

## ウイルスに特殊な RNA 高次構造を誘導する新規機構の解明

東京慈恵会医科大学 講師

大手 学

### 背景・目的

世界規模での大流行を引き起こすウイルスの出現は、歴史上幾度となく繰り返されてきた。ウイルス増殖を阻害する抗ウイルス薬は限られており、その殆どが特定のウイルスのみに作用する。そのため、新規のウイルスに対しては為す術がなく、広範なウイルスに効果のある制御法の開発が求められている。

共生細菌のボルバキアは、数億年にわたり昆虫の細胞内に共生している。宿主とは相利関係にあり、共生した昆虫の生存力や繁殖力を増強させる。このボルバキアが引き起こす様々な現象の一つとして、宿主のウイルス抵抗性を上昇させることが知られている。ボルバキアの抗ウイルス機構の標的となるウイルスは、プラス鎖 RNA をゲノムに持つウイルスで、昆虫ウイルスの他、昆虫が媒介するデングウイルスやジカウイルス等も抑制する。これまで、我々の研究グループはこの機構の解明に取り組み、ボルバキアが、共生した昆虫細胞内でウイルス RNA に特殊な高次構造を誘導し、ウイルス複製を阻害することを明らかにした。これは、ウイルス RNA の高次構造を標的とし、広範なウイルスの増殖を抑制できるこれまでにない新規抗ウイルス機構であると考えられる。本課題では、ボルバキアがウイルス RNA の高次構造を操作する仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

### 助成期間の成果

デングウイルス RNA への特殊な高次構造形成が、ボルバキアによるウイルス抑制へ関与している可能性を検証するため、修飾塩基を細胞培地に添加し、高次構造を形成できないウイルス RNA を作成した。ボルバキア共生ヤブカ培養細胞において増殖を観察したところ、ボルバキアの抑制効果が減弱していることがわかった。このことから、ボルバキアはデングウイルス RNA に特殊な高次構造を誘導することにより複製を阻害している可能性が示された。

次に、ボルバキアが標的とする RNA 配列を特定するため、遺伝子操作が容易な昆虫フロックハウスウイルス (FHV) の Trans-replication system を開発した。自己複製能を有するゲノム RNA の RNA3 と、複製酵素 RdRP を別のプラスミドにクローニングし、ショウジョウバエ S2 細胞に導入し発現を誘導したところ、RNA3 の複製が確認できた。この複製はボルバキア共生 S2 細胞では約 1/40 に減少しており、ボルバキアの抗ウイルス効果を詳細に調べることのできる実験系が確立できた。RNA3 に網羅的に変異を導入しウイルスの複製を定量したところ、3'末端付近の配列がウイルス抑制に必要な可能性が示された。RNA 配列の特性から、形成される高次構造を推測することができた。

RNA の高次構造変化に寄与する要因の特定を目指し、RNA の修飾状態を観察した。フロックハウスウイルス Trans-replication system のウイルスゲノムにストレプトアビジン結合性アプタマー配列を挿入し、ボルバキア共生昆虫細胞で複製するウイルス RNA を高純度で単離した。54 種類の修飾塩基について LC-MS により網羅的に定量したところ、ボルバキア共生細胞のウイルス RNA から 3 種類の修飾塩基が 15~77 倍多く検出された。どれもウイルス RNA に含まれる塩基としては初めての報告であり、新規のウイルス抑制機構の存在が示唆された。

### 考察・今後の見通し

本研究より、ウイルス RNA は多様な修飾を受けていることが明らかとなった。また、ボルバキア共生細胞から 3 つの特徴的なウイルス RNA 修飾が見つかった。RNA の二重らせんや複雑な高次構造を形成する分子間の結合力は、修飾により変化することが知られている。そのため、ウイルス RNA の複製に必要とされているステム・ループ構造や、翻訳効率をコントロールする RNA 高次構造が、同定された RNA 修飾によりダイナミックに制御されている可能性が考えられる。例えば、ボルバキアが RNA を修飾することにより、ウイルス複製を促進するステム・ループ構造が解かれ、RNA を“不活化”する構造を誘導しているのかもしれない (図 1)。

ボルバキアは宿主昆虫の生殖細胞内にも共生し、形成される卵の細胞内に入り込むことによって次世代へと伝わる。伝播率は実験室内ではほぼ 100%であり、ボルバキアは生殖細胞内で効率よく増殖し伝播できるように宿主の細胞機能を巧みに操作していると推測される。

昆虫の胚発生初期には、RNA-タンパク質の複合体である生殖質が母親から子へと伝わり、取り込まれた細胞が次世代の生殖細胞となる。母親の生殖細胞内ではボルバキアの周囲に生殖質を構成する RNA とタンパク質が集積し、生殖質と共に次世代の生殖細胞に取り込まれる。生殖質に局在する RNA も、我々がウイルス RNA で見出した特殊な RNA 高次構造を形成することが知られている。この構造は、母親の生殖細胞で作られた生殖質 RNA が、子の生殖細胞まで運ばれる間“不活化”状態を維持する機能があると推測される。ボルバキアの持つ昆虫の生殖質 RNA を制御する機構が、RNA ウイルスを抑制する機構の進化的な起源である可能性も考えられる。

ウイルス RNA の構造を標的としたウイルス抑制機構は、これまで全く手が付けられていない未知の機構である可能性が高いことから、新規 RNA 修飾因子や新たな現象が見いだされると考えられる。これまで調べられたプラス鎖 RNA ウイルスは、すべてボルバキアによって抑制される。そのため、この抗ウイルス機構はプラス鎖 RNA ウイルスを普遍的に抑える可能性がある。今後は、ボルバキアの持つ抗ウイルス因子の解析も進めることで、画期的なウイルス制御法の開発へと繋がるシーズ創出が期待される。

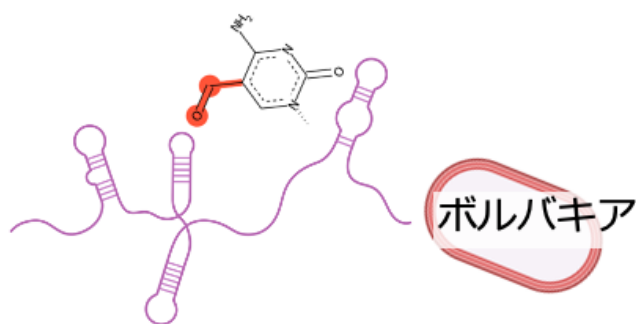


図 1. 予想されるボルバキアによるウイルス抑制機構