

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08496

研究課題名(和文)レトロトランスポゾンを紹介した新しい宿主-RNAウイルス間相互作用の探索と解析

研究課題名(英文) Interactions between retrotransposon and RNA viruses

研究代表者

本田 知之 (Honda, Tomoyuki)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80402676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ボルナ病ウイルス(BDV)の配列は逆転写され、宿主ゲノムに取り込まれる。この反応には、BDVと宿主レトロトランスポゾンであるLINEとの相互作用が関与すると考えられている。しかし、その生理的意義やLINE自身の生理機能については不明であった。本研究では、ウイルスとLINEとの相互作用と、その相互作用の結果生じたゲノム中のウイルス由来配列の生理的意義を解明した。その結果、BDV感染がLINE活性に影響すること、ゲノム中のBDV由来配列からはpiRNAが発現し、BDV mRNAを抑制することを見出した。以上より、LINEはウイルス配列の取り込みを促進し、宿主にウイルス抵抗性を賦与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The sequence of Borna disease virus (BDV) is reverse transcribed and integrated into the host genome. It is thought that this reaction is regulated by the interaction between BDV and LINE (long interspersed nuclear element), a host retrotransposon. However, the physiological significance of this phenomenon and the physiological function of LINE itself were still unknown. In this study, we elucidated the interaction between virus and LINE and the physiological significance of virus-derived sequences in the genome generated by the virus-retrotransposon interaction. We found that BDV infection indeed affects LINE activity, that BDV-related sequences in the mouse genome (mmEBLs) produce mmEBL-derived piRNAs, and that the mmEBL-derived piRNAs suppress mRNA with BDV-related sequences. From these results, we have proposed that LINE promotes the uptake of viral sequences into the host genome and imparts virus resistance to the host.

研究分野：ウイルス学

キーワード：レトロトランスポゾン RNAウイルス ボルナ病ウイルス 感染防御機構 内在性ウイルス配列 piRNA
B型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

最近、我々は、レトロウイルスでない RNA ウイルスであるボルナ病ウイルス(BDV)の配列が逆転写され、宿主ゲノムにインテグレーションされることを明らかにした(Horie, Honda et al., **Nature** 2010)。この逆転写反応には、BDV と宿主のレトロトランスポゾンである LINE (long interspersed nuclear element) との相互作用が関与していると考えられている。我々の報告以降、他の様々な RNA ウイルス配列が宿主細胞のゲノムにインテグレーションされていることが報告されてきている(Belyi et al., **PLoS Pathogens** 2010)。しかし、この新しく見出された現象の生理的な意義は未だ不明である。

LINE は、ヒトゲノムの約 17%を占める非 LTR 型レトロトランスポゾンである。LINE などのレトロトランスポゾンはゲノム上を転移することによって遺伝子変異を引き起こし、がんを含む様々な疾患の要因となることが報告されている(Goodier, **Mob. DNA** 2014)。一方で、生理条件下でも、脳と生殖系列で LINE の転移が高率に検出される。このことは、脳と生殖系列では、ゲノム安定性を犠牲にしても、LINE の転移を必要としている可能性を示唆する。しかし、LINE 転移がどのような生理機能を持つかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

近年話題となっている細菌の CRISPR/Cas9 系は、外来性病原体の核酸を宿主ゲノムに取り込む獲得免疫の一形態である。我々は、哺乳動物細胞においても同様の抗ウイルス防御機構があるのではないかと着想した。つまり、LINE が RNA ウイルス配列を逆転写し、ゲノムへ取り込むことで、抗ウイルス防御を行なっている可能性である。

一方で、レトロトランスポゾンの活性化はゲノム不安定化を惹起し、がんを引き起こし得ると考えられている。ウイルスの中にはがんを誘導するものがあり、そのようながん誘導性ウイルスがレトロトランスポゾンを活性化し、がんを引き起こしている可能性がある。

本研究では、このような可能性について検証を行い、レトロトランスポゾンを介した新しい宿主-RNA ウイルス間相互作用を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LINE による RNA ウイルス配列の逆転写メカニズムの解明

我々が明らかにした RNA ウイルス配列の逆転写現象 (Horie, Honda et al., **Nature** 2010)について、BDV をモデルにそのメカニズムを解析した。具体的には、LINE のコードするタンパク質 ORF1p に結合する宿主タ

ンパク質のうち、BDV とも相互作用する分子を探索した。得られた分子のノックダウンを用いて逆転写活性に与える影響を評価した。

(2) ゲノムに取り込まれたウイルス配列による類縁ウイルス感染阻害の解明

ゲノム中の BDV 由来配列 (Endogenous bornavirus-like element, EBL) の有無とその生物種の BDV 感受性には関連性がある。それは、ゲノム中に EBL を持つと BDV は感染しにくく感染しても重篤な症状をきたしにくい一方、ゲノム中に EBL を持たない動物種では BDV が致死性の脳炎を引き起こしやすいという傾向である。これが EBL による BDV 感染阻害によるものと考え、そのメカニズムを解析した。具体的には、EBL から RNA が発現しているか、発現しているならどのように制御されているかを解析した。また次世代シーケンサーで実際にどのような EBL 由来 RNA が発現しているかを決定した。さらに、その RNA の機能を、レポータープラスミドを作成して明らかにした。

(3) ウイルスによるレトロトランスポゾン活性化機構の解明

様々なウイルスについて、レトロトランスポゾンを活性化するか検証した。具体的には、BDV、インフルエンザウイルスについてレポーターあるいは逆転写産物の検出を用いて解析した。

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 LINE と相互作用するメカニズムの一端や、LINE の逆転写により生じたゲノム中の EBL から RNA が出ていること、EBL 由来の低分子 RNA が BDV 遺伝子の発現を抑制できることなどを明らかにし、RNA ウイルスとレトロトランスポゾンの相互作用について新しい知見を得ることができた。これらは、今後がんウイルスによるがん化メカニズムを解析したり、ウイルス配列由来低分子 RNA による新しい宿主防御機構を提唱する上で基盤的な知見であり、新しい研究領域への足がかりとなっている。以上のことから、本研究の目的は十分に達せられたと考えられる。

(1) LINE による RNA ウイルス配列の逆転写メカニズムの解明

下記の結果から、LINE の転移活性が LINE-binding protein-1 (LBP-1)により制御されていることが明らかとなった(図1)。

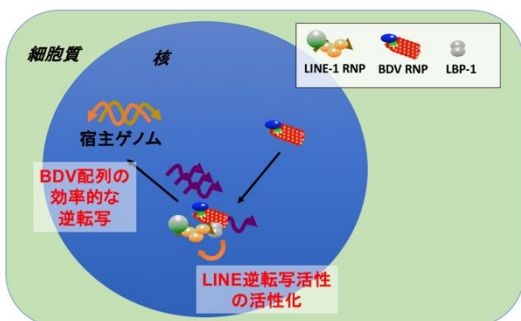
LINE ORF1p と相互作用する宿主分子を、共免疫沈降法を用いて単離した。その分子を LINE-binding protein-1 (LBP-1)と名付けた。

LBP-1 と BDV タンパク質との相互作用を検討したところ、両者間に相互作用を

認めた。

LBP-1 をノックダウンすると、LINE 転移活性は低下した。

図1 LBP-1がLINEとBDVとの橋渡しをする



(2) ゲノムに取り込まれたウイルス配列による類縁ウイルス感染阻害の解明

下記の結果から、EBL 由来の低分子 RNA が piRNA として機能し、類似の配列を持つ mRNA の発現を抑制することが明らかとなった (図2)。

EBL からは RNA が発現しており、マウス精巣では低分子量 RNA の piRNA として発現していた (図2.3)。

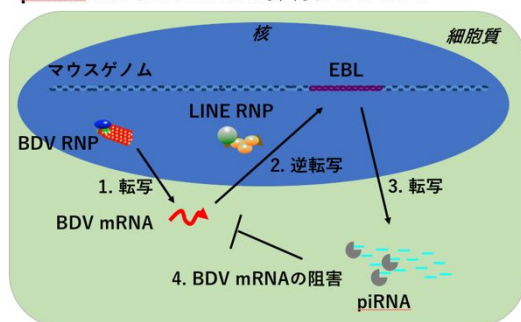
EBL は特に piRNA を産生する piRNA クラスターといゲノム領域に豊富に存在していた。

BDV と EBL で比較的類似している配列をレポーター遺伝子の下流に組み込んだレポータープラスミドを作成した。これをマウス生殖系細胞に導入したところ、レポーター遺伝子の発現が抑制されていた (図2.4)。

マウス生殖系細胞の中で、EBL 由来 piRNA と MIWI タンパク質は相互作用していた。

EBL 由来 piRNA の発現を抑制すると、上記のレポーター遺伝子の発現が部分的に回復した。

図2 BDV mRNAの転写からEBL形成、EBL由来 piRNAによるBDV mRNA抑制までのモデル



(3) ウイルスによるレトロトランスポゾン活性化機構の解明

下記の結果から、ウイルス感染がレトロトランスポゾンの活性に影響しうることが明らかとなった。現在、B型肝炎ウイルスなど他のウイルスについても検証中である。

BDV 感染細胞と非感染細胞で、LINE

転移レポーターの発現比較を行った。その結果、BDV 感染細胞では、LINE 転移レポーターの発現が低下していた。

インフルエンザウイルス感染で、ウイルス由来配列の逆転写産物が検出できることを確認した。

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21件)

以下全て、査読有で、研究代表者が corresponding author.

1. **Honda T.**, Sofuku K., Matsunaga H., Tachibana M., Mohri I., Taniike M., Tomonaga K.

Prevalence of antibodies against Borna disease virus proteins in Japanese children with autism spectrum disorder.

Microbiology and Immunology in press, 2018

DOI: 10.1111/1348-0421.12603

2. **Honda T.**

Potential links between hepadnavirus and bornavirus sequences in the host genome and cancer.

Frontiers in Microbiology 8, 2537, 2017

DOI: 10.3389/fmicb.2017.02537

3. **Honda T.**, Sofuku K., Kojima S., Yamamoto Y., Ohtaki N., Tomonaga K.

Linkage between the leader sequence and leader RNA production in Borna disease virus-infected cells.

Virology 510, 104-110, 2017

DOI: 10.1016/j.virol.2017.07.011

4. Tokunaga T., Yamamoto Y., Sakai M., Tomonaga K., **Honda T.**

Antiviral activity of favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses.

Antiviral Research 143, 237-245, 2017

DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.04.018

5. **Honda T.**, Sofuku K., Matsunaga H., Tachibana M., Mohri I., Taniike M., Tomonaga K.

Detection of antibodies to Borna disease virus proteins in an autistic child and her mother.

Japanese Journal of Infectious Diseases 70, 225-227, 2017

DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.277

6. **Honda T.**

Links between human LINE-1 retrotransposons and hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Chemistry* 4, 21, 2016
DOI: 10.3389/fchem.2016.00021

7. **Honda T.**, Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mobile Genetic Elements* 6(3), e1165785, 2016
DOI: 10.1080/2159256X.2016.1165785

8. **Honda T.**, Yamamoto Y., Daito T., Matsumoto Y., Makino A., Tomonaga K. Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. *Scientific Reports* 6, 26154, 2016
DOI: 10.1038/srep26154.

9. Sofuku K., Parrish NF., **Honda T.**, Tomonaga K. Transcription profiling demonstrates epigenetic control of non-retroviral RNA virus-derived elements in the human genome. *Cell Reports* 12, 1-7, 2015
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.007

〔学会発表〕(計 37 件)

1. **Honda T.**, Tomonaga K. L1-mediated gene transfer from viruses to the host confers antiviral immunity. 2nd Japan-Korea International Symposium for Transposable Elements, 2017年6月28日、東京医科歯科大学(東京)

2. **Honda T.**, Liu X, Garcia BC, Parrish NF, Tomonaga K. Loading of small RNAs derived from an endogenous bornavirus element on the MIWI protein in GC2 cells (S6-6). The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2017年9月8日、淡路夢舞台(兵庫)

3. **Honda T.**, Liu X, Garcia BC, Parrish NF, Tomonaga K. Targeting of bornavirus sequence by piRNA derived from an endogenous bornavirus element in GC2 cells (P2-N1-09). 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2017年10月25日、大阪国際会議場(大阪)

4. **本田知之**、大崎恵理子、上田啓次「ウイルス配列-L1キメラ遺伝子の機能解析」第1回若手内在性ウイルス様エレメント研究会 2016年12月16日、京都大学(京都)

5. **本田知之**、朝長啓造「RNAウイルス持続感染におけるウイルス特異的核内構造体の構造、形成、その生理意義(1AS5-4)」第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川)

6. **Honda T.**, Ohsaki E, Ueda K. The role of a viral-L1 chimeric transcript in hepatitis B virus infection (P1-084). 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年10月23日、パシフィコ横浜(神奈川)

7. **Honda T.**, Tomonaga K. Analysis of possible interaction between Borna disease virus and LINE-1. 1st Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements, 2016年6月10日、釜山(韓国)

9. **本田知之**「低分子RNAによる新しいウイルス防御機構の解明とその制御方法の探索」第6回SENRIの会 2016年1月13日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

10. **本田知之**「レトロトランスポゾンとpiRNAによるボルナウイルス制御仮説とその検証の試み」第9回日本ボルナウイルス研究会 2016年1月29日、鹿児島大学(鹿児島)

11. **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(1W12-p-3)」第38回日本分子生物学会年会 2015年12月1日、神戸国際会議場(兵庫)

12. **Honda T.**, Makino A, Tomonaga K. 「ボルナ病ウイルスと宿主レトロトランスポゾンLINE-1との相互作用解析(W3-E-05)」第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年10月23日、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計 2 件)

以下全て、査読ありで、研究代表者が corresponding author.

1. Sofuku K., **Honda T.** Influence of Endogenous Viral Sequences on Gene Expression. Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells 67-80, 2018
Dr. Fumiaki Uchiumi (Ed.), ISBN: 978-953-51-3856-3, InTech
DOI: 10.5772/intechopen.71864

2. **本田知之**、朝長啓造「内在性RNAウイルスエレメントによるウイルスRNA制御仮説」ウイルス、第66巻1号、39-46、2016

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：目的遺伝子の発現誘導可能なウイルスベクター

発明者：朝長啓造、**本田知之**、山本祐介

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願 2015-114308

出願年月日：2015 年 6 月 4 日

国内外の別：国内

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、初年度は京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野（当時）にて行われた。研究室のホームページは以下の通り。

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

2 年度以降は大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学にて行われた。研究室のホームページは以下の通り。

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/virus/index.html>

アウトリーチ活動等

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した。平成 29 年度には、群馬県立高崎高等学校（スーパーサイエンスハイスクール指定校）2 年生に対して研究内容の一端を紹介した。

6．研究組織

(1)研究代表者

本田 知之（HONDA, Tomoyuki）

大阪大学・医学系研究科・准教授

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

惣福 梢（SOFUKU, Kozue）

中山 椋太（NAKAYAMA, Ryota）

西川 祐樹（NISHIKAWA, Yuki）