

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15126

研究課題名(和文) マダニゲノム中に潜む内在性ウイルス遺伝子の探索

研究課題名(英文) The exploration of endogenous virus in tick genomes

研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA, Daisuke)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：10346926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：国内で複数種のマダニを採集し、次世代シーケンサーを用いてそれらのマダニ遺伝子ゲノム中のウイルス様遺伝子の探索を行ったところ、多様なウイルス様遺伝子が内在していることを示唆された。これらの内在性ウイルス様遺伝子の機能については不明だが、ヒトや動物に病原性を示すマダニ媒介ウイルスの感染性・増殖性に影響を及ぼしている可能性が考えられ、今後の研究に有用な情報を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Various endogenous viruses have been identified in the genomes of some kinds of ticks collected in Japan by next-generation sequencing. This finding will provide the useful information for the future study about pathogenic tick-borne viruses, because endogenous viruses may influence the infection and the propagation of tick-borne viruses in ticks.

研究分野：ウイルス学

キーワード：マダニ 内在性ウイルス 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

マダニは、ヒト・動物に種々の病原体を媒介するため、その対策が重要となる衛生動物である。マダニ媒介病原体のなかでも病原性マダニ媒介ウイルスは、重篤な急性感染症を引き起こし公衆衛生上の対策が重要である。国内では、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスとダニ媒介性脳炎 (TBE) ウイルスの患者発生が確認されている。

これらの病原性マダニ媒介ウイルスは、自然界においてはマダニの垂直伝播、およびマダニ・動物感染環で維持されている。マダニ媒介ウイルスは哺乳動物・マダニ両方の細胞に感染することができるが、マダニ体内の細胞でのウイルス増殖・維持機構については十分に解明されていない。

一方、近年の報告で、動物ゲノム中にレトロウイルス以外の内在性 RNA ウイルス遺伝子の存在が確認されており、このことは他の RNA ウイルス遺伝子も動物ゲノム中に潜在的に内在している可能性を示唆している。そこで、マダニゲノム中にマダニ媒介ウイルス遺伝子が内在化して潜在している可能性が考えられ、マダニ媒介ウイルスの感染性・増殖性に内在性ウイルス遺伝子が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、国内のマダニ種を対象に、マダニゲノム中にマダニ媒介ウイルス遺伝子が内在化して潜在していないかを検証するために、マダニゲノム中の内在性ウイルス遺伝子の探索を行い、マダニ-ウイルス感染機構の解明に寄与する基礎データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

長崎県と北海道で複数種のマダニを採集した。また、以前、2013-2014 年にかけてベトナムで採集したマダニについても実験に供した。

採集したマダニから DNA を抽出し、マダニのゲノム DNA を、Covaris M220 (Covaris) を用いてフラグメント化したのち、Pipin Prep (Sage science) でフラグメントのサイズ選択を行い、Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technology) で cDNA ライブラリを構築した。

Ion proton (Thermo Fisher) で cDNA のシーケンシングを行い、出力された fastq 形式のデータを、サンプルごとにソフトウェア Trinity ver 2.5.1 を用いて de novo Assembly を行い、contig を得た。構築された contig を tblastx ver 2.7.1 を用いて、ウイルスのタンパクの Refseq 登録レコードと比較し、各 contig の翻訳産物に最も近縁となるウイルスのアミノ酸配列を検索した。tblastx が検出したウイルスタンパクの Refseq 配列に対し、blastp ver 2.7.1 および Mview ver

1.6.3 を使って、マダニゲノム由来の contig の配列をアミノ酸に翻訳した配列をマッピングし、アミノ酸レベルでの類似度を確認した。

4. 研究成果

長崎県でフタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、タカサゴチマダニ、イエンチマダニ、キチマダニ、ツノチマダニ、北海道でヤマトマダニ、オオトゲチマダニを採集した。

これらのマダニと、ベトナムで採集したオウシマダニ、クリイロコイタマダニ中に内在性のウイルス様遺伝子の探索を行った結果、まず、クリイロコイタマダニから、パルボウイルス科デンソウイルス属の NS1 タンパク質コード領域に近似の塩基配列が見つかった。

このデンソウイルス類似配列は、これまで昆虫、甲殻類から単離されたデンソウイルスよりも、クロアシマダニのゲノム中に含まれるデンソウイルス類似保存領域と似通った配列を持っていた。この結果は、この配列がクリイロコイタマダニとクロアシマダニの共通祖先の段階でゲノムに取り込まれた可能性、あるいは昆虫-甲殻類で知られているデンソウイルス属とは異なる、未知のマダニ指向性デンソウイルス近縁群が存在していることを示唆している。

他のマダニのゲノム中からは、ssRNA ウイルス、dsRNA ウイルスに属する多様なウイルス類似の配列が見つかった。ssRNA ウイルスでは、Orthomyxoviridae 科、Phenuiviridae 科、Rhabdoviridae 科、及び未分類の直鎖状 RNA ゲノムを持つウイルス、環状 RNA ゲノムを持つウイルスに近縁の配列が見つかった。Orthomyxoviridae 科 Quaranjavirus 属、Phenuiviridae 科 Phlebovirus 属、Rhabdoviridae 科のウイルスは、昆虫、またはダニによって媒介されるアルボウイルスを含む群である。直鎖状 RNA ゲノムを持つ Wuhan Tick Virus 1、環状 RNA ゲノムを持つ Bole Tick Virus 3 と Tacheng Tick Virus 4 は、ともに近年 (2015)、中国から報告されたウイルスである。オオトゲチマダニおよびヤマトマダニのゲノムからは、dsRNA ウイルスである Totiviridae 科のウイルスに近縁な配列が見つかった。また、ヤマトマダニのゲノムからは、dsRNA ウイルスで分節ゲノムを持つ、Reoviridae 科 Sedoreovirinae 亜科 Orbivirus 属のウイルスに近縁な配列が見つかった。

これらの成果から、国内のマダニのゲノム中には多様なウイルス様遺伝子が内在している可能性が示唆された。これらのウイルス遺伝子配列が、マダニ細胞におけるマダニ媒介

ウイルスの感染・増殖に何らかの影響を及ぼしているかについては興味もたれるところであり、今後の研究が期待される。

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5件)

Kyaw Kyaw Aung, Tun Mya Myat Ngwe, Buerano Corazon C., Nabeshima Takeshi, Sakaguchi Miako, Ando Tsuyoshi, Inoue Shingo, Mya Yi Yi, Hayasaka Daisuke, Thu Hlaing Myat, Thant Kyaw Zin, Morita Kouichi. Isolation and genomic characterization of Culex flaviviruses from mosquitoes in Myanmar. 2018. 247:120-124. Virus Research. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.01.007. 査読有.

Yuki Takamatsu, Leo Uchida, Raekiansyah Muhareva, Luz Mark, Kouichi Morita, Daisuke Hayasaka. A Simple Mechanism Based on Amino Acid Substitutions is not a Critical Determinant of High Mortality of Japanese Encephalitis Virus Infection in Mice. 2018. 10:62. Viruses. DOI: 10.3390/v10020062. 査読有.

Nguyen Hang L.K., Pham Hang T.T., Nguyen Tinh V., Hoang Phuong VM, Le Mai T.Q., Taichiro Takemura, Futoshi Hasebe, Daisuke Hayasaka, Akio Yamada, Kozue Hotta. The genotypes of Orientia tsutsugamushi, identified in scrub typhus patients in northern Vietnam. 2017. 111:137-139. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. DOI:10.1093/trstmh/trx022. 査読有.

Gianne Eduard L. Ulanday, Satoshi Shimada, Ngwe Tun Mya Myat, Takeshi Nabeshima, Kouichi Morita, Daisuke Hayasaka. Pathogenic potential and growth kinetics of Muko virus in mice and human-derived cells. 2016. 44:31. Tropical Medicine and Health. DOI:10.1186/s41182-016-0032-7. 査読有.

Satoshi Shimada, Kotaro Aoki, Takeshi Nabeshima, Yu Fuxun, Yohei Kurosaki, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Miako Sakaguchi, Takeshi Fuchigami, Hokuto Ono, Kodai Nishi,

Guillermo Posadas-Herrera, Leo Uchida, Yuki Takamatsu, Jiro Yasuda, Yutaka Tsutsumi, Hiromi Fujita, Kouichi Morita. Daisuke Hayasaka. Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan. 2016. 1-11. 6:20213. Scientific Reports. DOI:10.1038/srep20213. 査読有.

[学会発表](計12件)

早坂大輔、内田玲麻、Mya Myat Ngwe Tun、嶋田聡、田口裕香、佐藤和也、森田公一：長崎県のイノシシにおけるダニ媒介性ウイルス感染の血清疫学調査：第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会：2017年：EM ウェルネスリゾートコスタピスタ沖縄ホテル&スパ（沖縄県中頭郡北中城村）

早坂大輔：長崎県のイノシシにおけるダニ媒介性ウイルス感染の血清疫学調査：第25回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー：2017年：海ぼうず（三重県南伊勢町）

Gianne Eduard L. Ulanday、嶋田聡、森田公一、早坂大輔：マダニから分離された Muko virus の哺乳動物への感染性、病原性の検討：第51回日本脳炎ウイルス生態学研究会：2016年：ホテルリステル猪苗代（福島県耶麻郡猪苗代町）

早坂大輔、Gianne Eduard L. Ulanday、嶋田聡、森田公一：マダニから分離された Muko virus の哺乳動物への感染性、病原性の検討：第24回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー：2016年：休暇村指宿（鹿児島県指宿市）

早坂大輔、嶋田聡、余福勲、田口裕香、佐藤和也、森田公一：長崎県におけるマダニ媒介性ウイルスの分布調査：第53回日本ウイルス学会九州支部総会：2016年：宮崎市民プラザ・オルブライトホール（宮崎県宮崎市）

早坂大輔、嶋田聡、森田公一：長崎県におけるマダニ媒介性ウイルスの侵淫状況の調査：第64回日本ウイルス学会学術集会：2016年：札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

早坂大輔、嶋田聡、余福勲、田口裕香、佐藤和也、森田公一：長崎県におけるマダニ媒介性ウイルスの分布調査：第57回日本熱帯医学会大会：2016年：一橋大学一橋講堂（東京都千代田区）

Satoshi Shimada, Kotaro Aoki, Takeshi Nabeshima, Yu Fuxun, Yohei Kurosaki, Kazuya Shiogama, Takanori Onouchi, Miako Sakaguchi, Takeshi Fuchigami, Hokuto Ono, Kodai Nishi, Guillermo Posadas-Herrera,

Leo Uchida, Yuki Takamatsu, Jiro Yasuda, Yutaka Tsutsumi, Hiromi Fujita, Kouichi Morita. Daisuke Hayasaka: Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan: 第 63 回日本ウイルス学会学術集会: 2015 年: 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、坂口美亜子、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ウイルス: 第 158 回日本獣医学会学術集会: 2015 年: 北里大学獣医学部 (青森県十和田市)

嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田 玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 52 回ウイルス学会九州支部総会: 2015 年: 別府ビーコンプラザ (大分県別府市)

早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ウイルス: 第 23 回 Seminar on Acari-Disease Interface: 2015 年: 日名取市文化会館 (宮城県名取市)

嶋田聡、青木康太郎、鍋島武、余福勲、黒崎陽平、塩竈和也、尾之内高慶、坂口美亜子、淵上剛、小野北斗、西弘大、Guillermo Posadas Herrera、内田 玲麻、高松由基、安田二郎、堤寛、藤田博己、森田公一、早坂大輔: 国内のマダニから分離された新規ナイロウイルス: 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会: 2015 年: ホテル京都エミナース (京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 大輔 (HAYASAKA, Daisuke)
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授
研究者番号: 10346926

(2) 研究分担者

鍋島 武 (NABESHIMA, Takeshi)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 30546859