

ネコ白血病ウイルス (FeLV) *gag* 遺伝子における
組換え現象

山口大学大学院連合獣医学研究科

河村 麻紀

2017年9月

目次

緒言	1
図	11
第一章 : FeLV <i>gag</i> 遺伝子の多様性と組換え FeLV の発見	15
(1) 概要	16
(2) 序論	17
(3) 材料と方法	20
(4) 結果	28
(5) 考察	37
(6) 図と表	40
第二章 : 癌関連遺伝子 <i>c-AKT1</i> との組換え FeLV の発見	54
(1) 概要	55
(2) 序論	57
(3) 材料と方法	60
(4) 結果	67
(5) 考察	72
(6) 図と表	75
結論	79
謝辞	81
参考文献	82

緒言

ガンマレトロウイルスは、ネコ、マウス、コアラなどの哺乳類に感染し、白血病やリンパ腫等の疾患をもたらすことが知られている。そのうち、ネコのガンマレトロウイルスの一つであるネコ白血病ウイルス (FeLV) は、家ネコやネコ科動物の間で伝播することが知られている (Cunningham *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 1999; Hardy Jr, 1993; Hofmann-Lehmann *et al.*, 1996; Jarrett *et al.*, 1964; Leutenegger *et al.*, 1999; Paul-Murphy *et al.*, 1994; Roelke *et al.*, 1993)。FeLV は、1964 年に発見されたが (Jarrett *et al.*, 1964), 現在においても感染症の制圧には至っていない。FeLV 感染症は、ウイルスに対する宿主の免疫応答が不十分な場合において、持続性ウイルス血症を呈し、免疫抑制、貧血、神経障害、繁殖障害、骨髄異形成症候群、リンパ腫、白血病など多様な疾患を引き起こす (Hardy, 1992; Hartmann, 2012; Hisasue *et al.*, 2009; Neil *et al.*, 1991; Niman *et al.*, 1980)。FeLV 感染症に対する特別な治療法はなく、予後不良な感染症である。

週一回以上外出をする日本の動物病院に来院した家ネコを対象として行われた 2008 年度の FeLV 感染調査による陽性率は、12.2%であった (Watanabe *et al.*, 2013)。FeLV 陽性ネコと陰性ネコとが接触しないように飼育すること、FeLV の検査を行うこと、ワクチン接種することなど、ウイルスが伝播しないための予防を中心とした取り組みが行われている。また、ワクチンの開発や様々な疾患を規定する因子を解明するための FeLV の遺伝子解析が進められている。

従来、FeLV の遺伝子解析は、FeLV 株間で特徴的な配列を持つ LTR およびエンベロープをコードする *env* 遺伝子を中心に進められてきており、構造蛋白質をコードする

gag 遺伝子に関する報告は少ない。*gag* 遺伝子は、FeLV 株間ではほとんど変異が見られず、構造蛋白質と病気との関連性はないと考えられてきた。また、ガンマレトロウイルスの *gag* 遺伝子の遺伝的多様性についての詳細な研究報告がないことから、FeLV *gag* 遺伝子に焦点をあて、その詳細な遺伝子解析を行った。

FeLV の構造と生活環

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る。エンベロープを持ち、ゲノムは一本鎖 RNA である。FeLV ゲノムの 5' ,3' 両端には、ウイルスの転写制御を行うプロモーターやエンハンサーとして機能する塩基配列を持った Long terminal repeat (LTR) がある。LTR の内側には、ウイルス粒子を構成する構造蛋白質 (最終的に MA, p12, CA, NC と呼ばれるサブユニットへとプロセッシングされる) をコードする *gag* 遺伝子、プロテアーゼ (Pro), 逆転写酵素 (RT) および組込み酵素 (IN) などのウイルス関連酵素をコードする *pol* 遺伝子、ウイルスの外被膜となるエンベロープ蛋白質をコードする *env* 遺伝子が並んでおり、5' -LTR-*gag-pol-env*-LTR-3' といったゲノム配列となっている (図 1)。

レトロウイルスの生活環は、レトロウイルスのエンベロープ蛋白質が、標的細胞にあるウイルス受容体に結合することで始まる。その結合後に、レトロウイルスは細胞内へ侵入し、ゲノム RNA を細胞内に放出する (脱核)。ゲノム RNA は、逆転写酵素によって二本鎖 DNA に逆転写され、複合体を形成し、核内に移行する。その後、インテグラーゼにより宿主染色体 DNA へ組込まれ、プロウイルス DNA となり、感染が成立する。プロウイルスより転写された RNA の一部はゲノム RNA となり、一部は mRNA として翻訳され、Gag, Pol, Env 蛋白質を合成する。Gag, Pol 蛋白質とゲノム RNA が会合し、

最終的に Env 蛋白質を露出した細胞膜に被われながら細胞膜より出芽し、放出される (図 2)。

内在性ネコ白血病ウイルス (内在性 FeLV : enFeLV)

内在性レトロウイルス (Endogenous retrovirus: ERV) は、古代レトロウイルス感染症の名残と考えられており、親から子へと遺伝的に引き継がれる。また、一般的に、ERV は、宿主ゲノムに内在化した後、変異や欠損等により不活性化すると考えられている。

内在性ネコ白血病ウイルス (enFeLV) は数百万年前に *Felis* 属に侵入したとされる ERV であり (Benveniste *et al.*, 1975; Polani *et al.*, 2010)、家ネコの染色体ゲノム上では、ハプロイドあたり約 6~12 コピー存在していると報告されている (Benveniste & Todaro, 1975; Koshy *et al.*, 1980; Niman *et al.*, 1980; Okabe *et al.*, 1978b; Okabe *et al.*, 1976)。

enFeLV と FeLV との塩基配列の相同性は、80~90%程度である (Pontius *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2005; Roca *et al.*, 2004; Tandon *et al.*, 2007)。また、FeLV と enFeLV の塩基配列の違いは、LTR の U3 および *env* 遺伝子において僅かに認められる (Berry *et al.*, 1988; Casey *et al.*, 1981; Okabe *et al.*, 1978a; Tandon *et al.*, 2008)。

FeLV の系統解析

生物の遺伝情報 (DNA 塩基配列やアミノ酸配列) がどのくらい似ているかを調べることによって、どの程度近縁であるかを知ることができ、分子や細胞レベルにおける生物の進化を理解することが可能となる。DNA 塩基配列やアミノ酸配列を比較して、近

縁なものごとにグループ化していくと、生物が共通祖先から分岐した順序を推定することができる。この分岐順序を枝状に表現したのが分子系統樹である。分子系統樹は、生物間または遺伝子の進化的道筋（系統）を解明する手段として用いられている。

系統解析を行うためには、複数の塩基配列やアミノ酸配列の長さがすべて等しくなるように並べる多重配列整列（マルチプルアライメント）を行う必要がある。マルチプルアライメントの整列が信頼できる場合、ギャップはただの missing data として対処可能であるが、組換え配列は除去する必要がある。

FeLV *env* 遺伝子の解析では、多くの組換えが見つかったが、その組換えのほとんどは、enFeLV *env* 遺伝子との組換えである (Watanabe *et al.*, 2013)。FeLV と enFeLV の *env* 遺伝子は、領域によってはそれらの塩基配列の違いから、FeLV と enFeLV とを区別することができる場合もある。しかしながら、ほぼ相同な塩基配列を持つ領域においては組換えを見つけることは難しい。そのため、組換え FeLV と組換え元と推測される複数の FeLV と enFeLV 塩基配列とを並べ、比較し、目視で確認する作業を行う必要がある。最終的には、コンピュータ解析ソフトを用いて組換え領域と組換え部位を検出し、組換えの有無を決定する。組換えを検出するプログラムソフトとしては、配列の相同性を比較する SimPlot ver. 3.5.1 (Lole *et al.*, 1999) や組換え部位を推測する RDP3 (Martin *et al.*, 2010) などが使用される。系統解析の際は、上記の方法で明らかとなった組換え領域を除去した塩基配列を用いて解析する。

FeLV の遺伝子型

FeLV は、*env* 遺伝子における分子系統解析によって遺伝子型 I, II および III の 3 つに分類されており、日本では、遺伝子型 I と遺伝子型 II のウイルスが蔓延し、欧米

では、遺伝子型 III のウイルスが蔓延している (Watanabe *et al.*, 2013)。

日本の FeLV の多くは、遺伝子型 I に属し、さらに、遺伝子型は clade 1 ~ 7 に分類されている。ウイルスの遺伝子型と地域性には、ある程度の相関が見られ、東日本では clade 1、関西や西日本では clade 2、九州では clade 3 が優勢に蔓延している傾向にある。日本に侵入した FeLV は、日本全国に散らばり、それぞれの地域において、独自にウイルスが進化したと考えられている。(図 3) (Watanabe *et al.*, 2013)。

FeLV のサブグループ

FeLV Env 蛋白質が細胞の受容体に結合することによって、ウイルスの吸着および細胞への侵入が生じる。この過程は、ウイルス感染の第一歩となる。FeLV のサブグループは、FeLV-A、-B、-C、-D、-E および -T の 6 種が知られており、受容体との相互作用に関わる FeLV Env 蛋白質がサブグループを規定する。サブグループの同定と分類は、ウイルス干渉試験や異種細胞における感染の感受性によって行われる (Anai *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2000; Jarrett *et al.*, 1973; Miyake *et al.*, 2016; Sarma & Log, 1973; Takeuchi *et al.*, 1992)。

ネコの間で伝播するウイルスは FeLV-A であり、すべての FeLV 感染症に関わる。他の FeLV サブグループは、FeLV-A が感染したネコの体内において “*de novo*” に出現し、FeLV-A を元として、*env* 遺伝子の変異や ERV との組換えによって生じると考えられている (Jarrett *et al.*, 1978; Jarrett & Russell, 1978; Riedel *et al.*, 1986)。

FeLV-A の受容体は、チアミン輸送体である THTR1 である (Mendoza *et al.*, 2006)。FeLV-B と FeLV-D は、ERV の *env* 遺伝子と組換えを起こしたウイルスであり、FeLV-B は enFeLV、FeLV-D は ERV-DC との組換えウイルスである。FeLV-B の受容体は、無機リ

ン酸輸送体である PIT1 および PIT2 (Anderson *et al.*, 2001; Kavanaugh *et al.*, 1994; Sugai *et al.*, 2001) であり, FeLV-D の受容体は, 明らかになっていない。また, FeLV-C, FeLV-E および FeLV-T は, FeLV-A の Env 蛋白質の変異によって生じており (Donahue *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 2016; Rigby *et al.*, 1992), FeLV-C の受容体は, ヘム輸送蛋白質の FLVCR1 (Quigley *et al.*, 2000; Tailor *et al.*, 1999), FeLV-T の受容体は PIT1 である (Anderson *et al.*, 2000)。FeLV-E の受容体は, 明らかになっていない。

FeLV による病気の発生

FeLV 感染ネコでは, リンパ腫, 白血病, 骨髄異形成症候群, 免疫不全, 貧血など多様な疾患が見られる (Chandhasin *et al.*, 2005; Hartmann, 2012; Hisasue *et al.*, 2009; Mackey *et al.*, 1975; Matsumoto *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 1987; Neil *et al.*, 1991; Overbaugh *et al.*, 1988a; Rohn *et al.*, 1994; Rojko *et al.*, 1979; Tzavaras *et al.*, 1990)。また, それらの血液疾患や免疫疾患に加えて, 呼吸器疾患, 腎疾患, 腸疾患 (Reinacher, 1987; 1989; Watanabe *et al.*, 2013) なども示すことが知られている。

FeLV の各サブグループやウイルス株の特定の遺伝子配列が, 病原性に関与すると考えられている (Chandhasin *et al.*, 2005; Chandhasin *et al.*, 2004; Finstad *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 1992; Nishigaki *et al.*, 2002; Nishigaki *et al.*, 1997)。FeLV-A/61E 株は, リンパ腫を発症し, FeLV-A/clone33 株は, 骨髄異形成症候群や骨髄性白血病の原因となる (Donahue *et al.*, 1988; Hisasue *et al.*, 2009)。FeLV-B は, リンパ系腫瘍や急性白血病などのリンパ造血系腫瘍の原因となる (Sheets *et al.*, 1993;

Tzavaras *et al.*, 1990)。FeLV-C は再生不良性貧血 (Abkowitz *et al.*, 1987; Riedel *et al.*, 1986), FeLV-T は免疫不全の原因となる (Anderson *et al.*, 2000; Rohn *et al.*, 1998)。

FeLV と癌発生のメカニズム

ニワトリに繊維肉腫を発症させるラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus: RSV) が発見されたことにより、レトロウイルスが腫瘍疾患を誘導する癌原ウイルスとして知られるようになった (Martin, 2004)。RSV は、ウイルスのゲノム上に *cellular-oncogene* (*c-onc*) である *c-src* を組込んだウイルスであり、そのようなウイルスに組込まれた癌遺伝子のことを *viral-oncogene* (*v-onc*) といい、上述の場合は *v-src* と呼ばれている。

前述したように、FeLV もまたリンパ腫や肉腫などの腫瘍疾患を発生させる。腫瘍発生のメカニズムとしては *proviral insertional mutagenesis* (図 4A) と *oncogene capture* (図 4B) が知られている。前者では、FeLV が宿主内の *c-onc* (*c-myc*, *fit-1*, *flvi-1*, *flviv-2*, *flit-1*) などの近傍にプロウイルスとして挿入した結果、FeLV LTR の強い転写活性能によって *c-onc* の発現増強がおこり、リンパ腫や悪性腫瘍を発生させる (Fujino *et al.*, 2009; Levesque *et al.*, 1990; Levy & Lobelle-Rich, 1992; Miura *et al.*, 1989; Tsujimoto *et al.*, 1993) (図 4A)。後者では、FeLV と *c-myc*, *tcr*, *notch2* などの *c-onc* との組換えによって生じる *v-onc* の出現によってリンパ腫を発生させ (Braun *et al.*, 1985; Doggett *et al.*, 1989; Fulton *et al.*, 1987; Levy *et al.*, 1984; Rohn *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2014), また、FeLV と *c-fes*, *fgr*, *abl*, *fms*, *kit* などの *c-onc* との組換えによって生じる *v-onc* の出現によって、多発性線維肉腫

を発生させる (Besmer *et al.*, 1983; Besmer *et al.*, 1986b; McDonough *et al.*, 1971; Snyder & Theilen, 1969; Ziemiecki *et al.*, 1984) (図 4B)。

***gag* 遺伝子**

gag 遺伝子は、ウイルス粒子のカプシドを形成する構造蛋白質である。*gag* 遺伝子は、前駆蛋白質の Pr65gag を発現し、発現した Pr65gag ポリ蛋白質はウイルスのプロテアーゼにより、マトリックス (MA または p15)、カプシド (CA または p27)、ヌクレオカプシド (NC または p10) および p12 の 4 つの成熟構造蛋白質に切断される。MA は、カプシドの最も外側の蛋白質層となる。また、MA は膜局在性のミリスチル化シグナルを持ち、ウイルスの出芽および成熟に必須である (Copeland *et al.*, 1988)。CA は、ウイルス粒子のカプシドを形成する主要な構造蛋白質であり、ELISA 法を用いて、FeLV 感染の有無を診断する検査用マーカーとなっている (Hartmann *et al.*, 2001; Lutz *et al.*, 1983)。また、CA は、レトロウイルス間で保存されている Major Homology Region (MHC) を持ち、Gag 多量体化を可能にする主要な決定因子を含んでいる (Derdowski *et al.*, 2004; Gitti *et al.*, 1996; Luban *et al.*, 1992; Mammano *et al.*, 1994; Wang & Goff, 2003)。NC は、RNA 結合ドメインである Cis-His 配列の Zinc ドメインを含み、ウイルスゲノム RNA 二量体と結合し、ヌクレオカプシドを形成する (Gorelick *et al.*, 1996; Katz & Jentoft, 1989; Prats *et al.*, 1990)。p12 は、細胞の ESCRT 機構をリクルートするための L ドメインとして知られており、PPPY, PSAP のモチーフを含み、効率的なウイルスの放出に必要である (Bouamr *et al.*, 2003; Martin-Serrano *et al.*, 2003; Rein *et al.*, 1986; Yuan *et al.*, 1999)。マウス白血病ウイルス (MLV) において、p12 や MA は、*gag* 遺伝子の中で比較的多样

性があることが知られており、反対に RNA と作用する CA や NC は、多様性が低いことが知られている (Aziz *et al.*, 1989; Pozsgay *et al.*, 1993)。

その他、Pr65gag と同じリーディングフレームの上流にある glycoGag が、ガンマレトロウイルス間で保存されている (Fujisawa *et al.*, 1997)。この glycoGag は、一般的に CUG を開始コドンとし、88 のアミノ酸のシグナルペプチドからなる II 型膜貫通蛋白質である。MLV に存在する glycoGag は、ウイルスの放出を増強することができる (Low *et al.*, 2007; Nitta *et al.*, 2010)。また、それは、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染力を増強させるアクセサリ蛋白質の一つである Nef と同様な機能を持つことが知られている (Pizzato, 2010; Usami *et al.*, 2015)。FeLV における glycoGag は、M-MLV とは異なる開始コドン AUG を持つが (Neil *et al.*, 1980), M-MLV と同様な機能を有するかどうかは分かっていない。

gag 遺伝子は、宿主ウイルス抵抗因子 Fv1 (Jolicoeur & Rassart, 1980) および TRIM5 α (Stremlau *et al.*, 2004) と相互作用することが知られている。Fv1 は、宿主の内在性レトロウイルス *gag* 遺伝子である (Best *et al.*, 1996)。それは、Friend-MLV (F-MLV) 抵抗性遺伝子として知られ、標的細胞に侵入したウイルスの逆転写後に作用し、プロウイルスの組込みを阻害する (Jolicoeur & Rassart, 1980)。また、Fv1 はマウスのウイルス感受性を制御することが知られている (Best *et al.*, 1996; Lilly, 1970)。NIH Swiss マウスの系統は、遺伝子型 $Fv1^{n/n}$ を持ち、BALB/c マウスの系統は、遺伝子型 $Fv1^{b/b}$ を持つことで、同種指向性ウイルスの特定のマウスに対する感受性に差が生じる。NIH Swiss マウスは、B-トロピック MLV 株 (B-MLV) に高い感受性を示し、BALB/c マウスの B-MLV 感受性は低い。反対に、BALB/c マウスは、N-トロピック MLV 株 (N-MLV) に高い感受性を示すが、NIH マウスの N-MLV 感受性は低い (Steeves & Lilly, 1977)。

Fv1のターゲットは、ウイルスのCAであり、マウスのウイルス感受性は、ウイルスCA蛋白質内のアミノ酸残基に特異的に依存する。

ヒトではFv1のような活性を示すRestriction factor 1 (Ref1) があり (Towers *et al.*, 2000), 現在ではTripartite motif protein 5 (TRIM5 α) として知られている (Hatzioannou *et al.*, 2004; Keckesova *et al.*, 2004; Perron *et al.*, 2004; Yap *et al.*, 2004)。TRIM5 α は、アカゲザルのHIV-1ウイルスへの感染を抑制する因子として発見された (Stremlau *et al.*, 2004)。Fv1およびヒトTRIM5 α の両方に対するウイルス感受性は、CAアミノ酸残基の110番目のアミノ酸によって決定され、アルギニン(R)がN指向性およびグルタミン酸(Q)がB指向性を示す (Kozak & Chakraborti, 1996; Towers *et al.*, 2000)。

FeLV *gag* 遺伝子については、網羅的なゲノムの解析報告はなく、遺伝的多様性、遺伝子の特徴や機能、疾患との関連性および抵抗性因子との相互作用などは知られていない。そのため、本研究では多くの野外サンプルを用い、FeLV *gag* 遺伝子についての詳細な解析を行った。

☒

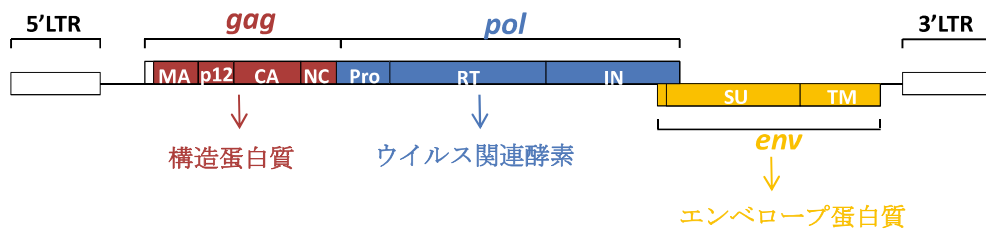


図1 FeLVのプロウイルスの構造模式図

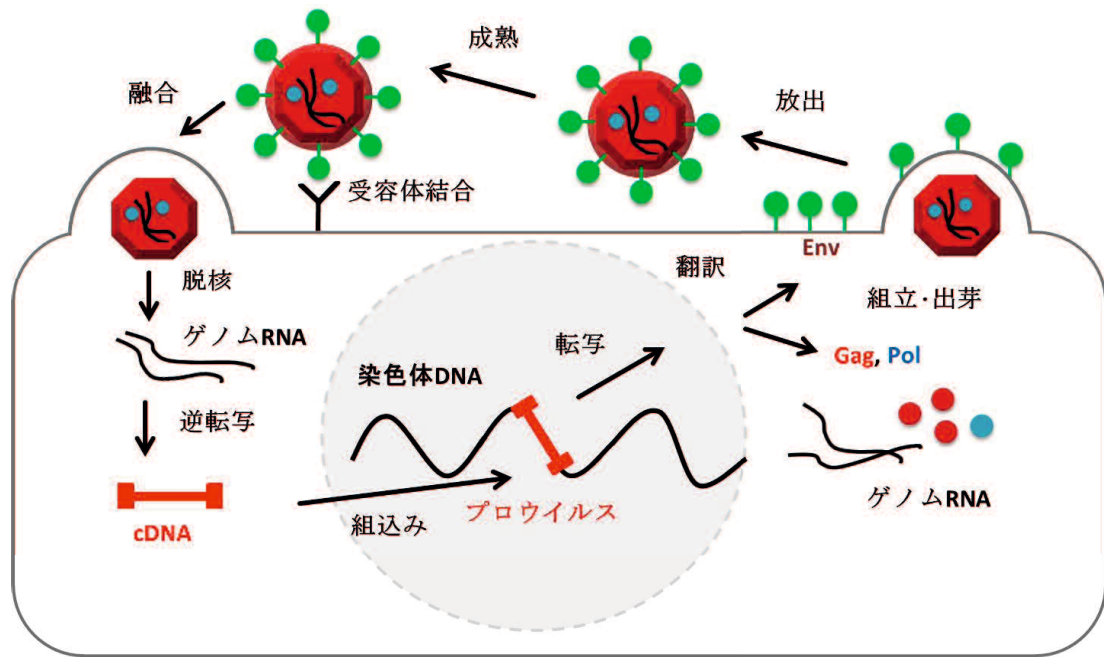


図2 FeLVのウイルス粒子と生活環の模式図

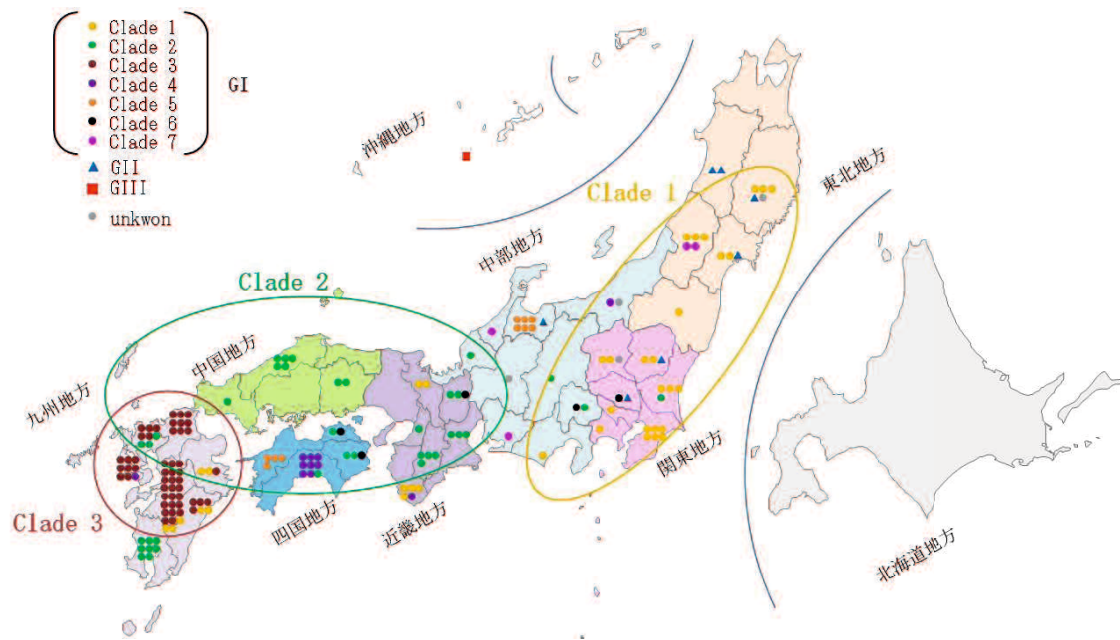


図3 日本における FeLV の遺伝子型の分布図(Watanabe *et al.*, 2013)

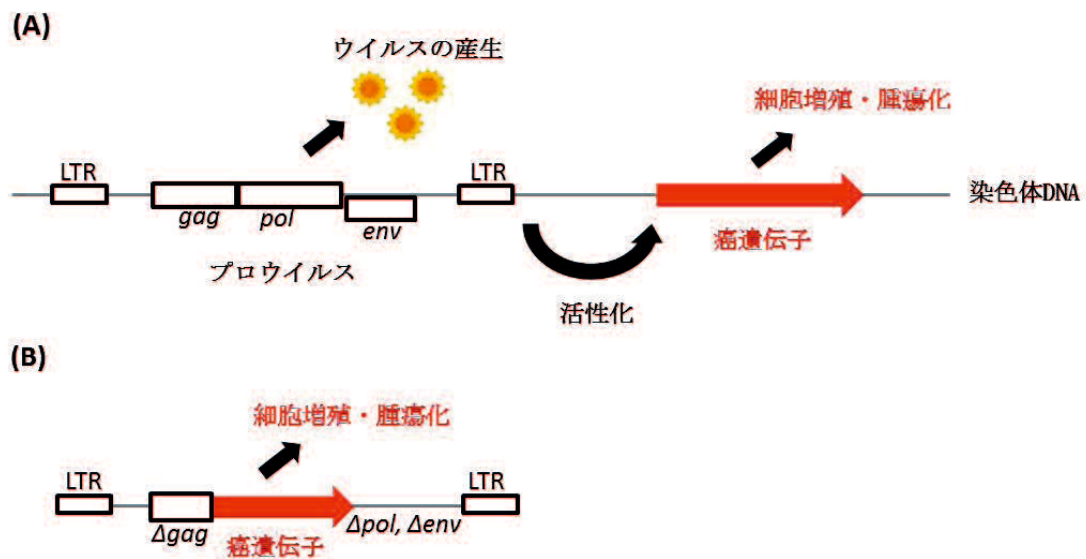


図 4 FeLV における腫瘍メカニズム

- A 癌遺伝子近傍へのプロウイルス挿入による腫瘍化
- B 癌遺伝子のプロウイルスへの組込みによる腫瘍化

第一章

FeLV *gag* 遺伝子の多様性と組換え FeLV の発見

(1) 概要

ネコ白血病ウイルス (FeLV)は、家ネコやネコ科動物の間で伝播し、リンパ腫、白血病、骨髄異形成症候群、免疫不全、貧血などの多様な疾患を引き起こす。その一方、すべての家ネコのゲノム中には、そのウイルスとほぼ同じ塩基配列を持った非感染性の内在性 FeLV (enFeLV)が存在する。FeLVは、宿主のゲノムと組換えを起こし易い特徴があり、FeLV *env* 遺伝子と enFeLV *env* 遺伝子との間での組換えによって、FeLV サブグループ B (FeLV-B) が出現する。FeLV-B の出現は、白血病やリンパ腫を発生するリスクを上げると考えられている。また、FeLV-B は、多様な組換えパターンが検出される一方で、同じ系統に属する組換え FeLV の株間に、組換え部位の一致が確認されないことから、伝播している可能性は低いと考えられている (Watanabe *et al.*, 2013)。

本研究では、FeLV *gag* 遺伝子の遺伝的多様性および enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の存在を明らかにし、また、その組換え FeLV が伝播している可能性を示した。EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の場合は、同じ系統に属する組換え FeLV の株間に組換え部位の一致が認められたことから、伝播している可能性がある。一方で、同じ FeLV 感染個体において、非組換え FeLV *gag* 遺伝子と組換え FeLV *gag* 遺伝子が同時に検出された。また、組換え FeLV の元株の enFeLV と同様な塩基配列を持つ enFeLV が、組織において実際に発現しているかどうかを確認したところ、脾臓と PBMC において発現していることを確認した。それらのことにより、enFeLV との組換えは *de novo* に生じる可能性も示された。

(2) 序論

ネコ白血病ウイルス (FeLV) は、ネコの間で伝播し (Hardy Jr, 1993; Jarrett *et al.*, 1964), 腫瘍性および非腫瘍性疾患などの多様な疾患を引き起こすウイルスとして知られている (Hartmann, 2012; Hisasue *et al.*, 2009)。持続性ウイルス血症を呈した家ネコは、一般的に数年以内に死亡するので、獣医臨床上極めて重要な感染症の一つである。

以前に、渡部らが FeLV *env* 遺伝子に対して、包括的な遺伝子解析を行い、それらの系統や構造変異の特徴を明らかにした。日本の FeLV は、遺伝子型 GI および GII に分類され、西洋の FeLV は、遺伝子型 GIII に分類される。そのうち遺伝子型 GI は、1 から 7 の clade に分類される (Watanabe *et al.*, 2013)。本研究では、ウイルスの構造蛋白をコードする *gag* 遺伝子の特徴を明らかにすることを目的に研究を行った。

家ネコのゲノム中には、FeLV とほぼ同じ塩基配列を持つ近縁な内在性 FeLV (enFeLV) が、ハプロイドあたり 6 から 12 コピー存在する (Benveniste & Todaro, 1975; Koshy *et al.*, 1980; Niman *et al.*, 1980; Okabe *et al.*, 1978b; Okabe *et al.*, 1976)。FeLV と enFeLV の塩基配列間では、非翻訳領域の転写活性を担う LTR U3 領域のみが非相同性配列となっている。その非相同性配列によって、FeLV と enFeLV は区別される (Berry *et al.*, 1988; Casey *et al.*, 1981; Okabe *et al.*, 1978a)。enFeLV は、家ネコのゲノム中にプロウイルスとして存在し、親から子へと遺伝的に伝わる内在化したレトロウイルスである (Benveniste & Todaro, 1975; Koshy *et al.*, 1980)。enFeLV は数百万年前に、家ネコの共通祖先の生殖系に侵入したと考えられている (Masuda *et al.*, 1996)。その後、ウイルスゲノムの欠損、挿入が生じることによって、非感染性のレ

トロウイルスになったと考えられている (Benveniste *et al.*, 1975; Livingston & Todaro, 1973; Roca *et al.*, 2004)。EnFeLV の一部は、完全長の *gag* と *env* 遺伝子の領域を持つ場合もあるが、その場合においてもフレームシフトやナンセンス変異によって、感染性は失われている。(Berry *et al.*, 1988; Mullins & Hoover, 1990)。

レトロウイルスの組換えは、ウイルスの生物活性あるいは病原性を変化させるような全く新しい形質を獲得する役割を持ち、また、複製エラーによる突然変異と合わさって、大きな遺伝的多様性を獲得する (Charini *et al.*, 1994; Khatchikian *et al.*, 1989)。

レトロウイルスの組換えのメカニズムは、2つの塩基配列の似た RNA 分子間の逆転写酵素による鋳型の乗り換え (template switch) であり、copy-choice と呼ばれている (Delviks-Frankenberry *et al.*, 2011)。その組換えウイルスの発生は、複製過程において高頻度に生じる (Hu & Temin, 1990a; b; Kawai & Hanafusa, 1972; Linial & Brown, 1979; Vogt, 1971; Wyke & Beaman, 1979)。

組換えレトロウイルスが注目されるのは、病原性が、組換え元のレトロウイルスよりも増強する場合があるからである。特に、ヒトの間で流行している HIV-1 は、サブグループ株間での組換えウイルスが、世界中に大流行する能力を持つとして注目され、circulate recombinant form (CRF) と呼ばれている (Robertson *et al.*, 2000)。ちなみに、FeLV によるサブグループ間での組換え FeLV は見つかってはいない (Watanabe *et al.*, 2013)。

ガンマレトロウイルスによる *gag* 遺伝子の組換え現象は、実験感染により生じた Mink cell focus-inducing (MCF) ウイルスで知られている (Evans & Cloyd, 1984)。そのウイルスは、Friend マウス白血病ウイルス (F-MLV) 株の 5' 末端側の *gag* 遺伝子

領域の一部に、NFS マウス由来の内在性 MLV の遺伝子を持つ。FeLV に関しては、骨髄性白血病を自然発症した家ネコから発見された FeLV-GM1 (pGMB-3:Accecion No. D13922) 株がある。その分子クローンは、自律増殖能欠損型の FeLV-B であり、*gag* 全長の解析データはないが、LTR U3 から *gag* 遺伝子の上流までの一部のシーケンス解析およびサザンブロットによる制限酵素マップで解析されており、FeLV *gag* 遺伝子の一部に enFeLV と似た塩基配列を持つ (Tzavaras *et al.*, 1990)。

FeLV は、宿主のゲノムと組換えを生じ易い性質を持っている。ゲノムの組換えは、特に、enFeLV *env* 遺伝子との間で起こりやすく、その組換えによって FeLV-B が出現することが知られている (McDougall *et al.*, 1994; Overbaugh *et al.*, 1988b)。FeLV-B は、ネコの個体の中で *de novo* に生じ、その発生は、白血病やリンパ腫を発生するリスクを上げる。FeLV-B が水平伝搬しているか否かについては、はっきりしていない。FeLV-B は、伝播しているという報告 (Stewart *et al.*, 2013) もあるが、一般的には、FeLV-B は、ネコの間で伝播しないと考えられている。網羅的な *env* 遺伝子の解析データからは、伝播を示すような結果は得られなかった (Watanabe *et al.*, 2013)。

FeLV の組換え現象は、*env* 遺伝子における報告はあるが、*gag* 遺伝子の領域についてはあまり良く知られていない。そこで、第一章では、野外株による FeLV *gag* 遺伝子の分子系統解析によるウイルス *gag* 遺伝子の構造解析ならびに遺伝的多様性について述べる。

(3) 材料と方法

FeLV *gag* 遺伝子の分子クローニングと遺伝子解析

所属研究室の先行研究において、FeLV の遺伝子型は、FeLV p27 抗原陽性の家ネコの血液サンプルの染色体 DNA から単離した FeLV *env* 遺伝子を用いて決定された (Watanabe *et al.*, 2013)。本研究においては、遺伝子型が決定された症例のうちの 78 症例の染色体 DNA を用いて、全長 FeLV *gag* 遺伝子の検出およびその分子クローニングを行った。始めにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、全長 FeLV *gag* 遺伝子の DNA 増幅産物を得た。PCR 反応は、ポリメラーゼの Prime STAR HS (TaKaRa) もしくは KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan) を使用し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて行った。Primer は、外来性 FeLV に特徴的な FeLV long terminal repeat (LTR) U3 領域 (Rohn & Overbaugh, 1995) と *pol* 遺伝子の protease 領域で作成した。また、末端に制限酵素サイトを付加した。Sense primer は Fe-23S (5' -AGGGATCCCAGCAGAAGTTTCAAGGCCACT-3') または Fe-78S (5' -AGAGATCTCAGCAGAAGTTTCAAGGCCACT-3') を用い、reverse primer は Fe-48R (5' -TTGAATTCCYGTGGCTCCTTGCACC-3') を使用した。Prime STAR HS の反応条件は、98°C10 秒、62°C30 秒、68°C2 分を 30 サイクル行った。KOD Fx Neo の反応条件は、94°C2 分のプレヒーティング、98°C10 秒、65°C30 秒、68°C1 分 45 秒を 30 サイクル行った。PCR 反応物は、1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液で染色後、UV イルミネータで可視化し、撮影した。次に、PCR 反応物を pCR[®]4Blunt-TOPO[®] vector (Zero Blunt Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen)、あるいは PCR 反応物を制限酵素 *EcoRI*, *BamHI* にて処理後、pBluescript II KS (-) phagemids vector

(stratagene)にライゲーションをした。ライゲーション反応物は、EcosTM Competent *E. coli* (Nippomgene) にトランスフォーメーションし、アンピシリン培地にて培養後、プラスミドを精製した。得られたプラスミドのクローニング部分 (LTR U3 *gag-pol*) については、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc.) を用いて、塩基配列を決定した。

FeLV *gag* 遺伝子の分子系統解析

FeLV と enFeLV の参照配列は、NCBI から取得した。使用した FeLV の参照配列は、FeLV-A/clone33, FAIDS, FRA, FeLV-B/2518, 4314, FeLV-D/TY26Le5, ON-T で、enFeLV の参照配列は enFeLV/AGTT, GGAG である。分子系統解析の前に、上記の参照配列と単離した FeLV *gag* 遺伝子あるいは NCBI で取得した *env* 遺伝子(表 1)とのマルチプルアライメントを行った。マルチプルアライメントは、系統解析ソフト SEAVIEW v4.3.0(Gouy *et al.*, 2010)にある Muscle(Edgar, 2004)を用いて作成し、整列の誤りは目視で補正した。系統推定には、形質状態法である最尤法 (Maximum Likelihood Method, ML 法)(Felsenstein, 1981)を用いた。最尤法は、SEAVIEW に添付されている PhyML(Guindon & Gascuel, 2003)を用いた。塩基置換モデルは、一般時間可逆 (General Time Reversible, GTR)モデル、樹形探索は NNI (Nearest Neighbor Interchange)法で行い、各ノードの分岐信頼度は近似的尤度比検定 (aLRT)(Anisimova & Gascuel, 2006; Rodriguez *et al.*, 1990)により算出した。それぞれの系統樹は、enFeLV をアウトグループとして、MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 5)(Kumar *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2011)で作成した。

EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の検出

表 1 の系統解析に用いた FeLV *gag* 遺伝子 (89 塩基配列) のマルチプルアライメントと組換え解析プログラムソフトを使って、組換え FeLV の検出を行った。組換え解析プログラムソフトは、DNA 塩基配列における組換えイベントの統計的同定を行う RDP3 解析ソフト (Martin *et al.*, 2010) を用い、組換え領域を視覚化した (図 3)。RDP3 は、網羅的な塩基配列の中から、潜在的な組換え領域を含む塩基配列を探るために、組換え元となっている 2 つの塩基配列と組換えを含む塩基配列とが、どの程度一致しているか統計的な評価を行うプログラムソフトである。2 つかそれ以上のアルゴリズムで、同じ組換えイベントが見つかった場合、組換えイベントの確からしさを証明する。本解析では、7 つのアルゴリズム (RDP (Martin *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2005b), GENCONV (Padidam *et al.*, 1999), Bootscan (Martin *et al.*, 2005a; Salminen *et al.*, 1995), MaxChi (Posada & Crandall, 2001; Smith, 1992), Chimera (Posada & Crandall, 2001), SiScan (Gibbs *et al.*, 2000), and 3SEQ (Boni *et al.*, 2007)) を用いて、仮想の組換えイベントを検出した。

次に、FeLV *gag* 遺伝子の塩基配列と参照塩基配列との相似性を可視化するために、組換え領域が、すべてのクローンで検出された GI/1, GI/5 の塩基配列 (表 1) と RDP3 で推測された各 enFeLV を用いて、塩基配列の比較を行った (図 6)。塩基配列の比較は、HIV-1 の抗ウイルス因子 APOBEC の高頻度変異を検出するために開発された、変異部位の解析ソフトである Hypermut2.0 (Analysis & Detection of APOBEC-induced Hypermutation 2.0) (Rose & Korber, 2000) を使用し、enFeLV の塩基配列と類似した塩基配列の領域を視覚化した (図 6)。具体的には、参照塩基配列と異なる対照塩基配列の一塩基の変異データをプロットした (図 6)。組換えの結合部と変異部位の詳細を

確認するために、対照配列と比較した際の塩基のミスマッチをカラーコード化された垂直線でプロットし、相似性の特徴を表した(図 6)。

組換え FeLV を持つ家ネコからの組換え元の enFeLV と FeLV *gag* 遺伝子の検出

組換え FeLV を持つ家ネコ (症例 No. 19) の染色体 DNA を用いた。症例 No. 19 の家ネコは、FeLV 抗原陽性の 6 才の雄であり、歯肉炎、口内炎の病歴を持つ。この症例の染色体 DNA から、組換え元の enFeLV と FeLV の *gag* 遺伝子を検出するために、組換え FeLV の enFeLV 配列中にある特徴的な配列と制限酵素部位を探索した。その特徴的な配列と制限酵素部位は、DDBJ/EMBL/GenBank に登録された既知の enFeLV と本研究で得た FeLV *gag* 遺伝子の塩基配列とのマルチプルアライメントを行い、比較した。制限酵素部位は、Genetyx_version8 のアプリケーションソフトを用いて確認をした。enFeLV と FeLV の検出は、FeLV と enFeLV との識別可能な 5' LTR U3 領域の塩基配列を目印に行った (Casey *et al.*, 1981; Okabe *et al.*, 1978a)。症例 No. NG19 の家ネコの染色体 DNA から組換え元の enFeLV *gag* 遺伝子を獲得するために、以下の primer を使い、PCR を行った。Sense primer (5' -TGGATCCGACCCCTGTCATAAT-3') は、以前に、McDougall, A. S. らの研究 (McDougall *et al.*, 1994) に使用された enFeLV の LTR U3 領域に作成された特異的な既知の primer に、制限酵素 *Bam*HI のリンカーを付加した Fe-131S を用いた。Reverse primer は、FeLV の分子クローニングに使用した際の 5' 側の *pol* 遺伝子に作成した Fe-48R を用いた。LTR U3 領域から *pol* 遺伝子領域までを TOPO vector に分子クローニングし、約 2.6kbp の enFeLV *gag* 遺伝子全長の配列を含むプラスミドを単離した。そのプラスミドの中から、組換え FeLV の enFeLV 内に存在する特徴的な 15bp の triple direct repeat を含む塩基配列の領域があるかどうかを確認した。そ

の確認のために, triple direct repeat 前後の配列に作成した Fe-39S sense primer (5' -GGTTCGTCGGTTCCTACCC-3') と Fe-128R reverse primer (5' -TTTGGGGAGAACGGGGTAGA-3') を用いて, PCR 法で増幅した。得られた PCR 産物は, 2%アガロースゲル電気泳動し, triple direct repeat を持つ組換え FeLV と比較を行い, 挿入塩基の有無を確認した。その triple direct repeat の挿入塩基を含んだ塩基配列を決定し, 組換え元の enFeLV と仮定した。組換え元の FeLV *gag* 遺伝子は, 症例 No. NG19 の染色体 DNA から, FeLV を FeLV 検出用 primer の Fe-23S と Fe-48R を用いて PCR で増幅後, TOPO vector を用いて分子クローニングし, プラスミドを単離した。その単離したプラスミドを, enFeLV 領域に特異的な制限酵素 *KasI* で処理し, そのうちの *KasI* 部位を持たないプラスミドの塩基配列を決定し, 組換え元の FeLV と仮定した。仮定した組換え元の enFeLV, FeLV と組換え FeLV の 3 つの塩基配列を用いて, RDP3 のアプリケーションソフトにある Boot-scanning 解析を行い, 組換え元の enFeLV と FeLV を決定した。

本研究でシーケンスによる塩基配列決定に用いた primer は, sense primer (Fe-39S, Fe-54S : 5' -ACGGGTGTCTGATGTCTGGA-3' , Fe-80S : 5' -CCTTTATCGCCAGTTGCTGTTAG-3'), reverse primer (Fe-86R : 5' -CCTGGGCCTCAGGGTCATA-3' , Fe-92R : 5' -GTGGTCGAGGGTGAGGCTTA-3') である。

組換え FeLV のウイルス分離

組換え FeLV が伝播するかどうかを確認するために, 組換え FeLV を持つ家ネコの末梢血単核球を FeLV 感受性の細胞に感染させた。その際に得られたウイルス分離株中に, enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV が検出されるかどうかを確認した。

FeLV 陽性家ネコ（症例 No. PI）の血液から末梢血単核球を分離および染色体 DNA を単離した。その後、PCR 法によって FeLV *gag* 遺伝子を増幅し、FeLV/gPI-1 の clone を得た。gPI-1 は、前述の分子系統樹作成に用いた塩基配列と RDP3 の組換え解析ソフトを用いて、内在性の組換え領域を含む組換え FeLV であることを確認した。次に、組換え FeLV/gPI-1 の clone を含む家ネコ（症例 No. PI）の末梢血単核球を FeLV 感受性であるネコの繊維芽細胞（AH927 細胞）と数週間共培養した後、AH927 細胞から染色体 DNA を単離し、組換え FeLV が検出されるかどうかを確認した。PCR 法によって、FeLV *gag* 遺伝子を増幅し、AgPI clone を得た。上記の gPI-1 と同様な組換え解析を行い、組換え FeLV であることを確認した。

EnFeLV *gag* 遺伝子の発現

組換え FeLV の元株の enFeLV が、FeLV 非感染家ネコにおいて、ネコの体内で発現しているかどうかを確認するために、Specific pathogen-free cat (症例 No. SPF cat-1) 由来の末梢血単核球および脾臓組織をホモジナイズし、RNAiso Plus (Takara) を用いて Total RNA を抽出した。その抽出した Total RNA を Recombinant DNaseI (Takara) で処理した。その後、PrimeScrip[®] II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて RT-PCR を行い、1st strand cDNA を合成した。その合成した cDNA は、KOD Fx Neopolymerase (TOYOBO), 前述した Fe-54S sense primer と Fe-86R reverse primer を用いた PCR 法によって、組換え元の enFeLV に特徴的な 15bp の triple direct repeat の塩基配列を含む enFeLV *gag* 遺伝子の増幅を行った。PCR 産物は、1%アガロースゲル電気泳動し、分子クローニングを行い、塩基配列を決定した。

完全長 enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV における p27 抗原の検出

FeLV の感染の有無を判定するために、ELISA 検査 kit (IDEXX Laboratorres, Inc.) が用いられる。その検査 kit は、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) という抗原と抗体の結合反応により色が発色するという原理を利用している。Kit 本体には予め FeLV の抗体が付着しており、検査液中に FeLV 抗原があった場合に結合し、発色する。発色した検体を FeLV 感染の陽性と判定する。

組換え FeLV を持つ家ネコ (症例 No. 19) から得られた完全長 enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV (FeLV/gNG19_RC (RC)) の p27 蛋白質の抗原検出を確認するために、分泌蛋白質のシグナルペプチドを有する Fc 融合蛋白質 (Fc-Fusion protein) の pFUSE-hIgG2-Fc2 (IL2ss) (InvivoGen) を用いて、Fc-Fusion plasmid を作成し、p27 蛋白質を発現させた。コントロールとして、組換え元の FeLV/gNG19-10 (WT) と Fc-Fusion plasmid (Empty) を組換え FeLV (RC) と同様に、Fc-Fusion protein を作成し、発現させた。コントロールとなる組換え元の enFeLV/engNG19-4p_SH は、組換え FeLV と同様な配列であるため、Fc-Fusion plasmid は作成していない。

60mm dish に前日培養したヒト胎児腎細胞由来の細胞 (293T) に、組換え FeLV (RC) , 組換え元の FeLV (WT) , Fc-fusion plasmid (Empty) の 3 つのプラスミド各 8 μ g と 20 μ l の Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を使って、トランスフェクションした。その 2 日後に培養上清を回収し、上清中の FeLVp27 抗原を ELISA 検査 kit (IDEXX Laboratorres, Inc.) を用いて検出した。また、培養上清 1ml を哺乳動物由来の IgG の Fc 領域に特異的に結合する Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) と混合し、室温で 2 時間、ゆっくり攪拌した。その後、14800rpm で 1 分間遠心分離し、Lysis Buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 2mM EDTA,

1mM Na₃V0₄, 1g/ml aplotinin, 1g/ml leupeptin)を用いて沈殿した Fc-Fusion protein を3回洗浄した。Fc-fusion protein に4×Sample Buffer(2ME+)を15 μ l 混合し, 100°C で, 5 分間インキュベーション後, 14800rpm で2 分間遠心分離した。その遠心分離後の上清 10 μ l を10% mini gel (Oriental Instruments)に加え, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動し, 培養上清中の蛋白質を分離した。泳動後のゲルを PVDF メンブラン (Immobilon-P Transfer Membrane 0.45m, Millipore) へ転写し, ブロッキング溶液 (5% 脱脂粉乳, TBS-T) で処理した。

Fluorescein-Labeled Antibody To Human IgG (Fc) (KPL) をメンブランに添加後, 4 °Cで一晩インキュベーションをした。その後, メンブランの洗浄を行い, 20×LumiGLO (R) Reagent and 20×Peroxide (Cell Signaling Technology)化学発光基質を用いて, Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJI PHOTO FILM. CO. LTD.) でシグナルを検出した。

(4) 結果

Genomic PCR による FeLV と enFeLV *gag* 遺伝子の検出

日本で流行している FeLV が、遺伝的にどのような特徴を持ち、同時にどのような変異が生じているかを調査するために、*gag* 遺伝子を標的とした PCR 法を樹立し、分子疫学的解析を行った。

完全長 FeLV *gag* 遺伝子の解析を行うため、FeLV 特異的な 5' 末端側の LTR U3 の 274bp を含んだ領域から *pol* 遺伝子の一部、157bp を含んだ領域までの約 2.4kbp の DNA 断片を増幅した (図 1A)。

FeLV *gag* 遺伝子を検出する PCR 法の有効性を確かめるために、FeLV 感染および非感染 AH927 細胞を用いて、FeLV *gag* 遺伝子の検出を行った。FeLV 感染細胞株 (AH927 細胞の FeLV-A/clone33, Glasgow1, FeLV-B/GA, FeLV-C/ Sarma 感染) のみ、FeLV *gag* 遺伝子が増幅された (図 1B)。上記の PCR 法の感度を検討したところ、検出感度は 6.06×10 コピー数であった (図 1C)。また、FeLV 抗原陽性および陰性の家ネコの染色体 DNA を用い、FeLV *gag* 遺伝子が増幅されるかどうかを検証した。FeLV 陽性家ネコのみ、約 2.4kbp DNA 断片が検出された (図 1D)。これらの DNA 断片を分子クローニングし、シーケンスによって塩基配列の決定を行い、FeLV であることを確認した。得られた塩基配列を、一般的に、日本の FeLV の参照配列として用いられている FeLV-A/clone33 の塩基配列と比べたところ、相同性は約 93~99%であった。

EnFeLV *gag* 特異的 PCR 法では、FeLV 非感染の AH927 細胞で DNA 断片の増幅を確認した (Data not shown)。また、FeLV 抗原陽性の家ネコ (症例 No. NG19) の染色体 DNA から enFeLV *gag* 遺伝子を分子クローニングし、シーケンスによって塩基配列の決定

を行った。症例 No. NG19 の家ネコの染色体 DNA から 3 つの enFeLV *gag* 遺伝子の塩基配列 (engNG19-1n, engNG19-2p, engNG19-4p_SH) が得られた。これらの塩基配列を, enFeLV の参照配列として用いられる AGTT と比べた所, 相同性は約 99%であった。

FeLV *gag* 遺伝子の分子系統解析と enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の発見

単離した FeLV *gag* 遺伝子の系統が, FeLV *env* 遺伝子の系統に一致するかどうかを検討した (Watanabe *et al.*, 2013)。FeLV *env* 遺伝子の研究では, 異なる遺伝子型の重感染は見られなかった。そのことから, 同じ症例から得られた FeLV の遺伝子による遺伝子型の一致を想定し, 系統解析を行った (図 2A, B, C)。実際には, *gag* と *env* の各遺伝子は別々に分子クローニングを行ったので同じプロウイルスに由来するの否かは不明である。FeLV *gag* 遺伝子の塩基配列の命名は, 症例の名前を用い, 且つ症例の頭文字に *gag* の “g” を付けることで *env* 遺伝子と区別した。また, 系統解析に使用した遺伝子を表 1, 2 に記載した。尚, clone33 と pJ7E2 はすでに NCBI に登録されているため *gag* の “g” の頭文字は使用していない。enFeLV *gag* 遺伝子の塩基配列の命名については, 症例の名前を用い, 且つ症例の頭文字に “eng” を付けた。

上記のことを踏まえて, 同じ症例の *env* 遺伝子と同様に, *gag* による遺伝子型が分類されるかどうかを確認するために, 地理的に偏りなく選出した 20 症例から単離した *gag* 遺伝子と *env* 遺伝子 (表 1, 2), 参照配列の FeLV-A/clone33 と pJ7E2, アウトグループとしての参照配列の enFeLV/GGAG, AGTT を用いて, 系統樹の構築を行った (図 2A)。同時に, *gag* 遺伝子と同じ症例から得られた *env* 遺伝子の分子系統樹を作成し, *gag* と *env* の系統樹を比較した (図 2A, B)。その系統樹の枝の長さは, 時間の経過とともに祖先の配列から変異を新たに獲得したことを示している。FeLV *gag* と enFeLV

gag 遺伝子の塩基配列の相似性は、その間の時間経過にも関わらず、約 10%の塩基の違いしか生じていないことから、系統がうまく分岐しない可能性もあったが、結果は FeLV と enFeLV が分岐した系統樹が得られた(図 2A, B)。但し、*gag* 遺伝子の樹形は、*env* 遺伝子の樹形とは異なっていた(図 2A, B)。図 2A の *gag* 遺伝子の系統樹において、本来、外来性 FeLV に属すると予測される gNG19_RC が、enFeLV の系統に分類された(図 2A)。また、*env* 遺伝子の系統とは異なり、遺伝子型 GI2 および GI3 が、二つのグループに分岐した(図 2A, B)。それらの遺伝子型 GI2 を赤色に、GI3 を緑色に示した(図 2A)。

次に、組換え FeLV を持つことを予測し、FeLV *gag* 遺伝子による組換え解析を行った。FeLV 代表の 82 症例、enFeLV 代表の 2 症例のネコから得られた表 1 と 2 に記載したすべての *gag* 遺伝子の 89 塩基配列のマルチプルアライメントを用い、RDP3 の組換え解析ソフトによって、*in silico* で包括的に *gag* 遺伝子の組換え解析を行った。その結果、仮想の組換え部位とその組換えの元株が検出された。4 症例の家ネコから、全長 enFeLV *gag* 遺伝子配列を含んだ 6 つの組換え FeLV の塩基配列

(gNG19_RC, gNG19-4_RC_SH, gTY26_RC_SH, gKG20-2_RC_SH, gMZ29-RC_SH, FeLV-D/TY26Le5) 35 症例の家ネコから enFeLV *gag* 遺伝子の一部を含んだ 35 の組換え FeLV の塩基配列が検出された(図 3)。その検出された中には、図 2A で逸脱した症例の塩基配列(gNR4, gKM34, gNG19_RC)も含んでおり、それらもまた組換え FeLV であることが判明した。組換え FeLV に含んだ enFeLV の配列は、*gag* 遺伝子の 3' 末端側の CA や NC をコードする領域に認められる傾向にあった(図 3)。

系統解析は、組換え領域を省くことが前提となるため、組換え解析によって検出した enFeLV の領域を排除した後、その残りの配列の全長を用いて FeLV *gag* 遺伝子の

系統樹を構築した (図 2C)。その結果, *env* 遺伝子と一致した樹系となり, 同症例から得られた系統関係は一致した (図 2B, C)。同様に, 89 の *gag* 遺伝子の塩基配列 (表 1, 2) 中にある潜在的な enFeLV の領域を排除し, 分子系統樹を構築した場合も *env* 遺伝子の系統 (Watanabe *et al.*, 2013) と一致した (図 4)。

図 4 では, 前述の全長 enFeLV *gag* 遺伝子塩基配列を含んだ 6 つの組換え FeLV の塩基配列は, 系統解析した領域のすべてが組換え配列であったため, その組換え配列を削除する必要がある, その配列の系統を表現できなかった。そのため, FeLV-A/pFRA をアウトグループとして分子系統樹を作成し, 組換え FeLV の持つ全長の *gag* 遺伝子配列が FeLV あるいは enFeLV のどちらのグループに分類されるかを確認した (図 5A)。

日本の代表株の FeLV-A/clone33 は組換え FeLV であったため, アウトグループには非組換え FeLV の FeLV-A/pFRA を用いた。その結果, 6 つの組換え FeLV の持つ全長の *gag* 遺伝子配列は, enFeLV のグループに分類された (図 5A)。また, 同様のデータセットを用いて, 組換え部位を検出した (図 5B)。その解析に使用した配列は, FeLV あるいは enFeLV のどちらであるかを区別するために, LTR U3 領域を含む塩基配列を含めた。その結果, *gag* 遺伝子上流に組換え部位は見つかった (図 5B)。

以上のことから, FeLV *gag* 遺伝子内に全長もしくは部分的に enFeLV の塩基配列を含む組換え FeLV の存在が明らかとなった。

EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV は伝播する

RDP3 プログラムソフトによる組換え解析によって, enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV (以下, 組換え FeLV と略す) は, 一部の系統に偏って検出されることが分かった (図 4)。組換え FeLV は, 遺伝子型 GI/2 では, 19 例中 1 例で検出され, GI/5 では, 6

例中 6 例で検出された (図 4)。GI/3 では 19 例中 2 例, GI/1 では 18 例中 18 例で組換え FeLV が検出された (図 4)。また, 組換え部位が一致した塩基配列を持つグループを図 3 の赤枠にアルファベット a-g で示し, 各地域でまとまりのある組換えパターンを示す組換え FeLV が存在することを見出した (図 3)。GI/1 の遺伝子型は d, e, f, g の 4 つのグループに分かれ, GI/5 は a, b の 2 つのグループに別れた (図 3)。また, GI/1 と GI/5 の各遺伝子型の中で, 一致した塩基配列のパターンを示す enFeLV 領域の変異部位の詳細を確認した (図 6)。変異部位の詳細は, Hypermutation を検出するために開発された Hypermut2.0 のプログラムソフトを用いて検出した。Hypermut2.0 は, その変異パターン (enFeLV との塩基配列の違い) をカラーの垂直線で示すことができる。図の横側に, FeLV *gag* 遺伝子の塩基配列とその系統関係を表す系統樹を記載し, 下側に塩基配列のアライメントの位置を示した (図 6)。同じ塩基配列の場合は空白で表される。EnFeLV を Query とし, GI1 と GI5 とのグループの塩基配列を比較した。予測される enFeLV との組換え領域をオレンジ色の太線で示した (図 6)。GI/1 と GI/5 の遺伝子型を持つ組換え FeLV の各 enFeLV の塩基配列に, 共通の遺伝子変異を持つクローンと単独の変異を持つクローンが見つかった (図 6)。それらの組換え部位は, RDP3 で検出した組換え部位とほぼ一致していた (図 3, 6)。また, 感染性ウイルス粒子として知られている弱毒性の海外株 FeLV-A/61E と強毒性の日本株 FeLV-A/clone33 の塩基配列においても, enFeLV *gag* 遺伝子の塩基配列を含んだ組換え FeLV であることが判明した (図 3)。

ウイルス分離株からの enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の検出

実際に, FeLV に感染した家ネコのリンパ球から組換え FeLV のウイルスは分離され

るのか否かを検討した。FeLV 非感染の AH927 細胞を用いて FeLV 陽性家ネコ (症例 No. PI) の末梢血単核球からウイルス分離を行った。ウイルス分離後に、得られた FeLV の *gag* 遺伝子の塩基配列を、シーケンスによって決定した (AgPI: Accession No. AB847301)。また、その症例の血液から DNA を抽出後、FeLV *gag* 遺伝子を単離し、その塩基配列をシーケンスによって決定した (gPI-1: Accession No. AB847288)。遺伝子型は、gPI-1, AgPI のいずれも GI/7 であった。AgPI と gPI-1 の塩基配列を、*gag* 遺伝子の系統解析に用いた 89 の塩基配列とマルチプルアライメントし、RDP3 プログラムソフトで解析した。その結果、ウイルス分離で得られた AgPI (gPI/AH927) と血液から DNA を抽出した gPI-1 のどちらも組換え FeLV が検出された (図 7)。以上のことから、組換えウイルスは単離されることが分かった。

EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV は *de novo* に生じる

EnFeLV *gag* 遺伝子領域を含む組換え FeLV が伝播する可能性を前述に示したが、それらがまた、*de novo* に生じる可能性も同時に検討した。組換え FeLV が、*de novo* に生じたのであれば、組換え FeLV を検出した同じ症例の家ネコから、FeLV と enFeLV が検出されるはずである。そこで、組換え FeLV を持つ症例 No. 19 の家ネコの染色体 DNA から、組換え元となった FeLV と enFeLV *gag* 遺伝子を探索した。その探索前に、組換え FeLV に存在する enFeLV の特徴を模索した。その結果、本研究の解析に用いた FeLV *gag* 遺伝子のマルチプルアライメントから、enFeLV *gag* 遺伝子に特異的な *KasI* 制限酵素部位と 6 つの全長 enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV から、共通した特徴的な塩基配列の 15bp の triple direct repeat を見つけた。それらを目印に、組換え FeLV (gNG19-RC と gNG19-4_RC_SH) を検出した症例 No. NG19 の染色体 DNA から、組換え元

の 15bp の triple direct repeat の塩基配列を含む enFeLV *gag* 遺伝子 (engNG19-4p_SH) を得た。また、組換え元の FeLV *gag* 遺伝子は、FeLV の分子クローニング中に、enFeLV に特異的に存在する制限酵素 *KasI* で処理することによって、組換え元の FeLV (gNG19-10) を得た。その enFeLV に特徴的な 15bp の triple direct repeat と *KasI* サイトを含む塩基配列は、図 8A に示した。組換え FeLV 由来の塩基配列の妥当性は、症例 No. NG19 から得られた組換え FeLV の塩基配列とその組換え元となる FeLV と enFeLV の 2 つの塩基配列を用いて、RDP3 に搭載された RDP3 プログラムによって確認された (図 8A)。また、塩基配列のマルチプルアライメントから、gNG19-4_RC_SH と engNG19-4p_SH の塩基配列上にある cytosine の欠失により、stop codon が入ることが分かった。同時に、gNG19_RC のように完全長の Gag 蛋白質になるには、cytosine の挿入が必要であることが分かった (図 8A)。組換え FeLV の gNG19_RC は、全長 enFeLV *gag* 遺伝子と組換わっているため、5' 側 LTR U3 領域後半の 32bp の部位から 3' 側の *pol* の FeLV *gag* 遺伝子の分子クローニング領域までの塩基配列を含めて解析した。組換え FeLV である gNG19-RC を Query として、元株の FeLV (gNG19-10) と enFeLV (engNG19-4p_SH) の各塩基配列とが、どの領域で一致するかを RDP3 に搭載された Bootscan のプログラムを用いて、組換え元の enFeLV と FeLV が交差した部分 (組換えジャンクション) を確認した。その結果、組換えジャンクションは、5' 側の *gag* 遺伝子上流にあることが分かった (図 8B)。3' 側は分子クローニングした領域が短いため、判定できなかった (図 8B)。以上のことから、症例 No. NG19 から、組換え FeLV と組換え元の FeLV と enFeLV が得られ、組換え FeLV の組換えジャンクションを見つけることができた。

組織での enFeLV *gag* 遺伝子の発現

組換え FeLV が, *de novo* に生じる場合, 家ネコの組織での発現が見つかるはずである。また, これまで, 家ネコにおける enFeLV *gag* 遺伝子の発現および遺伝子解析における研究はあまり報告されていないことから, enFeLV の発現を FeLV 非感染家ネコである SPF ネコ (症例 No. Kyoto SPF1) を用いて確認した。その SPF ネコの単核球末梢血と脾臓の RNA を使用し, enFeLV を検出する RT-PCR 法によって, 各 1.9kbp サイズの PCR 産物を得た (data not shown)。その各 PCR 産物を, 分子クローニング後, シーケンスによって各塩基配列の決定を行った (EFGPBM1A: Accession No. AB935097, EFGSP1A: Accession No. AB935098)。それらの塩基配列を本研究で単離した組換え FeLV とマルチプルアライメントを行い, 詳細に解析すると, 組換え元となった enFeLV に特徴的な制限酵素 *KasI* 部位と 15bp の triple direct repeat を持つことが分かった。また, enFeLV の症例 No. NG19 の家ネコで見つかった組換え FeLV (gNG19-4_RC_SH) および enFeLV (engNG19-4p_SH) における cytosine の一塩基欠損型の *gag* 遺伝子の塩基配列と一致することが分かった。即ち, 組換え FeLV が, 家ネコの単核球末梢血と脾臓の組織において, 発現していることが明らかとなった。

EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV における p27 の発現

本研究では, 全長 enFeLV *gag* 遺伝子配列を含んだ 6 つの組換え FeLV (gNG19_RC, gNG19-4_RC_SH, gTY26_RC_SH, gKG20-2_RC_SH, gMZ29-RC_SH, FeLV-D/TY26Le5) を見つけたが, そのうち gNG19_RC の塩基配列のみが完全長の Gag 蛋白質の ORF をコードしていた。それ以外は, 塩基欠損による stop codon の出現により, 欠損型変異体であった。全長 enFeLV *gag* 遺伝子の塩基配列を含んだ組換え FeLV にコードする

enFeLV *gag* 遺伝子が, Gag 蛋白質を発現するか否かを p27 抗原の検出により確認した。

Fc-Fusion protein vector を加工し, 組換え FeLV/gNG19_RC, 組換え元 FeLV/gNG19-10 と陰性コントロール/Empty vector の 3 つのプラスミドを作成した。293T 細胞に各プラスミドをトランスフェクションし, その細胞上清に, p27 抗原を検出できるか否かを FeLV の p27 抗原を検出する ELISA 検査 kit (図 9A) およびウエスタンブロット法 (図 9B) で確認した。いずれの方法においても, 非組換え FeLV p27 と同様に, 組換え FeLV p27 の蛋白質が検出された (図 9A, B)。

(5) 考察

FeLV の *gag* 遺伝子の遺伝的多様性を調べるために、*gag* 遺伝子の分子系統樹を作成したところ、*env* 遺伝子の系統とは異なり、遺伝子型 GI2 および GI3 が二つのグループに分岐されたこと（図 2A, B）、図 2A の *gag* 遺伝子の系統樹において、本来、外来性 FeLV に属すると予測される gNG19_RC が、enFeLV の系統に分類されたこと（図 2A）などから、FeLV *gag* 遺伝子に、enFeLV 配列を持つ組換え FeLV が存在することを示していると考えた。それを証明するために、FeLV *gag* 遺伝子による組換え解析を行ったところ、enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV の存在が明らかとなった。

組換え FeLV は、各遺伝子型のウイルスに見つかり、clade5 では 6 例中 6 例、clade1 では 18 例中の 18 例の組換え FeLV が検出された。一方、clade2 では 19 例中 1 例、clade3 では 19 例中 2 例の組換え FeLV が検出され、遺伝子型によって、組換え FeLV の検出頻度には偏りがあることが分かった。それらの結果は、組換え FeLV の伝播において、優勢なものとそうでないものがある可能性を示している。あるいは遺伝的浮動を示しているのかもしれない。図 3 の a-g で示したように系統に一致した同じ組換えパターンを持つ組換え FeLV が存在すること、GI/1 や GI/5 の遺伝子型で組換え FeLV の検出率が高く、その対照的に GI/2 や GI3 の遺伝子型では組換え FeLV の検出率が低い傾向にあったことから（図 4）、enFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV は、単独で伝搬した可能性がある（図 4）。

FeLV 遺伝子型での共通の enFeLV 領域を持つ各クローン間の enFeLV 配列の変異部位を確認すると、共通の遺伝子変異をもつクローンと、単独の遺伝子変異を持つクローンが存在することが分かった。その結果は、一部の enFeLV *gag* 配列を持つ組換え FeLV

が伝播することを示し、それらの共通の変異は、組換え FeLV が出現した後に、変異を獲得した可能性を示している。

感染性ウイルス粒子として知られている FeLV-A/61E と FeLV-A/clone33 の塩基配列においても、enFeLV *gag* 遺伝子の塩基配列を含んだ組換え FeLV であることが判明したことから、組換え FeLV が、伝播する可能性を示している。

さらに、ウイルス分離で得られた AgPI (gPI/AH927) と血液から DNA を抽出した gPI-1 のどちらも組換え FeLV が検出された(図 7)。EnFeLV *gag* 遺伝子の一部を含んだ組換え FeLV が、ウイルス分離によっても検出されたことから、感染性ウイルス粒子としての機能を持ち得ると同時に、その組換え FeLV が伝播した可能性が示された。

一般的に、組換え FeLV は *de novo* に生じ、*in vitro* で感染することはあっても、*in vivo* での感染性は無いと考えられており、enFeLV *env* 遺伝子との組換え FeLV による単独での感染例は、現在 2 例のみである (McDougall *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 2011)。また、以前の研究で、FeLV-B の *env* 遺伝子は、非常に多様な組換えパターンが検出されたが、系統に一致した複数の組換えパターンの一致は確認されなかったことから、enFeLV *env* 遺伝子の組換え FeLV が伝播する可能性は低いと考えている (Watanabe *et al.*, 2013)。以上のことから、FeLV *env* 遺伝子とは異なり、*gag* 遺伝子に enFeLV の *gag* 遺伝子を持つ組換え FeLV は、伝播する可能性が高いと考えている。

組換え FeLV は、同一個体内で、組換え FeLV の由来となる非組換え FeLV と enFeLV が検出されることから、組換え FeLV は、*de novo* に生じる可能性が示された。その時に見つかった組換え FeLV には、MA 蛋白質の領域に、ストップコドンを持つものと cytosine の挿入によってストップコドンを持たないクローンが存在した。非組換え FeLV では、cytosine の挿入のため、ストップコドンを持たず、一方、組換え FeLV の

元株の enFeLV では、cytosine の挿入は無く、ストップコドンが認められた。PCR によるミスリーディングとも考えられるが、FeLV となる過程において、ストップコドンの修復が生じたとも考えられる。ストップコドンの修復が生じたと考えられる組換え FeLV を、FeLV p27 抗原検出 kit で検出したところ、非組換え FeLV と同様に、組換え FeLV でも p27 抗原は検出された。そのことは、組換え FeLV においても、現在の検査 kit で p27 抗原を検出可能であることを示す。FeLV 陰性のネコでは、enFeLV の p27 抗原が、血中を循環していないため、偽陽性と判断されることはない。

本研究において、FeLV は、*env* 遺伝子だけでなく、*gag* や *pol* 遺伝子においても enFeLV との組換え部位が見つかったことから、ゲノム全体で、内在性のレトロウイルスの配列との組換えを生じ易いウイルスといえる。また、一部の家ネコの間で生じる組換え FeLV は、*de novo* に出現し、その後、ネコの間で伝播される可能性があることを示した。

(6) 図と表

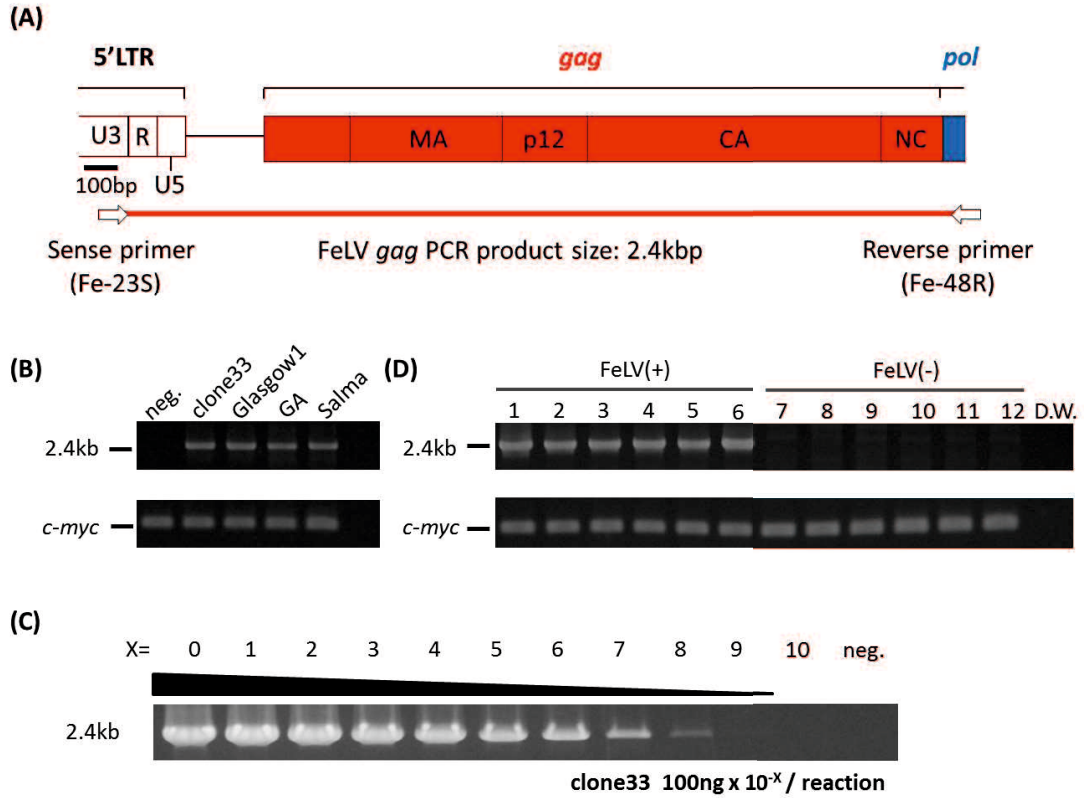


図1 PCR法によるFeLV *gag* 遺伝子の検出

- A PCR法におけるFeLV *gag* 遺伝子増幅領域の模式図。
- B 上の写真は、FeLV 感染株 (FeLV-A/clone33, Glasgow1, FeLV-B/GA, FeLV-C/Sarma) および非感染 AH927 細胞株 (neg.) のFeLV *gag* 遺伝子を検出した電気泳動像。下の写真は、内部対照として *c-myc* 遺伝子座の一部を増幅した (Anai *et al.*, 2012)。

C FeLV の PCR 法における FeLV *gag* 遺伝子の検出感度検定をした電気泳動像。

FeLV-A/clone33 のプラスミド 100ng を 10 倍ずつ段階希釈した。

X : 段階希釈数

D 上の写真は，臨床検体による FeLV *gag* 遺伝子の検出例。

FeLV 陽性 (+) と FeLV 陰性 (-) の臨床症例各 6 検体の FeLV *gag* 遺伝子を検出

した電気泳動像。下の写真は，内部対照として *c-myc* 遺伝子座の一部を増幅し

た (Anai *et al.*, 2012)。

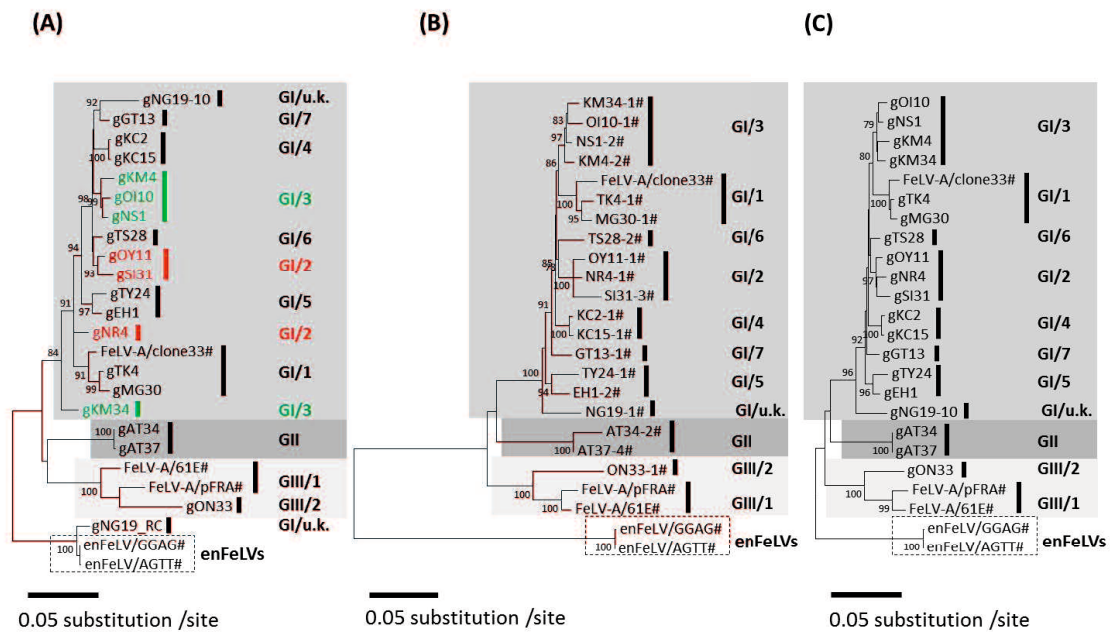


図2 FeLV *gag* および *env* 遺伝子と潜在的な組換え領域を除去した *gag* 遺伝子の最尤法 (ML) による分子系統樹

A FeLV *gag* 遺伝子の分子系統樹。同じ系統が分かれた遺伝子型を色で示した。赤色は GI/2, 緑は GI/3 である。

FeLV である gNG19_RC は, enFeLV のグループに属した。

B FeLV *env* 遺伝子の分子系統樹(Watanabe *et al.*, 2013)。

C 潜在的な組換え領域を除去した *gag* 遺伝子の分子系統樹。

EnFeLV/GGAG, AGTT は, アウトグループとして使用した。

GI/u.k.: Genotype I/unknown clade. #: 参照配列。

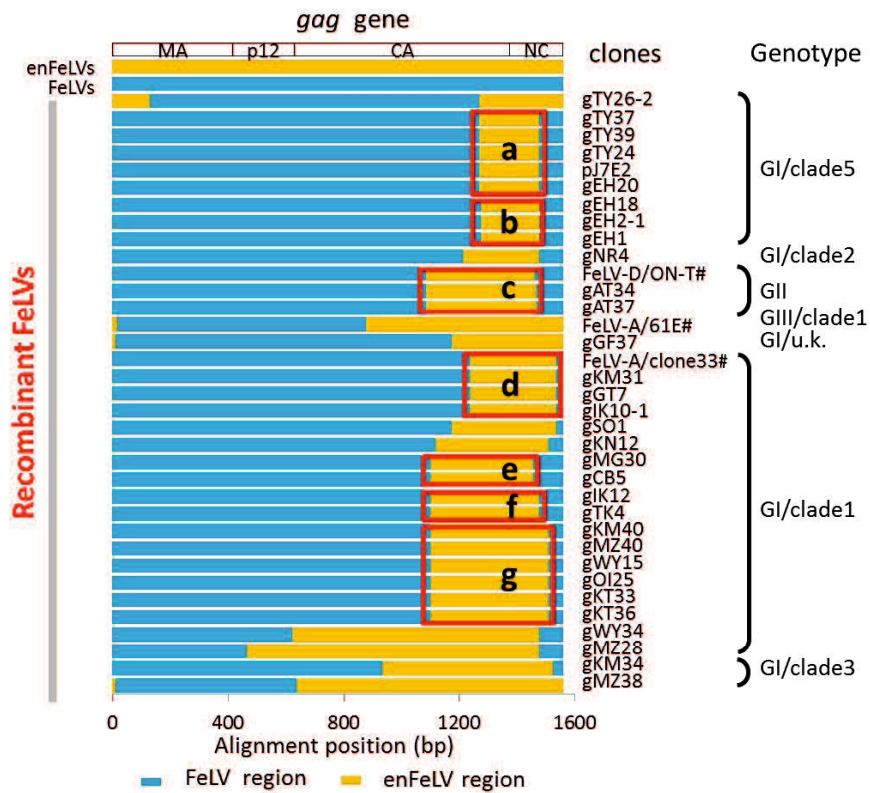


図3 RDP3の組換え解析ソフトを用いたFeLV gag遺伝子における組換え領域の検出

5' と 3' 側の組換え部位が同じであるグループをアルファベット 'a-g' で示した。

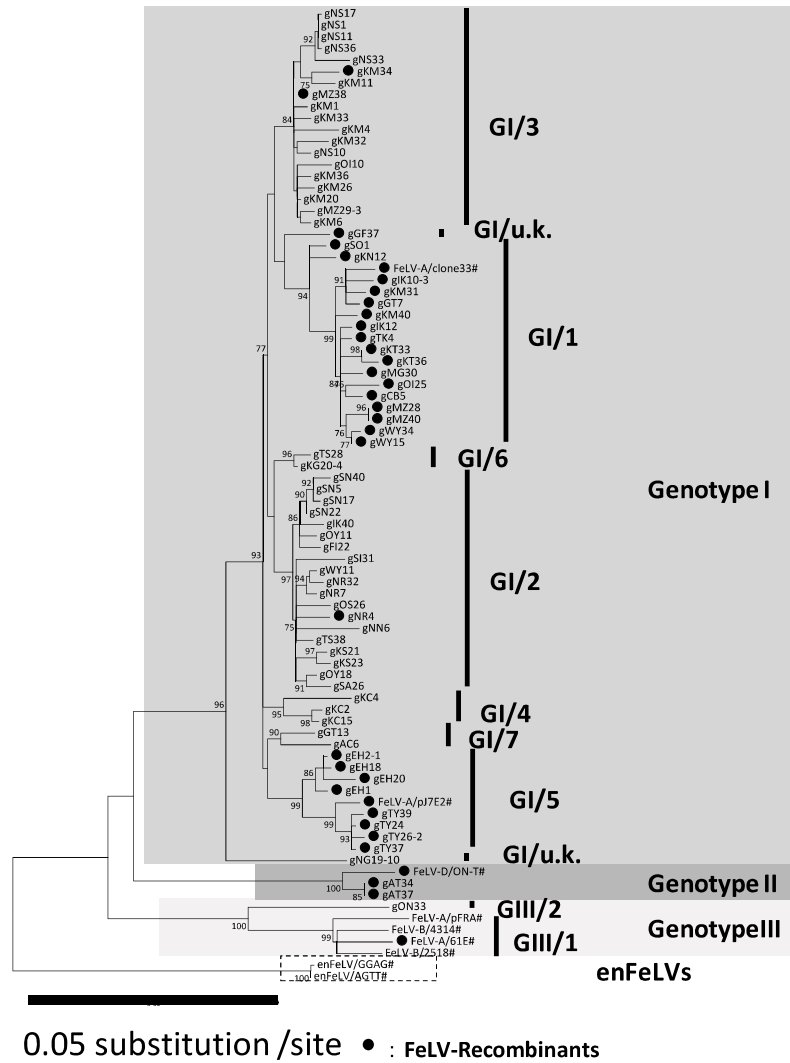


図 4 FeLV *gag* 遺伝子の分子系統解析による遺伝子型の決定

遺伝子型は、GI, GII と GIII。GI は、clade1 から 7 に分類された。GIII は、Clade1 と 2 に分類された。EnFeLV/GGAG, AGTT は、アウトグループとして使用した。

GI/u.k. : GenotypeI/unknown clade。#: 参照配列。

●: 組換え FeLV *gag* 遺伝子。

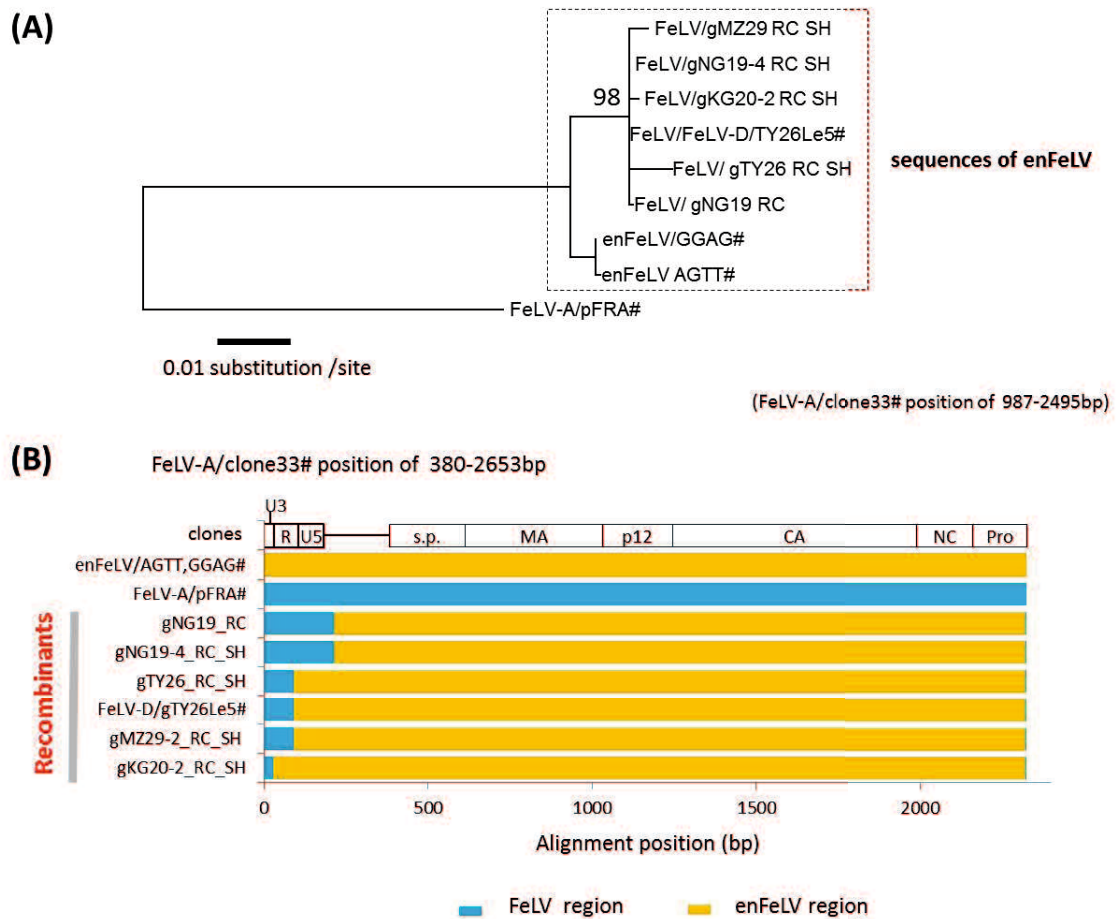


図5 全長 enFeLV *gag* 遺伝子を含んだ組換え FeLV の検出

A ML 法による分子系統樹

FeLV-A/pFRA は、アウトグループとして使用した。

B RDP3 による組換え解析

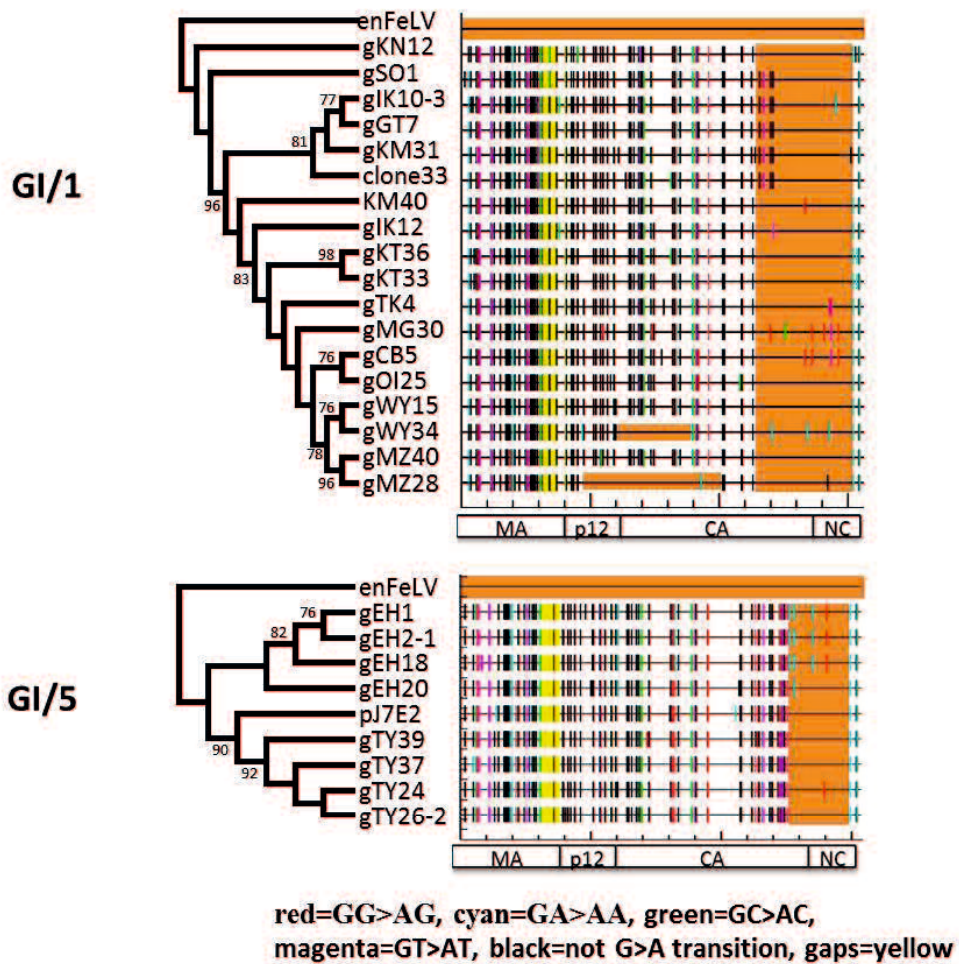


図 6 Hypermut2.0 ソフト分析による組換え FeLV *gag* 遺伝子の enFeLV 領域とその変異部位の検出

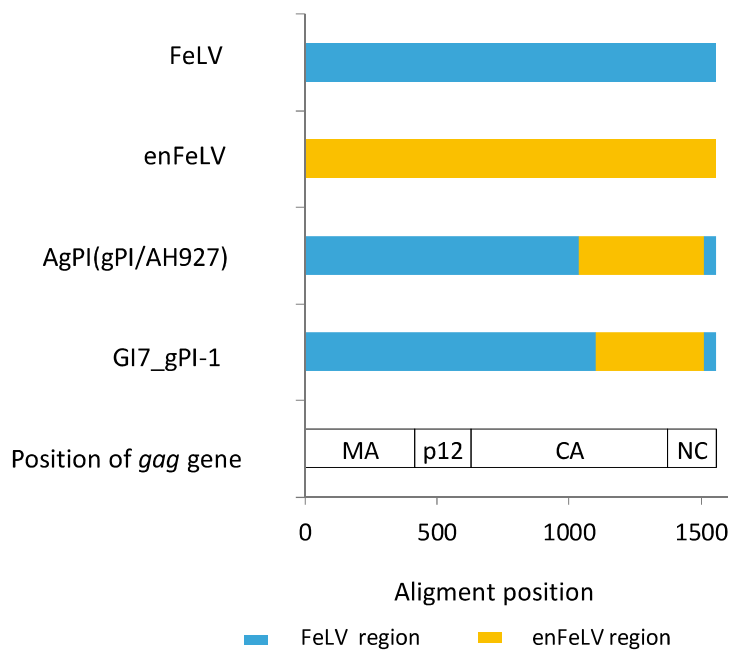


図 7 RDP3 の組換え解析ソフトでのウイルス分離株における組換え FeLV の検出

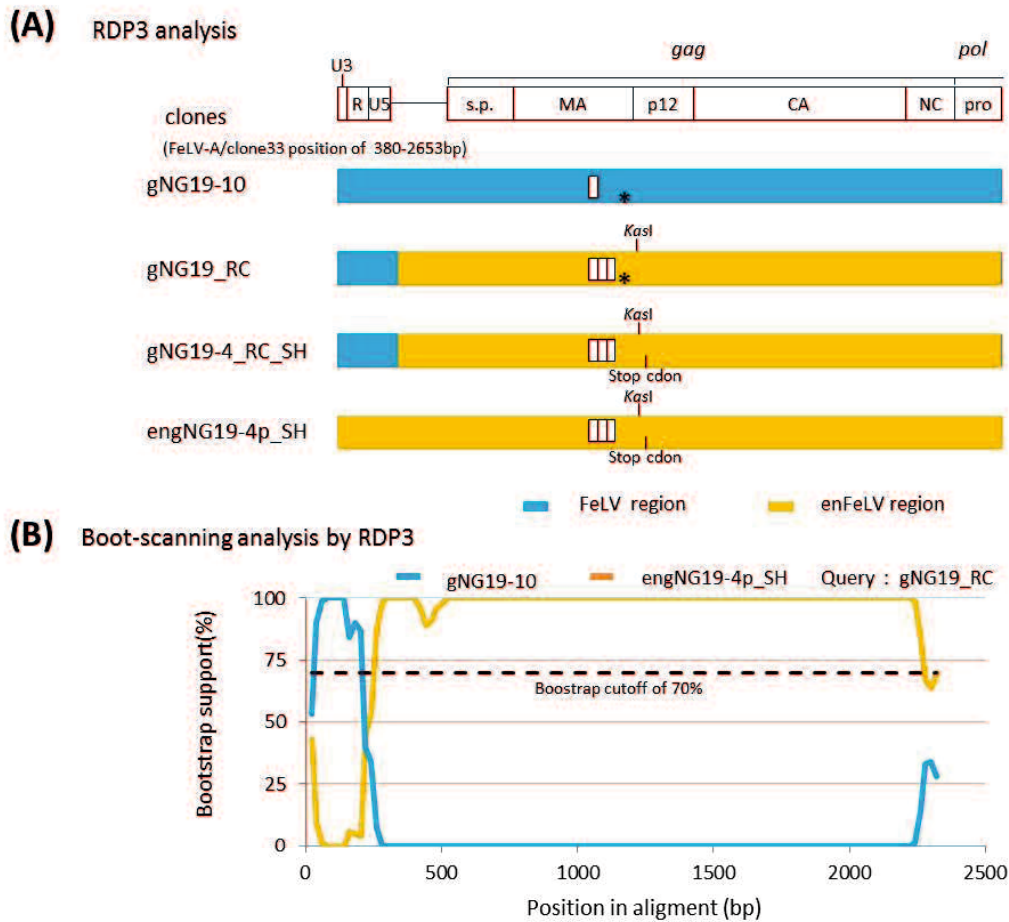


図 8 EnFeLV *gag* 遺伝子との組換え FeLV は *de novo* に生じる

A gNG19-10, gNG19_RC と gNG19-4_RC_SH, engNG19-4p_SH の各塩基配列を RDP3 の組換え解析ソフトで作成した組換え領域と各配列の特徴を表した模式図。

* : Cytosine insertion。Box: direct repprats。

B gNG19_RC を Query として gNG19-4_RC_SH と engNG19-4p_SH から組換えジャンクションを検出した Boot-scanning 解析の結果。

FeLV: gNG19-10。組換え FeLV: gNG19_RC と gNG19-4_RC_SH。

EnFeLV: engNG19-4p_SH。

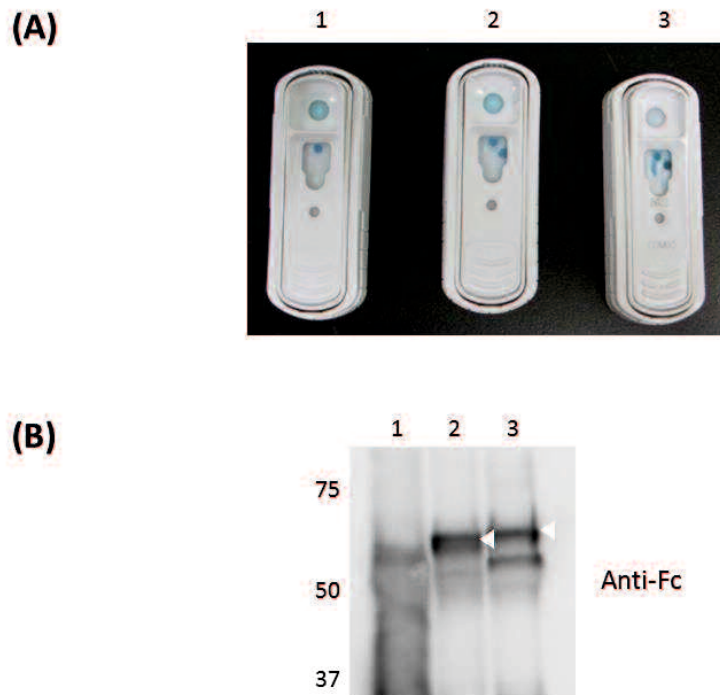


図9 組換え FeLV p27 蛋白質の発現

A ELISA 検査 kit を用いて p27 蛋白質抗原を検出した写真

B ウェスタンブロット法を用いて p27 蛋白質の発現を検出した写真

1: 陰性コントロール, Empty vector。 2: 組換え FeLV, gNG19_RC。

3: FeLV, gNG19-10。

表 1 遺伝子解析に使用した FeLV *gag* と *env* 遺伝子の参照塩基配列 (#)

Case	Sequence Name	Accession No.	Genotype	gene
	enFeLV/AGTT	AY364318	enFeLV	<i>gag, env</i>
	enFeLV/GGAG	AY364319	enFeLV	<i>gag,env</i>
Ricard subgroup A	FeLV-A/pFRA	AF052723	GIII/1	<i>gag, env</i>
FeLV-FAIDS	FeLV-A/61E	M18247	GIII/1	<i>gag, env</i>
Feline AML	FeLV-A/clone33	AB060732	GI/1	<i>gag, env</i>
FT-1 cells	pJ7E2	AB672612	GI/5	<i>gag, env</i>
2518	FeLV-B/2518	JF957361	GIII/1	<i>gag</i>
4314	FeLV-B/4314	JF957363	GIII/1	<i>gag</i>
IT38	FeLV-D/ON-T	AB673426	GII	<i>gag</i>
TY26	FeLV-D/Ty26Le5	AB673427	GII	<i>gag</i>
MZ29	MZ29-6	AB635831	GI/3	<i>env</i>
NS36	NS36-2	AB635825	GI/3	<i>env</i>
NS33	NS33-2	AB635821	GI/3	<i>env</i>
NS1	NS1-2	AB635803	GI/3	<i>env</i>
NS17	NS17-1	AB635819	GI/3	<i>env</i>
NS11	NS11-3	AB635816	GI/3	<i>env</i>
MZ38	MZ38-1	AB635842	GI/3	<i>env</i>
OI10	OI10-1	AB635827	GI/3	<i>env</i>
NS10	NS10-1	AB635813	GI/3	<i>env</i>
KM34	KM34-1	AB635713	GI/3	<i>env</i>
KM11	KM11-3	AB635740	GI/3	<i>env</i>
KM32	KM32-1	AB635718	GI/3	<i>env</i>
KM20	KM20-1	AB63573	GI/3	<i>env</i>
KM26	KM26-1	AB635724	GI/3	<i>env</i>
KM6	KM6-1	AB635742	GI/3	<i>env</i>
KM33	KM33-1	AB635715	GI/3	<i>env</i>
KM4	KM4-2	AB635748	GI/3	<i>env</i>
KM36	KM36-1	AB635708	GI/3	<i>env</i>
KM1	KM1-1	AB635750	GI/3	<i>env</i>
GF37	GF37-1	AB635849	GI/i.k.	<i>env</i>
SO1	SO1-6	AB635792	GI/1	<i>env</i>
CB5	CB5-1	AB635783	GI/1	<i>env</i>
MG30	MG30-1	AB635779	GI/1	<i>env</i>
KT36	KT36-2	AB635771	GI/1	<i>env</i>
KT33	KT33-1	AB635767	GI/1	<i>env</i>
TK4	TK4-1	AB635765	GI/1	<i>env</i>
WY15	WY15-1	AB635636	GI/1	<i>env</i>
WY34	WY34-3	AB635631	GI/1	<i>env</i>
KM40	KM40-2	AB635630	GI/1	<i>env</i>
MZ40	MZ40-1	AB635623	GI/1	<i>env</i>

MZ28	MZ28-2	AB635626	GI/1	<i>env</i>
OI25	OI25-3	AB635613	GI/1	<i>env</i>
IK12	IK12-2	AB635611	GI/1	<i>env</i>
IK10	IK10-3	AB635604	GI/1	<i>env</i>
KM31	KM31-2	AB635590	GI/1	<i>env</i>
GT7	GT7-1	AB635587	GI/1	<i>env</i>
KC15	KC15-1	AB635540	GI/4	<i>env</i>
KC2	KC2-1	AB635538	GI/4	<i>env</i>
KC4	KC4-5	AB635700	GI/4	<i>env</i>
AC6	AC6-3	AB635535	GI/7	<i>env</i>
GT13	GT13-1	AB635533	GI/7	<i>env</i>
NG19	NG19-1	AB635507	GI/u.k.	<i>env</i>
TY26	TY26-2	AB635514	GI/5	<i>env</i>
EH18	EH18-1	AB635527	GI/5	<i>env</i>
EH1	EH1-2	AB635524	GI/5	<i>env</i>
EH2	EH2-2	AB635525	GI/5	<i>env</i>
EH20	EH20-1	AB635529	GI/5	<i>env</i>
TY24	TY24-1	AB635511	GI/5	<i>env</i>
TY39	TY39-1	AB635521	GI/5	<i>env</i>
TY37	TY37-2	AB635519	GI/5	<i>env</i>
TS28	TS28-2	AB635645	GI/6	<i>env</i>
KG20	KG20-2	AB635639	GI/6	<i>env</i>
SI31	SI31-3	AB635552	GI/2	<i>env</i>
NN6	NN6-1	AB635558	GI/2	<i>env</i>
OS26	OS26-1	AB635556	GI/2	<i>env</i>
FI22	FI22-1	AB635562	GI/2	<i>env</i>
NR4	NR4-1	AB635559	GI/2	<i>env</i>
NR32	NR32-1	AB635573	GI/2	<i>env</i>
WY11	WY11-3	AB635571	GI/2	<i>env</i>
NR7	NR7-1	AB635564	GI/2	<i>env</i>
SA26	SA26-1	AB635677	GI/2	<i>env</i>
OY18	OY18-5	AB635672	GI/2	<i>env</i>
TS38	TS38-10	AB635679	GI/2	<i>env</i>
SN17	SN17-2	AB635665	GI/2	<i>env</i>
SN5	SN5-1	AB635668	GI/2	<i>env</i>
SN22	SN22-1	AB635664	GI/2	<i>env</i>
OY11	OY11-1	AB635660	GI/2	<i>env</i>
SN40	SN40-1	AB635661	GI/2	<i>env</i>
IK40	IK40-1	AB635658	GI/2	<i>env</i>
KS23	KS23-1	AB635580	GI/2	<i>env</i>
KS21	KS21-1	AB635576	GI/2	<i>env</i>
AT37	AT37-4	AB635491	GII	<i>env</i>
AT34	AT34-2	AB635486	GII	<i>env</i>
ON33	ON33-1	AB635483	GIII/2	<i>env</i>

表 2 本研究で同定した FeLV *gag* 遺伝子

Case	Name	Accession No.	Genotype	gene
NG19	engNG19-1m	AB847289	enFeLV	<i>gag</i>
NG19	engNG19-2p	AB847290	enFeLV	<i>gag</i>
NG19	engNG19-4p_SH	AB847291	enFeLV	<i>gag</i>
NG19	gNG19_RC	AB847254		<i>gag</i>
NG19	gNG19-4_RC_SH	AB847255		<i>gag</i>
TY26	gTY26_RC_SH	AB847265		<i>gag</i>
MZ29	gMZ29_RC_SH	AB847262		<i>gag</i>
KG20	gKG20-2_RC_SH	AB847263		<i>gag</i>
MZ29	gMZ29-3	AB847295	GI/3	<i>gag</i>
NS36	gNS36	AB847225	GI/3	<i>gag</i>
NS33	gNS33	AB847224	GI/3	<i>gag</i>
NS1	gNS1	AB847220	GI/3	<i>gag</i>
NS17	gNS17	AB847223	GI/3	<i>gag</i>
NS11	gNS11	AB847222	GI/3	<i>gag</i>
MZ38	gMZ38	AB847213	GI/3	<i>gag</i>
OI10	gOI10	AB847227	GI/3	<i>gag</i>
NS10	gNS10	AB847221	GI/3	<i>gag</i>
KM34	gKM34	AB847196	GI/3	<i>gag</i>
KM11	gKM11	AB847189	GI/3	<i>gag</i>
KM32	gKM32	AB847194	GI/3	<i>gag</i>
KM20	gKM20	AB847191	GI/3	<i>gag</i>
KM26	gKM26	AB847192	GI/3	<i>gag</i>
KM6	gKM6	AB847201	GI/3	<i>gag</i>
KM33	gKM33	AB847195	GI/3	<i>gag</i>
KM4	gKM4	AB847199	GI/3	<i>gag</i>
KM36	gKM36	AB847197	GI/3	<i>gag</i>
KM1	gKM1	AB847188	GI/3	<i>gag</i>
GF37	gGF37	AB847174	GI/u.k.	<i>gag</i>
SO1	gSO1	AB847241	GI/1	<i>gag</i>
CB5	gCB5	AB847167	GI/1	<i>gag</i>
MG30	gMG30	AB847210	GI/1	<i>gag</i>
KT36	gKT36	AB847208	GI/1	<i>gag</i>
KT33	gKT33	AB847207	GI/1	<i>gag</i>
TK4	gTK4	AB847243	GI/1	<i>gag</i>
WY15	gWY15	AB847251	GI/1	<i>gag</i>
WY34	gWY34	AB847252	GI/1	<i>gag</i>
KM40	gKM40	AB847200	GI/1	<i>gag</i>
MZ40	gMZ40	AB847214	GI/1	<i>gag</i>
MZ28	gMZ28	AB847212	GI/1	<i>gag</i>
OI25	gOI25	AB847228	GI/1	<i>gag</i>

IK12	gIK12	AB847178	GI/1	<i>gag</i>
IK10	gIK10-3	AB847177	GI/1	<i>gag</i>
KM31	gKM31	AB847193	GI/1	<i>gag</i>
GT7	gGT7	AB847176	GI/1	<i>gag</i>
KC15	gKC15	AB847184	GI/4	<i>gag</i>
KC2	gKC2	AB847185	GI/4	<i>gag</i>
KC4	gKC4	AB847186	GI/4	<i>gag</i>
AC6	gAC6	AB847163	GI/7	<i>gag</i>
GT13	gGT13	AB847175	GI/7	<i>gag</i>
NG19	gNG19-10	AB847256	GI/u.k	<i>gag</i>
TY26	gTY26-2	AB847299	GI/5	<i>gag</i>
EH18	gEH18	AB847169	GI/5	<i>gag</i>
EH1	gEH1	AB847168	GI/5	<i>gag</i>
EH2	gEH2-1	AB847171	GI/5	<i>gag</i>
EH20	gEH20	AB847170	GI/5	<i>gag</i>
TY24	gTY24	AB847246	GI/5	<i>gag</i>
TY39	gTY39	AB847249	GI/5	<i>gag</i>
TY37	gTY37	AB847248	GI/5	<i>gag</i>
TS28	gTS28	AB847244	GI/6	<i>gag</i>
KG20	gKG20-4	AB847292	GI/6	<i>gag</i>
SI31	gSI31	AB847236	GI/2	<i>gag</i>
NN6	gNN6	AB847216	GI/2	<i>gag</i>
OS26	gOS26	AB847230	GI/2	<i>gag</i>
FI22	gFI22	AB847172	GI/2	<i>gag</i>
NR4	gNR4	AB847218	GI/2	<i>gag</i>
NR32	gNR32	AB847217	GI/2	<i>gag</i>
WY11	gWY11	AB847250	GI/2	<i>gag</i>
NR7	gNR7	AB847219	GI/2	<i>gag</i>
SA26	gSA26	AB847234	GI/2	<i>gag</i>
OY18	gOY18	AB847232	GI/2	<i>gag</i>
TS38	gTS38	AB847245	GI/2	<i>gag</i>
SN17	gSN17	AB847237	GI/2	<i>gag</i>
SN5	gSN5	AB847240	GI/2	<i>gag</i>
SN22	gSN22	AB847238	GI/2	<i>gag</i>
OY11	gOY11	AB847231	GI/2	<i>gag</i>
SN40	gSN40	AB847239	GI/2	<i>gag</i>
IK40	gIK40	AB847179	GI/2	<i>gag</i>
KS23	gKS23	AB847206	GI/2	<i>gag</i>
KS21	gKS21	AB847205	GI/2	<i>gag</i>
AT37	gAT37	AB847165	GII	<i>gag</i>
AT34	gAT34	AB847164	GII	<i>gag</i>
ON33	gON33	AB847229	GIII/2	<i>gag</i>
KN12	gKN12	AB847203	GI/1	<i>gag</i>

第二章

癌関連遺伝子 *c-AKT1* との組換え FeLV の発見

(1) 概要

マウス白血病ウイルス (MLV) やネコ白血病ウイルス (FeLV) といったガンマレトロウイルスは、腫瘍原性レトロウイルスと呼ばれる。細胞増殖に関与する遺伝子の近傍に挿入されると、その癌原遺伝子をレトロウイルスのゲノムに組み込み、その遺伝子の発現を増強あるいは活性化させ、細胞の異常増殖を促し、腫瘍を引き起こす。本研究では、欠損型 *c-AKT* 癌原遺伝子をゲノム中に組み込んだ FeLV (FeLV-*AKT*) を、FeLV に自然感染した家ネコから初めて分離し、その詳細な解析を行った。癌原遺伝子 *c-AKT* を持った組換えウイルスは、マウスで見つかっており、MLV に *c-AKT1* (v-AKT マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 1) が組み込まれた AKT8 ウイルスがある。AKT8 は、マウスの胸腺に T 細胞性リンパ腫を発生させることが知られている。AKT1 の構造的特徴は、プレクストリン相同 (PH) ドメイン、キナーゼドメインを有することであり、PI3 キナーゼの重要な標的分子となっている。また、AKT1 は、レトロウイルスである Friend Spleen Focus-Forming Virus (SFFV) の感染などによって、恒常的な活性が生じることが知られている。

本研究で報告する FeLV-*AKT* は、AKT8 と同様に *AKT1* を FeLV がトランクダクションした組換えレトロウイルスである一方で、PH ドメインがほぼ欠損しており、AKT8 とは異なる構造を有する。最近ではヒトの腫瘍における報告で、AKT1 の PH ドメインにおける点変異や欠損による PH ドメイン機能の破壊が、恒常的活性型分子になると言われている。AKT1 の変異体が、機能において重要な調節的役割を持つことから、本研究で、発見したネコのリンパ腫における FeLV-*AKT* の構造とその機能を明らかにする必要がある。

本研究では, *gag* 遺伝子による新規の癌遺伝子の組みウイルス FeLV-*AKT* を見つけたことを報告する。

(2) 序論

MLV, FeLV, ALV などのレトロウイルスは、腫瘍原性レトロウイルスと呼ばれている。それらのレトロウイルスが、宿主ゲノム DNA にある *c-src*, *c-myb* などの癌原遺伝子や細胞増殖に関与する遺伝子の近傍に組込まれると、その遺伝子の発現を増強あるいは活性化し、細胞の異常増殖を促し、腫瘍を発生する (Brugge & Erikson, 1977; Chen *et al.*, 1980)。その中で、白血病を自然発症する系統マウス (AKR) から単離された AKT8 ウイルス (Staal *et al.*, 1977) は、MLV と細胞内のセリン/スレオニンキナーゼ (*c-AKT1*) の癌原遺伝子との組換えによって生じた Gag (MA, p12, Δ CA)-AKT 融合蛋白質をコードし、当ウイルスは mink 肺細胞を形質転換させ、マウスに胸腺型のリンパ腫を発症させることが知られている (Staal & Hartley, 1988)。当ウイルス性腫瘍遺伝子は、「v-AKT」と命名され、その後、ヒトにおいてそのホモログである *c-AKT* 遺伝子が同定された。*AKT* には、*AKT1*, *AKT2* と *AKT3* という 3 つのアイソフォームがあり (Vasudevan & Garraway, 2010)、この 3 つは N 末端領域の PH ドメインおよび C 末端領域のキナーゼドメインからなる共通のドメイン構造を持つ (Brazil & Hemmings, 2001; Hanada *et al.*, 2004)。*AKT* は、セリン/スレオニンキナーゼであり、受容体型チロシンキナーゼの下流のシグナル伝達因子として、細胞増殖、生存などに重要な役割を果たしている。成長因子あるいはそのほかの刺激によって受容体型チロシンキナーゼあるいは G 蛋白質結合受容体が活性化されると、クラス IA ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3 キナーゼ) が、細胞膜に局在するホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート (PI (4, 5) P₂) をホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリホスフェート (PI (3, 4, 5) P₃: PIP₃) に変換する (Cantley, 2002; Fayard *et al.*,

2010)。その後、AKT は、PH ドメインを介して PIP3 に接し、そのことにより AKT が細胞膜に局在する (Franke *et al.*, 1997)。さらに、同所に局在した他のキナーゼにより、キナーゼドメイン上のスレオニン 308 (T308) およびセリン 473 (S473) がリン酸化され活性化される (Bellacosa *et al.*, 1998; Scheid & Woodgett, 2003)。AKT は、細胞増殖と生存に重要な役割を持つ一方で、癌原遺伝子の一種であり、その恒常的な活性化は細胞の癌化と密接に関わっている。

ネコ白血病ウイルス (FeLV) は、ネコ間で伝播し (Hardy Jr, 1993; Jarrett *et al.*, 1964)、ネコに様々な腫瘍性および非腫瘍性疾患を引き起こす (Hartmann, 2012; Hisasue *et al.*, 2009)。ウイルスに取り込まれた癌遺伝子のことを「*v-onc*」遺伝子と呼び、癌遺伝子を取り込んだ FeLV はリンパ腫や多発性繊維肉腫に感染したネコで見つかっている (Hardy Jr, 1993)。

AKT8 ウイルスの Gag-AKT 融合蛋白質による腫瘍化には、膜局在性ミリスチル化シグナルを必要とし、マウスの AKT1 キナーゼの異常な膜局在化が、マウスにおいて腫瘍を発生させる (Ahmed *et al.*, 1993; Bellacosa *et al.*, 1991)。また、AKT1 の活性化が、ヒトの癌 (Carpten *et al.*, 2007) およびレトロウイルス感染 (Liu *et al.*, 2001; Nishigaki *et al.*, 2000; Palmarini *et al.*, 2001; Umehara *et al.*, 2010) において観察される。

AKT1 の変異による AKT1 の恒常的な活性化が、細胞の形質転換および癌を引き起こすことが報告されている (Carpten *et al.*, 2007)。AKT1 キナーゼによる脂質結合ポケットにおけるアミノ酸 17 でのグルタミン酸からリジンへの置換 (E17K) は、脂質結合ポケットにおける分子間相互作用としての静電気相互作用を変化させ、ホスホイノシチドリガンドと新たに水素結合を形成させることが明らかになっている (Carpten *et*

et al., 2007)。その AKT1 E17K 変異体は、細胞膜への局在によって、恒常的に下流のシグナル伝達を刺激し、細胞を形質転換させる。当変異は、マウスにおいて白血病を誘発し、またヒトにおいても乳癌、結腸直腸癌および卵巣癌における体細胞変異を引き起こす (Carpten *et al.*, 2007)。人工的に、AKT1 の PH ドメインを破壊した AKT1 Δ 4-129 の変異体および膜の指向性に重要なミリスチルシグナルと PH ドメイン欠損型 AKT1 を融合させた変異体は、AKT1 キナーゼの活性化能力を有し、下流のシグナル因子を恒常的に活性化させる (Kohn *et al.*, 1996)。実際に、ヒトの癌において AKT1 の PH ドメイン変異体が見つかっており、AKT の下流シグナルへの恒常的なリン酸化や細胞へのトランスフォーメーションが確認されている (Parikh *et al.*, 2012)。そのため、現在では、欠損型 PH ドメインが病気や癌に関与するかもしれないと考えられるようになっている。

本研究では、FeLV に感染した家ネコから初めて、FeLV *gag* 遺伝子における c-AKT 癌遺伝子との組換え FeLV のプロウイルス (FeLV-AKT) を単離した。その FeLV-AKT の構造を明らかにし、細胞での発現を確認したことを報告する。

(3) 材料と方法

FeLV-AKTの *gag* 遺伝子の分子クローニング

PCR は, FeLV 陽性ネコ症例 No. 1344 (3 歳, オス, 雑種) の胸水中に含まれていた細胞の染色体 DNA を鋳型とし, Fe-23S sense primer (5' -AGGGATCCCAGCAGAAGTTTCAAGGCCACT-3') (5pmol), Fe-48R reverse primer (5' -TTGAATTCCYGTGGCTCCTTGCACC-3') (10pmol), KOD FX Neo (0.5U) (TOYOBO), 2×PCR Buffer, 2mM dNTPs と混合し, DNA の増幅を行った。PCR 条件は, Pre Denature を 94°C, 2 分間, サイクリングは, Denature を 94°C, 10 秒間, Annealing を 65°C, 30 秒間, Extension を 68°C, 105 秒間で, 30 サイクルとした。その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し, 増幅された DNA 断片を確認した。その DNA 断片は, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製し, *Bam*HI と *Eco*RI 制限酵素 (TaKaRa 社) 反応を 37°C, 60 分間行った。この制限酵素反応物は, *Bam*HI と *Eco*RI 制限酵素 (TaKaRa 社) 反応を 37°C, 60 分間行った分子クローニング用ベクターの pBluescriptII KS (-) Phagemid vector (stratagene), Ligation high Ver. 2 ((TOYOBO) と混合し, ライゲーション反応を 16°C, 60 分間行い, プラスミドを作成した。そのプラスミドは, Competent high DH5 α (TOYOBO) と混合し, トランスフォーメーションを行い, アンピシリンを添加した LB 寒天培地で培養した。生育したコロニーを任意に取り, アンピシリンを添加した LB 培地で再培養した。その培養液は, アルカリ法によって, プラスミドを精製後, *Bam*HI と *Eco*RI 制限酵素 (TaKaRa 社) と反応させ, アガロースゲル電気泳動で, 増幅された DNA 断片を確認した。そのプラスミドは, High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を用いて精製後, シーケンスによって, DNA 塩基配

列を決定し、日本の DNA データバンクである DDBJ に登録した。遺伝子解析は、NCBI Blast: Nucleotide Sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) の検索サイトを利用した。

FeLV-AKTの全長クローニング

FeLV-AKT の組込み部位近傍の遺伝子を単離することによって、全長の FeLV-AKT を PCR 法で増幅した。

FeLV-AKT の組込み部位近傍の遺伝子の探索は、未知領域のクローニングが可能な Right walk kit (BEX)を用い、5' Right walk のプロトコールに従って行った。症例 No. 1344 の染色体 DNA は、*Bam*HI 制限酵素 (TaKaRa 社)反応を 37°C, 2 時間行った。その酵素反応した DNA は、*Klenow* Fragment (3' →5' exo-) (5U) (Biolabs), dGTP (1mM) (BEX)と混合し、インキュベーションを 25°C, 15 分間行った後、一塩基伸長反応を 75°C, 20 分間行った。一塩基伸長した DNA は、RWA-1(100pmol) (BEX), Ligation high Ver. 2 (TOYOBO)と混合し、16°Cで一晩反応させ、アダプターを結合した。そのアダプター結合した DNA を用いて、First PCR を行った。First PCR は、アダプター結合した DNA を鋳型として、Fe-120R sense primer (5' -TTGCCAGGGACACCTCCATC-3'), Fe-121 reverse primer R (5' -TGGGTCTGGAAGGAGTACTTCAGGG-3'), KOD-Plus-(1.0U) (TOYOBO), 10×Buffer for KOD-plus-, 2mM dNTPs, 25mM MgSO₄, WP-1 (10pmol) (BEX)と混合し、DNA の増幅を行った。PCR 条件は、Pre Denature を 94°C, 2 分間、サイクリングは、Denature を 94°C30 秒間、Annealing を 65°C, 30 秒間、Extension を 68°C, 5 分間を 35 サイクルとした。その PCR で得られた DNA を 1/100 に希釈し、次の Second PCR の鋳型とした。Second PCR は、その鋳型 DNA, FeLV-A/Glasgow-1 (Accession

No. KP728112) の 217-238bp の 部 位 に 相 当 す る Fe-7R primer (5' - GTCAACTGGGGAGCCTGGAGAC-3'), kit に 付 属 す る WP-2 (10pmol) (BEX), Go taq (Promega) と 混 合 し, DNA の 増 幅 を 行 っ た。PCR 条 件 は, Pre Denature を 94°C, 2 分 間, サ イ ク リ ン グ は, Denature を 94°C, 30 秒 間, Annealing を 65°C, 30 秒 間, Extension を 68°C, 5 分 間 を 30 サ イ ク ル と し た。そ の PCR 産 物 は, ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 気 泳 動 し, 増 幅 さ れ た DNA 断 片 を 確 認 し た。そ の DNA 断 片 は, QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) を 用 い て 精 製 し た。そ れ を ク ロ ー ニ ン グ 用 ベ ク タ ー の PGEM®-T Easy vector (Promega) を 使 用 し, ラ イ ゲ ー シ ョ ン 反 応 を 室 温 60 分 間 行 い, プ ラ ス ミ ド を 作 成 し た。そ の プ ラ ス ミ ド と Ecos™ Competent *E. coli* (Nippomgene) で ト ラ ン ス フ ォ ー メ ー シ ョ ン を 行 い, プ ラ ス ミ ド を 精 製 し た。ま た, そ の プ ラ ス ミ ド は, シ ー ク エ ン ス に よ っ て, ウ イ ル ス 5' 近 傍 の 塩 基 配 列 を 含 む FeLV の DNA 断 片 で あ る こ と を 確 認 し た。そ の DNA 断 片 の 塩 基 配 列 の 情 報 を も と に, 5' お よ び 3' の Franking primer を 作 製 し た。そ の 情 報 は, NCBI の Accession No. AANG01310906 に あ た り, そ の う ち の 996-1023bp 部 位 の 塩 基 配 列 を も と に, Fe-125S sense primer (5' - CATGCTTACCTCCAACATCTGGACAAG-3') を, そ の 下 流 の 1363-1391bp の 塩 基 配 列 を も と に, Fe-123R reverse primer (5' - TGTGGCAAGATAATGCTACATTGTGTGTA-3') を 作 成 し た。PCR は, 症 例 No. 1344 の 染 色 体 DNA を 鋳 型 と し て, Fe-125S (5pmol), Fe-123R (5pmol), KOD FX Neo (0.5U) (TOYOBO), 2×PCR Buffer, 2mM dNTPs と 混 合 し, DNA の 増 幅 を 行 っ た。PCR 条 件 は, Pre Denature を 94°C, 2 分 間, サ イ ク リ ン グ は, Denature を 94°C, 10 秒 間, Annealing を 65°C, 30 秒 間, Extension を 68°C, 5 分 間 を 30 サ イ ク ル と し た。そ の PCR 産 物 を ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 気 泳 動 し, 増 幅 さ れ た DNA 断 片 を 確 認 し た。そ の DNA 断 片 は, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を 用 い て 精 製 し, 分 子 ク ロ ー ニ ン グ 用 ベ ク タ ー の

Zero Blunt PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) の TOPO vector と混合し、ライゲーション反応を室温、30 分間行い、プラスミドを作成した。そのプラスミドは、Competent high DH5 α (TOYOBO) と混合し、トランスフォーメーションを行い、アンピシリンを添加した LB 寒天培地で培養した。生育したコロニーを任意に取り、アンピシリンを添加した LB 培地で再培養した。その培養液は、アルカリ法によって、プラスミドを精製後、*EcoRI* 制限酵素 (TaKaRa 社) と反応させ、アガロースゲル電気泳動で、増幅された DNA 断片を確認した。そのプラスミドは、Higih Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を用いて精製後、シーケンスによって、DNA 塩基配列を決定し、DDBJ に登録した。遺伝子解析は、NCBI Blast: Nucleotide Sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) の検索サイトを利用した。FeLV-*AKT* の遺伝子型は、以前の研究で FeLV *gag* 遺伝子の系統解析に使用したデータセットを用い、その中に本研究で分子クローニングした塩基配列を加えて系統解析を行い、決定した (Kawamura *et al.*, 2015)。

RT-PCR 法による Feline c-*AKT1* のクローニング

Feline c-*AKT1* は、5' /3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) を用いて、ネコの卵巣の RNA から単離した。FeLV-*AKT* の分子クローンから得られた AKT 3' UTR 領域の 49bp の配列情報をもとに、Fe-117R reverse primer (5' -AACTAGGGATCGGATTGTCCGCGAGGCTTCCTCC-3') を作成した (Accession No. ACBE01217183 の 2337-2370bp 部位に相当)。その primer を用いて、ネコの卵巣の total RNA を鋳型として、5' RACE 法により、AKT の First-strand cDNA を作成し、精製した。精製した cDNA に対して Poly[A] tailing を行い、それを鋳型として、First PCR を行った。その

PCRは、Oligo dT-anchor primerと Accession No. ACBE01217183 の 2310-2335bp 部位のネコのゲノム塩基配列情報をもとに作成した Fe-118R reverse primer (5'-CGTCCCCTGAAGCCGGCGTCGGGAGT-3') , KOD FX Neo (TOYOBO) と混合し, cDNA を増幅した。PCR 条件は, Pre Denature を 94°C, 2 分間, サイクリングは, Denature を 94°C, 10 秒間, Annealing を 65°C, 30 秒間, Extension を 68°C, 105 秒間を 30 サイクルとした。その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し, 増幅された DNA 断片を確認した。その DNA 断片は, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて精製し, pCR® 4Blunt-TOPO (invitrogen™) vector を用いて, クローニングを行い, シークエンスによって, Feline c-*AKT1* の塩基配列を決定し, DDBJ に登録した。遺伝子解析は, NCBI Blast: Nucleotide Sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) の検索サイトを利用した。

ウエスタンブロット法による FeLV-*AKT* の検出

Feline c-*AKT* および FeLV-*AKT* の分子クローンと全長クローンの蛋白質発現を確認するために, 各クローンのクローニングプラスミドを鋳型として, PCR を行った。Feline c-*AKT* を鋳型とする場合は, v-AKT-4S sense primer (5'-AGGGATCCACCATGAACGACGTGGCCATCGT-3') と v-AKT-2R reverse primer (5'-CAGAATTCAGGCCGTGCCGCTGGCGGAGTAG-3') を使用し, FeLV-*AKT* を鋳型とする場合は, v-AKT-3S sense primer (5'-AGGGATCCTGGATTGTTGGGATCTCATCCGT-3') と v-AKT-2R reverse primer を使用した。PCR は, 上記の各プラスミドと各 primer セット, KOD FX Neo (TOYOBO) と混合し, DNA の増幅を行った。その各 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し, 各増幅された DNA を確認した。その各 DNA 断片は, High Pure PCR

Product Purification Kit (Roche)を用いて精製後, *Bam*HI と *Eco*RI 制限酵素 (TaKaRa 社) 反応を 37°C, 60 分間行い, アガロースゲル電気泳動し, 精製した。また, pEF6/Myc-HisB (Invitrogen™) の発現 vector を *Bam*HI と *Eco*RI 制限酵素 (TaKaRa 社) で反応させ, アガロースゲル電気泳動し, 精製した。制限酵素で処理した発現 vector と各 PCR 産物は, Ligation high Ver. 2 (TOYOBO) と混合し, ライゲーションを行った。Ecos™ Competent *E. coli* (Nippongene) でトランスフォーメーションし, プラスミドを作成後, シークエンスによって各塩基配列を確認した。FeLV-*AKT*の全長クローニングから得た発現プラスミドを FeLV-*AKT* Fe1344/pEF とし, FeLV-*AKT*の分子クローニングから得た発現プラスミドを clone1/pEF, clone2/pEF, clone3/pEF と命名した。また, 発現プラスミド作成に用いた pEF6/Myc-HisB (Invitrogen™)の発現 vector を pEFself : empty vector (Empty)として用い, 陰性コントロールとした。

各発現プラスミドを 10%ウシ胎子血清 (FCS) , ペニシリン, ストレプトマイシンを加えた D-MEM (High Glucose) (Wako) で培養したコンフルエントな HEK293T 細胞に, Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし, 培養 2 日後に回収した。回収した細胞は, Lysis Buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1%NP-40, 2mM EDTA, 1mMNa3VO4, 1μ/ml aplotinin, 1μ/ml leupeptin) を用いて細胞を可溶化し, 細胞上清を回収した。各細胞上清に 4×Sample Buffer Solution(2ME+) (Wako)を混和し, インキュベーションを 100°C, 5 分間行い, 14800rpm で 1 分間遠心分離した。その上清を長寿ゲル 10% (Oriental Instruments Co., Ltd.) を用いて, SDS-ポリアクリドアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。マーカーは, Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad) を用いた。その SDS-PAGE 後, ウェスタンブロット法において, PVDF Membrane (Immobilon-P Transfer Membrane

0.45 μ l pore size : Millipore) へ転写し, ブロッキング液 10ml (10%スキムミルク, TBS-T) 溶液中で, 室温, 1 時間振盪した。抗体は, Anti-Myc-HRP Antibody (Wako) あるいは一次抗体として Anti-Akt1 (5C10) Antibody: sc-81434 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), 80S-159 : anti-FelV p15 Antibody (National Cancer Institute Frederick, MD), Phospho-Akt (Ser473) Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY[®]), ローディングコントロールとして Anti- β Actin Antibody (Gen Script) を用いた。その Membrane を, TBS-T で希釈し, 室温, 1 時間の振盪または 4°C にて一晩浸した。また, その Membrane を TBS-T 溶液中で洗浄した後, 二次抗体 : Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY[®]), donkey anti-goat IgG-HRP : sc-2056 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), anti-rabbit IgG-HRP Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY[®]) を Membrane に添加後, 室温で 1 時間振盪した。その Membrane の洗浄を行い, 20 \times LumiGLO (R) Reagent and 20 \times Peroxide (Cell Signaling Technology) を用いて蛋白質を検出した。

(4) 結果

FeLV-*AKT* の *gag* 遺伝子の検出

本研究で対象とした家ネコ（症例 No. 1344）は、3歳のオス、雑種で、T細胞受容体遺伝子の再編成に基づいて、T細胞リンパ腫と診断された(Mochizuki *et al.*, 2011; Mochizuki *et al.*, 2012)。

FeLV の遺伝子調査で用いた FeLV *gag* 遺伝子を検出するための PCR 法(Kawamura *et al.*, 2015)を用い、症例 No. 1344 の家ネコの染色体 DNA から、約 2.4kbp と約 2.9kbp サイズの DNA 断片を検出した（図 1A）。FeLV の代表株として、FeLV-A/Glasgow-1 (Accession No. KP728112) (Stewart *et al.*, 1986)を陽性コントロールに用い、約 2.4kbp の DNA 断片を検出した（図 1A）。症例 No. 1344 から得られた 2.4kbp サイズの DNA 断片と陽性コントロールの DNA 断片のサイズは一致し、症例 No. 1344 から得られた 2.9kbp サイズの DNA 断片が異常なサイズであることが分かった（図 1A）。症例 No. 1344 から得られた 2.4kbp と 2.9kbp の DNA 断片を分子クローニングし、2.4kbp からは1つ、2.9kbp からは3つの clone の塩基配列を決定した。遺伝子解析の結果、約 2.4kbp の DNA 断片は、実際は 2373bp であり、FeLV *gag* 遺伝子であることがわかった。その遺伝子を g1344-1 として、DDBJ に登録した (Accession No. AB847158)。その配列と代表株の FeLV-A/Glasgow1 との類似性は 93%であった。約 2.9kbp の DNA 断片は、実際は 2936bp (clone1) , 2946bp (clone2) , 2950bp (clone3) の3つの異なるサイズの *c-AKT1* を組込んだ FeLV *gag* 遺伝子であることが分かった。その3つの clone の塩基配列を DDBJ に登録した (FeLV-*AKT*/clone1 (Accession No. AB898753) , clone2 (Accession No. AB898754) , clone3 (Accession No. AB898755))。これらは DDBJ, EMBL

と GenBank のデータベースで利用可能である。Feline *c-AKT1* は、ネコにおけるでクローニング報告はなく、*Canis lupus familiaris v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1), transcript variant X2, mRNA (Accession No. XM_548000)* の 585bp-1729bp に 94%一致した。また、マウス *c-AKT1 (Accession No. NM_009652)* がアミノ酸レベルで類似しており、その類似性は 99.0-99.2%であった。

各 clone は、蛋白質のキナーゼドメインと PH ドメインの一部 (0.5kbp) をコードし、FeLV LTR および Gag 配列も含んでいた。また、各 clone は、マウスレトロウイルス AKT8 (Accession No. A40831) (Staal *et al.*, 1977) に類似していたが、AKT8 が PH ドメインを保有しているのに対し、本研究で得られたすべての clone では PH ドメインが欠損しており、AKT8 とは明らかに異なった構造を持っていた。

FeLV-*AKT* の遺伝子構造

症例 No.1344 から clone1, clone2, clone3 の組換え FeLV *gag* 遺伝子を単離したが、ネコのゲノムにそれらのプロウイルスが挿入されているか否かは分からない。それを確認するために、ネコゲノムを含む全長 FeLV-*AKT* プロウイルスのクローニングを試みた。PCR は、症例 No.1344 の染色体 DNA を鋳型として、Fe-125S sense primer と Fe-123R reverse primer を用い、約 4.6kbp の DNA 断片 (FeLV-*AKT*) と 0.3kbp の DNA 断片 (Pre-integration site) を得た (図 1B)。遺伝子解析の結果、4.6kbp の DNA 断片は、*v-AKT* の 1581bp コード領域と FeLV の不完全な *gag*, *pol* と *env* 遺伝子からなる 4615bp プロウイルスであった (図 1C)。その DNA 断片は、FeLV-*AKT* (F1344) と命名し、その塩基配列を DDBJ に登録した (Accession No. AB743573)。FeLV の *gag*, *pol* と *env* 遺伝子は、それらのコード領域に終止コドンを含んでいた (図 1C)。詳細な遺伝子解

析の結果, v-AKTがコードする 527 個のアミノ酸配列を持ち, N 末端領域における完全な Gag マトリックス (MA) および Gag p12 をコードする 145 個のアミノ酸と C 末端領域の c-AKT1 をコードする 382 個のアミノ酸で構成されていた。FeLV-AKT は, マウスで見つかった AKT8 ウイルスと同様に, Gag-AKT 融合蛋白質をコードするが, FeLV-AKT は c-AKT1 のアミノ酸 1~98 を欠き, PH ドメインを含まない。そのため, FeLV-AKT は, 構造的に, AKT8 ウイルスとは異なっていた (図 1D)。また, FeLV-AKT の Gag MA は, N-ミリスチル化シグナル(Henderson *et al.*, 1983; Schultz & Oroszlan, 1983)を含み, v-AKT は, ミリスチル化 Gag-AKT 蛋白質をコードしていた。

FeLV の遺伝子型は, *env* 遺伝子の系統解析により決定され, 最近の研究結果では, *gag* 遺伝子においても同様に系統解析することが可能であることが分かった (Kawamura *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2013)。そこで, FeLV-AKT(F1344)の遺伝子型を, FeLV に組込まれた c-AKT1 の 5' 末端側の *gag* 領域で系統解析を行ったところ, 日本国内に分布する GI/clade 3 の遺伝子型に分類されることが分かった (Kawamura *et al.*, 2015)。

FeLV-AKT に存在する Feline c-AKT1 を明らかにするために, RT-PCR 法を用いて, ネコの卵巣組織から Feline c-AKT1 の cDNA を単離した。Feline c-AKT1 の塩基配列は, DDBJ に登録した (Accession No. AB761984)。その cDNA は, 1440bp のコード領域を含み, アミノ酸配列は 480 アミノ酸で, ヒト (Accession No. M63167) およびマウス AKT1 蛋白質 (Accession No. NM_009652) のアミノ酸配列と比較すると 99.4%類似していた。遺伝子解析の結果, この clone は, 分子系統樹上でも AKT1 遺伝子群に分類した (data not shown)。

FeLV v-AKT の各 clone を詳細に遺伝子解析し, 各 clone と Feline AKT1 のアミノ酸

配列を比較した。FeLV v-*AKT* clone1 は, FeLV LTR, *gag* および *AKT* 配列を含む 2936bp のヌクレオチド配列を有した。そのオープンリーディングフレーム (ORF) は, Gag-AKT 融合蛋白質の 527 個のアミノ酸をコードしていた。その Gag-AKT 融合蛋白質は, N 末端領域に完全長 Gag MA および Gag p12 の断片を含む 145 アミノ酸の Gag 配列と 328 アミノ酸の C 末端領域の Feline AKT1 配列で構成していた。Clone1 は, Feline AKT1 のアミノ酸 1 から 98 を含まず, PH ドメインを欠損していた (図 1D)。また, clone1 と Feline AKT1 のアミノ酸を比較すると, clone1 の Gag-AKT は, Feline AKT1 の 281 番目のアミノ酸部位に対応する 328 番目のメチオニンがロイシンに変異 (M328L) および 421 番目のアミノ酸部位に対応する 468 番目のロイシンがプロリンに変異 (L468P) を含んでいた (表 1)。FeLV v-*AKT* clone2 は, FeLV LTR, *gag* および *AKT* 配列を含む 2946bp のヌクレオチド配列を有した。ORF は, Gag-AKT 融合蛋白質の 527 個のアミノ酸をコードしていた。Clone2 は, FeLV-AKT F1344 (図 1C) と本質的に構造が類似していた。しかし, FeLV-AKT F1344 で見られたアミノ酸 382 番目のメチオニンのリジンへの変異 (M328L) は, clone2 には存在しなかった (表 1)。Clone2 に含まれる Gag-AKT は, Feline c-AKT1 と比較して ORF に変異を有さなかった (表 1)。FeLV v-*AKT* clone3 は, FeLV LTR, *gag* および *AKT* 配列を含む 2950bp のヌクレオチド配列を有した。ORF は, Gag-AKT 融合蛋白質の 482 個のアミノ酸をコードしていた。ORF の開始コドンは, Gag の開始コドンを含む Gag MA の最初の 45 アミノ酸が欠けており, clone1 と clone2 とは翻訳開始部位が異なった。そのため, clone3 の Gag-AKT 蛋白質は, ミリストイル化シグナルが存在しないことが分かった (図 1D)。Clone3 の Gag-AKT は, clone3 と Feline AKT1 のアミノ酸を比較すると, clone3 の Gag-AKT は, Feline AKT1 の 281 番目のアミノ酸部位に対応する 283 番目のメチオニンがロイシンに変異 (M283L) およびキ

ナーゼドメインである 410 番目のアミノ酸部位に対応する 412 番目のセリンがアスパラギンに変異 (S412N) を含んでいた (表 1)。Clone3 は、他の clone と異なった翻訳開始部位を有していた (図 1 D)。また、他の clone の MA 領域に存在する 31 アミノ酸の N-ミリスチル化シグナルにあたる部分が、clone3 では欠損していた (図 1D)。

以上のことから、FeLV *gag* 遺伝子と Feline *c-AKT1* との間の組換え部位は、すべての clone において同じであったが、各 clone の ORF は、異なる突然変異または欠失、挿入を有することが分かった。

FeLV-*AKT* の蛋白質発現

FeLV-*AKT* F1344 プロウイルスおよび pEF6/ Myc-His 発現 vector を持つプラスミド *c-AKT1*, *v-AKT/clone1*, *clone2*, *clone3* を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、*v-AKT* および Feline *AKT1* の発現を確認した。Feline *AKT1* と *v-AKT* 蛋白質の発現は、マウスモノクローナル抗 *AKT1* 抗体およびマウス抗 Myc タグ抗体 HRP を用いて、ウエスタンブロット分析によって検出した (図 2)。また、各 FeLV *v-AKT* は、ヤギ抗 FeLV p15 (MA) 抗体を用いて検出され、FeLV *v-AKT* が細胞内の Gag-*AKT* 融合蛋白質として発現されることを明らかにした (図 2)。

AKT のキナーゼドメインは、スレオニン 308 (T308) およびセリン 473 (S473) のリン酸化によって活性化されることが知られている (Ahmed *et al.*, 1993; Bellacosa *et al.*, 1998)。抗リン酸化 *AKT* S473 抗体を用いて *AKT* の活性化を確認したところ、FeLV-*AKT* F1344 および Feline *AKT1*, *v-AKT/clone1*, *clone2* の *AKT* 活性化が検出され、*clone3* では検出されなかった (図 2)。

(5) 考察

本研究では、ネコのリンパ腫において新規の癌遺伝子を組込んだ FeLV (Gag-AKT 融合蛋白質をコードする *v-AKT* を持つ) を「FeLV-*AKT*」と命名し、分子クローンの同定を行った。遺伝子解析の結果、FeLV に組込んだ遺伝子は、Feline *c-AKT1* であると推測される。

FeLV-*AKT* の特徴は、AKT1 の恒常的活性化に必要な膜局在に關与する AKT の PH ドメインを欠いているところにある。しかしながら、Gag-AKT 融合蛋白質は、膜局在性のミリスチル化シグナルを含んでおり、また、ウイルスの LTR によって発現されることから、推定上、恒常的な活性型となると考えている。さらに、マウスレトロウイルス AKT8 およびヒト AKT において、実験的に、欠失あるいは破壊された PH ドメインを持つ AKT や人工的にミリスチルシグナルを付加した AKT は、活性型となることが報告されている (Aoki *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 1996; Parikh *et al.*, 2012)。以上のことから、FeLV-*AKT* の PH ドメインが欠失していても、ミリスチル化シグナルを有するなら、活性型となる可能性がある。

FeLV-AKT F1344 と clone1 を Feline AKT1 のアミノ酸と比較すると、FeLV-AKT F1344 と clone1 の Gag-AKT, Feline AKT1 の 281 番目のアミノ酸部位に対応する 328 番目のメチオニンがロイシンに変異 (M328L) を含んでいた (表 1)。マウス AKT1 でのメチオニン 281 番目のアミノ酸部位 (M281) は、蛋白質の ATP 結合ポケットであると考えられている (Chan *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2007)。そのため、FeLV-AKT F1344 と clone1 のキナーゼ活性は、低下している可能性がある。

FeLV Gag 蛋白質の前駆体である gPr80gag (glyco-Gag) および Pr65gag は、*gag* 遺

伝子上にある 2 つの翻訳開始部位から翻訳されると考えられている (Laprevotte *et al.*, 1984; Neil *et al.*, 1980)。FeLV v-*AKT* clone (clone3 を除く) にコードされる Gag-AKT 融合蛋白質は, *gag* 遺伝子の第一の翻訳開始部位で stop コドン変異が出現するため, *gag* 遺伝子の第二の翻訳開始部位から翻訳されると考えられる。また, FeLV v-*AKT* clone (clone3 を除く) の FeLV Gag p15 (MA) は, 31 アミノ酸の N-ミリスチル化シグナルを有し, 第二の翻訳開始部位から翻訳されると考えらる。対照的に, clone3 は, ミリスチル化シグナルがないため, 異なった翻訳開始部位を持つと考えられる。

本研究では, いくつかの変異を ORF 中に含む FeLV v-*AKT* clone が同定された。また, その腫瘍 DNA には, v-*AKT* の「heterogeneity」が存在した。そのことは, 腫瘍と v-*AKT* との関連性がある可能性を示す。FeLV-*AKT* のプロウイルスが腫瘍の原因となる場合, 腫瘍を形成した細胞でクローナルにゲノムに組込まれたプロウイルスが見つかるはずである。しかしながら, 本研究では FeLV-*AKT* プロウイルスが, 腫瘍内にクローナリィに組込まれているかどうかの解析は進めていない。

本研究では, *in vitro* および *in vivo* での FeLV-*AKT* の癌化能は明らかにできなかった。FeLV が *c-src* を oncogene capture することで出現したネコ肉腫ウイルス (FeSV) は, 培養中の線維芽細胞を形質転換し, *in vivo* で線維肉腫を誘導する (Besmer *et al.*, 1986a)。FeLV-*AKT* は, 線維肉腫を発症させる FeSV とは異なり, 線維芽細胞の形質転換も肉腫の誘導もしない可能性がある。

FeLV は, enFeLV (Kawamura *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2013) および ERV-DC (Anai *et al.*, 2012) の内在性レトロウイルス, あるいは *c-onc* を取り込んだ多数の組換え事象および様々な組換え形態の FeLV が見つかっている (Fulton *et al.*, 1987;

Levy *et al.*, 1984; Mullins *et al.*, 1984; Neil *et al.*, 1984; Rohn *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2014)。FeLV は、組換え易いウイルスといえる。そのため、細胞の増殖および細胞の分化に重要な調節因子として機能する新規の癌原遺伝子が見つかる可能性がある。また、組換えウイルスの出現は、FeLV 感染ネコにおける悪性疾患の特異性、潜在的病原性および症状を変える可能性がある。以上により、組換え FeLV の研究は、内在性のゲノムにおける病気との関連性やメカニズムを解明することに役立つと考えている。

(6) 図と表

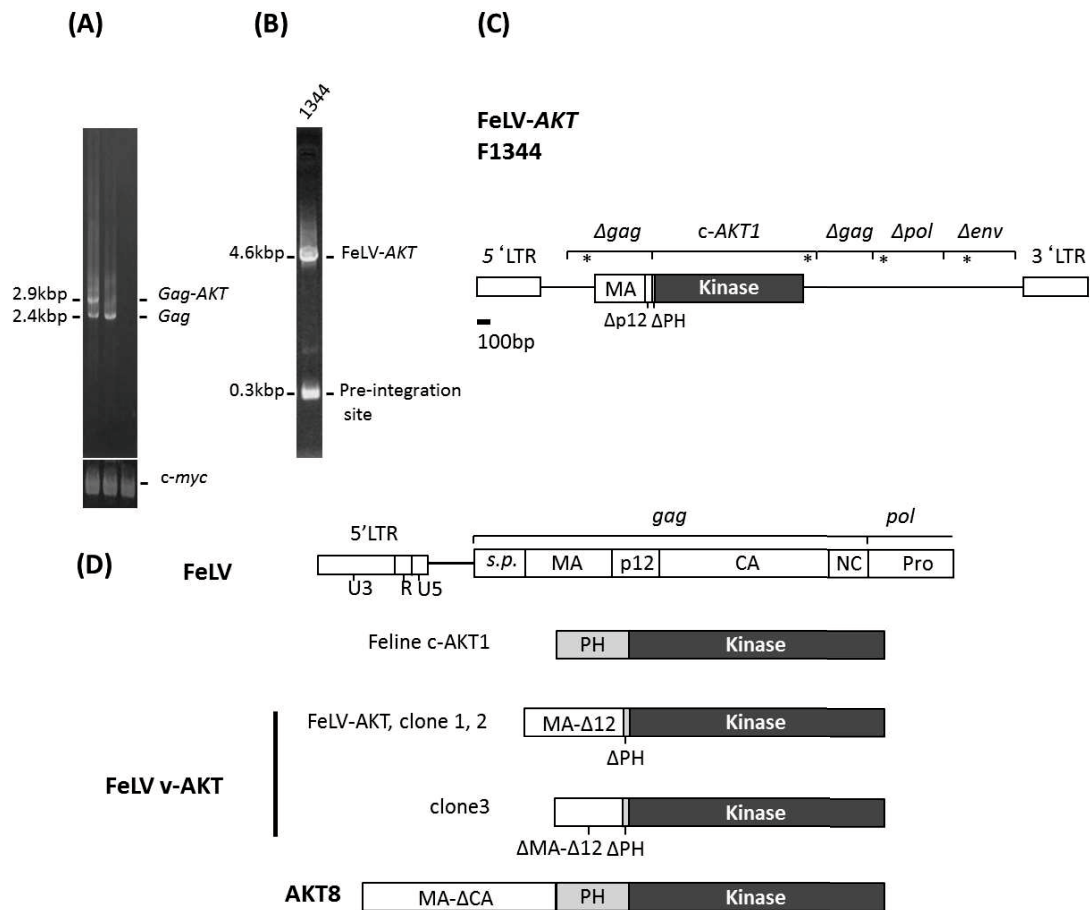


図1 組換え FeLV-*AKT* プロウイルスゲノムの検出と FeLV v-*AKT* の特徴

- A 腫瘍細胞（症例 No. 1344），AH927 細胞と FeLV-A/Glasgow-1 に感染した AH927 細胞の FeLV *gag* 遺伝子を PCR 増幅した電気泳動像。
内部対照として *c-myc* 遺伝子座の一部を増幅した (Anai *et al.*, 2012)。
- B 全長 FeLV-*AKT* プロウイルスゲノムを PCR 増幅した電気泳動像。

C 全長 FeLV-AKT F1344 の概略図。 Δgag , Δpol , Δenv は欠損した *gag*, *pol*, *env* 遺伝子を示す。*は stop コドンを示す。 ΔMA , $\Delta p12$, ΔPH は、欠損した MA, p12, pH を示す。

D 5' LTR, *gag* 遺伝子および部分的 *pol* 遺伝子を含む FeLV の 5' 部分の模式図を上にし、FeLV-AKT, v-AKT clone1, clone2, clone3, Feline c-AKT1 およびマウスレトロウイルス AKT8 の模式図を下に示す。 ΔMA , $\Delta p12$, ΔPH は、欠損した MA, p12, pH を示す。

s.p. : シグナルペプチド。 MA : マトリックス。 CA : カプシド。 NC : ヌクレオカプシド。 Pro : プロテアーゼ。 PH : プレクストリン相同ドメイン。

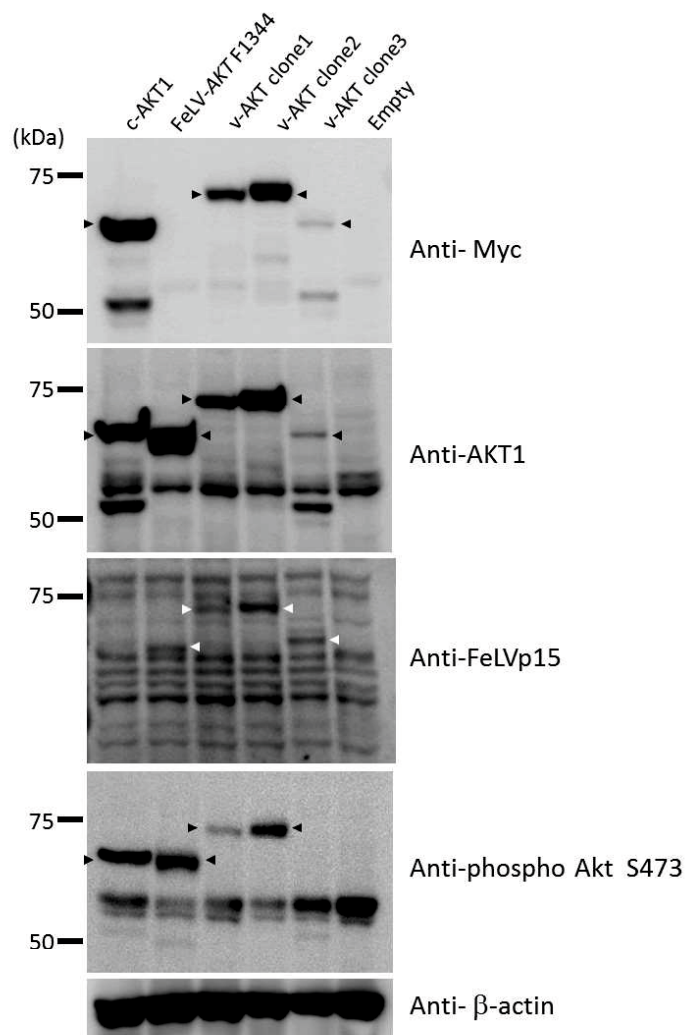


図2 FeLV v-AKT および Feline AKT1 の発現

HEK293T 細胞に FeLV-AKT F1344, v-AKT clone1, clone2, clone3 と Feline AKT1 をトランスフェクションし, Anti-Myc tag, AKT1, FeLV p15 (MA), AKTS473 リン酸化と βアクチンを用いたウエスタンブロッティング法によりその発現を確認したポリアクリルアミド電気泳動像。矢印は特異的なバンドを示す。Empty は empty vector を示す。

表 1 Feline AKT1 との比較による FeLV v-AKT のアミノ酸変化

	ORF size	Changes at amino acid positions within AKT		
Feline AKT1	480	M281	S410	L421
FeLV-AKT F1344	527	<u>M328L</u>	S457	L468
v-AKT clone 1	527	<u>M328L</u>	S457	<u>L468P</u>
v-AKT clone 2	527	M328	S457	L468
v-AKT clone 3	482	<u>M283L</u>	<u>S412N</u>	L423

下線が引かれたアミノ酸は、Feline AKT1 に対して変化したアミノ酸を示す。

M: メチオニン。L: ロイシン。S: セリン。N: アスパラギン。P: プロリン。

結論

FeLV の enFeLV との組換えは、これまで *env* 遺伝子において見つかり、詳細に解析されてきた。FeLV *gag* 遺伝子において、組換え現象について調査されたことがなく、ほとんど知られていなかった。本研究では、FeLV *gag* 遺伝子に、宿主の遺伝子である enFeLV の配列や *v-AKT* が存在することを発見した。EnFeLV *gag* 遺伝子を保持した組換え FeLV は高い頻度で検出されることが判明し、FeLV 感染ではある程度共通に生じている現象であることが結論される。この頻繁に認められる組換え体の出現の意義については、本研究では明らかにすることは出来なかった。しかし、HIV-1 の研究では、ウイルスの組換え体は、個体間を伝播し、親株よりも強毒株になることが示唆されている (Robertson *et al.*, 2000)。また、ウイルスの組換えによって、ウイルスの致死変異を排除し、ウイルスとしての機能修復を行っていることが報告されている (Clavel *et al.*, 1989)。家ネコに骨髄性白血病を引き起こすことが知られている FeLV-B/GM1 株は enFeLV *gag* 遺伝子を持ち、この内在性配列が特異な病原性発現と関連していることが報告されている。(Tzavaras *et al.*, 1990)。また LP-BM5 という MLV は、内在性レトロウイルスの *gag* 遺伝子を持ち、その領域が免疫不全を引き起こす原因であることが証明されている (Aziz *et al.*, 1989; Chattopadhyay *et al.*, 1989)。これらの知見を考慮にすると、enFeLV *gag* 遺伝子を保持した FeLV は、特異な病原性を示すウイルスの可能性がある。EnFeLV *gag* 遺伝子を保持した FeLV では *gag* の ORF が変更される場合が認められ、そのため、Gag の構造蛋白の変更となると考えられる。EnFeLV *gag* 遺伝子と組換えを起こすことによって、ウイルスの致死変異がもたらされる場合

が認められたため、ある種の enFeLV *gag* 遺伝子は抗ウイルス分子として機能を示すことが考えられる。また、ある種の組換え FeLV は、家ネコ間の間におけるウイルス伝播に優勢に生じていることも示唆された。これとは反対に、ウイルス感染では、通常、免疫淘汰圧の影響を受けるので、FeLV は変異によって機能しなくなった *gag* 遺伝子の修復のため、enFeLV との組換えによって、一見、遺伝子の修復が生じているようにも仮説することができる。

FeLV の *gag* 遺伝子と *env* 遺伝子の系統解析によって、FeLV *env* 遺伝子と同様に FeLV *gag* 遺伝子にも多様性があること、また、その多様性は、*env* 遺伝子よりも *gag* 遺伝子の方が小さいことが判明した。このことは、進化速度が *gag* 遺伝子の方が *env* 遺伝子よりも小さいことを示している。あるいは、*gag* 遺伝子の組換えによって、遺伝的多様性が小さく抑えられている可能性もある。

本研究では FeLV-*AKT* を発見し、その構造について詳細に解析を進めた。レトロウイルスはウイルス間、宿主遺伝子との間でとても頻繁に組換えを起こすことが知られている。組換え現象が、ウイルスや宿主の生存にとってそれぞれ有利に働くのか、不利に働くのか、深く考えさせられたが、結局、どちらの可能性も含んでいると思われる。

本研究は、FeLV の *gag* 遺伝子に焦点を当て、ウイルスの遺伝的多様性ならびに組換え現象について明らかにすることができた。これらの知見はワクチン開発には重要な情報であり、今後ウイルス感染症の制圧に貢献できるものと考えられる。また、レトロウイルス学における新たな発見の成果を提供したと結論する。

謝辞

本論文の作成において、多くのご指導を賜りました山口大学共同獣医学部感染免疫学研究室の西垣一男先生，三宅在子先生に深く感謝致します。ご助言および共同研究頂きました辻本元先生（東京大学大学院 農学生命科学研究科），遠藤泰之先生（鹿児島大学農学部獣医学科獣医内科学研究室），中谷雅明先生（横浜市立大学医学部），中川草先生（東海大学医学部），久末正晴先生（麻布大学獣医学部），また血液サンプル等の提供にご協力頂きました大里義治先生（有限会社 カホテクノ），獣医師の先生方に深く感謝致します。実験のご指導，ご協力およびご助言を頂きました同研究室の渡部伸也さん，梅原大吾さん，穴井由香里さん，越智春陽さん，小田原由佳さん，Minh Ha Ngo さんに心から感謝致します。皆様，本当に有難うございました。

参考文献

- Abkowitz, J. L., Holly, R. D. & Adamson, J. W. (1987). Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia: the kinetics of erythroid marrow failure. *J Cell Physiol* **132**, 571-577.
- Ahmed, N. N., Franke, T. F., Bellacosa, A., Datta, K., Gonzalez-Portal, M. E., Taguchi, T., Testa, J. R. & Tsichlis, P. N. (1993). The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene* **8**, 1957-1963.
- Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., Nakagawa, S., Kawamura, M., Gojobori, T. & Nishigaki, K. (2012). Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *J Virol* **86**, 8634-8644.
- Anderson, M. M., Luring, A. S., Burns, C. C. & Overbaugh, J. (2000). Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* **287**, 1828-1830.
- Anderson, M. M., Luring, A. S., Robertson, S., Dirks, C. & Overbaugh, J. (2001). Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. *J Virol* **75**, 10563-10572.
- Anisimova, M. & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* **55**, 539-552.
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tsichlis, P. & Vogt, P. K. (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- A* **95**, 14950-14955.
- Aziz, D. C., Hanna, Z. & Jolicoeur, P. (1989).** Severe immunodeficiency disease induced by a defective murine leukaemia virus. *Nature* **338**, 505-508.
- Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J. & Tschlis, P. (1998).** Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**, 313-325.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. & Tschlis, P. N. (1991).** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-277.
- Benveniste, R. E., Sherr, C. J. & Todaro, G. J. (1975).** Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. *Science* **190**, 886-888.
- Benveniste, R. E. & Todaro, G. J. (1975).** Segregation of RD-114 AND FeL-V-related sequences in crosses between domestic cat and leopard cat. *Nature* **257**, 506-508.
- Berry, B. T., Ghosh, A. K., Kumar, D. V., Spodick, D. A. & Roy-Burman, P. (1988).** Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. *J Virol* **62**, 3631-3641.
- Besmer, P., Hardy, W. D., Jr., Zuckerman, E. E., Bergold, P., Lederman, L. & Snyder, H. W., Jr. (1983).** The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV. *Nature* **303**, 825-828.
- Besmer, P., Lader, E., George, P. C., Bergold, P. J., Qiu, F. H., Zuckerman, E. E. & Hardy, W. D. (1986a).** A new acute transforming feline retrovirus with

- fms homology specifies a C-terminally truncated version of the c-fms protein that is different from SM-feline sarcoma virus v-fms protein. *J Virol* **60**, 194-203.
- Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F. H., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder, H. W., Jr., Brodeur, D., Zuckerman, E. E. & Hardy, W. D. (1986b).** A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* **320**, 415-421.
- Best, S., Le Tissier, P., Towers, G. & Stoye, J. P. (1996).** Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* **382**, 826-829.
- Boni, M. F., Posada, D. & Feldman, M. W. (2007).** An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* **176**, 1035-1047.
- Bouamr, F., Melillo, J. A., Wang, M. Q., Nagashima, K., de Los Santos, M., Rein, A. & Goff, S. P. (2003).** PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J Virol* **77**, 11882-11895.
- Braun, M. J., Deininger, P. L. & Casey, J. W. (1985).** Nucleotide sequence of a transduced myc gene from a defective feline leukemia provirus. *J Virol* **55**, 177-183.
- Brazil, D. P. & Hemmings, B. A. (2001).** Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**, 657-664.
- Brugge, J. S. & Erikson, R. L. (1977).** Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* **269**,

346-348.

- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M. H., Blanchard, K. L. & Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444.
- Casey, J. W., Roach, A., Mullins, J. I., Burck, K. B., Nicolson, M. O., Gardner, M. B. & Davidson, N. (1981). The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7778-7782.
- Chan, T. O., Zhang, J., Rodeck, U., Pascal, J. M., Armen, R. S., Spring, M., Dumitru, C. D., Myers, V., Li, X., Cheung, J. Y. & Feldman, A. M. (2011). Resistance of Akt kinases to dephosphorylation through ATP-dependent conformational plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 26.
- Chandhasin, C., Coan, P. N., Pandrea, I., Grant, C. K., Lobelle-Rich, P. A., Puetter, A. & Levy, L. S. (2005). Unique long terminal repeat and surface glycoprotein gene sequences of feline leukemia virus as determinants of disease outcome. *J Virol* **79**, 5278-5287.
- Chandhasin, C., Lobelle-Rich, P. & Levy, L. S. (2004). Feline leukaemia virus

- LTR variation and disease association in a geographical and temporal cluster. *J Gen Virol* **85**, 2937-2942.
- Charini, W. A., Todd, S., Gutman, G. A. & Semler, B. L. (1994). Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J Virol* **68**, 6547-6552.
- Chattopadhyay, S. K., Morse, H. C., 3rd, Makino, M., Ruscetti, S. K. & Hartley, J. W. (1989). Defective virus is associated with induction of murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3862-3866.
- Chen, J. H., Moscovici, M. G. & Moscovici, C. (1980). Isolation of complementary DNA unique to the genome of avian myeloblastosis virus (AMV). *Virology* **103**, 112-122.
- Clavel, F., Hoggan, M. D., Willey, R. L., Strebel, K., Martin, M. A. & Repaske, R. (1989). Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* **63**, 1455-1459.
- Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nexo, B., Schultz, A. M., Rein, A., Mikkelsen, T. & Jorgensen, P. (1988). Poorly expressed endogenous ecotropic provirus of DBA/2 mice encodes a mutant Pr65gag protein that is not myristylated. *J Virol* **62**, 479-487.
- Cunningham, M. W., Brown, M. A., Shindle, D. B., Terrell, S. P., Hayes, K. A., Ferree, B. C., McBride, R. T., Blankenship, E. L., Jansen, D., Citino, S. B., Roelke, M. E., Kiltie, R. A., Troyer, J. L. & O'Brien, S. J. (2008). Epizootiology and management of feline leukemia virus in the Florida puma.

- J Wildl Dis* **44**, 537-552.
- Daniels, M. J., Golder, M. C., Jarrett, O. & MacDonald, D. W. (1999). Feline viruses in wildcats from Scotland. *J Wildl Dis* **35**, 121-124.
- Davies, T. G., Verdonk, M. L., Graham, B., Saalau-Bethell, S., Hamlett, C. C., McHardy, T., Collins, I., Garrett, M. D., Workman, P., Woodhead, S. J., Jhoti, H. & Barford, D. (2007). A structural comparison of inhibitor binding to PKB, PKA and PKA-PKB chimera. *J Mol Biol* **367**, 882-894.
- Delviks-Frankenberry, K., Galli, A., Nikolaitchik, O., Mens, H., Pathak, V. K. & Hu, W. S. (2011). Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses* **3**, 1650-1680.
- Derdowski, A., Ding, L. & Spearman, P. (2004). A novel fluorescence resonance energy transfer assay demonstrates that the human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag I domain mediates Gag-Gag interactions. *J Virol* **78**, 1230-1242.
- Doggett, D. L., Drake, A. L., Hirsch, V., Rowe, M. E., Stallard, V. & Mullins, J. I. (1989). Structure, origin, and transforming activity of feline leukemia virus-myc recombinant provirus FTT. *J Virol* **63**, 2108-2117.
- Donahue, P. R., Hoover, E. A., Beltz, G. A., Riedel, N., Hirsch, V. M., Overbaugh, J. & Mullins, J. I. (1988). Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J Virol* **62**, 722-731.
- Donahue, P. R., Quackenbush, S. L., Gallo, M. V., deNoronha, C. M., Overbaugh, J., Hoover, E. A. & Mullins, J. I. (1991). Viral genetic determinants of T-cell

- killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J Virol* **65**, 4461-4469.
- Edgar, R. C. (2004).** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797.
- Evans, L. H. & Cloyd, M. W. (1984).** Generation of mink cell focus-forming viruses by Friend murine leukemia virus: recombination with specific endogenous proviral sequences. *J Virol* **49**, 772-781.
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulic, L. & Hemmings, B. A. (2010).** Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* **346**, 31-56.
- Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368-376.
- Finstad, S. L., Prabhu, S., Rulli, K. R. & Levy, L. S. (2004).** Regulation of FeLV-945 by c-Myb binding and CBP recruitment to the LTR. *Virology* **1**, 3.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Toker, A. (1997).** Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668.
- Fujino, Y., Liao, C. P., Zhao, Y. S., Pan, J., Mathes, L. E., Hayes, K. A., Ohno, K., Tsujimoto, H. & Roy-Burman, P. (2009).** Identification of a novel common proviral integration site, flit-1, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. *Virology* **386**, 16-22.
- Fujisawa, R., McAtee, F. J., Zirbel, J. H. & Portis, J. L. (1997).**

- Characterization of glycosylated Gag expressed by a neurovirulent murine leukemia virus: identification of differences in processing in vitro and in vivo. *J Virol* **71**, 5355-5360.
- Fulton, R., Forrest, D., McFarlane, R., Onions, D. & Neil, J. C. (1987).** Retroviral transduction of T-cell antigen receptor beta-chain and myc genes. *Nature* **326**, 190-194.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. & Gibbs, A. J. (2000).** Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**, 573-582.
- Gitti, R. K., Lee, B. M., Walker, J., Summers, M. F., Yoo, S. & Sundquist, W. I. (1996).** Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **273**, 231-235.
- Gorelick, R. J., Chabot, D. J., Ott, D. E., Gagliardi, T. D., Rein, A., Henderson, L. E. & Arthur, L. O. (1996).** Genetic analysis of the zinc finger in the Moloney murine leukemia virus nucleocapsid domain: replacement of zinc-coordinating residues with other zinc-coordinating residues yields noninfectious particles containing genomic RNA. *J Virol* **70**, 2593-2597.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. (2010).** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**, 221-224.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003).** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.

- Hanada, M., Feng, J. & Hemmings, B. A. (2004).** Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **11**, 1-2.
- Hardy, W. D., Jr. (1992).** Feline oncoretroviruses. In *The Retroviridae*, pp. 109-180. Edited by J. A. Levy. New York, N.Y.: Plenum Press.
- Hardy Jr, W. D. (1993).** Feline Oncoretroviruses. In *The Retroviridae* pp. p109-p180. Edited by J. A. Levy. New York: Springer Science + Business Media
- Hartmann, K. (2012).** Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses* **4**, 2684-2710.
- Hartmann, K., Werner, R. M., Egberink, H. & Jarrett, O. (2001).** Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet Rec* **149**, 317-320.
- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S. & Bieniasz, P. D. (2004).** Retrovirus resistance factors Ref1 and Lvl are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10774-10779.
- Henderson, L. E., Krutzsch, H. C. & Oroszlan, S. (1983).** Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: an unusual post-translational proteins modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 339-343.
- Hisasue, M., Nagashima, N., Nishigaki, K., Fukuzawa, I., Ura, S., Katae, H., Tsuchiya, R., Yamada, T., Hasegawa, A. & Tsujimoto, H. (2009).** Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. *Int J Cancer* **124**, 1133-1141.

- Hofmann-Lehmann, R., Fehr, D., Grob, M., Elgizoli, M., Packer, C., Martenson, J. S., O'Brien, S. J. & Lutz, H. (1996). Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 554-562.
- Hu, W. S. & Temin, H. M. (1990a). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1556-1560.
- Hu, W. S. & Temin, H. M. (1990b). Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**, 1227-1233.
- Jarrett, O., Hardy, W. D., Jr., Golder, M. C. & Hay, D. (1978). The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *Int J Cancer* **21**, 334-337.
- Jarrett, O., Laird, H. M. & Hay, D. (1973). Determinants of the host range of feline leukaemia viruses. *J Gen Virol* **20**, 169-175.
- Jarrett, O. & Russell, P. H. (1978). Differential growth and transmission in cats of feline leukaemia viruses of subgroups A and B. *Int J Cancer* **21**, 466-472.
- Jarrett, W. F., Crawford, E. M., Martin, W. B. & Davie, F. (1964). A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* **202**, 567-569.
- Jolicoeur, P. & Rassart, E. (1980). Effect of Fv-1 gene product on synthesis of linear and supercoiled viral DNA in cells infected with murine leukemia

- virus. *J Virol* **33**, 183-195.
- Katz, R. A. & Jentoft, J. E. (1989).** What is the role of the cys-his motif in retroviral nucleocapsid (NC) proteins? *Bioessays* **11**, 176-181.
- Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D. & Miller, A. D. (1994).** Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7071-7075.
- Kawai, S. & Hanafusa, H. (1972).** Genetic recombination with avian tumor virus. *Virology* **49**, 37-44.
- Kawamura, M., Watanabe, S., Odahara, Y., Nakagawa, S., Endo, Y., Tsujimoto, H. & Nishigaki, K. (2015).** Genetic diversity in the feline leukemia virus gag gene. *Virus Res* **204**, 74-81.
- Keckesova, Z., Ylinen, L. M. & Towers, G. J. (2004).** The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lvl retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10780-10785.
- Khatchikian, D., Orlich, M. & Rott, R. (1989).** Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* **340**, 156-157.
- Kohn, A. D., Takeuchi, F. & Roth, R. A. (1996).** Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem* **271**, 21920-21926.
- Koshy, R., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. (1980).** Characterization of the

- endogenous feline leukemia virus-related DNA sequences in cats and attempts to identify exogenous viral sequences in tissues of virus-negative leukemic animals. *Virology* **103**, 434-445.
- Kozak, C. A. & Chakraborti, A. (1996).** Single amino acid changes in the murine leukemia virus capsid protein gene define the target of Fv1 resistance. *Virology* **225**, 300-305.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. & Tamura, K. (2008).** MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* **9**, 299-306.
- Laprevotte, I., Hampe, A., Sherr, C. J. & Galibert, F. (1984).** Nucleotide sequence of the gag gene and gag-pol junction of feline leukemia virus. *J Virol* **50**, 884-894.
- Leutenegger, C. M., Hofmann-Lehmann, R., Riols, C., Liberek, M., Worel, G., Lups, P., Fehr, D., Hartmann, M., Weilenmann, P. & Lutz, H. (1999).** Viral infections in free-living populations of the European wildcat. *J Wildl Dis* **35**, 678-686.
- Levesque, K. S., Bonham, L. & Levy, L. S. (1990).** flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. *J Virol* **64**, 3455-3462.
- Levy, L. S., Gardner, M. B. & Casey, J. W. (1984).** Isolation of a feline leukaemia provirus containing the oncogene myc from a feline lymphosarcoma. *Nature* **308**, 853-856.
- Levy, L. S. & Lobelle-Rich, P. A. (1992).** Insertional mutagenesis of flvi-2 in

- tumors induced by infection with LC-FeLV, a myc-containing strain of feline leukemia virus. *J Virol* **66**, 2885-2892.
- Lilly, F. (1970).** Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice. *J Natl Cancer Inst* **45**, 163-169.
- Linial, M. & Brown, S. (1979).** High-frequency recombination within the gag gene of Rous sarcoma virus. *J Virol* **31**, 257-260.
- Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Masuda, S., Tokioka, T., Yamaoka, S., Maruyama, I. & Kitajima, I. (2001).** Phosphoinositide-3 kinase-PKB/Akt pathway activation is involved in fibroblast Rat-1 transformation by human T-cell leukemia virus type I tax. *Oncogene* **20**, 2514-2526.
- Livingston, D. M. & Todaro, G. J. (1973).** Endogenous type C virus from a cat cell clone with properties distinct from previously described feline type C virus. *Virology* **53**, 142-151.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. (1999).** Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* **73**, 152-160.
- Low, A., Datta, S., Kuznetsov, Y., Jahid, S., Kothari, N., McPherson, A. & Fan, H. (2007).** Mutation in the glycosylated gag protein of murine leukemia virus results in reduced in vivo infectivity and a novel defect in viral budding

- or release. *J Virol* **81**, 3685–3692.
- Luban, J., Alin, K. B., Bossolt, K. L., Humaran, T. & Goff, S. P. (1992). Genetic assay for multimerization of retroviral gag polyproteins. *J Virol* **66**, 5157–5160.
- Lutz, H., Pedersen, N. C., Durbin, R. & Theilen, G. H. (1983). Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in enzyme-linked immunosorbent assay of p27. *J Immunol Methods* **56**, 209–220.
- Mackey, L., Jarrett, W., Jarrett, O. & Laird, H. (1975). Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. *J Natl Cancer Inst* **54**, 209–217.
- Mammano, F., Ohagen, A., Hoglund, S. & Gottlinger, H. G. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* **68**, 4927–4936.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2003). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**, 4794–4804.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. & Lefevre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**, 2462–2463.
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. & Williamson, C. (2005a). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 98–102.
- Martin, D. P., Williamson, C. & Posada, D. (2005b). RDP2: recombination detection

- and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**, 260-262.
- Martin, G. S. (2004).** The road to Src. *Oncogene* **23**, 7910-7917.
- Masuda, R., Lopez, J. V., Slattery, J. P., Yuhki, N. & O'Brien, S. J. (1996).** Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Mol Phylogenet Evol* **6**, 351-365.
- Matsumoto, Y., Momoi, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1992).** Detection of enhancer repeats in the long terminal repeats of feline leukemia viruses from cats with spontaneous neoplastic and nonneoplastic diseases. *Virology* **189**, 745-749.
- McDonough, S. K., Larsen, S., Brodey, R. S., Stock, N. D. & Hardy, W. D., Jr. (1971).** A transmissible feline fibrosarcoma of viral origin. *Cancer Res* **31**, 953-956.
- McDougall, A. S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J. & Neil, J. C. (1994).** Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *J Virol* **68**, 2151-2160.
- Mendoza, R., Anderson, M. M. & Overbaugh, J. (2006).** A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J Virol* **80**, 3378-3385.
- Miura, T., Shibuya, M., Tsujimoto, H., Fukasawa, M. & Hayami, M. (1989).** Molecular cloning of a feline leukemia provirus integrated adjacent to the c-myc gene in a feline T-cell leukemia cell line and the unique structure of

its long terminal repeat. *Virology* **169**, 458-461.

Miura, T., Tsujimoto, H., Fukasawa, M., Kodama, T., Shibuya, M., Hasegawa, A. & Hayami, M. (1987). Structural abnormality and over-expression of the myc gene in feline leukemias. *Int J Cancer* **40**, 564-569.

Miyake, A., Watanabe, S., Hiratsuka, T., Ito, J., Ngo, M. H., Makundi, I., Kawasaki, J., Endo, Y., Tsujimoto, H. & Nishigaki, K. (2016). Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. *J Virol* **90**, 4832-4837.

Mochizuki, H., Nakamura, K., Sato, H., Goto-Koshino, Y., Sato, M., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H. & Tsujimoto, H. (2011). Multiplex PCR and Genescan analysis to detect immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in feline B-cell neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol* **143**, 38-45.

Mochizuki, H., Nakamura, K., Sato, H., Goto-Koshino, Y., Sato, M., Takahashi, M., Fukushima, K., Nakashima, K., Fujino, Y., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H. & Tsujimoto, H. (2012). GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gamma gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol* **145**, 402-409.

Mullins, J. I., Brody, D. S., Binari, R. C., Jr. & Cotter, S. M. (1984). Viral transduction of c-myc gene in naturally occurring feline leukaemias. *Nature* **308**, 856-858.

Mullins, J. I. & Hoover, E. A. (1990). Molecular aspects of feline leukemia virus pathogenesis. In *Retrovirus biology and human disease*, pp. 87-116. Edited by

- R. C. Gallo & F. Wong-Staal. New York, N.Y. : Dekker.
- Neil, J. C., Fulton, R., Rigby, M. & Stewart, M. (1991). Feline leukaemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. *Curr Top Microbiol Immunol* **171**, 67-93.
- Neil, J. C., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N. M., Onions, D. E., Lees, G. & Jarrett, O. (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* **308**, 814-820.
- Neil, J. C., Smart, J. E., Hayman, M. J. & Jarrett, O. (1980). Polypeptides of feline leukemia virus: a glycosylated gag-related protein is released into culture fluids. *Virology* **105**, 250-253.
- Niman, H. L., Akhavi, M., Gardner, M. B., Stephenson, J. R. & Roy-Burman, P. (1980). Differential expression of two distinct endogenous retrovirus genomes in developing tissues of the domestic cat. *J Natl Cancer Inst* **64**, 587-594.
- Nishigaki, K., Hanson, C., Ohashi, T., Thompson, D., Muszynski, K. & Ruscetti, S. (2000). Erythroid cells rendered erythropoietin independent by infection with Friend spleen focus-forming virus show constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase: involvement of insulin receptor substrate-related adapter proteins. *J Virol* **74**, 3037-3045.
- Nishigaki, K., Hanson, C., Thompson, D., Yugawa, T., Hisasue, M., Tsujimoto, H. & Ruscetti, S. (2002). Analysis of the disease potential of a recombinant retrovirus containing Friend murine leukemia virus sequences and a unique long

- terminal repeat from feline leukemia virus. *J Virol* **76**, 1527-1532.
- Nishigaki, K., Okuda, M., Endo, Y., Watari, T., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1997).** Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. *J Virol* **71**, 9823-9827.
- Nitta, T., Kuznetsov, Y., McPherson, A. & Fan, H. (2010).** Murine leukemia virus glycosylated Gag (gPr80gag) facilitates interferon-sensitive virus release through lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1190-1195.
- Okabe, H., DuBuy, J., Gilden, R. V. & Gardner, M. B. (1978a).** A portion of the feline leukaemia virus genome is not endogenous in cat cells. *Int J Cancer* **22**, 70-78.
- Okabe, H., DuBuy, J., Hatanaka, M. & Gilden, R. V. (1978b).** Reiteration frequency of feline type C viral genomes in homologous and heterologous host cell DNA. *Intervirology* **9**, 253-260.
- Okabe, H., Twiddy, E., Gilden, R. V., Hatanaka, M., Hoover, E. A. & Olsen, R. G. (1976).** FeLV-related sequences in DNA from a FeLV-free cat colony. *Virology* **69**, 798-801.
- Overbaugh, J., Donahue, P. R., Quackenbush, S. L., Hoover, E. A. & Mullins, J. I. (1988a).** Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science* **239**, 906-910.
- Overbaugh, J., Riedel, N., Hoover, E. A. & Mullins, J. I. (1988b).** Transduction of endogenous envelope genes by feline leukaemia virus in vitro. *Nature* **332**,

731-734.

- Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. M. (1999).** Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218-225.
- Palmarini, M., Maeda, N., Murgia, C., De-Fraja, C., Hofacre, A. & Fan, H. (2001).** A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* **75**, 11002-11009.
- Parikh, C., Janakiraman, V., Wu, W. I., Foo, C. K., Kljavin, N. M., Chaudhuri, S., Stawiski, E., Lee, B., Lin, J., Li, H., Lorenzo, M. N., Yuan, W., Guillory, J., Jackson, M., Rondon, J., Franke, Y., Bowman, K. K., Sagolla, M., Stinson, J., Wu, T. D., Wu, J., Stokoe, D., Stern, H. M., Brandhuber, B. J., Lin, K., Skelton, N. J. & Seshagiri, S. (2012).** Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19368-19373.
- Paul-Murphy, J., Work, T., Hunter, D., McFie, E. & Fjelline, D. (1994).** Serologic survey and serum biochemical reference ranges of the free-ranging mountain lion (*Felis concolor*) in California. *J Wildl Dis* **30**, 205-215.
- Perron, M. J., Stremlau, M., Song, B., Ulm, W., Mulligan, R. C. & Sodroski, J. (2004).** TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11827-11832.
- Pizzato, M. (2010).** MLV glycosylated-Gag is an infectivity factor that rescues Nef-deficient HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9364-9369.

- Polani, S., Roca, A. L., Rosensteel, B. B., Kolokotronis, S. O. & Bar-Gal, G. K. (2010). Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology* **405**, 397-407.
- Pontius, J. U., Mullikin, J. C., Smith, D. R., Lindblad-Toh, K., Gnerre, S., Clamp, M., Chang, J., Stephens, R., Neelam, B., Volfovsky, N., Schaffer, A. A., Agarwala, R., Narfstrom, K., Murphy, W. J., Giger, U., Roca, A. L., Antunes, A., Menotti-Raymond, M., Yuhki, N., Pecon-Slattery, J., Johnson, W. E., Bourque, G., Tesler, G. & O'Brien, S. J. (2007). Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res* **17**, 1675-1689.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13757-13762.
- Pozsgay, J. M., Beilharz, M. W., Wines, B. D., Hess, A. D. & Pitha, P. M. (1993). The MA (p15) and p12 regions of the gag gene are sufficient for the pathogenicity of the murine AIDS virus. *J Virol* **67**, 5989-5999.
- Prats, A. C., Roy, C., Wang, P. A., Erard, M., Housset, V., Gabus, C., Paoletti, C. & Darlix, J. L. (1990). cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol* **64**, 774-783.
- Quigley, J. G., Burns, C. C., Anderson, M. M., Lynch, E. D., Sabo, K. M., Overbaugh, J. & Abkowitz, J. L. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell

- aplasia. *Blood* **95**, 1093-1099.
- Rein, A., McClure, M. R., Rice, N. R., Luftig, R. B. & Schultz, A. M. (1986). Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7246-7250.
- Reinacher, M. (1987). Feline leukemia virus-associated enteritis--a condition with features of feline panleukopenia. *Vet Pathol* **24**, 1-4.
- Reinacher, M. (1989). Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Vet Immunol Immunopathol* **21**, 85-95.
- Riedel, N., Hoover, E. A., Gasper, P. W., Nicolson, M. O. & Mullins, J. I. (1986). Molecular analysis and pathogenesis of the feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-Sarva. *J Virol* **60**, 242-250.
- Rigby, M. A., Rojko, J. L., Stewart, M. A., Kociba, G. J., Cheney, C. M., Rezanka, L. J., Mathes, L. E., Hartke, J. R., Jarrett, O. & Neil, J. C. (1992). Partial dissociation of subgroup C phenotype and in vivo behaviour in feline leukaemia viruses with chimeric envelope genes. *J Gen Virol* **73**, 2839-2847.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S. & Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56.
- Roca, A. L., Nash, W. G., Menninger, J. C., Murphy, W. J. & O'Brien, S. J. (2005). Insertional polymorphisms of endogenous feline leukemia viruses. *J Virol* **79**,

3979-3986.

- Roca, A. L., Pecon-Slattery, J. & O'Brien, S. J. (2004). Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of recent origin. *J Virol* **78**, 4370-4375.
- Rodriguez, F., Oliver, J. L., Marin, A. & Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* **142**, 485-501.
- Roelke, M. E., Forrester, D. J., Jacobson, E. R., Kollias, G. V., Scott, F. W., Barr, M. C., Evermann, J. F. & Pirtle, E. C. (1993). Seroprevalence of infectious disease agents in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *J Wildl Dis* **29**, 36-49.
- Rohn, J. L., Luring, A. S., Linenberger, M. L. & Overbaugh, J. (1996). Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J Virol* **70**, 8071-8080.
- Rohn, J. L., Linenberger, M. L., Hoover, E. A. & Overbaugh, J. (1994). Evolution of feline leukemia virus variant genomes with insertions, deletions, and defective envelope genes in infected cats with tumors. *J Virol* **68**, 2458-2467.
- Rohn, J. L., Moser, M. S., Gwynn, S. R., Baldwin, D. N. & Overbaugh, J. (1998). In vivo evolution of a novel, syncytium-inducing and cytopathic feline leukemia virus variant. *J Virol* **72**, 2686-2696.
- Rohn, J. L. & Overbaugh, J. (1995). In vivo selection of long terminal repeat alterations in feline leukemia virus-induced thymic lymphomas. *Virology* **206**, 661-665.
- Rojko, J. L., Hoover, E. A., Mathes, L. E., Olsen, R. G. & Schaller, J. P. (1979).

- Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* **63**, 759-768.
- Rose, P. P. & Korber, B. T. (2000)**. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G → A hypermutation. *Bioinformatics* **16**, 400-401.
- Salminen, M. O., Carr, J. K., Burke, D. S. & McCutchan, F. E. (1995)**. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 1423-1425.
- Sarma, P. S. & Log, T. (1973)**. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology* **54**, 160-169.
- Scheid, M. P. & Woodgett, J. R. (2003)**. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* **546**, 108-112.
- Schultz, A. M. & Oroszlan, S. (1983)**. In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid. *J Virol* **46**, 355-361.
- Sheets, R. L., Pandey, R., Jen, W. C. & Roy-Burman, P. (1993)**. Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. *J Virol* **67**, 3118-3125.
- Smith, J. M. (1992)**. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* **34**, 126-129.
- Snyder, S. P. & Theilen, G. H. (1969)**. Transmissible feline fibrosarcoma. *Nature* **221**, 1074-1075.
- Staal, S. P. & Hartley, J. W. (1988)**. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine

- retrovirus. *J Exp Med* **167**, 1259-1264.
- Staal, S. P., Hartley, J. W. & Rowe, W. P. (1977).** Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3065-3067.
- Steeves, R. & Lilly, F. (1977).** Interactions between host and viral genomes in mouse leukemia. *Annu Rev Genet* **11**, 277-296.
- Stewart, H., Jarrett, O., Hosie, M. J. & Willett, B. J. (2011).** Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? *Vet Immunol Immunopathol* **143**, 325-331.
- Stewart, H., Jarrett, O., Hosie, M. J. & Willett, B. J. (2013).** Complete genome sequences of two feline leukemia virus subgroup B isolates with novel recombination sites. *Genome Announc* **1**, 00036-00012.
- Stewart, M. A., Warnock, M., Wheeler, A., Wilkie, N., Mullins, J. I., Onions, D. E. & Neil, J. C. (1986).** Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J Virol* **58**, 825-834.
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J. (2004).** The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848-853.
- Sugai, J., Eiden, M., Anderson, M. M., Van Hoesen, N., Meiering, C. D. & Overbaugh, J. (2001).** Identification of envelope determinants of feline leukemia virus subgroup B that permit infection and gene transfer to cells expressing human

- Pit1 or Pit2. *J Virol* **75**, 6841–6849.
- Taylor, C. S., Willett, B. J. & Kabat, D. (1999).** A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J Virol* **73**, 6500–6505.
- Takeuchi, Y., Vile, R. G., Simpson, G., O’Hara, B., Collins, M. K. & Weiss, R. A. (1992).** Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus. *J Virol* **66**, 1219–1222.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2008).** Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Vet Immunol Immunopathol* **123**, 129–133.
- Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Meli, M. L., Gomes-Keller, M. A., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007).** Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. *Mol Cell Probes* **21**, 257–266.
- Towers, G., Bock, M., Martin, S., Takeuchi, Y., Stoye, J. P. & Danos, O. (2000).** A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12295–12299.
- Tsujimoto, H., Fulton, R., Nishigaki, K., Matsumoto, Y., Hasegawa, A., Tsujimoto, A., Cevario, S., O’Brien, S. J., Terry, A., Onions, D. & et al. (1993).** A

- common proviral integration region, *fit-1*, in T-cell tumors induced by myc-containing feline leukemia viruses. *Virology* **196**, 845-848.
- Tzavaras, T., Stewart, M., McDougall, A., Fulton, R., Testa, N., Onions, D. E. & Neil, J. C. (1990).** Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. *J Gen Virol* **71**, 343-354.
- Umehara, D., Watanabe, S., Ochi, H., Anai, Y., Ahmed, N., Kannagi, M., Hanson, C., Ruscetti, S. & Nishigaki, K. (2010).** Role of phosphatidylinositol 3-kinase in friend spleen focus-forming virus-induced erythroid disease. *J Virol* **84**, 7675-7682.
- Usami, Y., Wu, Y. & Gottlinger, H. G. (2015).** SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* **526**, 218-223.
- Vasudevan, K. M. & Garraway, L. A. (2010).** AKT signaling in physiology and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **347**, 105-133.
- Vogt, P. K. (1971).** Genetically stable reassortment of markers during mixed infection with avian tumor viruses. *Virology* **46**, 947-952.
- Wang, M. Q. & Goff, S. P. (2003).** Defects in virion production caused by mutations affecting the C-terminal portion of the Moloney murine leukemia virus capsid protein. *J Virol* **77**, 3339-3344.
- Watanabe, S., Ito, J., Baba, T., Hiratsuka, T., Kuse, K., Ochi, H., Anai, Y., Hisasue, M., Tsujimoto, H. & Nishigaki, K. (2014).** Notch2 transduction by feline leukemia virus in a naturally infected cat. *J Vet Med Sci* **76**, 553-557.

- Watanabe, S., Kawamura, M., Odahara, Y., Anai, Y., Ochi, H., Nakagawa, S., Endo, Y., Tsujimoto, H. & Nishigaki, K. (2013). Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. *PLoS One* **8**.
- Wyke, J. A. & Beaman, J. A. (1979). Genetic recombination in Rous sarcoma virus: the genesis of recombinants and lack of evidence for linkage between pol, env and src genes in three factor crosses. *J Gen Virol* **43**, 349-364.
- Yap, M. W., Nisole, S., Lynch, C. & Stoye, J. P. (2004). Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10786-10791.
- Yuan, B., Li, X. & Goff, S. P. (1999). Mutations altering the moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *Embo J* **18**, 4700-4710.
- Ziemięcki, A., Hennig, D., Gardner, L., Ferdinand, F. J., Friis, R. R., Bauer, H., Pedersen, N. C., Johnson, L. & Theilen, G. H. (1984). Biological and biochemical characterization of a new isolate of feline sarcoma virus: Theilen-Pedersen (TP1-FeSV). *Virology* **138**, 324-331.