

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860336

研究課題名(和文)核内RNAウイルスと宿主DNA損傷の相互作用解析

研究課題名(英文)Involvement of DNA damage response pathway in RNA virus infection in the nucleus

研究代表者

本田 知之 (Honda, Tomoyuki)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：80402676

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)：宿主ゲノムDNAは、生命活動の中核であり、遺伝情報の基盤である。ゲノムDNAは、DNAウイルス感染により損傷を受けることが報告されている。しかし、RNAウイルス感染におけるDNA損傷については、ほとんど研究が進んでいなかった。本研究では、核に持続感染するRNAウイルス、ボルナ病ウイルス(BDV)とDNA損傷およびその修復機構(DDR)との関連を検討した。BDVの転写・複製の場には、DNA損傷マーカーやDDR関連分子が集積した。DDR関連分子の阻害剤により、BDVの転写・複製バランスが変化した。これらのことから、BDVはDDRと相互作用し、自身の転写・複製を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many environmental and physiological factors, such as infection of DNA viruses, can directly induce genome DNA damages and activate DNA damage response (DDR) pathways. Unlike DNA viruses, infection in the nucleus is uncommon for RNA viruses. Therefore, interaction between RNA virus and DDR pathways has been largely unknown.

Borna disease virus (BDV), a non-segmented, negative strand RNA virus, can establish persistent infection in the nucleus. BDV generates viral speckles of transcripts (vSPOTs) in the nucleus as the viral replication compartment. In this study, we found that H2AX co-localizes with vSPOTs. On the other hand, neither acute nor persistent infection of BDV could activate DDR in infected cells. Furthermore, the inhibition of DDR altered the balance between BDV transcription and replication in the infected cells. These observations suggested that BDV may locate preferably at the DDR focus to regulate its balance between replication and transcription.

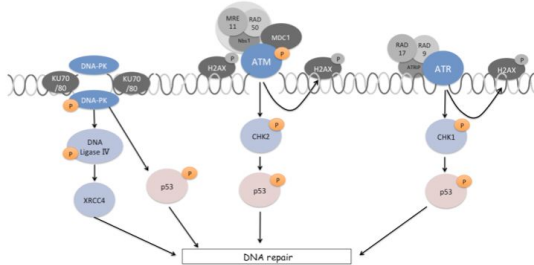
研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス 核 DNA損傷 DNA損傷修復系

1. 研究開始当初の背景

宿主ゲノム DNA は、生命活動の中核であり、遺伝情報の基盤である。ゲノム DNA は、常に様々な要因により損傷を受けている。その要因の一つに、ウイルス感染がある。ウイルス感染と DNA 損傷については、がんウイルスを中心に DNA ウイルスで活発に行われてきた。DNA ウイルスの中には宿主の DNA 損傷修繕機構(DDR、図1)を利用し、自身の増殖を促進するものも見出されている。例えば、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のタンパク質 IE1/IE2 は DDR 経路の一つである ATM 経路を活性化し、自身の複製を促進している。さらに、HCMV 感染時、HCMV Replication compartments (RCs)に DDR 関連因子が集積することも報告されている。一方、RNA ウイルス感染における DNA 損傷については、ほとんど研究が進んでいなかった。

図1 主なDDR経路



2. 研究の目的

ボルナ病ウイルス(BDV)は、マイナス鎖1本鎖 RNA ウイルスである。多くの RNA ウイルスは細胞質で増殖する。一方、BDV は、細胞核に持続感染するというユニークな特徴を持つ。我々は、これまでに、BDV が宿主クロマチンと結合し、核内に持続感染していることを明らかにしている。本研究では、核内 RNA ウイルス感染における DNA 損傷および DDR について、BDV をモデルウイルスとして検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BDV 特異的核内構造物(viral speckles of transcripts; vSPOTs)に集積する DDR 関連分子の探索

BDV は、持続感染細胞核内に、BDV リボタンパク質複合体(RNP)で構成される vSPOTs を形成する。この構造物は、BDV の転写・複製と関連があると考えられている。BDV と宿主 DDR 分子に相互作用があるとするならば、その分子は vSPOTs に局在する可能性が高い。そこで、免疫染色法を用いて、vSPOTs に局在する DDR 関連分子を探索した。

(2) BDV による DNA 損傷の評価

BDV 急性感染細胞、持続感染細胞について、DNA 損傷のマーカー分子である H2AX の量や染色像を解析した。また損傷された DNA 量をコメットアッセイにて検証した。さらに、その下流分子群についてもウエスタンブロット方にて検討

を行った。

(3) DDR 関連分子が BDV に与える影響の評価

X 線照射細胞における BDV 感染事前に X 線照射にて DNA 損傷および DDR 経路を誘導した上で、BDV の急性感染を行なった。X 線照射の有無で、BDV 感染拡大に影響が出るか評価した。

DDR 関連分子の阻害剤を用いた解析 BDV 持続感染細胞に各種 DDR 関連分子阻害剤を作用させ、BDV と DDR 関連分子の相互作用に与える影響および BDV 転写・複製に与える影響について、免疫染色法やリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

本研究により、以下の通りの成果を得た。これらの成果により、BDV が DDR 関連分子のうち DNA-PK と相互作用すること、DNA-PK との相互作用により BDV の転写・複製バランスが変化することなど、RNA ウイルスと DDR 関連分子との相互作用について新知見を見出すことが出来た。これらは、今後インフルエンザウイルスなど核に感染する他の RNA ウイルスと DDR 関連分子との相互作用を解析する上で、基盤的な知見であり、本研究の目的は十分に達せられたと考えられる。

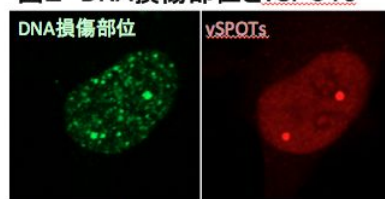
(1) BDV 特異的核内構造物(viral speckles of transcripts; vSPOTs)に集積する DDR 関連分子の探索

下記の結果から、vSPOTs に DDR 関連分子が集積していることが明らかとなった。

DDR 関連分子のうち、H2AX やリン酸化 ATM、リン酸化 DNA-PK などが、vSPOTs と共存することを見出した(図2)。

他の核内宿主構造物である Cajal body や PML body については、DDR 関連分子との共存は認めなかった。

図2 DNA損傷部位とvSPOTs



OB cells x400

(2) BDV による DNA 損傷の評価

下記の結果から、BDV は DNA 損傷および DDR 経路を誘導しないことが明らかとなった。

BDV を感染させて3日後、感染細胞における DNA 損傷を H2AX にて評価した。その結果、BDV 急性感染では、DNA 損傷を誘導しないことが明らかとなった。

BDV 持続感染においても、非感染細胞と比較して DNA 損傷の増加は認めなかった。

BDV 持続感染細胞については、コメットアッセ

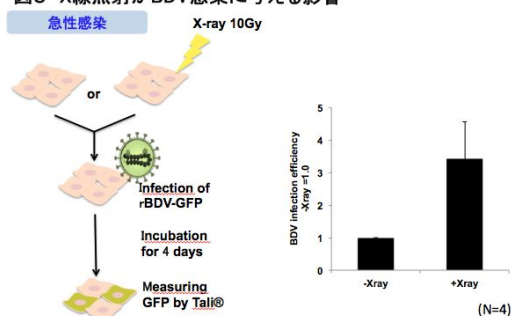
イによる DNA 損傷の評価も行なった。しかし、上記の結果同様、BDV 感染による DNA 損傷の誘導を検出することは出来なかった。

DDR 経路下流の分子のリン酸化レベルを、BDV 持続感染細胞と非感染細胞で比較した。しかし、両者の間で、DDR 下流分子のリン酸化に変化を認めなかった。

(3) DDR 関連分子が BDV に与える影響の評価
下記の結果から、DNA-PK が少なくとも BDV の転写・複製バランスを変化させることが明らかとなった。

X 線照射された細胞では、BDV の感染効率が増加していることが明らかとなった(図3)。

図3 X線照射がBDV感染に与える影響



BDV 持続感染細胞に X 線照射したところ、BDV の転写・複製バランスが変化した。

BDV 持続感染細胞に DDR 関連分子(ATM、ATR、DNA-PK)の各種阻害剤を作用させた。その結果、DNA-PK 阻害剤を添加した時のみ、BDV の転写・複製バランスに変化が出た。この時、vSPOTs とリン酸化 DNA-PK との核内での共局在は減少していた。

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 4 件)

1. Makino A., Fujino K., Parrish NF., Honda T., Tomonaga K.

Borna disease virus possesses an NF- κ B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene.

Scientific Reports, 5, 8696, 2015 査読有
doi: 10.1038/srep08696

2. Kojima S., Honda T., Matsumoto Y., Tomonaga K. (*) Heat stress is a potent stimulus for enhancing rescue efficiency of recombinant Borna disease virus. Microbiology and Immunology, 58(11), 636-642, 2014 査読有
doi: 10.1111/1348-0421

3. Fujino K., Horie M., Honda T., Merriman DK., Tomonaga K.
Inhibition of Borna disease virus

replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(36), 13175-13180, 2014 査読有
doi: 10.1073/pnas.1407046111

4. Honda T., Tomonaga K. (*)

Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in Borna disease virus infection.

Viruses, 5(8), 1978-1990, 2013 査読有
doi: 10.3390/v5081978

*は研究代表者が corresponding author.

[学会発表](計 20 件)

1. 惣福梢

DNA ダメージとボルナ病ウイルスとの関連性の解析

第 8 回日本ボルナウイルス研究会、2015 年 3 月 24 日、京都産業大学(京都)

2. 平井悠哉

超解像度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、2015 年 1 月 19-21 日、ラグナガーデンホテル(沖縄)

3. 本田知之

ボルナ病ウイルスの神経病原性に関する研究

第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10 日、パシフィコ横浜(横浜)

4. 本田知之

ボルナ病ウイルスと核内宿主機構

第 11 回ウイルス学キャンプ、2014 年 9 月 17-18 日、ニューウェルシティ湯河原(静岡)

5. 惣福梢

ボルナ病ウイルスが DNA ダメージ修復因子に与える影響

第 7 回日本ボルナウイルス研究会、2014 年 3 月 25 日、京都大学(京都)

6. 本田知之

核内におけるウイルス RNA 検知機構の解明

第 2 回感染症国際センターシンポジウム、2014 年 3 月 18 日、東京大学医科学研究所(東京)

7. 本田知之

細胞核におけるボルナ病ウイルス持続感染機構の解明

第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会、2013 年 11 月 25-27 日、ホテルおかだ(箱根)

8. 平井悠哉
クロマチン結合タンパク質 RBMX を介した
ボルナウイルスの複製機構の解析
第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイ
ナミクス研究会、2013 年 11 月 25-27 日、
ホテルおかだ（箱根）

9. 本田知之
RNA ウイルスと LINE-1 との相互作用解析
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月
3-6 日、神戸国際会議場（神戸）

10. 惣福梢
ボルナ病ウイルスタンパク質と DNA ダメー
ジ修復因子の相互作用
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年
11 月 10-12 日、神戸国際会議場（神戸）

10. 平井悠哉
ボルナウイルス感染細胞における特異的核
内構造体 vSPOT の構造形成メカニズムの解
明
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年
11 月 10-12 日、神戸国際会議場（神戸）

11. 本田知之
ボルナ病ウイルス RNP 複合体の制御機構の
解析
第 10 回ウイルス学キャンプ、2013 年 5 月
30-31 日、ニューウェルシティ湯河原（静岡）

12. 惣福梢
ボルナウイルスと DNA ダメージの関連性
第 10 回ウイルス学キャンプ、2013 年 5 月
30-31 日、ニューウェルシティ湯河原（静岡）

〔図書〕(計 4 件)

1. 本田知之
「ボルナ病ウイルスの神経病原性に関する
研究」
ウイルス、第 65 巻 1 号、2015、印刷中

2. 本田知之、朝長啓造
「ボルナ病ウイルス感染症の病態研究」
化学療法の領域、Vol.31 No.4、640-647、2015

3. 本田知之
「ボルナウイルス」
別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、
No.26、637-640、2013

4. Honda T., Tomonaga K. (*)
Host Molecular Chaperones: Cell Surface
Receptors for Viruses.
Heat Shock Proteins, 7 (Dr. Brian
Henderson (Ed.)), 293-307, 2013
doi: 10.1007/978-94-007-6787-4_19

*は研究代表者が corresponding author.

〔産業財産権〕
出願・取得状況（計 0 件）
特記事項なし。

〔その他〕
ホームページ等
本研究は、京都大学ウイルス研究所ヒトがん
ウイルス研究分野にて行われた。研究室のホ
ームページは以下の通り。
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/>

アウトリーチ活動等
京都大学ウイルス研究所主催の研究所見学
会にて、研究内容の一端を一般公開した。平
成 27 年度京都大学サマースクールにて、研
究内容の一端を高校生に解説する予定であ
る。

6. 研究組織
(1) 研究代表者
本田 知之 (HONDA, Tomoyuki)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：80402676

(2) 研究分担者
研究分担者なし。

(3) 連携研究者
連携研究者なし。

(4) 研究協力者
平井 悠哉 (HIRAI, Yuya)
惣福 梢 (SOFUKU, Kozue)