

令和 7 年 5 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K19185

研究課題名（和文）アルボウイルスの特殊なゲノムRNA構造の解析と媒介性の規定要因としての検証

研究課題名（英文）Structural analysis of arboviral genomic RNAs and their functional validation as key factors in vector susceptibility.

研究代表者

大手 学（OTE, MANABU）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20386717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：RNAウイルスはゲノムRNA内で複雑な二次構造を形成し、様々な宿主・ウイルスタンパク質と相互作用することにより増殖する。我々は、昆虫媒介性ウイルスのRNAに、典型的な二次構造ではない特殊な高次構造が形成されることを発見した。この高次構造について、その形成メカニズムを明らかにするため、ショウジョウバエ培養細胞と、自己複製能のない組み換え昆虫ウイルスを用いた実験系を確立した。感染環境によるダイナミックな構造変化を捉えるために、デングウイルスとフロックハウスウイルスについて大規模二次構造解析を行った。その結果、特にゲノムRNAの非コード領域が環境依存的に構造変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、昆虫媒介性RNAウイルスの特殊な高次構造の存在とその環境依存的変化を示しており、ウイルスの増殖や制御機構の新たな理解に貢献する。構造に特異的なRNA定量法の確立は、ウイルス診断や創薬への応用可能性を広げる点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：RNA viruses replicate by forming complex secondary structures within their genomic RNA and by interacting with various host and viral proteins. We discovered that insect-borne viruses adopt unique higher-order RNA structures that are different from conventional secondary structures. To investigate the mechanisms underlying the formation of these structures, we developed an experimental system using cultured Drosophila cells and recombinant insect viruses incapable of self-replication. To capture the dynamic structural changes that occur in response to the cellular environment during infection, we conducted large-scale RNA secondary structure analyses of dengue virus and Flock House virus. Our results revealed that the non-coding regions of the viral genome, in particular, undergo environment-dependent structural rearrangements.

研究分野：衛生動物学

キーワード：RNAウイルス ヤブカ

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスをはじめとするアルボウイルス(節足動物媒介性ウイルス)は、ヒトや家畜に感染症を引き起こす一方で、媒介者となる蚊などの節足動物では病原性を示さず、持続的に感染する。この特性は、節足動物媒介性の成立において極めて重要な要素であるが、その分子基盤については未解明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、節足動物媒介性を規定するウイルス側の因子を明らかにすることを目的とする。申請者はこれまでの研究から、ウイルスのゲノム RNA に形成される特殊な高次構造が、節足動物におけるウイルス複製に関与しているという仮説を立てた。本研究では、この構造の機能と形成機構の解明を目指す。最終的には、RNA 高次構造がウイルスの媒介性や病原性に寄与する新たな因子として位置づけられることを目指し、将来的にはこの構造を標的とした新たなベクター制御技術の開発が期待される。

3. 研究の方法

アルボウイルスとしてデングウイルスを、昆虫病原ウイルスとしてハマダラカに高い病原性を示すフロックハウスウイルス(FHV)を用いる。持続感染時のウイルス RNA の構造や細胞内局在を、FISH、DMS-seq、および免疫染色によって解析する。

4. 研究成果

この構造の働きを明らかにするため、デングウイルスが感染したヤブカ培養細胞に高次構造形成原子が修飾された塩基を取り込ませることにより、特殊な高次構造を形成できないウイルス RNA を作成した。このウイルスの複製は減弱したことから、この構造はウイルスが効率よく複製するために形成している可能性が示された。また、この構造を認識する抗体を用いた細胞染色により、デングウイルスの複製サイトに局在する RNA がこの構造を形成すること、デングウイルスやフロックハウスのゲノム RNA には、環境に依存して特殊な構造が形成されることがわかった。

まず、デングウイルスが感染したヤブカ培養細胞において、高次構造形成に関与する塩基を化学修飾することで、特殊な構造を形成できないウイルス RNA を作製した。その結果、この変異ウイルスの複製効率が低下したことから、当該構造がウイルス複製に重要である可能性が示唆された。さらに、構造特異的な抗体を用いた染色により、デングウイルス複製部位に局在する RNA がこの構造を形成していることが確認された。加えて、デングウイルスおよび FHV のゲノム RNA には、感染環境に応じて構造が動的に変化する性質があることも明らかとなった。

構造形成機構の解明のため、ショウジョウバエ培養細胞と自己複製能を持たない組換え昆虫ウイルスを用いた trans-replication system を確立した。ウイルスゲノムと複製酵素を別々のプラスミドにクローニングし、細胞に導入したところ複製活性が確認された。特に、プラスミド導入後 2 日目に転写阻害剤を添加すると複製活性が上昇することが判明した。また、約 250 塩基からなる複製に必要なゲノム RNA 領域を特定し、構造形成が推測される部位に変異を導入した。その結果、複製に影響を与えない変異の解析から、構造は複数の

RNA 分子の相互作用によって形成される可能性、また複数箇所が構造形成に関与している可能性が示された。

さらに、このシステムを活用し、RNA に担体結合性アプタマーを導入することで、ウイルス RNA を細胞内から高純度に回収する手法を開発した。この方法により、ウイルス RNA を 1 万~2 万倍に濃縮することが可能となった。加えて、特殊な高次構造に特異的に結合する一本鎖抗体を用いた免疫沈降法を確立し、構造を保持したウイルス RNA の定量解析が可能となった。さらに、メタノールおよびホルマリンによる固定処理が、不安定な構造の保存に有効であることを見出した。以上のように、特殊な構造を形成したウイルス RNA を定量、観察する新手法を開発した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大手 学、嘉糠 洋陸
2. 発表標題 共生細菌ボルバキアにより昆虫のウイルス抵抗性が誘導される仕組みの解明
3. 学会等名 第75回 日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大手 学、嘉糠 洋陸
2. 発表標題 共生細菌ボルバキアによる昆虫細胞内におけるウイルスRNAの操作と複製阻害
3. 学会等名 第67回 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大手学、嘉糠洋陸
2. 発表標題 共生細菌ボルバキアによるウイルス複製の阻害機構
3. 学会等名 第74回日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 大手学、嘉糠洋陸
2. 発表標題 共生細菌ボルバキアによる昆虫細胞内におけるウイルスRNAの操作と複製阻害
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	嘉糠 洋陸 (Kanuka Hirotaka) (50342770)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------