

ブイ トウ トウイ 論文内容の要旨

主 論 文

A single amino acid substitution in the NS4B protein of Dengue virus confers enhanced virus growth and fitness in human cells *in vitro* through IFN-dependent host response

(Dengue virus 非構造タンパク質 NS4B の一残基変異はヒト細胞においてインターフェロンの応答を抑制しウイルス増殖および適合性を増強する)

Thuy Thu Bui, Meng Ling Moi, Takeshi Nabeshima, Taichiro Takemura, Trang Thu Nguyen, Linh Ngoc Nguyen, Hang Thi Thu Pham, Thi Thu Thuy Nguyen, Dao Huy Manh, Shyam Prakash Dumre, Shusaku Mizukami, Kenji Hirayama, Shigeru Tajima, Mai Thi Quynh Le, Kiyoshi Aoyagi, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita

(Journal of General Virology 2018 年, 受理済)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田公一教授)

諸 言

Dengue virus 感染症は世界で毎年 3 億 9000 万人が感染し、9800 万人が発症するとされる熱帯地域では公衆衛生上最重要の蚊媒介性ウイルス感染症である。その病原体である Dengue virus は蚊とヒトという二つの進化上離れた宿主で効率よく増殖するが、それぞれの宿主ではウイルスは多様な遺伝子変異をもつ準種の集団として存在している。これは蚊細胞と哺乳類細胞の双方で効率よく増殖し種を維持するためのメカニズムの一つと考えられる。本論文では同一の患者サンプルから蚊やヒト等の哺乳類培養細胞を用いて分離されたウイルス株について、各種細胞におけるウイルス増殖性等を比較し、ウイルス非構造タンパク質 NS4B の重要性を検証し、特にヒト細胞における増殖異性の違いを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

対象と方法

2013 年にベトナムで発生した Dengue 熱流行時に採取されたサンプルをヒトスジシマカ培養細胞クローン (C6/36) とサル腎由来細胞 (Vero) において複数回継代を繰り返してそれぞれ、カ細胞、哺乳類細胞で高い増殖性を示すウイルス株を得た。得られたウイルス株の生物学的性状解析はそれぞれの細胞、および他の複数のヒト由来細胞

(Hep G2, K562, iPS-ML-DCs) を用いて検証した。分離株の全ゲノム解析は次世代シーケンサー (Ion Torrent system, Life Technologies Ltd.) を用いた。ウイルス株中の変異体比率の計測は3D-digital PCR (Quant Studio, Life Technologies Ltd.) で実施した。リコンビナントウイルスはデング1型ウイルス感染性クローン (DENV-1(02-20)/pW119, accession no. AB178040) を遺伝子改変し作製した。ウイルス感染によるヒト細胞の転写レベルでの応答については、マイクロアレイを用いて評価した。

結 果

1. 哺乳類細胞で分離したウイルス株は哺乳類細胞において高い増殖性を示し、カ細胞で分離した株よりも大きなプラークを形成した。
2. 分離株の全ゲノム解析の結果から、これらの生物活性の差をもたらす遺伝子変異は非構造タンパク質NS4Bの116番目の残基が関与していることが示唆された。
3. カ細胞高増殖性株では116Vが優勢でありヒト細胞高増殖性株では116Aまたは116Mが優勢であった。
4. デング1型感染性クローン, rDENV-1-NS4B-116V (116V型) に点突然変異を導入して作成したrDENV-1-NS4B-115AとrDENV-1-NS4B-115Mはヒト由来細胞 (Hep G2, K562, iPS-ML-DCs) において増殖性が増大した、カ細胞においてはその様な現象は見られなかった。
5. rDENV-1-NS4B-116VとrDENV-1-NS4B-115A/Mをヒト細胞に同時感染させると、rDENV-1-NS4B-115A/Mが優勢となり、細胞への適合性 (フィットネス) が増強されていた。カ細胞への同時感染では競合性に差は見られなかった。
6. iPS細胞から誘導したDC細胞 (iPS-ML-DCs) でのインターフェロン (IFN α/β) 誘導能を検証したところrDENV-1-NS4B-115A/M感染細胞では (IFN β) の誘導が優位に抑制されていること、そして転写段階ではインターフェロン制御遺伝子群 (IFIT3, IFI44L, OAS1) の転写抑制が確認された。

考 察

以上の結果から、新規のウイルス増殖性規定部位が NS4B 蛋白質の pTMD3 (predictable transmembrane domain 3) に存在することが明らかになった。pTMD3は他の遺伝子領域に比べて高い遺伝子変異がみられる領域であることが知られている。デングウイルスはこの領域の変異 (多様性) によりカとヒトというかけ離れた宿主において、いわば「トレードオフ」原理によりいずれの宿主においても効率よく増殖する能力を獲得している可能性が示唆された。そして、今回発見した NS4B-116A/M のヒト細胞での高増殖性はインターフェロン依存性の効果であることが強く示唆された。

本研究成果は今後、デングウイルスをはじめ蚊媒介性ウイルスの宿主特異性を分子レベルで理解するうえで極めて重要な知見を供するものである。