

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19443

研究課題名（和文）ボルナウイルス感染細胞の運命：ウイルスの新たな神経病原性を探る

研究課題名（英文）Fate of bornavirus-infected cells: novel viral neuropathogenic potential

研究代表者

堀江 真行（Horie, Masayuki）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20725981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では遺伝子組換え技術を用いて、宿主の神経細胞において機能的障害を引き起こすボルナ病ウイルス1（BoDV-1）が一度感染した細胞を恒久的に標識できる実験系を作出した。この実験系により、ウイルスが感染し、さらに薬剤等においてウイルスを排除した細胞と一度も感染していない細胞を区別することが可能となった。しかし、この実験系は培養細胞株においては機能するものの、実際の動物の脳の神経細胞では必ずしも機能しなかった。一方、遺伝子組換えBoDV-1に挿入した遺伝子配列において、宿主のRNA編集酵素によると考えられる変異が多数見つかかり、ウイルスと宿主の新たな相互作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、BoDV-1は人獣共通感染症としても再注目を浴びている。本研究によって作出した技術は、今後のBoDV-1の新たな病態・病原性の可能性を評価するうえで極めて重要な基盤となる。さらには想定外の成果として宿主RNA編集酵素との相互作用によるウイルスゲノムの変異が示唆されており、今後のウイルス-宿主細胞間相互作用のさらなる解明や、またウイルスの進化について有用な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we utilized genetic recombination technology to create an experimental system that can permanently label cells once infected with Borna disease virus 1 (BoDV-1), which causes functional defects in host neurons. This experimental system has made it possible to evaluate the function of cells that have been infected with the virus and then eliminated them by drugs or other means. However, although this system worked well in cultured cell lines, it did not work well in infected neurons of animals. On the other hand, we found many mutations in the Cre gene sequence inserted into recombinant BoDV-1 that were thought to be caused by the host's RNA editing enzyme, revealing a possible novel interaction between the virus and the host.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ボルナ病ウイルス RNA編集 Cre/loxP部位特異的組換え

1. 研究開始当初の背景

ボルナ病ウイルス 1 (Borna disease virus 1: BoDV-1) はモノネガウイルス目ボルナウイルス科オルソボルナウイルス属に属する一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである。BoDV-1 は、種々の哺乳動物で免疫介在性脳脊髄炎を引き起こすことが知られている。また、BoDV-1 は非細胞傷害性の持続感染を引き起こし、神経細胞を中心とした種々の脳細胞に機能的障害を引き起こすことも知られている。実際に BoDV-1 の感染による宿主細胞のエピジェネティックな変化も観察されている。

近年、種々の抗ウイルス薬などにより、BoDV-1 持続感染細胞から BoDV-1 を排除できることが示されたが、一度機能的障害に陥った細胞では、ウイルスを排除した場合においても機能が正常に回復しない可能性が考えられる。しかし、従来のウイルスを用いた手法では「非感染細胞」と「一度ウイルスに感染しその後ウイルスの感染を排除した細胞」を区別することが困難であり、上記の現象を探究することはできない。

2. 研究の目的

本研究は、一度 BoDV-1 に感染しその後ウイルスを排除した細胞の評価を目的として開始した。

3. 研究の方法

(1) Cre 発現組換え BoDV-1 の作出と Cre レポーター細胞の作出

Cre/loxP 部位特異的組換えは、Cre リコンビナーゼによって loxP サイトの DNA 組換えを起こす技術である。この組換え技術を利用し、Cre を発現する組換え BoDV-1 (rBoDV-1-Cre) と Cre の発現によってレポーター遺伝子を発現、あるいはレポーター遺伝子の発現をスイッチする細胞を組み合わせ、一度ウイルスに感染した細胞を恒久的に標識する実験系を作出した(図 1)。Daito らの方法[1]に従って rBoDV-1-Cre および rBoDV-1-Cre の P 遺伝子にマウス順化の変異[2]を導入した rBoDV-1-Cre-PK を作出した。Cre レポーター細胞として、Cre/loxP 部位特異的組換えによって dsRed から GFP へと発現をスイッチするヒトオリゴデンドログリオーマ(OL)細胞および Vero 細胞を作出した。レトロウイルスベクターを用いて、loxP-dsRed-loxP-GFP 配列を OL および Vero 細胞に導入した。それぞれの細胞について、限界希釈法による細胞クローニングを行い、最も蛍光タンパク質の発現が強いクローンを選択した。

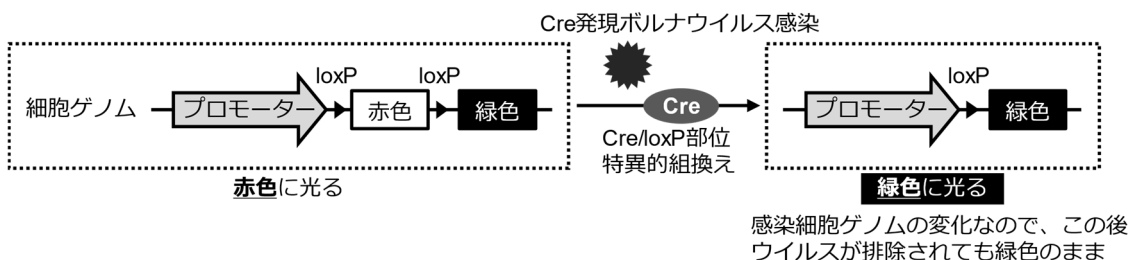


図 1. 感染細胞を恒久的に標識する実験系の作出の概要

(3) 脳スライスカルチャーによる感染実験

マウスの脳スライスカルチャーを用いて感染実験を行った。Wu らの方法[3]に従ってマウスの脳スライスカルチャーを準備し、rBoDV-1-Cre を感染させた。その後、免疫抗体法等によって BoDV-1 抗原および蛍光タンパク質の発現を観察した。

4. 研究成果

(1) Cre 発現組換え BoDV-1 の作出

はじめに、Cre を発現する組換え BoDV (rBoDV-1-Cre) および rBoDV-1-Cre の P 遺伝子にマウス順化の変異を導入した rBoDV-1-Cre-PK を作出した。どちらのウイルスも感染率の高い持続感染細胞を得るまでに 3 か月以上と、既報の rBoDV とくらべて極めて長期間を要したが、組換えウイルスを得ることができた。

次に、Cre/loxP 部位特異的組換えによって GFP から dsRed へと発現が変化する Cre レポーター細胞を作出した。細胞は BoDV の感染が容易に成立することが知られているヒトオリゴデンドログリオーマ(OL)細胞および Vero 細胞を用いた。どちらの Cre レポーター細胞においても、Cre の発現によって GFP から dsRed へとレポーター遺伝子の発現がスイッチすることを確認した。

得られた Cre レポーター-OL および Vero 細胞に rBoDV-1-Cre および rBoDV-1-Cre-PK を感染させたところ、どちらの感染細胞においてもレポーター遺伝子の発現が GFP から dsRed へとスイッチすることを確認した。またレポーター遺伝子のスイッチは感染後 36 時間から確認された(図 2)。

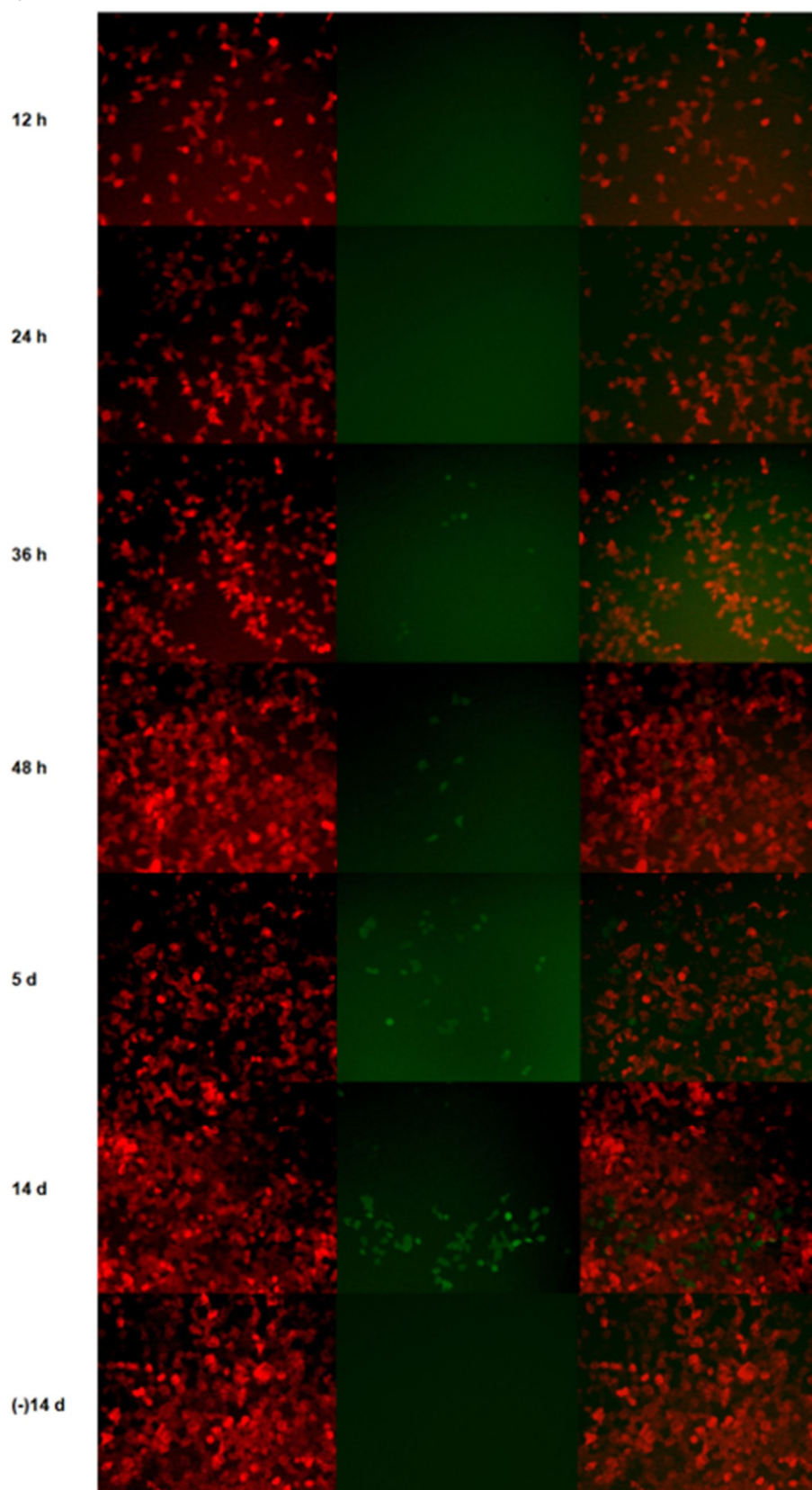


図 2. Cre レポーター-OL 細胞における BoDV-1-Cre 感染後のレポーター遺伝子発現の変化 .
BoDV-1-Cre 感染後、表記の時間において蛍光タンパク質の発現を確認した。h は時間

(2) 脳スライスカルチャーでの感染実験

次に、Cre/loxP 部位特異的組換えによって赤色蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換えマウスの脳スライスカルチャーを用いて、rBoDV-1-Cre の感染実験を行った。しかし、rBoDV-1-Cre の感染神経細胞においてはウイルスの感染自体は見られるものの、赤色蛍光タンパク質を発現していない細胞が多く見られた。

(3) BoDV 感染培養細胞における mRNA-seq 解析

(2)の実験が計画通りにいかなかったため、培養細胞を用いた検討を試みた。はじめに OL 細胞において、BoDV-1 感染時に遺伝子の発現変動がみられるかどうかを確かめるために mRNA-seq 解析を行った。しかし、感染細胞と非感染細胞の間に再現性のある遺伝子発現の変化は見られなかった。そのため、培養細胞では評価が困難であると考えた。

(4) rBoDV の Cre 遺伝子に生じた A-to-G 変異の発見と RNA 編集の可能性

上記の通り、(2)の実験系では Cre/loxP 部位特異的組換えがうまく起こらない感染細胞が見られた。この原因として、高い感染率の感染細胞を得るまでに長期間を要したため、長期間の培養によってウイルスの複製に必要な Cre 遺伝子に変異が生じた可能性が考えられた。そこで作出した rBoDV-1-Cre および rBoDV-1-Cre-PK の Cre 遺伝子のシーケンス解析を行った。

その結果、rBoDV-1-Cre には 10 塩基の、rBoDV-1-Cre-PK には 12 塩基の変異がそれぞれの Cre 遺伝子に確認された。驚くことに、これらの変異はそれぞれの株で異なる箇所に生じていたにもかかわらず、すべて（アンチセンス鎖の向きで）A（アデノシン）から G（グアノシン）への変異（A-to-G 変異）であった。2 株のウイルスにおいて異なる部位にこれほど多くの同じ塩基置換が起こるといふことは偶然とは考えづらく、特定の酵素、すなわち宿主細胞の RNA 編集酵素である ADAR1 の関与が疑われた。ADAR1 は二本鎖 RNA に結合し、A を I（イノシン）へと変換する RNA 編集酵素である。I は C（シトシン）と塩基対を形成するため、RNA の複製を経て G となる。

上記の通り、rBoDV-1-Cre および rBoDV-1-Cre-PK について、十分な感染率の持続感染細胞を作出するために非常に長い時間がかかった。これは、通常の Cre 遺伝子の RNA 配列や構造あるいは Cre タンパク質が、何らかの機構により BoDV-1 の複製を阻害しており、ADAR1 の A-to-I RNA 編集によって導入された変異の蓄積によってそれらの阻害効果がなくなったウイルスが感染を拡大することができたのではないかと考えられた。例えば二本鎖 RNA 構造は宿主の自然免疫を誘導する可能性がある。Cre 遺伝子の配列が二本鎖 RNA 構造を取るため、初期のウイルスは宿主細胞の自然免疫を誘導してしまい複製できなかったが、ADAR1 が二本鎖 RNA に結合し RNA 編集を行うことによって二本鎖 RNA 構造が徐々に少なくなっていき、あるところで自然免疫を誘導しないような配列の Cre 遺伝子になったのかもしれない。

上記の可能性を検証するために、RNA の二次構造予測を行った。しかし上記の 10 箇所および 12 箇所の変異による RNA の二次構造の変化が示唆されたものの、明確に二本鎖 RNA を取る構造がなくなるというような予測結果は得られていない。今後、実験的に自然免疫との関連を検証する必要がある。

以上の通り、本研究では当初の目的は果たせなかったものの、新しいウイルスの感染現象およびウイルスと宿主の相互作用を見出すことに成功した。

参考文献

1. Daito, T., et al., *A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region*. J Virol, 2011. **85**(23): p. 12170-8.
2. Ackermann, A., P. Staeheli, and U. Schneider, *Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7933-40.
3. Wu, Y.J., et al., *Borna disease virus-induced neuronal degeneration dependent on host genetic background and prevented by soluble factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(5): p. 1899-904.

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 3件）

1. 著者名 Kawasaki Junna, Kojima Shohei, Mukai Yahiro, Tomonaga Keizo, Horie Masayuki	4. 巻 118
2. 論文標題 100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2026235118	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 Horie Masayuki	4. 巻 94
2. 論文標題 Interactions among eukaryotes, retrotransposons and riboviruses: endogenous riboviral elements in eukaryotic genomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 253 ~ 267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.18-00049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanda Takehiro, Horie Masayuki, Komatsu Yumiko, Tomonaga Keizo	4. 巻 95
2. 論文標題 The Borna Disease Virus 2 (BoDV-2) Nucleoprotein Is a Conspecific Protein That Enhances BoDV-1 RNA-Dependent RNA Polymerase Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00936-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirai Yuya, Tomonaga Keizo, Horie Masayuki	4. 巻 192
2. 論文標題 Borna disease virus phosphoprotein triggers the organization of viral inclusion bodies by liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.153	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 Kawasaki Junna, Kojima Shohei, Tomonaga Keizo, Horie Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Hidden Viral Sequences in Public Sequencing Data and Warning for Future Emerging Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01638-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lin Hsien Hen, Horie Masayuki, Tomonaga Keizo	4. 巻 66
2. 論文標題 A comprehensive profiling of innate immune responses in bat cells <i>Eptesicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 97 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12952	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 川崎純菜、小嶋将平、向井八尋、朝長啓造、堀江真行
2. 発表標題 内性性ポルナウイルス様配列の網羅的解析：中生代から現代にわたるポルナウイルス感染履歴の追跡
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bea Clarise B. Garcia, Masayuki Horie, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal attachment of Borna disease virus 1
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 Bea Clarise B. Garcia, Masayuki Horie, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal tethering of Bornavirus
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bea Clarise B. Garcia, Masayuki Horie, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal tethering of Bornavirus
3. 学会等名 4th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Yumiko Komatsu, Madoka Sakai, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Nucleoprotein and phosphoprotein of Bornavirus 2 increase the rescue efficiency of recombinant Bornavirus 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 Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga
2. 発表標題 Effect of Bornavirus 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 神田雄大、堀江真行、小松弓子、朝長啓造
2. 発表標題 Back-primingによるボルナ病ウイルスのゲノム3'末端配列の多様化とゲノム複製効率への影響
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江真行、佐々悠木子、朝長啓造
2. 発表標題 ボルナウイルス感染の実態解明に向けて
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀江真行
2. 発表標題 哺乳動物とボルナウイルスの共進化：ドライ・ウェット・フィールドワークを組み合わせたアプローチ
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------