象 (oncogene capture) が見られる。ウイルスの持つ癌遺伝子は *v-onc* として知られる。FeLV *gag* 遺伝子において、セリン・スレオニンキナーゼである *c-AKT* の oncogene capture を発見し、新規ウイルスである FeLV-*AKT* の単離とその同定を行った。

FeLV 陽性ネコの T 細胞リンパ腫細胞のゲノム DNA を用いて、ウイルスの *gag* 遺伝子を解析した。その結果、FeLV と AKT の融合断片を検出したので、全長 FeLV プロウイルスの単離を行った。そのプロウイルスの塩基配列の解析により、Plekstrin Homology Domain (PH ドメイン) を欠いた *c-AKT1* がウイルス *gag* 遺伝子領域に組込まれた新規な組換えウイルスであることが判明し、FeLV-*AKT* と名付けた。

AKT は最初、マウスのレトロウイルスである AKT8 から発見されたセリン・スレオニンキナーゼであり、PH ドメインを持つ。また、AKT は PI3 キナーゼの重要な標的分子であり、しばしば AKT の恒常的な活性を生じることが知られている。

本研究では、リンパ腫を発症したネコにおいて、PH ドメインを欠いた *c-AKT1* の oncogene capture によって生じた FeLV-*AKT* を発見し、その構造を明らかにした。

これまでの研究では、ガンマレトロウイルス *gag* 遺伝子について、遺伝的多様性などの大規模な研究は行われてはいない。そのため、FeLV *gag* 遺伝子に着眼し、研究を行った。その結果、FeLV を材料として、遺伝的多様性、enFeLV との組換え現象、癌関連遺伝子との oncogene capture を発見した。本研究では、ウイルス進化および発癌のメカニズムを解析する上で重要な発見をしたと考える

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	河村 麻紀
審 査 委 員	主 査：山口大学 准教授 西垣 一男
	副 査：山口大学 教授 木村 透
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：山口大学 准教授 柳田 哲矢
題 目	ネコ白血病ウイルス (FeLV) <i>gag</i> 遺伝子における組換え現象

審査結果の要旨：

ネコ白血病ウイルス (FeLV) は、ガンマレトロウイルスに分類され、家猫に感染すると、リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群や貧血などの多様な悪性疾患を引き起こす。FeLV の遺伝的多様性の解析は LTR と *env* 遺伝子に関して研究報告がある。しかし FeLV を含むガンマレトロウイルスの *gag* 遺伝子における遺伝的多様性の研究は行われていない。本研究は、FeLV の構造遺伝子である *gag* に関して遺伝的多様性に注目し解析を行っている。

第一章では、FeLV *gag* 遺伝子の全長の検出系を樹立し塩基配列を決定した。*gag* 遺伝子の塩基配列のマルチプルアライメントを作成、phyML 法を用いて分子系統樹を作成した。その結果、FeLV *gag* 遺伝子の遺伝的多様性が存在し、遺伝子型を決定することが可能となった。Hypermot2.0 および RDP3 ソフトウェアを用いて FeLV *gag* 遺伝子を解析した結果、FeLV *gag* 遺伝子はしばしば、内在性 FeLV *gag* 遺伝子と組換えを起こしていることが判明した。詳細な組換え体の解析から、これらのウイルスは家猫の体内で出現している可能性を明らかにした。また、一部の組換え体では、家猫間において水平伝播していることも示唆された。

第二章では、FeLV *gag* 遺伝子に細胞性癌関連遺伝子を取りこまれ、新たな癌ウイルスを発見とその同定を行ったことについて発表している。レトロウイルスはしばしば細胞性癌関連遺伝子を取り込む現象 (oncogene capture) が知られている。

本研究では、FeLV 感染によって胸腺型リンパ腫 (T 細胞リンパ腫) を発症した家猫の胸水由来の腫瘍細胞を用いて研究を行った。細胞のゲノム DNA からセリンスレオニンキナーゼであ

(別紙様式第 10 号)

る猫の *AKT1* 遺伝子を FeLV に取り込んだ FeLV-AKT プロウイルスを単離した。塩基配列の解析の結果、v-AKT は *gag-AKT1* の融合した遺伝子で Gag-AKT 融合タンパクとして翻訳されていることを確認した。猫の c-AKT1 cDNA を単離し遺伝子を比較した結果、v-AKT1 は c-AKT1 のプレクストリン相同ドメイン (PHD) を欠いた分子であることが明らかとなった。FeLV v-AKT の構造から Gag のマトリックスのミリスチル化シグナルが存在するため、PHD が欠損していても、FeLV v-AKT は恒常活性化分子であると考えられる。

AKT はマウスのレトロウイルスである AKT8 から最初発見され、ヒトの卵巣がん等では恒常活性化 AKT(E17K)が発見されている。これらの AKT の構造はそれぞれ異なるため、今後 FeLV v-AKT の性状解析によって新たな AKT の性状が明らかになるであろう。

申請者の研究は FeLV *gag* 遺伝子に焦点を当て、ウイルス遺伝子の遺伝的多様性、ウイルスの組換え現象を明らかにし、*gag* 遺伝子に AKT1 の挿入を持った新規 FeLV-AKT の単離同定を行った。本研究において、著しく多様な FeLV 変異株及び、その遺伝的多様性の獲得機構が明らかとなった。これらの知見は、ウイルス生態の理解による感染症制圧戦略に寄与するだけでなく、個別の疾患発症における分子メカニズムの解明においても大きく寄与することが期待される。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値があり、優秀であることを認める。