

令和 6 年 6 月 20 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：22K20759

研究課題名(和文) Nonsense mediated mRNA decayによるRNAウイルスゲノムの品質管理と進化制御

研究課題名(英文) Quality and evolutionary control of RNA virus genome via nonsense mediated mRNA decay

研究代表者

小森園 亮 (Komorizono, Ryo)

京都大学・医生物学研究所・特定助教

研究者番号：10964637

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)：ウイルス感染と宿主のNMD機構の相互作用を解析するため、主要因子であるUPF・SMG・G3BP1遺伝子など複数の遺伝子ノックダウン細胞をレンチウイルスベクターにて樹立し、RNAウイルスであるボルナ病ウイルス・コクサッキーウイルスB3(CVB3)を接種した結果、有意に上清および細胞中ウイルスRNA量が増加した。同様に、NMD阻害剤であるNMDI-14を各感染細胞に投与した結果ノックダウン細胞と同じくウイルスRNA上は有意に増加した。以上のことから、宿主のNMD機構または各主要因子はRNAウイルスの複製を抑制する抗ウイルス作用を有していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではNMD機構がRNAウイルスの複製を制御していることが明らかとなったことから、NMD機構、特にUPFやSMG遺伝子を標的とした抗ウイルス薬の開発に貢献すると期待できる。またNMDとウイルス感染の相互作用の詳細はいまだ未解明であるが、RNAウイルスが感染に利用する新たな宿主機構として知見を得た意義のある成果といえる。本研究で用いたCVB3においては、ある特定の細胞種では細胞傷害性なしに長期間子孫粒子を産生する持続感染を成立させることが明らかとなり、急性感染と持続感染を1つのウイルス種で並行して解析できる実験系を確立させたことは本研究のみならず今後のウイルス学研究に活用されると予想される。

研究成果の概要(英文)：To analyze the interaction between viral infection and host NMD mechanisms, several gene knockdown cells were established with lentiviral vectors, including the UPFs, SMGs, and G3BP1 genes, which are key factors of NMD pathway. Inoculation of these cells with the RNA viruses Borna disease virus and coxsackie virus B3 (CVB3) resulted in significantly increased viral RNA amounts in the supernatant and infected cells. Similarly, NMDI-14, an NMD inhibitor, significantly increased viral RNA levels in each infected cell as well as in the knockdown cells. These results suggest that the host NMD mechanism or each key factor has antiviral activity to inhibit RNA virus replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス学 ウイルス進化 RNAウイルス RNA分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA ウイルスは真核生物や DNA ウイルスと比較し、変異率が非常に高く、ウイルスポリメラーゼの校正能力も欠如しているため急速に進化する。その結果、迅速に宿主へ適応し免疫反応から逃れ最終的に宿主へ病原性を示す。ウイルス進化に影響を与える宿主因子として、シチジン脱アミノ化酵素 APOBEC3 や RNA 編集酵素 ADAR が研究されているが、これらは点変異導入因子でありウイルスゲノム全体・配列多様性に影響を与える因子ではなく、ウイルス進化を制御する宿主機構の知見はいまだ不十分である。

近年、突然変異や転写・スプライシング異常により生じた不良な mRNA を選択的に分解する「NMD」の分子機構が明らかとなってきた。タンパク質をコードする領域に本来より上流に誤って終止コドン(未成熟終止コドン)が生じると、細胞毒性が高い異常タンパク質が翻訳されないよう mRNA の段階で NMD 因子 UPF1 が探知し、不良 mRNA は選択的に分解される。NMD は未成熟終止コドン、異常な立体構造、長鎖 2 本鎖構造を含む不良 mRNA を探知・除去することで RNA 品質機構として機能し、細胞の生体恒常性に大きく貢献している。

そこで、これら NMD の RNA 品質管理機能は同じく RNA をゲノムにもつウイルスにも作用し、かつ変異や立体構造を直接探知・分解するという観点から NMD はウイルス進化に影響を与えると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、RNA 品質機構である宿主の NMD 機構とウイルス感染の相互作用、および NMD 機構が RNA ウイルスの進化に影響を与えるか解析する。また RNA ウイルスは種によって多様な生活環を持っていることから複数種のウイルスを実験に用いて一貫性のある知見を得る。

3. 研究の方法

検証する RNA ウイルスとして、ボルナ病ウイルス (BoDV-1)・コクサッキーウイルス B3 (CVB3)・新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を用いた。

NMD によるウイルス感染の抑制評価

主要な NMD 因子 (UPFs, SMGs, STAU1/2, G3BP1) を shRNA によりノックダウンした細胞 (NMD-shRNA) に各ウイルスを接種後、感染細胞率・上清中の感染性ウイルス量・細胞内ウイルス RNA 量・ウイルスタンパク質発現量を経時的にコントロールと比較し、NMD の抗ウイルス効果を評価する。同様に、NMD 阻害剤である NMDI-14 を細胞へ投与し、濃度依存的に上記項目を評価する。

ウイルスタンパク質発現による NMD 阻害効果

ウイルスタンパク質単独の発現が宿主の NMD 作用に影響を与えるか検討する。各ウイルス遺伝子をコードした発現プラスミドを細胞へ導入後、免疫蛍光染色法により NMD 因子の細胞内局在を解析する。また細胞内局在に変化が認められた場合、免疫沈降法を用いてウイルスタンパク質と NMD 因子の結合性を評価する。またウイルス感染もしくはウイルスタンパク質発現による NMD 因子の発現量変動を RT-qPCR およびウェスタンブロットティングにより定量する。

NMD 因子ノックダウン細胞内におけるウイルスゲノムの多様性解析

NMD-shRNA 細胞に各ウイルスを接種後、経時的に細胞 RNA ならびに上清中のウイルス RNA を回収し、RNA-seq によりウイルスゲノム内の変異蓄積と配列多様性を解析する。

4. 研究成果

NMD 因子の遺伝子ノックダウンによりウイルス RNA 量は増加する

shRNA を発現するレンチウイルスベクターと HEK293T 細胞を用いて UPF, SMG など NMD 機構の主要因子のノックダウン細胞を樹立し、SARS-CoV-2 を MOI 0.2 にて接種したのち、上清中のウイルス RNA 量を qRT-PCR にて測定した (図 1)。その結果、UPF1 および UPF2 ノックダウン細胞において有意に上清中ウイルス RNA 量が増加した。

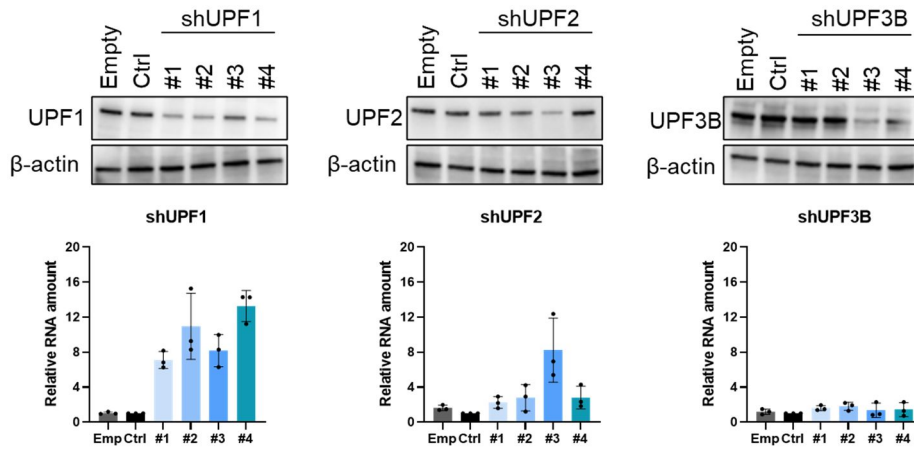


図 1 : NMD ノックダウン細胞における SARS-CoV-2 のウイルス RNA 量の変動

(上図)shRNA による NMD 因子ノックダウン細胞の樹立とウェスタンブロットング法による発現解析。(下図)NMD ノックダウン細胞への SARS-CoV-2 感染。MOI 0.2 にて接種したのち 72 時間後、細胞上清から RNA 抽出し qRT-PCR 法にてウイルス RNA 量を比較定量した。コントロール細胞(スクランブル配列を挿入した shRNA レンチウイルスベクター)におけるウイルス RNA 量を 1.0 とし、各細胞における RNA 量を相対値にて示した。Emp は shRNA 配列を挿入していないベクターを用いている。

次に、SARS-CoV-2 と同様に NMD 因子ノックダウン細胞において同じく RNA ウィルスであるボルナ病ウィルス (BoDV-1) およびコクサッキーウィルス B3 (CVB3) でもウイルス RNA が増加するか検討した。また、NMD 阻害剤である NMDI-14 の投与も検討した。NMDI-14 は NMD 主要因子である UPF1 と SMG7 の結合を阻害する低分子化合物である。その結果、SARS-CoV-2 と同様に NMD 因子ノックダウンにより BoDV-1 (細胞内ウイルス RNA 量) および CVB3 (上清中ウイルス RNA 量) でも有意に RNA 量が増加した(図 2)。

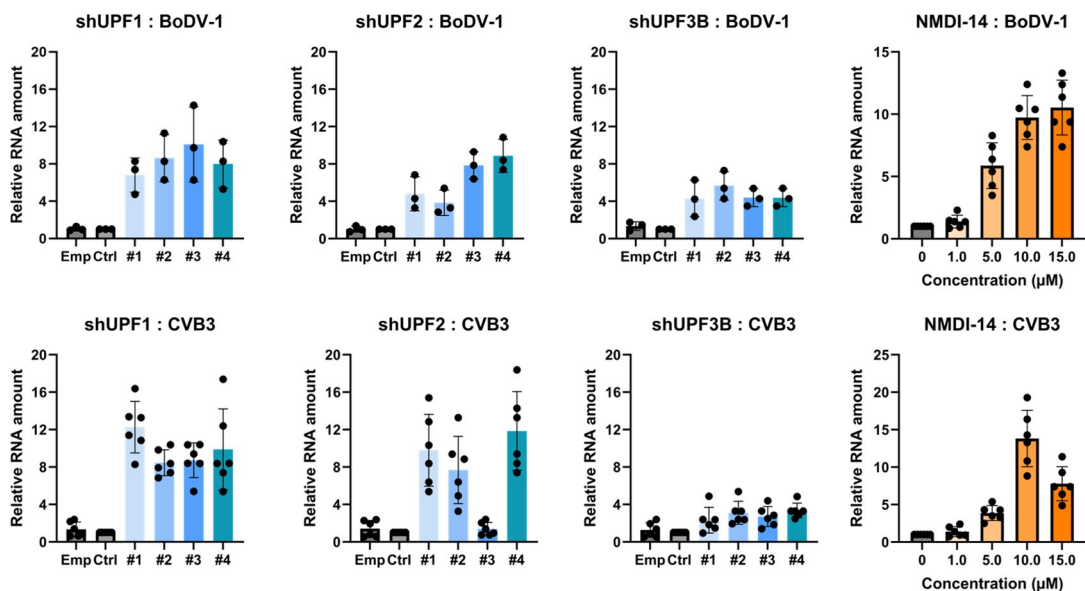
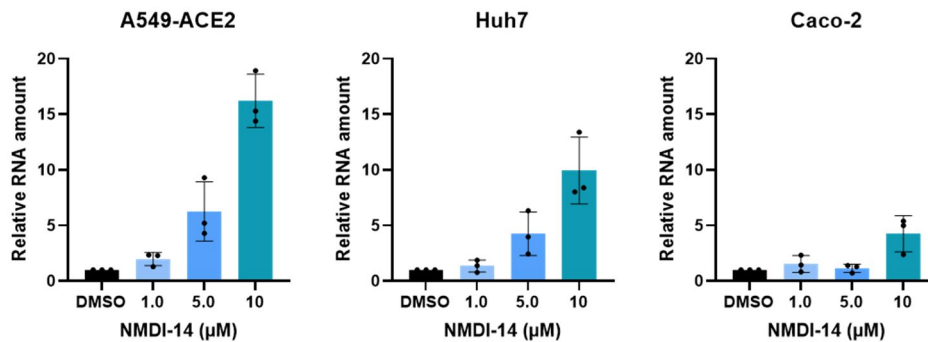


図 2 : RNA ウィルス感染に NMD 機構の影響

(上図)BoDV-1 を NMD ノックダウン細胞に MOI 0.4 で接種し、total RNA を細胞から回収後 qRT-PCR にてウイルス RNA を定量した。また BoDV-1 が持続感染した HEK293T 細胞に NMDI-14 を投与後、48 時間後ウイルス RNA 量を定量した。(下図) CVB3 を MoI 0.05 にて NMD ノックダウン細胞に接種し、72 時間後に細胞上清を回収しウイルス RNA 量を定量した。また CVB3 を MOI 0.05 で

接種し NMDI-14 を各濃度で投与後、48 時間後上清中ウイルス RNA 量を測定した。

また NMDI-14 において、A549-ACE2、Huh7、Caco-2 細胞における SARS-CoV-2 感染への影響も検討した結果同様の結果が得られた (図 3)。

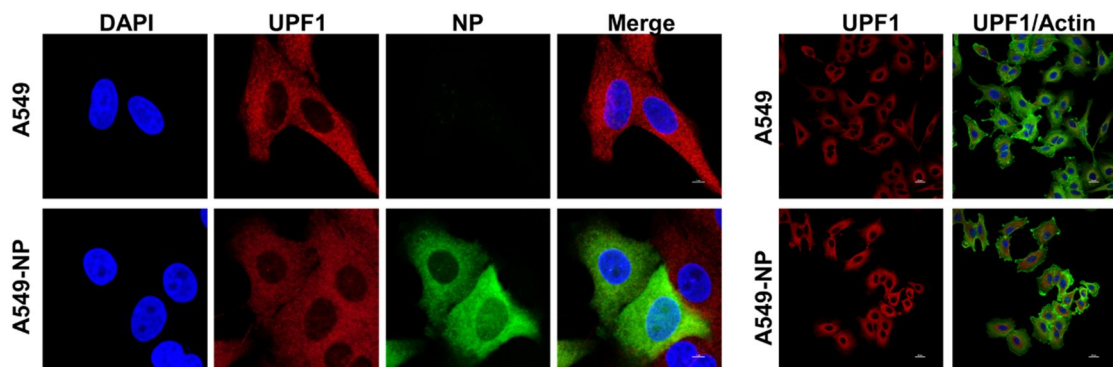


(図 3) NMD 阻害剤による SARS-CoV-2 感染への影響

各細胞に MOI 0.25 で SARS-CoV-2 を接種し 72 時間後、上清中のウイルス RNA を定量した。コントロールとして DMSO を投与し、相対値で示した。

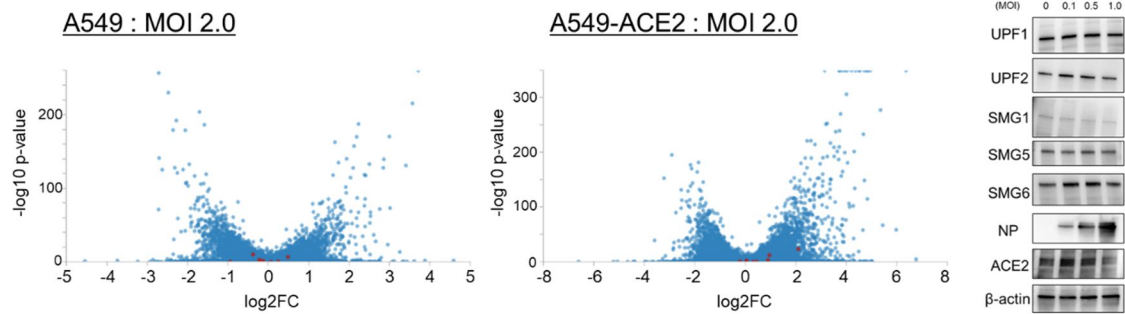
ウイルスタンパク質発現による NMD 阻害効果

既報の研究 (Gordon D et al., Nature, 2020) より SARS-CoV-2 の NP は UPF1 と結合することが質量分析により示唆されている。そこで、NP 発現により UPF1 の細胞内局在が変化するか検討した。レンチウイルスベクターにより SARS-CoV-2 NP 遺伝子を恒常発現する A549 細胞 (A549-NP) を樹立し、間接免疫染色法により NP および UPF1 の細胞内局在を解析した (図 4)。その結果、NP 発現の有無に関わらず UPF1 タンパク質は細胞質に局在していた。



(図 4) NP 発現細胞における UPF1 タンパク質の細胞内局在。NP 発現 A549 細胞における UPF1 の細胞内局在を抗 UPF1 抗体および抗 FLAG 抗体 (NP) により解析した。また細胞質マーカーとして beta-actin を用いた。

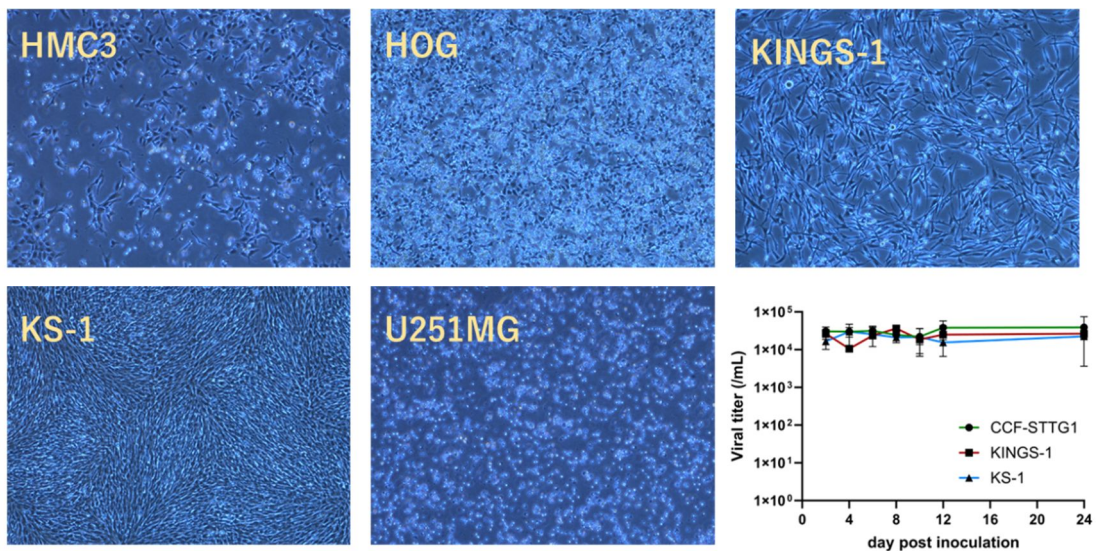
またウイルス感染により NMD 因子の発現レベルが変動するか RNA-seq により解析した。A549 および A549-ACE2 細胞に SARS-CoV-2 を MOI 2.0 で接種し 24 時間後、poly A tailed mRNA を濃縮した公共トランスクリプトーム解析データを利用した (図 5)。その結果、すべてのサンプルにおいて NMD 因子である UPF1/2/3A/3B および SMG1/5/6/7 の発現レベルの変動は認められなかった。またウェスタンブロッティング法により各因子のタンパク質発現を検討した結果、同様に顕著な差は認められなかった。



(図 5) SARS-CoV-2 感染による NMD 因子の発現変動。赤ドットは NMD 因子を示す。

NMD 因子ノックダウン細胞内におけるウイルスゲノムの多様性解析

NMD 機構が RNA ウイルスの進化に影響を与えるか解析するには長期的なウイルス継代が必要であり、急性感染性ウイルスでは感染後 24 時間以内に細胞死を誘導するため配列解析が困難であった。そのため、実験で扱いやすい CVB3 が持続感染を成立させる細胞株を探索した。ヒト神経系細胞である HMC3、HOG、KINGS-1、KS-1、U251MG 細胞に CVB3 を接種し、細胞傷害性と上清中のウイルス産生量を検討した (図 6)。その結果、KINGS-1 および KS-1 細胞では細胞傷害性をほとんど示さず、また子孫ウイルス粒子は少なくとも 24 日間産生されていた。以上の結果より、1 種のウイルスにより急性感染および持続感染両方の感染様式を並行して解析する実験系を確立し、NMD 機構の長期的なウイルス進化への影響を検討できることが予想された。



(図 6) 各細胞株への CVB3 の感染と子孫ウイルス粒子の産生。

上記の結果より、NMD 機構が RNA ウイルスの複製を制御していることが明らかとなったことから、NMD 因子、特に UPF や SMG 遺伝子を標的とした抗ウイルス薬の開発に貢献すると期待できる。また NMD とウイルス感染の相互作用の詳細ははまだ未解明であるが、RNA ウイルスが感染に利用する新たな宿主機構として知見を得た意義のある成果といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sunagawa Junya, Komorizono Ryo, Park Hyeongki, Hart William S., Thompson Robin N., Makino Akiko, Tomonaga Keizo, Iwami Shingo, Yamaguchi Ryo	4. 巻 19
2. 論文標題 Contact-number-driven virus evolution: A multi-level modeling framework for the evolution of acute or persistent RNA virus infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	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） 10.1371/journal.pcbi.1011173	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

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

1. 著者名 Sunagawa Junya, Park Hyeongki, Kim Kwang Su, Komorizono Ryo, Choi Sooyoun, Ramirez Torres Lucia, Woo Joohyeon, Jeong Yong Dam, Hart William S., Thompson Robin N., Aihara Kazuyuki, Iwami Shingo, Yamaguchi Ryo	4. 巻 14
2. 論文標題 Isolation may select for earlier and higher peak viral load but shorter duration in SARS-CoV-2 evolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-43043-2	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryo Komorizono, Shima Yoshizumi, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Excel-REGENS: The ex vivo gene cell therapy using REVec-based genetically engineered stem cells.
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

1. 発表者名 Ryo Komorizono
2. 発表標題 ポルナウイルスベクターを用いた遺伝子細胞治療薬の開発
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Komorizono, Shima Yoshizumi, Miya Kawanaka, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 RNA Virus Based Episomal Vector for Highly Efficient Genetic Engineering of Human Mesenchymal Stromal Cells
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy The 26th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小森園亮
2. 発表標題 自己複製型RNAウイルスベクター「REVec」の応用
3. 学会等名 BioJapan2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Komorizono, Chiaki Tanaka, Shima Yoshizumi, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Development of an RNA virus-based episomal vector with artificial aptazyme for switching gene expression off
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miina Kaneko, Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Intranuclear viral RdRp of Borna disease virus 1 interferes with host RNA maturation and metabolism.
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Komorizono, Miya Kawanaka, Shima Yoshizumi, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Product of a human endogenous bornavirus-like element suppresses RNA interference in mammalian cells
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ボルナウイルスベクターを利用した細胞の遺伝子改変と当該細胞を用いた細胞治療薬	発明者 小森園亮、朝長啓造	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2024- 45885	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------