

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14946

研究課題名(和文) 共生細菌に学ぶRNAウイルス制御

研究課題名(英文) RNA virus regulation based on symbiotic bacteria

研究代表者

倉田 祥一郎 (Kurata, Shoichiro)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90221944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、人的交流のグローバル化や気候温暖化などによって、昆虫などの節足動物が媒介するウイルス病の脅威が加速している。この問題に、共生細菌の研究から大きな手がかりが与えられている。すなわち、共生細菌ボルバキアが、共生したショウジョウバエに、プラス鎖一本鎖RNAウイルスに対する抵抗性を付与することが報告された。本研究では、研究代表者が明らかにした共生細菌によるウイルス抵抗性付加機構を基盤に、共生細菌を模倣する抗ウイルス薬の開発に必要な探索系の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, the viral diseases mediated by arthropods such as insects become severe problems due to globalization and climate changing. A big clue has been given to this problem from studies of symbiotic bacteria, which is that symbiotic bacteria, Wolbachia, inhibits the replication of RNA viruses in the host insect and induces host resistance against RNA viral infections. In this research, we developed a screening system necessary for the development of antiviral drugs based on the mechanism of virus resistance mediated by symbiotic bacteria.

研究分野：生物系薬学

キーワード：共生細菌 抗ウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、人的交流のグローバル化や気候温暖化などによって、昆虫などの節足動物が媒介するウイルス感染症の脅威が加速している。実際平成 26 年には、約 70 年ぶりに蚊が媒介するデング熱の国内感染が確認され、感染数は 160 名を越えた。同じく蚊が媒介するジカ熱は、平成 27 年に南米などで流行し、世界保健機関により国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態が宣言されるという事態にまで発展した。このような、節足動物が媒介するウイルス感染症だけでなく、エボラ出血熱や鳥インフルエンザといった近年になって国際的に懸念が高まっている新興ウイルス感染症の問題も大きく、ウイルス感染症の被害を防止する抗ウイルス薬等の開発が望まれている。

抗ウイルスを達成するためには、ウイルスが感染する宿主細胞には影響を与えずに、ウイルスのみを排除する必要がある。このため、現在開発が進められているウイルス制御は、ウイルスゲノム塩基配列やウイルスタンパク質などを標的とせざるを得ない。したがって、これらの技術は個別のウイルスを対象としたものとなり、広範なウイルスに汎用的な抗ウイルス技術とはなりにくい。

この問題に、共生細菌の研究から大きな手がかりが与えられた (Hedges et al. Science 2008, Teixeira et al. PLoS Biol. 2008)。細胞内共生細菌は、自立増殖が出来ないために、宿主に利益を与え共生関係を維持する。共生細菌ボルバキアは、自身が共生する宿主個体の生存、すなわち自己伝搬を優位にするために、共生した個体に RNA ウィルスに対する感染抵抗性を付与することが明らかとなった (図 1)。この共生細菌が誘導するウイルス抵抗性は、調べられた全てのプラス鎖 RNA ウィルスに対して認められている。さらには、自然界ではボルバキアが共生していないネッタシマカに、ボルバキアを人為的に共生させても、蚊が媒介する感染症を引き起こすデングウィルス、チャクンゲンニャウィルスの蚊体内での増殖を抑制できることが示され、共生細菌は、特定の宿主だけではなく抗ウイルス抵抗性を付与できることが明らかとなった (Moreira et al. Cell 2009)。これらのことから、共生細菌そのものを、昆虫が媒介するウイルス感染症の対策に利用し

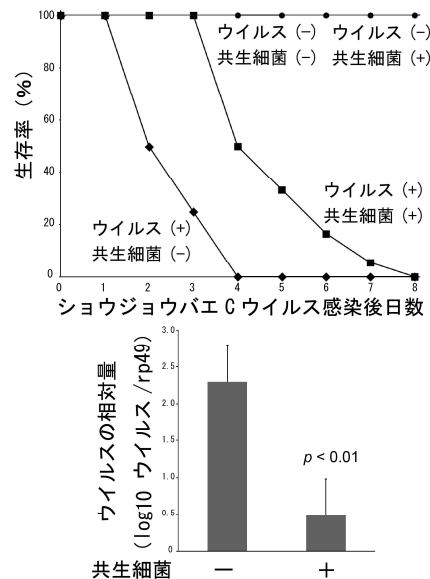


図 1 共生細菌によるウイルス抵抗性の付与 (上) とその際の宿主体内でのウイルス増殖 (下)

たウイルス制御の取り組みがなされている (Hoffmann et al. Nature 2011, Walker et al. Nature 2011)。

この取り組みでは、人為的にボルバキアを共生させた蚊を野外に放ち、通常はボルバキアを共生していない蚊の集団を、ボルバキアが共生した蚊の集団に置き換えて、ウイルス感染症の拡大を防ごうとするものである。しかしながら、共生細菌を保菌するベクターを自然界に大量に放つことは、マラリアなど他の媒介性感染症を蔓延させる危険性が高く真の意味では現実的ではない。また、ボルバキアは、昆虫にしか感染せず、ウイルス感染症対策へのボルバキアの利用は宿主が昆虫である場合に限定される。

研究代表者は、ショウジョウバエにおいてボルバキアが、RNA ウィルスの複製に必須な宿主因子 RNA 結合タンパク質 (RBP) を操作して、宿主にウイルス耐性を付与していることを明らかにした (未発表)。また、この RBP は進化的に保存された因子であり、哺乳動物培養細胞でも RBP ホモログは、RNA ウィルスの増殖に必要であった。この研究成果により、ウイルス複製に必要な進化的に保存された RBP を操作し、宿主にウイルス耐性を付与するという共生細菌の戦略を、抗ウイルスに模倣する化合物の開発が可能となった。このような化合物を薬剤として用いることで、ボルバキアを共生させたベクターを野外に放つのではなく、昆虫媒介性ウイルス病の対策が可能になるだけでなく、共生細菌そのものを

利用できない種のウイルス感染症、例えばヒトのウイルス感染症や農水産物のウイルス病に対する、これまでに例を見ない抗ウイルス薬の開発が可能となることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究は、ウイルス複製に必要な進化的に保存された RBP を、共生細菌が操作し、宿主にウイルス耐性を付与するという研究代表者独自の知見に基づいて、共生細菌を模倣する化合物を探索するスクリーニング系の開発を目指す。

この系で探索し同定する化合物は、共生細菌を模倣しウイルス媒介ベクター（昆虫）内でのウイルスの増殖を抑制する薬剤として、ベクターが媒介するウイルス病対策に有効であることが期待できる。さらに、RBP が種を越えて保存されており、RNA ウイルスの増殖に必要であることから、RBP 標的化合物は、ヒトのウイルス感染症に対する抗ウイルス薬、あるいは植物・動物の RNA ウイルス病に対する抗ウイルス農薬や動物用医薬品として展開することが可能である。共生細菌は、長年の共進化により、宿主には悪影響を与えずに、RNA ウイルスの増殖のみを抑制することに成功している。したがって、共生細菌を模倣する薬剤はその安全性についても期待がもてる。また、RBP 変異体はウイルス感染症に抵抗性を示すことから、RBP の変異を利用したウイルス抵抗性品種の開発への展開も期待できる。

## 3. 研究の方法

共生細菌は、宿主因子 RBP とウイルス RNA との結合を特異的に阻害する。そこで、本研究では、ショウジョウバエ培養細胞の系で、RBP とウイルス RNA との結合を、共生細菌のように阻害する化合物を探索するスクリーニング系の確立を目指した。平成 27 年度に、共生細菌を模倣する抗ウイルス薬のための化合物探索系の開発を行ったが、多検体スクリーニングに必要な検出感度を得ることが出来なかった。そこで研究目的を達成するために、当初の計画を変更することにした。すなわち、ショウジョウバエ培養細胞に共生細菌を感染させ、共生細菌によるウイルス抵抗性付与を培養細胞で再現できる系を確立した。そして、平成 28 年度において、この系

が共生細菌を模倣する抗ウイルス薬の開発に必要なスクリーニング系として利用できるかどうか検討した。

## 4. 研究成果

(1) 当初、宿主因子 RBP に着目して、共生細菌を模倣する抗ウイルス薬のための化合物探索系の開発を行ったが、多検体スクリーニングに必要な検出感度を得ることが出来なかった。そこで当初の計画を変更し、研究目的を達成することにした。そのために、まずショウジョウバエ S2 細胞に、ボルバキアが感染したカイコ細胞の培養上清を加え数ヶ月間継代培養した。その後、ボルバキアゲノムを特異的に検出する PCR と、ボルバキアの細胞内での存在を細胞染色により調べた。その結果、培養細胞を継代しても、ボルバキアの感染が維持されていることを確認できた。そこで、RNA ウイルスであり、ショウジョウバエに感染するショウジョウバエ C ウイルス (DCV) を用いてウイルスの増殖を調べた。その結果、ボルバキア感染 S2 細胞では、非感染 S2 細胞に比較して、DCV ウイルスゲノム量が低下していた。この結果は、培養細胞を用いて、共生細菌によるウイルス抵抗性付与を検出できる系が確立できたことを示している。

そこで、平成 28 年度には、この系が共生細菌を模倣する抗ウイルス薬の開発に必要なスクリーニング系として利用できるかどうか検討した。その結果、ショウジョウバエ個体と同様に、ボルバキアが宿主因子 RBP 依存に、培養細胞にウイルス抵抗性を付与していることが明らかとなった。この結果は、共生細菌が感染した培養細胞を用いて、宿主個体と同様に共生細菌を模倣する抗ウイルス薬のスクリーニングが可能となったことを示している。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究により、培養細胞を用いて、共生細菌によるウイルス抵抗性付与を検出できる系が確立でき、またこの系が、ボルバキアが共生した個体と同様な抗ウイルス効果を示していることが明らかとなった。このことは、共生細菌を模倣する抗ウイルス薬のスクリーニングを可能とするものであり、これまでにない新たな視点からのウイルス制御・抗ウ

ウイルス薬の開発に新たな道筋をつけるものとなった。

冒頭に述べたように、近年、人的交流のグローバル化や気候温暖化などによって、昆虫などの節足動物が媒介するウイルス感染症の脅威が加速しており、このような新興・再興ウイルス感染症の被害を防止する抗ウイルス薬等の開発が望まれている。加えて、ヒトに対する感染症だけでなく、農作物、畜産物、養殖水産物の生産に対しても、ウイルス病は依然として甚大な被害を与えている。さらに、その発生リスクは年々増大しているとも言われている。植物ウイルスの80%は、RNAウイルスである。我が国のその年間被害額は1000億円に登るという試算がある(朝日新聞、植物の世界)。昆虫が媒介するRNAウイルス病であるモザイク病だけでも、その年間被害額は50億円に登る(農林水産省、「aff」2011年8月号)。昆虫などが媒介するウイルス病は、農作物だけでなく、ウシのアカバネ病など畜産物へも大きな被害を与える。ダニによる感染症だけでも全世界で140~190億ドルもの被害がある(国連食糧農業機関(FAO)1997)。畜産業は、昆虫媒介性のウイルス病以外にも、RNAウイルスによる口蹄疫、トリインフルエンザなどで壊滅的な被害を受ける。水産業においても、ウイルス病の被害は大きく、魚病だけでも年間被害額は100から200億円と言われている。カキなどへのノロウイルスの被害も身近な例である。このように、農作物、畜産物、養殖水産物の生産者にとって、ウイルス病を制御することは極めて重要である。一方で、食の安全を求める消費者は、ウイルスなどの病原体を殺菌する薬剤の使用は極力望んでいない。また、環境保護や薬剤耐性ウイルスの出現などにも配慮が求められている。本研究は、人類の保健衛生の向上、加えて食と環境への安全を考慮した農水産物の生産性の向上のために、長年の共進化の過程で、共生細菌が種を存続させるために身につけた術を利用する新技術の開発を可能にした点で評価できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

## 倉田祥一郎

Study of endosymbiont-induced anti-virus effects in host insects (招待講演)

第89回日本細菌学会総会

March 24, 2016, Osaka, Japan

## 神啓佑、倉石貴透、倉田祥一郎

ショウジョウバエ培養細胞を用いた細胞内共生細菌 Wolbachia による宿主ウイルス抵抗性付与機構の解析

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会

2015年12月1日-4日、神戸

〔図書〕(計 1件)

矢野環、倉田祥一郎

化学同人、BIOSCIENCE シリーズ「共生微生物」大野博司編、2016、281(85-93)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei\\_original.html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉田 祥一郎 (KURATA Shoichiro)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：90221944

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし