

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18787

研究課題名(和文)非レトロウイルス性内在性ウイルスによる同種ウイルス感染阻害機構解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of allogeneic inhibition of virus infection by non-retroviral endogenous virus and its application to therapy

研究代表者

藤野 寛 (FUJINO, Kan)

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：40712617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナウイルスのN遺伝子が内在化した内在性ボルナウイルス様N因子(EBLN)は多くの動物で見つかっており、特にジュウサンセンジリス由来のEBLN(itEBLN)はBDVの感染を抑制することがわかっている。そこで、本研究ではその抑制機構を解明するために欠損体を作成しBDVに対する影響を確認した。共免疫沈降法及び蛍光抗体法によりitEBLNとBDVタンパク質との結合性を確認した。その結果itEBLNはBDVのNタンパク質に結合してBDVのmRNA発現を抑制させることでウイルスの感染を阻害している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endogenous Borna virus-like N factor (EBLN) which is derived from the N gene of Bornavirus has been found in many animals, and it has been known that EBLN derived from *Ictidomys tridecemlineatus* (itEBLN) suppresses infection of Borna disease virus (BDV). Therefore, in this study, we produced deletion mutants of itEBLN to elucidate its suppression mechanism and confirmed the effect on BDV infection. Binding between itEBLN and BDV protein was confirmed by co-immunoprecipitation method and immuno-fluorescent assay. As a result, it was suggested that itEBLN binds to N protein of BDV and suppresses mRNA expression of BDV and inhibiting BDV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ボルナ病ウイルス 非レトロウイルス性内在性ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする動物のゲノムには多くのレトロトランスポゾンや内在性レトロウイルスといったウイルス由来の配列が存在する。これらの内在性ウイルス因子は逆転写酵素を持つウイルス感染の痕跡であり、逆転写酵素を持たないRNAウイルスは内在化しないと考えられてきた。ところが、ボルナウイルスが哺乳動物のゲノムに組み込まれている事が発見されて以来、フィロウイルス等の非レトロウイルス性の内在性ウイルス因子が複数報告されている。これらのウイルスは自身の増殖過程において宿主ゲノムへの組み込みを必要としない。にもかかわらず、ボルナウイルスのN遺伝子が内在化した内在性ボルナウイルス様N因子(EBLN)はヒトをはじめとする霊長類、げっ歯類、そして有袋類に至るまで広く哺乳動物に存在することがわかっている。このことから申請者は、EBLNをはじめとする非レトロウイルス性内在性ウイルス因子は宿主の生存に寄与する様な働きを持つのではないかと考えるに至った。

これまでの研究により申請者は、近年内在化したと考えられるジュウサンセンジリスのゲノム由来のEBLN(itEBLN: *Ictidomys tridecemlineatus* EBLN)をタンパク質として培養細胞に発現させた際に、BDVの感染を抑制することを解明している。同種ウイルスに対する感染阻害作用が宿主の生存に寄与した結果として、多くの動物種に非レトロウイルス性内在性ウイルスが存在していると予測される。しかしながら、itEBLNによるBDV(Borna disease virus)感染阻害の詳細な機序は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

BDVは馬に致死的な脳炎を引き起こす原因ウイルスとして発見されたが、猫などの愛玩動物においても感染が確認されている。さらにヒトにおいても複数の精神疾患との関連が指摘されており、人獣共通感染症として注目されている。それにもかかわらず、現在に至るまでBDV感染に対する有効な治療法は確立されていない。itEBLNのBDV感染阻害に関わる経路を明らかとし、その機序を解明することでBDVに対する治療法の開発のみならず、非レトロウイルス性内在性ウイルス因子を用いた同種ウイルス感染に対する新たな治療・予防法の開発に繋がるものと考えられる。そこで本研究ではitEBLNによるBDV感染阻害に関わる領域を特定し、その機序を明らかとすることで、BDV感染抑制法の開発を目指している。

3. 研究の方法

BDVタンパク質との結合を確認するため、感染細胞にタグを付加したitEBLNを強制発現させて、免疫沈降法によりitEBLNと結合するタンパク質を回収する。得られたサン

ルを用いたウエスタンブロット法により、BDVタンパク質を検出する。BDVのNタンパク質において既に判明している核局在シグナルやウイルスタンパク質結合領域を参考に、itEBLNの欠損体を作成する。作成した欠損体を用いてウイルスタンパク質との結合能に変化が生じるかを確認し、itEBLNの機能領域を決定する。さらに間接免疫蛍光抗体法により細胞内局在の変化を観察する。

4. 研究成果

(1) itEBLNはウイルスポリメラーゼ複合体構成タンパク質と結合する

初めに、itEBLNと結合するBDVタンパク質を決定するために、293T細胞を用いた共免疫沈降法及び、IFAによる細胞内局在の確認を行った。共免疫沈降法では293T細胞にHAタグ付加itEBLNとBDVNタンパク質やBDVPタンパク質を強制発現させ結合を確認した。IFAでは293T細胞にitEBLNとBDVNタンパク質やBDVPタンパク質を強制発現させ、蛍光抗体法により細胞内局在を解析した。結果として、itEBLNはBDVのポリメラーゼ複合体を形成するタンパク質であるBDVNタンパク質及びPタンパク質と結合することが明らかとなった(図1. A, B)。また、これらのタンパク質とitEBLNを共発現させると単独発現時に細胞核内に局在していたBDVPタンパク質が、itEBLNと共局在して細胞質へ移行することが判明した。また、Nタンパク質においても同様に単独発現時には核内に局在するものも、itEBLNとの共発現により細胞質への移行を示した(図1. C, D)。

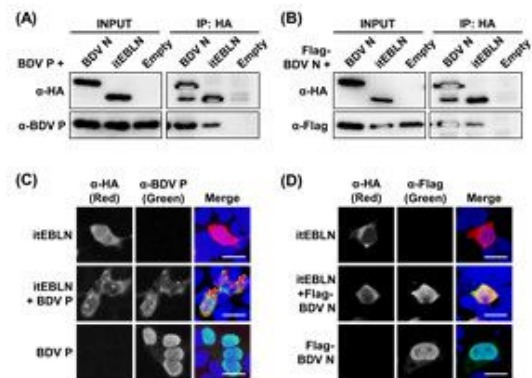


図1. itEBLNはBDVタンパク質と結合する

(2) itEBLNのBDVタンパク質結合領域の決定次に、ウイルスタンパク質とitEBLNとの結合部位を同定するために、itEBLN欠損体を作成して共免疫沈降法及びIFAにより結合性の変化を確認した。itEBLNはBDVのNタンパク質が内在化したものであり、Nタンパク質と類似した構造と取ると考えられるため、BDVNタンパク質のドメインを参考にP結合領域を欠損させた変異体、また、itEBLNのC末端から順次欠損させた欠損変異体を作成し、それらの発現をウエスタンブロット法により確認した(図2 A, B)。

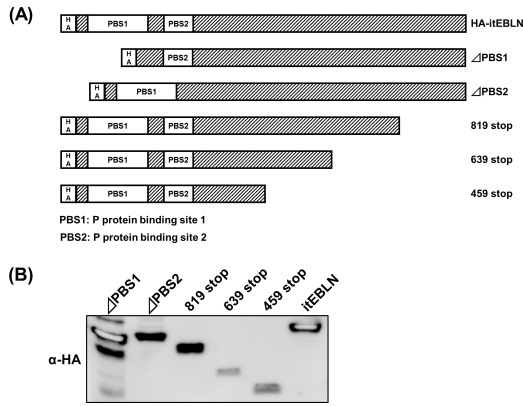


図 2 itEBLN 欠損変異体の作成

(3)293T 細胞に BDV P あるいは BDV N と共に itEBLN 及び itEBLN 欠損体タンパク質を共発現させ、共免疫沈降法により結合を確認した。結果、P 結合領域の N 末端側を欠損させた PBS1 では P との結合性が失われ、C 末端側を欠損させた PBS2 では N 及び P どちらとの結合性も失われていた(図 3 A,B)。これらの変異体の IFA を行った所、itEBLN では P タンパク質の局在の変化が認められた一方で、PBS1 及び PBS2 では局在の変化は認められなかった。また、N タンパク質においては、itEBLN と同様に PBS1 において N タンパク質の局在の変化が認められたが、PBS2 では認められなかった。以上の結果から、IFA においても共免疫沈降法と一致した結果が得られた(図 3 C,D,E)。

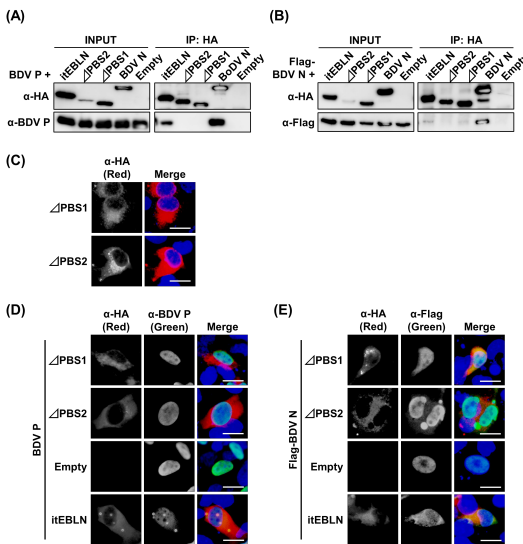


図 3 itEBLN 欠損体と BoDV P タンパク質および N タンパク質の結合

(4)itEBLN および itEBLN 欠損変異体による BDV mRNA 発現抑制
 欠損変異体の作成により、特定の BDV タンパク質との結合を示さない itEBLN の作成に成功した。そこで、次にそれらの欠損変異体による BDV 感染阻害作用を検討するために、itEBLN 欠損変異体を BDV 持続感染細胞に強制

発現させ、その後ウイルス mRNA を測定することで itEBLN によるウイルス転写活性に対する影響を調べた。リアルタイム PCR の結果、N との結合を示す PBS1 では BDV mRNA を itEBLN 全長と同程度に抑制したにも関わらず、N 及び P タンパク質のどちらとも結合を示さない PBS2 ではコントロールの Empty ベクターと同程度の mRNA が検出された(図 4)。

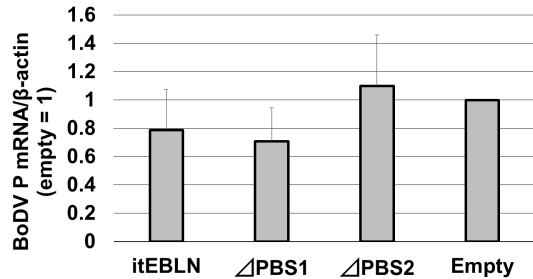


図 4. itEBLN および itEBLN 欠損変異体による BDV mRNA 発現抑制

(5)蛍光抗体法及び免疫沈降法により itEBLN は N 及び P タンパク質と結合することが明らかとなった。また、N 及び P タンパク質との結合を欠く itEBLN (PBS2) は BoDV の mRNA 抑制が認められなかった。一方、N タンパク質との結合を示す itEBLN (PBS1) は全長の itEBLN と同程度の抑制傾向を示した。以上の結果から、itEBLN は N タンパク質と結合し、ウイルスの転写活性に影響を与えている可能性が示唆された。N タンパク質に結合し、mRNA の発現を抑制することから、itEBLN は N タンパク質と結合することで核内に移行し、N タンパク質とともにゲノム及び RNP に結合することで正常なポリメラーゼの走行を阻害していると考えられる。また、興味深いことに、BDV P タンパク質と itEBLN タンパク質を共発現させると細胞内にドット状の構造物が確認された。この構造物は顕微鏡による観察上はドーナツ状の中央に穴の空いた円形構造を呈しており、BDV 感染時に細胞核内に観察される vSPOT と似た形態を示していた。しかしながら、これらのドット状構造物は細胞核及び細胞質全体に観察され、核内だけに観察される vSPOT とはその細胞内局在性が異なっていた。N タンパク質と P タンパク質の共発現ではこの様なドット状構造物は観察されない一方で、N 及び P タンパク質の導入比率を調整しさらに BDV ゲノムと L タンパク質を導入した際には vSPOT が出来る事が判明している。itEBLN と BDV N の相同性は 78% であり、BDV タンパク質との結合性は残しているものも立体構造などは変化していると考えられる。この違いがドット状構造物を作ることに作用していると考えられる。また、itEBLN は N タンパク質における N 末端の核内移行シグナルを欠損しているが、これを補完した itEBLN(NLS-itEBLN)を P タンパク質とともに共発現させた際にはドット状構造物は核内だけに認められた。このことから、この

構造物の局在性には itEBLN の局在が関与していると考えられる。以上の結果から itEBLN は BDV 感染阻害だけでなく、BDV の感染機構を解明するためのツールとしても有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

藤野 寛 他、ジューサンセンジリス由来内在性ボルナウイルスのボルナ病ウイルス感染阻害機構の解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 寛 (FUJINO, Kan)
麻布大学・獣医学科・助教
研究者番号：40712617