

1. 哺乳動物ゲノムに内在する非レトロウイルス型 RNA ウイルスエレメント

堀江 真行, 朝長 啓造

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野

私たちのゲノムの8%は内在性レトロウイルスによって占められている。内在性レトロウイルスは過去におけるレトロウイルス感染の痕跡であり、現存する唯一の「ウイルス化石」として、ウイルスと宿主との共進化に様々な知見を提供してきた。一方で、複製の際に宿主ゲノムへの組み込み（インテグレーション）を必要としないウイルスの生物系統的な内在化はこれまでは知られていなかった。最近、私たちはヒトをはじめとする多くの哺乳動物のゲノムにマイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナウイルスの遺伝子断片が内在化していることを発見した。これは、生物ゲノムに見つかった初めての RNA ウイルス化石である。さらに、自らは逆転写酵素を有していないボルナウイルスが宿主由来のレトロトランスポゾンを通じて宿主 DNA へとインテグレーションされる可能性も示された。この発見は、RNA ウイルスと宿主との新たな相互作用を示すとともに、遺伝学や細胞生物学をはじめとする多岐にわたる分野に大きな影響を与えた。本稿では、内在性ボルナウイルス因子の発見について概説するとともに、現在次々と発見されているレトロウイルス以外の内在性ウイルス断片についての最新知見を紹介する。

はじめに

生物は約40億年前に誕生し、自然淘汰と多様性の獲得を繰り返すことで現在の姿に進化してきた。ウイルス様の生命体も生物の誕生と同時に現れたと考えられるが、その原始の姿や役割に関しては何もわかっていない。一方、現在私たちが遭遇しているウイルスはきわめて多種多様な存在である。すなわち、ウイルスは生物の進化と共にその多様性を広げてきたと考えられる。しかしながら、宿主ゲノムに感染の痕跡を残すレトロウイルス以外は太古の姿を知ることができず、進化過程におけるウイルスと宿主との共存関係は大きな謎として残されている。

内在性レトロウイルスは、様々な生物のゲノムに残された唯一の「ウイルス化石」であり、ヒトゲノムの約8%、マウスゲノムの約10%は内在性レトロウイルス由来の配列で占められている^{1,2)}。内在性レトロウイルスは過去における外来性レトロウイルス感染の痕跡であり、レトロウイルスの進化を明らかにする極めて有用な手段を提供している¹⁾。これまでの研究から、レトロウイルスの内在化が宿主ゲノムの多様化に関与してきたことが示されている²⁾。また、内在性レトロウイルス由来の遺伝子の中には、胎盤形成など宿主にとって必須の機能を果たすものが存在することも知られている³⁻⁶⁾。このように、内在性レトロウイルスはレトロウイルスの進化のみならず、宿主とウイルスの共進化や宿主ゲノムの新奇性獲得といった多くの重要な知見を明らかにしてきた¹⁾。一方で、レトロウイルス以外のウイルスが系統的に宿主ゲノムに内在化することは知られておらず、多くのウイルスでは宿主との共進化を探ることは不可能と考えられていた。

最近、私たちはマイナス鎖 RNA ウイルスであるボルナウイルスの遺伝子の一部が、ヒトをはじめとする様々な哺乳動物のゲノムに内在化していることを発見した⁷⁾。本稿では、ボルナウイルスに関する最近の知見とともに、内在

連絡先

〒565-0871

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野

大阪府吹田市山田丘3-1

TEL: 06-6879-8306

FAX: 06-6879-8310

E-mail: tomonaga@biken.osaka-u.ac.jp

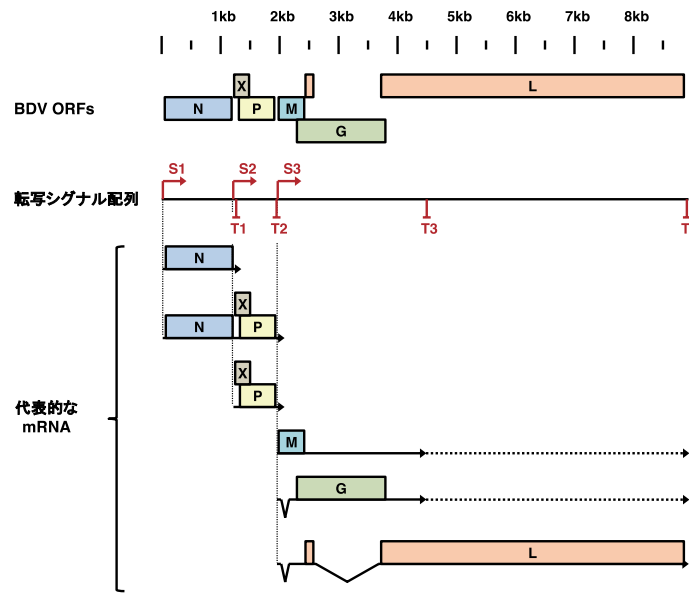


図1 BDV ゲノムの構造と転写産物

BDV ゲノムにコードされている ORF, 転写シグナル配列および代表的な mRNA を示した. S1~3 は転写開始シグナル配列を, T1~4 は転写終止シグナル配列を表す.

性ボルナウイルス因子の発見とその意義について概説する. また, 私たちの発見以降, 報告が相次いでいる非レトロウイルス型ウイルスの内在性因子についても最新の知見を紹介したい.

1. ボルナウイルス

ボルナウイルスはエンベロープを有し, 非分節のマイナス鎖一本鎖 RNA をゲノムに持つモノネガウイルス目ボルナウイルス科に属するウイルスである⁸⁾. ボルナウイルスは, 細胞核で複製を行うなど他のモノネガウイルス目のウイルスとは多くの異なる特徴を持っている. ボルナウイルス科の代表的なウイルスは, ウマやヒツジの急性脳炎 (ボルナ病) の原因ウイルスであるボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) である. その名前は, 19 世紀後半にドイツ東部のザクセン地方に存在する「ボルナ」という町において大流行が起こったことに由来する. これまで, ボルナウイルス科ボルナウイルス属には BDV の一種のみしか見つかっていなかったが, 2008 年に前胃拡張症候群という神経疾患を発症したオウムから BDV とは遺伝的に異なる鳥ボルナウイルス (Avian bornavirus: ABV) が発見された^{9, 10)}. 現在, ボルナウイルス科ボルナウイルス属には BDV と ABV の 2 種が存在している. さらに, 爬虫類ボルナウイルス (Reptile bornavirus: RBV) の存在も示唆されており⁷⁾, 哺乳動物以外の動物を宿主とするボルナウイルスの存在も明らかになりつつある.

ボルナウイルス研究は, BDV を中心に行われてきた.

BDV のゲノムは約 8.9kb の RNA からなり, 両末端にはゲノム鎖もしくはアンチゲノム鎖の複製に必要なプロモーター領域が存在する. また, ゲノム内には 3 つの転写開始シグナルと 4 つの転写終止シグナルが存在することが明らかとなっており, BDV の mRNA は 3 つの転写産物から選択的スプライシング機構を利用して効率よく発現されることが明らかとなっている (図 1).

BDV は 6 つの遺伝子 (N, X, P, M, G, L) をコードしている⁸⁾ (図 1). N 蛋白質はウイルスゲノムを保護するカプシド蛋白質である. P 蛋白質は RNA ポリメラーゼの補助因子として働き, L 蛋白質は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである. M 蛋白質と G 蛋白質はウイルス粒子の形成を担う構造蛋白質であり, G 蛋白質は細胞のレセプターとの結合や膜融合などの働きを持っていると考えられている. X 蛋白質は非構造蛋白質であり, 転写の調節因子としての働きや宿主細胞のアポトーシスを抑制する機能を持ち, BDV の複製に不可欠であることが報告されている¹¹⁻¹⁵⁾. BDV はゲノム RNA と N, P, L 蛋白質から成るリボ核酸タンパク複合体 (RNP) を形成しており, これが BDV の複製子としての最小構成要素であると考えられている¹⁶⁾.

BDV はユニークな特徴を持つウイルスである. 中でも, 細胞核における持続感染は最も特徴的である. 数多く存在する動物由来 RNA ウイルスのうち, 細胞核で複製を行うものはオルソミクソウイルス科とボルナウイルス科のみである. しかしながら, オルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスが溶解感染を呈するのに対し, BDV

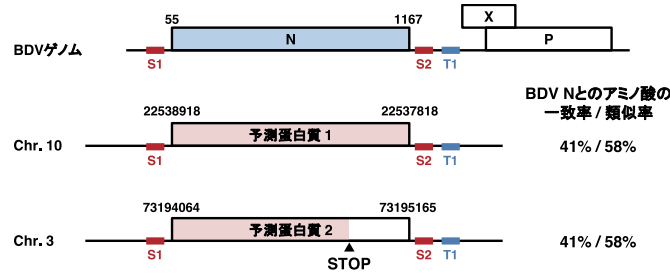
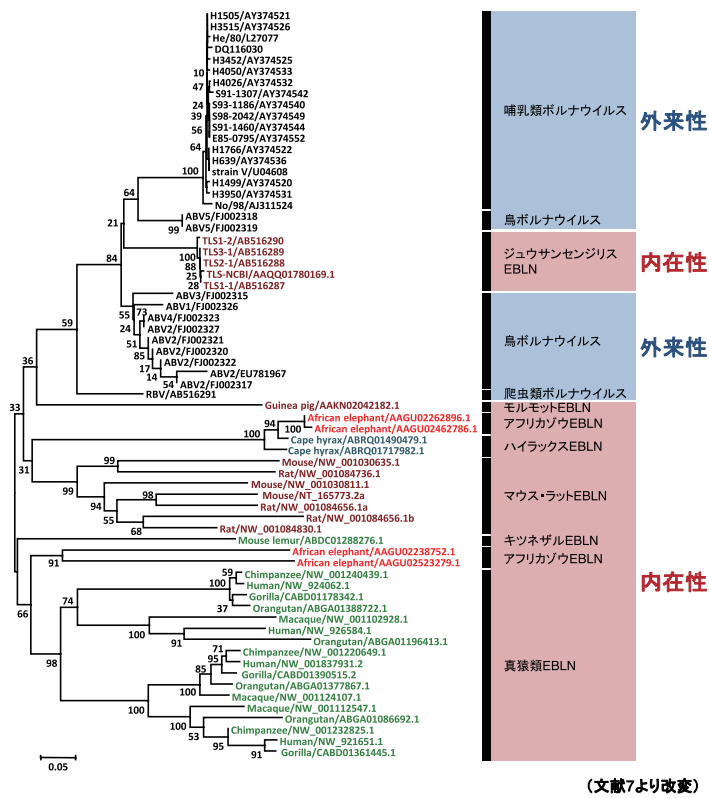


図2 ヒトゲノムに存在する BDV N 類似予測蛋白質

BDV ゲノムとヒトゲノムに存在する予測蛋白質を模式的に示した。予測蛋白質はそれぞれ 10 番染色体と 3 番染色体に存在する。予測蛋白質 2 の中ほどにはストップコドンが存在する (図の矢頭) が、ストップコドン以降も BDV N との類似性を有している。図の数字はそれぞれのゲノムにおける位置 (塩基番号) を示す。S1, S2, T1 は BDV の転写シグナル配列を表す。



(文献7より改変)

図3 外来性ボルナウイルス N 遺伝子と EBLN の系統樹

外来性ボルナウイルス (BDV, ABV, RBV) の N 遺伝子とデータベース検索によって得られた EBLN 配列を用いて近隣結合法にて系統樹を作成した。

をはじめとするボルナウイルス科は非細胞傷害性の持続感染を成立させる。つまり、ボルナウイルスは細胞核に持続感染する唯一の動物由来 RNA ウイルスなのである。核内で特異な性状を示すボルナウイルスの複製機構や持続感染機構を解明することは、RNA ウイルスと宿主の新たな相互作用の発見につながるだけでなく、ウイルスの病原性に関しても新たな知見が得られると考えられる。

2. 内在性ボルナウイルス様エレメントの発見

BDV は核内で持続感染する唯一の RNA ウイルスである。しかしながら、極めて動的で、しかも RNA 分子の安定化には適さないと考えられる細胞核で、BDV がどのように継続的な持続感染を成立させるかについては謎であった。私たちは BDV RNP の構成因子が宿主蛋白質を模倣し、あた

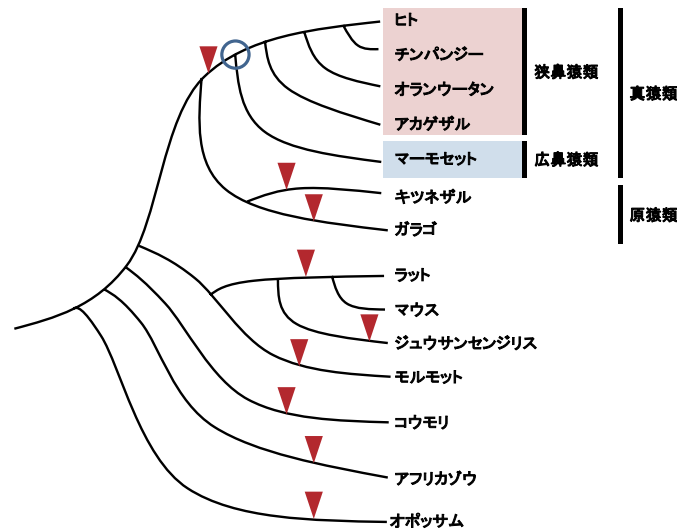


図4 生物の進化とボルナウイルス N 遺伝子の内在化

生物進化の系統樹を模式的に示した。進化の過程で図の矢頭の位置においてボルナウイルスの N 遺伝子が内在化したと考えられる。図の丸印は広鼻猿類と狭鼻猿類の分岐点であり、この分岐が約 4,000 万年前であると考えられている。

かも細胞核の一部であるかのように振る舞うことで持続感染を維持しているのではないかという仮説を立てた。そこで、BDV RNP の構成蛋白質と相同性の高い宿主蛋白質を tblastn プログラムを用いてデータベース検索を行った。すると驚くことに、ヒトゲノムに BDV の N 蛋白質と極めて高い相同性を示す 2 つの予測蛋白質が発見された。2 つの予測蛋白質は BDV N 蛋白質とのアミノ酸での一致率が 41% と高い相同性を示した。また、予測蛋白質に隣接する領域の塩基配列の解析を行ったところ、その周辺には S1, S2, T1 というボルナウイルスの転写関連シグナル配列が存在し、ボルナウイルスゲノムの構造と酷似していることが明らかとなった (図 2)。さらに、permutation 解析など詳細な遺伝学的解析を行った結果、2 つの予測蛋白質は BDV N と同一の起源をもつことが示唆された。そこで、予測蛋白質をコードしている配列を内在性ボルナウイルス様 N (Endogenous borna-like N; EBLN) エレメントと名付けた。

次に、ヒト以外の動物にも EBLN が存在する可能性を確かめた。234 種の真核生物のゲノムデータベースを用いた検索を行った結果、原猿類を含む霊長類、マウス、ラットやジュウサンセンジリスなどのげっ歯類、ゾウやハイラックスなどのアフリカ獣上目動物、コウモリ、さらには有袋類であるオボッサムなど、様々な哺乳動物のゲノムに EBLN が発見された。一方、ゲノムデータベースが完備されていない動物についてもサザンブロット法を用いて EBLN の検出を試みた。しかしながら、BDV あるいはヒト由来 EBLN 配列をプローブに用いた場合、ハイブリダイゼーション条件を緩やかにしても明瞭なバンドは検出されなかった。

EBLN と外来性ボルナウイルスの N 遺伝子の分子系統を明らかにするため、EBLN 配列と既知の外来性ボルナウイルスの N 遺伝子を用いて系統樹解析を行った (図 3)。その結果、真猿類 EBLN とマウス・ラット EBLN はそれぞれの単一のクラスターを形成し、宿主動物の系統発生に沿った枝分かれを示した。このことは、これらの EBLN は真猿類とマウス・ラットの共通祖先においてそれぞれに形成されたことを示唆している。一方、その他の動物由来の EBLN は系統発生とは無関係な位置に存在していた。面白いことに、北米大陸原産でリス科に属するジュウサンセンジリス由来の EBLN は、外来性ボルナウイルスである BDV や ABV と同じのクラスターに存在した。このことは、ジュウサンセンジリスの EBLN が比較的近年に形成されたことを示している。

以上の解析から、生物進化の過程 (図 4) において、矢頭の位置で外来性ボルナウイルスの N 遺伝子が内在化し EBLN が形成されたと考えられた。さらに、系統樹解析から真猿類 EBLN の内在化が起きた年代の推定を行った。真猿類 EBLN は狭鼻猿類と広鼻猿類の分岐以前に獲得されたと考えられ、これらの分岐年代が約 4,000 万年前と推定されていることから、少なくとも 4,000 万年以上前に内在化が起こったと考えられた。つまり、EBLN は 4,000 万年以上前に存在したボルナウイルスの化石なのである。これは、太古における RNA ウイルスの存在およびその感染を示す初めての証拠である。

3. ヒト細胞における EBLN 遺伝子の発現

先にも述べたが、内在性レトロウイルスの中には、宿主が自らの機能的遺伝子として取り込んだものが存在してい

表1 EBLNの有無とボルナウイルスに対する感受性の比較

宿主	EBLN	自然感染/病気	実験感染での病態
真猿類 (ヒトを含む)	+	+ / ±	+
原猿類	+	ND / ND	ND
マウス・ラット	+	- / -	+
リス	+	ND / ND	ND
モルモット	+	- / -	+
イヌ	-	+ / +	+
ネコ	-	+ / +	+
ウマ	-	+ / +	+
ウシ	+ / -	+ / +	+
ウサギ	-	+ / +	+
ヒツジ	-	+ / +	ND
ブタ	-	ND / ND	ND
トガリネズミ	+	+ / -	ND
オポッサム	+	+ / ±	ND
鳥類	-	+ / +	+

*ND: not determined

る。それでは、ボルナウイルス由来のEBLNの中には内在性レトロウイルスのように細胞内で発現し、機能を獲得したものは存在するのであろうか？哺乳類に存在するEBLNの多くはその遺伝子内に複数のストップコドンが存在する偽遺伝子となっている。しかしながら面白いことに、ヒトゲノムの第10番染色体と第3番染色体に存在するEBLN (EBLN-1, EBLN-2) は比較的長いオープンリーディングフレーム (ORF) を保持していることがわかっている。PCRによる解析の結果、様々なヒト由来細胞株にてこれらEBLN遺伝子をコードするmRNAの発現が検出された⁷⁾。EBLN-2に関しては、マイクロアレイによる解析データも公開されており¹⁷⁾、それによると多くの組織で発現が確かめられている。特に、CD4⁺ および CD8⁺ T細胞では高い発現が認められている。また、網羅的な蛋白質間相互作用の解析を行った報告において、EBLN-2といくつかの宿主因子との結合が示されており¹⁸⁾、EBLN-2が蛋白質として発現している可能性が強く示唆されている。

それでは、仮にEBLN遺伝子に機能があるとするれば、それはどのようなものなのであろうか。最も考えやすいのが、外来性ボルナウイルスの感染を制御している可能性である。実際に、内在性レトロウイルス遺伝子の一部は、外来性のレトロウイルス感染を阻止するものが存在することが古くより知られている¹⁾。また、昆虫ウイルスであるジシストロウイルスの内在化によって、蜂が同ウイルスへの抵抗性を獲得するという報告もある¹⁹⁾。EBLNが感染制御因子として機能する可能性を示唆する根拠としては、第一に、霊長類ではEBLN遺伝子が形成されて以降はN遺伝子の新

しい内在化が起こっていないように見えることである。すなわち、4,000万年前に形成されたEBLNが新しいボルナウイルスの感染あるいはインテグレーションを阻害しているようにも考えられる。2つめは、EBLNを持つ動物とボルナウイルスの自然感染あるいは病原性にある程度の相関性が認められる点である。現在、ヒトをはじめとするEBLNを有している霊長類では、BDVの感染は認められているが病気の発症は確認されていないか軽度なものである。一方、ボルナ病を発症するウマやヒツジはEBLNを有しておらず、急性の致死感染を引き起こすことが知られている²⁰⁾ (表1)。これは、EBLN配列が蛋白質もしくはRNAレベルでBDVの感染あるいは複製を制御している可能性を示している。すなわち、EBLNを持つ動物はボルナウイルスの感染リザーバー (自然宿主) になっている可能性もある。事実、ゲノムにEBLNを持つトガリネズミ (食虫目) はヨーロッパにおけるBDVの自然宿主であるとの報告もなされている^{21, 22)}。一方で、元々ボルナウイルスに抵抗性を持つ動物種では、慢性感染に移行しやすく、結果的にボルナウイルスの内在化が起こったという説も考えられる。今後は、両方の可能性を考慮に入れ解析を進める必要があると考えられる。

一方で、レトロウイルスで確認されているように、EBLNがウイルス感染とは全く関係のない機能を持つ可能性も考えられる。宿主にとって有用な機能を持たない遺伝子配列が、進化の過程で新たな機能を獲得する「イグザプテーション」という現象は²³⁾、宿主ゲノムの新奇性をもたらす新しい機序と考えられる。EBLNが宿主細胞内で機能性遺伝

表2 様々なBDV感染細胞株におけるBDV DNAの検出

細胞株	細胞株の由来	感染率	BDV DNA の検出	逆転写酵素活性 ^a
OL	ヒト	100%	○	<20
293T	ヒト	100%	○	<20
SK-N-SH	ヒト	100%	×	<20
U373	ヒト	2.0%	×	<20
Vero	サル	100%	×	<20
C6	ラット	100%	×	410
RK13	ウサギ	16.8%	○	<20
MDCK	イヌ	100%	○	89
Mv1Lu	ミンク	17.8%	○	<20

^a 逆転写酵素活性は μ ユニット/ μ gで表している

(文献7より改変)

子として働いているかを確認することは、RNA ウイルスと宿主との未知なる相互作用を明らかにしていく手段でもあると考えられる。

4. BDV 感染細胞における BDV DNA のインテグレーション

EBLN は外来性ボルナウイルスの N 遺伝子が内在化したものである。しかしながら、レトロウイルスとは異なり、ボルナウイルスは逆転写酵素をコードしていない。それではボルナウイルスの N 遺伝子はどのようにして宿主ゲノムへと組み込まれたのであろうか。また、現存するボルナウイルスである BDV では宿主ゲノムへのインテグレーションという現象が起こるのであろうか。

私たちはこれらの疑問を解決するために BDV を用いて実験を行った。BDV 持続感染細胞から核酸を抽出し、核酸分解酵素を用いて BDV ゲノム上の複数のプライマーで PCR を行った。その結果、BDV の mRNA を鋳型とする DNA が感染細胞内で合成されていることが明らかとなった。実験に用いた細胞株によっては BDV 由来 DNA が検出されないものもあったが、細胞の由来や細胞内の逆転写酵素活性との間に相関性は認められなかった (表2)。さらに、Alu-PCR 法を用いた解析で BDV 由来 DNA が宿主ゲノムにインテグレーションされていることが示された。そこで、novel Alu-PCR 法および inverse PCR 法を用いて BDV DNA の宿主ゲノム内でのインテグレーション構造の解析を行った。図5には同定された典型的な配列を示している。特徴として、5'末端側は BDV の N mRNA の転写開始部位もしくはその下流からインテグレーションされていた。一方、3'末端側は N mRNA の転写終止部位からポリ A 配列が続く配列が多くで同定された。特徴的なのは、インテグレーションされた BDV 配列の両端に宿主ゲノムの重複配列が観察されたことである。これは、哺乳類ゲノムに観察

された EBLN 配列の特長と極めて類似していた。

これらの解析によって、BDV mRNA が宿主ゲノムへとインテグレーションされることが証明された。さらに、インテグレーションされた BDV 配列の特徴から、ボルナウイルスの内在化に関する機序が浮かび上がった。それは、宿主のトランスポゾン的一种である非 LTR 型レトロトランスポゾン LINE (long interspersed nuclear element) の関与である。LINE RNA より翻訳される LINE 蛋白質 (逆転写酵素とエンドヌクレアーゼ) は、転写された自身の mRNA を選択的に認識してゲノムへのインテグレーションを触媒し、転位を完了させる。また稀に、細胞内の他の mRNA の逆転写とインテグレーションを触媒し、偽遺伝子の形成に関与していることも知られている^{24, 25)}。LINE により転移した DNA 配列の特徴として、5'末端は転写開始部位かそれ以降からインテグレーションされること、3'末端にはポリ A 配列を持つこと、そして組み込まれた遺伝子に隣接するゲノムに重複配列が見られること、の3つが挙げられる。これらの特徴はインテグレーションされた BDV mRNA の特徴と見事に一致する。このことから、BDV mRNA は LINE によって宿主ゲノムへと組み込まれたと考えられる。

実際に、EBLN の形成にも LINE が関与したことを示唆する証拠が残されている^{7, 20)} (図6)。ヒト EBLN の周辺の塩基配列を観察すると、BDV の転写開始および転写終止シグナルとポリ A 配列が存在する。さらに、隣接する DNA 配列には重複配列が確認される。また、内在化が起こった時期には LINE が活発に働いていたという報告もあり²⁶⁾、ボルナウイルスの内在化には LINE が関与した可能性が高い。

逆転写酵素を持たない RNA ウイルスが、宿主ゲノムへとインテグレーションされることは古くから報告されている²⁷⁻²⁹⁾。実験的なリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) のインテグレーションではマウスの LTR 型レトロトランス

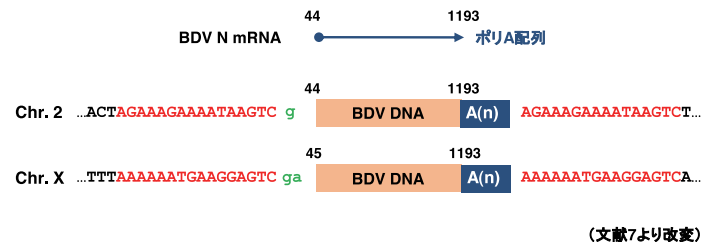


図5 BDV DNAの宿主ゲノムへのインテグレーション

Inverse PCR法によって、宿主ゲノムへとインテグレーションしたBDV DNAを検出した。ここではBDV mRNAとともに、代表的なものの構造を示す。図の数字は、BDVゲノム上の位置を示す。BDV N mRNAは44塩基目より転写が始まり、1193塩基目で転写が終結しポリA配列へと続く。赤字は宿主由来DNA配列の重複を示す。緑字は宿主にもBDVにも存在しない塩基を示す。

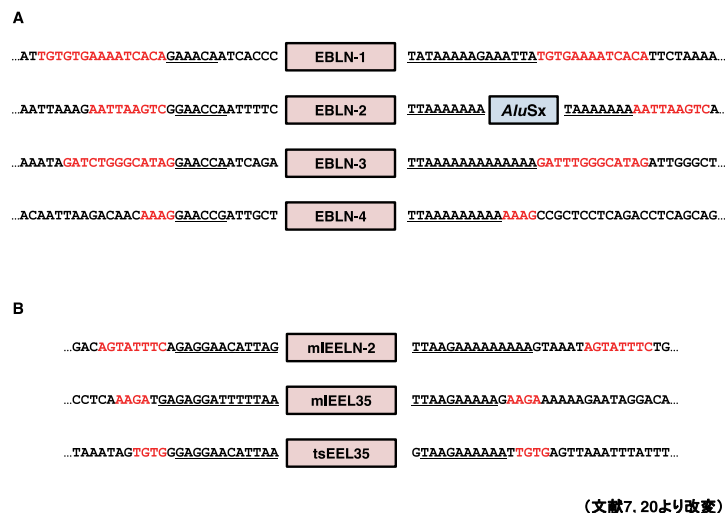


図6 EBLNおよび内在性フィロウイルス様配列の構造

(A) ヒト EBLN, (B) 内在性フィロウイルス様配列の構造を模式的に示した。下線の塩基はそれぞれのウイルスの転写開始配列、終止配列およびポリA配列を示す。赤字は重複配列を表す。mIEELN-2: コウモリ内在性エボラウイルス様 NP 配列 2, mIEEL35: コウモリ内在性エボラウイルス様 VP35 配列, tsEEL35: メガネザル内在性エボラウイルス様 VP35 配列。

ポゾンである intracisternal A particle (IAP) が関与していることが報告されている。一方、LINEは非常に多くの生物に存在しており、今もなお活性を保持しているものが存在する³⁰⁾。上記の通り、LINEの逆転写酵素は非特異的に mRNA を認識することがあるため、ボルナウイルスだけでなく他のウイルスの内在化にも関与しているかもしれない。後述するが、フィロウイルスも LINE によって内在化したことを示唆する報告がある。BDVは神経指向性のウイルスである。LINEは中枢神経系での高い発現が確認されており³¹⁾、脳神経細胞に感染したBDVがインテグレーションによって変異原となることで病原性を示す可能性も考えられる³²⁾。今後は、RNAウイルスの新しい病原機構として解析を進める必要があると考えられる。

5. EBLN 発見の広がり：

脊椎動物ゲノムで見つかった内在性ウイルス因子

EBLNの発見を機に、様々な真核生物のゲノムからレトロウイルス以外のウイルスの内在化が次々と発見されている。これまでに、脊椎動物に加え、昆虫や植物、さらには真菌などで様々なウイルスの内在化が報告されている³³⁾。この項では、表3に示す脊椎動物における内在性ウイルス因子に関する最新の知見を紹介したい。

DNAウイルスでは、サーコウイルスとバルボウイルスの内在化が報告されている^{34, 35)}。さらに、内在性パルボウイルス因子はパルボウイルス科のパルボウイルス属に近縁なグループと同科のディペンドウイルス属に近縁なグルー

表3 脊椎動物における非レトロウイルス型内在性ウイルス様因子

宿主	ssDNA				(+) ssRNA		(-) ssRNA					dsDNA-RT				
	サーコ		バルボ		ディベンド		TB		ボルナ			フィロ		NYA		
	Rep	Cap	NSI	VPI	Rep	Cap	NS3	N	M	L	NP	VP35	L	L	C	P
真猿類									○							
メガネザル					○				○			○				
キツネザル									○	○						
マウス					○	○			○		○					
ラット			○	○	○	○			○		○					
リス									○							
モルモット			○	○					○			△				
ウサギ					○	○										
イヌ	○				△											
マイクロバット					○	○			○		○	○	○			
トガリネズミ									○			△				
ゾウ					○				○							
オポッサム	○	○	○	○					○				○			
キンカチョウ															○	○
メダカ							△		△	○						
ゼブラフィッシュ														○		

ssDNA: 一本鎖 DNA ウイルス、(+) ssRNA: プラス鎖一本鎖 RNA ウイルス、(-) ssRNA: マイナス鎖一本鎖 RNA ウイルス、dsDNA-RT: 逆転写二本鎖 DNA ウイルス、TB: タマナコウモリウイルス、NYA: ニヤマニニ/ミッドウェイウイルス、△: BLAST E-value が低い (≒10⁻⁵) ものを表す

に分類されている。これらはすべて核内で増殖する一本鎖 DNA ウイルスである。この中で最も多く見つかった内在性因子はアデノ随伴ウイルス (AAV) に代表されるディベンドウイルスの内在性因子である。AAV は時に宿主ゲノムへとインテグレーションすることが知られており、ヒトの精巣組織におけるインテグレーションも報告されている³⁶⁾ことから、比較的内在化が起りやすい性質を持っているのではないかと考えられる。また、これらの内在性因子の一部は EST (Expressed Sequence Tag) データベースに登録されており、mRNA として発現している可能性が高い。これらのウイルスの内在化が起こった年代の推定も行われている。Kapoor らは、ラットの内在性パルボウイルス因子が約 2,500 から 3,500 万年前に形成されたと推定している³⁵⁾。Belyi らは様々な内在性因子の解析を行い、古いものでは 1 億年近く前に、また新しいものでは極めて近年に内在化が起こったのではないかと報告している³⁴⁾。

RNA ウイルスでは、ボルナウイルスと同じモノネガウイルス目に属するフィロウイルスとニヤマニニ/ミッドウェイウイルスの内在化が発見されている^{20, 37)}。さらに、ボルナウイルスの M 遺伝子や L 遺伝子の内在化も同定されている²⁰⁾。プラス鎖一本鎖 RNA ウイルスでは唯一、フラビウイルス科に属するタマナコウモリウイルスの内在性因子がメダカのゲノムから見つかっている。内在性フィロウイルス因子の一部も EST データベースに登録されており、mRNA として発現している可能性が高い。また、トビイロ

ホオヒゲコウモリのゲノムにはフィロウイルスの VP35 のほぼ全長と同じ長さの ORF を持つ配列が存在しており、何らかの機能を持っているかもしれない。Belyi らはオポッサムの内在性フィロウイルス因子の内在化が起こった年代の推定を行っており、およそ 3,200 から 5,300 万年前に内在化したと算出されている²⁰⁾。

逆転写ウイルスの一種であるヘパドナウイルスの内在化も確認されている³⁸⁾。ヘパドナウイルスは DNA をゲノムとして持っているが、複製の際に RNA を介し、RNA から DNA へと逆転写を行う特殊な複製サイクルを持つウイルスである。ヘパドナウイルス科に属する B 型肝炎ウイルスでは、宿主細胞ゲノムへとインテグレーションを起こすことがよく知られており、精子ゲノムにインテグレーションした例も報告されている³⁹⁾。Gilbert らは内在性ヘパドナウイルス因子と現存するヘパドナウイルスの遺伝子配列を利用し、長期間におけるヘパドナウイルスの進化速度の算出を試みている。Gilbert らの計算では、内在化配列から算出された極めて長い期間におけるウイルスの進化速度は、現存するウイルスの短期間の変異から算出された進化速度の 1/1000 程度であった。このように、内在性因子の発見によってウイルスの進化速度に関する新たな知見が得られている。他の内在性因子の見つかっているウイルスでも、長期と短期の進化速度を算出してみるの面白いだろう。

これらの様々なウイルスの内在化はどのように起こったのであろうか。どうやら、ウイルスの種類によってその機

構は異なるようである。内在性フィロウイルス因子の3'末端にはポリ A 配列が見られている。また、いくつかにはウイルス特異的な転写シグナル配列が観察されている。さらに、内在性因子の両端に重複配列も存在している。このことから、フィロウイルスの内在化にはボルナウイルスと同様に LINE が関与したのではないかと考えられる(図 6)²⁰⁾。一方、内在性パルボウイルス因子では VP と NS1 という 2 つの遺伝子由来の配列が隣接している例が多い。パルボウイルスの VP と NS1 遺伝子は異なる転写ユニットとして発現されることから、内在性パルボウイルス因子は mRNA ではなくゲノム鎖に由来する可能性が高い³⁵⁾。また、内在性ヘパドナウイルス因子にはポリ A 配列も隣接領域の重複配列もない³⁸⁾。パルボウイルスとヘパドナウイルスの両ウイルスは複製の際に細胞核で二本鎖 DNA を形成するため、複製産物である二本鎖 DNA ゲノムがインテグレーションに関与したと考えられる。AAV や HBV に関しては宿主ゲノム DNA の切断が起こった際の修復の過程でインテグレーションが起こると報告がある^{40,41)}。

現在のところ、上記のウイルス以外の内在化は報告されていない。Belyi らは、NCBI viral Refseq データベースに存在する一本鎖 DNA ウイルスの 2,382 個の蛋白質および一本鎖 RNA ウイルスの 79,001 個の蛋白質の配列を抽出して検索に使用している^{20, 34)}。これらの配列は、7 科の一本鎖 DNA ウイルスと 38 科および 9 つの未分類の一本鎖 RNA ウイルスを含んでいる。このような大規模な解析にもかかわらず、上記のウイルス以外は見つからない。なぜ他のウイルスの内在化は見つからないのだろうか。原因としては様々な要因が考えられるが、大きく生物学的要因と時間的・技術的要因の 2 つに分けられると考えられる。

生物学的要因としては、ウイルスのインテグレーションの起こりやすさ、細胞指向性、病原性や進化速度、さらには内在化による宿主への新規機能の付与が考えられる。上述の通り、ディペンドウイルスやヘパドナウイルスでは宿主ゲノムへのインテグレーションが比較的高頻度で起こることが知られており、これらのウイルスの内在性因子が発見されたのは理にかなっている。ボルナウイルスやフィロウイルスに関しては、もしかしたら LINE の逆転写酵素によって認識されやすいのかもしれない。細胞指向性に関しては、内在化には生殖細胞もしくは発生初期の細胞のゲノムへのインテグレーションが必須である。そのため、生殖細胞もしくは発生初期の細胞への指向性が重要である。ウイルスの病原性も重要である。いくら生殖細胞においてインテグレーションが起こりやすくても、感染細胞が死に至るようなウイルスでは内在化は起こりにくいであろう。また、後述の時間的・技術的要因と関係するが、ウイルスの進化速度が早い場合には、現存する外来性ウイルスの遺伝子配列と内在性配列との類似性が急速に失われ、現存する外来性ウイルスの遺伝子配列を用いて内在性配列を検出す

るのは困難であると考えられる。

内在化による何らかの機能の付加も重要な要因となるだろう。内在化によって宿主が何らかのメリットを得ることができるならば、内在化が起こった個体には正の選択が働くであろう。前述のように、EBLN がウイルスの感染防御に働いている可能性があり、内在化によってウイルスに対する防御機構を獲得したとする説は面白い。

時間的・技術的要因としては、2 つの要因が挙げられる。まず、内在化が起こった年代があまりにも昔である場合、現在の検索技術では検出できないほど外来性ウイルスの遺伝子配列と内在性配列が変化してしまっている可能性である。また、実際は内在化が起こっているがその生物種のゲノムが未解読であり発見されていないことも考えられる。もちろん、進化の過程において偶然の要素が重要な働きをしているのは間違いない。おそらく上記の要因と偶然とが複雑に絡み合った結果として、私たちのゲノムにウイルスの化石が存在するのであろう。

おわりに

内在性レトロウイルスの発見以来、長らくの間レトロウイルス以外のウイルスの化石は見つかっていなかった。しかしながら、ボルナウイルスの化石の発見後、次々と多くの内在性ウイルス因子が発見されている。現在、ゲノムのシーケンズデータは急速に増えつつあるものの、やはりゲノム情報が利用できる生物は限られている。今後さらなるゲノムデータベースの充実に従って、さらなる内在性ウイルス因子が発見されるとともに、より正確な内在化の年代の推定を可能にするであろう。EBLN の発見から様々な新しい知見が得られたのと同様、これらの内在性ウイルス因子を用いた解析によって、ウイルス進化だけでなく、ウイルスと宿主との相互作用や病原性、ひいては細胞の新たな機能の発見へとつながると確信している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、東京大学医科学研究所・実験動物研究施設の本田知之博士、国立遺伝学研究所・遺伝情報分析研究室の五條堀孝博士、鈴木善幸博士（現；名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科）、小林由紀博士をはじめ、多くの共同研究者の方々のご協力のもとに行われました。改めてここに深謝致します。

参考文献

- 1) Jern, P. and Coffin, J.M., Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet* 42, 709-32, 2008.
- 2) Bannert, N. and Kurth, R., The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 149-73, 2006.
- 3) Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H.,

- Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C., Jr. and McCoy, J.M., Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785-9, 2000.
- 4) Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L. and Heidmann, T., Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13013-8, 2003.
 - 5) Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Benit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V. and Heidmann, T., Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 725-30, 2005.
 - 6) Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P. and Heidmann, T., Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentalization of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12127-32, 2009.
 - 7) Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jern, P., Gojobori, T., Coffin, J.M. and Tomonaga, K., Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463, 84-7, 2010.
 - 8) Tomonaga, K., Kobayashi, T. and Ikuta, K., Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4, 491-500, 2002.
 - 9) Kistler, A. L., A. Gancz, S. Clubb, P. Skewes-Cox, K. Fischer, K. Sorber, C. Y. Chiu, A. Lublin, S. Mechani, Y. Farnoushi, A. Greninger, C. C. Wen, S. B. Karlene, D. Ganem, and J. L. DeRisi. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology* 488, 2008.
 - 10) Honkavuori, K. S., H. L. Shivaprasad, B. L. Williams, P. L. Quan, M. Hornig, C. Street, G. Palacios, S. K. Hutchison, M. Franca, M. Egholm, T. Briese, and W. I. Lipkin. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14:1883-6, 2008.
 - 11) Poenisch, M., Burger, N., Staeheli, P., Bauer, G. and Schneider, U., Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol* 83, 4297-307, 2009.
 - 12) Poenisch, M., Unterstab, G., Wolff, T., Staeheli, P. and Schneider, U., The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol* 85, 1895-8, 2004.
 - 13) Schwardt, M., Mayer, D., Frank, R., Schneider, U., Eickmann, M., Planz, O., Wolff, T. and Schwemmle, M., The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 86, 3163-9, 2005.
 - 14) Poenisch, M., Wille, S., Ackermann, A., Staeheli, P. and Schneider, U., The X protein of borna disease virus serves essential functions in the viral multiplication cycle. *J Virol* 81, 7297-9, 2007.
 - 15) Hayashi, Y., Horie, M., Daito, T., Honda, T., Ikuta, K. and Tomonaga, K., Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X. *Microbes Infect* 11, 394-402, 2009.
 - 16) Schneider, U., Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res* 111, 148-60, 2005.
 - 17) Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., 3rd and Su, A.I., BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol* 10, R130, 2009.
 - 18) Ewing, R.M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M.D., O'Connor, L., Li, M., Taylor, R., Dharsee, M., Ho, Y., Heilbut, A., Moore, L., Zhang, S., Ornatsky, O., Bukhman, Y.V., Ethier, M., Sheng, Y., Vasilescu, J., Abu-Farha, M., Lambert, J.P., Duwel, H.S., Stewart, II, Kuehl, B., Hogue, K., Colwill, K., Gladwish, K., Muskat, B., Kinach, R., Adams, S.L., Moran, M.F., Morin, G.B., Topaloglou, T. and Figeys, D., Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3, 89, 2007.
 - 19) Maori, E., Tanne, E. and Sela, I., Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* 362, 342-9, 2007.
 - 20) Belyi, V.A., Levine, A.J. and Skalka, A.M., Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* 6, e1001030, 2010.
 - 21) Hilbe, M., Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K. and Ehrensperger, F., Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12, 675-7, 2006.
 - 22) Puorger, M.E., Hilbe, M., Muller, J.P., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K. and Ehrensperger, F., Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol* 47, 236-44, 2010.
 - 23) Gould, S.J. and Vrba, E.S., Exaptation - a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8, 4-15, 1982.
 - 24) Maestre, J., Tchenio, T., Dhellin, O. and Heidmann, T., mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *EMBO J* 14, 6333-8, 1995.
 - 25) Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T., Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 24, 363-7, 2000.
 - 26) Ohshima, K., Hattori, M., Yada, T., Gojobori, T., Sasaki, Y. and Okada, N., Whole-genome screening indicates a possible burst of formation of processed pseudogenes and Alu repeats by particular L1 subfamilies in ancestral primates. *Genome Biol* 4, R74, 2003.
 - 27) Zhdanov, V.M., Integration of viral genomes. *Nature* 256, 471-3, 1975.
 - 28) Klennerman, P., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M.,

- A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* 390, 298-301, 1997.
- 29) Geuking, M.B., Weber, J., Dewannieux, M., Gorelik, E., Heidmann, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. and Hangartner, L., Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science* 323, 393-6, 2009.
 - 30) Ohshima, K. and Okada, N., SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail. *Cytogenet Genome Res* 110, 475-90, 2005.
 - 31) Coufal, N.G., Garcia-Perez, J.L., Peng, G.E., Yeo, G.W., Mu, Y., Lovci, M.T., Morell, M., O'Shea, K.S., Moran, J.V. and Gage, F.H., L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-31, 2009.
 - 32) Feschotte, C., *Virology: Bornavirus enters the genome*. *Nature* 463, 39-40, 2010.
 - 33) Koonin, E.V., Taming of the shrewd: novel eukaryotic genes from RNA viruses. *BMC Biol* 8, 2, 2010.
 - 34) Belyi, V.A., Levine, A.J. and Skalka, A.M., Sequences from Ancestral Single Stranded DNA Viruses In Vertebrate Genomes: The Parvoviridae And Circoviridae Are More Than 40-50 Million Years Old. *J Virol*. In press.
 - 35) Kapoor, A., Simmonds, P. and Lipkin, I.W., Discovery and Characterization of Mammalian Endogenous Parvoviruses. *J Virol*. In press.
 - 36) Mehrle, S., Rohde, V. and Schlehofer, J.R., Evidence of chromosomal integration of AAV DNA in human testis tissue. *Virus Genes* 28, 61-9, 2004.
 - 37) Taylor, D.J., Leach, R.W. and Bruenn, J., Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol* 10, 193, 2010.
 - 38) Gilbert, C. and Feschotte, C., Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. *PLoS Biol* 8, e1000495, 2010.
 - 39) Huang, J.M., Huang, T.H., Qiu, H.Y., Fang, X.W., Zhuang, T.G., Liu, H.X., Wang, Y.H., Deng, L.Z. and Qiu, J.W., Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 9, 736-40, 2003.
 - 40) Miller, D.G., Petek, L.M. and Russell, D.W., Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* 36, 767-73, 2004.
 - 41) Bill, C.A. and Summers, J., Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11135-40, 2004.

Endogenous bornavirus elements in mammalian genome

Masayuki HORIE, Keizo TOMONAGA

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

Approximately 8% of our genome is made up of endogenous retroviral elements. Endogenous retrovirus is a fossil record of ancient retrovirus infection and, therefore, gives important insights into the evolutionary relationship between retroviruses and their hosts. On the other hand, until recently, it has been believed that no endogenous non-retroviral viruses exist in animal genomes. We lately discovered endogenous elements homologous to the nucleoprotein of bornaviruses, a negative-strand RNA virus, in the genomes of many mammalian species, including humans. We also demonstrated that mRNA of extant mammalian bornavirus, Borna disease virus, is reverse-transcribed and integrated into the host genome DNA. These findings provided novel insights not only into the interaction between RNA viruses and their hosts, but also into the mechanism underlying the gain of novelty in mammalian genomes. In this review, we will briefly summarize our recent knowledge about endogenous bornavirus elements and also introduce some recent discoveries regarding endogenous elements of non-retroviral viruses in vertebrate genomes.

