

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0045

研究課題名(和文) 脊椎動物・節足動物比較によるウイルス感染制御コアネットワーク探索

研究課題名(英文) Searching for core-network of host factors regulating virus infections by comparing vertebrate and arthropod responses

研究代表者

松野 啓太 (Matsuno, Keita)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・講師

研究者番号：40753306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯を中心に全世界で問題となっているデング熱や、西日本で毎年春から秋にかけて死者が報告されているSFTSなど、アルボウイルス(蚊やマダニなどの吸血性節足動物によって媒介されるウイルスのうち、節足動物体内でも増殖するウイルス)による感染症が国内外で問題となっている。アルボウイルスに共通する特徴は、吸血される動物である脊椎動物と、吸血する節足動物の双方において増殖可能という点である。本研究では、脊椎動物・節足動物間で様々な要因を取り込んだ宿主因子ネットワークを比較し、相同なコアネットワークを抽出した。そして、アルボウイルスの増殖に必要な可能性の高い宿主因子を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルボウイルス(蚊やマダニなどの吸血性節足動物によって媒介されるウイルスのうち、節足動物体内でも増殖するウイルス)は、吸血に乗じて感染を繰り返すために、脊椎動物と節足動物という大きくことなる環境を往復することに特化しているウイルスである。そのため、他のウイルスと異なり、脊椎動物と節足動物の両方に保存されている因子を利用して増殖できると考えられる。本研究では、そうした因子を明らかにし、アルボウイルス感染症に対する治療薬の開発などに役立つ成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Infectious diseases caused by arboviruses (viruses transmitted by blood-sucking arthropods and can also grow in the arthropods), such as dengue fever and SFTS, have become a severe problem on public health worldwide. A common feature of arboviruses is that they can grow in both vertebrates and arthropods. In this study, we compared host factor networks between vertebrates and arthropods, and extracted a homologous core network. We then identified several host factors that are likely to be associated with arbovirus replication in cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アルボウイルス 宿主因子

## 1. 研究開始当初の背景

熱帯を中心に全世界で問題となっているデング熱、西日本で毎年春から秋にかけて死者が報告されている SFTS、さらに北海道で本邦初の死者が報告されたダニ媒介性脳炎など、アルボウイルス(吸血性節足動物によって媒介されるウイルスのうち、節足動物体内でも増殖するウイルス)による感染症が国内外で問題となっている。アルボウイルスは通常、野生動物-節足動物間で生活環が成立しており、吸血によりヒトや家畜に侵入した場合に病原性を示して感染症として認識される。そのため、アルボウイルスによる感染症の克服には運び屋(ベクター)である吸血性節足動物のコントロールが重要であると考えられてきた。しかし、ベクターコントロールが成功した例は未だなく、環境中のウイルス量を減らして暴露リスクを低減する対策はアルボウイルス感染症では難しい。したがって、アルボウイルス感染症による被害を減らすためにはワクチンや抗ウイルス薬が必須であると言える。

アルボウイルスに共通する特徴は、被吸血動物である脊椎動物と、吸血性節足動物の双方において増殖可能という点である。アルボウイルスは、特定の動物への馴化による増殖効率の最大化ではなく、脊椎動物・節足動物に交互に感染する生活環を維持することで増殖機会を最大化していると考えられている(trade-off 仮説)。また、脊椎動物におけるウイルスの増殖効率と病原性は密接に関与しているため、アルボウイルスの脊椎動物に対する病原性は、アルボウイルスではないウイルスに比べて変化しにくいとも言われている。これは、アルボウイルスが急速に特定の宿主に馴化しないことを意味している。すなわち、遺伝的背景のまったく異なるウイルス種であっても、アルボウイルスであれば生活環そのものへ同様に馴化しており、2種の宿主細胞での増殖機構を安定して維持していると言える。このアルボウイルスの性質は、異なるウイルスが同じ生活環に収斂したことで獲得されたものであることから、アルボウイルスは共通する宿主因子を増殖の分子基盤として利用している可能性が高い。

これまでのアルボウイルス感染症の研究では、病原性発現の舞台である脊椎動物でのウイルス動態、および関連する宿主因子の探索が主に行われてきた。レセプターなどのウイルスタンパク質と直接相互作用する因子が数多く同定され、細胞内輸送系などのウイルス増殖に必要な因子、あるいはウイルス増殖を阻害する自然免疫系などの因子も細かく解析されている。また、ウイルスの標的細胞も、病理学的解析の分解能が上がったことで明らかになりつつある。非モデル生物である蚊とマダニでは、オミクス解析が早くから取り入れられ、遺伝子ネットワーク解析が多用されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物・節足動物間で様々な要因を取り込んだ宿主因子ネットワークを比較し、相同なコアネットワークを抽出する。抽出された因子のウイルス増殖への関与を実験的に証明することで、脊椎動物・節足動物に共通するウイルス増殖の分子基盤を明らかにすることを目的とした。さらに、多種多様なアルボウイルスが共通して利用している宿主因子を明らかにすることで、すべてのアルボウイルス感染症に共通する疾患の分子基盤を解明でき、様々なアルボウイルスに効果のあるユニバーサルワクチンや、広いスペクトラムを示す抗ウイルス薬の開発につながる基礎的知見を得ることできると考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、アルボウイルスのモデルとしてブニヤウイルス科フレボウイルス属のウイルス、ヒダニ媒介性の SFTS ウイルスと、蚊媒介性のリフトバレー熱ウイルスを用いた。まず、リバースジェネティクス法により組換えウイルスを作製した。リフトバレー熱ウイルスは、既に確立されている系の分与を受けた。また、SFTS ウイルスのリバースジェネティクス系は、イギリスの研究者により中国分離株を用いて確立されているものの、系の移植を含め日本国内での成功例はまだなく、新規に確立する必要がある。並行して、各ウイルスタンパク質にペプチドタグやルシフェラーゼなどのレポーター配列を付加したレポーターウイルスを作製した。

ウイルスを感染させた脊椎動物細胞(ヒト・マウス)と節足動物細胞(蚊・マダニ)でトランスクリプトーム解析により、ウイルス感染・増殖により発現量に変化する宿主タンパク質を探索した。次にレポーターウイルスを用いて、実際のウイルス感染とほぼ同様の条件下で、レポーター配列を用いた共免疫沈降法によって、各ウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質を網羅的に探索(インタラクトーム解析)した。

それぞれの宿主-病原体の組合せで宿主因子ネットワーク解析を行った。特に、非モデル生物である蚊とマダニでは、各タンパク質の機能が十分に解析されていないため、BLAST などによるタンパク質機能推定を補助的に用いながら、ウイルス感染に関与する宿主因子ネットワークを明

らかにした。次に、脊椎動物・節足動物でそれぞれ構築したネットワークを比較し、共通するクラスター（＝コアネットワーク）を抽出した。

次に、同定したフレボウイルス増殖に関与している宿主因子候補群の中から、ウイルス増殖に実際に影響する因子を検証した。解析は培養細胞を使い、特定の宿主因子を siRNA を用いてノックダウンした細胞において、ウイルス増殖が促進あるいは抑制されるかどうかを観察した。

#### 4. 研究成果

まず、SFTS ウイルスあるいはその類縁ウイルスを感染させた哺乳動物細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い、感染後に SFTS ウイルス感染細胞では自然免疫関連遺伝子が類縁ウイルスとは異なる発現量となっていることを明らかにした。これは、ウイルスの病原性と宿主応答に関連があることを示している。また、SFTS ウイルスの非構造タンパク質 NSs、N、RNA ポリメラーゼ(L)に対する抗体を樹立または分与を受け、各ウイルスタンパク質と結合する宿主タンパク質および RNA の解析を行った。その結果、これまでに報告されている宿主因子以外にウイルスタンパク質と相互作用する因子を複数見いだすことができた。次に、哺乳動物由来培養細胞、マダニ由来培養細胞、蚊由来培養細胞、およびサシチョウバエ由来培養細胞に、リフトバレー熱ウイルス、サシチョウバエ媒介性フレボウイルス、SFTS ウイルス、およびマダニ由来 Mukawa ウイルスを感染させ、感染後 24、48、96 時間後に RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を実施した。

コアネットワークの抽出と各宿主因子の機能解析を行った。また、重症熱性血小板減少症ウイルス(SFTSV)を感染させた細胞を可溶化し、ウイルスの構造タンパク質の1つである N タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行い、SFTSV N タンパク質と共沈する宿主タンパク質および宿主 RNA を解析した。その結果、SFTSV 感染細胞において、ウイルスの増殖に関与すると推定される複数の宿主因子を同定した。次に、SFTSV ミニゲノム系を用いてウイルスの増殖に関与すると推定された上記の宿主因子の遺伝子発現をノックダウンし、ミニゲノム系に与える影響ならびにウイルス増殖に与える影響を測定した。その結果、これらの宿主因子のうち少なくとも 3 種の遺伝子の発現が SFTSV の増殖に正の影響を与えることが明らかとなった。以上のことから、ネットワーク解析を利用して節足動物媒介性フレボウイルスの増殖に重要な宿主因子を同定することができた。

SFTSV N タンパク質と共沈する宿主 RNA を解析した結果得られた、SFTSV 感染細胞において、ウイルスの増殖に関与すると推定される複数の宿主因子や、ここまでで同定したフレボウイルス増殖に関与している宿主因子候補群の中から、ウイルス増殖に実際に影響する因子を絞り込んだ。解析は培養細胞を使い、特定の宿主因子に対する siRNA を用いてノックダウンした細胞において、ウイルス増殖が促進あるいは抑制されるかどうかを観察した。培養細胞系でウイルス増殖を著しく促進あるいは抑制することが明らかとなった宿主 RNA については、さらにその産物であるタンパク質がウイルス増殖に及ぼす影響を解析し、RNA とタンパク質のいずれが重要であるかを検証した。次に、SFTSV と同じフレボウイルスである Mukawa ウイルスについて、同様の検討を行い、フレボウイルスの増殖に共通して関与する可能性のある宿主因子、および SFTSV の増殖に特異的に関与する宿主因子を同定した。これまでの成果より、ネットワーク解析を利用して節足動物媒介性フレボウイルスの感染を制御する宿主因子を探索することができることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuno Keita, Nonoue Noriyuki, Noda Ayako, Kasajima Nodoka, Noguchi Keita, Takano Ai, Shimoda Hiroshi, Orba Yasuko, Muramatsu Mieko, Sakoda Yoshihiro, Takada Ayato, Minami Shinji, Une Yumi, Morikawa Shigeru, Maeda Ken | 4. 巻<br>24                |
| 2. 論文標題<br>Fatal Tickborne Phlebovirus Infection in Captive Cheetahs, Japan  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Emerging Infectious Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>1726 ~ 1729 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3201/eid2409.171667   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Torii Shiho, Matsuno Keita, Qiu Yongjin, Mori-Kajihara Akina, Kajihara Masahiro, Nakao Ryo, Nao Naganori, Okazaki Katsunori, Sashika Mariko, Hiono Takahiro, Okamatsu Masatoshi, Sakoda Yoshihiro, Ebihara Hideki, Takada Ayato, Sawa Hirofumi | 4. 巻<br>10              |
| 2. 論文標題<br>Infection of newly identified phleboviruses in ticks and wild animals in Hokkaido, Japan indicating tick-borne life cycles  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Ticks and Tick-borne Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>328 ~ 335 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ttbdis.2018.11.012   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuno Keita, Kajihara Masahiro, Nakao Ryo, Nao Naganori, Mori-Kajihara Akina, Muramatsu Mieko, Qiu Yongjin, Torii Shiho, Igarashi Manabu, Kasajima Nodoka, Mizuma Keita, Yoshii Kentaro, Sawa Hirofumi, Sugimoto Chihiro, Takada Ayato, Ebihara Hideki | 4. 巻<br>3               |
| 2. 論文標題<br>The Unique Phylogenetic Position of a Novel Tick-Borne Phlebovirus Ensures an Ixodid Origin of the Genus Phlebovirus  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>mSphere  | 6. 最初と最後の頁<br>e00239-18 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1128/mSphere.00239-18   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>水間奎太, 松野啓太, 岡松正敏, 高田礼人, 迫田義博                           |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群ウイルスの核タンパク質と宿主RNA間の相互作用がウイルス増殖に与える新たな機能の解明 |
| 3. 学会等名<br>第16回 ウイルス学キャンプ in 湯河原                                  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keita Mizuma, Keita Matsuno, Masatoshi Okamatsu, Ayato Takada, Yoshihiro Sakoda   |
| 2. 発表標題<br>Profiling RNAs binding with the nucleoprotein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) revealed orchestrated replication of a segmented RNA virus |
| 3. 学会等名<br>International meeting on arboviruses and their vectors (IMAV 2019) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松野 啓太、中尾 亮、草木迫 浩大、大場 靖子、澤 洋文 |
| 2. 発表標題<br>マダニ中の多様なフレボウイルスは何者か？         |
| 3. 学会等名<br>第162回 日本獣医学会学術集会             |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>水間奎太, 松野啓太, 岡松正敏, 高田礼人, 迫田義博            |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群ウイルスの核タンパク質Nと結合する宿主RNAの機能解明 |
| 3. 学会等名<br>第162回 日本獣医学会学術集会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松野啓太、中尾亮、梶原将大、下田宙、海老原秀喜、高田礼人、前田健、岡松正敏、迫田義博 |
| 2. 発表標題<br>マダニ中のフレボウイルスの遺伝子系統解析に基づく性状推定               |
| 3. 学会等名<br>第162回 日本獣医学会学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2019年                                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>水間 奎太、松野 啓太、岡松 正敏、高田 礼人、迫田 義博           |
| 2. 発表標題<br>重症熱性血小板減少症候群ウイルスの核タンパク質Nと結合する宿主RNAの機能解明 |
| 3. 学会等名<br>第67回日本ウイルス学会学術集会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ryo Nakao, Gohta Kinoshita, Ayumi Saito, Yongjin Qiu, Keita Matsuno, Chihiro Sugimoto, Ken Katakura |
| 2. 発表標題<br>Complete mitochondrial genome analysis of ticks   |
| 3. 学会等名<br>14th International Congress of Parasitology (ICOPA 2018) (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keita Mizuma, Keita Matsuno, Masatoshi Okamatsu, Ayato Takada, Yoshihiro Sakoda   |
| 2. 発表標題<br>In-depth analysis of viral and host RNAs interacting with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) nucleoprotein N |
| 3. 学会等名<br>日本ウイルス学会北海道支部 平成30年度 夏季シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Keita Matsuno, Masahiro Kajihara, Nodoka Kasajima, Ryo Nakao, Shiho Torii, Hiroshi Shimoda, Ken Maeda, Ayato Takada, Hideki Ebihara, Hirofumi Sawa |
| 2. 発表標題<br>Genetic diversity among phleboviruses identified in ticks; implication of distinct evolutionary pathways of phleboviruses                          |
| 3. 学会等名<br>第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム（招待講演）（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kasajima N, Matsuno K, Torii S, Hiono T, Okamatsu M, Ebihara H, Sakoda Y  |
| 2. 発表標題<br>Suppression of PKR signaling pathway by nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. |
| 3. 学会等名<br>第66回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山崎 剛士<br>(Yamasaki Takeshi)<br><br>(70709881) | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員<br><br>(10101) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|