

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15687

研究課題名（和文）牛白血病ウイルスによる同種ウイルスの重複感染阻害機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanisms underlying viral interference in BLV infection

研究代表者

安藤 清彦（ANDOH, Kiyohiko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員

研究者番号：70806752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：牛に感染してリンパ腫を引き起こす牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）は、養牛産業における重要感染症の一つである。一度BLVに感染した牛は他のBLVに感染しないことから、BLVにはあとから感染するウイルスに対して感染を阻害する機能が備わっていると考えられる。本研究では、BLVが発現する遺伝子マイクロRNA（miRNA）やアンチセンスRNAがこの阻害機能を担っていると仮説を立てて検証を行った結果、これらの遺伝子は後から感染するBLVの増殖に影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BLVは、いまだ有効なワクチンや治療法が開発されていない。これは、BLVに感染した個体、あるいは感染細胞がどのようなメカニズムで病態を進行させるのかが詳細に解明されていないためである。本研究で解明を試みたBLVの同種ウイルスに対する感染阻害機能は、牛へのBLV感染を防除するメカニズムとも言い換えることができるため、将来的にBLV感染症を制御するための新たな技術開発における重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Bovine leukemia virus (BLV) infects bovine B cells and causes malignant lymphoma, resulting in severe economic losses in the livestock industry. BLV is hypothesized to have unknown viral interference mechanisms because only one BLV genotype is detected in one BLV infected cattle. In this study, we hypothesized that viral microRNA (miRNA) or antisense RNA is responsible for the interference and examined the hypothesis in vitro. As the result, neither miRNA nor antisense RNA affected BLV replication. Further studies are required to clarify mechanisms underlying viral interference in BLV infection.

研究分野：獣医微生物学、獣医ウイルス学、家畜感染症学、動物衛生学

キーワード：Bovine leukemia virus 干渉現象 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

Bovine leukemia virus (BLV) 感染により引き起こされるウシの B 細胞性腫瘍「牛伝染性リンパ腫 (EBL)」は、畜産業界に大きな経済被害をもたらす疾病の一つである。国内における EBL 発症牛の報告件数や BLV 感染牛の割合は年々増加しており、BLV 感染を制御する防除方法の開発は極めて重要な課題である。しかしながら、レトロウイルスである BLV は生涯にわたり感染が持続すること、持続感染中の BLV の病態進行メカニズムにはいまだ不明な点が多いことなどから、その感染を予防可能なワクチンあるいは病態進行及びリンパ腫発症を制御可能な治療法は実用化されていない。

BLV には様々な遺伝子型が存在し、日本国内においても複数の遺伝子型が流行している。しかしながら、感染個体からは基本的に 1 つの遺伝子型しか検出されず、複数の遺伝子型が同時に検出されることは極めて稀である。すなわち、一度 BLV に感染すると後から侵入する BLV に対して個体が非感受性になる、という同種ウイルスに対する干渉作用の存在が示唆される。ウイルスにおける干渉作用の一般的なメカニズムとして、初感染時の免疫誘導による獲得免疫や、感染細胞内の自然免疫応答による抗ウイルス状態への移行などがあるが、現在までに BLV の感染防御に有効なワクチンを確立できていないこと、また、持続感染中の BLV は宿主の免疫応答を回避するためにウイルス由来のタンパク質を発現しない潜伏状態となることから、一般的な干渉作用とは異なるメカニズムが存在する可能性がある。

BLV は、そのゲノム中に 5 種類のマイクロ RNA(miRNA) をコードしており、これらの miRNA は潜伏感染状態の細胞においても持続的に発現している。miRNA は、標的となる配列を持つ mRNA を直接切断する、あるいは翻訳を抑制することで、細胞の遺伝子発現を制御する機能を持つ。BLV のゲノムは、RNA から DNA に逆転写されたのちプロウイルスとして宿主ゲノムに組み込まれるため自身の miRNA の標的とはならないが、後から細胞内に侵入する BLV の逆転写前のゲノム RNA は、先に感染した BLV が発現する miRNA の標的となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、「BLV 感染個体からは、なぜ 1 つの遺伝子型しか検出されないのか」という問いについて、BLV が発現する miRNA が後から侵入する BLV の感染を阻害するという仮説のもと、個体レベルで観察される干渉現象を担う分子メカニズムの実態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) BLV 由来 miRNA を発現するプラスミドの作出と転写抑制活性評価試験の構築

BLV がコードする 5 種類の miRNA (miR-B1、-B2、-B3、-B4、-B5) について、各 miRNA をコードする領域を miRNA 発現用プラスミドにクローニングした。また、miRNA による翻訳抑制活性を評価するため、各 miRNA の標的配列をルシフェラーゼ遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域 (untranslated region: UTR) に付加したレポータープラスミド 5 種類をそれぞれ作出した。作出した miRNA 発現プラスミドとレポータープラスミドを 293T 細胞にコトランスフェクションし、miRNA 発現プラスミド導入細胞と空ベクター導入 mock 細胞のルシフェラーゼ活性を比較することでクローニングした miRNA の翻訳抑制活性を評価した。

## (2) BLV 感染後の転写活性を定量可能なレポーターアッセイの構築

細胞に感染した BLV の増殖活性を定量するため、BLV がコードする転写因子 TAX に反応してルシフェラーゼを発現するレポーター細胞を作出した。具体的には、BLV の long terminal repeat (LTR) 配列のうち TAX 応答配列を持つ U3 領域のみをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを作出し、このプラスミドを感染性 BLV 検出に用いられる指示細胞 CC81 (ネコ繊維芽細胞株) に導入したのち薬剤セレクションを行うことでレポーター細胞 CC81 LTR U3 luc を作出した。作出したレポーター細胞に BLV 持続感染細胞株 FLK-BLV (ヒツジ腎臓由来細胞株) の培養上清から調製した cell free BLV を異なる接種量及びウイルス吸着時間条件で感染させ、各接種条件下でのルシフェラーゼ活性を測定した

## (3) miRNA による干渉現象の評価試験

(1) で作出した miRNA 発現プラスミドのうち、翻訳抑制活性があった miR-B1、-B2、-B4、-B5 を(2)で作出したレポーター細胞に導入して数日間培養し、その後 cell free BLV を感染させてルシフェラーゼ活性を測定した。各 miRNA 発現プラスミド導入細胞と空ベクター導入 mock 細胞のルシフェラーゼ活性を比較することで、miRNA が後から感染した BLV の転写活性を低下させるか評価した。

## (4) BLV アンチセンス RNA を用いた評価試験

BLV は潜伏期間中、miRNA に加えてタンパク質をコードしない RNA をゲノムのアンチセンス鎖から発現している。このアンチセンス RNA である AS1-S 及び AS1-L を発現するプラスミドを作出し、(3)と同様の方法で後から感染した BLV の転写活性に影響を与えるか評価した。

## 4. 研究成果

(1) BLV がコードする miRNA 5 種類のうち、miR-B1、-B2、-B3、-B5 の 4 種類は単独発現プラスミドを構築することができた。miR-B4 のみ単独発現可能なプラスミドを構築できなかったため、隣り合う miR-B4 と miR-B5 両方を発現するプラスミドを作出して評価に用いた。レポータープラスミドを用いた翻訳抑制評価試験の結果、miR-B1、-B2、-B4、-B5 については miRNA の導入によりルシフェラーゼ活性の顕著な低下を認め、翻訳抑制活性を有していることが確認された。一方 miR-B3 については、miRNA の導入によるルシフェラーゼ活性の変化が認められなかった (図 1)。

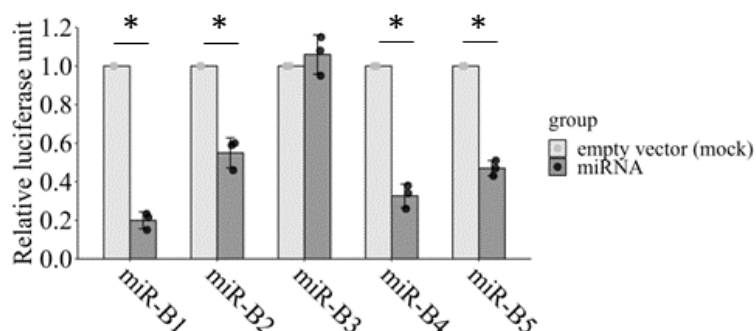


図 1 miRNA による翻訳抑制活性評価試験

miRNA 発現プラスミド及び miRNA 標的配列を持つレポータープラスミドを 293T 細胞に導入

した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定結果はプラスミド導入効率で補正した後、各 miRNA 導入細胞について mock 細胞のルシフェラーゼ活性を 1.0 とした場合の相対値として示す（各プロットは繰り返し 3 回の実施結果）。アスタリスクは  $p < 0.05$  を示す。

- (2) CC81 LTR U3 luc 細胞に 2 倍段階希釈した cell free BLV を感染させてルシフェラーゼ活性を測定した結果、接種ウイルス量依存的なルシフェラーゼ活性の減少が認められた。また、BLV 接種後の吸着時間を比較した実験においては、吸着時間依存的にルシフェラーゼ活性の増加が認められ、吸着時間 6 時間が最も高い活性を示した。24 時間吸着の場合は、細胞融合に伴う細胞剥離により細胞数が減少したため、ルシフェラーゼ活性が低下する傾向が認められた。以上の結果から、構築したレポーターアッセイが BLV 感染に伴う転写活性を定量的に検出可能であることが示された（図 2）。

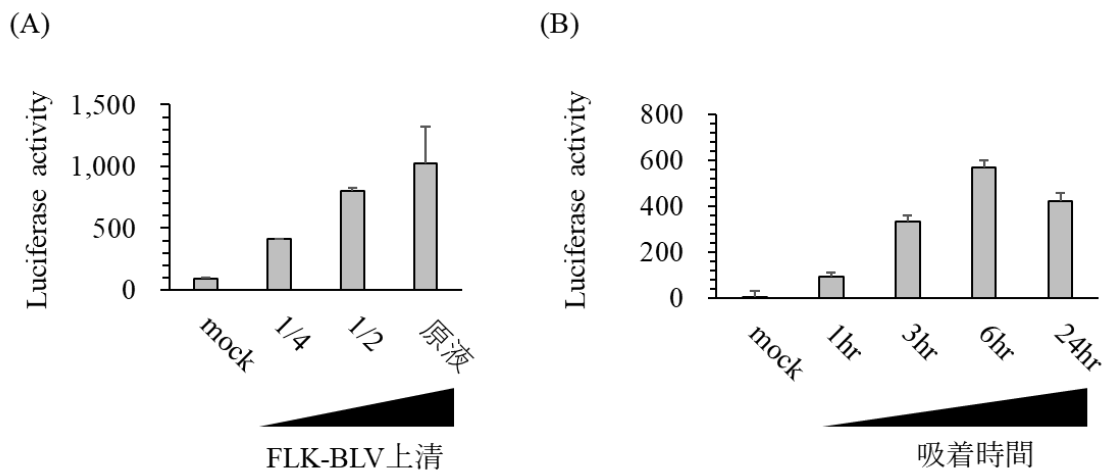


図 2 CC81 LTR U3 luc 細胞への BLV 接種試験

BLV TAX に反応してルシフェラーゼを発現する CC81 LTR U3 luc 細胞に対して、接種量 (A) または吸着時間 (B) の条件を変えて cell free BLV を感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定した (n=3)。

- (3) CC81 LTR U3 luc 細胞に miRNA 発現プラスミドを導入したのち cell free BLV を感染させた結果、miRNA 発現細胞、mock 細胞、プラスミド非導入細胞すべてにおいて BLV 感染によるルシフェラーゼ活性の増加が認められ、miRNA の導入による BLV 転写活性の抑制を認めなかった（図 3）。

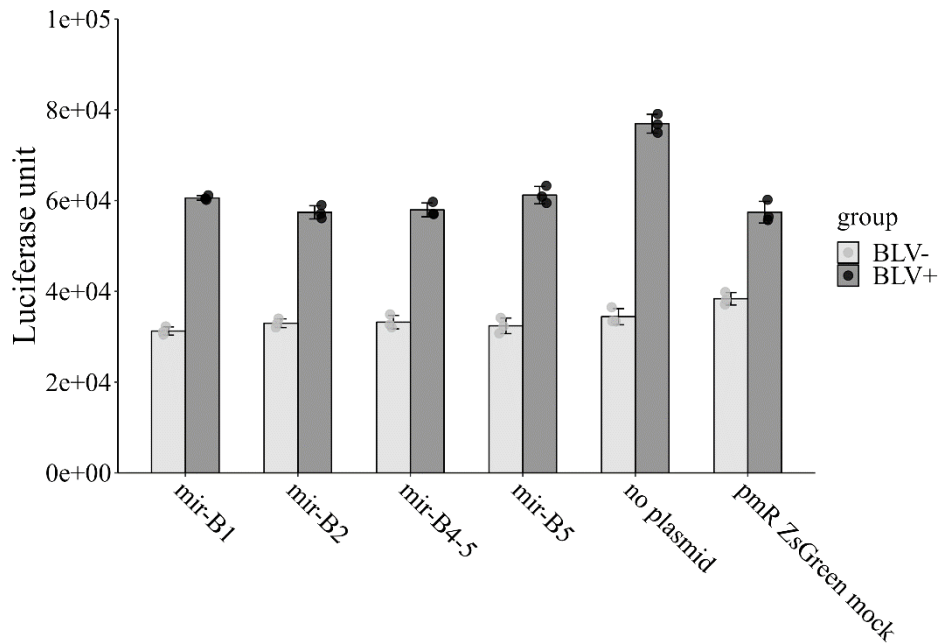


図3 miRNA 発現プラスミドを導入した CC81 LTR U3 luc 細胞における BLV 接種試験  
 CC81 LTR U3 luc 細胞に各 miRNA 発現プラスミド又は空ベクター (pmR ZsGreen) を導入したのち、cell free BLV を感染させてルシフェラーゼ活性を測定した (n=3)。

(4) CC81 LTR U3 luc 細胞に AS1-S 及び AS1-L 発現プラスミドを導入したのち cell free BLV を感染させた結果、アンチセンス RNA 発現細胞と mock 細胞どちらにおいても BLV 感染によるルシフェラーゼ活性の増加が認められ、アンチセンス RNA の導入による BLV の転写活性の抑制を認めなかった (図4)。

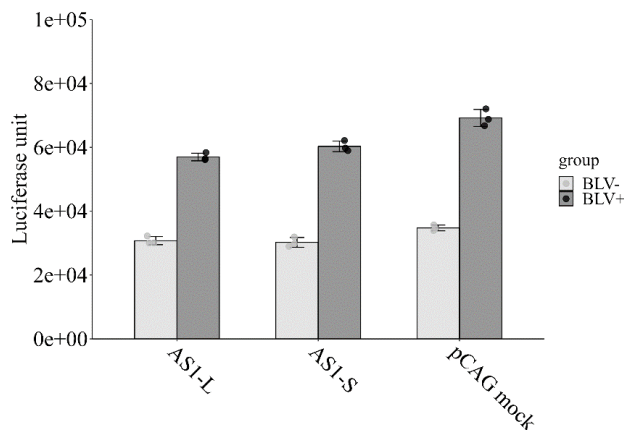


図4 アンチセンス RNA 発現プラスミドを導入した CC81 LTR U3 luc 細胞における BLV 接種試験  
 CC81 LTR U3 luc 細胞にアンチセンス RNA 発現プラスミド又は空ベクター (pCAG) を導入したのち、cell free BLV を感染させてルシフェラーゼ活性を測定した (n=3)。

本研究は、個体レベルで観察される干渉現象について、細胞レベルでのウイルス感染の阻害がその実態であるとの仮説の元検証を行った。その結果、BLV 本来の感染様式とは異なる”異種動物細胞への cell free BLV 感染“という限定的な条件ではあるものの、培養細胞を用いた BLV 重複感染モデルにおいて、miRNA は後から感染した BLV の転写活性に影響を与えないことが確認された。また、潜伏感染時に持続発現する miRNA 以外のウイルス因子であるアンチセンス RNA についても評価を行ったが、アンチセンス RNA も後から感染した BLV の転写活性に影響を及ぼさないという結果が得られた。BLV の干渉現象は未だ謎に包まれており、その解明にはさらなる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Andoh Kiyohiko, Akagami Masataka, Nishimori Asami, Matsuura Yuichi, Kumagai Asuka, Hatama Shinichi	4. 巻 261
2. 論文標題 Novel single nucleotide polymorphisms in the bovine leukemia virus genome are associated with proviral load and affect the expression profile of viral non-coding transcripts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 109200 ~ 109200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetmic.2021.109200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Andoh Kiyohiko, Nishimori Asami, Matsuura Yuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Bovine leukemia virus-derived long-noncoding RNA, AS1-S, binds to bovine hnRNPM and alters interaction properties between hnRNPM and host mRNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.02.27.530377	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kiyohiko Andoh, Asami Nishimori, Yuichi Matsuura
2. 発表標題 Evaluation of cellular functions affected by the long non-coding RNA encoded by bovine leukemia virus.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤清彦、西森朝美、松浦裕一
2. 発表標題 ウシ白血病ウイルス由来非翻訳性RNAが細胞機能に与える影響の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤清彦、西森朝美、松浦裕一
2. 発表標題 BLVがコードする非翻訳性RNA AS1-Sは宿主因子hnRNPMと結合する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤清彦、西森朝美、松浦裕一
2. 発表標題 BLVがコードする非翻訳性RNA AS1-Sと結合する宿主因子の同定
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関