

### 3. RD-114 物語：ネコの移動の歴史を探るレトロウイルス

宮 沢 孝 幸<sup>1)</sup>、下 出 紗 弓<sup>2)</sup>、中 川 草<sup>3)</sup>

1) 京都大学ウイルス研究所・進化ウイルス研究領域

2) 神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科

3) 東海大学医学部・基礎医学系分子生命科学

ネコ (*Felis catus*) の内在性レトロウイルスである RD-114 ウイルスは、1971 年にヒト横紋筋肉腫細胞から発見されたガンマレトロウイルスである。RD-114 ウイルスは、およそ数百万年前に地中海沿岸でヒヒ属の祖先動物の内在性レトロウイルスが、ネコ属の祖先動物に感染し内在化、その後、数百万年もの間、感染性の内在性レトロウイルスとして維持されてきたと考えられてきた。RD-114 関連ウイルスのネコゲノムの座位を精査した結果、感染性の RD-114 ウイルスをネコはもっておらず、感染性をもたない内在性レトロウイルス (RDRS と命名) の組換えによって感染性が復活した RD-114 ウイルスが生じることがわかった。さらに、感染性が復活しうるタイプの RDRS (新しい RDRS と命名) は、ネコが家畜化されたおよそ1万年前以降にネコのゲノムに侵入したと考えられた。新しい RDRS の保有率は、欧米とアジアのネコの間で大きく異なり、染色体上の位置もネコの品種によって異なった。本研究によって、これまで不明であった家畜化後のイエネコの移動経路を明らかにするための指標として、RDRS が有用であることがわかった。

#### RD-114 ウイルス発見の経緯

哺乳類のゲノムの約 10% はレトロウイルス様の配列が占めている<sup>9, 11, 18, 28)</sup>。この配列は内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus: ERV) と呼ばれている。一方、個体から個体へと感染し伝播していく通常のレトロウイルスは、ERV と区別して「外来性」レトロウイルスと呼んでいる。外来性レトロウイルスは通常「体細胞」に感染し、宿主のゲノムにプロウイルス DNA として組み込まれる。しかし、一部のレトロウイルスはごくまれに「生殖細胞」に感染すると考えられる。レトロウイルスが感染した生殖細胞由来の受精卵が個体として発生すると、レトロウイルス由来の遺伝子配列は、宿主ゲノムの一部として子孫へと「遺伝」によって受け継がれ ERV となると考えられている。

ネコにも様々な ERV が存在するが、RD-114 ウイルスは、1970 年代に現役だった年配のレトロウイルス研究者にとっては、非常に懐かしく思われることだろう。このウイルスは、1971 年にヒトで初めて見つかったレトロウイルスとして報告された<sup>21)</sup>、記念すべきウイルスなのである。ちなみに前年の 1970 年は逆転写酵素が発見された年でもある<sup>1, 45)</sup>。当時はガンが発生するメカニズムはわかっていなかったが、動物由来のレトロウイルスの中に腫瘍を引き起こすウイルス (ネコ肉腫ウイルスやラウス肉腫ウイルスなど) が存在することが知られていた。そのため、ヒトのガン発生メカニズムを探るべく、多くのウイルス研究者が腫瘍を誘導するヒトのレトロウイルスを必死で探索していた。RD-114 ウイルスはヒトの横紋筋肉腫由来の細胞 (RD 細胞) で見つかったガンマレトロウイルス (当時は C 型レトロウイルスと呼称) であり (図 1)、ヒトにガンを起こすウイルスと目された。当時のアメリカ大統領であるニクソンは RD-114 ウイルスの発見をガン解明に結びつく画期的発見とし、1971 年 12 月 26 日に、アポロ計画に続くアメリカの国家的プロジェクトとして National Cancer Act に署名し、大型予算の執行を命令した。

ヒトレトロウイルスの発見で世界が沸き返ったのであるが、その 1 年後には、RD-114 ウイルスはネコがもともと

#### 連絡先

〒 606-8507

京都市左京区聖護院川原町 53

京都大学ウイルス研究所進化ウイルス研究領域

TEL&FAX: 075-751-4814

E-mail: tmiyazaw@virus.kyoto-u.ac.jp

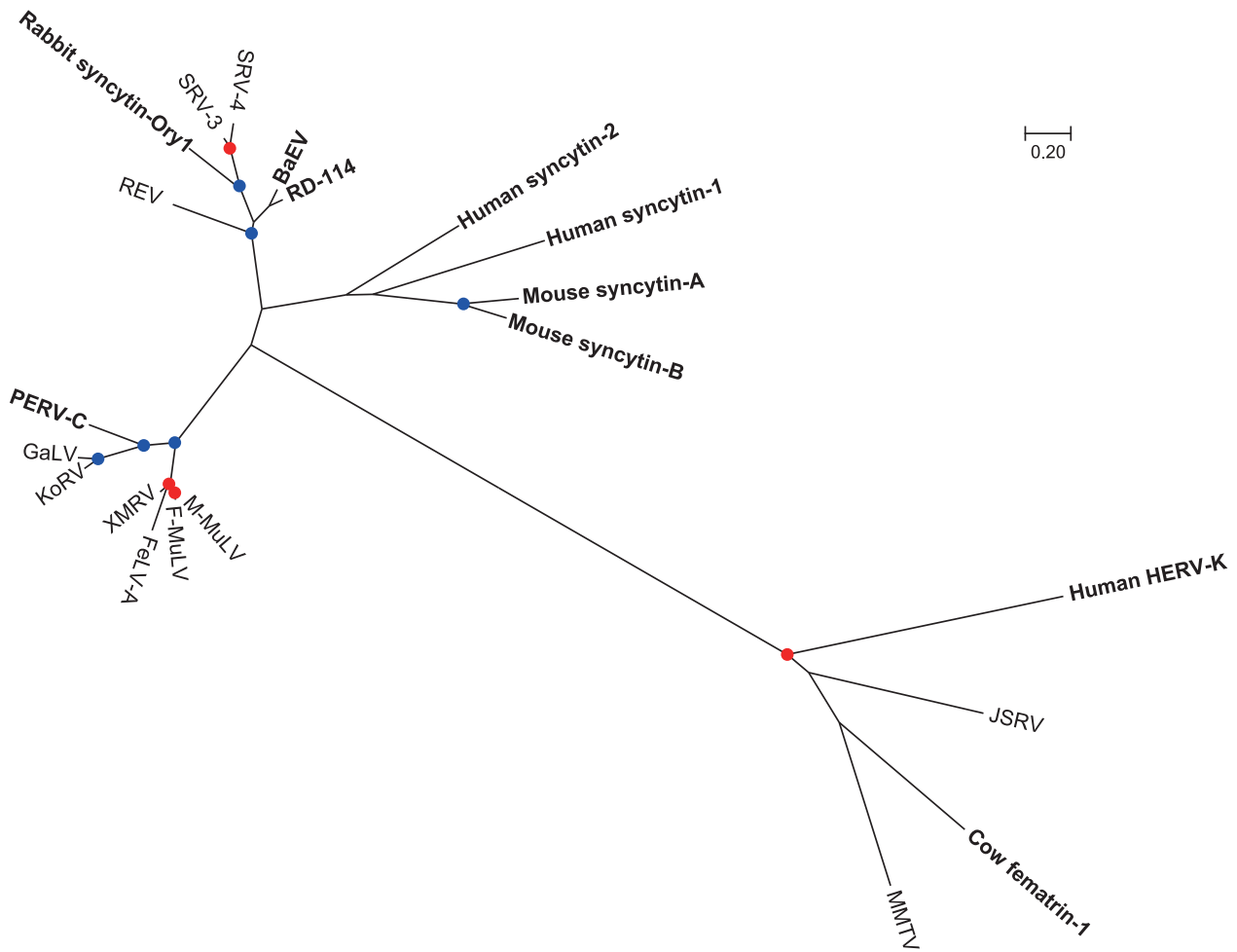


図1 レトロウイルスの系統樹

レトロウイルスの外膜タンパク質 (Env) 膜貫通 (TM) 領域のアミノ酸配列を用いて推定したレトロウイルスの系統樹。太字は ERV 由来の配列を表す。赤色と青色の丸はそれぞれブートストラップ値が 95 以上、または 80 以上で支持された分岐点を表す。

BaEV: ヒビ内在性レトロウイルス; F-MuLV: フレンドマウス白血病ウイルス; GaLV: ギボン白血病ウイルス; HERV-K: ヒト内在性レトロウイルス K; JSRV: ヤーグジークテヒツジレトロウイルス; KoRV: コアラレトロウイルス; MMTV: マウス乳がんウイルス; M-MuLV: モロニーマウス白血病ウイルス; PERV-C: ブタ内在性レトロウイルスサブグループ C; REV: 細網内皮症ウイルス; SRV-3: サルレトロウイルス 3 型; SRV-4: サルレトロウイルス 4 型; XMRV: 異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス。

もっている内在性レトロウイルスであることが判明し<sup>2, 8, 10, 31, 32, 33</sup>、発見の喜びは一時の糠喜びに終わった。そして本当のヒトレトロウイルスの発見は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) [またはヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (ATLV)] の発見 (1981 年) まで待つことになった<sup>15, 16</sup>。ヒトレトロウイルスと誤認された RD-114 ウイルスは、RNA Tumor Virus (逆転写酵素が発見される前のレトロウイルスの名前) をもじって、RNA Rumor Virus (「ヒトレトロウイルスとして噂されたレトロウイルス」という意味)<sup>49</sup> の第一号という汚名を着せられることになった。

### RD-114 ウイルスの由来

なぜヒトの横紋筋肉腫細胞にネコの ERV が感染していたのだろうか? その答えは明らかになっている。当時は、まだ実験用のヌードマウスは存在せず、ヒトの腫瘍は動物の脳に移植され維持されていたのである。そしてネコの脳に移植されて大きくなった横紋筋肉腫は、再び試験管内で培養され、そこに C 型レトロウイルスが見つかったのである。当時すでに、マウスには ERV が存在することは明らかになっていたが、異種動物に感染する “Xenotropic” の ERV はみつかっていなかった。そのため、ネコの脳に

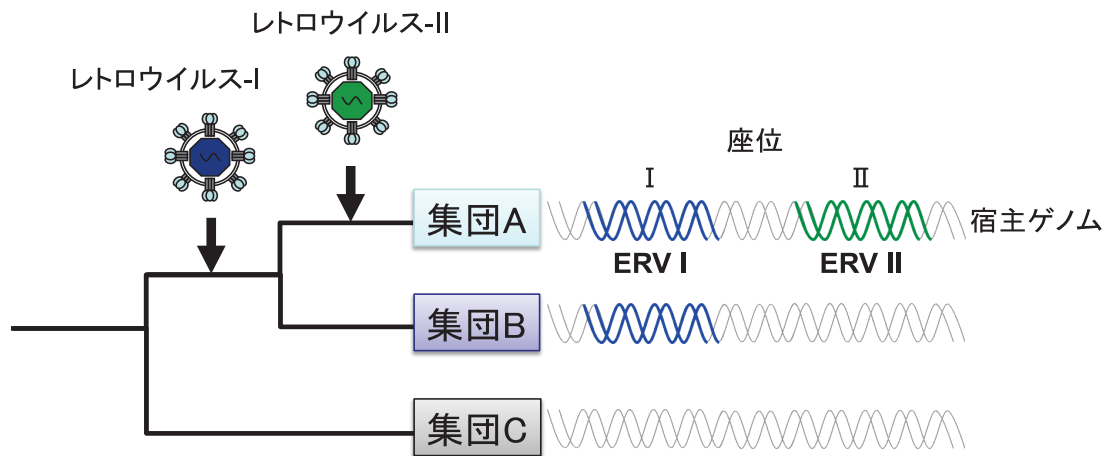


図2 ERV を利用した系統関係の解析

外来性レトロウイルスとしてレトロウイルス-Iとレトロウイルス-IIを仮に設定し、それに対応する内在性レトロウイルスをERV IとERV IIとした。

移植したヒトの横紋筋肉腫にネコの ERV が感染することは想定しておらず、ヒト横紋筋肉腫に感染したネコの ERV をヒトの外来性レトロウイルスであると誤認したのであった。

このように、RD-114 ウイルスはヒトレトロウイルス第一号にはならなかったのであるが、当時の研究で興味深い結果が得られた。そのころは、まだ塩基配列の決定法もサザンブロットハイブリダイゼーション法もなかったが、その代わりにリキッドハイブリダイゼーション法で核酸配列の類似度を推定する手法があった。リキッドハイブリダイゼーション法で、様々な動物がもっている RD-114 ウイルスに類似の ERV 配列を探索すると、ネコ属 [イエネコ (*Felis catus*), ジャングルキャット (*Felis chaus*), ヨーロッパヤマネコ (*Felis sylvestris*), スナネコ (*Felis margarita*)] のゲノムに RD-114 ウイルス様の ERV 配列が存在した<sup>5)</sup>。このことから、ネコ属の祖先動物の生殖細胞に RD-114 ウイルスの祖先ウイルスが感染し、ERV となったと考えられた。これは特段珍しいことではないが、ことはそれだけではなかった。なんと、ヒヒ属の動物 [キロヒヒ (*Papio cynocephalus*), マントヒヒ (*Papio hamadryas*), ギニアヒヒ (*Papio papio*)] も RD-114 ウイルス様の配列をもっていて<sup>5)</sup>、これらの動物の細胞から感染性の ERV (baboon endogenous retrovirus : BaEV) が産生されることがわかったのである (図1)<sup>4, 19, 47, 51)</sup>。これらの結果から、およそ数百万年前から 1,000 万年前に、地中海沿岸でネコ属とともに棲息していたとされるヒヒ属の祖先動物が感染性の ERV をもっていて、それが当時のネコ属の祖先動物に感染、RD-114 ウイルスとなったと推測された<sup>4, 13, 50)</sup>。また、ネコの細胞 (初代培養細胞) を薬剤 (ヨードプロモデオキシウリジン) で ERV の誘導を行うと、感染性の RD-114 ウイルスが飛び出してくること、その現象は調べた限りすべての個体 (ネコ) 由来の細

胞で起こりうることから、RD-114 ウイルスは感染性を保持したまま *Felis* 属のネコのゲノムに組み込まれ、綿々と維持されていると考えられた<sup>2,3)</sup>。

#### RD-114 ウイルスの生ワクチンへの混入

RD-114 ウイルスがヒトレトロウイルスではないことがわかってからは、RD-114 ウイルスの研究は下火になり、ほとんど顧みられることはなかった。ところが意外なところから RD-114 ウイルスは再び注目されることになった。2007 年、我々は生物学的製剤の安全性を調べている過程で、感染性の RD-114 ウイルスが伴侶動物用の弱毒生ワクチンに混入していることを見いだしたのである<sup>24, 25)</sup>。これまでも ERV 由来の RNA がワクチンに混入していることは報告されていたが、感染性のある ERV がワクチンに混入していることを確認したのは初めてであった。日本やイギリスで市販されている生ワクチンを調べると、RD-114 ウイルスの混入は、ネコのワクチンのみならず、イヌのワクチンにも混入していた<sup>53, 54, 55)</sup>。特に一部のイヌの生ワクチンには、1 ショットあたり  $5 \times 10^8$  RNA コピー (感染価としては  $10^4$  TCID<sub>50</sub>) ものウイルスが混入していた。RD-114 ウイルスは Xenotropic (ネコの細胞には感染せず、異種由来の細胞にしか感染しない) と発見当初に分類され、ネコのワクチンに混入していても接種動物であるネコには感染しないため、問題ないと考えられた。ところが、我々が詳しく調べたところ、RD-114 ウイルスは多くのネコの細胞にも感染し良く増殖すること [すなわち RD-114 ウイルスは Xenotropic ではなく、Polytropic (多指向性) であること] がわかった<sup>23, 34, 43, 56)</sup>。さらに、RD-114 ウイルスは、ワクチン接種動物であるイヌの細胞でも良く増殖し<sup>56)</sup>、感染実験により RD-114 ウイルスはイヌにも感染した。RD-114 ウイルスが混入したワクチンが

すぐに問題を引き起こすことは考えにくかったが、RD-114 ウイルスフリーのワクチンの製造が求められた。

### RD-114 ウイルスの生成機構と XMRV との類似性

RD-114 ウイルスのワクチンへの混入が明らかになって、我々はゲノム編集技術を応用して、RD-114 ウイルスを産生しえない細胞を樹立し、RD-114 ウイルスフリーのワクチンを開発することを目指した。これまでの研究で、RD-114 ウイルスはネコのゲノムに数十コピー存在するが、ウイルスを産生する RD-114 ウイルスゲノムの座位は1つであると考えられてきた。実際、由来が異なる RD-114 ウイルスの塩基配列を決定しても、LTR 配列を除いてほぼ同一であり、その説を裏付けた<sup>44)</sup>。しかしながら、過去に少なくとも3つの研究グループが感染性をもつ RD-114 ウイルスの染色体上の正確な位置を明らかにしようと試みていたが、どのグループも特定には至っていなかった<sup>37, 38, 39, 48)</sup>。また、ネコのゲノムデータベースには、感染性の RD-114 ウイルスと塩基配列が一致するプロウイルスを見つけることはできなかった。我々は数十もの RD-114 ウイルス関連配列をノックアウトすることは不可能であると考え、感染性の RD-114 ウイルスの座位のみをノックアウトすることを目指し、感染性 RD-114 ウイルスをコードする染色体の座位を特定することとした。

感染性 RD-114 ウイルスの座位を探索している過程で我々は興味深い事実を見いだした。従来の説とは異なり、感染性のある RD-114 ウイルスの配列はイエネコのゲノムにもともと存在せず、感染性の RD-114 ウイルスは、不完全な RD-114 ウイルス関連配列 (RD-114 virus-related sequence, RDRS) の組換えによって生じていたのである<sup>42)</sup>。ネコの細胞で ERV の発現を誘導すると RD-114 ウイルスが産生されるのは、宿主のゲノムの感染性 RD-114 ウイルスをコードしているプロウイルスから発現されるのではなく、不完全な RDRS の転写産物がウイルス粒子にコパッケージングされ、それが次の細胞に感染した際、逆転写の過程で組換えを起こし、感染性が復活した RD-114 ウイルスができるといったことがわかったのである。

この状況は、2009年から2012年に欧米を中心に世間を大きく騒がせた、慢性疲労症候群の原因ウイルス xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) の事例と似ている<sup>12)</sup>。XMRV は2006年にヒトの前立腺ガンの細胞で見つかったのであるが<sup>46)</sup>、2009年の *Science* 誌に、XMRV がヒトの慢性疲労症候群と関連があると公表され衝撃が走った<sup>20)</sup>。しかし後にこれは、慢性疲労症候群患者の疫学調査の際に検査に用いた RT-PCR のキットに、XMRV (もしくはそれに極めて類似したマウスの ERV) の RNA がわずかに混入していたことにより誤った結果が導かれたことによるものであることが、我々の研究で明らかになった<sup>16, 40)</sup>。また、ヒト前立腺ガンの株化細

胞に見つかった XMRV であるが、これも過去にヒトの前立腺ガンをマウスに移植した際、マウスの非感染性の ERV が組換えを起こし、複製可能なウイルスとなってヒトの前立腺がん細胞に感染、前立腺ガンを起こすウイルスとして誤認されたと考えられた<sup>36)</sup>。RT-PCR キットにマウスの ERV の RNA が混入した経緯についてもほぼ明らかになっている。PCR の非特異反応を減らすためにホットスタート法がそのキットでは用いられており、その試薬には DNA ポリメラーゼに対するモノクローナル抗体が添加されていた。モノクローナル抗体は、マウスのハイブリドーマの培養上清から精製しているため、その際にマウスの ERV 由来の RNA が混入したと考えられた。XMRV と RD-114 ウイルスは、もともとは何の関係もないのであるが、発見の経緯 (コンタミネーション)、ヒトレトロウイルスとしての誤認、生成機構 (異種動物体内でのリコンビネーション) が酷似しており興味深い。

### ネコの旅路を探るツールとしての RD-114 ウイルス

これまで、RD-114 ウイルスは数百万年前から1,000万年前にヒビ属の祖先動物からネコ属に感染し、感染性を保持したままネコのゲノムに組み込まれていると考えられてきた。しかしながら、RD-114 ウイルス関連配列を精査した結果、それが誤りであることがわかった<sup>42)</sup>。ネコはもともと感染性の RD-114 ウイルスをゲノムにもっておらず、組換えによって RD-114 ウイルスが生じるのであるが、組換えによって感染性を復活させる可能性がある RDRS は、欧米のネコの多くはもっているものの、アジアのネコではほとんど見られなかった。すなわち、感染性を復活させる RDRS は、ネコが家畜化された一万年以降にネコのゲノムに組み込まれたと考えられた。さらに、その RDRS (ここでは新しい RDRS とする) のゲノム上の座位が、イエネコの中で異なっていたのである (「RDRS をマーカーとしたネコの移動の解析」で詳しく記す)。欧米のグループが1970年代に調べたとき、すべてのネコ由来細胞で RD-114 ウイルスが薬剤で誘導されることを見いだしていたが、それは新しい RDRS を保有する欧米のネコを実験に用いていたからと考えられた。

この発見を受け、我々は RDRS がネコの移動歴を調べる上で役に立つのではないかと考えた。すなわち、新しいタイプの RDRS が1万年以降にネコゲノムに侵入し、入り込んだゲノム上の位置が異なるとすれば、RDRS の保有状況と位置を調べることで、ネコがどのように世界各地へと生息域を拡げ、品種を増やしてきたのかが解明できるのではないかと考えたのである<sup>42)</sup>。

ERV によって系統関係を調べる原理は以下の通りである。ある個体で生殖細胞ゲノムの特定の部位にレトロウイルスが組み込まれると、子孫ゲノムの同じ位置 (座位) にレトロウイルスのゲノムが ERV として組み込まれたまま



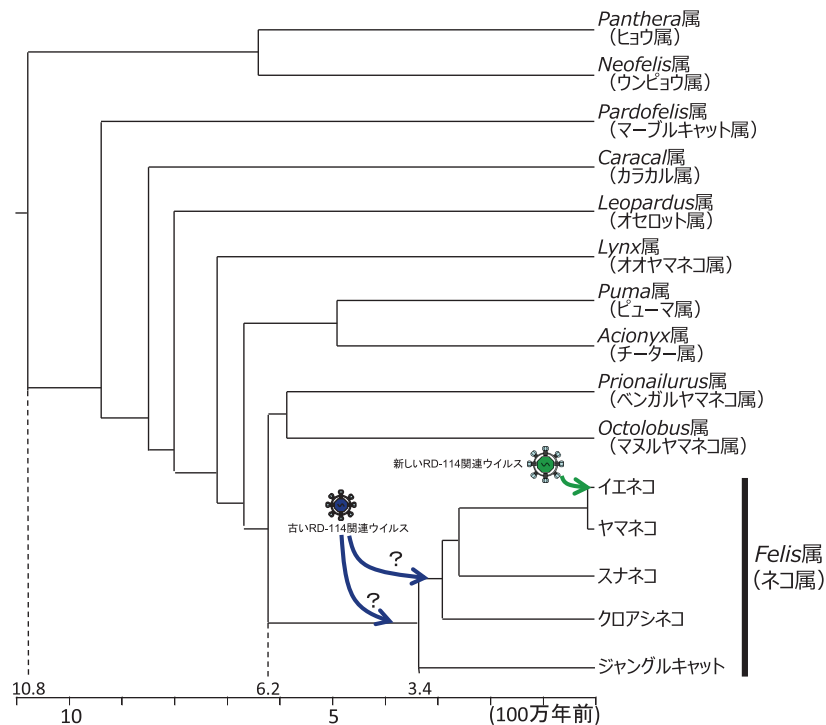


図3 RD-114 関連ウイルスの侵入時期

古い RD-114 関連ウイルスは、数百万年前に Felis 属に侵入した。一方、新しい RD-114 関連ウイルスはヤマネコとイエネコが分岐した後に侵入したと考えられる。

になり、メンデルの法則にしたがって子孫に伝えられる。この特性を利用し、ERV の分布を個体間・集団間で比較することでそれらの共通祖先を知ることができる (図1)。例えば、A、B、C という3つの集団の系統関係を調べたとき、座位 I で集団 A、集団 B に ERV が挿入されていて、集団 C には ERV が挿入されていなかったとする。この場合、集団 A と B は共通祖先をもち、C が最も古くに分岐したと推測できる。座位 I の ERV は、集団 A、B が共通祖先だった頃 (A と B が分岐する前) にその染色体領域に挿入されたと考えられる。さらに別の座位 II において、A に ERV が挿入されていて B、C には ERV が挿入されていなかったとする。この場合、A と B が分岐した後、集団 A にだけ座位 II の ERV が獲得されたことが推測できる。これらの結果から、まず集団 C が分岐、その後、集団 A と B の共通祖先の座位 I に ERV が組み込まれ、さらに集団 A と B が分岐したのちに集団 A の座位 II に ERV が組み込まれたという一連の流れが明らかになる。このように、座位 I と II の ERV の有無を調べることで集団間の系統関係を推測することができる。原理的には極めてシンプルであるが、系統関係を調べる上では塩基配列の変異に基づく系統関係の推定よりも確実である。ただし、ERV は数百万年前から数千万年前に組み込まれたものが多く、同種内の系統関係を調べるには不適であると考えられてきた。

### イエネコの起源とその移動の歴史

イエネコは野生の小型のヤマネコが、およそ1万年前に中東で農耕が発達した際に家畜化されたと考えられている。ネコは穀物を荒らすネズミ類の捕獲を目的として家畜化されたが、次第に愛玩動物としての側面も重視され、様々な品種がつけられた。中東で家畜化されたネコのうち、ある集団は貿易商人やバイキングたちとヨーロッパを移動し、大航海時代には新大陸へと上陸していった。一方、あるネコたちは仏教の経典をネズミから守るために、仏教徒とともにシルクロードを移動し、独自の形質を獲得したと考えられている。

イエネコの起源については、イエネコと様々な種類のヤマネコのミトコンドリア DNA の配列を比較した研究により、中東に生息するリビアヤマネコ (*Felis silvestris lybica*) であることがわかっている<sup>6)</sup>。考古学的な証拠としては、地中海のキプロス島で約1万年前の墓に成人とイエネコがともに埋葬された遺跡が見つかり、当時すでにネコは家畜化されていたと考えられている。ネコは現在世界各地に生息し、約100種類もの品種が存在するが、様々なイエネコやヤマネコ間で交雑が繰り返されてきたため、各品種の起源には不明な点が多い。

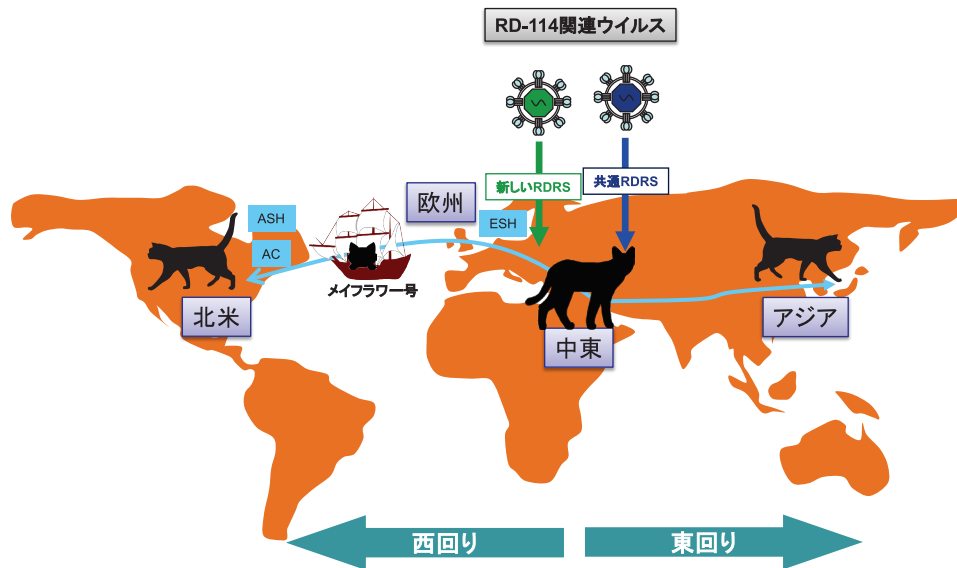


図4 ネコの移動とRDRSの獲得

古いRD-114関連ウイルスはネコが家畜される前にネコのゲノムに侵入した。新しいRD-114関連ウイルスは、ネコが家畜された後にネコのゲノムに侵入した。ゲノムに侵入したRD-114関連ウイルスのゲノム上での位置を指標にして、ネコの移動経路を知ることができる。

RDRS：RD-114ウイルス関連配列；ESH：ヨーロッパンショートヘア；ASH：アメリカンショートヘア；AC：アメリカンカール

#### RDRSをマーカーとしたネコの移動の解析

我々はまず、イエネコの血液および細胞のゲノムDNA配列を比較し、すべてのイエネコがC2染色体にRDRSを保有していることを明らかにし、これをRDRS C2aと名付けた(C2aとはC2染色体の1つめのRDRSという意味)。さらに、イエネコ以外のネコ科動物のゲノムDNAの配列を調査したところ、トラ、ユキヒョウ、サーバルキャット、ベンガルヤマネコではRDRS C2aを保持していなかった<sup>42)</sup>。このことから、RDRS C2aのゲノムへの侵入時期はベンガルヤマネコとネコ属(Felis属)が分岐した620万年前以降であることがわかった(図3)。その後の解析により、このRDRS C2aは、数百万年前にヒビからFelis属の祖先動物に感染したと従来考えられてきたERV配列(古いRD-114関連ウイルス由来)であると考えられた。

次に様々な品種・地域のイエネコを調べたところ、RDRS C2aとは別の染色体上にRDRSを保有している個体が存在することがわかった。RDRS C2a以外のRDRSはすべてのイエネコが保持しているわけではないため、新しいRDRS(新しいRD-114関連ウイルス由来)といえる。また、塩基配列解析により、この新しいRDRSこそが感染性をもつRD-114ウイルスの元(組換えによって生じた感染性RD-114ウイルスの元の配列)になったと考えられた。極めて興味深いことに、この新しいRDRSを保有し

ている個体は欧米では約半数であったのに対し、アジアではわずかに約4%のみだった(表1)<sup>42)</sup>。このことから、中東で家畜化されたイエネコのうち欧米へと向かった(西回り)一部の集団に新しいRDRSが侵入したと推察された(図4)。

新しいRDRSの染色体上の位置を調べると、さらに興味深いことがわかった。ヨーロッパンショートヘア、アメリカンショートヘア、アメリカンカールは共通してE3染色体にRDRSを保有していたのである<sup>42)</sup>。この結果は、従来の説、すなわち「ヨーロッパンショートヘアの元となったスカンディナ비아半島の土着ネコはイギリスへと渡った後、さらにメイフラワー号に乗ってアメリカに上陸し、アメリカンショートヘアやアメリカンカールがつくられた」と一致した<sup>22, 27)</sup>。このことから新しいRDRSが各品種の起源を知る上で有用なマーカーとして使用できることが裏付けられた(図4)。

#### おわりに

私(宮沢)はグラスゴー大学に留学していた1994年に、RD-114ウイルスがネコの細胞にも感染しうることを知り、以来、RD-114ウイルスが数百万年前にネコ属に侵入し、感染性を保持していることを不思議に思っていた。宿主に再感染して腫瘍を引き起こす可能性があるERVを数百万年も生体が保持する理由を知りたいと思っていた。いまま

表 1 ネコの各品種における新しい RDRS の保有率

地域	品種	新しい RDRS の保有率 (%)
北米	アメリカンカール	2 / 4 (50.0)
	アメリカンショートヘア	5 / 6 (83.3)
	ベンガル	1 / 2 (50.0)
	エキゾチック	2 / 4 (50)
	メインクーン	0 / 2 (0)
	計	10 / 18 (55.6)
欧州	ブリティッシュショートヘア	0 / 1 (0)
	ヨーロッパアンショートヘア	2 / 2 (100)
	マンチカン	0 / 1 (0)
	ロシアンブルー	2 / 6 (33.3)
	計	4 / 10 (40.0)
北米 × 欧州の 交雑種	ヒマラヤン	0 / 1 (0)
	ラグドール	0 / 3 (0)
	スコティッシュフォールド	12 / 17 (70.6)
	ミックス	0 / 4 (0)
	計	12 / 25 (48.0)
アジア	シンガプーラ	0 / 1 (0)
	トンキニーズ	0 / 1 (0)
	三毛猫	0 / 1 (0)
	日本雑種	3 / 77 (3.9)
	計	3 / 80 (3.8)
中東	アビシニアン	1 / 6 (16.7)
	ベルシャ	2 / 2 (100)
	計	3 / 8 (37.5)
総計		42 / 141 (29.8)

での研究の結果は教科書に書いてある通説を覆すものであり、ネコは感染性の RD-114 ウイルスのプロウイルスを保持しておらず、組換えによって感染性を回復すること、RD-114 ウイルスとして感染性を復活しうる RDRS は比較的最近にネコのゲノムに入り込んだことがわかった。また本研究によって、これまで不明であった家畜化後のイエネコの移動経路を明らかにするための指標として、RDRS が有用であることがわかった。イエネコは品種ごとに見ただけでなく性格や遺伝性疾患も様々であるが、その違いをもたらしている要因はほとんど未解明である。RDRS はイエネコの起源・歴史を紐解くだけでなく品種ごとの特徴・違いの理解にも役立つと考えられる。また、外来性レトロウイルスが ERV となる過程、すなわち「レトロウイルスの内在化過程」は生物学的に大きな命題であるが、まったく明らかになっていない。RDRS の解析から、RD-114 関連ウイルスが比較的近年にネコに内在化したこともわかったことから、レトロウイルスの内在化過程と宿主に与えた影響を調べる上でも、RD-114 関連レトロウイルスの研究は大いに役立つと考えられる。

今回は触れなかったが、我々は ERV が哺乳類の進化、特に胎盤の形成過程における ERV の役割も研究している<sup>17, 29, 30</sup>。(我々の成果については、今川らの稿「胎盤とレトロウイルス」を参照されたい。) RD-114 ウイルスの *env* 領域はウサギの胎盤形成に使われているとされる Syncytin-Ory1 にも相同性は高い (図 1)<sup>7, 14</sup>。その一方で、RD-114 ウイルスの *env* 領域は、2001 年から 2012 年に京都大学霊長類研究所で流行した、ニホンザルに致死性の血小板減少症を誘導するサルレトロウイルス (simian retrovirus type 4 : SRV-4) と同相同性が高く (図 1)、同じ感染受容体 (アミノ酸トランスポーター ASCT2) を使用している<sup>35, 42, 52</sup>。RD-114 ウイルス関連ウイルスが、今でも病原性ウイルスとして振る舞っている一方で、一部の哺乳類の胎盤の形成にも関与していることは非常に興味深い。1970 年代に RNA Rumor Virus として汚名を着せられた RD-114 ウイルスであるが、RD-114 ウイルスがネコの旅路を解き明かすツールになるだけでなく、レトロウイルスの生態を解き明かす鍵となることを切に願っている。

## 利益相反開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

## 引用文献

- 1) Baltimore D.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211, 1970.
- 2) Baluda MA, Roy-Burman P.: Partial characterization of RD114 virus by DNA-RNA hybridization studies. *Nat. New Biol.* 244:59-62, 1973.
- 3) Benveniste RE, Heinemann R, Wilson GL, Callahan R, Todaro GJ.: Detection of baboon type C viral sequences in various primate tissues by molecular hybridization. *J. Virol.* 14:56-67, 1974.
- 4) Benveniste RE, Lieber MM, Livingston DM, Sherr CJ, Todaro GJ, Kalter SS.: Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta. *Nature* 248:17-20, 1974.
- 5) Benveniste RE, Todaro GJ.: Evolution of C-type viral genes: inheritance of exogenously acquired viral genes. *Nature* 252:456-459, 1974.
- 6) Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen E, Harley EH, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald DW.: The Near Eastern origin of cat domestication. *Science* 317:519-523, 2007.
- 7) Dupressoir A, Vernochet C, Harper F, Guégan J, Dessen P, Pierron G, Heidmann T.: A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:E1164-1173, 2011.
- 8) Fischinger PJ, Peebles PT, Nomura S, Haapala DK.: Isolation of RD-114-like oncornavirus from a cat cell line. *J. Virol.* 11:978-985, 1973.
- 9) Gifford R, Tristem M.: The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26:291-315, 2003.
- 10) Gillespie D, Gillespie S, Gallo RC, East JL, Dmochowski L.: Genetic origin of RD114 and other RNA tumour viruses assayed by molecular hybridization. *Nat. New Biol.* 244:51-54, 1973.
- 11) Griffiths DJ.: Endogenous retroviruses and the human genome sequence. *Gen. Biol.* 2:Reviews1017, 2001.
- 12) Hamaguchi I.: XMRV and transfusion. *Jpn. J. Transfusion Cell Ther.* 58:699-703, 2012. (in Japanese)
- 13) Hatanaka S (畑中正一): レトロウイルスと私, 海鳴社, 1983. (in Japanese)
- 14) Heidmann O, Vernochet C, Dupressoir A, Heidmann T. Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology* 6:107, 2009.
- 15) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I.: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6476-6480, 1981.
- 16) Hué S, Gray ER, Gall A, Katzourakis A, Tan CP, Houldcroft CJ, McLaren S, Pillay D, Futreal A, Garson JA, Pybus OG, Kellam P, Towers GJ.: Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology* 7:111, 2010.
- 17) Imakawa K, Nakagawa S, Miyazawa T.: Baton pass hypothesis: successive incorporation of unconserved endogenous retroviral genes for placentation during mammalian evolution. *Genes Cells* 20:771-788, 2015.
- 18) International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921, 2001.
- 19) Kalter SS, Helmke RJ, Panigel M, Heberling RL, Felsburg PJ, Axelrod LR.: Observations of apparent C-type particles in baboon (*Papio cynocephalus*) placentas. *Science* 179:1332-1333, 1973.
- 20) Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfof MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Silverman RH, Mikovits JA.: Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* 326:585-589, 2009.
- 21) McAllister RM, Nicolson M, Gardner MB, Rongey RW, Rasheed S, Sarma PS, Huebner RJ, Hatanaka M, Oroszlan S, Gilden RV, Kabigting A, Vernon L.: C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nat. New Biol.* 235:3-6, 1972.
- 22) Menotti-Raymond M, David VA, Pflueger SM, Lindblad-Toh K, Wade CM, O'Brien SJ, Johnson WE.: Patterns of molecular genetic variation among cat breeds. *Genomics* 91:1-11, 2008.
- 23) Miyaho RN, Nakagawa S, Hashimoto-Gotoh A, Nakaya Y, Shimode S, Sakaguchi S, Yoshikawa R, Takahashi MU, Miyazawa T.: Susceptibility of domestic animals to a pseudotype virus bearing RD-114 virus envelope protein. *Gene* 567:189-195, 2015.
- 24) Miyazawa T.: Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines. *Biologicals* 38:371-376, 2010.
- 25) Miyazawa T, Yoshikawa R, Golder M, Okada M, Stewart H, Palmarini M.: Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets. *J. Virol.* 84: 3690-3694, 2010.
- 26) Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y.: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294:770-771, 1981.
- 27) Moore A, Choron S, Choron H.: Planet Cat: A Catalog, Mariner Books, 2007.
- 28) Mouse Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:860-921, 2002.
- 29) Nakaya Y, Koshi K, Nakagawa S, Hashizume K, Miyazawa T.: Fematrin-1 is involved in fetomaternal cell-to-cell fusion in Bovinae placenta and has contributed to diversity of ruminant placentation. *J. Virol.* 87:10563-10572, 2013.
- 30) Nakaya Y, Miyazawa T.: The roles of syncytin-like pro-



- teins in ruminant placentation. *Viruses* 7:2928-2942, 2015.
- 31) Neiman PE.: Measurement of RD114 virus nucleotide sequences in feline cellular DNA. *Nat. New Biol.* 244:62-64, 1973.
  - 32) Okabe H, Gildeen RV, Hatanaka M.: Extensive homology of RD114 virus DNA with RNA of feline cell origin. *Nat. New Biol.* 244:54-56, 1973.
  - 33) Okabe H, Gildeen RV, Hatanaka M.: RD 114 virus-specific sequences in feline cellular RNA: detection and characterization. *J. Virol.* 12:984-994, 1973.
  - 34) Okada M, Yoshikawa R, Shojima T, Baba K, Miyazawa T.: Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines. *Virus Res.* 155:268-273, 2011.
  - 35) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H.: Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Sci. Rep.* 5:8850, 2015.
  - 36) Paprotka T, Delviks-Frankenberry KA, Cingöz O, Martinez A, Kung HJ, Tepper CG, Hu WS, Fivash MJ Jr, Coffin JM, Pathak VK.: Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science* 333:97-101, 2011.
  - 37) Reeves RH, O'Brien SJ.: Molecular genetic characterization of the RD-114 gene family of endogenous feline retroviral sequences. *J. Virol.* 52:164-71, 1984.
  - 38) Reeves RH, Nash WG, O'Brien SJ.: Genetic mapping of endogenous RD-114 retroviral sequences of domestic cats. *J. Virol.* 56: 303-306, 1985.
  - 39) Spodick DA, Soe LH, Roy-Burman P.: Genetic analysis of the feline RD-114 retrovirus-related endogenous elements. *Virus Res.* 1:543-555, 1984.
  - 40) Sato E, Furuta RA, Miyazawa T.: An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology* 7:110, 2010.
  - 41) Sato K, Kobayashi T, Misawa N, Yoshikawa R, Takeuchi JS, Miura T, Okamoto M, Yasunaga J, Matsuoka M, Ito M, Miyazawa T, Koyanagi Y.: Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. *Sci Rep.* 5:14040, 2015.
  - 42) Shimode S, Nakagawa S, Miyazawa T.: Multiple invasions of an infectious retrovirus in cat genomes. *Sci. Rep.* 5:8164, 2015.
  - 43) Shimode S, Nakaoka R, Shogen H, Miyazawa T.: Characterization of feline ASCT1 and ASCT2 as RD-114 virus receptor. *J. Gen. Virol.* 94:1608-1612, 2013.
  - 44) Shimode S, Yoshikawa R, Hoshino S, Nakaya Y, Sakaguchi S, Kobayashi T, Miyazawa T.: Sequence comparison of three infectious molecular clones of RD-114 virus. *Virus Genes* 45:393-397, 2012.
  - 45) Temin HM, Mizutani S.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213, 1970.
  - 46) Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL.: Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog.* 2:e25, 2006.
  - 47) van der Kuyl AC, Dekker JT, Goudsmit J.: Full-length proviruses of baboon endogenous virus (BaEV) and dispersed BaEV reverse transcriptase retroelements in the genome of baboon species. *J. Virol.* 69:5917-5924, 1995.
  - 48) van der Kuyl AC, Dekker JT, Goudsmit J.: Discovery of a new endogenous type C retrovirus (FcEV) in cats: evidence for RD-114 being an FcEV<sup>Gag-Pol</sup>/baboon endogenous virus BaEV<sup>Env</sup> recombinant. *J. Virol.* 73:7994-8002, 1999.
  - 49) Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ.: Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:157-196, 2008.
  - 50) Weiss RA.: The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3:67, 2006.
  - 51) Yoshikawa R, Miyaho RN, Hashimoto A, Abe M, Yasuda J, Miyazawa T.: Suppression of production of baboon endogenous virus by dominant negative mutants of cellular factors involved in multivesicular body sorting pathway. *Virus Res.* 196:128-134, 2015.
  - 52) Yoshikawa R, Okamoto M, Sakaguchi S, Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T.: Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques. *J. Virol.* 89:3965-3975, 2015.
  - 53) Yoshikawa R, Sato E, Igarashi T, Miyazawa T.: Characterization of RD-114 virus isolated from a commercial canine vaccine manufactured using CRFK cells. *J. Clin. Microbiol.* 48:3366-3369, 2010.
  - 54) Yoshikawa R, Sato E, Miyazawa T.: Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. *Biologicals* 39:33-37, 2011.
  - 55) Yoshikawa R, Shimode S, Sakaguchi S, Miyazawa T.: Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Arch. Virol.* 159:399-404, 2014.
  - 56) Yoshikawa R, Yasuda J, Kobayashi T, Miyazawa T.: Canine ASCT1 and ASCT2 are functional receptors for RD-114 virus in dogs. *J. Gen. Virol.* 93:603-607, 2012.

## **RD-114 virus story : from RNA rumor virus to a useful viral tool for elucidating the world cats' journey**

**Takayuki MIYAZAWA<sup>1)</sup>, Sayumi SHIMODE<sup>2)</sup>, So NAKAGAWA<sup>3)</sup>**

1) Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan

2) Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, Kobe, Japan

3) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan

RD-114 virus is a feline endogenous retrovirus (ERV) isolated from human rhabdomyosarcoma in 1971 and classified as endogenous gammaretrovirus in domestic cats (*Felis catus*). Based on the previous reports in 70's, it has been considered that a horizontal, infectious event occurred to transfer the virus from ancient baboon species to ancient cat species, whereupon it became endogenous in the cat species about several million years ago in Mediterranean Basin. Although it has been believed that all domestic cats harbor infectious RD-114 provirus in their genome, we revealed that cats do not have infectious RD-114 viral loci, but infectious RD-114 virus is resurrected by recombination between uninfected RD-114 virus-related ERVs [here we designated them as RD-114-related sequences (RDRSs)]. Further, we also revealed the RDRSs which would potentially be resurrected as RD-114 virus (here we refer to them as “new” RDRSs) had entered the genome of the domestic cat after domestication of the cat around 10 thousand years ago. The fractions and positions of RDRSs in the cat genome differed in Western and Eastern cat populations and cat breeds. Our study revealed that RDRS would be a useful tool for elucidating the world travel routes of domestic cats after domestication.