

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870286

研究課題名(和文) ウイルスから探る分裂期染色体へのRNP局在機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the localization mechanism of RNP to the mitotic chromosomes by using the virus

研究代表者

平井 悠哉 (HIRAI, Yuya)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90710369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ボルナ病ウイルス(BDV)の、RNAとタンパク質の複合体であるRNPの染色体上への局在機構を明らかにすることを目指した。その結果、(1)間期と分裂期においては、RNPの存在様式が異なること、(2)特定のタンパク質との相互作用、あるいは細胞周期における核膜の崩壊が、分裂期染色体上へのRNPの局在を制御していること、が明らかになった。これらの結果により、RNPの染色体上への一般的な局在機構が説明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I aimed to reveal the localization mechanism of Borna disease virus (BDV) RNP, the complex of RNA and proteins, to the mitotic chromosomes. As a result, I showed that (1) the form of BDV RNP was different between in interphase and in mitotic phase, (2) the localization of BDV RNP to the mitotic chromosomes was regulated by the interaction with certain proteins, or the disruption of a nuclear envelope in the cell cycle. It is expected that these results explain the fundamental localization mechanism of RNP to the mitotic chromosomes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：分裂期染色体 BDV RNP RBMX 超解像顕微鏡法

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞分裂時において、染色体は高度に凝集し娘細胞に等分配される。分裂期染色体上に、RNA とタンパク質の複合体である RNP の存在は認められていたものの、染色体と RNP との関連についてはほとんど明らかにされていなかった。

(2) ボルナ病ウイルス (BDV) は核内で複製を行う RNA ウイルスであり、細胞分裂期には、自身のゲノム RNA を含む RNP を染色体上に局在させる。しかし、それらの相互作用や BDV の RNP の染色体上への局在機構の詳細などは明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

BDV の RNP を、分裂期染色体上に局在する RNP のモデルとして捉え、それらの相互作用や娘細胞への分配機構の詳細を明らかにすることで、広く細胞一般に当てはまる、RNP の分裂期染色体上への根本的な局在機構を解き明かすことを目的とした。具体的には、

- (1) RNP-染色体間相互作用に関与する因子の同定
- (2) 同定された因子が担う、RNP-染色体間相互作用に対する役割の解析
- (3) RNP と同定された因子の、分裂期における相互作用の時空間的解析

以上の3点を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) BDV 感染細胞から分裂期染色体を単離し、BDV の RNP のコアタンパク質である N に対する抗体を用い、免疫沈降を行った。共沈降されたタンパク質群を、質量分析法により同定した。また、核の不溶性画分からも同様に、免疫沈降および質量分析法により BDV の RNP と結合するタンパク質群を同定した。

(2) 同定されたタンパク質を、siRNA を用いてノックダウンし、細胞内における BDV の RNP の局在を共焦点顕微鏡法により観察した。また、ノックダウンによる BDV の転写・複製の変化の有無を、定量 PCR により検証した。

(3) BDV 感染細胞に対して、抗 N 抗体および抗 P 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。超解像顕微鏡法の一種である structured illumination microscopy (SIM) により、分裂期染色体上に存在する BDV の RNP の詳細な局在、また、BDV が感染細胞の核内に形成する構造体の微細構造を観察した。

### 4. 研究成果

- (1) BDV 感染細胞の分裂期染色体および核

内不溶性画分において、抗 N 抗体を用いた免疫沈降およびそれに引き続く質量分析により、BDV の RNP と結合するタンパク質として、クロマチン結合タンパク質である RBMX を同定した。まずは RBMX が実際に BDV の RNP と結合するかどうかを、免疫沈降法により検証した。その結果、RBMX と BDV の RNP のコアタンパク質である N は実際に相互作用することが明らかになった。

(2) siRNA を用いて RBMX をノックダウンし、定量 PCR によって BDV の転写・複製の量を調べたところ、RBMX のノックダウンにより、BDV の転写・複製ともに減少することが明らかになった。また RBMX のノックダウンにより、間期の核内に見られる BDV の RNP が形成する核内構造体である vSPOTs の構造は崩壊し、RNP はヘテロクロマチン上に局在した (図 1)。またその RNP の構造は、分裂期染色体上に見られるものと同様の構造であることが明らかになった。

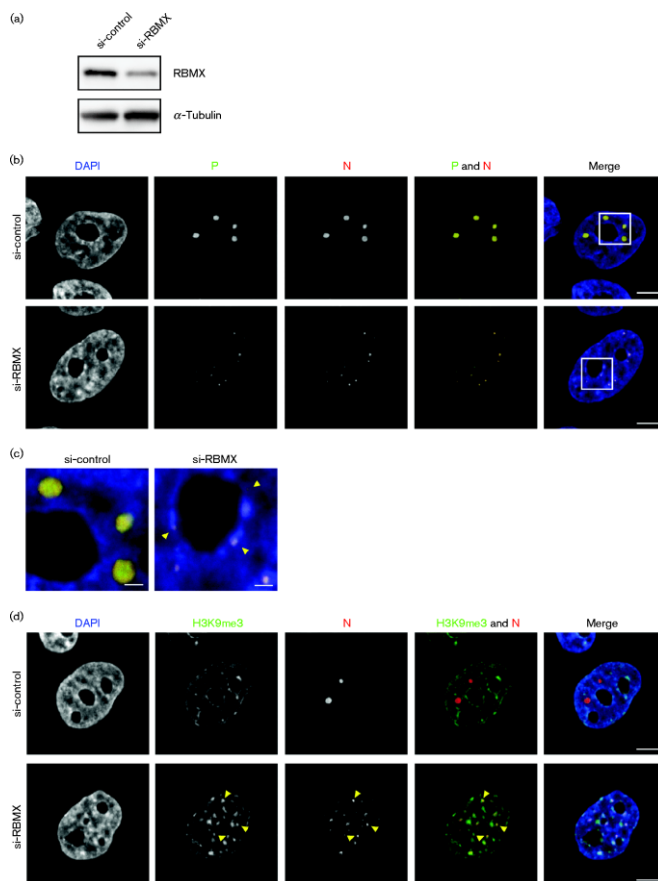


図 1 RBMX は vSPOTs の構造を維持する。

(3) BDV の RNP を構成するタンパク質である N と P の、間期および分裂期における詳細な局在を、超解像顕微鏡法の一つである SIM により観察した。その結果、間期において N と P は、vSPOTs の外縁付近のみで共局在することが明らかになった。また分裂期においては、N と P は染色体上においてごく近傍に局在した (図 2)。また vSPOTs は、核膜が崩壊する直前の分裂期の前期まではその構造が確認されるものの、核膜が崩壊する前中期にはその構造は崩壊することも明らかになった (図 3)。

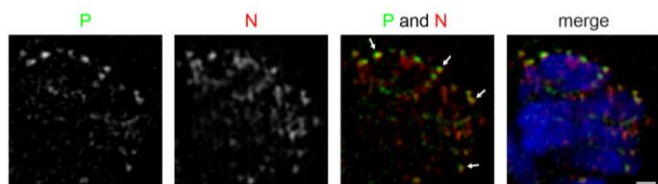


図 2 分裂期染色体上における、BDV の RNP の微細構造

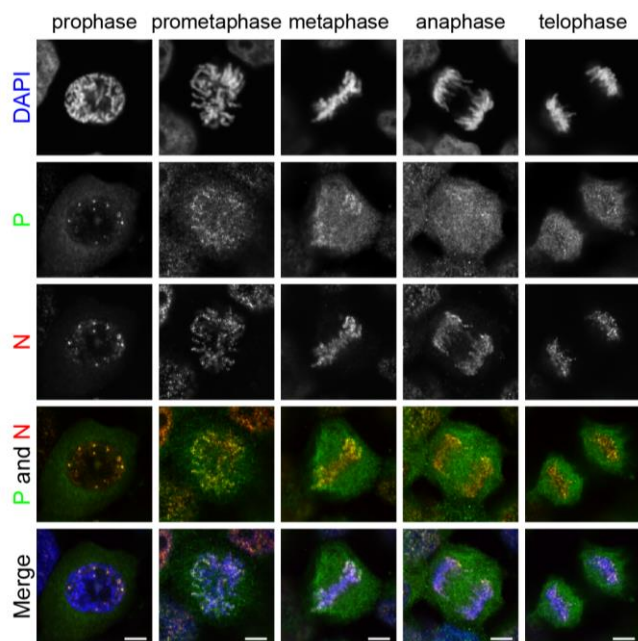


図 3 vSPOTs は分裂期における前中期に崩壊する。

これらの結果を総括すると、間期と分裂期に見られる RNP はその存在様式が異なり、特定のタンパク質との相互作用および核膜崩壊などのスイッチが、分裂期染色体上への RNP の局在を制御している可能性が示唆された。特に超解像顕微鏡法による解析は当初予定していたものではなかったが、それにより得られた知見は、今後 RNP の存在様式を明らかにする研究をけん引するものとして期待される。

## 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 Yuya Hirai, Yasuhiro Hirano, Atsushi Matsuda, Yasushi Hiraoka, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga. Borna Disease Virus Assembles Porous Cage-like Viral Factories in the Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有. 2016 ; 291(50) : 25789-25798. DOI: 10.1074/jbc.M116.746396.
- ② Yuya Hirai, Tomoyuki Honda, Akiko Makino, Yuzo Watanabe, Keizo Tomonaga. X-linked RNA-binding motif protein (RBMX) is required for the maintenance of Borna disease virus nuclear viral factories. *Journal of General Virology*. 査読有. 2015 ; 96(11) : 3198-3203. DOI: 10.1099/jgv.0.000273.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 平井悠哉. 核内アクチンによるボルナ病ウイルスの RNP の機能制御機構の解明. Symposium. 2017年1月16日~2017年1月18日. ラグナガーデンホテル (沖縄県・宜野湾市)
- ② Yuya Hirai, Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Hideyuki Okamura, Keizo Tomonaga. The analysis of the possible relationship between Borna disease virus and nuclear actin. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016年10月23日~2016年10月25日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ③ 平井悠哉. ボルナ病ウイルス特異的核内構造体の構造に影響を与える宿主因子の解明. 5th Negative Strand Virus-Japan Symposium. 2016年1月25日~2016年1月27日. ホテルモンテレ沖繩 (沖縄県・国頭郡)
- ④ 平井悠哉, 本田知之, 牧野晶子, 岡村英幸, 朝長啓造. RBMX はボルナウイルスが形成する核内構造体の構造を維持する. BMB2015. 2015年12月1日~2015年12月4日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ⑤ 平井悠哉. 超解像顕微鏡法によるボルナウイルス特異的核内封入体の構造観察および機能の解明. 4th Negative Strand Virus-Japan Symposium. 2015年1月19日~2015年1月21日. 沖縄ラグナガーデンホテル (沖縄県・宜野湾市)
- ⑥ 平井悠哉, 平野泰弘, 本田知之, 平岡泰, 朝長啓造. 超解像顕微鏡法によるボルナウイルス特異的核内構造体の構造および機能の解明. 第 32 回染色体ワークショップ、第 13 回核ダイナミクス研究会.

- 2014年12月15日～2014年12月17日.  
安芸グランドホテル(広島県・廿日市市)
- ⑦ 平井悠哉, 平野泰弘, 本田知之, 牧野晶子, 平岡泰, 朝長啓造. 超解像顕微鏡法によるボルナウイルス核内封入体の構造および機能の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10日～2014年11月12日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2016/tomonaga1612.html>

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/about/y2015/hirai201511.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 悠哉 (HIRAI, Yuya)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90710369