

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23874

研究課題名(和文) 感染記憶として働く小分子RNAを介したウイルス防御機構の解明

研究課題名(英文) Small RNA-based immune memory as an antiviral mechanism

研究代表者

小出 りえ (Koide, Rie)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：40846325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内在性ボルナウイルス様エレメント(EBLN)由来のpiRNAが配列特異的にボルナウイルス感染を抑制する可能性をEBLNノックアウトマウスを用いて検証した。EBLNノックアウトマウスは、ボルナウイルスmRNAに対してアンチセンス鎖のpiRNAを産生しないため、ボルナウイルス感染に対して高感受性になると仮定したが、EBLNノックアウトマウスと野生型マウスにおいてウイルス複製の差異は認められなかった。EBLN配列と現存のボルナウイルスN遺伝子配列の相同性は70%程度であり、ウイルスmRNAの効率的なサイレンシングには不十分である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、EBLN由来piRNAの機能を探るため、マウスゲノムからpiRNAを産生する3つのEBLNを全てノックアウトしたEBLNノックアウトマウスを作製した。またボルナウイルスのマウス感染実験系を確立し、EBLN由来piRNAがマウス脳組織においてボルナウイルス感染を抑制するか否かを検討した。EBLN由来piRNAがボルナウイルス感染を抑制するという仮説の実証には至らなかったが、EBLNノックアウトが海馬の感染性に影響を与える可能性があることがわかった。今後海馬にターゲットを絞り、新たな実験系を検討することで、piRNA経路を介した新たな抗ウイルス機構の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the possibility that piRNAs derived from endogenous bornavirus-like elements (EBLN) suppress Borna disease virus infection in a sequence-specific manner using EBLN knockout mice. We hypothesized that EBLN knockout mice become sensitive to Borna disease virus infection because they do not produce piRNAs antisense to Borna disease virus mRNAs. However, no difference in viral replication was observed between EBLN knockout mice and wild-type mice. EBLN sequences and the existing Borna disease virus N gene have about 70% sequence homology and might be insufficient for efficient silencing of viral mRNA.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性RNAウイルス ボルナウイルス 感染防御 小分子RNA piRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムには、内在性ウイルス様エレメント（EVE）と呼ばれるウイルス由来の配列が多数存在する。EVE の例として、内在性レトロウイルスが古くから知られており、その一部は宿主の生理機能を担うことが示されている。一方で、近年相次いで報告された非レトロウイルス型 EVE はタンパク質を発現しないものも多く、その機能については未解明の点が多い。

内在性ボルナウイルス様エレメント（EBLN）は、RNA ウイルスの一種であるボルナウイルスに類似した EVE であり、非レトロウイルス型 EVE として最初に報告された（Horie et al., Nature, 2010）。ボルナウイルスは、様々な脊椎動物の脳神経組織に感染し、神経症状を引き起こす。先行研究より、ボルナウイルス感染に比較的抵抗性を示す霊長類およびげっ歯類の EBLN が、PIWI-interacting RNA（piRNA）を産生するゲノム領域（piRNA クラスター）に高頻度に存在し、ボルナウイルスの mRNA に対してアンチセンス鎖の piRNA を産生することがわかっていた（Parrish et al., RNA, 2015）。piRNA とは、PIWI タンパク質と相互作用し、piRNA に相補的な配列をもつ標的 mRNA の発現を配列特異的に制御する小分子 RNA である。この機能から、申請者らは EBLN 由来の piRNA が RNA 干渉により近縁のボルナウイルスの感染を抑制する可能性を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、EBLN 配列由来の piRNA が RNA 干渉により配列特異的に外来性ボルナウイルスの感染を抑制する可能性を、遺伝子改変マウスモデルを用いたボルナウイルスの感染実験によって検証することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）遺伝子改変マウスモデルの作製

マウスゲノムには 5 つの EBLN が存在するが、そのうちの 3 つ（EBLN3、EBLN4、EBLN5）は piRNA クラスターの内部もしくは近傍に位置し、ボルナウイルスの mRNA に対してアンチセンス鎖の piRNA を産生する（Parrish et al., RNA, 2015）。そこで EBLN 由来 piRNA の機能を探るため、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて EBLN3、EBLN4、EBLN5 をそれぞれ KO したマウスを作製した。またこれらのマウスを交配することで、EBLN3、EBLN4、EBLN5 を全て欠損したマウス（EBLN-KO マウス）を得た。

また、マウスゲノムの piRNA クラスターに既存のボルナウイルス N 遺伝子配列（EBN）を挿入した、EBN-KI マウスを作製した。

（2）ボルナウイルスの感染実験

感染実験には、以前リバーシジェネティクス法を用いて作製された GFP 発現組換えボルナウイルスを用いた。新生仔マウスの右脳に GFP 発現組換えボルナウイルスを接種し、継時的に体重の変化を記録した。接種後一定期間が経過した時点で剖検を行い、脳を中心に組織を回収した。

（3）脳組織からのボルナウイルスの検出

採材したマウス脳組織から RNA を抽出し、ボルナウイルス P 遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 RT-PCR によって脳組織中のウイルス RNA コピー数を測定した。また、ビブラトームを用いて還流固定した脳から切片を作製し、ボルナウイルスの組織分布を脳組織蛍光観察にて確認した。

4. 研究成果

(1) マウス脳組織におけるボルナウイルス感染動態の解析

予備研究として、マウス脳組織におけるボルナウイルスの感染動態を明らかにするため、GFP 発現組換えボルナウイルスを接種したマウス脳内のウイルス RNA 量の推移を継時的に調べた。その結果、ウイルス RNA 量は接種後 4 週まで増加し続けるが、接種後 8 週以降いくつかの動物でウイルス RNA 量の減少が認められることがわかった (図 1)。この原因についてはまだ詳しく追求していないが、ボルナウイルスに対する感受性が高い個体と、ウイルス感染を制御している個体とで免疫応答が異なるか、またはウイルスが変異を獲得している可能性が考えられた。

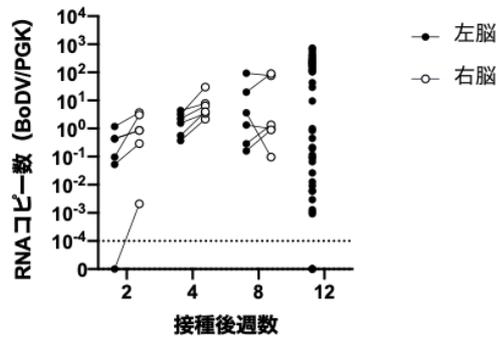


図1 マウス脳組織におけるウイルスRNA量の推移

次に、接種後 12 週の時点でマウス脳の様々な領域 (海馬、視床下部、皮質、小脳、嗅球、その他の脳領域) におけるウイルス RNA 量を調べたところ、海馬で最も多くウイルス RNA が検出された (図 2)。脳組織蛍光観察でも同様の結果が観察されたことから、GFP 発現組換えボルナウイルスはマウスの海馬でよく感染・増殖することがわかった。

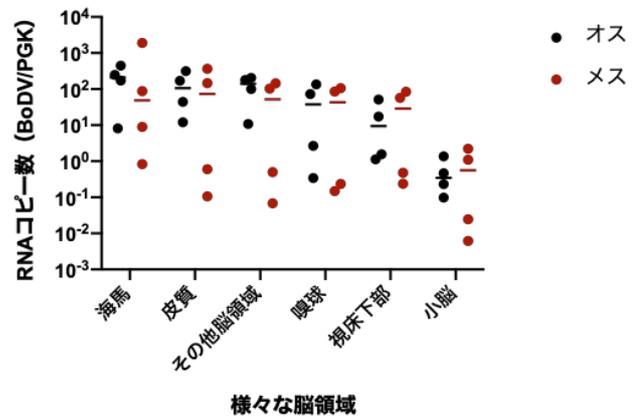


図2 様々な脳領域からのウイルスRNAの検出

(2) 野生型マウス、EBLN-KO マウスおよび IFN γ 受容体 KO マウスにおけるボルナウイルスの感染性の比較

EBLN 由来 piRNA がボルナウイルス感染を抑制するかどうかを検証するため、接種後 12 週目に EBLN-KO マウスおよび野生型マウスの脳内ウイルス RNA 量を比較し、ボルナウイルス感染に対する感受性の違いを調べた。また陽性コントロールとして、ボルナウイルスの排除に重要な働きをもつインターフェロン γ (IFN γ) (Hausmann et al., J Virol, 2005) の受容体をノックアウトしたマウス (IFN γ 受容体 KO マウス) を用いた。EBLN-KO マウスは、ボルナウイルスの mRNA に対してアンチセンス鎖の piRNA を産生できないため、ボルナウイルス感染に対して高感受性になると仮定したが、EBLN-KO マウスと野生型マウスにおいてウイルス複製の差異は認められなかった (図 3)。

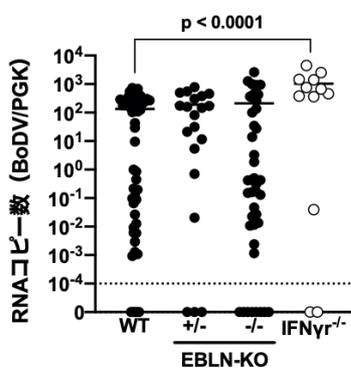


図3 ボルナウイルス感染性の比較

また先行研究の通り、IFN γ 受容体 KO マウスでは野生型マウスと比較してウイルス RNA 量の増加が認められたが、EBLN-KO マウスでは同様の現象は確認されなかった。EBLN 配列と既存のボルナウイルス N 遺伝子配列の相同性は 70%程度であり、ウイルス mRNA の効率的なサイレンシングには不十分である可能性も考えられた。そこで、配列相同性がサイレンシング活性にどう影響するかを調べるためのコントロールとして、申請者らは EBLN 配列の代わりに既存のボルナウイルス N 遺伝子配列を piRNA クラスタに挿入した EBN-KI マウスを作製した。EBN 由来の piRNA がボルナウイルスの mRNA と RNA 干渉するかどうか、また EBN-KI マウスは野生型マウスに比べてボルナウイルスに対する抵抗性を持つかどうか現在検証を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu, X., Kosugi, S., Koide, R., Kawamura, Y., Ito, J., Miura, H., Matoba, N., Matsuzaki, M., Fujita, M., Kamada, A.J., Nakagawa, H., Tamiya, G., Matsuda, K., Murakami, Y., Kubo, M., Sato, K., Momozawa, Y., Ohashi, J., Terao, C., Yoshikawa, T., Parrish, N.F., Kamatani, Y.	4. 巻 16
2. 論文標題 Endogenization and excision of human herpesvirus 6 in human genomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1008915-1008915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008915	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 該当する

1. 著者名 小出りえ、ニコラス・パリッシュ	4. 巻 273
2. 論文標題 内在性RNAウイルスとCRISPR様免疫	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ「レトロトランスポゾンと内在性ウイルス 機能と疾患」	6. 最初と最後の頁 1155-1158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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