

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15457

研究課題名（和文）哺乳類におけるCRISPR-Cas様ウイルス防御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of CRISPR-Cas-like viral defense mechanisms in mammals

研究代表者

小出 りえ (Koide, Rie)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：40846325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、内在性ボルナウイルス様配列（EBLN）由来のpiRNAを介した新たなウイルス防御機構を解明することを目的とした。先行研究より、EBLN由来piRNAが海馬の神経前駆細胞（hNPC）においてBoDV-1をサイレンシングする可能性を着想したが、hNPCにおいてEBLN由来piRNAの発現は確認できなかった。そこでEBLN由来piRNAを発現する生殖細胞に焦点を絞り、現在精子幹細胞や精巣器官培養系を用いたBoDV-1の感染実験を進めている。今後、BoDV-1の精巣感染モデルを確立し、生殖細胞においてEBLN由来piRNAがBoDV-1感染防御に果たす役割を詳細に解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類では前例のない、piRNAを介した抗ウイルス免疫機構の解明を目指す初の試みである。生物ゲノムにはEBLN以外にも多数のウイルス由来配列が存在するが、最近の研究でその一部がゲノム上のpiRNA産生領域（piRNAクラスター）に存在し、近縁ウイルスに対して相補鎖のpiRNAを産生することがわかってきた。したがって、本研究でpiRNAを介したウイルス制御機構を解明することは、BoDV-1のみならず、他の様々なウイルスの防御策を開発する上でも重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The study aims to elucidate a novel antiviral mechanism mediated by piRNAs derived from endogenous bornavirus-like elements (EBLNs). We hypothesized that EBLN-derived piRNAs may silence Borna disease virus-1 (BoDV-1) in hippocampal neural progenitor cells (hNPCs), but we were unable to detect EBLN-derived piRNAs from hNPCs in our hands. Based on these results, we are now shifting our focus to testes, which expressed EBLN-derived piRNAs. Currently, we are conducting BoDV-1 infection experiments using spermatogonial stem cells and testicular organ culture systems. In the future, we plan to establish a BoDV-1 testicular infection model and further analyze the antiviral role of EBLN-derived piRNAs in germ cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性RNAウイルス 抗ウイルス免疫 哺乳類 PIWI-interacting RNA CRISPR-Cas

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムには、内在性ウイルス様配列 (EVE) と呼ばれるウイルス由来の遺伝子配列が多数存在する。内在性ボルナウイルス様配列 (EBLN) は、RNA ウイルスの一種であるボルナ病ウイルス 1 (BoDV-1) に類似した遺伝子配列であり、初めて発見された非レトロウイルス型の EVE である。先行研究より、EBLN が piRNA クラスターと呼ばれるゲノム上の piRNA 産生領域に高頻度に存在し、BoDV-1 の mRNA に対してアンチセンス鎖の piRNA を産生することが示されていた。piRNA は、PIWI タンパク質と結合し、標的 mRNA の発現を配列特異的に制御する小分子 RNA である。この機能から、piRNA クラスター内に挿入された EBLN から産生される piRNA が、RNA 干渉によって BoDV-1 の感染を抑制する可能性を着想した。このような EVE 由来 piRNA による抗ウイルス機構は、原核生物の CRISPR-Cas システムと類似しており、節足動物であるカにおいて既に報告されている。しかし、同様のメカニズムが哺乳類の生体内で機能するかどうかはわかっていない。そこで本研究では、遺伝子改変マウスモデルを用いた感染実験により、哺乳類における piRNA を介した新たな抗ウイルス機構【図 1】を解析することにした。

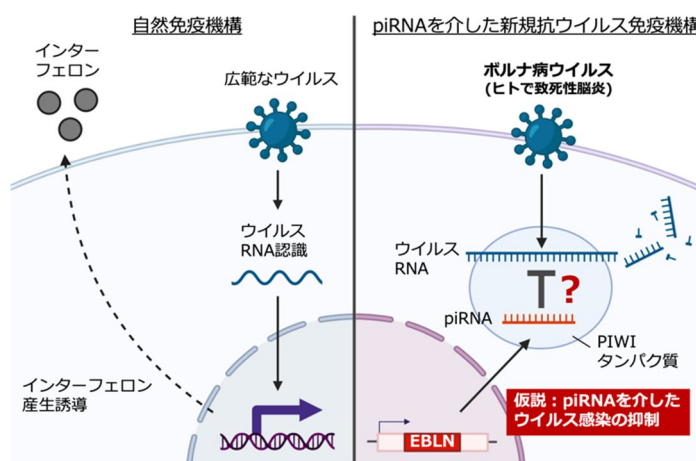


図1 小分子RNAを介した新たな抗ウイルス免疫機構と既存の自然免疫機構の比較

### 2. 研究の目的

本研究では、BoDV-1 と、その EVE である EBLN をモデルに、哺乳類ゲノムに存在する RNA ウイルス由来配列が、CRISPR-Cas システムと類似した仕組みでウイルス抵抗性に関与する可能性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスモデルの作製

EBLN 由来 piRNA の機能を探るため、研究代表者らは以前 piRNA を産生する 3 つの EBLN (EBLN3, EBLN4, EBLN5) をマウスゲノムからノックアウトした EBLN KO マウスを作製した。しかし、既存の BoDV-1 株は、EBLN 配列との配列相同性が 70% 程度しかなく、EBLN 由来 piRNA によって効率的にサイレンシングされない可能性があった。そこで本課題では、配列相同性がサイレンシング活性にどう影響するかを調べるためのコントロールとして、既存の BoDV-1 N 遺伝子配列をアンチセンス方向に piRNA クラスターに挿入した BoDV-1 N (-) KI マウスを作製した。また、Cre-loxP システムを用いて、ノックインした BoDV-1 N 配列の向きを反転させた BoDV-1 N (+) KI マウスも作製した。

#### (2) EBLN KO マウスを用いた BoDV-1 の感染実験

EBLN 由来 piRNA が BoDV-1 感染を抑制するかを調べるため、EBLN KO マウス、野生型マウス、その双方を掛け合わせた EBLN Hetero マウスを用いて BoDV-1 の感染実験を行った。コントロ

ールには、BoDV-1 の排除に重要な役割をもつインターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Hausmann et al., J Virol, 2005) のレセプターをノックアウトしたマウス (IFN $\gamma$  KO マウス) を使用した。異なる遺伝型の新生仔マウスに GFP 組換え BoDV-1 を脳内接種し、12 週間後に定量的 RT-PCR と脳組織観察によって BoDV-1 の感染を評価した。

### (3) hNPC を用いた実験系の確立

先行研究において piRNA とマウスの Piwi タンパク質である MILI が、海馬由来の神経前駆細胞 (hNPC) で高度に発現していることが示されていた (Gasperini et al., EMBO Rep 2022)。そこで、EBLN 由来の piRNA が脳全体に影響を与えるのではなく、hNPC において BoDV-1 をサイレンシングする可能性を着想した。hNPC において BoDV-1 感染を評価するため、本課題では hNPC の ex vivo 培養法の最適化ならびに BoDV-1 感染実験系の確立を行った。

### (4) hNPC および精巣を用いた Small RNA-seq 解析

hNPC が EBLN 由来の piRNA を発現するかを調べるため、hNPC およびコントロールの精巣から Small RNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンス解析を行った。得られたリードは、リファレンスゲノムにマッピングし、EBLN 由来 piRNA の発現を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) EBLN KO マウスを用いた BoDV-1 の感染実験

EBLN 由来 piRNA の機能を調べるため、野生型マウス、EBLN KO マウス、EBLN Hetero マウスおよび IFN $\gamma$  KO マウスを用いて BoDV-1 の感染実験を行い、BoDV-1 に対する感受性を比較した【図 2】。その結果、ウイルス接種後 12 週目において、コントロールの IFN $\gamma$  KO マウスでは、野生型マウスと比べてウイルス RNA 量の増加が認められた。一方、EBLN KO マウスと野生型マウスでは、脳全体のウイルス RNA 量の有意な差は認められなかった。しかし脳切片の蛍光観察の結果から、一部の EBLN KO マウスでは、海馬における GFP 発現が高いことがわかった。

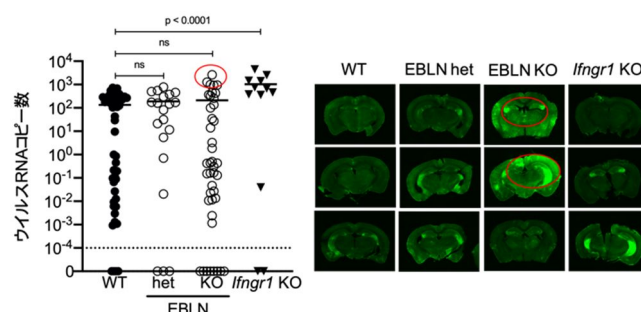


図2 マウスモデルにおけるポリナボウイルス感染性の比較

### (2) hNPC を用いた実験系の確立

先行研究および研究成果 (1) から EBLN 由来 piRNA が hNPC において BoDV-1 をサイレンシングする可能性を着想した。hNPC において BoDV-1 感染を評価するため、まず hNPC の ex vivo 培養法の最適化を行った。初期検討では、成体マウスの海馬歯状回からの直接単層接着培養や海馬器管培養を試みたが、いずれの方法も成功率が低かった。そこで、マウス胎児の海馬歯状回からニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成し、単離したシングルセルから単層接着培養を行う方法を検討した。この方法により、hNPC の安定した培養が可能となった。次いで、hNPC を用いた BoDV-1 感染実験系の確立のため、hNPC に GFP 組換え BoDV-1 を接種した。その結果、3 日後から GFP の発現が確認されたことから、hNPC において BoDV-1 感染が成立することがわかった。今後、異なる遺伝型のマウス由来の hNPC を用いた感染実験を行うことで、BoDV-1 感受性の違いを評価できると考えられた。

### ( 3 ) hNPC および精巣を用いた Small RNA-seq 解析

hNPC およびコントロールの精巣における EBLN 由来 piRNA の発現を調べるため、Small RNA-seq 解析を行った。その結果、近年 piRNA の存在が報告されていた海馬や hNPC から piRNA は殆ど検出されず、EBLN 由来 piRNA の発現も確認できなかった。一方、精巣は EBLN 由来 piRNA を発現しており、BoDV-1 N KI マウスの精巣では、ノックインされた BoDV-1 N 配列が piRNA にプロセシングされていた。以上の結果を基に、今後は生殖細胞に焦点を絞り、EBLN 由来 piRNA が BoDV-1 感染に与える影響を調べる予定である。現在、精子幹細胞や精巣器官培養系を用いた BoDV-1 の感染実験を進めており、今後 BoDV-1 の精巣内接種も行う予定である。これらの実験により、BoDV-1 の精巣感染モデルが確立できれば、生殖細胞において EBLN 由来 piRNA が BoDV-1 に対する抵抗性因子として機能する可能性を検証できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Kaneko Yuka, Naito Yuui, Koide Rie, Parrish Nicholas F., Takahashi Tomoko	4. 巻 658
2. 論文標題 The regulation of persistent Borna disease virus infection by RNA silencing factors in human cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 122 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.069	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rie Koide, Takaya Abe, Anselmo Jiro Kamada, Yuka Saito, Matteo Guerrini, Asami Fujii, Erica Parrish, Masayuki Horie, Hiroshi Kiyonari, Shigeo Koyasu, Kazuhiko Yamamoto, Keizo Tomonaga, Nicholas Parrish
2. 発表標題 A murine model to test the role of endogenous bornavirus-like elements on Borna disease virus infection.
3. 学会等名 第23回日本レトロウイルス研究会夏期セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Koide, Takaya Abe, Anselmo Jiro Kamada, Yuka Saito, Matteo Guerrini, Asami Fujii, Erica Parrish, Masayuki Horie, Hiroshi Kiyonari, Shigeo Koyasu, Kazuhiko Yamamoto, Keizo Tomonaga, Nicholas Parrish
2. 発表標題 A mouse model to test for EVE-derived antiviral activity against Borna disease 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

〔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
---------	---------