

**オルソボルナウイルスの
膜糖蛋白質の発現調整による
戦略的粒子産出機構とその応用**

酒井 まどか

目次

| | |
|--|----|
| 要旨 | 3 |
| 略語表 | 5 |
| 第一章 序論 | |
| 1-1. 治療分野におけるウイルスベクターの活躍 | 8 |
| 1-2. ボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) の持続感染機構 | 8 |
| 1-3. BoDV-1 による子孫ウイルス粒子の産生 | 9 |
| 1-4. エピゾーマル RNA ウイルスベクター (REVec) | 10 |
| 1-5. 本研究の目的 | 11 |
| 第二章 結果 | |
| 2-1. G の翻訳後修飾はその発現量により変化する。 | 14 |
| 2-2. G の過剰な発現は新規産出粒子の導入力価を低下させる。 | 16 |
| 2-3. 導入力価が低い粒子の産出は過剰発現による副産物 pre-G に起因する。 | 21 |
| 2-4. オルソボルナウイルス属で CnBV-1 のみ例外的に高い開裂効率を維持する。 | 23 |
| 2-5. CnBV-1-G のシグナルペプチドは G の開裂効率に関与し産出粒子の導入力価を上昇させる。 | 25 |
| 2-6. CnBV-1-G をもつ REVec は高い導入力価を示す。 | 28 |
| 第三章 考察 | |
| 3-1. G の蛋白質分解性成熟に関わる新たな細胞内因子の可能性 | 32 |
| 3-2. BoDV-1-G の子孫ウイルス粒子産出における役割 | 33 |
| 3-3. BoDV-1-G の発現量による戦略的な子孫ウイルス粒子産出機構 | 34 |

| | | |
|------------|-----------------------------|-----------|
| 3-4. | 粒子産出機構における CnBV-1-G の特質的な機能 | 34 |
| 3-5. | CnBV-1-G を用いた REVec システム改善 | 35 |
| 第四章 | 材料と方法 | 37 |
| | 文献 | 47 |
| | 注釈 | 57 |
| | 謝辞 | 58 |

要旨

遺伝子導入技術であるウイルスベクターは、基礎研究だけでなく臨床分野にも欠かすことができない。導入遺伝子を安全にかつ長期発現できるウイルスベクターが、臨床応用において求められている。持続感染を特徴とするボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) を用いたエピソード RNA ウイルスベクター (REVec) は、細胞に導入すると、外来遺伝子を長期間発現させることができる。しかしながら、BoDV-1 は産出粒子が少ないという課題がある。そこで、REVec の導入効率を向上させるために、BoDV-1 を含むオルソボルナウイルス属の膜糖蛋白質 (G) の感染性粒子産出における役割を評価した。

免疫染色による評価で、BoDV-1 感染細胞の半数において G の発現が検出限界以下であったことから、G のスプライシングサイトに変異を入れ、発現量を増加させたところ、細胞由来の蛋白質分解酵素フーリンによる開裂と翻訳後修飾に異常が生じた。

G の発現量による粒子産出への影響を調べるために、G 遺伝子欠損 REVec (ΔG -REVec) に G の発現を一過性に補完することで回収するシュードタイプ REVec を用いて、産出されるウイルス粒子を解析した。G の過剰な発現は、粒子の産出自体に影響を与えなかったが、導入効率の低い REVec 粒子の産出をもたらした。また、適切な開裂と糖鎖付加により成熟した G、および REVec がもつウイルスゲノム RNA の粒子への取り込みを阻害した。さらに、G の過剰な発現の副産物である未開裂の G がこれらの原因になることを明らかにした。

以上の G の特徴は、BoDV-1 を含むオルソボルナウイルス属のウイルスで共通したが、カナリアボルナウイルス 1 型 (CnBV-1) の G のみ例外的に、発現量を増加させた場合でも、高い開裂効率および細胞への導入効率を維持した。そして、CnBV-1 と近縁である CnBV-2 とのキメラ G を用いて、CnBV-1 のシグナルペプチドがフーリンとの相互作用を介する高い開裂効率の責任領域であり、そのことが高い導入効率を示す粒子の産出に寄与することを明らかにした。

最後に、導入効率の高い REVec システムに改善するために、CnBV-1-G 利用による効果を調べた。CnBV-1 は本来鳥類を宿主とするが、CnBV-1-G を持つシュードタイプ REVec は、ヒト培養細胞だけでなく幹細胞への遺伝子導入効率を上昇させた。また、シュードタイプだけでなく CnBV-1-G 遺伝子に組換えた REVec でも導入効率の向上に成功した。

以上から、オルソボルナウイルスは G の発現を制限することによって、感染性粒子の産出を制御することが明らかになった。未開裂の G は過剰な発現の指標となり、感染性粒子の産生に対する負のフィードバックとして機能する可能性が考えられた。このことは、持続感染を成立させるために、ウイルスが自身の膜糖蛋白質の発現を調整することで、免疫機構を逃れ忍びやかに粒子を産出する新たなメカニズムを示した。本研究成果は、オルソボルナウイルスの粒子産出についての理解を深めるだけでなく、REVec 産生システムの改善に貢献することが期待できる。

略語表

本文中および図表中に用いた略語は下記の通りである。

| | | |
|-------|--------------------------------------|---------------------|
| BoDV | : Borna disease virus | ボルナ病ウイルス |
| CBB | : Coomassie brilliant blue | クマシーブリリアントブルー |
| CnBV | : Canary bornavirus | カナリアボルナウイルス |
| EsBV | : Estrildid finch bornavirus | カエデチョウボルナウイルス |
| G | : Glycoprotein | 膜糖蛋白質 |
| HA | : Hemagglutinin | ヘマグルチニン |
| HIV | : Human immunodeficiency virus | ヒト免疫不全ウイルス |
| iPSC | : Induced pluripotent stem cell | 人工多能性幹細胞 |
| L | : Large polymerase protein | RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ |
| LCMV | : Lymphocytic choriomeningitis virus | リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス |
| M | : Matrix protein | マトリックス蛋白質 |
| MuBV | : Munia bornavirus | キンパラボルナウイルス 1 型 |
| MyoD1 | : Myogenic differentiation 1 | 骨格筋分化制御因子 1 |
| N | : Nucleoprotein | 核蛋白質 |
| OL | : Oligodendroglioma | ヒトオリゴデンドグリオーマ細胞 |
| OPC | : Oligodendrocyte precursor cell | オリゴデンドログリア前駆細胞 |
| P | : Phosphoprotein | リン酸化蛋白質 |
| PaBV | : Parrot bornavirus | オウムボルナウイルス |
| PDD | : Proventricular dilatation disease | 前胃拡張症 |
| PLA | : Proximity ligation assay | 近接ライゲーションアッセイ |
| REVec | : RNA virus-based episomal vector | エピゾーマル RNA ウイルスベクター |
| SP | : Signal peptide | シグナルペプチド |

| | |
|-------|---|
| SPC | : Subtilisin-like proprotein convertases サブチリシン様プロ蛋白質 転移酵素 |
| vgRNA | : Viral genome RNA ウイルスゲノム RNA |
| vRNP | : Viral ribonucleoprotein ウイルスリボヌクレオ蛋白質 |
| VSBV | : Variegated squirrel bornavirus カワリリスボルナウイルス |
| VSV | : Vesicular stomatitis virus 水疱性口内炎ウイルス |

第一章

序論

1-1. 治療分野におけるウイルスベクターの活躍

ウイルス工学は、ウイルスベクターという遺伝子導入ツールを疾患治療分野に提供し効用をもたらす¹。遺伝子治療の臨床現場では、遺伝子導入技術の中でウイルスベクターが最も多く採用され、遺伝子疾患やがんなどの治療に活用されている²。使用されるウイルスベクターの中でも、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスおよびレンチウイルスが多くを占め、遺伝子導入だけでなくそれを応用したゲノム編集技術にも利用される¹⁻³。しかしながら、臨床へのさらなる応用には免疫原性や腫瘍化などが課題とされ¹、すべてのウイルスベクターに継続的な遺伝子発現と導入後の安全性が求められる。

1-2. ボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) の持続感染機構

ウマやヒツジにボルナ病を引き起こす病原体としてボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) が発見された。BoDV-1 は、非分節一本鎖マイナス鎖 RNA (8.9 kb) をゲノムとし、ボルナウイルス科オルソボルナウイルス属に分類される。ウマ、ヒツジに加えウシ、ネコなどの哺乳類や、マガモなどの鳥類への自然感染、また実験的にはげっ歯類や霊長類に病原性を示すことが報告され、本ウイルスの宿主域は広い^{4,5}。一方で、ヒトへの BoDV-1 感染とそれによる疾患との因果関係について議論されてきたが⁶⁻⁹、BoDV-1 感染による急性脳炎の死亡例が近年報告された¹⁰⁻¹³。脳炎患者の脳の組織免疫染色と *in situ hybridization* 解析により、BoDV-1 の核蛋白質 (N) と RNA が検出された¹²。

細胞に BoDV-1 が感染すると、核内でその複製が維持されるが、細胞傷害性は示さない^{14,15}。ウイルス蛋白質である N、リン酸化蛋白質 (P) および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) と、ウイルスゲノム RNA (vgRNA) からなる複合体であるウイルスリボヌクレオ蛋白質 (vRNP) (図 1A) が複製の最小単位となり、転写複製がおこなわれる。また、細胞分裂期には vRNP をクロマチンに結合させることで、娘細胞にもその感染を継続させる (図 1B)^{14,16,17}。この機構ゆ

えに、BoDV-1 の持続感染において細胞がもつゲノム DNA への vgRNA の組み込みは極めて低頻度である¹⁸。細胞ゲノム DNA への挿入は腫瘍化の原因とされるが、BoDV-1 は宿主のクロマチンを感染の足場として利用するのみに留まることから、細胞を損傷せずに非分裂細胞および分裂細胞の両方で安定的に感染を維持できる。

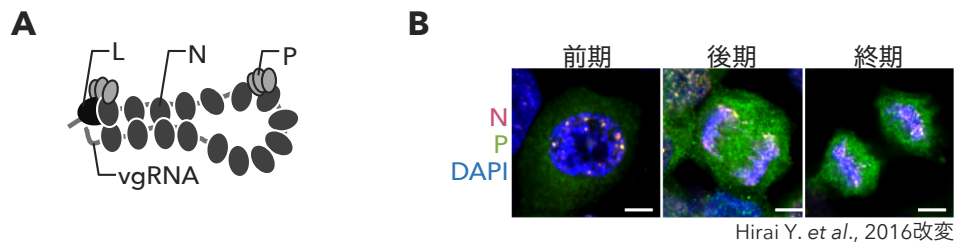


図1. BoDV-1はvRNPのクロマチンへの結合を介して感染を持続させる

(A) BoDV-1のvRNP。vgRNA, N, PおよびLで構成させる複合体であるvRNPは、核内で転写複製がおこなわれる。(B)免疫蛍光染色による分裂期のBoDV感染細胞中のN, Pの検出。核内で検出されるN, PのシグナルがvRNPを示す。Hirai, Y. *et al. JBC*. 2016の図5Aから引用した。

1-3. BoDV-1 による子孫ウイルス粒子の産生

外皮膜をもつ RNA ウイルスでは、一般的にマトリックス蛋白質 (M) と膜糖蛋白質 (G) が、子孫ウイルス粒子の形成に機能する¹⁹。BoDV-1 においても、感染性をもつ子孫ウイルス粒子の作製には、M と G が関与することが知られている²⁰。BoDV-1 の M は 4 量体を形成し、正電荷に帯電する面を露出させることで、形質膜との相互作用を可能にする^{21,22}。また、感染細胞において、P および vgRNA と相互作用し、その複製の場である vRNP と結合する^{21,23}。このことから、粒子への vRNP の輸送にも関与する可能性が示唆されている。一方、BoDV-1 の G は、細胞の受容体への結合^{24,25}、およびその後の pH 依存性エンドサイトーシスによる膜融合と細胞への侵入過程に機能することから、作製された粒子に感染性を付与する役割をもつ^{26,27}。他の RNA ウイルスでは粒子形成過程における膜糖蛋白質の役割が報告されているが²⁸⁻³⁰、BoDV-1 を含めオルソボルナウ

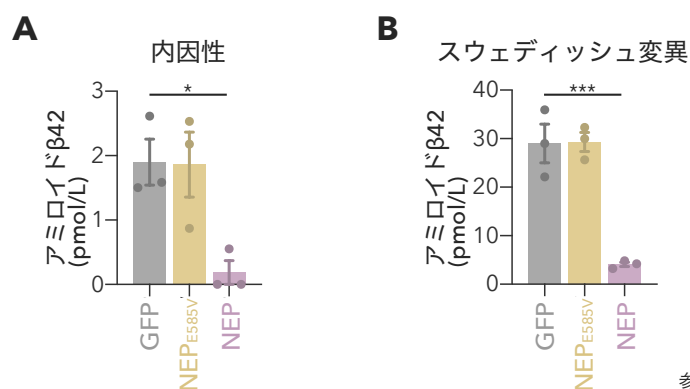
ウイルス属の G については明らかにされていない。

BoDV-1 の持続感染細胞から子孫ウイルス粒子がほとんど産出されないこと、またその培養上清に含まれるウイルス粒子の力価が極めて低いことがこれまでに報告されている³¹⁻³³。この特徴は、BoDV-1 が核内で持続感染を成立させるために重要な戦術の可能性が考えられるが、どのように子孫ウイルス粒子の産出を抑制的に制御しているか明らかにされていない。

1-4. エピゾーマル RNA ウイルスベクター (REVec)

持続感染する BoDV-1 の機構を利用して、導入遺伝子の長期間安定的な発現を目的としたエピゾーマル RNA ウイルスベクター (REVec) が、私が所属している研究室から報告された³⁴⁻³⁶。本ベクターを接種したマウス脳で 8 ヶ月間にわたり外来遺伝子 GFP の発現が観察された³⁶。また、REVec はウイルス粒子に感染性を付与する G 遺伝子を vgRNA 上で欠損させることで、非伝播型のベクター (Δ G-REVec) が作製された³⁶。 Δ G-REVec は G を発現する細胞では感染を伝播できるが、発現しない細胞に一度感染すると、その細胞から感染性を付与した子孫ウイルス粒子を産出できないため、感染を伝播できない³⁶。さらに、粒子の形成に機能する M も欠損させた Δ MG-REVec が開発された³⁷。これらの非伝播型ベクターは、導入した細胞を移植する *ex vivo* での応用が考えられている³⁸。

これまでに、BoDV-1 が向神経性であることから、神経変性疾患のアルツハイマー病治療を目的として、発症原因とされるアミロイド β を分解する酵素ネプリライシン遺伝子を組換えた REVec が開発され、その分解の効果が示された (図 2)³⁹。また、REVec システムは人工多能性幹細胞 (iPSC) を含む幹細胞に高効率で遺伝子を導入でき⁴⁰、導入による分化能への影響は観察されていない^{40,41}。さらに、転写因子の骨格筋分化制御因子 (MyoD1) を組換えた REVec を iPSC に導入することで、骨格筋細胞への分化に成功したことが報告されている⁴⁰。これらのことから、REVec システムは再生医療に応用できる可能性が示されている。



参考論文 Sakai M. et al. 2018 改変

図2. REVecから発現したNEPはアミロイドβを分解する

(A), (B) REVecを導入したヒト神経芽細胞腫の培養上清中のアミロイドβ42。内因性のアミロイドβの前駆体蛋白質(A)と、家族性変異で知られるスウェディッシュ変異 (K670N, M671L) をもつ前駆体蛋白質(B) から作製されたアミロイドβ42をELISAを用いて定量した。スウェディッシュ変異をもつ前駆体は、プラスミドにより発現させた。NEPはネプリライシンを、NEP^{E585V}は活性部位に変異 (E585V) をもつ不活性型ネプリライシンを示す。エラーバーは標準誤差を示す。ダネット検定により統計解析した。*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ 。参考論文のSakai M. et al. *Microbiol. immunol.* 2018の図2d, eのデータを使用し作製した。

BoDV-1 が核内で転写される機構を利用して、低分子 RNA の効率的かつ持続的な発現を目的にした REVec が構築され、標的遺伝子の発現抑制が確認された⁴²。また、BoDV-1 の複製を抑制する抗ウイルス剤であるファビピラビルを用いて、iPSC を含む導入細胞から REVec の効果的な排除が示された^{40,43}。発現調整においてさらなる改良が近年報告された。それは、REVec の導入遺伝子の下流にテオフィリン依存性自己開裂型リボスイッチ (L2b9) を追加することで、発現の切り替えを可能にした REVec システムが開発された⁴⁴。

1-5. 本研究の目的

2011 年に REVec システムが開発されて以降、ベクター自体の改良や有効性の評価がおこなわれてきたが、臨床分野において新たなウイルスベクターとして REVec システムを躍進させるためには、ベクターの回収効率が低いことが課題で

ある^{41,45}。子孫ウイルス粒子の産出能の低さは、BoDV-1の持続感染機構に重要とされる一方で、プラスミドから人工的に作製したベクターを高い力価で回収する点においては、障壁になっている。これまでに、タンジェンシャルフローろ過を用いた濃縮方法が報告されているが、大量にベクターを回収する課題が残された⁴⁶。

そこで本研究は、REVecシステムの導入効率を向上させることを目的とした。まず、BoDV-1感染細胞においてGの発現が制限されていることに注目し、発現量を変化させたときに産出される粒子を解析した。それによって、粒子産出におけるGの役割を明らかにした。さらに、BoDV-1以外のオルソボルナウイルス属のウイルスがもつGによるREVecの導入効率を比較し、REVecシステムの改良に応用できるかを検討した。

第二章

結果

2-1. G の翻訳後修飾はその発現量により変化する。

BoDV-1 は核内において複製および持続感染を成立させるために、M、G および L をコードするポリシストロニックの転写産物から、選択的スプライシング機構を利用することでそれぞれの蛋白質の発現量が調節される (図 3A) ⁴⁷⁻⁵⁰。これまで、BoDV-1 感染細胞において、N の発現が検出されるが G の発現が検出されない細胞があると報告されていた ^{26,27,51}。そのことを確かめるために、免疫蛍光染色法により評価したところ、BoDV-1 感染細胞のほとんどすべての細胞で一様に発現を検出できた N に対して、G の発現量はさまざまで、半数以上の細胞で検出限界以下だった (図 3B、C)。G の発現量が、BoDV-1 の感染性粒子の産出の低さに関係しているのではないかと考えられた。

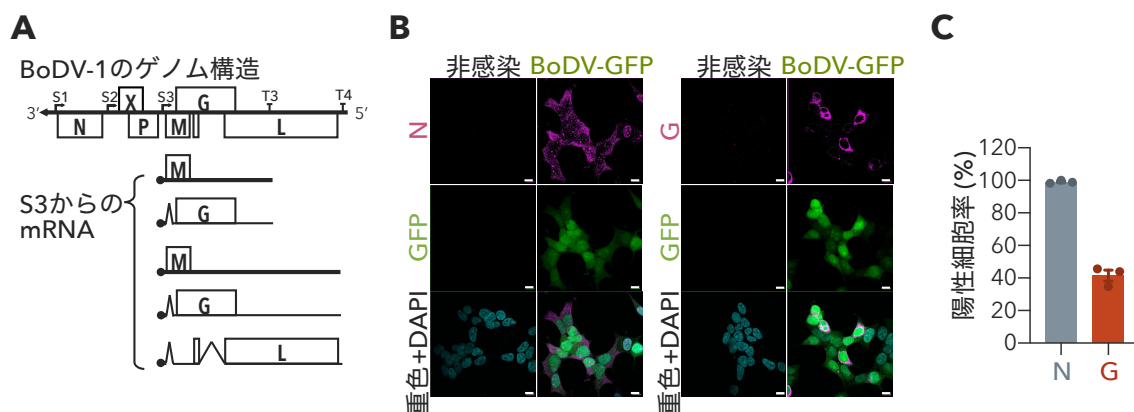


図3. BoDV-1感染細胞におけるGの発現

(A) BoDV-1のM, G, L遺伝子をコードするポリシストロニックの転写産物。転写開始配列 (S3) から転写終結配列 (T3, T4) までの代表的なmRNAを記す。(B) BoDV-GFP感染293T細胞におけるNおよびGの発現。抗N, G抗体を用いた免疫蛍光染色により検出した。ImageJにより最小閾値をそれぞれ46, 13に設定した。スケールバーは、10 μ mを示す。(C) BoDV-GFP感染293T細胞におけるN, Gの検出陽性率。(B) を元に、それぞれ757, 766 のGFP発現細胞のうちでNおよびGが検出された細胞を計数した。

G は、N 末端にシグナルペプチド、C 末端に膜貫通領域をもつ I 型一回膜貫通型蛋白質である ²⁶。G の前駆体 (pre-G) (95 kDa) が、遍在的に発現するサブチリシン様プロ蛋白質転移酵素であるフーリンによる開裂、および糖鎖修飾を受けることで、GP1 (51-60 kDa) と GP2 (43 kDa) に成熟する (図 4A) ^{26,52,53}。

BoDV-1 の粒子形成における G の発現量の影響を調べるために、BoDV-1 感染細胞と、プラスミドにより強制発現させたときの細胞における G の発現特性を観察した。G の ORF は M の ORF と、L の ORF およびイントロンと重なる^{48,49}。G の ORF そのままをコードするプラスミド (Gwt) に加えて、G の発現量を上昇させるためにスプライシングドナー部位とアクセプター部位に同義変異をもつスプライシングノックアウト G 発現プラスミド (GspKO) を作製した (図 4B)⁵⁴。Gwt 発現細胞、および GFP 組換え BoDV-1 (BoDV-GFP) 感染細胞では、pre-G と成熟した G が明瞭に検出されたが、発現量を増加させた GspKO を導入する

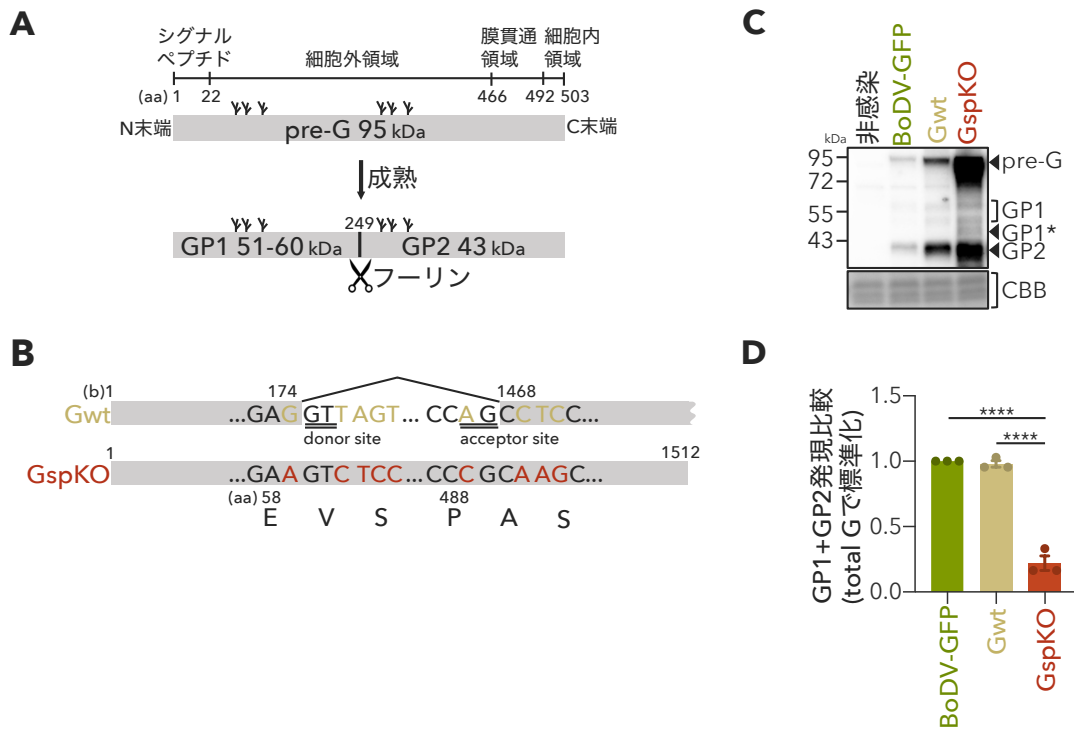


図4. BoDV-1-Gの発現は制限される

(A) BoDV-1-Gの構造と成熟。I型一回膜貫通型蛋白質で、翻訳後に糖鎖修飾と開裂を受けることで成熟する。(B) スプライシングノックアウトGspKO。BoDV-1-GのORFにあるスプライシングドナー部位(172-180塩基)とアクセプター部位(1464-1472塩基)に同義変異をもつ。(C) BoDV-GFP感染293T細胞およびG遺伝子を導入した293T細胞におけるGの発現。GwtもしくはGspKOの発現プラスミドを導入した2日後に回収した細胞溶解液を、抗BoDV-1-G抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。CBB染色は、ローディングコントロールとした。(D) Gの開裂効率の比較。(C)を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。GP1とGP2の合計をtotalG (GP1+GP2+pre-G)で割ることで算出した。エラーバーは、標準誤差を示す。フィッシャーの最小有意差法により統計解析した。****, $p < 0.0001$

と、pre-Gが増加し pre-G と開裂後 GP の修飾に異常が生じた (図 4C、D)。適切な成熟過程を経た GP1 と GP2 が、新規に産出されるウイルス粒子に取り込まれることから、G の発現量が子孫ウイルス粒子の産出に関与する可能性が示された。

2-2. G の過剰な発現は新規産出粒子の導入力価を低下させる。

BoDV-1 の子孫ウイルス粒子の産出に、G の発現量が関与するかを調べるために、G 遺伝子欠損 GFP 組換え REVec (Δ G-REVec) 感染 293T 細胞に、さまざまな量で GspKO 発現プラスミドを導入し、外皮膜に BoDV-1 の G (BoDV-1-G) を異所性に取り込ませた Δ G-REVec (BoDV-1G-REVec) を作製した (図 5A)³⁶。回収した BoDV-1G-REVec を Vero 細胞に接種させ、3 日後の GFP 陽性細胞を計数することで、そのベクターの導入効率 (力価) を決定した。興味深いことに、0.1 μ g の GspKO 発現プラスミドを導入したときは力価が 3 倍近く増加したが、導入プラスミド量を 1.5 μ g に増加させると力価は逆に減少した (図 5B)。このことから、高力価で REVec を回収できる最適な G の発現量があることが示された。

次に、GspKO 発現プラスミドを導入した Δ G-REVec 感染 293T 細胞における G の発現を、ウェスタンブロット法により観察した。高力価の BoDV-1G-REVec を産出した細胞では、GP1 と GP2 が明瞭に検出された一方で、過剰に発現させた細胞では pre-G と、異常な糖鎖修飾を受けた GP1 (GP1*)⁵⁵ が優位に検出された (図 5C)。次に、 Δ G-REVec 感染 293T 細胞に GspKO 発現プラスミドを導入することで産出させたウイルス粒子への G の取り込みを評価した。少量および適量の G を発現させた細胞から産出された粒子で検出される G は、GP1 と GP2 に限定されていた (図 5D)。その一方で、過剰に GspKO を発現させると、粒子に取り込まれた GP1 と GP2 は顕著に減少し、pre-G が検出された (図 5D、E)。粒子に取り込まれた M を検出することによって粒子の産出量を評価したところ、

Gの発現量に影響されなかった(図5F)。すなわち、Gが過剰に発現すると、新規に産出されるウイルス粒子への開裂されていないGの取り込みが増加することが示された。

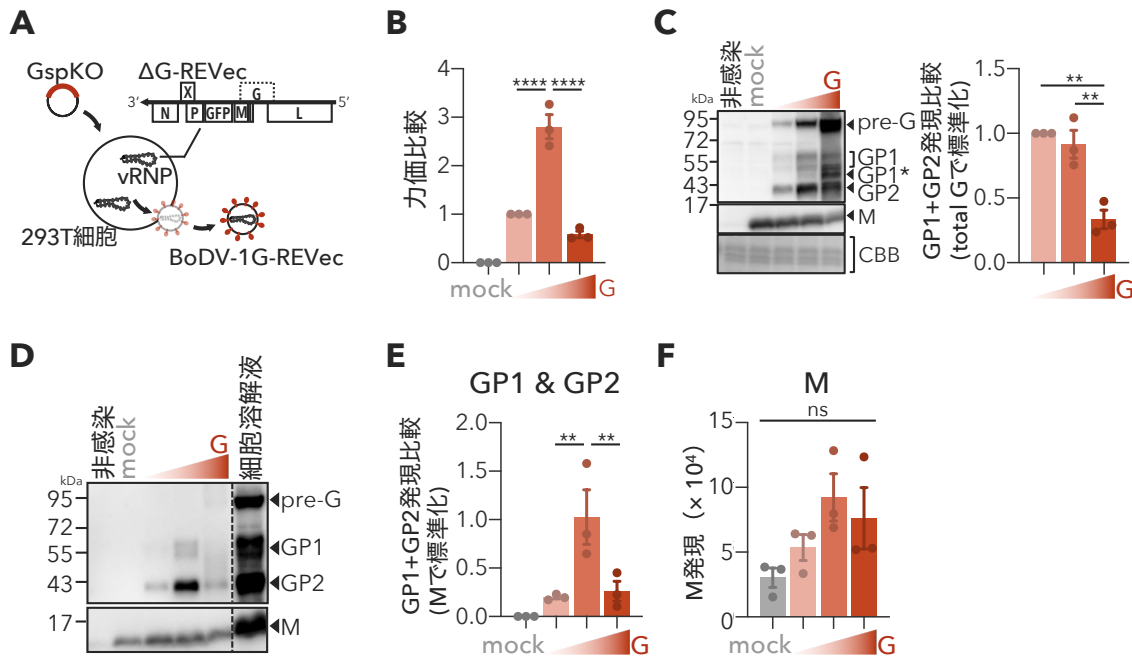


図5. Gの発現量増加が産出されるBoDV-1G-REVec粒子に影響する

(A) 一過的に感染性をもつ Δ G-REVecの回収方法。 Δ G-REVecが感染しvRNPを持続的に保持する293T細胞にGspKO発現プラスミドを導入し、BoDV-1G-REVecを回収する。(B) ベクター力価の比較。0.01, 0.1, 0.15 μ gのGspKO発現プラスミドと、産出を促進するためにM発現プラスミドを 3.0×10^6 の Δ G-REVec感染293T細胞に導入し、2日後にMgCl₂を含むHEPES緩衝液で回収し精製した。Vero/puro細胞を用いて力価を測定した。(C)(左) プラスミドを導入した Δ G-REVec感染293T細胞におけるGの発現。CBB染色をローディングコントロールとした。(右) Gの開裂効率の比較。(左) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析し、GP1とGP2の合計をtotalG (GP1+GP2+pre-G) で割ることで算出した。(D) 回収したBoDV-1G-REVec粒子に含まれるGおよびMの検出。(C)で0.1 μ gだけ導入した細胞溶解液を陽性対照として使用した。(E) ベクター粒子に含まれるGP1とGP2の比較。(D)を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析し、Mで標準化した。(F) ベクター粒子に含まれるM。(D) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、フィッシャーの最小有意差法 (B, E, F) およびテューキーの多重比較検定 (C) を用いた。**, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$; ns, non-significant

細胞における内因性のフーリンの発現が少量であることから⁵⁶、さまざま

な量でフーリンを追加で発現させ、そのときの BoDV-1-G の開裂と BoDV-1G-REVec の導入力価を調べた。予想した通り、フーリンの発現を追加すると、導入量依存的に粒子に取り込まれる pre-G が減少し (図 6A)、産出されるベクターの力価が増したが、図 5B で求めた最適な量 (0.1 μg) を発現させたよりも低か

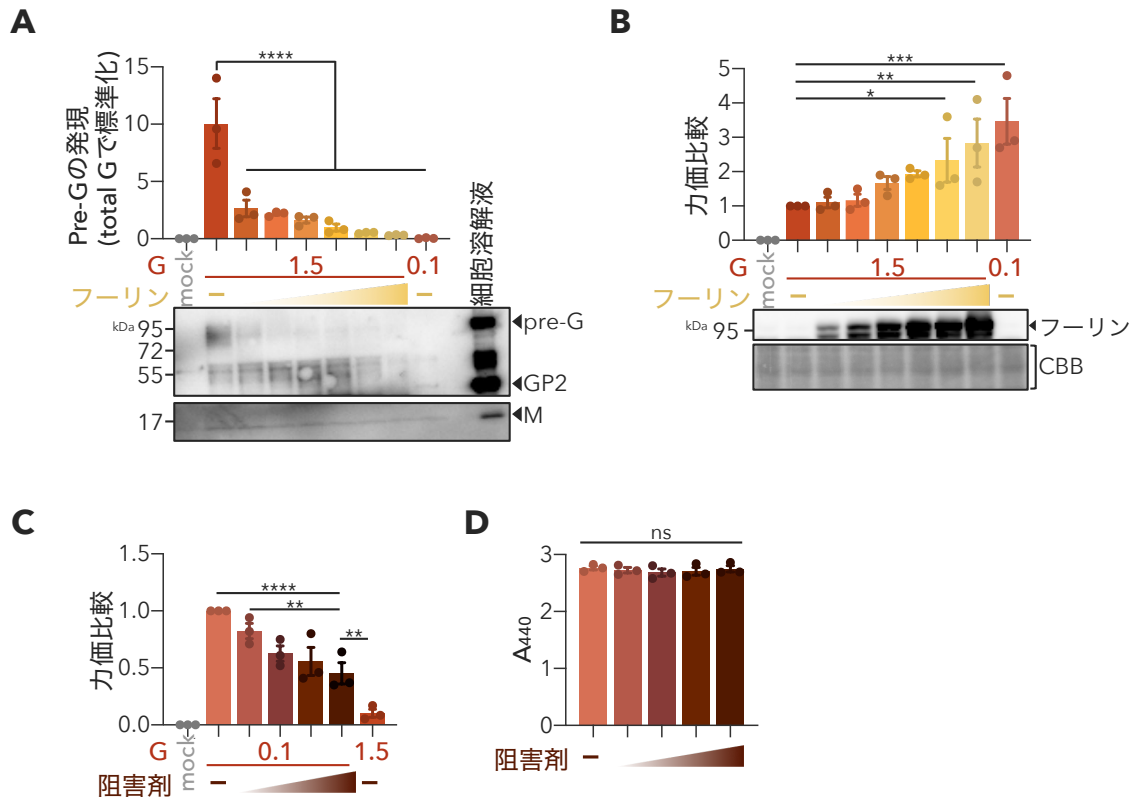


図6. フーリンによるGの開裂は産出粒子の導入力価を上昇させる

(A)(下段) フーリンを追加発現させて回収したBoDV-1G-REVecに含まれるGとMの検出。GspKO発現プラスミドに追加して、0.025, 0.085, 0.25, 0.85, 2.5, 8.5 μg のヒトフーリン発現プラスミドを導入し、2日後にBoDV-1G-REVec を回収した。(上段) pre-Gの比較。(下段) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。totalG (GP1+GP2+pre-G) で標準化した。(B)(上段) ベクター力価の比較。(下段) プラスミドを導入した2日後の細胞内のフーリンの発現。CBB染色は、ローディングコントロールとした。(C) フーリン阻害剤を用いて回収したベクター力価の比較。1, 3, 10, 30 μM のフーリン阻害剤(decRVKR-cmk)をプラスミドを導入した ΔG -REVec感染293T細胞の1時間後に添加し、2日後BoDV-1G-REVecを回収した。(D) ΔG -REVec感染293T細胞におけるフーリン阻害剤による細胞増殖への影響。(C) と同様の濃度を添加し2日後にWST-1を用いて評価した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、フィッシャーの最小有意差法 (A, B, C) およびテューキーの多重比較検定 (D) を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; n.s., non-significant

った (図 6B)。これらのことから、BoDV-1G-REVec の導入力価を決定するのは、フーリンだけでなく、G の発現量も関わることを示された。そのことを確かめるために、G が最適な量で発現する Δ G-REVec 感染 293T 細胞にフーリン阻害剤 (decRVKR-cmk) を添加し、産出される粒子の力価を評価した。使用した阻害剤の濃度依存的に、回収した BoDV-1G-REVec の力価が減少したが、G を過剰に発現させたときのほうが低かった (図 6C)。阻害剤添加による細胞の増殖に影響はなかった (図 6D)。導入力価の高い粒子を産出させるためには、G の開裂に寄与するフーリンの機能だけでなく、G の発現量が重要であることが確認された。

REVec の粒子の産出を確かめるために、ネガティブ染色をおこない電子顕微鏡を用いて解析した。G を発現していない Δ G-REVec 感染 293T 細胞から粒子が観察されたことから (図 7A)、BoDV-1 は M の発現のみで粒子を形成できることが示された。次に、過剰に G を発現させて回収した粒子は、BoDV-GFP および適量の G を発現させたときと同様に、突起をもつ粒子が電子顕微鏡で観察された (図 7A)。M による粒子形成能と、G による粒子形成への影響を評価するために、ウイルス様粒子を用いて解析した。HiBiT タグを付加した M または N を 293T 細胞に導入して、精製した培養上清の HiBiT による発光強度を測定することで、形成されたウイルス様粒子を定量した⁵⁷⁻⁵⁹。N を発現させても上清中にほとんど発光は検出されなかったが、M の発現では検出された (図 7B)。さらに、そこに G を発現させても検出される発光強度に変化はなかったことから (図 7B)、BoDV-1 は M 単体でウイルス様粒子を形成できるが、G の発現はその形成に影響を与えないことが示された。以上の結果から、BoDV-1-G の過剰な発現は、粒子自体の形成ではなく、GP1 と GP2 の粒子への取り込みに影響した結果、導入力価を低下させることが明らかとなった。

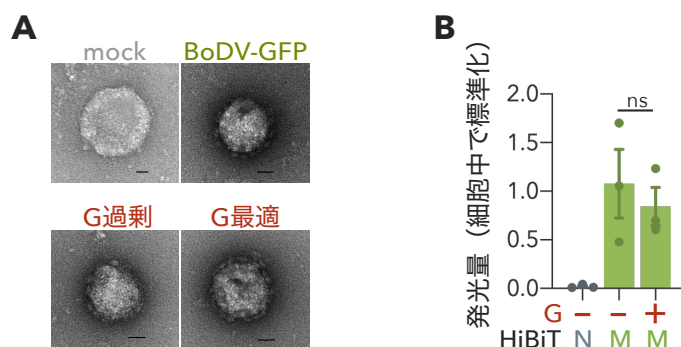


図7. Gの過剰な発現は粒子の産出自体に影響しない

(A) BoDV-GFPおよびBoDV-1G-REVecの電子顕微鏡解析。精製したベクターをネガティブ染色し観察した。エラーバーは、25 nmを示す。(B) ウイルス様粒子を用いた粒子産出量の比較。HiBiTタグを付与したNまたはM遺伝子と、GFPもしくはGspKO遺伝子を293T細胞に導入し2日後に上清を回収した。精製した上清および細胞溶解液のHiBiTの活性を測定した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、ボンフェローニの多重比較検定を用いた。n.s., non-significant

外皮膜をもつ RNA ウイルスの中で、膜蛋白質が vRNP と相互作用することでウイルス粒子の形成を促進させるウイルスが報告されている⁶⁰⁻⁶²。BoDV-1G-REVec の粒子への vRNP の取り込みを評価するために、粒子中の vgRNA を定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) により比較した。G の発現の増加によって、細胞中の vgRNA がわずかに増加した (図 8A)。G を発現させていない細胞から産生された粒子中に vgRNA が検出されたことから、BoDV-1 の M は粒子の形成だけでなく、粒子への vgRNP の取り込みに機能することが示された。一方、細胞中に過剰な pre-G を生じる G の過度な発現条件 (図 5C) では、粒子に取り込まれる vgRNA が G を発現させていないときと比較しておよそ 6 分の 1 まで減少した (図 8B)。以上のことから、感染細胞中の BoDV-1-G の発現量は、成熟した G だけでなく vgRNA の REVec 粒子への取り込みにも関与することが示された。

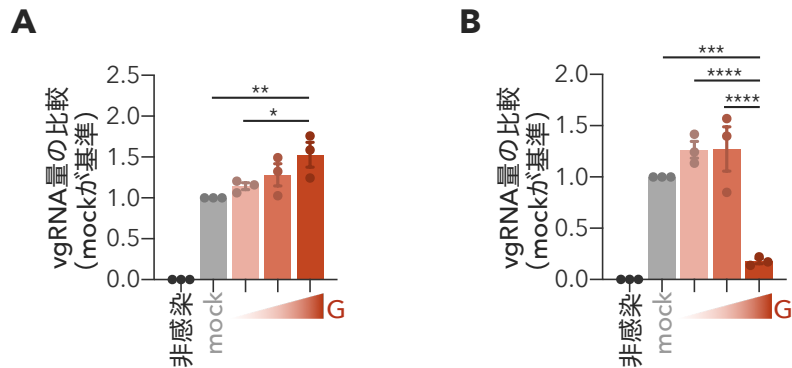


図8. Gの過剰な発現は粒子へのvgRNAの取り込みを減少させる

(A) GspKO遺伝子導入2日後の細胞内のvgRNA量の比較。(B) 回収したBoDV-1G-REVecに含まれるvgRNA量の比較。vgRNA量は定量的逆転写PCRにより検出した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、フィッシャーの最小有意差法を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

2-3. 導入力価が低い粒子の産出は過剰発現による副産物 pre-G に起因する。

G を過剰に発現させると細胞中で増加する pre-G が、子孫ウイルス粒子の産出に影響するのかを調べるために、フォーリンによる開裂部位⁵²をアラニン置換したG変異体 (GspKO_R4A) を作製した (図9A)⁶³。まず、Gの開裂が細胞内局在に影響するかを評価するために、 Δ G-REVec が感染する Vero 細胞に、フ

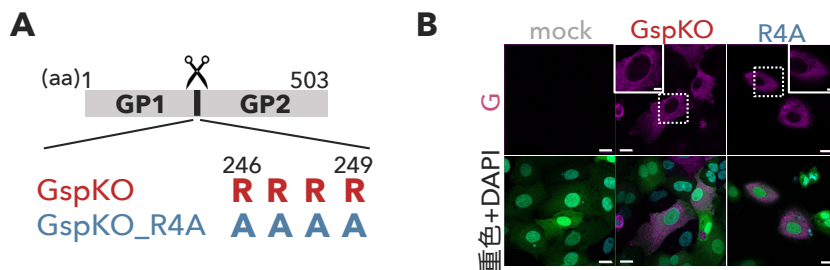


図9. Gの開裂は細胞内局在に影響しない

(A) 開裂しないGspKO_R4Aの変異。フォーリンによる開裂認識配列である246-249残基にあるアルギニンをアラニンに置換した。(B) Δ G-REVec感染Vero細胞におけるGspKOおよびGspKO_R4Aの細胞内局在。抗BoDV-1-G抗体を用いた免疫蛍光染色により検出した。スケールバーは、15 μ m (挿入図では5 μ m) を示す。

ーリンにより開裂する GspKO もしくは、開裂を介しない GspKO_R4A をプラスミドにより発現させ、抗 BoDV-1-G 抗体を用いてその局在を観察した。その結果、GspKO_R4A の局在は GspKO と変わらなかったことから (図 9B)、BoDV-1-G のフーリンによる開裂は、細胞内の局在自体に影響しないことが示された。

次に、 Δ G-REVec 感染 293T 細胞に、GspKO と GspKO_R4A を同時に遺伝子導入し、G の発現パターンの変化をウェスタンブロット法により解析した。導

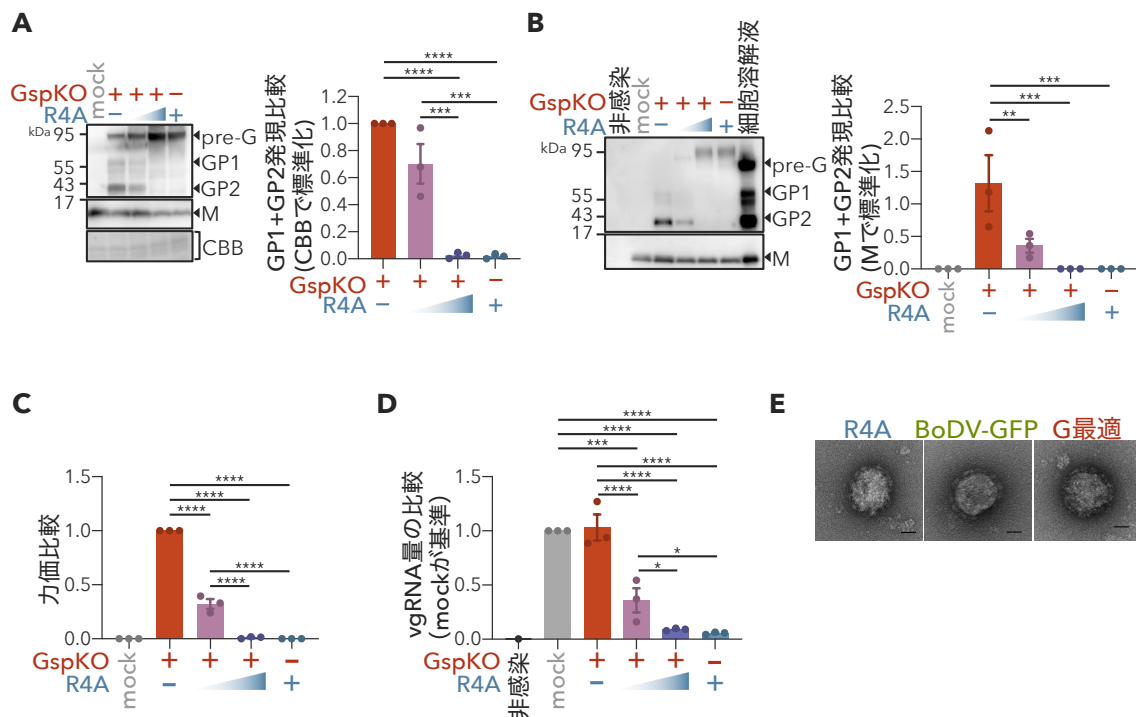


図10. 未開裂のGが粒子へのGP1, 2およびvgRNAの取り込みを減少させる

(A)(左) プラスミドを導入した Δ G-REVec感染293T細胞におけるGの発現。GspKO (0.1 μ g), GspKO_R4A (0.1, 1.5 μ g), M (5 μ g) 発現プラスミドを 3.0×10^6 の Δ G-REVec感染293T細胞に導入し、2日後にMgCl₂を含むHEPES緩衝液で回収し精製した。(右) 開裂したGの発現の比較。(左) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。GP1とGP2の合計をCBBで割ることで算出した。(B)(左) 回収したBoDV-1G-REVecに含まれるGおよびMの検出。(A)でGspKO (0.1 μ g) を導入した細胞溶解液を陽性対照として使用した。(右) ベクター粒子に含まれるGP1とGP2の比較。(左) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析し、Mで標準化した。(C) ベクター力価の比較。(D) 回収したBoDV-1G-REVecに含まれるvgRNA量の比較。vgRNA量は定量的逆転写PCRにより検出した。(E) BoDV-GFPおよびBoDV-1G-REVecの電子顕微鏡解析。精製したベクターをネガティブ染色し観察した。エラーバーは、25 nmを示す。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、チューキーの多重比較検定 (A) およびフィッシャーの最小有意差法 (B, C, D) を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

入した GspKO 発現プラスミド量が一定であるにもかかわらず、GspKO_R4A の発現を増加させると、開裂した GP1 と GP2 が減少した (図 10A)。また、未開裂の G の発現は、粒子に取り込まれた GP1 と GP2 の量と (図 10B)、導入力価を減少させた (図 10C)。さらに、G を過剰に発現させたときと同じく (図 8B)、未開裂の G を発現させると粒子に取り込まれた vgRNA が減少した (図 10D)。電子顕微鏡を用いて、産出された粒子を解析したところ、BoDV-GFP や、G を適切な量を発現させたときの粒子と同じく、GspKO_R4A を発現させたときでも突起をもつ粒子が観察された (図 10E)。以上のことから、G の過剰な発現により副産物的に増加する未開裂の G が、成熟した G および vgRNA の形成された粒子への取り込みを減少させ、粒子の導入力価を低下させることが示された。

2-4. オルソボルナウイルス属で CnBV-1 のみ例外的に高い開裂効率を維持する。

オルソボルナウイルス属には、BoDV-1 以外にさまざまなウイルスが含まれる⁶⁴。オルソボルナウイルスの G の細胞内領域は保存されているため (図 11A)、BoDV-1 から改良した Δ G-REVec の粒子の外皮膜に、BoDV-1-G に代わり他のオルソボルナウイルスの G を取り込ませたシュードタイプ Δ G-REVec を作製できるのではないかと予想した。さまざまな生物種を宿主とする、オルソボルナウイルスの G を比較することによって、G の成熟過程、および子孫ウイルス粒子の形成機構を調査した。BoDV-1 を含めオルソボルナウイルス属から異なる 10 つの遺伝子型のウイルスの G をもつシュードタイプ Δ G-REVec を作製した。本実験には、カワリリスボルナウイルス 1 型 (VSBV-1)、カナリアボルナウイルス 1 型、2 型 (CnBV-1, -2)、カエデチョウボルナウイルス 1 型 (EsBV-1)、オウムボルナウイルス 2 型、4 型、5 型、7 型 (PaBV-2, -4, -5, -7)、キンパラボルナウイルス 1 型 (MuBV-1) を用いた⁶⁴。予想した通り、試験したすべての G で、感染性が付与されたシュードタイプ Δ G-REVec が回収されたことから、BoDV-1 をもとに改

良された REVec システムにおいて、オルソボルナウイルスの G は BoDV-1-G に代替してベクターを産出できることが示された (図 11B、C)。試験したベクターの中で、CnBV-1-G をもつシュードタイプ Δ G-REVec が、Vero 細胞とウズラ線維肉腫細胞 (QT6 細胞) の両方で最も高い力価を示した (図 11B、C)。

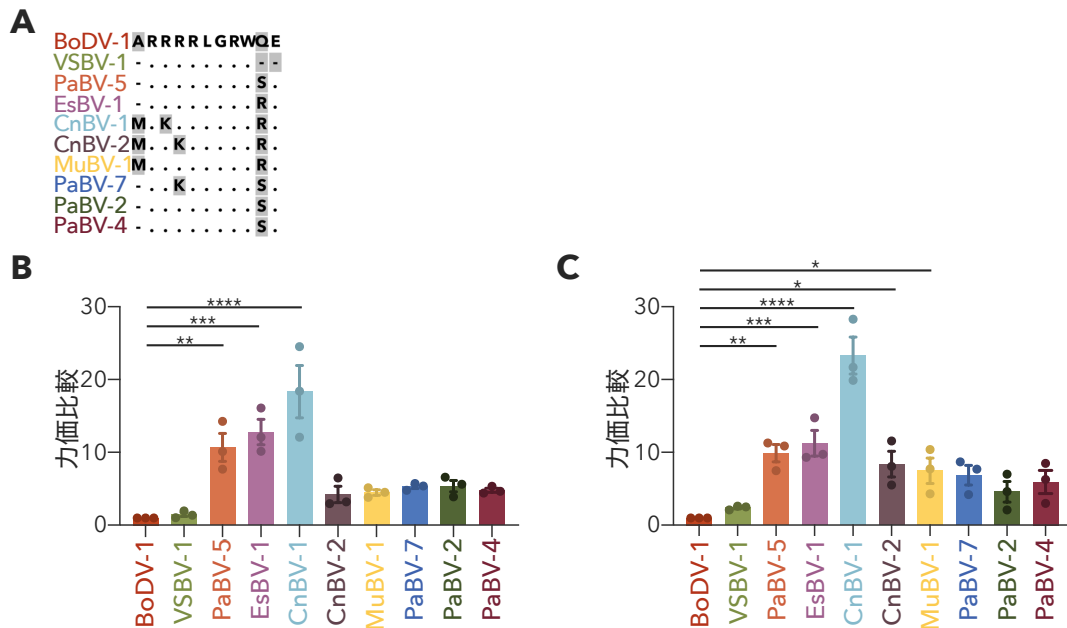


図11. オルソボルナウイルス属のGを用いて Δ G-REVecが回収できる

(A)(左)オルソボルナウイルス属に分類されるウイルスのG (10遺伝子) の細胞内領域のアライメント。(B), (C)ベクター力価の比較。それぞれのG発現プラスミド (0.4 μ g) を 1.2×10^5 の Δ G-REVec感染293T細胞に導入し、2日後に凍結融解法で回収した。Vero/puro細胞 (B), QT6細胞 (C) を用いて力価を測定した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、ダネットの多重比較検定を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

ベクターの高い導入力価に CnBV-1-G の開裂が関わるのかを調べるために、 Δ G-REVec 感染 293T 細胞に発現させる G の量を増減させた。ほとんどのシュードタイプ Δ G-REVec で、BoDV-1-G と同じく発現量を増加させると導入力価が減少したが、興味深いことに CnBV-1G-REVec の力価のみ影響しなかった (図 12A)。CnBV-1-G の発現量をさらに変化させたが、CnBV-1-REVec の導入力価は影響しなかった (図 12B)。細胞中の CnBV-1-G の発現パターンを解析したところ、発現量の増加により pre-G は検出されるが、開裂効率は減少しなかった (図

12C)。これらのことから、G の過剰な発現により産生される子孫ウイルス粒子の導入力価が減少する機構は、CnBV-1 以外のオルソボルナウイルスで広く共通することが示された。

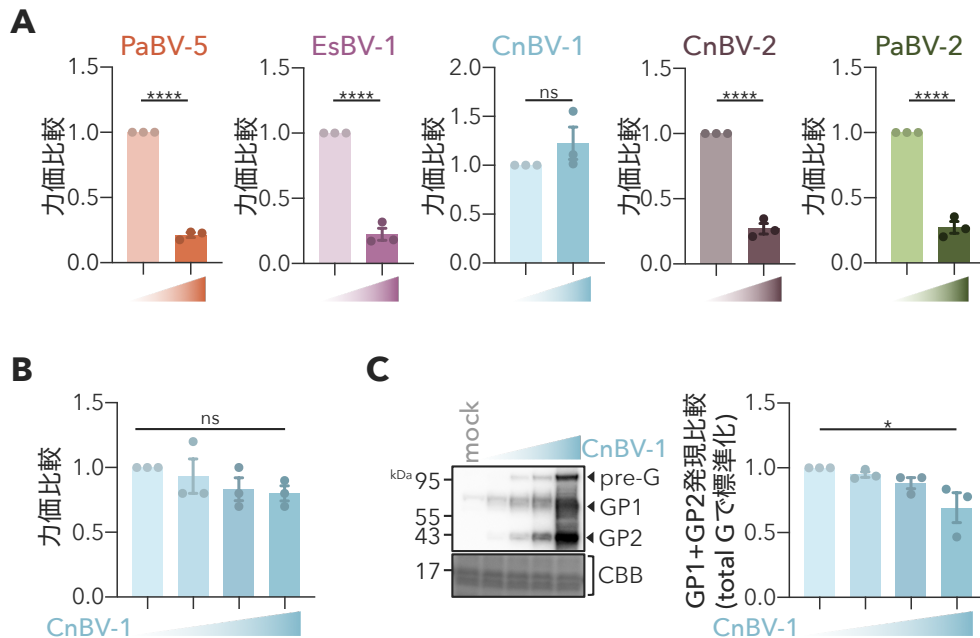


図12. CnBV-1-Gの発現量は導入力価に影響しない

(A)(左) Gの発現量に依存した導入力価の変化。それぞれのG発現プラスミド (0.015もしくは0.4 μg) を 1.2×10^5 の Δ G-REVec感染293T細胞に導入し、2日後に凍結融解法で回収した。力価はVero/puro細胞を用いて測定した。(B) CnBV-1G-REVecの力価の比較。CnBV-1-G発現プラスミド (0.015, 0.05, 0.15, 0.4 μg) を 1.2×10^5 Δ G-REVec感染293T細胞に導入し、2日後に凍結融解法で回収した。力価はVero/puro細胞を用いて測定した。(C)(左) CnBV-1-G発現プラスミド導入した Δ G-REVec感染293T細胞におけるGの発現。CBB染色をローディングコントロールとした。(右) Gの開裂効率の比較。(左)を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。GP1とGP2の合計をtotalG (GP1+GP2+pre-G)で割ることで算出した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、スチューデントのt検定 (A) およびテューキーの多重比較検定 (B, C) を用いた。*, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; n.s., non-significant

2-5. CnBV-1-G のシグナルペプチドは G の開裂効率に関与し産出粒子の導入力価を上昇させる。

発現量に依存しない一定した開裂効率を示す CnBV-1-G の責任領域を見つ

けるために、CnBV-1 と遺伝的に近縁の CnBV-2 とアミノ酸配列を比較し⁶⁵、3つの非保存領域に注目した (図 13A)。一つ目は、N 末端のシグナルペプチド (SP) で、CnBV-1 はアミノ酸が 9 つ少ない。二つ目は、CnBV-1 の 121 番目のアミノ酸 (P) で、膜融合の機能に重要とされる fusion loop 周辺に位置し極性が異なる^{66,67}。三つ目には、フーリンによる開裂部位の直前領域 (BC) に注目した⁵²。これらの 3 つの領域を、CnBV-1 と CnBV-2 で置換したキメラ G を発現するプラスミドを作製し (図 13B)、それらのキメラ G をもつシュードタイプ ΔG-REVec を回収した。その結果、CnBV-2 の SP に置換した CnBV-1-G (CnBV-1_SP2) は REVec

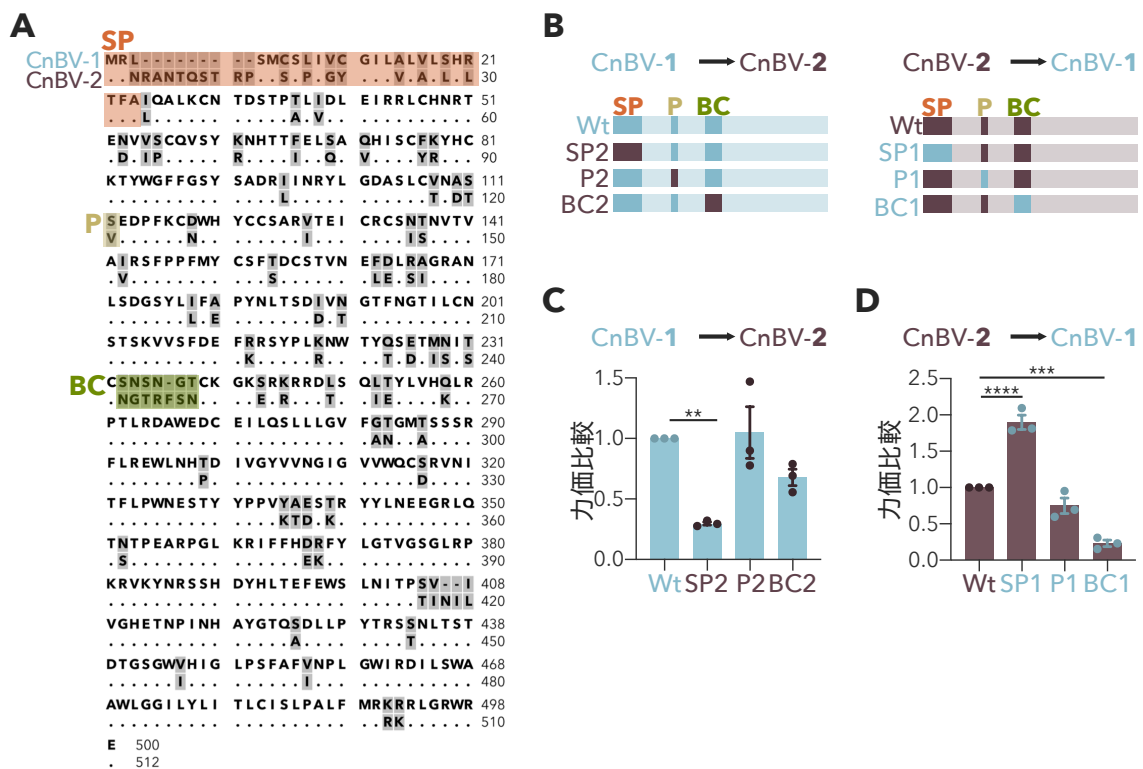


図13. CnBV-1-GのSPが高力価の感染性粒子の産出に關与する

(A) CnBV-1-GとCnBV-2-Gの配列比較。灰色のハイライトは、異なるアミノ酸もしくはギャップを示す。キメラを作製した領域は、SP: シグナルペプチド (オレンジ), P: 極性アミノ酸 (黄), BS: 開裂前 (緑) で示す。(B) 作製したキメラCnBV-1-GおよびCnBV-2-Gの模式図。(C), (D)キメラCnBV-1-G (C) もしくはキメラCnBV-2-G (D) により回収したΔG-REVecの導入力価の比較。それぞれのG発現プラスミド (0.4 μg) を 1.2×10^5 のΔG-REVec感染293T細胞に導入し、2日後に凍結融解法で回収した。力価は、Vero/puro細胞を用いて測定した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、ダネットの多重比較検定を用いた。**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

の力価を減少させた (図 13C)。逆に、CnBV-2-G に CnBV-1 の SP に置換すると、REVec の力価が増加した (図 13D)。以上のことから、CnBV-1-G の SP が、CnBV-1-G による高い導入力価の粒子の産出に参与することが示された。

次に、細胞中において、CnBV-1-G の SP が G の開裂効率にも影響するの
かを調べた。もとの CnBV-1_Wt と比較して、CnBV-1_SP2 の開裂効率が顕著に

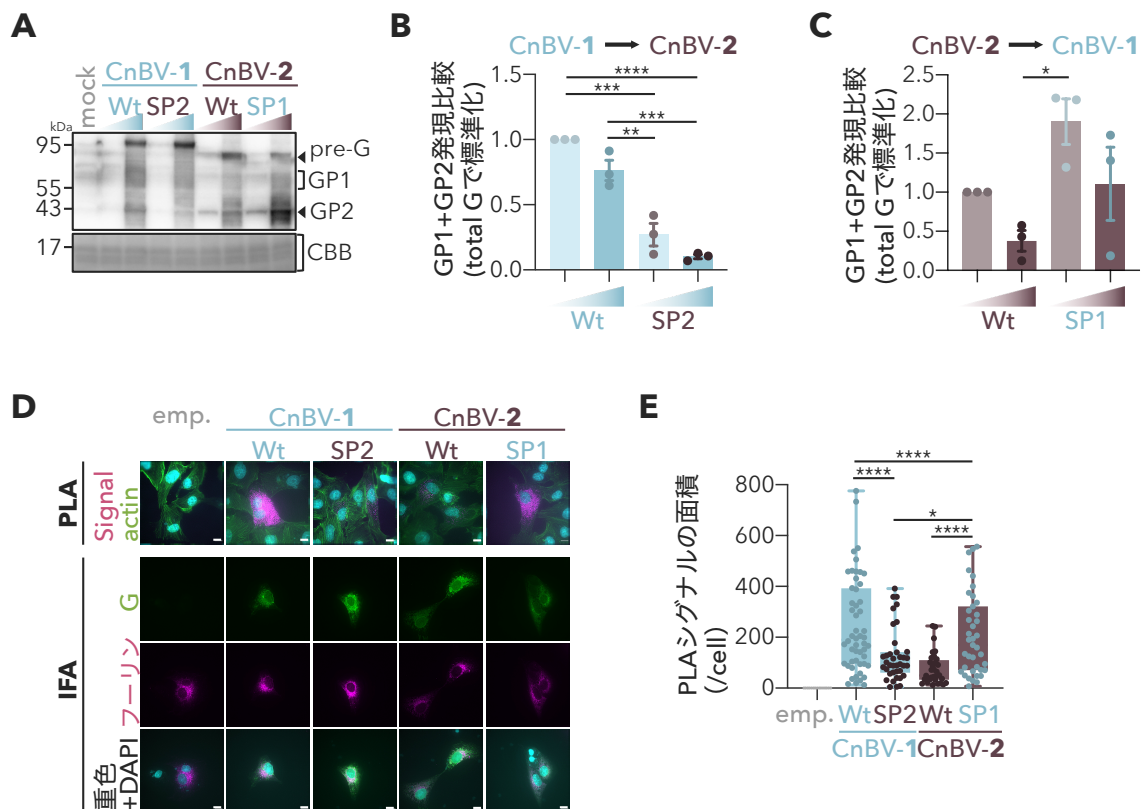


図14. CnBV-1-GのSPが発現量に依存しない開裂効率の維持に関わる

(A) キメラG発現プラスミド導入したΔG-REVec感染293T細胞におけるGの発現。CBB染色をローディングコントロールとした。(B), (C) キメラCnBV-1-G (B), キメラCnBV-2-G (C) の開裂効率の比較。(A) を元に、ImageJを用いてバンド強度により解析した。GP1とGP2の合計をtotalG (GP1+GP2+pre-G) で割ることで算出した。(D)(上段) PLAを用いたキメラGとフーリンとの相互作用の検出。相互作用のシグナルを赤、細胞骨格を緑で示す。(下段) キメラGとフーリンの細胞内局在。FLAGタグを付与したキメラGとフーリンプラスミドにより発現させ、抗FLAG抗体および抗フーリン抗体を用いて免疫蛍光染色により検出した。(E) キメラGとフーリンとの相互作用の定量化。(D)(上段) をもとに、ImageJを用いて1細胞当たりのシグナルの面積を解析した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、テューキーの多重比較検定 (B, C) およびフィッシャーの最小有意差法 (E) を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$

減少し、発現量を増加させるとさらにその効率が減少した (図 14A、B)。一方、CnBV-2_SP1 は発現を増加させても高い開裂効率を維持した (図 14A、C)。さらに、どのように G の SP が開裂効率に影響を及ぼすのかを調べるために、近接ライゲーションアッセイ (PLA) を用いて細胞内のフリーリンとキメラ G との相互作用を評価した。CnBV-1-G もしくは CnBV-2_SP1 を発現させた細胞において、フリーリンとの相互作用を示す PLA のシグナルは、CnBV-2-G もしくは CnBV-1_SP2 を発現させたときよりも多かった (図 14D、E)。その一方で、試験したすべての G の細胞内局在に変化はなかった (図 14D)。これらのことから、CnBV-1-G の SP が細胞内のフリーリンとの相互作用を介して pre-G の開裂効率に関与し、高い導入力価の REVec の産出に寄与することが示された。

2-6. CnBV-1-G をもつ REVec は高い導入力価を示す。

CnBV-1 は鳥類を宿主とするが^{68,69}、CnBV-1-G は哺乳類細胞において効率的に開裂し、 Δ G-REVec に感染性を付与した (図 11B、12B、12C)。そこで、Vero 細胞、QT6 細胞以外の細胞での CnBV-1-G-REVec の導入力価を調べるために、ヒト培養細胞、遺伝子細胞治療に利用されるヒト多能性幹細胞 (iPSC)⁷⁰⁻⁷²、生体の状態に近い哺乳類初代培養細胞を用いて評価した。ヒトオリゴデンドログリア細胞 (OL 細胞) において、CnBV-1-G は BoDV-1-G と比較して REVec の力価を 15 倍上昇させた (図 15A)。iPSC を用いた評価には 201B7 と 409B2 を使用し、CnBV-1-G は BoDV-1-G よりもそれぞれ 5.8 倍、13.6 倍高い導入力価を示した (図 15B)。さらに、ラット初代アストロサイト、初代オリゴデンドログリア前駆細胞 (OPC) への導入力価を比較した。どちらの初代培養細胞でも CnBV-1-G をもつシュードタイプ Δ G-REVec の導入力価のほうが高かった (図 15C)。これらの結果から、CnBV-1-G-REVec は iPSC を含めたヒト細胞および、哺乳類初代培養細胞に効率的に外来遺伝子を導入できることが示された。

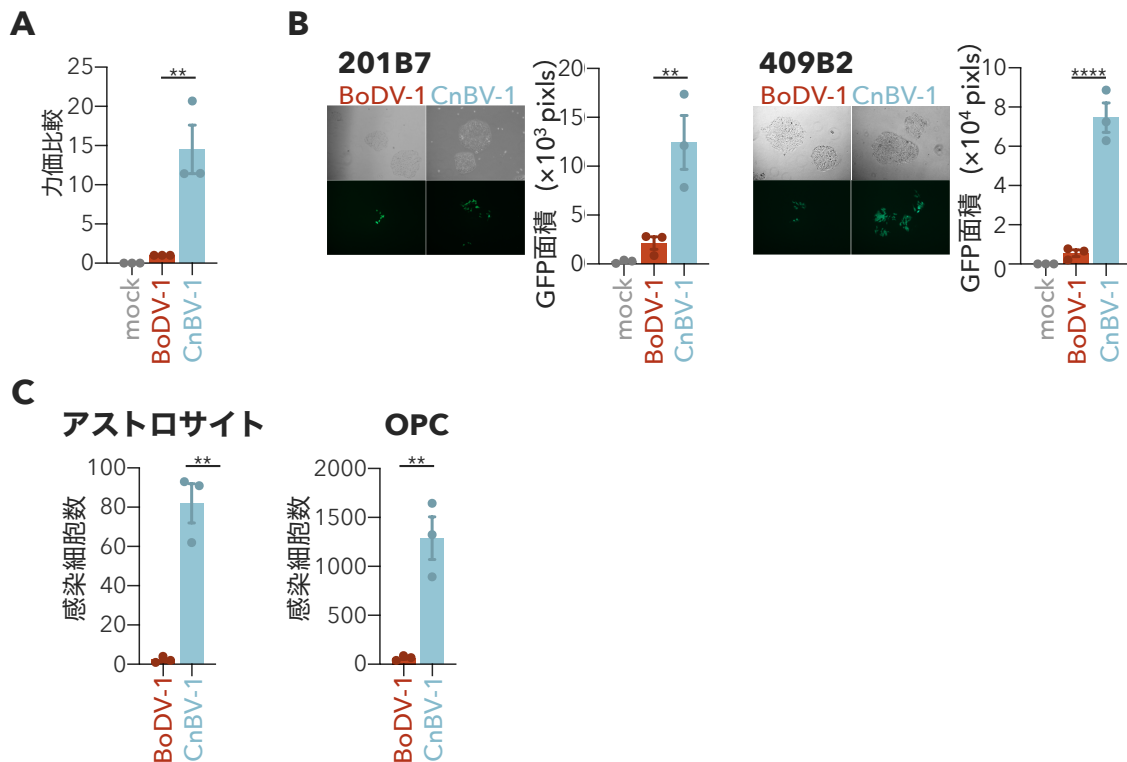


図15. CnBV-1G-REVecはヒト細胞およびラット初代培養細胞への導入力価が高い
(A) OL細胞における導入力価の比較。**(B)** ヒト iPSC における導入力価の比較。接種5日後の GFP 発現の領域を ImageJ により解析した。**(C)** ラット初代グリア細胞における導入力価の比較。接種3日後に、GFP 陽性細胞を計数した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、ボンフェローニの多重比較検定 (A, B) およびスチューデントの t 検定 (C) を用いた。**, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$

最後に、ベクターゲノム上に CnBV-1-G 遺伝子を組換えた REVec の力価を、BoDV-1-G および CnBV-2-G と比較した。REVec のゲノムでは G 遺伝子は、M と L 遺伝子が重なっているため (図 16A)、G 遺伝子の ORF のみをゲノムに組換えることができない。そこで、M 遺伝子、G 遺伝子、および L 遺伝子のイントロンを欠損させた Δ MG-REVec を利用し³⁷、GFP と L 遺伝子の間に G 遺伝子を挿入した (図 16A)。ゲノムプラスミドと、ヘルパープラスミド (N, X, P, M, L) を 293T 細胞に導入することで、G 組換え REVec を回収した (図 16B)。回収したベクターの導入力価は、Vero 細胞を用いて決定した。その結果、CnBV-1-G は、BoDV-1-G と CnBV-2-G と比較して最も高い導入力価を REVec にもたらした (図

16C)。以上から、CnBV-1-Gを用いることで、シュードタイプだけでなくG遺伝子組換えREVecの導入力価を向上できることが示された。

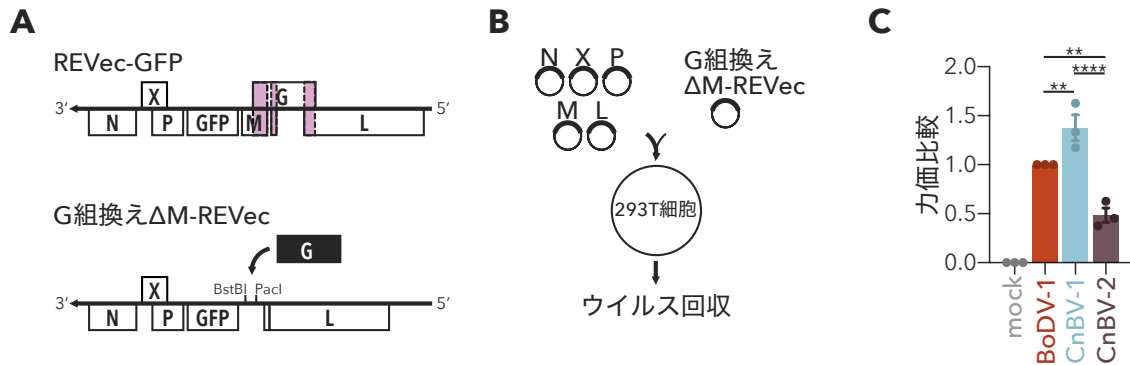


図16. CnBV-1-G組換えREVecは高い導入力価を示す

(A) REVec-GFPとG組換えΔM-REVecのゲノム構造。G遺伝子がM、L遺伝子と重なる領域をピンクで示す。G組換えΔM-REVecは、ΔMG-REVecのBstBIとPacIの間にG遺伝子を組み込んだ。(B) G組換えΔM-REVecの回収方法。(C) G組換えΔM-REVecの導入力価の比較。Vero/puro細胞を用いて導入力価を測定した。エラーバーは、標準誤差を示す。統計解析は、フィッシャーの最小有意差法を用いた。**, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$

第三章

考察

3-1. G の蛋白質分解性成熟に関わる新たな細胞内因子の可能性

本研究は、標的細胞への遺伝子導入効率の低い REVec システムを改善することを目的として、これまでに明らかにされていないオルソボルナウイルスの G の感染性粒子の形成における役割の解明を試みた。まず、これまで複数報告されていたことと一致して⁵¹、N が一様に発現する感染細胞の半数でしか G の発現を検出できない G の発現量の低さに注目し (図 3B、C)、それによる粒子産出に影響があるのかを調べた。BoDV-1-G を過剰に発現させると、pre-G が増加し (図 3C、5C)、その成熟過程における開裂効率、成熟した G と vgRNA の粒子への取り込みが減少することが示された (図 5C、8B)。これらの粒子は、導入力価が低い (図 5B、10C)。一方で、G の過剰な発現による pre-G の増加は (図 4C、5C)、内因性のフーリンの発現が低いことによって⁵⁶、BoDV-1-G の効率的な開裂が妨げられている結果である可能性が考えられた。実際に、プラスミド導入によりフーリンの発現を増加させると、粒子に取り込まれる未開裂 G が減少し (図 6A)、BoDV-1G-REVec の力価が上昇した (図 6B)。しかしながら、フーリンの追加発現による感染性粒子の産生は、G を最適な量を発現させたときよりも上回ることはなかった (図 6B)。逆に、最適な量で G が発現している細胞にフーリン阻害剤を処理したときの粒子の導入力価は、過剰に G を発現させたときよりも下回らなかった (図 6C)。さらに、オルソボルナウイルス属の中で CnBV-1-G だけ、その発現量に依存せず高い効率を維持した (図 12C)。これらの結果からフーリンの他に、開裂もしくは細胞内局在に影響を与える細胞内の蛋白質分解酵素やその他の要素が、オルソボルナウイルスの G の効率的な成熟に必要であることが示唆された。

これまで、フーリンによる開裂により活性化するウイルス膜糖蛋白質が多数あり⁷³、BoDV-1-G にもその開裂モチーフ RXK/RR をもつことから、フーリンによる開裂が成熟に関与することが確認された⁵²。しかしながら、開裂認識配列が共通するサブチリシン様プロ蛋白質転移酵素 (SPC) には、フーリン (SPC1) の他に 7 つの酵素 (SPC2、SPC3、SPC4、SPC5、SPC6、SPC7、PCSK9) が含ま

れる。その中でも、神経指向性を示す BoDV-1 が感染する脳に分布する神経内分泌細胞で発現する SPC2 や SPC3、もしくは BoDV-1-G が局在する小胞体⁵³で自己活性化する SPC4⁷⁴ が成熟に関わる可能性が考えられた。また、BoDV-1-G の膜貫通領域と細胞内領域に小胞体保留シグナル配列を持つことを示唆する報告がされているが、そのメカニズムは解明されていない⁵³。細胞内局在に影響を与える細胞内因子の解明にはさらなる解析が必要とされる。

3-2. BoDV-1-G の子孫ウイルス粒子産出における役割

開裂を介したウイルスの膜糖蛋白質の成熟は、子孫ウイルス粒子への組み込みや、その細胞内輸送に関わる⁷⁵⁻⁷⁹。BoDV-1-G の開裂されていない G の細胞内局在は、G の局在と変わらなかったことから (図 9B)、G の開裂はその細胞内輸送に関与しないことが示された。その一方、細胞内における未開裂の G の蓄積は、その開裂を妨げ (図 10A)、作製途中のウイルス粒子への vgRNA の取り込みを減少させる (図 10D)。外皮膜をもつ多くの RNA ウイルスの膜糖蛋白質が新規粒子の vRNP の取り込みの促進に関わることが知られている。例えば、BoDV-1 と同じく RNA ウイルスでブニヤウイルス科に含まれるウークニエミウイルスの膜糖蛋白質は、vRNP と相互作用を介して、粒子へのウイルスゲノムの取り込みに機能する⁶²。また、インフルエンザ A 型のヘマグルチニン (HA) は、粒子が出芽する脂質ラフトに vRNP を効率的に誘引することで、産出粒子に vRNP を取り込ませる^{80,81}。そのため、vgRNA の粒子への取り込みにおいて、膜糖蛋白質の前駆体 pre-G が抑制的な効果をもつことに BoDV-1 特異的な戦略があると考えられた。未開裂の G がどのようにその開裂効率を低下させ、さらに粒子への成熟 G および vgRNA の取り込みを減少されるのか不明であるが、未開裂の G が G の過剰な発現の指標となり、子孫ウイルス粒子の産出において負のフィードバックとしての役割を持つ可能性があると考えられた。vRNP の粒子への取り込みにおける BoDV-1-G がもつ機能の詳細な解明には、G と M もしくは vRNP との

相互作用についてのさらなる調査が必要である。

3-3. BoDV-1-G の発現量による戦略的な子孫ウイルス粒子産出機構

BoDV-1 の子孫ウイルス粒子の産出は、G の成熟に関わる蛋白質分解酵素よりも BoDV-1-G の発現量によって強力に制御されることが示された。BoDV-1 感染細胞における G の発現は、宿主のスプライシング機構を利用して転写された後でも制御される^{47,48}。G の ORF の上流には複数の開始コドンがあり、leaky ribosomal scanning を介して翻訳されるスプライシングされていない mRNA (2.8 kb, 7.2 kb)、および上流のミニストロンによって促された ribosomal reinitiation による翻訳されるスプライシングされた mRNA (2.7 kb, 7.1 kb) から G が発現する⁴⁸。さらに、BoDV-1-G の ORF には、L の mRNA のイントロンが含まれる⁴⁹。以前の報告では、*in vivo* 感染では、脳の大脳皮質、海馬、扁桃核、視床の神経細胞に G の発現が限定され、さらにその感染後期においてはその発現が制限される⁸²。外皮膜をもつウイルスでは、膜蛋白質の過剰な発現が新規ウイルス粒子の形成を促進する代わりに、未成熟の膜蛋白質の産生で宿主の自然免疫反応を誘導することも報告されている^{83,84}。これらの報告は、自然免疫反応の回避と、成熟粒子の効率的な産出は、相反関係であることを示す。BoDV-1 は細胞の核内で持続感染を成立させるために、レーダーに探知されにくいステルス機のように、免疫機構を逃れながら成熟粒子を産出し、水面下で感染を維持する機構を有しているのではないかと考えられた。

3-4. 粒子産出機構における CnBV-1-G の特質的な機能

BoDV-1-G を用いて明らかにした発現量に依存した子孫ウイルス粒子の産出機構が、オルソボルナウイルス属の G で広く保存された (図 12A)。しかしながら、例外的に CnBV-1-G は過剰に発現させても、その開裂効率および産出粒子

の導入力価が高く維持された (図 12B、C)。CnBV-1 は、前胃拡張症 (PDD) の症状を呈したカナリア (*Serinus canaria*) から 2009 年に同定された⁶⁸。感染実験において病原性の再現性が確認されたことから^{69,85}、PDD の病原ウイルスとして特定され、ドイツで捕獲されたカナリアの 40% で CnBV-1 が検出された⁶⁹。これまでに、CnBV-1 に加えて CnBV-2 と-3 が発見されたが、それぞれのウイルス学的な性状および病原性の相違は明らかにされていない。本研究において、CnBV-2-G と組換えたキメラ CnBV-1-G を用いた解析によって、SP が細胞内のフーリンとの相互作用を介した G の高い開裂効率に重要な領域であり、それによって産出された粒子の導入力価が上昇することが示された (図 11C、11D、12)。SP は、その蛋白質の分泌や成熟に関わる細胞内輸送を指示する配列であるが、さらなる機能をもつことが報告されている^{75,86-89}。例えば、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の膜蛋白質の SP は、その発現量、および輸送効率、糖鎖修飾、フォールディング、感染効率と多岐に影響を与える^{87,88,90}。また、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) の膜糖蛋白質 (GP) の SP は、シグナルペプチダーゼにより切断された後も GP と複合体を形成し、成熟過程における GP の開裂、および細胞表面での発現に関与する⁷⁵。今回の研究で、CnBV-1 の SP が G の開裂効率に関わる細胞内因子であるフーリンとの相互作用に関与することを明らかにした (図 14D、E)。しかしながら、CnBV-1 は培養細胞で持続感染を起こし⁶⁹、感染生体内ではウイルス力価が低いことから⁸⁵、CnBV-1 の感染細胞内での G の高い開裂効率やウイルス粒子の成熟効率を制限する因子が存在する可能性が考えられた。

3-5. CnBV-1-G を用いた REVec システム改善

オルソボルナウイルスの感染性粒子の産出における G の役割の解明は、REVec システムの改良に大いに貢献すると考えられた。実際に、遺伝子治療の分野で広く承認されているレンチウイルスおよびレトロウイルスでは²、ほかのウ

ウイルスである水疱性口内炎ウイルス (VSV) の膜糖蛋白質 G が利用されている^{91,92}。ベクターの回収に VSV-G を用いることで、導入できる細胞の種類が拡大する。また他方面ではベクター粒子に安定性を与え、ベクター精製の工程を経ても感染性を維持させる⁹³⁻⁹⁵。これまでの報告で、VSV-G は Δ G-REVec を産出させることができなかったが、BoDV-1-G の細胞内領域を組換えると産出できたことから、BoDV-1 の粒子への膜糖蛋白質の取り込みには細胞内領域が重要であることが示唆されていた³⁶。そこで、細胞内領域が保存されるオルソボルナウイルス属に含まれるウイルスの G を用いたところ、 Δ G-REVec を産出させることができた (図 11)。CnBV-1-G を外皮膜にもたせた Δ G-REVec は、iPSC を含めヒト細胞およびラット初代培養細胞にも、効率的に外来遺伝子を導入した (図 15)。さらに、ベクターゲノム上に CnBV-1-G を組換えた REVec の導入力価もまた、BoDV-1-G および CnBV-2-G を組換えた REVec と比較して最も高かった。以上のことから (図 16C)、*in vivo* および *ex vivo* での遺伝子細胞治療への応用の可能性が示された。しかしながら、将来的に臨床分野での利用のためには、CnBV-1-G を利用した REVec の免疫原性や分布など *in vivo* における特性の評価が必要である。

本研究において、膜糖蛋白質の発現を制限し、未成熟の膜蛋白質の蓄積を抑えることで、少数ではあるが導入力価の高い子孫ウイルス粒子のみを産出する BoDV-1 特異的な機構を明らかにした。このことは、無駄なく子孫ウイルス粒子を産出することで、宿主の免疫機構を回避しながら効率的に感染を拡大する新たな持続感染戦略として提示できる。さらに、REVec の産出システムの抜本的な改良に貢献することが期待できる。

第四章

材料と方法

細胞培養

ヒト胎児腎細胞（293T 細胞）、GFP 組換え BoDV-1 感染 293T 細胞、ピューロマイシン耐性遺伝子恒常発現アフリカミドリザル腎臓上皮細胞（Vero/puro 細胞）には、10% ウシ胎児血清（FCS）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（1.0 g/L glucose）（nacalai tesque, Kyoto, Japan）を使用した。ΔG-REVec 感染細胞 Vero 細胞には、10% FCS を含む DMEM（1.0 g/L glucose）（nacalai tesque）を使用した。ヒトオリゴデンドログリオーマ由来細胞（OL 細胞）と ΔG-REVec 感染細胞 293T 細胞には、それぞれ 5%、10% FCS を含む DMEM（4.5 g/L glucose）（Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA）を使用した。ウズラ線維肉腫細胞（QT6 細胞）には、5% FCS を含む DMEM-F12（Thermo Fisher Scientific）を使用した。ヒト人工多能幹細胞（iPSC）の 201B7 と 409B2 には、5 ng/mL FGF basic（ReproCELL Inc., Kanagawa, Japan）を含む Repro FF2（ReproCELL Inc.）を用いた⁴⁰。すべての細胞は、37 °C、5% CO₂、飽和水蒸気温槽中で培養した。

免疫蛍光染色

8 穴チャンバースライド（Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan）を用いておこなった。4% パラホルムアルデヒド（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）により室温で 15 分間、細胞を固定した。0.5% Triton-X100 と 2% FCS を含む PBS を以降の反応溶液として用いた。PBS で洗浄後、反応溶液で 15 分間ブロッキングと膜透過処理をおこなった。反応溶液で希釈した一次抗体を 1 時間反応させ、PBS で洗浄した。一次抗体の使用については下記に示す。反応溶液で 1,000 倍希釈した Alexa Flora 555 標識ウサギ抗体（Thermo Fisher Scientific）、Alexa Flora 488 標識マウス抗体（Thermo Fisher Scientific）および 300 nM DAPI（Merck, Darmstadt, Germany）を二次抗体反応液として加え、暗所室温で 1 時間静置した。PBS で洗浄後、Fluoro-KEEPER（nacalai tesqu）もしくは Prolong Gold（Thermo Fisher Scientific）を用いて封入した。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 ECRIPSE Ti

(Nikon, Tokyo, Japan) または DeltaVision Elite (Cytiva, Tokyo, Japan) を使用した。一次抗体は、抗 N 抗体 (HN132) (1:4)、抗 BoDV-1-G 抗体 (1:750)³⁶、抗 FLAG M2 抗体 (Merck) (1:5,000)、抗 フーリン 抗体 (abcam, Cambridge, UK; ab183495) (1:750) を上記の通り希釈して用いた。

プラスミド作製

ヒトフーリンの cDNA は、293T 細胞から逆転写 PCR により作製し、pCAGGS に挿入することで発現プラスミドを作製した。

HiBiT タグ付き BoDV-1-N もしくは、BoDV-1-M は、PCR により作製し、pCAGGS、pEF4myc/His にそれぞれ挿入した。

フーリンによる開裂を受けない GspKO_R4A 発現プラスミドは、開裂認識部位アルギニンをアラニンへの置換は、PCR を用いて作製し、pCAGGS に挿入した。

EsBV-1-G (GenBank accession no. KF680099)、CnBV-1-G (GenBank accession no. KC464471)、CnBV-2-G (GenBank accession no. KC464478)、PaBV-7-G (GenBank accession no. JX065210) は、人工遺伝子合成 (Fasmac, Kanagawa, Japan) により取得し、VSBV-1-G は gBlocks Gene Fragments (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) により取得した。PaBV-5-G (GenBank accession no. LC120625)、MuBV-1-G、PaBV-2-G⁹⁶ および PaBV-4-G⁹⁶ は、PaBV-5 感染オオハナインコ (*Eclectus roratus*) の糞便、MuBV-1、PaBV-2 もしくは PaBV-4 感染 QT6 細胞からそれぞれ逆転写 PCR により取得した。すべての G 遺伝子がつまみスプライシングアクセプター部位にある AG に同義変異を加えた。上記すべて、岩手大学大塚弥生博士からいただいた pCAGGS に挿入し発現プラスミドを作製した。

キメラ CnBV-1-G およびキメラ CnBV-2-G、FLAG タグ付き CnBV-1-G、CnBV-1_SP2、CnBV-2-G、CnBV-2_SP1 は、PCR により断片を作製した。シグナルペプチド領域は、SignalIP-5.0 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて決定した。

岩手大学大塚弥生博士からいただいた pCAGGS に挿入し発現プラスミドを作製した。

BoDV-1G-、CnBV-1G-、CnBV-2G- Δ M-REVec をつくるために、pFct-BoDV Δ MG-GFP³⁷ の P と GFP の遺伝子の間に、制限酵素認識部位の AscI と AsiSI を挿入した。さらに、GFP 遺伝子と G 遺伝子をそれぞれ AscI/AsiSI、BsiBI/PacI に挿入した。

ウェスタンブロット法

細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% TritonX-100) で 2 倍希釈した SDS サンプル緩衝液 (125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% 2-メルカプトエタノール、4% ドデシル硫酸ナトリウム、10% スクロース、0.01% ブロモフェノール) で溶解した細胞を 95 °C で 10 分間加熱したものを SDS-PAGE サンプルとした。回収したベクターのサンプルは、上記の SDS サンプル緩衝液で準備した。e-PAGEL (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) を用いてゲル 1 枚あたり 20-25 mA 定電流で、蛋白質を分画し、Trans-Blot Turbo PVDF Transfer Pack (Bio-Rad, Richmond, USA) を用いてポリフッ化ビニリデン膜に転写した。その後、5% スキムミルク (Wako Pure Chemical Industries) を含む TBS-T (0.1% Tween 20) を用いて室温で 1 時間以上ブロッキングした後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (Toyobo, Osaka, Japan) で希釈した一次抗体を一晩 4 °C で反応させた。一次抗体は、抗 BoDV-1-G 抗体 (1:1,000)²⁴、注文品の抗 CnBV-1-G 抗体 (Eurofins Genomics K.K., Tokyo, Japan) (1:1,000)、抗 BoDV-1-M 抗 (1:500)²³、抗フーリン抗体 (abcam, Cambridge, UK; ab183495) (1:20,000) を希釈して用いた。TBS-T で洗浄後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (Toyobo) で 50,000 倍希釈した HRP 標識抗マウスまたはラビット IgG 抗体 (Merck) を室温で 2 時間以上反応させた。TBS-T で洗浄後、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) に用いて、化学発光反応により検出した。Fusion Solo instrument (Vilber-

Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex, France) でバンドの検出、および撮影をおこなった。バンド強度は、ImageJ を用いて解析した。

REVec 回収と導入力価の測定

Cellmatrix (Nitta Gelatin Inc, Osaka, Japan) でコーティングし Δ G-REVec 感染 293T 細胞で播種した。翌日、TransIT-293 Transfection Reagent (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて付属の手順に従い、それぞれ図の説明文に記載したプラスミド (図 5B, 6A, 10A, 11BC, 12A, 13CD) を導入した。フーリン阻害剤を用いる場合は、導入 1 時間後に decRVKR-cmk (Cayman Chemical, Michigan, USA) を図の説明文に記載した濃度で添加した。decRVKR-cmk については後述にする。導入 48 時間後、20 mM 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.5) で洗浄し、1% FCS と 250 mM $MgCl_2$ を含む 20 mM HEPES を加えた。37 °C で 90 分間静置した後、上清を 0.22 μ m フィルター (Merk) でろ過し、20%ショ糖と 1% FCS を含む 20 mM HEPES を用いて 80,000 \times g、4 °C で 1 時間超遠心した⁹⁷。その沈殿物を PBS で懸濁した。代替りの方法として、プラスミド導入 48 時間後、FCS を含まない DMEM (Thermo Fisher Scientific) を洗浄し、同 DMEM を加え 2 回凍結融解した。加えた培養液を 3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。両方法で回収したベクター溶液は、-80 °C で保存した。

回収したベクターを 10 倍段階希釈した溶液を準備し、Vero/puro 細胞、QT6 細胞、もしくは OL 細胞に接種させ、3 日後に Eclipse TE-2000-U 倒立顕微鏡 (Nikon) を用いて GFP 陽性細胞を計数した。

WST-1 を用いた細胞増殖の評価

ジメチルスルホキシドに溶解し、10 mM decRVKR-cmk (Cayman Chemical) を保存用濃度として準備した。細胞に使用する濃度には、Opti-MEM I Reduced

Serum Media (Thermo Fisher Scientific) を用いて希釈した。12 穴プレートに ΔG-REVec 感染 293T 細胞を播種した翌日に、各濃度の decRVKR-cmk を添加した。2 日後、100 μL の Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa) を添加し、37 °C で 2 時間反応させた後、440 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-9000 Lab) (Corona Electric, Ibaragi, Japan) を用いて測定した。

電子顕微鏡解析

超遠心した後、20 mM HEPES で懸濁した沈殿物を、2% パラホルムアルデヒドで固定し、2% 酢酸ウラニルを用いてネガティブ染色した。透過電子顕微鏡像は、加速電圧 80 kV で HT7700 (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan) を用いた。

HiBiT によるウイルス様粒子解析

293T 細胞に HiBiT タグ付き BoDV-1-N、HiBiT タグ付き BoDV-1-M、BoDV-1-G、陰性対照として EGFP 発現プラスミドを TransIT-293 Transfection Reagent (TaKaRa) を用いて導入した。その 48 時間後、培養上清を 20% ショ糖水溶液によって $288,000 \times g$ 、4 °C で 2 時間超遠心し、沈殿物を PBS により懸濁した。また、細胞は上述の細胞溶解液により回収した。それぞれ、9 μL の精製した培養上清と細胞溶解液の HiBiT は、Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega, Wisconsin, USA) を用いて付属の手順に従い、定量した。

定量的逆転写 PCR による vgRNA の比較

Nucleospin RNA virus kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いて付属の手順に従い、超遠心したベクター溶液から total RNA を抽出した。7 μL の RNA から、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて BoDV-

1 特異的プライマー (5'-GTT GCG TTA ACA ACA AAC CAA TCA T-3')⁹⁸ によって、cDNA を合成した。1 μ L の cDNA から、Luna Universal qPCR Master Mix (New-England Biolabs, Massachusetts, USA) を用いて定量 PCR をおこなった。BoDV-1 ゲノム特異的プライマー (forward : 5'- ATG CAT TGA CCC AAC CGG TA -3'、reverse : 5'- ATC ATT CGA TAG CTG CTT CCT TC -3') を用いた⁴³。定量 PCR は、CFX Connect real-time system (Bio-Rad) を用いて 95 °C を 30 秒後、95 °C で 5 秒間し、60 °C を 30 秒間の過程を 40 サイクルでおこなった。測定した CT 値から検量線を作成することで、vgRNA 量を比較した。

アミノ酸配列のアライメント

CLC Genomics Workbench Version 20.0.4w を用いて、オルソボルナウイルス属のウイルスの G の細胞内領域をアライメントした。細胞内領域は、TMHMM Server v. 2.0 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を用いて決定した。

In situ 近接ライゲーションアッセイ

5.0×10^4 Vero/puro 細胞に、Lopofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて付属の手順に従い、FLAG タグ付き CnBV-1-G、CnBV-1_SP2、CnBV-2-G、または CnBV-2_SP1 (0.4 μ g) とヒトファーリン (0.1 μ g) を導入した。その後 48 時間で、細胞を 4% パラホルムアルデヒド (Wako Pure Chemical Industries) によって室温で固定し、0.5% Triton-X100 と 2% FCS を含む PBS で 15 分間処理した。同反応液で希釈した抗 FLAG M2 (Merck) (1:5,000)、または抗ファーリン抗体 (Abcam; ab183495) (1:750) で 1 時間反応させた。以降の過程は、DuoLink PLA テクノロジープローブおよび試薬 (Merck) を用いて、付属の手順に従った。抗マウス PLUS および抗ウサギ MINUS を PLA プローブとして使用した。増幅過程の後、細胞骨格を標識するために 100 nM Acti-stainTM 488 Fluorescent Phalloidin

(Cytoskeleton, Denver, USA) を用いて室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄した後、Duolink in situ mounting medium containing DAPI で封入した。DeltaVision Elite (Cytiva) を用いて観察した。

iPSC における Δ G-REVec の導入力価

Δ G-REVec 感染 293T 細胞を、Cell matrix (Nitta Gelatin Inc) でコーティングしたシャーレに播種し、TransIT-293 Transfection Reagent (TaKaRa) を用いて、BoDV-1-G もしくは CnBV-1-G 発現プラスミドを導入した。その 48 時間後、細胞を 2% FCS を含む 200 μ L の DMEM 中に懸濁させ、超音波処理により細胞を破壊した。上清を 1200 \times g、4 $^{\circ}$ C で 25 分間遠心分離することにより回収した。201B7 または 409B2 iPSC への Δ G-REVec の接種は、記載されているようにおこなった⁴⁰。接種 5 日後に、Eclipse TE-2000-U 倒立顕微鏡 (Nikon) を用いて蛍光顕微鏡像を取得し、GFP 発現領域の面積を ImageJ で解析した。

ラット初代グリア細胞樹立

アストロサイト

0 から 2 日の Slc:SD ラット (SLC, Shizuoka, Japan) 新生仔の大脳皮質を取り出し、20 % FCS DMEM (Thermo Fisher Scientific) で懸濁し、Poly-DL-ornithine hydrobromid (Merck) でコーティングした T-75 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) で培養した。2 日に 1 度の培地交換で 2 週間培養した後、220 rpm、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とうさせた。培地交換後さらに、220 rpm、37 $^{\circ}$ C で一晩振とうさせた T-75 フラスコの底に接着した細胞を、トリプシンではがしてアストロサイト として回収した。1,000 rpm で 3 分間遠心し、回収した細胞を 10 % FCS を含む DMEM (Thermo Fisher Scientific) で懸濁した。24 穴プレートには 5.0×10^4 、また 48 穴プレートには 1.0×10^4 で播種した。3 日 1 回の培地交換で培養した。

オリゴデンドログリア前駆細胞 (OPC)

上述のアストロサイトの樹立工程の途中で 220 rpm、37 °C でさらに一晩振とうさせた後、培養上清を 40 μ m セルスレーナー (Falcon、Kanagawa、Japan) によりろ過した培地を 10 cm シャーレにまき、1 時間 37 °C で静置した。シャーレの上清を 40 μ m セルスレーナーでろ過し、1,200 rpm で 5 分間遠心して OPC として回収し下記の OPS 用の培地で懸濁した。OPC 用の培地は、2 mM L-glutamine acid (nacalai tesque)、B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific) 10 ng/mL Recombinant Human PDGF-AA (Peprotech、Rocky Hill、USA)、および 10 ng/mL Recombinant Human FGF-basic (Peprotech) を含む Neurobasal Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Poly-L-ornithine hydrobromide (Thermo Fisher Scientific) でコーティングした 6 穴プレートには 1.0×10^4 の OPC、48 穴プレートには 1.0×10^4 播種し、2 日 1 回の培地交換で培養した。

ラット初代グリア細胞における導入力価評価

前述の樹立したラット初代アストロサイトおよび OPC に、各培地で 250 倍希釈した超音波処理により回収したベクター (BoDV-1G-REVec、CnBV-1G-REVec) を、48 穴プレートにそれぞれ 125 μ L を加えた。37 °C で 1 時間吸着させ、培地で一度洗浄し、培養した。培養 3 日後、Eclipse TE-2000-U 倒立顕微鏡 (Nikon) で GFP の発現を観察した後、4 % パラホルムアルデヒドで固定した。GFP 陽性細胞の計数は、オールインワン顕微鏡 BZ-X700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いた。

G 組換え Δ M-REVec-GFP の作出

293T 細胞 (6.0×10^5) に、pCAG-BoDV-2-N (500 ng)、BoDV-1-P (25 ng)、

BoDV-1-X (5 ng)、BoDV-1-M (20 ng)、BoDV-1-L (250 ng)、および BoDV-1-G-、CnBV-1-G-または CnBV-2-G- Δ M-REVec のゲノムプラスミド (2 μ g) を TransIT-293 Transfection Reagent (TaKaRa) により導入した。導入 3 日後、それぞれ 4.0×10^6 の細胞から、上述の超音波を用いた方法によりベクターを回収した。導入力価は、上述の通り、Vero/puro 細胞を用いて決定した。

統計解析

統計解析は GraphPad Prism 8 を用いた。使用した検定方法は、図の説明文に示した。

文献

1. Lundstrom, K. RNA viruses as tools in gene therapy and vaccine development. *Genes (Basel)*. **10**, 1–24 (2019).
2. Ma, C. C., Wang, Z. L., Xu, T., He, Z. Y. & Wei, Y. Q. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol. Adv.* **40**, 1–14 (2020).
3. Anguela, X. M. & High, K. A. Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* **70**, 273–288 (2019).
4. Tizard, I., Ball, J., Stoica, G. & Payne, S. The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Anim. Heal. Res. Rev.* **17**, 92–109 (2016).
5. Berg, M., Johansson, M., Montell, H. & Berg, A. L. Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol. Infect.* **127**, 173–178 (2001).
6. Rott, S., Herzog, B., Fleischer, A., Winokur, J., Amsterdam, W., Dyson, H. K. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science*. **228**, 755–756 (1983).
7. McClure, M. A., Thibault, K. J., Hatalski, C. G. & Lipkin, W. I. Sequence similarity between Borna disease virus p40 and a duplicated domain within the paramyxovirus and rhabdovirus polymerase proteins. *J. Virol.* **66**, 6572–6577 (1992).
8. Kolodziejek, J. *et al.* Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J. Gen. Virol.* **86**, 385–398 (2005).
9. Hornig, M. *et al.* Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* **17**, 486–493 (2012).
10. Niller, H. H. *et al.* Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999–2019: an epidemiological investigation. *Lancet*

- Infect. Dis.* **20**, 467–477 (2020).
11. Korn, K. *et al.* Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1377–1379 (2018).
 12. Liesche, F. *et al.* The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Borna disease virus infection. *Acta Neuropathol.* **138**, 653–665 (2019).
 13. Klaus Korn, Roland Coras, Tobias Bobinger, Sibylle M Herzog, Hannes Lücking, Robert Stöhr, Hagen B Huttner, Arndt Hartmann, A. E. Fatal encephalitis associated with Borna disease virus 1. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1375–1377 (2018).
 14. Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* **4**, 491–500 (2002).
 15. Hans, A. *et al.* Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. *FASEB J.* **18**, 863–865 (2004).
 16. Matsumoto, Y. *et al.* Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* **11**, 492–503 (2012).
 17. Hirai, Y. *et al.* Borna disease virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **291**, 25789–25798 (2016).
 18. Horie, M., Kobayashi, Y., Suzuki, Y. & Tomonaga, K. Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20120499 (2013).
 19. Garoff, H., Hewson, R. & Opstelten, D.-J. E. Virus maturation by budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1171–1190 (1998).
 20. Perez, M. & de la Torre, J. C. Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *J. Gen. Virol.* **86**, 1891–1895 (2005).
 21. Neumann, P. *et al.* Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein

- (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3710–3715 (2009).
22. Kraus, I., Bogner, E., Lilie, H., Eickmann, M. & Garten, W. Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett.* **579**, 2686–2692 (2005).
 23. 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).
 24. 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**, 12622–5 (2009).
 25. Makino, A., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Binding properties of GP1 protein of Borna disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* **71**, 243–6 (2009).
 26. Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F. a & de la Torre, J. C. Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J. Virol.* **71**, 3208–3218 (1997).
 27. Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B. & de la Torre, J. C. Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J. Virol.* **72**, 783–8 (1998).
 28. Gustin, J. K., Bai, Y., Moses, A. V. & Douglas, J. L. Ebola Virus Glycoprotein Promotes Enhanced Viral Egress by Preventing Ebola VP40 from Associating with the Host Restriction Factor BST2/Tetherin. *J. Infect. Dis.* **212**, S181–S190 (2015).
 29. El Najjar, F., Schmitt, A. P. & Dutch, R. E. Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production. *Viruses* **6**, 3019–3054 (2014).
 30. Jayakar, H. R., Jeetendra, E. & Whitt, M. A. Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.* **106**, 117–132 (2004).
 31. Stitz, L. *et al.* A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease:

- influence on virus tropism outside the central nervous system. *J. Virol.* **72**, 8884–8892 (1998).
32. Lennartz, F. *et al.* Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell. Microbiol.* **18**, 340–354 (2016).
 33. Bajramovic, J. J. *et al.* Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J. Virol.* **77**, 12222–12231 (2003).
 34. Schneider, U., Ackermann, A. & Staeheli, P. A Borna disease virus vector for expression of foreign genes in neurons of rodents. *J. Virol.* **81**, 7293–72966 (2007).
 35. Ackermann, A., Guelzow, T., Staeheli, P., Schneider, U. & Heimrich, B. Visualizing viral dissemination in the mouse nervous system, using a green fluorescent protein-expressing Borna disease virus vector. *J. Virol.* **84**, 5438–5442 (2010).
 36. Daito, T. *et al.* A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. *J. Virol.* **85**, 12170–12178 (2011).
 37. Fujino, K. *et al.* Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein genes. *Microbiol. Immunol.* **61**, 380–386 (2017).
 38. Komatsu, Y. & Tomonaga, K. Reverse genetics approaches of Borna disease virus: applications in development of viral vectors and preventive vaccines. *Curr. Opin. Virol.* **44**, 42–48 (2020).
 39. Sakai, M. *et al.* Degradation of amyloid β peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector. *Microbiol. Immunol.* **62**, 467–472 (2018).
 40. Komatsu, Y. *et al.* RNA virus-based episomal vector with a fail-safe switch facilitating efficient genetic modification and differentiation of iPSCs. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **14**, 47–55 (2019).
 41. Ikeda, Y. *et al.* A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell

- modification. *Gene Ther.* **23**, 256–262 (2016).
42. Honda, T. *et al.* Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
 43. 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).
 44. Yamamoto, Y., Tomonaga, K. & Honda, T. Development of an RNA Virus-Based Episomal Vector Capable of Switching Transgene Expression. *Front. Microbiol.* **10**, 1–9 (2019).
 45. Komatsu, Y., Tanaka, C., Komorizono, R. & Tomonaga, K. In vivo biodistribution analysis of transmission competent and defective RNA virus-based episomal vector. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
 46. Komatsu, Y., Kakuya, Y. & Tomonaga, K. Production of high-titer transmission-defective RNA virus-based episomal vector using tangential flow filtration. *Microbiol. Immunol.* **64**, 602–609 (2020).
 47. Beatrice Cubitt a, Christopher Oldstone a, Juan Valcarcel b, J. C. de la T. RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res.* **34**, 69–79 (1994).
 48. Schneider, P. A., Kim, R. & Lipkin, W. I. Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J. Virol.* **71**, 5614–5619 (1997).
 49. Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N. & Lipkin, W. I. Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J. Virol.* **74**, 4425–4428 (2000).
 50. Kojima, S. *et al.* Splicing-dependent subcellular targeting of Borna disease virus nucleoprotein isoforms. *J. Virol.* **93**, 1–19 (2019).
 51. Zimmermann, V., Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. Impact

- of antigenic diversity on laboratory diagnosis of Avian bornavirus infections in birds. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **26**, 769–777 (2014).
52. Richt, R. A., Fu, T., Herden, C., Bause-niedrig, I. & Garten, W. Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J. Virol.* **72**, 4528–4533 (1998).
 53. Eickmann, M. *et al.* Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett.* **579**, 4751–4756 (2005).
 54. Daito, T., Fujino, K., Watanabe, Y., Ikuta, K. & Tomonaga, K. Analysis of intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein fused with fluorescent markers in living cells. *J. Vet. Med. Sci. Japanese Soc. Vet. Sci.* **73**, 1243–1247 (2011).
 55. Kiermayer, S., Kraus, I., Richt, A., Garten, W. & Eickmann, M. Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. **531**, 255–258 (2002).
 56. Shapiro, J. *et al.* Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 3–12 (1997).
 57. Sasaki, M. *et al.* Development of a rapid and quantitative method for the analysis of viral entry and release using a NanoLuc luciferase complementation assay. *Virus Res.* **243**, 69–74 (2018).
 58. Dixon, A. S. *et al.* NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol.* **11**, 400–408 (2016).
 59. Tamura, T. *et al.* Characterization of recombinant Flaviviridae viruses possessing a small reporter tag. *J. Virol.* **92**, 1–19 (2017).
 60. Suomalainen, M., Liljeström, P. & Garoff, H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J. Virol.* **66**, 4737–4747 (1992).
 61. McCown, M. F. & Pekosz, A. The Influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J. Virol.* **79**, 3595–

- 3605 (2005).
62. Överby, A. K., Pettersson, R. F. & Neve, E. P. A. The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging. *J. Virol.* **81**, 3198–3205 (2007).
 63. Clemente, R. & de la Torre, J. C. Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *J. Virol.* **81**, 5968–5977 (2007).
 64. Amarasinghe, G. K. *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch. Virol.* **164**, 1967–1980 (2019).
 65. Komorizono, R., Makino, A., Horie, M., Honda, T. & Tomonaga, K. Sequence determination of a new parrot bornavirus-5 strain in Japan: implications of clade-specific sequence diversity in the regions interacting with host factors. *Microbiol. Immunol.* **60**, 437–441 (2016).
 66. Garry, C. E. & Garry, R. F. Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (γ penetrene). *Virol. J.* **6**, 1–10 (2009).
 67. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M. & Schornberg, K. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 189–219 (2008).
 68. Weissenböck, H., Sekulin, K., Bakonyi, T., Högler, S. & Nowotny, N. Novel Avian Bornavirus in a Nonpsittacine Species (Canary; *Serinus canaria*) with Enteric Ganglioneuritis and Encephalitis. *J. Virol.* **83**, 11367–11371 (2009).
 69. Rubbenstroth, D. *et al.* Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Vet. Microbiol.* **165**, 287–295 (2013).
 70. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 115–130 (2017).
 71. Blau, H. M. & Daley, G. Q. Stem cells in the treatment of disease. *N. Engl. J. Med.*

- 380**, 1748–1760 (2019).
72. Honda, T. *et al.* Sustainable tumor-suppressive effect of iPSC-derived rejuvenated T cells targeting cervical cancers. *Mol. Ther.* **28**, 1–12 (2020).
 73. Braun, E. & Sauter, D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin. Transl. Immunol.* **8**, 1–19 (2019).
 74. Zhou, A., Webb, G., Zhu, X. & Steiner, D. F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745–20748 (1999).
 75. Bederka, L. H., Bonhomme, C. J., Ling, E. L. & Buchmeier, M. J. Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization. *MBio* **5**, 1–14 (2014).
 76. Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W. & Klenk, H. D. Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res.* **60**, 55–65 (1999).
 77. Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J. C., Gorney, R. & Oldstone, M. B. A. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* **314**, 168–178 (2003).
 78. Lenz, O., Meulen, J. Ter, Klenk, H. D., Seidah, N. G. & Garten, W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12701–12705 (2001).
 79. Bolt, G., Pedersen, L. Ø. & Birkeslund, H. H. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: Role of furin. *Virus Res.* **68**, 25–33 (2000).
 80. Zhang, J., Leser, G. P., Pekosz, A. & Lamb, R. A. The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. *Virology* **269**, 325–334 (2000).
 81. Takizawa, N., Momose, F., Morikawa, Y. & Nomoto, A. Influenza a virus hemagglutinin is required for the assembly of viral components including bundled vrnps at the lipid raft. *Viruses* **8**, 1–15 (2016).

82. Werner-Keišs, N. *et al.* Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **34**, 590–602 (2008).
83. Décembre, E. *et al.* Sensing of ommature particles produced by Dengue virus infected cells induces an antiviral response by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog.* **10**, 1–23 (2014).
84. Sinigaglia, L. *et al.* Immature particles and capsid-free viral RNA produced by Yellow fever virus-infected cells stimulate plasmacytoid dendritic cells to secrete interferons. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
85. Rubbenstroth, D. *et al.* No contact transmission of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and domestic canaries (*Serinus canaria forma domestica*). *Vet. Microbiol.* **172**, 146–156 (2014).
86. Marzi, A. *et al.* The signal peptide of the Ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* **80**, 6305–6317 (2006).
87. Yolitz, J. *et al.* Signal peptide of HIV envelope protein impacts glycosylation and antigenicity of gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 2443–2448 (2018).
88. Asmal, M. *et al.* A signature in HIV-1 envelope leader peptide associated with transition from acute to chronic infection impacts envelope processing and infectivity. *PLoS One* **6**, 1–12 (2011).
89. Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**, 417–428 (2000).
90. Jan, M., Upadhyay, C. & Hioe, C. E. HIV-1 Envelope glycan composition as a key determinant of efficient virus transmission via DC-SIGN and resistance to inhibitory lectins. *iScience* **21**, 413–427 (2019).
91. Sinn, P. L., Sauter, S. L. & McCray, P. B. Gene therapy progress and prospects:

- Development of improved lentiviral and retroviral vectors - Design, biosafety, and production. *Gene Ther.* **12**, 1089–1098 (2005).
92. Shahryari, A. *et al.* Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders. *Front. Genet.* **10**, 1–25 (2019).
 93. Cone, R. D. & Mulligan, R. C. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6349–6353 (1984).
 94. Mochizuki, H., Schwartz, J. P., Tanaka, K., Brady, R. O. & Reiser, J. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* **72**, 8873–8883 (1998).
 95. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.-K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells (gene therapy/zebrafish). *Genetics* **90**, 8033–8037 (1993).
 96. Horie, M. *et al.* Isolation of avian bornaviruses from psittacine birds using QT6 quail cells in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 305–308 (2016).
 97. Ovanesov, M. V *et al.* Activation of microglia by borna disease virus infection: in vitro study. *J Virol* **80**, 12141–12148 (2006).
 98. Honda, T. *et al.* Linkage between the leader sequence and leader RNA production in Borna disease virus-infected cells. *Virology* **510**, 104–110 (2017).

注釈

図 11B、11C、12A で使用した VSBV-1-G、PaBV-5-G、MuBV-1-G、PaBV-2-G および PaBV-4-G 発現プラスミドに用いた cDNA は、本研究室所属 小森園 亮氏により作製された。図 6A、6B で使用したヒトフリーン発現プラスミドは、本研究室所属 助教牧野 晶子博士により作製された。電子顕微鏡による解析（図 7A, 10E）は、京都大学大学院生命科学研究科微細構造ウイルス学所属の博士課程藤田 陽子氏によって取得されたデータを使用した。図 15C で用いた初代ラットグリア細胞は、滋賀医科大学内科学講座脳神経内科所属の南山 素三雄特任助教と共同で樹立したものである。

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。

Madoka Sakai, Yoko Fujita, Ryo Komorizono, Takehiro Kanda, Yumiko Komatsu, Takeshi Noda, Keizo Tomonaga, Akiko Makino

Optimal expression of the envelope glycoprotein of orthobornaviruses determines the production of mature virus particles

Journal of Virology, in press, doi: 10.1128/JVI.02221-20.

謝辞

本研究の開始から学位論文をまとめるまで、多くの方々からのご支援とご指導をいただきました。お世話になった皆様に、この場をお借りして感謝の意を申し上げます。

はじめに、本研究の機会を与えていただき、また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、多くの知識や助言をくださいました同研究室 助教牧野 晶子博士に深く感謝いたします。本大学微細構造ウイルス学 藤田 陽子氏には迅速な対応でデータを取得いただきました。滋賀医科大学内科学講座脳神経内科 南山 素三雄特任助教には、ラット初代培養細胞の樹立に関わる実験技術をご教授いただきました。そして、同研究室に所属されていた小松 弓子博士には、公私ともに研究生活を支えていただきました。ここに、感謝の意を表します。

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・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門 RNA ウイルス分野の皆様には感謝申し上げます。

最後に、家族からの温かい最大の支え、友人からのはげましのおかげで、この研究を達成することができました。心からの感謝の気持ちを申し上げます。