

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02215

研究課題名(和文) 共生細菌ボルバキアによるRNAウイルス抑制機構の全容解明

研究課題名(英文) The mechanism of Wolbachia-mediated RNA virus blocking

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：節足動物に広く感染する細胞内共生細菌ボルバキアは、宿主の雌化、雄殺し、細胞質不和合性といった性・生殖攪乱や、RNAウイルスの増殖抑制を引き起こす。このボルバキアの抗ウイルス効果のメカニズムを明らかにするため、ボルバキア共生ヤブカ培養細胞を用いた詳細な解析を行い、ボルバキアはウイルスの複製を阻害していることを明らかにし、標的候補となる複数の宿主RNA結合タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボルバキアを利用した感染症ウイルスの撲滅戦略が世界各地で進んでおり、成果を上げつつある。しかし、そのウイルス抑制機構については不明な点が多い。我々は、ボルバキア共生ヤブカ培養細胞を用いた実験系を立ち上げ、ボルバキアがウイルス複製を標的にしていることを明らかにし、ボルバキアが標的とするRNA結合タンパク質を複数同定した。以上の発見は、共生細菌がウイルスを直接阻害するこれまでにない新規の抗ウイルス機構の存在を示唆している。ボルバキアの持つ抗ウイルス活性物質を特定し利用することにより、ウイルス増殖を効果的に抑制できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Wolbachia are the most abundant intracellular bacteria and expected to infect >65% of insect species worldwide. The global Wolbachia pandemic is maintained by their ability to manipulate host biology in diverse ways such as feminization, parthenogenesis, male killing, and cytoplasmic incompatibility. Using an Aedes cell line infected Wolbachia, we revealed that Wolbachia showed their anti-viral effect in a cell-autonomous manner and disturbed virus replication. The impact against virus RNAs could be mediated through RNA binding proteins physically or functionally interacting with P-body proteins.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：ボルバキア RNA ウイルス ヤブカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的大流行を引き起こす病原性ウイルスの出現は、歴史上幾度となく繰り返されてきた。ウイルス増殖を抑制する抗ウイルス薬が開発されてきたが、その殆どが特定のウイルスのみに作用する。そのため、現代においても新規病原性ウイルスの出現の前には為す術がなく、広範なウイルスに効果を示す制御法の開発が求められている。

60%以上の昆虫種の細胞内には、グラム陰性細菌のボルバキアが共生している。ボルバキアは、宿主昆虫の生理・生態を大きく変化させることが知られており、デング熱やジカ熱を媒介するヤブカでは、デングウイルス、ジカウイルス等のプラス鎖 RNA ウイルスの伝播を抑制する。この抗ウイルス効果は極めて顕著であるが、詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

ボルバキアによる RNA ウイルス抑制機構の解明を目指す。申請者は、ボルバキアがショウジョウバエの生殖細胞で宿主 RNA を制御して雌の生殖幹細胞の未分化能を制御していることを発見し、その機構を明らかにした。そこで、同様の機構がウイルス RNA に対しても作用し、その複製を阻害している可能性の検証を行う。

3. 研究の方法

《ボルバキアによるウイルス抑制ステップの特定》

(1) ボルバキア wMel が共生したヤブカ培養細胞 RML-12 にデングウイルスを感染させる。数日後、蛍光 in situ hybridization 法にてウイルス、ボルバキアを検出する。細胞ごとにそれぞれの蛍光強度を測定し、ウイルス量とボルバキア量との相関を見る。

(2) デングウイルスをボルバキア共生ヤブカ培養細胞 RML-12 に感染させる。RNA 抽出後、ウイルス RNA のプラス鎖、マイナス鎖を標的としたタグ配列付きプライマーにより逆転写を行う。タグプライマーにより、プラス鎖とマイナス鎖 RNA をそれぞれ定量する。

(3) デングウイルス Type I の構造タンパク質遺伝子領域を欠いたレプリコンプラスミドと、Type II の構造タンパク質遺伝子を持つプラスミドを HEK293T に導入し、単回感染性粒子を作成する。ボルバキア共生ヤブカ培養細胞 RML-12 に感染させ、複製を RNA-qPCR により観察する。

《ボルバキアによる RNA ウイルス抑制に関与する宿主因子の同定》

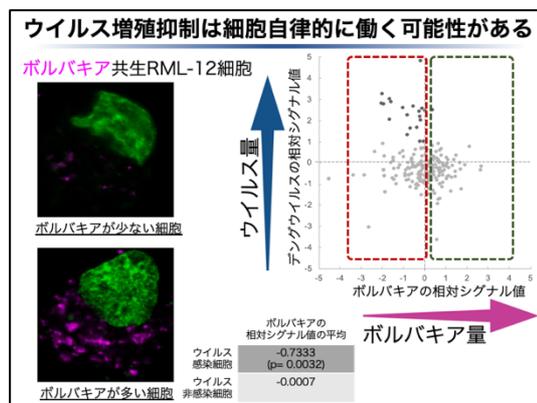
ショウジョウバエ遺伝子データベース Flybase より、申請者が同定したショウジョウバエ雌生殖細胞でボルバキアと相互作用する宿主因子 Cup, Me31B, nos mRNA, orb mRNA との、物理的、遺伝学的相互作用が報告されている遺伝子をピックアップする。それらのヒトスジシマカのオースログ遺伝子をクローニングし、デングウイルス感染ヤブカ細胞での分布を観察する。ウイルス複製サイトへの局在が見られたものについて、二本鎖 RNA を in vitro transcription により作成し、ヤブカ細胞へ導入して遺伝子ノックダウンを行い、デングウイルスの複製を RT-qPCR により観察する。

(研究試料は西條政幸先生、田島茂先生、鈴木亮介先生、脇田隆字先生、加藤文博先生、小西英二先生、日紫喜隆行先生より分与)

4. 研究成果

【ボルバキアの抗ウイルス効果は細胞自律的である】

ボルバキアの効果が、全身性のものなのか、細胞自律的なものであるのか検証を行った。ボルバキア共生ヤブカ培養細胞では、宿主細胞内にボルバキアが共生するが、宿主細胞ごとのボルバキア数は一定ではない。そこで、ボルバキア数によって抗ウイルス効果に変化が見られるか観察した。この細胞株にデングウイルスを感染させ、宿主細胞ごとにボルバキア量とウイルス量を計測したところ、ボルバキアが少ない宿主細胞では顕著にウイルス量が多かった(右図)。この結果は、ボルバキア感染によって誘導される液性因子による、培地中でのウイルス阻害や、宿主細胞の免疫機構の活性化の可能性を強く否定する。つまり、ボルバキアの効果は、共生した宿主細胞限定であることが明らかとなった。



【ボルバキアの RNA ウイルスの複製を阻害する】

以上の結果から、ボルバキアは、RNA ウイルスの細胞侵入、複製、ウイルス粒子形成、細胞からの放出等のステップを阻害している可能性が考えられた。そこでまず、デングウイルス感染初期のウイルス RNA の様子を詳細に調べた。その結果、感染後 1 時間のプラス鎖 RNA 量は、ボルバキア有無で差がなく、

ウイルスの細胞侵入には影響がないことがわかった(右図)。一方、マイナス鎖RNA量がボルバキア共生細胞では減少していた。このことから、ボルバキアは、マイナス鎖RNAの合成や安定性に影響を与えている可能性が考えられた。

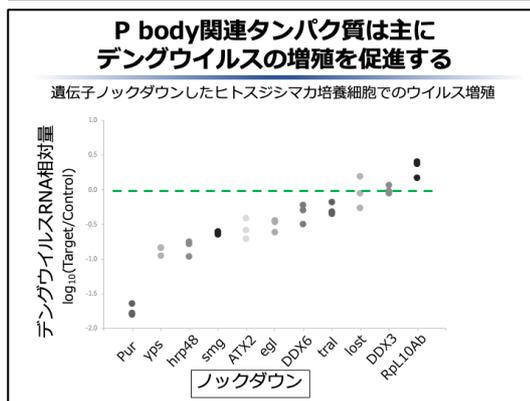
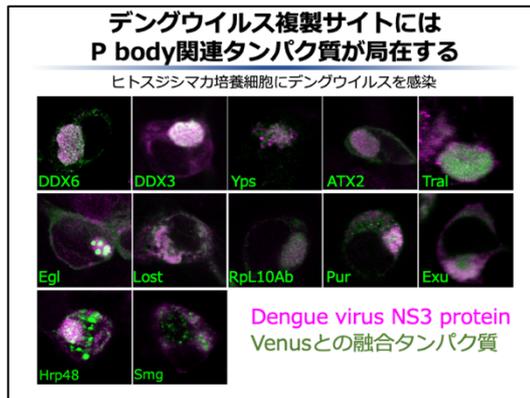
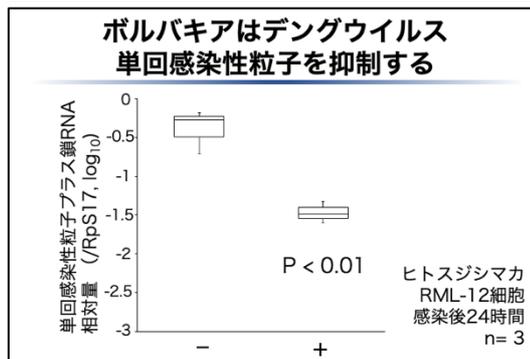
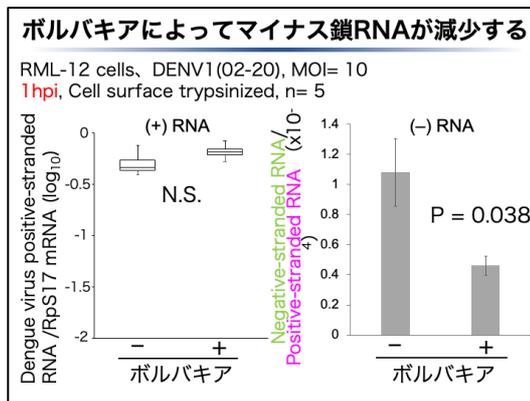
単回感染性粒子は、ウイルスと同様に細胞に感染、複製できるが、構造タンパク質遺伝子を欠いているためウイルス粒子を形成することができない。この単回感染性をボルバキア共生ヤブカ培養細胞に感染させると、その増殖が阻害された(右下図)。このことから、ボルバキアがウイルス複製を阻害していることが明らかとなった。

【ウイルス抑制に関与する宿主因子】

申請者は、昆虫の生殖細胞にて、ボルバキアが宿主RNAと共局在し、その翻訳を制御していることを発見した¹⁻⁴。このRNA制御機構が、RNAウイルスも標的としている可能性を、ボルバキアが共生するヤブカ培養細胞を用いて検証した。まず、候補となるショウジョウバエ59遺伝子のヤブカオースログを、ボルバキアの抗ウイルス効果が観察されるヤブカ培養細胞cDNAより増幅した。クローニングできた24遺伝子の分布を観察したところ、12遺伝子の産物がデングウイルス複製サイトに局在することがわかった(右図)。これらの内、遺伝子ノックダウンができた11遺伝子のウイルス複製への影響を調べたところ、8遺伝子がウイルス複製を促進、1遺伝子がウイルス複製を阻害していることがわかった(右下図)。このことは、ショウジョウバエ雌生殖細胞でRNAを制御するタンパク質群が、RNAウイルスの複製に関与している可能性を示している。

以上、ボルバキアは、ウイルスRNAを標的とし、その複製を阻害している可能性が示された。また、ウイルス増殖に関与する宿主RNA結合タンパク質が複数同定され、新規のウイルス抑制機構の存在が示唆された。

- Ote, M., Ueyama, M. & Yamamoto, D. Wolbachia Protein TomO Targets nanos mRNA and Restores Germ Stem Cells in Drosophila Sex-lethal Mutants. *Curr. Biol.* **26**, 2223-2232 (2016).
- Ote, M. & Yamamoto, D. The Wolbachia protein TomO interacts with a host RNA to induce polarization defects in Drosophila oocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **99**, e21475 (2018).
- Ote, M. & Yamamoto, D. Enhancing Nanos expression via the bacterial TomO protein is a conserved strategy used by the symbiont Wolbachia to fuel germ stem cell maintenance in infected Drosophila females. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **98**, e21471 (2018).
- Ote, M. & Yamamoto, D. Impact of Wolbachia infection on Drosophila female germline stem cells. *Curr. Opin. Insect Sci.* **37**, 8-15 (2020).



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ote Manabu, Kanuka Hirotaka	4. 巻 46
2. 論文標題 A highly secure method for rearing <i>Aedes aegypti</i> mosquitoes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-018-0098-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 大手 学
2. 発表標題 ヤブカにおける共生細菌ボルバキアによるRNAウイルスの制御
3. 学会等名 第72回 日本衛生動物学会 東日本支部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Ote, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Vector control strategies utilizing symbiotic bacteria Wolbachia
3. 学会等名 The 3rd International Joint Symposium Promotion of Infectious Disease Research Cooperation between Africa and Japan toward Science, Technology and Innovation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大手 学
2. 発表標題 ボルバキアによる宿主操作の分子基盤
3. 学会等名 昆虫病理研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018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
3. 学会等名 第74回 日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manabu Ote, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Host manipulation by symbiotic bacteria Wolbachia pipientis in Drosophila and Aedes mosquito
3. 学会等名 14th Japan Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大手 学、嘉糠 洋陸
2. 発表標題 ボルバキアによるデングウイルスRNAの制御
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu OTE
2. 発表標題 Virus RNA and insect germline RNA: Candidate targets of Wolbachia-mediated phenomena
3. 学会等名 EMBO Conference Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors Vector and Disease Control (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabu Ote, Moeko Minakuchi, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 RNAs as potential targets for Wolbachia-mediated phenomena
3. 学会等名 Wolbachia Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------