

Abstract of Doctoral Thesis

Name: Didik Pramono

Title: Co-option of truncated envelope proteins derived from endogenous retroviruses in mammals
(哺乳類における内在性レトロウイルス由来欠損型エンベロープタンパク質の共進化)

Abstract of thesis:

Retroviruses are RNA viruses that infect a broad range of vertebrate hosts, including mammals. Retroviruses are uniquely capable of utilizing reverse transcriptase to convert their RNA genome into DNA, which can then be integrated into the host genome. Retroviruses in the family *Retroviridae* are classified into two categories: exogenous retroviruses (exRVs) and endogenous retroviruses (ERVs). A significant proportion of ancient retroviral sequences, designated ERVs, are known to infect germ cells, integrate into the host genome, and are vertically transmitted to the offspring. This process contributes significantly to the generation of ERVs in the mammalian genome via repeated germline reinfection. ERVs are inactivated through methylation and accumulation of mutations, including those involving nucleotide substitutions, deletions, and insertions. Viral gene changes may alter the function of the encoded proteins. The proviral genome is comprised of three major genes: *gag*, *pol*, and *env*. The *env* genes encode the surface (SU) and transmembrane (TM) subunits that facilitate targeting and entry into specific cell types for infection. Defective env-ERV is an Env protein with a signal peptide and SU subunit but contains a premature stop codon and a lack or partial deletion of the TM subunit. Moreover, env-ERVs may be crucial for physiological functions in the host, including maintenance of homeostasis, placentation, innate immunity regulation, and restriction of infection. This study examines the molecular interactions between viruses and hosts, focusing on events in the evolution of viruses and env-ERV functions.

In Chapter One, I investigate the truncated Env protein, FeLIX, which functions as a restriction factor for mammalian retrovirus infection. The feline leukemia virus (FeLV) is a *Gammaretrovirus* endemic to domestic cats worldwide. FeLV is associated with the development of malignant hematopoietic disorders in cats, including lymphoma and immunodeficiency. FeLV is classified into several subgroups (A, B, C, D, E, and T) based on the viral receptor interference or receptor usage. The transmission of FeLV-B does not occur among domestic cats, and *in vivo* experimental infections are resistant to FeLV-B. It has been suggested that the presence of enFeLV is associated with this phenomenon. The absence of enFeLV in Florida panthers infected with FeLV-B highlights an association between enFeLV and FeLV-B. However, the molecular mechanisms underlying the restriction of FeLV-B infection in domestic cats remain unclear. The soluble Env protein derived from ERVs functions as a cofactor that assists in FeLV-T infection. However, we show here that soluble Env protein exhibits antiviral activity and provides resistance to mammalian retroviral infection through competitive receptor binding. This finding may explain why FeLV-B transmission is not observed in

(Appended form No. 3)

domestic cats.

In Chapter Two, I characterize the ERV-derived placenta-specific soluble protein, EnvV-Fca, from domestic cats. While investigating the expression of ERV *env* genes in domestic cats, we discovered that EnvV-Fca is closely related to EnvV2-Hum. EnvV-Fca was specifically detected in the placental trophoblast syncytiotrophoblastic layer and expressed as a secreted protein in cultured cells. Genetic analyses have indicated that the EnvV2 genes are widely present in vertebrates and are under purifying selection among carnivores, suggesting a potential benefit to the host. Moreover, these findings suggest that birds, bats, and rodents carrying EnvV2 play significant roles as intermediate vectors in the spread or cross-transmission of viruses among species.

In Chapter Three, I focus on the evolution of endogenous koala retrovirus, which may function as a restriction factor for koala retrovirus subtype-A (KoRV-A). KoRV is currently transitioning from an exRV to an ENV; therefore, we elucidated the co-evolutionary processes of retroviruses. By searching public databases, we identified endogenized-KoRV truncated envelope (*env*) genes that were expressed. Of these, five truncated *env* genes were selected and constructed as expression vectors to determine their viral inhibitory effects. We found that some KoRV-truncated Env proteins inhibit KoRV-A infection. In addition, a frameshift mutation in the truncated *env* gene affected the level of inhibition. This study shows that the evolutionary process of ERVs is consistent with the ongoing endogenization of retroviruses. Our findings demonstrated that the evolutionary arms race between viruses and koalas emerged as a viral resistance factor. Furthermore, we investigated the receptor usage of KoRV-A, KoRV-related retroviruses, and FeLV-B. I observed that koala Pit1 (koPit1), but not koPit2, is permissive to KoRV-A, WMV, and FeLV-B infection. GALV and HPG use koPit1 and koPit2 as receptors. Our findings suggest that interspecies transmission of KoRV-related retroviruses may occur via the Pit1 receptor.

In conclusion, this study provides evidence for the characterization and functions of defective *env*-ERVs as antiviral agents against mammalian retroviruses. Furthermore, this study contributes to the fundamental understanding that soluble Env proteins restrict retroviruses from diverse host species, implying that their functions may support host immunity and antiviral defenses by controlling retroviral spread. Furthermore, this study provides an evolutionary scenario for host-pathogen interactions.

(About 800 words in English)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Didik Pramono
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 小原 恭子
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：山口大学 教授 日下部 健
題 目	Co-option of truncated envelope proteins derived from endogenous retroviruses in mammals (哺乳類における内在性レトロウイルス由来欠損型エンベロープタンパク質の共進化)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>レトロウイルスは、逆転写酵素を利用して RNA ゲノムを DNA に変換し、宿主ゲノムに組み込むことができるユニークなウイルスである。内在性レトロウイルス (ERV) と呼ばれる古代のレトロウイルスは、宿主ゲノムの数%を占める膨大なウイルスゲノムとして存在している。レトロウイルスは一般に、<i>gag</i>, <i>pol</i>, <i>env</i> の 3 つの主要な遺伝子を持ち、それらによってコードされるタンパク質から構成されている。<i>env</i> 遺伝子は表面 (SU) サブユニットと膜貫通 (TM) サブユニットをコードし、標的細胞への侵入においてその第一歩となるウイルスと受容体の相互作用に貢献する。欠損型 ERV Env タンパク質はシグナルペプチドと SU サブユニットを持つ Env タンパク質であるが、停止コドンの存在のため TM サブユニットの欠失または部分欠失を含む。さらに、ERV Env タンパク質は恒常性の維持、胎盤形成、自然免疫の調節、感染の制限など宿主の生理的機能にとって重要である可能性が明らかになりつつある。本研究ではウイルスと宿主の分子間相互作用を、ウイルスの進化におけるイベントと ERV Env の機能に焦点を当て研究を行った。</p> <p>第 1 章では、哺乳類のレトロウイルス感染制限因子として機能する欠損型 ERV Env 由来のタンパク質 FeLIX について研究を行った。ネコ白血病ウイルス (FeLV) は、世界中の家猫に感染が認められるガンマレトロウイルスである。FeLV は、リンパ腫や免疫不全など猫の悪性血液疾患の発症に関連している。FeLV は、ウイルス受容体の使用状況により、6 つのサブグループ (A, B, C, D, E, T) に分類される。FeLV-B の感染は家猫の間では起こらず、<i>in vivo</i> の実験的感染では抵抗性を示す。この現象を説明する分子メカニズムは不明であった。ERV に由来する分泌性欠損型 Env タンパク質である FeLIX は、FeLV-T の感染を補助する補因子として機能する。しかしながら、本研究では FeLIX が抗ウイルス活性を示し、競合的受容体結合を通して哺乳類レトロ</p>	

(別紙様式第 10 号)

ウイルス感染（ネコ、コウモリ、ギボンザルおよびコアラ由来のレトロウイルス）に対する抵抗性を賦与することを本研究で示した。この発見は、FeLV-B の感染が家猫で水平伝播されない現象を説明するものであると考えられる。

第 2 章では、家猫の ERV に由来する欠損型 *env* 遺伝子の特徴を持つ *EnvV-Fca* について研究を行った。家猫における ERV *env* 遺伝子の発現を調べる過程において、*EnvV-Fca* が *EnvV2-Hum* (Human) と近縁であることを発見した。*EnvV-Fca* は胎盤絨毛の合胞体層で特異的に検出され、培養細胞では分泌タンパク質として発現した。遺伝子解析の結果、*EnvV-Fca* を含む *EnvV2* 遺伝子群は脊椎動物に広く存在し、肉食動物の間で純化選択を受けていることが示され、宿主に利益をもたらす可能性が示唆された。さらに、これらの知見は、*EnvV2* を持つ鳥類、コウモリ、げっ歯類が、種間のウイルスの拡散や相互伝播において、中間ベクターとして重要な役割を果たしていることを示唆している。

第 3 章では、コアラレトロウイルスサブタイプ A (以下 KoRV-A) の制限因子として機能する可能性のある、内在性コアラレトロウイルスの進化に焦点を当てて研究を行った。KoRV は現在、外来性レトロウイルス (exRV) から ERV に移行しつつあるため、レトロウイルスの共進化過程を解明した。公開データベースを検索し、内在化 KoRV で発現している欠損型エンベロープ (*env*) 遺伝子を同定した。その中から 5 つの *env* 遺伝子を選択し、発現ベクターとして構築し、ウイルス抑制効果を検討した。その結果、いくつかの KoRV 切断 Env タンパク質が KoRV-A の感染を阻害することが判明した。また、欠損型 *env* 遺伝子のフレームシフト変異は、阻害の程度に影響を与えた。本研究は、ERV の進化過程が、現在進行中のレトロウイルスの内生化と一致していることを示している。

本研究は、哺乳類レトロウイルスに対する抗ウイルス分子として、欠損型 ERV Env の特徴と機能を示す証拠を明らかにするものである。分泌性という特徴を持った欠損型 Env タンパク質が多種多様なレトロウイルスを制限し、その機能がレトロウイルスの拡散を制御することによって宿主の免疫をサポートし、ウイルス感染防御をサポートするという基本的な理解に貢献する。最後に、本研究は宿主と病原体の相互作用について、進化的シナリオを示すものである。

以上により、審査委員一同は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。