

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14576

研究課題名(和文)脂質輸送機構を介したアルボウイルスの節足動物内輸送と垂直感染機構の解明

研究課題名(英文)An elucidation in the mechanism of vertical transmission of arthropod-borne virus(arbovirus) via a lipid transport mechanism

研究代表者

西山 祥子(Shoko, Nishiyama)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：90817058

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):脂質は節足動物の主要栄養素であると同時に節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)を構成する成分でもある。このため、蚊の脂質を輸送する蛋白質がアルボウイルスの感染に関わっていると仮定した。蚊に2本鎖RNA(dsRNA)を導入することにより、標的となる遺伝子をノックダウンする事が可能である。上記の仮説を検証するため脂質輸送蛋白質をノックダウンした蚊にウイルスを感染させ、アルボウイルスの感染率や垂直感染率に与える影響を解析する。このシステムを利用し、蚊の脂質輸送蛋白質がアルボウイルスの感染に果たす役割を解明し、垂直感染メカニズムを明らかにする事を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスを脂質複合体の一種として、節足動物の脂質代謝の観点から感染メカニズムの解明に取り組んだ研究はほとんどなく、ウイルスの伝播・垂直感染に関する新規知見が得られることが期待される。さらに垂直感染機能を欠損したウイルスを作製し、自然界でのウイルス感染制御にも有用なワクチン開発が期待される。宿主の脂質代謝機構は節足動物、鳥類、哺乳類で進化的に保存され、共通点が多い。特にアルボウイルスの哺乳類感染は催奇形性を誘発するため、本研究の成果を応用することにより、ヒトを含めた哺乳類での垂直感染機構の解明や異常産・催奇形性に有用な治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文):Lipid is not only the essential nutrient for arthropods but also components of arbovirus viral particles. Therefore, I hypothesized that the mosquito's lipid transport protein interacts with arbovirus infection.

The mosquito's target gene can be knocked down by introducing double-stranded RNA(dsRNA) into mosquitos. La crosse virus infects mosquitos in which lipid transport protein is knocked down, and the infectious rate and vertical transmission rate of knock-down mosquitos were analyzed using this technology. I aim to understand the role of lipid transport protein in arbovirus infection and reveal the mechanism of vertical transmission of arbovirus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アルボウイルス 蚊 ラクロスウイルス 脂質輸送蛋白質 垂直感染

1. 研究開始当初の背景

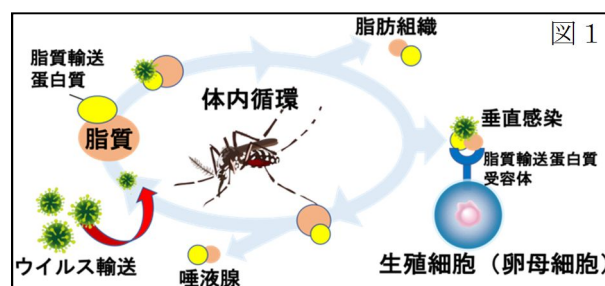
【背景】

近年、気候変動により、アルボウイルスの流行地域やベクター分布域が拡大しており、その感染症への対策の重要性が増している (Neglected Tropical Diseases - Oceania, 2016)。アルボウイルスの蚊への感染において特筆すべき特徴として垂直感染があり、これがウイルス感染蚊の増加を招き、哺乳類への感染の流行につながる直接因子となる。そのため、ウイルス感染蚊の垂直感染を制御することにより、人を含めた哺乳類の感染を予防できると考えられる。

蚊が取り込んだアルボウイルスは中腸細胞で増殖後、体腔液に放出され、生殖細胞に輸送されて垂直感染するが、

- (1) 蚊の生殖細胞へのウイルスの輸送経路と
- (2) 生殖細胞への感染機構には不明な点が多い。

アルボウイルスの多くは宿主由来の脂質膜からなるエンベロープから構成されており、これらの脂質輸送機構を普遍的に利用している可能性が高い。



このことからアルボウイルスは蚊の吸血によって脂質と共に中腸から取り込まれ、脂質輸送受容体によって全身に輸送され、生殖細胞に感染することで垂直感染するという仮説に至った (図1)。

2. 研究の目的

本研究では蚊のアルボウイルスの垂直感染機構を解明することを目的とした。アルボウイルスが体内移動のため脂質代謝機構を利用し、生殖細胞に侵入するか否かを解明する。具体的には、人獣共通感染症国際共同研究所が飼育、維持しているヒトスジシマカとネッタシマカに垂直感染率が高いラクロスウイルスを感染させ、以下の2点を明らかにする。

- (1) ウイルスの輸送に重要な脂質輸送蛋白質の特定
- (2) 脂質代謝の遺伝子発現を解析し、異種の宿主での垂直感染率の違いを考察

3. 研究の方法

- (1) LAMP法によるラクロスウイルスの検出
- (2) 節足動物の複数の脂質輸送蛋白質を2本鎖RNAでノックダウンし、感染時の節足動物内のウイルス分布と垂直感染率の解析

4. 研究成果

(LAMP法を用いた蚊、及び幼虫のラクロスウイルスの検出)

(LAMP法に用いるプライマーの選別とラクロスウイルスの遺伝子増幅効率の検証)

蚊の幼虫からRNAを抽出し、RT-PCRを行ったところ幼虫に含まれるPCR阻害物質により、ラクロスウイルスの検出を行うことが出来なかった。そのため、クルードサンプルからの遺伝子増幅に有用なLAMP法をラクロスウイルス検出のために確立することとした。LAMP法にはNEB社のWarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA)を用いた。本試薬は遺伝子増幅によって、試薬の色がpH依存的に赤色から黄色に変化する。本試薬とラクロスウイルスの感染が確認されているヒトスジシマカを用いて、ラクロスウイルスの遺伝子の増幅を試みた。

ラクロウイルス感染ヒトスジシマカから RNA を抽出し、逆転写反応を行い得られた cDNA を $10^0 \sim 10^{-4}$ まで段階希釈し、LAMP 反応液に添加し、65 度 30 分反応させたところ、以下の反応が認められた(図 2)。

- RNA、cDNA それぞれで 10^{-4} まで黄色に変色した。
- cDNA の原液では黄色への変色は認められなかった。
- 陰性コントロールでは 30 分経過しても黄色への変色は認められなかった。

このことから LAMP 法を用いて蚊に感染しているラクロウイルスの遺伝子の検出を行うことが可能であることが示された。また、 10^{-4} の希釈まで増幅が認められ、同サンプルをリアルタイム PCR で解析した場合と遜色なかった(図 3)。以上のことから、LAMP 法によりラクロウイルスを検出することができた。さらに RNA、及び cDNA 添加サンプルでのウイルスの検出感度に差は認められなかった。また、cDNA の原液で黄色に陽転しなかったのは、添加した cDNA の量が多すぎたためであると考えられる。このことから、LAMP 法に蚊から抽出した RNA を直接用いることが可能であると考えられた。

(LAMP 法を用いた幼虫からのウイルス検出)

上記に示された通り、幼虫から抽出した RNA を用いた RT-PCR は遺伝子増幅阻害物質により困難である可能性が考えられた。そのため、LAMP 法は幼虫に感染しているウイルスの検出に有用かを検証した。

非感染のヒトスジシマカの幼虫に 100ul の PBS を添加し、すり潰した。それを 1,200rpm で 10 分遠心し、その上清 100ul に $10^5 \sim 10^2$ PFU のラクロウイルスをそれぞれ添加した。そこから、RNA を抽出して 25ul の水で溶出した。その内、1ul を LAMP 法に用いた (4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 4×10^0 のウイルスをそれぞれ LAMP 反応液に添加した)。

- 40PFU のラクロウイルスを添加したサンプルまで黄色に陽転を認めた(図 4)。

以上のことから、LAMP 法を用いた幼虫に感染しているラクロウイルスの検出の限界は 40PFU であると考えられた。これは成虫からのラクロウイルス検出の際の感度と同等となった。

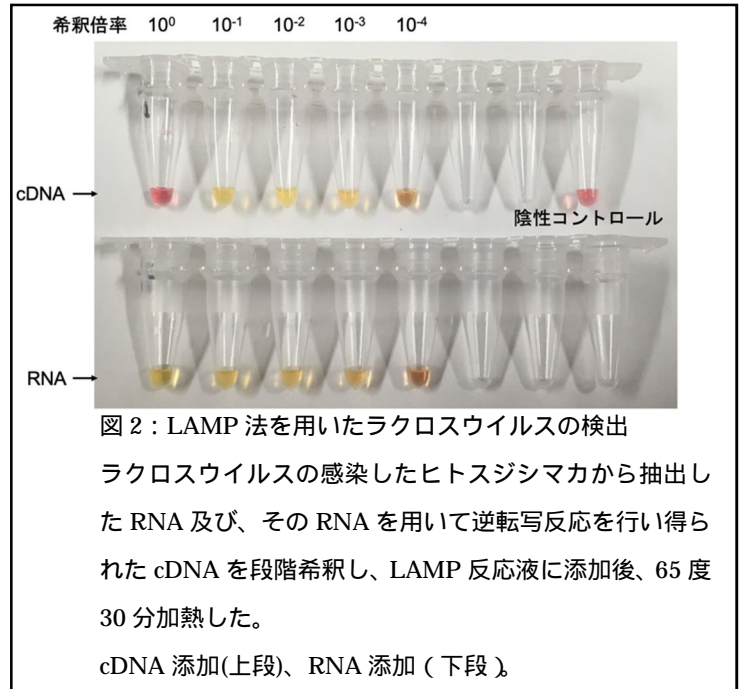


図 2 : LAMP 法を用いたラクロウイルスの検出
ラクロウイルスの感染したヒトスジシマカから抽出した RNA 及び、その RNA を用いて逆転写反応を行い得られた cDNA を段階希釈し、LAMP 反応液に添加後、65 度 30 分加熱した。
cDNA 添加(上段)、RNA 添加(下段)



図 3 : リアルタイム PCR を用いたラクロウイルスの検出
LAMP 法に用いたラクロウイルスの感染したヒトスジシマカの cDNA をリアルタイム PCR にて解析した。希釈倍率は $10^0 \sim 10^{-4}$ まで行った。LAMP 法による解析と同様の結果が得られた。

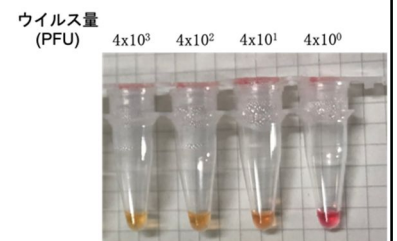


図 4 : 幼虫から抽出した RNA に含まれるウイルスの検出限界

(ヒトスジシマカの垂直感染率の算出)

本研究では dsRNA 接種して作成したノックダウン蚊を用いて実験を行う。しかし、dsRNA がウイルスの垂直感染に与える影響は不明である。そのため、ヒトスジシマカの垂直感染率を評価した。

材料と方法

ヒトスジシマカを用いて以下の実験を行った(図5)。33匹のヒトスジシマカに人工吸血装置を用いて 2×10^6 /ml のウイルスを経口接種した。感染10日、12日、14日目に同装置を用いて、追加で蚊への吸血を行った。感染後17-22日の間に採卵を行い、合計188個の卵を採取した。

ついで卵を孵化させ、33個の幼虫を得た。また非感染コントロール群として31匹のヒトスジシマカに細胞培養液加血液を吸血させた。蚊の吸血率、羽化率を表1に示した。

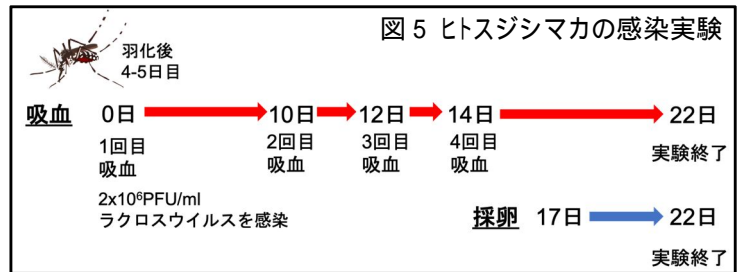
33匹の幼虫から RNA を抽出し、LAMP 法を用いてラクロスウイルスの垂直感染率を解析した。また非感染の幼虫5匹を陰性コントロールとして同様に解析した。

結果

33匹の幼虫の RNA を解析したところ7匹で LAMP 反応液が黄色に陽転した。また、陰性コントロールでは見られなかった。

考察

本実験でヒトスジシマカでのラクロスウイルスの垂直感染率は21%であることが明らかになった(表1)。



	感染群 (33匹)	非感染群 (31匹)
吸血率	82.5%	77.5% (ウイルスなし)
産卵数	113	136
羽化率	33	41
垂直感染率	21%(7/33匹)	0%

(遺伝子ノックダウン蚊へのラクロスウイルスの感染)

脂質輸送蛋白質のノックダウンしたヒトスジシマカ及び、ネッタイシマカにラクロスウイルスを感染させ、その感染率、垂直感染率を解析した。

材料と方法

実験の流れを図6に示す。羽化後4-5日目の蚊を用いた。蚊の重要な脂質輸送蛋白質であるアポリポプロテイン II/I とヴィテロジェニン A の dsRNA を37匹のヒトスジシマカにそれぞれ接種した。また同様にアポリポプロテイン II/I、ヴィテロジェニン A 遺伝子の dsRNA をそれぞれ25匹、19匹、25匹のネッタイシマカに接種した。

さらに陰性コントロールとして GFP の dsRNA を30匹のヒトスジシマカ、22匹のネッタイシマカに接種した。1回目の吸血は dsRNA 接種後4日目に人工吸血装置を用いて行い、 3×10^7 PFU/ml のウイルスを含むウマ血液を蚊に吸血させた。2回目の吸血は1回目の吸血後9日目に、それぞれの吸血後、産卵した卵を回収した。



結果と考察

蚊のウイルス感染をリアルタイム PCR を行い解析したところ、ウイルスの感染が認められた(図7)。また、脂質輸送蛋白質をノックダウンした蚊でもウイルス感染が認められた(図8)。

(遺伝子ノックダウン蚊の産卵率)

本実験で dsRNA を投与されたヒトスジシマカが産んだ卵数を表 2 に示した。アポリポタンパク II/I dsRNA を投与した群では産卵数の減少が認められた。対してヴィテロジェニン投与群では産卵数の減少は認められなかった。同様に dsRNA を投与されたネッタシマカが産んだ卵数を表 3 に示した。同様にアポリポタンパク II/I dsRNA を投与した群では産卵数の減少が認められた。卵の孵化率はいずれ群でも低かった。

(垂直感染率を幼虫を用いて検証)

上記で確立した LAMP 法を用いて、幼虫でのウイルス感染率を検証した。

- ヒトスジシマカでは陰性コントロール群の垂直感染率が 20%であったのに対し、ヴィテロジェニン A ノックダウン群では 12.5%であった(表 4)。
- ネッタシマカではいずれの群でも垂直感染が認められなかった(表 5)。

陰性コントロール dsRNA(GFP)を導入した蚊におけるラクロスウイルスの垂直感染率は dsRNA 未導入蚊と同等であった(表 1、表 4)。このことから、dsRNA が蚊でのウイルスの垂直感染に及ぼす影響は低いと考えられた。

本実験により、ネッタシマカよりヒトスジシマカのラクロスウイルスの垂直感染率が高いことが明らかとなった。また、成虫に感染したウイルス量は同等であることが示されている(図 7)。このことから蚊の種類の違いにより、垂直感染率が異なることが明らかとなった。また、ヒトスジシマカで、わずかではあるが、ヴィテロジェニン A ノックダウン群で垂直感染率の減少が見られた。ヴィテロジェニン A が垂直感染に関わっている可能性が示された。今後、さらに検体数を増やして解析を進める予定である。

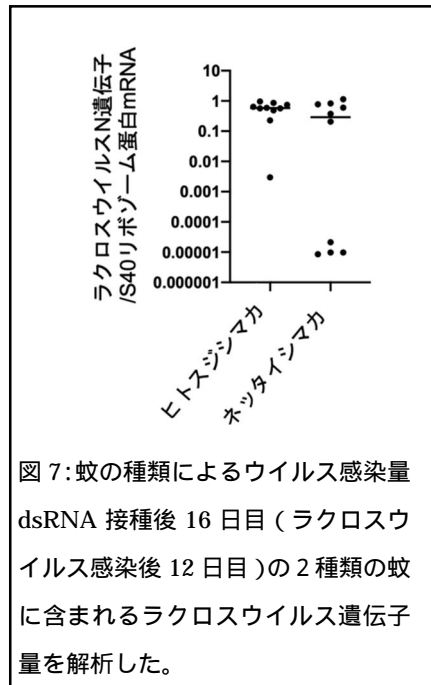


図 7:蚊の種類によるウイルス感染量 dsRNA 接種後 16 日目(ラクロスウイルス感染後 12 日目)の 2 種類の蚊に含まれるラクロスウイルス遺伝子量を解析した。

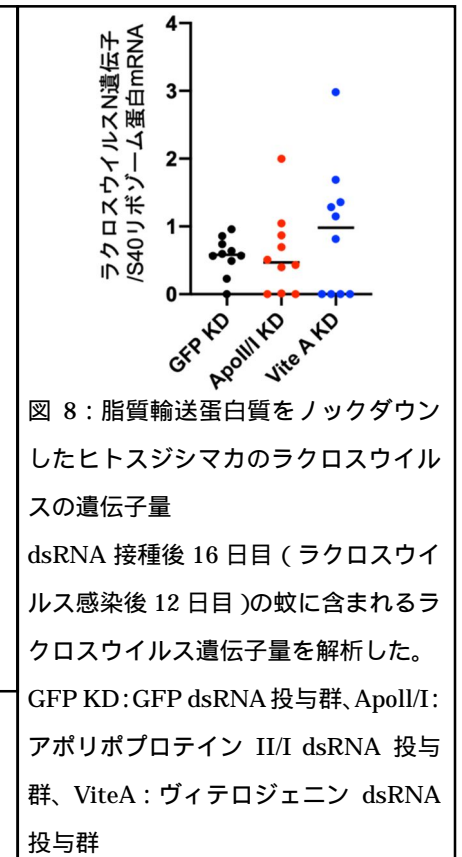


図 8:脂質輸送蛋白質をノックダウンしたヒトスジシマカのラクロスウイルスの遺伝子量 dsRNA 接種後 16 日目(ラクロスウイルス感染後 12 日目)の蚊に含まれるラクロスウイルス遺伝子量を解析した。 GFP KD:GFP dsRNA 投与群、Apoll/I:アポリポタンパク II/I dsRNA 投与群、ViteA:ヴィテロジェニン dsRNA 投与群

表 2:脂質輸送蛋白質がノックダウンしたヒトスジシマカの産卵率、孵化率

	GFP dsRNA 接種群	アポリポタンパク II/I dsRNA 接種群	ヴィテロジェニン A dsRNA 接種群
接種した蚊の数	30	37	37
卵の数	134	18	230
孵化数	10	0	8

表 3:脂質輸送蛋白質がノックダウンしたネッタシマカの産卵率、孵化率

	GFP dsRNA 接種群	アポリポタンパク II/I dsRNA 接種群	ヴィテロジェニン A dsRNA 接種群
接種した蚊の数	22	25	19
卵の数	475	100	248
孵化数	77	2	12

表 4:脂質輸送蛋白質がノックダウンしたヒトスジシマカの垂直感染率

	ノックダウン遺伝子		
	GFP	アポリポタンパク II/I	ヴィテロジェニン A
垂直感染率 (%)	20%(2/10匹)	0% (0/0匹)	12.5%(1/8匹)

表 5:脂質輸送蛋白質がノックダウンしたネッタシマカの垂直感染率

	ノックダウン遺伝子		
	GFP	アポリポタンパク II/I	ヴィテロジェニン A
垂直感染率 (%)	0%(0/10匹)	0% (0/2匹)	0%(0/7匹)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Runtuwene Lucky R., Kawashima Shuichi, Pijoh Victor D., Tuda Josef S. B., Hayashida Kyoko, Yamagishi Junya, Sugimoto Chihiro, Nishiyama Shoko, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Takasaki Tomohiko, James Anthony A., Kobayashi Takashi, Eshita Yuki	4. 巻 21
2. 論文標題 The Lethal(2)-Essential-for-Life [L(2)EFL] Gene Family Modulates Dengue Virus Infection in Aedes aegypti	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7520 ~ 7520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207520	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nishiyama Shoko, Hirano Minato, Muto Memi, Kambara Mao, Ito Naoto, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 66
2. 論文標題 Y shaped RNA secondary structure of a noncoding region in the genomic RNA of tick borne encephalitis virus affects pathogenicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 234 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12971	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------