

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580442

研究課題名(和文) ボルナ病ウイルス感染症の実態解明に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic study for assembling the picture of Borna Virus Infection

研究代表者

大塚 弥生 (Otsuka, Yayoi)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：30396303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナ病ウイルスエンベロープ蛋白質(BDVG)の発現はボルナ病ウイルス感染細胞でも低く、ウイルス粒子の検出が困難であることに関係している。本研究では鳥ボルナウイルスエンベロープ蛋白質(ABVG)は、BDVGと類似した構造にも関わらず細胞内で高率に発現し、その発現効率の違いはBDVG分子内の膜貫通領域のアミノ酸配列および宿主スプライシング因子による影響であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Borna disease virus (BDV) establishes persistent infection in the central nervous system and causes behavioral disturbances in several animal species including humans. BDV glycoprotein (BDVG) expression is extremely low in cells persistently infected with BDV and cells transfected with BDVG cDNA. Recently, avian bornavirus (ABV) was identified in parrots. In this study, we characterized ABV glycoprotein (ABVG) and reported that the expression of ABVG in transfected cells was remarkably higher than that of BDVG, despite similarities in their polypeptide backbone. We also showed that the amino acid sequence of the transmembrane domain affected plasma membrane expression levels of BDVG, and suggested the possible roles of host splicing factors in modulating the expression levels of BDVG.

研究分野：獣医学

キーワード：ボルナ病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

BDV(Borna disease virus; BDV) は Mononegavirus 目に属する一本鎖 (-)RNA ウィルスであり、感染細胞の核内で転写・複製するユニークな特徴をもつ。馬・牛・羊、さらに犬・猫などの広い宿主域を持ち、脳中枢神経に高い親和性を持ち、細胞傷害を示さずに持続感染を成立させ、遅発性神経症状を発症させることが分かっているが、その実態は大部分が不明である。また近年ではヒトの神経・精神障害患者で有意に高いBDV陽性率が確認され、人獣共通感染症の危険性も危惧されており、真相究明が急務である。

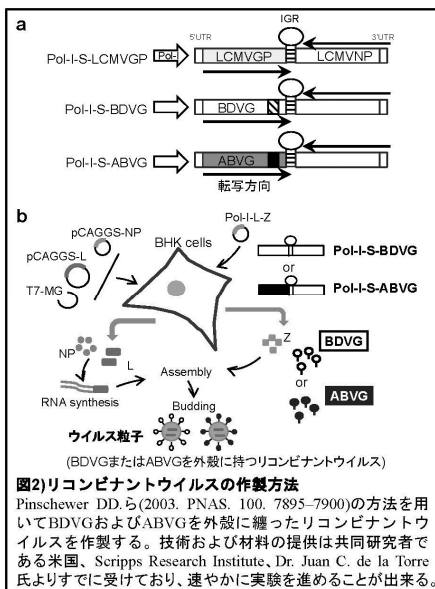
ウィルスの組織特異性や宿主域は宿主細胞表面の受容体とウィルス粒子表面の特異性結合によって決定される。宿主細胞受容体や感染経路の同定は感染防御や治療法の開発に重要である。

2. 研究の目的

BDV は感染動物体内においてウィルス粒子が認められず、培養細胞での感染実験でも検出されない。エンベロープ蛋白質(BDVG)の発現は BDV 感染細胞、あるいは BDVG をコードする cDNA を組み込んだプラスミドベクターを導入した培養細胞でも低いことが明らかとなっている。このことがウィルス粒子の検出が困難であることに関係していると考えられている。一方、近年同定された鳥ボルナウィルス (Avian borna virus: ABV) 感染鳥の組織からはウィルス粒子が検出される。本研究では、ABV エンベロープ蛋白質(ABVG)と BDVG の発現機構を比較し、ウィルス粒子形成に影響を与える因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

- リンパ性脈絡膜髄膜炎ウィルス (LCMV) リバースジェネティクス法を用



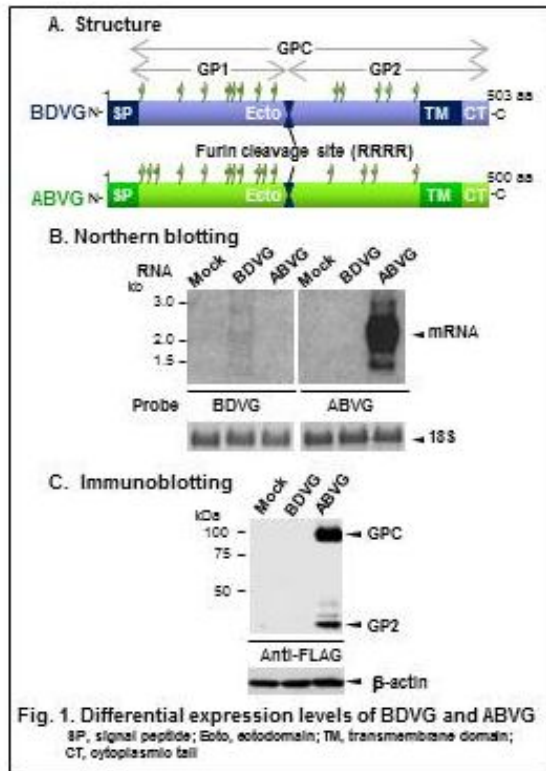
いた BDVG と ABVG を外殻蛋白質に持つリコンビナントウィルスの作製。

- BDVG および ABVG のクローニングと発現コンストラクト作製。
- ノーザンブロッティング 他

4. 研究成果

1. BDVG と ABVG の発現効率の違い

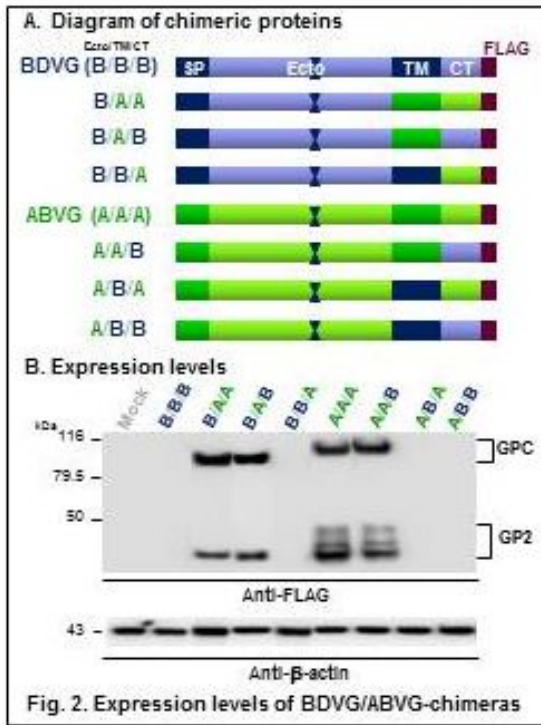
BDVG および ABVG は構造上、多くの類似点を持つ (Fig. 1A)。BDVG および ABVG の細胞質内領域に FLAG タグを付加したポリペプチドを発現させるベクターを構築し、293T 細胞に導入後、その発現量を mRNA および蛋白質レベルで解析した。その結果、BDVG の発現は ABVG に比べ、mRNA および蛋白質レベルで著しく低かった (Fig. 1B & C)。



この発現効率の違いの原因を探るため、BDVG および ABVG をエクドメイン・膜貫通領域 (TM)・細胞質内領域 (CT) に分け、Fig. 2A のようにそれぞれ組み替えたキメラ蛋白質発現コンストラクトを作製し、発現量の差をもたらす領域を解析した。その結果、BDVG の発現量低下をもたらす領域が BDVG の TM 領域にあることが示された (Fig. 2B)。

2. BDVG 発現に関わるスプライスドナー・アクセプター (SD・SA) 結合の影響

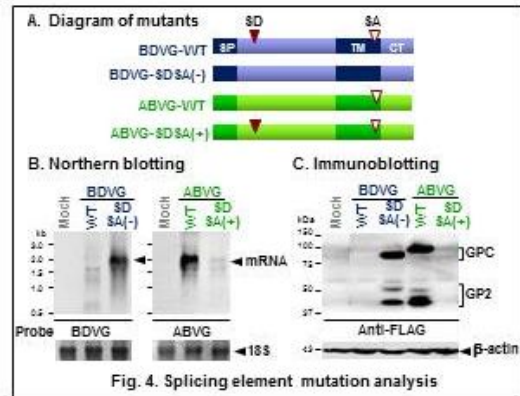
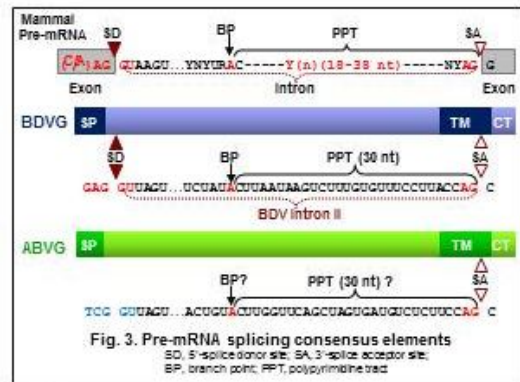
ウィルスは、その小さなゲノムから多彩な蛋白質を発現する必要があり、宿主のスプライシング機構や、プロテアーゼを利用する。BDV も宿主の選択的スプライシング機構を利用していることが分かっているが、関与するスプライシング因子はまだ同定されていない。Fig. 3 に示すように、BDVG のオープンリーディ



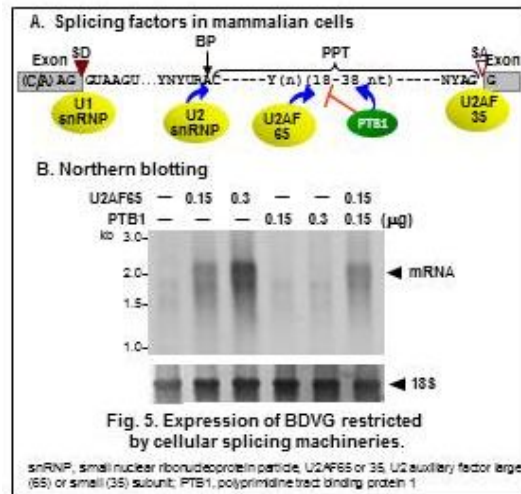
ングフレームには哺乳類において保存されているスプライシング関連配列の類似配列である 5' splice donor (SD)、branch point (BP)、ポリピリミジントラクト配列 (PPT)、3' splice acceptor (SA) サイトがあるが、ABVG には SD に相当する配列がない。そこで SD・SA サイトの有無が両者の発現効率の違いをもたらす原因であるかどうか、変異体を発現させるプラスミドベクターを作製し、Fig. 2 と同様に解析した。その結果、BDVG の SD・SA サイトをサイレンス変異させると (Fig. 4A, BDVG -SD・SA(-)), mRNA および蛋白質レベルいずれも BDVG 野生型と比較して発現が増加した (Fig. 4B & C)。一方 ABVG 野生型に SD サイトを組み込むと (Fig. 4A, ABVG-SD・SA(+)), その発現量は mRNA、蛋白質共に検出レベル以下となった (Fig. 4B & C)。BP、PPT、SA サイトは TM 領域をコードする遺伝子配列に存在する (Fig. 3)。加えて Fig. 2 で示したように、BDVG の TM 領域が、自身の蛋白質発現に抑制的に働いていた。この結果は Fig. 4 の結果と一致しない。以上の所見は SA サイトの前に存在する PPT 配列が、BDVG の発現を抑制する要因の一つである可能性を示唆するものである。我々はこの仮説を検証するために、PPT 配列を認識するスプライシング因子に着目した。

3. BDVG 発現は宿主スプライシング因子による抑制を受ける。

ウイルス RNA のプロセッシングでは、宿主細胞の RNA 結合蛋白質は不可欠な存在であり、heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) は選択的スプライシングの中心的役割を担っている。一方、恒常的スプライシ



ングの際、U2 auxiliary factor 65 (U2AF65) が PPT に結合し、BP への U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) の結合を誘導する (Fig. 5A)。hnRNPs の一つである PTB1 は PPT への結合に際し U2AF 65 と競合して、恒常的スプライシングを抑制する (Fig. 5A)。本研究ではこれらの二つの因子の影響を調べるために、Myc タグを付加した U2AF 65 と PTB1 の発現ベクターを構築し、BDVG と共に 293T 細胞に共発現させ、mRNA レベルを解析した。その結果、予想に反して、U2AF65 が濃度依存性に BDVG の発現を増加させた (Fig. 5B)。以上より、BDVG の発現には他のウイルス遺伝子の発現とは異なり、恒常的スプライシング因子である U2AF 65 が関与することが示唆された。



4. BDVG と ABVG を外殻蛋白質に持つリコンビナントウイルスの作製

BDVGあるいはABVGを外殻に持つリコンビナントウイルスを作製するためにBDVG、ABVG、それぞれを発現するpol-1-Sベクターの構築を行った。BDVG、ABVGをコードする遺伝子をLCMV-polymerase-1-Sベクター(pol-1-S-LCMVGP)のLCMVGP部位に組み込み、発現ベクターを構築した。シリアンハムスター腎(BHK)細胞に上記ベクターと、LCMVの核酸(NP)、ポリメラーゼ(L)、およびZ蛋白質(Z)を発現するプラスミド類を同時に遺伝子導入し、2日後にその培養上清を回収した(P0)。その後BHK細胞培養液中にP0を感染させ3日間培養後、上清を回収しウイルス調製液(P1)とした。

5. 作製したリコンビナントウイルスの評価

Vero細胞を96ウェルプレートに 1×10^5 cell/wellとなるように調整し、24時間培養した。培養液を除去後、P1液を1から 10^{-8} まで10倍段階希釈し、Vero細胞に添加し感染させた。90分インキュベーション後にP1液を除去し、培養液に置換後20時間培養した。その後4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、抗LCMV-NP抗体を用いて免疫染色し、ウイルス価を測定した。その結果、陽性コントロールであるLCMVGリコンビナントウイルス(LCMVG WT)はVero細胞への感染が認められたが、ABVGを外殻に持つリコンビナントウイルス(ABVG WT)は感染が認められなかった(Fig.6)。

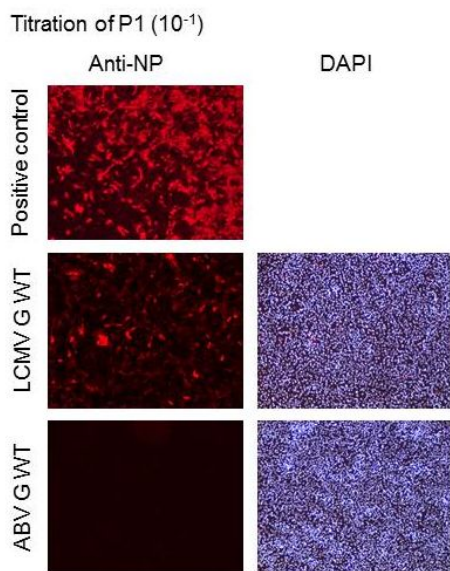


Fig. 6. リコンビナントウイルスの感染価測定

そこで BHK 細胞内でウイルス粒子が産生さ

れているか確認するため、P0 を感染された時の BHK 細胞を 4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、抗 LCMV-NP 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、陽性コントロールである LCMVG リコンビナントウイルス(LCMVG)は BHK 細胞への感染が認められ、P0 液中にウイルスが放出されていることが示唆された(Fig.7)。しかし ABVG を外殻に持つリコンビナントウイルス(ABVG)は P1 作成時に BHK に感染していないことから、ウイルス粒子の形成が起きていないことが推測された。今回 LCMV リバースジェネティクスではウイルス粒子は形成できなかった。LCMV リバースジェネティクスを用いたリコンビナントウイルスの作製は、以前 VSVG にて成功している。今回 ABVG でウイルス粒子が産生されなかった原因は不明であるが、ABV は LCMV の粒子形成と異なるメカニズムにより複製されることが示唆された。

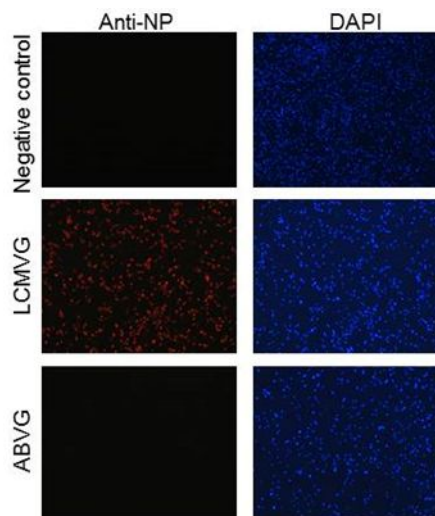


Fig.7. BHK 細胞におけるウイルス粒子の産生

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)

[雑誌論文](計2件)

1. Otsu W, Kurooka T, Otsuka Y, Sato K, Inaba M. A new class of endoplasmic reticulum export signal PhiXPhiPhi for transmembrane proteins and its selective interaction with Sec24C. J Biol Chem. 2013. 288(25):18521-18532. DOI: 10.1074/jbc.M112.443325. 査読有り

2. Sato K, Otsu W, Otsuka Y, Inaba M. Modulatory roles of NHERF1 and NHERF2 in cell surface expression of the glutamate transporter GLAST. Biochem Biophys Res Commun. 2013. 430(2):839-845. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.059. 査読有り

〔学会発表〕(計9件)

1. 篠春香、山崎弥生(大塚)、佐藤龍也、小林沙織、内田直宏、佐藤れえ子、山崎真大「メトヘモグロビン血症を疑うポメラニアンの子猫の生化学的解析」第12回日本獣医内科学アカデミー学術大会. 2016年2月19日~21日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. 佐々木 祐典、小野寺理恵、岡真一、佐々木優子、中崎公仁、中村秀之、山崎(大塚)弥生、須永隆文、泉佳代子、本望修「心肺停止後全脳虚血に対する骨髄幹細胞の静脈内投与による治療法の検討」.第16回日本脳低温療法学会.2013年7月(愛知).
3. 佐々木祐典、小野寺理恵、佐々木優子、須永隆文、大塚弥生、泉佳代子、本望修。「霊長類脳梗塞モデル(中大脳動脈閉塞)の開発と骨髄幹細胞の経静脈的移植の安全性評価」第38回脳卒中学会.2013年3月21日~23日.グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
4. 大津航、大塚弥生、宮園耕介、佐藤耕太、稲葉睦「R664X変異Anion Exchanger1(AE1)の小胞体関連分解:AE1と小胞体蛋白質との相互作用」日本膜学会第35年会.2013年5月20日~21日.早稲田大学(新宿)
5. 大津航、大塚弥生、宮園耕介、佐藤耕太、稲葉睦「膜蛋白小胞輸送の分子機構:新規シグナル配列 x x と Sec24C の選択的相互作用」.第86回日本生化学会大会.2013年9月11日~13日.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
6. 大津航、大塚弥生、宮園耕介、佐藤耕太、稲葉睦「R664X変異Anion Exchanger1(AE1)の小胞体関連分解:AE1と小胞体蛋白質との相互作用」第85回日本生化学会大会.2012年12月14日~16日福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡市)
7. 大津航、宮園耕介、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦。「新規 COPII 輸送モチーフ x x

は Sec23/24 複合体との結合を介して膜内在性タンパク質の小胞体からの放出を促進する」第154回日本獣医学学会学術集会.2012年09月14日~16日岩手大学(盛岡市)

8. 大津航、宮園耕介、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦。「新規 COPII 輸送モチーフ x x は Sec23/24 複合体との結合を介して膜内在性タンパク質の小胞体からの放出を促進する」.第49回日本生化学会北海道支部例会.2012年7月20日.北海道大学(札幌市)

9 大津航、大塚弥生、佐藤耕太、稲葉睦。「新規COPII輸送モチーフ x x は Sec23/24複合体との結合を介して膜内在性タンパク質の小胞体からの放出を促進する」日本膜学会第34年会.2012年05月8日~9日.早稲田大学(新宿)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等;なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 弥生 (OTSUKA, Yayoi)

北海道大学大学院・獣医学研究科・客員研究員

研究者番号:30396303

(2)研究分担者

佐藤 耕太 (SATO, Kota)

北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授
研究者番号:50283974

(3)連携研究者

稲葉 睦 (INABA, Mutsumi)

北海道大学大学院・獣医学研究科・教授
研究者番号:00183179