

**コウモリゲノムに内在する
ボルナウイルス様配列
miEBLN-1 の分子進化学的解析
および機能探索**

向井 八尋

目次

要旨	3
略語表	5
第一章 序論	
1-1. 内在性ウイルス様配列について	8
1-2. 内在性ボルナウイルス様配列について	9
1-3. これまでの研究の推移と本研究の目的	10
第二章 結果	
2-1. miEBLN-1 は RNA 結合タンパク質をコードしうる	12
2-2. miEBLN-1 は負の自然選択下において進化している	15
2-3. miEBLN-1 はユビナガコウモリ臓器においてタンパク質を発現する	19
2-4. miEBLN-1p は BoDV-1 N に類似した RNA 結合様式を示す	21
2-5. miEBLN-1p は抗ウイルス作用を示さない	23
2-6. miEBLN-1p は宿主の RNA 結合タンパク質と相互作用する	28
2-7. miEBLN-1p はストレス顆粒に局在する	31
2-8. miEBLN-1p は RNA 結合能依存的に LINE-1 RNP と相互作用する	32
2-9. miEBLN-1p は IDR 依存的に LINE-1 RNP と相互作用する	35
第三章 考察	
3-1. miEBLN-1p の生化学的な性状	40
3-2. miEBLN-1p の抗ウイルス機能について	41
3-3. miEBLN-1p とストレス顆粒との関連	42

3-4. miEBLN-1p による LINE-1 抑制機構	43
3-5. miEBLN-1 および EBLN が宿主進化に及ぼした可能性	44
第四章 材料と方法	47
引用文献	74
注釈	83
謝辞	84

要旨

内在性ボルナウイルス様配列 (EBL) は、ボルナウイルスに由来するゲノム配列の総称であり、多様な種の脊椎動物ゲノムにおいて同定されている。これまでに、いくつかの EBL が機能的なタンパク質をコードすることが報告されている。しかしながら、宿主細胞における EBL 機能の適応進化が、由来となったボルナウイルス遺伝子の機能とどのように相関しているのかについては明らかとなっていなかった。

本研究では、ウイルスゲノム RNA に結合するヌクレオプロテイン (N) をコードするボルナウイルスの N 遺伝子由来の EBL、ボルナウイルス様 N 配列 (EBLN) 、に着目し、RNA 結合タンパク質として宿主に外適応している可能性のある EBLN を探索するとともに、培養細胞におけるその機能について解析を行った。

RNA 結合タンパク質の配列予測ツールを用いた解析の結果、脊椎動物ゲノムに存在する多くの EBLN が RNA 結合タンパク質をコードしている可能性が明らかとなった。その中でも、ユビナガコウモリ (*Miniopterus natalensis*) ゲノムから同定された miEBLN-1 は、負の自然選択圧のもとで進化しているタンパク質 (miEBLN-1p) をコードしていることが示された。さらに、ユビナガコウモリの臓器を用いた発現解析の結果、miEBLN-1p が様々な臓器で発現していることが明らかとなり、miEBLN-1p が RNA 結合タンパク質として宿主機能を担っている可能性が強く示唆された。

そこで次に、miEBLN-1p の組換え精製タンパク質を用いた *in vitro* での生化学的解析により、RNA 結合能の検証を行った。その結果、miEBLN-1p は、宿主由来の RNA 分子と結合できるタンパク質であることが示され、その性状は哺乳類由来のボルナウイルスであるボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) の N タンパク質と類似していることが明らかとなった。さらに、miEBLN-1p の機能を予測するため、タンデムアフィニティー精製法およびプロテオーム解析によ

って相互作用タンパク質の同定を試みた。その結果、 miEBLN-1p は、細胞内で MOV10、IGF2BP3 といった RNA 結合タンパク質と相互作用することが確かめられた。一方、同定された相互作用タンパク質の多くは、レトロトランスポゾン的一种である LINE-1 の抑制因子として報告されていたため、レポーターアッセイにより miEBLN-1p の LINE-1 抑制作用を評価した。その結果、miEBLN-1p も同様に LINE-1 活性を抑制することが確認された。

miEBLN-1 の由来であるボルナウイルスの N 遺伝子は、ウイルス RNA ゲノムに結合する RNA 結合タンパク質をコードしている。今回の解析により、ユビナガコウモリは獲得したボルナウイルス遺伝子の本来の機能である RNA 結合能を、自らの生理的機能に転用したことが示唆された。EBL がウイルスタンパク質に由来する機能を残したまま、宿主細胞に外適応している例は未だ報告されておらず、今回の結果は内在化したウイルス遺伝子の適応進化の方向性に関して新たな知見を提唱することができると考えられる。

略語表

本文中および図表中で用いた略語を、以下に記す。

aa	: Amino Acids
BoDV	: Borna disease virus
BSA	: Bovine Serum Albumin
cDNA	: Complementary DNA
CDS	: Coding Sequence
CLIP-seq	: Cross-Linking Immunoprecipitation - seq
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBL	: Endogenous bornavirus-like elements
EMSA	: Electrophoresis mobility shift assay
ERV	: Endogenous Retrovirus
EVE	: Endogenous Viral Elements
FCS	: Fetal Bovine Serum
GFP	: Green Fluorescent Protein
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	: Human immunodeficiency virus
HRP	: Horseradish peroxidase
IDR	: Intrinsically disordered region
kDa	: Kilo dalton
LINE-1	: Long interspersed element 1
LLPS	: Liquid-liquid phase separation
mRNA	: Messenger RNA
ORF	: Open Reading Frame
PBS	: P-binding site
PBS	: Phosphate buffered salts

PCR	: Polymerase Chain Reaction
RdRp	: RNA-Dependent RNA Polymerase
RNP	: Ribonucleotide Protein
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TAP	: Tandem-affinity purification
TBS	: Tris Buffered Saline
TSD	: Target Site Duplication
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
vSPOT	: Viral speckle of transcripts
WGS	: Whole genome shotgun
WB	: Western Blotting

第一章

序論

1-1. 内在性ウイルス様配列について

ウイルスが宿主細胞に感染した際、様々な機構によってウイルスの遺伝情報が宿主ゲノムに挿入されることが知られている¹。このウイルスゲノムの挿入が生殖系列細胞に起こった場合、生じたウイルス由来の配列は以降の子孫の体細胞ゲノムに遺伝的に引き継がれていく^{2,3}。この過程をウイルスゲノムの内在化といい、生じた配列は内在性ウイルス様配列 (Endogenous Viral Elements; EVE) と呼ばれる。

EVE の大部分は、感染の際にウイルスがコードする酵素によってウイルスゲノムの逆転写および宿主ゲノムへの挿入を行うレトロウイルスに由来する内在性レトロウイルス (Endogenous Retrovirus; ERV) に占められ、ヒトゲノムの 8 %を占めていることが明らかとなっている⁴。これら ERV はただの分子化石ではなく、新たな機能を獲得することで宿主の生存と適応に寄与しうることが知られている。例えば、齧歯類のゲノムに内在し、レトロウイルスの *env* 遺伝子に由来する *Fv4* は、ドミナントネガティブ作用によりレトロウイルスの感染を抑制するタンパク質をコードすることが報告されている^{5,6}。また、免疫以外にも様々な生理学的機能の獲得が報告されており、*env* 遺伝子由来の *Syncytin* は、哺乳類の胎盤形成の際に必須である膜融合タンパク質をコードすることが知られている^{7,8}。さらに、*ASPRV1* 遺伝子がコードする *SASPase* というアスパラギン酸特異的プロテアーゼは、レトロウイルスのプロテアーゼに由来することが知られており、マウスを用いた実験系においては皮膚の保湿に重要であることが明らかになっている^{9,10}。このように、宿主は ERV を介してウイルスが元来持っていた性質を獲得し、別の生理的機能に転用することが明らかとなっている。

1-2. 内在性ボルナウイルス様配列について

ボルナウイルスは、ボルナウイルス科 (Family: *Bornaviridae*) を構成するウイルスの総称である。ボルナウイルスのゲノムは、約 9 kb の非分節の一本鎖マイナス鎖の RNA であり、ヌクレオタンパク質 (N)、Xタンパク質 (X)、リン酸化タンパク質 (P)、マトリックスタンパク質 (M)、エンベロープ糖タンパク質 (G)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) コードする 6つの遺伝子を持つ¹¹ (図 1)。ボルナウイルスは、自身の感染サイクルにおいてウイルスゲノムの逆転写および宿主ゲノムへの挿入は必要としないため、逆転写酵素やインテグラーゼを持たない。しかし、これまでヒトから魚に至るまで様々な脊椎動物ゲノムからボルナウイルス由来の EVE が同定されている¹²⁻¹⁶。これらを内在性ボルナウイルス様エレメント (Endogenous bornavirus-like elements; EBL) といい、これまでに N、M、G、L 遺伝子に由来する EBL が同定されてきており、各々 EBLN、EBLM、EBLG、EBLL と呼称される^{12-14,17-23}。

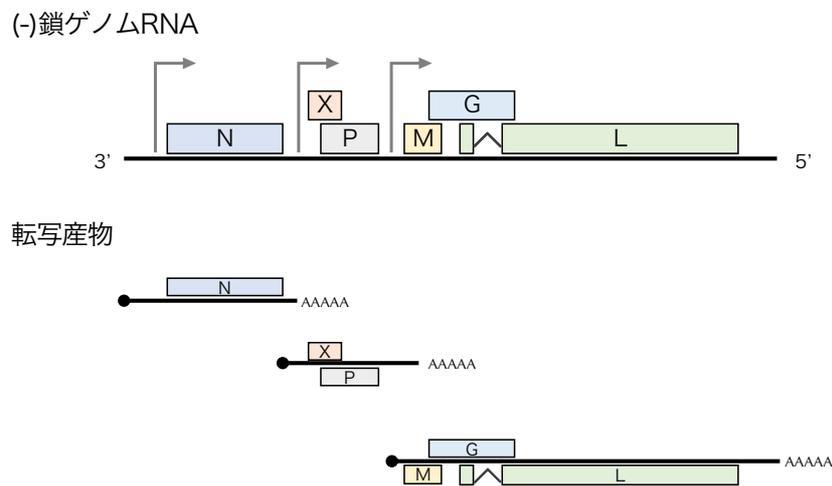


図1. ボルナウイルスのゲノムおよび転写産物の模式図

各色のボックスはそれぞれのウイルス遺伝子を示す。ボルナウイルスの転写は矢印で示される転写開始点から行われ、L遺伝子はスプライシングを受ける。

これら EBL の一部は、内在化してから数千万年もの間、由来となったボ
ルナウイルスの遺伝子と同程度の長さの ORF を保持し、宿主細胞内において転
写されている。このことから、「一部の EBL は内在化以降、宿主にとって有用
な機能を獲得し、宿主の適応進化に寄与する」という仮説が提唱され、機能解
析が行われてきた^{21,24-26}。例えば、我々の研究室は以前、ジュウサンセンジリ
スのゲノムに内在する EBLN である itEBLN にコードされるタンパク質がドミ
ナントネガティブ作用によって BoDV-1 の感染を抑制することを報告している²⁵。
また、ヒトゲノムに内在する hsEBLN-2 タンパク質がミトコンドリアに局
在しており、細胞の生存に関係していることが明らかになっている²⁶。

1-3. これまでの研究の推移と本研究の目的

これらのような先行研究によって、EBL が担う機能の一端が明らかにな
りつつある。しかしながら、EBL の機能解析の報告はほんの数例にとどまって
おり、その生物学的意義や脊椎動物の進化への影響は不明である。この点を解
消するためには、宿主に有益な機能を持ちうる EBL を同定し、その機能を解析
することによって知見を蓄える必要がある。

よって本研究では、「機能的な ERV の多くが元々のウイルスタンパ
ク質の性質を保持している」という点に着目し、機能的な EBL の同定を試みた。
ボルナウイルス N タンパク質は、ゲノム RNA をパッケージングする RNA 結合
タンパク質である。よって本研究ではまず、*in silico* 解析によって「RNA 結合
能を保持し、かつ自然選択圧下にある EBLN」を機能性 EBLN の候補として探
索した。その結果ユビナガコウモリのゲノムから同定された EBLN (miEBLN-1)
が、1230 万年前から負の自然選択圧下において進化していることが明らかにな
った。よって、miEBLN-1 タンパク質 (miEBLN-1p) に着目し、分子生物学的な
手法によって機能解析を行った。

第二章

結果

2-1. miEBLN-1 は RNA 結合タンパク質をコードしうる

まず初めに、データベース解析によって RNA 結合タンパク質をコードしうる EBLN の同定を試みた。我々のグループは以前、tBLASTn によって真核生物ゲノムに存在する EBLN を網羅的に同定している¹⁶。この EBLN から 300 コドン以上の ORF を抽出して以降の解析に用いた。Deep-pred は、深層学習に基づいた配列類似性に依存しない RNA 結合タンパク質予測ツールであり、インプットのアミノ酸配列が RNA 結合タンパク質である可能性を 0~1 の Probability score として算出する²⁷。Deep-pred による RNA 結合能の予測の結果を図 2 に示す。統計解析の結果、ボルナウイルス N タンパク質は EBLN タンパク質と比して有意に高い予測スコア ($p = 0.00043$) を示した。しかしながら、いくつかの EBLN タンパク質は高い予測スコアを示し、特に *Miniopterus natalensis* のゲノム (アクセッション番号: LDJU01000053) から同定された EBLN (miEBLN-1) にコードされる 376 aa のタンパク質は、Deep-pred による予測において 0.99 という非常に高い予測値を示した (図 2)。

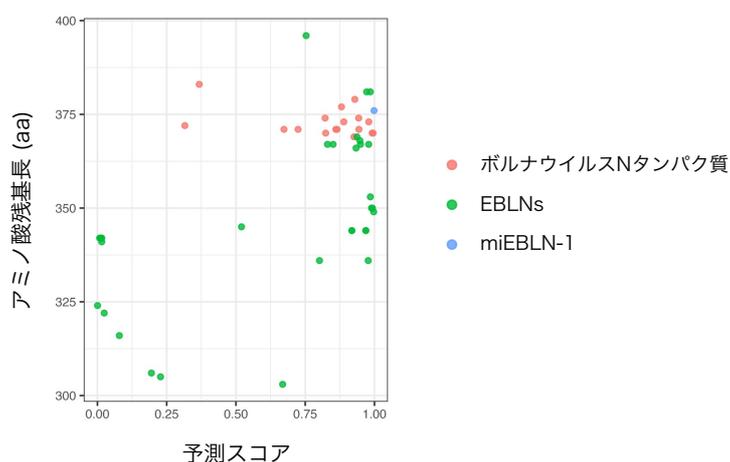


図2. EBLNsおよびボルナウイルスNタンパク質のRNA結合性予測

EBLNsタンパク質およびボルナウイルスNタンパク質のProbabilityの散布図。tBLASTnにより同定したEBLNから300aa以上のタンパク質をコードしうるORFを抽出し、Deep-RBPpredにより予想アミノ酸配列がRNAタンパク質であるProbabilityをプロットした。

よって次に、miEBLN-1 の予測アミノ酸配列とボルナ病ウイルス 1 型 (Borna disease virus-1; BoDV-1) N タンパク質のアミノ酸配列を用いてペアワイズアラインメントを行った。その結果、N 末端を除いた領域において高い配列類似性を示し、全長では 45 % のアミノ酸残基一致率を示した(図 3)。BoDV-1 N タンパク質の RNA 結合能は 4 つの正電荷残基 (以下、RNA 結合残基とする) に依存する²⁸。BoDV-1 N タンパク質のアラインメントにおいて、miEBLN-1 タンパク質 (以降、miEBLN-1p とする) は RNA 結合残基に対応する位置に正電荷アミノ酸を有していた(図 3)。これらの結果から、miEBLN-1p が、BoDV-1 N タンパク質と同様に RNA 結合タンパク質であることが示唆された。

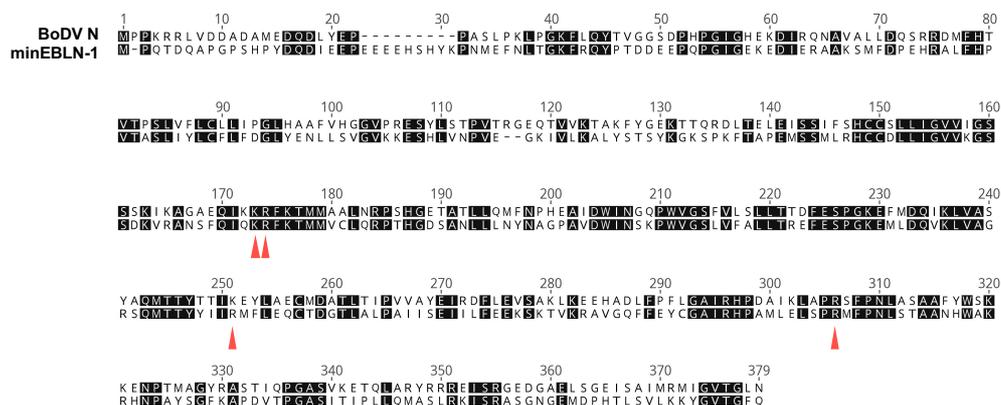


図3. BoDV-1 NとmiEBLN-1のペアワイズアラインメント

miEBLN-1 ORFから予想されるアミノ酸配列と、BODV-1 Nタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを行った。BoDV-1 NのRNA結合残基を赤い矢印で示す。

ボルナウイルスは逆転写酵素を持たない。そのため、EBLはレトロトランスポゾンなどの宿主機構によって逆転写されたボルナウイルスの転写産物が宿主ゲノムに挿入されて発生すると考えられている²⁰。miEBLN-1配列がウイルス配列のコンタミネーションに由来する可能性を排除するため、miEBLN-1近傍のゲノムDNA配列から内在化機構の推定を試みた。ボルナウイルスのN遺伝子は、N遺伝子のORFのみをコードするN mRNAか、5'末端から順にN、X、P遺伝子のORFをコードするN/X/P mRNAとして転写される(図4)¹¹。転

写はゲノム RNA 配列中の転写開始・転写終了シグナルに制御され、これらのシグナル配列の一部はウイルス mRNA 上にも残る (図 4)¹¹。miEBLN-1 近傍のゲノム DNA 配列を確認すると、転写開始・終了シグナル配列 (S1、S2、T1、T2) に類似する配列が存在していた。シグナル配列に類似する配列と miEBLN-1 ORF の位置関係は、N/X/P mRNA 上におけるシグナル配列と N ORF の位置関係に酷似していた(図 4)。いくつかの EBLN は、レトロトランスポゾン的一种である LINE-1 (Long interspersed element 1) の逆転写・ゲノム挿入機構によって宿主ゲノムに挿入されることが示唆されている²⁰。LINE-1 の挿入領域の両末端には、TSD (Target Site Duplication) と呼ばれる短い反復配列が存在する²⁹。miEBLN-1 近傍のゲノム配列を確認すると、S1 類似配列および T2 類似配列の近傍に 12 塩基長の TSD 様配列が見受けられた(図 4)。これらの結果から、miEBLN-1 は LINE-1 転移機構により宿主ゲノムに挿入された外来性ボルナウイルス N/X/P mRNA に由来することが示唆された。

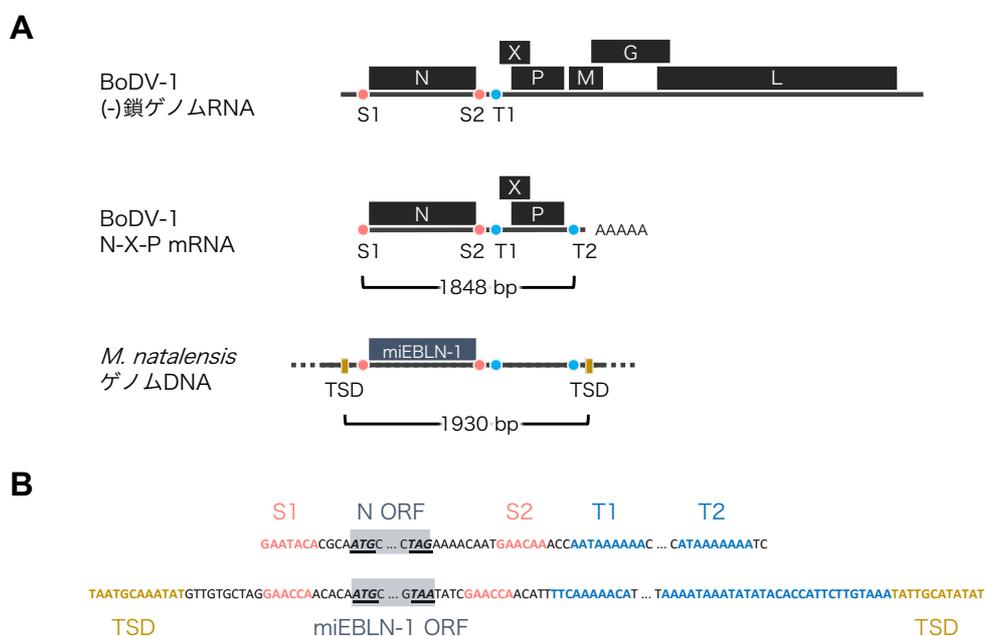


図4. miEBLN-1近傍領域とBoDVの配列比較

ボルナウイルスゲノムRNA、N-X-P mRNA、miEBLN-1近傍領域の (A) 模式図および (B) 配列の比較。転写開始および終了シグナル (S1, S2, T1, T2)、TSDを各色で示す。

2-2. miEBLN-1 は負の自然選択下において進化している

一般的に、ある遺伝子が実際に機能的であるかを議論する際には、オーソログとの配列比較に基づいてコードされるアミノ酸配列の自然選択圧を推測する³⁰。miEBLN-1p が自然選択圧を推測するため、miEBLN-1 のオーソログの同定を試みた。まず、miEBLN-1 を含む 6 kb の近傍領域ゲノム DNA 配列をクエリーに用いて、コウモリの Whole genome shotgun (WGS) データベースを参照とした BLASTn 検索を行った。その結果、*M. natalensis* の遠縁にあたる *Ptenorotus parnellii* および *Rousettus aegyptiacus* のゲノムから miEBLN-1 が挿入される以前のシンテニー領域が同定されたものの、miEBLN-1 近傍領域の全長に配列類似性を示す配列は得られなかった(図 5)。

よって次に、データベースにない *M. natalensis* の近縁種のゲノムにおける miEBLN-1 オーソログの探索を行った。*M. natalensis* の同属の近縁種である *M. fuliginosus* および *M. schreibersii* の各腎臓皮質に由来する YubFKT-1 細胞および SubK12-08 細胞よりゲノム DNA を抽出し、PCR およびその PCR 増幅産物のシーケンシングを行った。その結果、*M. fuliginosus*、*M. schreibersii* のゲノムより、miEBLN-1 およびその周辺領域に各々 98.3 %、99.5 % の塩基配列一致率を示す配列が同定された(図 5)。また、同定された *M. fuliginosus*、*M. schreibersii* の配列には、miEBLN-1 と同じ長さの ORF が存在し、その ORF の配列はそれぞれ miEBLN-1 と 99.3 %、99.9 % のアミノ酸配列一致率を示した(図 5、図 6)。これらのことから、両種は miEBLN-1 のオーソログを持つと考えられ、この三種の分岐した年代から、miEBLN-1 の内在化は少なくとも 12.3 Mya 以前に起こったものと推定された(図 7)。以下、*M. natalensis*、*M. fuliginosus* および *M. schreibersii* ゲノムに内在する miEBLN-1 オーソログを各々 minEBLN-1、mifEBLN-1 および misEBLN-1 とする。

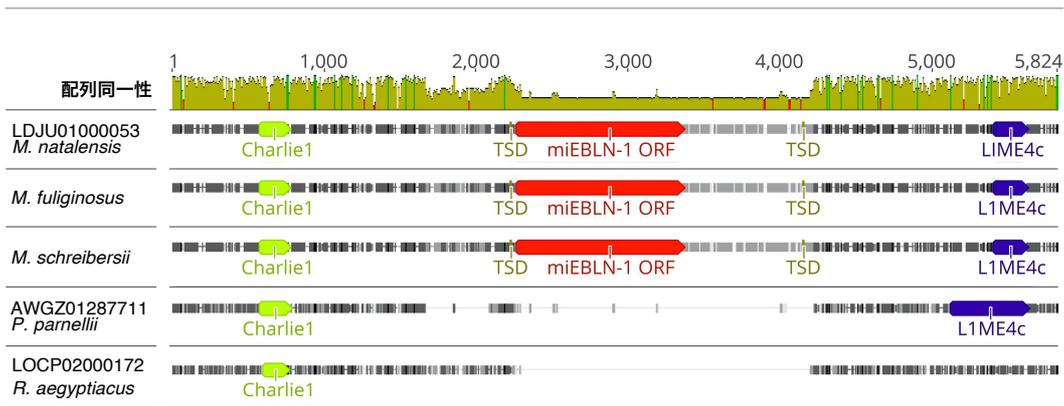


図5. miEBLN-1 シンテニー領域のゲノム配列比較

miEBLN-1 オーツログ領域と miEBLN-1-empty シンテニー領域のアラインメント。ゲノムDNA の由来生物種、およびNCBI に登録されているアクセッション番号を各配列の左側に記す。配列の黒色の濃淡が配列類似性を示し、灰色の線がギャップ領域を示している。miEBLN-1 のORFを赤色の矢印、Repeat Maskerにて同定された反復配列を各々の種類に伴った色の矢印、同定したTSD配列をオレンジの線で示している。

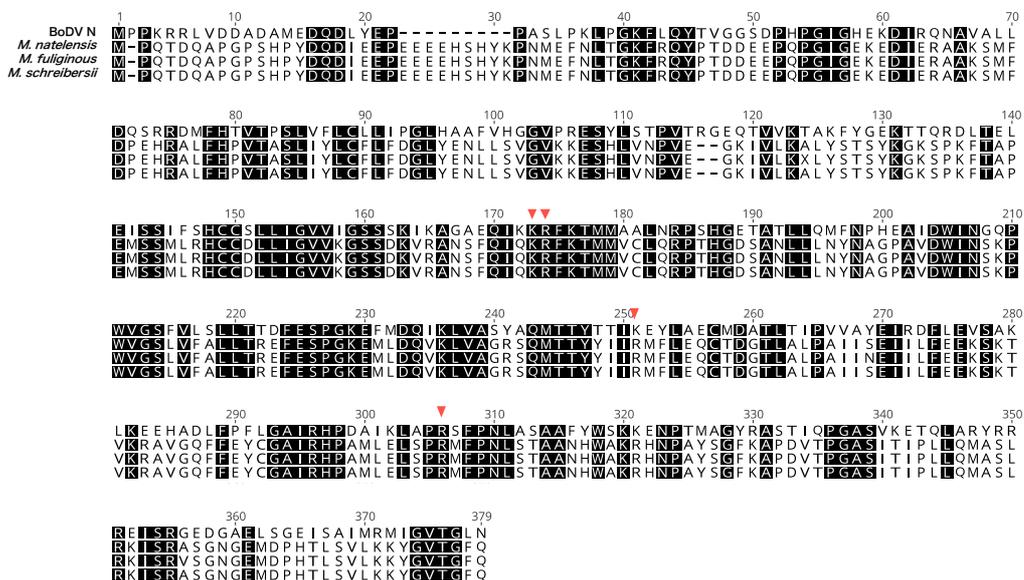


図6. BoDV-1 NとmiEBLN-1のマルチプルアラインメント

miEBLN-1, miEBLN-1, miEBLN-1のORFから予想されるアミノ酸配列と、BODV-1 Nタンパク質のアミノ酸配列を---によってアラインメントを行った。いずれの配列においても一致しているアミノ酸残基を黒で示す。BoDV-1 NのRNA結合残基を赤い矢印で示す。

次に、同定された miEBLN-1 オースログの配列を用いて miEBLN-1 の自然選択圧を推定した。一般に、宿主の生存に寄与する機能的なタンパク質をコードする遺伝子は、負の自然選択圧の下で進化する。その結果アミノ酸残基の変化を伴わない同義置換に比べてアミノ酸残基の変化を伴う非同義置換の割合 (d_N/d_S) が有意に低くなる³⁰。miEBLN-1 オースログの塩基配列および予測アミノ酸配列の比較に基づいて d_N/d_S 解析を行った結果、どの比較においても 1 を大きく下回る d_N/d_S が算出され、miEBLN-1 と Empty の比較においては統計的に有意であることが示された(表 1、表 2)。このことから、miEBLN-1 は負の自然選択圧のもと進化していることが明らかとなり、宿主コウモリに有益なタンパク質をコードしていることが示唆された。

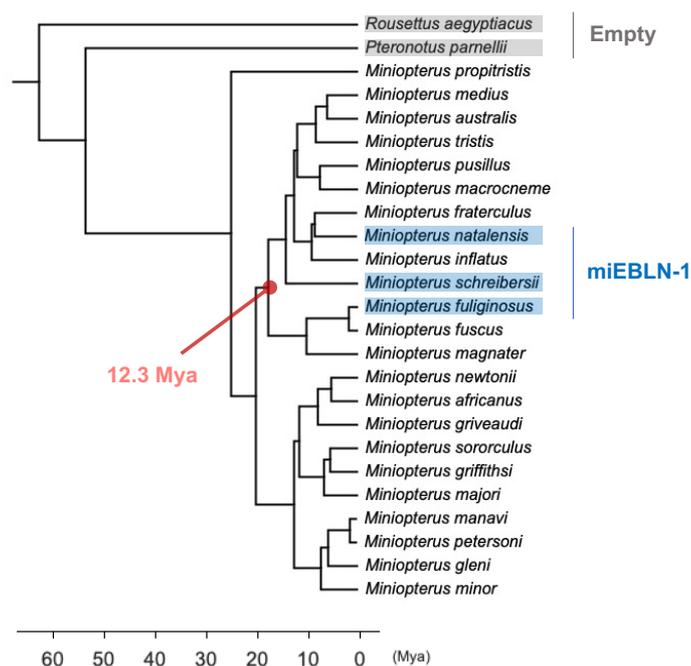


図7. 翼手目の系統樹とオースロジー解析による内在化年代の推定

miEBLN-1オースログ領域が同定された種 (miEBLN-1) を青色で、miEBLN-1-empty シンテニー領域が同定された種 (Empty) を灰色で示す。推測される分岐年代のスケールを翼手目の系統樹下に示す。Mya, million years ago

表1. miEBLN-1 オースログの比較に基づく d_N/d_S 解析による自然選択圧の検出
(mifEBLN-1 ORFの362塩基目に位置するSNPがCであると仮定)

比較	d_S	d_N	d_N/d_S	Fisher's p
minEBLN-1 v.s. mifEBLN-1	0.0173	0.0037	0.2117	0.0415
minEBLN-1 v.s. misEBLN-1	0.0029	0	0.001	0.2193
mifEBLN-1 v.s. misEBLN-1	0.0147	0.0036	0.2596	0.3189

表2. miEBLN-1 オースログの比較に基づく d_N/d_S 解析による自然選択圧の検出
(mifEBLN-1 ORFの362塩基目に位置するSNPがTであると仮定)

比較	d_S	d_N	d_N/d_S	Fisher's p
minEBLN-1 v.s. mifEBLN-1	0.0179	0.0024	0.1342	0.0175
minEBLN-1 v.s. misEBLN-1	0.0029	0	0.001	0.3189
mifEBLN-1 v.s. misEBLN-1	0.0147	0.0024	0.1625	0.0443

2-3. miEBLN-1 はユビナガコウモリ臓器においてタンパク質を発現する

前項にて、miEBLN-1 が機能的なタンパク質をコードしていることが示唆されたため、ユビナガコウモリ生体組織を用いて miEBLN-1 の発現様式を解析した。*M. fuliginosus* 雌成体の肝臓組織より RNA を抽出し、RT-PCR によって miEBLN-1 の転写産物の検出を試みた。その結果、予想される配列の PCR 産物が確認され、miEBLN-1 の転写が示された(図 8A)。この miEBLN-1 mRNA の構造を明らかにするため、*M. fuliginosus* 雌成体の肝臓組織 RNA を用いて RACE 解析を行った。その結果、miEBLN-1 ORF 全長を含み、4 つのエクソンからなる mRNA が同定された(図 8B)。また、転写開始点は miEBLN-1 より約 97 kb 上流であることが示唆された。この同定された mRNA 上には miEBLN-1 の ORF 以外に、100 アミノ酸残基以上をコードし得る ORF は存在しなかった。次に、各臓器における miEBLN-1 mRNA の発現量を比較するため、*M. fuliginosus* 雌成体の各臓器より RNA を抽出して定量 RT-PCR を行った。その結果、miEBLN-1 mRNA は様々な臓器で転写されていることが明らかとなった(図 8C)。

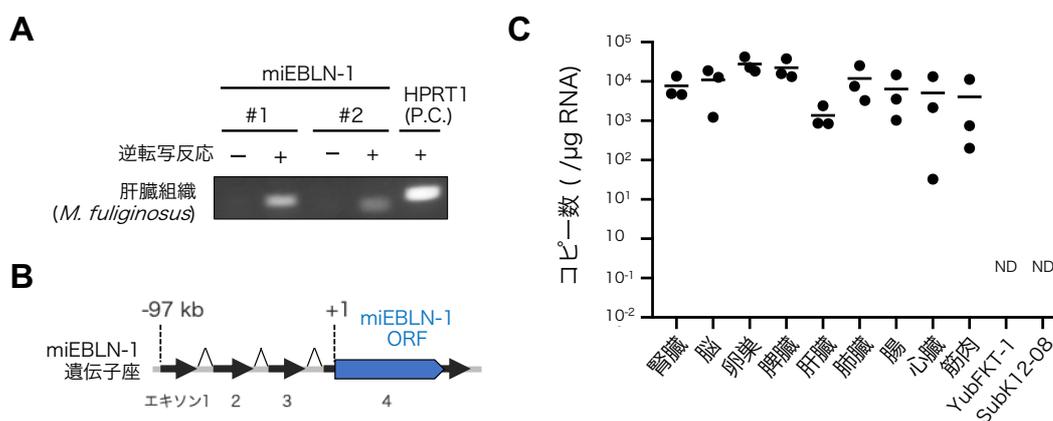


図8. miEBLN-1 mRNAの同定および構造解析

(A) RT-PCRによるmiEBLN-1 mRNAの検出。ポジティブコントロールとしてHPRT1を用いた。

(B) *M. fuliginosus*肝臓組織RNAを用いたRACE解析により同定したmRNAの構造。

(C) *M. fuliginosus*生体組織を用いた定量PCR。

よって、コウモリの各臓器内で発現する miEBLN-1p の検出を試みた。はじめに、精製組換え miEBLN-1p を免疫したウサギ全血から、抗原アフィニティークロマトグラフィーにより抗 miEBLN-1 抗体を精製した(図 9A)。この抗 miEBLN-1p 抗体を用いてウェスタンブロッティング (Western Blotting; WB) 解析を行い、各臓器内の miEBLN-1p の発現を評価した。その結果、腎臓、肝臓、脳および生殖組織など種々の臓器サンプルにおいて miEBLN-1p 予想分子量と同位置にシグナルが確認された (図 9B)。この結果から、コウモリの生体組織内における miEBLN-1p の発現が示唆された。

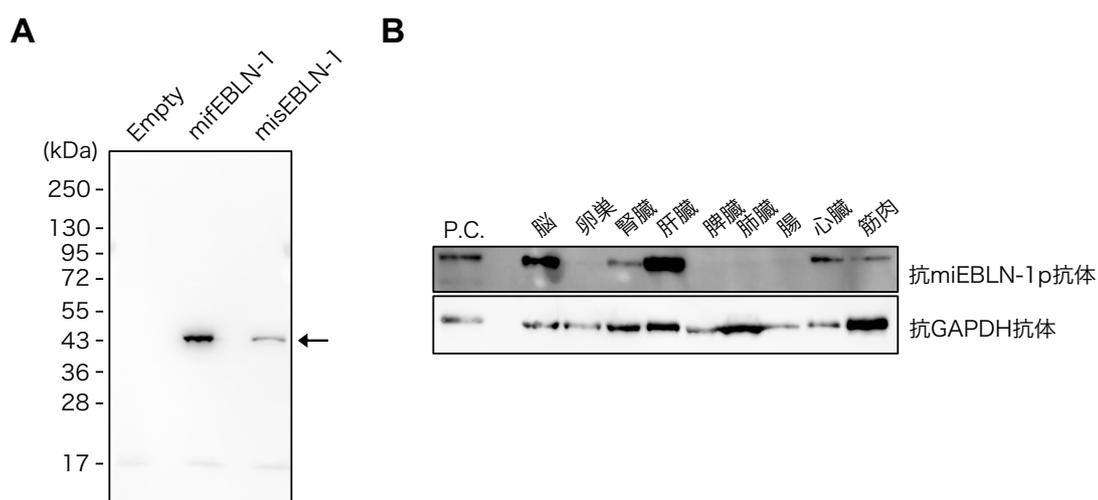


図9. コウモリ生体組織中で発現するmiEBLN-1pの検出

(A) 抗miEBLN-1p抗体の特異性の検証。miEBLN-1pに由来するシグナルを矢印で示す(約43kDa)。mifEBLN-1, misEBLN-1; pCAG-mifEBLN1, pCAG-misEBLN-1をトランスフェクションしたHEK293T細胞、Empty; pCAG-EmptyをトランスフェクションしたHEK293T細胞。
 (B) ウェスタンブロッティング解析による*M. fuliginosus*生体組織中のmiEBLN-1pの検出。P.C.; pCAG-mifEBLN1をトランスフェクションしたHEK293T細胞。

2-4. miEBLN-1p は BoDV-1 N に類似した RNA 結合様式を示す

Deep-pred を用いた解析により、miEBLN-1p は RNA 結合タンパク質であることが示唆されている(図 2 参照)。よって、miEBLN-1p の RNA 結合能および結合様式について解析を行った。Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) では、別々に精製したタンパク質と RNA を混合したのちに電気泳動に供し、RNA の移動度の変化からタンパク質との相互作用を評価する。精製した miEBLN-1p と *in vitro* transcription によって合成した DIG ラベル化 GAPDH mRNA を用いて EMSA を行った。その結果、miEBLN-1p とインキュベーションしたサンプルにて GAPDH mRNA の移動度の減少が確認され、miEBLN-1p が RNA 結合タンパク質であることが示唆された(図 10B)。miEBLN-1p は BoDV-1 N タンパク質の RNA 結合残基に対応する位置に正電荷残基を持つ(図 10A)。miEBLN-1p の RNA 結合におけるこの 4 つの正電荷残基の重要性を検証するため、これらを全てアラニンに置換した変異体 (以降、miEBLN-1p def とする) を作成し、EMSA によって野生型 miEBLN-1p (以降、miEBLN-1p WT とする) との比較を行った。その結果、miEBLN-1p WT とは対照的に、miEBLN-1p def とインキュベーションしたサンプルでは移動度の減少が観察されなかった(図 10B)。これらの結果より、miEBLN-1p は BoDV-1 N と同様に 4 つの正電荷残基に依存して RNA に結合することが示唆された。

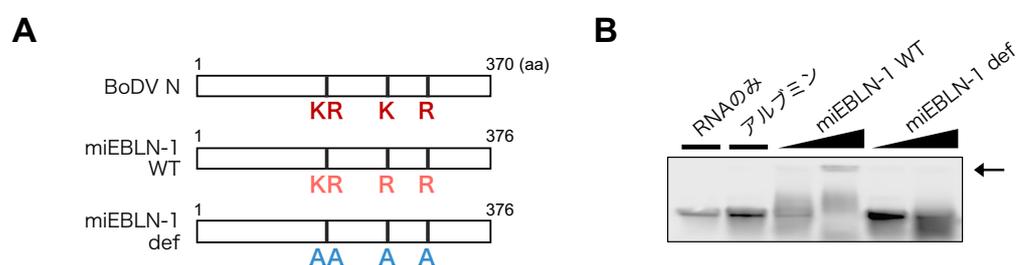


図10. EMSAによるmiEBLN-1pのRNA結合能の評価

(A) BoDV-1 NとmiEBLN-1の amino 酸配列の比較。miEBLN-1は、BoDV-1 NのRNA結合残基に相当する位置に4つの正電荷 amino 酸残基を持つ。

(B) EMSAによるmiEBLN-1p WTおよびmiEBLN-1p defのRNA結合能の評価。RNA-miEBLN-1p複合体に由来すると考えられるシグナルを矢印で示す。

細胞内においても miEBLN-1p が同じ様式で RNA に結合しているか確かめるため、ヒト OL 細胞に用いた RNA 免疫沈降を行った。具体的には、ヒト由来オリゴデンドロサイト (human oligodendrocyte; OL) に miEBLN-1p WT または miEBLN-1p def の発現を導入し、抗 miEBLN-1p 抗体を用いた免疫沈降によって得られた溶出画分から RNA を精製した。その RNA を用いて RT-PCR を行った結果、miEBLN-1p WT 導入細胞の溶出画分からのみ GAPDH mRNA が検出された(図 11)。このことから、細胞内においても同様に、miEBLN-1p が正電荷残基に依存して RNA に結合することが示唆された。

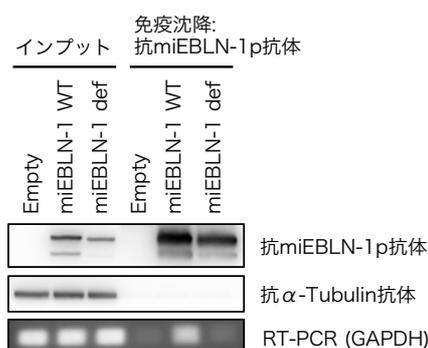


図11. RIPによるmiEBLN-1pのRNA結合能の評価

miEBLN-1p WTおよびmiEBLN-1p defをトランスフェクションしたヒトOL細胞を用いて免疫沈降を行い、溶出画分を用いてWBおよびRT-PCRを行った。

BoDV-1 N タンパク質は、主に N 末端および C 末端領域に集中するアミノ酸残基の相互作用によってホモテトラマーを形成すると考えられている^{28,31}。miEBLN-1p のオリゴマー形成能を実験的に確かめるため、SubK12-08 細胞に HA タグあるいは FLAG タグを付加した miEBLN-1p 発現プラスミドをトランスフェクションし、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降を行った。結果、溶出画分から FLAG タグ付加 miEBLN-1p が検出され、miEBLN-1 タンパク質がコウモリ細胞内においてホモオリゴマーを形成していることが示唆された(図 12A)。

次に、*in vitro* における miEBLN-1p のオリゴマー形成能を確かめた。グルタルアルデヒドはタンパク質架橋剤であり、タンパク質を非可逆的に架橋する^{28,32}。精製 miEBLN-1p をグルタルアルデヒド存在下で加熱し、SDS-PAGE にて分離した。結果、グルタルアルデヒド存在下でのみ miEBLN-1p モノマー (約 43 kDa) より高い分子量のシグナルが検出され、miEBLN-1p が *in vitro* においてもホモオリゴマーを形成していることが示唆された(図 12B)。

上記の一連の結果から、オリゴマー形成能や RNA 結合様式に関して、miEBLN-1p が BoDV-1 N タンパク質と近い性質を持つことが示唆された。

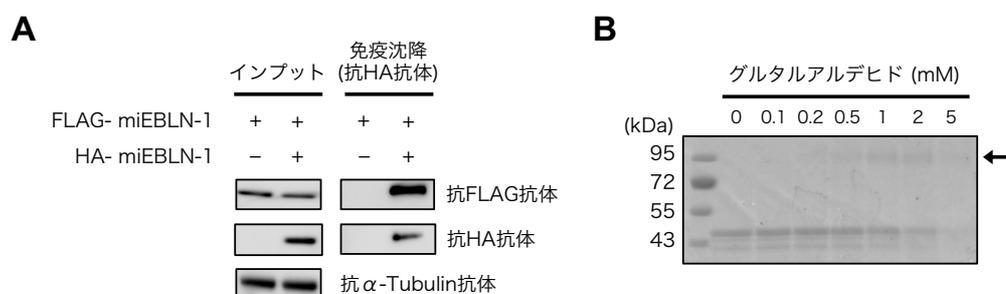


図12. miEBLN-1pの多量体化の評価

(A) Co-IPによるmiEBLN-1pのオリゴマー形成の評価。SubK12-08細胞にHAタグ付加miEBLN-1とFLAGタグ付加miEBLN-1をトランスフェクションし、co-IPによってHAタグ付加miEBLN-1p複合体を精製した。

(B) 化学架橋を施した精製miEBLN-1pのSDS-PAGE解析によるオリゴマー形成の評価。miEBLN-1pオリゴマー由来と考えられるシグナルを矢印で示す。miEBLN-1pモノマーは約43 kDaの分子量を示す。

2-5. miEBLN-1p は抗ウイルス作用を示さない

一部の EVE タンパク質は、遺伝的に近い配列を持つ外来性ウイルスの感染をドミナントネガティブ作用によって抑制する³³。miEBLN-1p がどのボルナウイルスに対して遺伝的に近縁であり、抗ウイルス作用を示しうるかを推測するため、miEBLN-1 を含むコウモリの EBLN とボルナウイルスの N 遺伝子のアミノ酸配列のアラインメントに基づいた分子系統樹を作成した。コウモリゲ

ノムに内在する EBLN のうち、250 アミノ酸残基以上のものを抽出し、外来性ボルナウイルス N 遺伝子と合わせて近隣接合法により分子系統樹を作成した (図 13)。その結果、外来性ボルナウイルスの N 遺伝子は属ごとに 3 つのクレードに分かれ、コウモリ EBLN がその 3 つのクレードに付随する形で分類された。miEBLN-1 はオルソボルナウイルス属と同じクレードに存在していることから、miEBLN-1 は現生のオルソボルナウイルス N 遺伝子に近いアミノ酸配列を持つことが示唆された(図 13)。

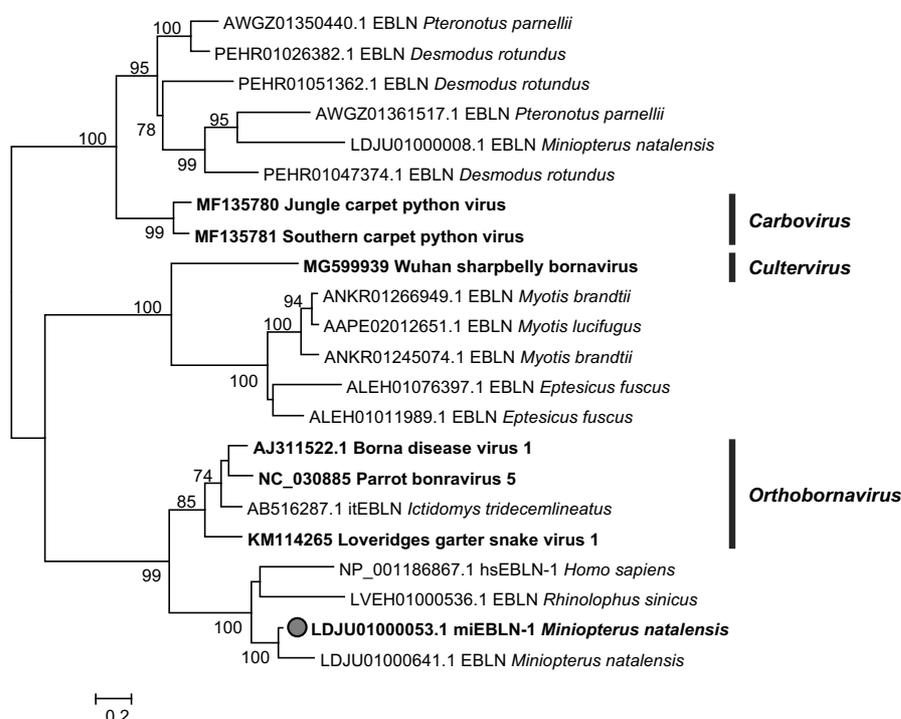


図13. ボルナウイルスNおよびEBLNのアミノ酸配列に基づく分子系統樹

miEBLN-1を赤色の円で、外来性ボルナウイルスNをボールドで示す。各外来性ボルナウイルスのウイルス属を系統樹右側に示す。分子系統樹の各ノードにノードの信頼性の指標であるブートストラップ値を示す。スケールバーはアミノ酸の座位あたりの置換数を示す。

図 13 にて、miEBLN-1 がオルソボルナウイルス N 遺伝子に近いアミノ酸配列を持つことが示唆されたため、オルソボルナウイルス属に属する BoDV-1 に対する miEBLN-1p の感染抑制作用を評価した。ボルナウイルスは、感染細胞の核内に Viral speckle of transcripts (vSPOT) と呼ばれる特徴的なドット様構造

を構築する³⁴。vSPOTは主にウイルスゲノムRNAとウイルスN、P、Lタンパク質によって構成され、ボルナウイルスの転写・複製の場として機能する³⁵⁻³⁷。ジュウサンセンジリスのゲノムに内在しているEBLN(itEBLN)は、感染細胞内においてvSPOTと共局在し、ウイルスタンパク質と競合することでBoDV-1の感染を阻害することが報告されている²⁵。miEBLN-1pのvSPOTへの局在を確かめるため、BoDV-1が持続感染したヒトOL細胞に各EBLNタンパク質の発現を導入し、間接蛍光免疫染色(Indirect immunofluorescence assay; IFA)によって細胞内局在を観察した。その結果、itEBLNタンパク質が細胞核内のvSPOTに共局在した一方で、miEBLN-1pは細胞質全体に分布しており、vSPOTに局在しなかった(図14A)。さらに、BoDV-1持続感染ヒトOL細胞より各EBLNタンパク質複合体を免疫沈降により精製し、複合体中のウイルスタンパク質をWB解析により検出した。結果、BoDV-1NやitEBLNとは対照的に、miEBLN-1pはBoDV-1Pタンパク質との相互作用を示さなかった(図14B)。これらの結果から、miEBLN-1pはBoDV-1タンパク質とは相互作用しないことが示唆された。

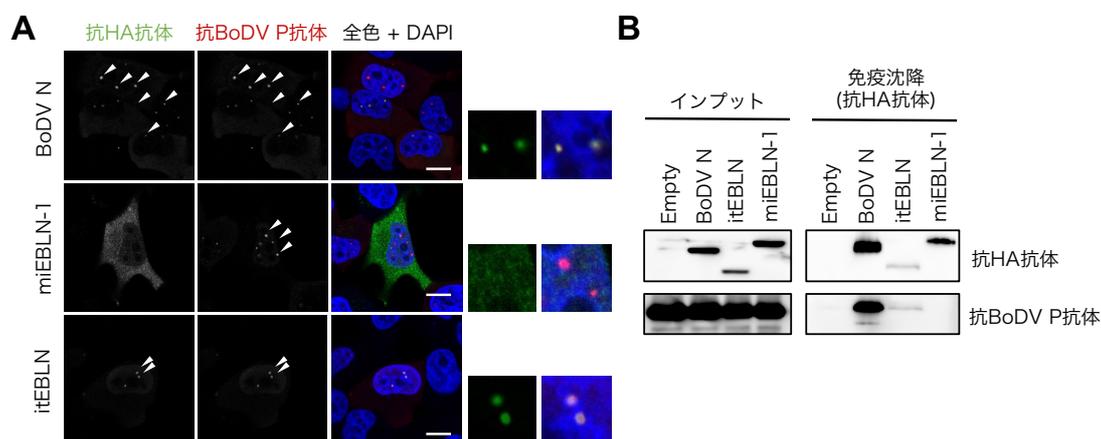


図14. miEBLN-1pとボルナウイルスタンパク質の相互作用の解析

(A) BoDV-1持続感染ヒトOL細胞内のBoDV-1 N、itEBLN、miEBLN-1タンパク質の局在。vSPOTを白矢印で示す。スケールバーは10 μ mを示す。

(B) 免疫沈降によるBoDV-1 Pタンパク質との相互作用の検出。BoDV-1持続感染ヒトOL細胞にHAタグ付与BoDV-1、itEBLN、miEBLN-1発現プラスミドをトランスフェクションし、HAの免疫沈降によって得た溶出画分内のBoDV-1 Pタンパク質をWBにより検出した。

次に、HEK293T 細胞を用いたミニレプリコンアッセイによって各 EBLN タンパク質の BoDV-1 ポリメラーゼ活性の阻害作用を評価した。その結果、itEBLN が BoDV-1 ポリメラーゼ活性を顕著に抑制したことは対照的に、miEBLN-1 は BoDV-1 ポリメラーゼの活性を阻害しなかった(図 15A)。これらのことから、miEBLN-1 タンパク質は外来性ボルナウイルスに対する感染抑制作用を有していないことが示唆された。

これまでの研究から、ボルナウイルスは宿主細胞に持続的に感染することが明らかとなっている¹¹。細胞を用いた実験系においても同様であり、ボルナウイルスの持続感染は顕著な細胞死を引き起こさず、分裂した娘細胞にも引き継がれる³⁴。BoDV-1 の持続感染に対する抑制作用を評価するため、レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼを発現する BoDV-1 (BoDV-1-fluc)^{38,39} に持続感染させた Vero 細胞を用いて解析を行った。BoDV-1-fluc 持続感染 Vero 細胞に itEBLN および miEBLN-1 のタンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に細胞中のルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、miEBLN-1 発現群ではルシフェラーゼ活性の低下は見られず、miEBLN-1p が BoDV-1 の持続感染を阻害しないことが示唆された(図 15B)。

次に、BoDV-1 の持続感染の成立過程に対する抑制作用を評価するため、miEBLN-1p を恒常発現する YubFKT-1 細胞を用いて感染実験を行った。レトロウイルスベクターによって YubFKT-1 細胞に miEBLN-1p の恒常発現を導入したのち、BoDV-1 を感染させ、1、4、7 日後に RNA を回収し定量 PCR によって BoDV-1 ゲノム RNA を定量した。その結果、いずれのタイムポイントにおいても有意な差は見られず、miEBLN-1p が BoDV-1 の持続感染の成立を抑制しないことが示唆された(図 15C)。

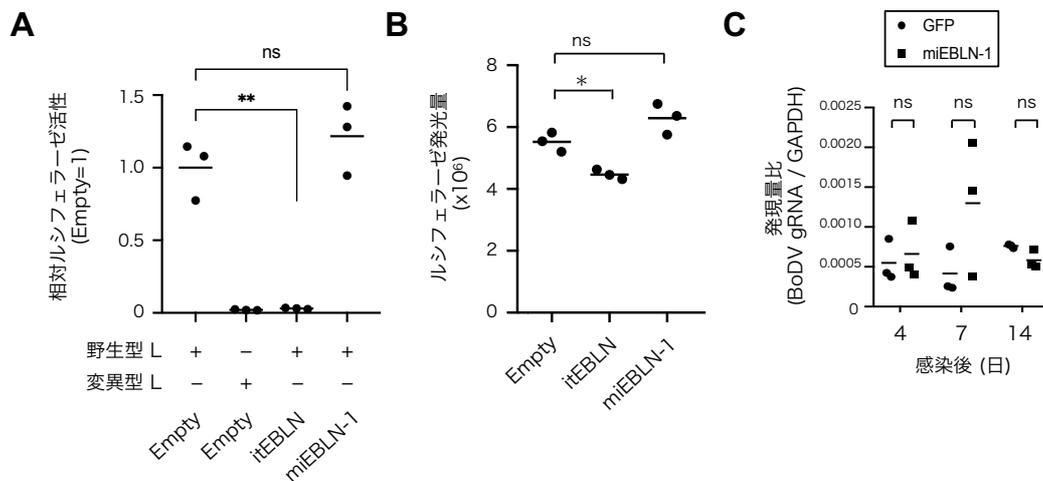


図15. miEBLN-1pによるBoDV-1感染抑制作用の評価

(A) ミニレプリコンアッセイによるBoDV-1ポリメラーゼ阻害作用の評価。ネガティブコントロールとしてポリメラーゼ活性を持たない変異型Lタンパク質を用いた。

(B) レポーターウイルスによるBoDV-1持続感染に対する抑制作用の評価。ホタルルシフェラーゼをレポーター遺伝子として発現するBoDV-1をVero細胞に持続感染させたのちに、各プラスミドを導入してルシフェラーゼ活性を測定した。

(C) miEBLN-1p恒常発現YubFKT-1細胞を用いたBoDV-1の感染動態に対する影響の評価。統計検定にはOne-way ANOVAおよびDunnett testを使用した。

これまでの結果から、miEBLN-1p はボルナウイルスの感染を抑制しないことが明らかとなった。しかし、miEBLN-1p が RNA 結合タンパク質であることから、ボルナウイルス以外の RNA ウイルスの感染に関与している可能性も考えられる。この点について検証するため、miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞に A 型インフルエンザウイルス (Influenza A virus; IAV) を感染させ、12、24、48 時間後のウイルス力価をプラークアッセイによって定量した。その結果、いずれのタイムポイントにおいても有意な差は見られず、miEBLN-1p がインフルエンザウイルスの感染を抑制しないことが明らかとなった(図 16)。

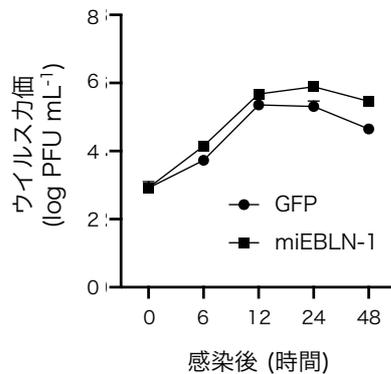


図16. miEBLN-1pによるIAV感染抑制作用の評価

miEBLN-1pまたはGFPを恒常発現するYubFKT-1細胞にIAVを感染させ、培養上清中のウイルスカ価をプラークアッセイで測定した。

2-6. miEBLN-1p は宿主の RNA 結合タンパク質と相互作用する

これまでの解析により、miEBLN-1 は抗ウイルス作用以外の機能を担っていることが示唆された。miEBLN-1p の機能に関する手掛かりを得るため、TAP 法 (Tandem Affinity Purification Assay) と質量分析により、miEBLN-1 と相互作用するタンパク質の同定を試みた。SubK12-08 細胞に HA および FLAG タグをタンデムに付与した miEBLN-1p の発現を導入し、二度の免疫沈降により miEBLN-1p 複合体を精製した。PAGE によって分離した後、銀染色より溶出画分に含まれるタンパク質を検出した。その結果、miEBLN-1p 発現導入群に特異的なバンドが複数確認された(図 17)。このゲルを複数領域に分けて切り出し、質量分析解析を行った結果、IGF2BP3、TROVE2、MOV10 など多くの宿主タンパク質が同定された(表 3)。興味深いことに、これらの同定された相互作用タンパク質の多くは RNA 結合タンパク質であり⁴⁰⁻⁴⁶、トランスポゾン的一种である LINE-1 の抑制因子として報告されている遺伝子が多く見られた(表 3)⁴⁷⁻⁵⁰。同様に、非膜オルガネラの一つであるストレス顆粒の構成因子として報告されている遺伝子も多く見られた(表 3)⁵¹⁻⁵⁶。

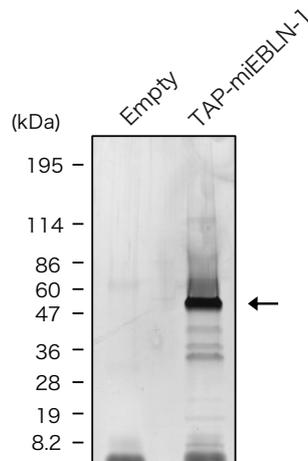


図17. TAP解析によるmiEBLN-1p複合体の精製

TAP (Tandem affinity purification) により精製したmiEBLN-1p複合体をSDS-PAGEに供し、銀染色によって検出した。miEBLN-1pに由来するシグナルを矢印で示す。

表3. 質量分析により同定された宿主タンパク質とそれらの性質に関する報告

遺伝子	スコア ^{a)}	ペプチド数	RNA結合能	LINE-1抑制	ストレス顆粒
IGF2BP3	717	16	[40]	[47-50]	[51]
PGAM5	531	15	-	-	-
TROVE2	504	14	[41]	[47-50]	-
MOV10	274	7	[42]	[47-50]	[52, 53]
PABPC1	241	5	[43]	[47-49]	[51, 54, 55]
PABPC4	205	4	[44]	[47-49]	[54]
ACTA1	193	4	-	-	-
IGFBP2	192	5	-	-	-
SNRPG	140	2	[45]	-	-
SNRPD3	124	4	[45]	-	-
PURA	118	3	[46]	[48-50]	[56]
SNRPN	112	3	[45]	-	-

^{a)} MASCOTにより算出したProtein Scoreを示す。

次に、質量分析解析により同定されたタンパク質と miEBLN-1 タンパク質の相互作用を検証するため免疫沈降を行った。SubK12-08 細胞より得られた cDNA を用いて、質量分析解析により同定された遺伝子を発現プラスミドにクローニングした。SubK12-08 細胞に FLAG タグを付加した miEBLN-1p および

Myc タグを付加した相互作用タンパク質の発現を導入し、抗 FLAG タグ抗体によって免疫沈降を行なった。その結果、溶出画分から MOV10、IGF2BP3 と予想される分子量サイズのシグナルが検出され、これらシグナルの強度は RNase A 処理によって顕著に減弱していた(図 18A)。さらに、miEBLN-1p WT と miEBLN-1p def を用いて宿主タンパク質との相互作用を比較したところ、miEBLN-1p def は MOV10 と相互作用しなかった(図 18B)。これらのことから、miEBLN-1p がこれらの宿主タンパク質と RNA を介して相互作用していることが示唆された。

MOV10 は抗ウイルス因子として知られるが、ボルナウイルスとの関連は未だに報告されていない。よって、免疫沈降により BoDV-1 N と MOV10 の相互作用を検証したところ、miEBLN-1p とは対照的に BoDV-1 N は MOV10 との相互作用を示さなかった(図 18C)。このことから、miEBLN-1 がその進化過程で MOV10 との相互作用を新たな機能として獲得したことが示唆された。

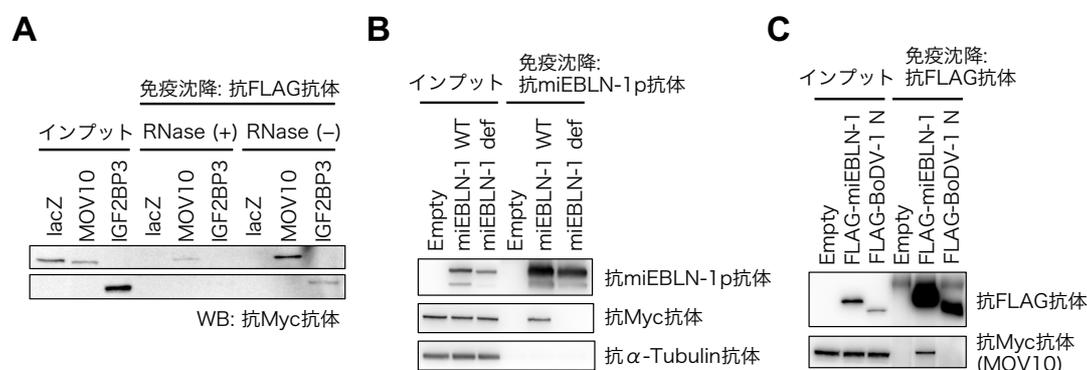


図18. miEBLN-1pと宿主タンパク質の相互作用の解析

(A) 免疫沈降による相互作用の検証。SubK12-08細胞にFLAGタグ付加miEBLN-1pおよびMycタグ付与宿主タンパク質をトランスフェクションした。

(B) 免疫沈降による相互作用のRNA結合残基依存性の検証。ヒトOL細胞にmiEBLN-1p WTおよびdefとMycタグ付与MOV10をトランスフェクションした。

(C) 免疫沈降によるBoDV-1 NとMOV10の相互作用の検証。SubK12-08細胞にFLAGタグ付与miEBLN-1pおよびBoDV-1 NとMycタグ付与MOV10をトランスフェクションした。

2-7. miEBLN-1p はストレス顆粒に局在する

ストレス顆粒は、RNA-タンパク質複合体に富む非膜オルガネラであり、主に RNA 結合タンパク質の凝集に伴う可逆的な液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation; LLPS) によって構築される⁵⁷。ストレス顆粒は、ウイルス感染・熱ショック・高浸透圧などの環境ストレスに細胞が曝露した際に一時的に細胞質に構築され、これらのストレスに対する耐性に関与していると考えられている⁵⁷。MOV10 や IGF2BP3 など、miEBLN-1p の相互作用タンパク質の多くは、ストレス顆粒の構成因子として報告されていた(表 3 参照)。このことから、miEBLN-1p もまたストレス顆粒に局在することが示唆された。この点について検証するため、miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞に様々なストレス処理を施し、IFA によって miEBLN-1p の細胞内局在の変化を観察した。その結果、NaCl 含有培地による高浸透圧ストレス処理を施した際に、miEBLN-1p が細胞質内の顆粒様構造に局在することが明らかとなった(図 19A)。また、この顆粒様構造はストレス顆粒のマーカータンパク質として一般的に用いられる G3BP1 と共局在していた⁵⁸。この結果について確証を得るため、miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞を用いて免疫沈降を行い、内在の MOV10 および G3BP1 との相互作用を検証した。その結果、高浸透圧ストレス処理の有無に関わらず miEBLN-1p と MOV10、G3BP1 との相互作用が確認された(図 19B)。ストレス顆粒は動的な構造体であり、環境ストレスの有無に応じて速やかに構築と消失を繰り返すことが知られている⁵⁷。よって、miEBLN-1p の高浸透圧ストレスに伴う細胞内動態を検証するため、高浸透圧ストレス処理後に通常の培地に戻して 30 分のリカバリーを置いた後に細胞を固定し IFA を行った。その結果、miEBLN-1p は細胞質全体に分布しており、その細胞内局在の変化がストレスに応答した可逆的なものであることが明らかとなった(図 19C)。これらの結果から、miEBLN-1p がストレス顆粒の構成因子の一つであることが示唆された。

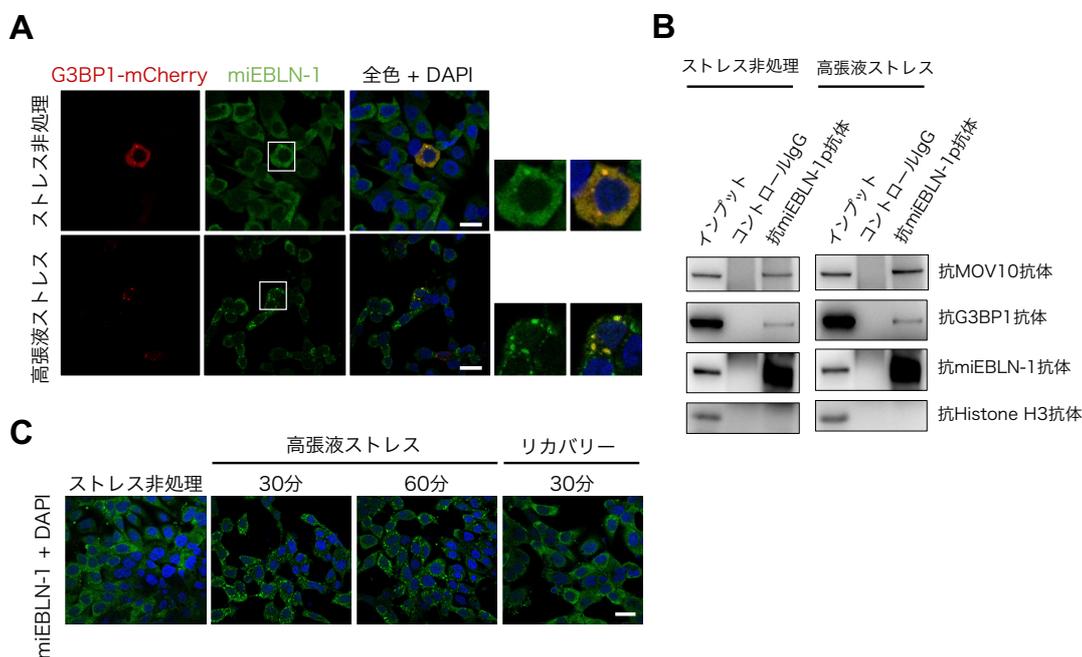


図19. miEBLN-1pのストレス顆粒への局在の評価

(A) 高張液ストレス条件下におけるmiEBLN-1pとストレス顆粒の共局在。YubFKT-1細胞をNaCl (0.2 M) 含有培地で1時間インキュベーションし、直後に細胞を固定しIFAに用いた。スケールバーは20 μm を示す。

(B) miEBLN-1pの免疫沈降によるG3BP1、MOV10との相互作用の検出。YubFKT-1細胞をNaCl (0.2 M) 含有培地で1時間インキュベーションし、直後に細胞を回収し免疫沈降を行った。ネガティブコントロールとしてウサギ由来コントロールIgGを用いた。

(C) 高張液ストレス条件下におけるmiEBLN-1pの細胞内動態。YubFKT-1細胞をNaCl (0.2 M) 含有培地で1時間、その後に通常の培地で30分インキュベーションした。各タイムポイントで細胞を固定し、IFAに用いた。スケールバーは50 μm を示す。

2-8. miEBLN-1p は RNA 結合能依存的に LINE-1 RNP と相互作用する

LINE-1 は、哺乳類のゲノムに内在するレトロトランスポゾンの一つである⁵⁹。LINE-1 は RNA 結合タンパク質である ORF1 と逆転写酵素である ORF2 をコードするポリシストロニックな mRNA として転写され、細胞質内において LINE-1 mRNA-ORF1-ORF2 という RNA-タンパク質複合体 (LINE-1 RNP) として存在する^{48,60}。この LINE-1 RNP が細胞核内に輸送され、逆転写を受けた LINE-

1 mRNA がゲノム DNA に新たに挿入されることでコピー数を増やしていく。以前の研究によって、この LINE-1 RNP がストレス顆粒と共局在しうることが報告されている^{61,62}。さらに、MOV10をはじめとして、質量分析によって同定した miEBLN-1p の相互作用タンパク質の多くが LINE-1 の転移抑制因子として報告されていた(表 3 参照)。よって、miEBLN-1p が LINE-1 RNP と相互作用することで転移を抑制する可能性について検証を行った。

まず初めに、miEBLN-1p と LINE-1 RNP の相互作用について解析を行なった。具体的には、ヒト OL 細胞に miEBLN-1p および Myc タグ付与 ORF1 タンパク質の発現を導入し、IFA および免疫沈降を行った。プラスミドを用いた過剰発現系において、ORF1 タンパク質は細胞質に顆粒状の構造体 (ORF1-foci) を構築する⁶²。IFA の結果、miEBLN-1p WT がこの ORF1-foci に局在する一方で、miEBLN-1p def は ORF1-foci への局在を示さなかった(図 20A)。さらに、免疫沈降においても miEBLN-1p WT のみが ORF1 タンパク質との相互作用を示した(図 20B)。これらの結果から、miEBLN-1p が自らの RNA 結合能に依存する形で LINE-1 RNP と相互作用することが示唆された。

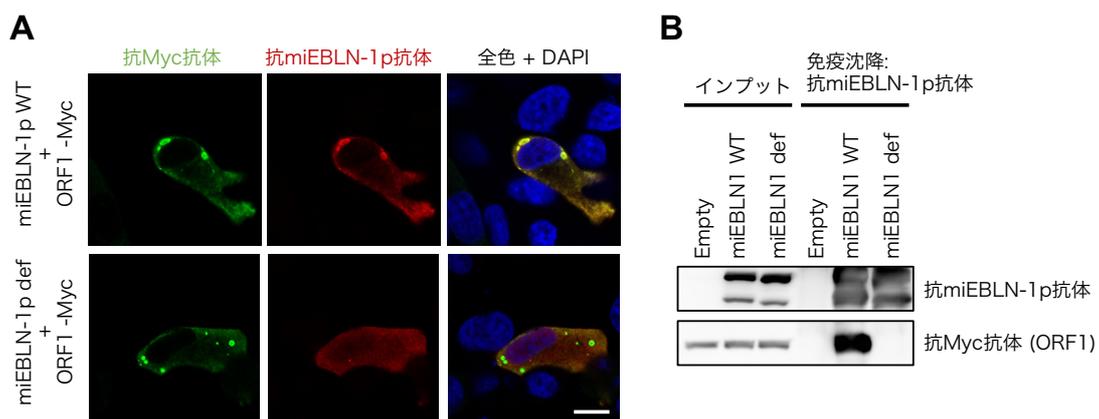


図20. miEBLN-1pとLINE-1 ORF1タンパク質の相互作用

(A) miEBLN-1pとORF1タンパク質の細胞内局在。ヒトOL細胞にmiEBLN-1pおよびMycタグ付与ORF1の発現を導入し、IFAを行った。スケールバーは10 μm を示す。

(B) miEBLN-1pの免疫沈降によるORF1タンパク質との相互作用の検出。ヒトOL細胞にmiEBLN-1pおよびMycタグ付与ORF1の発現を導入し、免疫沈降を行った。

よって、miEBLN-1p の LINE-1 転移に対する抑制作用を評価するため、HEK293T 細胞を用いて LINE-1 retrotransposition assay を行なった^{63,64}。LINE-1 レポータープラスミドには、ヒト LINE-1 全長に加えて、その下流に EGFP ORF および CMV 由来プロモーターがアンチセンス方向に挿入されている⁶⁴。EGFP ORF はイントロンにより分断されているため、プラスミドから転写した mRNA がスプライシングを受けたのち、LINE-1 の機構によってゲノム DNA に挿入された場合においてのみ EGFP を発現する。この LINE-1 レポータープラスミドを、miEBLN-1p 発現プラスミドと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、14 日後における GFP 陽性細胞率を測定した。その結果、BoDV-1 N タンパク質発現導入群がコントロール群と同程度の GFP 陽性細胞率を示したことは対照的に、miEBLN-1p 発現導入群は顕著に低い GFP 陽性細胞率を示した(図 21A)。このことから、miEBLN-1p が LINE-1 の転移を抑制することが示唆された。

さらに、同様の LINE-1 レポーターアッセイによって miEBLN-1p WT および miEBLN-1p def の LINE-1 転移抑制作用を比較した。その結果、miEBLN-1p def は miEBLN-1p WT と遜色ない LINE-1 転移抑制作用を示した(図 21B)。このことから、miEBLN-1p が RNA 結合残基以外に LINE-1 抑制の責任領域を有していることが示唆された。

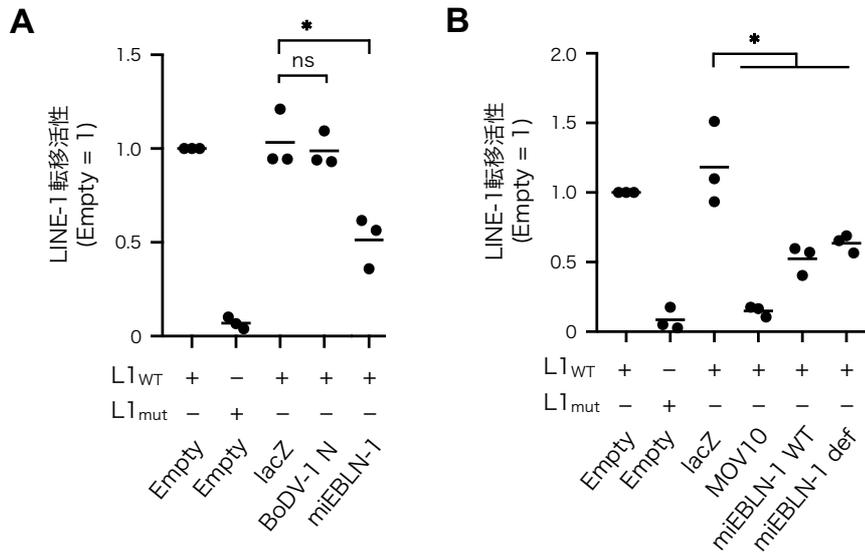


図21. LINE-1レポーターアッセイによるLINE-1転移抑制作用の評価

HEK293T細胞にLINE-1レポータープラスミドおよび各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、14日後に測定したGFP細胞陽性率をLINE-1転移活性とした。統計検定にはOne-way ANOVAおよびDunnett testを使用した。

2-9. miEBLN-1p は IDR 依存的に LINE-1 RNP と相互作用する

天然変性領域 (Intrinsically disordered region; IDR) とは、様々な生化学的な要因からタイトな三次元構造を持たないタンパク質領域の総称である⁶⁵。IDR は細胞内において柔軟な直鎖ペプチドとして存在し、非特異的かつ動的なタンパク質間相互作用のハブとなることで LLPS を促すと考えられている⁶⁵。これらのことから、miEBLN-1p による LINE-1 転移抑制に miEBLN-1p 自身の IDR が関係している可能性を検証した。

まず初めに、miEBLN-1 のアミノ酸配列を予測によって IDR の同定を試みた。foldindex はタンパク質のアミノ酸配列から三次元構造の堅牢性を計算するアルゴリズムであり、IDR の予測ツールとして一般的に用いられる⁶⁶。miEBLN-1 および BoDV-1 N タンパク質のアミノ酸配列を foldindex による予測に供した。その結果、BoDV-1 N タンパク質が全長にわたってタイトな三次元

構造を持つと予測された一方で、miEBLN-1p の N 末端領域 (1-75 aa) は非常にルーズな三次元構造を持ち、細胞内において IDR として存在していることが予測された(図 22A)。

LINE-1 RNP との相互作用における miEBLN-1p の N 末端領域の重要性を検証するために、アラニン置換変異体解析を行った。具体的には、IDR と予測された 19 から 68 番目のアミノ酸残基をカバーするように、7 アミノ酸残基ずつアラニン置換を施した(図 22B)。以降、これらの変異体を miEBLN-1p AS1-7 とする。これらのアラニン置換変異体および ORF1 タンパク質の発現をヒト OL 細胞に導入し、ORF1 との相互作用を検証した。その結果、AS4-7 は IFA において ORF1-foci との共局在を示さず、免疫沈降において ORF1 との相互作用を示さなかった(図 22C, D)。これらのことから、miEBLN-1p の N 末端領域が LINE-1 RNP との相互作用において重要であることが示唆された。

これまでの結果から、miEBLN-1p は自身の RNA 結合残基および IDR に依存して LINE-1 RNP に相互作用していることが示唆された。miEBLN-1p の LINE-1 転位抑制作用におけるこれらの領域の重要性を検証するため、IDR と予測された N 末端領域 1-68 アミノ酸残基の欠失変異体 (miEBLN-1p Δ -WT) およびそれに加えて RNA 結合残基をアラニンに置換した変異体 (miEBLN-1p Δ -def) を作成した。これらの変異体を用いて LINE-1 レポーターアッセイを行った結果、miEBLN-1p Δ -WT、miEBLN-1p Δ -def どちらも miEBLN-1p WT と遜色ない LINE-1 転移抑制作用を示したことから、IDR は LINE-1 転移抑制には寄与していないことが示唆された(図 23)。

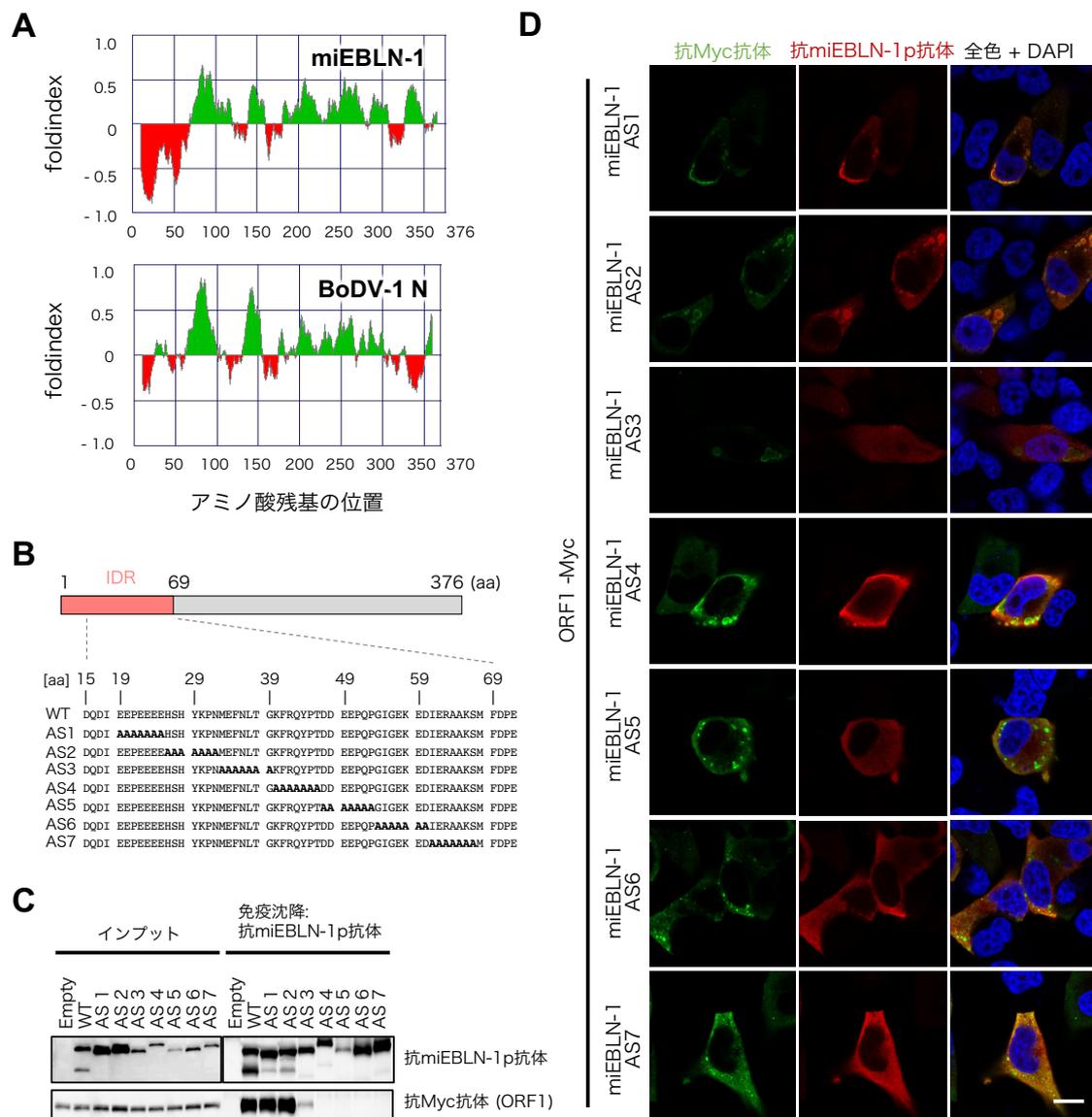


図22. miEBLN-1p N末端領域のORF1タンパク質との相互作用における重要性

(A) foldindexによる三次元構造の堅牢性の予測。y軸はfoldindexによる予測値であり、x軸は各タンパク質のアミノ酸残基の位置を示す。

(B) アラニン置換変異体miEBLN-1pの作成。19-67aaに渡って、7アミノ酸残基ごとにアラニン置換変異を施した変異体を作成し、それぞれAS1-7とした。

(C) AS変異体とORF1タンパク質の相互作用の検出。ヒトOL細胞にmiEBLN-1p WT、ASおよびMycタグ付与ORF1タンパク質の発現を導入し、miEBLN-1pの免疫沈降を行った。

(D) AS変異体とORF1タンパク質の細胞内局在。ヒトOL細胞にmiEBLN-1pおよびMycタグ付与ORF1の発現を導入し、IFAを行った。スケールバーは10 μ mを示す。

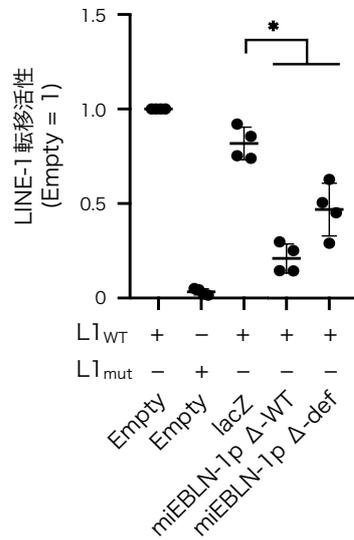


図23. LINE-1レポーターアッセイによるLINE-1転移抑制作用の評価

HEK293T細胞にLINE-1レポータープラスミドおよび各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、14日後に測定したGFP細胞陽性率をLINE-1転移活性とした。統計検定にはOne-way ANOVAおよびDunnet testを使用した。

第三章

考察

3-1. miEBLN-1p の生化学的な性状

BoDV-1 N タンパク質は、ホモオリゴマーを形成する^{28,31}。BoDV-1 N タンパク質 – RNA 複合体の構造解析は未だなされていないものの、BoDV-1 N モノマーの X 線結晶構造解析に基づく表面電荷の計算から、BoDV-1 N テトラホモオリゴマー表面に豊富に分布する正電荷残基と RNA が相互作用することで RNA に結合すると考えられている³¹。今回行った免疫沈降解析及び精製タンパク質を用いた解析の結果、miEBLN-1p モノマー同士の相互作用が明らかとなり、miEBLN-1p がホモオリゴマーを形成していることが示唆された。miEBLN-1 は BoDV-1 N のアミノ酸配列モチーフをほとんど保持していないが(図 3)、このアミノ酸配列モチーフはボルナウイルス科全体で見ればほとんど保存されていない²³。その上、BoDV-1 N タンパク質のオリゴメライゼーションは広範な領域に分布するアミノ酸残基の相互作用によって生じると考えられているため³¹、miEBLN-1 タンパク質が BoDV-1 N タンパク質と同様の様式でオリゴマーを形成し RNA に結合している可能性は大いに考えられる。

今回の解析で、miEBLN-1p の RNA 結合能が 4 つの正電荷アミノ酸残基に依存していることが明らかとなった。これら正電荷アミノ酸残基はアラインメントにおいて BoDV-1 N タンパク質の RNA 結合残基と一致するため、両者が類似した分子機構によって RNA に結合していることが示唆される。しかし一方で、miEBLN-1p が vSPOT へ局在しないことや、BoDV-1 N タンパク質が LINE-1 転移抑制能を示さないことなどを鑑みると、両者が異なる RNA 結合選択性を持つ可能性も考えられる。これまで行われた BoDV-1 N タンパク質の RNA 結合選択性に関する解析は、古典的なゲルシフトアッセイのみであり、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析は行われていない²⁸。CLIP-seq (Cross-Linking Immunoprecipitation - seq)^{67,68} などによって両者の RNA 結合選択性を比較し、miEBLN-1p の生化学的性質の変遷をより詳細に解析することが今後の課題の一つである。

3-2. miEBLN-1p の抗ウイルス機能について

一部の EVE タンパク質は、ウイルスタンパク質のドミナントネガティブ変異体として働き、その感染を阻害することが報告されている^{5,6,69,70}。実際、我々のグループは以前、リスのゲノムから同定した itEBLN が BoDV-1 の感染を抑制することを報告している。しかしながら、今回の解析では、miEBLN-1p は BoDV-1 の感染を抑制しなかった。このことに対する説明として、BoDV-1 N タンパク質と配列相同性の差がある。itEBLN タンパク質と BoDV-1 N タンパク質のアミノ酸配列一致率が 77 %²⁵ であるのに対し、miEBLN-1 タンパク質と BoDV-1 N タンパク質のアミノ酸配列一致率は 45 % である。さらに、itEBLN タンパク質は BoDV-1 N タンパク質の BoDV-1 P タンパク質結合サイト (P-binding site、N 末端から順に PBS-1、PBS-2) を保持している一方で、miEBLN-1p のアミノ酸配列中に PBS-1、2 に類似する領域は見られない。このために miEBLN-1p は BoDV-1 タンパク質と相互作用せず、感染を阻害しなかったと考えられる。

本研究ではさらに、他の RNA ウイルスに対する感染抑制作用を評価するため、miEBLN-1p を恒常発現するコウモリ細胞を用いて IAV の感染実験を行った。その結果、miEBLN-1p が IAV の感染を抑制しないことを明らかとした(図 16)。このことから、miEBLN-1 がボルナウイルスに限らず他のウイルスに対しても感染抑制作用を示さないことが示唆される。しかしながらその一方で、miEBLN-1p の相互作用タンパク質である MOV10 が抗ウイルス因子として報告されていること⁷¹に加え、ストレス顆粒はウイルス感染下において抗ウイルス因子をリクルートすることで細胞内免疫を制御することが報告されている⁷²⁻⁷⁴。よって、miEBLN-1p が MOV10 やストレス顆粒を介して BoDV-1 や IAV 以外のウイルスの感染を抑制する可能性は否定できないため、以降解析を行う必要があると考えられる。

3-3. miEBLN-1p とストレス顆粒との関連

細胞内外の浸透圧差は、細胞質内の水分量やイオン強度を左右するため、細胞の生存において非常に重要なファクターである⁷⁵。そのため、細胞は様々な機構によって外部浸透圧の変動に対応することが知られている^{75,76}。例えば、哺乳類の腎髄質細胞は尿濃縮の過程で高浸透圧ストレスに頻繁に暴露する⁷⁷。その際、転写因子である TonEBP によって浸透圧調節物質 (オスモライト) の産生とトランスポータータンパク質の翻訳を促進し、細胞死を未然に防ぐことが知られている⁷⁷⁻⁷⁹。高浸透圧下におけるストレス顆粒の明確な役割は明らかとなっていない。しかしながら、高浸透圧ストレス下におけるストレス顆粒の形成とオスモライトの細胞内濃度が互いに制御していることから、ストレス顆粒もまたオスモライトと同様に高浸透圧への適応機構の一つであると考えられている⁸⁰。本研究において、miEBLN-1p は高浸透圧ストレスに応じてストレス顆粒へと局在していた(図 19)。さらに、コウモリ臓器を用いた解析では miEBLN-1p が腎臓で発現していることが確認されている(図 9)。これらのことから、miEBLN-1 がストレス顆粒を介した高浸透圧ストレスへの適応に寄与している可能性が示唆される。

ストレス顆粒は、前述したような環境ストレスへの応答のみならず、細胞内免疫など様々な生理学的機能に関与することが明らかとなっている^{57,81,82}。本研究では、コウモリ生体内の様々な臓器において miEBLN-1 のタンパク質発現が確認された。このことから、miEBLN-1p がストレス顆粒を介して各臓器で様々な機能に寄与している可能性も考えられる。その一例として、ニューロン恒常性への寄与が挙げられる。ストレス顆粒の構築やクリアランスに影響を及ぼす変異が、ALS などの神経疾患と関連しているという報告が近年なされている^{83,84}。また、ニューロン細胞内に観察される特徴的な RNP 構造体 (Neuronal RNP granules; ニューロン性 RNP 顆粒) は構成因子の多くをストレス顆粒と共有しており、ストレス顆粒と相同な構造体であると考えられている^{85,86}。本研究

においても miEBLN-1p が脳組織で発現していることが明らかとなっているため、ニューロンにおける発現様式の解明も今後の課題の一つである。

3-4. miEBLN-1p による LINE-1 抑制機構

LINE-1 は、レトロトランスポゾン的一种であり、哺乳類のゲノムに広汎に存在する⁸⁷。LINE-1 の転移はゲノムの損傷につながる有害な現象であるため、宿主は様々な抑制因子によってその転移を制御している^{50,61,88}。一般に、体細胞ゲノム中の LINE-1 はエピジェネティックに制御されているため、LINE-1 は胚や脳、生殖組織などにおいてのみ高い転写活性および転移活性を示す^{47,89}。今回の研究において miEBLN-1 は脳や生殖器官において高いタンパク質発現量を示し、LINE-1 レポーターアッセイにおいて顕著な LINE-1 転移活性抑制作用を示した。これらのことから、miEBLN-1 が LINE-1 の転移活性を抑制することによって、宿主であるユビナガコウモリの生存に寄与していると考えられる。

LINE-1 の転移は、LINE-1 RNP が細胞核内へと移動した後、逆転写を受けて宿主ゲノム DNA に挿入されることによって行われる。本研究では、miEBLN-1p def および AS 変異体を用いた解析の結果、miEBLN-1p が自らの RNA 結合残基と IDR に依存して LINE-1 ORF1 タンパク質と相互作用していることも明らかとなった。miEBLN-1p と BoDV-1 N タンパク質とのペアワイズアラインメントにおいて、N 末端領域のアミノ酸配列一致率は低い(図 3、図 6)。さらに、foldindex を用いた IDR 予測の結果、BoDV-1 N の N 末端領域には miEBLN-1p のような IDR が見られていなかった(図 22)。これらのことから、miEBLN-1 は BoDV-1 N に由来する RNA 結合残基を維持しつつ、他の領域に変異を蓄積することで新たなタンパク質間相互作用と機能を獲得したと示唆される。

本研究において、miEBLN-1p が自らの RNA 結合能と IDR に依存して ORF1 タンパク質と相互作用していることが明らかとなった。しかしその一方で、LINE-1 レポーターアッセイではこれらの領域を欠く miEBLN-1p 変異体で

あっても顕著な LINE-1 転移抑制作用を示していた。このことから、miEBLN-1p による LINE-1 転移抑制機構は LINE-1 RNP との直接的な相互作用に依存しないものであることが示唆された。SAMHD1 タンパク質は細胞核内に局在するため LINE-1 RNP との相互作用は示さないが、LINE-1 RNP とストレス顆粒の共局在を促進することで LINE-1 転移を抑制することが報告されている⁶¹。miEBLN-1p もまたストレス顆粒の構成因子であることから、miEBLN-1p による LINE-1 転移抑制の分子機構にストレス顆粒が介在している可能性も考えられる。

トランスポゾンには、絶えず宿主ゲノムの中で宿主と共進化しているため、たとえ同種のトランスポゾンであってもその配列や性状は宿主によって異なる^{87,90,91}。LINE-1 に関しても例外ではなく、ヒトゲノム内においては高い転移活性をもつ LINE-1 のコピーが多く同定されている一方で、いくつかの種のゲノム内においては全ての LINE-1 のコピーが転移活性を失った「絶滅」状態にあると考えられている^{87,90-92}。興味深いことに、先行研究では、*M. natalensis* ゲノム内の全ての LINE-1 ORF1 には Premature stop codon が生じており、これによって LINE-1 の転移活性は既に失われていると推測されている⁹³。さらに、miEBLN-1 近傍配列に LINE-1 による挿入の痕跡配列が見られることから、miEBLN-1 の発生時点では LINE-1 はまだ転移活性を有していたことが示唆されていた(図 4)。これらのことを加味すると、ユビナガコウモリ属 LINE-1 の絶滅に miEBLN-1 が寄与している可能性も考えられる。この点について検証を行うためにも、ユビナガコウモリ属 LINE-1 の配列を用いて miEBLN-1p の LINE-1 転移抑制作用をより詳細に解析することは今後の重要な課題の一つと考えられる。

3-5. miEBLN-1 および EBLN が宿主進化に及ぼした可能性

進化学の分野において、ある形質が本来持つ機能や性質とは異なる方面に転用されることを外適応という。生物はその進化の過程において、トランスポゾンやウイルスなどの非自己遺伝エレメントを積極的に外適応により取り

込み、新たな機能性を獲得してきた⁹⁴⁻⁹⁶。特に ERV は胎盤形成や免疫など、重要な生命現象に寄与することで宿主進化に大きな影響を及ぼしてきたことが知られている⁵⁻⁸。一方で、非レトロウイルスに由来する EVE が宿主進化にどのような影響を及ぼすのかは明らかではなかった。本研究では、EBL の宿主進化に及ぼす影響を明らかにするため、RNA 結合タンパク質として外適応している EBLN の探索を試みた。その結果同定された miEBLN-1 は、少なくとも 12 Mya 以前に遡る内在化以降、負の自然選択圧の下で進化していることが明らかとなった。さらに、miEBLN-1p は BoDV-1 N タンパク質と似た様式で RNA に結合するタンパク質であり、レポーターアッセイにおいては LINE-1 転移抑制作用を示した。よって、ユビナガコウモリが内在化を介してボルナウイルス N 遺伝子の RNA 結合能を獲得し、トランスポゾン制御に転用したことが強く示唆された。本研究によって得た知見により、外適応によるウイルス由来遺伝子の性質の獲得が ERV に限定されない一般的な現象である可能性が示された。

本研究では EBLN に対象を絞って機能性 EBL を探索したが、脊椎動物ゲノム中には N 遺伝子に由来する EBLN に限らず、M、G、L 遺伝子に由来する EBL が膨大に存在している¹⁶。また、機能性 ERV が *env* や *gag* 遺伝子など様々な遺伝子に由来している⁹⁵。このことから、宿主による EBL を介したボルナウイルス遺伝子の性質の獲得は N 以外のボルナウイルス遺伝子においても起こりうると示唆される。実際、我々のグループは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) 活性に必要なアミノ酸残基を保持した EBLN コピーをコウモリゲノムから同定している²¹。ヒトから魚類に至るまで、あらゆる脊椎動物に内在化してきたボルナウイルスが、宿主の進化にどれほどの影響を及ぼしてきたのか明らかにするため、今後も引き続き機能性 EBL の探索および解析を行なっていきたい。

第四章

材料と方法

細胞培養

M. fuliginosus 腎臓上皮細胞 (YubFKT-1 細胞)、および *M. schreibersii* 腎臓上皮細胞 (SubK12-08 細胞) は山口大学の前田健教授よりご供与いただいた [41, 42]。

ヒト由来オリゴデンドログリオーマ細胞 (ヒト OL 細胞)、ヒト由来腎臓上皮細胞 (HEK293T 細胞)、Vero 細胞、YubFKT-1 細胞および SubK12-08 細胞は、10 % FCS CELLect (MP biomedical, Santa Ana, USA) を含む DMEM (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, USA) を用いて、37°C、5 % CO₂、飽和水蒸気温槽中で培養した。

BoDV-1 含有細胞破碎液の回収

BoDV-1 持続感染 OL 細胞をトリプシン処理によって回収し、PBS (-) に懸濁した。細胞を BIORUPTORII (ソニック・バイオ、神奈川、日本) による超音波破碎に供した後、4°C、1200 × g、25 分間の遠心分離を行った。上清を回収し、ウイルス溶液として -80°C に保存した。

プラスミド

Gaussia luciferase 遺伝子をレポーター遺伝子に持つ BoDV-1 ミニゲノム発現プラスミド (pCAG-HR-Gluc^{97,98})、HA タグ付加 itEBLN 発現プラスミド (pcDNA3-HA-itEBLN²⁵)、HA タグ付加 BoDV-1 N 発現プラスミド (pcDNA3-HA-N⁹⁹)、BoDV-1 P 発現プラスミド (pCXN2-P¹⁰⁰)、および変異体 BoDV-1 L 発現プラスミド (pCAG-mutL⁹⁸) は、当研究室で作製したものを使用した。BoDV-1 N 発現プラスミド (pcDNA3-N¹⁰⁰) および BoDV-1 L 発現プラスミド (pCAG-L¹⁰⁰) は、Dr. de la Tore からご供与していただいた¹⁰¹。Cypridyna luciferase 発現プラスミドは、pCMV-Cluc2 (New England BioLabs, Ipswich, USA) を用いた。Myc タグ付加 β-ガラクトシダーゼ発現プラスミド (pEF4-lacZ) は、pEF4/Myc-His/lacZ (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いた。pCAG-HR-Gluc は、5'末端より順に、ハンマーヘッドリボザイム (HamRz)、BoDV-1 Trailer 配列、アンチセンス方向の Gaussia luciferase 遺伝子、BoDV-1 Leader 配列、D 型肝炎ウイルス由来リボザイム (HdRz) をコードしている。その転写産物は、リボザイムの切断を経て 3'方向に BoDV-1 Leader 配列、アンチセンス方向の Gaussia luciferase 遺伝子、BoDV-1 Trailer 配列となる。

本研究で作製したプラスミドの作製方法を以下に示す。なお、特に記載が無い場合、DNA ライゲーションには DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (Takara, Tokyo, Japan) を、制限酵素処理後の DNA 精製には QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を、PCR 増幅産物の精製には innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) を、5'末端のリン酸化処理には T4 Polynucleotide Kinase (Takara) を、5'末端の脱リン酸化処理には Alkaline Phosphate (Calf intestine) (CIAP) (Takara) を用いた。PCR の各反応条件は、この項の最後にまとめて詳述する。

miEBLN-1 発現プラスミド (pCAG-miEBLN1) は、以下のように作製した。まず、SubK12-08 細胞由来ゲノム DNA を用いた PCR によって miEBLN-1 ORF 全長の配列を増幅した。この PCR 増幅産物および CAG プロモーターをもつ pCAGGS プラスミド (pCAG-Empty) を ClaI / NheI 制限酵素処理によって線状化し、互いにライゲーションすることによって pCAG-miEBLN1 を作製した。

FLAG タグおよび Myc タグ配列を持つエンブティープラスミド (pCAG-FLAG、pCAG-Myc) は、以下のように作製した。超純水によって FLAG-tag F / R、あるいは Myc-tag F / R を各 10 μ M に希釈し、95°C で 2 分間、37°C で 10 分間、4°C で 30 分間インキュベーションすることによってハイブリダイゼーションした。次に、5'末端のリン酸化処理を行なったのち、innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG) によって精製した。一方で、pCAG-Empty を EcoRI / SacI 制限酵素処理によって線状化し、5'末端の脱リン酸化処理を行なったのちに innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG) によって精製した。FLAG あるいは Myc タグオリゴ DNA と線状化 pCAG-Empty をライゲーションし、pCAG-FLAG および pCAG-Myc を作製した。

FLAG タグ付加 miEBLN-1 発現プラスミド (pCAG-FLAG-miEBLN1) は、以下のように作製した。SubK12-08 細胞由来ゲノム DNA を用いた PCR によって miEBLN-1 ORF 全長の配列を増幅した。この PCR 増幅産物および pCAG-FLAG を NheI / ClaI 制限酵素処理によって線状化し、互いにライゲーションすることで pCAG-FLAG-miEBLN1 を作製した。

HA タグ付加 miEBLN-1 発現プラスミド (pCAG-HA-miEBLN1) は、以下のように作製した。超純水によって各 10 μ M に希釈した HA-tag F / R を 95°C で 2 分間、37°C で 10 分間、4°C で 30 分間インキュベーションすることによってハイブリダイゼーションし、5'末端のリン酸化処理を行なったのち、

innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG) によって精製した。一方で、pCAG-FLAG-miEBLN1 を EcoRI / ClaI 制限酵素処理によって線状化し、5'末端の脱リン酸化処理を行ったのちに innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG) によって精製した。これらをライゲーションし、pCAG-HA-miEBLN1 を作製した。

TAP タグ (5'末端より順に、HA タグ、TEV (Tobacco Etch Virus) 由来プロテアーゼの切断配列、FLAG タグをタンデムに連結したもの) 付加 miEBLN-1 発現プラスミド (pCAG-TAP-miEBLN1) は、以下のように作製した。まず、SubK12-08 細胞由来ゲノム DNA を用いた PCR によって miEBLN-1 ORF 全長の配列を増幅した。この PCR 増幅産物と、当研究室が過去に作製した TAP タグ配列をもつエンブティープラスミド¹⁰²を EcoRI / XhoI 制限酵素処理によって線状化し、互いにライゲーションすることで pcDNA3-TAP-miEBLN1 を作製した。次に、pcDNA3-TAP-miEBLN1 を鋳型に用いた PCR によって、TAP タグを含む ORF 全長を増幅した。この PCR 増幅産物および pCAG-Empty に XhoI / ClaI 制限酵素処理を施し、互いをライゲーションすることで pCAG-TAP-miEBLN1 を作製した。

RNA 結合変異体 miEBLN-1 発現プラスミド(pCAG-miEBLN1-def)、およびアラニン置換変異体 miEBLN-1 発現プラスミド(pCAG-miEBLN1-AS1~7)は、以下の様にして作成した。pCAG-miEBLN1 を鋳型として用いた PCR によってフラグメント配列を増幅し、これらを In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara) によって pCAG-Empty に組み入れることによって作製した。

IDR 欠損変異体 miEBLN-1 発現プラスミド (pCAG-miEBLN1- Δ WT、pCAG-miEBLN1- Δ def) は、以下の様にして作成した。pCAG-miEBLN1 または pCAG-miEBLN1-def を鋳型として用いた PCR によって、N 末端領域を除く miEBLN-1 ORF 全長を増幅した。この PCR 産物と pCAG-Empty にフラグメント配列を増幅し EcoRI / KpnI 制限酵素処理を施し、互いをライゲーションすることで pCAG-miEBLN1- Δ WT および pCAG-miEBLN1- Δ def を作製した。

Myc タグ付加 IGF2BP3、MOV10 発現プラスミド (pEF4-IGF2BP3、pEF4-MOV10、pCAG-IGF2BP3、pCAG-MOV10) は、以下の様に作製した。SubK12-08 細胞由来 cDNA を用いた PCR によって、IGF2BP3、MOV10 の ORF 全長の配列を増幅した。この PCR 増幅産物と pEF4/myc-His B プラスミド (Invitrogen) に KpnI / BstBI 制限酵素処理を施し、互いにライゲーションすることで pEF4-IGF2BP3 および pEF4-MOV10 を作製した。次に、pEF4-IGF2BP3 お

よび pEF4-MOV10 を鋳型に用いた PCR によって IGF2BP3、MOV10 の ORF 全長の配列を増幅した。この PCR 増幅産物と pCAG-Myc に KpnI / NheI 制限酵素処理を施し、互いにライゲーションすることで pCAG-IGF2BP3、pCAG-MOV10 を作製した。

Myc タグ付加 LINE-1 ORF1 発現プラスミド (pCAG-ORF1-Myc) は、以下の様に作成した。後述の LINE-1 レポータープラスミド (EF06R) を鋳型として用いた PCR によって、ORF1 タンパク質の ORF 全長を増幅した。この PCR 産物と pCAG-Myc に EcoRI / NheI 制限酵素処理を施し、互いにライゲーションすることで pCAG-ORF1-Myc を作製した。

GAPDH mRNA 発現プラスミド (pSPT18-GAPDH) は、以下の様に作製した。まず、SubK12-08 細胞由来 cDNA を用いた PCR によって GAPDH mRNA 全長を増幅した。この PCR 増幅産物と、DIG RNA Labeling Kit (Roche) 付属の pSPT18 プラスミドに EcoRI / XbaI 制限酵素処理を施し、互いにライゲーションすることで pSPT18-GAPDH を作製した。

miEBLN-1 タンパク質精製に用いたプラスミド (以下、pET15b-coYub とする) は、以下の様に作製した。*M. fuliginosus* の miEBLN-1 ORF 全長の塩基配列を、GeneArt Strings DNA Fragments (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA) によって大腸菌のコドン使用率に基づいてコドンの最適化した塩基配列に変換した。同 GeneArt Strings DNA Fragments (Thermo Fisher Scientific) によって、そのオリゴ DNA の合成を行った。このオリゴ DNA と pET-15b プラスミド (Novagen、Madison、USA) に NdeI / BamHI 制限酵素処理を施し、互いにライゲーションすることで pET15b-coYub を作製した。

変異型 miEBLN-1 タンパク質精製に用いたプラスミド (以下、pET15b-coYub-mut とする) は、以下の様に作製した。変異型 miEBLN-1 タンパク質の ORF を、pET15b-coYub を鋳型とした PCR によって 4 つのフラグメントに分けて合成した。pET15-b プラスミドを NdeI / BamHI 制限酵素処理によって線状化した。線状化した pET15-b プラスミドおよび 4 つの PCR 増幅産物を NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) によってライゲーションし、pET15b-coYub-mut とした。

LINE-1 レポータープラスミド (EF06R) およびコントロール用プラスミド (EF05J) [49]は、Dr. Eline T. Luning Prak から供与いただいたものを使用した。EF06R は、5'末端から順にヒト由来 LINE-1 (L1RP) の 5'UTR、ORF1、ORF2、

3'UTR、アンチセンス方向のイントロンに分断された EGFP ORF、アンチセンス方向の CMV プロモーターをコードしている。EF05J は EF06R コンストラクトの ORF1 に転移活性を失う変異を導入したものである。

mCherry 融合ヒト G3BP1 タンパク質発現プラスミド (pmCherry-CI-G3BP1) は、大阪歯科大学歯学部歯学科の平井悠哉助教授にご供与いただいたものを使用した。

< miEBLN-1 ORF の PCR 反応条件 >

PCR 酵素： Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
(Thermo Fisher Scientific)
鋳型： SubK12-08 細胞由来ゲノム DNA (100 ng)
プライマー： miEBLN-1 cloning F / R
温度条件： 98°C、30 秒
([98°C、10 秒] – [70°C、30 秒] – [72°C、30 秒]) × 30 サイクル
72°C、5 分

< TAP タグ付加 miEBLN-1 ORF の PCR 反応条件 >

PCR 酵素： GoTaq DNA Polymerase (Promega、Madison、USA)
鋳型： pcDNA3-TAP-miEBLN1 (400 ng)
プライマー： TAP-miEBLN-1 ORF F / R
温度条件： 94°C、2 分
([94°C、30 秒] – [60°C、30 秒] – [72°C、80 秒]) × 30 サイクル
72°C、3 分

< MOV10 の PCR 反応条件 >

PCR 酵素： GoTaq DNA Polymerase (Promega)
鋳型： SubK12-08 細胞由来 cDNA
(total RNA 1 µg を用いて 20 µL スケールで合成し、1 / 20 量を使用、詳細は後述の「RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認」の項を参照)
プライマー： MOV10 F / MOV10 R1 (pEF4-MOV10)
MOV10 F / MOV10 R2 (pCAG-MOV10)

温度条件： 94°C、5分
([94°C、30秒] – [57°C、30秒] – [72°C、3分]) × 30 サイクル
72°C、3分

< IGF2BP3 の PCR 反応条件 >

PCR 酵素： GoTaq DNA Polymerase (Promega)
鋳型： SubK12-08 細胞由来 cDNA
(total RNA 1 µg を用いて 20 µL スケールで合成し、1 / 20 量を使用、詳細は後述の「RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認」の項を参照)
プライマー： IGF2BP3 F / IGF2BP3 R1 (pEF4-IGF2BP3)
IGF2BP3 F / IGF2BP3 R2 (pCAG-IGF2BP3)
温度条件： 94°C、5分
([94°C、30秒] - [57°C、30秒] – [72°C、2分]) × 30 サイクル
72°C、3分

< GAPDH mRNA の PCR 反応条件 >

PCR 酵素： GoTaq DNA Polymerase (Promega)
鋳型： SubK12-08 細胞由来 cDNA
(total RNA 1 µg を用いて 20 µL スケールで合成し、1 / 20 量を使用、詳細は後述の「RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認」の項を参照)
プライマー： GAPDH mRNA F / R
温度条件： 94°C、5分
([94°C、30秒] – [60°C、30秒] – [72°C、1分]) × 30 サイクル
72°C、3分

< 変異体 miEBLN-1 ORF フラグメントの PCR 反応条件 >

PCR 酵素： GoTaq DNA Polymerase (Promega)
鋳型： pET15b-coYub (40 ng)
プライマー： miEBLN1 mutORF F1 / R1
miEBLN1 mutORF F2 / R2
miEBLN1 mutORF F3 / R3

miEBLN1 mutORF F4 / R4
温度条件： 94°C、5分
([94°C、30秒]–[60°C、30秒]–[72°C、30秒])×30サイクル
72°C、3分

RNA 結合タンパク質をコードしうる EBLN の同定

RNA 結合タンパク質をコードしうる EBLN の同定は、以下のステップに従って行った。我々のグループは以前、真核生物ゲノムに対する tBLASTn によって EBLN を網羅的に同定している¹⁶。その結果を元に、EBLN 候補のゲノム DNA 配列を取得し、各々の配列がコードしうる ORF を orfipy¹⁰³ によって同定した。次に、既知のボルナウイルス N および EBLN に類似しない配列を取り除くため、ボルナウイルス N のアミノ酸配列をリファレンス、各々の EBLN 候補の予測アミノ酸配列をクエリーとして BLASTp を行った。この BLASTp において E 値が 10^{-10} を下回り、かつ 300 コドン以上持つ EBLN のアミノ酸配列をインプットとして Deep-RBPpred²⁷ による RNA 結合タンパク質予測を行った。

コウモリゲノム DNA のシーケンシング

YubFKT-1 細胞および SubK12-08 細胞より、QIAmp DNA blood mini kit (QIAGEN、Tokyo、Japan) を用い、付属の手順に従って DNA を抽出した。ゲノム DNA 100 ng を鋳型とした 20 μ L の反応系において、Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) によって PCR を行った (PCR 条件は下記参照)。1.5 % アガロースゲル (組成は下記参照) を用いた電気泳動により PCR 増幅産物を確認した。BioDoc-It Imaging system (UVP、Upland、USA) により泳動後のゲルを撮像し、画像データを取得した。得られた PCR 増幅産物を innuPREP PCRpure kit (Analytik Jena AG) によって精製し、株式会社 FASMAC (Atsugi、Japan) に受託することによってシーケンシングを行った。

< PCR の反応条件 >

プライマー： miEBLN-1 locus F / R
温度条件： 94°C、30秒
([94°C、10秒]–[66°C、30秒]–[72°C、3分]) 35 サイクル

72°C、5分

<アガロースゲルの組成>

Agarose S (Nippon Gene、Tokyo、Japan)	1.5 % (w/v)
Tris-Acetate-EDTA Buffer Powder, pH 8.3 (Takara)	1×

PCR による miEBLN-1 オースログの同定

RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) を用いて *M. natalensis* ゲノムの miEBLN-1 とその周辺領域 (miEBLN-1 とその上流および下流 2.5 kb を含む計約 6 kb のゲノム領域) および *M. schreibersii*、*M. fuliginosus* ゲノム DNA のシーケンシング (前項参照) によって得られた配列に存在する反復配列を検出した。反復配列のアノテーション情報とこれらの塩基配列を Geneious にインポートし、E-INS-i アルゴリズムを用いた MAFFT¹⁰⁴ によるマルチプルアラインメントを行った。このアラインメントの結果と、アラインメント上での反復配列のパターンからオースロジーを判断した。

BLASTn による miEBLN-1 シンテニー領域の同定

M. natalensis ゲノムの miEBLN-1 とその周辺領域 (miEBLN-1 とその上流および下流 2.5 kb を含む計約 6 kb のゲノム領域) の塩基配列をクエリーとして、翼手目の WGS および RefSeq データベースに対して BLASTn 解析を行った。BLAST ヒットのうち、miEBLN-1 に類似する配列を持たず、miEBLN-1 の周辺領域に類似する配列をもつ BLAST ヒットの配列を以降の解析に用いた。

RepeatMasker を用いて、miEBLN-1 周辺領域 (miEBLN-1 とその上流および下流 2.5 kb を含む計約 6 kb のゲノム領域) および上記のヒット配列に存在する反復配列を検索した。得られた反復配列のアノテーション情報とこれらの配列を Geneious にインポートし、E-INS-i アルゴリズムを用いた MAFFT¹⁰⁴ によるアラインメントを行った。このアラインメントの結果と、アラインメント上での反復配列のパターンから miEBLN-1-empty シンテニー領域を決定した。

内在化年代の推定

miEBLN-1 オースログを持つ *M. natalensis*、*M. schreibersii*、*M. fuliginosus* の分岐年代から miEBLN-1 が内在化した最小年代を推定した。一方

で miEBLN-1 が内在化した最大年代は、miEBLN-1-epmtty シンテニー領域を持つ *P. parnellii* とユビナガコウモリ属の共通先祖が分岐した年代から推定した。それぞれの分岐年代は TimeTree¹⁰⁵ を参照した。

d_N/d_S 解析

d_N/d_S 解析は、共同研究者である日本大学生物資源科学部獣医学科の鈴木由紀専任講師に行なって頂いた。以下にその詳細を記載する。

非同義置換率 (d_N) および同義置換率 (d_S) は misEBLN-1、minEBLN-1、mifEBLN-1 の ORF の配列を対象に、MEGA7 ソフトウェアの Nei-Gojobori モデルで算出した¹⁰⁶。統計的有意性は、各配列を比較した際の置換数から Fisher's exact test によって検定した。

分子系統樹の推定

NCBI に登録されている翼手目の WGS データベース (taxid: 9397、2018 年 5 月 10 日時点) を用いて、外来性ボルナウイルス (表 4 参照) の各 N 遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとした tBLASTn 検索を行った。その結果得られた BLAST ヒット配列を Geneious にインポートしてアミノ酸配列へと変換した。BLAST ヒット配列が複数のストップコドンを含み ORF が断片化している場合は、個々の ORF 同士が重複する領域を除去したのちに、これらを連結して 1 つの ORF とした。これらのうちから、250 アミノ酸残基以上の長さを持つものを選抜し、tBLASTn 解析にクエリーとして用いた外来性ボルナウイルス N タンパク質の配列 (表 4 参照) を含めて E-INS-i アルゴリズムを用いた MAFFT によってマルチプルアラインメントを行った。この結果を MEGA7¹⁰⁷ にインポートし、p-distance に基づいた近隣結合法によって分子系統樹を推定した。分子系統樹の各ノードの信頼性は、ブートストラップ解析を 1000 回反復することによって評価した。

RNA の抽出

コウモリの採取・解剖後、液体窒素により瞬間凍結されたコウモリ組織を少量の PBS によって懸濁し、バイオマッシャーII (Nippi) によってホモジナイズした。その後、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を加えさらに懸濁したものを -80°C で冷凍保存した。上記の試料を解凍し、Direct-zol RNA

MiniPrep Plus Kit (Zymo research、Irvine、USA) を用いて、付属の手順に従い RNA を抽出した。

YubFKT-1 細胞および SubK12-08 細胞からの RNA 抽出に関しては、Nucleospin RNA Plus (Macherey Nagel、Düren、Germany) を用い、付属の手順に従って抽出した。

RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認実験 (次項参照) に用いた RNA については、ゲノム DNA の混入を避けるため、DNase I (Roche、Basel、Switzerland) によって 37°C、1 時間の反応により DNA を消化した後、RNAClean XP (Beckman Coulter Life Sciences、Blair、USA) によって精製している。

RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認

肝臓組織および SubK12-08 細胞から抽出した RNA を各々 1 µg 用いて、20 µL のスケールで Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) によって以下の条件で逆転写を行った。この cDNA を鋳型に用いて、Takara Ex Taq (Takara) によって以下の条件で RT-PCR を行った。

< 逆転写の反応条件 >

プライマー： 付属の Anchored oligo dT プライマー

[[70°C、5分] - [4°C、1分] - [50°C、1時間] - [95°C、5分]] × 1 サイクル

< PCR の反応条件 >

プライマー： miEBLN-1 Pair 1 F / R

miEBLN-1 Pair 2 F / R

HPRT1 F / R

温度条件： 94°C、2分

[[94°C、30秒] - [60°C、30秒] - [72°C、20秒]] × 30 サイクル

72°C、3分

RT-PCR 後、1.2 % アガロースゲルを用いて 150 V の定電圧で PCR 増幅産物の電気泳動を行なった。BioDoc-It Imaging system (UVP) を用いてゲルを撮像し、画像データを取得した。

RACE 解析

肝臓および脳組織から抽出した RNA と GeneRacer Kit (Invitrogen) および SuperScript III RT (Invitrogen) を用いて、付属の手順に従い RACE 解析を行った。Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて得られた PCR 増幅産物を付属の pCR-Blunt II-TOPO プラスミドにクローニングし、付属の M13 プライマーによってシーケンシングを行った。

定量 RT-PCR による miEBLN-1 発現量の評価

上述の「RT-PCR による miEBLN-1 の発現確認」の項にて得られたコウモリ組織由来 cDNA を鋳型として、miEBLN-1 mRNA の ORF に特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR を行った。試薬および調製は Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, USA) に準じ、測定機器として CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) を用いた。コピー数は制限酵素処理によって線状化した pCAG-miEBLN1 をテンプレートとして作成した検量線に基づいて算出した。

< PCR の反応条件 >

プライマー： miEBLN-1 qPCR F/R

([95°C、10分]) × 1 - ([95°C、15秒] - [60°C、30秒]) × 45 サイクル

miEBLN-1 組換えタンパク質の精製

pET15b-coYub あるいは pET15b-coYub-mut を用いて、大腸菌 BL21(DE3) (Novagen) 株の形質転換を行った。組み換えタンパク質の誘導は、終濃度 0.4 mM のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシドによって行った。回収した細胞ペレットを、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル (EDTA フリー) (nacalaitesque, Kyoto, Japan)、1 μL/mL Benzonase Nuclease (Merck Millipore, Burlington, USA) および 1 kU/mL rLysozyme (Merck Millipore) を含む BugBuster Protein Extraction Reagent (Merck Millipore) によって懸濁し、室温下で 40 分振盪することによって溶解した。得られた細胞溶解液を遠心分離 (12,000 × g、4°C、10分) に供し、上清を回収し、0.2 μm Polyethersulfone フィルター (Merck Millipore) に通したものを可溶性画分とした。この可溶性画分を用いて、TALON Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) により付属の手順

に従って miEBLN-1 タンパク質を精製した。溶出液は、1 mL ごとのフラクションごとに分けて回収した。各フラクションを、e-PAGEL (Atto Cooperation、Tokyo、Japan) を用いた SDS-PAGE に供し、One Step CBB (Bio Craft、Tokyo、Japan) によって CBB 染色を行った。miEBLN-1 タンパク質の予想分子量 (約 43 kDa) のシグナルを比較し、miEBLN-1 タンパク質を多く含むことが予想された画分のみ以降の操作に用いた。

抗体のアフィニティー精製に用いた野生型 miEBLN-1 タンパク質、ならびに EMSA に用いた野生型及び変異型 miEBLN-1 タンパク質については、さらにゲルからの抽出による精製も行った。以下に詳細を記す。TALON Metal Affinity Resin (Clonetech Laboratories) によって得られた溶出液の全量に対して 4 倍量の氷冷したアセトン (nacalai tesque) を加え、激しく攪拌したのち-30°C 下に於て 8 時間インキュベーションした。その後、12,000 × g, 20 分, 4°C によってペレットを回収し、4 M 尿素/ 1× SDS Sample Buffer (組成は下記参照) に懸濁した。miEBLN-1 タンパク質溶解液の全量を SDS-PAGE に供し、One Step CBB (Bio Craft) によってタンパク質の染色を行った。このゲルから目的の分子量 (約 43 kDa) 付近に見られるバンドを切り出し、バイオマッシャーV (Nippi、Tokyo、Japan) を用いて Gel Extraction Buffer (組成は下記参照) 中でホモジナイズした後、室温で 8 時間振盪し、ゲルからタンパク質を溶出した。溶出液の全量に対して 4 倍量の氷冷したアセトン (nacalai tesque) を加え、激しく攪拌したのち-30°C に於て 8 時間インキュベーションした。12,000 × g、20 分、4°C の遠心分離によって回収したペレットを 8 M 尿素により懸濁し、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo Fisher Scientific) によって透析を行い、溶媒を PBS (-) 又は Gel Shift Assay Buffer (組成は下記参照) へと置換した。

< 2× SDS Sample Buffer の組成 >

Tris - HCl pH 6.8	125 mM
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	4 % (w/v)
Glycerol	10 % (w/v)
2 - Mercaptoethanol	10 % (w/v)
Glycerol	5 % (v/v)
Bromophenol blue	微量

< Gel Extraction Buffer の組成 >

Tris - HCl pH 8.0	20 mM
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	1 % (w/v)

< Gel Shift Assay Buffer の組成 >

HEPES pH 7.9	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ²	1 mM
1,4-Dithiothreitol	1 mM
Glycerol	5 % (v/v)

抗 miEBLN-1p 抗体の作製及び精製

前項によって得られた精製 miEBLN-1p 溶液を、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo Fisher Scientific) によって透析を行い、溶媒を PBS (-) へと置換した。このタンパク質溶液をウサギに免疫し、全血清を回収した。なお、ウサギへの免疫および全血清の回収はユーロフィンジェノミクス (Tokyo, Japan) に委託した。

さらに全血清中の抗 miEBLN-1p 抗体を精製するため、High-Affinity Antibody Purification Kit (GenScript Biotech, New Jersey, USA) を用いて抗原アフィニティー精製を行った。その際、ゲル抽出によって精製した miEBLN-1p を抗原として用い、操作は付属の手順に従って行った。

コウモリ生体組織中のタンパク質抽出

凍結試料を 0°C に冷却した金属板の上で少量切り取り、バイオマッシャーII (Nippi) を用いて少量の PBS (-) 中でホモジナイズした。RIPA Buffer (組成は下記参照) を加え、さらにホモジナイズした後、4°C 下で 30 分間インキュベートした。得られた臓器乳剤中の細胞膜を破碎するため、Biorupter (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて High voltage、90 秒間の条件で超音波処理を行った。その後、10,000 × g、10 分間、4°C の遠心分離を行い、回収した上清を可溶性タンパク質画分とした。

< RIPA Buffer の組成 >

Tris HCl pH 8.0	50 mM
-----------------	-------

NaCl	150 mM
NP-40	1 % (v/v)
Sodium dodecyl sulfate	0.1 % (w/v)
Sodium Deoxycholate	0.5 % (w/v)
cOmplete Protease Inhibitor (Roche)	2×

コウモリ組織由来可溶性タンパク質画分の総タンパク質定量

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、付属の手順に従ってコウモリ組織由来可溶性タンパク質画分の総タンパク質量を定量した。なお、検量線は上記のキットに付属している Albumin Standard を段階希釈することで作成した。

ウエスタンブロッティング解析

各サンプルを e-PaGEL (Atto Cooperation) にアプライし、300 V の定電圧で 45 分間の電気泳動を行った。泳動後のゲルを Trans-Blot Turbo PVDF Transfer Pack (BIO-RAD、Hercules、USA) によって Mini Format, 0.2 μm PVDF Single Application (BIO-RAD) に転写した。転写後のメンブレンを Blocking Buffer (組成は下記参照) で 1 時間ブロッキングし、Blocking Buffer で希釈した一次抗体によって室温、1 時間のインキュベーションを行った。その後、1× TBS-T にて室温、5 分間のメンブレンの洗浄を 3 回行った。Blocking Buffer で 5000 倍に希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Merck Millipore) または HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Merck Millipore) によって室温、1 時間でインキュベーションして二次反応を行ない、同様に 1× TBS-T を用いて洗浄した。最後に ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare、Little Chalfont、UK) を添加し化学発光反応を行い、ImageQuant LAS 4000 mini system (FujiFilm、Tokyo、Japan) によって撮影した。

< Blocking Buffer の組成 >

スキムミルク (nacalai tesque)	4 % (w/v)
TBS-T (組成は以下参照)	1×

< 1× TBS-T の組成 >

Tris buffered saline (TBS) Tablets, pH 7.6 (Takara)	×1
---	----

Tween 20 (Wako, Kyoto, Japan)

0.1 % (v/v)

哺乳動物細胞へのプラスミドトランスフェクション

培養細胞へのトランスフェクションは、LINE-1 レポーターアッセイにおいては TransIT-293 Transfection Reagent を、それ以外の全ての実験においては Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いた。なお、どちらの試薬を用いる場合においても付属の手順に従ってトランスフェクションを行っている。

SubK12-08 細胞および YubFKT-1 細胞へのプラスミドトランスフェクションには、1.0 μg のプラスミドに対して 3.0 μL の Lipofectamine2000 を用いた。一方で、ヒト OL 細胞および HEK293T 細胞へのプラスミドトランスフェクションには、1.0 μg のプラスミドに対して 2.5 μL の Lipofectamine2000 を用いた。

DIG ラベル化 RNA の合成

NdeI/ NheI 制限酵素処理によって線状化した pSPT18 GAPDH をテンプレートとして用い、T7 ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応を行った。その際用いた試薬や詳細な操作は DIG RNA Labeling Kit (Roche) に準じた。得られた合成 RNA を Nucleospin RNA (Macherey Nagel) によって精製し、Tape Station HS RNA kit (Agilent Biosystems, Santa Clara, USA) を用いて塩基長および分解度のチェックを行った。

EMSA による RNA 結合能の評価

75°C、3 分間の加熱と 5 分間の氷冷により、DIG ラベル化 RNA の変性を行った。精製した野生型および変異型 miEBLN-1 タンパク質と変性 DIG ラベル化 RNA を Gel Shift Assay Buffer (組成は上述の「miEBLN-1 組み換えタンパク質の精製」の項を参照) に混合し、4°C、1 時間インキュベーションした。その後、変性アガロースゲル (組成は下記参照) を用い、TBE を泳動溶液として、4°C 下、50 V の定電圧で 1 時間電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルを、10× SSC Buffer (組成は下記参照) を用いた Downward method により Nylon membrane, positively charged (Sigma - Aldrich) に 8 時間転写した。転写後のメンブレンを、CX-2000 UV Crosslinker (UVP) を用いた UV 照射 (12,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) によってクロスリンクした。その後、メンブレンを Wash Buffer (組成は下記参照) により 10 分間洗浄し、Blocking Buffer (組成は下記参照) によって 1 時間ブロッ

キングした。Anti-DIG AP (Roche) を Blocking Buffer によって 250 倍に希釈し、4°C 下で一晩インキュベーションした。反応後、メンブレンを Wash Buffer によって 3 回洗浄したのち、Tripex CDP-Star Ready-to-use (Thermo Fisher Scientific) をメンブレン上に滴下して 1 分以上反応させ、ImageQuant LAS 4000 mini system (FujiFilm、Tokyo、Japan) にて検出した。

< 変性アガロースゲル >

Agarose S (Nippon Gene)	1.2 % (w/v)
TBE (組成は下記参照)	0.5×
Formaldehyde	0.66 M

< 5× TBE Buffer の組成 >

Tris	0.445 M
Boric Acid	0.445 M
EDTA	0.01 M

これらを超純水で溶解したものを 5× 濃度とし、以降これを希釈して用いた。

< 10× SSC Buffer の組成 >

NaCl	1.5 M
Trisodium citrate dihydrate	0.15 M

< Wash Buffer の組成 >

PBS (-)	1×
Tween20	0.05 % (v/v)

< Blocking Buffer の組成 >

PBS (-)	1×
Tween20	0.05 % (v/v)
Skim Milk (nacalai tesque)	5 % (w/v)

免疫沈降溶出画分を用いた RT-PCR

1.2 × 10⁶ 個の OL 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、pCAG-Empty、pCAG-miEBLN1、pCAG-miEBLN1-def のうちいずれか 2 μg をトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、氷冷 PBS (-) にて二回洗浄した。その後、TNE Buffer - 1 (組成は下記参照) を 1 mL 加え、4°C 下で 1 時間インキュベーションした。その後、細胞溶解液を 12,000 × g、4°C、20 分間の遠心分離に供し、上清を可溶性画分とした。2 μL の抗 miEBLN-1p 抗体を担持させた 50 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を可溶性画分で懸濁し、室温で 15 分間ローテーターにより攪拌した。これによって可溶性画分の免疫沈降を行なった。反応後のビーズを 1× SDS Sample Buffer に懸濁し、85°C にて 15 分間インキュベーションすることで得た溶出液を以降の WB 解析に用いた。また、反応後のビーズを 500 μL の Trizol Reagent に懸濁し、55°C にて 15 分間インキュベーションすることで得た溶出液を以降の RT-PCR に用いた。溶出液として得られた Trizol reagent から RNA を精製し、Verso RT cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) によって逆転写反応を行なった。これにより得られた cDNA を用いて、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) によって下記の条件で PCR を行い、1.5 % アガロースゲルを用いた電気泳動に供した。

< TNE Buffer - 1 の組成 >

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	0.1 % (v/v)
cOmplete Protease Inhibitor (Roche)	1×
RNase OUT (Thermo Fisher Scientific)	0.1 U/μL
1,4-Dithiothreitol	0.5 mM

< 逆転写の反応条件 >

プライマー： 付属の Anchored oligo dT プライマー
([70°C、5分] - [4°C、1分] - [50°C、1時間] - [95°C、5分]) × 1 サイクル

< PCR の反応条件 >

プライマー： GAPDH F/R
([98°C、10 秒]-[55°C、15 秒]-[68°C、30 秒]) × 30 サイクル

免疫沈降による miEBLN-1 タンパク質のオリゴマー形成評価

1.2 × 10⁶ 個の SubK12-08 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、2 μg の pCAG-FLAG-miEBLN1 に加え、2 μg の pCAG-Empty 2 μg あるいは pCAG-HA-miEBLN1 をトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、氷冷 PBS (-) にて二回洗浄した。その後、TNE Buffer – 1 (組成は上記参照) を 200 μL 加え、4°C 下で 1 時間インキュベーションした。その後、細胞溶解液を 12,000 × g、4°C、20 分間の遠心分離に供し、上清を可溶性画分とした。4 μg の抗 FLAG mouse M2 抗体 (Sigma-Aldrich) を担持させた 15 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を可溶性画分で懸濁し、室温で 15 分間ローテーターにより攪拌した。これによって可溶性画分の免疫沈降を行なった。反応後のビーズを 1 μg/μL 3× FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) PBS (-) 溶液に懸濁し、4°C にて 3 時間インキュベーションすることで miEBLN-1 タンパク質複合体を溶出した。得られた溶出液に等量の 2× SDS Sample Buffer を加え、95°C、5 分間の加熱によって変性させたものを以降の解析に用いた。

化学的架橋法による miEBLN-1p のオリゴマー形成評価

PBS (-) を溶媒とする精製 miEBLN-1p 溶液に、Glutaraldehyde 25 % in Water (nacalai tesque) を終濃度 0.1、0.2、0.5、1、2、5 mM となるように添加し、37°C、5 分間インキュベーションした。反応後、直ちに等量の 2× SDS Sample Buffer と混合し、95°C、5 分間の加熱によって変性した。e-PAGEL (Atto Cooperation) を用いて各サンプルの電気泳動を行い、One Step CBB (Bio Craft) によってゲルを染色し、ImageQuant LAS 4000 mini system (FujiFilm) にて撮影した。

ミニレプリコンアッセイ (BoDV-1 ポリメラーゼ阻害作用の評価)

2 × 10⁵ 個の HEK293T 細胞を 24 ウェルプレートに播種した。24 時間後、0.125 μg の pCAG-HR-Gluc、pCAG-L、pcDNA3-N プラスミド、0.0125 μg の pCXN2-P プラスミド、0.05 μg の pCMV-Cluc2 を調製し、0.25 μg の pCAG-

Empty、pcDNA3-HA-itEBLN、pCAG-miEBLN1 を各々加えて、トランスフェクションした。トランスフェクションから 36 時間後に Dual luciferase assay kit (Promega) を用いて培地中のルシフェラーゼ活性を測定し、Cypridina luciferase 活性の測定値に対する相対値からポリメラーゼ活性を評価した。ネガティブコントロールには、pCAG-L の代わりに pCAG-Lmut プラスミドをトランスフェクションした細胞を用いた。

BoDV-1 持続感染ヒト OL 細胞を用いた IFA

2×10^4 個の BoDV-1 (He/80 株) 持続感染ヒト OL 細胞を 8 ウェルチャンバーに播種した。24 時間後、pCAGGS FLAG-mi1、pcDNA3 HA-itEBLN、pCAGGS HA-BoDV N を各々 0.2 μg ずつトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、培地を吸引除去し 200 μL の 4 % - Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (nacalai tesque) を加え、室温にて 15 分間静置して細胞を固定した。その後、1 % (w/v) Triton X-100 (nacalai tesque) / PBS (-) 溶液を加え、室温にて 10 分間静置し透過処理を行なった。PBS (-) によって 3 回洗浄したのち、Blocking Buffer (組成は下記参照) を加え 30 分間静置することでブロッキングした。一次抗体反応として、上述の Blocking Buffer で希釈した抗 BoDV-1 P ポリクローナル抗体 (HB03、10000 倍希釈) および抗 FLAG mouse M2 抗体 (Sigma-Aldrich、2000 倍希釈) あるいは抗 HA mouse HA7 抗体 (Sigma-Aldrich、2000 倍希釈) を加え室温で 1 時間静置した。PBS(-) で 3 回洗浄した後、二次抗体反応として上述の Blocking Buffer で希釈した Alexa Flour 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific、2000 倍希釈) あるいは Alexa Flour 555 標識抗ラビット IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific、2000 倍希釈) および DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Merck Millipore、500 倍希釈) を加え、暗所で室温にて 1 時間静置した。その後、PBS (-) で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 ECRIPSE Ti (Nikon、Tokyo、Japan) にて観察した。

< Blocking Buffer の組成 >

Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich)	1 % (w/v)
Triton X-100 (nacalai tesque)	0.1 % (w/v)
PBS (-)	1×

BoDV-1 持続感染ヒト OL 細胞を用いた免疫沈降

1.2×10^6 個の BoDV-1 (He/80 株) 持続感染ヒト OL 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、pCAG HA- mi1、pCAG HA- BoDV N を各ウェルに 1.5 μg 、pcDNA3-HA- itEBLN 各ウェルに 3.0 μg ずつトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、氷冷 PBS (-) にて二回洗浄した。TNE Buffer - 1 (組成は上記参照) を 200 μL 加え、4°C 下で 2 時間、ローテーターを用いて攪拌した。細胞溶解液を $12,000 \times g$ 、4°C、10 分間の遠心分離に供し、上清を回収したものを可溶性画分とした。4 μg の抗 HA mouse HA7 抗体 (Sigma-Aldrich) を担持させた 15 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を可溶性画分で懸濁し、室温で 15 分間、ローテーターを用いて攪拌した。これによって可溶性画分の免疫沈降を行なった。反応後のビーズを 2 度 PBS(-) によって洗浄した後、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HA ペプチド PBS (-) 溶液に懸濁し、冷温下で 3 時間インキュベーションすることで溶出した。溶出画分を等量の 2 \times SDS Sample Buffer と混合し、95°C、5 分間加熱することによって変性させたものを以降の解析に用いた。

ルシフェラーゼ発現 BoDV-1 を用いた抗ウイルス作用評価

0.08×10^6 個の BoDV-1-fluc (He/80 株) 持続感染 Vero 細胞を 48 ウェルプレートに播種した。24 時間後、pCAG-Empty、pcDNA-HA-itEBLN、pCAG-miEBLN1 を各ウェルに 0.4 μg ずつトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、細胞を PBS (-) にて二回洗浄し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) および GloMax® Discover Microplate Reader (Promega) によってルシフェラーゼ活性を測定した。

コウモリ細胞を用いた BoDV-1 感染実験

0.1×10^6 個の YubFKT-1 細胞を 96 ウェルプレートに播種した。24 時間後、20 μL の BoDV-1 含有細胞破碎液を各ウェルに加え、15 分毎に浸透しつつ 37°C で 1 時間インキュベーションした。その後、10% FCS を含む DMEM にて培養および継代を続け、各タイムポイントにて細胞を回収した。細胞内の total RNA を Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel, Allentown, USA) を用いて回収し、さらに Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写を行った。Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) および CFX

Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて定量 PCR を行ない、比較 Ct 法によって BoDV-1 ゲノム RNA 量を評価した。

< 逆転写の反応条件 >

プライマー： 付属の Anchored oligo dT プライマー
BoDV-1 gRNA RT

([70°C、5分] - [4°C、1分] - [50°C、1時間] - [95°C、5分]) × 1 サイクル

< PCR の反応条件 >

プライマー： GAPDH qPCR F/R
BoDV-1 gRNA F/R

([95°C、10分]) × 1 - ([95°C、15秒] - [60°C、30秒]) × 45 サイクル

コウモリ細胞を用いた IAV 感染実験

Influenza A/WSN/33 (H1N1) (WSN 株) は東京大学の河岡義裕教授よりご供与いただいた。miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞および GFP 恒常発現 YubFKT-1 細胞に IAV を MOI=1 となるように接種し、37°C で 1 時間反応させた。PBS (-) で洗浄したのち、0.2 % BSA を含む MEM を加え 37°C で培養した。各タイムポイントで培地を回収し、4°C、3000 rpm、10 分間遠心した上清をウイルス溶液として以下のプラークアッセイに供した。MDCK 細胞に 0.2 % BSA を含む MEM によって段階希釈したウイルス溶液を接種し、37°C で 1 時間反応させた。アガロース溶液 (組成は以下参照) を加え、室温で 15 分静置しアガロースが固まったのちにインキュベーターに移し 37°C で 36 時間培養した。アガロースの上から 20 % (v/v) ホルマリン (富士フィルム和光純薬) を加え、室温で 30 分静置し細胞を固定した。アガロースとホルマリン溶液を除き、アミドブラック溶液 (組成は以下参照) を加え室温で 1 時間静置した。水道水で洗浄し、プラークの数からウイルス力価を算出した。

< アガロース溶液の組成 >

Sea plaque agarose (Lonza, Basel, Switzerland)	0.5 % (w/v)
Sea Kem GTG agarose (Lonza)	0.5 % (w/v)
10 × MEM (Gibco BRL Life Technologies)	10 % (v/v)
FCS (MP biomedical)	4 % (v/v)

NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	3 % (w/v)
MEM NEAA × 100 (Gibco BRL Life Technologies)	1 % (v/v)
MEM Vitamin (Gibco BRL Life Technologies)	1 % (v/v)
L-Glutamine (Sigma-Aldrich)	2 % (v/v)
Pen. & Strep. (Wako)	1 % (v/v)
TPCK Trypsin (Merck Millipore)	0.1 % (v/v)
MilliQ	to 100 mL

<アミドブラック溶液の組成>

Amidoblack (富士フィルム和光純薬)	0.05 % (w/v)
Methanol	50 % (v/v)
Acetic acid	10 % (v/v)
蒸留水	to 50 mL

TAP 法による miEBLN-1 タンパク質複合体の精製

1.0 × 10⁶ 個の SubK12-08 細胞を 10 cm ディッシュに播種した。24 時間後、pCAG-TAP-miEBLN1 または pCAG-Empty プラスミドを各々 10 μg トランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、氷冷 PBS (-) にて二回洗浄した。その後、TNE Buffer - 2 (組成は下記参照) を 500 μL 加え、4 °C 下で 1 時間、ローテーターにより攪拌した。その後、細胞溶解液を 12,000 × g、4 °C、10 分間遠心分離に供し、回収した上清を可溶性画分とした。4 μg の抗 HA mouse HA7 抗体 (Sigma-Aldrich) を担持させた 15 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を可溶性画分で懸濁し、室温で 15 分間、ローテーターを用いて攪拌した。これによって可溶性画分の免疫沈降を行なった。反応後、磁気ビーズに結合したタンパク質を 0.067 U/μL AcTEV プロテアーゼ (Thermo Fisher Scientific) によって 16 °C、3 時間消化した。4 μg の抗 FLAG mouse M2 抗体 (Sigma-Aldrich) を担持させた 15 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) をプロテアーゼ反応溶液で懸濁し、室温で 15 分間、ローテーターを用いて攪拌した。反応後のビーズを 1 μg/μL 3× FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) PBS (-) 溶液に懸濁し、4 °C にて 2.5 時間インキュベーションすることで miEBLN-1 タンパク質複合体を溶出

した。得られた溶出液に等量の 2× SDS-Sample Buffer を加え、95 °C、5 分間の加熱によって変性させたものを以降の解析に用いた。

< TNE Buffer - 2 の組成 >

Tris-HCl pH 8.0	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	0.1 % (v/v)
cOmplete Protease Inhibitor (Roche)	1×

TAP 法溶出画分中の相互作用タンパク質の同定

前項によって得られた溶出画分を e-PaGEL (Atto Cooperation) を用いた SDS-PAGE によって分離し、Silver Quest (Thermo Fisher Scientific) を用いて銀染色を行なった。pCAG-TAP-miEBLN1 をトランスフェクションしたサンプルのレーンを 16 の領域に分けて切り出し、質量分析解析に供した。 *M. schreibersii* のアノテーション付きペプチド配列 (GEO : GSE50699¹⁰⁸) に miEBLN-1 ORF の予想アミノ酸配列を加えた配列ファイルをデータベースとして、得られたペプチド配列のアノテーション情報を検索することで、相互作用タンパク質を同定した。

免疫沈降による miEBLN-1p - 宿主タンパク質間相互作用の検証

RNase 存在下における免疫沈降による相互作用の検証は、以下の様に行なった。 3.6×10^5 個の SubK12-08 細胞を 12 ウェルプレートに播種した。24 時間後、pEF4-lacZ、pCAG-MOV10、pCAG-IGF2BP3 プラスミドを各々 0.5 μg に加え、pCAG-FLAG-mi1 を 0.5 μg トランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、氷冷 PBS (-) にて二回洗浄した。その後、TNE Buffer - 1 (組成は上記参照) を 200 μL 加え、4 °C 下で 1.5 時間、ローテーターにより攪拌した。その後、細胞溶解液を $12,000 \times g$ 、4 °C、3 分間の遠心分離に供し、上清を可溶性画分とした。4 μg の抗 FLAG mouse M2 抗体 (Sigma-Aldrich) を担持させた 15 μL slurry の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を可溶性画分によって懸濁し、室温で 15 分間、ローテーターを用いて攪拌した。これによって可溶性画分の免疫沈降を行なった。反

応後、ビーズを 0.1 mg/mL RNase A (Invitrogen) PBS (-) 溶液に懸濁し室温で 15 分間インキュベーションした。反応後のビーズを 2 度 PBS (-) によって洗浄した後、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 \times FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) PBS (-) 溶液に懸濁し、冷温下で一晩インキュベーションすることで miEBLN-1 タンパク質複合体を溶出した。得られた溶出液に 2 \times SDS Sample Buffer を加え、95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分の加熱によって変性させたものを以降の解析に用いた。

miEBLN-1p WT と miEBLN-1p def を用いた免疫沈降による相互作用の比較は、前項「免疫沈降溶出画分を用いた RT-PCR」と同じサンプルを用いた。

miEBLN-1p と BoDV-1 N を用いた免疫沈降による相互作用の比較は、以下の様にして行なった。1.2 $\times 10^6$ 個の SubK12-08 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、2 μg の pCAG-MO10-Myc に加え、pCAG-Empty、pCAG-FLAG-miEBLN1、pCAG-FLAG-BoDV-N のうちいずれか 2 μg をトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、スクレーピングによって細胞を回収し、免疫沈降を行った。詳細な条件は前項「免疫沈降溶出画分を用いた RT-PCR」に準ずる。

IFA による miEBLN-1p のストレス顆粒局在評価

4 $\times 10^4$ 個の miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞を 8 ウェルチャンバーに播種した。24 時間後、0.25 μg の pmCherry-C1-G3BP1 をトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、培地を吸引除去し 0.2M NaCl (nacalai tesque) および 10% FCS を含む DMEM を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベーションした。その後直ちに 4% - Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (nacalai tesque) によって細胞を固定し、抗 miEBLN-1p 抗体を用いて IFA を行った。詳細な反応条件は前項「BoDV-1 持続感染ヒト OL 細胞を用いた IFA」に準ずる。

ストレス処理下での免疫沈降による miEBLN-1p の相互作用評価

2.0 $\times 10^6$ 個の miEBLN-1p 恒常発現 YubFKT-1 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、スクレーピングによって細胞を回収し、抗 miEBLN-1p 抗体および normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) を用いて免疫沈降を行った。詳細な実験条件は前項「免疫沈降溶出画分を用いた RT-PCR」に準ずる。

IFA による miEBLN-1p と ORF1 の共局在評価

4.0×10^4 個の OL 細胞を 8 ウェルチャンバーに播種した。24 時間後、pCAG-ORF1-Myc と pCAG-miEBLN1 を共に $0.1 \mu\text{g}$ ずつトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、4 % - Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (nacalai tesque) によって細胞を固定し、抗 miEBLN-1p 抗体および抗 Myc 抗体を用いて IFA を行った。詳細な反応条件は前項「BoDV-1 持続感染ヒト OL 細胞を用いた IFA」に準ずる。

免疫沈降による miEBLN-1 と ORF1 の相互作用評価

2.0×10^6 個の OL 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。24 時間後、 $2 \mu\text{g}$ の pCAG-ORF1-Myc に加えて、pCAG-miEBLN1、pCAG-miEBLN1-AS1~7 のいずれか $2 \mu\text{g}$ を各々のウェルにトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、トリプシン処理によって細胞を回収し、抗 miEBLN-1p 抗体を用いて免疫沈降を行った。詳細な実験条件は前項「免疫沈降溶出画分を用いた RT-PCR」に準ずる。

LINE-1 レポーターアッセイ (LINE-1 転移活性抑制作用の評価)

HEK293T 細胞を 0.4×10^6 個、12 ウェルプレートに播種した。24 時間後、EF06R $0.65 \mu\text{g}$ に加え pCAG-Empty、pEF-lacZ、pCAG-miEBLN1、pCAG-miEBLN1-def、pCAG-MOV10、pCAG-miEBLN1- Δ WT、pCAG-miEBLN1- Δ def のいずれか $0.25 \mu\text{g}$ を TransIT®-293 Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, WI, USA) によって各々のウェルにトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、培養液を $2.5 \mu\text{g/mL}$ puromycin 含有 DMEM に換えて 48 時間インキュベーションすることでセレクションを行なった。セレクション以降は 3 日おきに継代し、15 日目に 4 % - Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (nacalai tesque) にて固定し、BD LSRFortessa Cell Analyzer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) によって GFP 陽性細胞数を計測した。

表4. 本研究において用いた抗体一覧

抗体	製造社	ID	希釈倍率
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich	F1804-1MG	2000
Monoclonal Anti-HA antibody produced in mouse clone HA-7, purified from hybridoma cell culture	Sigma-Aldrich	H3663-200UL	2000
Myc-Tag (9B11) Mouse mAb	Cell Signaling	2276S	2000
Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Antibody, clone 6C5	EMD Millipore	MAB374	2000
Monoclonal Anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2	Sigma-Aldrich	T5168	2000
Anti-Mov10 antibody	Abcam	ab80613	1000
Anti-G3BP1 antibody (H-10)	Santa Cruz Biotechnology	sc365338	250
Anti-Histone H3 Antibody, CT, pan	Millipore	cloneA3S	1000

引用文献

1. Horie, M. & Tomonaga, K. Non-retroviral fossils in vertebrate genomes. *Viruses* **3**, 1836–1848 (2011).
2. Jern, P. & Coffin, J. M. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* **42**, 709–732 (2008).
3. Weiss, R. A. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* **3**, 67 (2006).
4. Griffiths, D. J. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* **2**, REVIEWS1017 (2001).
5. Inaguma, Y., Yoshida, T. & Ikeda, H. Scheme for the generation of a truncated endogenous murine leukaemia virus, the Fv-4 resistance gene. *J Gen Virol* **73**, 1925–1930 (1992).
6. Takeda, A. & Matano, T. Inhibition of infectious murine leukemia virus production by Fv-4 env gene products exerting dominant negative effect on viral envelope glycoprotein. *Microbes and infection* **9**, 1590–6 (2007).
7. Dupressoir, A. *et al.* Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 725–30 (2005).
8. Mi, S. *et al.* Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**, 785–789 (2000).
9. Matsui, T. *et al.* SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO molecular medicine* **3**, 320–33 (2011).
10. Bernard, D. *et al.* Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **125**, 278–87 (2005).
11. Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* **4**, 491–500 (2002).
12. Belyi, V. A., Levine, A. J. & Skalka, A. M. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* **6**, e1001030 (2010).

13. Horie, M. *et al.* Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* **463**, 84–87 (2010).
14. Katzourakis, A. & Gifford, R. J. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet* **6**, e1001191 (2010).
15. Shi, M. *et al.* The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556**, 197–202 (2018).
16. Kawasaki, J., Kojima, S., Mukai, Y., Tomonaga, K. & Horie, M. 100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**, (2021).
17. Cui, J. & Wang, L. F. Genomic Mining Reveals Deep Evolutionary Relationships between Bornaviruses and Bats. *Viruses* **7**, 5792–5800 (2015).
18. Gilbert, C. *et al.* Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc Biol Sci* **281**, 20141122 (2014).
19. Horie, M. & Tomonaga, K. Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. *Virus Res* **262**, 2-9 (2018).
20. Horie, M., Kobayashi, Y., Suzuki, Y. & Tomonaga, K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20120499 (2013).
21. Horie, M. *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep* **6**, 25873 (2016).
22. Kobayashi, Y. *et al.* Exaptation of Bornavirus-Like Nucleoprotein Elements in Afrotherians. *PLoS Pathog* **12**, e1005785 (2016).
23. Hyndman, T. H., Shilton, C. M., Stenglein, M. D. & Wellehan, J. F. X. Divergent bornaviruses from Australian carpet pythons with neurological disease date the origin of extant Bornaviridae prior to the end-Cretaceous extinction. *PLoS Pathog* **14**, e1006881 (2018).
24. Sofuku, K., Parrish, N. F., Honda, T. & Tomonaga, K. Transcription Profiling Demonstrates Epigenetic Control of Non-retroviral RNA Virus-Derived Elements in the Human Genome. *Cell Rep* **12**, 1548–1554 (2015).
25. Fujino, K., Horie, M., Honda, T., Merriman, D. K. & Tomonaga, K. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13175–13180 (2014).

26. Fujino, K. *et al.* A Human Endogenous Bornavirus-Like Nucleoprotein Encodes a Mitochondrial Protein Associated with Cell Viability. *Journal of virology* **95**, e0203020 (2021).
27. Zheng, J. *et al.* Deep-RBPPred: Predicting RNA binding proteins in the proteome scale based on deep learning. *Scientific reports* **8**, 15264 (2018).
28. Hock, M. *et al.* RNA induced polymerization of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* **397**, 64–72 (2010).
29. Moran, J. v *et al.* High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* **87**, 917–927 (1996).
30. Mugal, C. F., Wolf, J. B. & Kaj, I. Why time matters: codon evolution and the temporal dynamics of dN/dS. *Mol Biol Evol* **31**, 212–231 (2014).
31. Rudolph, M. G. *et al.* Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure* **11**, 1219–1226 (2003).
32. Tang, X. & Bruce, J. E. Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods Mol Biol* **492**, 283–293 (2009).
33. Aswad, A. & Katzourakis, A. Paleovirology and virally derived immunity. *Trends Ecol Evol* **27**, 627–636 (2012).
34. Matsumoto, Y. *et al.* Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* **11**, 492–503 (2012).
35. Sasaki, S. & Ludwig, H. In borna disease virus infected rabbit neurons 100 nm particle structures accumulate at areas of Joest-Degen inclusion bodies. *Zentralbl Veterinarmed B* **40**, 291–297 (1993).
36. Chase, G. *et al.* Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* **81**, 743–749 (2007).
37. Schneider, U., Naegel, M., Staeheli, P. & Schwemmle, M. Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* **77**, 11781–11789 (2003).
38. Komatsu, Y., Tanaka, C., Komorizono, R. & Tomonaga, K. In vivo biodistribution analysis of transmission competent and defective RNA virus-based episomal vector. *Scientific reports* **10**, 5890 (2020).

39. Daito, T. *et al.* A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. *Journal of virology* **85**, 12170–8 (2011).
40. Palanichamy, J. K. *et al.* RNA-binding protein IGF2BP3 targeting of oncogenic transcripts promotes hematopoietic progenitor proliferation. *The Journal of clinical investigation* **126**, 1495–511 (2016).
41. Hung, T. *et al.* The Ro60 autoantigen binds endogenous retroelements and regulates inflammatory gene expression. *Science* **350**, 455–9 (2015).
42. Fu, K. *et al.* Biological and RNA regulatory function of MOV10 in mammalian germ cells. *BMC biology* **17**, 39 (2019).
43. Kini, H. K., Silverman, I. M., Ji, X., Gregory, B. D. & Liebhaber, S. A. Cytoplasmic poly(A) binding protein-1 binds to genomically encoded sequences within mammalian mRNAs. *RNA* **22**, 61–74 (2016).
44. Kini, H. K., Kong, J. & Liebhaber, S. A. Cytoplasmic poly(A) binding protein C4 serves a critical role in erythroid differentiation. *Molecular and cellular biology* **34**, 1300–9 (2014).
45. Kondo, Y., Oubridge, C., van Roon, A.-M. M. & Nagai, K. Crystal structure of human U1 snRNP, a small nuclear ribonucleoprotein particle, reveals the mechanism of 5' splice site recognition. *eLife* **4**, (2015).
46. Gallia, G. L., Johnson, E. M. & Khalili, K. Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic acids research* **28**, 3197–205 (2000).
47. Pizarro, J. G. & Cristofari, G. Post-Transcriptional Control of LINE-1 Retrotransposition by Cellular Host Factors in Somatic Cells. *Frontiers in cell and developmental biology* **4**, 14 (2016).
48. Taylor, M. S. *et al.* Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell* **155**, 1034–48 (2013).
49. Goodier, J. L., Cheung, L. E. & Kazazian, H. H. Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic acids research* **41**, 7401–19 (2013).
50. Moldovan, J. B. & Moran, J. v. The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and Alu Retrotransposition. *PLoS genetics* **11**, e1005121 (2015).

51. Kobayashi, T., Winslow, S., Sunesson, L., Hellman, U. & Larsson, C. PKC α binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. *PloS one* **7**, e35820 (2012).
52. Gallois-Montbrun, S. *et al.* Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *Journal of virology* **81**, 2165–78 (2007).
53. Goodier, J. L., Cheung, L. E. & Kazazian, H. H. MOV10 RNA helicase is a potent inhibitor of retrotransposition in cells. *PLoS genetics* **8**, e1002941 (2012).
54. Burgess, H. M. *et al.* Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. *Journal of cell science* **124**, 3344–55 (2011).
55. Burgess, H. M. & Gray, N. K. An integrated model for the nucleo-cytoplasmic transport of cytoplasmic poly(A)-binding proteins. *Communicative & integrative biology* **5**, 243–7 (2012).
56. Daigle, J. G. *et al.* Pur-alpha regulates cytoplasmic stress granule dynamics and ameliorates FUS toxicity. *Acta neuropathologica* **131**, 605–20 (2016).
57. Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in cell biology* **26**, 668–679 (2016).
58. Kedersha, N. *et al.* G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *The Journal of cell biology* **212**, 845–60 (2016).
59. Kazazian, H. H. Genetics. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science* **289**, 1152–1153 (2000).
60. Doucet, A. J. *et al.* Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS genetics* **6**, (2010).
61. Hu, S. *et al.* SAMHD1 Inhibits LINE-1 Retrotransposition by Promoting Stress Granule Formation. *PLoS genetics* **11**, e1005367 (2015).
62. Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R. & Kazazian, H. H. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol Cell Biol* **27**, 6469–6483 (2007).

63. Kimberland, M. L. *et al.* Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* **8**, 1557–1560 (1999).
64. Farkash, E. A., Kao, G. D., Horman, S. R. & Prak, E. T. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Res* **34**, 1196–1204 (2006).
65. Martin, E. W. & Holehouse, A. S. Intrinsically disordered protein regions and phase separation: sequence determinants of assembly or lack thereof. *Emerging topics in life sciences* **4**, 307–329 (2020).
66. Prilusky, J. *et al.* FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* **21**, 3435–3438 (2005).
67. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
68. van Nostrand, E. L. *et al.* Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods* **13**, 508–514 (2016).
69. Best, S., le Tissier, P., Towers, G. & Stoye, J. P. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* **382**, 826–829 (1996).
70. Mura, M. *et al.* Late viral interference induced by transdominant Gag of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11117–11122 (2004).
71. Cuevas, R. A. *et al.* MOV10 Provides Antiviral Activity against RNA Viruses by Enhancing RIG-I-MAVS-Independent IFN Induction. *J Immunol* **196**, 3877–3886 (2016).
72. Reineke, L. C., Kedersha, N., Langereis, M. A., van Kuppeveld, F. J. M. & Lloyd, R. E. Stress granules regulate double-stranded RNA-dependent protein kinase activation through a complex containing G3BP1 and Caprin1. *mBio* **6**, e02486 (2015).
73. Reineke, L. C. & Lloyd, R. E. The stress granule protein G3BP1 recruits protein kinase R to promote multiple innate immune antiviral responses. *Journal of virology* **89**, 2575–89 (2015).
74. Onomoto, K. *et al.* Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PloS one* **7**, e43031 (2012).

75. Strange, K. Cellular volume homeostasis. *Advances in physiology education* **28**, 155–9 (2004).
76. Bourque, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature reviews. Neuroscience* **9**, 519–31 (2008).
77. Handler, J. S. & Kwon, H. M. Kidney cell survival in high tonicity. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* **117**, 301–6 (1997).
78. Halterman, J. A., Kwon, H. M. & Wamhoff, B. R. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C1-8 (2012).
79. Miyakawa, H., Woo, S. K., Dahl, S. C., Handler, J. S. & Kwon, H. M. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2538–42 (1999).
80. Bounedjah, O. *et al.* Macromolecular crowding regulates assembly of mRNA stress granules after osmotic stress: new role for compatible osmolytes. *The Journal of biological chemistry* **287**, 2446–58 (2012).
81. Mahboubi, H. & Stochaj, U. Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 884–895 (2017).
82. Franchini, D. M. *et al.* Microtubule-Driven Stress Granule Dynamics Regulate Inhibitory Immune Checkpoint Expression in T Cells. *Cell Rep* **26**, 94-107.e7 (2019).
83. Ramaswami, M., Taylor, J. P. & Parker, R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell* **154**, 727–36 (2013).
84. Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J. & Gitler, A. D. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of cell biology* **201**, 361–72 (2013).
85. Kiebler, M. A. & Bassell, G. J. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**, 685–90 (2006).
86. Barbee, S. A. *et al.* Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**, 997–1009 (2006).
87. Beck, C. R. *et al.* LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* **141**, 1159–1170 (2010).

88. Li, X. *et al.* The MOV10 helicase inhibits LINE-1 mobility. *J Biol Chem* **288**, 21148–21160 (2013).
89. Giorgi, G., Virgili, M., Monti, B. & del Re, B. Long INterspersed nuclear Elements (LINEs) in brain and non-brain tissues of the rat. *Cell Tissue Res* **374**, 17–24 (2018).
90. Sookdeo, A., Hepp, C. M. & Boissinot, S. Contrasted patterns of evolution of the LINE-1 retrotransposon in perissodactyls: the history of a LINE-1 extinction. *Mobile DNA* **9**, 12 (2018).
91. Cantrell, M. A., Scott, L., Brown, C. J., Martinez, A. R. & Wichman, H. A. Loss of LINE-1 activity in the megabats. *Genetics* **178**, 393–404 (2008).
92. Grahn, R. A., Rinehart, T. A., Cantrell, M. A. & Wichman, H. A. Extinction of LINE-1 activity coincident with a major mammalian radiation in rodents. *Cytogenetic and genome research* **110**, 407–15 (2005).
93. Platt, R. N., Mangum, S. F. & Ray, D. A. Pinpointing the vesper bat transposon revolution using the *Miniopterus natalensis* genome. *Mob DNA* **7**, 12 (2016).
94. Senft, A. D. & Macfarlan, T. S. Transposable elements shape the evolution of mammalian development. *Nature reviews. Genetics* **22**, 691–711 (2021).
95. Frank, J. A. & Feschotte, C. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. *Current opinion in virology* **25**, 81–89 (2017).
96. Chuong, E. B., Elde, N. C. & Feschotte, C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* **351**, 1083–1087 (2016).
97. Tokunaga, T., Yamamoto, Y., Sakai, M., Tomonaga, K. & Honda, T. Antiviral activity of favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. *Antiviral Res* **143**, 237–245 (2017).
98. 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).
99. Yanai, M., Sakai, M., Makino, A. & Tomonaga, K. Dual function of the nuclear export signal of the Borna disease virus nucleoprotein in nuclear export activity and binding to viral phosphoprotein. *Virology journal* **14**, 126 (2017).

100. Yanai, H. *et al.* Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal. *Microbes Infect* **8**, 1522–1529 (2006).
101. Perez, M., Sanchez, A., Cubitt, B., Rosario, D. & de la Torre, J. C. A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* **84**, 3099–3104 (2003).
102. 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).
103. Singh, U. & Wurtele, E. S. orfipy: a fast and flexible tool for extracting ORFs. *Bioinformatics* **37**, 3019-3020 (2021).
104. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772–780 (2013).
105. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M. & Hedges, S. B. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol Biol Evol* **34**, 1812–1819 (2017).
106. Nei, M. & Gojobori, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**, 418–426 (1986).
107. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870–1874 (2016).
108. Wang, Z. *et al.* Unique expression patterns of multiple key genes associated with the evolution of mammalian flight. *Proc Biol Sci* **281**, 20133133 (2014).

注釈

本論文では、趣旨を明快にするため、共同研究者の方々のご協力により得られたデータも示した。本研究で行った EBLN 探索は、当研究室の博士課程学生である川崎純菜氏により得られた結果に基づいて行われた。また、表 1 および表 2 は、当時日本大学生物資源科学部動物医科学研究センターに所属されていた故 鈴木由紀准教授と共同で行った解析により得られた結果である。

本学位論文は以下の学術論文に基づいて作成したものである。

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Shohei Kojima, Junna Kawasaki, and Keizo Tomonaga.

An endogenous bornavirus-like nucleoprotein in miniopterid bats retains the RNA-binding properties of the original viral protein.

FEBS Letters, Volume 596, Issue 3, 2022. DOI: 10.1002/1873-3468.14290

謝辞

本研究の機会を与えていただき、終始ご指導を賜りました京都大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門 RNA ウイルス分野の朝長啓造教授に心より感謝いたします。また、本研究遂行にあたり、多くの知識や示唆を頂戴いたしました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻の堀江真行教授に深く感謝いたします。

当時日本大学生物資源科学部動物医科学研究センターに所属されていた故 鈴木由紀准教授には、共同研究者として進化学的解析にご協力いただいた上、本研究遂行にあたり多くの知識や示唆を頂戴いたしました。ここに、感謝の意を示します。

京都大学生命科学研究科統合生命科学専攻細胞周期学分野の石川冬木教授ならびに渡邊祐三技術職員には、質量分析解析に関する知識および技術の提供を賜りました。ここに、感謝の意を示します。

京都大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門免疫制御分野の竹本経緯子助教授には RNA-seq 解析のデータ処理に関する知識を頂きました。ここに、感謝の意を示します。

国立感染症研究所獣医科学部の前田健部長には、ユビナガコウモリの生体サンプルの供与を賜りました。ここに、感謝の意を示します。

日頃より多大なるご協力、ご支援いただきました京都大学ウイルス・再生医科学研究所 RNA ウイルス分野の皆様には感謝申し上げます。

最後に、この研究を博士論文として形にするまで続けることができたのは、これまで温かく見守っていただいた家族、友人諸兄のおかげです。心から感謝の気持ちとお礼を申し上げます。