

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04083

研究課題名(和文) 核内RNAウイルスの認識と制御に関わるDNA損傷応答機構の解明

研究課題名(英文) Study on DNA damage responses for regulation of intranuclear RNA 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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNA損傷応答機構と核内複製するRNAウイルスの関連性について分子メカニズムを解明することを目的に実施された。本研究では、DNA損傷センサー分子であるIF116が、核内でのボルナ病ウイルスの複製を認識して宿主応答を引き起こすことを見出した。また、DNA損傷応答に関わるDNA-PKがボルナ病ウイルスの複製場に局在し、複製に関与することを明らかにした。さらに、DNA損傷応答にも関与する核内のRNA編集酵素ADAR2がボルナ病ウイルスのゲノムRNAにA-to-G編集を導入することで自然免疫応答からの回避と持続感染の成立に寄与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、核内で増殖するボルナ病ウイルスが、宿主によりDNA損傷と認識され、細胞のDNA損傷反応を誘導するとともに、ウイルスが宿主のDNA損傷機構を利用して複製や感染を成立させている可能性を見出した。本研究は、核内複製RNAウイルスが宿主ゲノムの損傷機構と関連することを示唆する初めての成果であり、今後、インフルエンザウイルスなどその他の核内複製RNAウイルスの複製阻害や病原性発現のメカニズムの解明へとつながる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the interaction of DNA damage responses with replication of intranuclear replicating RNA viruses, such as Borna disease virus (BoDV). In this study, we found that IF116, a DNA damage sensor molecule, recognizes nuclear replication of BoDV and triggers host immune responses. We also found that DNA-PK, which is involved in the DNA damage response, is localized at BoDV viral factories and of which activation affect BoDV replication. Furthermore, we showed that ADAR2, a nuclear RNA-editing enzyme that is also shown to be associated with DNA damage responses, contributes to avoidance of the innate immune response and the establishment of persistent infection by introducing A-to-G editing into the genomic RNA of BoDV.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス 細胞核 DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染に対する自然免疫応答は、宿主細胞に感染したウイルスを細胞内のセンサー分子により認識することで開始される。これまでの研究から、宿主細胞に侵入したウイルス由来核酸を感知するセンサー分子が数多く同定され、その特異性も明らかにされてきた。しかしながら、そのほとんどはエンドゾームを含む細胞質に存在する分子であり、核内に存在するウイルス核酸に対しては、機能しないことが示されている。一方で、核内でのウイルス認識に関しては、唯一、DNA ウイルスであるヘルペスウイルスを認識して、免疫応答を誘導する因子が報告されている。しかしながら、インフルエンザウイルスやボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BoDV) など、細胞核で増殖する RNA ウイルスが核内のどのような宿主機構により認識され、宿主の防御反応が惹起されるのかについては明らかになっていなかった。

本研究の代表者は、細胞核で持続感染する BoDV の研究を行ってきた。これまでに、BoDV の持続感染機構の解明をはじめ、ボルナウイルスの核内動態と宿主因子や内在化に関して多くの知見を明らかにしてきた (1-4)。その中で、ボルナウイルスのリボ核酸複合体 (RNP) がクロマチン結合因子である HMGB1 や PARP-1 と相互作用することを発見し報告した (5)。また、核内で HMGB1 を介して BoDV とインフルエンザウイルス RNP を認識する分子として IFI16 を同定した。さらに、BoDV RNP と結合し、核内複製場 (ウイルスファクトリー) に共局在する因子として RBMX、 γ -H2AX ならびに DNA-PK を同定していた (6)。

γ -H2AX と DNA-PK は、二本鎖 DNA 損傷応答において中心的役割を果たす分子であり、損傷部位に局在し、損傷修復に機能している。一方、BoDV の複製に関与する HMGB1、IFI16 そして RBMX は DNA 損傷を認識するセンサー分子として、また PARP-1 は DNA 損傷の修復因子として DNA 損傷応答に関与していることも知られている。これらの事実は、核内での RNA ウイルスの認識と制御には宿主の DNA 損傷応答機構が関与している可能性を強く示していた。

2. 研究の目的

上記の研究背景により、研究代表者はインフルエンザウイルスや BoDV などの核内で複製する RNA ウイルスの感染は、宿主に DNA 損傷として認識され、DNA 損傷応答を介した自然免疫誘導により制御されているのではないかと着想した。そこで本研究では、この仮説の証明することを目的に、BoDV 複製と宿主の DNA ダメージ応答ならびに核内の RNA ウイルス認識機構との関連性解析について遂行された。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト由来培養細胞であるオリゴデンドロサイト由来 OL 細胞と胎児腎細胞 HEK293 細胞に BoDV を持続感染させた細胞株 (OL/BoDV と 293/BoDV) を用いて解析を進められた。詳細な研究方法については、「4. 研究成果」の項において記載を行う。

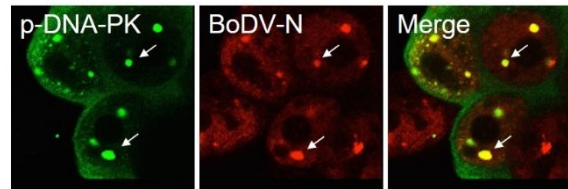
4. 研究成果

(1) BoDV 複製と宿主の DNA ダメージ応答との関連性の解析

これまでに BoDV 複製への関与が示されている宿主因子 HMGB1、IFI16 ならびに RBMX がどのように協調して、核内でのボルナ病ウイルス認識に関与しているかを明らかにするために、OL/BoDV 細胞を用いて、siRNA を用いて DNA 損傷センサー分子のノックダウンを行った。その結果、IFI16 のノックダウンにより、炎症性サイトカインの発現低下と BoDV 複製の上昇が観察された。これまでの研究で、IFI16 は HMGB1 を介して BoDV RNP と結合していることが明らかになっており、今回の成果は、IFI16 が HMGB1 を介して核内の BoDV 感染を認識し、背全免疫応答を誘導していることを示している。

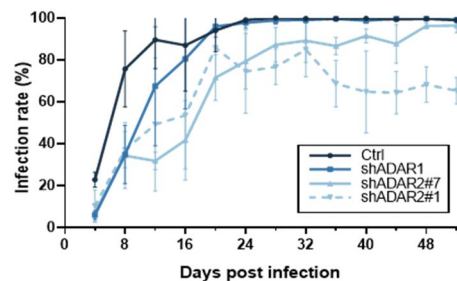
過去の研究において、HMGB1 ならびに IFI16 はともに DNA 損傷を認識していることが示されている。上記の結果は、BoDV 感染が細胞に DNA 損傷として認識され、DNA ダメージ応答 (DNA damage response: DDR) が活性化する可能性を示していた。そこで、BoDV の核内複製場における DDR の関与を検討した。BoDV の複製場である vSPOTs における DDR 経路関連因子の共局在を解析した結果、DNA 二本鎖切断の修復に関与したセリン/トレオニンキナーゼであるリン酸化

DNA 依存的プロテインキナーゼ (DNA-PK) が vSPOTs に共局在することが明らかとなった (挿入図)。DNA-PK は触媒サブユニットである DNA-PKcs と DNA 二本鎖結合サブユニットである Ku70/80 ヘテロ二量体からなる複合体で、DNA 二重鎖切断のセンサーとして DNA 修復機構に関与している。さらなる解析により、DNA-PK のリン酸化を阻害する PIK-75 を処理することで、BoDV の複製が上昇し、核内における vSPOTs の数が減少することを明らかにした。また、DNA 二本鎖切断を誘導する試薬の投与で vSPOTs とリン酸化 DNA-PK の共局在が減少することも示された。以上の結果より、BoDV の核内感染と宿主 DDR との相互作用が示された。



(2) 核内 RNA 編集酵素 ADAR2 による BoDV の認識と DNA ダメージとの関連性

RNA 編集酵素 ADAR は、二本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンに変換することで、RNA の構造変化やアミノ酸の置換を行う。最近の研究により、がん細胞株における ADAR の発現が、DDR および DNA 複製に関与する mRNA の安定性に影響を与えていることが報告されており、DNA ダメージとして認識される BoDV 感染と ADAR との関連性に興味もたれた。そこで、ADAR の発現が BoDV の核内持続感染に与える影響について検討を行った。本研究では、細胞核に局在し、BoDV の感染指向性細胞である神経細胞で高発現している ADAR2 に着目して解析した。その結果、ADAR2 を shRNA によりノックダウンした細胞に BoDV を感染させると BoDV の感染効率は顕著に減少することが示された (挿入図)。また、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、ADAR2 ノックダウン細胞では感染や刺激なしで自然免疫応答が誘導されることが示された。一方、ADAR2 ノックダウン細胞ではウイルスのゲノムへの A-to-G 変異が減少し、産生されたウイルスは自然免疫応答を高く誘導することが示された。このことは、DNA ダメージとして認識される BoDV 複製場に、ADAR2 が局在し、BDV ゲノムの編集を行っている可能性を示している。本研究から、BoDV は核内に局在する ADAR2 を利用してウイルスゲノム RNA 編集することで、自然免疫応答から逃れ、核内での複製と持続感染を成立させていると考えられた (7)。



<引用文献>

1. Watanabe Y, Ohtaki N, Hayashi Y et al., Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases. PLoS Pathog. 5:e1000654 (2009)
2. Honda T, Horie M, Daito T et al., Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at cell surface. J. Virol. 83:12622-12625 (2009)
3. Horie M, Honda T, Suzuki Y et al., Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. Nature 463:84-87 (2010)
4. Honda T, Fujino K, Okuzaki D et al., Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express Borna disease virus phosphoprotein. J. Virol. 85: 4567-4571 (2011)
5. Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H et al., Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. Cell Host Microbe 11:492-503 (2012)
6. Hirai Y, Honda T, Makino A et al., X-linked RNA-binding motif protein (RBMX) is required for the maintenance of Borna disease virus nuclear viral factories. J. Gen. Virol. 96:3198-3203 (2015)
7. Yanai M, Kojima S, Sakai S et al., ADAR2 is involved in self and nonself recognition of Borna disease virus genomic RNA in the nucleus. J Virol. 94(6):e01513-19 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirai Y, Domae E, Yoshikawa Y, Okamura H, Makino A, Tomonaga K.	4. 巻 263
2. 論文標題 Intracellular dynamics of actin affects Borna disease virus replication in the nucleus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Res	6. 最初と最後の頁 179-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2019.02.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Tomonaga K, Makino A.	4. 巻 94
2. 論文標題 ADAR2 Is Involved in Self and Nonself Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e01513-19.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01513-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komorizono R, Tomonaga K, Makino A.	4. 巻 275
2. 論文標題 Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of parrot bornavirus 4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol Methods.	6. 最初と最後の頁 113749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2019.113749.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai M, Ueda S, Daito T, Asada-Utsugi M, Komatsu Y, Kinoshita A, Maki T, Kuzuya A, Takahashi R, Makino A, Tomonaga K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Degradation of amyloid peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 467-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12602.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima S, Sato R, Yanai M, Komatsu Y, Horie M, Igarashi M, Tomonaga K.	4. 巻 93
2. 論文標題 Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01621-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01621-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda T, Sofuku K, Kojima S, Yamamoto Y, Ohtaki N, Tomonaga K.	4. 巻 510
2. 論文標題 Linkage between the leader sequence and leader RNA production in Borna disease virus-infected cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 104-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2017.07.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kanda T, Horie M, Komatsu Y, Sakai M, Tomonaga K.
2. 発表標題 Nucleoprotein and phosphoprotein of Borna disease virus 2 increase the rescue efficiency of recombinant Borna disease virus 1.
3. 学会等名 38th Annual Meeting American Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanda T, Horie M, Komatsu Y, Tomonaga K.
2. 発表標題 Effect of Borna disease virus genome terminal sequences on viral replication and transcription.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makino A, Tanaka C, Tomonaga K
2. 発表標題 Pathogenicity of variegated squirrel bornavirus.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Makino A, Tomonaga K
2. 発表標題 BoDV utilizes ADAR2 for evasion of innate immune response.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Garcia BC, Horie M, Kojima S, Tomonaga K
2. 発表標題 Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal attachment of Borna disease virus
3. 学会等名 The 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Roles of non-coding RNAs from endogenous bornavirus-like elements in Borna disease virus infection
3. 学会等名 2nd International Symposium on RNA virus persistence (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Intranuclear persistent infection of bornavirus as an evolutionary strategy determining the survival and fitness Systematic investigation of novel lineages of endogenous bornavirus-like elements in vertebrate genomes. (4/
3. 学会等名 Virus Dynamics Workshop in Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shohei Kojima, Ryo Sato, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Manabu Igarashi, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 Alternative splicing unmask an endoplasmic reticulum targeting signal of Borna disease virus nucleoprotein
3. 学会等名 17th Negative Strand RNA Virus (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Makino, Yutaro Yamamoto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 Translational regulation of Borna disease virus.
3. 学会等名 17th Negative Strand RNA Virus (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga .
2. 発表標題 Cleavage of viral glycoprotein is involved in the infection efficiency of non-propagating bornaviral vector.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shohei Kojima, Ryo Sato, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Manabu Igarashi, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 RNAスプライシングはボルナ病ウイルスのヌクレオプロテインの多様な細胞内局在を制御する
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bea Clarise B. Garcia, Yukiko Sassa, Akiko Makino, and Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line.
3. 学会等名 36th Annual Meeting of the American Society for Virology. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuya Hirai, Akiko Makino, Hideyuki Okamura and Keizo Tomonaga.
2. 発表標題 Analysis of possible influences of nuclear actin in forming the viral factories of Borna disease virus and its crosstalk with Cajal bodies.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mako Yanai, Akiko Makino, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 ADAR2 plays a key role in the maintenance of the persistent infection of Borna disease virus
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Bornavirus infection: a new model of evolution and coexistence of RNA viruses.
3. 学会等名 The National Symposium on Zoonoses Research 2017. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学ウイルス・再生医科学研究所RNAウイルス分野 https://t.rnavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	本田 知之 (Honda Tomoyuki) (80402676)	大阪大学・医学(系)研究科・准教授 (14401)	
連携研究者	小池 学 (Koike Manabu) (70280740)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・主幹研究員 (82502)	