

オルソボルナウイルスの宿主特異性に関わる 分子機構の研究

小森園 亮

目次

要旨

略語表

第一章 序論

- 1-1. ボルナウイルスの基本性状
- 1-2. 新興ボルナウイルス
- 1-3. オルソボルナウイルスの系統と宿主域
- 1-4. ウイルスの宿主特異性規定と進化
- 1-5. これまでの研究の推移と本研究の目的

第二章 結果

- 2-1. クレード 2 ウイルスは哺乳類細胞へ感染性を示す
- 2-2. G タンパク質を介する細胞侵入段階は宿主域規定因子ではない
- 2-3. MG タンパク質組換えウイルスの感染性評価
- 2-4. N タンパク質の N 末端領域には正の選択圧が働いている
- 2-5. クレード 3 ウイルスの N タンパク質は哺乳類細胞における核移行活性が低い
- 2-6. 哺乳類細胞におけるクレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性は低い
- 2-7. クレード 3 ウイルスの N タンパク質核移行シグナルは哺乳類細胞におけるウイルスポリメラーゼ活性を抑制する
- 2-8. N タンパク質の核移行シグナルを置換したボルナ病ウイルスは哺乳類細胞での増殖効率が減少する
- 2-9. 鳥類由来のインポーチンは哺乳類細胞内でのクレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性を上昇させる

第三章 考察

- 3-1. 本研究の意義
- 3-2. 細胞侵入過程とウイルス進化
- 3-3. 核移行とウイルス複製

第四章 材料と方法

引用文献

注釈

謝辞

要旨

ボルナウイルスは非分節 1 本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムに持ち、核内で持続的に複製するウイルスである。ボルナウイルス科オルソボルナウイルス属はクレード 1 哺乳類ボルナウイルス、クレード 2 鳥類ボルナウイルス、クレード 3 鳥類ボルナウイルスと系統学上大きく 3 つのクレードに分類される。現在までに、クレード 1 には 3 種類、クレード 2 および 3 には 13 種類のウイルスが同定されているが、これらオルソボルナウイルスの宿主特異性および宿主特異性を決定する分子基盤に関する知見は殆どない。そこで本研究では、これら 3 つのクレードに分類されるオルソボルナウイルスの *in vitro* における宿主特異性、ならびにその宿主特異性に関わる分子基盤の解明を目的とし研究を行った。

まず初めに、各クレードに属する 4 種のウイルス（クレード 1: ボルナ病ウイルス; Borna disease virus 1 ; BoDV-1, クレード 2: キンバラボルナウイルス 1 ; *Munia bornavirus* 1 ; MuBV-1, クレード 3: オウムボルナウイルス 2 ; Parrot bornavirus 2 ; PaBV-2, オウムボルナウイルス 4 ; Parrot bornavirus 4 ; PaBV-4) を哺乳類細胞および鳥類細胞に接種し *in vitro* における宿主特異性を評価した。その結果、クレード 1 ウイルス (BoDV-1) ならびにクレード 2 ウイルス (MuBV-1) は哺乳類および鳥類細胞両方に感染性を示すのに対し、クレード 3 ウイルス (PaBV-2, PaBV-4) は鳥類にのみ感染性を示すことが明らかとなった。

多くの RNA ウイルスでは、細胞表面に発現する受容体とウイルス粒子の表面糖タンパク質が結合する細胞侵入段階で宿主特異性が制限される。そこで、クレード 3 ウイルスの表面糖タンパク質 (G タンパク質) と哺乳類細胞の受容体との結合能が低く、細胞侵入段階が宿主特異性を制限していると仮定し、G タンパク質をそれぞれのクレードに置換したシュードタイプウイルスの感染性を評価した。その結果、クレード 3 ウイルスは哺乳類細胞に感染性を示さないにも関わらず、クレード 3 の G タン

パク質を発現する組換え BoDV-1 は哺乳類細胞にも感染性を示した。以上のことから、G タンパク質を介する細胞侵入段階は宿主特異性を制限する決定段階ではないことが示唆された。

ウイルスはさまざまな宿主に適応し複製効率を上げるため、進化の過程で次々に変異を獲得する。そこで、ウイルス進化の過程においてクレード特異的に変異が有意に蓄積した部位を検出するため、ウイルスゲノム配列を用いて比較ゲノム解析を行った。その結果、N タンパク質の N 末端領域に他の領域と比較し有意に変異が蓄積しており、正の選択圧が働いていることが示唆された。モチーフ予測ならびにタンパク質局在を解析した結果、この N タンパク質の末端領域は核移行シグナル(NLS)であると予測された。そこで次に、各クレードの N タンパク質の哺乳類および鳥類細胞における細胞内局在を比較した。その結果、クレード 3 ウイルスの N タンパク質は哺乳類細胞における核内移行活性が低下していた。また、クレード 3 の NLS は哺乳類細胞における核移行活性がクレード 1 と比較して低いことが示された。

最後に、この NLS を介する N タンパク質の核移行能がウイルスの転写複製活性に及ぼす影響を明らかにするために、哺乳類ならびに鳥類細胞におけるポリメラーゼ活性をミニレプリコンアッセイを用いて評価した。その結果、クレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性は哺乳類細胞において顕著に低いことが示された。また、クレード 1 およびクレード 3 のポリメラーゼ活性は NLS を介した N タンパク質の核移行能に依存することが示唆された。さらに、N タンパク質の NLS をクレード 3 の配列に置き換えた組換え BoDV-1 は、哺乳類細胞における増殖効率が野生型と比較し顕著に低下した。以上の結果より、NLS を介する N タンパク質の核移行活性が宿主特異的なオルソボルナウイルスのポリメラーゼ活性に重要であり宿主特異性に関与していることが示された。本研究により、進化過程においてウイルスが種間を超えた宿主へ適応するメカニズムの一端が明らかとなった。

略語表

本文中および図表中に用いた略語は以下の通りである。

A.A.	: Amino acid
ABBV	: Aquatic bird bornavirus
ABV	: Avian bornavirus
BoDV	: Borna disease virus
cDNA	: Complementary DNA
CnBV	: Canary bornavirus
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
dN/dS	: The ratio of non-synonymous to synonymous substitutions
DNA	: Deoxyribonucleic acid
eGFP	: Enhanced green fluorescent protein
EsBV	: Estrildid finch bornavirus
FCS	: Fatal calfserum
G	: Glycoprotein
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gRNA	: genome RNA
Gluc	: Gaussia luciferase
HIV-1	: human immunodeficiency virus 1
IAV	: Influenza A virus
IFA	: Indirect immune fluorescence assay
IMP	: Importin
KPNA	: karyopherin alpha
kb	: Kilobase
L	: RNA dependent RNA polymerase
M	: Matrix protein
mM	: Milimolar
MOI	: Multiplicity of infection
mRNA	: messenger RNA
MuBV	: Munia bornavirus
N	: Nucleoprotein
NCBI	: National Center for Biotechnology Information

NES	: Nuclear export signal
NLS	: Nuclear localization signal
NPC	: Nuclear pore complex
nt	: Nucleotide
ORF	: Open reading frame
P	: Phosphoprotein
PAGE	: Poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate-buffered saline
PDD	: proventricular dilatation disease
pH	: Potential of hydrogen
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
PaBV	: Parrot bornavirus
RNA	: Ribonucleic acid
RT-PCR	: Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-qPCR	: Real-time quantitative polymerase chain reaction
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TBS	: Tris buffered saline
TNPO	: Transportin
Triton X-100	: Octylphenol ethoxylate
Tween-20	: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
vRNP	: Viral ribonucleoprotein
VSBV	: Variegated squirrel bornavirus
vSPOT	: Viral speckle of transcripts
WB	: Westernblotting
WT	: Wildtype
X	: X protein
ΔG	: G gene deficient recombinant virus
ΔMG	: M and G gene deficient recombinant virus
%	: Percent
μL	: Microliter
μg	: Microgram
μm	: Micrometer

第一章

序論

1-1. ボルナウイルスの基本性状

オルソボルナウイルス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し、非分節1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムに有するRNAウイルスである¹⁻³。多くのRNAウイルスは細胞質内で転写複製をおこない、増殖後は細胞傷害性を示すのに対し、オルソボルナウイルスは細胞傷害性を示すことなく、細胞核内で転写複製をおこない細胞分裂後も持続感染を長期間成立させる非常に特徴的なRNAウイルスである⁴。オルソボルナウイルスのプロトタイプとして現在までにボルナ病ウイルス(Borna disease virus 1 ; BoDV-1)が主に研究されている。BoDV-1は中央ヨーロッパにおいて、ウマやヒツジで散発的に流行した髄膜脳脊髄炎(ボルナ病)の病原因子として同定された⁵⁻⁷。BoDV-1感染個体は、数週間または長い場合数ヶ月の潜伏期間を経て、痙攣、発熱、抑鬱、興奮、麻痺などを呈したのち全身性麻痺により、ウマの場合約80-100%が死に至る⁸。近年、ヒトへの感染とその病原性も確認されており、急性脳炎による死亡が報告された⁹⁻¹¹。

BoDV-1はエンベロープに包まれた直径100-130 nmの球状のウイルス粒子から成り、約8.9 kbのウイルスゲノムRNAに少なくとも6つの遺伝子をコードしている(図1)¹²。他のモノネガウイルスと同様、3'末端よりヌクレオタンパク質(N)、リン酸化タンパク質(P)、マトリックタンパク質(M)、表面糖タンパク質(G)、RNA依存性RNAポリメラーゼ(L)が順にコードされている。またP遺伝子をコードするmRNAに約10 kDaの非構造タンパク質であるXタンパク質がバイシストロニックにコードされている¹³。N、P、Lタンパク質はRNAポリメラーゼ複合体の主要構成因子であり、ウイルスの転写複製に必須である。Mタンパク質は1本鎖RNAおよび脂質膜と結合し、エンベロープを裏打ちする構造タンパク質である¹⁴。Gタンパク質はウイルス粒子表面に突出し、宿主細胞への侵入に関与している¹⁵。Xタンパク質はPタンパク質との相互作用を介してウイルスの転写複製活性を負に制御するアクセサリー

タンパク質である¹⁶。

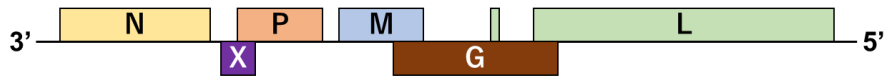


図1. オルソボルナウイルスのゲノム構造

オルソボルナウイルスは少なくとも N, P, X, M, G, L と 6 つの遺伝子をコードしている。X および P をコードする mRNA は異なるフレームで ORF が存在し、それぞれの翻訳開始点がリボソームに認識されることでタンパク質が発現する。M, G, L をコードするポリシストロン性 pre-mRNA はスプライシングにより個々のタンパク質を発現する mRNA へ成熟する。

BoDV-1 の受容体は明らかにされていないが、ウイルスと宿主細胞の吸着に関与する宿主因子として 78 kDa glucoseregulated protein(BiP, GRP78)が同定されている¹⁷。またウイルス側の因子として、G タンパク質の N 末端側にある GP1 ドメインが細胞表面への吸着に関与することが明らかとなっている¹⁸。細胞表面への吸着後、Rab5 を介したエンドサイトーシス、または脂質ラフトを経由してウイルス粒子は細胞質内へ侵入する^{19,20}。細胞質侵入後、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜の膜融合により、複製複合体であるウイルスリボヌクレオプロテイン(vRNP)が細胞質へ放出される²¹。BoDV-1 は核内で転写複製をおこなうため、宿主の分子機構を利用して vRNP を核内へ移行する。N、P、L タンパク質はそれぞれ核内移行シグナル(nuclear localization signal ; NLS)をもち、ウイルスタンパク質単独、もしくは相互作用により核内へ移行される (図 2)²¹。

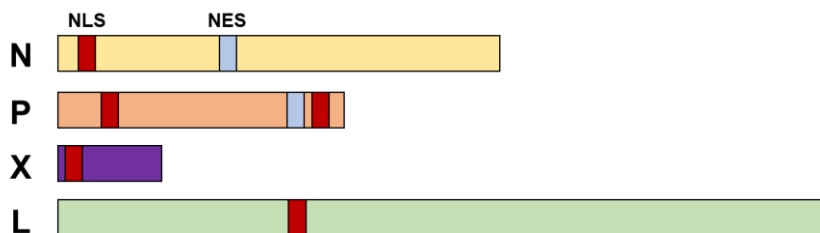


図 2. ウイルスタンパク質の核移行シグナルと核外輸送シグナルの分布

ウイルスタンパク質 N, P, X, L はそれぞれ核移行シグナル(NLS)および核外輸送シグナル(nuclear export signal ; NES)を有しており、宿主の分子輸送機構を用いてウイルスタンパク質を核内外へ輸送することで核内での転写複製を可能にしている。

他のモノネガウイルスと同様、BoDV-1 の転写複製にはヌクレオカプシド、N-P タンパク質複合体、P-L タンパク質複合体による vRNP の形成が必須である^{22,23}。ヌクレオカプシドはウイルス RNA を覆うように結合する N タンパク質からなり、転写複製の鋳型として機能する。BoDV-1 は感染細胞の核内で、宿主のクロマチンを足場としたドット状の構造物である viral speckle of transcripts(vSPOT)を形成する^{24,25}。この vSPOT ではウイルスタンパク質だけでなく、ウイルスゲノム RNA およびアンチゲノム RNA も検出されていることから BoDV-1 の転写複製の場であると考えられている。安定な vSPOT の形成に関与している宿主因子としてヒストン、High mobility group box protein 1(HMGB1)、X-linked RNA-binding motif protein(RBMX)が同定されており、これら核内機能タンパク質は vSPOT の形成のみならず、ウイルスの転写効率にも影響を及ぼす^{24,26}。細胞分裂時には BoDV-1 は vRNP を宿主のクロマチンに結合させることで、娘細胞にも vRNP を分配し、細胞分裂後も染色体とともに細胞核に維持され持続感染を成立させる²⁴。

1-2. 新興ボルナウイルス

オルソボルナウイルス属に属するウイルスは、2008 年以前では BoDV-1 のみが同定されていた。しかしながら、前胃拡張症 (proventricular dilatation disease ; PDD) を呈するオウムの脳からボルナウイルス様 RNA 配列が検出され、新たに鳥ボルナウイルス(ABV)が同定された^{27,28}。

PDD は中枢神経系および末梢神経の神経節へのリンパ球浸潤を主とする致死

性の神経疾患である^{29,30}。PDDに罹患した個体は、前胃平滑筋の弛緩、迷走神経麻痺により前胃が拡張し、胃腸機能不全や運動失調、心因発作などを含む重度の神経症を呈する³⁰。PDDは飼育、野生問わず50種以上のオウムでの発症例が世界中で報告されているが、治療法はいまだ確立されておらず対症療法のみが行われている。一度発症すると自然寛解の見込みは薄く、急性の場合数週間で死に至る。ABVの発見以前は、PDD疾患の原因は不明であり、主に飼育等によるストレスであるとされていた。

ABVの感染がPDDの原因であることは実験的に示されているが、現在確認されている遺伝子型すべてがPDDを引き起こすかはいまだ不明である³¹。その中でも、Parrot bornavirus-2 (PaBV-2)、Parrot bornavirus-4 (PaBV-4)が最も多くの鳥類から検出されている³²。健康鳥からもABVが検出されていることから、感染のみがPDD発症を促すわけではなく、その他の環境要因や宿主要因と相まって致死性のPDDへ発展すると考えられている³³。またPDDだけではなく、毛引き症を呈するオウムからも同ウイルスが検出されているため、その他神経症との関連も疑われている³⁴。ABVの自然感染での感染性は高く、飼育されていた感染オウム1羽のケージ内侵入により、数ヶ月にしておよそ14/71羽がPDDにより死亡し、16/71羽が陽性であったという報告がある。また疫学調査から既に全世界にABVは広まっていることが明らかとなっており、その多くは水平伝播による感染である³⁵。ABV陽性鳥では神経系のみならず全身の臓器からも広くウイルスRNAが検出されており、また糞便からも検出されることから、感染経路は糞便を介した経口感染と考えられている^{34,35}。

さらに、2011-13年の間に原因不明の進行性脳炎または髄膜脳炎で死亡した3名の高齢男性の脳組織から、新たにカワリスボルナウイルス (Variegated squirrel 1 bornavirus:VSBV-1) が発見同定された³⁶。3名の患者はカワリス (Sciurus variegatoides) のブリーダーであり、同動物との接触歴がある。患者の凍結脳と飼育されていたカワリス1頭の肝臓、腎臓、肺などの臓器からほぼ同一のウイルスRNAが

次世代シーケンス技術により検出された。また、患者の血清中および髄液中からボルナウイルスの抗体が検出されたことから、カワリリスボルナウイルス感染により脳炎を発症したと考えられている³⁶。

1-3. オルソボルナウイルスの系統と宿主域

現在までにウマやヒト、オウムを含む様々な動物から 20 種以上のオルソボルナウイルス属の遺伝子型が同定されている³⁷。先行研究では、オルソボルナウイルス属は系統学的に 3 つのクレードに分類されることを報告している (図 3)³⁸。クレード 1 は BoDV-1 や VSBV-1 などの哺乳類ボルナウイルスから、クレード 2 は毛引き症に関与すると疑われている Parrot bornavirus 5 (PaBV-5) や Munia bornavirus 1 (MuBV-1) などの ABV から、クレード 3 は PDD を引き起こす原因でありボルナウイルスの中で最も頻繁に同定される PaBV-2 や PaBV-4 などの ABV から構成されている。

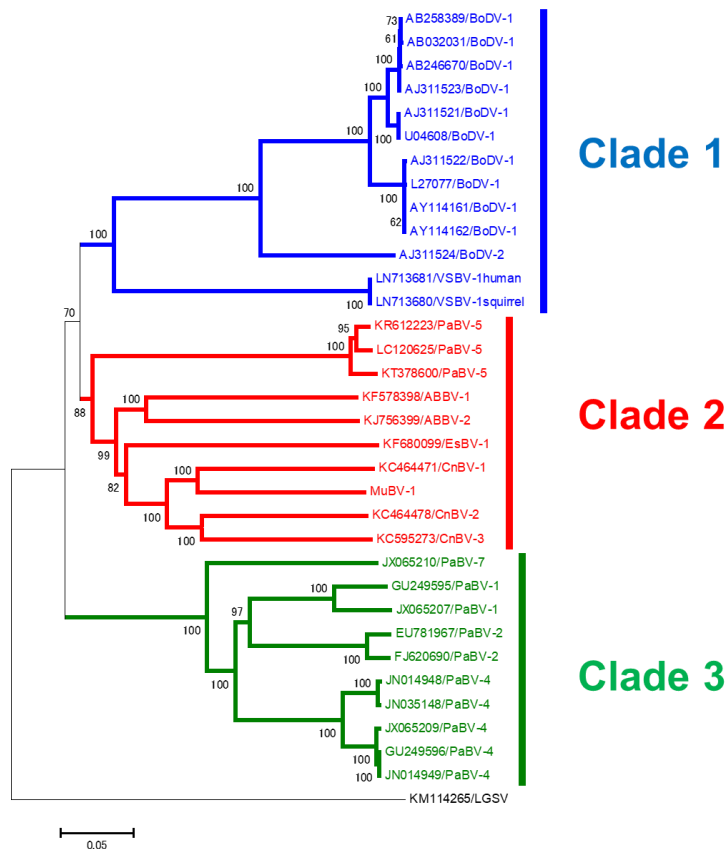


図 3. オルソボルナウイルス属の系統樹

近隣結合法にて作成したウイルスゲノム配列の有根系統樹を示す。ブーストラップは 10,000 に設定し、節に示す値はブーストラップ値である。各ウイルス株は NCBI Accession number/ウイルス遺伝子型名で示した。

クレード 1 に属する BoDV-1 の宿主域は広く、実験感染では鳥、ウサギ、ラットなど霊長類以外にも感染しボルナ病様の神経症状を引き起こす⁵。BoDV-1 の自然感染ではネコのスタッガリング病やウシの受胎率の低下などとの関連性が報告されている^{39,40}。また VSBV-1 はリスを媒介したヒトへの感染が疑われており、これら哺乳類ボルナウイルスは人獣共通感染症として近年再認識されている³⁶。

ABV は現在までに、疫学研究においては鳥類からのみ検出、分離されている。その一方で、細胞株を用いた感染実験ではクレード 3 ウイルスである PaBV-2、PaBV-4 は鳥類細胞にのみ感染性を示すのに対し、同じく ABV でありクレード 2 に分類される Estrildid finch bornavirus-1 (EsBV-1) と Canary bornavirus-2 (CnBV-2) は哺乳

類由来である Vero 細胞にも感染性を示すことが報告されている^{41,42}。これらの報告はクレード 2 ウイルスの人獣共通感染症の可能性を示唆している。

1-4. ウイルスの宿主特異性規定と進化

ウイルスの生活環において、宿主特異性を規定する重要な段階は、ウイルス粒子表面の膜糖タンパク質と宿主細胞表面に発現する受容体が結合し細胞内へ侵入する過程である。世界で広く分布している新興・人獣共通感染症の 1 つである鳥インフルエンザウイルスはその代表例である。同ウイルスは粒子表面のヘマグルチニンが、受容体である宿主細胞表面のガラクトースに結合したシアル酸に吸着することで細胞内へ侵入する⁴³。このシアル酸は、動物種によりガラクトースとの結合様式が異なっている。鳥類ではガラクトースに $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸、ヒトでは $\alpha 2,6$ 結合したシアル酸が主に発現している^{43,44}。鳥ウイルスのヘマグルチニンは $\alpha 2,3$ 結合したシアル酸のみを、ヒトウイルスのヘマグルチニンは $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸のみ認識するため、鳥ウイルスはヒトに感染にくい^{45,46}。しかしながら、鳥ウイルスのヘマグルチニンの特定の領域に変異が生じると、 $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸を認識できるようになり、ウイルスはヒトへの感染能を獲得する⁴³。多くの RNA ウイルスの宿主特異性は細胞内侵入過程におけるウイルス表面タンパク質と宿主受容体の結合特異性で規定され、またそれをウイルスは変異を獲得し適応進化することにより種の壁を乗り越え新たに感染を成立させる。

1-5. これまでの研究の推移と本研究の目的

新興ボルナウイルスについては、疫学的な研究は比較的多く報告されているが、基本的なウイルス性状の知見は乏しい。細胞株を用いた感染実験から、EsBV-1とCnBV-2は哺乳類細胞で増殖することが報告されており、鳥ボルナウイルスは人獣共通感染症の潜在性を有していることが示唆されている^{41,42}。しかしながら、その宿主域およびそれを規定する分子基盤はまったく明らかになっていない。またオルソボルナウイルスはどのようにしてそれぞれの宿主へ適応し、各クレードへの分岐を経てウイルスの特性が進化したかの知見はまだない。そこで本研究では、新興感染症である鳥ボルナウイルスの基本的なウイルス性状を把握し、オルソボルナウイルスの宿主適応を理解することを目的に、上記3つのクレードに分類されるウイルスの宿主特異性の評価およびその宿主特異性に関与する分子機序の解明を行った。さらに本研究結果から観察されたボルナウイルスの進化の特徴についても解析を行い考察した。

第二章

結果

2-1. クレード 2 ウイルスは哺乳類細胞への感染性を示す

オルソボルナウイルスの宿主域規定の分子メカニズムを解明するため、まずはじめに哺乳類細胞および鳥類細胞を用いてクレード 1(BoDV-1)、クレード 2(MuBV-1)、クレード 3 ウイルス(PaBV-2 および PaBV-4)の宿主特異性を評価した (図 3)。本実験では哺乳類細胞株として Vero, OL, COS-7, BHK, MDCK, C6 細胞を用い、また鳥類細胞として QT6 および DF-1 細胞を用いた。マイトマイシン C を使用した共培養によるウイルス感染法 (第四章 材料と方法を参照) により各細胞株へウイルスを接種し、14 日後に抗 BoDV-1 P 抗体を用いた間接免疫蛍光染色法(Indirect immune fluorescence assay ; IFA)をおこなった(図 4)。その結果、クレード 1 に分類される BoDV-1 およびクレード 2 に分類される MuBV-1 を接種したすべての細胞株において、ウイルス抗原が検出された。一方で、クレード 3 に分類される PaBV-2 および PaBV-4 を接種した細胞株では、鳥類細胞(QT6 および DF-1 細胞)にのみウイルス抗原が検出され、哺乳類細胞ではほぼウイルス抗原は検出されなかった。

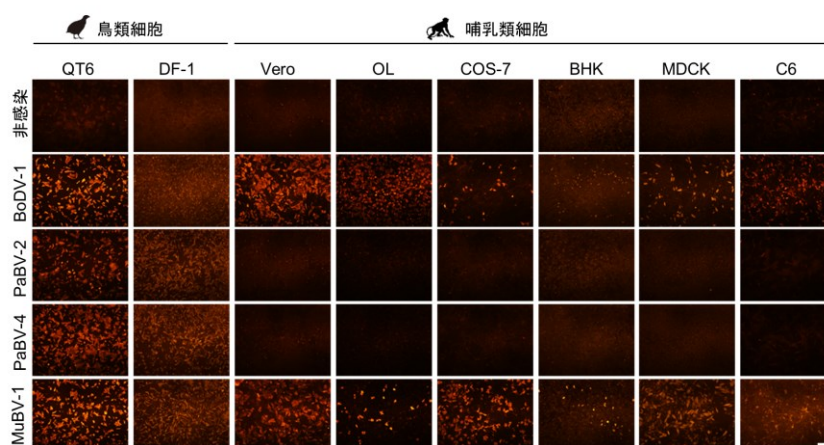


図 4. 免疫蛍光染色法によるオルソボルナウイルスの宿主特異性の評価

ウイルス接種 14 日後に、500 倍希釈した抗 BoDV-1 P 抗体を用いて免疫蛍光染色法をおこなった。コントロールとしてウイルス接種をおこなっていない非感染細胞を用いた (1 段階目)。二次抗体として Alexa Flour 555 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を

用いた。(スケールバー: 100 μm)

また IFA だけでなくウェスタンブロッティングによるウイルス抗原の検出と RT-PCR 法によるウイルス RNA の検出をおこなった(図 5)。IFA と同じく接種 14 日後の細胞を回収し、抗 BoDV-1 P 抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこなった結果、BoDV-1 および MuBV-1 は鳥類細胞および哺乳類細胞でバンドが検出されたのに対し、PaBV-2 および PaBV-4 は鳥類細胞でのみバンドが検出された。マウス胎児線維芽細胞である 3T3 細胞とヒト子宮頸ガン由来細胞である Hela 細胞は BoDV-1 の感受性が低いことが報告されている。本実験でも同様に、クレードにかかわらず 3T3 細胞および Hela 細胞ではバンドは検出されなかった。

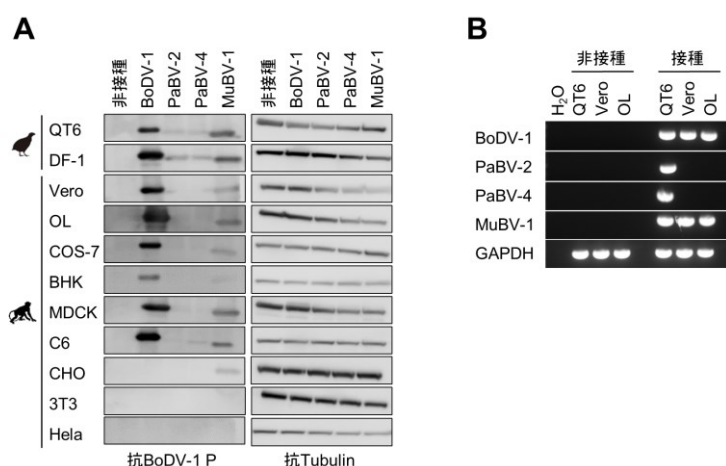


図 5. ウェスタンブロッティングおよび RT-PCR による宿主特異性の評価

(A) 抗 BoDV-1 P 抗体によるウェスタンブロット法を用いたウイルス抗原の検出。感染 14 日後に感染細胞の溶解液を回収した。コントロールとして抗 Tubulin 抗体 (Merck) を用いた (右段)。

(B) RT-PCR によるウイルス RNA の検出。PaBV-2、PaBV-4 または MuBV-1 を共培養ウイルス感染法により接種した細胞から、感染 14 日後に RNA を抽出して、それぞれの遺伝子型の M 遺伝子特異的プライマーを用いてウイルス RNA の検出をおこなった。

以上のことから、クレード 2 ウイルス(PaBV-2 および PaBV-4)は鳥類細胞にのみ感

染性を示すのに対し、クレード1ウイルス(BoDV-1)およびクレード2ウイルス(MuBV-1)は鳥類細胞のみならず哺乳類細胞にも感染性を示すことが明らかとなった。MuBV-1と同じくクレード3に分類されるEsBV-1およびCnBV-1もVero細胞にわずかながら感染性を示すことが報告されているため^{41,42}、哺乳類細胞への感受性はクレード3に共通する性質であることが示唆された。

鳥類の平均体温は哺乳類より高くおよそ40~42°Cである。インフルエンザウイルスでは、宿主の体温に適応したウイルスポリメラーゼ活性を持つことが報告されている。例えばH7N9亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト分離株には、RNAポリメラーゼ活性の至適温度を鳥類の体温41°Cから哺乳類の上気道温度の34°Cに低下させる変異がPB2遺伝子に入っている⁴⁷。ABVも同様に鳥類を宿主とするウイルスであるため、RNAポリメラーゼが高温条件に適応し、37°Cで培養する哺乳類細胞での増殖性が低下している可能性がある。そこで、高温条件下(39°C)でのABVの哺乳類細胞

(Vero細胞)への感染性を検討した(図6)。ウェスタンブロッティングによりウイルスタンパク質を検出した結果、クレード3ウイルスであるPaBV-2とPaBV-4はVero細胞で増殖せず、クレード1ウイルスであるBoDV-1およびクレード2ウイルスであるMuBV-1は増殖することが示唆された。このことから、高温条件下でもクレード3ウイルスは哺乳類細胞で増殖せず、培養温度は宿主特異性に影響を与えないと示唆された。

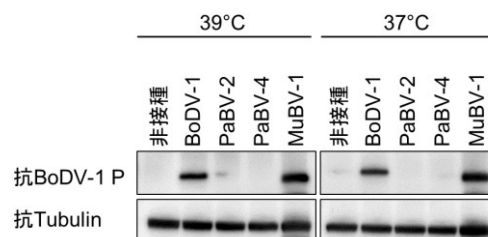


図6. 高温条件下でのウイルス感染性

39°C（左）または 37°C（右）の培養条件で、共培養によるウイルス感染法により Vero 細胞へウイルスを接種し、抗 BoDV-1 P 抗体を用いたウェスタンブロッティングをおこなった。コントロールとして抗 Tubulin 抗体（Merck）を用いた（下段）。

2-2. G タンパク質を介する細胞侵入段階は宿主域規定因子ではない

多くの RNA ウイルスの宿主特異性は、宿主細胞表面に発現する受容体とウイルス粒子表面に発現する膜糖タンパク質との結合特異性に規定されている。上記の結果より、クレード 2 ウイルスは哺乳類細胞および鳥類細胞の両方で増殖するのに対し、クレード 3 ウイルスは鳥類細胞でのみ増殖することが示唆された。そこで、オルソボルナウイルスの宿主特異性が宿主細胞への侵入段階に規定されるか検討するため、G および M タンパク質のシュードタイプウイルスを作製し、その感染指向性を評価した（図 7）。作製したそれぞれのシュードタイプウイルスを哺乳類細胞である Vero 細胞、また鳥類細胞である QT6 細胞へ感染させた結果、すべての G タンパク質（図 7A）および M タンパク質シュードタイプウイルス（図 7B）は QT6 細胞に感染性を示した。興味深いことに、哺乳類細胞で増殖できるクレード 1 ウイルス (BoDV-1, VSBV-1) およびクレード 2 ウイルス (PaBV-5, MuBV-1) の G または M タンパク質を持つシュードタイプウイルスだけでなく、鳥類細胞でのみ増殖するクレード 3 ウイルス (PaBV-2, PaBV-4) の G タンパク質を持つシュードタイプウイルスでも Vero 細胞に感染性を示した。陰性対照である G および M タンパク質を発現しない空ベクターのみを導入し回収したシュードタイプウイルス (empty 群) は、どちらの細胞株においても感染性を示さなかった。これらのことから、G および M タンパク質を介した細胞内侵入段階は宿主特異性を規定しないことが明らかとなった。

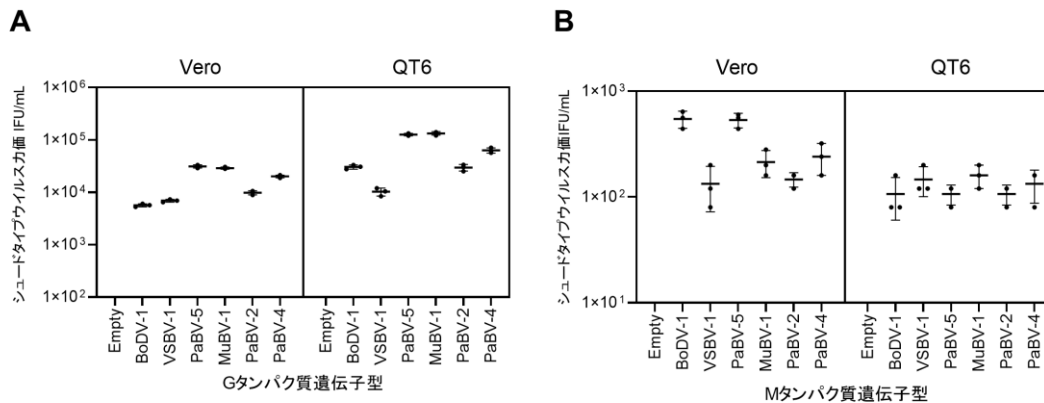


図 7. G および M タンパク質シュードタイプウイルスの感染指向性評価

(A) G タンパク質シュードタイプ BoDV-1 および (B) M タンパク質シュードタイプ BoDV-1 の感染性。GFP をコードした G 遺伝子欠損組換え BoDV-1(rBoDVΔG-GFP)または M 遺伝子欠損組換え BoDV-1(rBoDV ΔM-GFP)を持続感染させた 293T 細胞に、各遺伝子型の G タンパク質または M タンパク質を発現するプラスミドをそれぞれ導入し、シュードタイプウイルスを回収後 Vero 細胞 (左) または QT6 細胞 (右) に接種した。感染後 3 日目に蛍光顕微鏡で GFP 陽性細胞をカウントした。(n=3)

BoDV-1 の粒子は宿主細胞表面の受容体に吸着した後、エンドサイトーシスにより細胞質内へ取り込まれる。エンドソーム内の低 pH 環境は G タンパク質の立体構造変化を引き起こし、ウイルスエンベロープとエンドソーム脂質膜の膜融合を誘導する。BoDV の vRNP は膜融合により細胞質へ放出され、核内に移行したのちに転写複製を開始する。G タンパク質過剰発現細胞への低 pH 処理による合胞体形成誘導は、この膜融合能の指標となる。エンベロープと細胞膜の膜融合段階で宿主特異性が規定されるのかを、各クレードウイルスの G タンパク質を介した合胞体形成の誘導により評価した (図 8)。

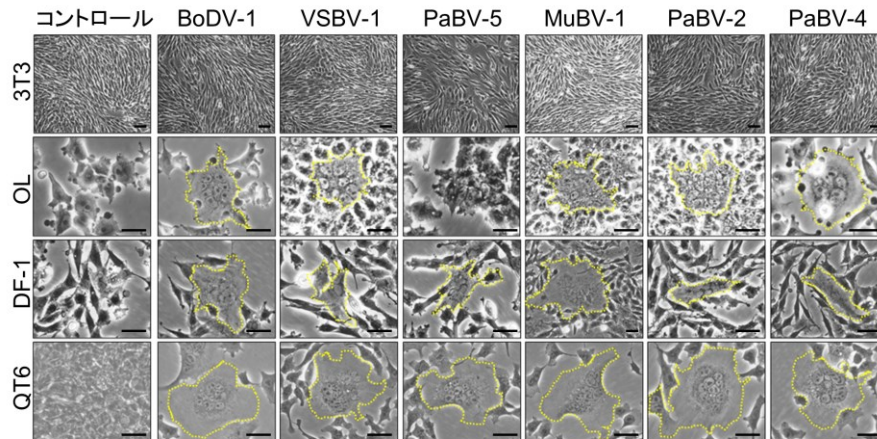


図 8. G タンパク質を介した合胞体形成誘導能の評価

レトロウイルスを用いて作製した G タンパク質恒常発現細胞を pH 5.0 で処理して合胞体形成を誘導し、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を倒立顕微鏡で観察した。形成された合胞体を黄色枠で示す。(スケールバー:30 μm)

レトロウイルスベクターを用いてそれぞれの遺伝子型の G タンパク質恒常発現細胞 (QT6、DF-1、OL、3T3 細胞) を作製し、pH 5.0 の環境下で静置することにより合胞体形成を誘導した。pH 7.0 で処理した場合には、いずれの細胞株においても合胞体形成は観察されなかった。一方、pH 5.0 で処理した場合には、G タンパク質発現細胞において合胞体形成が観察された (図 8 の黄色枠部分)。哺乳類および鳥類細胞に感染性を示すクレード 1 およびクレード 2 ウイルスの G タンパク質では、どちらの細胞株においても合胞体形成が観察された。また哺乳類細胞では感染性を示さないクレード 3 ウイルス (PaBV-2 と PaBV-4) の G タンパク質においても、鳥類細胞 (QT6、DF-1 細胞) のみならず、哺乳類細胞株 (OL 細胞) でも合胞体形成が観察された。オルソボルナウイルス非感受性である 3T3 細胞ではどの G タンパク質発現細胞でも合胞体形成は観察されなかった (図 8 上段)。また、各ウイルスが持続感染した QT6 細胞を用いて上記と同様の処理を行い合胞体形成を誘導させた結果、すべての持続感染細胞で合胞体が観察された (図 9)。以上の結果より、G タンパク質を介するウイルスエンベロープと細胞膜の膜融合段階は、オルソボルナウイルスの宿主特異性の規定段階ではないことが示唆され

た。

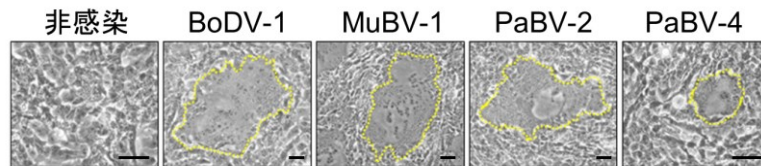


図 9. QT6 感染細胞を用いた合胞体形成誘導

QT6 持続感染細胞を pH 5.0 で処理して合胞体形成を誘導し、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を倒立顕微鏡で観察した。形成された合胞体を黄色枠で示す。(スケールバー:30 μm)

2-3. MG タンパク質組換えウイルスの感染性評価

上述の結果より、G タンパク質または M タンパク質を介した侵入段階および G タンパク質を介した膜融合段階では宿主特異性は規定されないことが示唆された。さらに細胞侵入段階における宿主域規定を詳細に検討するため、M タンパク質と G タンパク質をそれぞれ組み合わせた MG タンパク質シュードタイプウイルスを作製し、Vero 細胞または QT6 細胞への感染性を評価した (図 10)。その結果、作製した MG タンパク質のシュードタイプウイルスすべてが、鳥類細胞である QT6 細胞のみならず (図 10 右)、哺乳類細胞である Vero 細胞にも感染性を示した (図 10 左)。M および G タンパク質発現プラスミドを導入していないシュードタイプウイルスはどの細胞株においても感染性を示さなかった (図 10 中の Empty 群)。これらのことから、M および G タンパク質のいずれの組み合わせであっても、そのシュードタイプウイルスは哺乳類細胞にも鳥類細胞にも感染性を示し、M および G タンパク質はオルソボルナウイルスの宿主特異性を規定する因子ではないことが示唆された。

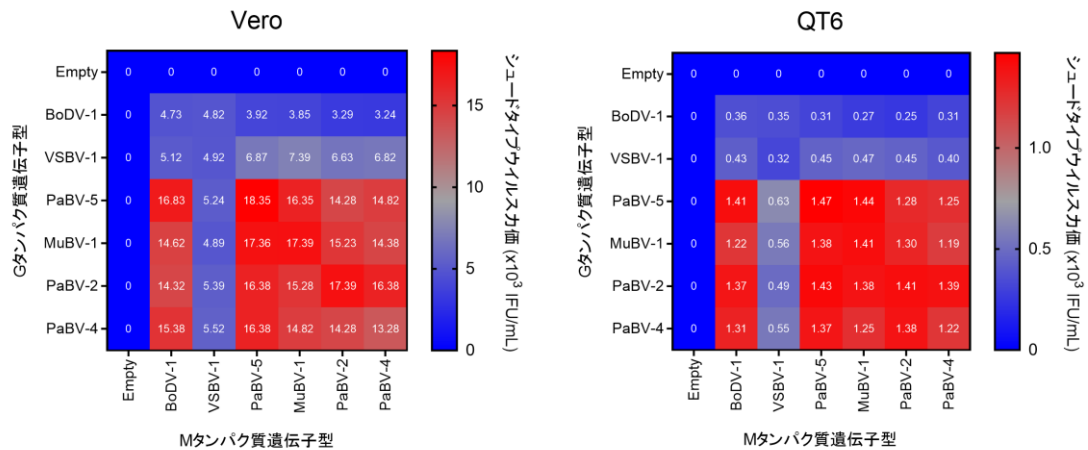


図 10. MG シュードタイプウイルスの感染指向性評価

各遺伝子型の M、G タンパク質発現プラスミドの組み合わせを、GFP をコードした MG 欠損組換え BoDV-1(rBoDVΔMG-GFP)を持続感染させた 293T 細胞に導入し、回収したシュードタイプウイルスを Vero 細胞（左）と QT6 細胞（右）に接種した。シュードタイプウイルス作製に用いたプラスミドに関して X 軸に M タンパク質、Y 軸に G タンパク質の遺伝子型を示す。ヒートマップの色に対応してウイルス力価の増減を表し、セル内に値(x 10³ infectious forming unit/mL)を示した。(n=3)

2-4. N タンパク質の N 末端領域には正の選択圧が働いている

上述の結果より、多くの RNA ウイルスでは宿主細胞への侵入段階で宿主特異性が規定される一方で、オルソボルナウイルスでは M および G タンパク質を介した細胞侵入過程は規定段階ではないことが明らかとなった。そこで、オルソボルナウイルスの宿主細胞への感受性の違いを理解するために、ウイルスゲノム配列を用いた比較ゲノミクス解析をおこない、オルソボルナウイルスの進化過程でクレード依存的な進化的選択を経験した遺伝子領域の検出を試みた。進化的選択を経験した遺伝子領域には、ウイルスの進化の過程において異なる宿主に適応するための変異が有意に蓄積されたと予想され、ウイルスの宿主特異性を理解する足掛かりとなる。進化的選択圧を経験し有意に変異が蓄積した領域を検出するため、オルソボルナウイルスの 3 つのクレード間で、

ウイルスタンパク質のアミノ酸配列の類似性を分析した (図 11)。

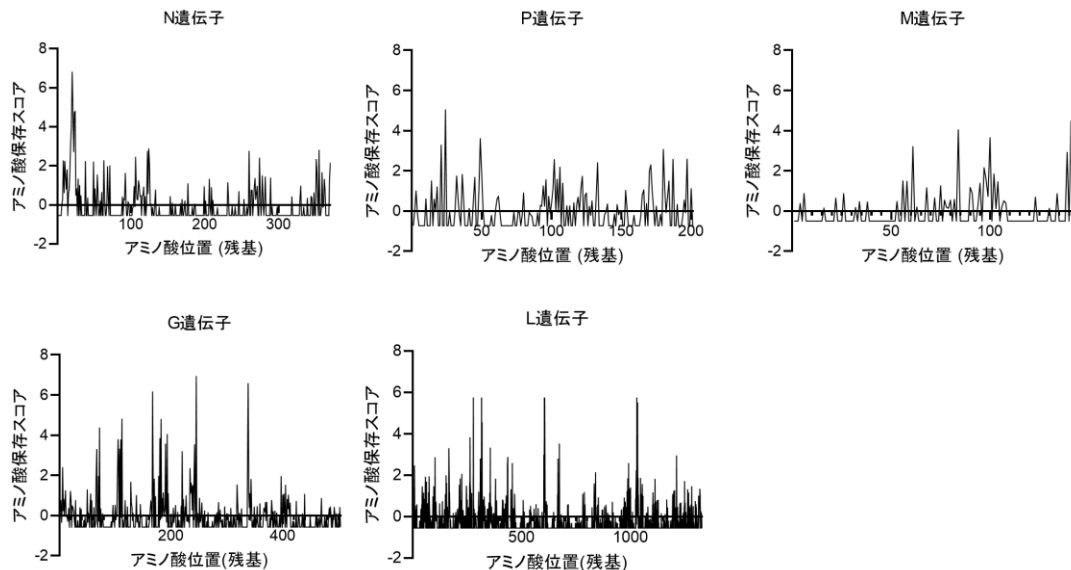


図 11. 各ウイルスタンパク質のアミノ酸配列の保存度

ウイルスタンパク質の各位置のアミノ酸保存スコアは、ConSurf (<https://consurf.tau.ac.il/>)⁴⁸により算出した。基準配列として BoDV-1 のアミノ酸配列を用いた。最も低いスコアは、タンパク質配列の中で最も保存されている部位であることを示す。

多重配列整列後、ConSurf⁴⁸を用いて、BoDV-1の配列を基準配列として、最尤法により各アミノ酸残基の類似度を計算した。ConSurfによって算出されたアミノ酸保存度スコアは、基準配列をもとにした各アミノ酸位置における進化的保存度の指標である。図 11 に示すように N、G、L の各遺伝子内では、他の遺伝子よりも高いスコアが数か所で算出され、これらの遺伝子がウイルスの進化過程で有意に変異を蓄積した可能性が示唆された。

つぎに、各ウイルスタンパク質の分子進化速度を推定するため、BoDV-1 (クレード 1) と PaBV-4 (クレード 3) の配列を用いて同義・非同義置換率 (dN/dS) を解析した。アミノ酸配列を整列後、12 残基ごとのフラグメントに分け、そのアミノ酸配列と元の塩基配列から dN/dS 値 (ω) を算出した (図 12)。 $\omega < 1.0$ はその配列に負の自然淘

汰が働き、機能的制約によりアミノ酸変異の蓄積を排除する部位であることを意味する。 $\omega > 1.0$ はその部位に正の自然淘汰が働き、適応的進化により積極的に変異を固定させる進化部位であることを意味する。進化速度推定の結果、図 12 に示すように他の領域よりも多くの変異を獲得していると予想される正の自然選択下の領域 ($dN/dS > 1.0$) が N 遺伝子と L 遺伝子の末端に検出された (図 12 中の矢印)。これらの領域がオルソボルナウイルスの適応進化過程において正の影響を与えている可能性が示唆された。

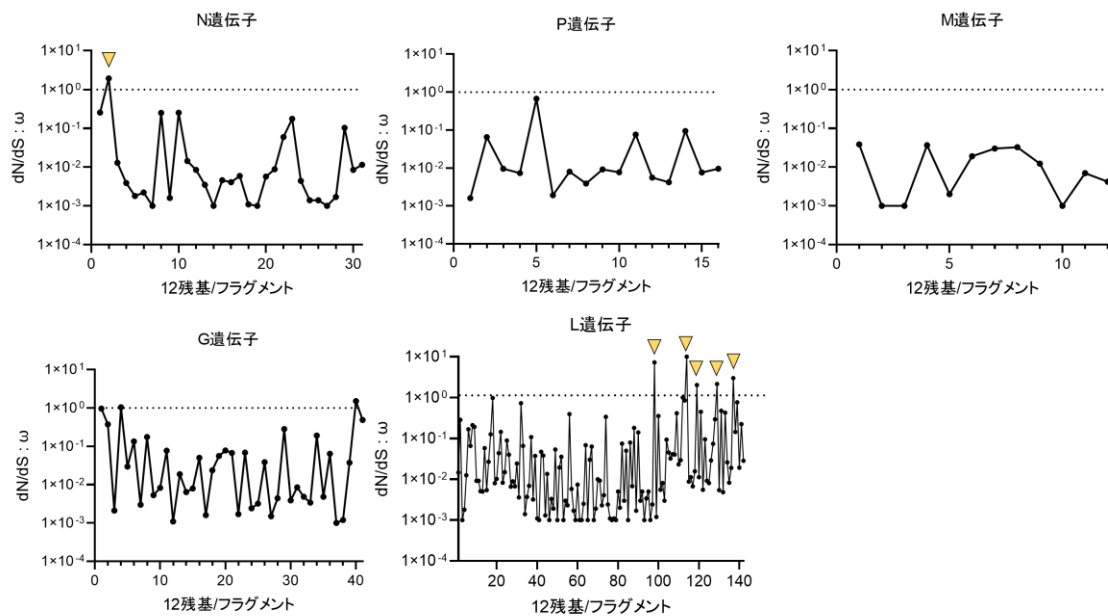


図 12. 各ウイルスタンパク質の進化速度推定

BoDV-1 と PaBV-4 間の各ウイルス遺伝子における同義・非同義置換率(dN/dS)の解析。それぞれの塩基配列を 36 塩基 (12 アミノ酸残基) ずつに分け、その dN/dS を示した。横軸は分画したフラグメントを、縦軸は dN/dS 値 (ω) を表す。

L 遺伝子内の dN/dS 比が 1.0 より大きい領域に既知の機能的モチーフはなかったが、同じく dN/dS 比が 1.0 以上となった N 遺伝子の N 末端領域には NLS ($P^3KRRLVDDA^{11}$) が含まれていた⁴⁹。そこで、N タンパク質の配列を詳細に解析するため、BoDV-1 (クレード 1)、MuBV-1 (クレード 2)、PaBV-4 (クレード 3) の N タンパク質配列を用いて各コドンの標準化 $dN-dS$ 値の分布を計算した (図 13)。図 13 に示

すように、正の選択圧を示す 0 以上の値は、NLS を含む N 末端領域に特に蓄積されており、この領域がオルソボルナウイルスの進化過程におけるクレード依存的な適応進化に関与している可能性が示唆された。

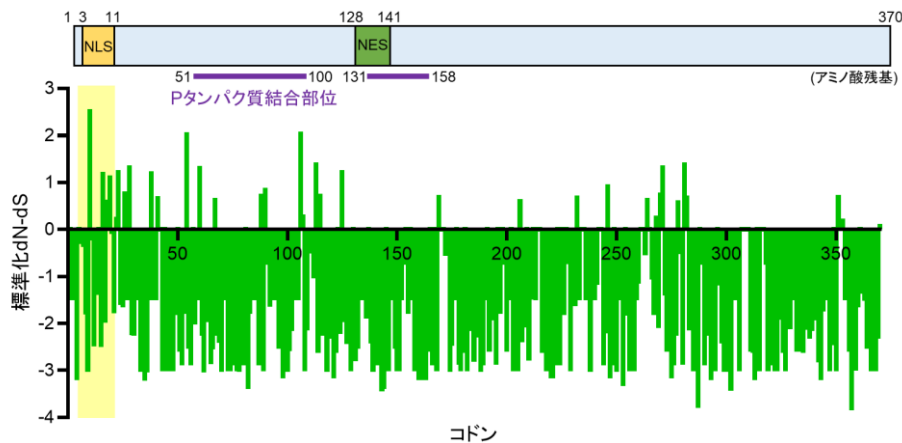


図 13. N 遺伝子のコドンごとの進化速度推定

各コドンの標準化 dN-dS 値は、BoDV-1、PaBV-4 また MuBV-1 の N 遺伝子配列を用いて算出した。

2-5. クレード 3 ウイルスの N タンパク質は哺乳類細胞における核移行活性が低い

以上の結果から、N タンパク質がオルソボルナウイルスのクレード特有の宿主特異性および適応進化に深く関与していると示唆されたため、N タンパク質の細胞内局在や転写複製活性に与える影響を検討した。オルソボルナウイルスの N タンパク質の N 末端領域を整列した結果、クレード 1 およびクレード 2 ウイルスは保存された NLS 配列を有していたが、クレード 3 ウイルスの保存度は低かった (図 14)。

		NLS予測部位																													
		NLSコア部位																													
遺伝子型	クレード	1																													32
BoDV-1	1	M P P K R - R - L V D D A D A M E D Q D L Y E P P A S L P K L P																													
BoDV-2		M P P K R - R - L V D D A D - M E D Q D I Y E P P A S L P K L S																													
VSBV-1		M P P K R - R - L L E D P D V M D D Q E P E P T S P P M P K L P																													
PaBV-5	2	M P P K K - R - P M E S S E D M D D S D S Q P R L E H M P R L P																													
MuBV-1		M P P K R - R - L V D T P E D M E D Q D S S G R S D H M P K L P																													
CnBV-1		M P P K R - R - L V D S P E D M E D E G P S D R P T H L P K L P																													
CnBV-2		M P P K R - R - L M D N P E D M E D Q G S T D R P D H L P K L P																													
CnBV-3		M P P K R - R - L V D S P E D M D D D S S S S T P A H M P K L P																													
ABBV-1		M P P K R - R - L M D S P E D M D E Q S T S D R P D H M P K L P																													
ABBV-2		M P P K R - R - L V D N P E D M D D Q S S S E R P D H M P K L P																													
PaBV-1	3	M P P K R Q R S P N D Q D E D M D S G E P G A T R S H F P S L T																													
PaBV-2		M P P K R Q R S P N D Q D E E M D S G D P G A T R S H F P S L T																													
PaBV-4		M P P K R Q R S P N D Q D E E M D S G E P A A S R G H F P S L T																													
PaBV-7		M P P K R Q R S P N D Q D D D M D S G E P G A S K D H F P R L T																													

図 14. N タンパク質の NLS 領域比較

オルソボルナウィルスの遺伝子型間での N タンパク質の NLS 配列の多重配列整列をおこなった。cNLS Mapper^{50,51} で予測された NLS 領域 (1-32 残基) を示した。BoDV-1 と同一のアミノ酸残基は黄色で強調した。

興味深いことに、2つのアミノ酸 (Q6 および S8) の挿入といくつかのユニークな置換がクレード 3 ウイルスの NLS コア領域に観察された。インポーチン α 依存性の NLS を予測できる cNLS Mapper^{50,51} は、BoDV-1 の N タンパク質 NLS が既に報告されている配列よりもさらに長い配列 (3-32 残基) である可能性を示した⁴⁹。実際、BoDV-1 N タンパク質の N 末端領域 (1~32 残基) を付加したタンデム GFP は、導入した細胞の核内にほとんど局在していたが、NLS コア配列 (1-11 残基) のみを付加したタンデム GFP 発現プラスミドを導入した細胞では、細胞質内にも GFP 蛍光が観察された (図 15)。このことから、上述の配列解析 (図 12、図 13) で予測された正の選択を経験した N タンパク質の N 末端領域 (1~32 残基) は、NLS であることが示唆された。

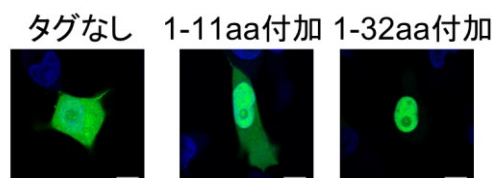


図 15. N タンパク質の N 末端領域の核移行活性

N タンパク質の N 末端領域 (1~11 または 1~32 残基) を付加したタンデム GFP をコードするプラスミドを OL 細胞に導入し、48 時間後の GFP の蛍光を観察した。(スケールバー: 10 μm)

次に、鳥類細胞および哺乳類細胞内における各遺伝子型の N タンパク質の核内移行活性を P タンパク質の発現下または非発現下で比較した。N タンパク質は、P タンパク質と結合することにより NES による核外輸送を制御し、自身の核内保持を促進することが明らかになっている。BoDV-1、MuBV-1 および PaBV-4 の N、P タンパク質発現プラスミドをそれぞれ OL 細胞または QT6 細胞に導入した (図 16)。

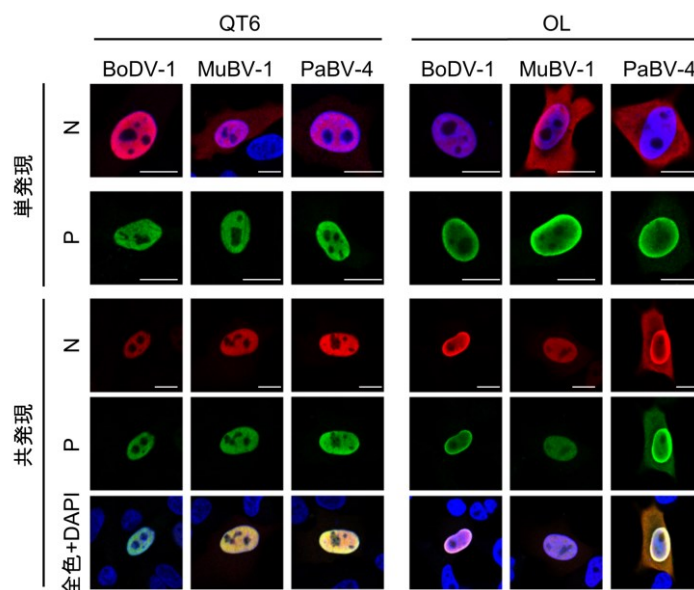


図 16. 鳥類細胞および哺乳類細胞における各クレードウイルスの N および P タンパク質の細胞内局在

Myc タグ付加 N タンパク質および FLAG タグ付加 P タンパク質の発現プラスミドを QT6 細胞または OL 細胞に単独または同時に導入した。導入し 48 時間後に IFA をおこない、N タンパク質と P タンパク質の細胞内局在を検出した。プラスミドを導入しシグナルが検出された細胞の代表的な画像を示す。(スケールバー:10 μm)

BoDV-1 の N タンパク質は単独発現下において哺乳類細胞と鳥類細胞の両方で核内に局在したのに対し、MuBV-1 と PaBV-4 の N タンパク質は細胞質と核の両方に局在した。また P タンパク質との共発現により、OL 細胞において MuBV-1 N タンパク質の核内蓄積が誘導された。一方で、PaBV-4 の N タンパク質は OL 細胞において P タンパク質の発現下でも細胞質内での局在を維持しており、哺乳類細胞における PaBV-4 の

核局在活性能は BoDV-1 や MuBV-1 と比較し低いことが示唆された。

これら共発現下における細胞内局在の割合を測定したとき、哺乳類細胞では BoDV-1 (クレード 1)、また MuBV-1 (クレード 2) の場合は核内に局在している N タンパク質が多いのに対し、PaBV-4 (クレード 3) では有意に低かった (図 17)。これらの結果、クレード 3 ウイルスである PaBV-4 の N タンパク質は哺乳類細胞における核移行活性が他のクレードと比較し低いことが示唆された。

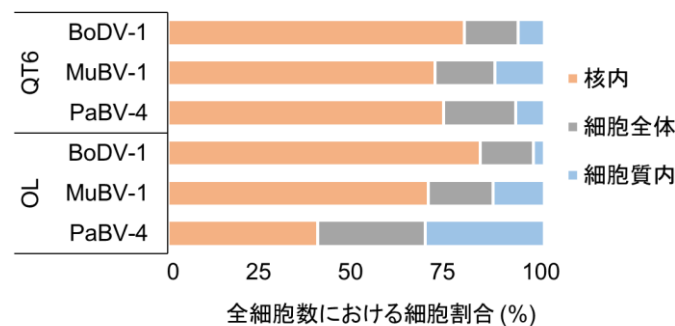


図 17. 鳥類細胞または哺乳類細胞における NP 共発現下での N タンパク質の細胞内局在
QT6 細胞または OL 細胞に BoDV-1 (クレード 1)、MuBV-4 (クレード 2)、PaBV-4 (クレード 3) 由来の N タンパク質と FLAG タグを付加した P タンパク質を発現するプラスミドを導入した。N タンパク質の細胞内局在は、導入し 48 時間後に共焦点顕微鏡による IFA で解析した。N タンパク質の局在 (核、細胞質、またはその両方) を評価し、その割合を求めた。
(1 回あたり 200 細胞をカウント、n=3)

2-6. 哺乳類細胞におけるクレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性は低い

オルソボルナウイルスの宿主特異性の規定は細胞侵入段階には規定されず、また鳥類にのみ感染性を示すクレード 3 ウイルスの N タンパク質の核移行活性は哺乳類細胞において低いことが明らかとなった。そこで、つぎに細胞内侵入後のウイルスの転写過程に着目し、細胞株におけるクレード 1 およびクレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性を評価した。鳥類細胞である DF-1T 細胞と、哺乳類細胞である 293T、OL 細胞を用

いた BoDV-1 (クレード 1) または PaBV-4 (クレード 3) のミニレプリコンアッセイにより細胞内のウイルス転写活性を比較した (図 18)。BoDV-1 のミニレプリコンアッセイでは、哺乳類細胞および鳥類細胞どちらにおいても高い転写活性がみられた (図 18 左)。しかしながら、鳥類細胞でのみ増殖するクレード 3 に分類される PaBV-4 のミニレプリコンアッセイでは、哺乳類細胞では転写活性はほとんど検出されず、鳥類細胞でのみ高い転写活性を示した (図 18 右)。これらのことから、クレード 3 ウイルスの転写活性は哺乳類細胞においては顕著に制限され、鳥類細胞に指向性があることが示唆された。

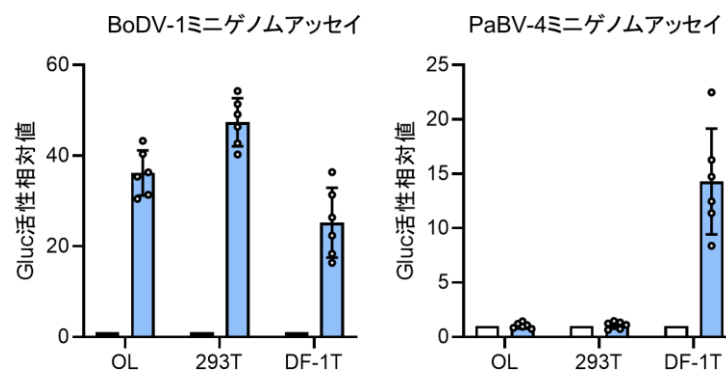


図 18. BoDV-1 および PaBV-4 の哺乳類および鳥類細胞における転写活性比較

各細胞株に BoDV-1 または PaBV-4 の N、P、L タンパク質発現プラスミド、および Gluc を挿入したミニレプリコンを導入し 72 時間後に Gluc 活性を測定した。L タンパク質発現プラスミドを導入していない陰性対照の Gluc 活性値を 1.0 とした。(n=3, エラーバーは標準誤差を示す)

2-7. クレード 3 ウイルスの N タンパク質核移行シグナルは哺乳類細胞におけるウイルスポリメラーゼ活性を抑制する

クレード 3 ウイルスの転写活性は哺乳類細胞内で顕著に制限されることから、オルソボルナウイルスの宿主特異性は細胞侵入後の段階で規定されることが示唆された。NLS を介する N タンパク質の核内局在化は、オルソボルナウイルスの効率的な核

内での転写複製に不可欠である。前述の配列解析、また細胞内局在解析（図 12~図 17）の結果から N タンパク質の NLS が宿主への適応過程で進化し、宿主特異性を規定している可能性が考えられる。この仮説を検証するために、クレード 1 とクレード 3 ウイルス間でそれぞれの NLS を入れ替えたキメラ N タンパク質変異体を作製した（図 19 左）。前述の細胞内局在解析の結果と一致して、PaBV-4 の NLS を有する BoDV-1 N タンパク質（BoDV-1N rNLS）は、導入した哺乳類細胞において、野生型(WT)と比較して細胞質に多くシグナルが検出された（図 19 右）。一方、PaBV-4 N に BoDV-1 の NLS を置換した PaBV-4N rNLS は、PaBV-4N WT と比較し核内に多くシグナルが検出されたことから、クレード 3 の NLS は哺乳類細胞における核内移行活性は低く、また宿主に依存した N タンパク質の核内移行能は NLS が深く関与していることが示唆された。

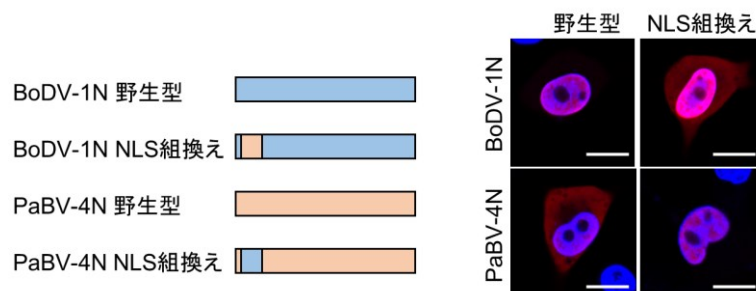


図 19. NLS を置換したキメラ N タンパク質の細胞内局在

作製したキメラ N タンパク質の模式図とその細胞内局在。OL 細胞に各プラスミドを導入し、48 時間後各タンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡で評価した。(スケールバー: 10 μ m)

つぎに、上述の NLS を置換したキメラ N タンパク質変異体を用いて鳥類および哺乳類細胞でミニレプリコンアッセイをおこなった。PaBV-4 の NLS 配列を有する N タンパク質を用いた BoDV-1 のミニレプリコンアッセイでは、鳥類細胞では転写活性に変化がなかったのに対し、哺乳類細胞においては転写活性が有意に低下した（図 20 左）。さらに、BoDV-1 の NLS 配列を有する N タンパク質を用いた PaBV-4 のミニレプリコン

アッセイでは、鳥類細胞での転写活性は変わらず、哺乳類細胞での活性が有意に上昇した (図 20 右)。これらの結果より、クレード 1 ウイルスの NLS は哺乳類細胞においてウイルスの転写活性を増加させることが示唆された。以上の結果から、オルソボルナウイルスの宿主特異性は転写過程で規定され、その分子メカニズムの一端として NLS を介した N タンパク質の核内移行が関与することが示唆された。

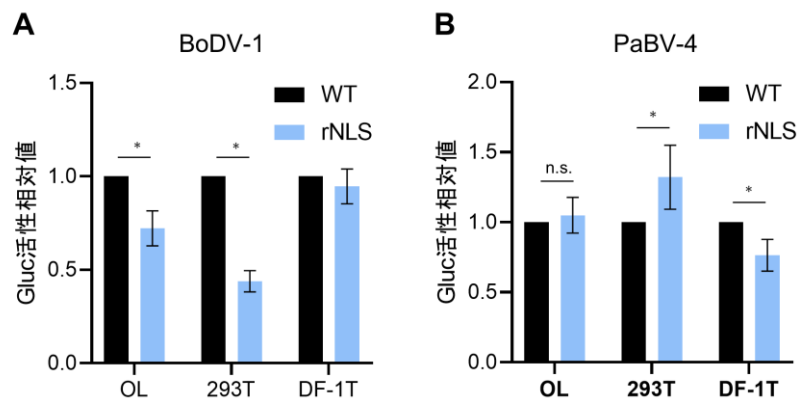


図 20. BoDV-1 および PaBV-4 のミニレプリコン活性に対する NLS 置換の影響

キメラ N タンパク質 (rNLS) 発現プラスミドを用いた転写活性と野生型 (WT) の N タンパク質発現プラスミドを用いた転写活性の相対比を示す。データは、6 回の独立した実験から得られた結果の平均値および標準誤差として示した。統計解析には、One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test を用いた。(*, $p < 0.05$)

2-8. N タンパク質の核移行シグナルを置換したボルナ病ウイルスは哺乳類細胞での増殖効率が減少する

オルソボルナウイルスの複製における N タンパク質の NLS の役割をより詳細に解析するため、逆遺伝学的手法を用いて GFP を発現する BoDV-1 をもとに、PaBV-4 の NLS 配列を有するキメラ rBoDV-1 (rBoDV-1 rNLS) を作製した。キメラ rBoDV-1 ゲノムとヘルパープラスミドを 293T 細胞に導入し 3 日後に Vero 細胞と共培養した。野生

型 (WT) の rBoDV-1 は、Vero 細胞と共培養してから少なくとも 30 日後には 80% の感染率を示したが、rBoDV-1 rNLS は 1% 以下の感染率を示した (図 21A)。同様に、組換えウイルス作製の際、rNLS は WT よりも顕著に低いレスキュー効率を示した (図 21B)。

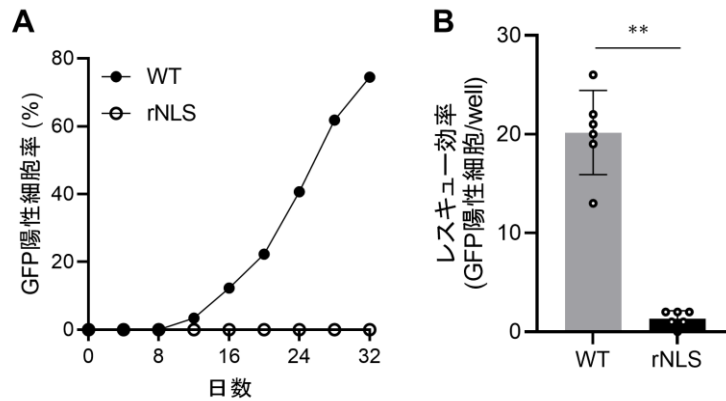


図 21. NLS を置換したキメラウイルスの作製とその効率

293T 細胞にそれぞれのゲノムプラスミドと N, P, L タンパク質発現プラスミドを導入し、Vero 細胞と共培養することで野生型(WT)およびキメラウイルス(rNLS)を作製した。

(A) プラスミドを導入してから経時的に GFP 陽性細胞率を 4 日ごとに Tali™ Image-Based Cytometer により測定した。

(B) 6 well plate に播種した 203T 細胞にプラスミドを導入し 3 日後に、GFP 陽性細胞数を目視によりカウントしウイルスレスキュー効率として示した。統計解析には、Student's t-test を用いた。(n=6, **, p < 0.01)

作製したキメラウイルスの特徴を解析するため、rBoDV-1 rNLS 陽性の Vero 細胞をクローニングし、持続感染する細胞株を樹立した (図 22)。抗 BoDV-1 N 抗体により免疫染色した結果、rBoDV-1 rNLS が持続感染した細胞では、野生型と比較し N タンパク質が核内にも広く局在しているように観察された (図 22 下段)。

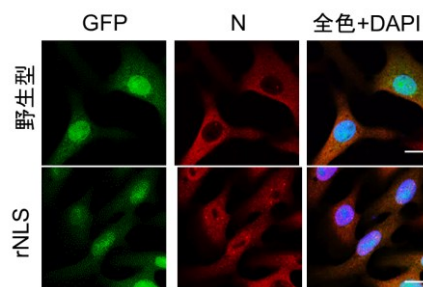


図 22. キメラウイルス感染細胞における N タンパク質の細胞内局在

野生型および N タンパク質の NLS を置換したキメラウイルス (rNLS) それぞれの Vero 感染細胞をクローニングし、rBoDV-1 持続感染細胞を樹立した。抗 BoDV-1 N 抗体を用いて IFA をおこなった。緑色は GFP 蛍光、青色は DAPI のシグナルを示している。(スケールバー: 10 μm)

さらに、持続感染した細胞から WT およびキメラ rNLS ウイルス粒子を回収し、OL 細胞に感染多重度 0.05 (multiplicity of infection : MOI) で接種した (図 23)。経時的に細胞から RNA を抽出し、BoDV-1 の P 遺伝子特異的なプライマーを用いてウイルスゲノム量を測定した。その結果、rBoDV-1 rNLS は WT と比較し OL 細胞において極めて遅い増殖を示した。ウイルスを接種し 20 日後には WT の場合、感染細胞率がおよそ 50% であるのに対し rNLS は 5% 未満であった。これらの結果は、PaBV-4 の NLS は BoDV-1 の哺乳類細胞における複製効率を顕著に抑制させることを示している。

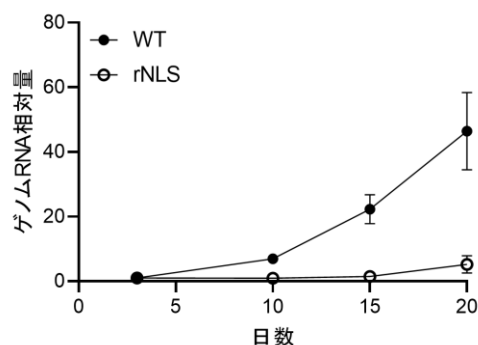


図 23. OL 細胞における WT および BoDV-1 rNLS の増殖曲線

OL 細胞に MOI 0.05 で rBoDV-1 (WT または rNLS) を接種させ、プロットした時点でのゲノム RNA 量を qRT-PCR により測定した。(n=3)

2-9. 鳥類由来のインポーチンは哺乳類細胞内でのクレード 3 ウイルスのポリメラーゼ活性を上昇させる

ウイルスタンパク質は NLS を介して宿主の核輸送機構を利用し核内外を行き来する。オルソボルナウイルスの N タンパク質も同様に NLS を介して核へ移行するため、インポーチン α および β などの核輸送に関与する宿主因子が、オルソボルナウイルスの転写活性を左右することが予想される。そこで最後に、鳥類由来の核移行を担うインポーチンなどの宿主因子が、哺乳類細胞における PaBV-4 のポリメラーゼ活性をレスキューできるか検討した。QT6 細胞から各種インポーチン遺伝子をクローニングし、PaBV-4 ミニレプリコンとともに 293T 細胞へ共導入した (図 24)。その結果、インポーチン β (KPNB1) ではなく、インポーチン α ファミリー (KPNA1、KPNA2、KPNA4) を導入により哺乳類細胞内でのルシフェラーゼ活性が顕著に上昇した。この結果から、オルソボルナウイルスの N タンパク質の核内移行には、宿主の種特異的な NLS 配列が重要であり、宿主核内でのウイルスポリメラーゼ活性を左右していることが示唆された。

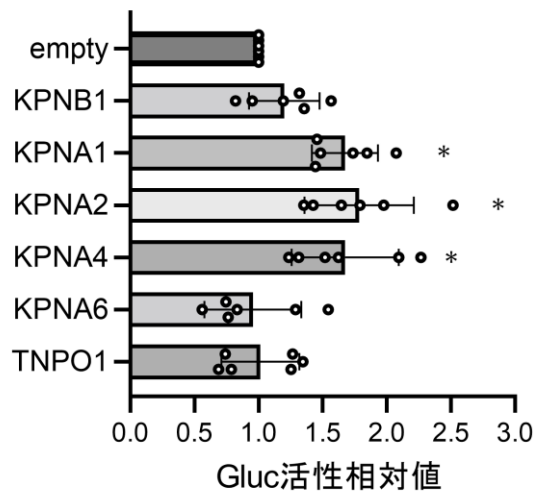


図 24. 鳥類由来のインポーチンは哺乳類細胞内での PaBV-4 のポリメラーゼ活性を上昇させる
 293T 細胞に PaBV-4 の N、P、L タンパク質発現プラスミドと鳥類由来インポーチン発現プラスミドを共導入した。導入した後 72 時間後に Gluc 活性を測定し、WST-1 により標準化した。インポーチン発現プラスミドの代わりに空ベクターを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を 1.0 とし、それぞれの群について相対値で示した。各ドットは、独立した実験の相対値を表す。データは、6 回の独立した実験から得られた結果の平均値および +SE として示されている。統計解析には、One-way ANOVA followed by a Dunnett's test を用いた。(n=6, *, p < 0.05)

第三章

考察

3-1. 本研究の意義

本研究では、オルソボルナウイルスに属するいくつかの遺伝子型の哺乳類および鳥類細胞への感染性を評価し、先行研究でも報告されているように PaBV-2 や PaBV-4 などのクレード 3 に分類される ABV は哺乳類細胞への感染性を示さないが、クレード 2 に分類される MuBV-1 などの ABV は鳥類細胞のみならず、哺乳類細胞への感染能も有することを示した。また、オルソボルナウイルスの宿主特異性は M および G タンパク質を介する細胞侵入段階には規定されないことがシュードタイプアッセイや合胞体形成能の比較により明らかとなった。さらに、ウイルス配列の比較解析や進化解析により、N タンパク質の NLS 領域が正の選択圧を経験していること、およびこの NLS を介した N タンパク質の核移行能がポリメラーゼ活性の宿主指向性に関与していることが明らかになった。これらの結果から、オルソボルナウイルスの N タンパク質の核移行活性が宿主特異性に関与し、宿主への適応進化に寄与した可能性が示唆された。

3-2. 細胞侵入過程とウイルス進化

宿主とウイルスの間には、ウイルスの宿主への適応とそれに宿主が対抗する適応が競うように発達する「進化的軍拡競争 (Arms Race)」が起こる⁵²。宿主にとって細胞傷害性や感染個体への病原性、行動異常など負の側面を多くもつウイルスを克服するため、宿主は世代を経るごとに自身のゲノムに変異を蓄積して抗ウイルス機構を獲得する。それに対して、ウイルスは自身の急速な変異速度によりさらに進化することで、宿主が獲得した抗ウイルス機構を乗り越え、ふたたび宿主への感染を成立させる。このような進化的軍拡競争を長期間繰り広げることによりウイルスと宿主生物の双方に遺伝的多様性が生じる。例えばフィロウイルス科のエボラウイルスの自然宿主はコウモリと

考えられているが、エボラウイルスの感染性はコウモリの種によって異なる。コウモリ目の African straw-colored fruit bats (*Eidolon helvum*) は、エボラウイルスの侵入過程を阻止するが、これは *Eidolon helvum* の進化過程でエボラウイルスのレセプターである Niemann-Pick C1 遺伝子のウイルス結合部位に変異が蓄積したことにより、現在の個体が抗ウイルス機構を持っているためと考えられている⁵³。

現在までにオルソボルナウイルスの宿主特異性がどのようなメカニズムで規定されるのかは未だ解明されていない。本研究では、オルソボルナウイルスの宿主特異性は細胞侵入の段階では制限されないことを明らかにした。この結果よりオルソボルナウイルスは、鳥類と哺乳類細胞の両方に発現している1つ以上の保存された受容体と特異的結合して細胞内に侵入することが示唆された。今後オルソボルナウイルスの細胞侵入に関与する受容体を明らかにすることで、これらのウイルスの宿主特異性や進化過程、さらには人獣共通感染症の病原体としての可能性について、より深い理解が得られるだろう。

3-3. 核移行とウイルス複製

細胞核内で転写複製するウイルスは、感染を成立させるために細胞膜だけでなく核膜も通過しなければならない。核膜を通過してウイルス因子を核内へ輸送するためには、宿主と同じく核膜孔複合体 (NPC) が用いられる⁵⁴。NPCは巨大なタンパク質複合体であり、分子を核に出入りさせるゲートとして機能し、比較的大きな分子であっても NPC を介することで効率的に核輸送できる。この核内外への分子輸送を担う宿主因子の代表例は、輸送受容体ファミリーの一員であるインポーチンなどの「カリオフィェリン」である^{55,56}。カリオフィェリンは、NLSをもつ分子と相互作用して NPC へ運搬し、核膜を通過させる。この分子輸送システムは、宿主の機構を利用し増殖するウイルスにお

いても活用され、自身のタンパク質を核内に輸送するため広く利用されている。鳥類および哺乳類に感染する A 型インフルエンザウイルスのポリメラーゼサブユニットの核内輸送は、種特異的なインポーチン α サブユニットに依存していることが報告されている⁵⁷。さらに、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の preintegration 複合体の核輸送は、HIV-1 インテグラーゼがマウスの輸送システムと十分に相互作用しないためにマウス細胞内では制限されることが明らかとなっている⁵⁸。またバイオインフォマティクス解析によりウイルス DNA をキャプシドにカプセル化するための分子モーターであるヘルペスウイルスのターミナーゼがもつ NLS 配列は、本研究のオルソボルナウイルスと同様に他のウイルスタンパク質と比較し急速に進化しており、ウイルスのサブファミリー間で多様化していることが示唆されている⁵⁹。

本研究では、インポーチンのように核内輸送に関わる遺伝子が、ウイルスとの進化軍拡競争を通して多様性を獲得し、それに適応したクレード 1 のオルソボルナウイルスは哺乳類と鳥類での増殖性を示し、一方、適応しなかったクレード 3 ウイルスは鳥類細胞にのみ適応していたと考えられた。実際、インポーチンファミリーは生物種間で多様性が大きいことが分子進化学的解析により明らかとなっている⁶⁰。H7N7 亜型の鳥インフルエンザウイルスでは、ウイルスの転写複製に必須の PB2 と NP の変異により哺乳類のインポーチン $\alpha 1$ に認識されるようになり、哺乳類細胞内でのウイルスの転写活性が上昇し増殖能を獲得したと報告されている⁶¹。ウイルスタンパク質の効率的な核輸送にはウイルスがもつ NLS とインポーチンのようなトランスポーター受容体との結合親和性が重要であることから、ウイルスの多様化に伴う宿主適応には宿主のトランスポーター受容体との親和性を維持する NLS の進化が必要であると考えられる。本研究では、オルソボルナウイルスの N タンパク質の NLS を認識して核内移行を行う宿主因子の発見に至っていない。今後、ウイルスタンパク質の核内輸送を担う因子を同定することで、オルソボルナウイルスの適応進化過程における宿主との進化的軍拡競争のさらな

る理解につながるだろう。

第四章

材料と方法

細胞培養

アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞(Vero 細胞)は、2%ウシ胎児血清 (Fatal calf serum: FCS) (MP Biomedical, CA, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, MS, USA) 中で培養した。ヒト由来オリゴデンドログリオーマ細胞(OL 細胞)は、5%FCS を含む DMEM 中で培養した。ヒト由来腎臓上皮細胞(293T 細胞)、イヌ由来腎臓尿細管上皮細胞(MDCK 細胞)、ラット由来グリア腫細胞(C6 細胞)、アフリカミドリザル由来腎臓上皮細胞(COS-7 細胞)、ニワトリ由来線維芽細胞(DF-1)、ヒト由来子宮頸部類上皮癌細胞(HeLa 細胞)、シリアンハムスター由来腎臓細胞(BHK 細胞)、およびマウス胎児由来線維芽細胞(NIH-3T3 細胞)は、10% FCS を含む DMEM 中で培養した。ウズラ由来繊維肉腫細胞(QT6 細胞)およびチャイニーズハムスター由来卵巣細胞(CHO-K1 細胞)は、それぞれ 10%FCS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F12(DMEM/F12)(Thermo Fisher Scientific) または DMEM/F12 Ham(Thermo Fisher Scientific)中で培養した。上記すべての細胞は、5% CO₂ 含む飽和水蒸気温槽中、37°Cで培養した。

ウイルス株

BoDV-1 に持続感染した OL 細胞(OL/BoDV-1)は、以前報告されたように He/80/Fct 株のリバーシジェネティクス法を用いて得た⁶²。各鳥ボルナウイルスに持続感染した QT6 細胞株は、PaBV-2 KOKO 株⁶³、PaBV-4 7I6 株⁶³ および MuBV-1 を非感染 QT6 細胞に接種後、二週間継代を行い得られた。これらボルナウイルス持続感染細胞はそれぞれの親細胞と同条件で培養した。上記持続感染細胞は感染性ウイルスを産生し、かつ細胞の 90%以上が抗 P タンパク質抗体を用いた免疫染色法により陽性であることを確認した。

ウイルス溶液の調整

各ウイルス持続感染細胞をトリプシン処理により回収し、DMEM に懸濁した。トリプシン処理には 0.05% Trypsin-EDTA(Thermo Fisher Scientific)を用いた。BIORUPTOR II(ソニックバイオ、神奈川、日本)を用いて、同細胞懸濁液を超音波処理し(条件: Time ON = 30 秒、Time OFF = 30 秒、サイクル数 = 5、Power = High)、1200×g、4°Cで 25 分間遠心分離した。上清を回収し、感染性ウイルス溶液として使用まで-80°Cにて保存した。

ウイルス溶液を用いた感染

培地を除去後、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline: PBS)で細胞を洗浄しウイルス溶液を添加した。37° C で 1 時間接種した後、接種した細胞を DMEM で 2 度洗浄し、FCS を含むそれぞれの培地中で培養した。

共培養によるウイルス感染

持続感染細胞(2.0×10^6 細胞)を 10cm ディッシュ上で培養し 24 時間後、ピューロマイシン耐性の非感染 Vero 細胞(1.0×10^6 細胞)を同ディッシュに添加した。2 日間共培養した後、ピューロマイシン($8.0 \mu\text{g/mL}$)を含む培地で 14 日間培養し、元の持続感染細胞を除去した。これら共培養細胞は 2 日に 1 回継代を行った。ピューロマイシン耐性 Vero 細胞以外の非感染細胞を用いた実験では、元の持続感染細胞を除去するためにマイトマイシン C(和光、大阪、日本)を使用した。マイトマイシン C は細胞内で還元され DNA の核酸塩基に架橋構造を介して結合し、DNA の開裂および複製を阻害す

る。培養細胞に直接添加することで細胞分裂、増殖を停止させ徐々に死滅させる。持続感染細胞の培養液にマイトマイシンC溶液を10cmディッシュに最終濃度15 μ g/mLになるように直接滴下した。マイトマイシンC溶液の滴下後、感染細胞を37°Cで2時間培養した。DMEMで3回洗浄した後、マイトマイシンC処理した同ディッシュに非感染細胞(3.0×10^6 細胞)を混合し共培養した。マイトマイシンC処理した元の感染細胞は細胞死を引き起こし徐々に除去され、混合した非細胞は正常に増殖する。これら共培養した細胞は2日ごとに3倍希釈で継代した。

プラスミドの作製

アンチセンス方向に *Gaussia luciferase*(Gluc)遺伝子をコードした BoDV-1 ミニレプリコン発現プラスミドである pMG-BoDV/Gluc、BoDV-1 N 発現プラスミドである pCA-N、BoDV-1 P 発現プラスミドである pCXN2-P、BoDV-1 L 発現プラスミドである pCAGGS-L は、当研究室で以前作製されたものを使用した⁶⁴。同様に pMG-PaBV-4/Gluc、pCAG-PaBV-4/N、pCAG-PaBV-4/P、pCAG-PaBV-4/L は Friedrich-Loeffler-Institut の Dr. Dennis Rubbenstroth より供与いただいた。各遺伝子型 BoDV-1、PaBV-2、PaBV-4、PaBV-5、MuBV-1 の G タンパク質および M タンパク質発現プラスミドを pEF4A(Thermo Fisher Scientific)に挿入し作製した。また Integrated DNA Technologies gBlocks(USA)により人工合成した VSBV-1 の G 遺伝子、M 遺伝子配列を pCAGGS に挿入し各発現プラスミドを作製した。ボルナウイルスの G 遺伝子は mRNA に転写されたのち、宿主のスプライシング機構を利用し成熟した mRNA になる。プラスミド導入によるタンパク質発現を高めるため、それぞれの G 遺伝子配列に含まれる 3'-スプライシング部位 “AG”を PaBV-2 および PaBV-4、PaBV-5 では “GG”に、MuBV-1 では “AC” に置換した。BoDV-1、PaBV-4、MuBV-1 の N または P 遺伝子の配列を

pcDNA3(Thermo Fisher Scientific)に挿入した。BoDV-1、PaBV-4、MuBV-1 の N タンパク質の C 末端側に Myc タグを融合させた配列を PCR により合成し、pcDNA3 に挿入した。同様に BoDV-1、PaBV-4、MuBV-1 の P タンパク質の N 末端側に FLAG タグを融合させた配列を pcDNA3 に挿入した。また N-NLS 変異体の発現プラスミドを構築するために、BoDV-1 N の NLS 配列(アミノ酸配列 3-30 番目)を PaBV-4 N の NLS 配列に置き換えた。同様に、BoDV-1 N に PaBV-4 N の NLS 配列へ置換した変異体を PCR による変異導入で合成し、pcDNA3 に挿入した。

細胞へのプラスミドの導入

プラスミドは、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) または TransIT-293(TaKaRa)を用いて細胞に導入した。操作は付属の手順に従った。

BoDV-1 組換えウイルスの作製

BoDV-1 He/80/Fct 株のリバースジェネティクス法は、大東卓史博士らが報告している方法に従い実施した⁶²。P 遺伝子領域と M 遺伝子領域間に GFP 遺伝子をコードする(pFct-He/80 PM-GFP)完全長 cDNA クローンを保有するプラスミドを使用した。293T 細胞に pFct-He/80 PM-GFP、pCA-N、pCXN2-P、pCAGGS-L を TransIT-293 Transfection Reagent(TaKaRa)を用いて導入した。導入し 72 時間後、導入後の細胞を継代しピューロマイシン耐性 Vero 細胞と共培養した。共培養して 3 日後、ピューロマイシンを加え Vero 細胞のみを選択的に培養し、元の 293T 細胞を死滅させた。組換えウイルスが持続感染を成立させるまで継代をおこなった。NLS を改変した組換えウイルス(rNLS)を作製する際には、pFct-He/80 PM-GFP の N 遺伝子領域に PCR により変異を導入した cDNA クローン(pFct-He/80-rNLS PM-GFP)を使用した。プラスミドを導入し

たウェルごとの GFP 陽性細胞数をカウントすることで、組換え BoDV-1 のレスキュー効率を評価した。

G 遺伝子、M 遺伝子および MG 遺伝子欠損組換えウイルスの作製

G 遺伝子を欠損した組換え BoDV-1(rBoDVΔG GFP)、M 遺伝子を欠損した組換え BoDV-1(rBoDVΔM GFP)、および M 遺伝子と G 遺伝子の両方を欠損した組換え BoDV-1(BoDVΔMG GFP)は先行研究で報告された方法に従いリバースジェネティクス法により作製した^{62,65}。これらの組換えウイルスは、P 遺伝子領域の下流にレポーター遺伝子として GFP をコードしている。293T 細胞に BoDV-1 cDNA 発現ベクタープラスミドおよび pCA-N、pCXN2-P、pCAGGS-L を TransIT-293 Transfection Reagent(TaKaRa)を用いて導入した。G 遺伝子欠損組換えウイルス作製にはこれらプラスミドに加え G 遺伝子発現プラスミド pCAGGS-G を、M 遺伝子欠損組換えウイルス作製には M 遺伝子発現プラスミド pCAGGS-M をヘルパープラスミドとして導入し、それぞれ rBoDVΔG または rBoDVΔM を作製した。M および G 遺伝子両方を欠損した組換えウイルス rBoDVΔMG の作製には、M および G 遺伝子発現プラスミドをベクターおよび N、P、L 遺伝子発現プラスミドを 293T 細胞に導入した。導入して 72 時間後に細胞を継代した。継代して 24 時間後、M タンパク質および G タンパク質を安定的に発現するピューロマイシン耐性 Vero 細胞を 293T 細胞に混合し共培養をおこなった。共培養して 3 日後、ピューロマイシンを加え Vero 細胞のみを選択的に培養し、元の 293T 細胞を死滅させた。組換えウイルスが持続感染を成立させるまで継代をおこなった。

G タンパク質恒常発現細胞株の樹立

G タンパク質恒常発現細胞を樹立するために、pMXs-Puro レトロウイルスベ

クター(Cell Biolabs Inc、SD、USA)を用いた。各遺伝子型のG遺伝子を pMXs プラスミドのマルチプルクローニングサイトに挿入した。6 ウェルプレートに播種した Platinum-GP レトロウイルスパッケージング細胞(Cell Biolabs Inc)に水胞性口内炎ウイルス膜糖タンパク質発現プラスミド(pMD2.G)および G 遺伝子を挿入した pMXs-Puro レトロウイルスベクターを導入しレトロウイルスベクターを作製した。導入し 72 時間後、レトロウイルスを含む培養上清を回収し、1200 x g で遠心分離した。遠心後上清を回収し、0.45 μm フィルター(Merck)でろ過した。精製したレトロウイルスベクターを含む培養上清を各細胞株(OL、QT6、DF-1、および 3T3 細胞)に添加した。レトロウイルスを接種した各細胞を、ピューロマイシン 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む培地中で培養しセレクションをおこなった。

合胞体形成アッセイ

G タンパク質恒常発現細胞を 6 ウェルプレートに播種(5.0×10^5 細胞/well)し、24 時間後に培地を除去して 37°C の PBS で 2 回洗浄した後、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含む D-PBS+ pH5.0(ナカライテスク)0.5 mL を細胞に添加した。37°C で 5 分間静置した後、細胞を DMEM で 3 回洗浄し、新たに 2mL の培地を加え 37°C で 90 分間培養した。培養後、培地を除去し 4% パラホルムアルデヒドを添加し細胞を固定した。顕微鏡(ニコン)で細胞を観察し画像を取得した。

BoDV-1 を用いたシュードタイプアッセイ

G 遺伝子欠損組換え BoDV-1(rBoDV Δ G GFP)、M 遺伝子欠損組換え BoDV-1(rBoDV Δ M GFP)、および M 遺伝子と G 遺伝子の両方を欠損した組換え BoDV-

1(BoDVΔMG GFP)が持続感染した 293T 細胞に各遺伝子型の G タンパク質、M タンパク質発現プラスミドを導入することによりシュードタイプウイルスを作製した。プラスミドを導入して 48 時間後、前述の方法に従いウイルス溶液を調整し、使用まで 80°Cにて保存した。

RNA 抽出

培養細胞からの RNA 抽出は、TRIzol(Thermo Fisher Scientific)を用いておこなった。操作は付属の手順に従った。

RT-PCR

cDNA の作製には Verso cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)を使用した。操作は付属の手順に従った。逆転写用プライマーにはランダムヘキサマーを用いた。RT-PCR には、合成された cDNA を鋳型とし、PrimeStar MAX ポリメラーゼ (TaKaRa、滋賀、日本)を付属の手順に従い使用した。PCR は 98°Cを 30 秒間行った後、98°Cを 20 秒間、55°Cを 8 秒間、72°Cを 15 秒間の過程を 25 サイクルでおこなった。使用した各プライマーの配列は表 1 に記載した。アガロースゲル電気泳動は 100V の定電圧でおこない、画像は BioDoc-It Imaging System(Ultra-Violet Products Ltd., UK)で取得した。

定量 RT-PCR (qRT-PCR)

培養細胞から抽出した RNA 1.0 μg と Verso cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)を使用し、cDNA を作製した。逆転写用プライマーには、Olido dT、BoDV-1

ゲノム特異的プライマーまたは PaBV-4 ゲノム特異的プライマーのいずれかを使用した。定量 RT-PCR には合成された cDNA を鋳型とし、SYBR-Green PCR Assay(東洋紡、大阪、日本)を使用した。各評価方法には比較 Ct 法を用い、定量 RT-PCR には Rotor-Gene Q System(Qiagen、Germany)を用いて実施した。いずれも操作は付属の手順に従った。使用したプライマーの配列は表 1 に記載した。

免疫蛍光染色 (IFA)

12 ウェルプレートまたは 8 ウェルチャンバースライドに播種し培養した細胞を PBS で洗浄し、37°C に温めた 4% パラホルムアルデヒド(富士フィルム和光純薬)を添加して室温で 15 分間静置し細胞の固定をおこなった。4% パラホルムアルデヒドを除去し PBS で 2 回洗浄した後、0.25% Triton X-100(ナカライテスク、京都、日本)を含む PBS に 10 分間浸し膜透過処理をおこなった。膜透過処理後、1% FCS を含む PBS に室温で 1 時間浸しブロッキングをおこない、1% FCS を含む PBS に希釈した抗 BoDV N 抗体、抗 BoDV P 抗体、抗 FLAG タグ抗体、抗 Myc タグ抗体を細胞に添加し室温で 1 時間反応させた。1 次抗体を反応させた後、PBS で 3 回洗浄し 1% FCS を含む PBS に希釈した Alexa Fluor 標識 2 次抗体(Thermo Fisher Scientific)および 4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI: Merck)を添加した。室温で 1 時間反応させた後に、PBS で 4 回洗浄し観察に用いた。免疫蛍光観察と画像の取得には、ECLIPSE Ti 共焦点レーザー走査顕微鏡(Nikon、東京、日本)を使用した。本研究で使用した 1 次抗体は表 2 に記載した。

ウェスタンブロッティング

回収した細胞懸濁液と等量の 2×SDS-Sample 緩衝液(10%メルカプトエタノール(富士フィルム和光純薬、大阪、日本)、4%SDS(富士フィルム和光純薬)、0.3M スク

ロース(富士フィルム和光純薬)、0.01%BPB(富士フィルム和光純薬)を含む 125 mM Tris-HCl 緩衝液(Tris: ナカライテスクおよび HCl: 富士フィルム和光純薬)を添加後、95°C で 10 分間加熱しタンパク質を変性させた。変性後のタンパク質をサンプルとし SDS-PAGE に供し分画した。電気泳動は e-PAGEL minigel 12.5%もしくは 5-20%ポリアクリルアミドゲル(ATTO、東京、日本)を、泳動用緩衝液は Tris-glycine-SDS buffer powder(TaKaRa)を用いた。電気泳動は 400V の定電圧で実施した。泳動後、Trans-Blot Turbo PVDF Transfer Pack(Bio-Rad、CA、USA)を用いてゲル中のタンパク質を PVDF 膜へと転写した。膜転写にはセミドライ式ブロッティング法を用いた。膜転写後、Blocking One(ナカライテスク)に PVDF 膜を浸し室温で 1 時間浸透することでブロッキングをおこなった。ブロッキング後、Can Get Signal Immunionreaction Enhancer Solution 1(東洋紡、大阪、日本)を用いて 1 次抗体を希釈し、室温で 1 時間 PVDF 膜と反応させた。TBS-T(TBS: Tris buffered saline tablets pH 7.6 (TaKara)、0.1% Tween-20(富士フィルム和光純薬))で 3 回洗浄した後、Can Get Signal Immunionreaction Enhancer Solution 2(東洋紡)を用いて 2 次抗体を希釈し、洗浄後の PVDF 膜と室温で 1 時間反応させた。2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase: HRP)で標識された抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch、PA、USA)を使用した。TBS-T で 3 回洗浄後、Amersham ECL Prime(GE Healthcare、IL、USA)を用いて化学発光反応をおこなった。HRP 発光の検出および画像の取得には ImageQuant LAS 4000mini(GE Healthcare)を用いた。操作はすべて付属の手順に従った。本研究で使用した 1 次抗体は表 2 に記載した。

ミニレプリコンアッセイ

BoDV-1 および PaBV-4 のミニレプリコンアッセイは、以前に報告された方法

に従い実施した^{64,66}。12 ウェルプレートに 8.0×10^4 細胞の 293T 細胞または OL 細胞、および 10^5 細胞の DF-1 細胞を播種し 24 時間培養した。培養後、それぞれに対応する pCAGGS-Gluc ミニレプリコンプラスミドを 0.25 μg 、pCAGGS-N を 0.25 μg 、pCAGGS-P を 0.025 μg 、pCAGGS-L を 0.25 μg を導入した。導入して 48 または 72 時間後に培養上清を回収し、Gaussia luciferase 活性を BioLux Luciferase Assay Kit (New England BioLabs, MA, USA) を用いて測定した。それぞれのサンプルにおける Gluc 活性を標準化するため Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa) を用いて WST-1 活性を測定した。データの取得には Berthold Lumat LB 9507 (Bad Wildbad, Germany) を用いた。すべての操作は付属の手順に従い実施した。

ウイルスゲノム配列の系統解析

ボルナウイルス科オルソボルナウイルス属に含まれる 16 の遺伝子型の計 34 株の N、P、X、M、G、また L 遺伝子の一部を含むゲノム塩基配列を MAFFT⁶⁷ にて多重アライメントし、MEGA X⁶⁸ にて系統樹を作成した。系統樹は Juke-Cantor モデル近隣結合法 (10,000 bootstrap) により作成⁴⁸ した。解析に用いたウイルス株、国際塩基配列データベースに登録されているアクセッションナンバーは図に示した。

アミノ酸配列解析

各クレードに属するウイルスに蓄積した変異を同定するため、ConSurf⁶⁸ を用いてアミノ酸保存スコアを算出した。BoDV-1 のウイルス遺伝子 (N、P、M、G、L) のアミノ酸配列 (Accession no. AB258389)、BoDV-2 (AJ311524)、VSBV-1 (LN713680)、PaBV-5 (LC120625)、CnBV-2 (KC464478)、MuBV-1、PaBV-2 (KC464478)、PaBV-4

(JX065209)、および PaBV-7(JX065209)のウイルス遺伝子(N、P、M、G、L)のアミノ酸配列を MAFFT⁶⁷によりアラインメントした。L 遺伝子の解析では、PaBV-7 の配列が部分的にしか決定されていないため、解析に用いる配列長は PaBV-7 に合わせた。アラインメント後、最尤法によりスコアを算出した。

dN/dS 解析

BoDV-1(AB258389)と PaBV-4(JX065209)の N、P、M、G、L タンパク質のアミノ酸配列を MAFFT⁶⁷ でアラインメントした。アラインメントされた配列を 12 残基ごとに分割し、各セグメントの非同義置換率(dN)と同義置換率(dS)およびその比(dN/dS: ω)を PAL2NAL により算出した。各コドンの dN/dS 標準値は、遺伝子型 BoDV-1、PaBV-4、MuBV-1 の N 遺伝子の完全長を用いて HyPhy パッケージにより算出した⁶⁹。

引用文献

1. Briese, T. *et al.* Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4362–4366 (1994).
2. Cubitt, B., Oldstone, C. & de la Torre, J. C. Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* **68**, 1382–1396 (1994).
3. Kuhn, J. H. *et al.* Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch. Virol.* **160**, 621–632 (2015).
4. Ludwig, H., Bode, L. & Gosztonyi, G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog. Med. Virol. Fortschritte Med. Virusforsch. Progres En Virol. Medicale* **35**, 107–151 (1988).
5. Kinnunen, P. M., Palva, A., Vaeheri, A. & Vapalahti, O. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections. *J. Gen. Virol.* **94**, 247–262 (2013).
6. Staeheli, P., Sauder, C., Hausmann, J., Ehrensperger, F. & Schwemmler, M. Epidemiology of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 2123–2135 (2000).
7. Ludwig, H. & Bode, L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* **19**, 259–288 (2000).
8. Dürrwald, R. & Ludwig, H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralblatt Vet. Reihe B J. Vet. Med. Ser. B* **44**, 147–184 (1997).
9. Niller, H. H. *et al.* Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 467–477 (2020).
10. Korn, K. *et al.* Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1375–1377 (2018).
11. Schlottau, K. *et al.* Fatal Encephalitic Borna Disease Virus 1 in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1377–1379 (2018).
12. Kohno, T. *et al.* Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J. Virol.* **73**, 760–766 (1999).
13. Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* **4**, 491–500 (2002).
14. Kraus, I. *et al.* Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated

- matrix protein. *J. Virol.* **75**, 12098–12104 (2001).
15. Stitz, L. *et al.* A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J. Virol.* **72**, 8884–8892 (1998).
 16. Watanabe, Y., Ohtaki, N., Hayashi, Y., Ikuta, K. & Tomonaga, K. Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases. *PLoS Pathog.* **5**, e1000654 (2009).
 17. Honda, T., Horie, M., Daito, T., Ikuta, K. & Tomonaga, K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at the cell surface. *J. Virol.* **83**, 12622–12625 (2009).
 18. Makino, A., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Binding properties of GP1 protein of Borna disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 243–246 (2009).
 19. Clemente, R. & de la Torre, J. C. Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules. *J. Virol.* **83**, 10406–10416 (2009).
 20. Clemente, R., de Parseval, A., Perez, M. & de la Torre, J. C. Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *J. Virol.* **83**, 2655–2662 (2009).
 21. Honda, T. & Tomonaga, K. Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* **5**, 1978–1990 (2013).
 22. Schneider, U., Blechschmidt, K., Schwemmler, M. & Staeheli, P. Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 55290–55296 (2004).
 23. Geib, T. *et al.* Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease virus nucleocapsid components. *J. Virol.* **77**, 4283–4290 (2003).
 24. Matsumoto, Y. *et al.* Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* **11**, 492–503 (2012).
 25. Hirai, Y. *et al.* Borna Disease Virus Assembles Porous Cage-like Viral Factories in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **291**, 25789–25798 (2016).
 26. Hirai, Y., Honda, T., Makino, A., Watanabe, Y. & Tomonaga, K. 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).
27. Kistler, A. L. *et al.* Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol. J.* **5**, 88 (2008).
 28. Honkavuori, K. S. *et al.* Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1883–1886 (2008).
 29. Daoust, P. Y., Julian, R. J., Yason, C. V. & Artsob, H. Proventricular impaction associated with nonsuppurative encephalomyelitis and ganglioneuritis in two Canada geese. *J. Wildl. Dis.* **27**, 513–517 (1991).
 30. Doneley, R. J. T., Miller, R. I. & Fanning, T. E. Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Aust. Vet. J.* **85**, 119–123 (2007).
 31. Gancz, A. Y. *et al.* Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virol. J.* **6**, 100 (2009).
 32. Sassa, Y. *et al.* Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. *Virus Genes* **47**, 173–177 (2013).
 33. Payne, S. *et al.* Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). *J. Virol.* **85**, 12053–12056 (2011).
 34. Horie, M., Ueda, K., Ueda, A., Honda, T. & Tomonaga, K. Detection of Avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. *Microbiol. Immunol.* **56**, 346–349 (2012).
 35. Kistler, A. L., Smith, J. M., Greninger, A. L., Derisi, J. L. & Ganem, D. Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *J. Virol.* **84**, 2176–2179 (2010).
 36. Hoffmann, B. *et al.* A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 154–162 (2015).
 37. Rubbenstroth, D. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Bornaviridae. *J. Gen. Virol.* **102**, (2021).
 38. Komorizono, R., Makino, A., Horie, M., Honda, T. & Tomonaga, K. Sequence determination of a new parrot bornavirus-5 strain in Japan: implications of clade-specific sequence diversity in the regions interacting with host factors. *Microbiol. Immunol.* **60**, 437–

- 441 (2016).
39. Wensman, J. J. *et al.* Markers of Borna disease virus infection in cats with staggering disease. *J. Feline Med. Surg.* **14**, 573–582 (2012).
 40. Hagiwara, K., Ando, T. & Koiwa, M. The influence of Borna disease viral infection on dairy cow reproduction. *J. Vet. Med. Sci.* **74**, 419–421 (2012).
 41. Rubbenstroth, D. *et al.* Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Vet. Microbiol.* **165**, 287–295 (2013).
 42. Rubbenstroth, D. *et al.* Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Vet. Microbiol.* **168**, 318–323 (2014).
 43. Chandrasekaran, A. *et al.* Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. Biotechnol.* **26**, 107–113 (2008).
 44. Shinya, K. *et al.* Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *J. Virol.* **79**, 9926–9932 (2005).
 45. Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G. & Paulson, J. C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**, 17–23 (1994).
 46. Ito, T. & Kawaoka, Y. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet. Microbiol.* **74**, 71–75 (2000).
 47. Chan, L. L. Y. *et al.* Evaluation of the human adaptation of influenza A/H7N9 virus in PB2 protein using human and swine respiratory tract explant cultures. *Sci. Rep.* **6**, 35401 (2016).
 48. Ashkenazy, H. *et al.* ConSurf2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**, W344–350 (2016).
 49. Kobayashi, T. *et al.* Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* **243**, 188–197 (1998).
 50. Kosugi, S. *et al.* Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **284**, 478–485 (2009).
 51. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. & Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10171–10176 (2009).
 52. Simmonds, P., Aiewsakun, P. & Katzourakis, A. Prisoners of war - host adaptation and its constraints on virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 321–328 (2019).

53. Ng, M. *et al.* Filovirus receptor NPC1 contributes to species-specific patterns of ebolavirus susceptibility in bats. *eLife* **4**, e11785 (2015).
54. Beck, M. & Hurt, E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 73–89 (2017).
55. Wenthe, S. R. & Rout, M. P. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000562 (2010).
56. Miyamoto, Y., Yamada, K. & Yoneda, Y. Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *J. Biochem. (Tokyo)* **160**, 69–75 (2016).
57. Gabriel, G. *et al.* Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat. Commun.* **2**, 156 (2011).
58. Tsurutani, N. *et al.* Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. *J. Virol.* **81**, 677–688 (2007).
59. Sankhala, R. S., Lokareddy, R. K. & Cingolani, G. Divergent Evolution of Nuclear Localization Signal Sequences in Herpesvirus Terminase Subunits. *J. Biol. Chem.* **291**, 11420–11433 (2016).
60. O'Reilly, A. J., Dacks, J. B. & Field, M. C. Evolution of the karyopherin- β family of nucleocytoplasmic transport factors; ancient origins and continued specialization. *PLoS One* **6**, e19308 (2011).
61. Gabriel, G., Herwig, A. & Klenk, H.-D. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin $\alpha 1$ is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* **4**, e11 (2008).
62. Daito, T. *et al.* A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. *J. Virol.* **85**, 12170–12178 (2011).
63. Horie, M. *et al.* Isolation of avian bornaviruses from psittacine birds using QT6 quail cells in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 305–308 (2016).
64. Kojima, S., Honda, T., Matsumoto, Y. & Tomonaga, K. Heat stress is a potent stimulus for enhancing rescue efficiency of recombinant Borna disease virus. *Microbiol. Immunol.* **58**, 636–642 (2014).
65. Fujino, K. *et al.* Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein genes. *Microbiol. Immunol.* **61**, 380–386 (2017).
66. Reuter, A. *et al.* Synergistic antiviral activity of ribavirin and interferon- α against parrot

- bornaviruses in avian cells. *J. Gen. Virol.* **97**, 2096–2103 (2016).
67. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **20**, 1160–1166 (2019).
68. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
69. Pond, S. L. K., Frost, S. D. W. & Muse, S. V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **21**, 676–679 (2005).

注釈

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Ryo Komorizono, Yukiko Sassa, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga

Evolutionary Selection of the Nuclear Localization Signal in the Viral Nucleoprotein Leads to Host Adaptation of the Genus Orthobornavirus

Viruses, 2020 Nov 11;12(11):1291. DOI: 10.3390/v12111291.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心にご指導ご鞭撻いただいた京都大学生命科学研究科 朝長啓造教授に心より感謝申し上げます。また日頃より多くのご指導を賜り、さまざまな研究の機会を与えてくださった牧野晶子助教に深く感謝申し上げます。快く研究材料を提供してくださり、数々のご助言を頂戴致しました東京農工大学農学研究院動物生命科学部門獣医伝染病研究室 佐々悠木子講師、大阪府立大学獣医環境科学分野感染症制御学講座獣医微生物学教室 堀江真行教授、ならびに朝長研究室の皆様心よりお礼申し上げます。