

**A-to-I 編集酵素 ADAR2 を利用した
ボルナ病ウイルスの自然免疫回避機構**

柳井 真瑚

目次

要旨

略語表

第一章 序論

- 1-1. ボルナ病ウイルスの基本性状
- 1-2. A-to-I 編集酵素 ADAR の機能
- 1-3. 自然免疫における自己/非自己認識機構
- 1-4. ウイルス感染における ADAR の役割
- 1-5. ボルナ病ウイルス感染における自然免疫応答

第二章 結果

- 2-1. BoDV の感染初期に ADAR は重要である。
- 2-2. ADAR2 ノックダウンは抗ウイルス応答を誘導する。
- 2-3. ADAR2 は BoDV 感染の広がりに関与する。
- 2-4. ADAR2 は BoDV 持続感染の維持に働く。
- 2-5. ADAR2 ノックアウトは BoDV の感染効率を減少させる。
- 2-6. ADAR2 の A-to-I 編集活性は BoDV の感染に重要である。
- 2-7. ADAR2 は BoDV ゲノム RNA を編集する。
- 2-8. BoDV ゲノム RNA への ADAR2 による A-to-I 編集は自然免疫の誘導を抑制する。

第三章 考察

- 3-1. 本研究の意義
- 3-2. ADAR2 と BoDV における相互作用の特異性
- 3-3. 宿主における ADAR2 の自然免疫抑制作用

3-4. ADAR2 ノックダウンによる宿主因子を介した BoDV 感染抑制機構

3-5. BoDV のゲノム RNA への編集を介した自然免疫抑制機構

第四章 材料と方法

引用文献

注釈

謝辞

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。

ADAR1	: Adenosine deaminase acting on RNA 1
ADAR2	: Adenosine deaminase acting on RNA 2
ADAR3	: Adenosine deaminase acting on RNA 3
ALS	: Amyotrophic lateral sclerosis
AMPA	: α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
A-to-G	: Adenosine to guanine
A-to-I	: Adenosine to inosine
BoDV	: Borna disease virus
BPB	: Bromophenol blue
Ca	: Calcium
CRISPR	: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
CXCL1	: C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL5	: C-X-C motif chemokine ligand 5
CXCL8	: C-X-C motif chemokine ligand 8
CXCL10	: C-X-C motif chemokine ligand 10
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DI RNA	: Defective interfering RNA
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EGFP	: Enhanced green fluorescent protein
FCS	: Fetal calf serum
G	: Glycoprotein
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GluR2	: Glutamate receptor 2
Go	: Gene ontology
gRNA	: guide RNA
HCl	: Hydrochloric acid

HDV	: Hepatitis delta virus
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	: Human immune deficiency virus
IAV	: Influenza A virus
IFA	: Indirect immune fluorescence assay
IgG	: Immunoglobulin G
IL-1 β	: Interleukin 1 β
IL-6	: Interleukin 6
L	: RNA dependent RNA polymerase
L-HDAg	: Large delta antigen
M	: Matrix protein
MDA5	: Melanoma differentiation-associated gene 5
MDCK	: Madin-Darby canine kidney
MEM	: Minimum Essential Medium
MOI	: Multiplicity of infection
MgCl ₂	: Magnesium chloride
MeV	: Measles virus
miRNA	: microRNA
mRNA	: Messenger RNA
N	: Nucleoprotein
NF- κ b1	: Nuclear factor-kappa B1
OAS	: 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase
OL	: Oligodendroglioma
P	: Phosphoprotein
PAMPs	: Pathogen-associated molecular patterns
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
pH	: Potential of hydrogen
PKR	: Protein kinase R
PTX3	: Pentraxin 3
PVDF	: Polyvinylidene difluoride

Rab27b	: Ras-related protein Rab-27b
RFP	: Red fluorescent protein
RIG-I	: Retinoic acid-inducible gene-I
RIP	: RNA immunoprecipitation
RNA	: Ribonucleic acid
RT-PCR	: Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-qPCR	: Real-time quantitative polymerase chain reaction
SAFA	: Scaffold-attachment factor A
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
S-HDAg	: Small delta antigen
shRNA	: Small hairpin RNA
siRNA	: Small interfering RNA
SSPE	: Subacute sclerosing panencephalitis
TBS	: Tris buffered saline
Tris	: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
Triton X-100	: Octylphenol ethoxylate
Tween-20	: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
vRNP	: Viral ribonucleoprotein
vSPOT	: Viral speckle of transcripts
WB	: Western blotting
X	: X protein
°C	: Degree Celsius
kb	: Kilobase
M	: Mole
µg	: Microgram
µL	: Microliter
µm	: Micrometer
mM	: Millimolar
nm	: Nanometer
%	: Percent
rpm	: Rotations per minute

要旨

宿主は二本鎖 RNA を非自己として認識し、自然免疫を誘導する。一方で、宿主は自己の二本鎖 RNA による自然免疫の誘導を防ぐために、ADAR1 (Adenosine deaminase acting on RNA 1) の A-to-I 編集活性を利用し、二本鎖 RNA の構造変化を促し、RNA センサー分子による認識を回避している。ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BoDV) は非分節一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムにもつウイルスで、核内で複製して細胞非傷害性に持続感染する。BoDV がウイルス由来二本鎖 RNA の非自己認識をどのように回避しているのか、その機構は明らかでない。そこで私は、ADAR に着目し、BoDV 感染における ADAR の意義およびその分子基盤の解明を目的として研究をおこなった。

ADAR ファミリーのうち、A-to-I 編集活性をもつ ADAR1 と ADAR2 のノックダウン細胞を樹立し、BoDV 感染初期に対する ADAR の関与を評価した。その結果、両ノックダウン細胞は BoDV 感染効率を減少させ、ADAR1 と ADAR2 いずれもが BoDV 感染に重要であることが明らかとなった。ADAR1 は宿主の非自己認識の回避に関与しているが、ADAR2 については不明である。そこで、非感染の ADAR2 ノックダウン細胞の遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析により評価した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞において免疫、炎症関連遺伝子群の発現が有意に上昇したことから、ADAR2 も非感染状態における自然免疫の抑制に寄与していることが示された。

BoDV は主に細胞間接着と細胞分裂を介して感染を広げる。そこで BoDV 感染の広がりに対する ADAR の影響を評価したところ、ADAR2 のノックダウンは BoDV 感染の広がりを抑制したが、ADAR1 のノックダウンは影響を与えなかった。そこで ADAR2 に着目し、BoDV 持続感染の維持に対する影響を評価した。BoDV 持続感染細胞中の ADAR2 をノックダウンしたところ、ウイルス

ゲノム RNA 量およびウイルス力価が減少した。これらの結果より、ADAR2 が BoDV の生活環全体を通じて重要な役割を果たすことが示唆された。ADAR2 の重要性をさらに検証するために、ADAR2 ノックアウト細胞株を樹立し、BoDV 感染初期への影響を評価し、ADAR2 ノックアウト細胞でも BoDV 感染効率は減少し、ADAR2 は BoDV 感染に重要な因子であることが支持された。

次に、ADAR2 ノックダウン細胞の A-to-I 編集活性を評価したところ、A-to-I 編集活性が検出限界以下に減少していることが明らかとなった。そこで、A-to-I 編集活性の重要性を評価するために、表現型回復実験をおこなった。ADAR2 ノックダウン細胞に野生型 ADAR2 を発現させると BoDV の感染効率が回復したが、ADAR2 編集活性欠損変異体では回復しなかった。このことから、ADAR2 の A-to-I 編集活性が BoDV 感染に重要であることが示唆された。次に BoDV ゲノム RNA が、ADAR2 による A-to-I 編集を受けているかを検討するために、ADAR2 ノックダウン細胞と野生型細胞それぞれに感染している BoDV の配列比較と、ADAR2-BoDV ゲノム RNA の相互作用解析を実施した。その結果、ADAR2 が BoDV ゲノム RNA を基質として A-to-I 編集していることが示唆された。BoDV ゲノム RNA に対する A-to-I 編集の自然免疫に対する影響を評価するために、ADAR2 ノックダウン細胞より BoDV を回収し、感染実験をおこなった。その結果、非編集のゲノム RNA をもつ BoDV は、編集を受けた BoDV よりも免疫応答を強く誘導した。

以上の結果から、BoDV が核内で持続感染を成立させるために、ADAR2 の A-to-I 編集を利用して非自己認識を回避し、自然免疫の誘導を抑制していることが示された。本研究により、ウイルスが宿主の機構を利用して免疫を回避する新しいメカニズムが明らかになった。

第一章

序論

1-1. ボルナ病ウイルスの基本性状

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BoDV) は全長 8.9 kb の非分節一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムに持つウイルスで、モノネガウイルス目、ボルナウイルス科、オルソボルナウイルス属に属する¹。BoDV の宿主域は広く、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ネコなど様々な哺乳動物への自然感染が報告されている。BoDV は向神経性を示し、主にウマやヒツジなど感受性の高い動物に致死性の脳脊髄炎を引き起こす^{2,3}。しかし多くの哺乳動物において、BoDV は劇的な症状を引き起こさず、中枢神経系に持続感染する^{3,4}。

ヒトへの BoDV 感染については、散発的な報告はあるものの、精神疾患や神経疾患との因果関係については明らかにされていなかった^{5,6}。しかし 2018 年、ドイツで 1 人のドナーから臓器移植を受けた患者 3 人が BoDV 感染による急性脳炎を発症し、うち 2 人が死亡した⁷。また同年ドイツで、健康な 25 歳男性が BoDV 感染による急性脳炎で死亡した例が報告された⁸。2019 年には、原因不明の脳炎で亡くなった患者 6 人の脳を *in situ hybridization* により検証したところ、全ての患者から BoDV の RNA が検出された⁹。これらの報告により、現在では BoDV はヒトに致死性の脳炎を起こしうると考えられている。

BoDV はエンベロープに覆われた、直径 100~130 nm の球形の粒子を形成する¹⁰。8.9 kb のゲノムには 3'末端から順に、核タンパク質 (N)、リン酸化タンパク質 (P)、X タンパク質 (X)、マトリックスタンパク質 (M)、糖タンパク質 (G)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) の少なくとも 6 つの遺伝子がコードされている¹¹。また、ゲノムの両末端には転写と複製に必須のリーダー配列およびトレーラー配列をもつ¹²。N、P、L はゲノム RNA と共にウイルスリボ核タンパク質 (viral ribonucleoprotein: vRNP) を形成し、転写および複製を担う¹³⁻¹⁵。M と G 共にウイルス粒子を形成する¹⁶。X は非構造タンパク質で、P との相互

作用を介して BoDV の複製に抑制的に作用する^{17,18}。

多くの RNA ウイルスと異なり、BoDV は核内で転写、複製をおこない持続感染を成立させる^{19,20}。BoDV 持続感染細胞から放出されるウイルス粒子量は極めて少なく、主に細胞分裂、または細胞間接着を介して感染を広げていく^{16,21}。細胞分裂時には、vRNP が宿主のクロマチンに結合し、娘細胞へと分配されることで持続感染が維持されている^{22,23}。また、持続感染細胞核内には vSPOT (viral speckle of transcripts) と呼ばれるドット状の構造物が観察される。vSPOT には vRNP を構成するウイルスタンパク質およびゲノム RNA に加えて、アンチゲノム RNA も検出されることから、vSPOT は BoDV の複製の場であると考えられている^{22,23}。

1-2. A-to-I 編集酵素 ADAR の機能

ADAR により触媒される A-to-I 編集は、二本鎖 RNA 中のアデノシンが加水分解による脱アミノ反応を経て、イノシンへと置換される反応である^{24,25}。生じたイノシンの構造はグアニンと類似しているため、シーケンス解析や翻訳の際にはグアニンとして認識される^{24,25} (図 1)。

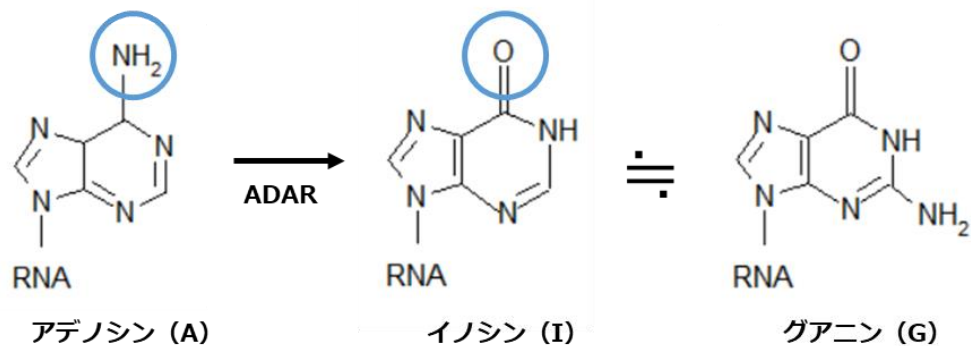


図 1. ADAR に A-to-I 編集の概略図

ADAR は加水分解的脱アミノ化反応によりアデノシンをイノシンへと置換 (A-to-I 編集) する酵素である。A-to-I 編集の結果生じたイノシンは、グアニンと構造が類似しているため、シーケンス解析や翻訳の際には、イノシンとして認識される。

A-to-I 編集は、1987 年にアフリカツメガエルの初期胚抽出物内で、二本鎖 RNA 構造を巻き戻す unwinding 活性として初めて報告された²⁶。後に、この unwinding 活性が A-to-I 編集によって引き起こされた二本鎖 RNA の構造変化であることが証明され、続いて A-to-I 編集の責任遺伝子である ADAR (Adenosine deaminase acting on RNA) が同定された^{24,27}。ADAR は線虫からヒトまで広く保存されており、哺乳類では ADAR1、ADAR2 および ADAR3 が同定されている^{28,29}。ADAR1-3 はいずれも保存された二本鎖 RNA 結合領域および、デアミナーゼ領域を有しているが、哺乳類においては ADAR1 と ADAR2 のみが A-to-I 編集活性を示す²⁹ (図 2)。

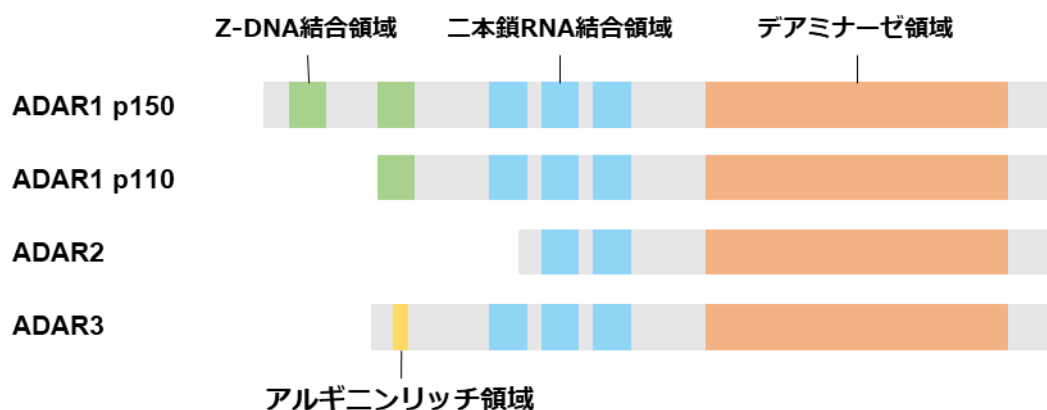


図 2. ADAR ファミリーの構造

哺乳類では ADAR1-3 が同定されており、共通して類似した構造をもつが、ADAR1 と ADAR2 のみが A-to-I 編集活性を示す。

ADAR1 は広範に発現しており、恒常発現型の p110 とインターフェロン誘導性の p150 の 2 つのアイソフォームをもつ³⁰。p110 は核内と細胞質の両方に

局在する一方で、p150 は細胞質にのみ局在する^{31,32}。また、ADAR1 は N 末端側に Z 型 DNA 結合領域を 2 つ有しており、二本鎖 RNA との結合を維持する機能があると示唆されている^{33,34}。ADAR2 は中枢神経系に高く発現し、細胞核内に局在する^{35,36}。ADAR3 も同じく中枢神経系に高発現するが、その詳しい生理機能は明らかにされていない。しかし ADAR1 および ADAR2 による A-to-I 編集を妨げるドミナントネガティブとして機能している可能性が示唆されている^{29,37}。

ADAR1 と ADAR2 の基質となる二本鎖 RNA に特徴的なモチーフは見つかっていない。しかし、RNA 編集を網羅的に解析するエディトーム解析から、ADAR1 は繰り返し配列を、ADAR2 は非繰り返し配列の翻訳領域を主な基質とすることが示唆されている³⁷。また、編集を受けるアデノシンを中心としたトリプレットは、編集の頻度に応じてクラス I から III に分類されている³⁸。

mRNA、miRNA、ノンコーディング RNA など細胞中の様々な RNA で A-to-I 編集は生じており、生命活動に対する影響も多岐にわたる³⁹。イノシンの構造はグアニンと類似しているため、タンパク質の翻訳やシーケンス解析の際に、グアニンとして認識される (図 1)。そのため、翻訳領域への A-to-I 編集は、タンパク質の構造と機能を変化させる。このような現象は、脳内で発現している神経伝達物質受容体でよく観察されている⁴⁰⁻⁴²。例えば、AMPA 型グルタミン酸受容体 (Glutamate receptor 2: GluR2) の mRNA には、Q/R 部位と呼ばれ、ADAR2 からほぼ 100% の効率で編集を受けるアデノシンがある⁴³。ADAR2 ノックアウトマウスは、その Q/R 部位への編集不全から Ca²⁺透過性の高い GluR2 のみが産出され、最終的には Ca²⁺の過剰流入により細胞死が誘導され死に至る^{44,45}。さらに GluR2 の編集不全は、孤発性筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や、統合失調症といった神経・精神疾患との因果関係が証明されている⁴⁶⁻⁴⁸。このように、A-to-I 編集により多様なバリエーションを作り出すことは、正常な

脳の発達と機能、生命活動に必須である。

また、A-to-I 編集は、スプライシングドナーやアクセプターサイトの付加、またはブランチポイントの除去を介してスプライシングパターンを変化させ、遺伝子発現を制御にも関与している⁴⁹。さらに、A-to-I 編集により二本鎖 RNA が構造変化を起こすことで、RNA 結合タンパク質の RNA への到達性が変わり、RNA の安定性や局在の制御、免疫応答誘導の回避にも寄与している⁵⁰⁻⁵³。

1-3. 自然免疫における自己/非自己認識機構

ヒトを含む高等生物には、自然免疫と獲得免疫の2つの免疫系が備わっており、両者の協働により病原体の排除が達成される。自然免疫は、病原体が感染してすぐに機能する免疫系で、病原体由来のタンパク質や核酸の特徴的な分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識して非自己とみなし、病原体排除のためのシグナルおよび、適応免疫を誘導する^{54,55}。ウイルス RNA の PAMPs は、5'末端の三リン酸と二本鎖構造が同定されている。宿主は、これら2つの特徴を認識する RNA センサー分子をそれぞれ発現しており、自己と非自己の識別に用いる。5'末端に三リン酸をもつ RNA は RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) に、二本鎖 RNA は、RIG-I、MDA5 (Melanoma differentiation-associated protein 5)、OAS (Oligoadenylate synthase)、PKR (Protein kinase double strand RNA dependent) などにより細胞質で認識される^{52,53,56-58}。また近年、核内でも SAFA (Scaffold-attachment factor A) が二本鎖 RNA を認識することも報告されている⁵⁹。PAMPs の認識後、下流のシグナル伝達が活性化され、インターフェロンや炎症性サイトカインの発現が誘導され、抗ウイルス状態になる。

病原体由来の分子を非自己として認識し、免疫応答を誘導するシステムは生命体に必要不可欠であるが、自己免疫疾患に見られるように、宿主の非自己

認識の厳密性には限界がある^{60,61}。上述のように、二本鎖 RNA はウイルス RNA の特徴であるが、宿主の Alu 配列を含む RNA は二本鎖を形成し、免疫応答を誘導する^{62,63}。そのため、宿主は自己が“非自己”として認識されるのを回避する機構を合わせ持っている。A-to-I 編集酵素である ADAR1 は、宿主 mRNA の 3' 非翻訳領域にある Alu 配列により形成された二本鎖 RNA を編集し、長い二本鎖 RNA 構造を消失させる。これにより、MDA5 からの認識を回避し、自己 RNA による自然免疫の誘導を抑制している。ADAR1 ノックアウトマウスは、A-to-I 編集活性の消失に伴い二本鎖 RNA が増加し、MDA5 に始まる過剰な免疫応答が誘導され、胎生致死となる⁵²。

1-4. ウイルス感染における ADAR の役割

ウイルスは宿主の様々な機構を自身の生活環に利用するが、ADAR による A-to-I 編集も例外ではない。D 型肝炎ウイルス (Hepatitis delta virus: HDV) は、その生活環に B 型肝炎ウイルスを必要とするウイルスで、約 1.7 kb の一本鎖マイナス鎖環状 RNA をゲノムにもつ⁶⁴。ゲノム RNA は分子内の相補性が高く、約 74%が塩基対を形成するため、ロッド状の二本鎖構造をとる^{65,66}。HDV のゲノム RNA には、複製に必要な S-HDAg (Small delta antigen) のみがコードされている。しかし感染後期になると、HDV は ADAR1 の A-to-I 編集を利用して S-HDAg のストップコドンを潰し、長いアイソフォームである L-HDAg (Large delta antigen) を発現させる^{65,67,68}。これにより、ウイルスの複製が抑えられ、ウイルス粒子の形成が始まる。また類似した例として、マウスポリオーマウイルスが挙げられる。同ウイルスの転写産物上には、感染初期と後期の遺伝子が重複している領域がある。そこには ADAR による A-to-I 編集が高頻度に生じる、ハイパー

エディティングが観察されることから、A-to-I 編集が感染初期と後期の遺伝子発現を制御するスイッチとして機能していることが示唆されている^{69,70}。

ADAR による A-to-I 編集は、ウイルスの生活環を制御するだけでなく、自然免疫からの回避にも寄与している。麻疹ウイルス (Measles virus: MeV) は、麻疹の原因ウイルスで、一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムにもつ。MeV 感染の多くは急性感染となるが、稀に脳内で持続感染し、亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) を引き起こす⁷¹。SSPE の患者の脳内で発現している MeV のマトリックスタンパク質 mRNA からは、ADAR によるハイパーエディティングが多く検出される⁷²。翻訳されたマトリックスタンパク質の抗原性は変化しており、MeV が獲得免疫系から逃れ、持続感染するために A-to-I 編集を利用していると考えられている⁷²。

また MeV は、その複製過程で欠陥干渉 RNA (defective interfering RNA: DI RNA) を産生する。DI RNA は二本鎖構造をとるため、RNA センサー分子に認識され、抗ウイルス応答を誘導する^{73,74}。MeV は自身の感染によって発現が誘導された ADAR1 p150 を利用し、DI RNA に A-to-I 編集を加え PKR からの認識を回避し、DI RNA による自然免疫応答の誘導の増幅を抑えている⁷⁵。

他にもヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) や⁷⁶⁻⁷⁹、A 型インフルエンザウイルス (Influenza A virus: IAV)^{80,81} などの RNA ウイルスで、編集活性依存的または非依存的な ADAR の関与が報告されているが、上述のような作用機序まで明らかにされている例は限られている。また、同じウイルスに対しても実験系によって ADAR の異なる作用が報告されており、ウイルス感染における ADAR の役割については解明すべき点が多く残されている⁸²。

1-5. ボルナ病ウイルス感染における自然免疫応答

BoDV はインターフェロン感受性であるが、培養細胞、実験動物において持続感染を成立させることから、BoDV は自然免疫を抑制する機構を有していると考えられている⁸³⁻⁸⁵。例えば、BoDV-N は、インターフェロンや炎症性サイトカインの転写因子として機能する NF- κ B1 のプロセッシングを阻害し、自然免疫応答の抑制に寄与することが報告されている⁸⁶。また、RIG-I による 5'末端三リン酸の認識を回避するために、BoDV のゲノム RNA 末端は複製過程でその 5'末端を一リン酸へと変化させている^{87,88}。このように、BoDV の免疫の抑制、回避の機構は解明されつつある。しかしながら、SAFA のような核内二本鎖 RNA センサー分子の存在が報告される一方で、核内で持続感染する BoDV が二本鎖 RNA 構造の認識を回避する戦略をもつのかは明らかにされていない。そこで私は宿主の A-to-I 編集による非自己認識の回避機構に着目し、BoDV 感染における ADAR の意義およびその分子基盤の解明を目的とし研究をおこなった。

第二章

結果

2-1. BoDV の感染初期に ADAR は重要である。

BoDV 感染における ADAR の影響を調べるために、ヒトオリゴデンドログリア細胞 (OL 細胞) にレンチウイルスを用いて ADAR1 または ADAR2 に対する shRNA を導入した。shRNA の設計は、共同研究者である小嶋将平博士 (京都大学) によりおこなわれた。shRNA 導入細胞の ADAR1 と ADAR2 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより解析したところ、ADAR1 と ADAR2 の発現量はそれぞれの shRNA を導入した細胞で有意に減少した。また、ADAR1 と ADAR2 のノックダウンは、互いに影響しなかった (図 3 AB)。

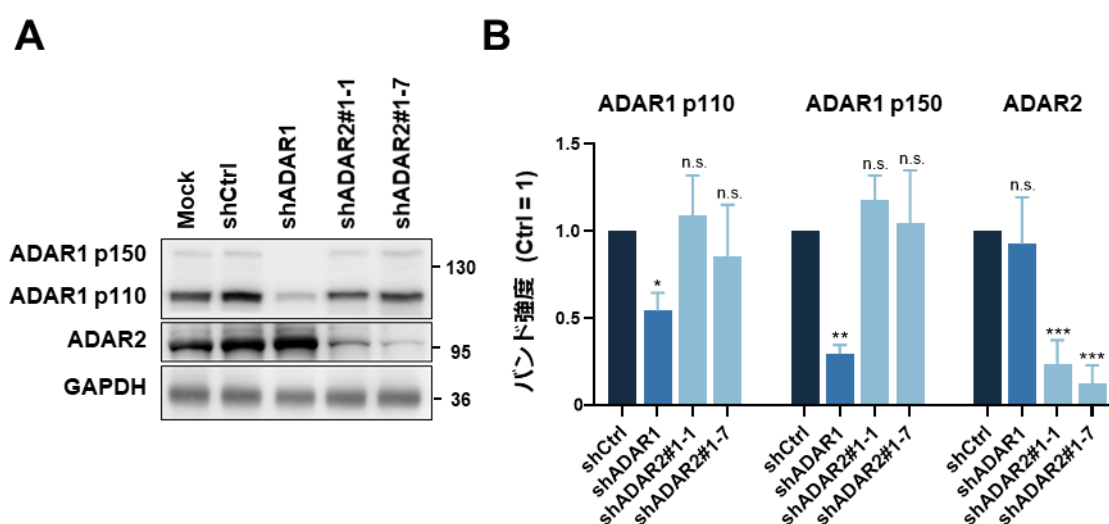


図 3. ADAR ノックダウン細胞株の樹立

(A) ADAR1 または ADAR2 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、OL 細胞に接種した。細胞をクローニングした後、ウェスタンブロッティングにより細胞中の ADAR1 および ADAR2 の発現量を解析した。GAPDH はローディングコントロールとして使用した。(B) ウェスタンブロッティングにより検出されたバンドの強度を定量した。値は GAPDH のバンド強度により補正した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., 有意差なし)

BoDV 感染初期において、ADAR が感染に関与しているかを評価するために、BoDV を MOI (Multiplicity of infection) = 1 または 10 で ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞に接種した。4 日後、抗 BoDV-P 抗体および DAPI を用いて間接免疫蛍光染色法 (Indirect immune fluorescence assay: IFA) を実施した (図 4A)。BoDV-P 陽性細胞をカウントし、感染細胞率を算出した結果、MOI=1 で BoDV を接種した時、野生型細胞では BoDV 感染細胞率が約 22%であった。それに対して、ADAR1 ノックダウン細胞では約 6%、ADAR2 ノックダウン細胞では約 8%と、両ノックダウン細胞において感染細胞率は有意に減少した (図 4B 左)。MOI = 10 で BoDV を接種した時も同様に、ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞で BoDV 感染細胞率は有意に減少した (図 4B 右)。

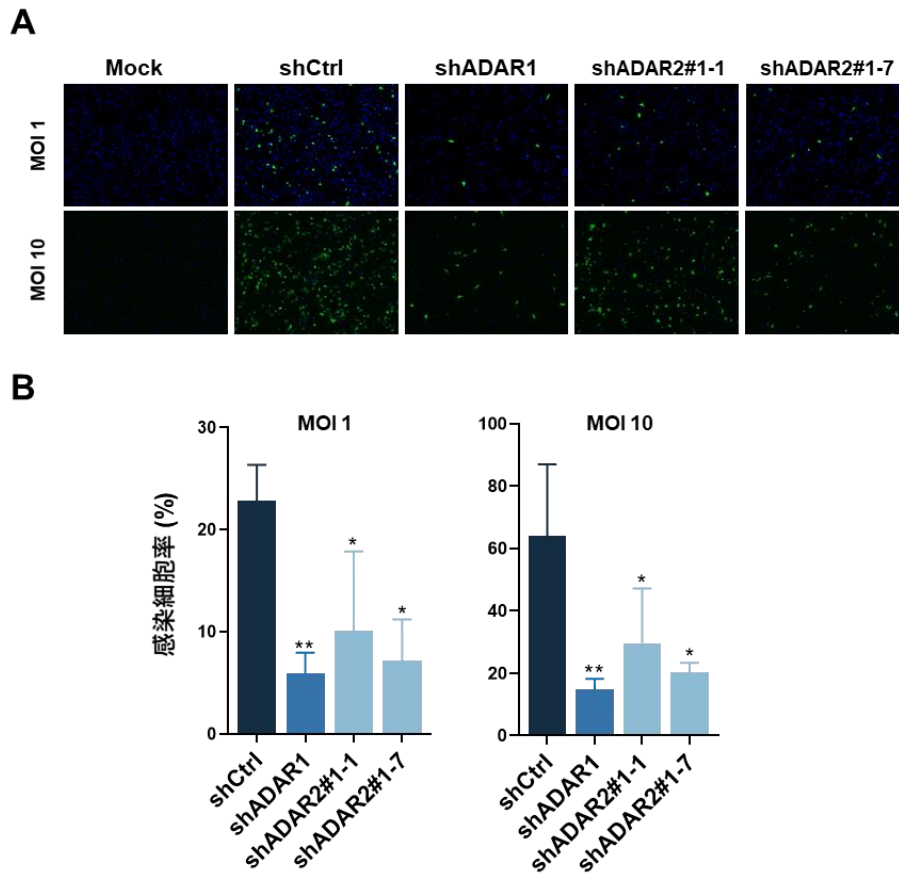


図 4. ADAR ノックダウン細胞における BoDV 感染初期の感染効率

(A) ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞に BoDV を MOI = 1 または 10 で接種した。4 日後、DAPI (青) および抗 BoDV-P 抗体 (緑) を用いて IFA をおこなった。(B) BoDV-P 陽性細胞率をカウントし、感染細胞率を算出した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

さらに、同細胞における BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR により定量したところ、感染効率の結果と一致して、ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞では、BoDV ゲノム RNA 量は有意に減少した (図 5A)。また、BoDV-N の発現量をウェスタンブロッティングにより解析し、検出されたバンドの強度を定量し比較した。その結果、BoDV-N の発現量も ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞で有意に減少した (図 5BC)。

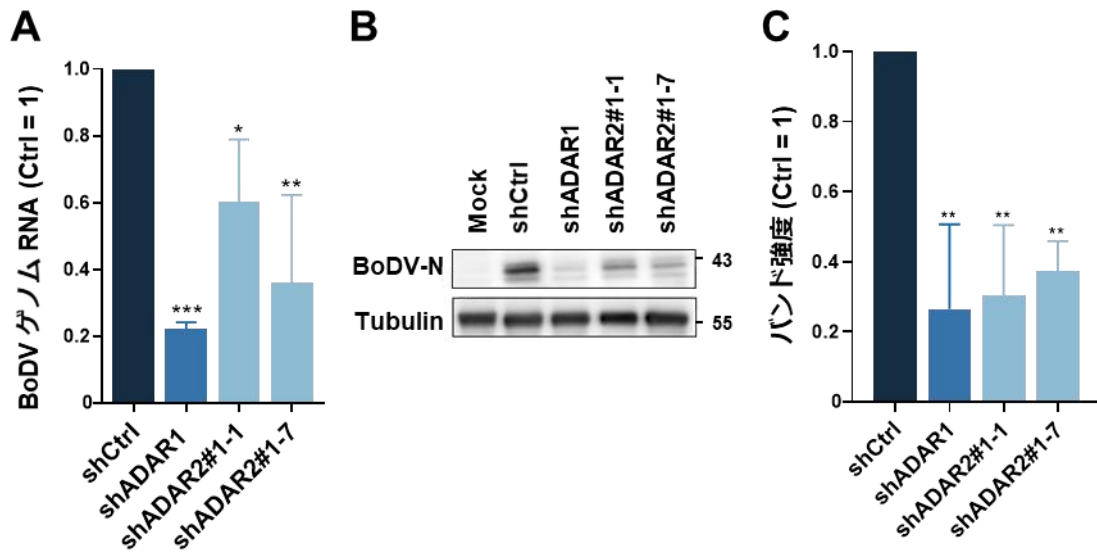


図 5. ADAR ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量と N 発現量

(A) BoDV を MOI=1 で ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞に接種してから 4 日後、ADAR1 または ADAR2 ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR により定量した。値は GAPDH で補正した。(B) 同細胞中の BoDV-N 発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。Tubulin はローディングコントロールとして使用した。(C) ウェスタンブロッティングにより検出されたバンドの強度を定量し、Tubulin のバンド強度で補正した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

2-2. ADAR2 ノックダウンは抗ウイルス応答を誘導する。

A-to-I 編集により RNA の二本鎖構造を変化させ、RNA への RNA 結合タンパク質の到達性を変えることは ADAR の重要な役割である^{50,51,53}。ADAR1 ノックアウトマウスは、A-to-I 編集の消失により二本鎖 RNA が増加し、MDA5 により惹起される過剰な免疫応答により胎生致死となる⁵²。このように ADAR1 は、自己が“非自己”として認識され、免疫応答が誘導されるのを回避するのに寄与

している。しかし一方で、ADAR1 と同じく A-to-I 編集活性をもつ ADAR2 の自然免疫に対する作用は明らかにされていない。そこで、ADAR2 ノックダウン細胞の発現変動遺伝子をマイクロアレイ解析により評価した。その結果、野生型細胞と比較して ADAR2 ノックダウン細胞で発現が 2 倍以上変動したものを 512 遺伝子同定した (図 6A)。さらに rank product 法により、特に発現変動量の大きい 65 遺伝子を抽出した。

次に、抽出した発現変動遺伝子の遺伝子オントロジー解析を、DAVID を用いておこなった。その結果、65 の発現変動遺伝子には、免疫および炎症関連遺伝子が有意に多く含まれていた (図 6B)。さらに、これらの遺伝子の発現は全て上昇していた。感染もしくはリガンドによる刺激がなくても、ADAR2 ノックダウン細胞で免疫、炎症関連遺伝子の発現が上昇していたことから、ADAR2 も ADAR1 と同様に非感染時の自然免疫の抑制に寄与していることが示唆された。

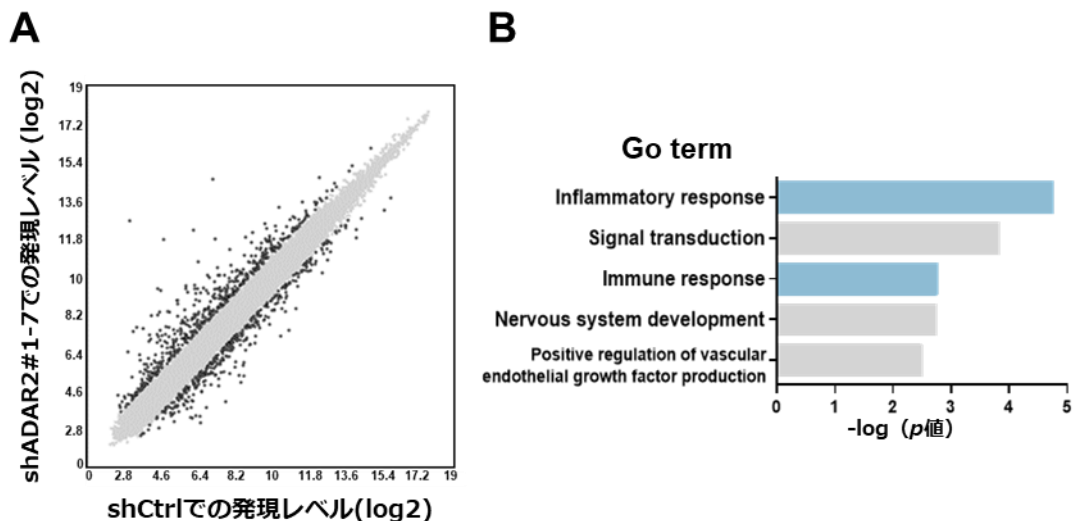


図 6. マイクロアレイによる ADAR2 ノックダウン細胞の発現変動遺伝子解析

(A) 非感染の ADAR2 ノックダウン細胞 (shADAR2#1-7) をマイクロアレイにより解析し、発現変動遺伝子を同定した。ADAR2 ノックダウン細胞で発現が 2 倍以上変動した 512 の遺伝子を黒で示す。(B) rank product 法により抽出された発現変動量の大きい 65 遺伝子に対する遺伝子オントロジー解析。エンリッチされていた上位 5 つの Go term を示し、青色は免

疫、炎症応答を、灰色はその他を示す。

ADAR2 のノックダウンにより誘導された免疫、炎症関連遺伝子が BoDV 感染初期の感染効率の低下 (図 4) に寄与している可能性が考えられた。そこで、ADAR2 ノックダウン細胞で BoDV 感染効率を減少させた責任遺伝子を明らかにするために、免疫、炎症関連遺伝子を含む発現量が上昇した 50 遺伝子に対して siRNA スクリーニングをおこなった。ADAR2 ノックダウン細胞に siRNA をトランスフェクション法により導入し、24 時間後に MOI= 1 で BoDV を接種した。さらに 72 時間後、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。その結果、Rab27b と CXCL1 をサイレンシングした ADAR2 ノックダウン細胞で、BoDV の感染細胞率が野生型細胞と同程度にまで上昇した (図 7A)。さらに、Rab27b と CXCL1 に対する異なる siRNA を用いて実験を実施したところ、スクリーニングの結果と同様に、Rab27b と CXCL1 のサイレンシングにより ADAR2 ノックダウン細胞における BoDV 感染細胞率は回復した (図 7B)。このことから、ADAR2 ノックダウンによる Rab27b と CXCL1 の発現上昇が、BoDV 感染初期の感染効率を減少させたことが示唆された。

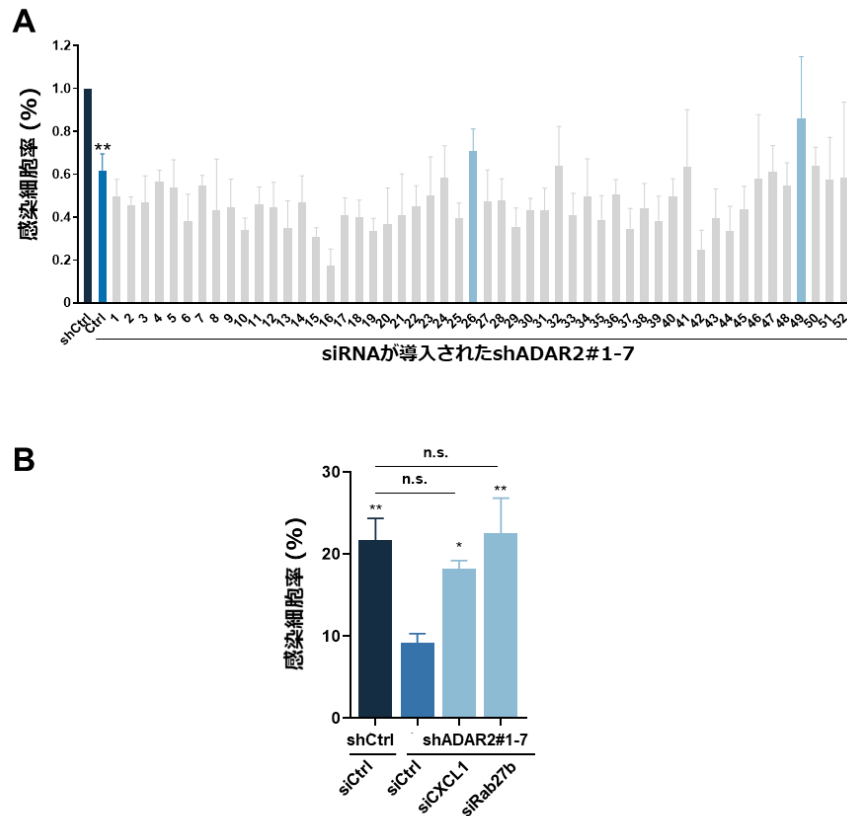


図 7. ADAR2 ノックダウン細胞に対する siRNA スクリーニング

(A) ADAR2 ノックダウン細胞に siRNA を導入してから 24 時間後、BoDV を MOI=1 で接種した。さらに 72 時間後、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により BoDV 感染細胞率を算出した。siRNA#26= Rab27b、siRNA#49= CXCXL1、それ以外の遺伝子については表 3 に示す。

(B) Rab27b と CXCL1 に対する異なる配列をもつ siRNA を用いて、(A) と同じ手順で実験をおこなった。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; n.s., 有意差なし)

2-3. ADAR2 は BoDV 感染の広がりに関与する。

BoDV 持続感染細胞では、細胞分裂の際、vRNP がクロマチンと結合し、染色体と共に娘細胞へと分配されることで感染が維持されている²²。また BoDV 持

続感染細胞から放出されるウイルス粒子量は極めて少なく、細胞-細胞間接着や、細胞分裂を介して感染を広げていく²²。そこで、ADAR が BoDV 感染の広がりに関与しているかを検討した。ADAR 1 または ADAR2 ノックダウン細胞に BoDV を MOI= 1 で接種し、4 日ごとに細胞の継代を行い、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により BoDV 感染細胞率の推移を観察した。その結果、ADAR1 ノックダウン細胞の BoDV 感染細胞率は、陰性対照と同様の動態を示した ($p>0.05$) (図 8)。一方 ADAR2 ノックダウン細胞では、陰性対照と比較して BoDV 感染細胞の広がりが有意に遅延した ($p<0.05$) (図 8)。

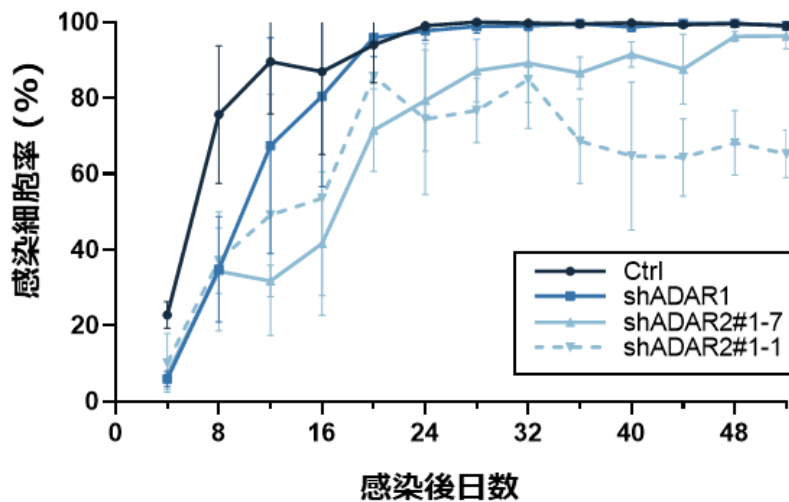


図 8. ADAR ノックダウン細胞における BoDV 感染の広がり

ADAR ノックダウン細胞に BoDV を MOI=1 で接種した後、4 日ごとに抗 BoDV-P 抗体を用いて IFA をおこない、BoDV 感染細胞率を算出した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。 p 値は文中に示し、two-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。

ADAR2 ノックダウン細胞 (shADAR2#1-7) で、BoDV 感染細胞率が 100% に達した、感染 48 日目の BoDV ゲノム RNA を RT-qPCR により定量したところ、いずれの ADAR2 ノックダウン細胞でも、BoDV ゲノム RNA 量は陰性対照と比較して有意に減少した (図 9A)。一方、ADAR1 ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量は陰性対照と比較して有意に増加した (図 9A)。次に、BoDV-N の発現量をウェスタンブロッティングにより解析し、検出されたバンドの強度を定量した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞では、陰性対照と比較して BoDV-N の発現量が有意に減少した (図 9BC)。これらの結果より、ADAR1 が感染初期にのみ関与する一方で、ADAR2 は BoDV 感染初期に加え、BoDV 感染の広がりにも重要であることが示唆された。

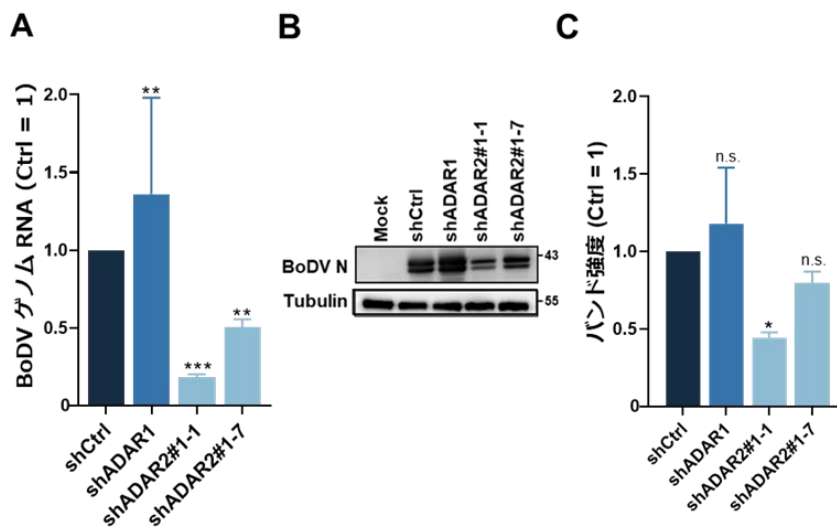


図 9. BoDV 感染 48 日目における、ADAR ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA、BoDV-N の発現量

(A) 感染 48 日目の ADAR ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR により定量した。値は GAPDH で補正した。(B) 同細胞中の BoDV-N の発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。Tubulin はローディングコントロールとして使用した。(C) ウェスタンブロッティングにより検出されたバンドの強度を定量した。値は Tubulin のバンド強度により補正した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., 有意差なし)

2-4. ADAR2 は BoDV 持続感染の維持に働く。

ADAR2 が BoDV の持続感染の維持に関与するかを調べるために、ADAR2 に対する 2 種類の shRNA (shADAR2#1、shADAR2#2) を発現するレンチウイルスをそれぞれ BoDV 持続感染細胞に導入した。導入後 10 日の細胞における ADAR2 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより評価したところ、陰性対照と比較して、shRNA を導入した細胞では ADAR2 の発現量が有意に減少した (図 10AB)。IFA により shRNA 導入 30 日後の BoDV 感染細胞率を算出したところ、ADAR2 をノックダウンした BoDV 持続感染細胞の感染細胞率は 100%を示し、ADAR2 ノックダウンによる変化はなかった。(図 10C)。

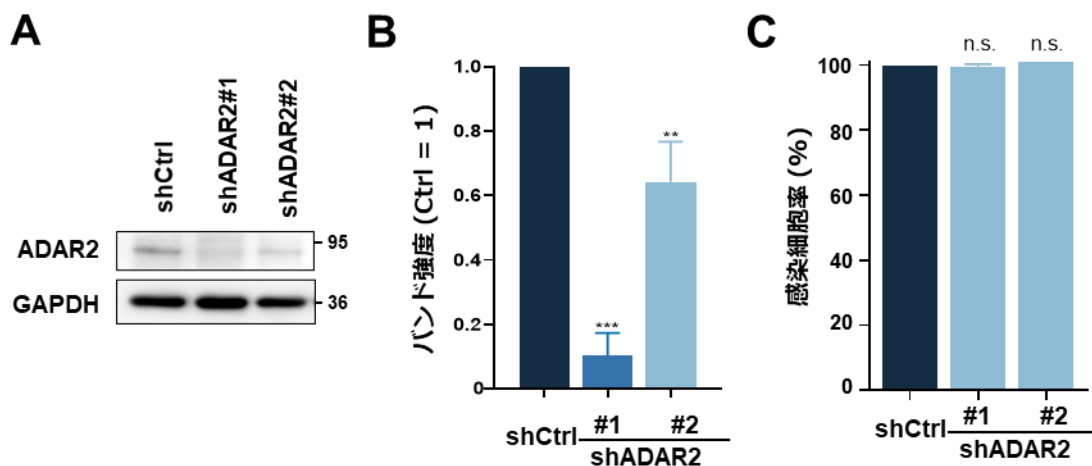


図 10. BoDV 持続感染細胞に対する ADAR2 ノックダウンの感染細胞率における影響

(A) ADAR2 に対する異なる配列の shRNA (shADAR2#1、shADAR2#2) を発現するレンチウイルスをそれぞれ BoDV 持続感染細胞に接種した。10 日後、ADAR2 の発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。GAPDH はローディングコントロールとして使用した。

(B) ウェスタンブロッティングにより検出されたバンドの強度を定量した。値は GAPDH のバンド強度により補正した。(C) レンチウイルス導入から 30 日後、同細胞の感染細胞率を、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により算出した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., 有意差なし)

次に、同細胞中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR 法により定量した。その結果、BoDV ゲノム RNA 量は、陰性対照と比較して ADAR2 ノックダウン細胞で有意に減少した (図 11A)。さらに、同細胞より BoDV を回収して力価を測定したところ、ADAR2 をノックダウンした時、陰性対照と比較して BoDV の力価は有意に減少した (図 11B)。これらのことより、ADAR2 は BoDV の持続感染の維持にも働くことが示唆された。

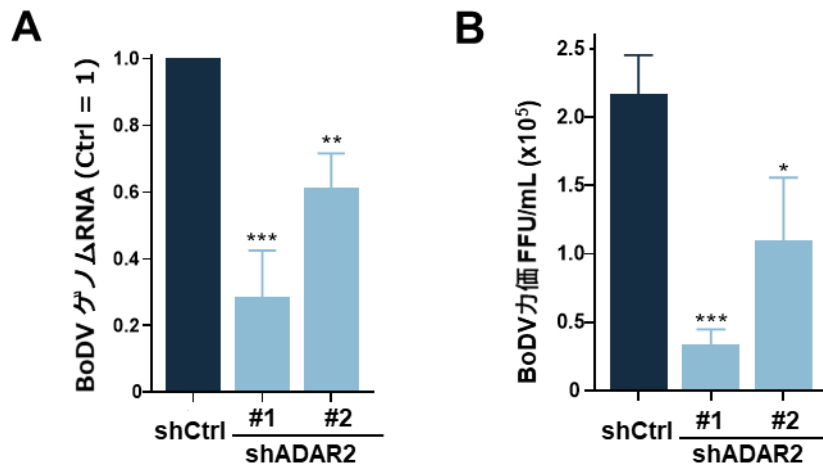


図 11. BoDV 持続感染 ADAR2 ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量と BoDV-N 発現量

(A) BoDV 持続感染 ADAR2 ノックダウン細胞中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR 法により定量した。値は GAPDH で補正した。(B) 同細胞から回収した BoDV を OL 細胞に接種し、ウイルス力価を算出した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

IAV は 8 本に分節化された一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムにもつウイルスで、BoDV と同じく核内を複製の場とする。しかしながら、持続感染する BoDV とは異なり、IAV は細胞障害性に急性感染する。ADAR2 が核内に局在することから、IAV 感染にも ADAR2 が関与する可能性が考えられた。そこで、ADAR2 ノックダウン細胞に IAV を MOI=1 で接種し、48 時間後に細胞上清を回

収し、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイにより IAV の力価を測定した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞より回収した IAV のウイルス力価は、陰性対照と比較して有意な差がなかった (図 12)。このことから、ADAR2 は BoDV 感染環においては重要な役割を果たすが、同じく核内で複製する IAV の感染には影響しないことが示唆された。

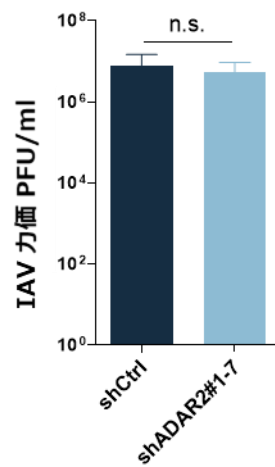


図 12. IAV に対する ADAR2 ノックダウンの影響

ADAR2 ノックダウン細胞に IAV を MOI= 1 で接種して 48 時間後、細胞培養上清から IAV を回収し、プラークアッセイにより IAV 力価を測定した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。 p 値は t 検定により算出した。(n.s., 有意差なし)

2-5. ADAR2 ノックアウトは BoDV の感染効率を減少させる。

ADAR2 の重要性をさらに検証するために、CRISPR Cas9 システムを用いて ADAR2 ノックアウト OL 細胞を作製し、BoDV 感染実験をおこなった。Cas9 と ADAR2 をターゲットとした gRNA (guide RNA) の複合体をエレクトロ

ポレーション法により OL 細胞へ導入した。細胞をクローニングした後、ウェスタンブロットティングにより ADAR2 の発現量を解析した (図 13A)。続いて、BoDV を MOI= 1 で ADAR2 ノックアウト細胞に接種し、4 日後に抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞を用いた実験の結果と同様に、ADAR2 ノックアウト細胞において、BoDV の感染細胞率は有意に減少した。(図 13B)。また同細胞中の BoDV ゲノム RNA を RT-qPCR により定量したところ、ADAR2 ノックアウト細胞中の BoDV ゲノム RNA 量は陰性対照と比較して、有意に減少した (図 13C)。これらの結果は、BoDV 感染における ADAR2 の重要性を支持するものと考えられた。

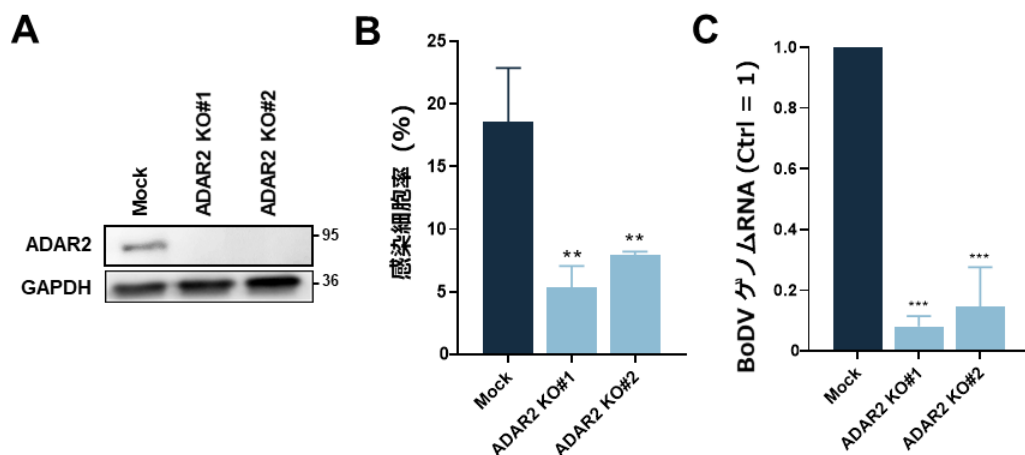


図 13. ADAR2 ノックアウト細胞を用いた感染実験

(A) CRISPR Cas9 システムを用いて ADAR2 ノックアウト OL 細胞を作製し、ウェスタンブロットティングにより ADAR2 の発現量を解析した。GAPDH はローディングコントロールとして使用した。(B) ADAR2 ノックアウト細胞に BoDV を MOI= 1 で接種し、4 日後、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。(C) 同細胞中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR 法により定量した。値は GAPDH で補正した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

2-6. ADAR2 の A-to-I 編集活性は BoDV の感染に重要である。

これまでの結果より、ADAR2 は BoDV の感染環に重要な因子であると考えられるが、ADAR2 の A-to-I 編集活性が寄与しているかは不明である。そこで、A-to-I 編集活性の関与を調べるために、ADAR2 ノックダウン細胞の A-to-I 編集活性を評価した。宿主の AMPA 型グルタミン酸受容体の一つである GluR2 の mRNA の翻訳領域には Q/R 部位と呼称され、ADAR2 により 100%に近い効率で編集されるアデノシンが存在する⁸⁹。シーケンス解析において、イノシンはグアニンとして認識されるため、A-to-I 編集が生じると同部位には A-to-G の置換が検出される。Q/R 部位の配列を調べることで、細胞の A-to-I 編集活性を評価することができる (図 14A)。ADAR2 ノックダウン細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により Q/R 部位を含む GluR2 遺伝子断片を増幅し、ダイレクトシーケンス法により同部位の配列を解析した。その結果、野生型細胞では G のシグナルのみが検出された。一方、ADAR2 ノックダウン細胞では、A のシグナルのみが検出された (図 14B)。この結果より、本研究で作出した ADAR2 ノックダウン細胞において A-to-I 編集活性が検出限界以下に減少していることが明らかとなった。

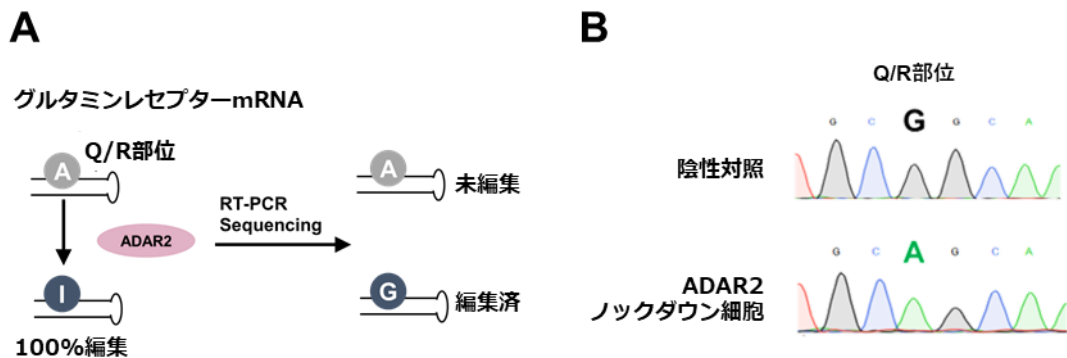


図 14. ADAR2 ノックダウン細胞の A-to-I 編集活性解析

(A) A-to-I 編集活性解析の概略図。宿主の GluR2 mRNA には Q/R 部位と呼ばれるアデノシンがあり、ADAR2 によりほぼ 100%の効率で編集される。イノシンはシーケンス解析においてグアニンとして認識されるため、同サイトの A-to-G 置換を調べることで、ADAR2 の A-to-I 編集活性が評価できる。(B) ADAR2 ノックダウン細胞の GluR2 mRNA の Q/R 部位の配列をダイレクトシーケンス法により解析した。

次に、BoDV 感染初期における ADAR2 の A-to-I 編集活性の必要性を明らかにするために、表現型回復実験をおこなった。ADAR2 ノックダウン細胞に ADAR2 野生型 (ADAR2 WT)、ADAR2 編集活性欠損変異体 (ADAR2 E/A) または、陰性対照として赤色蛍光タンパク質 (Red fluorescent protein: RFP) を発現するプラスミドをトランスフェクション法により導入した。48 時間後、BoDV を MOI= 1 で接種し、さらに 72 時間後に抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。その結果、ADAR2 WT を過剰発現させた細胞では、陰性対照と比較して BoDV の感染細胞率が有意に上昇した (図 15)。一方で、ADAR2 E/A を過剰発現させても感染細胞率は上昇しなかった (図 15)。これらのことから、ADAR2 の A-to-I 編集活性が BoDV 感染に重要であることが示唆された。

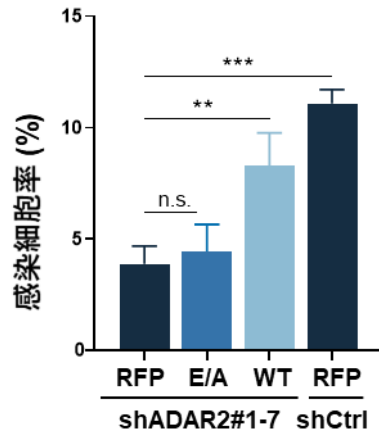


図 15. ADAR2 編集活性欠損変異体を用いた表現型回復実験

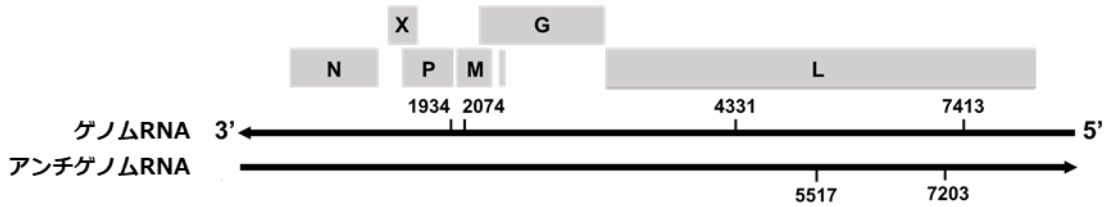
ADAR2 ノックダウン細胞に ADAR2 WT、ADAR2 E/A または RFP を発現するプラスミドを導入した。48 時間後に BoDV を MOI=1 で接種し、さらに 72 時間後、抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., 有意差なし)

2-7. ADAR2 は BoDV ゲノム RNA を編集する。

BoDV ゲノム RNA が、ADAR2 による A-to-I 編集を受けているかを調べるために、ウイルスが持続感染している ADAR2 ノックダウン細胞、または野生型細胞に含まれる BoDV ゲノム RNA の配列を比較した。同細胞より BoDV 粒子を回収し、RNA を抽出後、RT-PCR 法により全長を 9 断片に分けて増幅させた。TOPO ベクターへクローニングした後、大腸菌を用いて形質転換をおこない、各断片につき 10 コロニーの配列を解析した。その結果、野生型細胞では A-to-G の変異をもつ部位が 6 箇所同定され、うち 3 つは非同義置換で、BoDV ゲノム RNA の P、M、L 遺伝子上に位置していた (図 16AB)。その他の 3 つは同義置換で、すべて L 遺伝子上に位置していた (図 16AB)。

野生型細胞から回収した BoDV に検出された A-to-G 置換の割合はいずれも 10%であった (図 16B)。一方 ADAR2 ノックダウン細胞から回収された BoDV ゲノム RNA においては、同部位には G は検出されず、A のみが検出された (図 16B)。ADAR2 が A-to-I 編集のターゲットとするアデノシンの周辺に特定のモチーフは同定されていないが、アデノシンを中心としたトリプレットには偏りがあり、A-to-I 編集が起こりやすい順にタイプ I ~ III に分類されている⁹⁰。今回同定された 6 箇所は、いずれも A-to-I 編集の頻度が高いタイプ I と II に分類された (図 16B)。これらの結果より、BoDV のゲノム RNA が少なくとも 6 箇所において ADAR2 による A-to-I 編集を受けている可能性が示唆された。

A



B

位置	鎖	アミノ酸置換	トリプレットの 種類	A-to-G 比率		
				野生型	ADAR2 ノックダウン	
1934	P遺伝子	ゲノム	V→A	II	10%	0%
2074	M遺伝子	ゲノム	F→L	I	10%	0%
4331	L遺伝子	ゲノム	M→T	II	10%	0%
5517	L遺伝子	アンチゲノム	-	I	10%	0%
7203	L遺伝子	アンチゲノム	-	II	10%	0%
7413	L遺伝子	ゲノム	-	II	10%	0%

図 16. BoDV ゲノム RNA 上の A-to-I 編集部位

(A) 同定された A-to-I 編集部位の位置を BoDV ゲノム RNA 上に示す。(B) 検出された A-to-G 置換の位置、鎖、アミノ酸置換、トリプレットの種類、A-to-G 変異の頻度を示す。ADAR2 により A-to-I 編集を受ける頻度は、アデノシンを中心としたトリプレットにおいて偏りがある。編集を受けやすいほうから順に、タイプ I～タイプ III の三段階に分類されている。

ADAR2 は二本鎖 RNA 結合領域を介して基質 RNA に結合することで A-to-I 編集をおこなう^{91, 92}。そこで次に、ADAR2 と BoDV ゲノム RNA 間の相互作用を RNA 免疫沈降法により評価した。FLAG タグが付加された ADAR2 WT、ADAR2 二本鎖 RNA 結合能欠損変異体 (ADAR2 EAA) を発現するプラスミドをトランスフェクション法により BoDV 持続感染細胞に導入した。また、陰性対照として、蛍光強度を増強させる変異を導入した緑色蛍光タンパク質 (Enhanced green fluorescent protein: EGFP) を、陽性対照として、BoDV ゲノム RNA と結合して vRNP を構成する BoDV-N を発現したプラスミドも使用した。トランスフェクションから 48 時間後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降をおこない、沈降物

をウェスタンブロッティングおよび RT-PCR 法により解析した。その結果、ADAR2 WT は BoDV ゲノム RNA と共沈したのに対して、ADAR2 EAA は RNA と共沈しなかった (図 17A)。RT-qPCR 法により沈降物中の BoDV ゲノム RNA 量を定量した。その結果、ADAR2 EAA と共沈した BoDV ゲノム RNA 量は陰性対照の EGFP と比較して有意な差はなかった (図 17B)。一方、ADAR2 WT と共沈した BoDV ゲノム RNA 量は、ADAR2 EAA および陰性対照と比較して約 710 倍と有意に増加した (図 17B)。以上の結果より、ADAR2 は BoDV ゲノム RNA と、二本鎖 RNA 結合領域を介して相互作用していることが明らかとなり、ADAR2 が BoDV ゲノム RNA を基質として A-to-I 編集していることが示唆された。

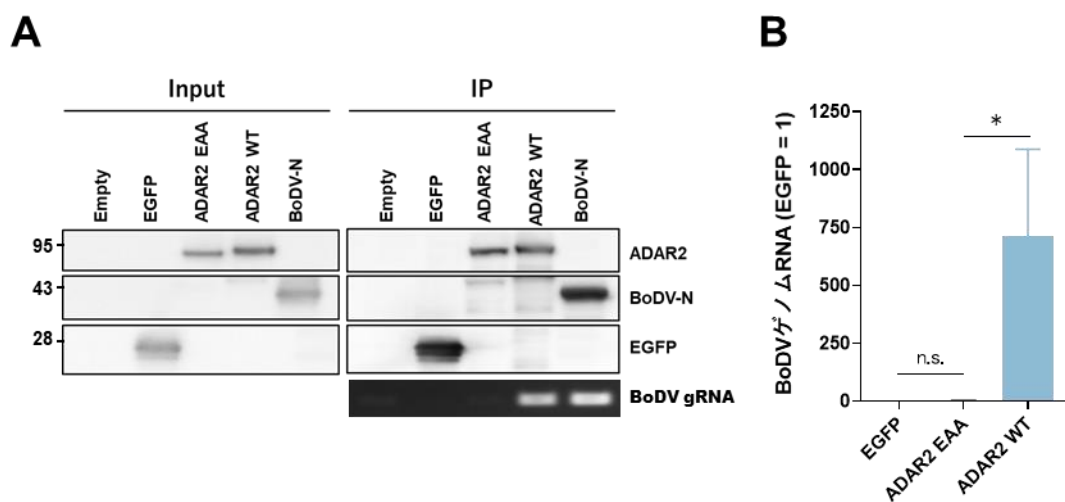


図 17. ADAR2 と BoDV ゲノム RNA 相互作用

(A) FLAG タグが付加された ADAR2 WT、ADAR2 EAA (二本鎖 RNA 結合能欠損変異体)、EGFP (陰性対照)、BoDV-N (陽性対照) を発現するプラスミドをトランスフェクション法により BoDV 持続感染細胞に導入した。48 時間後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降をおこない、沈降物をウェスタンブロッティングおよび RT-PCR により解析した。(B) 沈降物中の BoDV ゲノム RNA 量を RT-qPCR により定量した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により

陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし)

2-8. BoDV ゲノムへの ADAR2 による A-to-I 編集は自然免疫の誘導を抑制する。

宿主は ADAR1 の A-to-I 編集を利用して、宿主由来の二本鎖 RNA の非自己認識を回避する⁵²。また MeV は ADAR1 p150 を利用して、DI RNA の二本鎖 RNA 構造を変化させ、過剰な自然免疫の誘導を抑制している⁷⁵。これまでの結果から、BoDV は持続感染するために、ADAR2 による A-to-I 編集を利用して、宿主による非自己認識を回避している可能性が考えられた。そこで BoDV ゲノム RNA に対する ADAR2 による A-to-I 編集の自然免疫への影響を明らかにするために、ウイルスが感染する ADAR2 ノックダウン細胞から“編集を受けていない BoDV”を回収し、ウイルスによる自然免疫誘導を評価した。自然免疫の評価には、BoDV 感染により発現が上昇することが報告されている IL-6 と CXCL10 に着目した⁹³。

ADAR2 ノックダウン細胞から回収した BoDV を OL 細胞へ接種して、8 時間後に IL-6 と CXCL10 の発現量を RT-qPCR 法により解析した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞より回収した BoDV は、陰性対照と比較して IL-6 は約 4.2 倍、CXCL10 は約 5.6 倍と、発現量を有意に増加させた (図 18A)。この結果が、BoDV に起因するかを確認するために、非感染の ADAR2 ノックダウン細胞に、ウイルス回収時と同じ処理を行い、回収した溶液を OL 細胞に接種し、8 時間後に IL-6 と CXCL10 の発現量を RT-qPCR 法により定量した。その結果、非感染 ADAR2 ノックダウン細胞から回収した溶液を接種した OL 細胞における IL-6 と CXCL10 の発現量は、陰性対照と比較して、有意な差はなかった (図 18B)。これらの結果より、ADAR2 ノックダウン細胞から回収した BoDV がより強い免疫応答を誘導することが示唆された。

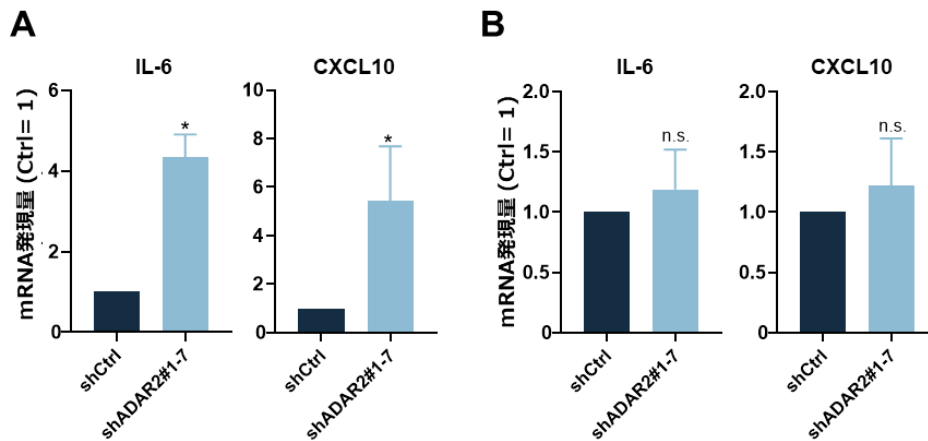


図 18. 非編集の BoDV ゲノム RNA の自然免疫誘導

(A) BoDV 持続感染 ADAR2 ノックダウン細胞より回収した BoDV 粒子を OL 細胞に接種し、8 時間後、IL-6 と CXCL10 の発現量を RT-qPCR 法により定量した。(B) 非感染の ADAR2 ノックダウン細胞を用いて、(A) と同様の手順で実験をおこなった。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は t 検定により陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし)

次に、ADAR2 の A-to-I 編集が自然免疫誘導抑制に重要であることを明らかにするために、表現型回復実験をおこなった。BoDV 感染 ADAR2 ノックダウン細胞に ADAR2 WT、ADAR2 E/A、陰性対照として EGFP を発現するプラスミドを導入し、選択培地を用いて安定発現細胞を樹立した。各細胞より BoDV 粒子を回収し、OL 細胞に接種してから 8 時間後、IL-6、CXCL10 の発現量を RT-qPCR により定量した。その結果、ADAR2 WT 発現細胞より回収した A-to-I 編集を受けた BoDV は、陰性対照と比較して、IL-6 および CXCL10 の発現量を有意に減少させた (図 19)。一方 ADAR2 E/A 発現細胞より回収した BoDV は IL-6 の発現を有意に減少させたが、CXCL10 の発現量は有意に上昇させた (図 19)。これらのことより、BoDV は ADAR2 による A-to-I 編集を受けることで、新規感染時の細胞における自然免疫の誘導を抑制していることが示唆された。

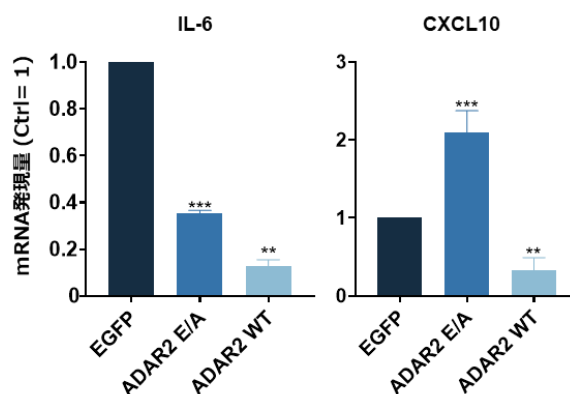


図 19. BoDV ゲノム RNA への A-to-I 編集による自然免疫応答の抑制

BoDV 感染 ADAR2 ノックダウン細胞に ADAR2 WT、ADAR2 E/A、陰性対照として EGFP を発現させた。同細胞より回収した BoDV 粒子を OL 細胞に接種し、8 時間後、IL-6 と CXCL10 の発現量を RT-qPCR により定量した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は one-way ANOVA の後、ダネットの検定により陰性対照と比較して算出した。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

持続感染においても ADAR2 が免疫誘導の抑制に寄与しているかを調べるために、BoDV が持続感染している ADAR2 ノックダウン細胞の CXCL10 発現量を評価した。非感染 ADAR2 ノックダウン細胞中の CXCL10 発現量を RT-qPCR 法により定量したところ、陰性対照と比較して有意な差はなかった(図 20)。また、ADAR2 ノックダウン細胞を用いたマイクロアレイでも、CXCL10 は発現変動遺伝子に含まれていなかった。一方 BoDV が持続感染した ADAR2 ノックダウン細胞については、陰性対照よりも CXCL10 の発現量が約 3.9 倍と、有意に増加した(図 20)。このことより、BoDV は持続感染においても自然免疫の誘導の抑制に ADAR2 を利用していることが示唆された。

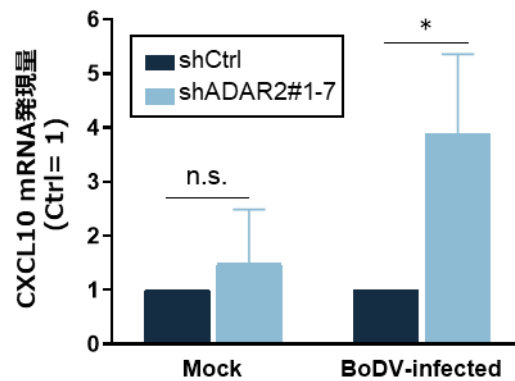


図 20. BoDV 持続感染細胞中の CXCL10 発現量の評価

非感染または BoDV が持続感染している ADAR2 ノックダウン細胞中の CXCL10 の発現量を RT-qPCR により定量し、各陰性対照と比較した。独立した 3 回の実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。いずれも p 値は t 検定陰性対照と比較して算出した。(*, $p < 0.05$; n.s., 有意差なし)

第三章

考察

3-1. 本研究の意義

宿主とウイルスは、自身の生存をかけて攻防を繰り返してきた。宿主は、PAMPs を非自己として認識し、免疫応答を誘導する。一方でウイルスは、宿主の細胞機構や、自身が発現するタンパク質を利用して免疫から逃れている⁹⁴。しかし、これまで核内で持続感染する RNA ウイルスがどのように宿主の二本鎖 RNA 認識による免疫誘導を回避しているかは不明であった。本研究は、以下の実験結果より、BoDV が自然免疫誘導を抑制するために、核内で ADAR2 の A-to-I 編集活性を利用していることを明らかにした。1. ADAR2 ノックダウンおよび、ノックアウト細胞中で BoDV の感染効率が減少するが、野生型 ADAR2 の発現により、感染効率は回復する (図 4、13、15)。2. ADAR2 は核内で持続感染している BoDV のゲノム RNA に A-to-I 編集する (図 16)。3. ADAR2 は二本鎖 RNA 結合領域で BoDV のゲノム RNA と結合する (図 17)。4. ADAR2 ノックダウン細胞から回収した BoDV は、野生型細胞から回収したウイルスよりも、強く免疫応答を誘導した (図 18)。野生型 ADAR2 を同細胞に発現させることで、BoDV による免疫誘導は減弱した (図 19)。これらの結果は、BoDV ゲノム RNA が ADAR2 による編集を利用して“自己 RNA”を模倣し、自然免疫が誘導されるのを回避していることを強く支持するものと考えられた。本研究は、核内で持続感染するウイルスが二本鎖 RNA の認識を回避するために核内で A-to-I 編集を利用している可能性を示す初めての報告であり、ウイルスによる精巧な免疫回避機構に新たな知見をもたらすものと考えられた。

3-2. ADAR2 と BoDV における相互作用の特異性

BoDV は感染初期、感染の広がり、持続感染の維持と、その感染環を通

して ADAR2 を利用していることが本研究により明らかとなった。ADAR1 の恒常発現アイソフォームである p110 は細胞質と核内に、ADAR2 は核内に局在し、いずれも核内の BoDV ゲノム RNA への到達が可能である^{32,35}。宿主においても ADAR1 と ADAR2 がどのように基質を選択しているのか、その作用機序は明らかではない。しかし、エディトーム解析より ADAR1 は Alu 配列様の繰り返し配列を、ADAR2 は翻訳領域の非繰り返し配列を好んで基質とする傾向にあることが知られており、繰り返し配列をもたない BoDV ゲノム RNA への編集には、ADAR2 の方が適していたと推察された。また、BoDV の組織特異性と ADAR2 の発現分布が一致していることは、BoDV が ADAR2 を利用するに至る進化的一因となった可能性も考えられた。

ADAR2 が、BoDV 以外の核内複製ウイルスの感染にも関与するのかを調べるために、IAV を用いた感染実験を実施した。その結果、ADAR2 ノックダウン細胞より回収した IAV の力価は、野生型細胞から回収したものと比較して有意な差はなく、ADAR2 が IAV 感染に関与しないことが示唆された (図 12)。これまでに、IAV ゲノム RNA に対する ADAR1 による A-to-I 編集は報告されており、同じ核内に局在する ADAR2 が IAV のゲノム RNA を編集する可能性はあると考えられる⁸¹。しかし IAV は、BoDV と異なり RIG-I などの RNA センサー分子により認識され、強い免疫応答を誘導するため、ADAR2 による免疫誘導の抑制があったとしても、IAV 感染動態を変える程の影響は及ぼさないと考えられた⁹⁵。

3-3. 宿主における ADAR2 の自然免疫抑制作用

ADAR2 ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析から、感染や刺激がな

くても、ADAR2 ノックダウン細胞中で免疫および炎症関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった (図 6)。このことにより、ADAR1 だけではなく、ADAR2 も宿主の RNA による自然免疫誘導の回避に寄与している可能性が示唆された。ADAR2 の A-to-I 編集活性不全は、ALS や統合失調症など神経、精神疾患との関連が証明されている一方で、自然免疫への作用はこれまで明らかにされていなかった^{47,48}。本研究は、BoDV 感染における ADAR2 の意義に加え、宿主における ADAR2 の新たな機能の解明にも寄与した。ADAR2 のノックダウンにより発現が上昇し、遺伝子オントロジー解析で免疫、炎症応答関連遺伝子として分類されたものには、CXCL1、CXCL5、CXCL8、IL-1 β 、PTX3 をはじめとするケモカインやインターロイキンが多く含まれていた。一方で、ADAR1 ノックダウン、ノックアウトで見られるインターフェロンの発現上昇は検出されなかった。このことから、宿主が形成する二本鎖 RNA を MDA5 からの認識を回避させ、自然免疫の誘導を回避する ADAR1 とは異なる機序で、ADAR2 は自己の RNA による自然免疫の誘導を回避していると推察された。

3-4. ADAR2 ノックダウンによる宿主因子を介した BoDV 感染抑制機構

ADAR2 ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析と siRNA スクリーニングより、Rab27b と CXCL1 の発現上昇が BoDV 感染初期における感染効率の減少に寄与することを明らかにした (図 7)。Rab27b と CXCL1 の抗 BoDV 作用はこれまで知られておらず、本研究は、BoDV と宿主因子の新しい相互作用も明らかにした。Rab27b はエキソソームの分泌過程に関与するタンパク質である⁹⁶。エキソソームは脂質二重膜に覆われた小胞で、内部に細胞中の RNA やタンパク

質を含み、細胞間のコミュニケーションを担う⁹⁷。エクソソームとウイルス感染との関連も報告されており、C 型肝炎ウイルス感染細胞からはウイルス由来 RNA を含むエクソソームが分泌されており、周辺の細胞がその RNA を受け取ることで、自然免疫が惹起され感染の広がりを防いでいる。BoDV 感染におけるエクソソームの役割は明らかにされていないが、エクソソーム中に含まれた何らかの因子によって抗ウイルス作用がもたらされた可能性が考えられる。また、CXCL1 は分泌タンパク質で、好中球の遊走を誘導するが、培養細胞中での BoDV 感染への影響は不明である⁹⁸。CXCL1 のレセプターである CXCR2 の mRNA が RT-qPCR で検出限界以下だったこと、リコンビナントの CXCL1 を培養上清中に添加しても BoDV 感染に変化がなかった（データは割愛する）ことから、細胞内に局在している CXCL1 またはその RNA が未知の機序で作用していることが考えられた。

3-5. BoDV のゲノム RNA への編集を介した自然免疫抑制機構

本研究では、ADAR2 ノックダウン細胞と野生型細胞それぞれに感染している BoDV の配列比較と、ADAR2-BoDV ゲノム RNA の相互作用解析から、BoDV ゲノム RNA が ADAR2 により A-to-I 編集を受けている可能性を示した（図 16、17）。さらに、ADAR2 ノックダウン細胞より回収したウイルスは自然免疫の誘導を強めたことから（図 18）、BoDV ゲノム RNA への A-to-I 編集が自然免疫の誘導を抑制していると考えられる。しかし、その作用機序は未だ明らかでない。本研究で同定した A-to-I 編集箇所のうち 3 つは P、M、L 遺伝子上に位置する非同義置換であった。アミノ酸置換後の変異体の自然免疫抑制への影響

を調べることで、メカニズム解明の一助になると考えられる。

また一方で、本研究の配列解析では検出されなかった、低頻度の A-to-I 編集が BoDV ゲノム RNA で広く起こっている可能性も考えられる。ポリオウイルス感染では、少数派として存在するウイルスの配列が生体内での感染動態、病原性を変えることが報告されている⁹⁹。あるいは、宿主の ADAR1 による非自己認識の回避にみられるように、ADAR2 による A-to-I 編集が、BoDV ゲノムの分子内、または分子間の二本鎖 RNA 形成をゲノム RNA 上の様々な位置で阻害し、SAFA のような核内に局在する二本鎖 RNA センサー分子からの認識を回避している可能性もある。これらの仮説を検証するためには、BoDV ゲノム RNA 上で A-to-I 編集を受けている部位を網羅的に検出する必要があり、コピー数が極めて低い BoDV のゲノム RNA の配列を次世代シーケンスで深く解読する手法の開発と、A-to-I 編集を直接検出する手法の応用は今後の課題の一つである。

第四章

材料と方法

細胞培養

ヒトオリゴデンドログリア細胞 (OL 細胞) および BoDV 持続感染 OL 細胞は 5%ウシ胎児血清 (Fetal calf serum: FCS) (MP Biomedicals、CA、USA) を含む DMEM (Thermo Fisher Scientific、MS、USA) で培養した。ADAR1 ノックダウン OL 細胞および ADAR2 ノックダウン OL 細胞は同培養液に 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシン (Merck、Darmstadt、Germany) を添加したものを使用した。293LTV 細胞は、10% FCS、1% MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM で培養した。MDCK 細胞は 5% FCS、7.5% NaHCO_3 (Thermo Fisher Scientific)、1% MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Thermo Fisher Scientific)、1% MEM Vitamin Solution (Thermo Fisher Scientific)、1% L-glutamine (Merck) および 1% Penicillin-Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) を含む MEM (Thermo Fisher Scientific) で培養した。

プラスミドの作製

ADAR2 発現プラスミド (pcDNA3-ADAR2 および pcDNA3-3xFLAG-ADAR2) は、OL 細胞より抽出した全 RNA を鋳型として RT-PCR 法により ADAR2 遺伝子を増幅し、pcDNA3 ベクターまたは 3xFLAG のタグ配列がマルチクロニングサイトに付加された pcDNA3 ベクター (Thermo Fisher Scientific) にクローニングして作製した。逆転写反応には SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) を、PCR には PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa、滋賀、日本) を付属の手順に従い使用した。ADAR2 編集活性欠損変異体発現プラスミド (pcDNA3-ADAR2 E/A および pcDNA3-3xFLAG-ADAR2 E/A) は、PCR により 396 番目の

グルタミン酸 (GAA) をアラニン (GCA) に置換する変異を導入して作製した。ADAR2 二本鎖 RNA 結合能欠損変異体発現プラスミド (pcDNA3-3xFLAG-ADAR2 EAA) は、Wistar Institute の西倉和子教授より提供を受けた。EGFP 発現プラスミド (pcDNA3-3xFLAG-EGFP) は、pEGFP-N1 (Addgene、MA、USA) を鋳型として EGFP 配列を PCR により増幅して作製した。ライゲーション反応には DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用い、形質転換には XL10- Gold (Agilent、CA、USA) を使用した。大腸菌からプラスミドを回収するために PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

細胞へのプラスミドの導入

プラスミドは、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いたトランスフェクション法により細胞に導入した。操作は付属の手順に従った。

ノックダウン細胞株の樹立

shRNA 発現プラスミドを作製するために、ADAR1、ADAR2 またはコントロールの shRNA 配列を pRSI-U6-(sh)-UbiC-RFP-2A-Puro (Cellecta、CA、USA) へクローニングした。本実験に使用した shRNA の配列は以下の通りである。
shADAR1 5'-CCAGCACAGCGGAGUGGUA-3'; shADAR2#1 5'-TACATGAGTGATCGTGGCC-3'; ADAR2#2 5'-GATAGACACCCAAATCGTA-3'。同
プラスミド 0.35µg は、1.4µg psPAX2 (Addgene) と、0.35µg pMD2.G (Addgene) と共にトランスフェクション法により 6 well plate へ播種された 293LTV 細胞へ

と導入された。72 時間後、レンチウイルスベクターを含む培養細胞上清を回収し、0.45 μm のフィルター (Merck) でろ過した。精製したレンチウイルスを OL 細胞に接種し、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンでウイルス感染細胞のセレクションをおこない、ペニシリンカップ (SANSYO、東京、日本) を用いてクローニングした。

BoDV を含む細胞破碎液の回収

BoDV 感染 OL 細胞をトリプシン処理により回収し、りん酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) に懸濁した。BIORUPTORII (ソニック・バイオ、神奈川、日本) を用いて同細胞を超音波破碎し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 x g で 25 分間遠心した。上清を回収し、ウイルス溶液として -80 $^{\circ}\text{C}$ に保存した。

BoDV 粒子の回収

BoDV 持続感染細胞に 250mM MgCl_2 (富士フィルム和光純薬) および 1% FCS を含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (Sigma-Aldrich、MO、USA) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 90 分間反応させた。上清を回収し、0.22 μm のフィルター (Merck) でろ過した後に、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

BoDV の感染

BoDV を含む溶液を細胞に添加し、37°Cで反応させた。1 時間後、細胞を PBS で洗浄し、2% FCS を含む DMEM で培養した。

免疫蛍光染色

細胞を PBS で洗浄し、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 分間反応させた。PBS で洗浄した後に、0.1% Triton X-100（ナカライテスク、京都、日本）および 2% FCS を含む PBS で透過処理をおこなった。抗 BoDV-P 抗体を 2% FCS を含む PBS で 2000 倍希釈し、細胞に添加して室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後に、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific）を 1000 倍希釈、DAPI（Merck）を 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように 2% FCS を含む PBS で希釈し、細胞に添加した。室温で 1 時間反応させた後に、PBS で洗浄し、観察に用いた。観察には BZ-X710 All-in-One Fluorescence Microscope（KEYENCE、大阪、日本）を使用し、感染細胞率は BoDV-P 陽性細胞数を総細胞数で割ることで算出した。

RNA 抽出

全 RNA の抽出は、NucleoSpin RNA Kit（Macherey-Nagel、Düren、Germany）または Trizol LS（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-qPCR

cDNA の作製には Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を付属の手順に従い使用した。逆転写用のプライマーは、BoDV ゲノム RNA 特異的プライマーおよび oligodT を使用した。BoDV ゲノム RNA に対する RT-qPCR は Thunderbird Probe qPCR Mix (東洋紡、大阪、日本) を、それ以外の配列に対する qPCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡)、または、Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs、MA、USA) を使用した。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、プローブは表 1 に記載した。

表 1. 使用したプライマー、プローブ一覧

用途	プライマー、プローブ	配列 (5'-3')
RT	BoDV He80 genome	GTTGCGTTAACAACAAACCAATCAT
	BoDV huP2br genome	TGTTGCGCTAACAACAAACC
RT-PCR	hADAR1 Fw	AAAGATATCTGAATCCGCGGCAGGGGTATCCCTCAG
	hADAR1 Rv	TTTCTCGAGCTATACTGGGCAGAGATAAAAGTTCTTTT
	hADAR2 Fw	AAAGGTACCATGGATATAGAAGATGAAGAAAACATGAGT
	hADAR2 Rv	TTTGAATTCTCAGGGCGTGAGTGAGAAGTGGTCCTGCTCG
	ADAR2 E/A Fw	GACTGCCATGCAGCAATAATATCTCGG
	ADAR2 E/A Rv	CCGAGATATTATTGCTGCATGGCAGTC
	EGFP Fw	AAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCAC
	EGFP Rv	TTTCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT
	hGluR2 Fw	TTCTGGTCCAGCAGATTTAGCC
	hGluR2 Rv#1	TTCCCTTTGGACTTCCGCAC
	hGluR2 Rv#2	TGGGAGACACCATCCTCTCTACAG
	He80#1 Fw	TGTTGCGTTAACAACAAACCAATCATTATC
	He80#1 Rv	TGGGTTTCCTTGACACTTGC
	He80#2 Fw	CACGAAGCTTTCCCAATCTG
	He80#2 Rv	GTGTTAGGAGCAAGAAGTCGT
	He80#3 Fw	TATCGACGTAGAACCAGCAG
	He80#3 Rv	CGGGGGTGTGGTTGTTGTAAC
	He80#4 Fw	TTGGGGTAGTCTGGCAATGC
	He80#4 Rv	CATGGGGGAGGTTGATTGAG
	He80#5 Fw	GCTGCCTAATGACCTACAACC
	He80#5 Rv	ATCTCCAGCAGCTCGTAAG
	He80#6 Fw	TTCTGGTGCAACGGTTTCC
	He80#6 Rv	CTGGGCAGGGTTGCAGGAGTTGGAAGCCCA
	He80#7 Fw	TCACCTCGCTGAACCTTGAC
	He80#7 Rv	ACACCGCCCGATCTAATCAC
He80#8 Fw	AACTTCCATGGAGTATTGTAATTCGGTCT	
He80#8 Rv	TATTGTGAACCCCTGTGCG	
He80#9 Fw	GCCACCTGCCAGCACTAAC	
He80#9 Rv	TGCGCTACAACAAAGCAACAACCAAAACCCA	
qPCR	BoDV He80 Fw	ATGCATTGACCCAACCGGTA
	BoDV He80 Rv	ATCATTGATAGCTGCTCCCTTC
	BoDV huP2br Fw	ATGCATTGACCCAACCGGTA
	BoDV huP2br Rv	ATCATTGATAGCTGCTCCCTTC
	BoDV BoDV-P probe	FAM-AGAACCCCTCCATGATCTCAGACCCAGA-TAMRA
	hADAR2 Fw	GTGTAAGCACGCGTTGTAAGT
	hADAR2 Rv	CGTAGTAAGTGGGAGGGAACC
	hGAPDH Fw	AGCGAGATCCCTCCAAAATC
	hGAPDH Rv	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
	hCXCL1 Fw	CGCCCAAACCGAAGTCATAGCC
	hCXCL1 Rv	TTCTCCCTTCTGGTCAGTTG
	hRab27b Fw	CTCGGGAAGTGGCTGACAAA
	hRab27b Rv	CCACACACTGTTCCATTTCGC
	hIL-6 Fw	GGCACTGGCAGAAAACAACC
	hIL-6 Rv	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
hCXCL10 Fw	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC	
hCXCL10 Rv	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT	

ウェスタンブロットティング

細胞懸濁液に等量の 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)、4% SDS (富士フィルム和光純薬)、0.3 M 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) (HCl、富士フィルム和光純薬)] を添加し、95℃で 10 分間加熱してタンパク質を変性させ、SDS-PAGE に供した。電気泳動は e-PAGEL minigel 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) を用いて、400V 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 膜へとセミドライ式ブロットティング法により転写した。膜への転写後、Blocking One (ナカライテスク) を用いてブロッキングをおこない、0.1% Tween-20 (富士フィルム和光純薬) を含む TBS-T で洗浄した。TBS は Tris buffered saline tablets pH 7.6 (TaKaRa) を用いて付属の手順に従い作製した。

Can Get Signal Immunionreaction Enhancer Solution 1 (東洋紡) を用いて 1 次抗体を希釈し、室温で 1 時間または、4℃で 16 時間反応させた。本研究で使用した 1 次抗体および希釈倍率は表 2 に記載した。TBS-T 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、室温で 1 時間反応させた。2 次抗体には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 抗体および抗ラビット IgG 抗体を 2000 倍希釈で使用した。TBS-T で洗浄した後、付属の手順に従い Amersham ECL Prime (GE Healthcare、IL、USA) を用いて化学発光反応をおこなった。発光の検出および画像の取得には ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) を用いた。検出されたバンドの強度は Multi Gauge V3.2 software (富士フィルム

和光純薬) を用いて定量した。

表 2. 使用した抗体一覧

抗体名	使用した実験 ^{a,b}	メーカー	希釈率
抗ヒトADAR1モノクローナル抗体	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
抗ヒトADAR2モノクローナル抗体	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
抗ヒトGAPDHモノクローナル抗体	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
抗ヒトTubulinモノクローナル抗体	WB	Sigma-Aldrich	1/2000
抗BoDV-Pポリクローナル抗体	WB、IFA	- ^c	1/1000
抗BoDV-Nポリクローナル抗体	WB	- ^c	1/4
抗FLAG M2 モノクローナル抗体	WB、RIP	Sigma-Aldrich	1/1000
Alexa Fluor 488 標識抗ウサギIgG抗体	IFA	Thermo Fisher Scientific	1/1000
ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体	WB	Jackson ImmunoResearch	1/1000
ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体	WB	Jackson ImmunoResearch	1/1000

^aWB: ウェスタンブロッティング

^bRIP: RNA免疫沈降

^c(Hirai et al, Virus Res, 2019)

マイクロアレイ解析

ADAR2 ノックダウン細胞 (shADAR2#1-7) と野生型細胞から全 RNA を抽出し、Human Clariom S Array (Thermo Fisher Scientific) を用いて、付属の手順に従い解析をおこなった。Transcriptome Analysis Console software (Thermo Fisher Scientific) を用いて取得したデータを解析し、発現が 2 倍以上変動する遺伝子を抽出した。さらに、これらの遺伝子に対して統計解析ソフト R を用いて rank product 解析をおこない、発現変動量の大きい遺伝子を抽出した⁶⁸。また、遺伝子オンロジー解析には Database for Annotated Visualization, Integration and Discovery software (DAVID) を使用した¹⁰⁰。

siRNA 導入による感染効率回復実験

1 遺伝子に対して 4 種類の siRNA を含む siRNA プールは (Dharmacon、CO、USA) より購入した。ターゲットとした遺伝子と siRNA の番号は表 3 に記載した。siRNA のトランスフェクションには HiPerfect (QIAGEN、Hilden、Germany) を用い、操作は付属の手順に従った。トランスフェクションから 24 時間後、BoDV を MOI= 1 で接種し、37°C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、2% FCS を含む DMEM で培養した。3 日後、IFA により感染細胞率を算出した。

表 3. 使用した siRNA 一覧

siRNA#	Gene name	siRNA#	Gene name	siRNA#	Gene name
1	TMPRSS15	19	TMEM47	37	PDCD1LG2
2	CXCL5	20	CSMD3	38	CXCL8
3	ANPEP	21	NCAM2	39	FGF5
4	AOX1	22	C6orf99	40	CDCP1
5	TMEM156	23	G0S2	41	PLAU
6	CXorf57	24	GLIPR1	42	SNAI2
7	GPR85	25	BIRC3	43	PRTFDC1
8	S100A16	26	RAB27B	44	CDK15
9	IL1B	27	AKR1C1	45	SRPX2
10	GCA	28	EMP1	46	CPED1
11	QPRT	29	GRPR	47	HS3ST3A1
12	SERPINB7	30	HDAC9	48	ANTXR2
13	ZNF804A	31	ABI3BP	49	CXCL1
14	EVI2A	32	PTX3	50	FGF1
15	TFPI	33	SYTL2	51	Non-targeting control
16	C3	34	SPP1	52	GAPDH
17	IL1RAPL1	35	TENM1		
18	NAV3	36	SYT1		

インフルエンザウイルスの感染実験

Influenza A/WSN/33 (H1N1) (WSN 株) は東京大学の河岡義裕教授より提供を受けた。ADAR2 ノックダウン細胞および野生型細胞に WSN を MOI= 1 で接種し、37°C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、37°C で 48 時間培養し、

上清を回収した。4°C、3000 rpm で、10 分間遠心し、回収した上清をウイルス溶液としてプラークアッセイに供した。MDCK 細胞に 10 倍ずつ段階希釈した WSN を接種し、37°C で 1 時間反応させた。0.2% の Tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone-treated trypsin (Merck) を含むアガロース (Lonza、Basel、Switzerland) を上から添加し、そのまま室温で 15 分、次いで 37°C で 36 時間反応させた。20% ホルマリン (富士フィルム和光純薬) をアガロースの上から添加し、室温で 30 分間反応させた。20%ホルマリンとアガロースを除去し、0.005%のアミドブラック (富士フィルム和光純薬) を添加し、室温で 1 時間反応させた。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。

ADAR2 ノックアウト細胞株の樹立

ADAR2 ノックアウト細胞の作製には、Alt-R® CRISPR-Cas9 System (Integrated Device Technology、CA、USA) を付属の手順に従い使用した。ターゲット配列には 5'-GCCATGCAGAAATAATATCTCGG-3' を採用した。crRNA (Integrated Device Technology) と tracrRNA (Integrated Device Technology) を 100µM ずつ混合し、95°C で 5 分間加熱した。gRNA と Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (Integrated Device Technology) を混合し、室温で 20 分間反応させた。Cas9-gRNA 複合体は 4D-Nucleofector (Lonza) と SF Cell Line 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza) を用いてエレクトロポレーション法により OL 細胞へ導入した。

A-to-I 編集活性解析

宿主の AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 の mRNA には、ほぼ 100% の効率で ADAR2 から A-to-I 編集される Q/R 部位と呼ばれるアデノシンが存在する。Q/R 部位の配列を調べることで、細胞内の A-to-I 編集活性を評価する。Q/R 部位を含む GluR2 断片を PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて Semi-nested PCR により増幅した。PCR 産物はサンガーシーケンス法により配列を決定した (Fasmac、神奈川、日本)。シーケンス解析には、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit が、付属の手順に従い使用されている。

ADAR2 発現による感染効率回復実験

ADAR2 ノックダウン細胞に pcDNA3-ADAR2、pcDNA3-ADAR2 E/A または、pcDNA3-RFP をトランスフェクション法により導入した。48 時間後、同細胞に BoDV を MOI=1 で接種し、37°C で 1 時間反応させた。3 日後に抗 BoDV-P 抗体を用いた IFA により感染細胞率を算出した。

BoDV ゲノム RNA の配列解析

BoDV が持続感染している ADAR2 ノックダウン細胞および野生型細胞からウイルス粒子を回収し、Trizol LS を用いて全 RNA を抽出した。同 RNA を鋳型として Verso cDNA Synthesis Kit を用いて、BoDV ゲノム RNA 特異的プライマーにより逆転写をおこなった。プライマーの配列は表 1 に記載した。操作は付属の手順に従った。KOD One PCR Master Mix-Blue (東洋紡) を用いて BoDV

ゲノムを 9 つの断片に分けて増幅し、アガロース電気泳動に供した。目的のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した PCR 産物を pCR4Blunt-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) へクローニングした。形質転換には XL10-Gold ウルトラコンピテントセル (Agilent) を使用し、一断片につき 10 コロニーを採取し、GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いてプラスミドを回収し、サンガーシーケンス法により配列を決定した (Fasmac)。配列解析には Geneious software (Biomatters、 Auckland、 New Zealand) を用いた。

RNA 免疫沈降

BoDV 持続感染細胞に pcDNA3-3xFLAG-ADAR2 WT、 pcDNA3-3xFLAG-ADAR2 EAA、 pcDNA3-3xFLAG-EGFP、または pcDNA3-3xFLAG-BoDV-N をトランスフェクション法により導入した。48 時間後、RiboCluster Profiler RIP-Assay Kit (MBL、愛知、日本) を用いて抗 FLAG 抗体で免疫沈降をおこなった。ただし、付属のアガロースビーズではなく、Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を使用した。沈降物は、ウェスタンブロットティング、RT-PCR 法および RT-qPCR 法で解析した。

引用文献

1. Ludwig H, Bode L, Borna disease virus: New aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *OIE Rev Sci Tech.* 12, 259–288 (2000).
2. Bilzer T, Planz O, Lipkin WI, Stitz L, Presence of CD4+ and CD8+ T Cells and Expression of MHC Class I and MHC Class II Antigen in Horses with Borna Disease Virus-Induced Encephalitis. *Brain Pathol.* 5, 223–230 (1995).
3. Ikuta, Hagiwara K, Taniyama H, Nowotny N, Epidemiology and Infection of Natural Animal Hosts. Borna Disease Virus and Its Role in Neurobehavioral Diseases. *American Society of Microbiology.* 87–123 (2002).
4. Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmler M, Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol.* 81, 2123–2135 (2000).
5. Schwemmler M, Borna disease virus infection in psychiatric patients: Are we on the right track? *Lancet Infect Dis.* 1, 46–52 (2001).
6. Hornig M, Briese T, Licinio J, Khabbaz RF, Altshuler LL, Potkin SG, Schwemmler M, Siemietzki U, Mintz J, Honkavuori K, Kraemer HC, Egan MF, Whybrow PC, Bunney WE, Lipkin WI, Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 17, 486–493 (2012).
7. Rapid risk assessment: Acute encephalitis associated with infection with Borna disease virus 1-Germany. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm: ECDC (2018).
8. Korn K, Coras R, Bobinger T, Herzog SM, Lücking H, Stöhr R, Huttner HB, Hartmann A, Ensser A, Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus

1. *N Engl J Med.* 379, 1375–1377 (2018).
9. Liesche F, Ruf V, Zoubaa S, Kaletka G, Rosati M, Rubbenstroth D, Herden C, Goehring L, Wunderlich S, Wachter MF, Rieder G, Lichtmanegger I, Permanetter W, Heckmann JG, Angstwurm K, Neumann B, Märkl B, Haschka S, Niller HH, Schmidt B, Jantsch J, Brochhausen C, Schlottau K, Ebinger A, Hemmer B, Riemenschneider MJ, Herms J, Beer M, Matiasek K, Schlegel J, The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Borna virus infection. *Acta Neuropathol.* 138, 653–665 (2019).
10. Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K, Nakai M, Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol.* 73, 760–766 (1999).
11. Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park YS, Kim S, Ludwig H, Lipkin WI, Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 4362–4366 (1994).
12. Schneemann A, Schneider PA, Kim S, Lipkin WI, Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol.* 68, 6514–6522 (1994).
13. Honda T, Tomonaga K, Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses.* 5, 1978–1990 (2013).
14. Hock M, Kraus I, Schoehn G, Jamin M, Andrei-Selmer C, Garten W, Weissenhorn W, RNA induced polymerization of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology.* 397, 64–72 (2010).
15. 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*. 14, 1–7 (2017).
16. Lennartz F, Bayer K, Czerwonka N, Lu Y, Kehr K, Hirz M, Steinmetzer T, Garten W, Herden C, Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell Microbiol.* 18, 340-54 (2016).
 17. Schneider U, Naegele M, Staeheli P, Schwemmler 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).
 18. 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).
 19. Briese T, De la Torre JC, Lewis A, Ludwig H, Lipkin WI, Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 11486–11489 (1992).
 20. Cubitt B, de la Torre JC, Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol.* 68, 1371–1381 (1994).
 21. Pauli G, Ludwig H, Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Res.* 2, 29–33 (1985).
 22. Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmler M, Tomonaga K, Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe.* 11, 492–503 (2012).
 23. Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T, Tomonaga K, Borna disease

- virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. *J Biol Chem.* 291, 25789–25798 (2016).
24. Bass BL, Weintraub H, An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell.* 55, 1089–1098 (1988).
 25. Eisenberg E, Levanon EY, A-to-I RNA editing - Immune protector and transcriptome diversifier. *Nat Rev Genet.* 19, 473–490 (2018).
 26. Bass BL, Weintraub H, A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell.* 48, 607–613 (1987).
 27. Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K, Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 11457–11461 (1994).
 28. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M, A mammalian RNA editing enzyme. *Nature.* 379, 460–464 (1996).
 29. Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K, A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA.* 6, 755–767 (2000).
 30. Patterson JB, Samuel CE, Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol Cell Biol.* 15, 5376–5388 (1995).
 31. Poulsen H, Nilsson J, Damgaard CK, Egebjerg J, Kjems J, CRM1 Mediates the Export of ADAR1 through a Nuclear Export Signal within the Z-DNA Binding Domain. *Mol Cell Biol.* 21, 7862–7871 (2001).
 32. Eckmann CR, Neunteufl A, Pfaffstetter L, Jantsch MF, The Human But Not the *Xenopus* RNA-editing Enzyme ADAR1 Has an Atypical Nuclear Localization

- Signal and Displays the Characteristics of a Shuttling Protein. *Mol Biol Cell*. 12, 1911–1924 (2001).
33. Schwartz T, Rould MA, Lowenhaupt K, Herbert A, Rich A, Crystal structure of the $Z\alpha$ domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*. 284, 1841–1845 (1999).
 34. Herbert A, Alfken J, Kim YG, Mian IS, Nishikura K, Rich A, A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 8421–8426 (1997).
 35. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Higuchi M, Seeburg PH, RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family. *J Biol Chem*. 271, 31795–31798 (1996).
 36. O’Connell MA, Krause S, Higuchi M, Hsuan JJ, Totty NF, Jenny A, Keller W, Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biol*. 15, 1389–1397 (1995).
 37. Tan MH, Li Q, Shanmugam R, Piskol R, Kohler J, Young AN, Liu KI, Zhang R, Ramaswami G, Ariyoshi K, Gupte A, Keegan LP, George CX, Ramu A, Huang N, Pollina EA, Leeman DS, Rustighi A, Goh YPS, Chawla A, Del Sal G, Peltz G, Brunet A, Conrad DF, Samuel CE, O’Connell MA, Walkley CR, Nishikura K, Li JB, Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals. *Nature*. 550, 249–254 (2017).
 38. Lehmann KA, Bass BL, Double-Stranded RNA Adenosine Deaminases ADAR1 and ADAR2 Have Overlapping Specificities. *Biochemistry*. 39, 12875-12884. (2000).
 39. Paz-Yaacov N, Levanon EY, Nevo E, Kinar Y, Harmelin A, Jacob-Hirsch J,

- Amariglio N, Eisenberg E, Rechavi G, Adenosine-to-inosine RNA editing shapes transcriptome diversity in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 12174–12179 (2010).
40. Paul MS, Bass BL, Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA. *EMBO J.* 17, 1120–1127 (1998).
 41. Flomen R, Knight J, Sham P, Kerwin R, Makoff A, Evidence that RNA editing modulates splice site selection in the 5-HT_{2C} receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 32, 2113 (2004).
 42. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB, Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature.* 387, 303–308 (1997).
 43. Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH, RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell.* 67, 11–19 (1991).
 44. Kask K, Zamanillo D, Rozov A, Burnashev N, Sprengel R, Seeburg PH, The AMPA receptor subunit GluR-B in its Q/R site-unedited form is not essential for brain development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 13777–13782 (1998).
 45. Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH, Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature.* 406, 78–81 (2000).
 46. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S, Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci.* 30, 11917–11925

- (2010).
47. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S, TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol.* 120, 75–84 (2010).
 48. Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T, A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Mol Brain.* 7, (2014).
 49. Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB, Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature.* 399, 75–80 (1999).
 50. Anantharaman A, Tripathi V, Khan A, Yoon J-H, Singh DK, Gholamalamdari O, Guang S, Ohlson J, Wahlstedt H, Öhman M, Jantsch MF, Conrad NK, Ma J, Gorospe M, Prasanth SG, Prasanth K V, ADAR2 regulates RNA stability by modifying access of decay-promoting RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 45, 4189–4201 (2017).
 51. Zhang Z, Carmichael GG, The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell.* 106, 465–475 (2001).
 52. Liddicoat BJ, Ramaswami G, Hartner JC, Li JB, Piskol R, Higuchi M, Chalk AM, Seeburg PH, Walkley CR, RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science.* 349, 1115–1120 (2015).
 53. Chung H, Calis JJA, Wu X, Sun T, Yu Y, Sarbanes SL, Dao Thi VL, Shilvock AR, Hoffmann HH, Rosenberg BR, Rice CM, Human ADAR1 Prevents Endogenous RNA from Triggering Translational Shutdown. *Cell.* 172, 811-824

- (2018).
54. Desmet CJ, Ishii KJ, Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol.* 12, 479–491 (2012).
 55. Kawai T, Akira S, Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.* 34, 637–650 (2011).
 56. Zhao L, Jha BK, Wu A, Elliott R, Ziebuhr J, Gorbalenya AE, Silverman RH, Weiss SR, Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe.* 11, 607–616 (2012).
 57. Li Y, Banerjee S, Goldstein SA, Dong B, Gaughan C, Rath S, Donovan J, Korennykh A, Silverman RH, Weiss SR, Ribonuclease 1 mediates the cell-lethal phenotype of double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 deficiency in a human cell line. *Elife.* 6, (2017).
 58. George CX, Ramaswami G, Li JB, Samuel CE, Editing of Cellular Self-RNAs by Adenosine Deaminase ADAR1 Suppresses Innate Immune Stress Responses. *J Biol Chem.* 291, 6158–6168 (2016).
 59. Cao L, Liu S, Li Y, Yang G, Luo Y, Li S, Du H, Zhao Y, Wang D, Chen J, Zhang Z, Li M, Ouyang S, Gao X, Sun Y, Wang Z, Yang L, Lin R, Wang P, et al., The Nuclear Matrix Protein SAFA Surveils Viral RNA and Facilitates Immunity by Activating Antiviral Enhancers and Super-enhancers. *Cell Host Microbe.* 26, 369-384 (2019).
 60. Fischer S, Pattern Recognition Receptors and Control of Innate Immunity: Role of Nucleic Acids. *Curr Pharm Biotechnol.* 19, 1203–1209 (2012).
 61. Volkman HE, Stetson DB, The enemy within: Endogenous retroelements and

- autoimmune disease. *Nat Immunol.* 15, 415–422 (2014).
62. Ahmad S, Mu X, Yang F, Greenwald E, Park JW, Jacob E, Zhang CZ, Hur S, Breaching Self-Tolerance to Alu Duplex RNA Underlies MDA5-Mediated Inflammation. *Cell.* 172, 797-810 (2018).
 63. Hundley HA, Krauchuk AA, Bass BL, C. elegans and H. sapiens mRNAs with edited 3' UTRs are present on polysomes. *RNA.* 14, 2050–2060 (2008).
 64. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G, Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut.* 18, 997–1003 (1977).
 65. Wang K-S, Choo Q-L, Weiner AJ, Ou J-H, Najarian RC, Thayer RM, Mullenbach GT, Denniston KJ, Gerin JL, Houghton M, Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome. *Nature.* 323, 508–514 (1986).
 66. Kuo MY, Goldberg J, Coates L, Mason W, Gerin J, Taylor J, Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J Virol.* 62, 1855–1861 (1988).
 67. Jayan GC, Casey JL, Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression. *J Virol.* 76, 12399–12404 (2002).
 68. Wong SK, Lazinski DW, Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 15118–15123 (2002).
 69. Garren SB, Kondaveeti Y, Duff MO, Carmichael GG, Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene

- Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLoS Pathog.* 11, (2015).
70. George CX, Samuel CE, Host Response to Polyomavirus Infection Is Modulated by RNA Adenosine Deaminase ADAR1 but Not by ADAR2. *J Virol.* 85, 8338–8347 (2011).
 71. Horta-Barbosa L, Fuccillo DA, Hamilton R, Traub R, Ley A, Sever JL, Some Characteristics of SSPE Measles Virus. *Exp Biol Med.* 134, 17–21 (1970).
 72. Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA, Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell.* 55, 255–265 (1988).
 73. Shivakoti R, Siwek M, Hauer D, Schultz KLW, Griffin DE, Induction of Dendritic Cell Production of Type I and Type III Interferons by Wild-Type and Vaccine Strains of Measles Virus: Role of Defective Interfering RNAs. *J Virol.* 87, 7816–7827 (2013).
 74. Ho T-H, Kew C, Lui P-Y, Chan C-P, Satoh T, Akira S, Jin D-Y, Kok K-H, PACT- and RIG-I-Dependent Activation of Type I Interferon Production by a Defective Interfering RNA Derived from Measles Virus Vaccine. *J Virol.* 90, 1557–1568 (2016).
 75. Pfaller CK, Donohue RC, Nersisyan S, Brodsky L, Cattaneo R, Extensive editing of cellular and viral double-stranded RNA structures accounts for innate immunity suppression and the proviral activity of ADAR1 p150. *PLoS Biol.* 16, e2006577 (2018).
 76. Doria M, Neri F, Gallo A, Farace MG, Michienzi A, Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res.* 37, 5848–5858 (2009).

77. Weiden MD, Hoshino S, Levy DN, Li Y, Kumar R, Burke SA, Dawson R, Hioe CE, Borkowsky W, Rom WN, Hoshino Y, Adenosine Deaminase Acting on RNA-1 (ADAR1) Inhibits HIV-1 Replication in Human Alveolar Macrophages. *PLoS One*. 9, e108476 (2014).
78. Biswas N, Wang T, Ding M, Tumne A, Chen Y, Wang Q, Gupta P, ADAR1 is a novel multi targeted anti-HIV-1 cellular protein. *Virology*. 422, 265–277 (2012).
79. Doria M, Tomaselli S, Neri F, Ciafre SA, Farace MG, Michienzi A, Gallo A, ADAR2 editing enzyme is a novel human immunodeficiency virus-1 proviral factor. *J Gen Virol*. 92, 1228–1232 (2011).
80. de Chasseay B, Aublin-Gex A, Ruggieri A, Meyniel-Schicklin L, Pradezynski F, Davoust N, Chantier T, Tafforeau L, Mangeot P-E, Ciancia C, Perrin-Cocon L, Bartenschlager R, André P, Lotteau V, The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 Playing a Supportive Role in Virus Replication. *PLoS Pathog*. 9, e1003440 (2013).
81. Suspene R, Petit V, Puyraimond-Zemmour D, Aynaud M-M, Henry M, Guetard D, Rusniok C, Wain-Hobson S, Vartanian J-P, Double-Stranded RNA Adenosine Deaminase ADAR-1-Induced Hypermutated Genomes among Inactivated Seasonal Influenza and Live Attenuated Measles Virus Vaccines. *J Virol*. 85, 2458–2462 (2011).
82. Tomaselli S, Galeano F, Locatelli F, Gallo A, ADARs and the Balance Game between Virus Infection and Innate Immune Cell Response. *Curr Issues Mol Biol*. 17, 37-51 (2015).
83. Hallensleben W, Staeheli P, Inhibition of Borna disease virus multiplication by

- interferon: Cell line differences in susceptibility. *Arch Virol.* 144, 1209–1216 (1999).
84. Staeheli P, Sentandreu M, Pagenstecher A, Hausmann J, Alpha/Beta Interferon Promotes Transcription and Inhibits Replication of Borna Disease Virus in Persistently Infected Cells. *J Virol.* 75, 8216–8223 (2001).
 85. Ovanesov M V, Ayhan Y, Wolbert C, Moldovan K, Sauder C, Pletnikov M V, Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation.* 5, 50 (2008).
 86. Makino A, Fujino K, Parrish NF, Honda T, Tomonaga K, Borna disease virus possesses an NF- κ B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene. *Sci Rep.* 5, 8696 (2015).
 87. Martin A, Hoefs N, Tadewaldt J, Staeheli P, Schneider U, Genomic RNAs of Borna disease virus are elongated on internal template motifs after realignment of the 3' termini. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 7206–7211 (2011).
 88. Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F, Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PLoS One.* 3, e2032 (2008).
 89. Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH, RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: A base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell.* 75, 1361–1370 (1993).
 90. Lehmann KA, Bass BL, Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry.* 39, 12875–12884 (2000).

91. Stephens OM, Haudenschild BL, Beal PA, The binding selectivity of ADAR2's dsRBMs contributes to RNA-editing selectivity. *Chem Biol.* 11, 1239–1250 (2004).
92. Xu M, Wells KS, Emeson RB, Substrate-dependent contribution of double-stranded RNA-binding motifs to ADAR2 function. *Mol Biol Cell.* 17, 3211–3220 (2006).
93. Shankar V, Kao M, Hamir AN, Sheng, H, Koprowski H, Dietzscholdl B, Kinetics of Virus Spread and Changes in Levels of Several Cytokine mRNAs in the Brain after Intranasal Infection of Rats with Borna Disease Virus. *J Virol.* 66, 992-8 (1992).
94. Hoffmann HH, Schneider WM, Rice CM, Interferons and viruses: An evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.* 36, 124–138 (2015).
95. Liu G, Park H-S, Pyo H-M, Liu Q, Zhou Y, Influenza A Virus Panhandle Structure Is Directly Involved in RIG-I Activation and Interferon Induction. *J Virol.* 89, 6067–6079 (2015).
96. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, et al., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 12, 19–30 (2010).
97. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S, Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2, 569–579 (2002).
98. Rajarathnam K, Schnoor M, Richardson RM, Rajagopal S, How do chemokines

- navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways. *Cell Signal.* 54, 69–80 (2019).
99. Xiao Y, Dolan PT, Goldstein EF, Li M, Farkov M, Brodsky L, Andino R, Poliovirus intrahost evolution is required to overcome tissue-specific innate immune responses. *Nat Commun.* 8, (2017).
 100. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4, 44–57 (2009).

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。

Mako Yanai, Shohei Kojima, Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Keizo Tomonaga and Akiko Makino.

ADAR2 is involved in self and nonself recognition of Borna disease virus genomic RNA in the nucleus

Journal of Virology, in press, 2020. DOI: 10.1128/JVI.01513-19

謝辞

本研究を遂行するにあたり、素晴らしい環境を与え、6年間熱心に、忍耐強くご指導下さいました、京大生命科学研究科 朝長啓造教授に心より感謝申し上げます。また、博士課程より研究を指導し、研究者として、人生の先輩として常に私を引っ張って下さいました牧野晶子助教に、深く感謝申し上げます。

日頃よりの的確なアドバイスで研究の遂行を助けて下さいました、京都大学白眉センター 堀江真行特定准教授、並びに京都大学京阪神次世代グローバル研究リーダー育成コンソーシアム 小松弓子特定助教に、心よりお礼申し上げます。また、研究室生活を通して、私を支えて下さいました朝長研究室の皆様、ウイルス・再生医科学研究所の皆様にも心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進学を応援し、最後まで温かく見守ってくれた家族に心から感謝致します。