

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253027

研究課題名(和文) 感染記憶：ゲノムに刻まれたウイルス抵抗性の解明

研究課題名(英文) Infection memory: study on antiviral functions of endogenous viruses

研究代表者

朝長 啓造 (Tomonaga, Keizo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：10301920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物には、感染したウイルスの遺伝情報をゲノムに記憶し進化に利用する仕組みがあることが示唆されている。本研究は、哺乳動物ゲノムで発見された内在性ボルナウイルス様配列(EBLs)の機能、特に感染防御に関する働きを明らかにすることを目的に遂行された。本研究により、ヒト由来EBLsの発現と遺伝子発現調節機能が明らかになるとともに、マウスならびにジュウサンセンジリスにおけるEBLsがそれぞれ piRNAとタンパク質を発現して、ボルナウイルスの感染防御に働く可能性を示した。さらに、Eptesicus属コウモリに内在化したEBLsが機能性のRNA依存性RNAポリメラーゼ酵素をコードする可能性も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that our life-form has a mechanism to memorize virus infections as endogenous element in the genomes and uses them as novel genes on evolution. This study was carried out to understand the functions, especially antiviral activity, of endogenous bornavirus-like elements (EBLs) in mammalian genomes, which we found in a previous report. In this study, we demonstrated the expression regulation of EBLs in human genomes, as well as function of a human EBL to regulate neighboring gene expression. Furthermore, we showed that EBLs from mouse and Thirteen-lined ground squirrel genomes express piwi-interacting RNA and protein, respectively, and could act as antiviral factors against bornavirus infection in cultured cells. Moreover, we revealed the possibility that EBLs endogenized in the genome of the Eptesicus genus bat genome encode a functional RNA dependent RNA polymerase derived from ancient bornavirus infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性ウイルス ボルナウイルス ウイルス抵抗性 外適応 進化

1. 研究開始当初の背景

私たちの体には、さまざまな生体防御の仕組みが備わっており、繰り返される感染に対して効率よく応答できるように免疫系を進化させてきた。特に、獲得免疫においては、メモリー細胞が特定の病原体を「記憶」することで、再感染時に迅速かつ効率よく病原体を排除できる機構を確立させている。この機構は「免疫記憶」と呼ばれ、ワクチン開発に応用され、疾患の予防と治療に大きく貢献してきた。

一方、最近の研究により、生体には免疫記憶以外にも病原体の感染を「記憶」する仕組みがあることが示唆されている。これまでに、特定の内在性レトロウイルスの生体内での発現が、近縁レトロウイルスの感染を防御することが明らかとなっている。また、生殖細胞でレトロトランスポズンの転移を阻害する仕組みにも、内在性レトロウイルス由来の機能性 RNA 分子の関与が明らかとなっている。これらは、生体には、感染したウイルスの遺伝情報を内在化により「記憶」し、感染防御に利用する「感染記憶」という仕組みが存在することを示唆している。

近年まで、内在性ウイルスによる感染防御は、ゲノムへのインテグレーションを介して増殖するレトロウイルスに限られた現象であると考えられてきた。しかしながら、私たちは動物ゲノムにはレトロウイルス以外のウイルスに由来する塩基配列が多数存在することを発見した (Horie et al, Nature 2010)。なかでも、ヒトをはじめとする多くの哺乳動物のゲノムに見つかった内在性ボルナウイルス様配列 (Endogenous bornavirus-like elements: EBLs) は、現存するボルナウイルスの遺伝子配列との相同性がきわめて高く、細胞内で転写されることも明らかとなった。面白いことに、ボルナウイルスによる疾患を自然発症する動物は、ゲノムに EBLs を持たない種のみであり、EBLs を持つ動物ではボルナウイルスに対して抵抗性を示すことが確認されている。

研究開始当時、研究代表者らはヒト、マウス、ジウサンセンジリス (以下ジリス)、そしてコウモリのゲノムに存在する EBLs の発現と機能解析を行っていた。そして、以下に示す研究成果を得ていた。

(1) ヒト臓器で、3種類の EBLs 配列 (*homo sapiens* EBL nucleoprotein-1 -2, -3; hsEBLN-1, -2, -3) 由来 RNA の発現と hsEBLN-2 由来タンパク質の発現を確認した。(2) hsEBLN-1 が精巣のみで RNA を高発現していることを確認した。(3) hsEBLN-2 がミトコンドリアに局在するタンパク質であることを明らかにした。(4) hsEBLN-3 由来 RNA が、lncRNA (長鎖非コード RNA) としてボルナウイルスの複製を抑制する可能性を示した。(5) マウス (*Mus musculus*) EBLNs (mmEBLNs) が、精巣で piRNA を産生していることを明らか

にした。(6) ジリス (*Ictidomys tridecemlineatus*) EBLN (itEBLN) 由来のタンパク質が、哺乳類由来のボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) の複製を培養細胞で抑制することを証明した。(7) *Eptesicus* 属コウモリのゲノムにボルナウイルスに由来する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子がオープンリーディングフレーム (ORF) を保持したまま存在することを明らかにし、*Eptesicus* EBL L gene (eEBLL-1) と名付けた。

これらの事実から、EBLs が宿主細胞において RNA あるいはタンパク質として発現され、進化過程で何らかの機能を付与された可能性が示唆されていた。特に、ボルナウイルスの感染あるいは増殖を防御する機能があることが考えられた。すなわち、これら EBLs が「感染記憶」と名付けたウイルス感染防御機構を持つ可能性が考えられ、その機構や成り立ちを詳細に解明することで、私たちが生まれながらに持つ未知のウイルス抵抗性を明らかにできると考えられた。

2. 研究の目的

研究開始当初までに得られていた成果により、生体は、進化過程で感染したウイルスの遺伝情報を自らのゲノムに取り込むことで記憶し、感染防御に利用する仕組み「感染記憶」があることが示唆された。そこで本研究は、研究代表者が発見した哺乳動物における EBL 配列の発現や宿主細胞内での機能、特に感染防御に関わる働きを明らかにするとともに、その詳細な作用機構を解析することを目的とした。そして、私たちが生まれながらにして持つウイルス抵抗性、いわゆる遺伝免疫、の本質を明らかにすることを目標とした。本研究の遂行により、それまでに知られていない新たな抗ウイルス機構の発見に繋がるとともに、進化過程におけるウイルス内在化の意義ならびに生物ゲノムの進化について新たなパラダイムを提唱できると思われた。また、感染記憶の仕組みを利用することで、これまでとは異なる、より効果的な抗ウイルス戦略の開発にも応用できると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトをはじめとする様々な哺乳動物ゲノムに存在する EBLs の性状解析を行った。解析には、臓器や培養細胞における EBLs の発現とともに、BDV に対する EBLs の感染防御機構を様々な手法を用い、それぞれ動物由来の EBLs に応じた研究方法を用いた。以下に、それぞれの EBLs の解析で用いた研究方法について簡単に記載する。

(1) hsEBLNs に関する研究：購入した様々なヒト臓器由来 RNA を用いて、hsEBLNs RNA の発現をリアルタイム RT-PCR で測定した。また、hsEBLN-1 RNA 発現におけるエピ

ジェネティックな制御について、ヒトオリゴデンドログリオーマ由来細胞を用いて解析した。さらに、hsEBLN-1 RNA の発現が hsEBLN-1 の近傍遺伝子発現に与える影響についても検証を行った。

(2) itEBLN に関する研究：共同研究により入手したジュウサンセンジリス (TLS) 由来臓器における itEBLN 由来 RNA ならびにタンパク質の発現を qRT-PCR とウェスタンブロット法にて解析した。また、itEBLN 由来タンパク質が BDV の複製に与える影響を明らかにするために、TLS ゲノムより itEBLN 領域を発現プラスミドにクローニングを行い、BDV 持続感染細胞にトランスフェクションにより導入を行った。また、組換え itEBLN タンパク質を恒常発現するヒト由来細胞を作製することで、itEBLN タンパク質発現による BDV 感染阻害効果を検討した。

(3) mmEBLNs に関する研究：マウス精巣における mmEBLN 由来低分子 RNA の発現を検出するために、マウス精巣由来低分子 RNA を精製し、次世代シーケンシスによる解析を行った。また、mmEBLN 由来 piRNA の発現を既存のデータベースを用いて検証した。

(4) eEBLN に関する研究：Eptesicus 属コウモリのゲノムにボルナウイルスに由来 RdRp 遺伝子の発現を、わが国で捕獲した Eptesicus 属コウモリ由来の組織サンプルを用いて RT-PCR 法にて検出した。また、検出された eEBLN の進化系統学的解析を定法にない行った。

4. 研究成果

(1) hsEBLNs に関する研究

生物は、感染したウイルス遺伝子をゲノムに組み込むことで進化してきたと考えられている。これまでに、生物のゲノムに組み込まれたウイルス遺伝子の生物ゲノムへの影響は、レトロウイルス以外では知られていなかった。今回の解析により、ヒトゲノムに組み込まれた EBLN 由来配列がヒト遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。さらに、このウイルス由来配列の詳しい発現解析から、ヒトゲノムには RNA ウイルス由来配列の発現を抑える仕組みがあることが証明された。

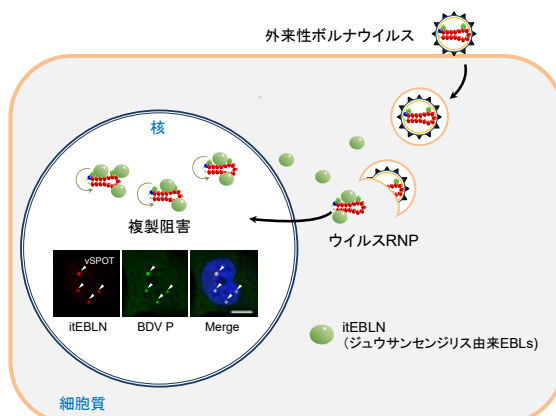
本研究は、生物ゲノムに組み込まれている RNA ウイルス由来配列の詳しい発現様式を明らかにした初の報告である。また、ヒトゲノムに存在する7つの内在性ボルナウイルス配列 hsEBLNs がそれぞれの臓器で異なる発現を示すこと、そして特定の hsEBLN では精巣以外での発現が抑えられていることを発見した。さらに、精巣以外での発現が抑えられている hsEBLN がヒストン脱アセチル化酵素および DNA メチル化酵素による複合的な転写抑制を受けていることを明らかにした。面白いことに、脱アセチル化酵素が優位に働

く転写制御機序は、内在性レトロウイルスではほとんど報告されておらず、内在性レトロウイルスと内在性ボルナウイルスとでは、転写抑制の仕組みが異なることが示された。一方、発現が抑えられている hsEBLN の発現を人工的に上昇させることで、近接する遺伝子の発現量に変化した。これは、ゲノムへの影響が謎であった RNA ウイルス由来配列の宿主ゲノム進化への関与を示す画期的な発見であり、ウイルスと宿主である人類が互いに関連し合って進化してきた“共進化”を解明する新しい手掛かりになると期待された。また、宿主細胞における EBLs の発現制御および発現産物の機能の解明は新しいウイルス防御法の発見にもつながると期待された。

(2) itEBLN に関する研究

itEBLN は、外来性ボルナウイルスの N 遺伝子とアミノ酸レベルで 77%の相同性を有している。今回の解析から、TLS 臓器での mRNA としての発現が確認されるとともに、タンパク質として翻訳されている可能性が示された。また、itEBLN のタンパク質としての機能を予測するため、組換え itEBLN を作成し、BDV 感染に対する効果を検討した。その結果、一過性に発現させた組換え itEBLN は、BDV 持続感染細胞の核内に形成されるウイルス複製点 (vSPOT) に局在し、ウイルス mRNA ならびにゲノム RNA レベルを有意に減少させた。そこで次に、組換え itEBLN を恒常的に発現するヒト由来細胞株を作成し、BDV 感染実験を行なったところ、itEBLN 恒常発現細胞では BDV の感染が顕著に阻害されることが示された。さらに、itEBLN と BDV の複製複合体である RNP が結合していること、itEBLN の発現により BDV ポリメラーゼの転写活性が有意に低下することが明らかになった。

今回の研究により、itEBLN はタンパク質として BDV の複製を顕著に抑制することが示された。その詳細な機序については不明だが、itEBLN は BDV-N タンパク質のドミナント・ネガティブ阻害体として機能すると考えられた (図)。本研究は、レトロウイルス以外のウイルスに由来する内在性因子による



ジュウサンセンジリス由来内在性ボルナウイルス様因子 (itEBLN) による外来性ボルナウイルス (BDV) の感染阻害。itEBLN は、ウイルス RNP に取り込まれ、感染細胞核内に形成される複製点 vSPOT に侵入すると考えられる。itEBLN は BDV-N タンパク質のドミナント・ネガティブ阻害体として複製を阻害すると思われる。

外来性ウイルスの感染阻害を示した初めての報告である。

(3) mmEBLNs に関する研究

本研究では、哺乳類ゲノムに内在化している EBLN が、原核生物で CRISPR のスパーサーとガイド RNA によりファージに対する抵抗性を獲得するのと同様の方法で、哺乳類のウイルス抵抗性に関与していると考え、EBLN からの低分子 RNA の産生を検討した。その結果、げっ歯類と霊長類のゲノムにおいてそれぞれ独立に獲得された EBLN 配列より、低分子 RNA である piwi-interacting RNA (piRNA) が産生していることが明らかとなった。また、げっ歯類と霊長類において、EBLN 配列の多くがゲノム中の piRNA 産生領域に内在化していることを明らかにし、piRNA を産生する系統が選択的に進化を勝ち抜いてきた可能性を示した。piRNA はレトロトランスポゾンや内在性レトロウイルスの転移阻止に関与していることがわかっている。このことから、EBLN 由来 piRNA がボルナウイルスに対する配列特異的な免疫記憶として、原核生物の CRISPR/Cas システムと同様に、哺乳動物において機能していると考えられた。

本研究では、宿主が RNA ウイルスの配列をゲノムへ組み込み、再び RNA として発現し (transcription reversion)、既存の piRNA サイレncing 経路 (anamnesic piRNA silencing) を利用することでウイルスに対する抵抗性に機能するという Transcription reversion and anamnesic piRNA silencing (TRAP) 仮説を提唱した。

(4) epEBLL に関する研究

本研究では、*Eptesicus* 属のコウモリのゲノムに存在する、EBLL 配列 (eEBLL-1) に関する研究を行った。eEBLL-1 はボルナウイルスの L 遺伝子とほぼ同じ長さの、5,000 塩基以上からなる巨大な ORF を持っている。進化的解析により、eEBLL-1 は 1,180 万年以上に *Eptesicus* 属コウモリのゲノムに内在化し、現代に至るまで巨大な ORF を維持してきたことが明らかとなった。また、進化の過程において eEBLL-1 に自然選択が作用していることがわかり、機能的なタンパク質をコードしていることが示唆された。eEBLL-1 のアミノ酸配列を解析すると、RdRp 活性に必須の配列がすべて存在することがわかった。さらに、*Eptesicus* 属コウモリの体内で eEBLL-1 が mRNA として転写されていることを実験的に証明した。これらのことから、eEBLL-1 は *Eptesicus* 属コウモリにおいて機能的タンパク質をコードすることが強く示唆され、RdRp として働く可能性が考えられた。

哺乳動物は RdRp を持っていない。一方、植物等のゲノムは RdRp をコードしており、抗ウイルス機構や遺伝子発現調節機構において重要な役割を担っていることが報告されている。本研究は、哺乳動物がウイルスから RdRp を獲得したことを示唆する世界で初めての研究であり、哺乳動物とウイルスの共

進化の解明する新たな手がかりになる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

- ① Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Mühldorfer K, Kurth A, Müller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmler M and Tomonaga K. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient RNA virus. *Sci Rep* 6:25873 (2016) doi: 10.1038/srep25873. 査読有
- ② Parrish NF and Tomonaga K. Endogenized viral sequences in mammals. *Curr Opin Microbiol.* 31:176-183. (2016) 査読有
- ③ Honda T and Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mobile Genetic Elements* 6:e1165785 (2016) doi: 10.1016/j.mib.2016.03.002. 査読有
- ④ 本田知之, 朝長啓造. 内在性 RNA ウイルスエレメントによる多彩な細胞内 RNA 制御. *ウイルス*. 66: 39-46 (2016) <http://doi.org/10.2222/jsv.66.39> 査読無
- ⑤ 朝長啓造. ヒトゲノム内の RNA ウイルス由来配列の制御機構と機能. *医学のあゆみ* 259(2): 193-194 (2016) <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=aa7ayuma/2016/025902/011&name=0193-0194j&UserID=130.54.13.0.245> 査読無
- ⑥ Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T and Tomonaga K. piRNA derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* 21:1691-1703 (2015) doi: 10.1261/rna.052092.115. 査読有
- ⑦ Sofuku K, Parrish NF, Honda T and Tomonaga K. Transcription profiling demonstrates epigenetic control of non-retroviral RNA virus-derived elements in the human genome. *Cell Rep.* 12:1548-1554 (2015) doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.007. 査読有
- ⑧ Fujino K, Horie M, Honda T, Merriman DK and Tomonaga K. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:13175-13180 (2014) doi: 10.1073/pnas.1407046111. 査読有

[学会発表] (計 125 件)

- ① 朝長啓造. 哺乳動物ゲノムに内在化しているボルナウイルス由来因子の機能解

- 析. 第 39 回分子生物学会 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- ② 藤野 寛, 鈴木朋弥, 田原口智士, 朝長啓造. ジュウサンセンジリス由来内在性ボルナウイルスのボルナ病ウイルス感染阻害機構の解明. 第 39 回分子生物学会 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- ③ Keizo Tomonaga. Transcription profile and prospective function of non-retroviral RNA virus-derived elements in mammalian genomes. International Conference of the Genetics Society of Korea 2016. Jeju Island, Korea 2016 年 11 月 10 日
- ④ 小嶋将平, 本田知之, 朝長啓造. ウイルス感染を抑制する内在性ボルナウイルス由来 RNA エLEMENTの進化. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- ⑤ Kojima S, Tomonaga K. A novel lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome is inhibitor against exogenous virus infection. Regulatory & Non-Coding RNAs, CSHLM, Cold Spring Harbor, New York USA, 2016 年 8 月 23-27 日
- ⑥ Kojima S, Honda T and Tomonaga K. A lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome functions as a potent inhibitor of exogenous virus infection. RNA2016. Kyoto 2016 年 6 月 28 日-7 月 2 日
- ⑦ 本田知之, 朝長啓造: RNA ウイルス配列の内在化により宿主が獲得したウイルス抵抗性の解明. BMB2015. 神戸. 2015 年 12 月 1-4 日
- ⑧ Tomonaga K: Co-evolution of bornaviruses and their hosts. 第 63 回日本ウイルス学会. 福岡. 2015 年 11 月 22-24 日
- ⑨ Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Akasaka T, Fujino K, Kohl C, Gillich N, Mueller M, Corman VM, Wibbelt G, Kurth A, Ogawa H, Imai K, Suzuki Y, Schwemmler M, Tomonaga K. A putative RNA-dependent RNA polymerase gene derived from an ancient bornavirus in bats. 第 63 回日本ウイルス学会. 福岡. 2015 年 11 月 22-24 日
- ⑩ Kojima S, Honda T, Tomonaga K: Analysis of antiviral role and its mechanism of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein in Borna disease virus infection. 第 63 回日本ウイルス学会. 福岡. 2015 年 11 月 22-24 日
- ⑪ 惣福梢. 本田知之, 朝長啓造: ヒト内在性ボルナウイルス様 N エLEMENT 転写産物による周辺遺伝子発現制御機構. 第 17 回日本 RNA 学会年会. 札幌. 2015 年 7 月 15-17 日
- ⑫ Parrish NF, Makino A, Honda T and Tomonaga K. Endogenous bornavirus-like

- nucleoprotein elements give rise to piwi-interacting RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA. 2015 年 5 月 22 日.
- ⑬ 本田知之, 小嶋将平, 朝長啓造 内在性ボルナウイルス様ELEMENTの非コードRNAとしての生理機能解明 第37回日本分子生物学会年会 横浜 2014 年 11 月 25-27 日
- ⑭ 惣福梢, 本田知之, 小嶋将平, 朝長啓造 ヒト内在性ボルナウイルス様 N エLEMENTのエピジェネティック制御機構 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月 10-12 日
- ⑮ Shohei Kojima, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga, Nuclear localization of RNA derived from endogenous bornavirus-like nucleoprotein 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム 奈良 2014 年 9 月 23-26 日
- ⑯ Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Tomoyuki Honda, Takumi Akasaka, Nadine Gillich, Marcel Muller, Victor M. Corman, Yoshiyuki Suzuki, Keizo Tomonaga. Putative mammalian RNA-dependent RNA polymerase genes derived from an ancient Bornavirus/ International Union of microbiological Societies Congresses Montreal, CANADA July27-August 1,2014
- ⑰ Keizo Tomonaga. Bornavirus infection: a unique life style of an animal RNA virus in the DNA habitat. DNA Habitat and its RNA Inhabitants. Salzburg Austria. 3-5 July, 2014.

[図書] (計 3 件)

- ① 堀江 真行, 朝長啓造. ボルナウイルス感染症 人獣共通感染症 改訂 3 版 木村 哲, 喜田宏編, p163-168. 医薬ジャーナル社 (2015)

[産業財産権]

なし

[その他]

<https://t.mavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝長 啓造 (TOMONAGA, Keizo)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 10301920

(2) 連携研究者

本田 知之 (HONDA, Tomoyuki)
大阪大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80402676