

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20507

研究課題名（和文）エピソード型RNAウイルスベクターの遺伝子発現を制御する技術の開発

研究課題名（英文）Development of technology to regulate gene expression of episomal RNA virus vector

研究代表者

神田 雄大（Kanda, Takehiro）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：50964649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ボルナ病ウイルス1（BoDV-1）の人工合成技術を用いて、アクセサリタンパク質（X）を欠損させた組換えウイルスを合成するプロトコルを確立した。また、このX欠損型の組換えウイルスを用いて、BoDV-1の感染サイクルにおけるXの機能解析を行い、XがRNA合成、ウイルスタンパク質の核外輸送、子孫粒子の形成に必須であることを示した。さらに、Xがこれらの機能を発揮するためには、ウイルスRNAタンパク質複合体の中心であるリン酸化タンパク質（P）に結合する必要があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が、BoDV-1を基盤にして開発した新規のウイルスペクターREVecは、幹細胞に高効率に遺伝子を導入し、長期に渡って持続的に遺伝子を発現させることができる。一方で、導入された遺伝子の発現が、どのような機序で制御されているかは明らかでなかった。本研究では、XがREVecによる持続的な遺伝子発現に重要な役割を果たしていることを示すことができた。Xをターゲットにし、REVec由来の遺伝子の発現を制御する技術確立することで、REVecが遺伝子細胞治療分野において、有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, by using a reverse genetics system for BoDV-1, we established a protocol to rescue X-deficient rBoDV-1. We analyzed the function of X in the BoDV-1-infected cells by using X-deficient rBoDV-1 and demonstrated that X plays a critical role in viral RNA synthesis, nuclear export of viral proteins, and production of progeny virions. In addition, we also showed that X needs to interact with P to exert its function.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルスペクター アクセサリタンパク質 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

マイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) を基盤として開発されたエピソーム型 RNA ウイルスベクター (REVec) は、細胞核での長期的かつ安全な遺伝子発現が可能な新規 RNA ウイルスベクターである。REVec は、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) やレンチウイルスベクター (LV) などの既存のウイルスベクターと比べ、iPS 細胞を含む幹細胞への遺伝子導入効率が格段に優れており、分化誘導後も長期に遺伝子を発現し続けることが可能であるため (Komatsu et al, *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019)、再生医療や遺伝子細胞医療の分野での臨床応用が期待されている。しかし、RNA ウイルスを基盤にした REVec はウイルス由来の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼがウイルス RNA の転写複製を行っているため、AAV や LV などの DNA ウイルスを基盤にしたウイルスベクターのように、プロモーターを改変することで遺伝子発現を制御することができない点が大きな課題であった。再生医療や遺伝子細胞医療の分野での実用化に向け、REVec による遺伝子の発現量を調節する技術を開発し、より利便性の高いウイルスベクターとして発展させることが求められている。

REVec は感染後、核内にウイルス RNA と複数のウイルスタンパク質から成るウイルス RNA タンパク質複合体 (vRNP) を形成し、RNA の転写と複製を行う。また、vRNP は染色体に結合することで、細胞分裂の際に安定的に娘細胞に受け継がれるため、分裂細胞においても持続的な遺伝子発現が可能になっている (Matsumoto et al, *Cell Host Microbe*, 2012)。一方で、感染後期には、アクセサリタンパク質 (X) の発現が増加し、一部の vRNP が細胞質に輸送されるが、両者の因果関係は明らかでない。また、細胞質ではウイルス RNA がほとんど検出されないため、細胞質に輸送された vRNP はウイルス RNA をほとんど合成していないと考えられている。このことから、X タンパク質が vRNA の細胞質への輸送に関与し、ウイルス RNA の転写複製を制していることが推測されるが、REVec の感染サイクルにおける X タンパク質の機能は明らかになっていない。感染細胞における X タンパク質の機能を詳細に解明し、REVec の遺伝子発現を制御する技術に応用させることができれば、幹細胞の増殖・分化に応じて導入した遺伝子の発現量を調節できるベクターの開発が可能になり、再生医療や遺伝子細胞医療の分野に大きく貢献できるとの考えから本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、REVec の感染サイクルにおける X タンパク質の機能を明らかにし、REVec の遺伝子発現を制御する技術を開発することである。特に、X タンパク質が REVec の遺伝子発現や持続感染にどのような影響を与えているのかを明らかにし、ベクター技術への応用の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) X 欠損型 REVec の人工合成法の改良：研究代表者が確立した手法を用いることで、X 欠損型 REVec を人工合成することが可能である。しかし、現行の手法では、合成できる X 欠損型 REVec のウイルス力価が低く、様々な解析に用いることが困難であった。そこで、X 欠損型 REVec を効率的に人工合成できる系を確立するため、一過性に加える X タンパク質発現プラスミドの添加量の最適化を行った。

(2) X タンパク質が vRNP の細胞内分布に与える影響の評価：X 欠損型 REVec を作出し、これを薬剤に反応して X タンパク質を発現する Vero 細胞に感染させた。感染細胞を固定し、IFA 法で vRNP の中核であるリン酸化タンパク質 (P)、および REVec のゲノム RNA に結合する核タンパク質 (N) の細胞内分布を観察した。

(3) X タンパク質が REVec の子孫粒子の形成に与える影響の評価：X 欠損型 REVec を作出し、これを薬剤に反応して X タンパク質を発現する Vero 細胞に感染させた。この細胞を、RFP を発現する Vero 細胞と共培養することで、REVec の感染伝播に X タンパク質が必要か確認した。

(4) X タンパク質が REVec の RNA 合成に与える影響の評価：X 欠損型 REVec を作出し、これを薬剤に反応して X タンパク質を発現する Vero 細胞に感染させた。その後、4 日ごとに細胞を継代して total RNA を抽出し、RT-qPCR 法で REVec のゲノム RNA とメッセンジャー RNA (mRNA) を測定した。

4. 研究成果

(1) 添加する X タンパク質発現プラスミドの量を 0ng から 25ng の範囲で検討し、合成できる X 欠損型 REVec の力価を検討したところ、2.5ng あるいは 5.0ng の X タンパク質発現プラスミドを添加した際に、合成できる X 欠損型 REVec のウイルス力価が最大化した (図1)。

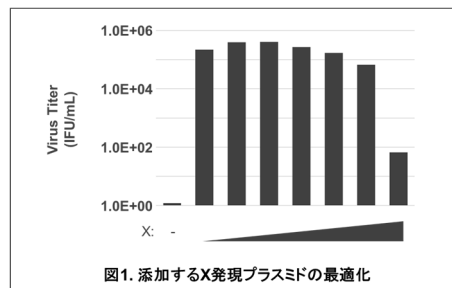


図1. 添加するX発現プラスミドの最適化

(2) GFP を発現する REVec (REVec-GFP) を感染させた Vero 細胞において、N タンパク質は核と細胞質の両方に分布していた。一方で、X 欠損型 REVec を感染させた Vero 細胞において、N タンパク質は核にのみ局在していた。しかし、X 欠損 REVec を感染させた Vero 細胞に薬剤を添加して X タンパク質を発現させると、REVec-GFP を感染させた Vero 細胞と同様、N タンパク質は核と細胞質の両方に分布した (図2)。また、P タンパク質についても同様の実験を行ったところ、N タンパク質と同様の結果が得られた。これらの結果から、X タンパク質が vRNP の核外輸送に関与していることが考えられた。

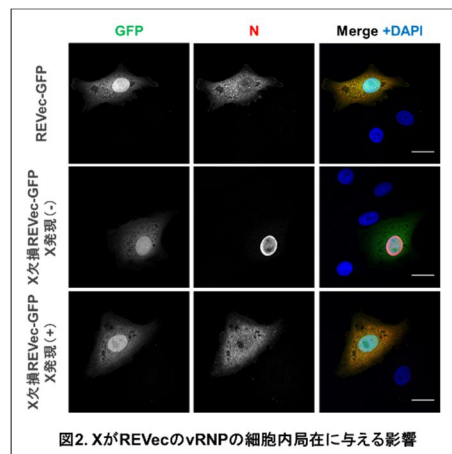


図2. XがREVecのvRNPの細胞内局在に与える影響

(3) 薬剤を添加して X タンパク質を発現させた条件で共培養を行ったところ、約 0.66% の割合で REVec 由来の GFP と非感染細胞由来の RFP を共発現する細胞が観察された。一方で、X タンパク質を発現させずに共培養を行った場合、GFP と RFP を共発現する細胞は観察されなかった (図3)。この結果から、X タンパク質が REVec の子孫粒子の形成に関与していることが考えられた。

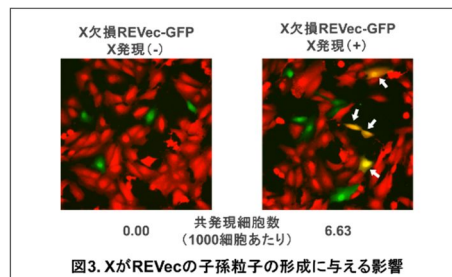


図3. XがREVecの子孫粒子の形成に与える影響

(4) 継代の際に薬剤を添加して X タンパク質を発現させたところ、REVec のゲノム RNA と mRNA は一定程度で推移したのに対し、X タンパク質を発現させなかった場合、継代の度に REVec のゲノム RNA と mRNA は減少し、感染 16 日後にはほとんど検出されなくなった (図4)。この結果から、X タンパク質が REVec の RNA 合成を制御していることが考えられた。

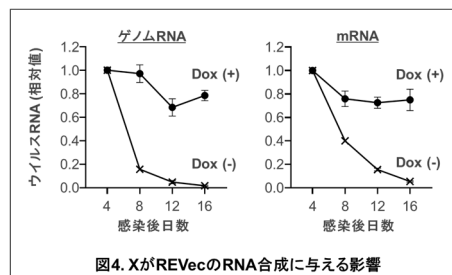


図4. XがREVecのRNA合成に与える影響

(5) 2-4 の結果から、X タンパク質が REVec の感染サイクルに重要な役割を果たしていることが明らかになった。これまでに、X タンパク質は、11 番目のグルタミン酸残基を介して P タンパク質と結合することが報告されている (Kobayashi et al, *J Virol*, 2003)。そこで、11 番目のグルタミン酸残基をアラニンに置換することで、P タンパク質との結合能を欠損させた変異体 (X/E11A) を作製し、これらの X タンパク質の機能が P タンパク質との結合を介して発揮されるのかどうか検証した。その結果、X/E11A を用いた場合も、X タンパク質を欠損させた場合と同様の結果が得られたことから、X タンパク質が P タンパク質との結合を介して REVec の感染サイクルに影響を与えることが明らかになった。

REVec は、自身の vRNP を宿主の染色体に結合させ、染色体と共に娘細胞に継代されることで、安定的な持続感染を可能にしている (Hirai et al, *J Biol Chem*, 2016)。X 欠損 REVec の vRNP は細胞核内に局在しており、感染を伝播することができなかったことから、X タンパク質は vRNP の核外輸送と、感染性粒子の形成に必須であることが考えられた。一方で、vRNP が核内に限局するにもかかわらず、感染細胞を継代する度にウイルス RNA のコピー数が減少し、持続感染することができなかった。このことから、ウイルス RNA を合成するためには、vRNP が核内に存在するだけでは十分ではなく、X タンパク質、あるいは X タンパク質を介した何らかの因子が必要であることが考えられた。また、REVec が持続感染を維持するために X タンパク質が重要な機能を果たしている可能性が考えられた。

今後は、細胞分裂時における X タンパク質の機能 (特に、vRNP と染色体の相互作用のメンテナンス) を分子レベルで明らかにすることで、REVec の遺伝子発現を制御する技術の開発に発展させる。また、X タンパク質を欠損させることで、宿主の遺伝子発現やウイルス RNA にどのような影響があるか明らかにし、X 欠損 REVec の臨床応用への可能性を探索する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kanda Takehiro, Tomonaga Keizo	4. 巻 14
2. 論文標題 Reverse Genetics and Artificial Replication Systems of Borna Disease Virus 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2236 ~ 2236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v14102236	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Komorizono Ryo, Fujino Kan, Kessler Susanne, Runge Solveig, Kanda Takehiro, Horie Masayuki, Makino Akiko, Rubbenstroth Dennis, Tomonaga Keizo	4. 巻 97
2. 論文標題 Reverse genetics of parrot bornavirus 4 reveals a unique splicing of the glycoprotein gene that affects viral propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	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） 10.1128/jvi.00509-23	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Pauline Santos, Dirk Hooper, Martin Beer, Dennis Rubbenstroth, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Establishment of a reverse genetics system for Borna disease virus 2
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 Takehiro Kanda
2. 発表標題 Reverse genetics system of Orthobornaviruses and its application
3. 学会等名 National Taiwan University School of Veterinary Medicine Special Seminar（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Pauline Santos, Dirk Hoper, Martin Beer, Dennis Rubbenstroth, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Development of a reverse genetics system for Borina disease virus 2 unveils a unique strategy to maintain viral genetic diversity in the persistently infected cells
3. 学会等名 The 21st Awaji international forum on infection and immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Elongation of additional nucleotides at the 3' end of Borina disease virus 1 genomic RNAs is initiated by the back-priming of the RNA-dependent RNA polymerase and regulates viral replication
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023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