

Abstract of Doctoral Thesis

Name Dimas Arya Abdillah

Title: 10-My history of felidae endogenous retrovirus gamma4 infections

(ネコ科内在性レトロウイルス γ 4 感染の 1000 万年の歴史)

Abstract of thesis:

Viral protein–host interactions represent a complex and critical aspect of biomedical research, particularly in the context of endocrine regulation and host defense. The severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the cause of global pandemic covid-19. The angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a spike (S) protein receptor has been documented in AP. Therefore, the covid-19 infection potentially disrupts reproductive hormone. On the other hand, Retroviruses, which have unique ability to converts RNA into DNA by reverse transcriptase enzyme, have different fate when enter the host. They can be released and infect to another host horizontally as exogenous retrovirus (exRVs) and integrated into the genome through germline passing down to the offspring (ERVs). The feline leukaemia virus (FeLV) is an exogenous gammaretrovirus that causes malignant haematopoietic disorders in domestic cats. In our previous study, we identified a new recombinant FeLV containing an X region derived from *Felis catus* endogenous gamma retrovirus 4 (FcERV-gamma4). Therefore, tracing the FcERV-gamma4 can provide unique models for not only the modern reservoir of new recombinant viruses but also the genetic features shared among ancient retroviruses. Eventually, the defective env subunit containing only the SU subunit is often observed as a consequence of the interaction between the host and the virus. The defective env may have beneficial function to the host. This dissertation investigates the functional consequences of viral protein interactions with the host endocrine and immune systems, using cattle and domestic cats as mammalian models.

In Chapter One, I investigated how aging influence gene expression in AP. Using RNA sequencing (RNA-seq), I analyzed AP glands from young heifers (~22 months old) and older cows (~120 months old). Of total 20,171 annotated genes expressed in both age groups. The sum expression of seven key AP hormone genes constituted approximately 41.6% of total transcripts in young cattle and 35.5% in older cattle, indicating a significant decline in hormone gene expression with age ($P < 0.05$). Differentially expressed genes (DEG) were identified genes compared young to old 48 genes downregulated and 218 upregulated.

In parallel, I investigate the potential SARS-CoV-2 spike protein influence reproductive hormone. Expression analyses confirmed the presence of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) mRNA and protein in bovine AP cells. Immunofluorescence microscopy revealed co-localization of ACE2 and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors on the plasma membrane of gonadotrophs, with approximately 90% of GnRH receptor-positive cells expressing ACE2. Treatment of cultured bovine AP cells with recombinant SARS-CoV-2 spike protein (0.07–7 pM) resulted in a significant suppression of both basal and GnRH-induced LH secretion, and a dose-dependent suppression of GnRH-induced FSH secretion. Pre-treatment with an

(About 800 words in English)

ERK1/2/5 pathway inhibitor partially restored LH and FSH secretion levels.

In chapter two, I investigated retroviral evolution and infection mechanisms in cats, focusing on feline leukemia virus (FeLV) and endogenous retroviruses. First, a novel receptor interference assay was developed to differentiate FeLV subgroups A, B, C, and E using pseudotyped viruses. Of total 50 cases, FeLV-A infection alone was detected in 19 cases (38%), whereas co-infection with both FeLV-A and FeLV-B was observed in 31 cases (62%). No cases of FeLV-B infection alone were observed. Interestingly, we found XR-FeLV in two cases. Thus, based on these results, the new interference assay could be used to distinguish FeLV subgroups. Next, I assessed new replication competent virus FeLV-B. To date, the Gardner-Arnstein (GA) strain remains the only known infectious clone of FeLV-B. on FeLV-B pathogenicity, diagnosis, and vaccine development. Here, we isolated an infectious molecular clone of FeLV-B, termed B16.

Finally, I examined the evolution of *Felis catus* endogenous retrovirus gamma4 (FcERV-gamma4) across the Felidae family. The presence of intact full-length proviruses in the Felidae ERV-gamma4 suggests that they emerged very recently and spread rapidly in each lineage of cats. To explore host restriction for these viruses, functional envelope proteins from domestic cats (*Felis catus*) and Geoffroy's cats (*Leopardus geoffroyi*) were reconstructed. FcERV-gamma4 and LgERV-gamma4 can infect a wide range of mammalian cell lines. Truncated Env proteins from FcERV-gamma4 (called Refrex-2) are secreted by cells and inhibit infection by these viruses, likely through receptor competition. Refrex-2, which lacks the transmembrane domain, is widely expressed in domestic cats and conserved across Felidae species. Genetic evidence suggests Refrex-2 has been maintained by purifying selection, reflecting a long evolutionary battle with retroviral infections and their significant role in shaping animal evolution.

In conclusion, this study examined how viral proteins influence hormone regulation and immune function in cattle and cats. Aging was shown to impair anterior pituitary function in cows, while the SARS-CoV-2 spike protein suppressed reproductive hormone secretion via the ACE2 receptor. In cats, analysis of FeLV and endogenous retroviruses led to the identification of a new infectious FeLV-B clone. Additionally, the evolution of ERV-gamma4 produced a truncated envelope protein, Refrex-2, which may inhibit viral infection, highlighting the evolutionary dynamics of host-virus interactions.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Dimas Arya Abdillah
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：山口大学 教授 高木 光博
	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	10-My history of felidae endogenous retrovirus gamma4 infections (ネコ科内在性レトロウイルスγ4 感染の 1000 万年の歴史)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>学位審査論文は 3 章から構成されている。第 1 および 2 章では、加齢における下垂体細胞の機能変化を、遺伝子発現解析法により調査を行い、その実験の過程において SARS-CoV-2 の受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) の発現が認められたことから、ウイルスと下垂体細胞の相互作用について調査を行った。第 3 章では、内在性レトロウイルスの進化と宿主との共進化について研究を行った。</p> <p>第 1 章では、加齢が下垂体前葉 (AP) の遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。RNA シーケンス (RNA-seq) を用いて、若い雌牛 (約 22 ヶ月齢) と高齢の雌牛 (約 120 ヶ月齢) の AP を解析した。両年齢群で発現したアノテーション付き遺伝子は合計 20,171 個であった。7 つの主要な AP ホルモン遺伝子の総発現量は、若い雌牛では総転写物の約 41.6%、高齢の雌牛では 35.5%を占めており、ホルモン遺伝子の発現量が年齢とともに有意に減少したことが示された ($P < 0.05$)。発現変動遺伝子 (DEG) を同定し、若齢牛と高齢牛を比較した結果、48 遺伝子が低下し、218 遺伝子が増加していることが判明した。これらの結果は今後の老化における重要な経路を探索する上で重要な知見を提供すると考えられる。</p> <p>第 2 章では、ウシ AP 細胞におけるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) の発現が RNAseq 解析から明らかになった。この知見から、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が生殖ホルモンに影響を与える可能性を調査した。ウシ AP 細胞におけるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) の mRNA とタンパク質の存在が確認された。免疫蛍光顕微鏡検査により、AP 細胞の細胞膜上に ACE2 と性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体が共局在していることが明らかとなった。また、</p>	

GnRH 受容体陽性細胞の約 90%が ACE2 を発現していた。培養ウシ AP 細胞を組換え SARS-CoV-2 スパイク蛋白質 (0.07-7 pM) で刺激すると、黄体形成ホルモン (LH) 分泌と GnRH 誘発 LH 分泌の両方が有意に抑制され、さらに、GnRH 誘発卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌は用量依存的に抑制された。ERK1/2/5 経路阻害剤で前処理すると、LH と FSH の分泌レベルは部分的に回復した。これらの結果は、SARS-CoV-2 は、潜在的に、AP 細胞からの LH および FSH の分泌を抑制することが示された。結論として、この効果は雌牛の不妊の原因となる可能性が推測された。

第 3 章ではネコ科動物の内在性レトロウイルス $\gamma 4$ (FcERV- $\gamma 4$) の進化について調べた。ネコ科 ERV- $\gamma 4$ には完全長プロウイルスが存在することから、ごく最近まで伝播していることが予想され、ネコ科動物の各系統で急速に広がったことが示唆される。これらのウイルスの感染性を調べるため、家猫 (*Felis catus*) とジェフロイ猫 (*Leopardus geoffroyi*) の機能的エンベロープタンパク質を再構築することに成功した。その結果 FcERV- $\gamma 4$ と LgERV- $\gamma 4$ は広範な哺乳動物細胞株に感染することができることが判明した。FcERV- $\gamma 4$ から由来する欠損型 Env タンパク質 (Refrex-2 と命名) は細胞から分泌されることが認められ、おそらくレセプターの競合によって、これらウイルスによる感染を阻害することが判明した。Refrex-2 はネコ科で保存されている。遺伝学的証拠から、Refrex-2 は純化選択によって維持されてきたことが示唆される。以上の結果は、レトロウイルス感染と宿主の間において、長い進化の戦いと、共進化していることが認められ、動物の進化を形成する上で重要な役割を担ってきたと考えられる。

本研究論文では SARS-CoV-2 や内在性レトロウイルスと宿主の相互作用について、分子レベルで新たな生命現象を解明した。また、老化における下垂体前葉の変化について遺伝子レベルで明らかにした。

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。