

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660271

研究課題名(和文) ジーンターゲティング法を用いた蚊ゲノムに内在するRNAウイルス様遺伝子の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of the endogenous RNA virus elements in mosquito genomes by gene targeting

研究代表者

伊澤 晴彦 (ISAWA, Haruhiko)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長

研究者番号：90370965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蚊のゲノムに内在するラブドウイルスヌクレオプロテイン様配列(ERNE)の構造と機能を解明することを目的とした。

その結果、ネッタイエカ、アカイエカ、チカイエカの一部系統においてERNEの存在を確認された。しかしながらこれらERNEは、イエカの系統や個体によってゲノム上の遺伝子構造や配列には多様性があることが判明した。また一部系統では、当該蛋白質がコードされる方向とは逆のアンチセンス鎖側に相当するRNAのほうがより多く転写されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the structure and function of the endogenous rhabdoviral nucleoprotein element (ERNE) in the mosquito genomes.

Several laboratory strains of *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens pallens* and *Culex pipiens form molestus* had ERNEs in their genomes. However, the gene structure and sequence of the ERNE varied depending on the strain or individual of the *Culex* mosquitoes. Transcription analysis showed that, in a mosquito strain, the antisense RNAs of the ERNE were transcribed more abundantly than the sense strand RNAs.

研究分野：衛生昆虫学

キーワード：ウイルス 感染症 ゲノム 昆虫 進化

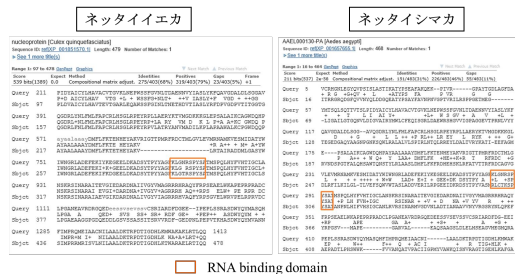
1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムには、レトロウイルスに由来する配列が数多く認められており、これら内在性レトロウイルス由来の遺伝子が、体細胞のがん化や哺乳動物における胎盤形成など、生物の生命現象やゲノム進化に深く関与していることはよく知られている。これまで生物のゲノムに内在化しているウイルス由来の配列は逆転写酵素を持つレトロウイルスのみであると考えられてきた。しかし近年、様々な生物のゲノム中にレトロウイルス以外の RNA ウイルスの遺伝子と高い相同性を示す配列が次々と見出され、生物のゲノムにはこれまで考えられていた以上に多様なウイルス由来の配列が内在化していることが明らかになってきた (Katzourakis and Gifford 2010; Holmes 2011)。我々は最近、日本脳炎ウイルスの主要媒介蚊であるコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* から、ラブドウイルス科 (-鎖 RNA ウイルス) の新規ウイルスであるコガタアカイエカラブドウイルス *Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus* (CTRV) を分離発見し、その性状について報告した (Kuwata et al. Journal of Virology 2011)。CTRV は、分子系統解析からはショウジョウバエのシグマウイルスと近縁であったが、特異な粒子形態や細胞核での複製など、既知のラブドウイルスには見られない特徴を有していた。さらに興味深いことに、病原体を媒介する吸血性節足動物である蚊やマダニのゲノムに、CTRV のヌクレオプロテイン (N) 遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が内在化していることを、データベース解析の過程で偶然見出した。そこで吸血性節足動物のゲノムに内在するラブドウイルス様遺伝子の機能と進化的意義の解明を目的とした研究を計画した。

2. 研究の目的

近年、様々な真核生物のゲノムに、レトロウイルス以外の RNA ウイルスに由来する遺伝子配列が内在化していることが明らかとなり、その機能と生物進化における意義が注目されている。最近我々は、蚊から分離発見した新規ラブドウイルスであるコガタアカイエカラブドウイルスの遺伝子解析の過程で、本ウイルスのヌクレオプロテイン (N) 遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が、蚊のゲノムに内在化していることを見出した (下図)。

CTRV_N と高い相同性を持つ領域が蚊ゲノム上に存在



イェカ属蚊における内在性 CTRV_N 因子 Endogenous Rhabdoviral N Element (ERNE) の分布を調査

本研究では、蚊のゲノムに内在するラブドウイルスのヌクレオプロテイン様領域 (Endogenous Rhabdoviral N Element; ERNE) 遺伝子の構造と機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

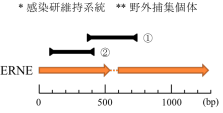
(1) 各種イェカ属蚊における ERNE の分布
データベース解析の結果、イェカ属蚊の ERNE はゲノム上に2つのイントロンを含む遺伝子として存在していることが推察された。そこでまず、様々なイェカ属蚊種および系統における ERNE 配列の有無について調査した。対象として選んだ9種13系統のイェカ属蚊飼育系統よりそれぞれのゲノム DNA を抽出した (2 ~ 10 個体/系統)。次に ERNE の第2、3番エクソン領域に特異的プライマーを作製し、増幅産物の有無を調べた (下図)。

【材料と方法】

- 9種13系統のイェカ属蚊 (表)
- ・ 形態に基づく同定
- ・ mtDNAのCOI遺伝子配列に基づく分子同定
- ERNEの検出
- ・ イェカ・ヤブカのERNEに基づいて作成したコンセンサスプライマー (右図)

表 解析に用いたイェカ属蚊種または系統

| 種または系統 | 由来 |
|----------|--------------------|
| ネットタイエカ | |
| SGP* | シダゴール |
| JNB* | ヨハネスブルク (アフリカ) |
| アカイエカ | |
| NID* | 新宿 (東京) |
| NSM* | 西宮 (兵庫) |
| RNS | 品川 (東京) 2012年11月** |
| チカイエカ | |
| TRK* | 新宿 (東京) |
| イナトミシオカ | 岩手 (宮城) 2011年7月** |
| キヌタケシオカ | 品川 (東京) 2011年10月** |
| カラツイエカ | 石垣 (沖縄) 2007年9月** |
| ハマダライエカ | 岩手 (宮城) 2011年7月** |
| ニセシロハシエカ | 石垣 (沖縄) 2007年9月** |
| シロハシエカ | 石垣 (沖縄) 2007年9月** |
| コガタアカイエカ | 小笠原 (島根) 2009年8月** |



(2) ERNE 近傍領域の遺伝子配列の決定
ERNE が蚊ゲノムに挿入される機構としてはトランスポゾン等の転移因子の存在が考えられる。そこで、本研究では ERLN 近傍領域の遺伝子配列の決定を試みた。すなわち、ERLN が含まれると考えられるゲノム領域 (195000 ~ 204000) について特異的プライマーを設計し、PCR を行い、得られた増幅産物について塩基配列を決定した。

(3) イェカ属蚊における ERNE 遺伝子の RNA 発現検証
蚊細胞内において ERNE が RNA として存在するか検証するため、蚊より RNA を抽出し、ERNE 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。また、転写の方向性を検証するために、strand-specific RT-PCR を行った。

(4) ERNE の起源についての分子系統学的検討
検出された ERNE 遺伝子について、各種ラブドウイルスの N 蛋白質コアモチーフのアミノ酸配列に基づいた分子系統解析を行った。

(5) ERNE の起源についての分子系統学的検討

検出された ERNE 遺伝子について、各種ラブドウイルスの N 蛋白質コアモチーフのアミノ酸配列に基づいた分子系統解析を行った。

4. 研究成果

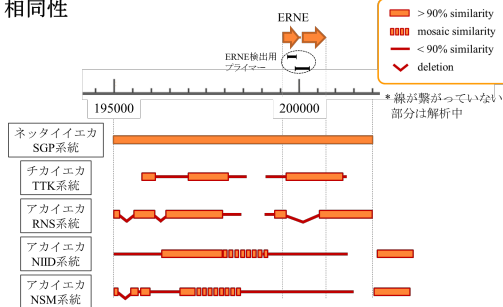
(1) 各種イエカ属蚊における ERNE の分布

9種13系統のイエカ属蚊飼育系統よりそれぞれゲノムDNAを抽出し、ERNE 特異的プライマーを用いてPCRを行った。その結果、ネッタイエカ *Culex quinquefasciatus* のHRN系統とSGP系統、ならびにチカイエカ *Culex pipiens form molestus* のTTK系統において、予想されるサイズの増幅産物が得られた。各産物のシーケンス解析を行った結果、これらはERNE配列であることが確認された。なお、アカイエカ *Culex pipiens pallens* のRNS系統においては、ERNE 遺伝子の一部断片のみが見出された。いずれの蚊系統においても、ERNE 遺伝子を持つ個体と持たない個体が混在していることが明らかとなった。また、ERNE 遺伝子の有無について、雌雄間で特段の差は認められず、同性個体でもERNE 遺伝子を持つ個体と持たない個体が混在していた。

(2) ERNE 近傍領域の遺伝子配列の決定

イエカ属蚊9系統を対象に、ERNE が含まれると考えられるゲノム領域(195000~204000)について特異的プライマーを設計し、ロングPCRを行った。その結果、SGP系統、NIID系統、NSM系統、RNS系統、TTK系統の各イエカ系統において長鎖の増幅が確認された。なお、SGP系統、TTK系統のPCR産物内にはERNEが認められ、RNS系統ではERNEの一部が認められた。一方、NIID系統、NSM系統ではERNEの存在が確認できなかった。それぞれのERNEについて塩基配列を決定し、遺伝子構造を比較した(下図)。(1)の結果と併せて考えると、ERNE

各イエカ系統におけるERNE近傍領域の塩基配列の相同性

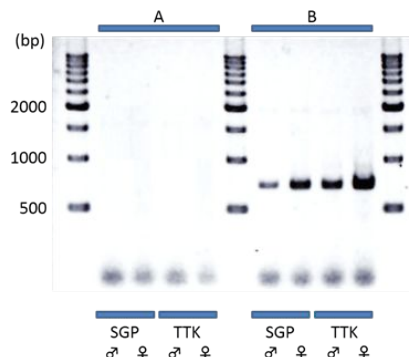


配列が検出された蚊種または系統すべての個体がERNE 遺伝子を完全な形で保持しているのではなく、蚊系統または個体によってゲノム上の遺伝子構造や配列にはかなりの多様性があり、相互に異なる場合があることが明らかとなった。

(3) イエカ属蚊における ERNE 遺伝子の RNA 発現検証

ERNE 遺伝子由来する転写物を調べる

目的で、ERNE 遺伝子の増幅が顕著にみられたネッタイエカ SGP 系統ならびにチカイエカの TTK 系統(各系統雌雄2個体)を用いてRNAを抽出し、以下の実験を行った。各RNA抽出物をDNase処理後、RT-PCRを行った結果、予想される位置に増幅産物が確



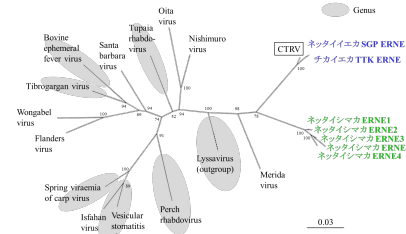
認された(下図B)。一方、同じ核酸抽出物を用い、逆転写反応を介さないでPCRを行った結果、増幅産物は確認されなかった(下図A)。さらに、Oligo-dTプライマーを用いた逆転写反応後、ERNE 特異的プライマーを用いてPCR反応を行ったが、明瞭な増幅産物は確認されなかった。以上の結果から、蚊の細胞内でERNEに由来するRNA転写物は存在すると考えられるが、ERNE 遺伝子が mRNA として発現まで起こっているかは確認できなかった。

さらに、転写の方向性を strand-specific RT-PCRにより調べたところ、当初の予想に反してERNE 遺伝子のコードされる正方向(センス鎖側)の転写物は比較的少なく、逆に蛋白質をコードしないアンチセンス鎖側の転写が圧倒的に優勢であることが示唆された。また、センス鎖側の転写物については、未知のイントロンの存在を考慮しても、オープンリーディングフレーム内に in-frame の停止コドンが存在するようであり、完全な蛋白質をコードしない可能性が考えられた。このため、当初計画していたERNE 遺伝子の翻訳産物を標的としたノックアウトによる表現型解析については現時点で再検討を要することとなり、まずERNE 遺伝子の転写機構を詳細に検討する必要があると考えられた。

(4) ERNE の起源についての分子系統学的検討

検出されたERNE 遺伝子について、ラポドウイルス N 蛋白質コアモチーフのアミノ酸配列に基づいた分子系統解析を行った結果、これらイエカ属蚊ゲノムへのERLNのインテグレーションは比較的最近起こったことが推察された(下図)。

ラブドウイルスN蛋白質のコアモチーフアミノ酸配列に基づいた分子系統解析 (220 aa)



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

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、富田 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、平成 28 年 4 月 15 日～平成 28 年 4 月 17 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊澤 晴彦 (ISAWA Haruhiko)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長
研究者番号：90370965

(2) 研究分担者

沢辺 京子 (SAWABE Kyoko)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長
研究者番号：10215923

油田 正夫 (YUDA Masao)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：10215923

(3) 連携研究者

岩永 史朗 (IWANAGA Shiro)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：20314510