

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32701
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K15172
研究課題名（和文）ヒト内在性ボルナウイルスのイグザプテーションにより獲得した新規機能に関する研究

研究課題名（英文）Functional analysis of human endogenous bornavirus-like N element-2

研究代表者
藤野 寛（Fujino, Kan）

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：40712617
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ボルナウイルス属のN遺伝子がゲノムに内在化した配列である内在性ボルナウイルス様N因子（EBLN: Endogenous Bornavirus-like N element）はヒトを含む多くの動物ゲノムで発見されている。ボルナウイルスは宿主のゲノムに入り込む内在化を必要としないウイルスであるにも関わらず、多くの動物に内在化していることから、申請者はEBLNには宿主に寄与する何らかの機能があるのではないかと考え、研究を行った。結果として本研究により、hsEBLN-2の発現に関わると考えられるプロモーター領域を決定し、タンパク質の機能としては細胞の生存に関わる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトに内在化したボルナウイルスの一つである、hsEBLN-2の機能解析を行った。結果として、hsEBLN-2の発現に関わるプロモーター領域を決定し、hsEBLN-2の減少により細胞の活性が減少することやhsEBLN-2を強制発現させた細胞では過酸化水素による細胞傷害性に抵抗を示すことが明らかとなった。本研究により、hsEBLN-2が細胞内で機能していることが示唆された。非レトロウイルス性内在性ウイルスが宿主配列と融合することによって機能を獲得する可能性を示したことで、これまで知られていなかった新たなウイルス-宿主の相互作用を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：The endogenous Bornavirus-like N element (EBLN) is originated from the sequence of N genes of the Bornavirus. EBLNs have been found in many animal genomes including human. Despite Bornavirus does not require endogenization to replicate, Bornavirus endogenized in many animals. Thus, we thought that the EBLNs has some function that contributes to the host, and conducted this study. In this study, we identified a promoter region that is thought to be involved in the expression of hsEBLN-2 (Homo sapiens EBLN-2). In addition, we showed that the function of hsEBLN-2 may be related to cell survival.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ボルナウイルス 内在性ウイルス ボルナ病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

非レトロウイルス性ウイルス由来の配列は様々な動物ゲノムで見つかっている。中でも、ボルナウイルス属の N 遺伝子が内在化した配列である内在性ボルナウイルス様 N 因子 (EBLN: Endogenous Bornavirus-like N element) はヒトを含む多くの動物ゲノムで発見されている。ボルナウイルスは自身の生活環において DNA を経ることなく増殖し、レトロウイルスとは異なり、宿主のゲノムに入り込む内在化を必要としない。それに関わらず多くの動物に内在化していることから、申請者は EBLN には宿主に寄与する何らかの機能があるのではないかと考え、研究を行った。特に、ヒトに内在化した EBLN の一つである hsEBLN-2 (homo sapiens EBLN-2) は約 4000 万年前に内在化したにも関わらず、mRNA 及びタンパク質の発現が報告されていた。申請者の以前の研究により、hsEBLN-2 はヒト由来の配列と融合したタンパク質として発現し、ミトコンドリア局在を示すことが判明していた。このことから、hsEBLN-2 はイグザプテーションにより新たな機能を獲得している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では hsEBLN-2 が宿主に内在化し、4000 万年の間に獲得あるいは維持してきたと考えられる機能を解明することを目的としている。これまでに報告されている EBLN は N 遺伝子の相同部位が RNA として機能する、あるいは、タンパク質として宿主タンパク質と相互作用しながら機能することが報告されている。しかしながら、hsEBLN-2 はユニークなことに N 末端部に宿主由来の配列が付加されており、この宿主由来の配列によりミトコンドリア局在を示すことが明らかとなっている。非レトロウイルス性内在性ウイルスが宿主由来配列と融合することにより新たな機能を獲得したという報告はこれまでになく、hsEBLN-2 の機能を解明することは、単に新たな機能性タンパク質の発見というだけでなく、非レトロウイルス性内在性ウイルスのイグザプテーションによる機能獲得という新しい現象の発見につながると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、ミトコンドリアに関わる経路のうちどの経路に hsEBLN-2 が機能しているか確認するため、「プロモーターアッセイによる発現解析」、「強制発現及びノックダウン細胞を用いた解析」の 2 つのアプローチを並行して進め、hsEBLN-2 の機能解明を目指した。始めに、hsEBLN-2 mRNA の上流領域をいくつかの断片に分け、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込むことでプロモーターアッセイを行い hsEBLN-2 のプロモーター領域の同定を目指した。また、作成したプラスミドを用いて、アポトーシス誘導や自然免疫誘導といった様々な刺激を与え、レポーター活性の変化を観察することで hsEBLN-2 の発現に対する影響を検討した。次に、ミトコンドリアに関わる経路のうちどの経路に hsEBLN-2 が関わっているのか確認するため、強制発現系やノックダウン系による実験を行った。

4. 研究成果

プロモーターアッセイの結果、hsEBLN-2 mRNA の上流-750bp から-1000bp の領域に周囲と比較して強いプロモーター活性が認められた (図 1)。ChIP-Atlas より、この領域には ATF4 等の転写因子が結合することが示唆されていることから、hsEBLN-2 の発現にはこれらの因子が関与している可能性が考えられる。さらに、上記の領域を含むプラスミドを用いて様々な刺激に対する hsEBLN-2 のプロモーター活性の変動を調べたところ、特にスタウロスポリンやエトポシド等によるアポトーシス誘導時に活性が低下することが示された。また、リアルタイム PCR によっても同様に mRNA が低下することが確認できた (図 2)。一方で今回の系では、ウイルス感染やオートファジー誘導といった刺激による影響を確認することは出来なかった。以上の結果から、hsEBLN-2 はアポトーシスといった細胞生存に関わる可能性が示唆された。

次にノックダウンの系によって hsEBLN-2 発現を減少させたところ、細胞活性の減少が認められた (図 3)。これらの細胞活性の減少がアポトーシスと関連しているかを確認するために、PARP の切断の有無を調べたところ、アンチセンスオリゴ (ASO) を用いた hsEBLN-2 ノックダウン細胞では優位に PARP の切断が起こっている事が明らかとなった。加えて

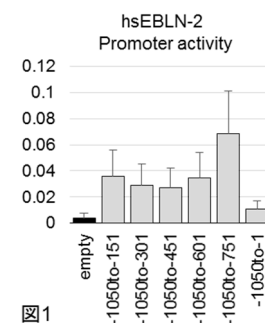


図1

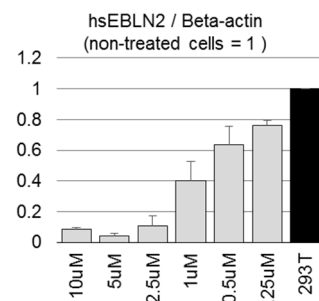


図2

スタウロスポリン

hsEBLN-2 強制発現細胞では、過酸化水素水による処理の際にコントロールと比較して優位に高い細胞活性を示すことが分かった(図4)。最後に hsEBLN-2 を強制発現させた細胞で宿主タンパク質である HAX-1 の安定性を CHX により確認したところ、hsEBLN-2 発現細胞では HAX-1 が安定する傾向が確認された。以上のことから、hsEBLN-2 は HAX-1 といった抗アポトーシス因子を安定化することにより細胞の生存に寄与する可能性が示された。

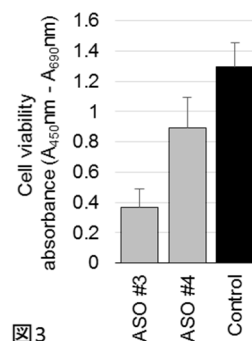


図3

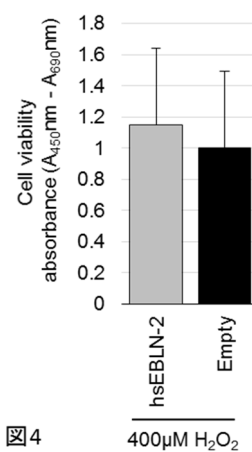


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----