

博士論文

牛白血病ウイルスの生活環における
Env タンパク質 gp30 の YXXL 配列の機能解析

松浦遼介

学位論文

牛白血病ウイルスの生活環における **Env** タンパク質 gp30 の YXXL 配列の機能解析

新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻
感染制御分子機能解析分野

松浦遼介

目次

略語.....	4
要旨.....	6
緒言.....	12
1. 免疫受容体チロシン活性モチーフ (ITAM)	12
2. 牛白血病ウイルス (BLV)	13
3. BLV のゲノムと粒子構造.....	14
4. BLV の生活環.....	15
5. Envelope Glycoprotein (Env) の構造と機能	16
6. Env の ITAM の機能	16
7. Env の YXXL 配列の機能	17
8. 本研究の目的と成果.....	18
材料と方法.....	20
1. プラスミド.....	20
2. 細胞培養とプラスミドの導入法.....	21
3. ウイルス粒子の回収.....	22
4. Western blot	23

5.	Reverse transcribed quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).....	24
6.	Luminescence syncytium induction assay (LuSIA).....	25
7.	シンシチウム法.....	25
8.	蛍光抗体法.....	26
9.	Env の細胞膜上での局在の解析	27
10.	Env の共局在の解析	28
11.	統計解析.....	28
	結果.....	29
1.	YXXL 変異感染性分子クローンおよび Env 発現ベクターの作製	29
2.	YXXL 変異感染性分子クロンの発現と粒子形成の解析および Env 発現ベクター の発現の解析.....	29
3.	YXXL 変異感染性分子クローンによるシンシチウム形成の解析.....	31
4.	Env 発現ベクターによるシンシチウム形成の解析	32
5.	YXXL 変異感染性分子クローン導入細胞における Env の局在の解析	33
6.	Env 発現ベクター導入細胞における Env の局在の解析	34

7.	YXXL 変異感染性分子クローン導入細胞における Env の初期エンドソームおよび トランスゴルジネットワークにおける局在の解析.....	35
8.	ウイルス粒子中への Env の取り込みの解析.....	36
	考察.....	38
	結論.....	46
	謝辞.....	47
	参考文献.....	48
	図表.....	56

略語

AP-1 : Activator protein 1

AP2 : adaptor related protein 2

BLV : 牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus)

CA : カプシドタンパク質

CAT1 : cationic amino acid transporter 1

CD : cluster of differentiation

DMEM : Dullbecco's modified eagle medium

DNA : deoxyribonucleic acid

EBV : Epstein-Barr ウイルス

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EEA1 : Early endosome antigen marker 1

EGFP : enhanced green fluorescent protein

Env : envelope glycoprotein

FBS : fetal bovine serum

HH8V : ヒトヘルペスウイルス 8 型

HIV : ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus)

HRP : horseradish-peroxidase

HTLV : ヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (human Tcell leukemia virus)

IgG : 免疫グロブリン G (immunoglobulin G)

ITAM : 免疫受容体チロシン活性化モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation

motif)

LTR : long terminal repeat

LuSIA : luminescence syncytium induction assay

MA : マトリクスタンパク質

MMTV : マウス乳がんウイルス

mRFP : monomeric red fluorescent protein

mRNA : messenger ribonucleic acid

NC : スクレオカプシドタンパク質

NF-AT : Nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PCR : polymerase chain reaction

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

Rab11-FIP1C : rat brain 11 family-interacting protein 1 C

RNA : ribonucleic acid

RT-qPCR : reverse transcribed quantitative polymerase chain reaction

SDS : sodium dodecyl sulfate

SIV : サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus)

SLC7A1 : solute carrier family 7 member 1

Syk : spleen tyrosine kinase

TGN46 : *trans*-Golgi network protein

ZAP70 : zeta-chain-associated protein kinase

要旨

<背景>

免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) は cluster of differentiation (CD) 3 γ 、CD3 δ 、CD79 α 、CD79 β 、Fc ϵ RI β などの免疫細胞に発現するタンパク質が有する特徴的な YXX[L/I]-X₆₋₈-YXX[L/I]からなる配列である。この配列中のチロシンは細胞外からのレセプターへの刺激によりリン酸化され、spleen tyrosine kinase (Syk) などのチロシンキナーゼをリクルートし、細胞の分化、成熟、免疫応答を制御している。ゲノム中に ITAM を有する Epstein-Barr ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 8 型、マウス乳がんウイルスは全て B 細胞に感染することができ、その ITAM が細胞の形質転換、がん化に関与していることが報告されている。

ITAM をもつウイルスの一つに牛白血病ウイルス (BLV) がある。BLV はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) に近縁なレトロウイルスであり、その膜糖タンパク質 (Env) の膜貫通サブユニット (gp30) の C'末端には 3 つの YXXL 配列からなる二組の ITAM が存在する。BLV の ITAM は CD8 とのキメラタンパク質を用いた実験において、インターロイキン 2 の産生、カルシウムの細胞内への流入といった免疫応答を引き起こすことが報告されている。また、BLV によるリンパ球増多症の牛において、Syk の messenger ribonucleic acid が増えているとの報告もされている。しかし、*in vivo* および *in vitro* の研究において、gp30 のリン酸化は確認されていない。このため、BLV の生活環における ITAM の機能はいまだ不明な点が多い。

一方で、3 つの YXXL 配列はエンドサイトーシスに重要な AP2 タンパク質の結合モチーフである YXX Φ モチーフにも合致する。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイ

ルス、HTLV-1などの多くのレトロウイルスの Env はただ一つの YXXΦモチーフを有する。HIV においては、この配列が Env のエンドサイトーシスに関与することが報告されている。これまでに BLV では、三つある YXXL 配列のうち N 末端に存在する二つが CD8 とのキメラタンパク質において膜局在を制御すること、また *in vitro* および *in vivo* の研究において、ウイルスの感染性を制御することが明らかにされている。

<目的>

BLV の YXXL 配列が ITAM として、あるいは YXXΦモチーフとしてウイルスの生活環に関与していることは疑いようもない。しかし、YXXL 配列がどのように BLV の生活環を制御しているかはいまだ不明なままである。本研究においては、BLV の感染性に密接に関係するシンシチウム形成能に注目をして、三つすべての YXXL 配列のウイルスの生活環における役割を明らかにすることを目的とした。

<材料と方法>

BLV の感染性分子クローンである pBLV-IF2 の gp30 中の三つの YXXL 配列 (1st, 2nd and 3rd YXXL) のチロシンとロイシンをアラニンに置換し、Y487A、L490A、Y498A、L501A、Y508A、L511A の六つの変異株を作成した。また、pBLV-IF2 およびその変異株の Env 領域を pME-18neo ベクターに組み込み、pEnv-WT、pEnv-Y487A、pEnv-L490A、pEnv-Y498A、pEnv-L501A、pEnv-Y508A、pEnv-L511A を作成した。これらのプラスミドを COS-1 細胞に導入することで、タンパク質の発現やウイルス粒子の放出、ウイルス粒子への Env の取り込みを解析した。また、CC81-GREMG 細胞あるいは CC81 細胞に導入し、シンシチウムの形成能を解析した。さらに、HeLa 細胞に導入することで Env の局在を解析した。

<結果>

1.YXXL 変異株の発現解析

各感染性分子クローンの発現およびウイルス粒子の放出を解析したところ、変異を導入した gp30 および Env の細胞表面サブユニット (gp51) や Gag などの構造タンパク質の発現が確認されたが、その発現量に大きな差は認められなかった。また、BLV のウイルス粒子の産生についても、すべての変異株において、野生株と比較して顕著な差は認められなかった。同様に、Env 発現プラスミドにおける Env の発現を確認したところ、gp51 の発現が確認され、その発現量に変化は認められなかった。このことから、YXXL 配列への変異はウイルスタンパク質の発現およびウイルス粒子の放出に影響を与えないことが明らかとなった。

2. YXXL 配列のシンシチウム形成における役割の解析

シンシチウム形成における YXXL 配列の機能を解析した結果、全てのチロシン変異株において、野生株よりも有意に多くのシンシチウムが形成されたが、ロイシン変異株においては、変化は認められなかった。Env 発現プラスミドにおいても同様に Y487A、Y498A 変異株において有意にシンシチウム形成能が増強された。また、Y508A 変異株も有意ではないが、高いシンシチウム形成能を示した。このことから、このシンシチウム形成能の変化は Env 単独で引き起こされたものであると考えられた。また、YXXL 配列はシンシチウム形成能をそれぞれ独立して負に制御していることが示唆された。

3.YXXL 配列の Env の局在における役割の解析

HIV において、細胞膜表面上の Env が Cell-Cell fusion に重要であると報告されている。そこで、チロシン変異によるシンシチウム形成能の増強のメカニズムを明らかにするために、Env の細胞膜表面での局在を蛍光抗体法で観察し、その蛍光強度を測定したところ、全

でのチロシン変異株導入細胞において野生株やロイシン変異株導入細胞と比較して、細胞膜表面上に Env が多く局在していた。さらに、透過処理条件下では、野生株および全ての変異株において Env は細胞質一面に広がるのではなく、核周辺部に斑点状に集積していた。興味深いことに、透過処理条件下で細胞膜の Env の蛍光強度を測定したところ、Y498A 変異株導入細胞においてのみ、Env は細胞膜に多く局在しており、Env が界面活性剤耐性膜に局在している可能性が示された。また、これらの結果は Env 発現プラスミドを用いた実験でも同様であった。以上の結果から、YXXL 配列は他のウイルスタンパク質から独立して、Env の局在を制御していることが示唆された。

Env の細胞内での斑点状の集積は、Env の細胞内小器官への局在を示唆する。Env がどの細胞内小器官に局在するかを調べることで、いまだ明らかになっていない Env の輸送経路および YXXL 配列の細胞内局在の制御メカニズムを明らかにすることができる。そこでトランスゴルジネットワークと初期エンドソームのマーカーである TGN46 および EEA1 と Env の共局在を解析した。その結果、TGN46 と共局在する Env の割合は全ての変異株において差はなかったが、EEA1 と共局在する Env の割合はチロシン変異株において有意に減少していた。この結果から、野生株とロイシン変異株由来 Env は合成された後にトランスゴルジネットワークを經由し、細胞膜表面に運ばれ、その後、エンドサイトーシスで細胞内へと取り込まれることが示唆された。一方、チロシン変異株では、細胞内へのエンドサイトーシスが阻害されたために細胞膜表面上に Env が留まり、細胞膜表面上の Env の量の増加した結果、シンシチウム形成能の増強につながったのではないかと考えられた。

4. YXXL 配列のウイルス粒子中への Env の取り込みにおける役割の解析

Env がウイルス粒子に取り込まれるためには、budding site への輸送が必須である。Env の局在の変化はウイルス粒子への Env の取り込みを阻害する可能性がある。そこで、感染

性分子クローンを導入した COS-1 細胞の培養上清中のウイルス粒子を超遠心で回収し、Western blot を用いて、gp51 抗原および p24 抗原を検出した。結果 1 において各変異株間でウイルスの放出には差がないことを示した通り、本実験においても全ての変異株で p24 タンパク質のバンドがほぼ同じ強さで検出されたことから、ウイルスの放出に各変異株間で差がないことが証明された。しかし、変異株の中で Y498A および L511A のみで、gp51 のバンドが検出されなかった。これは、Y498A および L511A 変異がウイルス粒子中への Env の取り込みを阻害していることを示している。

<考察および今後の展望>

本研究では 3 つの YXXL 配列が BLV の生活環において、独立してシンシチウムの形成能とウイルス粒子への Env の取り込みを制御していることを初めて明らかにした。1st YXXL 配列はチロシン残基によって、Env の局在を制御することで、シンシチウムの形成を制御した。同様に 2nd YXXL 配列はチロシン残基によって、Env の局在とシンシチウムの形成を制御していることに加えて、チロシン残基によって、ウイルス粒子への Env の取り込みを制御していた。また、3rd YXXL 配列も 1st、2nd YXXL 配列と同様のチロシン残基による Env の局在とシンシチウムの形成の制御に加えて、ロイシン残基によって Env の取り込みを制御していた。

上記の三つの YXXL 配列の機能の違いは YXXL 配列がそれぞれ独立して異なる機能を持ち、ウイルスの生活環を制御していることを示唆する。他のレトロウイルスが一つの特異的な配列によって生活環の制御をしているが、BLV は 3 つの配列によって制御していることは、BLV と他のレトロウイルスの明瞭な相違である。また、本研究で明らかとなった Env の細胞膜表面上での発現の抑制は、宿主の Env 特異的な抗体から逃避するためと考えられる。そして、これらの BLV の生活環における YXXL 配列の独立した制御がおそらく BLV

が3つのYXXL配列を完全に保存している理由である。

HIV-1における研究ではYXXL配列に類似のYSPL配列がAP2と結合し、Envのエンドサイトーシスを制御していることが知られている。また、このエンドサイトーシスがEnvのウイルス粒子中への取り込みに関与していると報告されている。本研究においても、YXXL配列がエンドサイトーシスを制御していることを示唆する結果が得られた。しかし、3つのチロシン変異株のうち、Y498AのみがEnvのウイルス粒子中への取り込みを阻害した。これは結果3で示した界面活性剤耐性膜へのEnvの局在が関与していると考えられる。また、ロイシン変異のうちL511Aのみが、Envのウイルス粒子中への取り込みを阻害した。これらの結果から、Envのウイルス粒子中への取り込みには局在の変化だけでなく、その他の因子が関与している可能性が示唆される。

この完全に保存された配列は異なる宿主因子と関連して働き、ウイルスの生活環を制御していると考えられる。つまり、YXXL配列と直接あるいは間接的に結合する宿主因子の同定はウイルスの生活環のより深い理解につながると同時に、BLVに対する新規薬剤の開発の第一歩となることは間違いない。プロテオミクス解析などによる宿主因子の同定は世界中に蔓延し、大きな被害をもたらしているBLVの制御に必要不可欠である。

緒言

1. 免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM)

免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) は Cluster of differentiation (CD) 3 γ 、CD3 δ 、CD79 α 、CD79 β 、Fc ϵ RI β などの免疫細胞に発現するタンパク質が有する特徴的な YXX[L/I]-X₆₋₈-YXX[L/I] (Y: チロシン、L: ロイシン、I: イソロイシン、X: 非特定のアミノ酸) からなる配列である (図 1) (1)。これらのタンパク質は B 細胞レセプター、T 細胞レセプターおよび補体などの抗原受容体複合体を構成するサブユニットであり、ITAM はチロシンキナーゼを有さない抗原受容体に代わり細胞外からの刺激を細胞内に伝達する初期の反応を担っている。B 細胞レセプター複合体は、免疫グロブリンと ITAM を有する CD79 α 、CD79 β からなるシグナル伝達コンポーネントから構成される (図 1 右図)。免疫グロブリンが抗原による刺激を受けると、受容体のクロスリンクにより、spleen tyrosine kinase (Syk) と Src ファミリープロテインキナーゼである Lyn が活性化される。活性化された Lyn は CD79 α 、CD79 β 中の ITAM の二つのチロシンをリン酸化する。ITMA 中のリン酸化された二つのチロシンは Syk に二つ存在する Src homology 2 ドメインとの相互作用を介して Syk をリクルートする(2)。T 細胞レセプターにおいては、Syk ファミリーである Zeta-chain-associated protein kinase (ZAP70) が ITAM によってリクルートされる (2)。リクルートされた Syk は Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) や Activator protein 1 (AP-1) などの転写因子を、ZAP70 は Nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) や AP-1 などの転写因子をリン酸化カスケードによって活性化し、これらの転写因子を介して、細胞の増殖や、分化、成熟、インターロイキンの産生などの免疫細胞の活性化を行う(3, 4)。一方で、がん組織においては、正常組織では発現して

いない Syk が異常発現し、がん細胞の生存や増殖を調整することが知られている(5)。

ウイルスはしばしば効率よく複製するために、あるいは潜伏感染をするために、宿主細胞のシグナル伝達経路を利用する。ITAM をゲノム中に有するウイルスとして、牛白血病ウイルス (BLV)、マウス乳がんウイルス (MMTV)、ヒトヘルペスウイルス 8 型 (HH8V) および Epstein-Barr ウイルス (EBV) が知られている(1, 6, 7)。これらのウイルスは全て B 細胞に感染することができる。なぜこれらの B 細胞に感染することができるウイルスが ITMA を有するかは不明であるが、ITAM を有する利点として、Syk を介した NF- κ B や AP-1、Akt の活性化による細胞の増殖の活性化、長期生存によるウイルス感染の拡大が考えられる(8)。実際に、MMTV においては、ITAM を有する Envelope Glycoprotein (Env) がマウス乳腺上皮細胞株にがん化を起こすこと、このがん化は Syk や Src ファミリープロテインキナーゼ阻害剤で阻害されることが報告されている(7)。また、HH8V においては、ITAM を有する K1 タンパク質が Akt の活性化を伴う霊長類の上皮細胞株の不死化を引き起こすこと、トランスフェクションによるが報告されている(9)。加えて、EBV では、ITAM 配列を有する latent membrane protein 2 によって、がん細胞の特徴である転移能の獲得、Syk の活性化による悪性腫瘍の形成が報告されている (10) (11)。

2. 牛白血病ウイルス (BLV)

レトロウイルス科、デルタレトロウイルス亜科に属する BLV は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) に近縁な腫瘍ウイルスであり、地方病性牛白血病の原因ウイルスである(12)。BLV の自然宿主はウシとスイギュウであり、世界中に蔓延している(13-15)。BLV はプロウイルスとして宿主ゲノムに組み込まれ、生涯にわたって持続感染をし、他のウシへの感染源となる。BLV の主な感染ルートは吸血昆虫などが媒介する血液に含まれる感染細胞による水平感染と母牛から仔牛への胎盤やミルクに含まれる感染細胞を介した垂直感染

である(16, 17)。BLV 感染牛のうち約 70%は健康な状態を保つが、約 30%はリンパ球増多症を呈し、5-10 年の感染の後に 1-5%が B 細胞リンパ腫を発症し死に至る(18)。また、BLV はヒツジに容易に実験感染させることができ、ヒツジはウシよりも非常に高い頻度かつ短い期間で B 細胞リンパ腫を発症するため、しばしばモデル動物として使用されてきた(19)。BLV の経済被害は B 細胞リンパ腫によるウシの全廃棄だけではなく、BLV に感染することによって生じる産乳量の低下(20)、免疫機能の低下による他の疾患への易感染(21)、空胎期間の延長などが報告されており(22)、世界的に大きな経済被害をもたらしている。しかし BLV に対する効果的な根治療法や有効な予防法はなく、ワクチンの早急な開発が望まれており、ワクチンの開発には免疫の主要な標的である Env の機能解析などの研究が必要不可欠である。

3. BLV のゲノムと粒子構造

BLV はプラス鎖 single-strand ribonucleic acid (RNA) ウイルスであり、そのゲノムサイズは約 9000bp である。ゲノムの両端に Long terminal repeat (LTR) をプロモーターとして有する (図 2)。また、レトロウイルスに共通な *gag*、*pro*、*pol*、*env*のほかに、デルタレトロウイルス亜科に特徴的な pX 領域中を持ち、調節遺伝子である *tax* や *rex* を有する(23)。加えて、アクセサリ遺伝子である *R3* や *G4*、noncoding RNA である microRNA や *AS1*、*AS2* を有する。これらのアクセサリタンパク質や noncoding RNA もウイルスの複製や病態進行などに寄与することが報告されている(24-26)。

BLV は直径約 100 nm の粒子からなるエンベロープウイルスである (図 3) (27)。宿主細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜からなるエンベロープの表面上には Env がスパイクしている。脂質二重膜の内側では Gag タンパク質由来のマトリクスタンパク質 (MA) が脂質二重膜を裏打ちしており、同じく Gag タンパク質由来のカプシドタンパク質 (CA) (p24) が

コアを形成している。コア内には逆転写酵素やインテグラーゼ、Gag タンパク質由来のヌクレオカプシドタンパク質 (NC) に覆われたウイルス RNA が存在する。

4. BLV の生活環

BLV の生活環は、レセプターである cationic amino acid transporter 1 (CAT1) / solute carrier family 7 member 1 (SLC7A1) を介して、細胞にウイルス粒子が吸着をすることから開始する (図 4) (28)。BLV のがん化の標的は CD5 陽性 B 細胞であるが、非常に多くの種類の細胞に感染することが知られている(29)。ウイルスと細胞の融合後、脱殻、RNA から deoxyribonucleic acid (DNA) の逆転写が行われ、ウイルスゲノム DNA が核へと移行する。核移行後にウイルスゲノム DNA は宿主細胞の染色体 DNA に組み込まれ、プロウイルスとなる(30)。その後、転写活性化因子 Tax による LTR のプロモーター活性の上昇によって、プロウイルスからの転写が行われ、ウイルスが産生される(31)。その一方で、BLV 感染細胞の多くは、LTR がプロモーターとして活性化されず、ウイルスタンパク質の合成が行われない潜伏化した状態を保つ(32)。

BLV はウイルス粒子を介した cell free による感染ではなく、主に感染細胞から直接非感染細胞にウイルスが感染する cell to cell の感染によって、感染が広がると考えられている。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や HTLV-1 における cell to cell 感染のようにウイルスシナプスを介した cell to cell 感染が BLV でも起こると考えられている(33-35)。しかし、実際どのようなメカニズムで BLV の cell to cell 感染がおこるかはいまだ明らかにされていない。

BLV の感染細胞は周囲の細胞と融合しシンシチウムを形成する。このシンシチウムの形成はレトロウイルスに共通してみられる特徴であり、感染細胞に発現した Env が周囲の細胞のレセプターとの結合を介して、誘導すると考えられている。HIV において、シンシチ

ウムの形成がウイルスの感染や複製に非常に重要であることが報告をされ、ウイルスの生活環に必須であることが知られている(36, 37)。BLVにおいても、シンシチウムの形成には不明な点が多く残されているが、感染性の指標の一つとして考えられている。

5. Envelope Glycoprotein (Env) の構造と機能

BLV の Env は前駆体である Pr72^{Env} がシグナル配列に従い、I 型膜一回貫通タンパク質として、粗面小胞体で合成される。合成された後に、ゴルジ体へと輸送をされ、糖鎖の付与が行われる(38)。また、その過程で宿主プロテアーゼにより、表面糖タンパク質 (gp51) と膜貫通タンパク質 (gp30) に分解される(23)。分解された gp51 と gp30 はジスルフィド結合により強く結合し(39)、ウイルスの budding site に輸送され、ともにウイルス粒子へと取り込まれ、機能する(40)。gp51 と gp30 はそれぞれウイルスの感染に非常に重要な機能を持ち、宿主免疫の標的である多くのエピトープを有することが知られている(41-44)。

gp51 はレセプターである CAT1/SLC7A1 と結合し、ウイルスの細胞への吸着を制御している (図 5) (28)。gp30 は細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの 3 つのドメインに分けられる。細胞外ドメインは gp51 とのジスルフィド結合を担う。また、ウイルスと細胞膜の融合を担う疎水性アミノ酸が多く含まれる 12 のアミノ酸からなる配列を N 末端に有し、レセプターとの結合後、ウイルスと細胞膜の融合を行う(45)。膜貫通ドメインは gp51 と gp30 の複合体を細胞膜あるいはウイルス膜にアンカーする(39)。細胞内ドメインは 58 のアミノ酸から構成され、その C 末端には BLV 株間で完全に保存された三つの YXXL 配列 (1st YXXL、2nd YXXL、3rd YXXL) を有している(1)。この 3 つの YXXL 配列は二組の ITAM として発見された (図 5)。

6. Env の ITAM の機能

BLV の gp30 の C 末端には三つの YXXL 配列からなる二組の ITAM に合致する配列が存在する(1)。CD8- α と gp30 の細胞内ドメインのキメラタンパク質 (CD8-CTM) を強制発現させた B 細胞において、抗 CD8- α 抗体による刺激を与えると、小胞から細胞質へのカルシウムの流入やインターロイキン 2 の産生といった通常の抗原受容体によって引き起こされるものと同様の免疫細胞の活性化が行われた(46)。この gp30 の ITAM によるシグナル伝達には 1st YXXL と 2nd YXXL からなる ITAM が関与しているが、3rd YXXL 配列は関与しない。加えて、BLV のがん化の標的である B 細胞における ITAM によるシグナリングに密接に関与する Syk の messenger RNA (mRNA) 量が BLV によるリンパ球増多症の牛の白血球において BLV 感染健康牛と比較して有意に増加し、リンパ腫を発症した牛において BLV 感染健康牛と比較して有意に減少することが報告されている(47)。この BLV 感染牛における Syk の mRNA 量の変化には gp30 中の ITAM によるシグナル伝達関わっている可能性が示唆されている。しかし、BLV 感染牛の末梢血単核細胞および BLV 感染培養細胞、BLV 感染性分子クローン導入細胞において、抗リン酸化チロシン抗体を用いた Western blot によってリン酸化された gp30 を検出することができなかったという報告は存在するが、リン酸化された gp30 を検出した報告は現在までに存在しない(48)。このことから、BLV の gp30 中の ITAM のチロシンがリン酸化され、Syk や ZAP70 などのチロシンキナーゼをリクルートし、免疫細胞を活性化する ITAM としての機能を有し、感染細胞の制御を行っているかどうかは依然不明のままである。

7. Env の YXXL 配列の機能

gp30 中の 3 つの YXXL は YXX Φ モチーフ (Y: チロシン、 Φ : 疎水性かつ大きなアミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、バリン)、X: 非特定のアミノ酸) と一致する配列である(49)。YXX Φ モチーフはエンドサイトーシスに重要な

Adaptor related protein 2 (AP2) の μ 2 サブユニットとの結合モチーフであり、トランスフェリン受容体などに存在することが知られている(50, 51)。HIV やサル免疫不全ウイルス (SIV)、HTLV-1 などの多くのレトロウイルスの Env はただ一つの YXX Φ 配列を持つ(52-54)。特に HIV においては Env 中の YSPL 配列が AP2 との結合を介したエンドサイトーシスを制御しており、YSPL 配列に変異を加え、エンドサイトーシスを阻害すると Env が budding site へ輸送されず、Env のウイルス粒子中への取り込みが抑制されることが知られている(55)。BLV においても CD8-CTM を用いた実験により、gp30 の細胞内ドメインがエンドサイトーシスに関与していること、1st YXXL と 2nd YXXL が CD8-CTM の細胞膜局在に関与することが報告されている(56, 57)。また、実験感染ヒツジ中で 1st YXXL 中のチロシン残基がプロウイルスロードを制御することや 2nd YXXL のチロシン残基が感染性を制御すること(58)、2nd YXXL のチロシン残基が Env のウイルス粒子中への取り込みを制御することが報告されている(49)。これらの知見から、N 末端側の二つの YXXL 配列がウイルスの感染に非常に重要であると考えられているが、BLV の生活環における実際の機能はいまだ不明である。

8. 本研究の目的と成果

本研究の目的は、免疫細胞の賦活化において機能を有する ITAM としてではなく、三つの独立した YXXL 配列の BLV の生活環における役割を明らかとすることである。

BLV の YXXL 配列によるシグナル伝達における過去の研究で、1st YXXL と 2nd YXXL が ITAM としてのシグナル伝達機能を有する可能性が示唆されたが、3rd YXXL 配列はシグナル伝達機能を持たないことが報告された(46)。そして、ITAM としての機能を有していないことから 3rd YXXL 配列についての研究はほとんど行われていない。しかし、HIV などの他のレトロウイルスにおいて、YXX Φ 配列が単独で機能を持っていることから、3rd YXXL 配

列も ITAM としてではなく、YXXL 配列として機能を有する可能性がある。また、ウイルスの感染性に 1st YXXL と 2nd YXXL が寄与することは知られているが、そのメカニズムは不明である。

本研究では、初めに BLV の生活環において非常に重要なステップの一つであり、ウイルスの感染性の指標の一つとなるシンシチウムの形成における YXXL 配列の役割を解析し、三つの YXXL 配列のチロシンがシンシチウムの形成を抑制していることを発見した。次に YXXL 配列によるシンシチウムの形成の抑制が gp51 の局在の制御、特にエンドサイトーシスの制御によって行われていることを明らかにした。最後に二番目の YXXL 配列のチロシン残基と三番目の YXXL 配列のロイシン残基がウイルス粒子中への Env の取り込みを制御していることを明らかにした。

材料と方法

1. プラスミド

BLV の感染性分子クローンである pBLV-IF2 (59)、pBluescriptII SK(-)、enhanced green fluorescent protein (EGFP) (60) 発現プラスミド pEGFP-N1、pME-18neo、monomeric red fluorescent protein (mRFP) に Flag タグを付与した Flag-mRFP 発現 pME18neo (pFlag-mRFP) (61) は間教授より分与していただいた。YXXL 変異 pBLV-IF2 である Y487A、L490A、Y498A、L501A、Y508A、L511A は以下のように作成した (図 6)。pBLV-IF2 を *Hind*III と *Kpn*I を用いて消化し *env* 遺伝子を含む 3'末端側を pBluescriptII SK(-) に導入し、3'-BLV/SK を作製した。その後、3'-BLV/SK を鋳型とし、表 1 で示すようなプライマーを用い、Polymerase chain reaction (PCR) 法により、YXXL 配列中のそれぞれのチロシンとロイシンをアラニンに置換した。YXXL 配列に変異を加えた 3'-BLV/SK を *Hind*III と *Eco*RI で消化し、pBLV-IF2 の *Eco*RI-*Hind*III フラグメントに導入し、YXXL 変異感染性分子クローンを作製した。

Env 発現ベクター pEnv-WT、pEnv-Y487A、pEnv-L490A、pEnv-Y498A、pEnv-L501A、pEnv-Y508A、pEnv-L511A は以下のように作製した (図 7)。pBLV-IF2 とその YXXL 変異株を *Xho*I と *Xba*I で消化し、*env* 遺伝子を含む領域を pME-18neo に導入し、pEnv-WT および YXXL 変異 Env 発現ベクターを作製した。

各プラスミドを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit にて増幅後、理化学研究所脳神経科学研究センター生体物質分析支援ユニットにて配列解析し、GENETYX ver. 10.0.0 (GENETYX 社製) にてアライメント解析を行い、それぞれのプラスミドの配列を確認した。

pEGFP-N1 および pFlag-mRFP はトランスフェクション効率の測定に用いた。また、pBluescriptII SK(-)および pME-18neo は、感染性分子クローンあるいは Env 発現ベクターの陰性コントロールとして使用した。

2.細胞培養とプラスミドの導入法

COS-1 細胞（アフリカミドリザル腎由来細胞株）、FLK-BLV 細胞（ヒツジ胎児腎由来細胞株に BLV を持続感染させた細胞株）、HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来細胞株）、CC81 細胞（マウス肉腫ウイルスで不死化したネコ腎由来細胞）、CC81-GREMG 細胞（CC81 細胞に BLV のレポータープラスミドである pBLU3^{GREM}-EGFP を組み込んだ BLV レポーター細胞）(62)は 10% fatal bovine serum（FBS ; SIGMA 社製）および Pen-Strep Glutamine（Invitrogen 社製）添加 Dullbecco's Modified Eagle Medium（DMEM ; Invitrogen 社製）にて培養した。

Western blot、Reverse transcribed quantitative PCR (RT-qPCR)、ウイルス粒子の回収を行うためにプラスミドを COS-1 細胞に Fugen HD（Promega 社製）を用いて次のように導入した。トランスフェクションの 20 時間前に 5.0×10^5 個の COS-1 細胞を 60 mm dish に播種した。感染性分子クローンのトランスフェクションでは 400 μ l の Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific 社製）中で 7.6 μ g の pBLV-IF2 あるいはその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)と 0.4 μ g の pEGFP-N1、32 μ l の Fugen HD（Promega 社製）を混合し COS-1 細胞の培養上清へと加えた。Env 発現ベクターのトランスフェクションでは、400 μ l の Opti-MEM 中で 3.8 μ g の pEnv-WT あるいはその変異株か陰性コントロールである pME-18neo と 0.2 μ g の pEGFP-N1、16 μ l の Fugen HD を混合し COS-1 細胞の培養上清へと加えた。

感染性分子クローンにおけるシンシチウム形成能を測定するためにプラスミドを CC81-

GREMG 細胞に 25 kDA Linear Polyethylenimine (Polysciences 社製) を用いて次のように導入した。10%FBS を含む DMEM 中に懸濁した 8.0×10^5 個の CC81-GREMG 細胞に 200 μ l の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific 社製) 中で 2.8 μ g の pBLV-IF2 あるいはその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)と 1.2 μ g の Flag-mRFP、14 μ g の 25 kDA Linear Polyethylenimine を混合し加えた。トランスフェクション試薬を加えた CC81-GREMG 細胞を 24 穴プレートあるいはカバーガラスを敷いた 24 穴 plate に 2.0×10^5 個ずつ 4 穴に分けて播種した。

Env 発現ベクターにおけるシンシチウム形成能を測定するためにプラスミドを CC81 細胞に Lipofectamien 3000 (Thermo Fisher Science 社製) を用いて次のように導入した。10%FBS を含む DMEM 中に懸濁した 1.2×10^6 個の CC81 細胞に 400 μ l の Opti-MEM 中で 7.2 μ g の pEnv-WT あるいはその変異株か陰性コントロールである pME-18neo と 0.8 μ g の pEGFP-N1、12 μ l の Lipofectamine 3000 Transfection Reagent と 16 μ l の P3000 Reagent を混合し加えた。トランスフェクション試薬を加えた CC81 細胞は 60 mm dish に 1.0×10^6 個、12 穴プレートに 2.0×10^5 個播種した。

蛍光抗体法を行うためにプラスミドを HeLa 細胞に Fugen HD を用いて次のように導入した。トランスフェクションの 20 時間前にカバーガラスを敷いた 12 穴プレートに 1.0×10^5 個の HeLa 細胞を播種した。2.0 μ g の pBLV-IF2 あるいはその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)、または 2.0 μ g の pEnv-WT あるいはその変異株か陰性コントロールである pME-18neo と 8 μ l の Fugen HD を 100 μ l の Opti-MEM 中で混合し、HeLa 細胞の培養上清に加えた。

3. ウイルス粒子の回収

トランスフェクション 48 時間後に pBLV-IF2 あるいはその変異株か陰性コントロールで

ある pBluescriptII SK(-)を導入した COS-1 細胞の培養上清を回収し、2,150 g で 10 分間 4°C で遠心し細胞を取り除いた。その後、4.5 ml の上清を 194,000 g で 45 分間 4°C で超遠心しウイルス粒子を回収した。ウイルス粒子は 15 μ l のリン酸緩衝生理食塩水[137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄]に懸濁後、Western blot に用いた。

4. Western blot

トランスフェクションの 48 時間後に pBLV-IF2 およびその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)、あるいは pEnv-WT およびその変異株か陰性コントロールである pME-18neo を pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) とともに導入した COS-1 細胞を 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いて回収した。トランスフェクション効率を測定するために、回収した細胞の一部を用いて、FACSCalibur™ flow cytometer (日本 BD 社製) によって、EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。また、残りの細胞を NET Buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、1% NP40]に懸濁し、氷上で 30 分間静置した。15000rpm で 10 分間 4°C で遠心し、上清のみを回収した後、BCA™ Protein Assay kit – Reducing Agent Compatible (Thermo Fisher Science 社製) により上清中のタンパク質量を定量した。定量したタンパク質量をトランスフェクション効率で標準化し、4 × sodium dodecyl sulfate (SDS) 試料用緩衝液[250 mM Tris-HCl(pH6.8)、20% 2-メルカプトエタノール、8% SDS、20% スクロース、0.02% bromophenol blue]と混和し、100°C で 5 分間加温処理した。また、回収したウイルス粒子 15 μ l は 5 μ l の 4 × SDS 試料用緩衝液と混和し、100°C で 5 分間処理した。タンパク質を Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis により分離し、polyvibylidene diluoride membrane filter (Merc Millipore

社製)に転写し、5%スキムミルク溶液(雪印メグミルク社製)で30分ブロッキングした。一次抗体には、BLV感染牛由来血清、BLV非感染牛由来血清、抗BLV gp51モノクローナル抗体(BLV2;VRMD社製)、抗BLV p24モノクローナル抗体(BLV3;VRMD社製)、抗GFPモノクローナル抗体(1E4;MBL社製)を用いた。二次抗体には、horseradish-peroxidase (HRP) 標識抗ウシ免疫グロブリン G (IgG) 抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories社製)およびHRP標識抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories社製)を使用した。検出されたバンドの濃度の解析にはAlphaEastFCTM software (Alpha Innotech社製)およびImageJ (National Institutes of Health製)を使用した。

5. Reverse transcribed quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

トランスフェクション48時間後にpBLV-IF2あるいはその変異株か陰性コントロールであるpBluescriptII SK(-)をpEGFP-N1(トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子)とともに導入したCOS-1細胞の培養上清を回収した。2150gで10分間4°Cで遠心し細胞を取り除いた後に、QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen社製)を用いて、ウイルスRNAを回収した。ウイルスRNAのコピー数はHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific社製)を用いて逆転写した後に、BLV-CoCoMo-qPCR (RIKEN GENESIS社製)を用いて測定した(63-65)。同時に、pEGFP-N1を感染性分子クローンとともに導入したCOS-1細胞を2mM EDTAで回収した後に、FACSCalibur™ flow cytometerによってEGFP発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。BLV-CoCoMo-qPCRによって測定したウイルスRNA量はトランスフェクション効率で補正し、解析した。

6. Luminescence syncytium induction assay (LuSIA)

CC81-GREMG 細胞を用いて、LuSIA を行った。24 穴プレートの 4 穴に播種した内の 1 穴の pBLV-IF2 あるいはその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)を pFlag-mRFP (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) とともに導入した CC81-GREMG 細胞をトランスフェクション後 20 時間後に 2 mM EDTA を用いて回収し、FACSCalibur™ flow cytometer によって mRFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。残りの well 中の CC81-GREMG 細胞はトランスフェクション後 48 時間後に 10 µg/ml の Hoechst33342 (SIGMA 社製) を含む 3.6%ホルムアルデヒド溶液で固定した。EGFP を発現している蛍光シンシチウムを EVOS2 fluorescence microscope (Thermo Fisher Science 社製) で観察し、撮影した写真中の蛍光シンシチウム数を HCS Studio Cell Analysis software (Thermo Fisher Science 社製) を用いて測定した。また、写真中の細胞の数を核の数から HCS Studio Cell Analysis software を用いて測定した。得られた蛍光シンシチウム数は写真中の核の数とトランスフェクション効率を用いて補正し、解析した。また、シンシチウムの大きさはシンシチウム中に取り込まれた細胞数を表すと考え、HCS Studio Cell Analysis software を用いて蛍光シンシチウムの大きさを測定した。

カバーガラス上の CC81-GREMG 細胞も同様に 10 µg/ml の Hoechst33342 (SIGMA 社製) を含む 3.6%ホルムアルデヒド溶液で固定し、スライドガラス上に 90% グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000 ; Olympus 社製) を用いて観察した。

7. シンシチウム法

トランスフェクション後 20 時間後に 12 穴 plate に播種した pEnv-WT あるいはその変異株か陰性コントロールである pME-18neo を pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を

測定するためのマーカー遺伝子) とともに導入した CC81 細胞を 2mM EDTA で回収し、FACSCalibur™ flow cytometer によって、EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。トランスフェクション 48 時間後に pEnv-WT あるいはその変異株か陰性コントロールである pME-18neo を導入した CC81 細胞はメイグリュンワルド染色液で 2 分間固定した。その後、6.7 mM リン酸バッファー (pH6.4) で 10 倍希釈したメイグリュンワルド染色液で 3 分間、ギムザ染色液で 15 分間染色をし、顕微鏡下でシンシチウムを観察した。陰性コントロールである pME18neo を導入した細胞において複数の核を持つ細胞の核の数の平均は 5.2 個であった (図 8)。この結果から、核を 6 個以上持つ細胞をシンシチウムとして測定した。シンシチウム数はトランスフェクション効率の比で補正し、解析した。

8. 蛍光抗体法

トランスフェクション 48 時間後に pBLV-IF2 およびその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)、あるいは pEnv-WT およびその変異株か陰性コントロールである pME-18neo を導入した HeLa 細胞を 4.0%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、細胞内の Env と細胞膜上の Env を観察するために、0.5% TritonX-100 による透過処理群と、非透過処理群を作製した。5%スキムミルク溶液でブロッキング後に一次抗体と室温で 1 時間反応させた。その後、二次抗体と室温で 1 時間反応させ、Hoechst33342 で核を染色した。Env タンパク質の細胞膜および細胞内での局在を見るために一次抗体には、抗 BLV gp51 モノクローナル抗体 (BLV1; VRMD 社製) を二次抗体には Alexa Fluor488 標識抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific 社製) あるいは Alexa Fluor594 標識抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。各サンプルは 90%グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000) により細胞を観察し、核近傍に焦点を当てた共焦点画像

を撮影した。また、Z-stack 解析を行うために、gp51 を発現している細胞について、同じ Z 軸において 2 μm 間隔で 3 枚の画像を撮影した。

また、Env の初期エンドソームあるいはトランスゴルジネットワークでの局在を確認するために、一次抗体として、抗 BLV gp51 モノクローナル抗体 (BLV1; VRMD 社製) と初期エンドソームマーカーである early endosome antigen1 (EEA1) (66) に対する抗 EEA1 ポリクローナル抗体 (ab2900 ; Abcam 社製) あるいはトランスゴルジネットワークマーカーである *trans*-Golgi network protein (TGN46) (67) に対する抗 TGN46 ポリクローナル抗体 (ab50595 ; Abcam 社製) を用い、二次抗体として、Alexa Fluor488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific 社製)、Alexa Fluor594 標識抗マウス IgG 抗体 (を用いた)。

9. Env の細胞膜上での局在の解析

図 9 に示すように、以下の通りに細胞膜上の蛍光強度を測定した。pBLV-IF2 およびその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)、あるいは pEnv-WT およびその変異株か陰性コントロールである pME-18neo を導入した HeLa 細胞の核近傍に焦点を当てた共焦点画像をもとに、FV10-ASW 4.02 (オリンパス社製) を用いて、核を通る直線上の蛍光強度をラインプロファイルによって測定し、蛍光強度マップを作成した。細胞膜上の gp51 の蛍光強度は蛍光強度マップ上の細胞膜領域のピーク値から測定した。各細胞の蛍光強度は核実験における野生株の平均蛍光強度で標準化した。野生株および各変異株におけるデータは各 50 個以上の細胞から収集した。

Z-stack 解析においても同様に、各 Z-stack 画像をもとにラインプロファイルを行い、蛍光強度マップを作成した。各細胞における細胞膜上の gp51 の蛍光強度は、各 Z-stack 画像から得られた細胞膜上の gp51 の蛍光強度の平均値とした。野生株および各変異株における

データは各 10 個の細胞から収集した。

10. Env の共局在の解析

pBLV-IF2 およびその変異株か陰性コントロールである pBluescriptII SK(-)を導入した HeLa 細胞における初期エンドソームあるいはトランスゴルジネットワークに焦点を当てた共焦点画像をもとに、FV10-ASW 4.02 (オリンパス社製) を用いて、Villalta のアルゴリズムを用いて、共局在指数を算出した(68)。野生株および各変異株におけるデータは各 50 個以上の細胞から収集した。

11. 統計解析

平均値の差の検定には Dunnett 法を用い、野生株と全ての変異株を比較した。有意確率 $p \text{ value} < 0.05$ のとき統計学的に有意差があるものとした。

結果

1. YXXL 変異感染性分子クローンおよび Env 発現ベクターの作製

YXXL 配列の BLV の生活環における機能を明らかにするために、BLV の感染性分子クローンである pBLV-IF2 の gp30 の三つの YXXL 配列のチロシン残基とロイシン残基をアラニンに置換し、Y487A、L490A、Y498A、L501A、Y508A、L511A の六つの変異株を作製した (図 6)。また、YXXL 配列に変異を加えることによって生じた変化が、Env の YXXL 配列単独による機能か、あるいは他のウイルスタンパク質の存在を必要とする機能かを明らかにするために、pEnv-WT および、YXXL 変異 Env 発現プラスミド pEnv-Y487A、pEnv-L490A、pEnv-Y498A、pEnv-L501A、pEnv-Y508A、pEnv-L511A を作製した (図 7)。各プラスミドは配列解析を行い、その遺伝子配列が目的の配列と同じであることを確認した。

2. YXXL 変異感染性分子クローンの発現と粒子形成の解析および Env 発現ベクターの発現の解析

感染性分子クローンである pBLV-IF2 および YXXL 変異株の BLV の生活環における役割を明らかにするにあたり、まず、pBLV-IF2 および YXXL 変異株がトランスフェクションされた細胞中でウイルスタンパク質を産生するか否か、また、YXXL 変異によってウイルスタンパク質の分子量が変化するか否か、ウイルス粒子を放出するか否かを Western blot および RT-qPCR を用いて解析した。

COS-1 細胞に pBLV-IF2 および YXXL 変異株を導入し、48 時間後におけるウイルスタンパク質の発現を Western blot によって検出した (図 10)。BLV 感染牛由来の血清を用いることで、BLV の構造タンパク質である p24、gp30、gp51 および Gag タンパク質、Env タ

ンパク質の前駆体である Pr45^{Gag}、Pr70^{Gag}、Pr72^{Env} が検出された (図 10 左図)。同時に、抗 EGFP 抗体によって、トランスフェクション効率を測定するためのマーカーである EGFP が検出された。その結果、ウイルスタンパク質の発現量および分子量に YXXL 変異による影響は認められなかった。また、一方で BLV 非感染牛由来の血清を用いても、これらのウイルスタンパク質は検出されなかった (図 10 右図)。この結果は、YXXL 変異感染性分子クローンはトランスフェクションされた細胞内で pBLV-IF2 と同様にウイルスタンパク質を産生し、その分子量に変化を与えないことを示している。

続いて、YXXL 変異感染性分子クローンがウイルス粒子を放出するかどうかを解析した。トランスフェクション 48 時間後に、pBLV-IF2 および YXXL 変異株を pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) とともに導入した COS-1 細胞の培養上清からウイルス RNA を抽出し、逆転写後に BLV-CoCoMo-qPCR で DNA 量を測定することで、COS-1 の培養上清中に放出されたウイルス RNA 量を解析した (図 11)。同時に、FACSCalibur™ flow cytometer によって EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。BLV-CoCoMo-qPCR で測定したウイルス RNA 量をトランスフェクション効率で補正した。その結果、全ての YXXL 変異株でウイルス RNA が検出され、また、そのウイルス RNA 量に YXXL 変異による有意な差は認められなかった (図 11)。この結果は、YXXL 配列はウイルス粒子の放出に関与しないことを示している。

同様に Env タンパク質発現ベクター導入細胞における gp51 の発現を Western blot で確認した (図 12)。COS-1 細胞に pEnv-WT および YXXL 変異株を pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) とともに導入し、48 時間後に、抗 gp51 抗体を用いて、gp51 の発現を Western blot によって検出した (図 12 左図)。同時に、抗 EGFP 抗体によって、トランスフェクション効率を測定するためのマーカーである EGFP を検出し、gp51 のバンドの濃さをトランスフェクションされた細胞の割合を示す EGFP の

バンドの濃さで補正した。その結果、すべての変異株において、gp51 のバンドの濃さに有意な差は認められなかった (図 12 右図)。この結果は、YXXL 配列は gp51 の発現に対して影響を及ぼさないことを示唆する。

3. YXXL 変異感染性分子クローンによるシンシチウム形成の解析

感染性分子クローンにおいて、YXXL 変異はウイルスタンパク質の発現量に変化を与えなかった。そこで、YXXL 配列がシンシチウムの形成に関与しているかを LuSIA で確認した (図 13)。CC81-GREMG 細胞は CC81 細胞に pBLU3^{GREM}-EGFP という BLV の LTR 下流に EGFP をコードしたプラスミドを安定導入した細胞である。pBLU3^{GREM}-EGFP は LTR の U3 領域中の glucocorticoid response element に変異を有し、Tax 非存在下における EGFP の発現を抑制しているため、高感度に BLV の Tax 依存的に EGFP を発現する。CC81-GREMG 細胞に pBLV-IF2 を pFlag-mRFP (トランスフェクション効率を測定するマーカー遺伝子) とともに導入することにより、Tax の発現に従い EGFP が発現し、Env の発現に伴い細胞融合が起こり、蛍光シンシチウムが形成されるかどうかを解析した (図 13 左上図)。同時に mRFP をマーカーとして、トランスフェクション効率を測定した。その結果、すべての YXXL 変異株導入 CC81-GREMG 細胞において、蛍光シンシチウムの形成が確認された (図 13 左上図)。蛍光シンシチウム数を、トランスフェクション効率で補正し、比較したところ、特に Y487A、Y498A、Y508A のすべてのチロシン変異株導入 CC81-GREMG 細胞において、pBLV-IF2 と比較して有意に多くの蛍光シンシチウムが観察された (Y487A : 1.55 倍、Y498A : 2.10 倍、Y508A : 1.61 倍) (図 13 右上図)。一方で、L490A、L501A、L511A のロイシン変異株導入 CC81-GREMG 細胞においては、蛍光シンシチウムの数は pBLV-IF2 と同等であった (L490A : 1.22 倍、L501A : 1.22 倍、L511A : 1.21 倍) (図 13 右上図)。また、蛍光シンシチウムの大きさを測定したところ、Y487A、Y498A、

Y508A のすべてのチロシン変異株によって、pBLV-IF2 よりも大きな蛍光シンシチウムが形成された (Y487A : 1.27 倍、Y498A : 1.35 倍、Y508A : 1.29 倍) (図 13 左下図)。この結果から、三つの YXXL 配列のチロシン残基をアラニンに置換すると、シンシチウム形成能が高まることが明らかとなり、これは YXXL 配列のチロシン残基がシンシチウムの形成を抑制する機能を有することが示唆する。

4. Env 発現ベクターによるシンシチウム形成の解析

YXXL 配列によるシンシチウム形成の抑制に Env 以外のウイルスタンパク質が関与するかを調べるために、Env 単独でのシンシチウム形成を観察した。CC81 細胞に pEnv-WT および YXXL 変異株と pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するマーカー遺伝子) をともに導入し、72 時間培養後にメイグリユンワルド染色液とギムザ染色液で染色し、シンシチウムを可視化した。その結果、pEnv-WT および全ての YXXL 変異株において、シンシチウムの形成が確認された (図 14 左図)。同時に EGFP をマーカーとして、トランスフェクション効率を測定した。シンシチウム数を、トランスフェクションされた細胞の値で補正し、比較したところ、特に pEnv-Y487A、pEnv-Y498A 導入 CC81 細胞において、pEnv-WT よりも有意に多くのシンシチウムが確認された (pEnv-Y487A : 2.62 倍、pEnv-Y498A : 2.31 倍) (図 14 右図)。また、有意差はないものの pEnv-Y508A 導入 CC81 細胞においても多くのシンシチウムが確認された (1.59 倍)。一方で pEnv-L490A、pEnv-L501A、pEnv-L511A は pEnv-WT と同程度の融合活性を示した (pEnv-L490A : 1.20 倍、pEnv-L501A : 1.25 倍、pEnv-L511A : 0.89 倍) (図 14 右図)。この結果は各 YXXL 配列のチロシンによるシンシチウム形成の抑制に他のウイルスタンパク質が関与していないことを示している。

5. YXXL 変異感染性分子クローン導入細胞における Env の局在の解析

HIVにおいて、細胞膜上の Env が細胞融合の引き金となることが知られている(69)。そこで、YXXL 配列のチロシン残基によるシンシチウム形成の抑制メカニズムを明らかにするために、HeLa 細胞における Env の発現量と局在を解析した。HeLa 細胞に pBLV-IF2 あるいは YXXL 変異株を導入し、72 時間培養後に非透過処理群と TritonX-100 による透過処理群に分け、蛍光抗体法で細胞膜上および細胞内の gp51 を観察した。また、非透過処理群、透過処理群の両群において、gp51 を発現する HeLa 細胞の核近傍に焦点を当てた共焦点画像をもとにラインプロファイルを行い、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の Env の蛍光強度を測定した。

非透過処理条件下では、Y487A、Y498A、Y508A のすべてのチロシン変異株導入 HeLa 細胞において、pBLV-IF2 と比較して強い蛍光が細胞膜上で観察され (図 15 左図)、蛍光強度マップから細胞膜上の蛍光強度を測定したところ、有意に高い値を示した (Y487A : 2.45 倍、Y498A : 2.53 倍、Y508A : 2.06 倍) (図 15 右図)。一方で、L490A、L501A、L511A のロイシン変異株導入 HeLa 細胞においては、細胞膜上の蛍光強度は pBLV-IF2 と同等であった (L490A : 1.40 倍、L501A : 1.12 倍、L511A : 1.12 倍) (図 15 右図)。この結果から、チロシン残基は細胞膜上での Env の局在を負に制御していると考えられる。また、10 細胞について Z-stack 解析を行い、同様の傾向が観察された。同 Z 軸で 2 μm ごとに撮影されたすべての画像において、全てのチロシン変異株導入細胞で強い蛍光が確認された (図 16 上図)。また、蛍光強度マップから細胞膜上の蛍光強度を測定したところ、全てのチロシン変異株において pBLV-IF2 と比較して有意に高い値を示した (Y487A : 1.31 倍、Y498A : 1.26 倍、Y508A : 1.31 倍) (図 16 下図)

透過処理条件下では、pBLV-IF2 およびすべての YXXL 変異株を導入した HeLa 細胞内で Env は核周辺部に斑点状に局在をしていた (図 17 左図)。また、Y498A 導入 HeLa 細胞においてのみ pBLV-IF2 と比較して有意に強い蛍光が細胞膜上で確認された (1.63 倍)

(図 17 右図)。この結果は Y498A 由来 Env は界面活性剤耐性膜ドメイン上に存在している可能性を示唆する。このことから、Env の局在を制御する YXXL 配列のチロシン残基の中でも、2nd YXXL 配列のチロシン残基は細胞膜上の膜ドメインの局在を制御している可能性が示された。また、10 細胞について行った Z-stack 解析においても、細胞内に斑点状の集積が確認された(図 18 上図)。また、すべての Z-stack 画像において、Y498A 導入 HeLa 細胞において、pBLV-IF2 よりも有意に強い細胞膜上の蛍光が確認された(Y498A:1.57 倍)(図 18 下図)。

6. Env 発現ベクター導入細胞における Env の局在の解析

YXXL 配列のチロシン残基によって制御される Env の局在には他のウイルスタンパク質が関与しているかどうかを確認するために、HeLa 細胞に pEnv-WT あるいは YXXL 変異株を導入し、72 時間培養後に非透過処理群と TritonX-100 による透過処理群に分け、蛍光抗体法で細胞膜上および細胞内の Env を観察した。また、非透過処理群、透過処理群の両群において、Env を発現する HeLa 細胞の核近傍に焦点を当てた共焦点画像をもとにラインプロファイルを行い、細胞膜上の Env の蛍光強度を測定した。

感染性分子クローンにおける結果と同様に、非透過処理条件下では、pEnv-Y487A、pEnv-Y498A、pEnv-Y508A のすべてのチロシン変異株を導入した HeLa 細胞において、pEnv-WT と比較して強い蛍光が細胞膜表面で確認され(図 19 左図)、蛍光強度マップから細胞膜上の蛍光強度を測定したところ、有意に高い値を示した(Y487A : 1.42 倍、Y498A : 1.69 倍、Y508A : 1.50 倍)(図 19 右図)。Z-stack 解析でも同様にすべてのチロシン変異株導入細胞の Z-stack 画像において、pEnv-WT 導入細胞よりも強い蛍光を示した(図 20 左図)。また、蛍光強度マップから細胞膜上の蛍光強度を測定したところ、全てのチロシン変異株において pEnv-WT と比較して有意に高い値を示した(pEnv-Y487A : 1.37 倍、pEnv-

Y498A : 1.39 倍、pEnv-Y508A : 1.46 倍)

透過処理条件下においても、感染性分子クローンと同様に pBLV-IF2 およびすべての YXXL 変異株を導入した HeLa 細胞内で Env は核周辺部に斑点状に局在をしていた (図 21 左図)。また、pEnv-Y498A 導入 HeLa 細胞においてのみ pEnv-WT と比較して有意に強い蛍光が細胞膜上で確認された (1.85 倍) (図 21 右図)。Z-stack 解析においても同様に細胞質の核周辺部における集積が確認された (図 22 左図)。また、pEnv-Y498A 導入 HeLa 細胞において、pEnv-WT と比較して細胞膜上で有意に強い蛍光が確認された (pEnv-Y498A : 1.54 倍)。これらの結果が感染性分子クローンをを用いた実験の結果と同様であったことから、YXXL 配列のチロシン残基による Env の局在の制御には他のウイルスタンパク質が関与していないことが明らかとなった。

7. YXXL 変異感染性分子クローン導入細胞における Env の初期エンドソームおよびトランスゴルジネットワークにおける局在の解析

Env の細胞内における斑点状の局在は Env が細胞内小器官を介して輸送されている可能性を示唆している。一般的に細胞内におけるタンパク質の輸送にはゴルジ体やエンドソーム、リソソームが強く関与している(70)。そこで、Env の局在の変化がどのようにして生じたかを明らかにするために、HeLa 細胞に感染性分子クローン pBLV-IF2 あるいは YXXL 変異株を導入し、Env と初期エンドソームマーカである EEA1、トランスゴルジネットワークのマーカである TGN46 との共局在の解析を蛍光抗体法で行った。共局在の解析は Villalta のアルゴリズムを用いて行い、EEA1 あるいは TGN46 と共局在している Env の割合を算出した。

pBLV-IF2 あるいはすべての変異株由来の Env において、EEA1 との共局在が確認された (図 23 上図)。しかし、Y487A、Y498A、Y508A のすべてのチロシン変異株において、

pBLV-IF2 と比較して EEA1 と共局在する Env の割合が有意に減少していた (pBLV-IF2 : 0.27, Y487A : 0.12, Y498A : 0.10, Y508A : 0.15) (図 23 下図)。一方で L490A、L501A、L511A のロイシン変異株においては、EEA1 との共局在指数は pBLV-IF2 と同等であった (L490A : 0.20, L501A : 0.31, L511A : 0.24)。同様に、pBLV-IF2 あるいはすべての変異株由来の Env において、TGN46 との共局在が確認された (図 24 上図)。また、全ての変異株において、TGN46 と共局在する Env の割合に変化はなかった (24 下図)。これらの結果から、Env は合成されたのちにトランスゴルジネットワークを經由して、細胞膜表面に運ばれ、その後エンドサイトーシスされ、初期エンドソームに取り込まれる可能性が示唆された。また、チロシン変異株においては、このエンドサイトーシスが阻害されることにより、初期エンドソームに取り込まれず、細胞膜表面にとどまることで細胞膜上の Env の量が増えたと考えられる。

8. ウイルス粒子中への Env の取り込みの解析

HIV において、Env タンパク質の分布がウイルスタンパク質の Budding site への集合に重要なように(55)、BLV においても Env がウイルス粒子に取り込まれるためには、ウイルスの budding site に Env タンパク質が正しく輸送される必要があると考えられる。しかし、本研究において、チロシンに変異を加えることで、Env タンパク質の輸送が阻害されることが明らかとなった。そこで YXXL 変異株において、Env がウイルス粒子中に取り込まれるか否かをウェスタンブロットによって解析した。COS-1 細胞に pBLV-IF2 あるいは YXXL 変異株を導入し、48 時間後に上清から超遠心にてウイルス粒子を回収した。ウイルス粒子中の構造タンパク質は SDS-PAGE 後に抗 p24 抗体および抗 gp51 抗体によって検出した。

図 9 において、YXXL 変異が培養上清中へのウイルス RNA の放出に関与しなかった結果通り、pBLV-IF2 およびすべての YXXL 変異株において、p24 タンパク質が検出され、その

量に大きな変化は認められなかった。一方で、Y498A および L511A 由来のウイルス粒子からは Env が検出されなかった (図 25 左図)。実際に Western blot のバンドの濃さを測定すると、p24 に対する gp51 の量が Y498A、L511A において有意に減少している (Y498A : 0.29 倍、L511A : 0.43 倍) (図 25 右図)。この結果から、2nd と 3rd の YXXL 配列はウイルス粒子中への Env の取り込みを制御していると考えられる。

考察

本研究において、私は gp30 の YXXL 配列の BLV の生活環における機能を、感染性分子クローン及び Env 発現ベクターを用いて解析し、表 2 に示す結果を得た。また、図 26 にまとめたそれぞれの YXXL 配列の新規機能から、私は三つの主要な結論を得た。一つ目は、YXXL 配列中のチロシン残基が独立して、Env によるシンシチウム形成を抑制していることである。また、このシンシチウム形成の制御には、Env の局在が関与していた。この YXXL 配列とシンシチウム制御に関する報告は私が世界で初めて行った。二つ目の主要な結論は三つの YXXL 配列中のチロシン残基がそれぞれ独立して Env の局在を制御していることである。加えて、この YXXL 配列による Env の局在の制御には他のウイルスタンパク質は関与しないことが明らかとなった。一方で、YXXL 変異によってトランスゴルジネットワークに局在する Env の割合に変化はなかったが、初期エンドソーム中の Env の割合が減少していたことから、YXXL 配列は宿主因子との相互作用によってエンドサイトーシスを制御している可能性が示唆された。過去に行われた研究においても、YXXL 配列とエンドサイトーシスの関係は示唆されていたが、本研究における Env タンパク質のエンドソームへの取り込み量の変化から、初めて YXXL 配列がエンドサイトーシスを制御していることが示された。加えて、Y498A 変異株由来の Env は TritonX-100 処理条件下においても、細胞膜上に強く局在していた。これは、Y498A 変異株由来の Env が界面活性剤耐性膜ドメイン上に局在していた可能性を示す。このことから、2nd YXXL はエンドサイトーシスだけでなく、Env の細胞膜ドメインにおける局在も制御している可能性が示唆された。この細胞膜ドメインにおける局在の変化は、Env のウイルス粒子への取り込みの阻害に関与している可能性がある。三つ目の結論は、2nd YXXL 中のチロシンと 3rd YXXL 中のロイシンが Env タンパク

質のウイルス粒子への取り込みを制御していることである。これらの結果から、私は三つの YXXL 配列が BLV の生活環において重要な役割を独立して担っていると結論付けた。

図 26 にまとめたように三つの YXXL 配列中のチロシン残基は Env のエンドサイトーシスを制御することによって、シンシチウム形成を抑制している可能性が示唆された。しかし、三つの YXXL 配列のチロシン残基のうち 2nd YXXL のチロシン残基のみが、シンシチウム形成の抑制だけでなく、ウイルス粒子中への Env の取り込みを制御していた。また、3rd YXXL だけがチロシン残基ではなくロイシン残基によって、ウイルス粒子中への Env の取り込みを制御していた。これらの結果はそれぞれの YXXL 配列が異なる宿主因子と相互作用し、ウイルスの生活環を制御している可能性を示唆している。HIV や SIV、HTLV-1 などの他のレトロウイルスはただ一つの YXXΦ配列で Env を制御しているが、BLV は三つの YXXL 配列がそれぞれ独立してウイルスの生活環に必須な Env タンパク質の制御を行っている。このことが、GenBank に報告されている 517 種の BLV の野生株の全てにおいて、三つの YXXL 配列が完全に保存されている理由として考えられる。加えて、我々の発見の一つである Env の YXXL 配列によるエンドサイトーシスの制御は、細胞膜上の Env の量を制限し、宿主の Env 特異的な免疫応答からの逃避に関与している可能性があり、これも BLV の株間において YXXL 配列が完全に保存されている理由と考えられる。

レトロウイルスの Env はウイルス感染とシンシチウムの形成において中心的な役割を担っている(71)。BLV においても Env 中のいくつかの特定のアミノ酸に点変異を加えると、シンシチウム形成が抑制されることが知られている(72, 73)。一方で、本研究においては、gp30 の YXXL 配列のチロシンがシンシチウム形成を抑制していることが明らかとなった。レトロウイルスの Env のシンシチウム形成能は二つの要素で決まると考えられる。一つは、Env の融合能である。実際に SIV の Env タンパク質において、C 末端の 146 アミノ酸を欠損させることで、Env の融合能が高まり、シンシチウムの形成能が高まるという報告があ

る(74)。二つ目の要素は、細胞膜における Env の量である。SIVmac239 株の Env の 723 番目のチロシン残基に変異を加えることによって、細胞膜上の Env の量が増加し、その結果、シンシチウムの形成が強くなるという報告がある(75)。本研究においては、YXXL 配列のチロシンの変異によって、細胞膜上の Env の量が増えていることから、チロシン残基によるシンシチウム形成の抑制は細胞膜における Env の量に関与していると考えられる。

レトロウイルスの Env の細胞膜の budding site への輸送は多くの宿主因子によって制御されていることが知られている。HIV の Env の膜貫通サブユニットである gp41 は、Env の細胞膜までの輸送において adaptor related protein1 と、エンドサイトーシスにおいて AP2 と、細胞膜へのリサイクリングに rat brain 11 family-interacting protein 1 C (Rab11-FIP1C) と相互作用することが報告されている(52, 76, 77)。しかし、BLV の gp51 と gp30 がどのように budding site へ輸送されるかはいまだ不明である。本研究において、蛍光抗体法によって、非透過処理条件下で感染性分子クローン、Env 発現ベクター導入細胞のいずれにおいても、チロシン変異株由来 Env が細胞膜上に強く局在していることを明らかにした。フローサイトメトリー法を用いることで、細胞膜全体におけるタンパク質の発現量の確認を一度に多くの細胞において測定できるため、本実験においても、当初はフローサイトメトリー法を用いた測定を試みたが、感染性分子クローンや Env 発現ベクターのトランスフェクション効率や発現効率が低く、細胞膜上での発現量を正確に比較することができるデータを得ることができなかった。そこで、感染性分子クローンあるいは Env 発現ベクターを安定導入することで、発現量の比較に耐えうるデータが得ることができると考えられたが、クローニングの過程で発現量や局在に偏りが生じる可能性があったため、本研究では蛍光抗体法を用いた。細胞膜全体の測定が可能なフローサイトメトリー法とは異なり、蛍光抗体法では細胞膜上の一点のみを測定可能なため、50 個以上の細胞の測定することで、データの信頼性を高めた。加えて、Z 軸における複数の平面の画像は正確な情報を提供できる。

そこで、Z-stack 解析を行い、細胞膜の複数の Z 軸平面における Env の局在を確認した。その結果、複数の Z 軸平面においても同様の傾向が確認され、確かに非透過処理条件下で感染性分子クローン、Env 発現ベクター導入細胞のいずれにおいても、チロシン変異株由来 Env が細胞膜上に強く局在していることが示された。これらの結果から、Env の YXXL 配列のチロシンが他のウイルスタンパク質ではなく、宿主因子との相互作用によって、Env の輸送を制御していると考えられる。加えて、蛍光抗体法で Env を染色することにより、透過処理条件下では感染性分子クローンあるいは Env 発現ベクター導入細胞において、全ての変異株および野生型の Env が各周辺部に斑点状に局在していることが明らかとなった。この斑点状の Env の集積は Env の細胞内での輸送が細胞内小器官を介して行われている可能性を示唆した。そこで、本研究において変化した細胞膜の局在に特に関与すると考えられる初期エンドソームとトランスゴルジネットワークにおける Env の局在の解析を行った。その結果、チロシン変異株において、初期エンドソームマーカーである EEA1 と共局在する Env の割合が減少していた。初期エンドソームは細胞膜上のタンパク質がエンドサイトーシスされた際に最初に輸送される細胞小器官である。このことから、YXXL 配列のチロシン残基がエンドサイトーシスを制御している可能性が示唆された。一方で、いずれの変異株においても、タンパク質が細胞膜に輸送される過程で経由するトランスゴルジネットワークのマーカーである TGN46 との共局在に変化は見られなかった。これらの結果は、Env が粗面小胞体で合成された後に、トランスゴルジネットワークを経由して、細胞膜に輸送され、エンドサイトーシスによって、細胞内に取り込まれるが、チロシン変異株ではエンドサイトーシスが阻害され、細胞膜上に留まることを示唆する。この YXXL 配列による Env のエンドサイトーシスの制御は、CD8 と gp30 の細胞内ドメインのキメラタンパク質 (CD8-CTM) を用いた実験においても、示唆されている(57)。特に、Y487A、Y498A 変異を 1st YXXL あるいは 2nd YXXL に加えた CD8-CTM において、細胞膜上のキメラタンパク質量が増加す

ることが報告されている(56)。これらの過去の研究を併せて考えると、Env の細胞膜への輸送が次の三つのステップで行われていることがわかる (図 27)。1) Env タンパク質はシグナルペプチドの機能により、粗面小胞体で前駆体として合成が行われる。2) 合成後、トランスゴルジネットワークを經由して細胞膜へと運ばれ、その過程で gp51 と gp30 に分解され、糖鎖の付与が行われ、成熟する。3) 細胞膜へと運ばれた後に、速やかにエンドソームへと取り込まれる。本研究における結果は、Env の budding site への輸送の過程において、YXXL 配列が独立してエンドサイトーシスという非常に重要なステップを担っていることを示している。加えて、EEA1 と共局在する Env の割合が、TGN46 と共局在する Env の割合よりもわずかに多いという本研究の結果は、宿主の Env 特異的な免疫の攻撃からの逃避のために細胞膜上の Env は速やかにエンドサイトーシスするためであると考えられる。

透過処理後の細胞における細胞膜表面のタンパク質量を蛍光抗体法で測定した。当初、私は非透過処理条件下での結果と同様に全てのチロシン変異株で Env が細胞膜上に強く局在していると仮説を立てていた。しかし、驚くべきことに、透過処理条件下では、Y498A 由来の Env のみが感染性分子クローンおよび Env 発現ベクター導入細胞の両者において、強く細胞膜に局在した。本研究において、界面活性剤である Triton-X 100 を用いて、透過処理を行っている。しかし、界面活性剤を用いることによって、細胞膜上のタンパク質、特に界面活性剤に可溶性膜画分に存在するタンパク質が一部脱落することが知られている(78)。一方、スフィンゴ脂質やコレステロールを多く含む細胞膜ドメインは界面活性剤に非可溶性であり、界面活性剤耐性膜と呼ばれる(79,80)。このことから、Y498A 由来の Env は野生型の Env と比較してより強く界面活性剤耐性膜に局在している可能性が示唆された。

budding site への Env の輸送は Env のウイルス粒子への取り込みおよびウイルスの複製に影響を与える(55)。Env のウイルス粒子への取り込みに影響を与える要素として、以下の二つの要素が考えられる。一つ目の要素として、HIV において、Env が一度エンドサイト

ーシスをされた後に、リサイクリングエンドソームを経由して再度細胞膜上の budding site に運ばれることが、Env のウイルス粒子への取り込みに必須であり、Env の細胞内輸送を阻害すると Env がウイルス粒子中に取り込まれなくなることが報告されている(81)。また、二つ目の要素として、MA タンパク質が関与しているということが知られている(82)。本研究において、Env の局在を変えた三つのチロシン変異の中で Y498A においてのみ Env のウイルス粒子への取り込みが阻害された。この Env のウイルス粒子への取り込みの阻害は、一つ目の要素によって、説明が可能である。本研究において Y498A 由来の Env のみが TritonX-100 で透過処理をした細胞においても細胞膜上に強く局在していたことから、Y498A 由来の Env は界面活性剤耐性膜に強く局在している可能性が示唆された。界面活性剤耐性膜、特に脂質ラフトはウイルスの粒子形成に非常に重要な役割を担っている。HIV においても、Env は界面活性剤耐性膜と界面活性剤に可溶性な膜の二つの膜ドメインに局在しているが、ウイルス粒子へと取り込まれるためには界面活性剤耐性膜に輸送される必要があることが報告されている(83)。BLV においては、ウイルスの放出と脂質ラフトの関係性は明らかにされていないが、HIV と同様に脂質ラフトが大きな役割を果たしているのではないかと考えられている。本研究において示唆された Y498A 変異における界面活性剤耐性膜における Env の局在の増強とウイルス粒子中への Env の取り込みの阻害は、Env がウイルス粒子に取り込まれるためには budding site である脂質ラフトへ輸送される必要があることと一見矛盾している。しかし、Y498A 変異において、界面活性剤耐性膜により多くの Env が局在しながら、ウイルス粒子に取り込まれない理由として次の仮説が考えられる。脂質ラフトにおけるエンドサイトーシスとクラスリン依存性のエンドサイトーシスの違いである。HIV において、ウイルス粒子の budding site への輸送には AP2 を介したクラスリン依存性のエンドサイトーシスが必要であることが報告されている。しかし、Y498A 由来の Env は界面活性剤耐性膜に局在しているため、クラスリン依存性のエンドサイトーシス

が阻害されている可能性があり、界面活性剤耐性膜には局在しているが、真のウイルスの budding site への輸送が阻害されている可能性が考えられる。同様に三つのロイシン変異の中で 3rd YXXL の L511A 変異のみが Env のウイルス粒子への取り込みを阻害したが、これには一つ目の要素と二つ目の要素の両方の要素の関与が考えられる。本研究において L511A 変異はシンシチウム形成あるいは Env の局在、特にエンドサイトーシスに影響を与えていない。そのため、L511A 変異による Env のウイルス粒子への取り込みの阻害は Gag-Env の相互作用の阻害あるいはエンドサイトーシス後の Env の budding site へのエスコートに影響を与えている可能性が考えられる。Env のウイルス粒子への取り込みに関する詳細なメカニズムの解明には、今後の YXXL 配列が相互作用する宿主因子の同定などの研究が必要である。

本研究において、それぞれ単一の変異によって表現型が変化したことやそれぞれの YXXL 配列が独自の機能を有していたことから、私は三つの YXXL 配列が BLV の生活環において重要な役割を独立して担っていると結論付けた。また、このそれぞれ独立した機能と宿主の免疫応答からの逃避に非常に重要な役割を担っている可能性から、三つの YXXL 配列が野生株に完全に保存されているのだと考えている。しかし、Y487A や Y508A において、エンドサイトーシスが阻害されているにもかかわらず、Y498A とは異なり、ウイルス粒子中への取り込みが阻害されなかったことから、それぞれの配列がお互いに機能を補完している可能性も考えられる。そこで、YXXL 配列のより詳細なメカニズムの解析には、三つ存在する YXXL 配列のチロシンとロイシンに単一の変異ではなく、複数の変異を加えた変異株を用いた解析も必要である。

本研究において明らかになった YXXL 配列におけるシンシチウム形成の制御は Env の輸送が強く関与していることは間違いない。特に YXXL 配列が AP2- μ 2 の結合モチーフであることから、チロシンへの変異は AP2- μ 2 との結合能を失わせ、エンドサイトーシスが阻害

されている可能性が考えられ、示唆されている(57)。実際に私は共免疫沈降法により、pBLV-IF2 由来の gp30 が AP2 と結合することを確認している。今後の gp30 の YXXL 配列と AP2- μ 2 の直接的な結合の検出によって、Env の輸送に対する大きな知見が得られると考えられる。Env のエンドサイトーシスは宿主免疫からの逃避、およびウイルス粒子中への Env の取り込みに特に重要なステップであるため、BLV に対する新規薬剤の標的となると考えられる。しかし、Env の輸送の変化だけでは、Y498A および L511A のウイルス粒子中への Env の取り込みの阻害メカニズムを十分に説明することはできない。このことから、YXXL 配列は多くの宿主因子との相互作用を介して、BLV の生活環を制御していると考えられる。BLV は他のレトロウイルスと比較して、非常にウイルス粒子の産生量が少ないウイルスであり、不活化ワクチンの作製が非常に困難である。ウイルスの粒子形成に非常に重要な役割を持っている Env、特にその中の YXXL 配列の機能解析を行うことによって、ウイルスの産生量を上昇させるあるいは、ウイルス産生量を規定する宿主因子を同定することができれば、ワクチンの開発に非常に重要な知見を得ることができる。このことから、YXXL 配列と相互作用する宿主因子の同定は BLV の生活環に対する大きな知見になるとともに、世界中に蔓延し、大きな経済被害をもたらしている BLV に対する創薬とワクチン開発の第一歩となるだろう。

結論

本研究において、図 27 に示すように私は gp30 の三つの YXXL 配列がそれぞれ独立をして、シンシチウムの形成の抑制と Env の輸送、特にエンドサイトーシスに参与していることを明らかにした。また、2ndYXXL と 3rdYXXL が Env のウイルス粒子への取り込みを制御していることを明らかにした。これらの知見は YXXL 配列が独立して、それぞれ異なる宿主因子と関与している可能性を示唆している。しかし、ウイルス粒子への Env の取り込みに関するメカニズムをはじめとして、三つの YXXL 配列がそれぞれどのような宿主因子と相互作用し、BLV の生活環を制御しているかについてはいまだ不明な点が多く残されている。今後の研究において、YXXL 配列と相互作用する宿主因子を明らかにすることは、いまだ有効な治療法やワクチンが存在せず、世界中で大きな経済被害をもたらしている BLV を克服する第一歩となると考えられる。

謝辞

本研究の機会をいただき、終始多大なるご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科連携教授、間陽子先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な協力をしていただいた理化学研究所環境資源科学研究センター生命分子解析ユニット、堂前直ユニットリーダー、理化学研究所光量子工学研究センター生細胞超解像イメージングチーム、黒川量雄博士、理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット、大附寛幸博士に御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり、多大なご指導、ご助言および厳正な審査を賜りました東京大学新領域創成科学研究科病態医療科学分野/ウイルス発癌分野、内丸薫教授、中野和民准教授、同分子発癌分野、井上純一郎教授、東京大学農学国際専攻国際動物生産学講座国際動物資源科学研究室、松本安喜准教授に深く感謝いたします。

終始ご協力を賜りました理化学研究所科技ハブ産連本部バトンゾーン研究推進プログラム中村特別研究室（旧分子ウイルス学特別研究ユニット）、佐藤洋隆博士、Meripet Polat 博士、Lanlan Bai 博士、Liushiqi Borjigi 博士、斎藤督氏、松本京子氏、橋本容子氏、Chang Hao 氏、Wlaa Assi 氏、Chieh Wen Lo 氏、Rania Hamada Ali Ahmed 氏、Metwally Samy Gamal Alsaied Mohamed 氏、曾矢麻理子氏、十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科、竹嶋伸之輔教授に感謝いたします。

最後に、終始援助し支えてくれた両親、弟、友人にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

1. **Reth M.** 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**:383-384.
2. **Hamerman JA, Lanier LL.** 2006. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2006**:re1.
3. **Yamada T, Taniguchi T, Yang C, Yasue S, Saito H, Yamamura H.** 1993. Association with B-cell-antigen receptor with protein-tyrosine kinase p72syk and activation by engagement of membrane IgM. *European journal of biochemistry* **213**:455-459.
4. **Straus DB, Weiss A.** 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *The Journal of experimental medicine* **178**:1523-1530.
5. **Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM.** 2010. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**:88-92.
6. **Lee H, Veazey R, Williams K, Li M, Guo J, Neipel F, Fleckenstein B, Lackner A, Desrosiers RC, Jung JU.** 1998. Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature medicine* **4**:435-440.
7. **Katz E, Lareef MH, Rassa JC, Grande SM, King LB, Russo J, Ross SR, Monroe JG.** 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *The Journal of experimental medicine* **201**:431-439.
8. **Lanier LL.** 2006. Viral immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signaling in cell transformation and cancer. *Trends in cell biology* **16**:388-390.
9. **Wang L, Dittmer DP, Tomlinson CC, Fakhari FD, Damania B.** 2006. Immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer research* **66**:3658-3666.
10. **Lu J, Lin WH, Chen SY, Longnecker R, Tsai SC, Chen CL, Tsai CH.** 2006. Syk tyrosine kinase mediates Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A-induced cell migration in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **281**:8806-8814.
11. **Fukuda M, Kawaguchi Y.** 2014. Role of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of latent membrane protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr virus LMP2A-induced

- cell transformation. *Journal of virology* **88**:5189-5194.
12. **Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN.** 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in microbiology* **4**:328.
 13. **Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M.** 2000. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *The Journal of veterinary medical science* **62**:329-331.
 14. **Selim A, Marawan MA, Ali AF, Manaa E, AbouelGhaut HA.** 2019. Seroprevalence of bovine leukemia virus in cattle, buffalo, and camel in Egypt. *Tropical animal health and production.*
 15. **Polat M, Takeshima SN, Aida Y.** 2017. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology journal* **14**:209.
 16. **Ruiz V, Porta NG, Lomonaco M, Trono K, Alvarez I.** 2018. Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Frontiers in veterinary science* **5**:267.
 17. **Watanuki S, Takeshima SN, Borjigin L, Sato H, Bai L, Murakami H, Sato R, Ishizaki H, Matsumoto Y, Aida Y.** 2019. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Veterinary research* **50**:102.
 18. **Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L.** 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* **4**:18.
 19. **Djilali S, Parodi AL.** 1989. The BLV-induced leukemia-lymphosarcoma complex in sheep. *Veterinary immunology and immunopathology* **22**:233-244.
 20. **Norby B, Bartlett PC, Byrem TM, Erskine RJ.** 2016. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of dairy science* **99**:2043-2052.
 21. **Trainin Z, Brenner J, Meirum R, Ungar-Waron H.** 1996. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* **54**:293-302.
 22. **Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB, Jefferson B.** 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-

- like viruses, production records, and management practices. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire **59**:271-278.
23. **Sagata N, Yasunaga T, Ohishi K, Tsuzuku-Kawamura J, Onuma M, Ikawa Y.** 1984. Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. The EMBO journal **3**:3231-3237.
 24. **Willems L, Kerkhofs P, Dequiedt F, Portetelle D, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R.** 1994. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**:11532-11536.
 25. **Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, Van den Broeke A.** 2016. Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. Retrovirology **13**:33.
 26. **Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R, Willems L.** 1998. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. Journal of virology **72**:2554-2559.
 27. **Wang H, Norris KM, Mansky LM.** 2002. Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function. Journal of virology **76**:8485-8493.
 28. **Bai L, Sato H, Kubo Y, Wada S, Aida Y.** 2019. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **33**:14516-14527.
 29. **Graves DC, Ferrer JF.** 1976. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. Cancer research **36**:4152-4159.
 30. **Kettmann R, Meunier-Rotival M, Cortadas J, Cuny G, Ghysdael J, Mammerickx M, Burny A, Bernardi G.** 1979. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**:4822-4826.
 31. **Katoh I, Yoshinaka Y, Ikawa Y.** 1989. Bovine leukemia virus trans-activator p38tax activates heterologous promoters with a common sequence known as a cAMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF. The EMBO journal **8**:497-503.
 32. **Lagarias DM, Radke K.** 1989. Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections.

- Journal of virology **63**:2099-2107.
33. **Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ.** 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *The Journal of experimental medicine* **199**:283-293.
 34. **Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PKC, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CRM.** 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**:1713-1716.
 35. **Ashrafi F, Nassiri M, Javadmanesh A, Rahimi H, Rezaee SA.** 2019. Epigenetics evaluation of the oncogenic mechanisms of two closely related bovine and human deltaretroviruses: A system biology study. *Microbial pathogenesis* **139**:103845.
 36. **Bracq L, Xie MR, Lambele M, Vu LT, Matz J, Schmitt A, Delon J, Zhou P, Randriamampita C, Bouchet J, Benichou S.** 2017. T Cell-Macrophage Fusion Triggers Multinucleated Giant Cell Formation for HIV-1 Spreading. *Journal of virology* **91**.
 37. **Xie M, Leroy H, Mascarau R, Woottum M, Dupont M, Ciccone C, Schmitt A, Raynaud-Messina B, Verollet C, Bouchet J, Bracq L, Benichou S.** 2019. Cell-to-Cell Spreading of HIV-1 in Myeloid Target Cells Escapes SAMHD1 Restriction. *mBio* **10**.
 38. **Webster RGG, A.** 1994. *Encyclopedia of Virology: A-Fur*, Academic Press.
 39. **Johnston ER, Radke K.** 2000. The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *Journal of virology* **74**:2930-2935.
 40. **Hunter E.** 1997. Viral Entry and Receptors. *In Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE* (ed.), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
 41. **Bai L, Takeshima SN, Isogai E, Kohara J, Aida Y.** 2015. Novel CD8(+) cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine* **33**:7194-7202.
 42. **Bruck C, Mathot S, Portetelle D, Berte C, Franssen JD, Herion P, Burny A.** 1982. Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* **122**:342-352.
 43. **Bai L, Otsuki H, Sato H, Kohara J, Isogai E, Takeshima SN, Aida Y.** 2015. Identification and characterization of common B cell epitope in bovine leukemia virus via high-throughput peptide screening system in infected cattle. *Retrovirology* **12**:106.
 44. **Callebaut I, Voneche V, Mager A, Fumiere O, Krchnak V, Merza M, Zavada J, Mammerickx M, Burny A, Portetelle D.** 1993. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *Journal of virology* **67**:5321-5327.

45. **Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Burny A, Portetelle D.** 1992. The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *The Journal of biological chemistry* **267**:15193-15197.
46. **Beaufils P, Choquet D, Mamoun RZ, Malissen B.** 1993. The (YXXL/I)₂ signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *The EMBO journal* **12**:5105-5112.
47. **Murakami H, Kuroiwa T, Suzuki K, Miura Y, Sentsui H.** 2011. Analysis of Syk expression in bovine lymphoma and persistent lymphocytosis induced by bovine leukemia virus. *The Journal of veterinary medical science* **73**:41-45.
48. **Hamilton VT, Stone DM, Pritchard SM, Cantor GH.** 2002. Bovine leukemia virus gp30 transmembrane (TM) protein is not tyrosine phosphorylated: examining potential interactions with host tyrosine-mediated signaling. *Virus research* **90**:155-169.
49. **Inabe K, Nishizawa M, Tajima S, Ikuta K, Aida Y.** 1999. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *Journal of virology* **73**:1293-1301.
50. **Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS.** 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**:1872-1875.
51. **Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL.** 2018. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annual review of biochemistry* **87**:871-896.
52. **Boge M, Wyss S, Bonifacino JS, Thali M.** 1998. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *The Journal of biological chemistry* **273**:15773-15778.
53. **Yuste E, Reeves JD, Doms RW, Desrosiers RC.** 2004. Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. *Journal of virology* **78**:6775-6785.
54. **Delamarre L, Pique C, Rosenberg AR, Blot V, Grange MP, Le Blanc I, Dokhelar MC.** 1999. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *Journal of virology* **73**:9659-9663.
55. **Lambele M, Labrosse B, Roch E, Moreau A, Verrier B, Barin F, Roingeard P,**

- Mammano F, Brand D.** 2007. Impact of natural polymorphism within the gp41 cytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 on the intracellular distribution of envelope glycoproteins and viral assembly. *Journal of virology* **81**:125-140.
56. **Novakovic S, Sawai ET, Radke K.** 2004. Dileucine and YXXL motifs in the cytoplasmic tail of the bovine leukemia virus transmembrane envelope protein affect protein expression on the cell surface. *Journal of virology* **78**:8301-8311.
57. **De Gassart A, Trentin B, Martin M, Hocquellet A, Bette-Bobillo P, Mamoun R, Vidal M.** 2009. Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein. *Cell biology international* **33**:36-48.
58. **Willems L, Gatot JS, Mammerickx M, Portetelle D, Burny A, Kerkhofs P, Kettmann R.** 1995. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *Journal of virology* **69**:4137-4141.
59. **Inabe K, Ikuta K, Aida Y.** 1998. Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology* **245**:53-64.
60. **Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
61. **Hagiwara K, Murakami T, Xue G, Shimizu Y, Takeda E, Hashimoto Y, Honda K, Kondoh Y, Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y, Aida Y.** 2010. Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochemical and biophysical research communications* **403**:40-45.
62. **Sato H, Watanuki S, Bai L, Borjigin L, Ishizaki H, Matsumoto Y, Hachiya Y, Sentsui H, Aida Y.** 2019. A sensitive luminescence syncytium induction assay (LuSIA) based on a reporter plasmid containing a mutation in the glucocorticoid response element in the long terminal repeat U3 region of bovine leukemia virus. *Virology journal* **16**:66.
63. **Jimba M, Takeshima SN, Matoba K, Endoh D, Aida Y.** 2010. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology* **7**:91.
64. **Jimba M, Takeshima SN, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsushashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y.** 2012. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC veterinary research* **8**:167.
65. **Takeshima SN, Watanuki S, Ishizaki H, Matoba K, Aida Y.** 2016. Development of a

- direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers. Archives of virology **161**:1539-1546.
66. **Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH.** 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. The Journal of biological chemistry **270**:13503-13511.
 67. **Ganley IG, Espinosa E, Pfeffer SR.** 2008. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. The Journal of cell biology **180**:159-172.
 68. **Villalta JI, Galli S, Iacaruso MF, Antico Arciuch VG, Poderoso JJ, Jares-Erijman EA, Pietrasanta LI.** 2011. New algorithm to determine true colocalization in combination with image restoration and time-lapse confocal microscopy to MAP kinases in mitochondria. PloS one **6**:e19031.
 69. **Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG.** 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. Science **232**:1123-1127.
 70. **Huang Y, Ma T, Lau PK, Wang J, Zhao T, Du S, Loy MMT, Guo Y.** 2019. Visualization of Protein Sorting at the Trans-Golgi Network and Endosomes Through Super-Resolution Imaging. Frontiers in cell and developmental biology **7**:181.
 71. **Bruck C, Portetelle D, Burny A, Zavada J.** 1982. Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions. Virology **122**:353-362.
 72. **Gatot JS, Callebaut I, Mornon JP, Portetelle D, Burny A, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L.** 1998. Conservative mutations in the immunosuppressive region of the bovine leukemia virus transmembrane protein affect fusion but not infectivity in vivo. The Journal of biological chemistry **273**:12870-12880.
 73. **Johnston ER, Albritton LM, Radke K.** 2002. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. Journal of virology **76**:10861-10872.
 74. **Spies CP, Compans RW.** 1994. Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. Virology **203**:8-19.
 75. **Sauter MM, Pelchen-Matthews A, Bron R, Marsh M, LaBranche CC, Vance PJ,**

- Romano J, Haggarty BS, Hart TK, Lee WM, Hoxie JA.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *The Journal of cell biology* **132**:795-811.
76. **Wyss S, Berlioz-Torrent C, Boge M, Blot G, Honing S, Benarous R, Thali M.** 2001. The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]. *Journal of virology* **75**:2982-2992.
77. **Qi M, Chu H, Chen X, Choi J, Wen X, Hammonds J, Ding L, Hunter E, Spearman P.** 2015. A tyrosine-based motif in the HIV-1 envelope glycoprotein tail mediates cell-type- and Rab11-FIP1C-dependent incorporation into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**:7575-7580.
78. **Yu J, Fischman DA, Steck TL.** 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *Journal of supramolecular structure* **1**:233-248.
79. **Simons K, Ikonen E.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
80. **Goni FM.** 2014. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochimica et biophysica acta* **1838**:1467-1476.
81. **Kirschman J, Qi M, Ding L, Hammonds J, Dienger-Stambaugh K, Wang JJ, Lapierre LA, Goldenring JR, Spearman P.** 2018. HIV-1 Envelope Glycoprotein Trafficking through the Endosomal Recycling Compartment Is Required for Particle Incorporation. *Journal of virology* **92**.
82. **Tedbury PR, Freed EO.** 2014. The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Trends Microbiol* **22**:372-378.
83. **Patil A, Gautam A, Bhattacharya J.** 2010. Evidence that Gag facilitates HIV-1 envelope association both in GPI-enriched plasma membrane and detergent resistant membranes and facilitates envelope incorporation onto virions in primary CD4+ T cells. *Virology journal* **7**:3.

图表

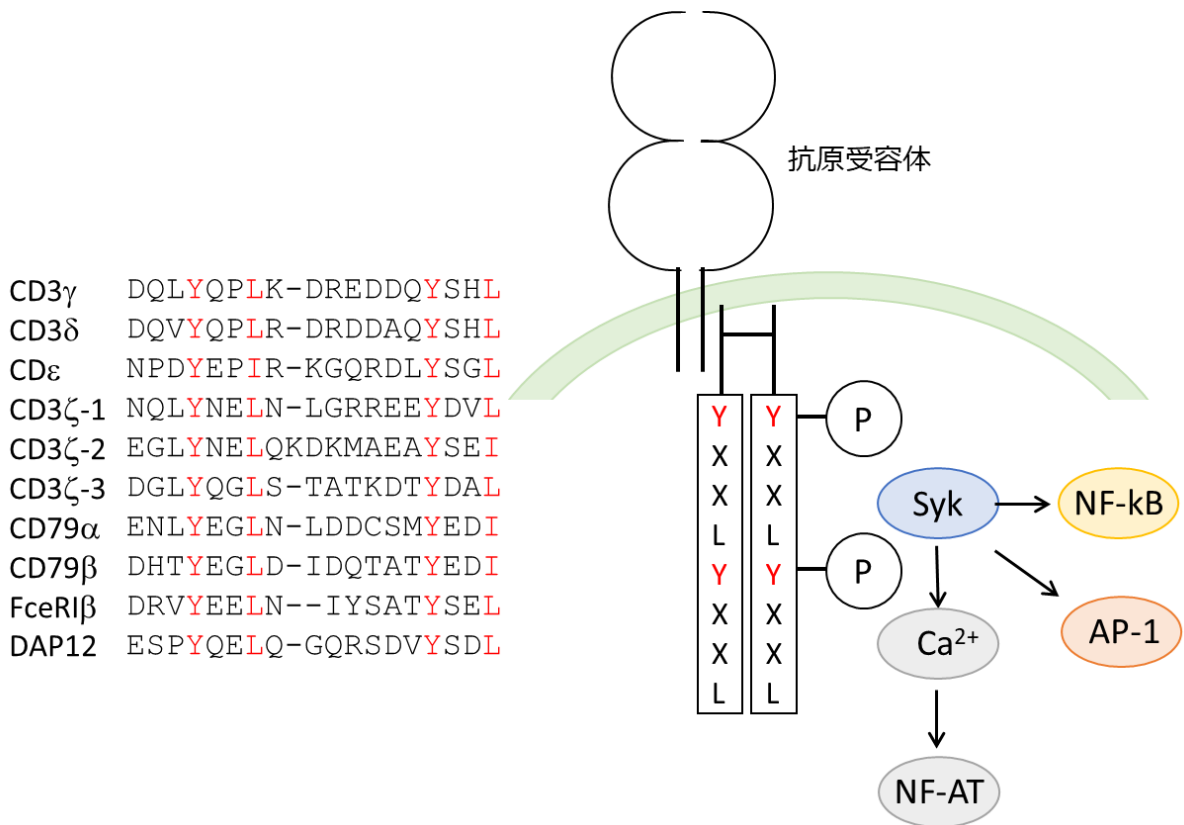


図1 ITAM とその機能

ITAM は抗原受容体を構成するサブユニットが有する YXX[L/I]-X₆₋₈-YXX[L/I]からなる配列であり、細胞外からの刺激を細胞内に伝え、免疫細胞を活性化する働きを有する。

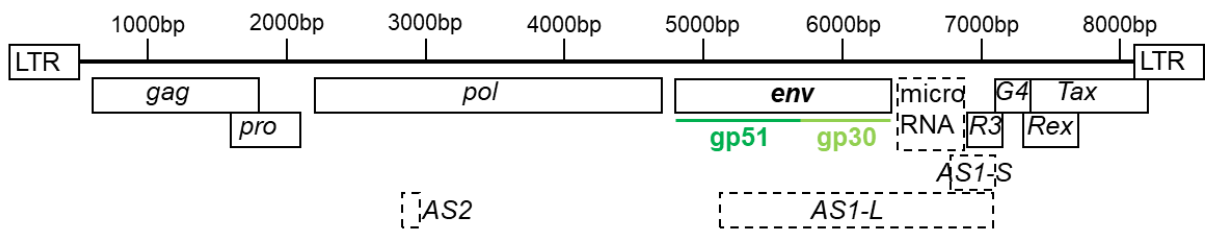


図2 BLV ゲノムの構造

BLV は全てのレトロウイルスに共通な *gag*、*pro*、*pol*、*env*に加えて、調節遺伝子である *tax* や *rex*、アクセサリータンパク質である *G4*、*R3*、noncoding RNA である micro RNA や *AS-1*、*AS-2*を有する。

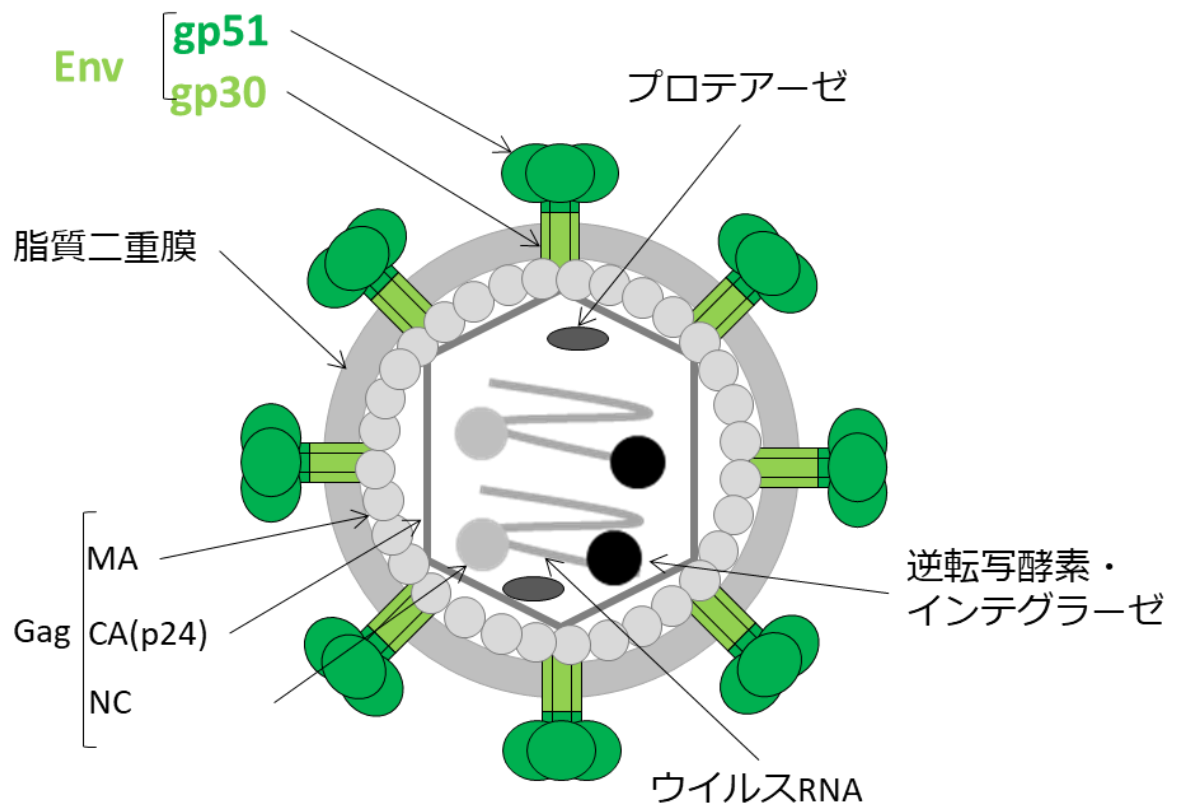


図3 BLVの粒子構造

BLVの粒子構造を示す。BLVは直径100nm-120nmのエンベロープウイルスである。

Envはウイルス粒子の表面にスパイクしている。

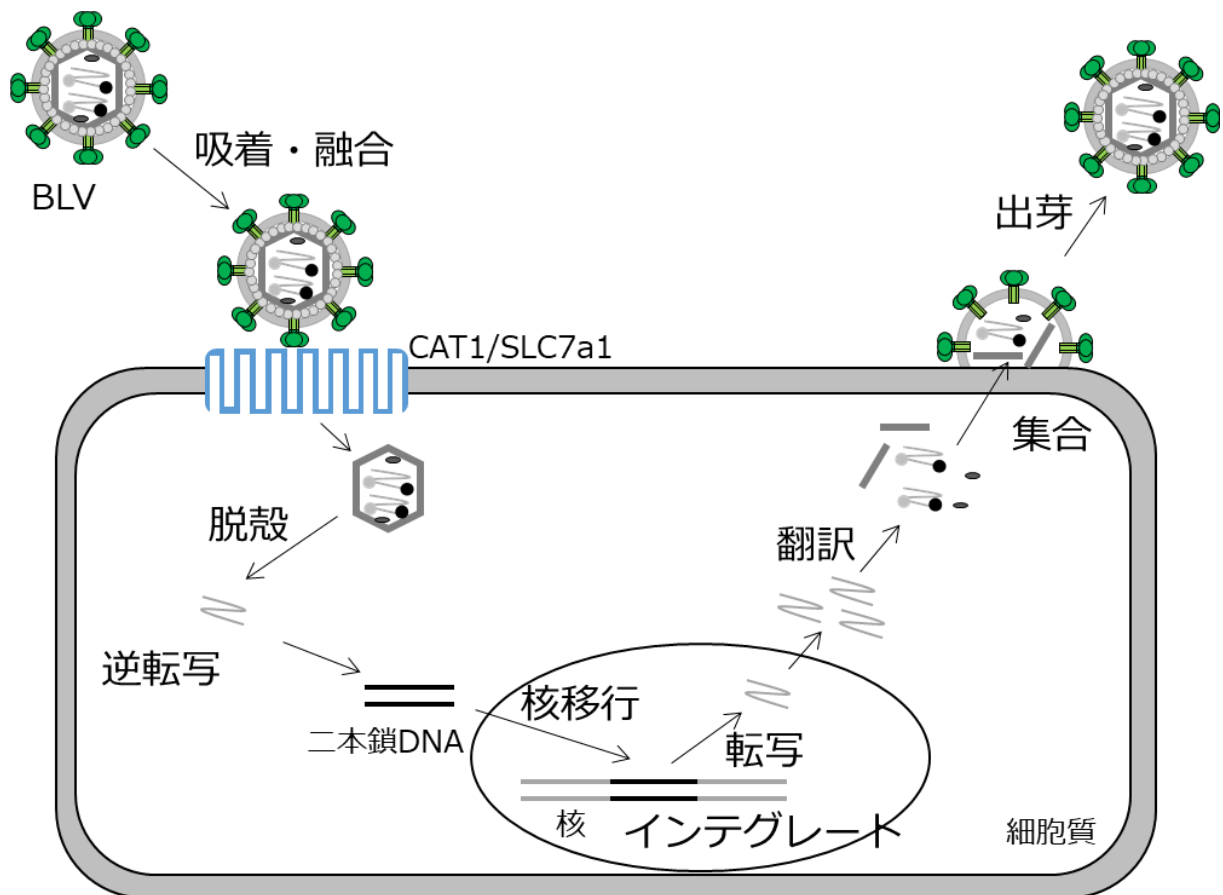


図4 BLV の生活環

BLV は宿主細胞に CAT1/SLC7a1 を介して、吸着・融合する。その後、脱殻をしたウイルス RNA は逆転写され、ゲノムにインテグレート、プロウイルスとなる。プロウイルスからの転写後、新たなウイルス粒子が形成され、細胞から出芽する。

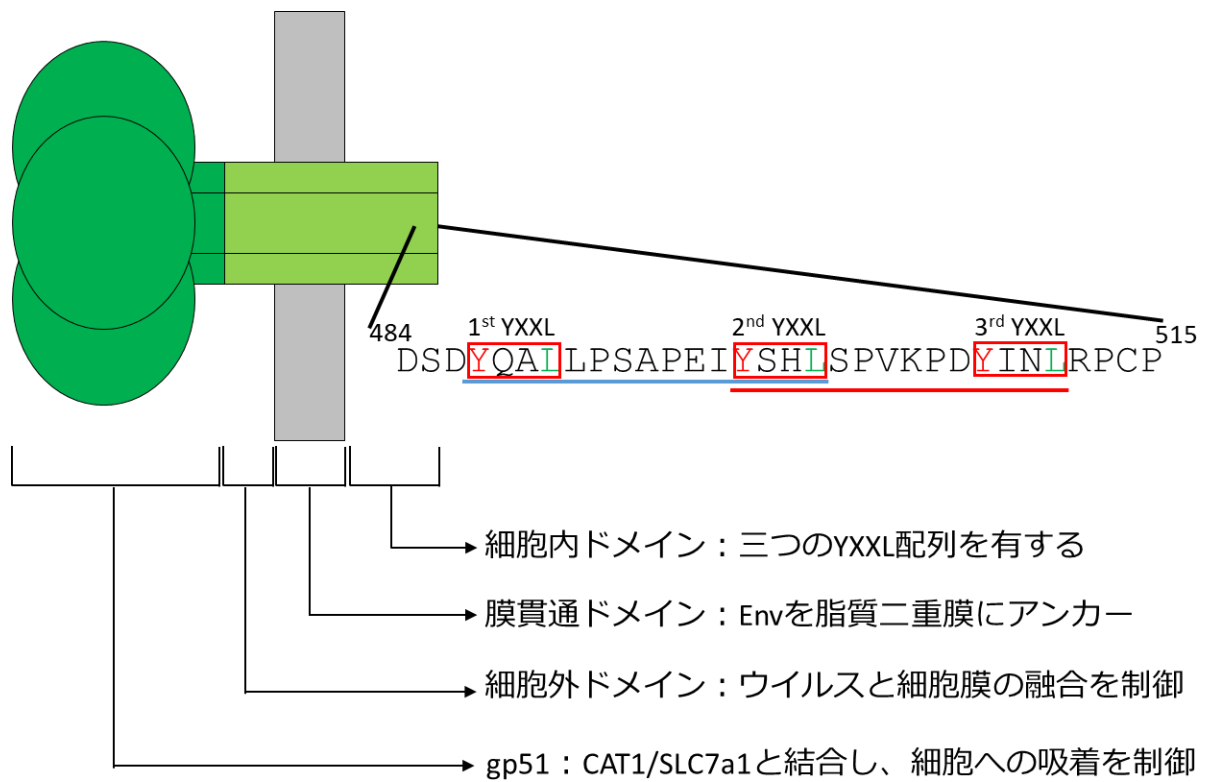


図5 Env タンパク質の構造と機能

Env タンパク質は gp51 と gp30 に分解されて機能する。gp30 の細胞内ドメインには三つの YXXL 配列が存在する。

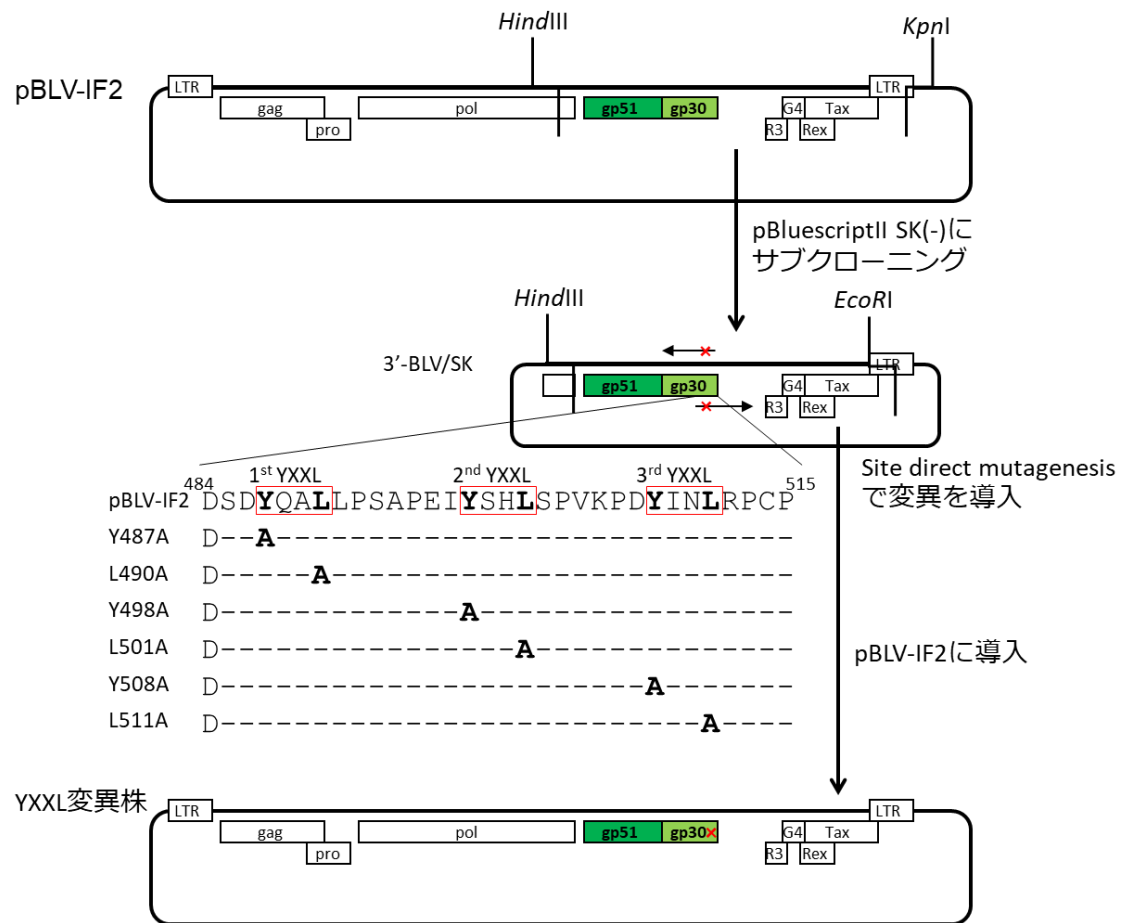


図6 YXXL 変異感染性分子クローンの作製

pBLV-IF2 をから、env を含む領域をサブクローニングし、site direct mutagenesis によって、YXXL 配列中のそれぞれのチロシンとロイシンをアラニンに置換した。その後、変異を加えた env 配列を pBLV-IF2 の env 配列と交換し、Y487A、L490A、Y498A、L501A、Y508A、L511A を作製した。

表1 YXXL変異感染性分子クローン作製に使用したプライマー

変異株	Forward primer	Reverse primer
Y487A	tctgat <u>GCT</u> caggccttgctacat	ggcctga <u>GC</u> atcagaatcgggtta
L490A	aggcc <u>GCT</u> taccatctgcaccaga	gatggtag <u>AGC</u> ggcctgataatcagaa
Y498A	agagatc <u>GCT</u> tctcacctctcccc	ggtgaga <u>AGC</u> gatctctggtgcagatg
L501A	tctcac <u>GCT</u> tccccgtcaaaccg	cggggga <u>AGC</u> gtgagagtagatctctg
Y508A	ccgat <u>GCT</u> atcaacctccgacct	ggttgat <u>AGC</u> atcgggttgacgggg
L511A	catcaac <u>GCT</u> cgacctgccttgat	gggtcg <u>AGC</u> gttgatgtaatcgggt

変異導入部位を大文字でアラニン配列を下線で示している

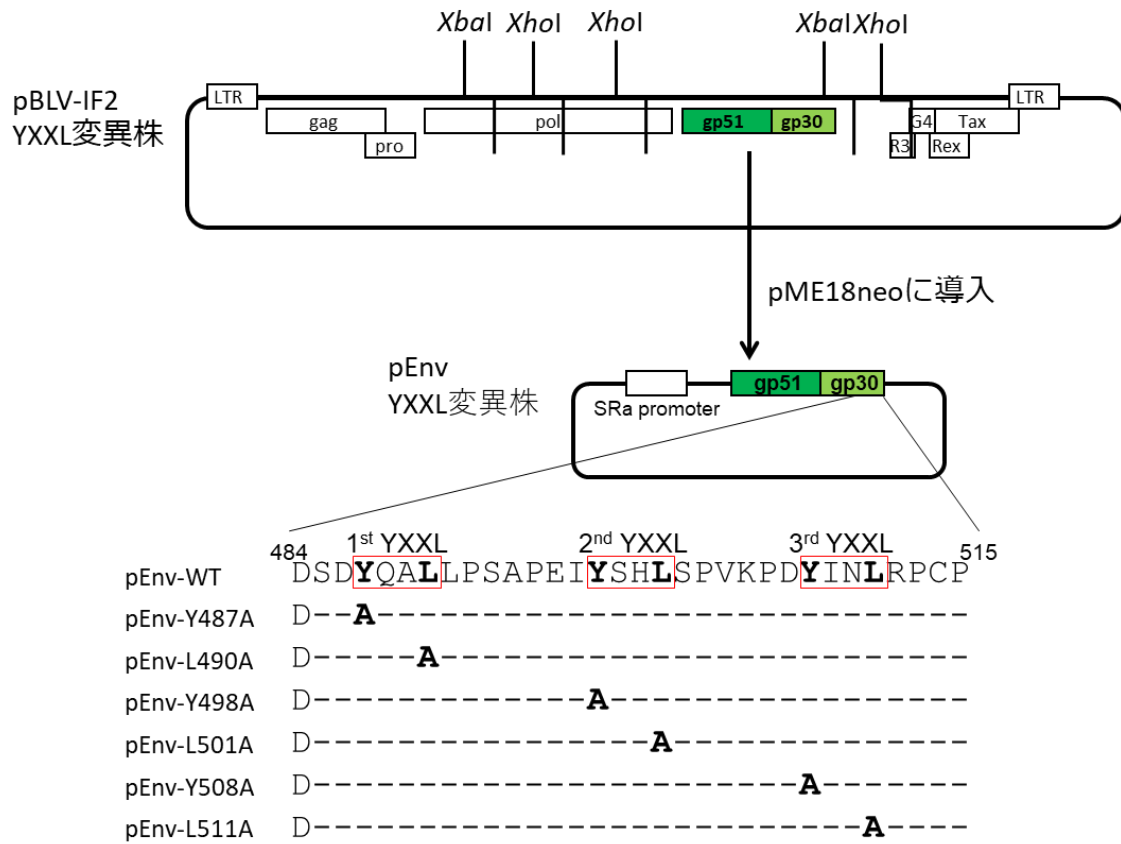


図7 Env 発現ベクターあるいは YXXL 変異 Env 発現ベクターの作製

pBLV-IF2 あるいはその変異株から *env* を含む領域を pME-18neo に導入し、pEnv-WT、pEnv-Y487A、pEnv-L490A、pEnv-Y498A、pEnv-L501A、pEnv-Y508A、pEnv-L511A を作製した。

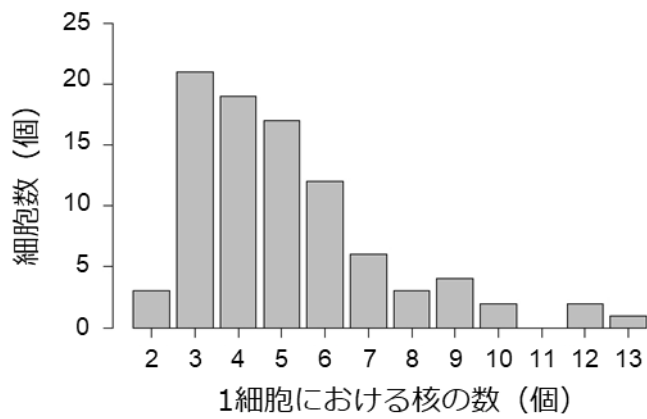


図8 pME18neoを導入したCC81細胞における1細胞あたりの核の数

pME18neoを導入したCC81細胞をメイグリュンワルド染色液およびギムザ染色液で染色し、顕微鏡下で観察し、複数の核を持つ細胞の数とその細胞における核の数を測定した。

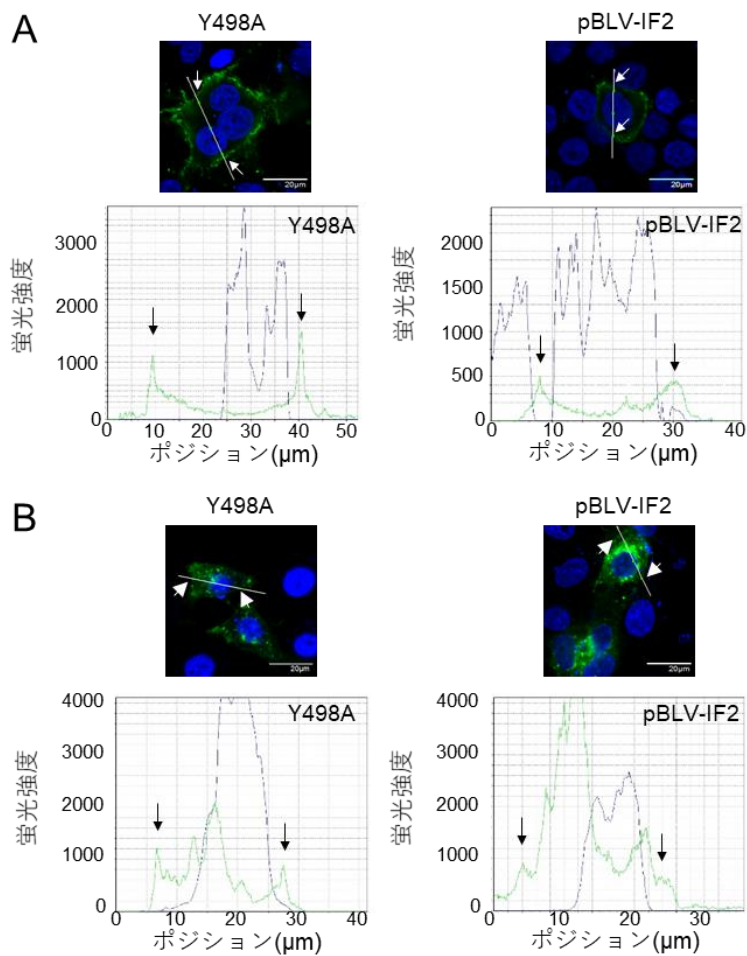


図9 細胞膜上の蛍光強度の測定法

カバーガラスを敷いた12穴プレートに 1.0×10^5 個のHeLa細胞を播種し、20時間後に感染性分子クローンあるいはEnv発現ベクターをHeLa細胞に導入した。トランスフェクション後72時間後に、4%パラホルムアルデヒドで固定し、非透過処理群(A)と透過処理群(B)に分け、抗gp51抗体を用いて、gp51を検出した。それぞれのgp51を発現している細胞について、写真に示すように核を通過する線上の蛍光強度からラインプロファイルによって蛍光強度マップを作製した。細胞膜上の蛍光強度は蛍光強度マップ上の細胞膜のピーク値として測定した。写真中の白い矢印とグラフ中の黒い矢印はそれぞれ細胞膜の位置を示している。

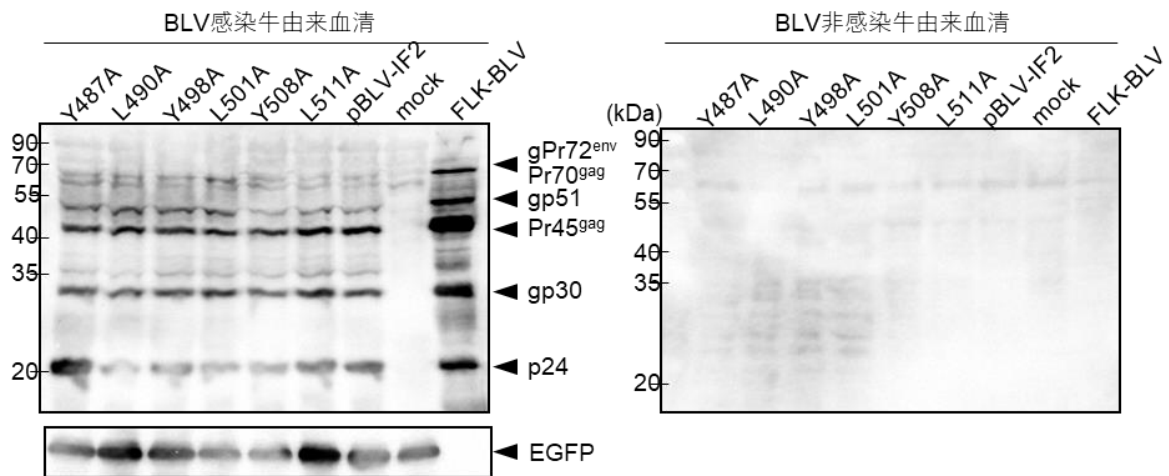


図 10 感染性分子クローンの発現の解析

COS-1 細胞に感染性分子クローンと pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) を導入し、48 時間後に COS-1 細胞を 2 mM EDTA を用いて、回収した。一部の細胞を用いて、FACSCalibur™ flow cytometer を用いて、EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。残りの細胞を NET Buffer で可溶化し、Cell lysate を作製し、タンパク質量を定量した。定量したタンパク質量をトランスフェクション効率で標準化し、BLV 感染牛由来血清 (左図)、BLV 非感染牛由来血清 (右図) を用いて Western blot によって、ウイルスタンパク質の発現を確認した。同時に、抗 EGFP 抗体によって EGFP の発現を検出した (左図)。矢印はそれぞれのウイルスタンパク質および EGFP のバンドの位置を示している。

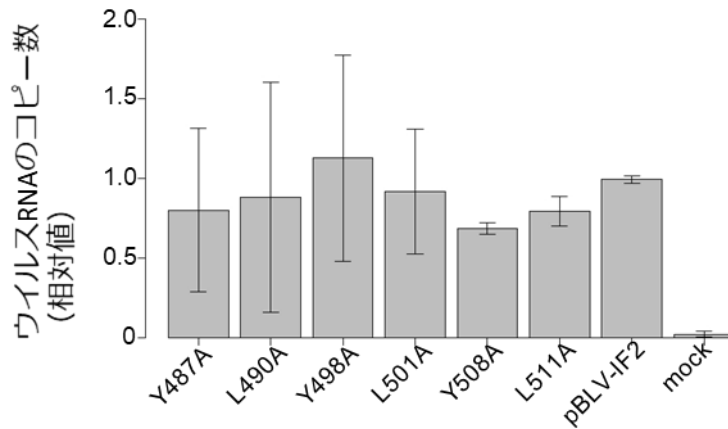


図 11 感染性分子クローンのウイルスの放出の解析

COS-1 細胞に感染性分子クローンと pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) を導入し、48 時間後に培養上清からウイルス RNA を回収した。ウイルス RNA は逆転写後に、BLV-CoCoMo-qPCR を用いて定量した。同時に FACSCalibur™ flow cytometer を用いて、EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。BLV-CoCoMo-qPCR によって定量したウイルス RNA 量をトランスフェクション効率によって補正した。独立した実験を 3 回行い、ウイルス RNA 量の相対値の平均とエラーバーをグラフに示した。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 の値と比較した。

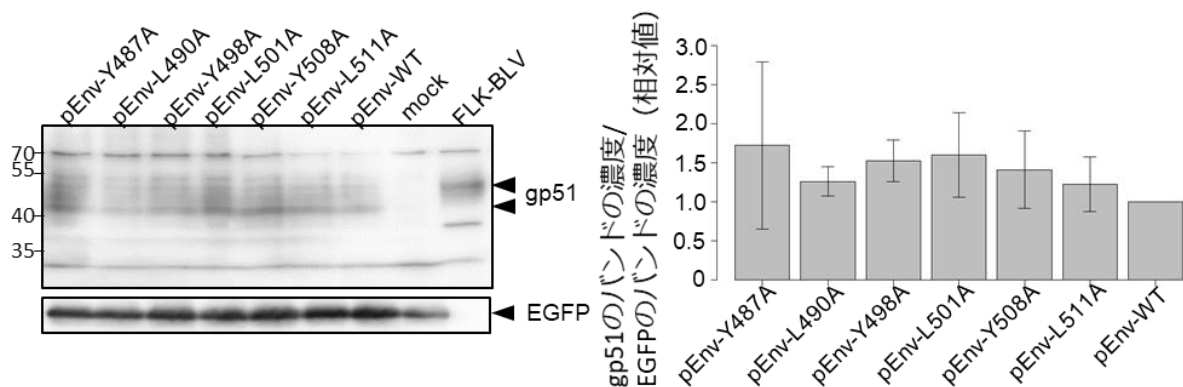


図 12 Env 発現ベクターの発現の解析

pEnv-WT あるいは YXXL 変異株と pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するためのマーカー遺伝子) を COS-1 細胞に導入し、48 時間後に COS-1 細胞を 2 mM EDTA を用いて、回収した。一部の細胞を用いて、FACSCalibur™ flow cytometer を用いて、EGFP 発現細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。残りの細胞を NET Buffer で可溶化し、Cell lysate を作製し、タンパク質量を定量した。定量したタンパク質量をトランスフェクション効率で標準化し、抗 gp51 抗体を用いて、gp51 の発現を検出した (左図)。同時に、抗 EGFP 抗体によって EGFP の発現を検出した (左図)。矢印は gp51 および EGFP のバンドの位置を示している。それぞれの変異株におけるバンドの濃度を AlphaEastFCTM software を用いて測定し、EGFP のバンド濃度で補正した。独立した実験を 3 回行い、gp51 のバンドの濃度を EGFP のバンドの濃度で割った値の相対値の平均値とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pEnv-WT の値と比較した。

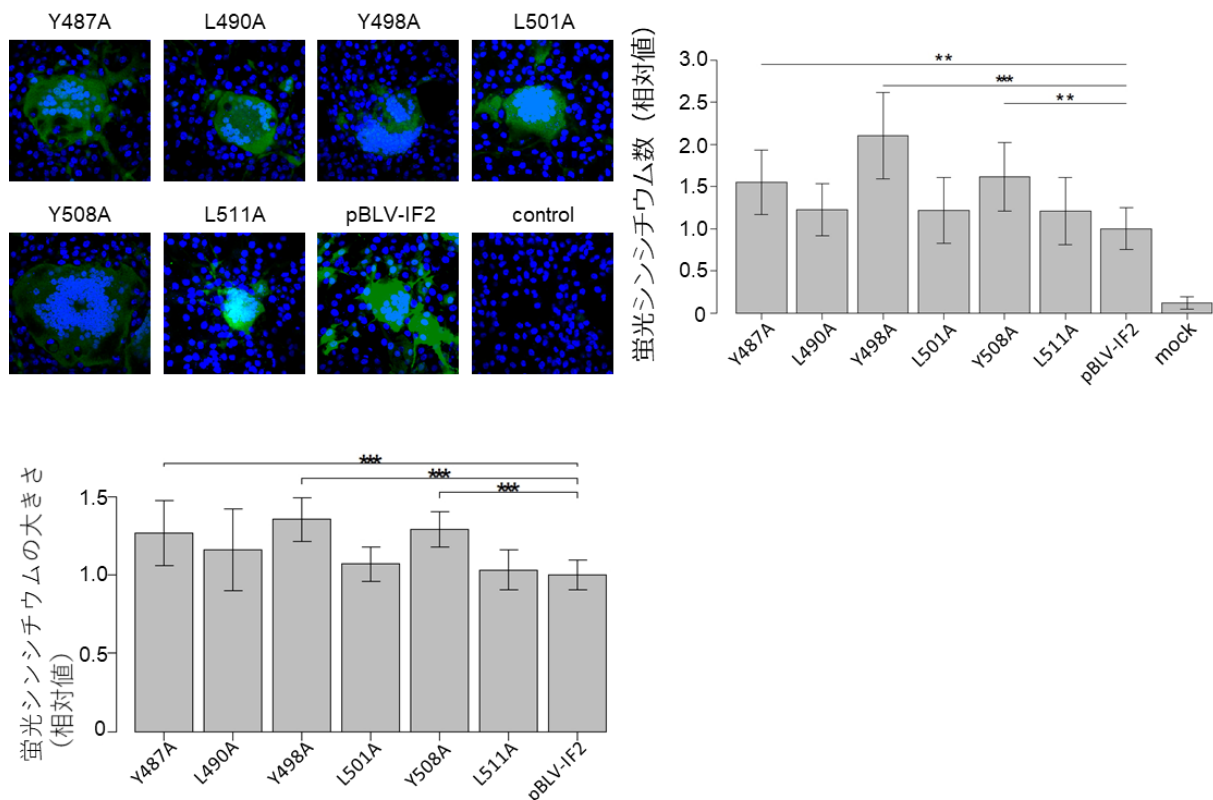


図 13 感染性分子クローンにおけるシンシチウム形成能の解析

CC81-GREMG 細胞に感染性分子クローンと pFlag-mRFP (トランスフェクション効率を測定するマーカー遺伝子) を導入し、24 穴プレートに播種した。トランスフェクション 20 時間後に、四分の一の細胞を 2mM EDTA で回収し、FACSCalibur™ flow cytometer を用いて、mRFP 保持細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。トランスフェクション後、72 時間後に残り四分の三の細胞を固定し、EVOS2 fluorescence microscope で観察し、蛍光シンシチウムをの数を HCS Studio CellAnalysis software で測定し、トランスフェクション効率で補正した。同時に、蛍光シンシチウムの大きさを HCS Studio CellAnalysis software で測定した。独立した実験を 4 回行い、蛍光シンシチウム数 (右上図) と蛍光シンシチウムの大きさ (左下図) の相対値の平均とエラーバーをグラフに示した。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 の値と比較した。** : $p < 0.01$ 、*** :

$p < 0.001$ 。一部の細胞においては、共焦点レーザー顕微鏡（FV1000）を用いて、蛍光シンチウムを観察した（左上図）。

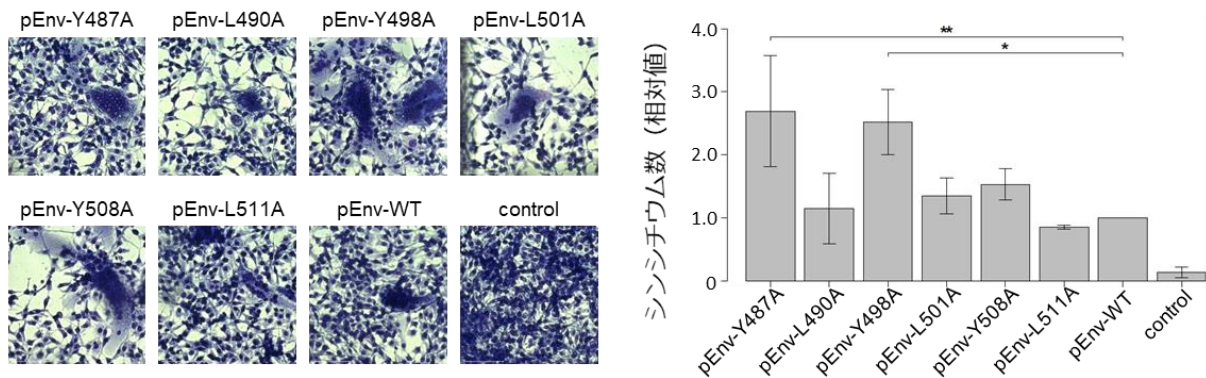


図 14 Env 発現ベクターに置けるシンシチウム形成能の解析

CC81 細胞に Env 発現ベクターと pEGFP-N1 (トランスフェクション効率を測定するマーカー遺伝子) を導入し、60 mm dish と 24 穴プレートに播種した。トランスフェクション 20 時間後に、12 穴プレート中の細胞を 2mM EDTA で回収し、EGFP 保持細胞を検出し、トランスフェクション効率を算出した。トランスフェクション 72 時間後にメイグリンワールドギムザ染色によって固定し、シンシチウムを顕微鏡下で観察した (左図)。また、40 mm² の区画における各変異株のシンシチウム数を測定し、トランスフェクション効率で補正した。独立した実験を 3 回行い、シンシチウム数の相対値の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pEnv-WT と比較した。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。

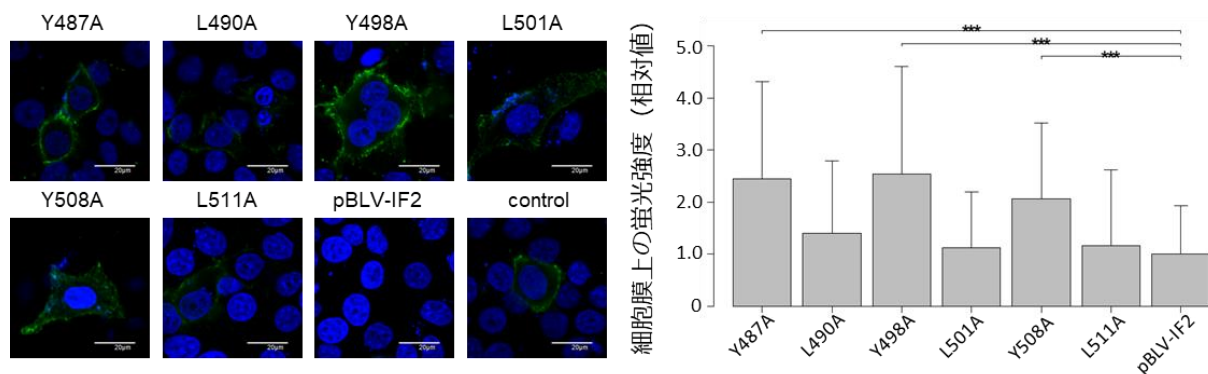


図 15 感染性分子クローンにおける細胞膜での Env の発現の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定した。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した (左図)。ラインプロファイルにより、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の蛍光を測定し、各細胞の蛍光強度は各実験に置ける **wild type** の平均蛍光強度で標準化した。各感染性分子クローンにおけるデータは各 50 個以上の細胞から収集した。細胞膜上の蛍光強度の相対値の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。*** : $p < 0.001$ 。

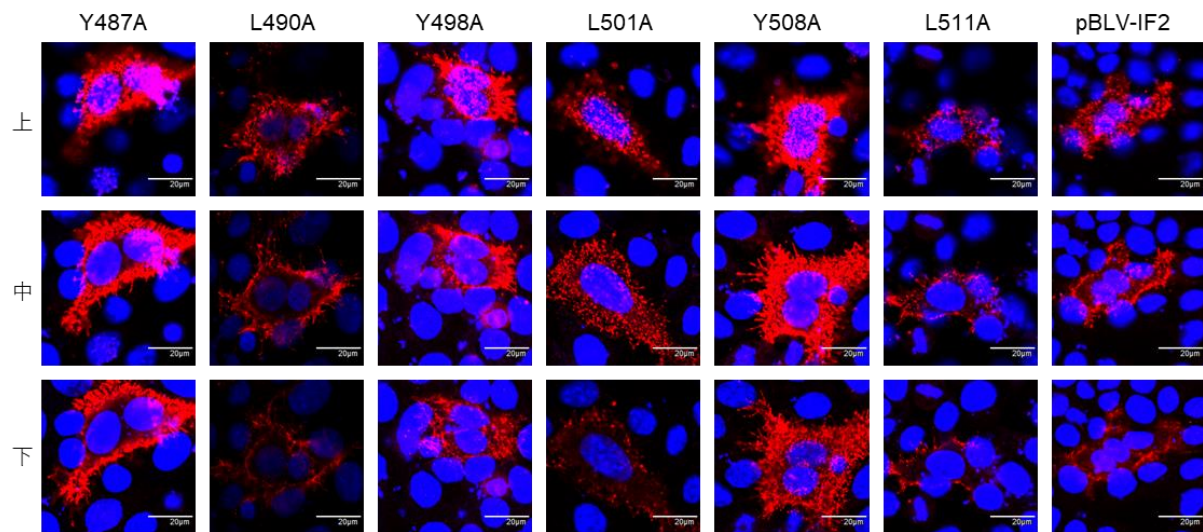


図 16 Z-stack 解析による感染性分子クローン導入細胞における非透過処理条件下での細胞膜上の Env の発現の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定した。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した。各 gp51 発現細胞の Z-stack 画像 2 µm 間隔で撮影し (上図)、ラインプロファイルにより、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の蛍光を測定した。10 個の細胞から蛍光強度を測定し、pBLV-IF2 の平均蛍光強度で標準化し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。

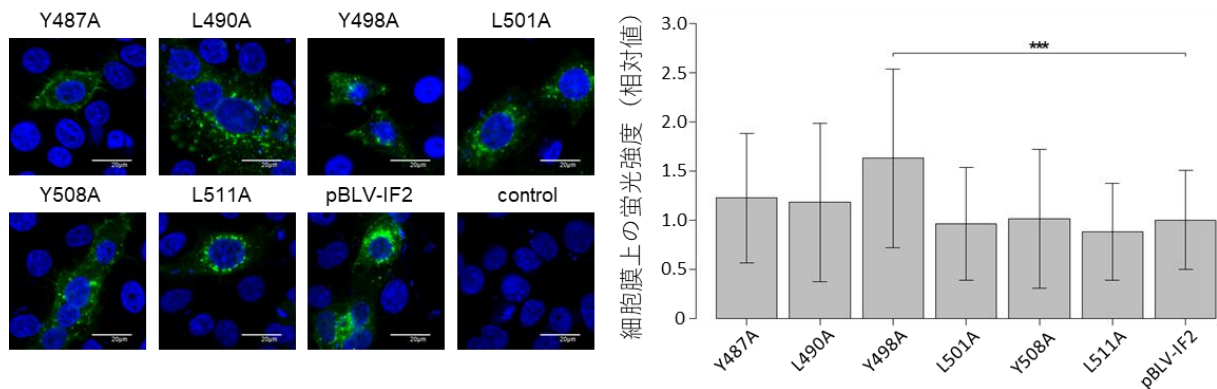


図 17 感染性分子クローンにおける細胞内での Env の発現の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した (左図)。ラインプロファイルにより、細胞膜上の蛍光を測定し、各細胞の蛍光強度は各実験に置ける wild type の平均蛍光強度で標準化した。各感染性分子クローンにおけるデータは各 50 個以上の細胞から収集し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。*** : $p < 0.001$ 。

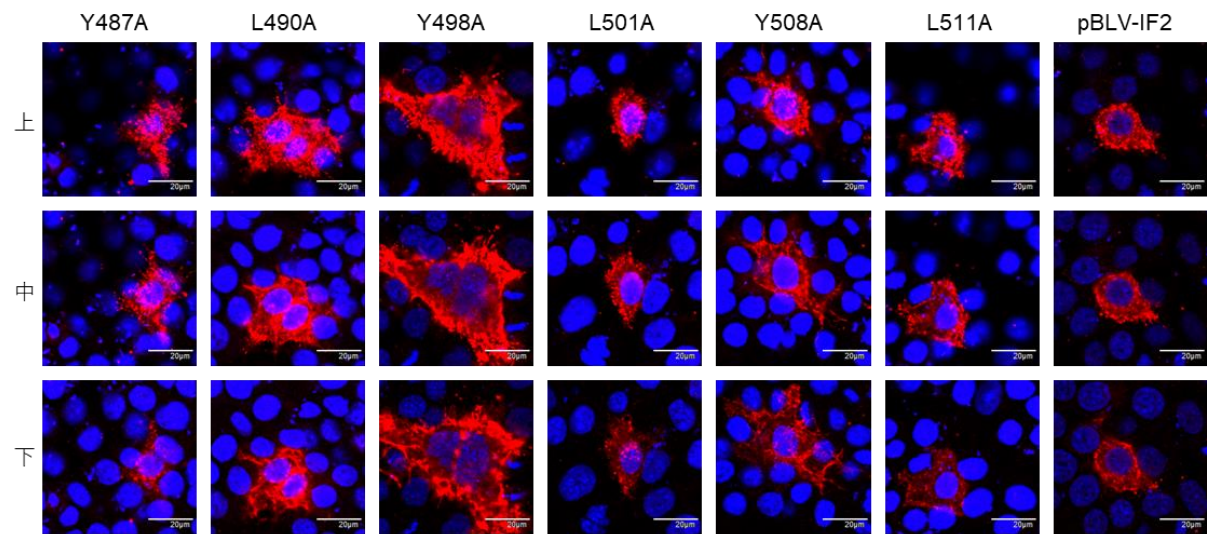


図 18 Z-stack 解析による感染性分子クローン導入細胞における透過処理条件下での細胞膜上の Env の発現の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した。各 gp51 発現細胞の Z-stack 画像 2 µm 間隔で撮影し (上図)、ラインプロファイルにより、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の蛍光を測定した。各細胞の蛍光強度は pBLV-IF2 の平均蛍光強度で標準化した。各感染性分子クローンにおけるデータは 10 個の細胞から収集し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。*** : $p < 0.001$ 。

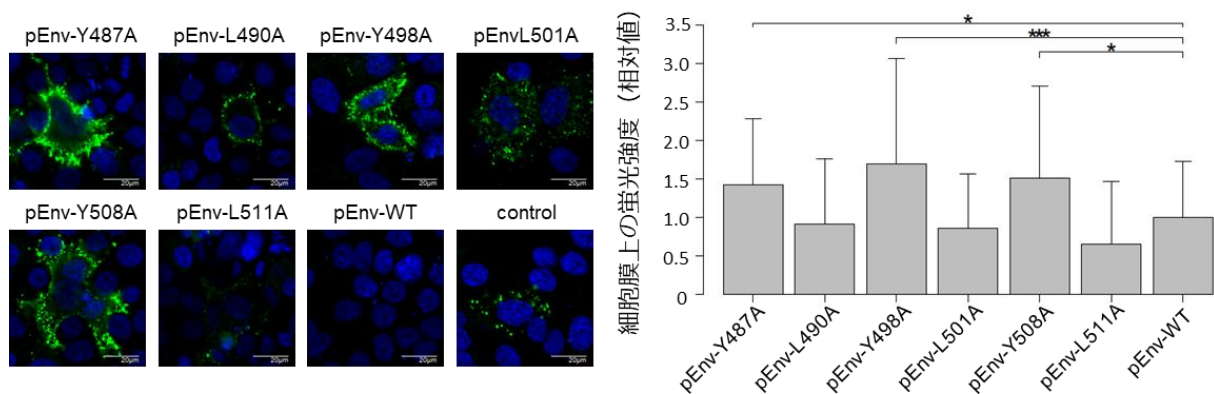


図 19 Env 発現ベクターにおける細胞膜での Env の発現の解析

Env 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定した。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した (左図)。ラインプロファイルにより、細胞膜上の蛍光を測定し、各細胞の蛍光強度は各実験に置ける pEnv-WT の平均蛍光強度で標準化した。細胞膜上の蛍光強度は 50 個以上の細胞から収集し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pEnv-WT と比較した。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。

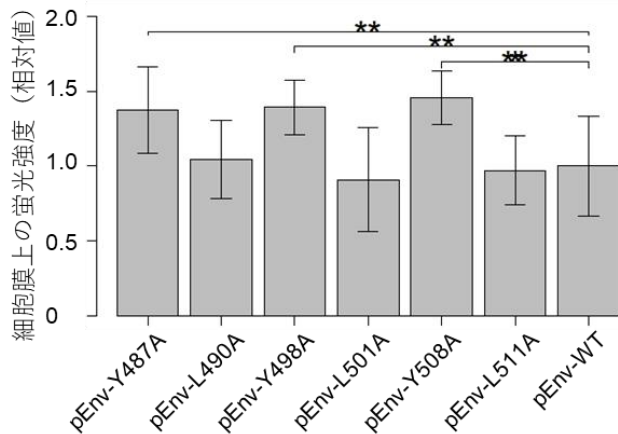
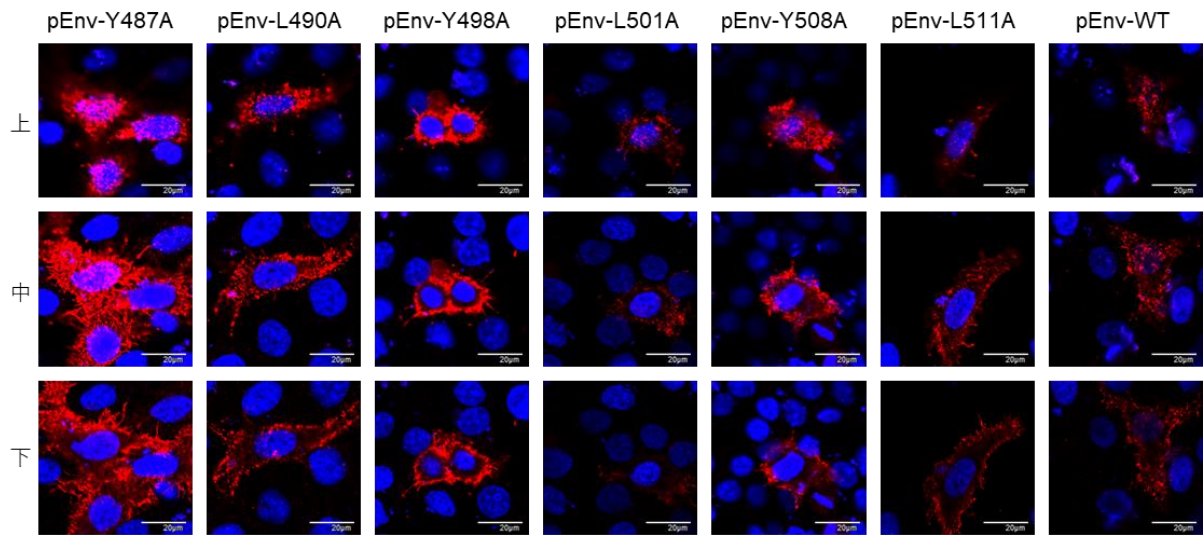


図 20 Z-stack 解析による Env 発現ベクター導入細胞における非透過処理条件下での細胞膜上の Env の発現の解析

Env 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定した。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した。各 gp51 発現細胞の Z-stack 画像 2 µm 間隔で撮影し (上図)、ラインプロファイルにより、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の蛍光を測定した。各細胞の蛍光強度は 10 個の細胞から収集し、pEnv-WT の平均蛍光強度で標準化後、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pEnv-WT と比較した。** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 。

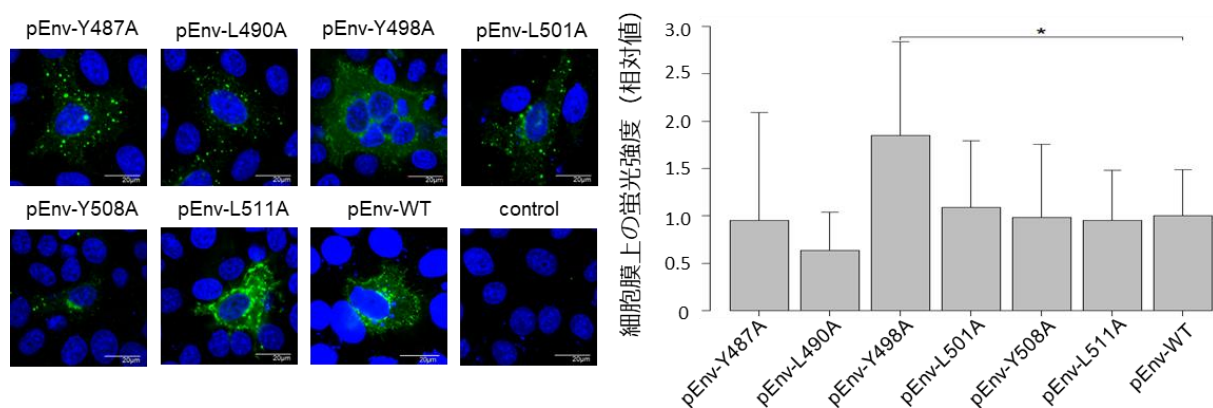


図 21 Env 発現ベクターにおける細胞内での Env の発現の解析

Env 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した (左図)。ラインプロファイルにより、細胞膜上の蛍光を測定し、各細胞の蛍光強度は各実験に置ける wild type の平均蛍光強度で標準化した。細胞膜上の蛍光強度は 50 個以上の細胞から収集し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、WT と比較した。* : $p < 0.05$ 。

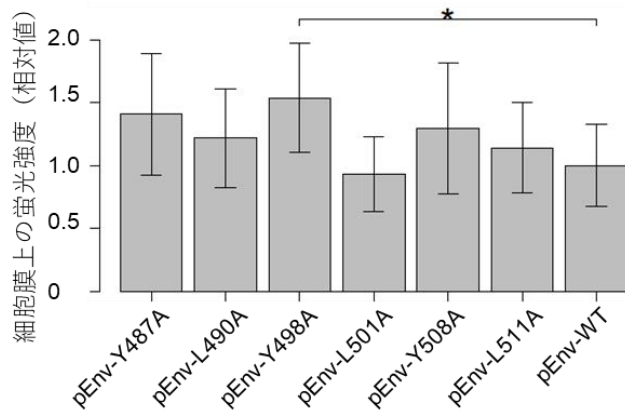
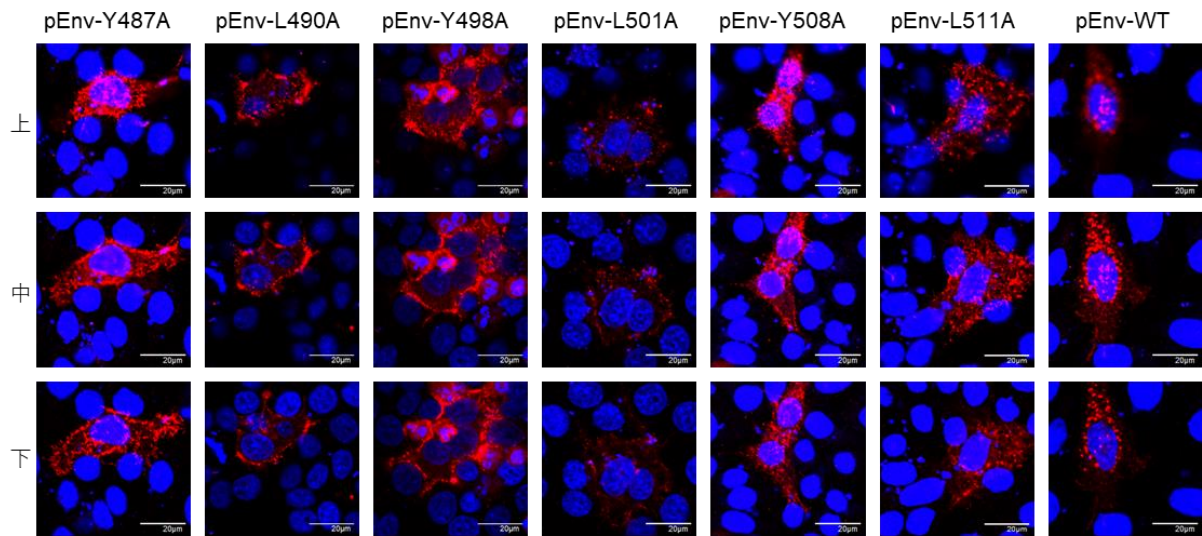


図 22 Z-stack 解析による Env 発現ベクター導入細胞における透過処理条件下での細胞膜上の Env の発現の解析

Env 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出した。各 gp51 発現細胞の Z-stack 画像 2 µm 間隔で撮影し (上図)、ラインプロファイルにより、蛍光強度マップを作製し、細胞膜上の蛍光を測定した。10 個の細胞から蛍光強度を測定し、pEnv-WT の平均蛍光強度で標準化し、細胞膜上の蛍光強度の平均とエラーバーをグラフに示した (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pEnv-WT と比較した。* : $p < 0.05$ 。

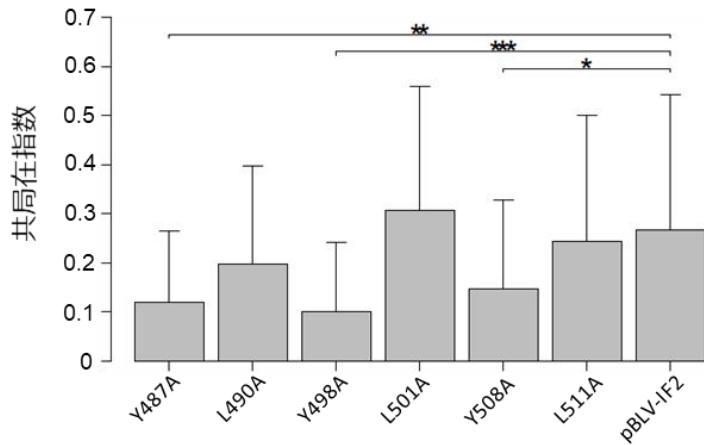
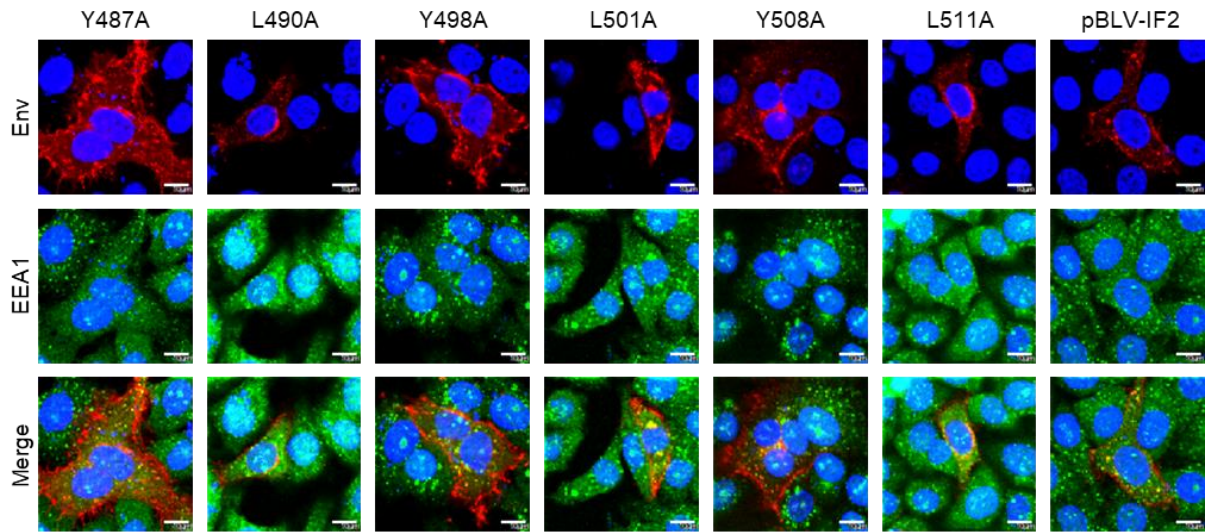


図 23 Env と EEA1 の共局在の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出し、初期エンドソームは抗 EEA1 抗体を用いて検出した (上図)。Villalta のアルゴリズムにより、EEA1 と共局在している Env の割合 (共局在指数) を測定した。共局在指数は各 50 個以上の細胞から測定し、各細胞における共局在指数の平均とエラーバーをグラフに示した (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。* : 0.05、** : 0.01、*** : 0.001。

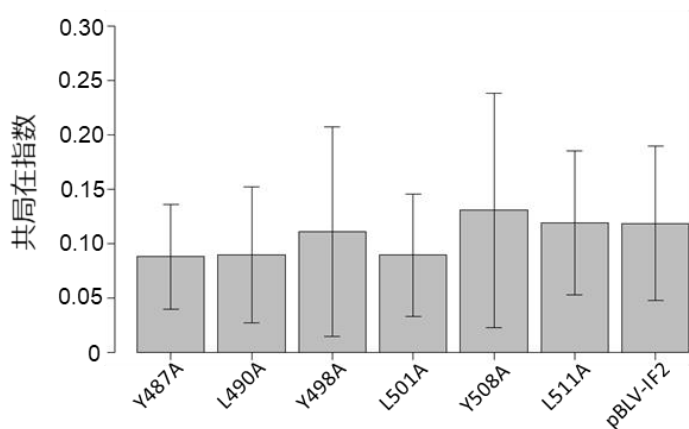
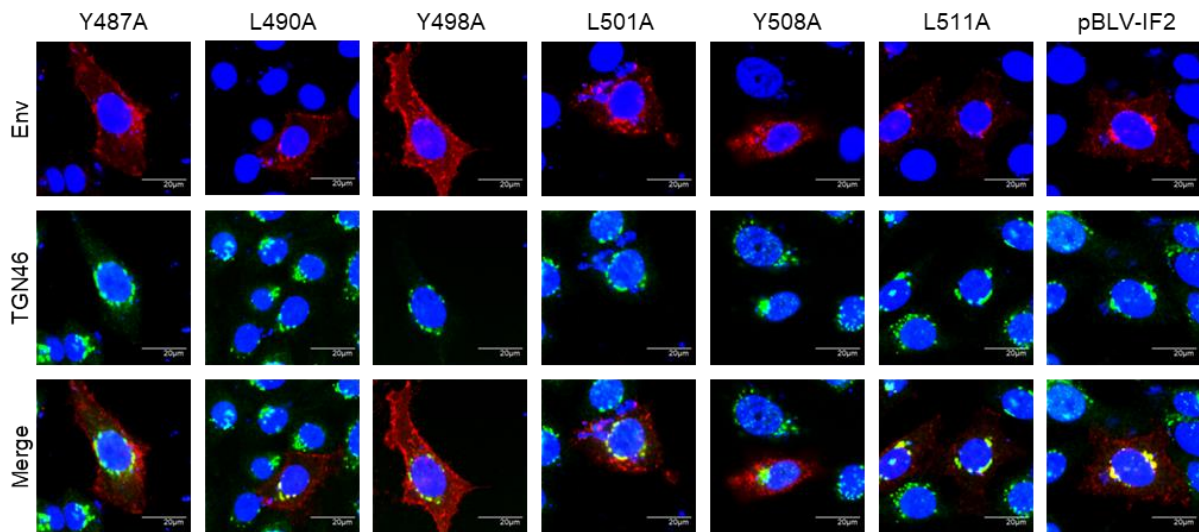


図 24 Env と TGN46 の共局在の解析

感染性分子クローンを HeLa 細胞に導入し、72 時間後に固定し、TritonX-100 で透過処理を行った。Env は抗 gp51 抗体を用いて検出し、トランスゴルジネットワークは抗 TGN46 抗体を用いて検出した (上図)。Villalta のアルゴリズムにより、EEA1 と共局在している Env の割合 (共局在指数) を測定した。各感染性分子クローンにおけるデータは各 50 個以上の細胞から収集し、各細胞における共局在指数の平均とエラーバーを表している (下図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。

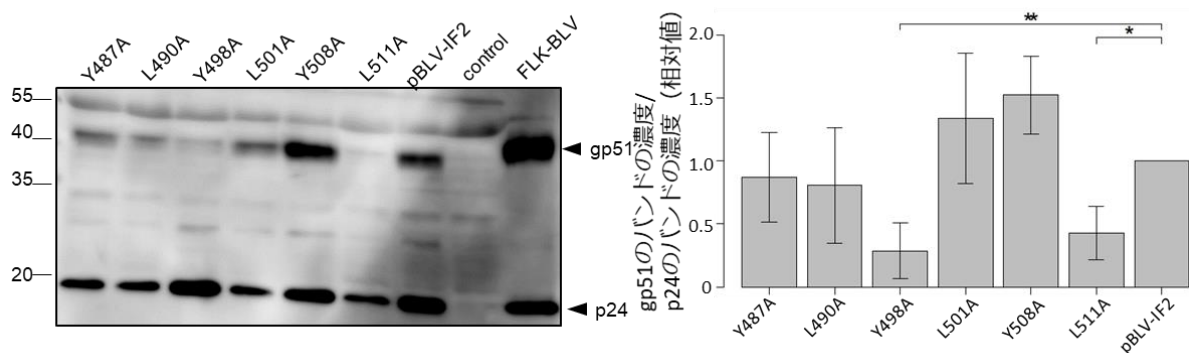


図 25 ウイルス粒子中への Env の取り込みの解析

感染性分子クローンを導入した COS-1 細胞の培養上清からウイルス粒子を回収し、抗 gp51 抗体、抗 p24 抗体を用いて、Western blot を行い、ウイルス粒子中の gp51 と p24 を検出した (左図)。矢印は gp51 および EGFP のバンドの位置を示している。ImageJ を用いて、gp51 と p24 のバンドの濃度を測定し、gp51 の測定量を p24 の測定量で補正した。独立した 6 回の実験を行い、gp51 のバンドの濃度を p24 のバンドの濃度で割った値相対値の平均とエラーバーをグラフに示した (右図)。それぞれの値は Dunnett テストによって、pBLV-IF2 と比較した。* : $p < 0.05$ 、** : 0.01 。

表2 感染性分子クローン、Env発現ベクターにおけるYXXL変異によるシンシウム形成、Envの局在、Envのウイルス粒子への取り込みの変化

YXXL 配列	変異	シンシウム形成能 ¹	Envの局在		ウイルス粒子への取り込み ⁴			
			細胞全体	初期エンドソーム ²	トランスゴルジネットワーク ³	Envの取り込み		
感染性分子クローン	1 st YXXL	Y487A	+++	細胞膜	-	+	+	
		L490A	+	細胞質	+	+	+	
		Y498A	+++	細胞膜	-	+	-	
	2 nd YXXL	L501A	+	細胞質	+	+	+	
		Y508A	+++	細胞膜	-	+	+	
		L511A	+	細胞質	+	+	-	
	Wild Type	+	細胞質	+	+	+		
	Env発現ベクター	1 st YXXL	Y487A	++	細胞膜			
			L490A	+	細胞質			
Y498A			++	細胞膜				
2 nd YXXL		L501A	+	細胞質				
		Y508A	+	細胞膜				
		L511A	+	細胞質				
Wild Type		+	細胞質					

¹Wild typeと比較したシンシウム形成能の変化：+、Wild typeと同等；++、p<0.05；+++、p<0.01；++++、p<0.001

²Wild typeと比較した初期エンドソーム中のEnv量：+、Wild typeと同等；-、Wild typeよりも減少

³Wild typeと比較したトランスゴルジネットワーク中のEnv量：+、Wild typeと同等

⁴Wild typeと比較したEnvのウイルス粒子への取り込み量：+、Wild typeと同等；-、Wild typeよりも減少

484 1st YXXL 2nd YXXL 3rd YXXL 515
 DSD **YQAL** LPSAPEI **YSHL** SPVKPD **YINL** RPCP

YXXL 配列	機能
1st YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の抑制 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御
2nd YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の抑制 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御 ③ チロシンによるEnvのウイルス粒子への取り込みの制御 ④ チロシンによる膜局在の制御
3rd YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の抑制 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御 ③ ロイシンによるEnvのウイルス粒子への取り込みの制御

図 26 本研究において明らかとなった YXXL 配列のそれぞれの機能

BLV の gp30 の三つの YXXL 配列を含む C'末端の配列と、各 YXXL 配列の機能を示している。

1st YXXL 2nd YXXL 3rd YXXL
 484 DSD **YQAL** LPSAPEI **YSHL** SPVKPD **YINL** RPCP 515

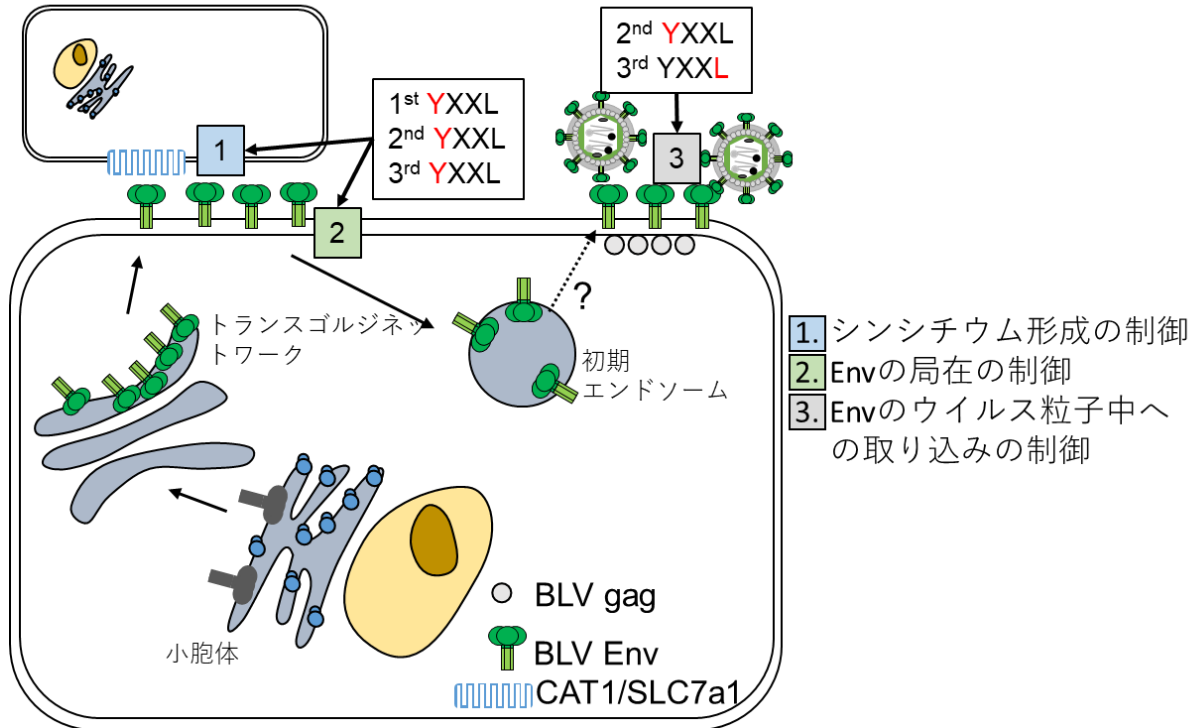


図 27 本研究において明らかとなった各 YXXL 配列の機能と模式図

BLV の gp30 の三つの YXXL 配列を含む C'末端の配列と、各 YXXL 配列の機能の模式図を示している。