

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 NGO MINH HA

題 目 : Evolutionary dynamics of endogenous retroviruses (ERV-DC) in *Felis* lineage  
ネコ科動物における内在性レトロウイルス (ERV-DC) の進化ダイナミクス

### 論文要旨 :

Retroviruses belonging to Retroviridae family are classified into exogenous retroviruses (exRVs) and endogenous retroviruses (ERVs). ERVs are known as DNA sequences comprising approximately 6–10% of cat, human, and mouse genome. ERVs are descendants of exRVs that integrated into the germ line of the ancestral host lineage and are now transmitted vertically from parents to offspring in a Mendelian inheritance pattern. ERVs are ubiquitously present in all vertebrates. Most ERVs are inactivated but some still retain replication capacity to produce infectious viruses in mice and cats. Interestingly, although most ERVs seem to represent junk DNA, a few ERVs have been co-opted by their hosts to gain physiological functions through “ERV domestication” such as antiviral factors, placenta formation ability, innate immunity regulation, and so on. Thus, ERV domestication has contributed dramatically to host evolution.

Feline endogenous retroviruses have been identified and grouped phylogenetically into different classes. Endogenous retroviruses of domestic cats (ERV-DCs) are one of the youngest feline ERV groups in domestic cats (*Felis silvestris catus*); some members are replication-competent (ERV-DC10, ERV-DC18, and ERV-DC14), produce the anti-retroviral soluble factor Refrex-1 (ERV-DC7 and ERV-DC16), or can generate recombinant feline leukemia virus (FeLV). However, the evolution of ERV-DC in *felis* lineage remains unclear.

In chapter one, I assessed the invasion by two distinct infectious ERV-DCs, ERV-DC10 and ERV-DC14, in domestic cats. Of a total sample of 1646 cats, 568 animals (34.5%) were positive for ERV-DC10 (heterozygous: 377; homozygous: 191), 68 animals (4.1%) were positive for ERV-DC14 (heterozygous: 67; homozygous: 1), and 10 animals (0.6%) were positive for both ERV-DC10 and ERV-DC14. ERV-DC10 and ERV-DC14 were detected in domestic cats in Japan as well as in Tanzania, Sri Lanka, Vietnam, South Korea and Spain. Breeding cats including Singapura, Norwegian Forest and Ragdoll cats showed high frequencies of ERV-DC10 (60–100%). By contrast, ERV-DC14 was detected at low frequency in breeding cats. These results suggest that ERV-DC10 is widely distributed while ERV-DC14 is maintained in a minor population of cats. Thus, ERV-DC10 and ERV-DC14 have invaded cat populations independently.

In chapter two, I investigated ERV-DC in European wildcats (*Felis silvestris silvestris*) and

detected four loci: ERV-DC6, ERV-DC7, ERV-DC14, and ERV-DC16. ERV-DC14 was detected at a high frequency in European wildcats; however, it was replication-defective due to single G→A nucleotide substitution resulting in an E148K substitution in ERV-DC14 envelope (Env). This mutation results in a cleavage-defective Env that is not incorporated into viral particles. Introduction of the same mutation into feline and murine infectious gammaretroviruses resulted in similar Env dysfunction. Interestingly, the same mutation was found in a FeLV from naturally-occurring thymic lymphoma and a mouse ERV, suggesting a common mechanism of virus inactivation. Refrex-1 was present in European wildcats; however, ERV-DC16, but not ERV-DC7, was unfixed in European wildcats. Thus, *Refrex-1* has had an antiviral role throughout *Felis* evolution, pre-dating cat exposure to feline retroviruses. ERV-DC sequence diversity was present across wild and domestic cats but was locus-dependent. To sum up, ERVs have evolved species-specific phenotypes through the interplay between ERVs and their hosts. The mechanism of viral inactivation may be similar irrespective of the evolutionary history of retroviruses. The tracking of ancestral retroviruses can shed light on their roles in pathogenesis and host-virus evolution. In chapter three, I conducted analysis of ERV-DC in jungle cats (*Felis chaus*) showing evolutionary lineage. Based on phylogenetic analysis, I found existence of ERV-DC/*F. chaus* (endogenous retrovirus in jungle cat) like ERV-DC genotype III compared to three genotypes identified in domestic cats previously. The integration time of ERV-DC/*F. chaus* was estimated to be approximately 160,000 years ago. ERV-DC/*F. chaus* integration polymorphism was not fixed in jungle cat. The sites of integration were different between *Felis chaus* and domestic cats. ERV-DC/*F. chaus* integrated into *Felis chaus* have been inactivated due to gene mutations and deletions, and have lost autonomous growth and infectivity. However, existence of intact ERV-DC/*F. chaus env* was found. Using pseudotyped viruses, this ERV-DC/*F. chaus env* still retained infectious capacity suggesting that existence of infectious ERV-DC/*F. chaus* proviruses in jungle cats. These results suggested that ERV-DC and ERV-DC/*F. chaus* internalized in the *Felis silvestris catus* and *Felis chaus* have undergone evolutionary route independently in the process of co-evolution with each host. Determination and characterization of ERV-DC/*F. chaus* would be helpful for understanding virus evolution and host-virus interaction.

In conclusion, my studies firstly reported the invasion of infectious endogenous retroviruses in domestic cats, the inactivation of an infectious endogenous retrovirus via a single nucleotide polymorphism, and the potential existence of infectious endogenous proviruses in jungle cats. This information provided new insights into evolution of endogenous retroviruses in *felis* lineage based on ERV-DCs.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ngo Minh Ha
審査委員	主査：山口大学 教授 西垣一男
	副査：鹿児島大学 教授 遠藤泰之
	副査：山口大学 教授 水野拓也
	副査：山口大学 准教授 馬場健司
	副査：山口大学 准教授 柳田哲矢
題目	Evolutionary dynamics of endogenous retroviruses (ERV-DC) in <i>Felis</i> lineage (ネコ科動物における内在性レトロウイルス (ERV-DC) の進化ダイナミクス)
審査結果の要旨： 内在性レトロウイルス (ERV) は、動物ゲノムの約 6~10%を占める DNA 配列であり、ジャンク DNA と考えられているが、いくつかの ERV は抗ウイルス因子や胎盤形成能力などを保持し生理機能を示す。一方、ERV のゲノム組換えではウイルスの急速な進化を引き起こし、さらには、新たな病原性ウイルスが出現する。申請者は、家猫 ( <i>Felis silvestris catus</i> ) の中で最も若い ERV グループの 1 つである ERV-DC に焦点を当て、家猫とヤマネコの ERV の分子解析を通して、ウイルスの進化動態を研究している。 博士論文は第一章、第二章および第三章から構成されている。  【第一章】 第一章では、家猫において、2 つの異なる自律増殖性を持った感染性 ERV-DC (ERV-DC10 および ERV-DC14) の保有について、合計 1646 匹の家猫を用いて調査をしている。34.5%が ERV-DC10 陽性、4.1%が ERV-DC14 陽性、0.6%が両遺伝子を保有していた。ERV-DC10 および ERV-DC14 は、日本のみならず、海外の家猫 (タンザニア、スリランカ、ベトナム、韓国、スペイン) にも検出された。また、純血種猫における調査では、保有頻度に極端な違いが認められた。以上の結果は、自律増殖性 ERV が世界中の家猫に蔓延していることが明らかとなった。ERV-DC10 が広く分布しているのに対し、ERV-DC14 は少数の猫で維持されており、それぞれ独立して家猫の集団に侵入したと考えられた。	

### 【第二章】

第二章では、ヨーロッパヤマネコ (*Felis silvestris silvestris*) の ERV-DC を解析している。13箇所の遺伝子座が家猫で同定されているが、ヨーロッパヤマネコでは、ERV-DC6、ERV-DC7、ERV-DC14、および ERV-DC16 の 4 遺伝子座を検出した。ERV-DC14 はヨーロッパヤマネコで高頻度 (11 匹中 9 匹が陽性) に検出された。しかし、ERV-DC14 エンベロープ (Env) において、E148K (148 番目のグルタミン酸がリシンへの置換) のアミノ酸置換が発生する単一の G→Aヌクレオチド置換により感染自律能が欠損していた。この変異はエンベロープ蛋白の開裂不全を引き起こし、ウイルス粒子に Env が取り込まれないことが原因であった。この変異は自然発生縦隔型リンパ腫に認められた猫白血病ウイルス (FeLV) やマウス由来 ERV において認められ、ウイルス不活性化の共通メカニズムの存在を示唆するものであった。抗レトロウイルス分子である Refrex-1 は、ヨーロッパのヤマネコに存在していたが、それをコードする ERV-DC7 は固定化されているが、ERV-DC16 は固定化されていなかった。Refrex-1 の存在は動物進化の過程で出現し、レトロウイルスの曝露に対して抵抗を持たせる役割を果たしていることを示唆する。以上の結果から、ウイルスは宿主とともに進化しており、その過程において種特異的な表現型へと進化している。ウイルス不活性化のメカニズムは、レトロウイルスの進化の歴史に関係なく類似している可能性が示された。

### 【第三章】

第三章では、家猫と同じ進化系統を示すジャングルキャット (*Felis chaus*) の ERV-DC の分析を行っている。ウイルスの分子系統解析に基づいて、新たな遺伝子型である ERV-DC/F. chaus の存在を同定した。ERV-DC / F.chaus には自律増殖性ウイルスは認められなかったが、インタクティブなエンベロープ (*env*) 遺伝子が認められ、ウイルスの *env* の感染性を明らかにしている。

これらの研究は内在性レトロウイルスの進化プロセスについて猫属をモデルに解明し、内在性レトロウイルスが動物の進化と大きくかかわっていることを明らかにしている。また新たなレトロウイルス性状を発見したものである。

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