

## 2. ボルナ病ウイルスの持続感染と病態機序に関する研究

朝長 啓造

### 1. はじめに

ウイルス性脳疾患の原因には、種類の異なる様々なウイルスが考えられる。中枢神経系という感染部位の特殊性により、いずれも宿主に重篤な症状を引き起こすことは言うまでもない。最近では、ニパウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスそして西ナイルウイルスなど、新興性のウイルスも多く出現しており、中枢神経系におけるウイルス感染症の予防と制圧は私たちに残された課題であるといえる。神経ウイルスの治療を困難にしている理由は、免疫系による排除が困難なことに加え、多くの神経ウイルスが長期にわたり持続感染し、遅発性に疾患を発症させるためと考えられる。したがって、脳神経細胞における持続感染の成立と遅発性に誘導される病態の機序を理解することは、ウイルス性脳疾患を克服するための必須条件であると考えられる。

ボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) は、脳神経細胞に強い親和性を持つモノネガウイルス目ボルナウイルス科に属する RNA ウイルスである。BDV は、ドイツ南東部で急性脳炎を主徴とするウマの地方病の原因ウイルスとして同定された<sup>1,2)</sup>。しかし、その後ヒトを含む多くの温血動物でも感染が確認されている。わが国においては、ウマやウシなどの家畜そしてイヌやネコなどのペットで、BDV の感染と BDV によると思われる神経疾患が報告されている<sup>3-6)</sup>。ヒトにおける疫学調査では、検査方法によりばらつきが認められるものの、多因子疾患とされる神経・精神障害患者で有意に高い陽性率が確認されている<sup>7,8)</sup>。BDV がヒトに感染していることは世界的なコンセンサスになりつつあるが、その病原性に関してはいまだ謎

に包まれている。人獣共通感染症としての危険性やヒト神経疾患への関与が示唆される現状において、BDV の中枢神経障害性の解明は重要性を増してきている。本稿では、著者らが進めてきた研究の中で、BDV の持続感染機構と病原性に関する研究について概説するとともに、最新の知見もあわせて紹介する。

### 2. ボルナ病ウイルスの性状

BDV は、エンベロープに被われた非分節型のマイナス鎖、一本鎖の RNA をゲノムに持つモノネガウイルスである。Borna とは、ドイツ東部のサクソニー地方にある町の名前である。1885年に、このウイルスによる疫病がこの町のウマで大流行をしたことに由来して名づけられた。BDV は、長年、未分類のウイルスであったが、1994年、ウイルスの全塩基配列が決定され、モノネガウイルス目に属することが判明した<sup>9)</sup>。しかし、複製の場が核であることなど、他の動物由来モノネガウイルスとは異なる性状を示すことから、新しくボルナウイルス科が設けられた。現在、ボルナウイルス科はボルナ病ウイルス 1 種のみである。

BDV のゲノムは約 8.9kb からなり、両末端には転写や複製に必須である約 30~50 ベースの非翻訳領域がコードされている。ゲノム内には、3 つの転写開始配列と 5 つの転写終始配列が確認されている。また、5 つのスプライシング関連配列がある (図 1)<sup>10)</sup>。現在、ゲノム内には少なくとも 6 つの蛋白質がコードされていると考えられている<sup>10)</sup>。Nucleoprotein (N 蛋白質) と phosphoprotein (P 蛋白質) は、ウイルスゲノムの核輸送ならびに転写・複製に必須な蛋白質であると考えられている。X 蛋白質は、その詳細な機能については不明であるが、ウイルスの転写・複製にあたり、N および P 蛋白質の機能補助に働くものと思われる。Matrix (M 蛋白質) および envelope (G 蛋白質) はそれぞれウイルス粒子を形成する構造蛋白質である。G 蛋白質には糖が付加されており、中和抗体を誘導する。Polymerase (L 蛋白質) は、ウイルスゲノムの転写・複製に必須な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである。

BDV は神経親和性のウイルスである。培養細胞を用いた実験では、非細胞障害性に感染し、感染細胞は見た目

大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野  
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1)

The mechanism of persistent infection and pathogenesis  
of Borna disease virus

Keizo Tomonaga

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

TEL: 06-6879-8308

FAX: 06-6879-8310

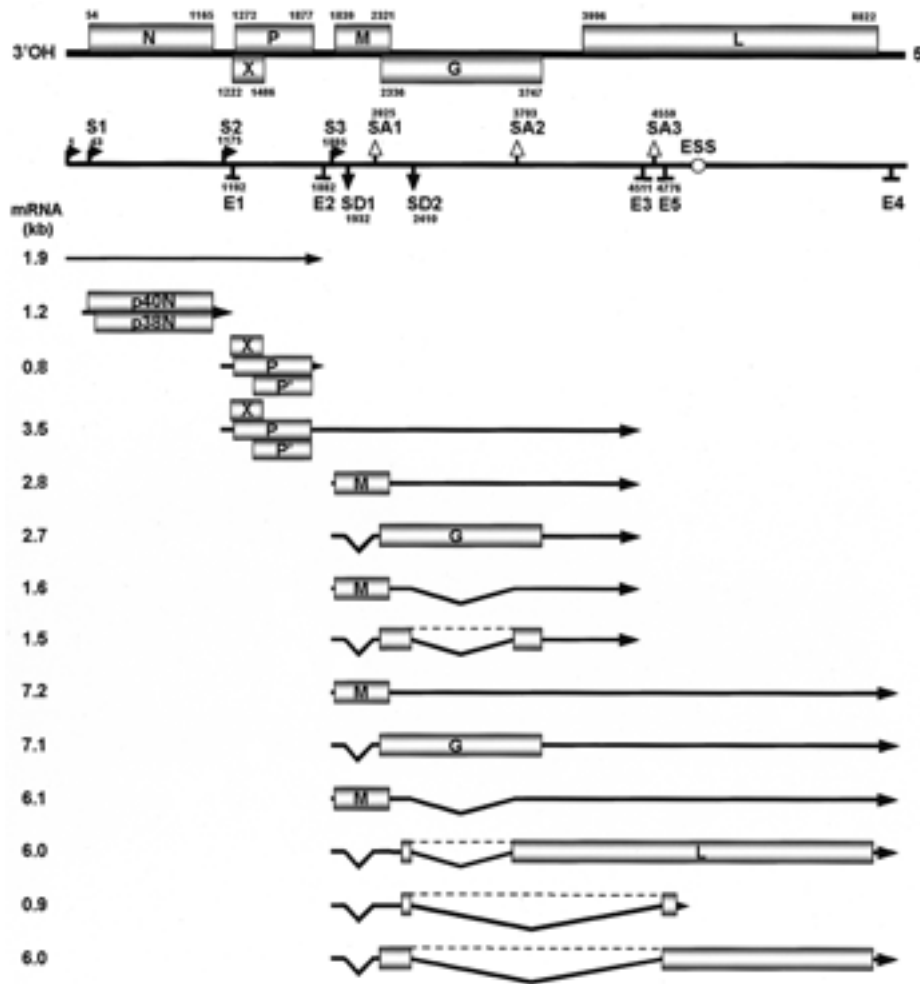


図1 BDVの遺伝子構造と転写産物  
 S：転写開始シグナル，E：転写終結シグナル，SD/SA：スプライシング関連シグナル，  
 ESS：スプライシング抑制配列

非感染の細胞と変わりはない．さらに，細胞からのウイルス粒子の放出が微量であるのもBDV感染の特徴である．これら培養細胞における性状は，脳内でのBDVの感染状態を反映しているものと思われる．事実，実験感染ラットでは，BDVは神経細胞を破壊せずに長期にわたる持続感染を成立させる．

### 3. BDVの転写複製機構

BDVは，核内で転写・複製をおこなうという動物由来のモノネガウイルスの中では極めてユニークな特徴を持っている．また，1つのmRNA上にいくつもの翻訳開始点をもつ polycistronic な転写産物の発現を行うのもBDVの特徴である(図1)．N蛋白質(p40N)をコードしているmRNAからは，その翻訳開始が塩基にして39ベース下流から始まる38kDaの isoform, p38Nが産生されている<sup>11)</sup>．M,GそしてL蛋白質をコードするmRNAも polycistronic なmRNAとして転写される<sup>12,13)</sup>(図1)．さらに，BDV

mRNAの中で一番小さな0.8kbのmRNAも，XおよびP蛋白質の2つのオープン・リーディング・フレームをコードしている．著者らは，BDVの増殖機構を明らかにすることを目的に，転写産物の詳細な解析を行ってきた．その中で，0.8kbのmRNAからは，XおよびP蛋白質に加え，16kDaの新たな蛋白質(P'蛋白質)が産生されていることを発見した<sup>14,15)</sup>．解析の結果，16kDaの蛋白質は，P蛋白質と同じフレーム上にあり，3番目のAUGコドンから翻訳される蛋白質であった(図2)．P'蛋白質の機能は不明であるが，核内で他のウイルス蛋白質と共局在することから，ウイルスの転写あるいは増殖に関与していると思われる．さらに，0.8kb mRNAから発現される蛋白質の翻訳効率を調べた結果，mRNAの5'末端にある非翻訳領域(5'-UTR)がX蛋白質の翻訳に重要な役割を果たしていることが明らかとなった<sup>14)</sup>．面白いことに，開始コドンが一番上流にあるX蛋白質の翻訳開始点周囲の配列(PuNNAUG, prevalence of >90%)は，下流のP蛋白質

のそれ (PyNNAUGPu, prevalence of < 5 %) よりも優勢であると考えられた。にもかかわらず、感染初期には、X 蛋白質の発現が P 蛋白質の発現に比べて少ないという現象を著者らは見つけている<sup>16)</sup>。このことは、感染初期に X 蛋白質の翻訳を抑制する何らかの機構が働いていることを

示している。X 蛋白質の発現は、BDV の持続感染成立に関与している可能性があり (後述)、現在、X 蛋白質の翻訳調節機構を 5'-UTR と宿主因子の相互作用を中心に解析を進めている。

一方、核内で転写を行うウイルスの多くは RNA スプライシング機構を用いて転写産物の発現調節を行っている。BDV も RNA スプライシング機構により、mRNA の発現を行っていることが明らかとなっている<sup>17,18)</sup>。著者らは、BDV のスプライシング様式を解析することにより、ゲノム上に新たな 3' スプライス部位 (SA3) を発見した (図 1)<sup>19,20)</sup>。BDV 感染細胞ならびに感染ラットの脳を使って詳しく調べた結果、BDV はゲノム上の異なるスプライス部位を選択的に認識する選択的 RNA スプライシング機構を用いて mRNA の発現を行っていることが明らかとなった (図 1)。さらに著者らは、スプライシング部位の選択には、SA3 の下流に存在するスプライシング抑制配列 (ESS) と転写終結シグナル (E5) が関与している可能性を示し (図 3)、BDV が増殖ステージ特異的に転写産物の発現調節を行っていることを明らかにした<sup>19)</sup>。以上の結果より、BDV は他のマイナス鎖 RNA ウイルスでは見られないユニークで複雑な転写・翻訳機構を用いて、比較的短いゲノムを効率良く利用していると考えられた。

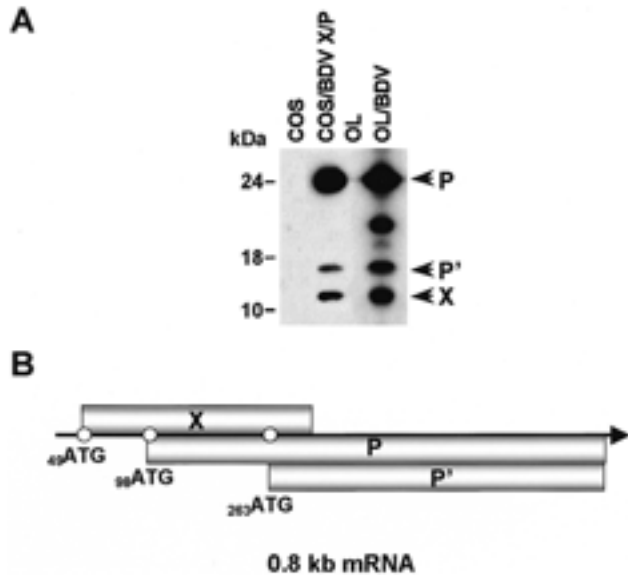


図 2 BDV 0.8kb mRNA の翻訳機構  
(A) 0.8kb mRNA と相同な cDNA を導入した COS 細胞と BDV 持続感染 OL 細胞では、X と P 蛋白質に加え 16kDa の P' 蛋白質が確認される。

#### 4. BDV の持続感染機構

BDV が核内で複製するとともに、安定した持続感染を成立させるためには、ウイルス蛋白質の発現レベルと細胞

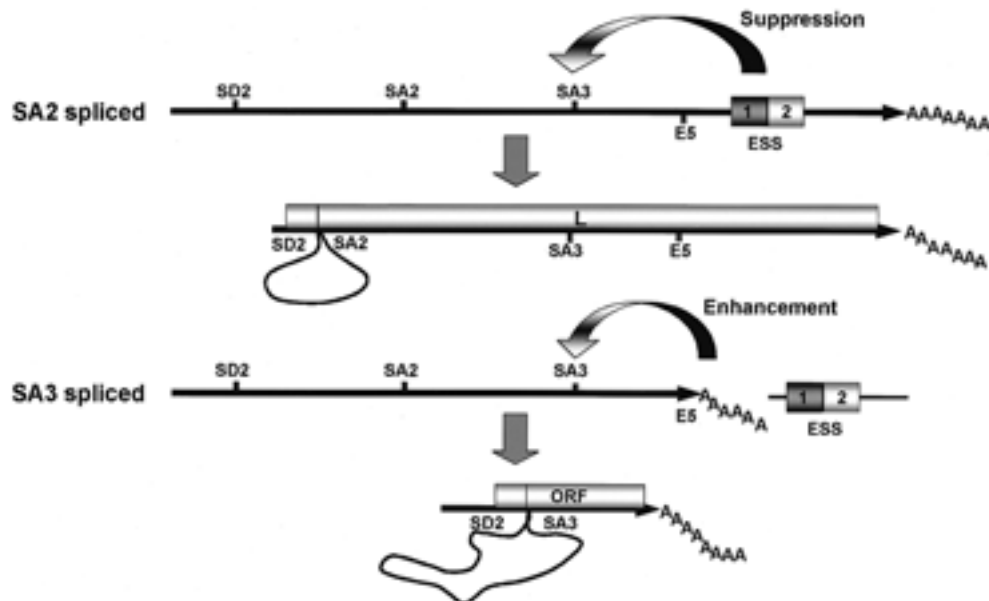


図 3 BDV の選択的スプライシング調節機構  
E5 で転写が終結しない転写産物にはスプライシング抑制配列 (ESS) が含まれており、SA3 を利用するスプライシングが抑制される。その結果、L 蛋白質が発現される。一方、E5 で転写が終結するものには ESS が含まれておらず、効率的に SA3 スプライシングを起こす。

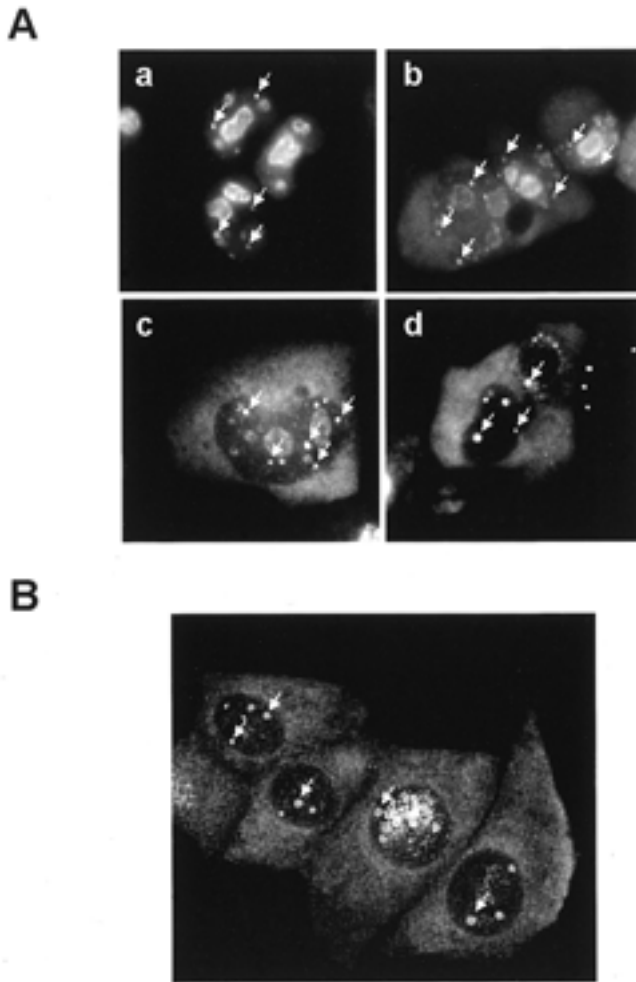


図4 BDV P蛋白質の細胞内局在の変化

(A) a, 感染初期には核内にドット状構造物(矢印)として観察される。b, 時間経過とともにウイルス蛋白質は細胞質へと移行する。c and d, 持続感染期と思われる細胞では、ウイルス蛋白質は細胞質に豊富に局在するようになる。抗BDV P抗体とKi67抗体(核染色)の2重染色像。(B) BDV持続感染MDCK細胞。

内局在を効率良く制御する必要がある。BDVを神経系由来の培養細胞に感染させると、感染初期には主要抗原(NおよびP蛋白質)が核内にドット状の構造物として観察される(図4Aa)。このドット状の構造物はBDVのゲノムを含み、転写・複製の中心であると考えられている。やがて、BDV蛋白質はドット状の構造物を残したまま、核内に広く認められるようになる。さらに観察を続けると、抗原は細胞質へと広がり(図4Ab)、最終的には、核内のドット構造と細胞質内に限局された局在を示すようになる(図4Ac and Ad)。BDVが持続感染している培養細胞では、多くの細胞がウイルス抗原を細胞質に豊富に含むことから(図4B)、BDV蛋白質の細胞質内局在が持続感染の成立と深く関わっているのではないかと考えている。そこで、著者らはBDVの主要抗原であるN、PおよびX蛋白

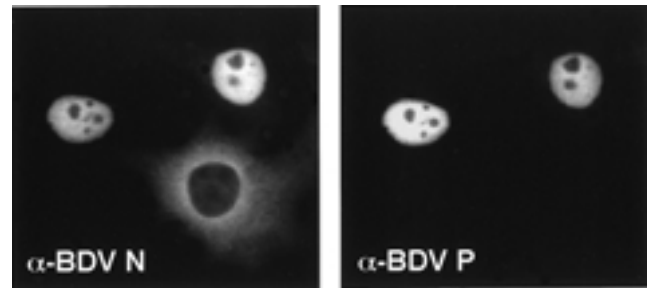


図5 P蛋白質によるN蛋白質の核外輸送の阻害

PとN蛋白質(p38N)ともに発現している細胞では、N蛋白質の核外輸送が抑制されている。

質の相互作用による発現調節と細胞内局在の変化について解析を行った。これまでの研究により、これらの蛋白質は、それぞれが核移行シグナル(NLS)を持ち、単独で核内局在を示すことがわかっている<sup>21-23)</sup>。また、細胞内では相互に結合していることも明らかとなっている<sup>24)</sup>。しかし、先に示したように、持続感染細胞ではウイルス蛋白質は細胞質に多く局在している。そこで、著者らはN蛋白質の細胞内局在について詳細な検討を行った。様々なN蛋白質の変異体を作成して解析を行った結果、N蛋白質は核移行能に加え、核外輸送能も有することが明らかとなり、ロイシンとイソロイシンに富んだ典型的な核外輸送シグナル(NES)が同定された<sup>25)</sup>。p38Nの核外輸送がレプトマイシンBで阻害されたことより、N蛋白質の核外輸送には、輸送因子であるCRM1(exportin1)が関与していると考えられた。また、面白いことに、N蛋白質のNES領域はP蛋白質との結合領域と厳密に重なっており、P蛋白質の存在下ではN蛋白質の核外輸送が顕著に阻害されることも確かめられた(図5)。先にも述べたが、N蛋白質にはp40Nとp38Nの2つのisoformがある。今回の解析より、p38NはNLS領域が欠損しており、NESのみを保持する蛋白質であることも確かめられた。

次に、著者らはもうひとつの主要抗原であるX蛋白質に注目して、その発現意義の追究を行った。X蛋白質はP蛋白質と同じmRNAから翻訳されている。そこで、P蛋白質の細胞内局在をX蛋白質の発現下において詳細に観察した。その結果、単独で核内局在を示すP蛋白質は、X蛋白質の存在下においてのみ細胞質内局在を示すことが明らかとなった<sup>16)</sup>。互いへの結合領域を欠損している変異体では、P蛋白質が核内局在を示したことより、P蛋白質はX蛋白質と結合することによりはじめて細胞質に局在することが明らかとなった。P蛋白質のNLS領域は、X蛋白質結合により覆い隠されていないことから、X蛋白質との結合によるP蛋白質の構造的変化が、P蛋白質の細胞内局在に関与していると考えられた。興味深いことに、感染細胞において核内にP蛋白質が局在している細胞では、X蛋白質の発現が認められないことも明らかとなった<sup>16)</sup>。こ

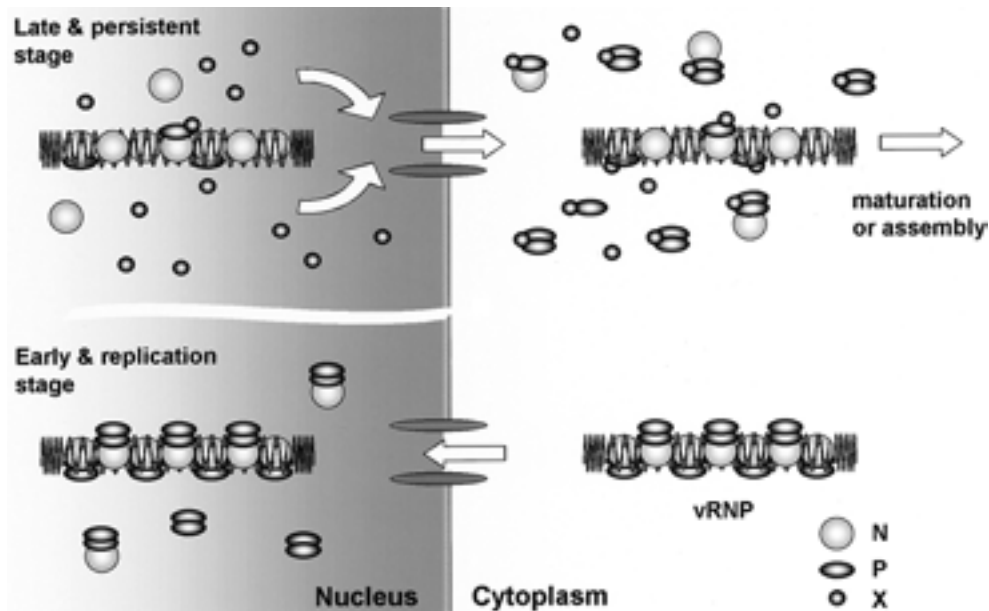


図6 BDVの核輸送機構

のことは、同じ mRNA から発現されている2つの蛋白質間に厳密な翻訳調節があることを示している。事実、0.8kb mRNA に相応な cDNA を細胞に導入すると、時間経過とともに X 蛋白質の発現が上昇することも確かめられている。

N および P 蛋白質はウイルスの複製本体である蛋白質-核酸複合体 (vRNP) を構成する主要因子である。これまでの結果は、ウイルスの複製と持続感染の成立には、細胞内でのウイルス蛋白質の発現レベルの厳密な制御が重要であることを示している。著者らは、核内での P 蛋白質レベルがウイルス複製と持続感染を決定しているのではないかと考えている。感染初期には、P 蛋白質は N 蛋白質とともに vRNP を核内に留め、転写・複製を促す (図6)。一方、核内での複製レベルが閾値に達すると、X 蛋白質の発現量が増加し、核内の P 蛋白質の濃度を低下させ、複製レベルを制御する (図6)。それと同時に、N 蛋白質と協調して新たに作られた vRNP を細胞質に運び、ウイルス粒子の成熟を助けている (図6)、と考えている。このことから、核内での P 蛋白質レベルの低下、あるいは細胞質内での P 蛋白質の蓄積が持続感染成立の必須条件であると予想される。この仮説は、培養細胞で見られたウイルス蛋白質の発現レベルと細胞内局在の変化とよく一致している。さらに、BDV 持続感染細胞では、N 蛋白質に対する P 蛋白質の量比が著しく高い<sup>26)</sup>こともこの仮説を支持している。

最近の報告により、N、P あるいは X 蛋白質を過剰発現させた細胞では、ウイルスの増殖が抑制されることが示されている<sup>27)</sup>。また、著者らは、ウイルス増殖が低下している細胞においても、ゲノム RNA は安定に維持されている

ことも明らかにしている<sup>28)</sup>。脳内における BDV の持続感染機構を解明するためには、ウイルス蛋白質の転写・翻訳制御をより詳細に明らかにするとともに、持続感染状態でのゲノム RNA の安定化機序の解明が必要であると考えられる。

## 5. BDV 持続感染による病態

ボルナ病 (BD) は、長い間、ドイツ南東部を中心とする地域のウマに発生する地方病であると考えられていた<sup>1,29)</sup>。しかし、近年の疫学調査の結果、BDV の感染は世界中に広がっており、ヒトを含む多くの温血動物に認められることが確かめられている<sup>2,30)</sup>。わが国においては、BD を発症したウマ、ウシそしてイヌが発見されている<sup>3-5)</sup>。また、統合失調症患者の剖検脳より BDV の分離も報告されている<sup>31)</sup>。

ウマにおける BDV 感染症には急性型と慢性型がある。急性型 BD では、数週間から数ヶ月間の潜伏期の後に、微熱、軽度の行動異常、過敏、無関心などの症状が認められ、次第に痙攣、興奮、無動、麻痺などを呈した後、全身麻痺に陥り、その約80%が死亡する。脳は組織学的に散在性の非化膿性髄膜脳脊髄炎像を示す。また、大型の神経細胞内には特徴的な好酸性の核内封入体が認められる。一方、慢性型では、特別な病理組織学的病変は認められない。しかし、最近の調査の結果、原因不明の運動器障害を伴ったウマやネコでは BDV の陽性率が高く、このような動物において中枢神経系での持続感染が高率に認められることが示されている。

実験動物 (ラット、マウス、スナネズミ) への感染では、BDV は明らかな神経病原性を示す<sup>8,32)</sup>。成ラットへの感染

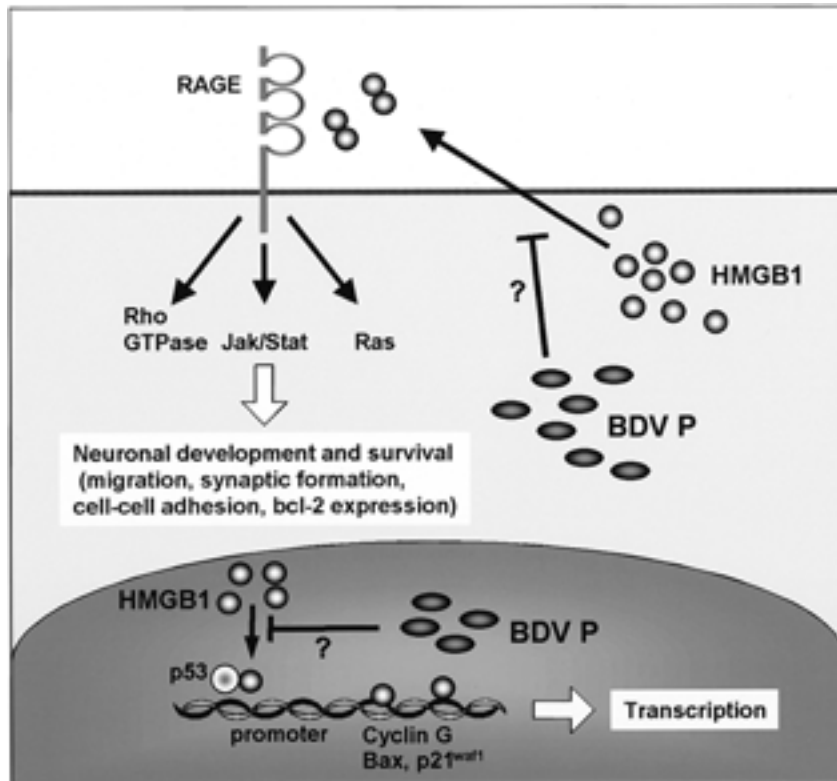


図7 P蛋白質によるHMGB1の機能阻害

HMGB1は細胞外に放出され、受容体であるRAGEと結合する。同時に、核内で転写因子やDNAと結合することで転写活性化にも関与している。P蛋白質はHMGB1と結合して、HMGB1の細胞外への放出もしくはRAGEとの結合、ならびに核内のHMGB1と転写因子との結合を阻害していると考えられる。

では、細胞性免疫が誘導され、ウマの急性型BDに類似した髄膜脳炎を発症する。しかし、炎症反応によってもBDVは完全に排除されることなく、宿主免疫からの攻撃を回避し、脳内で長期的な持続感染を成立させる<sup>33)</sup>。感染成ラットは、BDVの持続感染により運動器障害などの神経症状を発症する。一方、免疫系が未成熟な新生仔ラットでは、感染によっても免疫組織学的な病変は示さない<sup>32)</sup>。しかし、成熟後は、新生仔ラットに顕著な脳の低形成、特に小脳や海馬の神経細胞や顆粒層の脱落を引き起こし、その結果として、社会行動、攻撃性、学習能力そして多動などの情動行動の異常を誘導する<sup>34)</sup>。米国では、BDV感染新生仔ラットを自閉症のモデルとして研究が進められている<sup>35)</sup>。新生仔スナネズミへの感染においても、BDVは細胞性免疫を誘導せずに神経症状を引き起こす。著者らは、新生仔スナネズミが神経細胞の破壊を伴わない急性の致死性症状を起こすことを明らかにするとともに、神経症状の発症には、脳内特定部位（小脳プルキンエ細胞、脳幹）でのウイルスの増殖と脳内サイトカイン（IL-1 $\beta$ ）の発現が関与していることを示している<sup>36~38)</sup>。これら実験動物での結果は、BDVの持続感染が免疫応答非依存的に神経細

胞の破壊や機能異常を誘導することを示している。

## 6. 中枢神経系障害性の発症機序

BDV持続感染はどのような機序で神経病原性を誘導するのだろうか。著者らは、その機序を探る目的で、持続感染期に発現が増大するP蛋白質と結合する宿主因子の同定を行った。その結果、P蛋白質はHigh mobility group box protein 1（HMGB1あるいはamphoterin）と呼ばれる蛋白質と特異的に結合していることが判明した<sup>39)</sup>。HMGB1は、胎生期から成熟期の脳で高い発現が認められる神経突起伸長促進因子である。HMGB1は細胞外に放出されることで、受容体であるRAGE（receptor for advanced glycation end products）と結合し、その機能を発揮している（図7）<sup>40)</sup>。著者らの解析により、BDVを感染させた神経系細胞では、HMGB1の作用である神経突起伸長能や細胞遊走能の低下が認められた（図8）。また、BDV感染細胞ではHMGB1によるRAGE発現の低下が見られたことから、P蛋白質はHMGB1の細胞外への放出あるいはRAGEとの結合を直接阻害しているものと考えられた（図7）。HMGB1とRAGEの結合は、低分子G蛋白質であ

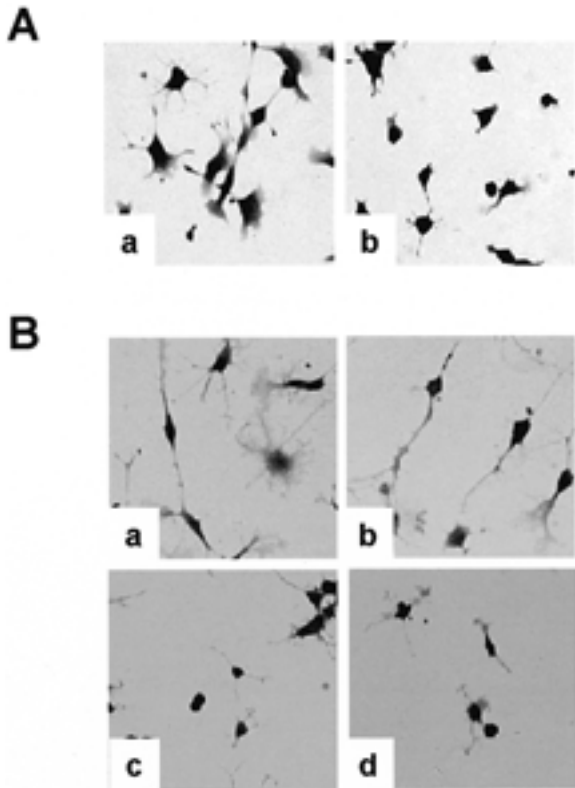


図8 P蛋白質による細胞突起伸長の抑制

(A) BDVが持続感染しているC6細胞(b)では、一定時間における細胞突起の伸長能に低下が見られる。(B) 非感染細胞の上清に精製P蛋白質(c)と抗HMGB1抗体(d)を添加し、細胞突起の伸長を観察した。

るCdc42やRacの活性化やRasシグナルおよびJak/Stat伝達系の活性化を引き起こすことが知られている(図7)<sup>41)</sup>。これらの活性化は、脳内では神経細胞のストレスに対する生存維持やシナプス形成に関与していると考えられ、P蛋白質によるこれらHMGB1機能の障害がBDVの中枢神経系障害性に関与している可能性も考えられる。実際に、著者らはBDV持続感染細胞において、熱処理などのストレスによる細胞骨格の早期崩壊と回復遅延を観察している。

細胞外でのRAGEとの結合の他に、HMGB1は核内においても重要な機能を果たしている。HMGB1は、転写因子などの宿主因子(p53, Hox, Pou, Oct, steroid hormone receptors, TATA-binding proteinなど)と結合することにより、それら因子のDNAへの結合を促進している(図7)<sup>42)</sup>。また、DNAに直接働いてDNAの高次構造を転写反応の最適構造に変化させる働きも持っている。著者らは、P蛋白質とHMGB1の結合部位の同定を行い、細胞内におけるP蛋白質とHMGB1の結合が、HMGB1とがん抑制因子p53との結合を競合阻害していることを明らかにした<sup>43)</sup>。さらに、P蛋白質の発現により、p53によるCyclin G1やp21<sup>waf1</sup>の転写活性化の低下も観察された。一方、フランスのHansらは、BDV持続感染細胞では、継続的なERK1/2伝達系の活性化が起こっているものの、活性化したERKの核内移行が抑制されていることを示している<sup>44)</sup>。これらの結果は、BDV持続感染によるP蛋白質の

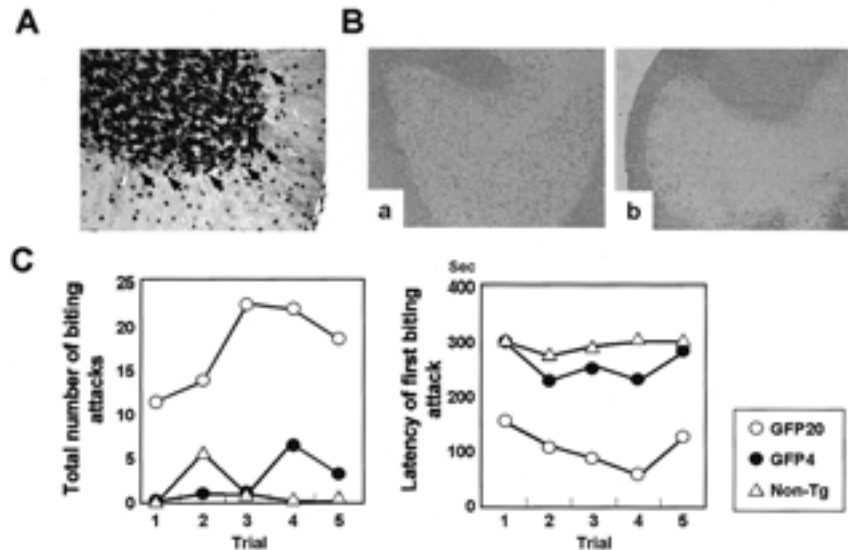


図9 P蛋白質発現トランスジェニックマウスの解析

(A) 小脳におけるP蛋白質の発現(矢印:P蛋白質発現パーグマングリア細胞、8ヶ月齢)(B) シナプス数の減少。小脳領域のシナプトフィジン染色(8ヶ月齢)a、トランスジェニックマウス、b、対照群。(C) 雄間の攻撃性の上昇。GFP20:P高発現トランスジェニックマウス、GFP4:P低発現トランスジェニックマウス、Non-Tg:対照群。P高発現マウスでは、一定時間における攻撃回数(左)の増加と最初に攻撃するまでの時間(右)の短縮が見られる。

発現が、細胞のあらゆる生存維持機能に影響を与えている可能性を示している。

さらに、著者らはP蛋白質と中枢神経系障害性の関連性を探るために、P蛋白質をグリア細胞に発現するトランスジェニックマウスの確立を行った。その結果、胎生期よりP蛋白質を発現しているトランスジェニックマウスでは、約4ヶ月齢より、雄間の攻撃性の上昇、空間記憶能力の低下あるいは多動などの神経症状を示すことが明らかとなった<sup>45)</sup>。行動異常を示しているマウスの脳内を詳細に解析した結果、神経栄養因子であるBDNFの低下やセロトニンレセプターの発現異常とともに、顕著なシナプス数の減少が観察された(図9)。また、神経細胞死やグリア細胞の活性化などは観察されなかったことより、P蛋白質発現トランスジェニックマウスの神経症状は、グリア細胞の機能的障害によるものではないかと考えられた。今回の解析では、残念ながら、トランスジェニックマウス脳内でのHMGB1の機能障害は確認できなかった。しかし、著者らが新生仔ラットを用いて行った解析では、BDVの持続感染によりHMGB1の受容体であるRAGEの脳内発現が顕著に低下していた<sup>46)</sup>。このことは、BDV持続感染脳内におけるHMGB1の細胞外への発現抑制を示すものなのかもしれない。

これまでの研究で見えてきたことは、BDVの持続感染は、神経細胞あるいはグリア細胞を直接的には破壊しないものの、それらの生存維持に関与する機能に異常を起こすのではないかとということである。これまでの著者らの観察では、その機序にP蛋白質が深く関与していることを示唆している。BDVの中枢神経病原性の本質は、持続感染期における脳内でのP蛋白質の蓄積とも考えられる。今後は、感染脳内におけるP蛋白質の動態とHMGB1の機能異常についてより詳しく解析していく必要があると思われる。

BDVの持続感染により、脳神経細胞の機能的な脆弱化が起こるのは間違いないだろう。しかし、自然感染において、その脆弱化が神経症状にどのように関わっているのかは明らかではない。多くの神経・精神疾患が多因子性疾患であることを考えると、BDV持続感染による神経細胞の脆弱化が他の負荷因子と重なったときにはじめて神経症状として現れてくるとも考えられる。近年の脳神経科学の急進や神経疾患の病因解明を見ていると、ウイルス性脳疾患の発症にも複合因子が絡んでいることは想像に難くない。今後は、持続感染をキーワードにその複合因子を紐解く作業を積極的に展開していきたいと考える。

## 7. 謝 辞

本稿は、平成14年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞の受賞内容の一部を基にまとめたものであります。受賞対象となった研究は、北海道大学免疫科学研究所(現・遺伝子病制

御研究所)・血清学部門、大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野(生田和良教授)で行われたものです。杉浦奨励賞受賞にご推薦いただいた大阪大学微生物病研究所・生田和良教授、大阪大学医学部・山西弘一教授、日本大学生物資源科学部・見上彪教授に心より深謝いたします。本研究は、多くの先生方そして学生のご指導・ご協力によって成し遂げられたものであります。あらためましてここでお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Ludwig, H. and Bode, L.(2000). Borna disease virus : new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* **19** : 259-288.
- 2) Tomonaga, K. and Carbone, K. M.(2002). Borna disease virus : spanning a century of science. In "Borna disease virus and its role in neurobehavioral diseases"(K. M. Carbone, Ed.), pp.1-21. ASM press, Washington, DC.
- 3) Taniyama, H., Okamoto, M., Hirayama, K., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Kamitani, W., Tsunoda, N. and Ikuta, K.(2001). Equine Borna disease in Japan. *Vet. Rec.* **148** : 480-482.
- 4) Okamoto, M., Furuoka, H., Hagiwara, K., Kamitani, W., Kirisawa, R., Ikuta, K. and Taniyama, H.(2002). Borna disease in a heifer in Japan. *Vet. Rec.* **150** : 16-18.
- 5) Okamoto, M., Kagawa, Y., Kamitani, W., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K. and Taniyama, H.(2002). Borna disease in a dog in Japan. *J. Comp. Pathol.* **126** : 312-317.
- 6) Nakamura, Y., Watanabe, M., Kamitani, W., Taniyama, H., Nakaya, T., Nishimura, Y., Tsujimoto, H., Machida, S. and Ikuta, K.(1999). High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet. Microbiol.* **70** : 153-169.
- 7) Ikuta, K., Ibrahim, M. S., Kobayashi, T. and Tomonaga, K.(2002). Borna disease virus and infection in humans. *Front. Biosci.* **7** : D470-495.
- 8) Jordan, I. and Lipkin, W. I.(2001). Borna disease virus. *Rev. Med. Virol.* **11** : 37-57.
- 9) de la Torre, J. C.(1994). Molecular biology of Borna disease virus : prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* **68** : 7669-7675.
- 10) Tomonaga, K., Kobayashi, T. and Ikuta, K.(2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes. Infect.* **4** : 491-500.
- 11) Pyper, J. M. and Gartner, A. E.(1997). Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J. Virol.* **71** : 5133-5139.
- 12) Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F. A. and de la Torre, J. C.(1997). Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J. Virol.* **71** : 3208-3218.
- 13) Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N. and Lipkin, W. I.(2000). Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J. Virol.* **74** : 4425-4428.



- 14) Kobayashi, T., Watanabe, M., Kamitani, W., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2000). Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus : a 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* **277** : 296–305.
- 15) Watanabe, M., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2000). Antibodies to Borna disease virus in infected adult rats : an early appearance of anti-p10 antibody and recognition of novel virus-specific proteins in infected animal brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* **62** : 775–778.
- 16) Kobayashi, T., Zhang, G., Lee, B. J., Baba, S., Yamashita, M., Kamitani, W., Yanai, H., Tomonaga, K. and Ikuta, K. Modulation of nuclear localization of Borna disease virus phosphoprotein by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame. *J. Virol.* (in press).
- 17) Cubitt, B., Oldstone, C., Valcarcel, J. and Carlos de la Torre, J. (1994). 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.
- 18) Schneider, P. A., Schneemann, A. and Lipkin, W. I. (1994). RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68** : 5007–5012.
- 19) Tomonaga, K., Kobayashi, T., Lee, B. J., Watanabe, M., Kamitani, W. and Ikuta, K. (2000). Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 12788–12793.
- 20) Cubitt, B., Ly, C. and de la Torre, J. C. (2001). Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **82** : 641–646.
- 21) Shoya, Y., Kobayashi, T., Koda, T., Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M. (1998). Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J. Virol.* **72** : 9755–9762.
- 22) Kobayashi, T., Shoya, Y., Koda, T., Takashima, I., Lai, P. K., Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M. (1998). Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* **243** : 188–197.
- 23) Wolff, T., Unterstab, G., Heins, G., Richt, J. A. and Kann, M. (2002). Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the Borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J. Biol. Chem.* **277** : 12151–12157.
- 24) Schwemmle, M., Salvatore, M., Shi, L., Richt, J., Lee, C. H. and Lipkin, W. I. (1998). Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J. Biol. Chem.* **273** : 9007–9012.
- 25) Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2001). Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J. Virol.* **75** : 3404–3412.
- 26) Watanabe, M., Zhong, Q., Kobayashi, T., Kamitani, W., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2000). Molecular ratio between Borna disease viral-p40 and-p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol. Immunol.* **44** : 765–772.
- 27) Geib, T., Sauder, C., Venturelli, S., Hassler, C., Staeheli, P. and Schwemmle, M. (2003). Selective virus resistance conferred by expression of Borna disease virus nucleocapsid components. *J. Virol.* **77** : 4283–4290.
- 28) Ibrahim, M. S., Watanabe, M., Palacios, J. A., Kamitani, W., Komoto, S., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2002). Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendrogloma cell line. *J. Virol.* **76** : 3873–3880.
- 29) Rott, R. and Becht, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190** : 17–30.
- 30) Ikuta, K., Hagiwara, K., Taniyama, H. and Nowotny, N. (2002). Epidemiology and infection of natural animal hosts. *In* “Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease” (K. M. Carbone, Ed.), pp. 87–123. ASM press, Washington, DC.
- 31) Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torre, J. C. and Ikuta, K. (2000). Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J. Virol.* **74** : 4601–4611.
- 32) Pletnikov, M. V., Gonzalez-Dunia, D. and Stitz, L. (2002). Experimental infection : pathogenesis of neurobehavioral disease. *In* “Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease” (K. M. Carbone, Ed.), pp. 125–178. ASM press, Washington, DC.
- 33) Hornig, M., Solbrig, M., Horscroft, N., Weissenbock, H. and Lipkin, W. I. (2001). Borna disease virus infection of adult and neonatal rats : models for neuropsychiatric disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253** : 157–177.
- 34) Hornig, M., Weissenbock, H., Horscroft, N. and Lipkin, W. I. (1999). An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 12102–12107.
- 35) Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Vasudevan, K., Moran, T. H. and Carbone, K. M. (1999). Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats : a model of autism. *Behav. Brain Res.* **100** : 43–50.
- 36) Watanabe, M., Lee, B. J., Kamitani, W., Kobayashi, T., Taniyama, H., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2001). Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally Borna disease virus-infected gerbils. *Virology* **282** : 65–76.
- 37) Watanabe, M., Lee, B. J., Yamashita, M., Kamitani, W., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2003). Borna disease virus induces acute fatal neurological disorders in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions. *Virology* **310** : 245–253.
- 38) Lee, B. J., Watanabe, M., Yamashita, M., Kamitani, W., Kobayashi, T., Tomonaga, K. and Ikuta, K. Age- and

- host-dependent control of lethal Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. (submitted).
- 39) Kamitani, W., Shoya, Y., Kobayashi, T., Watanabe, M., Lee, B. J., Zhang, G., Tomonaga, K. and Ikuta, K. (2001). Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* **75** : 8742-8751.
- 40) Rauvala, H., Huttunen, H. J., Fages, C., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Imai, S., Raulo, E. and Kilpelainen, I. (2000). Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility. *Matrix Biol.* **19** : 377-387.
- 41) Stern, D. M., Yan, S. D., Yan, S. F. and Schmidt, A. M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res. Rev.* **1** : 1-15.
- 42) Muller, S., Scaffidi, P., Degryse, B., Bonaldi, T., Ronfani, L., Agresti, A., Beltrame, M. and Bianchi, M. E. (2001). The double life of HMGB 1 chromatin protein : architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* **20** : 4337-4340.
- 43) Zhang, G., Kobayashi, T., Kamitani, W., Komoto, S., Yamashita, M., Baba, S., Yanai, H., Ikuta, K. and Tomonaga, K. Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB 1. (submitted).
- 44) Hans, A., Syan, S., Crosio, C., Sassone-Corsi, P., Brahic, M. and Gonzalez-Dunia, D. (2001). Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC 12 cells. *J. Biol. Chem.* **276** : 7258-7265.
- 45) Kamitani, W., Ono, E., Yoshino, S., Kobayashi, T., Taharaguchi, S., Lee, B. J., Yamashita, M., Kobayashi, T., Okamoto, M., Taniyama, H., Tomonaga, K. and Ikuta, K. Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral abnormalities with altered expressions of BDNF and serotonin receptors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
- 46) Kamitani, W., Lee, B. J., Yamashita, M., Zhang, G., Yanai, H., Ikuta, K. and Tomonaga, K. (unpublished data).