

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19119

研究課題名（和文）媒介蚊のゲノムに眠る古代ウイルス遺伝子は蚊に深刻な病態を引き起こすのか？

研究課題名（英文）Do ancient viral genes derived from endogenous viral elements induce significant fitness costs in mosquitoes?

研究代表者

鈴木 康嗣（Suzuki, Yasutsugu）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特定准教授

研究者番号：00896087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：シマカは多くのヒト病原性ウイルスを媒介するが、シマカ自体に重篤な病態を誘導するウイルスは皆無である。本研究では古代ウイルスが蚊に高い病原性を持っていた可能性を考え、その探索元としてEVEに着目した。EVE探索は、複数のバイオインフォマティクスツールを用いて最適な検出条件を検討し、ネッタイシマカゲノムから長いORFを持つEVEが多く同定された。これらの遺伝子を人工合成し、ネッタイシマカ細胞および個体に過剰発現させたが、細胞変性や生存減退は見られなかった。シマカへの病原遺伝子の同定には至らなかったが、本研究成果は、シマカが進化の過程でウイルス感染への高い寛容性を獲得したことを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのヒト病原性ウイルスを媒介するシマカは、自身がウイルスに感染しても重篤な病態を示さないため、蚊に病態を誘導するウイルスの同定は、その制御につながる。我々は、その探索元として、古代のウイルスに着目し、シマカのゲノムに残る内在性ウイルス配列（EVE）を様々な生命情報学ツールで探索を実施した。その結果、新たな古代ウイルス由来と考えられる遺伝子を同定し、人工合成を行った。これらの遺伝子をシマカの細胞株と個体内で発現させたが、細胞傷害や寿命の減退は見られなかった。本研究はEVE探索の適切なツール選択の重要性とシマカのウイルスに対する高い寛容性を示唆し、ウイルスと蚊の共進化の理解を深めた。

研究成果の概要（英文）：Aedes mosquitoes are known to transmit numerous human pathogenic viruses, yet there are scant reports of viruses inducing severe pathology in Aedes mosquitoes themselves. This study hypothesized that ancient viruses may have possessed high pathogenicity for vector mosquitoes and employed various bioinformatics tools to explore endogenous viral elements (EVEs). In the end, we chose and performed tBLASTn searches on multiple Aedes aegypti genomes, identified EVEs with extended open reading frames (ORFs), and identified several novel EVEs. These genes were then artificially synthesized and overexpressed in Aedes aegypti cell lines and individuals with no obvious cytopathic effects or reduction in mosquito survival. Although we were not able to find pathogenic gene in the mosquitoes, our findings suggest the presence of novel EVEs with ORFs and highlight the evolved tolerance of Aedes mosquitoes to viral infections.

研究分野：ウイルス学、衛生昆虫学

キーワード：内在性ウイルス配列 媒介蚊

1. 研究開始当初の背景

シマカなどの媒介蚊にはヒト病原性ウイルス以外にも、多様な蚊特異的ウイルスが感染しているにも関わらず、それによる重篤な病態誘導は、ほとんど報告されていない。近年、我々はネッタイシマカとそれに広く感染する蚊特異的ウイルスをモデルとして、内在性ウイルス配列(感染したウイルス由来のDNAが、宿主のゲノムに組み込まれたもの、endogenous viral element: EVE)が同一の核酸配列を持つウイルスの複製を抑制することを報告した。シマカの内在性ウイルス配列の多くは、数万年から数百万年前に蚊のゲノムに挿入されたと推定されており、太古の昔にシマカが獲得した抗ウイルス機構の一つと考えられる。その中には数 kb に渡り、タンパクをコードする領域(open reading frame: ORF)を保持している配列が稀に存在する。この ORF の保持は、内在性ウイルス配列がシマカの生存のために重要な機能を有することを強く示唆している。以上より、ORF を保持している内在性ウイルス配列は、その元となったウイルスの蚊体内での複製を抑制していたと考えられる。蚊の生存戦略上、抑制する必要があったウイルスということは、蚊への高い病原性を有していた可能性が高い。

現在の実施されている蚊媒介感染症制御の一つは殺虫剤散布であるが、他の生物に悪影響を及ぼすと共に薬剤耐性蚊の出現の問題も顕在化している。よって、媒介蚊を狙い撃ちにして病態誘導させるウイルス技術が開発できれば、新たな媒介蚊ならびに蚊媒介性感染症制御法となりうる。

2. 研究の目的

本研究は、蚊病原性ウイルスの探索元として、現存するウイルスではなく、シマカのゲノムに化石として残るウイルス遺伝情報の EVE に着目し、蚊に深刻な病態を誘導する古代のウイルス遺伝子の同定と復元を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In silico* EVE 探索ツールの比較と検討

ネッタイシマカゲノム中の EVE の網羅的探索に向けて、バイオインフォマティクスツールの比較検討を行った。具体的には、EVE 探索が多く行われてきたヒトゲノムを用いて、tBLASTn、tFASTx、tFASTy による EVE 検出感度を比較した。

(2) ネッタイシマカゲノムからの EVE の網羅的探索

ネッタイシマカのリファレンスゲノムである AaegL5.0 ならびに、近年、公開されたネッタイシマカゲノム配列である CU_AaegROCK_1.0 に対して、tBLASTn、tFASTx、tFASTy による EVE 探索を行った。クエリーとしては、シマカのエVEの中でも、多くの割合を占めるフラビウイルス属ウイルスのアミノ酸配列を用いた。

(3) 長い ORF を保持する EVE の選別

上記(2)のエVE探索において、ヒットしたネッタイシマカのエVEから100コドン以上を終止コドンなしで保持するORFを網羅的に抽出した。さらにそのORF配列をクエリーとして、既知のフラビウイルス属ウイルスに対してBLASTxを行うことで、フラビウイルスに配列類似性を持つEVE由来ORFを得た。さらに、それらのORFを手作業にて解析し、比較的長いORFを保持するフラビウイルス様EVEを同定した。

(4) 同定された EVE 由来遺伝子のクローニング

バイオインフォマティクス解析より同定されたEVEの中でも、AaegL5.0およびCU_AaegROCK_1.0の両ゲノムに共通して存在し、およそ5.5 kbpと同定されたEVEの中では最長のEVEに着目し、その遺伝子のクローニングを行った。遺伝子解析ソフトを用いて、類似のフラビウイルスである cell-fusing agent virus、Kamiti river virus、Culex flavivirus、Kilpisjarvi flavivirus などの遺伝子配列との比較によって、EVE中のストップコドンもしくはフレームシフトを手作業で除去した。これによって、5.5 kbのエVE由来遺伝子配列を得た。さらに、このEVE由来遺伝子配列から、非構造タンパク遺伝子(non-structural: NS)3とNS4に該当するDNA配列を、人工的に合成した。合成したDNA断片は、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB)を用いて、昆虫細胞株の発現プラスミドである pIEx-4 の multiple cloning site にクローニングした。その後、抽出したプラスミドは Sanger シーケンス解析を行った。

(5) EVE 由来遺伝子発現による蚊細胞ならびに個体への影響評価

Aag2 細胞は、ライボビッツ L-15 培地に 10% FBS ならびに 1x ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した培地で、培養を行った。EVE 由来の NS3 および NS4 に加えて GFP 発現プラスミドをトランスフェクションに用いた。トランスフェクションは、TransIT-Insect (MirusBio) を用いて行った。

ネッタイシマカ成体は、28℃、相対湿度 80% の環境下で、10% ショ糖水を栄養源として維持した。各プラスミドを個体内で発現させるために、*in vivo* トランスフェクションを用いた (G Cheng, 2011, PLoS One)。具体的には、プラスミドを Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) と混合し、30 分室温でインキュベート後、ネッタイシマカ成体の胸腔にマイクロインジェクターを用いて接種した。その後、日ごとの生存個体数を計測し、蚊の生存への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) *In silico* EVE 探索ツールの比較と検討

本研究の目的達成には、シマカの EVE を余すことなく同定することが重要となる。これまで、EVE の探索にはもっぱら tBLASTn と呼ばれるプログラムが用いられてきた。tBLASTn による検索では、現存ウイルスのタンパク質のアミノ酸配列をクエリーとして用い、生物のゲノムの塩基配列をデータベースとして類似配列の探索を行う。tBLASTn は実行速度が比較的に早く、また検出感度も良い。一方、tBLASTn では変異により生じたフレームシフトを考慮できず、進化速度のはやいウイルス遺伝子由来の EVE や、内在化から長い時間が経過し変異を蓄積した EVE については検出できない可能性がある。実際に近年の研究において、tFASTx および tFASTy というフレームシフトを考慮し、tBLASTn 様の配列類似性検索を行うプログラムによって、tBLASTn では検出できない EVE の検出に成功したことも報告されている (Garcia et al. Virus Evol. 2023)。これらのことから、tFASTx/tFASTy を用いることにより、tBLASTn より高感度にシマカゲノムの EVE を検出できる可能性がある。そこではじめに、tBLASTn と tFASTx/tFASTy の EVE 検出感度を比較した。そこで、これまでに EVE 探索が頻繁に行われているヒトゲノムを用いて、tBLASTn、tFASTx、tFASTy による EVE 検出感度の比較を行った。その結果、tFASTx と tFASTy では、tBLASTn と比べてより多くのヒットが得られ、EVE 探索における有用性が示唆された。

(2) ネッタイシマカゲノムからの EVE の網羅的探索

次に、実際にネッタイシマカのゲノムを用いて、tBLASTn、tFASTx、tFASTy による EVE の検索を行った。また今回の検索では、ネッタイシマカのリファレンスゲノムとして使用されている AaegL5.0 に加え、近年新たに公開された高品質のネッタイシマカゲノム配列である CU_AaegROCK_1.0 を用いた。フラビウイルス属ウイルスのアミノ酸配列をクエリーとし、上記の 2 つのゲノムに対して各プログラムによって検索を行った結果、tFASTx と tFASTy では、tBLASTn と比べて大量のヒットが得られた。しかし、ヒットした配列のうち、tFASTx と tFASTy のみでヒットした配列の多くは単純リピーター様配列であり、偽陽性であると考えられた。偽陽性と真の EVE 配列を適切に区別するためには、大規模検索後に手動での精査が必要であり、多大な労力を要した。これらのことから、クエリーとなるウイルスの配列や生物のゲノム配列、あるいはその特定の組み合わせによっては、tFASTx と tFASTy が必ずしも最善の検出プログラムではないということが示唆された。これらの結果から、本研究では多少の感度を犠牲にしても、より正確と考えられる tBLASTn による検出データを用いることとした。

(3) 長い ORF を保持する EVE の選別

古代のフラビウイルスの遺伝子を復元するためには、比較的長いオープンリーディングフレームを持つ EVE を検出する必要がある。そこで、tBLASTn 検索によってヒットしたネッタイシマカゲノム内の EVE 配列から 100 コドン以上からなる ORF を網羅的に抽出し、さらに抽出した ORF の配列をクエリーとし、既知のフラビウイルス属ウイルスに対して BLASTx を行い、フラビウイルスに配列類似性を示す EVE の ORF を抽出した。最終的に、得られた ORF 情報を手作業にて解析し、比較的長い ORF を持つフラビウイルス様 EVE を抽出した。最終的に AaegL5.0 では 8 つの、CU_AaegROCK_1.0 では 18 個の比較的長い ORF を持つ EVE を抽出した。

(4) 同定された EVE 由来遺伝子のクローニング

上記のバイオインフォマティクス解析から同定された EVE の中でも、AaegL5.0 および CU_AaegROCK_1.0 の両ゲノムから共通して見つかり、特に長い ORF を有していると考えられた EVE に着目した。この EVE は、およそ 5.5 kbp であり、全長が 11 kb 程度の RNA をゲノムとして持つフラビウイルスの 5 割程度をカバーしており、その領域としては非構造タンパク遺伝子 (non-structural: NS) 1 の途中から NS2、-3、-4 そして -5 途中までに該当するものであった。一方で、ストップコドンもしくはフレームシフトにより、ORF と推定されるものが 8 つ存在したため、これを他のフラビウイルスの配列との比較により、手作業でフレームを調整し、NS1 途中から NS5 途中までをカバーするおよそ 5.5 kb の EVE 由来遺伝子配列を得た。この中から NS3 と NS4 に該当する領域の DNA 配列を、人工的に合成し、昆虫細胞株の発現プラスミドである

pIEx-4 にクローニングし、Sanger シーケンス解析によってもそれを確認した。

(5) EVE 由来遺伝子発現による蚊細胞ならびに個体への影響評価

EVE 由来の NS3 および NS4 をクローニングしたプラスミド、およびコントロールとして、GFP 発現プラスミドをネッタイシマカ細胞株である Aag2 にトランスフェクションし、細胞変性が誘導されるかを観察したが、明らかな増殖の減退や細胞浮遊、融合などの変化は、認められなかった。

また、ネッタイシマカのメス成体にも *in vivo* トランスフェクションを用いて、EVE 由来の NS3 および NS4 発現プラスミドを胸腔内接種し、過剰発現を行った。その後、蚊の生存への影響を GFP 発現プラスミド接種した個体群と比較したが、有意な差は認められなかった。

以上の結果より、今回用いた EVE 由来の NS3 および NS4 の単独発現では、蚊に重篤な病態を引き起こしうる細胞傷害などは誘導されないことが明らかとなった。この結果における技術的な課題としては、過剰発現の方法が挙げられる。シマカにおけるウイルス病態の具体的なメカニズムの前例がないため、どのような条件が必須であるかは不明であるものの、ウイルス病原遺伝子は、単一の遺伝子ではなく、他のウイルス遺伝子と共発現させる必要があるのかもしれない。さらには、特定の器官でのみ傷害を誘導する必要がある可能性もある。よって、現存するウイルスと EVE 由来遺伝子のキメラウイルスを作製し、感染させることで、病態を含む EVE 由来遺伝子の機能が評価できるかもしれない。

また、生物学的観点から考えると、EVE の由来となったウイルスが現存していた時の蚊と現在のネッタイシマカでは、生物学的に異なる性質を持つ可能性は十分にある。特に EVE の獲得を含めて、蚊とウイルスはその軍拡競争によって、長期間にわたり、共進化を遂げていることが予想される。よって、現在のネッタイシマカが、EVE 以外の形質として、ウイルス感染に対して高い寛容性を獲得しているのであれば、EVE が形成された時点では病態を引き起こし得たウイルス遺伝子をネッタイシマカで発現させたとしても、その病態効果は中和されているのかもしれない。一方で、同定された EVE はこの度の実験で用いた古代ウイルス様遺伝子以外にもあるため、さらに多くの EVE 由来遺伝子と現代のウイルスとのキメラウイルス感染を組み合わせ、さらに検討することが必要である。

バイオインフォマティクスによる EVE 探索においても、tBLASTn、tFASTx、tFASTy などの用いるプログラムによって、大きな差が生まれることが、本研究から示された。そのため、今後の関連ツールの開発やクエリーとして用いるウイルス配列の更新によって、さらに多くの EVE 由来遺伝子候補の同定が可能になると期待される。また、本研究では、ネッタイシマカにおけるウイルス由来の病原遺伝子の同定には至らなかったものの、その過程で新たな EVE やそれ由来の遺伝子配列が明らかとなり、古代のウイルスの“姿”の一端が明らかになった。これは現代のウイルスに至るまでの進化の歴史を辿るために有用な情報になるかもしれない。さらにネッタイシマカのウイルス感染への寛容性を紐解く足掛かりにもなる蚊とウイルスの共進化の理解が深まったと考えている。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uddin Mohammad Mosleh, Suzuki Yasutsugu, Reyes Jerica Isabel L., Watanabe Kozo	4. 巻 591
2. 論文標題 In vitro characterization of cell-fusing agent virus DNA forms in Aedes aegypti mosquitoes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 109982 ~ 109982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2024.109982	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Suzuki Yasutsugu, Suzuki Takahiro, Miura Fuminari, Reyes Jerica Isabel L., Asin Irish Coleen A., Mitsunari Wataru, Uddin Mohammad Mosleh, Sekii Yu, Watanabe Kozo	4. 巻 11
2. 論文標題 No detectable fitness cost of infection by cell-fusing agent virus in <i>Aedes aegypti</i> mosquitoes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.231373	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mohammad Mosleh UDDIN, Yasutsugu SUZUKI, Takahiro SUZUKI, Jerica Isabel L. REYES, Kozo WATANABE
2. 発表標題 Viral DNA forms of cell-fusing agent virus (CFAV) are produced in Aedes aegypti mosquito in vitro and in vivo
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasutsugu SUZUKI
2. 発表標題 Understanding antiviral immunity in Aedes mosquitoes from nanoscale to macroscale
3. 学会等名 PASTEUR JAPAN 2022 SYMPOSIUM: FRANCE-JAPAN COOPERATION ON HEALTH (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasutsugu SUZUKI, Mohammad Mosleh UDDIN, Takahiro SUZUKI, Jerica Isabel L. REYES, Kozo WATANABE
2. 発表標題 Characterization of the viral DNA formation of cell-fusing agent virus (CFAV) in Aedes aegypti mosquito cell lines
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohammad Mosleh Uddin, Yasutsugu Sujuki, Kozo Watanabe
2. 発表標題 Viral DNA forms of cell fusing agent virus (CFAV) are produced in Aedes aegypti mosquito cell lines
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木康嗣, Jerica Isabel L Reyes, Mohammad Mosleh Uddin, 鈴木貴大, 韋子成, 大村瑞羅, 渡辺幸三
2. 発表標題 環境生態・保健研究室における媒介蚊・ウイルス相互作用研究の紹介
3. 学会等名 第27回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分担 者	堀江 真行 (Horie Masayuki) (20725981)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授 (24405)	

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