

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850208

研究課題名(和文) ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼに由来する遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) An RNA-dependent RNA polymerase gene in the genomes of bats

研究代表者

堀江 真行 (Horie, Masayuki)

鹿児島大学・共同獣医学部・特任助教

研究者番号：20725981

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)：内在性ボルナウイルス様L (EBLL) は、生物ゲノムに存在する、ボルナウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子に由来する配列である。本研究において、Eptesicus属コウモリに存在するEBLL (eEBLL-1) が1180年以上にわたって、5000塩基以上からなるオープンリーディングフレームを保持していることが明らかとなった。さらに進化学的解析や転写産物の解析により、eEBLL-1が機能的なタンパク質をコードしていることが強く示唆された。本研究は、ウイルス由来RdRpが哺乳動物細胞において機能し得ることを世界で初めて示した研究である。

研究成果の概要(英文)：Endogenous bornavirus-like L (EBLL) elements are heritable sequences derived from bornavirus L genes that encode a viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) in eukaryotic genomes. Here, we showed that bats of the genus Eptesicus have preserved for more than 11.8 million years an EBLL element named eEBLL-1, which has an intact open reading frame of more than 5,000 nucleotides. Sequence analysis revealed that functional motifs essential for mononegaviral RdRp activity are well conserved in the EBLL-1 genes. Genetic analyses showed that natural selection operated on eEBLL-1 during the evolution of Eptesicus. We detected efficient transcription of eEBLL-1 in tissues from Eptesicus bats and in cell culture from *E. nilssonii* that we established. To our knowledge, this study is the first report showing that the eukaryotic genome has gained a riboviral polymerase gene from an ancient virus that has the potential to encode a functional RdRp.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性ウイルス様エレメント 共進化 RNA依存性RNAポリメラーゼ ボルナウイルス

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物のゲノムにはウイルスに由来する遺伝子配列が多数存在し、これらを内在性ウイルス様エレメント (EVE) とよぶ (Katzourakis *et al.*, 2010)。EVE 由来遺伝子の一部は、哺乳動物の生理機能に必須の役割を果たすことが知られており、哺乳動物とウイルスの共進化の観点から非常に興味深い研究対象である。また、EVE は過去のウイルス感染の分子化石であるため、体化石を残さない太古のウイルスに関する知見が得られる貴重な研究材料である (Jern *et al.*, 2008)。

ボルナウイルスは様々な脊椎動物に感染する RNA ウイルスであり、モノネガウイルス目に属する。これまでにヒトを含む様々な哺乳動物のゲノムに、ボルナウイルスに由来する遺伝子配列 (内在性ボルナウイルス様エレメント: EBL エレメント) が存在することが報告されている (Horie *et al.*, 2010)。しかし EBL エレメントの生物学的意義はほとんどわかっていない。

ボルナウイルスの L 遺伝子は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) をコードする。哺乳動物ゲノムにはボルナウイルスの L 遺伝子に由来する EBLL が多数存在するが、それらに関する詳細な解析は全く行われていない。EBLL に関する知見を得るため、哺乳動物の EBLL エレメントについてスクリーニングを行い、*Eptesicus fuscus* というコウモリのゲノムに、ボルナウイルスの L 遺伝子とほぼ同じ長さの 5000 塩基以上からなる巨大なオープンリーディングフレーム (ORF) を持つ EBLL が存在することを発見した。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳動物とウイルスの共進化の解明を目的とし、上記の *E. fuscus* ゲノムに存在する EBLL の生物学的意義に関する知見を得ることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 進化学的解析

BLAST を用いたデータベース検索により、コウモリの EBLL を網羅的に検出した。さらに各種コウモリのゲノム DNA を鋳型とした PCR とシーケンスにより、各種 EBLL の塩基配列を決定した。

得られた配列を用いて、内在化機構および内在化年代を推定するとともに、自然選択圧の検出を行った。さらに、推定されるアミノ酸配列を解析した。

また、EBLL とボルナウイルスの L 遺伝子の進化に関する知見を得るために系統樹解析を行った。

(2) *Eptesicus* 属コウモリにおける EBLL の発現解析

RT-PCR 法により EBLL の mRNA の発現を解析した。コウモリ cDNA は口ベルトコッホ研究

所より分与を受けた。

(3) *E. nilssonii* 由来細胞株の樹立

北海道帯広市にて *E. nilssonii* を捕獲し、各種臓器より培養細胞を作成し、EBLL に関する解析を行った。

(4) ボルナウイルスの検出と分離

様々な動物の検体から RT-PCR 法によりボルナウイルスの検出を行うとともに、データベースからボルナウイルス様配列の検索を試みた。

4. 研究成果

(1) 内在化機構に関する解析

はじめに上記の巨大な ORF を持つ *E. fuscus* の EBLL (efEBLL-1) がどのようにコウモリゲノムに組み込まれたのか、すなわち efEBLL-1 の内在化機構に関する解析を行った。

efEBLL-1 の周辺の塩基配列を詳細に観察すると、efEBLL-1 の下流にはボルナウイルスの転写終止シグナル様配列とそれに続く短いポリ A 配列が確認された。さらに efEBLL-1 のポリ A 配列の直下および efEBLL-1 の上流に重複配列 (target site duplication: TSD) が観察された。ポリ A 配列および TSD は、レトロトランスポゾンである LINE-1 の逆転写酵素を介した内在化の痕跡である。そのため、efEBLL-1 も LINE-1 の活性を介して *Eptesicus* 属コウモリのゲノムに内在化したと考えられた。

(2) 内在化年代の推定

次に efEBLL-1 の内在化年代の推定を行った。内在化年代の推定には、相同な EBLL の検出が必要である。はじめに相同な EBLL を検出するため、データベース検索によるコウモリ EBLL の検索と相同性解析を行った。BLAST によるデータベース検索により、*E. fuscus* に比較的近縁な *Myotis* 属コウモリゲノムより EBLL を検出した。検出した EBLL について、efEBLL-1 との相同性解析を行ったが、トランスポゾンの挿入などにより、相同か否かは判断できなかった。

データベース解析では有用な知見が得られなかったため、*Eptesicus* 属コウモリのゲノム DNA を用い、PCR とシーケンス解析により、EBLL の検出を行った。その結果、*E. nilssonii* と *E. serotinus* のゲノムに efEBLL-1 に極めて類似した EBLL が存在することが明らかになった。さらに各 EBLL-1 の全長配列とその周辺配列の塩基配列を確認したところ、3 種の *Eptesicus* 属コウモリ間では EBLL の全長のみならず、その周辺配列も高度に保存されていることが明らかとなった。上記のデータは、3 種の EBLL が相同な遺伝子配列であることを意味する。この相同な EBLL を efEBLL-1 と名付けた。

efEBLL-1 は相同であることから、少なくとも

も3種のコウモリの共通祖先においてL遺伝子の内在化が起こったと考えられる。これらのコウモリの分岐年代は約1180年前と推定されていることから、eEBLL-1は少なくとも1180年前に内在化したことが示唆された(図1)。

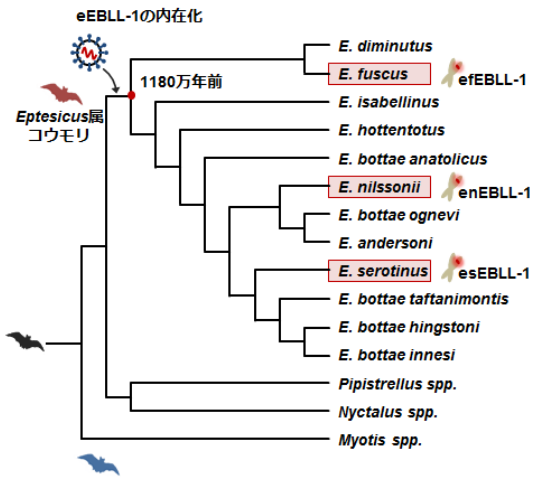


図1 .eEBLL-1の内在化年代の推定

(3) 自然選択圧の検出

E. nilssonii と *E. serotinus* の2種のeEBLL-1も *E. fuscus* と同じ長さの巨大なORFを持つことから、eEBLL-1は何らかの機能的なタンパク質をコードしている可能性が強く示唆された。eEBLL-1のタンパク質としての機能の有無を推定するため、eEBLL-1における自然選択圧について2通りの解析を行った。

はじめにORFの維持に関する選択圧を解析した。eEBLL-1が中立に進化した場合に1180万年の間に獲得するストップコドンの数をシミュレートしたところ、ストップコドンが0である確立、すなわちORFを維持する確率は極めて低いことが明らかとなった(図2a)。つまり、進化の過程においてORFを維持する選択圧が働いていたと考えられる。

次にeEBLL-1の非同義置換/同義置換比(dN/dS)の計算により自然選択圧の解析を行ったところ、負の自然選択圧が検出された。これはeEBLL-1がタンパク質をコードし、機能的制約があることを意味する(図2b)。

上記の解析より、eEBLL-1が機能的なタンパク質をコードすることが強く示唆された。

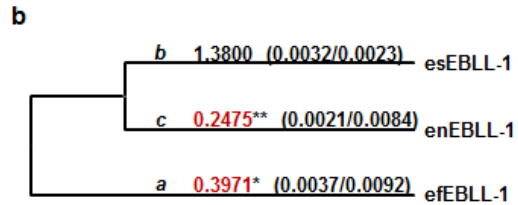
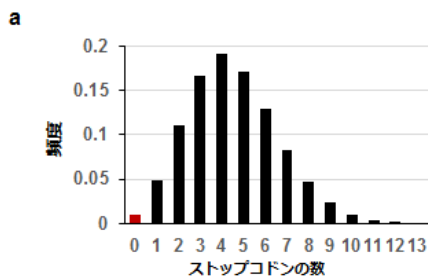


図2 .eEBLL-1における自然選択圧の検出

(4) アミノ酸配列の解析

これまでの解析によってeEBLL-1が機能的なタンパク質をコードすることが強く示唆された。タンパク質の機能に関する知見を得るために、eEBLL-1のアミノ酸配列の解析を行った。

eEBLL-1のアミノ酸配列を用いてPfam検索を行ったところ、ポルナウイルスのLタンパク質と同様に、Mononegavirales RNA-dependent RNA polymerase domain と Mononegavirales mRNA-capping region V domain が存在することが明らかとなった。

次にこれまでに同定されているモチーフ配列の検索を行った。RdRp活性に必須のGDNモチーフや、mRNAのキャッピングに必要なPRNTaseモチーフが存在し、ポルナウイルスのLタンパク質に存在する既知のモチーフ配列がすべてのeEBLL-1に保存されていることが明らかとなった(図3)。これらのことから、eEBLL-1もポルナウイルスのLタンパク質と同様に、RdRp活性を持つことが示唆された。

哺乳動物はRdRpを持っていない。植物等はRdRpをコードしており、抗ウイルス機構や遺伝子発現調節機構に重要な役割を果たすことが知られている。eEBLL-1も哺乳動物において同様の機能を持つかもしれない。

```
BDV      NVTFNILGQGDNQTIIIVHKSASQNNQLLAERA
efEBLL-1 GIHGEVLGQGDNQTILITPPRHMSQEDARDVV
```

図3 .efEBLL-1に保存されたモチーフ配列の一例

(5) eEBLL-1の転写産物の検出

Eptesicus 属コウモリの細胞内におけるeEBLL-1の転写産物を確認するため、*E. nilssonii* および *E. serotinus* の各組織よりRNAを抽出しRT-PCRを行った。その結果、特異的なバンドが観察され、eEBLL-1が *Eptesicus* 属コウモリの細胞においてRNAとして発現していることを明らかにした(図4)。

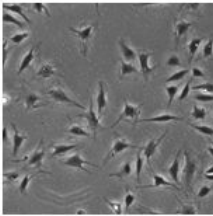


図4. eEBLL-1 転写産物の検出

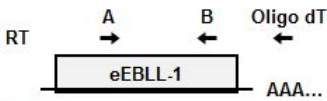
(6) *E. nilssonii* 由来培養細胞の樹立と解析
Eptesicus 属コウモリを実験動物として使用するのには困難であるため、eEBLL-1 の機能解析には培養細胞が必須である。しかし、これまでに *Eptesicus* 属コウモリ由来の細胞株の樹立はほとんど報告されていないため、*E. nilssonii* を捕獲し、細胞株の樹立を試みた。
E. nilssonii の腎臓、肝臓、脾臓、肺より初代培養細胞の作成を試み、腎臓および脾臓より初代培養細胞が得られた。両細胞を長期継代したところ、腎臓由来細胞は少なくとも9ヶ月にわたって継代が可能であった(図5a)。一方、脾臓由来細胞は2ヶ月で増殖能を失い、それ以上の継代ができなかった。樹立した腎臓由来細胞を HAMO1-EnK と名付けた。HAMO1-EnK 細胞について、cytochrome b 遺伝子配列を解析し、確かに *E. nilssonii* であることを確認した。

次に、HAMO1-EnK 細胞のゲノムにおける eEBLL-1 の配列を解析したところ、これまでの解析と同様に ORF が保存されていた。さらに同細胞より RNA を抽出し、strand-specific RT-PCR を行ったところ、eEBLL-1 よりセンス鎖 mRNA が転写されていることが明らかとなった(図5b, c)。HAMO1-EnK 細胞は今後の eEBLL-1 の機能解析に極めて有用なツールである。

a



b



c

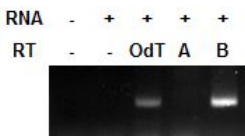


図5. *E. nilssonii* 由来細胞株の樹立と eEBLL-1 の発現解析

(7) eEBLL-1 とボルナウイルスの相互作用

EBL の一部はボルナウイルスのポリメラーゼ活性を阻害し、抗ボルナウイルス作用を持つことが報告されている。哺乳動物のボルナウイルスの一種であるボルナ病ウイルス

(BDV) のミニレプリコンを用いて、eEBLL-1 が BDV のポリメラーゼ活性に与える影響を検討した。その結果、eEBLL-1 の有無にかかわらず、BDV のポリメラーゼ活性に変化はなかった。抗ウイルス作用を持つ EVE の多くは、近縁のウイルスにのみに対して抗ウイルス作用を持つことが知られていることから、eEBLL-1 とボルナウイルスの系統樹解析を行う必要があると考えられた。

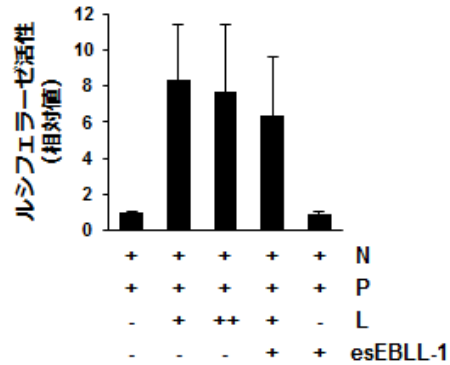


図6. eEBLL-1 存在下における BDV ミニレプリコンアッセイ

(8) コウモリ EBLL に関する系統樹解析

コウモリ EBLL とボルナウイルスの L 遺伝子を用いて、系統樹解析を行った。その結果、eEBLL-1 やその他のコウモリ EBLL は、既知のボルナウイルスとは遺伝的に遠縁なクラスターを形成することが明らかとなった。これらのことから、既知のボルナウイルスとは遺伝的に遠縁なコウモリボルナウイルスの存在が示唆された。

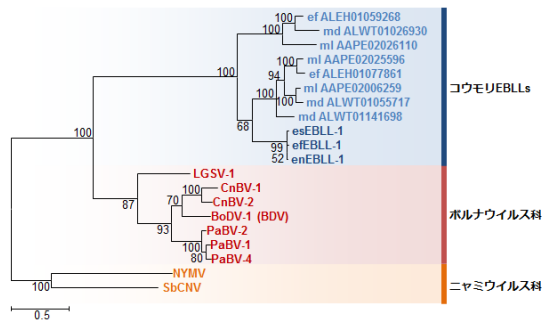


図7. 系統樹解析.

(9) 新規ボルナウイルスの分離

上記の解析から、遺伝的に eEBLL-1 により近縁なボルナウイルスが存在することが示唆された。また、eEBLL-1 がそれらのウイルスの複製を制御する可能性も考えられた。そこで新規ボルナウイルスの探索を行った。

様々な動物の糞便等を材料として、RT-PCR によりスクリーニングを行ったところ、数検体において鳥ボルナウイルスの核酸を検出した。RT-PCR 陽性の個体よりウイルス分離を試みたところ、2 株のオウムボルナ

ウイルス 2 (PaBV-2)、2 株の PaBV-4、さらに新規ボルナウイルスであるジュウシマツのボルナウイルス 1 株、計 5 株の鳥ボルナウイルスの分離に成功した。また、PaBV-5 の全長配列を決定した。

これまでに日本国内での鳥ボルナウイルスの分離の報告はなく、我が国における初の鳥ボルナウイルス分離例となった。また、ジュウシマツのボルナウイルスは世界で初めての分離例であり、今後の各種研究において有用なツールである。

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 5 件)すべて査読有り

1. Komorizono, R., Makino, A., Horie, M., Honda, T. and Tomonaga, K. 2016. Sequence determination of a new parrot bornavirus-5 strain in Japan; implication of clade specific sequence diversity in the regions interacting with host factors. *Microbiol. Immunol.* In press. doi: 10.1111/1348-0421.12385.
2. Brunotte, L., Beer, M., Horie, M. and Schwemmler, M. 2016. Chiropteran influenza viruses: flu from bats or a relic from the past? *Curr. Opin. Virol.* 16: 114-119. doi: 10.1111/1348-0421.12385.
3. Horie, M., Kobayashi, Y., Honda, T., Fujino, K., Akasaka, T., Kohl, C., Wibbelt, G., Muhldorfer, K., Kurth, A., Muller, M. A., Corman, V. M., Gillich, N., Suzuki, Y., Schwemmler, M. and Tomonaga, K. 2016. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci. Rep.* 6: 25873. doi: 10.1038/srep25873.
4. Horie, M., Sassa, Y., Iki, H., Ebisawa, K., Fukushi, H., Yanai, T. and Tomonaga, K. 2016. Isolation of avian bornaviruses from psittacine birds using QT6 quail cells in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 305-308. doi: 10.1292/jvms.15-0372.
5. Sassa, Y., Bui, V. N., Saitoh, K., Watanabe, Y., Koyama, S., Endoh, D., Horie, M., Tomonaga, K., Furuya, T., Nagai, M., Omatsu, T., Imai, K., Ogawa, H. and Mizutani, T. 2015. Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild bird samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan. *Virus Genes* 51: 234-243. doi: 10.1007/s11262-015-1240-7.

[学会発表](計 9 件)

1. 堀江真行. ボルナウイルス感染症. 第 89 回鹿児島県家畜疾病診断会. 2016 年 2 月 23 日. 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
2. 堀江真行, 中川寛子, 正谷達膳, 小澤真, 松鶴彩, 奥谷公亮, 金澤伯弘, 上野晃聖. 野鳥におけるボルナウイルス検出の試み. 第 9 回ボルナウイルス研究会. 2016 年 1 月 29 日. 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
3. Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Tomoyuki Honda, Takumi Akasaka, Nadine Gillich, Marcel A. Mueller, Victor M. Corman, Haruko Ogawa, Kunitoshi Imai, Yoshiyuki Suzuki, Martin Schwemmler and Keizo Tomonaga. A putative RNA-dependent RNA polymerase gene derived from an ancient bornavirus in bats. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22-24 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
4. Ryo Komorizono, Masayuki Horie, Tomoyuki Honda, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Sequence analysis of a novel parrot bornavirus 5. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22-24 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
5. 堀江真行. コウモリゲノムに内在するボルナウイルス由来遺伝子配列の解析. 育志賞研究発表会. 2015 年 8 月 31 日. 京都大学 (京都府京都市)
6. Nadine Gillich, 小嶋将平, 朝長啓造, Martin Schwemmler, 堀江真行. Cre リコンビナーゼ発現組換えボルナ病ウイルスの作出と性状解析. 第 8 回日本ボルナウイルス研究会. 2015 年 3 月 24 日. 京都産業大学 (京都府京都市)
7. 堀江真行, 小林由紀, 本田知之, 藤野寛, 赤坂卓美, Marcel A. Müller, Victor M. Corman, Claudia Kohl, Nadine Gillich, 鈴木善幸, Martin Schwemmler, 朝長啓造. コウモリゲノムに内在するボルナウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ由来する遺伝子配列に関する研究. 第 51 回日本ウイルス学会九州支部総会. 2014 年 9 月 5 日. 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)
8. 堀江真行. ボルナウイルスと哺乳動物の共進化. 育志賞研究発表会. 2014 年 8 月 20 日. 東京工業大学東工大蔵前会館 (東京都大田区)
9. Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Tomoyuki Honda, Takumi Akasaka, Nadine Gillich, Marcel A. Mueller, Victor M. Corman, Yoshiyuki Suzuki, Martin Schwemmler and Keizo Tomonaga.

Putative mammalian RNA-dependent RNA polymerase genes derived from an ancient bornavirus. 16th International Congress of Virology. 2014年7月31日・モントリオール(カナダ).

〔図書〕(計 1件)

1. 堀江真行、朝長啓造：ボルナウイルス感染症．人獣共通感染症 改訂3版，2016年、p163-168，医薬ジャーナル社

〔その他〕

アウトリーチ活動、ホームページ等
ENDEAVR 若手内在性ウイルス様エレメント研究会のホームページとTwitter
<http://endeavr.jimdo.com/>
<https://twitter.com/endeavr2016>

6．研究組織

(1)研究代表者

堀江真行 (HORIE, Masayuki)
鹿児島大学・共同獣医学部・特任助教
研究者番号：20725981

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小林由紀 (KOBAYASHI, Yuki)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：30712492

赤坂卓美 (AKASAKA, Takumi)
帯広畜産大学・畜産学部・助教
研究者番号：40748357

小川晴子 (OGAWA, Haruko)
帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・教授
研究者番号：10400079

今井邦俊 (IMAI, Kunitoshi)
帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・教授
研究者番号：70374767

朝長啓造 (TOMONAGA, Keizo)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：10301920