

Title	Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal
Author(s)	矢内, 英之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/46226">http://hdl.handle.net/11094/46226</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	矢内英之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20110 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal (RNA ポリメラーゼ II プロモーターを用いた効率的なボルナ病ウイルスのリバース・ジェネティクスシステムの確立)
論文審査委員	(主査) 教授 生田 和良 (副査) 教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

遺伝子操作によって人工的にウイルスを作出するリバース・ジェネティクス (RG) は RNA ウイルスの転写・複製のみならず病原性の解明にも多大な貢献を果たしてきた。また、RG は RNA ウイルスを基盤としたウイルスベクターの開発にも必須のシステムとなっている。

ボルナ病ウイルス (BDV) はヒトを含めた広範な動物に感染が認められるモノネガウイルス目に属する向神経性のウイルスである。その特徴は非細胞傷害性に持続感染することに加え、動物由来モノネガウイルス目では唯一、核内で転写・複製をおこなうことにある。ウイルス複製の最小単位であるリボ核酸複合体 (vRNP) は、ゲノム RNA とそれを保護する N 蛋白質、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) である L 蛋白質、ならびに RdRp の補助因子 P 蛋白質から構成されている。RG の確立には、vRNP を哺乳類細胞内で人工的に構築させる必要がある。現在、複製の鋳型となるマイナス鎖一本鎖のゲノム RNA を生成する技術としては、バクテリオファージ T7 由来の T7 プロモーターやリボゾーム RNA を合成する RNA ポリメラーゼ I (Pol I) プロモーターが主に用いられている。両プロモーターともに RNA の転写効率には優れているが、BDV RG の作成に対してはいくつかの欠点を持っている。T7 プロモーターの活性化には T7 RNA ポリメラーゼ (T7P) が供給されなければならないが、T7P を発現する組換えワクシニアウイルスや T7P の安定発現細胞株が必要である。しかし、その使用や作製は煩雑である。また、BDV の複製の場は核であり、細胞質で働く T7P は BDV RG にとっては最適の選択ではないと考えられる。一方、Pol I プロモーターは種依存性が高く、ウイルスを作製する際の細胞の選択の幅を狭めてしまう可能性がある。そこで、本研究では BDV 組換えウイルス作出の足掛かりとして、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) プロモーターを用いた BDV ミニゲノムシステムの構築を試みた。

## 〔 方法ならびに成績 〕

BDV の転写・複製に必須なゲノムの両末端 (5 Trailer, 3 Leader) の間にリポーター遺伝子である Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) を挿入し、さらにその両端をハンマーヘッドリボザイム (HamRz) と D 型肝炎ウイルス

由来リボザイム (HDVRz) で挟んだコンストラクトを構築した。そして、そのコンストラクトを Pol II プロモーターの下流に挿入することで、BDV ミニゲノムプラスミド (Pol II-MG) を作成した。Pol II プロモーターには汎用されている CMV あるいは CAG を用いた。

作製した Pol II-MG は、BDV の N、P、L 蛋白質をコードするプラスミドとともに 293T 細胞に導入し、60 時間後に細胞内の CAT 活性を ELISA にて測定した。その結果、Pol II-MG は、Pol I プロモーターを用いたシステムよりも CAT の発現が顕著に低いことが明らかになった。一方、Pol II システムにおいても、細胞への Pol II-MG の導入量を増やすと、CAT 活性が上昇することから、Pol II-MG は、Pol I システムに比べ、RNA の転写効率が低いことが欠点であると考えられた。そこで、Pol II-MG の転写効率を上昇させるために、以下の検討をおこなった。まず、2 つのタイプの HamRz (HamRz-R および HamRz-L) の RNA 切断効率を検討した。In vitro の系では両 HamRz ともに効率的な RNA 切断が確認された。一方、ミニゲノムでその活性を比較検討したところ、HamRz-R が CMV、CAG プロモーターともにミニゲノムの発現効率がよく、BDV Pol II-MG には適当であると判断した。次に、Pol II による転写を効率的におこなうために、polyadenylation (poly-A) シグナルを HDVRz の下流に挿入した。しかしながら、poly-A シグナルの挿入により CAT 活性は顕著に減少し、ミニゲノムの効率的な発現には、poly-A の付加は不必要であると判断した。

近年、プラスミドに挿入された SV40 の origin of replication や early-late プロモーター領域の配列が、プラスミドの細胞核への移行に重要であるとの知見が得られている。一方、Pol II-MG の用量依存的な CAT の活性の上昇を考えると、効率的な Pol II-MG の核移行がミニゲノムの発現上昇につながるのではないかと考えられた。そこで、SV40 の origin of replication や early-late プロモーター領域の配列を 3 つの領域 (SV1、SV2、SV3) に分けて、それぞれを HDVRz の下流に挿入した。その結果 origin of replication を含む領域 (SV3) を挿入した Pol II-MG において、Pol I プロモーターシステムと同等かそれ以上の活性が得られた。また、SV3 挿入 Pol II-MG では由来の異なる種々の細胞でも高い CAT 活性が認められ、その汎用性の高さが示された。

最近の知見において、BDV の X 蛋白質が P 蛋白質と結合することによって、BDV のポリメラーゼ活性を負に制御することが明らかとなっている。そこで、T7 や Pol I プロモーターを基盤としたミニゲノムでは解析が困難と考えられる X 蛋白質の種特異的な BDV のポリメラーゼ活性の阻害効果を Pol II-MG を用いて測定した。その結果、X 蛋白質の発現により、ヒト由来 293T 細胞では BDV ポリメラーゼ活性が顕著に阻害されたのに対し、ハムスター由来 BHK 細胞やサル由来 Vero 細胞では中程度の阻害効果であった。一方、マウス由来 N2a 細胞では X 蛋白質による阻害効果は観察されなかった。

#### [ 総 括 ]

Pol II プロモーターを用いた効率的な BDV MG システムを開発した。SV40 の核移行シグナルを挿入したプラスミドにおいてミニゲノムの発現効率が上昇したことより、BDV の RG の確立には核内で効率的なミニゲノムの発現が必要であると考えられた。また、Pol II-MG は由来の異なる種々の細胞での発現が可能であり、広範な宿主域を持つ BDV の転写や複製の解析に有用であると考えられた。本成果は、組換えウイルス作出のための細胞の選択にも幅を与えるものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

ボルナ病ウイルス (BDV) は非分節、一本鎖、マイナス鎖の RNA をゲノムとして持つウイルスで、モノネガウイルス目に属するウイルスの中で唯一、細胞の核内で転写と複製を行う。現在、モノネガウイルス目に属するウイルスのリバース・ジェネティクスではウイルスの cDNA や蛋白発現などに T7 プロモーターが用いられているが、核で複製する BDV にとって最適ではないと考えられる。一方、Pol I プロモーターは種特異性が高い為にウイルスを作製する為の細胞の選択の幅を狭めてしまう可能性がある。そこで、本研究では RNA polymerase II (Pol II) プロモーターを用いた BDV のリバース・ジェネティクスへの足掛かりとして、BDV ミニゲノムの構築を目標とした。

CAG や CMV プロモーターを用いた BDV ミニゲノムは Pol I プロモーターを用いたミニゲノムよりも活性が低かった。しかしプラスミドに核移行 signal を付加することで、Pol I プロモーターを用いたものと同等の活性をもたせることに成功した。また本研究で確立したミニゲノムを用いて由来の異なる種々の細胞株で、X 蛋白質の BDV ポリメラーゼに対する阻害効果が異なるのではないかという可能性を見出した。

矢内英之君の研究内容は、Pol II プロモーターを用いて BDV のリバース・ジェネティクスシステム確立し、様々な細胞を用いての解析を可能とした。本システムは他のウイルスにも適用できるシステムであり学位の授与に値すると考えられる。