

## 5. 内在性 RNA ウイルスエレメントによるウイルス RNA 制御仮説

本田 知之<sup>1,2)</sup>, 朝長 啓造<sup>2)</sup>

1) 大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座ウイルス学

2) 京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野

内在性ボルナウイルス様エレメント (Endogenous bornavirus-like element: EBL) は、過去のボルナウイルス感染により内在化したボルナウイルス由来配列である。EBL の発見以来、ボルナウイルスのみならず、様々な RNA ウイルス遺伝子の内在化が見つかってきている。一方で、それらの内在性 RNA ウイルスエレメントの生理機能についての解析は緒についたばかりである。本稿では、その中で最も研究が進んでいる EBL の生理機能について、私たちの研究を中心に最新の知見を紹介する。EBL の生理機能解析からわかってきたことは、宿主細胞は RNA ウイルス遺伝子由来の配列を利用し、様々な機構でウイルス感染を制御している可能性である。その制御は、ウイルスの転写・複製過程および転写後のウイルス RNA 安定性の両方のレベルにおいて起きていると考えられる。また、EBL の解析により、今まで哺乳類ではその存在が想定されて来なかった低分子 RNA 増幅システムの可能性が見えてきたので、合わせて紹介したい。

### 1. はじめに

ボルナウイルスは、非分節一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムに持つモノネガウイルス目に属する RNA ウイルスである<sup>1,2)</sup>。現在、ボルナウイルス科ボルナウイルス属には、哺乳類に感染するボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) や鳥類に感染する鳥ボルナウイルスなどが同定されている<sup>3)</sup>。ボルナウイルスのゲノムには、N, X, P, M, G, L の6つの遺伝子がコードされている。2010年に私たちのグループは、ボルナウイルス遺伝子類似配列がヒトをはじめとする多くの哺乳類のゲノム内に存在することを発見した<sup>4)</sup>。遺伝学的解析により、これらの配列はボルナウイルスの遺伝子と同一起源であり、過去に感染したボルナウイルスの遺伝子が内在化したものであると考えられた。私たちは、これらの内在化配列を、内在性ボルナウイルス様

エレメント (Endogenous bornavirus-like element: EBL) と名付けた。これまでに、N, M, G, L 遺伝子に由来する EBL が、様々な動物ゲノムで報告されている<sup>4-7)</sup>。例えば、N 遺伝子に由来する EBL (EBL from N gene: EBLN) は、ヒトゲノム中に少なくとも7カ所存在している。哺乳類ゲノム中の EBLN 配列のほとんどは偽遺伝子化している<sup>4)</sup>。それにもかかわらず、多くの場合、これらの配列から RNA が転写されている。また、一部の EBLN は極めて長いオープンリーディングフレーム (ORF) を保持しており、発現レベルは低いもののタンパク質としても発現している<sup>8,9)</sup>。それでは、これらの EBL 由来 RNA もしくはタンパク質は何か機能を持つのだろうか？最近の研究から、これらの EBL 由来転写産物が様々な機構でウイルス RNA を制御する可能性が示されつつある。本稿では、EBL による多彩なウイルス RNA 制御の機構について、想定される仮説を概説する。

### 2. EBL RNA による宿主転写制御

EBL の生理機能を探索する上で、同様に宿主ゲノムに内在化したレトロウイルスである内在化レトロウイルスやゲノム内を移動するウイルス様転移因子であるレトロトランスポゾンの生理機能は参考となる。内在性レトロウイルスや非 LTR 型レトロトランスポゾンである LINE (Long interspersed nuclear element) の挿入がゲノム DNA に起

#### 連絡先

〒565-0871

大阪府吹田市山田丘2-2 B7

大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座ウイルス学

TEL: 06-6879-3783

FAX: 06-6879-3789

E-mail: thonda@virus.med.osaka-u.ac.jp

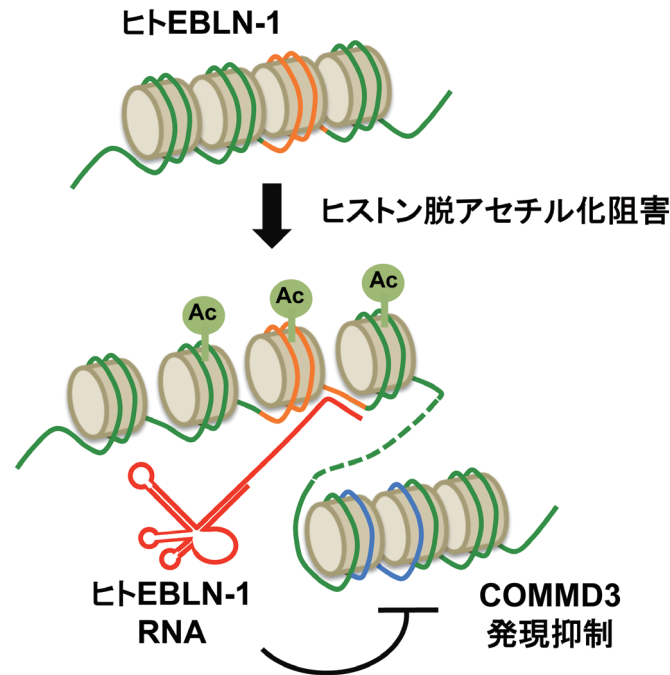


図1 ヒト EBLN-1 RNA による周辺遺伝子の転写制御機構

ヒト EBLN-1 の転写は、精巣以外では、ヒストン脱アセチル化とヒストンメチル化による制御を受け抑制されている。ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いることで、ヒト EBLN-1 RNA の発現が誘導できる。この発現誘導により、隣接する COMMD3 遺伝子の発現が抑制された。また、この COMMD3 発現抑制は、ヒト EBLN-1 RNA に対する siRNA 処理により解除できた。

こと、挿入部位近傍の遺伝子に様々な影響を及ぼすことが知られている<sup>10, 11)</sup>。ある遺伝子のエクソン部分への LINE 挿入は、その遺伝子の破壊もしくは機能変化につながる。イントロンに挿入されると、新たなスプライシングサイトを形成し、その遺伝子のスプライシングパターンを変化させることもある。遺伝子間領域へこれらの挿入が起こると、これらのエレメント自身が持つプロモーター活性により、上流、下流いずれに位置する遺伝子も RNA への転写量が変化しうる。

これらのことから、私たちもまず、EBL が近傍遺伝子の転写を制御している可能性を考えた。ヒト EBLN-1 からの転写は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やヒストンメチル化酵素に対する siRNA を用いて誘導できる<sup>12)</sup>。私たちは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によりヒト EBLN-1 からの転写を誘導した時に、その上流遺伝子である COMMD3 の発現は低下することを見出した(図1)<sup>12, 13)</sup>。この効果は、ヒトを含む霊長類細胞では認められるのに対して、げっ歯類細胞では認められなかった。霊長類ゲノムに存在する EBLN-1 の遺伝子座位と相同なげっ歯類ゲノムの遺伝子座位には、EBLN が存在しない。このことから、COMMD3 の近傍に EBLN が存在することが、EBLN による COMMD3 の転写制御に重要であることがわかる<sup>12, 14)</sup>。

この COMMD3 転写制御は、ヒト EBLN-1 に対する siRNA を用いることで消失した。霊長類の EBLN-1 のうちタンパク質をコードしているものはヒト EBLN-1 のみであり、EBLN-1 タンパク質としての機能で、様々な霊長類細胞で認められるこの転写制御を説明するのは難しい<sup>4)</sup>。また、EBLN-1 のコードするタンパク質には進化上の選択圧が認められない<sup>15)</sup>。さらに、ヒト EBLN-1 タンパク質は主に細胞質に局在することが示されており、核内での遺伝子制御に働く可能性は考えにくい。以上の結果から、EBL のうち少なくともヒト EBLN-1 は、RNA として機能し周辺遺伝子の転写を制御していると考えられる。ヒト EBLN-1 が制御する COMMD3 遺伝子は、細胞の NF $\kappa$ B シグナルを負に制御する遺伝子である<sup>16)</sup>。ヒト EBLN-1 が COMMD3 遺伝子の発現を抑制することから、宿主細胞は EBLN-1 を獲得し、NF $\kappa$ B シグナルの活性を高め、抗ウイルス能を高めることに利用したのかもしれない<sup>13)</sup>。

### 3. EBL 由来低分子 RNA によるウイルス RNA の転写後制御

細胞内 RNA の安定性を決定する因子として、低分子 RNA がある。ヒトやマウスでは、そのような低分子 RNA の一種である piRNA (PIWI-interacting RNA) を産生している EBLN が存在する<sup>17)</sup>。piRNA は、主に生殖系細胞に

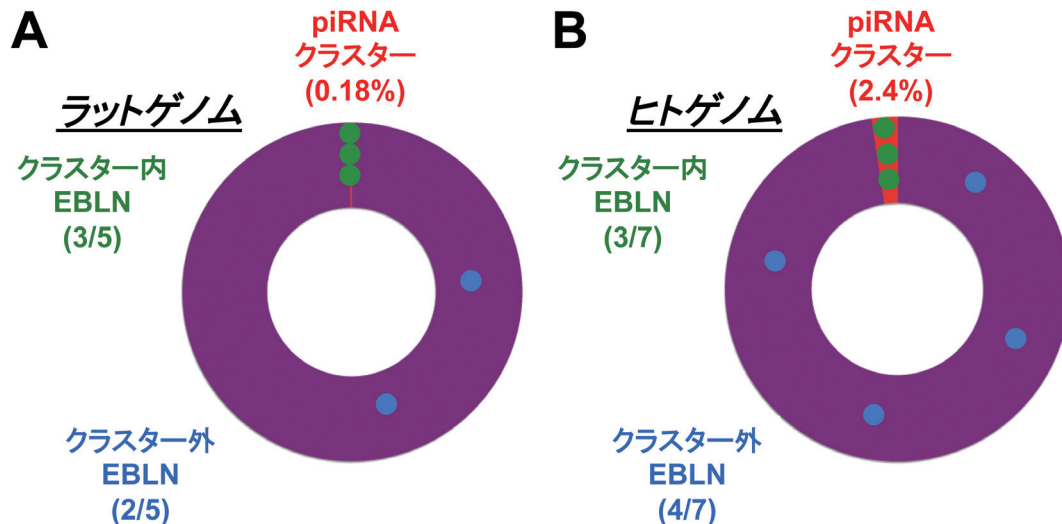


図2 EBLN と piRNA クラスター

(A) ラットゲノムにおける EBLN と piRNA クラスター. ラットゲノム中に piRNA クラスターは 0.18% 存在する. 5 個のラット EBLN のうち, 3 個がこのクラスターに局在した. (B) ヒトゲノムにおける EBLN と piRNA クラスター. ヒトゲノム中に piRNA クラスターは 2.4% 存在する. 7 個のヒト EBLN のうち, 3 個がこのクラスターに局在した. ラット, ヒト両方のゲノムにおいて, EBLN がこのように piRNA クラスターに偶然集積する確率は極めて低い. このことは, EBLN の機能に piRNA が深く関わっている可能性を示唆する.

において, レトロトランスポゾンなどの転移因子を抑制し, それらにより生じる DNA 損傷などの有害事象からゲノムを防御する低分子 RNA である<sup>17)</sup>. piRNA 前駆体は, ゲノム上に形成されたクラスター (piRNA クラスター) から転写された長い一本鎖 RNA であると考えられている<sup>18)</sup>. piRNA 前駆体は, 切断されて 23-30 塩基長の小さな成熟 piRNA となる. piRNA は, その結合分子である PIWI タンパク質と協調的に, piRNA に相補的な配列を持つレトロトランスポゾンの発現を抑制する. 私たちは, 霊長類ゲノムやげっ歯類ゲノム中の EBLN のうちいくつか, この piRNA クラスターの内部もしくは近傍に存在していることを見出した (図 2)<sup>19)</sup>. 例えば, ラットゲノム中で piRNA クラスターと定義されている領域は, 0.18% 程度である. 一方, ラットゲノム中に EBLN は 5 箇所見出されており, そのうち 3 箇所が piRNA クラスターの内部もしくは近傍に存在した. さらに, これらの 3 箇所の EBLN からは実際に, ボルナウイルスの mRNA 配列に対してアンチセンス鎖の piRNA が産生されていた. 同様の現象は, 他の霊長類・げっ歯類ゲノムの EBLN についても確認されたため, EBLN が piRNA クラスターに存在することに何らかの意味があることが推察される.

ボルナウイルスと piRNA クラスター中の EBLN との関係は, 細菌類の適応免疫の一種である CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) システムにおける, ファージと

CRISPR アレイに取り込まれたファージ配列との関係と類似している<sup>20)</sup>. この類似性から考えられる魅力的な仮説は, EBLN 由来 piRNA がボルナウイルス感染を抑制する可能性である<sup>13, 19)</sup>. 太古の昔, 感染細胞は, 宿主ゲノムの piRNA クラスターにボルナウイルスの配列を取り込むことで, ボルナウイルスに対する piRNA を産生し, 抗ボルナウイルス活性を獲得したのかもしれない. 私たちは少なくとも, これらの EBLN 由来 piRNA が, 相補的な配列を持つレポーター遺伝子の発現を抑制することを見出している (未発表). EBLN が piRNA クラスターに高率に見つかることと合わせると, EBL 由来低分子 RNA によるウイルス RNA の制御は, EBL が比較的獲得しやすい機能であったのかもしれない.

#### 4. EBL タンパク質によるウイルス感染制御

一部の内在性レトロウイルス配列が, タンパク質として機能し, 類縁レトロウイルスの感染を阻害することが知られている<sup>21, 22)</sup>. 同様に, EBL 配列がタンパク質として機能し, BDV の感染あるいは複製を制御している可能性が考えられる<sup>5, 23)</sup>. ジュウサンセンジリスゲノムには, 比較的近年にゲノムに挿入されたと考えられる EBLN (*Ictidomys tridecemlineatus* EBLN: itEBLN) が存在する<sup>9)</sup>. itEBLN は, 比較的長い ORF を保持しており, BDV N タンパク質とアミノ酸レベルで約 77% という高い相同性を持つ. itEBLN タンパク質を BDV 感染細胞に発現させると, BDV のリボタン

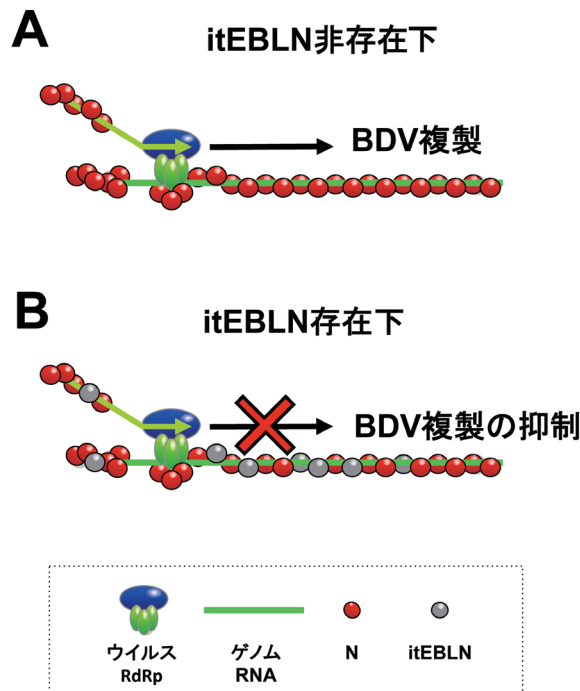


図3 itEBLN タンパク質のBDV複製抑制機構

(A)itEBLN 非存在下のBDV複製. Nタンパク質に覆われたBDVゲノムRNAを鋳型に, ウイルスのRdRpがアンチゲノムRNAを合成する. アンチゲノムRNAもNタンパク質に覆われ, これを鋳型に自身のゲノムRNAを複製する. (B) itEBLN存在下のBDV複製. itEBLNタンパク質は, Nタンパク質の一部の機能ドメインを保持している. Nタンパク質の代わりに, itEBLNタンパク質がゲノムRNAの一部を覆うと考えられる. その結果, ウイルスRdRpは, itEBLNタンパク質を含むゲノムRNAを鋳型として認識できずに, BDV複製が抑制される.

パク質複合体(RNP)が集積する核内構造体(viral speckles of transcripts: vSPOTs)に, itEBLNタンパク質は局在した<sup>9, 24</sup>. その時, BDVRNPとitEBLNタンパク質は相互作用していた. itEBLNタンパク質発現により感染細胞中BDV量は減少するため, itEBLNタンパク質はBDVRNPと相互作用してウイルス複製を抑制する可能性が考えられた<sup>9</sup>. itEBLNタンパク質には, Nタンパク質の持つ機能ドメインの一部だけが保存されている. そのため, itEBLNはNタンパク質のドミナントネガティブ体として働いていることが推察される(図3)<sup>9, 13</sup>. itEBLNタンパク質を取り込んだウイルスRNPは, ウイルス複製の鋳型として機能できなくなり, ウイルス複製が阻害されると考えられる. このように, EBLは, 内在性レトロウイルス配列同様, ドミナントネガティブタンパク質としてBDVの複製を抑制し, その結果, ウイルスゲノムRNA量を低下させることが明らかとなった.

### 5. RNAポリメラーゼ機能モチーフを持つEBLタンパク質

植物や分裂酵母などいくつかの真核生物のゲノムには, RNA依存性RNAポリメラーゼ(RNA-dependent RNA

polymerase: RdRp)がコードされている<sup>25</sup>. 一方, 哺乳類動物のゲノムには, DNA依存性RNAポリメラーゼ(RNAポリメラーゼIIなど)は存在するが, 典型的なRdRpモチーフを持つ分子はこれまで見つかっていなかった<sup>25</sup>. ボルナウイルスのRdRpをコードするL遺伝子に由来する内在性配列(EBL from L gene: EBL)は, 哺乳類から節足動物まで非常に広範な生物種のゲノムに存在することが明らかとなっている. しかし, そのほとんどが, 進化の過程で偽遺伝子化しており, タンパク質をコードしていない. 私たちは, オオクビワコウモリゲノムに存在するEBL(*Eptesicus fuscus* EBL-1: efEBL-1)が, ボルナウイルスL遺伝子とほぼ同じ長さのORFを保持していることを見出した<sup>26</sup>. さらに, 近縁種のコウモリゲノムの解析から, *Eptesicus*属に属する3種のコウモリゲノムにORFを保持したefEBL-1と相同な*Eptesicus*属EBL-1(eEBL-1)を見出した. 進化的な解析から, eEBL-1は1,180万年以上前に内在化し, その後自然選択圧の存在下にあることが示された. さらに, eEBL-1のアミノ酸解析から, eEBL-1タンパク質は既知のモノネガウイルスのRdRpに共通する機能モチーフ配列が存在することが明らかと





とが多い。一方、EBLN を持たないウマやヒツジでは、BDV による致死性脳炎（ボルナ病）が報告されている。このように、EBLN を持つ動物と BDV 感染の病原性にはある程度の相関性が認められる<sup>5,6</sup>。さらに、EBLN をもつそれぞれの生物系統で、EBLN 獲得以降、新しいボルナウイルスの内在化が起こっていないようにみえる<sup>4</sup>。これらの事実と私たちの研究結果から、EBL は元来、抗ボルナウイルス活性を持つタンパク質もしくは RNA として機能してきたことが示唆される<sup>13</sup>。細胞が太古の RNA ウイルス由来配列を自分の中の類縁ウイルス RNA の発現制御に用いている点は興味深い。

内在性 RNA ウイルス配列は、ボルナウイルスに由来する EBL に限ったものではない。私たちが transcript reversion と名付けた RNA ウイルス mRNA の宿主ゲノムへのインテグレーション現象は、RNA ウイルスに共通の感染現象として考えられるようになってきている<sup>6,13,30-32</sup>。今後、様々な内在性 RNA ウイルス配列の生理機能についての知見が蓄積されていくことで、新しい RNA ウイルスの制御法や新しい RNA 発現調節機構などが見出されることが期待される。また、このように多彩な生理機能を持ちうる内在性 RNA ウイルス配列の研究は、宿主ゲノムの進化を考える一助にもなろう。これからの内在性 RNA ウイルス研究の多方面へのさらなる展開に期待したい。

### 謝辞

本総説の執筆の機会を与えてくださいました渡邊雄一郎先生ならびにウイルス編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

### 利益相反事項について

本稿に関し、開示すべき利益相反状態にある企業はありません。

### 文 献

- 1) Honda T., Tomonaga K. (2013) Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* **5**: 1978–1990.
- 2) Tomonaga K., Kobayashi T., Ikuta K. (2002) Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* **4**: 491–500.
- 3) Kuhn J. H., Dürrwald R., Bao Y., Briese T., Carbone K., et al. (2015) Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol* **160**: 621–632.
- 4) Horie M., Honda T., Suzuki Y., Kobayashi Y., Daito T., et al. (2010) Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* **463**: 84–87.
- 5) Horie M., Kobayashi Y., Suzuki Y., Tomonaga K. (2013) Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20120499.
- 6) Belyi V. A., Levine A. J., Skalka A. M. (2010) Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* **6**: e1001030.
- 7) Katzourakis A., Gifford R. J. (2010) Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet* **6**: e1001191.
- 8) Ewing R. M., Chu P., Elisma F., Li H., Taylor P., et al. (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* **3**: 89.
- 9) Fujino K., Horie M., Honda T., Merriman D. K., Tomonaga K. (2014) Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 13175–13180.
- 10) Singer T., McConnell M. J., Marchetto M. C. N., Coufal N. G., Gage F. H. (2010) LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci* **33**: 345–354.
- 11) McClintock B. (1956) Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **21**: 197–216.
- 12) Sofuku K., Parrish N. F., Honda T., Tomonaga K. (2015) Transcription Profiling Demonstrates Epigenetic Control of Non-retroviral RNA Virus-Derived Elements in the Human Genome. *Cell Rep* **12**: 1548–1554.
- 13) Honda T., Tomonaga K. (2016) Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mob Genet Elem.* **6**: e1165785.
- 14) Honda T. (2015) Neuropathogenesis of persistent infection with Borna disease virus. *Uirusu* **65**: 145–154.
- 15) Kobayashi Y., Horie M., Tomonaga K., Suzuki Y. (2011) No evidence for natural selection on endogenous borna-like nucleoprotein elements after the divergence of Old World and New World monkeys. *PLoS One* **6**: e24403.
- 16) Burstein E., Hoberg J. E., Wilkinson A. S., Rumble J. M., Csomos R. A., et al. (2005) COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* **280**: 22222–22232.
- 17) Siomi M. C., Sato K., Pezic D., Aravin A. A. (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 246–258.
- 18) Brennecke J., Aravin A. A., Stark A., Dus M., Kellis M., et al. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**: 1089–1103.
- 19) Parrish N. F., Fujino K., Shiromoto Y., Iwasaki Y. W., Ha H., et al. (2015) piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* **21**: 1691–1703.
- 20) Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823–826.
- 21) Jern P., Coffin J. M. (2008) Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* **42**: 709–732.
- 22) Hilditch L., Matadeen R., Goldstone D. C., Rosenthal P. B., Taylor I. A., et al. (2011) Ordered assembly of murine leukemia virus capsid protein on lipid nanotubes directs specific binding by the restriction factor,

- Fv1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5771–5776.
- 23) Feschotte C. (2010) Virology: Bornavirus enters the genome. *Nature* **463**: 39–40.
- 24) Matsumoto Y., Hayashi Y., Omori H., Honda T., Daito T., et al. (2012) Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* **11**: 492–503.
- 25) Zong J., Yao X., Yin J., Zhang D., Ma H. (2009) Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* **447**: 29–39.
- 26) Horie M., Kobayashi Y., Honda T., Fujino K., Akasaka T., et al. (2016) An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. *Sci Rep.* **6**: 25873.
- 27) Schneider U., Naegele M., Staeheli P., Schwemmler M. (2003) Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* **77**: 11781–11789.
- 28) Martienssen R. A., Zaratiegui M., Goto D. B. (2005) RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet* **21**: 450–456.
- 29) Maillard P. V., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., et al. (2013) Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* **342**: 235–238.
- 30) Taylor D. J., Leach R. W., Bruenn J. (2010) Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol* **10**: 193.
- 31) Koonin E. V. (2010) Taming of the shrewd: novel eukaryotic genes from RNA viruses. *BMC Biol* **8**: 2.
- 32) Holmes E. C. (2011) The Evolution of Endogenous Viral Elements. *Cell Host Microbe* **10**: 368–377.

## Possible roles of endogenous RNA virus elements in RNA virus infection

Tomoyuki HONDA<sup>1,2), \*</sup>, Keizo TOMONAGA<sup>2)</sup>

1) Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology,

Osaka University Graduate School of Medicine, B7 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

2) Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogo-in, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

\* E-mail: thonda@virus.med.osaka-u.ac.jp

Endogenous bornavirus-like elements (EBLs) are ancient bornavirus-derived sequence in the genomes of eukaryotes. Expression profile of EBLs suggests that, although most of the EBLs in mammalian genomes have lost their coding potential, many of them are transcribed in a cell-type specific or ubiquitous manner. This observation leads us to speculate that EBLs may have functions in their host cells. Here we describe possible functions of EBLs and their evolutionary significance. Our recent studies revealed that EBLs in some mammals, including humans, play critical roles in viral infection as either RNAs or proteins in previously undescribed mechanisms. Considering that species having EBLs in their genomes appear to be relatively resistance to BDV-mediated pathogenesis, endogenization of RNA viruses might be an evolutionarily inevitable event in the adaptation of hosts to the viruses.

