

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07558

研究課題名(和文)トラフグ口白症ウイルスの全ゲノム解読とワクチン開発

研究課題名(英文)Whole genome determination and vaccination of kuchijirosho virus.

研究代表者

宮台 俊明(Miyadai, Toshiaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・名誉教授

研究者番号：20157663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグ口白症感染脳に出現する3種類のRNA配列(kuchijirosho associated RNA: KAR)を得た。3種類とも相同性検索によって類似の配列を得ることができなかつたため、新規のウイルス種と考えられた。演繹アミノ酸配列も相同性が高い配列は検索されなかつた。タンパク質の高次構造予測では、ウイルスRNAポリメラーゼとアルギニンキナーゼに類似していた。いずれもウイルス関連遺伝子である。ところが、カプシドあるいはエンベロープタンパク質に相当する遺伝子はみつかっていない。口白症感染培養細胞をホルマリン処理してトラフグに接種したが、ワクチン効果は得られなかつた。

研究成果の概要(英文)：Three types of RNA (kuchijirosho associated RNA: KAR) appeared in the kuchijirosho-affected fugu brain. BLAST analysis of nucleotide and amino acid sequence showed that KARs are not similar to any other viruses registered in the database, suggesting that kuchijirosho virus may be classified into a new category of virus. Swiss-Plot analysis indicated that KAR coding proteins possess viral RNA polymerase or arginine kinase; however, we could not find RNA encoding capsid protein or envelope protein.

Formalin treated cell culture infected with kuchijirosho virus had no effect as vaccine.

研究分野：水族病理学

キーワード：口白症 トラフグ ウイルス ゲノム ワクチン

1. 研究開始当初の背景

トラフグの口白症は 1980 年代に長崎県で報告されて以来、トラフグ養殖に被害を及ぼしてきた。病原体はウイルスと考えられているがウイルス種は特定されていない。また、ワクチンなどの防御方法も確立されていない。我々は口白症ウイルスの物理化学的性状およびウイルスゲノムの一部の解読を進めてきた。

2. 研究の目的

- (1) 口白症ウイルスの全ゲノムの塩基配列を決定してウイルス種を特定する。データは抗ウイルス薬のターゲット遺伝子を特定するための基礎データとなることを見込まれる。
- (2) ワクチンを作成し、口白症を防御する方法を確立する。

3. 研究の方法

- (1) 未知塩基配列ウイルスのゲノム塩基配列をクローニングする方法(RDA法)を用いて、ウイルスゲノムをクローニングする。また、次世代シーケンサーを用いて、網羅的な塩基配列決定を行う。
- (2) 定量 PCR を用いて実験感染後の口白症ウイルスゲノムの脳内における量的推移を測定する。
- (3) insituハイブリダイゼーションにより、脳内の口白症感染部位を特定する。
- (4) 電子顕微鏡により、口白症感染培養細胞の変成の状態を観察し記載する。
- (5) 口白症感染培養細胞をホルマリン処理し、ワクチンとしてトラフグに筋注して攻撃感染に対して防御効果を持つかどうか検証する。

4. 研究成果

- (1) 口白症ウイルスゲノムの塩基配列
口白症ウイルスの種を特定するためには、ウイルスゲノムの全塩基配列を知ることが必須要件である。

本研究では RDV 法(Rapid Determination of Viral RNA sequence)を用いたところ、3種類の RNA をクローニングすることができた。これらの RNA を kuchijirosho associated RNA (KAR) と呼ぶこととし、3種類をそれぞれ KAR-A、KAR-B、KAR-C とする。

これらの RNA は長いオープンリーディングフレームを有していた。塩基長とメチオニンから始まるアミノ酸配列長は表に記した。BLAST により塩基配列と演繹アミノ酸配列を検索したところ、相同性の高い配列はデータベースから得ることはできなかった。

表 KAR の塩基配列長とアミノ酸配列長

KAR-	塩基配列	アミノ酸配列長
A	1581	498
B	1791	515
C	1410	454

Swiss-plot 法による高次構造予測から機能タンパク質の相同性を検索したところ、KAR-A

は Dhori ウイルス(オルソミクソウイルス科)の RNA ポリメラーゼ、KAR-B は B 型インフルエンザ(オルソミクソウイルス科)の RNA ポリメラーゼ、KAR-C はアルギニンキナーゼに類似した領域を持つことが予測された。

通常、ウイルスゲノムから最も多く発現される遺伝子はカプシドタンパク質あるいはエンベロープタンパク質である。ところが本研究においては、これらのタンパク質をコードする RNA を見つけることができなかった。以前、感染脳からウイルス粒子を精製する試みを行ったところ¹⁾、密度勾配遠心で感染性の高いゾーンは回収できるものの、ウイルス粒子を確認することはできなかった。また、何人かの研究者が感染脳を電顕観察したが、井上(1988)²⁾以外ウイルス粒子を確認していない。口白症ウイルスを接種したフグ卵巣初代培養では cpe が現れ、ウイルス粒子状の物体が多数観察されるが、これがウイルス粒子であるかどうかは確認できていない(後述)。これらの事実から、本ウイルスの粒子形成能は極めて低いと推測され、全ゲノムを解読することが極めて困難な理由はそこにあるものと考えられる。

今後は、密度勾配遠心のウイルス分画から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによってゲノム RNA の配列を探索する。

(2) 口白症感染後の KAR 量の脳内推移

KAR が口白症の病状の進行に関係しているかどうかを調べるため、KAR の塩基配列をもとにして定量 PCR のプライマーを設計し、実験感染後の脳内 KAR 量を測定した。その結果、図 1 のように接種 1 ~ 2 日後には出現が認められ、病状の進行とともに増加することが分かった。4 日後には狂奔遊泳が始まり、6 日後には行動が緩慢となって、8 日後には死亡する個体が現れた。以上の結果から、KAR は口白症の発症と密接に関連していることが推測された。

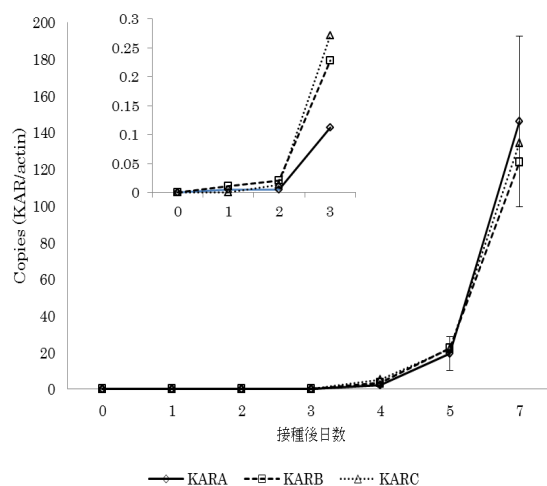


図 1 口白症接種後の脳内 KAR 量の推移

(3) 口白症の脳内 KAR の分布

口白症を発症したトラフグの脳の病理組織

学的観察によると³⁾、中脳・橋・延髄に存在する巨大神経細胞の核小体が凝集する以外、変性は観察されていない。ところが、口白症に感染すると狂奔から緩慢行動へと急速に病状は悪化し、10日以内に100%死亡すると、極めて劇症に推移し、この症状が上記の病変だけでは説明できなかった。そこで、KARが脳内のどの部位に存在するかをin situハイブリダイゼーションによって調べてみた。その結果、KAR-A、-B、-C全てが小脳の一部を除くほぼ全ての脳の、おそらく神経細胞に観察された(図2)

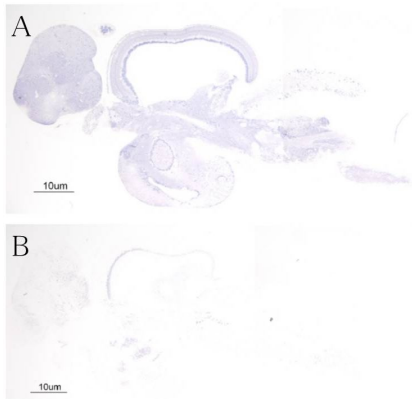


図2 KAR-Cを用いたin situハイブリダイゼーション A:感染脳 B:健康脳

この結果から、口白症ウイルスは全脳に感染していると考えられ、口白症が劇症で推移し、予後不良であることが理解できる。

(4) 口白症感染培養細胞の電子顕微鏡観察

口白症ウイルスは卵巣初代培養に感染し、変性することが知られている⁴⁾。細胞培養系でウイルス粒子を単離することができれば、ゲノム解析をするうえでもより精製度の高い粒子を効率よく得ることができる。そこで、実際に培養細胞でウイルス粒子が形成されているかどうかを検証した。

図3にみられるとおり、多重膜構造、脂肪滴、ウイルス様粒子など、ウイルス感染細胞の特徴を示す像が観察された。ウイルス様粒子はカプシド、エンベロープなど殻に包まれてはいないため、ウイルスだとしてもコアであると推測される。これは、脳内でウイルス粒子が発見されにくく、精製によって回収されるウイルス粒子が極めて少ないことと一致する。

上記がウイルスのコア構造であるとする、このコアからウイルスゲノムを抽出できる可能性がある。今後はコアを精製し、ゲノムの回収を試みる。

(5) 口白症ワクチン

上記の感染細胞をホルマリン処理したものをトラフグに筋注射し、攻撃感染によってワクチン効果を検証したところ、効果を得ることはできなかった。ウイルスワクチンはカプシ

ドタンパク質、エンベロープタンパク質など殻タンパク質を主成分とするものが多い。しかし、口白症ウイルスの場合、KARには殻を構成するタンパク質遺伝子は含まない、精製ウイルス粒子数が少ない、脳内の電顕観察ではウイルス粒子を観察できた例が少ない、細胞培養の電顕観察では殻を持ったウイルス粒子を観察できない、感染細胞を用いたワクチン接種では防御効果が得られない、などの理由から、(もし存在するのであれば)殻タンパク質遺伝子をクローニングしたうえで、リコンビナントタンパク質をワクチンとして用いること以外、ワクチンを製造する方法はないと考えられる。

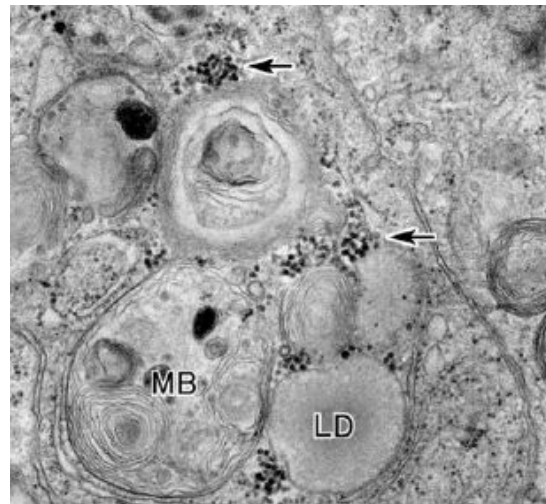


図3 口白症感染脳磨碎濾液を接種したトラフグ卵巣初代培養 多重膜構造(MB) 脂肪滴(LD) ウイルス様粒子(矢印)

参考文献

- 1) Miyadai T, Hashimoto E, Hashimoto K, Watari T, Ohtani M, Tahara D. Partial Purification of Kuchijirosho Causative Agent by Sodium Iotalamate Density Gradient Centrifugation. *Fish Pathology*, VOL.39;NO.4;PAGE.213-214(2004)
- 2) 井上潔. トラフグの“口白症”に関する研究. 博士論文、北海道大学、1988.
- 3) 和田新平, 藤巻由紀夫, 畑井喜司雄, 窪田三郎, 磯田政恵. 養殖トラフグの“口白症”自然発症例の病理組織学的所見. *Fish Pathol.* 1985; 20: 495-500.
- 4) Inouye K, Yoshikoshi K, Takami I. Isolation of causative virus from cultured Tiger puffer (*Takifugu rubripes*) affected by Kuchijirosho (Snout ulcer disease). *Gyobyu kenkyu*, 1992; 27: 97-102.

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)

〔学会発表〕(計3件)

北村万佑香・加藤毅士・末武弘章・小高智之・宮台俊明. トラフグ口白症ウイルス関連配列の同定. 平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年

北村万佑香・加藤毅士・末武弘章・小高智之・前田知己・宮台俊明. トラフグ口白症ウイルス関連配列の発現部位の同定. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015 年

北村万佑香・加藤毅士・一色正・末武弘章・小高智之・前田知己・宮台俊明. トラフグ口白症の分子生物学的診断方法の確立. 平成 28 年日本魚病学会春季大会. 2016 年.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮台俊明 (MIYADAI, Toshiaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・名誉教授

研究者番号：20157663

(2) 研究分担者

末武弘章 (SUETAKE, Hiroaki)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：00334326

(3) 連携研究者

一色正 (ISSHIKI, Tadashi)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30378319

吉田天士 (YOSHIDA, Takashi)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80305490