



TITLE:

The Borna disease virus (BoDV) 2 nucleoprotein is a conspecific protein that enhances BoDV-1 RNA-dependent RNA polymerase activity(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kanda, Takehiro

CITATION:

Kanda, Takehiro. The Borna disease virus (BoDV) 2 nucleoprotein is a conspecific protein that enhances BoDV-1 RNA-dependent RNA polymerase activity. 京都大学, 2022, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2022-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k23786>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	神田 雄大
論文題目	<p>The Borna disease virus (BoDV) 2 nucleoprotein is a conspecific protein that enhances BoDV-1 RNA-dependent RNA polymerase activity (ボルナ病ウイルス 2 型のヌcleoプロテインはボルナ病ウイルス 1 型の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を高める同種のタンパク質である)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>マイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) に由来する REVec (RNA virus-based episomal vector) は、細胞核での安全かつ長期的な遺伝子発現が可能な新規 RNA ウイルスベクターである。REVec はアデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクターと比べ、iPS 細胞を含む幹細胞への遺伝子導入効率に優れており、分化誘導後も長期に遺伝子を発現し続けることから、遺伝子治療や再生医療分野での臨床応用が期待されている。</p> <p>REVec は、組換え BoDV-1 の作製技術であるリバースジェネティクス法を用いて培養細胞で合成される。しかしながら、BoDV-1 の転写・複製効率は低く、幹細胞への高い導入効率を示す高力価の REVec を回収するためには、約 2 カ月近く培養を継続する必要があり、この煩雑性が REVec の臨床応用を推進する上で大きな障害となっている。</p> <p>そこで本研究では、REVec 合成にかかわる BoDV-1 リバースジェネティクス法の改良を目的に、ボルナ病ウイルス 2 型 (BoDV-2) 由来タンパク質の性状解析と BoDV-1 リバースジェネティクス法への応用を試みた。</p> <p>BoDV-2 は、BoDV-1 と同じ哺乳類 1 オルソボルナウイルス属に分類されるウイルスであり、BoDV-1 と比べ、培養細胞での迅速な感染伝播が報告されている。BoDV-2 はこれまでに世界で 1 株しか分離報告がなく、その入手は困難であったことから、本研究では、BoDV-2 ゲノム配列の登録情報よりヌcleoプロテイン (N) とリン酸化タンパク質 (P) 遺伝子を人工合成し、発現プラスミドを構築した。</p> <p>まず、BoDV-2 の N および P が BoDV-1 のポリメラーゼ活性に及ぼす影響をミニレプリコンアッセイ法にて検討した。その結果、BoDV-2 の N は BoDV-1 のポリメラーゼ活性を約 8 倍上昇させることが示された。一方、BoDV-2 の P 単独では BoDV-1 のポリメラーゼ活性に影響を及ぼすことができなかったが、BoDV-2 の N と P を両方用いることでポリメラーゼ活性は約 20 倍上昇した。また、BoDV-2 の N と P のアミノ酸配列を BoDV-1 のそれらと比較することで、ポリメラーゼ活性を上昇させる責任残基を同定することに成功した。</p> <p>次に、BoDV-2 の N と P の発現プラスミドを用いたリバースジェネティクスを行い、REVec の回収効率の改善を試みた。その結果、BoDV-2 の N の発現プラスミドを導入した細胞では、極めて迅速な REVec の回収が可能であることが明らかとなった。そこで、REVec のゲノム配列内の N 遺伝子を BoDV-2 の N 遺伝子に置換したキメラ型 REVec (REVec-N2) を作製し、その感染伝播と遺伝子発現効率の検討を行った。その結果、REVec-N2 は、従来の REVec と比べ、約 2 倍の転写効率を示すことが明らかとなった。</p> <p>本研究では、BoDV-2 の N が BoDV-1 のポリメラーゼ活性を顕著に上昇させることを明らかにした。また、BoDV-2 の N の発現プラスミドをヘルパープラスミドとして用いることでリバースジェネティクスによる REVec の回収効率が大幅に改善することを示した。さらに、BoDV-2 の N 遺伝子を持つキメラ型 REVec を作製し、遺伝子発現効率の改善にも成功した。本研究は、BoDVs の転写・複製機構に新たな知見を加えるとともに、REVec の改良によりその実用化にも寄与する意義深い研究である。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>マイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナ病ウイルス 1 型 (BoDV-1) に由来する REVec (RNA virus-based episomal vector) は、導入細胞の核内で安全かつ持続的な遺伝子発現が可能な新規ウイルスベクターである。REVec は、既存のウイルスベクターと比べ、幹細胞への遺伝子導入に優位性を示すことから、幹細胞を用いた遺伝子細胞治療や再生医療における利用が期待されている。一方、効率的な遺伝子導入のための高力価の REVec を調整するためには、リバースジェネティクスを用いて作製した REVec を長期間、培養細胞で継代する必要があり、この煩雑性が REVec の実用化を促進する上で大きな技術的課題となっていた。そこで本論文では、高力価の REVec を効率的に回収する技術的改良を目的に、BoDV-1 の亜型である BoDV-2 に着目して、BoDV-2 由来タンパク質の性状解析を行った。また、得られた知見を REVec 合成のリバースジェネティクスへの応用を試みた。</p> <p>まず申請者は、BoDV-2 のヌcleoプロテイン (N) とリン酸化タンパク質 (P) 遺伝子を人工合成することで発現プラスミドを構築し、BoDV-1 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性に与える影響を解析した。その結果、BoDV-2 由来 N タンパク質が BoDV-1 のポリメラーゼ活性を有意に上昇させることを突き止めた。また、BoDV-2 の N と P タンパク質の両方を用いることで、BoDV-1 のポリメラーゼ活性がより顕著に上昇することを明らかにした。申請者は、BoDV-1 のポリメラーゼ活性を上昇させる BoDV-2 の N と P タンパク質の責任アミノ酸の同定にも成功している。</p> <p>次に、BoDV-2 由来の N と P タンパク質を用いたリバースジェネティクスを行うことで、従来方法と比較して、きわめて迅速に REVec を回収できることを示した。さらに、REVec ゲノム内の N 遺伝子を BoDV-2 由来の N 遺伝子に置換したキメラ型 REVec を作製した結果、キメラ型 REVec は約 2 倍の転写効率を示すことを明らかにした。</p> <p>以上の研究は、RNA ウイルスの転写・複製機構の解明に貢献し、遺伝子細胞治療や再生医療に資する新規 RNA ウイルスベクターの実用化に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 2 月 10 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
<p>要旨公開可能日： 年 月 日以降</p>