

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04614

研究課題名(和文) ヒトスジシマカにおけるデングウイルス受容体の同定と蚊細胞への吸着・侵入機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of receptors expressed on Aedes albopictus cells that mediate dengue virus binding and entry

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヤブカの一種ヒトスジシマカは、世界各地で流行するデング熱の主要な媒介蚊である。本研究では、ヒトスジシマカがなぜ効率の良いデングウイルスの媒介種となりうるのか、その高いウイルス親和性と媒介特性を支える分子基盤について分子レベルで明らかにすることを目的とした。まず、デングウイルスの吸着・侵入に関わる受容体の探索を目的とした発現スクリーニング系の構築を試みた。さらに、ヒトスジシマカ細胞のデングウイルス感受性に影響を与える因子について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, is regarded as the major vector of dengue fever in various parts of the world. The purpose of this study was to investigate the molecular basis of the efficient transmission of dengue virus by *Aedes albopictus* mosquitoes. We tried to develop a novel expression screening method for identifying cell surface receptors for dengue virus binding and entry, and also investigated host and viral factors that affect dengue virus susceptibility of *Aedes albopictus* cells.

研究分野：衛生昆虫学

キーワード：遺伝子 ウイルス 感染症 昆虫 生体分子

1. 研究開始当初の背景

蚊やダニなどの節足動物は、人畜から吸血する際に様々な感染症を伝播する。吸血性の節足動物が媒介する病原ウイルスはアルボウイルスと総称され、熱帯・亜熱帯地域を中心に世界各地で公衆衛生上の大きな問題となっている。デングウイルスはフラビウイルス科に属する蚊媒介性のアルボウイルスで、世界で年間約5千万～1億人の感染者と数万人の死者を出すデング熱の病原体である。デングウイルスは、ヒトが保有宿主となり、これをヤブカ属の蚊が媒介することで、蚊・ヒト・蚊の感染環が形成され維持されている。とりわけヒトスジシマカ *Aedes albopictus* はデングウイルスに対して高い親和性と媒介能を有しており、その高い環境適応能と繁殖力で、近年世界各地に分布を拡大させている。日本では2014年、首都圏を中心に150名を超えるデング熱の国内感染が発生したが、我々は実際に感染推定地に生息するヒトスジシマカ個体群を調べ、デングウイルスを高率に保有していることを確認した。今回のデング熱感染拡大は、本蚊種の生態的特性とウイルス媒介特性が大きく関与していたことは明らかである。しかし、ヒトスジシマカがなぜ効率の良いデングウイルスの媒介種となりうるのか、その高い親和性と媒介特性を支える分子基盤についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

ヤブカ的一种ヒトスジシマカは、世界各地で流行するデング熱の主要な媒介蚊であり、高いデングウイルス増殖能と媒介能とを併せ持つ。また近年、ヒトスジシマカは、デングウイルスと同属のジカウイルスの媒介蚊としても注目されている。本研究では、デングウイルスがヒトスジシマカ細胞へ感染する初期過程を分子レベルで明らかにするために、ヒトスジシマカ細胞表面で発現するデングウイルス受容体(レセプター)候補を検索・同定し、蚊体内における発現特性を明らかにし、特異的ウイルス受容体を介したデングウイルスの蚊細胞への特異的な吸着と侵入のメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。将来的には、ヒトスジシマカのデングウイルスに対する高い親和性と媒介特性を支える分子基盤を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) デングウイルス国内分離株のゲノム解析

スクリーニングに用いるデングウイルス株を決定するため、2014年に東京都内4カ所で捕集された蚊から分離されたデングウイルスについて、エンベロープ遺伝子の解析を行った。より詳細にウイルス株間の比較を行うため、次世代シーケンサーを用いたゲノム広範にわたる解析も行った。このために、デ

ングウイルスのゲノムRNAから、逆転写反応によりcDNAを合成した。計3組のプライマーを用いたPCRにより、デングウイルスの遺伝子コード領域をカバーする3つの断片を増幅した。これらの増幅断片を用いて、さらなる断片化とアダプターライゲーションによりライブラリーを調製した。これらをIon PGMシステムによる次世代シーケンス解析に供した。

(2) 実験に用いるヒトスジシマカ由来培養細胞の性状解析

デングウイルスの重要なベクターであるヒトスジシマカにおけるデングウイルス増殖機構の解明には、ヒトスジシマカ由来培養細胞が世界中で広く利用されている。今回実験に用いるヒトスジシマカ由来培養細胞の一つであるC6/36細胞について、ある維持系統株では昆虫特異的ウイルス(デングウイルスの一種)が潜在感染していることが知られており、デングウイルスの増殖と細胞変性効果等を低下させる可能性が示唆されている。このため、可能な限り他のウイルスの汚染の少ない細胞系統を用いて、ヒトスジシマカ由来cDNAライブラリーを作成するのが望ましいと考えられた。そこで入手元の細胞バンクの異なる複数のC6/36細胞株(JCRB株およびECACC株)の潜在感染ウイルスの有無について、次世代シーケンサーを用いて調査した。

(3) 発現スクリーニング系構築の試み

ヒトスジシマカのデングウイルスのレセプターを探索するため、C6/36細胞(ECACC)からpoly(A)選抜によるmRNA精製を行い、cDNAライブラリーの作成を行った。cDNAは発現ベクターへの組換えが容易なGatewayベクターにクローニングした(図1)。また、既

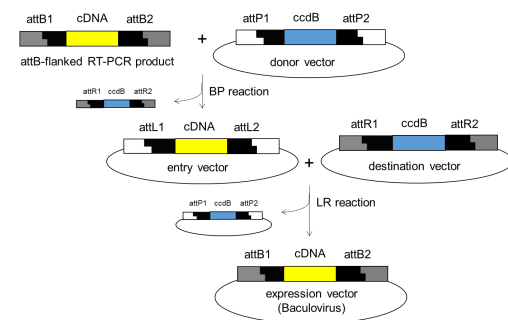


図1. cDNAライブラリーの作製

知のデングウイルスレセプターの一つであるヒトのDC-SIGNをコードする遺伝子(CD209)をコントロールとして用いるため、Gatewayベクターにサブクローニングした。作成したcDNAライブラリーは、バキュロウイルスベクターに導入し、ヨトウガの一種 *Spodoptera frugiperda* 由来の培養細胞 Sf9 に接種した。Sf9細胞で増殖したバキュロウイルスは、細胞膜を自らのエンベロープとし

て細胞から出芽するため、細胞膜上で発現したレセプターはバキュロウイルスに取り込まれ、デングウイルスとの相互作用が予想される。プレート上に固相化したデングウイルスに対して cDNA ライブラリー発現バキュロウイルスを加えると、デングウイルスのレセプターを発現している細胞から出芽したウイルスのみがデングウイルスと相互作用し、選抜されると期待された。

(4) ヒトスジシマカ培養細胞に持続感染しているウイルスによるデングウイルスの増殖に与える影響

入手元細胞バンクが異なる複数の C6/36 細胞株におけるデングウイルスの増殖性について、ウイルス力価を指標に比較した。結果、デングウイルス感受性の異なることが判明した 2 つの細胞株 (JCRB 株および ECACC 株) の RNA 解析を、次世代シーケンサーを用いて行い、両株間の発現遺伝子の差異を検出した。さらに 2 種のウイルスに持続感染していることが明らかとなった C6/36 JCRB 株 (デングウイルス低感受性) について、これらのウイルスをそれぞれ単離し、デングウイルス高感受性株である ECACC 株に接種し、これらのウイルスの感受性と細胞傷害性の評価を行った。また、双翅目昆虫で知られている自然免疫経路に注目し、持続感染ウイルス存在下における各種シグナル経路の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) デングウイルス国内分離株のゲノム解析

デングウイルスの 2014 年国内分離株のエンベロープ遺伝子の解析を行った結果、調べたすべての分離株が 1 型ウイルスであった。これら分離されたデングウイルス株のうち 11 株のコード領域全長を決定した。これらを国内感染患者から得られたデングウイルスのゲノム配列を比較した結果、完全一致するウイルス株が 7 株、一方、塩基置換を持つ株が 4 株あり、これらのうちアミノ酸変異を伴うものが 2 株含まれていた。これらの変異が細胞感受性等に影響するかについては現時点で不明である。これら分離株の中から実験に用いる株の選定を行った。

(2) 実験に用いるヒトスジシマカ由来培養細胞の性状解析

ヒトスジシマカ由来 cDNA ライブラリーを作成する準備として、実験に用いるデングウイルスに高感受性なヒトスジシマカ由来培養細胞を検索し、また昆虫ウイルス等の潜在感染がないかを確認した。その結果、入手元の異なる C6/36 細胞株間 (JCRB 株, ECACC 株) で、本来は同一クローン細胞であるにも関わらずデングウイルス感受性に顕著な違いがあることを見出した (後述)。次に JCRB 株, ECACC 株それぞれの RNA 解析を行った結果、

デングウイルス感受性の低かった JCRB 株では新種のウイルスである Shinobi tetravirus (SHTV, 仮称) とラブドウイルス科の 1 種である Menghai rhabdovirus (MERV) の 2 種のウイルスが持続感染していることが明らかとなった。各ウイルスの完全長ゲノムを決定し解析した結果、SHTV は 3 つの ORF を含む 4,982 nts の+鎖の 1 本鎖 RNA, MERV は 5 つの ORF を含む 10,777 nts の-鎖の 1 本鎖 RNA をそれぞれゲノムとして持つことが判明した (図 2)。各ウイルスの推定 RNA-dependent RNA

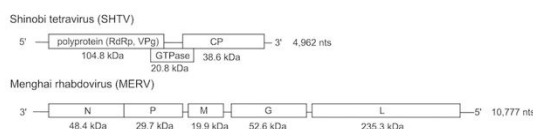


図 2. SHTV, MERV のゲノム構造

polymerase 配列より系統樹を作製し解析した結果、SHTV は同じ双翅目昆虫であるショウジョウバエから見つかっている Newfield virus と最も近縁であり、MERV は他種の蚊で見つかっている Puerto Almendras virus と最も近縁であり、これら 2 つのウイルスは昆虫ウイルスの 1 種であると推定された。JCRB 株, ECACC 株の両者は増殖能、細胞形態を含め見かけの表現系には違いが認められないことから、今回見出した 2 種の持続感染ウイルスは C6/36 細胞に対して非病原性のウイルスであると考えられた。また、JCRB 株のゲノム DNA および培養上清を解析した結果、SHTV, MERV は細胞ゲノムに挿入されたウイルス様配列 (endogenous viral element) ではなく、培養上清中に放出される感染性のウイルスであることが確認された。また、JCRB 株の培養上清より限外希釈法を用いて SHTV, MERV 非保有細胞株である ECACC 株に接種試験を行うことで、SHTV, MERV それぞれを単離することに成功した。単離したウイルスをそれぞれ ECACC 株に感染させたところ、細胞の増殖能や形態への影響は認められず、非病原性の持続感染が再現できた。以上の結果に基づき、潜在感染ウイルスのない細胞系統 (ECACC) を用いて、ヒトスジシマカ由来 cDNA ライブラリーを作成した。

(2) 発現スクリーニング系構築の試み

デングウイルスの受容体候補の探索のためのスクリーニング系の検討を行った。デングウイルス受容体は膜タンパク質であると考えられたため、ヒトスジシマカの cDNA ライブラリーを用いて受容体候補の膜タンパク質の発現とデングウイルスとの相互作用を利用した発現スクリーニングを計画した。まず、バキュロウイルスベクターを利用したスクリーニング法について検討を行った。方法としては、cDNA をバキュロウイルスベクターに導入し、昆虫培養細胞 Sf9 に感染させ新たなウイルス粒子を形成させることによって、エンベロープに発現した膜タンパク質を

取り込ませる。次にデングウイルスと結合するウイルス粒子を選抜して導入遺伝子を調べることで、受容体候補を絞り込むこととした(図3)。

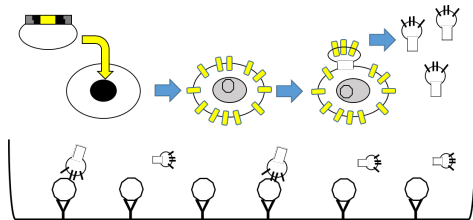


図3. ウイルス固相化プレートによるレセプター発現バキュロウイルスの選抜(模式図)

一方、スクリーニングの陽性コントロールとして用いるために、すでにヒト細胞におけるデングウイルスの受容体の一つとして知られる DC-SIGN をコードする遺伝子(CD209) cDNA を Gateway ベクターにクローニングした。CD209 とヒトスジシマカの cDNA ライブラリーをそれぞれ Gateway ベクターの組換え反応によりバキュロウイルスベクターに導入し、Sf9 細胞にトランスフェクトして、組換えウイルスの形成と力価を調べた。しかし原因は不明であるが、作製したバキュロウイルスを感染させた細胞でのウイルスの顕著な増殖は確認できず、導入遺伝子の発現は確認できなかった。このため今後、スクリーニング系の再構築と至適化が必要と考えられた。

(4) ヒトスジシマカ培養細胞に持続感染しているウイルスによるデングウイルスの増殖に与える影響

ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞の JCRB 株および ECACC 株間のデングウイルス感受性を比較したところ、2つのウイルスの潜在感染を受けている JCRB 株は、ECACC 株に比べて著しく非感受性であることが判明した。この差は、デングウイルス力価がプラトーに達する感染後 3~4 日目において 100 倍以上と極めて顕著であった(図4)。

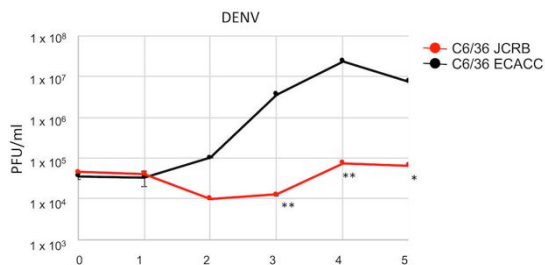


図4. JCRB 株および ECACC 株におけるデングウイルス (DENV) 増殖曲線

これら細胞株のデングウイルス感受性の違いが、潜在感染しているウイルス (SHTV, MERV) による直接的な影響であるのか、あるいは潜在感染ウイルスが、宿主細胞のデング

ウイルス感受性に関わる遺伝子(レセプターを含む宿主側因子など)の発現を変化させることによる間接的な影響であるのかは不明である。いずれにしても、野外のヒトスジシマカ個体群においても、デングウイルス感受性は様ではなく、蚊個体や蚊系統間でかなり異なる可能性もあることが推定される。一方、蚊を含む双翅目昆虫では、病原体に対する防御メカニズムとして RNAi, Toll 経路, Jak/STAT 経路, オートファジー等が知られている。C6/36 細胞は、RNAi-defective な細胞系であることがすでに知られており、今回調査した細胞株間のデングウイルス感受性の違いは、RNAi 以外の経路中の何らかの異常に起因する可能性もある。現在、これらの自然免疫経路のデングウイルスに対する防御機構、および JCRB 株の持つ高いデングウイルス抵抗性のメカニズムの詳細を明らかにするとともに、ヒトスジシマカ個体レベルにおけるデングウイルス等のフラビウイルスの感受性機構の分子基盤の解明を試みている。

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 2 件)

Daisuke Kobayashi, Katsunori Murota, Ryosuke Fujita, Kentaro Itokawa, Akira Kotaki, Meng Ling Moi, Hiroko Ejiri, Yoshihide Maekawa, Kohei Ogawa, Yoshio Tsuda, Toshiori Sasaki, Mutsuo Kobayashi, Tomohiko Takasaki, Haruhiko Isawa, Kyoko Sawabe, Dengue Virus Infection in *Aedes albopictus* during the 2014 Autochthonous Dengue Outbreak in Tokyo Metropolis, Japan, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 査読有、98 巻、2018、1460-1468、DOI:10.4269/ajtmh.17-0954

Meng Ling Moi, Daisuke Kobayashi, Haruhiko Isawa, Toshinori Sasaki, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Kyoko Sawabe, Tomohiko Takasaki, Dengue virus isolation in mosquito *Aedes albopictus* captured during an outbreak in Tokyo, 2014, by a method relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc R-expressing BHK cells, Vector Borne Zoonotic Diseases, 16 巻、2016、810-812、DOI: 10.1089/vbz.2016.1982

[学会発表](計 14 件)

Ryosuke Fujita, Fumihiro Kato, Shigeru Tajima, Masayuki Saijo, Haruhiko Isawa,

Kyoko Sawabe, Shinobi tetravirus and Kunoichi rhabdovirus, latent viruses in mosquito cultured cell line suppress multiplication of arboviruses, International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 50th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (Golden Jubilee), 2017

小林大介、木村晶平、伊澤晴彦、糸川健太郎、室田勝功、藤田龍介、Nana Antwi、Deborah Pratt、Esinam Agbosu、大橋光子、Kofi Bonney、Samuel Dadzie、沢辺京子、太田伸生、2016年ガーナ共和国における疾病媒介節足動物の分布調査ならびに保有ウイルスの解析、第69回日本衛生動物学会大会、2017

室田勝功、小林大介、藤田龍介、糸川健太郎、前川芳秀、葛西真治、角田隆、皆川昇、Tran Chi Cuong、Tran Vu Phong、Nguyen Thi Yen、Vu Sinh Nam、伊澤晴彦、沢辺京子、ベトナムのヤブカより分離されたウイルスに関する解析、第69回日本衛生動物学会大会、2017

小林大介、木村晶平、伊澤晴彦、室田勝功、糸川健太郎、藤田龍介、Nana Antwi、Deborah Pratt、Esinam Agbosu、大橋光子、Kofi Bonney、Samuel Dadzie、沢辺京子、太田伸生、2016年ガーナ共和国で採集された蚊およびマダニが保有するウイルスの解析、第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2017

室田勝功、小林大介、藤田龍介、江尻寛子、前川芳秀、佐々木年則、伊澤晴彦、津田良夫、比嘉由紀子、砂原俊彦、吉川亮、松本文昭、三浦佳奈、山下綾香、皆川昇、沢辺京子、2014年から2016年に長崎県で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の日本脳炎ウイルス保有状況調査第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2017

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、なぜネッタイシマカは、日本脳炎ウイルスのベクターにならないのか 蚊体内での考察、第68回日本衛生動物学会東日本支部大会、2016

藤田龍介、伊澤晴彦、沢辺京子、蚊が運ぶウイルス -Zika, Dengue, そしてさらに見つかる新規ウイルスたち-、第12回昆虫病理研究会シンポジウム、2016

伊澤晴彦、藤田龍介、小林大介、江尻寛子、糸川健太郎、山内健生、加藤大智、三條場千寿、小林睦生、佐々木年則、沢辺京子、次世代シーケンサーを用いた吸血性節足動物保有ウイルスの迅速・網羅的な同定、第59回日本衛生動物学会大会、2016

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59回日本衛生動物学会大会、2016

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タイシマカの抗ウイルス機構、第59回日本衛生動物学会大会、2016

伊澤晴彦、2014年のヒトスジシマカからの Dengue ウイルスの分離状況とその評価、2015年度日本衛生動物学会東日本支部例会シンポジウム「2014年に流行した Dengue 熱から、今後の媒介蚊対策に何を学ぶか」、2016

藤田龍介、江尻寛子、小林大介、伊澤晴彦、加藤大智、三條場千寿、山内健生、沢辺京子、吸血性節足動物保有ウイルス及び培養細胞持続感染ウイルスの NGS 解析、平成28年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第86回大会)、2016

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タイシマカの防御機構、日本比較免疫学会第27回学術集会、2015

小林大介、伊澤晴彦、江尻寛子、佐藤智美、津田良夫、前川芳秀、モイメンリン、小滝徹、高崎智彦、佐々木年則、小林睦生、太田伸生、沢辺京子、2014年野外捕集蚊からの Dengue ウイルスの検出ならびに分離、第50回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2015

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-ent.html>

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

佐々木 年則 (SASAKI, Toshinori)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
研究者番号：10300930

津田 良夫 (TSUDA, Yoshio)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
研究者番号：20207393

駒形 修 (KOMAGATA, Osamu)
国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
研究者番号：20435712

(3)連携研究者

鎌田 龍星 (KUWATA, Ryusei)
山口大学・理工学研究科・学術研究員
研究者番号：00711219

(4)研究協力者

室田 勝功 (MUROTA, Katsunori)

藤田 龍介 (FUJITA, Ryosuke)

小林 大介 (KOBAYASHI, Daisuke)