

宿主と RNA ウイルスの共生メカニズムの解明

所属：岡山大学 学術研究院 医歯薬学域

助成対象者：本田 知之

共同研究者：なし

概要

RNA ウイルスの多くがコウモリに感染するが、感染したコウモリが症状を呈することはなく、ウイルスと宿主が共生状態にあると考えられている。この共生メカニズムは現時点で不明である。ウイルス感染による症状の多くが免疫応答による病態であることを考えると、コウモリは既知の免疫とは異なる抗ウイルス防御の仕組みを持つか、既知免疫により出現する病態を軽減する仕組みを持つと考えられる。本研究では、コウモリが持つ内在性 RNA ウイルス配列に着目し、その機能解明を通じてコウモリと RNA ウイルスとの共生メカニズムの解明を目指した。その結果、内在性 RNA ウイルス配列はコウモリの宿主遺伝子発現に影響し、非感染時でも高いウイルス感染耐性を示している可能性が示唆された。

abstract

Although many RNA viruses infect bats, infected bats exhibit few symptoms in most cases. Thus, these viruses and bats (hosts) are in a symbiotic state. The mechanism of this symbiosis is currently unknown. Considering that many of the symptoms during viral infections are caused by immune responses against viruses, bats may have an antiviral mechanism that differs from known immunity or a mechanism to attenuate pathologies that emerge due to known immunity. In this study, we focused on the endogenous RNA virus

sequences in the bat genome and aimed to elucidate their functions to understand the mechanism of symbiosis between bats and RNA viruses. We found that endogenous RNA viral sequences may influence host gene expression in bats, and that bats may exhibit high resistance to viral infection even when uninfected.

研究内容

【背景と目的】

2019 年より、新型コロナウイルス感染症が社会問題となっている。ヒトでは大きな社会問題となっているが、このウイルスはコウモリに感染する近縁コロナウイルスがヒトに入ってきたものと考えられている。興味深いことに、コロナウイルスに限らず、RNA ウイルスの多くがコウモリに感染するが、感染したコウモリが症状を呈することはなく、ウイルスと宿主が共生状態にあると考えられている。この共生メカニズムは現時点で不明である。ウイルス感染による症状の多くが免疫応答による病態であることを考えると、コウモリは既知の免疫とは異なる抗ウイルス防御の仕組みを持つか、既知免疫により出現する病態を軽減する仕組みを持つと考えられる。それらのメカニズムを解明することで、病原体とヒトの間に疑似共生状態を作り出すという感染症の新しい制御法が開発できるのではないかと着想した。

近年、コウモリが多彩な RNA ウイルスの自然宿主（不顕性に感染する宿主）になっていることが明らかになってきた。それを受けて、コウモリの免疫の特殊性を探索する研究が世界中で行われている。これまでに、コウモリではウイルス感染で自然免疫が誘導されにくいことや、抗体産生などの獲得免疫も誘導されにくいことなどが報告されている(1)。このことは、コウモリでは既知の免疫の働きが弱くなっていることを示唆し、ウイルス感染による症状が出ないこととも合致する。一方で、ウイルスの無尽蔵な増殖がコウモリで起こるわけではない。このことから、2つの可能性が考えられる。1つは、既存の免疫機構以外の抗ウイルス防御機構をコウモリが持つ可能性である。もう1つの可能性として、ウイルスを制御するレベルの免疫は誘導されるが、それによる症状の発現を軽減する機構をコウモリが持っている可能性も考えられる。

私たちは以前に、RNA ウイルスの遺伝配列と類似した配列が動物ゲノム中に存在することを発見した(2)。これらの配列（内在性 RNA ウイルス配列）は、太古に祖先 RNA ウイ

ルスが祖先動物に感染した際に、RNA ウイルスの遺伝配列が宿主ゲノムに取り込まれてきたものと考えられている。このような内在性 RNA ウイルス配列をゲノムにもつ動物種は、持たない動物種と比較して、現在の当該 RNA ウイルスによる症状が出にくい傾向がある。つまり、内在性 RNA ウイルス配列には、既知免疫を介さない何らかの抗ウイルス活性があるか、免疫誘導による症状を軽減する活性があると考えられる(3)。

フィロウイルスは、ヒトに感染すると致死率 40-50%であるが、コウモリには病原性を示さない。一方、ヒトゲノムには内在性フィロウイルス配列は存在しないが、コウモリゲノムには存在する。このことから、内在性フィロウイルス配列がコウモリとフィロウイルスとの共生を生み出している可能性が考えられる。本研究では、コウモリに存在する内在性フィロウイルス配列に着目して、フィロウイルスの一種マールブルグウイルスとコウモリとの共生原理を明らかにすることを目的とした。

【結果】

① マールブルグウイルスのミニゲノム系の確立

マールブルグウイルスはバイオセーフティレベル (BSL) 4 病原体であり、研究のためには特別な設備を持つ P4 施設で扱う必要がある。そこで、本研究ではまず、P2 施設で研究可能なマールブルグウイルスミニゲノム系の樹立を試みた。マールブルグウイルスの複製基本単位であるリボタンパク質複合体 (ribonucleoprotein complex, RNP) の構成分子である NP, VP35, L タンパク質を発現するプラスミドと、マールブルグウイルスゲノムの leader 配列と trailer 配列の間にアンチセンス方向にガウシアルシフェラーゼ (GLuc) 遺伝子を挿入したミニゲノムを発現するプラスミドを作成した (図 1)。これらのプラスミドをヒ

図 1 : マールブルグウイルスミニゲノム系の概要

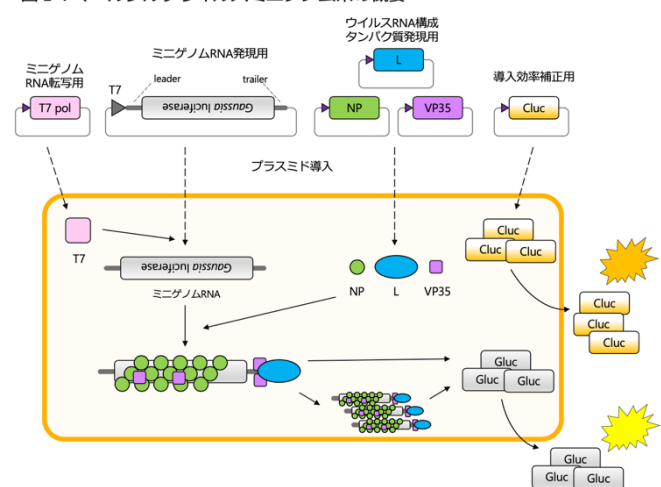
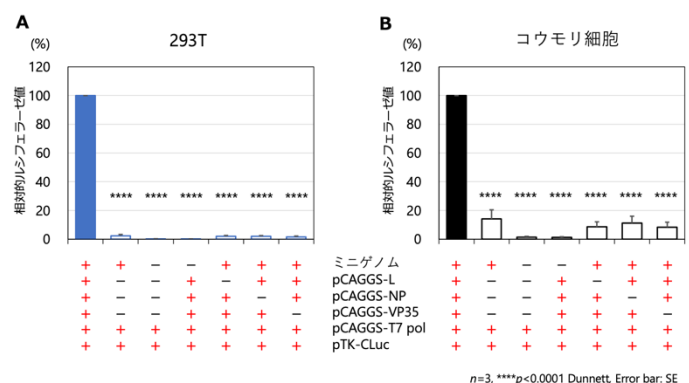


図 2 : マールブルグウイルスミニゲノム系によるウイルスRNP再構成



ト胎児由来 293T 細胞とコウモリ細胞に導入したところ、全てのウイルス RNP 構成分子を発現した時のみ、GLuc の活性を認めた（図 2）。この GLuc 活性は、マールブルグウイルスの転写活性に相関すると考えられた。以上のことから、ウイルスミニゲノムを用いてマールブルグウイルス RNP を再構成するマールブルグウイルスミニゲノム系を確立することができた。

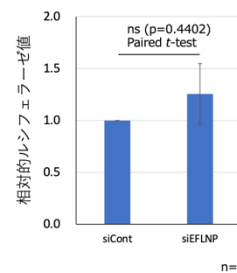
②コウモリの持つ新規内在性フィロウイルス nEFLNP1 (novel EFLNP1) 配列の発見

これまでに報告されてきたコウモリゲノムにある内在性フィロウイルス配列は、ウイルスの VP35 遺伝子に由来する EFL35 と、NP 遺伝子に由来する EFLNP であった。私たちは、これまでに EFL35 あるいは EFLNP が見つかったコウモリ種以外のコウモリゲノムに、新規内在性フィロウイルス配列 nEFLNP1 を発見した。

③マールブルグウイルス転写活性制御における nEFLNP1 の働きの検討

この nEFLNP1 を持つコウモリ種由来細胞では、マールブルグウイルスミニゲノム系で GLuc 活性を検出できた（図 2 B）ことから、このコウモリ細胞を使い nEFLNP1 によるマールブルグウイルス転写活性制御の検討を行うことにした。nEFLNP1 をノックダウンした細胞

図 3：nEFLNP1 ノックダウンによるマールブルグウイルス転写活性への影響

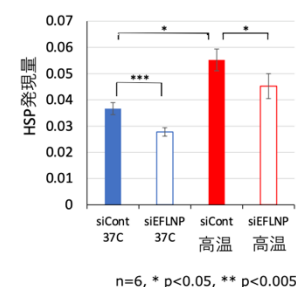


でミニゲノムアッセイを行ったところ、ノックダウンの有無に関わらず同程度の GLuc 活性を示した（図 3）。このことから、nEFLNP1 にはマールブルグウイルスの転写を直接制御する活性はないと考えられた。

④EFLNP1 が誘導するコウモリ遺伝子の検討

③の結果から、内在性フィロウイルス配列が抗フィロウイルス活性を持つ可能性については低いと考えられた。そこで、もう 1 つの可能性である抗ウイルス免疫がもたらす病態発現を内在性フィロウイルス配列が軽減する可能性を検討した。抗ウイルス免疫がもたらす症状としてよくあるものが発熱である。発熱に対する生体

図 4：nEFLNP1 ノックダウンによる宿主遺伝子発現への影響



反応として heat shock protein (HSP) の発現誘導がある。私たちは、nEFLNP1 が発熱時の HSP 誘導に関わるのではないかと考え、高温培養時に誘導される HSP の発現に変化がある

か検討した。高温培養時 control 細胞では HSP の誘導を認めたが、nEFLNP1 ノックダウン時には HSP 誘導が抑制された（図 4）。以上のことから、nEFLNP1 は HSP 誘導に関わることが示された。

【考察】

本研究で私たちは、内在性フィロウイルス配列が持つ機能として、2つの可能性を想定した。1つは直接抗マールブルグウイルス活性を示す可能性で、もう1つはマールブルグウイルスに対する免疫応答による変化（本研究では、高温による HSP 誘導）を軽減する可能性である。本研究では、これらの可能性について検証した。

まず、マールブルグウイルスの実験系の確立と、使用するコウモリ細胞が持つ内在性フィロウイルス配列（nEFLNP1）の同定を行った。これにより、上記可能性の検証を行うことができる環境を整えることができた。

次に、上述の可能性のうち前者を検証したが、nEFLNP1 の有無でマールブルグウイルスの転写活性に変化はなかったため、この可能性は低いと考えられた。一方、後者については、nEFLNP1 ノックアウト時に高温による HSP 誘導が抑制されたため、nEFLNP1 獲得により体温上昇時と類似した生体反応を誘導することが考えられた。HSP は免疫制御因子として知られており(4)、コウモリでは nEFLNP1 獲得により常時 HSP が誘導できるようになり、平時のウイルス感染耐性が增強している可能性が考えられた。平時のウイルス感染耐性の增強により、ウイルス感染時にはウイルス増殖が進みにくく、ウイルス増殖に伴う免疫応答が軽減されているのかもしれない。

【今後】

今後は、マールブルグウイルス感染における HSP の役割を解明し、nEFLNP1 獲得による HSP 活性化がコウモリとマールブルグウイルスの共生メカニズムの一端であることを示したいと考えている。それにより、将来的には内在性 RNA ウイルス配列を用いた宿主と RNA ウイルスとの擬似共生状態の樹立を目指したい。

【引用文献】

1. Banerjee A, Baker ML, Kulcsar K, Misra V, Plowright R, Mossman K. Novel Insights Into Immune Systems of Bats. Front Immunol. 2020 11:26. doi:

10.3389/fimmu.2020.00026.

2. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*. 2010 463(7277):84-7. doi: 10.1038/nature08695.

3. Ogawa H, Honda T. Viral Sequences Are Repurposed for Controlling Antiviral Responses as Non-Retroviral Endogenous Viral Elements. *Acta Med Okayama*. 2022 76(5):503-510. doi: 10.18926/AMO/64025.

4. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules*. 2018 23(11):2846. doi: 10.3390/molecules23112846.

【本助成に関わる成果物】

[論文発表]

1. 本田知之「ウイルスと宿主との共生から見るウイルス病原性」岡山医学会雑誌 Vol. 134 No. 1 p.10-15、2022

2. Ogawa H, Honda T. Viral Sequences Are Repurposed for Controlling Antiviral Responses as Non-Retroviral Endogenous Viral Elements. *Acta Med Okayama*. 2022 76(5):503-510. doi: 10.18926/AMO/64025.

[口頭発表]

1. 本田知之、内在性ウイルス様配列とその功罪、S-SPING Seminar, 2022 年 12 月 9 日、島根大学医学部国際交流ラウンジ（出雲市）

[ポスター発表]

1. 小川 寛人, 難波ひかる, 本田 知之、マールブルグウイルスのミニゲノムシステム構築およびコウモリ細胞における転写複製活性の測定、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、2022 年 11 月 13-15 日、長崎

2. 小川 寛人, 難波 ひかる, 加藤 大和, 本田 知之、コウモリ細胞におけるマールブルグウイルスミニゲノムレポーターアッセイの構築、第 36 回中国四国ウイルス研究会、2022 年 10 月 29-30 日、徳島

〔その他〕

アウトリーチ活動

1. 本田知之、岡山大学 令和4年度高校生のための大学講座「新型コロナウイルスはどこへ向かうのか？」2022年8月10日

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人住友電工グループ社会貢献基金に厚く御礼申し上げます。