

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660262

研究課題名(和文) Wolbachiaによる宿主へのRNAウイルス抵抗性誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Virus resistance induced by Wolbachia

研究代表者

大手 学 (Ote, Manabu)

東北大学・生命科学研究科・研究支援者

研究者番号：20386717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：共生細菌ボルバキアはショウジョウバエ生殖細胞においてRNA結合タンパク質と共局在するというSerbusらの報告をもとに、体細胞において発現するRNA結合タンパク質とボルバキアとの関係を調べた。その結果、ショウジョウバエのRNA結合タンパク質変異体ではボルバキア様の現象が誘導されることがわかった。また、ボルバキアは体細胞においてもRNA結合タンパク質と共局在していることがわかった。以上のことから、ボルバキアが宿主のRNA結合タンパク質を標的としている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Based on the Serbus's report, I elucidated the possible involvement of RNA-binding proteins in the Wolbachia-induced phenomenon. It was revealed that Drosophila mutants of RNA-binding proteins phenocopy the host resistance to RNA viruses induced by Wolbachia. The RNA-binding proteins were colocalized with Wolbachia in somatic cells, implying the direct interaction of Wolbachia and the RNA-binding proteins. These findings raise the possibility that Wolbachia target the RNA-binding proteins for manipulation of host biology.

研究分野：昆虫学

キーワード：ボルバキア ショウジョウバエ ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

地球上の生物には種内の個体間のみならず、種間における相互作用が広く観察される。特に、細胞内に他の生物が生息する細胞内共生はその最も極端な例の一つである。節足動物に広く感染する細胞内共生細菌ボルバキアは宿主の性、生殖を操作することにより集団内での感染を拡大する。また、宿主の RNA ウィルスに対する抵抗性を上昇させるとも知られている。これらの現象を応用することにより、害虫防除、疫学的な目的から、昆虫集団の操作が可能となることが期待されている。しかし、ボルバキアによる宿主操作のメカニズムは現象論的な報告にとどまる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ボルバキアによる宿主の RNA ウィルス抵抗性誘導メカニズムの解明を目指す。遺伝学的解析が可能なキイロショウジョウバエを用い、ボルバキアが標的とする宿主因子を同定する。また、組換えウィルス等を用いボルバキアが作用するウィルス増殖ステップの特定を目指す。

Serbus らは、ショウジョウバエ生殖細胞においてボルバキアが RNA 結合タンパク質と近接して分布し、共に細胞質を移動することを報告している。また、ボルバキアが標的としていると考えられる宿主の性決定機構や RNA ウィルス増殖抑制では、RNA や RNA 結合タンパク質が中心的な役割を果たしている。以上のことから、ボルバキアは宿主の RNA 制御機構を標的としている可能性があると考えた。そこで、特に宿主の RNA 結合タンパク質に注目し、それらをコードする遺伝子の変異体を用いた実験を行う。

### 3. 研究の方法

キイロショウジョウバエに感染するボルバキア系統 wMel, wAu を用いる。ボルバキアが標的とするウィルス増殖ステップの同定には、構造タンパク質を欠く Sindbis ウィルスの発現を誘導できるショウジョウバエ系統を用いる。GAL4/UAS システムを用いて発現を誘導し、ボルバキア感染によってレポータータンパク質の発現が変動するか観察する。

ボルバキアが作用する宿主因子の同定には、ショウジョウバエ変異体、遺伝子ノックアウト系統を用い、ボルバキア感染時の現象を再現する遺伝子を同定する。変異体、RNAi 誘導個体に RNA ウィルスを胸部にインジェクションし、数日後個体から RNA を回収しウィルス RNA 量を調べる。ボルバキア感染のように、RNA ウィルスの増殖が抑えられる遺伝子を同定する。

Serbus らの報告では、ショウジョウバエの生殖細胞にてボルバキアは RNA 結合タンパク質と共局在している。ボルバキアが増殖を抑える RNA ウィルスはショウジョウバエでは体細胞に感染することが知られている。また、ボルバキアによるウィルス増殖抑制は細

胞自律的に起こることが示唆されている。よって、ボルバキアは体細胞内で RNA ウィルスと相互作用している可能性があることから、体細胞でのボルバキアと RNA 結合タンパク質の局在を調べる。

### 4. 研究成果

ボルバキアによるウィルス増殖抑制では、細胞内でのウィルスの複製が抑えられているのか、またはウィルス粒子の形成ステップが阻害されているのか明らかとなっていない。そこで、ウィルス増殖過程のうちウィルス粒子形成ステップを欠く UAS-Sindbis-GFP 系統 (Hardy 博士より分与) を用い、ボルバキア感染の影響を調べた。UAS-Sindbis-GFP は構造タンパク質をコードする遺伝子が GFP に置き換わっている。GAL4 により転写された +鎖 Sindbis-GFP RNA から非構造タンパク質が翻訳され、-鎖 RNA が作られる。-鎖 RNA から RNA ポリメラーゼにより GFP をコードする subgenomic RNA が作られ、GFP が発現する。この UAS-Sindbis-GFP の発現を heat shock-GAL4 により誘導すると、ボルバキア非感染個体において腹部で強い GFP シグナルが見られた (図 1 上段)。一方、ボルバキア (wMel) 感染個体では GFP シグナルは減弱していた (図 1 下段)。

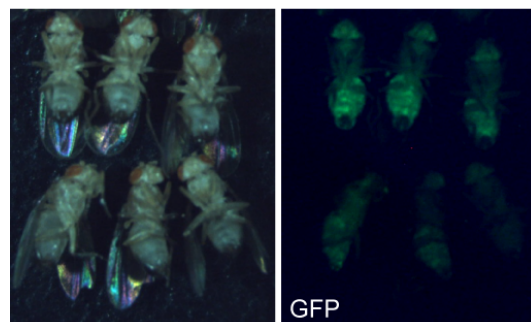


図 1 Sindbis-GFP の発現はボルバキアによって抑えられる。(上段) ボルバキア非感染個体 (下段) ボルバキア感染個体

また、GFP 発現が抑えられる組織を詳細に調べたところ、マルピーギ管での発現がボルバキアによって抑制されていた。一方、中腸、脂肪体での発現には影響がなかった。ボルバキア (wMel) の感染状態を調べたところ、マルピーギ管ではすべての分化した細胞で感染が見られたが、中腸、脂肪体では感染細胞は限られていた。一方、ボルバキア系統 wAu は脂肪体での感染も顕著であり、Sindbis-GFP の発現も抑えられていた。以上のことから、ボルバキアは RNA ウィルスの粒子形成ステップを阻害するのではないことがわかった。また、GFP の発現が抑えられている組織にはボルバキアが顕著に感染していたことから、ボルバキアが細胞自律的にウィルスの増殖を抑えることが推測された。

Serbus らにより報告された、ショウジョウバエ生殖細胞での RNA 結合タンパク質とボル

バキとの共局在が、体細胞でも観察されるかどうかを調べた。ショウジョウバエ生殖細胞では、卵へと成長する細胞へ、それと連なる細胞から RNA が微小管を伝って輸送されることが知られている。それら RNA は輸送中に翻訳が抑制されており、様々な翻訳調節因子が結合している。それら因子のうち、体細胞でも発現しているものについて調べたところ、卵巣の体細胞 (図 2)、マルピーギ管にてボルバキアと共局在していることがわかった。

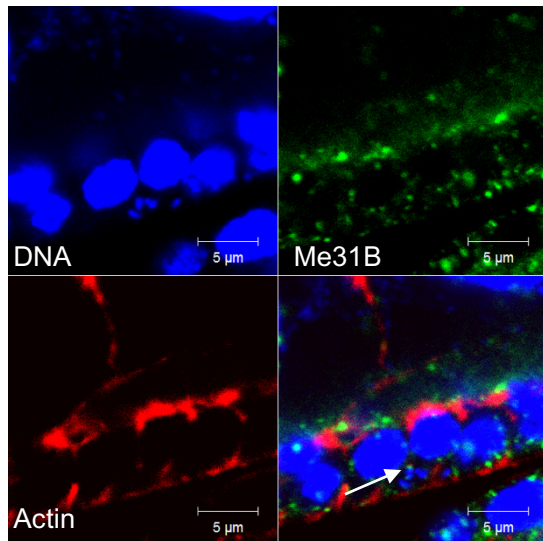


図 2 ボルバキアと RNA 結合タンパク質の体細胞での共局在 (矢印)

以上のように、体細胞においてもボルバキアと RNA 結合タンパク質の相互作用が示唆されたことから、宿主体細胞で発現する RNA 結合タンパク質の機能低下または増強が RNA ウイルス抵抗性上昇につながっている可能性について検証した。

ショウジョウバエ Bloomington ストックセンターにある hairpin RNA を発現する UAS 系統から、体細胞で発現する RNA 結合タンパク質を標的とするものを取り寄せ、heat shock-GAL4 により発現誘導を行ったのち、Drosophila C virus を感染させた。その後、個体より RNA を回収し、ウイルス RNA 量を計測した。その結果、Me31B をノックダウンした

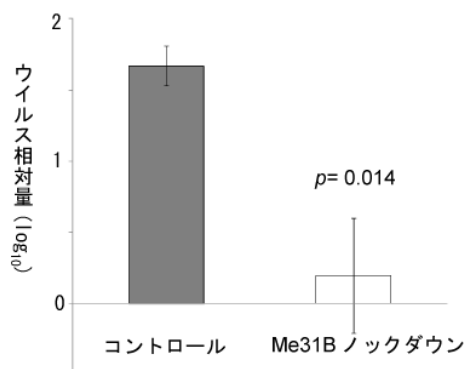


図 3. RNA 結合タンパク質 Me31B ノックダウンによるショウジョウバエ個体でのショウジョウバエ C ウイルスの増殖の抑制

際にウイルスの増殖が抑えられていることがわかった (図 3)。また、me31B 機能欠失変異をヘテロ接合で持つ個体では Drosophila C virus の増殖が抑えられ、感染後の生存率が上昇した (図 4)。

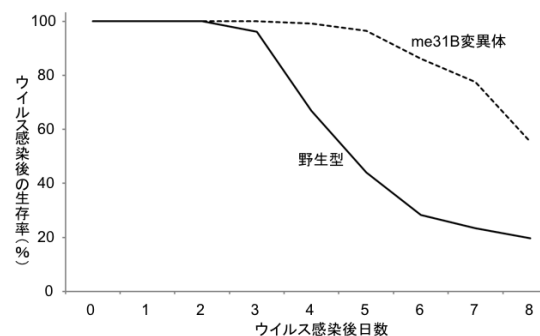


図 4 Drosophila C virus 感染後の生存率

また、ボルバキアが増殖を抑えることが知られている Flock house virus にも同様の効果が見られた。ボルバキアが増殖を抑えないことが知られている DNA ウイルスの IIV6 の増殖を PCR により計測したところ、変異の効果は見られなかった。また、それぞれのウイルスの TCID50 を計測したところ、変異の導入により Drosophila C virus、Flock house virus は減少したが IIV6 には効果がなかった。また、ボルバキア感染個体において、me31B 遺伝子のコピー数を増加させると、ボルバキアの効果が抑えられることがわかった。以上のことから、me31B の機能低下によって、ボルバキア用の RNA ウイルス抵抗性上昇が見られることがわかった。

ボルバキアは宿主の細胞外では増殖できず、個体間の水平伝播の頻度は高くないと言われている。よって、垂直伝播による母親から子への伝達是最も主要な感染経路となる。そのためには生殖細胞に感染すること、将来卵となる細胞へ感染することが最も重要となる。胚発生期に始原生殖細胞が形成される領域には Aub, AGO1 などの RNA 結合タンパク質が集積している。卵巣では将来卵となる細胞へ RNA や RNA 結合タンパク質が輸送されることが知られている。ボルバキアは、これら RNA、RNA 結合タンパク質と共局在しており、同様の動態を示すことにより効率的に次世代へと伝わっている可能性がある。これら母性因子と相互作用する能力がボルバキアの引き起こす性、生殖操作、RNA ウイルス増殖抑制の基盤となっている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Manabu OTE, Misaki KURATA and

Shoichiro KURATA, Genetic analysis of virus resistance induced by symbiotic bacteria *Wolbachia*, The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2013 12/3-6, Kobe Port Island (Hyogo・Kobe)

(2) Manabu Ote and Shoichiro Kurata, RNA virus resistance induced by the bacterial endosymbiont *Wolbachia*, Young Researcher's conference, 2013 4/18-19, Gonryo-kaikan (Miyagi・Sendai) Japan

(3) Manabu Ote and Shoichiro Kurata, *Wolbachia*-mediated virus resistance in *Drosophila melanogaster*, 7<sup>th</sup> International *Wolbachia* conference, 2012, St Pierre d' Oleron, France

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大手 学 (OTE, Manabu)

東北大学・大学院生命科学研究科・研究支援者

研究者番号：20386717

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：