様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 １７ 日現在

機関番号：１６３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１８９０６

研究課題名（和文）ネッタイシマカのゲノム編集に向けたデングウイルス感染防御遺伝子の検索

研究課題名（英文）Search of Infection Resistance Genes for Genome Editing of Aedes aegypti

研究代表者
渡辺　幸三（Watanabe, Kozo）

愛媛大学・理工学研究科（工学系）・教授

研究者番号：８０６３４４３５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：デング熱はネッタイシマカ等の蚊が媒介するウイルス感染症での感染環により流行が拡大する。本研究は，次世代シークエンシング（RNAseq）を用いたゲノムワイドの比較遺伝子発現解析により，ネッタイシマカへのデングウイルス感染抑制に寄与している遺伝子群とその生物学的機能を推定した。比較遺伝子発現解析には，デングウイルスに感染している個体，ボルバキアに感染している個体，両者に感染していない個体を用いた。解析の結果，ウイルス感染に関与している69個の遺伝子が探索された。これらはセリンプロテアーゼ活性，ATP結合，匂い分子結合タンパク質などの機能に関与していることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
世界的にデング熱患者が急増しているが，有効なワクチンはなく，予防策は蚊に刺されないようにすることのみである。本研究により，デングウイルスを媒介するネッタイシマカ体内でのデングウイルス感染やボルバキアによるウイルス感染抑制に関する遺伝子群とその機能を推定することができた。このような遺伝子レベルの制御メカニズムが今後さらに集積すれば，将来的にはデングウイルスに感染しない（しにくい）蚊を「遺伝子ドライブ」によるゲノム編集で作成するための有用な情報となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dengue viruses are biologically transmitted among humans through the bite of infected female Aedes aegypti mosquitoes. However, gene-based processes occuring in viral infected mosquitoes are not clear yet. Next-generation sequencing based transcriptome analysis (RNAseq) is a powerful technique for assessing the differential expression of genes. Using this technique, we compared gene expression patterns among mosquito individuals infected with 1) Dengue virus, 2) asymbiotic bacteria Wolbachia, and 3) neither of these, using Aedes aegypti samples collected from the Philippines. Before the RNAseq analysis, we screened Dengue virus or Wolbachia positive individuals using PCR or RT-PCR assays. Through the RNAseq analysis, we found 69 genes, which are potentially related to biological process concurring in Dengue infected mosquito bodies. These genes are estimated to be related to many biological functions such as serine-type endopeptidase activity, ATP binding, and odorant binding protein.

研究分野：生態疫学

キーワード：デング熱　ネッタイシマカ　次世代シークエンサー　トランスクリプトーム　生態疫学

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

デング熱はネッタイシマカ等の蚊が媒介するウイルス感染症で「-ヒト-蚊-ヒト-」の感染環により流行が拡大する。近年，蚊へのデングウイルス感染を抑制する昆虫共生細菌ボルバキア（*Wolbachia*）が注目されている。ボルバキアとウイルスは競合関係にあり，ボルバキアが共生している蚊体内では，何かしらの細胞応答の結果，デングウイルスが増幅できなくなると考えられている。ボルバキアは感染（共生）しているメス蚊から子に垂直感染する。したがって，蚊にボルバキアを人工的に感染させて環境中に放虫すれば，デングウイルスに感染しない蚊が増え，デング熱流行を抑制できる可能性がある。オーストラリアやマレーシアなどで，ボルバキア人工感染蚊を環境中に放つ社会実験が試みられているが，まだ顕著な効果は確認されていない。

蚊体内でのデングウイルス感染やボルバキアによるウイルス感染抑制に関する遺伝子レベルの制御メカニズムが理解できれば，ウイルスに感染しない蚊を作成する遺伝子工学技術に活用できる。蚊の遺伝子発現は，１）蚊への外的刺激（＝ボルバキアやデングウイルス感染）をトリガーに，２）複数の転写制御タンパク質の発現を介して，３）ウイルス感染耐性機能の発現（機能的タンパク質の発現）に至る一連の流れから理解される。近年の次世代シーケンス技術の向上により，膨大なゲノムを網羅するトランスクリプトーム（遺伝子発現）解析で，ある外的刺激下で特異的発現が起こる遺伝子を数多く同定できるようになった。デングウイルス感染の抑制に寄与する遺伝子群を特定できれば，近年注目されている「遺伝子ドライブ（改変された遺伝情報を次世代に運ぶ）」技術（Mali et al., Science, 2013）と組み合わせて，その遺伝子をゲノムに挿入し，その子孫のみが遺伝子を受け継ぐバイアスをかけて蚊集団全体に急速に広めることが可能になる。

環境中の蚊をウイルスに感染しない蚊に置き換える遺伝子ドライブを実現するには，まず，ウイルス感染耐性機能の発現に至るまでの一連の遺伝的メカニズムを理解する必要がある。そのためには，デングウイルス感染蚊，ボルバキア感染蚊，両者に感染していない蚊の遺伝子発現パターン（遺伝子の発現量データ）をゲノム全体に渡って比較する必要がある。しかし，その先行研究は存在しない。

２．研究の目的

本研究は蚊ゲノムの比較遺伝子発現解析により，ネッタイシマカへのデングウイルス感染抑制に寄与している遺伝子群を特定することを目的としている。将来，これら遺伝子群をゲノムに人工的に挿入した蚊を遺伝子ドライブで環境中に増やすデング熱制御技術への適用を想定している。

３．研究の方法

フィリピンで採取したネッタイシマカ成虫個体を使って，デングウイルスとボルバキアを PCR 検出した。モスキートトラップを各地点に設置し，2 日間稼働させたのちに回収することで採取した.

通常，蚊からデングウイルスを検出する際には，1 個体ではなく 10～30 個体をプールして抽出した RNA を使う。本研究では，デング陽性個体を判別してからトランスクリプトーム解析（遺伝子発現解析）に使う必要があるため，蚊 1 個体ずつから RNA を抽出してウイルスを検出した。また，ボルバキアを検出する際には，蚊から DNA も抽出する必要があるため，各標本をペッセルですり潰して二層抽出法で RNA と DNA を分けて抽出した。1 個体から得られる DNA と RNA の収量を最大化する実験プロトコールを検討するために複数の抽出キットやキットを使わないマニュアル抽出を比較した結果，Qiagen AllPrep DNA/RNA Micro Kit が最も DNA と RNA の双方の収量と純度を高められることが確かめられた。

デングウイルス感染蚊の検出のため，ネッタイシマカのメス成虫 359 個体から RNA を抽出し，デングウイルスの 4 つの血清型（DENV1～4）にそれぞれ特異的なプライマーを使って，One-Step Real-Time RT-PCR でウイルス RNA を増幅し，血清型ごとにデングウイルス感染の有無を判定した。この PCR はマルチプレックス PCR で行い，4 つの血清型の感染をそれぞれ同時に判定した。

ボルバキア感染蚊の検出のため，抽出した DNA を使って共生細菌ボルバキアに特異的な wolbachia surface protein(wsp)general primers(wsp81F と wsp691R) 及び 16SrDNA wolbachia specific screening primers (WSpecF と WSpecR) を使用し，ボルバキア特異の遺伝子領域の増幅を試みた。ボルバキア陽性個体については，PCR 産物の塩基配列をサンガーシークエンスで解読し，BLAST 検索を行い，増幅された遺伝子領域が ボルバキア に由来する配列 であったかを判定した。以上により，各蚊を「デングウイルス感染蚊」,「ボルバキア感染蚊」,「非感染蚊（いずれにも感染していない）」に区分した。

ネッタイシマカから抽出した RNA の次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い，ゲノム網羅的な遺伝子発現量の定量を行った。それぞれの系から３個体をランダムに選んで実験に使用する。課題１において，異なる２つの血清型（DENV-2 と４）のデングウイルスが検出されたため，感染したウイルスの血清型ごとに蚊の遺伝子発現パターンが変わる可能性があるので，血清型ごとに３個体ずつをトランスクリプトーム解析に用いた。対照系として，デングウイルスに感染していない３個体も用いた。

トランスクリプトーム解析は，磁気ビーズ法によりメッセンジャーRNA（mRNA）のみを単離・精製して行った。得られたmRNAを平均200塩基程度に断片化し，cDNAに逆転写した。次世代シーケンサー（Illumina HiSeq 4000）で塩基配列を解読する際に各個体を識別するインデックスタグが含まれるアダプターをcDNA断片に付加し，最後にPCR増幅してmRNAライブラリーを準備した。そして，次世代シークエンサー（Illumina HiSeq 4000）でmRNAライブラリーの配列データを取得した。

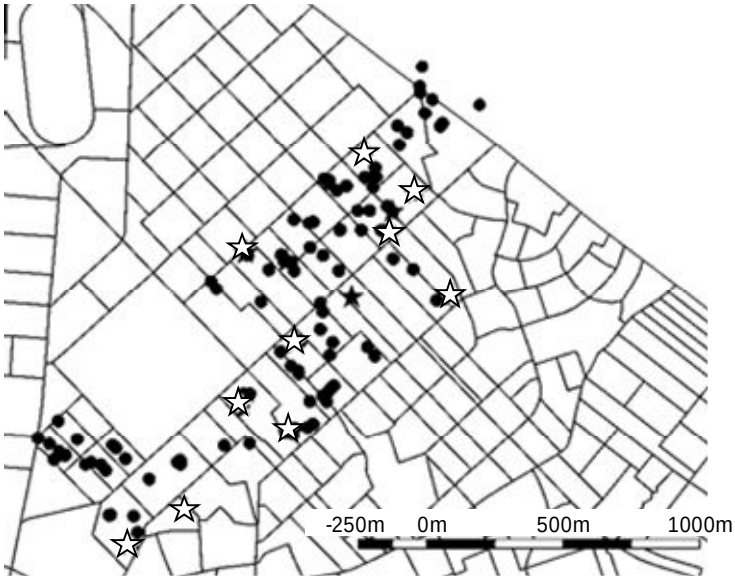

図1　フィリピン・メトロマニラのボルバキア陽性（☆）と陰性（●）のネッタイシマカが採取された世帯の分布。調査エリアの広域にボルバキアに感染したネッタイシマカ個体が分布していることが明らかになった。

次世代シークエンシング解析で得られた遺伝子発現データのバイオイフォマティックス解析を行った。まず，クオリティフィルタリングを行い，その後，既に取得されてデータベースに登録されているネッタイシマカの全ゲノム配列を参照配列として，ソフトウェアBOWTIEを使ったアライメントを行った。その後，３つの系（DENV-2に感染，DENV-4に感染，デングウイルスに感染していない）の遺伝子発現パターンを比較して，非感染系に比べて，デングウイルス感染下でmRNAのコピー数が相対的に高まったり，低下したりしている遺伝子群をMAプロット（MA Plot）解析により統計学的に探索した。その後，探索された遺伝子をネッタイシマカのタンパク配列データが格納されたUniProtに照合することで，それらの生物学的機能を検索した。

４．研究成果

フィリピンのメトロマニラで採取された429個体のネッタイシマカ成虫のうち，*wsp*領域では7個体（1.6%）16s領域では15個体においてボルバキアDNAの増幅が見られた。いずれかの領域で増幅が見られた16個体のうち，両領域で増幅が見られたのは5個体であった。調査エリアの広域にボルバキアに感染したネッタイシマカ個体が分布しており（図１），各サンプルから検出されたボルバキアの遺伝子配列には高い多様性が見られた。いずれかのマーカーでボルバキア陽性が確認された16個体といずれのマーカーでも陰性だった16個体をトランスクリプトーム解析に用いた。また，RealTime PCRによりデングウイルスへの感染が確認された6匹のメス個体のうち，3個体からDEN-2，3個体からDEN-4の血清型が検出された。これら6匹とデングウイルスに感染していなかった3個体もトランスクリプトーム解析に用いた。

次世代シークエンシング解析の結果，合計241,737,995配列（ペアエンド，200塩基長）が取得された。多くの配列は，デングウイルス陽性個体あるいはデングウイルスおよびボルバキアに共に感染していない個体（非感染個体）に由来する配列となった。また，上記のデングウイルスに感染した6個体に由来する配列から，デングウイルスの遺伝子配列と高い相同性を示す配列が多く見られた。これはトランスクリプトーム解析の結果からも，これら6個体がデングウイルスに感染していることを裏付ける結果となった。

MAプロット解析に基づいて，デングウイルス陽性と陰性のネッタイシマカの遺伝子発現データを比較した。その結果，デングウイルス感染下でmRNAのコピー数が統計学的有意に高まったり（Up-regulation）低下した（down-regulation）遺伝子がネッタイシマカゲノム上で69個見つかった。これらは，デングウイルス感染下において特異的にその発現が制御されている遺伝子である可能性が高い。これら69個の遺伝子配列をタンパクの配列データとその生物学的機能

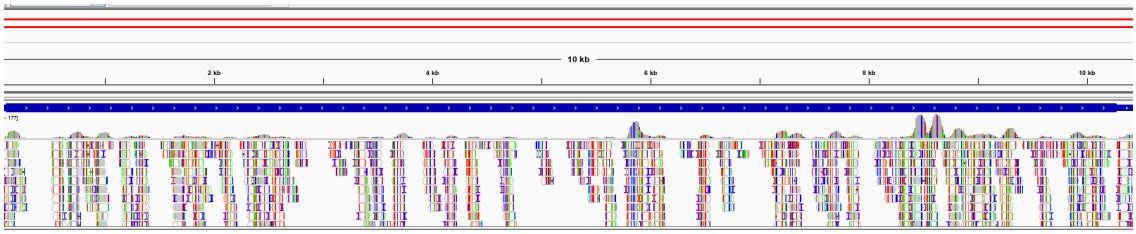

図２　ネッタイシマカのゲノム配列を参照配列としてアライメントされたデングウイルス陽性（DEN-2）個体のmRNAの配列（一部）のゲノムマッピング結果の例。

が格納されたUniProtに照合した結果，セリンプロテアーゼ（タンパク質分解酵素の一つ）活性（serine-type endopeptidase activity），エネルギーの放出・貯蔵や物質の代謝・合成に関与するATP結合，匂い分子結合タンパク質（odorant binding protein）の機能を有する遺伝子などの数多くの機能が同定された。

DEN-2陽性，DEN-4陽性，非感染のそれぞれのネッタイシマカ個体の遺伝子発現パターンを主成分分析に基づいて比較した結果，３つの系に大きな違いが見られた（図）。これは，デングウイルスの感染-非感染の状態により，遺伝子発現が高まったり（Up-regulation），低下したりする（down-regulation）遺伝子群が大きく異なることを表している。さらに，デングウイルスに感染した個体の中でも，感染した血清型が異なる個体間において遺伝子発現パターンに大きな違いが生まれるという興味深い事実も明らかになった。

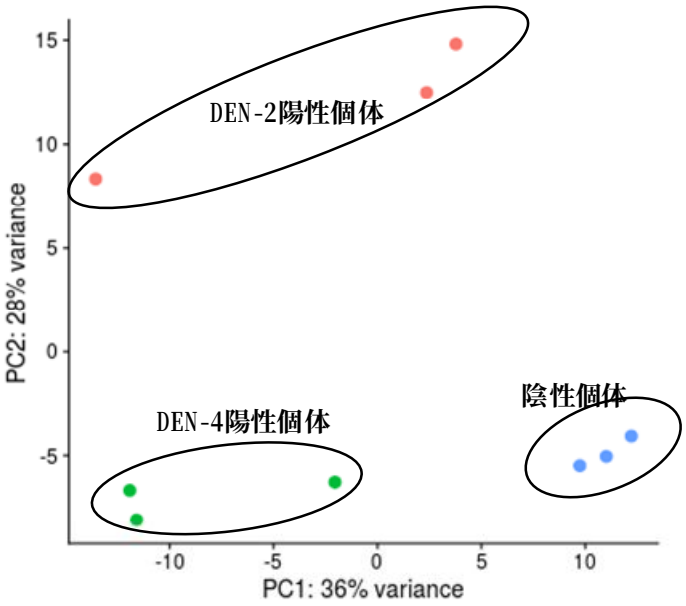

図３　DENV-2血清型，DEN-４血清型のデングウイルスに感染した個体とデングウイルス非感染個体の遺伝子発現パターンの主成分分析（PCA）による比較結果。３つの系の遺伝子発現パターンが大きく異なっていることが明らかにされた。

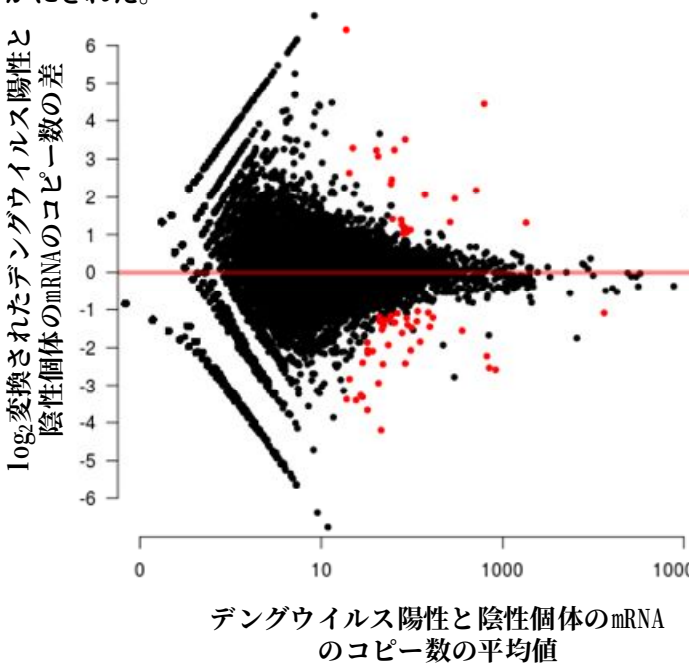

図４　MAプロット解析によるデングウイルス陽性と陰性のネッタイシマカの遺伝子発現データの比較に基づく感染に与している遺伝子の検索。デングウイルス感染下でmRNAのコピー数が相対的に高まったり（Up-regulation）低下した（down-regulation）遺伝子群（図中の69個の赤色のプロット）が見つかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計５件）

① Carvajal,T. M., K. Hashimoto, R. K. Harnandika, D. M. Amalin and K. Watanabe, Detection of Wolbachia Infection in Field-collected Mosquito Vector, *Aedes aegypti* in Metropolitan Manila, Philippines, Parasites & Vectors, accepted

② Faridah, L., N. Fauziah, S Ekawardhani, Riyadi, and K. Watanabe, Is Rapid Dengue Test Necessary at Primary Health Centre? A Study In Bandung City, Journal of Clinical and Diagnostic Research, accepted

③ Carvajal, T. M., K. Hashimoto, K. J. D. Go, M. A. I. J. Cruz, M. J. L. B. Martinez, J. D. R. Capistrano, V. S. P. Tiopianco, D. M. Amalin, and K. Watanabe, Detection and Distribution of Wolbachia Endobacteria in *Culex quinquefasciatus* Populations (Diptera: Culicidae) from Metropolitan Manila, Philippines, Journal of Vector Borne Diseases, 55, 265-270, 2018, DOI: doi.org/10.4103/0972-9062.256561

④ Ho, H., T. Carvajal, J.R. Bautista, J.D. Capistrano, K. Viacrusis, L. F. Hernandez, and K. Watanabe, Using Google Trends to Examine the Spatio-Temporal Incidence and Behavioral Patterns of Dengue Disease: A Case Study in Metropolitan Manila, Philippines, Tropical Medicine and Infectious Disease, 3(4), 118, 2018, DOI: doi.org/10.3390/tropicalmed3040118

⑤ 糠澤桂，西元竣哉，鈴木祥広，渡辺幸三，マニラ首都圏におけるデング熱媒介蚊の産卵活動に関わる因子の時空間的分析，土木学会論文集 G（環境），Vol.74，No.5，I_79-I_85，

2018

〔学会発表〕（計９件）

① Maria Angenica REGILME, Tatsuya INUKAI, Katherine VIACRUSIS, Divina AMALIN, Kozo WATANABE: Genetic Analysis of *Aedes aegypti* in Manila, Philippines: Dispersal Pattern and Gene Expression Under Wolbachia Infection, Water and Environment Technology Conference 2018 (WET2018), Matsuyama (Japan), 2018.7.14

② Tatsuya INUKAI, Maria Angenica Fulo REGILME, Thaddeus M. CARVAJAL, Billy Joel M. ALMARINEZ, Divina M. AMALIN, Kozo WATANABE: Wolbachia Detection and Distribution of Dengue Vector in Manila, Philippines, Water and Environment Technology Conference 2018 (WET2018), Matsuyama (Japan), 2018.7.14

③ Thaddeus M. Carvajal, Kazuki Hashimoto, Reza Kurniawan Harnandika, Divina Amalin, and Kozo Watanabe: Detecting *Wolbachia* Sp. in Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti* and Its Potential as A Biological Mass Release Vector Control Program in The Philippines, Pest Management Council of the Philippines 50th Anniversary and Annual Scientific Conference, IloIlo (Philippines), 2018.5.11

④ Thaddeus M. Carvajal, Kohei Ogishi, Sakiko Yaegeshi, Lara Fides T. Hernandez, Katherine M. Viacrusis, Howell T. Ho, Divina Amalin, and Kozo Watanabe: Fine-Scale Genotyping and Dispersal Movement of Dengue Mosquito Vector, Aedes Aegypti in Metropolitan Mania, 2nd Bandung International Scientific Meeting on Parasitology & Tropical Diseases, Bandung (Indonesia), 2018.4.27

⑤ Maria Angenica Regilme, Tatsuya Inukai, Katherine Viacrusis, Divina Amalin, and Kozo Watanabe: Genetic analysis of Aedes aegypti in Manila, Philippines: Dispersal pattern and gene expression under Wolbachia infection, 2nd Bandung International Scientific Meeting on Parasitology & Tropical Diseases, Bandung (Indonesia), 2018.4.27

⑥ Kozo Watanabe: Individual-Based Dengue Virus Surveillance in Mosquitoes Collected Concurrently with Suspected Patients: Implications On Spatial Transmission in Tarlac City, Philippines, 2nd Bandung International Scientific Meeting on Parasitology & Tropical Diseases, Bandung (Indonesia), 2018.4.27

⑦ Regilme Maria Angenica, Inukai Tatsuya, Viacrusis Katherine, Amalin Divina, Watanabe Kozo: Dispersal variation of Aedes aegypti in Manila, Philippines - Do roads affect the population structure?, 2nd Bandung International Scientific Meeting on Parasitology & Tropical Diseases, Bandung (Indonesia), 2018.4.27

⑧ Kozo Watanabe: Eco-epidemiology of Dengue Mosquitoes in the Philippines: Climate Modeling and Genetic Analyses, XXII International Conference of the Society for Human Ecology, Los Baños (Philippines), 2017.11.30

⑨ Kozo Watanabe: New Techanology Usage for Dengue Surveylance, Multi-discipline and Interrelation Institutions Seminar on Dengue Elimination in Bandung City, Bandung (Indonesia), 2017.10.26

〔図書〕（計１件）

① Carvajal, T. M., H. T. Ho, L. F. T. Hernandez, K. M. Viacrusis, D. M. Amalin, and K. Watanabe, An Ecological Context towards Understanding Dengue Disease Dynamics in Urban Cities: a Case Study in Metropolitan Manila, Philippines: Health in Ecological Perspectives in the Anthropocene (Editors: C. Watanabe, T. Watanabe), pp. 117-131 (Chapter 10), Springer, 2019

〔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

６．研究組織

(1)研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。