

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19084

研究課題名(和文) 日本脳炎ウイルスの蚊細胞への感染機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of Japanese encephalitis virus infection in mosquito cells

研究代表者

鎌田 龍星 (KUWATA, Ryusei)

山口大学・共同獣医学部・学術研究員

研究者番号：00711219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本脳炎ウイルスJapanese encephalitis virus (JEV) は世界で年間数万人の感染者及び1万数千人の死者を生じる重要なウイルス感染症である。JEVは豚や鳥を増幅動物とし、蚊によって媒介される。JEVの細胞受容体は脊椎動物細胞でいくつか報告されているが、蚊細胞ではごく限られている。我々は、蚊細胞のウイルス受容体を探索する研究で、JEVのウイルス様粒子Virus-like particles (VLPs)を用いた新たな実験系を確立した。今後、この技術を応用して引き続きJEVの蚊細胞受容体の探索を行い、蚊媒介ウイルスの蚊細胞への感染機序の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Japanese encephalitis virus (JEV) causes viral encephalitis in Asia, estimating nearly 68000 clinical cases of JE globally each year. JEV is transmitted by mosquitoes, and maintained in a cycle between mosquitoes and vertebrate hosts, such as pigs and birds, in nature. Some of JEV receptor on cell surface has been reported on vertebrate cells, but a little or none on mosquito cells. We have established a new experimental systems to examine the cell factor binding to JEV by using virus-like particles (VLPs). Now we applied the JEV_VLPs systems to elucidate the mechanisms for the JEV infections on mosquito cells.

研究分野：公衆衛生

キーワード：節足動物媒介感染症 蚊 ウイルス 細胞 受容体

1. 研究開始当初の背景

蚊やマダニは吸血の際にヒトや動物へウイルス等の病原体を媒介する、公衆衛生上の重要な節足動物である。これら節足動物によって媒介される病原ウイルスは節足動物媒介性ウイルス Arthropod-borne virus (アルボウイルス Arbovirus) と総称され、世界で広く問題となっている。これらアルボウイルスは媒介節足動物 - 脊椎動物間で感染環が維持されており、この異なる生物間の往来がアルボウイルスの永続的な感染力と病原性の維持に重要と考えられている

日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) はフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、アジアを中心に世界で年間数万人の感染者及び1万数千人の死亡者を生じる、重要なアルボウイルス感染症である。JEV は豚や鳥を増幅動物とし、蚊 (主にコガタアカイエカ) によって媒介される。

ウイルスは細胞に感染する際、自身の外皮蛋白質と細胞表面の受容体蛋白質とを連結させて結合する。アルボウイルスの場合、脊椎動物、節足動物に類似またはそれぞれに異なる受容体を利用していると考えられている。JEV の宿主細胞受容体については、脊椎動物細胞でいくつか示されているが、昆虫細胞では同定されていない。

2. 研究の目的

我々は、これまで JEV の感染機序の解明や高感度検出系の確立に関する分子生物学的研究、JEV の感染環や越冬機序の解明に関する分子疫学的研究に取り組んできた。その過程において我々は、JEV エンベロープ蛋白質 (E) のアミノ酸 387-399 番目に該当する RGD 領域が、蚊細胞への効率的な感染に重要な役割を担う可能性を見出した。JEV_RGD 領域は E 蛋白質の外部ドメインであることから、この領域が細胞接着因子として機能している可能性が考えられる。

そこで本研究では、この JEV_RGD 領域と相互作用する蚊細胞受容体の探索を行い、JEV の蚊細胞への感染機序への理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) JEV_RGD ペプチドの合成と解析

JEV_RGD 領域を含む遺伝子断片を pGEX-6P-1 ベクターにクローニング後、大腸菌 DH5 で蛋白質を発現し、JEV_RGD 領域を含む蛋白質 23aa を GST 融合蛋白質として合成・精製した (GST_RGD)。比較対象として、脊椎動物細胞での継代により得られた JEV 変異株由来のペプチド GST_RGN を同様に合成・精製した (図 1)。精製した各蛋白質の蚊細胞または脊椎動物細胞に対する細胞吸着性を検証するため、フローサイトメトリー解析を行った。

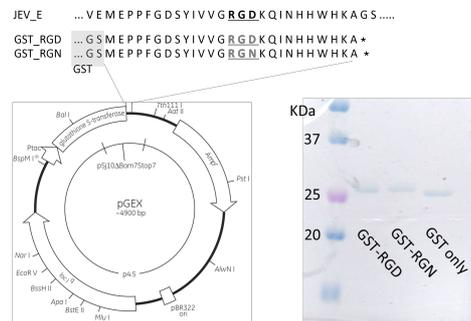


図 1 クローニングしたプラスミドのマップ (左) と、合成・精製したペプチドをポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ゲルを CCB 染色した画像 (右)

(2) JEV のウイルス粒子様構造物 (Virus-like particles; VLPs) の作製と応用

Inagaki et al. (2016) を参考に、タグ蛋白質を導入した JEV_VLPs の作製を試みた。JEV/Bo/Miyazaki/1/2009 株の遺伝子の一部にタグ蛋白質の遺伝子を組み込んだ配列を pCAGGS ベクターにクローニングした。得られたプラスミドを HEK293 細胞に導入し、培養上清中への JEV_VLP の生成をウエスタンブロットによって観察した。また、PCR により RGD 領域に変異または欠損を導入したプラスミドを作製し、オリジナルのプラスミドと同様に JEV_VLPs が合成されるか検証した。

4. 研究成果

(1) 合成した各ペプチドを用いて、フローサイトメトリーによる細胞吸着性を調べた。その結果、GST_RGD ペプチドは脊椎動物細胞への吸着は認められたが、蚊細胞への吸着は認められなかった。また、GST_RGN ペプチドは、蚊細胞、脊椎動物細胞のどちらにも吸着が認められなかった (図 2)。

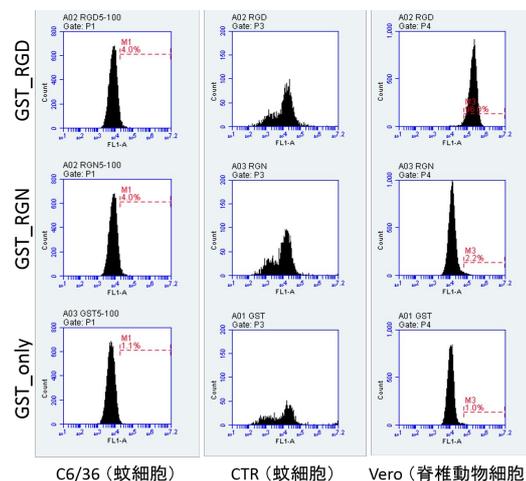


図 2 合成ペプチドの各種培養細胞に対する吸着性。最下列の GST-only (コントロール) と比較して、Vero 細胞 (アフリカモドリザル由来) の GST_RGD は赤い点線のエリアに細胞が検出され、GST_RGD ペプチドが吸着した細胞を多く検出していることを示している。

一般に、アミノ酸の RGD 配列は、細胞接着性蛋白質に共通する細胞接着活性配列として知られており、今回検出された GST_RGD の Vero 細胞との接着は、Vero 細胞表面に分布するインテグリンとの結合が考えられた。これらのことから、JEV_RGD 領域の細胞吸着性を調べるためには、E 蛋白質の立体構造が維持された状態で解析を行う必要があると考えられた。

(2) JEV E 蛋白質の立体構造を維持したまま細胞吸着性の解析を行いたいと考え、次に、JEV の VLPs を作製し、解析に応用することを試みた。Inagaki et al. (2016) を参考に、JEV の preM-E をコードする遺伝子に Strep、Flag を導入した配列をデザインし、pCAGGS ベクターでクローニングを行った後、HEK293 細胞にトランスフェクションし、JEV_VLPs の生成を試みた。その結果、トランスフェクションを行った HEK293 細胞の培養上清中に、E 蛋白質と融合した Strep 蛋白質を検出することが出来、これらの培養上清中に JEV_VLPs が生成されていることが示された(図 3)。次に、オリジナルの RGD 配列に対し、PCR によって RGD 配列を RGG、RGN、RG に変異させたプラスミドを作製し、同様に VLPs が得られるか検証した。その結果、RGG、RGN プラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞の培養上清では、E 蛋白質と融合した Strep 蛋白質を検出することが出来たが、RG プラスミドでは HEK293 細胞内での遺伝子発現は認められたものの、培養上清中への出芽は認められなかった(図 3)。これらの結果から、JEV_RGD は JEV の出芽や粒子形成に重要である可能性が示唆された。

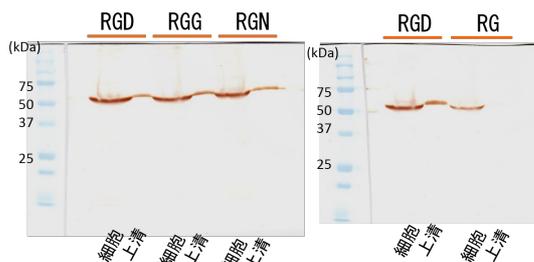


図 3 JEV_RGD 領域を、RGG、RGN、RG に変異させ、各プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションした 3 日後の細胞および培養上清を抗原としたウエスタンブロット。RGD、RGG、RGN では細胞および培養上清に特異的バンドが検出されるが、RG では培養上清にバンドが検出されない

本研究により、JEV_VLPs によるアッセイ法を確立することに成功した。今後は JEV_RGD 領域に変異を導入した VLPs とオリジナル株との比較を行い、フローサイトメーターやセルエライザによる細胞吸着性の解析と、ウエスタンブロット等により、JEV_RGD と相互作用する細胞因子の探索を行う。

<引用文献>

Inagaki *et al.*, Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7 (2016) 723-729

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 7 件)

Kuwata R, Shimoda H, Phichitraslip T, Prasertsincharoen N, Noguchi K, Yonemitsu K, Minami M, Supriyono, Tran NTB, Takano A, Suzuki K, Nemoto M, Bannai H, Yokoyama M, Takeda T, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Maeda K (2018) Getah virus epizootic among wild boars in Japan around 2012. *Archives of Virology*. Accepted. 査読有 doi: 10.1007/s00705-018-3897-4.

Fujita R, Kuwata R, Kobayashi D, Bertuso AG, Isawa H, Sawabe K (2017) Bustos virus, a new member of the negevirus group isolated from a *Man-sonia* mosquito in the Philippines. *Archives of Virology* 162(1), 79-88. 査読有. doi: 10.1007/s00705-016-3068-4.

Sasaki T, Kuwata R, Hoshino K, Isawa H, Sawabe K, Kobayashi M (2017) Argonate 2 suppresses Japanese encephalitis virus infection in *Aedes aegypti*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70(1), 38-44. 査読有 doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.671.

Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Kobayashi M, Maeda K, Sawabe K (2015) Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with *Culex flavivirus* (Flaviviridae). *Journal of Medical Entomology* 52(2), 222-229. 査読有. doi: 10.1093/jme/tju059.

Gillich N, Kuwata R, Isawa H, Horie M (2015) Persistent natural infection of a *Culex tritaeniorhynchus* cell line with a novel *Culex tritaeniorhynchus* rhabdovirus strain. *Microbiology and Immunology* 59(9), 562-566. 査読有 doi: 10.1111/1348-0421.12279.

Kuwata R, Sugiyama H, Yonemitsu K, Dung VN, Terada Y, Taniguchi M, Shimoda H, Takano A, Maeda K (2015) Isolation of Japanese encephalitis virus and novel insect-specific flavivirus from mosquitoes collected in a cowshed in Japan. *Archives of Virology* 160(9), 2151-2159. 査読有. doi: 10.1007/s00705-015-2488-x.

Hoshino K, Isawa H, **Kuwata R**, Tajima S, Takasaki T, Iwabuchi K, Sawabe K, Kobayashi M, Sasaki T (2015) Establish-ment and characterization of two new cell lines from the mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 51(7), 672-679 . 査読有. doi: 10.1007/s11626-015-9883-1.

[学会発表](計 31 件)

Kuwata R. Surveillance of mosquito-borne arboviruses infection in Asian countries. Central Mindanao University Research Seminar (Musuan, Bukid-non, Philippines) 2018 年 3 月 27 日

Kuwata R, Shimoda H, Bannai H, Nemoto M, Phichitrasli T, Prasertsincharoen N, Supriyono, Minami S, Nagata N, Yonemitsu K, Noguchi K, Takano A, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Maeda K. A recent Getah virus outbreak in Japan was occurred during 2012. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (大阪府大阪市) 2017 年 10 月 24-26 日

Torii S, **Kuwata R**, Supriyono, Noguchi K, Nagata N, Minami S, Yonemitsu K, Shimoda H, Kesumawati U, Itokawa K, Isawa H, Sawabe K, Maeda K. Analysis of the endogenous virus-like sequences in mosquito genome. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (大阪府大阪市) 2017 年 10 月 24-26 日

鎌田龍星, 下田宙, 根本学, 坂内天, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, Supriyono, 南昌平, 米満研三, 野口慧多, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Bazartseren B, 前田健. アジアにおけるゲタウイルスの蔓延状況. 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (大阪府吹田市) 2017 年 10 月 23 日

鳥井駿, **鎌田龍星**, Supriyono, Ngo TBT, 野口慧多, 南昌平, 米満研三, 下田宙, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, Kesumawati U, Baltazar ET, Agungpriyono S, Rerkamnuaychoke W, Bazartseren B, 本道栄一, 前田健. アジアにおける蚊媒介性ウイルスの調査. 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (大阪府吹田市) 2017 年 10 月 23 日

鎌田龍星, 下田宙, 坂内天, 根本学, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, Supriyono, 南昌平, 長田奈緒, 米満研三, 野口慧多, Jittapalapong S, Rerkamnuay-choke W, 前田健. ゲタウイルスならびに日本脳炎ウイルスの血清疫学調査. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島県鹿児島市) 2017 年 9 月 13-15 日

鳥井駿, **鎌田龍星**, Supriyono, 下田宙, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, Kesumawati U, Baltazar ET, Agungpriyono S, Rerkamnuaychoke W, Bazartseren B, 本道栄一, 前田健. アジアにおける蚊媒介性ウイルスの調査. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島県鹿児島市) 2017 年 9 月 13-15 日

鎌田龍星, 鳥井駿, 野口慧多, 米満研三, 南昌平, 長田奈緒, Supriyono, Ngo TBT, 下田宙, 高野愛, 前田健. 山口捕集蚊から分離された新規 RNA ウイルスの遺伝子発現機構. 第 32 回中国四国ウイルス研究会 (岡山県倉敷市) 2017 年 6 月 10-11 日

鳥井駿, **鎌田龍星**, Supriyono, 野口慧多, 長田奈緒, 南昌平, 米満研三, 下田宙, Kesumawati U, 糸川健太郎, 伊澤晴彦, 沢辺京子, 前田健. 蚊のゲノムにみられる内在性ウイルス様配列の解析. 第 32 回中国四国ウイルス研究会 (岡山県倉敷市) 2017 年 6 月 10-11 日

鎌田龍星, 下田宙, 杉山弘樹, Phichitrasilp T, Nuansri N, Khomkrajang S, Srinivat T, Buadok W, Prasertsincharoen N, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W. 前田健. 本邦イノシシにおける日本脳炎ウイルス・ゲタウイルス感染の血清疫学調査. 第 69 回日本衛生動物学会大会 (長崎県長崎市) 2017 年 4 月 15-16 日

Kuwata R, Supriyono, Kesumawati U, Sugiyama H, Torii S, (+25 名)

Surveillance for mosquito-borne infectious diseases in Asian countries. International Young Scientists 'Symposium in Bogor Agricultural University 'Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health' (Bogor, Indonesia) 2016 年 11 月 29 日

Supriyono, Takano A, **Kuwata R**, Shimoda H, Sugiyama H, (+26 名) Isolation and identification of pathogens from ticks and mosquitoes in Asian countries. International Young Scientists 'Symposium in Bogor Agricultural University 'Fusion of Science to Strengthen Young Scientist Capacity in Achieving the Global Health' (Bogor, Indonesia) 2016 年 11 月 29 日

Kuwata R, Yonemitsu K, Shimoda H, Kobayashi J, Maeda K. Comparison of growth of flaviviruses in mosquito cell lines. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (北海道札幌市) 2016 年 10 月 23-25 日

鎌田龍星, 杉山弘樹, 鳥井駿, 高野愛, 下田宙, 米満研三, 小林良祐, Hengjan Y, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, Supriyono, Kesumawati U, Setiyono A, Dargantes AP, Abella JAC, Baltazar ET,

- Simborio LT, Agungpriyono S, Rerkam -uaychoke W, 海老原秀喜, 本道栄一, 前田健. 東南アジア諸国における蚊保有ウイルスの調査. 第 23 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (北海道札幌市) 2016 年 10 月 22 日
- 鎌田龍星**, 小林淳, 杉山弘樹, 黒田雄大, 神先芽衣, 南昌平, 長田奈緒, 米満研三, Nguyen DV, 下田宙, 高崎智彦, 前田健. ネットイシマカ由来培養細胞の樹立とフラビウイルス感受性の比較. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (神奈川県藤沢市) 2016 年 9 月 6-8 日
- 杉山弘樹, **鎌田龍星**, 鳥井駿, 米満研三, 下田宙, 沢辺京子, 前田健. コガタアカイエカの生態調査. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (神奈川県藤沢市) 2016 年 9 月 6-8 日
- 藤田龍介, **鎌田龍星**, 小林大介, Bertuso AG, 伊澤晴彦, 沢辺京子. スマカ由来新規ウイルス Bustos virus の機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 (神奈川県横浜市) 2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日
- 鎌田龍星**, 原七海, 長田奈緒, 杉山弘樹, 南昌平, 米満研三, Nguyen DV, 下田宙, Agungpriyono S, 水谷哲也, 本道栄一, 前田健. 哺乳動物及び吸血節足動物におけるラブドウイルスの調査. 第 31 回中国四国ウイルス研究会 (鳥取県鳥取市) 2016 年 7 月 9-10 日
- 杉山弘樹, **鎌田龍星**, 米満研三, 南昌平, 下田宙, 前田健. 日本脳炎ウイルス媒介蚊の海外からの侵入の可能性. 第 31 回中国四国ウイルス研究会 (鳥取県鳥取市) 2016 年 7 月 9-10 日
- 鎌田龍星**, 杉山弘樹, 米満研三, Simborio LT, Baltazar ET, Abella JA, Dargantes AP, Kesumawati U, Setiyono A, Rerkam -uaychoke W, Phichitrasilp T, Prasertsincharoen N, 下田宙, 本道栄一, 前田健. 日本脳炎媒介蚊の吸血活動と遺伝子型診断について. 第 51 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (福島県耶麻郡猪苗代町) 2016 年 5 月 13-14 日
- 21 前田健, **鎌田龍星**, 下田宙, 小林淳. 新規ネットイシマカ由来培養細胞のウイルス感受性. 第 51 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (福島県耶麻郡猪苗代町) 2016 年 5 月 13-14 日
- 22 **鎌田龍星**, 杉山弘樹, 米満研三, 下田宙, 前田健. 山口県牛舎における初春の吸血蚊について. 第 68 回日本衛生動物学会大会 (栃木県宇都宮市) 2016 年 4 月 15-16 日
- 23 **鎌田龍星**, 伊澤晴彦, 糸川健太郎, 佐々木年則, 駒形修, 葛西真治, 冨田隆史, 津田良夫, 小林睦生, 前田健, 沢辺京子. 蚊のゲノムに内在するウイルス様配列について. 第 68 回日本衛生動物学会大会 (栃木県宇都宮市) 2016 年 4 月 15-16 日
- 24 佐々木年則, **鎌田龍星**, 星野啓太, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 小林睦生. 日本脳炎ウイルスに対するネットイシマカの抗ウイルス機構. 第 68 回日本衛生動物学会大会 (栃木県宇都宮市) 2016 年 4 月 15-16 日
- 25 **Kuwata R.** Adaptation of Japanese encephalitis virus to mammalian cells and discovery of novel mosquito-borne viruses. International Symposium on Intracellular Pathogens, Yamaguchi (山口県山口市) 2016 年 2 月 5 日
- 26 **Kuwata R**, Sugiyama H, Hamasaki C, Minami S, Yonemitsu K, Dung NV, Shimoda H, Maeda K. Identification and characterization of a novel RNA virus isolated from mosquito. The 63th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (福岡県福岡市) 2015 年 11 月 22-24 日
- 27 杉山弘樹, **鎌田龍星**, 米満研三, 南昌平, 濱崎千菜美, 倉重威見, 福島和彦, 三好雅和, 藤井陽一, 下田宙, 前田健. 牛舎での蚊の捕集 - 本土、見島、隠岐島 -. 第 23 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (福岡県福岡市) 2015 年 11 月 21 日
- 28 **鎌田龍星**, 杉山弘樹, 黒田雄大, 南昌平, 米満研三, 下田宙, 前田健. 蚊から分離された新規 RNA ウイルスの解析. 第 158 回日本獣医学会学術集会 (青森県十和田市) 2015 年 9 月 7-10 日
- 29 **鎌田龍星**, 杉山弘樹, 黒田雄大, 下田宙, 前田健. 牛舎捕集蚊由来新規 RNA ウイルスの性状解析. 第 30 回中国四国ウイルス研究会 (岡山県倉敷市) 2015 年 6 月 27-28 日
- 30 **鎌田龍星**, 竹之内惇, 木村菜穂, 南昌平, 米満研三, 下田宙, 前田健. 細胞馴化日本脳炎ウイルスの性状解析. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (京都府京都市) 2015 年 5 月 15-16 日
- 31 杉山弘樹, **鎌田龍星**, 黒田雄大, 倉重威見, 福島和彦, 三好雅和, 藤井陽一, 鈴木真士, 水間なつみ, 藤井宏志, 藏重宏史, 下田宙, 津田良夫, 前田健. 山口県におけるコガタアカイエカの消長. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (京都府京都市) 2015 年 5 月 15-16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 龍星 (KUWATA, Ryusei)
山口大学・共同獣医学部・学術研究員
研究者番号: 00711219

(4) 研究協力者

前田 健 (MAEDA, Ken)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 90284273