

「人類の脅威となりうる新興・再興ボルナウイルス感染症の制御に向けた基盤研究」

京都大学医生物学研究所 教授

朝長 啓造

要旨

ボルナ病ウイルス (BoDV-1) は、ボルナウイルス科に属する一本鎖マイナス鎖の RNA ウイルスである。近年、ドイツにおいて BoDV-1 感染による致死性脳炎が相次いで報告されるとともに、BoDV-1 に近縁で高い致死性を示す新興ボルナウイルスのヒトへの感染も確認され、ボルナウイルス感染症がエマージングリスクとなる可能性が指摘されている。本研究は、いまだ明らかにされていないボルナウイルスの感染受容体の同定ならびに複製に関わる宿主因子の解明を目標に進められた。CRISPR スクリーニングによる解析の結果、BoDV-1 の感染に関与する複数の宿主因子を同定した。ウイルスの細胞侵入にヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が細胞への接着因子として関与し、HSPG ノックアウト細胞では感染効率が顕著に低下することを確認した。また、ウイルス複製と持続感染には宿主因子 ANP32A が不可欠であり、ANP32A は BoDV-1 の L タンパク質と直接相互作用し、複製を促進する役割を持つことを明らかにした。さらに、ANP32A の 28 番目のアルギニン残基が種間での感染感受性を規定することも示された。これらの宿主因子の同定と解析は、新興・再興ボルナウイルス感染症の予防や治療法開発の重要な基盤となることが期待される。

背景・目的

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus 1: BoDV-1) は、ヨーロッパ中部においてウマに脳炎を起こすウイルスとして同定された一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである。BoDV-1 のヒトへの病原性は長い間不明であったが、2018 年、ドイツにおいて同ウイルスに感染した臓器移植ドナーから、レシピエントに伝播し、2 名が急性脳炎により死亡する事例が報告された¹。また、健康人が BoDV-1 感染により急性脳炎を発症し死亡していたことも示された²。さらに、レトロスペクティブな脳組織のスクリーニングにより、原因不明の脳炎で亡くなった患者剖検脳で高率に BoDV-1 が検出されることも報告された³。2022 年にはミュンヘン郊外で 2 人の少年が BoDV-1 感染による急性脳炎で亡くなっている。現在、ドイツでは、年 5-6 名の BoDV-1 脳炎の患者が見つかりことが報告されており、BoDV-1 が病原性因子としてヒト社会に浸透していたことが示された⁴。一方、2015 年に、ドイツで原因不明の髄膜脳炎を起こして亡くなった患者の脳検体から、新型ボルナウイルス (Variegated Squirrel Bornavirus 1: VSBV-1) が発見されている⁵。死亡患者は中米原産のリスを飼育しており、このリスが保有していた VSBV-1 が伝播したものであることが確認され、その後も動物園の飼育員が急性脳炎で亡くなった例も報告された。VSBV-1 はヒトへ致死性が極めて高い人獣共通感染ウイルスであり、野生動物からの伝播に警鐘が鳴らされている。VSBV-1 は主にアジア産の *Callosciurinae* 亜科のリスから検出されており、本邦に近縁の高病原性ボルナウイルスが存在する可能性も示されている。さらに、最新の研究では、中国四川の野生のトガリネズミより BoDV-1 に極めて近縁のボルナウイルスが発見されており、いまだ未知のボルナウイルスが数多く存在することが示唆されている⁶。

そこで本研究では、重篤な病原性が懸念されるボルナウイルスについて、その感染機構と病原性を包括的に明らかにし、新興・再興ボルナウイルス感染症の予防と治療を目指した基盤原理の確立を行うことを目標にした。報告書では、いまだ不明である BoDV-1 の感染受容体（レセプター）の同定および宿主域の決定に関わる宿主因子の検索について報告する。

方法

本研究では、神経指向性を有する BoDV-1 の感染機構の解明を目的として、ウイルスの宿主細胞侵入に関与する受容体や複製に必須な宿主因子の同定を行った。以下に主要な手法と実験系を記す。

1. 感染レセプター候補の探索

BoDV-1 の感染に関わる細胞膜上受容体を探索するため、3つのアプローチを採用した。

1. プロテインマイクロアレイ (HuProt™ Human Proteome Microarray) : BoDV-1 エンベロープ糖タンパク質 (G) と Fc 融合タンパク質 (Fc-GP1) をプローブとして用い、ヒト由来タンパク質との結合解析を行った。
2. メンブレンプロテオームアレイ : ヒト膜タンパク質を網羅的に発現した細胞群に Fc-GP1 を投与し、結合を評価。
3. CRISPR-KO スクリーニング : Cas9 を発現する Vero 細胞および OL 細胞に sgRNA ライブラリーを導入し、ノックアウト (KO) 細胞群を BoDV-1 の G タンパク質をもつ水疱性口内炎ウイルス (VSV) シュードタイプウイルス⁷ 感染させた後、生存細胞の DNA を抽出、NGS 解析により感染に必要な宿主因子を網羅的に同定した。

2. HSPG の関与の評価

メンブレンプロテオームアレイおよび CRISPR スクリーニング結果から、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が BoDV-1 の感染に関与することが示唆された。これを検証するため、HSPG の合成酵素である EXT2 ノックアウト細胞の作製およびヘパリナーゼ処理を行い、BoDV-1 感染効率への影響を定量的に測定した。

3. ANP32A の機能解析

BoDV-1 持続感染の維持およびウイルス複製における ANP32A の役割を明らかにするため、ANP32A-KO 細胞を用いた BoDV-1 感染実験、ミニゲノムアッセイ、免疫沈降 (Co-IP) による BoDV-1 蛋白質 (N、P、L) との相互作用解析を行った。加えて、種間での感染感受性の違いを評価するため、様々な動物由来 ANP32A を発現させた細胞に BoDV-1 を感染させ、感染率を比較した。また、ANP32 ファミリー (A、B、E) の機能代償性と残基 28 番の意義について、変異体の発現実験を通じて検証した。

結果

本研究では、BoDV-1 の感染機構の解明を目的とし、感染レセプターの同定と、複製維持に関与する宿主因子の探索を行った。その結果、BoDV-1 の感染にはヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と宿主タンパク質 ANP32A が重要な役割を果たすことが明らかになった。以下に結果の概要を記載する。

1. BoDV-1 の感染受容体探索の結果

プロテインマイクロアレイおよびメンブレンプロテオームアレイを用いた解析では、GP1-Fc タンパ

ク質と結合する複数の候補タンパク質が検出された。HuProt™マイクロアレイでは、LGALS1、RANKなどがヒットしたが、それぞれの候補分子を過剰発現またはノックアウトしても BoDV-1 の感染効率に明確な影響は認められず、これらの分子は単独ではレセプターとしての機能は否定された。

さらに、メンブレンプロテオームアレイでは、CLEC4M、DC-SIGNR などのレクチンに加え、PVRL4 など他のウイルスの吸着因子としても報告されている分子が GP1 と結合したが、これらの候補遺伝子も単独では感染受容体として機能しないことが、BoDV-1-ΔMG-GFP を用いたノックアウト細胞を用いた感染アッセイで確認された。

2. CRISPR-KO スクリーニングによる宿主因子の同定

Cas9 を発現する Vero 細胞に対してレンチウイルス由来の sgRNA ライブラリーを導入し、BoDV-1 の G タンパク質をもつ VSV シュードタイプウイルスを感染後、10 日目に生き残った細胞群を NGS 解析することで、ウイルス感染に必須な宿主因子候補をスクリーニングした。その結果、BoDV-1 の G タンパク質に特異的に結合する 215 個の遺伝子を同定した。さらに VSV との比較により、特異的な因子の選別が可能となった。その中で、SLC39A9、TMEM165、EXT1、EXTL3、HS2ST1 などヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の合成に関与する因子が多く検出された。そこで、EXT2 をノックアウトした細胞を作製し、GP1-Fc タンパク質の結合と BoDV-1 の感染効率の検討を行った。その結果、EXT2 をノックアウトした細胞には GP1-Fc タンパク質の吸着が見られなくなり、さらに BoDV-1 の感染効率が著しく低下していた (図 1a,b)。また、EXT2 を細胞に再導入することで感染性が回復することが示された。加えて、ヘパリナーゼ処理により HSPG が分解された細胞では、BoDV-1 感染効率が処理濃度依存的に減少することも

示され、BoDV-1 が HSPG を細胞吸着のアタッチメントファクターとして利用していることが確認された。

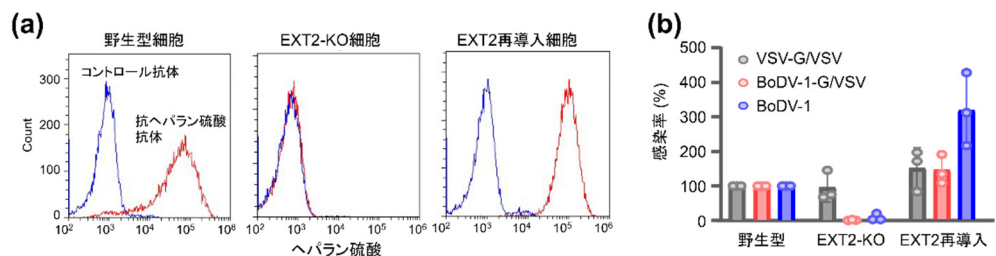


図1. BoDV-1感染におけるHSPGの役割
(a) EXT2ノックアウトによるヘパラン硫酸欠損細胞の作製
(b) ヘパラン硫酸欠損細胞へのBoDV-1の感染

3. HSPG-KO 細胞を用いた CRISPR-KO スクリーニング

他の多くのウイルスでも示されているように、HSPG はウイルス粒子を細胞表面に吸着させ、それを細胞侵入のためのレセプターに受け渡すための役割を担っていると考えられた。そのため、HSPG が発現している細胞では、CRISPR-KO スクリーニングにおいても、HSPG への吸着がドミナントとなり、細胞侵入のレセプターの同定が困難になっていると考えられた。そこで、Cas9 を発現する HSPG 欠損型の Vero 細胞と OL 細胞を作製し、VSV シュードタイプを用いたウイルスレセプターの同定を試みた。Cas9 発現 HSPG 欠損型 Vero 細胞を用いた解析では、アルファウイルスなど多くのウイルスがレセプターとして使用している LDLR が同定されたが⁸、解析の結果、LDLR のコレステロールの産生機能が BoDV-1 の感染に必要であることがわかり、LDLR はボルナウイルスのレセプターではないことが示された。一方、HSPG 欠損 OL 細胞を用いた検討では、上述のメンブレンプロテオームアレイでも同定された分子が同定された。現在、この同定遺伝子についてノックアウト実験や中和実験を行いレセプターとしての機能の確認を行っている。

4. ANP32A の BoDV-1 感染・複製における機能

BoDV-1-ΔMG-GFP 感染 Cas9 発現 OL 細胞を用いた持続感染モデルにおいて、CRISPR-KO スクリーニングを行った結果、ANP32A が BoDV-1 の持続感染および複製に極めて重要な因子であることが明らかとなった。ANP32A は BoDV-1 感染細胞では核内の複製の場である vSPOT と共局在することが示された (図 2a)。また、ANP32A を欠損させた OL 細胞では

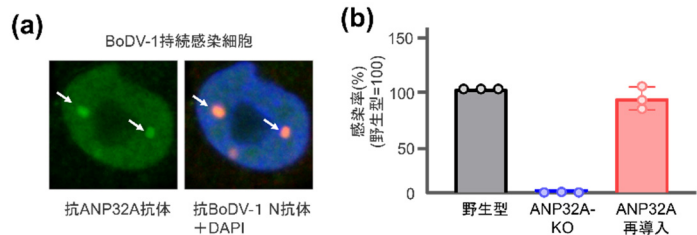


図2. BoDV-1 感染におけるANP32Aの関与
(a) BoDV-1感染細胞核におけるANP32AとBoDV-1の共局在
(b) ANP32A欠損細胞へのBoDV-1の感染

BoDV-1 の感染率が著しく低下し、再導入によってその感染性が回復した (図 2b)。また、BoDV-1 ミニゲノムアッセイでは、ANP32A の存在下でのみでウイルス RNA の合成が観察され、組換え N、P、L タンパク質を用いた免疫沈降実験において、ANP32A が L と直接関与していることが確認された。

5. 種間での ANP32A の機能的違い

BoDV-1 の宿主特異性に関する解析の結果、マウス由来 ANP32A は BoDV-1 感染を十分に支持できず、ヒト由来 ANP32A を導入したマウス細胞において BoDV-1 の感染率が上昇することが確認された (図 3)。一方、BoDV-1 はラット由来の ANP32A を使用できることも示された。これらの結果から、各動物における ANP32A のアミノ酸配列を比較したところ、ANP32A の 28 番目のアルギニン残基が BoDV-1 L タンパク質との相互作用に不可欠であり、この部位の変異が BoDV-1 の感染性を大きく左右することが示された。実際にマウスの ANP32A ノックアウト細胞に、ヒト由来 ANP32A あるいはマウス ANP32A の 28 番目の残基 (リシン) をアルギニンに置換した変異型 ANP32A を導入すると BoDV-1 が感染を認められた。このことから、ANP32A の 28 番目の残基の違いが BoDV-1 の宿主域を決定していると考えられた。

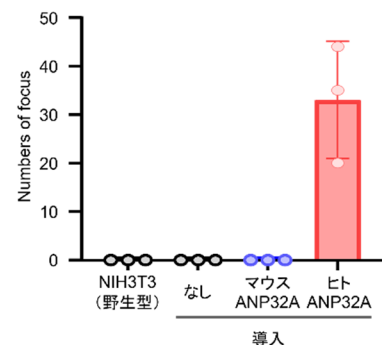


図3. ANP32Aの宿主特異性
ヒト由来ANP32A導入マウスNIH3T3細胞へのBoDV-1の感染

考察

本研究では、BoDV-1 の感染機構解明に向けた複数の網羅的解析により、宿主細胞への侵入過程および持続感染における宿主因子の役割が明らかとなった。特に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) および ANP32A という 2 つの宿主因子の存在が、BoDV-1 の感染および複製の鍵となることが今回の研究から明らかとなった。

BoDV-1 の感染において、HSPG はアタッチメントファクターとして機能しており、ウイルスが初期に細胞表面へ接着する過程に重要な役割を果たしていると考えられた。HSPG がウイルスの細胞への接着に使用されていることは、他の多くのウイルス (SARS-CoV-2、HSV、HIV) においても報告されている⁹。BoDV-1 においても、他のウイルスと同様に HSPG がウイルス粒子の細胞への接着を促進する因子として機能しており、他に存在するいまだ未知の感染レセプターにウイルス粒子を受け渡す役割を担っていると考えられる。例えば、SARS-CoV-2 では、ウイルスのエンベロープタンパク質である S タンパク質と HSPG の結合により、S タンパク質の構造が変化してレセプターである ACE2 への結合が促進

されることが報告されている¹⁰。ヘパリンの添加により BoDV-1 の感染性が向上することも示されている。この観察結果は、BoDV-1 においても SARS-CoV-2 と同様のメカニズムで HSPG が関与していると思われた。本研究では、ヘパラン硫酸の合成酵素のひとつである EXT2 をノックアウトした細胞を作製、この細胞を用いた CRISPR-KO スクリーニングを実施した。これにより、HSPG の関与を排除した細胞での感染レセプターの同定が可能と考えられた。その結果、現在までに BoDV-1 の感染性に影響を与える候補遺伝子のいくつか同定されている。現在、これら遺伝子のノックアウト細胞あるいはタンパク質に良い中和実験を行うことにより、BoDV-1 の感染レセプターとしての役割を検討している。HSPG は多くの細胞で普遍的に発現しており、今回の研究では、BoDV-1 の感染レセプターではないことが示唆される。一方で、BoDV-1 感染の制御において HSPG の構造や発現量を調節することが感染抑制に有効である可能性も示唆された。今後は、感染制御の観点からも HSPG の解析を進める必要があると考える。

本研究において、BoDV-1 の複製と持続感染の維持には ANP32A が極めて重要であることを明らかにすることができた。ANP32A は細胞内において BoDV-1 の L タンパク質と複合体を形成し、ウイルス RNA の複製を促進するシャペロンのような役割を担っていると推測される。このような機能は、インフルエンザウイルスでも報告されていることから¹¹、ANP32 ファミリーが核内で増殖する RNA ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが示唆された。私たちの研究から、ANP32A の 28 番目のアルギニン残基が BoDV-1 の L タンパク質との結合および複製促進に必須であり、さらに宿主間の感受性の違いを規定していることが明らかとなった。これは、ウイルスの宿主域を分子レベルで説明できる重要な発見である。この残基の違いが、BoDV-1 の L との結合にどのような役割や機能を果たしているのかが、ANP32A の BoDV-1 に対する感染促進機序の解明には重要な鍵となると考えられる。今後は、ANP32A と BoDV-1 L の結晶構造について、ドッキングシミュレーションなどの手法にて詳細に解析することで、ANP32A の BoDV-1 複製にかかる分子メカニズムの解明につなげたいと考えている。

BoDV-1 はドイツにおいて毎年数名の急性脳炎を引き起こしていることが報告されている。その感染メカニズムの解明は、神経疾患の病因解明や治療法の開発にも資する可能性がある。今回同定された HSPG やレセプター候補因子、そして ANP32A のような宿主因子を標的としたウイルス感染と複製阻害の方法の開発は、将来的に BoDV-1 感染症の治療あるいは予防につながる可能性がある。また、ANP32A の種特異性の解析は、野生動物におけるボルナウイルス感染リスクの評価、感染拡大の予測、Zoonosis のリスク管理にも応用できると考えられる。

BoDV-1 は細胞傷害性が乏しいにもかかわらず、神経系に持続感染し病態を発揮するというユニークな性質を持つ。今回明らかとなった宿主因子の詳細な解析は、ボルナウイルスがもたらす慢性感染あるいは免疫病態の理解にも大いに寄与すると考えられる。

共同研究者

京都大学医生物学研究所・幹細胞遺伝学分野教授：遊佐宏介

京都大学医生物学研究所・RNA ウイルス分野准教授：牧野晶子

京都大学医生物学研究所・RNA ウイルス分野助教：松郷宙倫

引用論文

- [1] Schlottau K, Forth L, Angstwurm K, et al. Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2018. 379:1377-1379.
- [2] Korn K, Coras R, Bobinger T, et al. Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. *N Engl J Med*. 2018. 379:1375-1377.
- [3] Niller HH, Angstwurm K, Rubbenstroth D, et al. Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect Dis*. 2020. 20(4):467-477.
- [4] Rubbenstroth D, Schlottau K, Schwemmle M, et al. Human bornavirus research: Back on track! *PLoS Pathog*. 2019. 15(8):e1007873.
- [5] Hoffmann B, Tappe D, Höper D, et al. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med*. 2015. 373:154-62.
- [6] Wardeh M, Blagrove MSC, Sharkey KJ, et al. Divide-and-conquer: machine-learning integrates mammalian and viral traits with network features to predict virus-mammal associations. *Nat Commun*. 2021. 12:3954.
- [7] Akiba Y, Matsugo H, Kanda T, et al. A single amino acid substitution in the Borna disease virus glycoprotein enhances the infectivity titer of vesicular stomatitis virus pseudotyped virus by altering membrane fusion activity. *Microbiol Immunol* 2024. 68:381-392.
- [8] Yao S, Li T, Zhang Q, et al. Low-density lipoprotein receptor is required for alphavirus entry. *J Virol*. 2018. 92:e00512-18.
- [9] Chen Y, Zhang J, Wang Z, et al. Heparan sulfate in viral attachment and entry. *Front Mol Biosci*. 2021. 8:659505.
- [10] Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell*. 2020. 183:1043-1057.e15.
- [11] Zhang Z, Dong H, Wang X, et al. Structural basis for ANP32A-dependent influenza virus polymerase host restriction. *Nature*. 2019. 575:377-381.

助成研究に関連した発表論文

- [1] Yanai M, Sakai M, Komorizono R, Makino A, **Tomonaga K**. Stability of Borna disease virus-based episomal vector under physical and chemical stimulation. *Microbiol Immunol*. 66(1):24-30. (2022)
- [2] Kanda T, Sakai M, Makino A, **Tomonaga K**. Exogenous expression of both matrix protein and glycoprotein facilitates the infectious viral particle production of Borna disease virus 1. *J Gen Virol*. 103(7):001767. (2022)
- [3] Tarbouriech N, Chenavier F, Kawasaki J, Bachiri K, Bourhis JM, Legrand P, Freslon L, Roy A, Laurent EMN, Suberbielle E, Ruigrok RWH, **Tomonaga K**, Gonzalez-Dunia D, Horie M, Coyaude E, Crépin T. Borna disease virus 1 phosphoprotein forms a tetramer and in-teracts with host factors involved in DNA double-strand break repair and mRNA processing. *Viruses* 14(11):2358

(2022)

- [4] Yamazaki H, Yamamoto N, Sonoyama T, Nasu S, Maruoka H, Makino A, **Tomonaga K**, N Shigemoto, Ohge H, Fujiwara K, Shinohara S, Takeno S, Omori K, Naito Y. A Multicenter study to investigate the positive rate of SARS-CoV-2 in middle ear and mastoid specimens from otologic surgery patients. *Auris Nasus Larynx* 50(2):285-291. (2023)
- [5] Garcia BCB, Mukai Y, **Tomonaga K**, Horie M. The hidden diversity of ancient bornaviral sequences from X and P genes in vertebrate genomes. *Virus Evol.* 8:vead038 (2023)
- [6] Komorizono R, Fujino K, Kessler S, Runge S, Kanda T, Horie M, Makino A, Rubbenstroth D, **Tomonaga K**. Reverse genetics of parrot bornavirus 4 reveals a unique splicing of the glycoprotein gene that affects viral propagation. *J Virol.* 97(8):e0050923. (2023)
- [7] Akiba Y, Matsugo H, Kanda T, Sakai M, Makino A, **Tomonaga K**. A single amino acid substitution in the Borna disease virus glycoprotein enhances the infectivity titer of vesicular stomatitis virus pseudotyped virus by altering membrane fusion activity. *Microbiol Immunol* 68(11):381-392 (2024)
- [8] Komorizono R, Yoshizumi S, **Tomonaga K**. Development of an RNA virus-based episomal vector with artificial aptazyme for gene silencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 108:491. (2024)
- [9] Kanda T, Dianne Santos PD, Höper D, Beer M, Rubbenstroth D, **Tomonaga K**. Absence of superinfection exclusion of Borna disease virus 2 maintains genomic polymorphisms in persistently infected cells. *npj Viruses* (in press) (2025)