

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15313

研究課題名（和文）効率的なワクチン製造に向けたウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of apoptosis induction mechanism in virus-infected cells for efficient vaccine production

研究代表者

河東 康彦（Kawato, Yasuhiko）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・研究員

研究者番号：90634220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マダイイリドウイルス（RSIV）の培養細胞におけるウイルス産生効率の低さは、感染細胞においてウイルスの複製が途中で阻害されているためだと示唆された。Annexin VやTUNEL法による観察では、アポトーシスがRSIV感染細胞における複製阻害に関与している可能性は低いと考えられた。RSIV感染細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析により、感染細胞で顕著に発現量が上昇していた遺伝子が確認された。これらの遺伝子のウイルス複製阻害への影響を明らかにするために、siRNAを用いたノックダウン試験を実施したが、siRNAを導入していない感染細胞の影響が強く出たためにノックダウンの効果を判定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダイイリドウイルスの培養細胞におけるウイルス産生効率の低さは、感染細胞においてウイルスの複製が途中で阻害されているためだと示唆され、その因子についても複数推定された。この情報を基に、効率的なマダイイリドウイルス病ワクチンの製造に繋がれる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Formalin inactivated vaccine against red sea bream iridovirus (RSIV) which causes severe economic damages in Japanese mariculture has been produced using cell cultures, but it is costly and time consuming due to low ability of viral propagation in the cell cultures. The present study demonstrated that the virus replication was inhibited in most of the RSIV-infected cells. The apoptosis did not seem to be associated with the inhibition of viral replication based on the analysis of the virus-infected cell using Annexin V and TUNEL assay. RNA-seq analysis of the RSIV-infected cells indicated that there are some candidate genes related with the inhibition of viral replication. However, gene knockdown assay using siRNA was not successful because the efficiency of siRNA transfection into fish cell line was low.

研究分野：魚病学

キーワード：マダイイリドウイルス 培養細胞 ワクチン ウイルス複製阻害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マダイイリドウイルス (RSIV) 病はマダイやブリを始めとした 30 種以上の海産養殖魚で発生しており、日本では最も被害の大きいウイルス病である。また、国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病にも指定されており、ワクチン等による本病の適切な管理は、海外への水産物輸出が促進されている情勢下で重要な取り組みとなる。本疾病に対しては不活化ワクチンが市販されているが、製造時に使用されている魚類培養細胞のウイルス産生能力は低く、ワクチンの製造コストが高くなるという問題がある。そのため、特にマダイ養殖でのワクチンの普及率は低く、依然として RSIV 病は海産養殖で最も発生件数の多いウイルス病として報告されている。これまでに研究代表者は、RSIV への感受性が高いイシガキダイから培養細胞 (SKF-9) を樹立し、従来の魚類培養細胞よりも効率的にウイルスが培養できることを確認した (Kawato et al. 2017)。また、ウイルスの抗原量が多いワクチンほど有効性が高くなることを確認し、培養細胞のウイルス産生量を高めるといった戦略が、ワクチン効果の増強や製造コストの低下につながることを示唆されている。一方、ウイルス産生量の上がった SKF-9 細胞においても、RSIV を接種した細胞で、徐々にウイルス感染から回復していく現象が観察されている。この現象に対して、「RSIV は培養細胞の何らかの因子によりウイルス複製が阻害されているのではないか？」との仮説を立てた。ウイルス感染に対抗する細胞レベルでの反応として、インターフェロン誘導タンパク質や RNA 干渉が一般的に知られているが、そのいずれに関しても RSIV では知見がほとんどない。一方、RSIV 感染細胞においてアポトーシスの誘導が報告されているものの、これがウイルス側の増殖に必要な機構なのか、宿主側の抗ウイルス応答なのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、RSIV の複製阻害因子を探索し、培養細胞における効率的なワクチン製造につなげることを目的とした。最初にイシガキダイ由来の SKF-9 細胞を用いて RSIV の増殖過程を詳細に解析することで、どのタイミングで複製阻害が起きているのかを整理した。ウイルスの複製阻害因子の探索では、まずは先行研究でも知見のあるアポトーシスに着目して検討を行った。さらに、ウイルス感染細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析により、ウイルスの複製阻害に関与している遺伝子を推定して、siRNA を用いたノックダウン試験を実施した。

3. 研究の方法

(1) RSIV の培養細胞における増殖過程の解析

6 ウェルプレートに播種した SKF-9 細胞に、RSIV KagYT-96 株を接種した。1 時間後に接種源を除去し、培地で細胞を 3 回洗浄してから新たな培地を加えてウイルス接種細胞の培養を開始した。0、1、2、3、および 4 日後に細胞培養上清を回収し、新たな培地を 1 mL 加えて細胞の凍結融解を 3 回繰り返して細胞内のウイルスを回収した。細胞培養上清および細胞内ウイルスの感染力価およびウイルスゲノム数を測定した。

(2) RSIV 感染細胞におけるアポトーシス誘導状況の解析

RSIV 接種 8 日後に全細胞を 4%PFA で固定した。細胞は 0.5% Triton X-100 による膜透過処理を行い、3%BSA によりブロッキングを行った後に多重染色を実施した。細胞の染色では、Anti-RSIV ORF44 M10 モノクローナル抗体 (M10 抗体)、Anti-RSIV virion ウサギ抗血清 (RSIV 抗血清) およびアポトーシス検出試薬を用いた。M10 抗体、RSIV 抗血清およびアポトーシス検出試薬の蛍光標識として、FITC、TRITC、および Alexa Fluor 647 をそれぞれ用いた。また、アポトーシス検出試薬には Annexin V あるいは TUNEL 法を用いた。染色細胞は 3 種類の蛍光波長フィルターを持つ蛍光顕微鏡により観察を行った。

(3) RSIV 感染細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析

SKF-9 細胞に RSIV を多重感染度 (MOI) が、0.01、1、あるいは 100 となるように接種し、25°C で培養した。MOI=0.01 ではウイルス接種 6 時間、1、2、および 3 日後に、MOI=1 および 100 ではウイルス接種 1、3、6、および 14 日後に、全細胞から RNA 抽出を実施した。陰性対照として培地のみを接種した細胞を、ウイルス接種細胞と同じ時期に回収して RNA 抽出を行った。これらの抽出核酸から RNA-seq 解析により 1 サンプルあたり約 5G の情報量を持つトランスクリプトーム断片を得た。本解析で得られた全サンプルのトランスクリプトーム断片をアッセンブルしたコンティグに加え、先行研究で得られたイシガキダイの網羅的なトランスクリプトームデータをリファレンスとして、各サンプルのマッピング解析を行った。いずれかのウイルス接種サンプルで、陰性対照に比べて発現量が 10 倍以上上昇していたコンティグを BLAST 解析によりアノテーションを付与した。その中から、遺伝子長や BLAST 解析の状況を基に 12 遺伝子を選択した。

(4) RSIV 感染細胞のノックダウン試験

ウイルス感染細胞で発現量が 10 倍以上に上昇していた 12 遺伝子を、siRNA を用いたノックダウン試験の対象とした。また、本試験の陽性対照として 4 種類の RSIV 遺伝子 (アポトーシス関連、主要カプシドタンパク質、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ) を選定した。各遺伝子についてオフターゲットの影響を考慮して、3 種類の異なる配列を持った siRNA を設計および

び人工合成した。予備試験として、蛍光標識 RNA を用いて siRNA 導入に最適な RNA 濃度および導入試薬の濃度を検討し、96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり、siRNA を 2pmol、導入試薬を 0.3 μ L とする条件を決定した。この条件下で、上記 16 遺伝子を対象に siRNA を用いたノックダウン試験を実施した。各 siRNA を導入して 24 時間後に RSIV を接種し、ウイルス接種から 7 日後の培養上清中ウイルスゲノム数を測定した。

4. 研究成果

(1) RSIV の培養細胞における増殖過程の解析

RSIV 接種細胞内および培養上清における継時的なウイルス量の変化を図 1 に示した。RSIV 接種細胞では、接種 1 日後 (days post inoculation: dpi) でもウイルスゲノムおよび感染性ウイルスの増加は確認されなかった。2 dpi において細胞内でのウイルスゲノム数が $10^{7.7}$ コピー/well となっていたがウイルス感染力価は $10^{4.0}$ TCID₅₀/well にとどまっていた。さらに、培養上清のウイルス感染力価は $10^{2.6}$ TCID₅₀/mL であったことから、感染性ウイルスの複製および細胞外への放出は 2 dpi の時点では完了していないことが示唆された。3 dpi では細胞内のウイルスゲノム数は 2 dpi とほとんど差はなかったが、ウイルス感染力価が $10^{6.4}$ TCID₅₀/well と大きく上昇していた。さらに、培養上清中のウイルス感染力価は $10^{5.9}$ TCID₅₀/mL と 2 dpi と比較して 1000 倍以上に増加していた。このことから、RSIV は細胞に感染してから成熟粒子が細胞外に放出される 1 段階増殖に 2 日間以上 3 日間未満の時間が必要であることが明らかとなった。

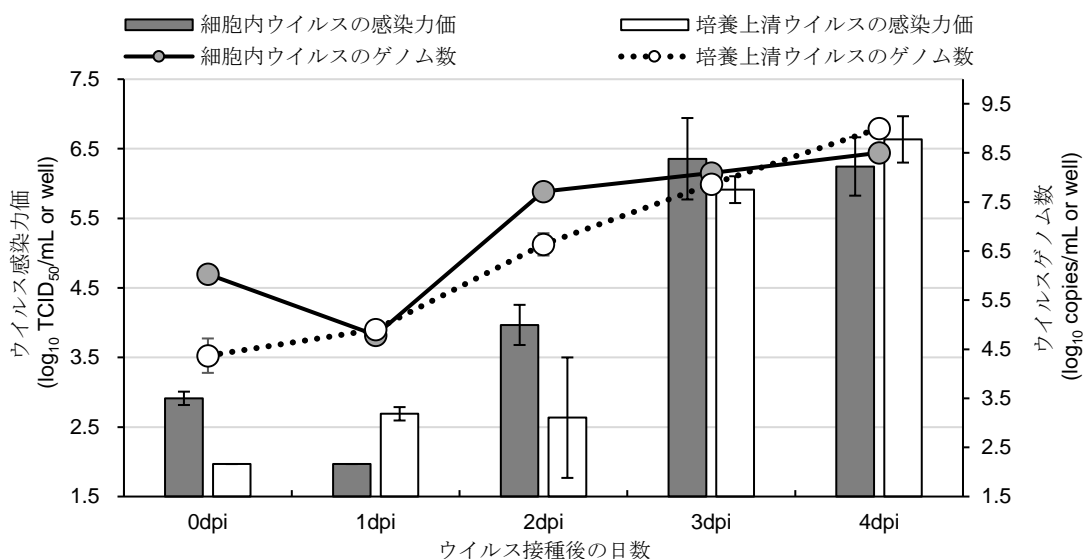


図 1. RSIV 接種細胞内および培養上清における継時的なウイルス量の変化。結果は n = 3 の平均値を示しており、バーは標準偏差を示す。

(2) RSIV 感染細胞におけるアポトーシス誘導状況の解析

RSIV 感染細胞におけるアポトーシスの誘導状況を図 2 に示した。M10 抗体はウイルス粒子に反応せず、ウイルス複製中の細胞にのみ反応することが確認されている (Xu et al. 2010)。そのため、緑色蛍光の M10 抗体反応細胞はウイルス複製途中の細胞であることが示唆された。一方、精製ウイルス粒子から作製した RSIV 抗血清に反応する細胞 (赤色蛍光) は、ウイルス構造タンパク質の翻訳・構築までウイルス複製が進んだ細胞であると推定される。これらの抗体による染

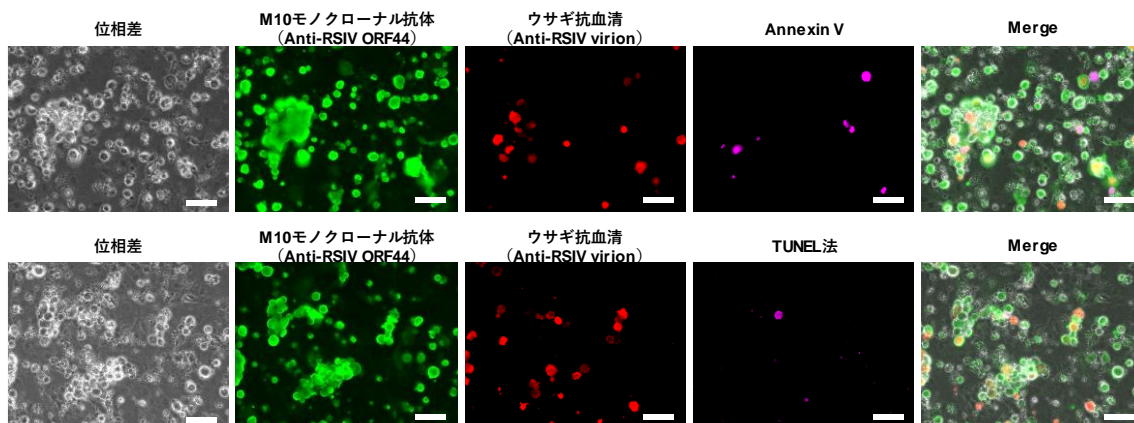


図 2. RSIV 感染細胞におけるアポトーシス誘導状況の観察。上段は Annexin V を、下段は TUNEL 法を用いた結果を示す。スケールバーは 50 μ m。

色結果から、ウイルス感染細胞（緑色蛍光）の一部がウイルス構造タンパク質の翻訳・構築まで進んでいる（赤色蛍光）ことが示唆された（図2）。これが細胞側の抗ウイルス応答によるウイルス複製阻害と考え、まずはアポトーシスの誘導状況を観察するために Annexin V あるいは TUNEL 法による多重染色を行った。Annexin V ではアポトーシスの初期段階であるホスファチジルセリンの露出を検出することができ、TUNEL 法ではアポトーシスの後期段階である DNA の断片化を検出することができる。染色結果は、Annexin V および TUNEL 法のいずれの方法においても、RSIV 感染細胞ではアポトーシスの誘導があまり起きていないことが示唆された。さらに、アポトーシスが誘導された細胞（桃色蛍光）の多くは、ウイルス構造タンパク質の翻訳・構築が進んだ細胞（赤色蛍光）でもあった（図2）。このことから、アポトーシスが RSIV 感染細胞における複製阻害に関与している可能性は低いと考えられた。

(3) RSIV 感染細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析

RSIV 感染細胞で発現量が大きく上昇していた 12 遺伝子を表 1 に示した。選択する遺伝子について、ウイルス未接種細胞（陰性対照）に対する発現量比の閾値が低いと大量のコンティグが選択されて詳細な解析が困難であったことから、本研究では発現量比の閾値を 10 倍以上と設定した。ここに示した遺伝子以外にも、陰性対照に比べて発現量が上昇していたコンティグが確認されたものの、ORF への翻訳ができない小断片や、BLAST 解析でいずれの遺伝子にも該当しないものが多かった。選択された 12 遺伝子の発現動態は、全ての MOI で発現量が上昇していた遺伝子 (No. 6, 7, 8, 9, 10, 12)、MOI=100 でのみ発現量が上昇していた遺伝子 (No. 1, 3, 4)、MOI=0.01 あるいは 1 でのみ発現量が上昇していた遺伝子 (No. 5, 11)、陰性対照では遺伝子発現量が 0 であった遺伝子 (No. 2) に大別された。さらに細かく見ると、MOI=1 については、6 dpi のみ発現量が上昇する遺伝子 (No. 7, 8)、14 dpi のみ発現量が上昇する遺伝子 (No. 5, 6)、6 dpi および 14 dpi の両方で発現量が上昇する遺伝子 (No. 9, 10, 11, 12) に分かれていた。また、低 MOI 接種区では相対的にウイルス感染細胞が少ない 3dpi (1 段階目のウイルス複製が完了して娘ウイルスが放出される) までは、これらの遺伝子の発現量はほとんど上昇せず、3 段階目のウイルス複製が始まったと考えられる 6 dpi から顕著な発現量の上昇が確認された。各遺伝子の機能からウイルス複製阻害に対する作用を推定すると、No. 1-3 はアポトーシス関連、No. 4-6 はインターフェロン関連、No. 7 は RNA 干渉関連でウイルス複製阻害に関与している可能性が考えられた。No. 8 の遺伝子に関しては、細胞のエクソサイトーシスに関与していることから、ウイルス放出に関連して阻害作用をもたらしているのではないかと推定した。No. 9-12 に関しては、ウイルス複製阻害へ与える影響は不明であった。

表 1. RSIV 感染細胞で発現量が大きく上昇していた遺伝子

No.	推定機能	ウイルス複製阻害への推定作用	長さ (bp)	ウイルス未接種細胞に対する発現比											
				MOI = 0.01				MOI = 1				MOI = 100			
				1dpi	3dpi	6dpi	14dpi	1dpi	3dpi	6dpi	14dpi	6hpi	1dpi	2dpi	3dpi
1	E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	アポトーシス関連	3033	0.6	1.0	0.3	0.1	1.3	0.6	1.0	0.1	2.8	13.2	97.0	161
2	CARD-containing protein 11-like	アポトーシス関連	3492	*	*	1.6	*	*	*	14.9	*	*	*	24.2	*
3	Netrin receptor UNC5D-like	アポトーシス関連	885	0.6	1.2	0.7	0.6	1.8	0.6	0.4	3.5	2.4	11.1	21.2	20.1
4	Interferon regulatory factor 3	インターフェロン関連	1062	1.6	0.3	0.3	4.3	1.7	1.4	0.6	0.0	*	61.9	110	75.4
5	Viperin	インターフェロン関連	951	2.1	0.7	0.5	109	1.0	1.1	0.8	29.3	7.7	10.2	3.7	2.3
6	c-c chemokine receptor type 4-like	インターフェロン関連	1218	0.8	1.1	1.0	63.6	1.4	1.4	2.2	87.6	4.9	10.9	17.1	35.2
7	Helicase mov-10-B.2	RNA干渉関連	1401	1.2	2.5	8.6	33.5	1.9	6.8	34.9	7.2	6.4	37.8	33.3	88.0
8	Synaptotagmin-11-like isoform	ウイルス放出	2769	2.4	1.8	31.3	19.4	1.0	1.7	217	5.3	1.5	29.2	22.3	27.9
9	Spectrin beta non-erythrocytic 1-like isoform	不明	3322	1.2	1.2	38.8	357	5.1	17.5	252	76.5	5.8	49.9	23.8	180
10	Dystroglycan	不明	7899	0.3	2.4	17.4	108	7.0	5.5	190	64.5	13.2	53.2	39.0	106
11	Hormonally up-regulated Neu-associated kinase	不明	2460	2.0	0.0	12.7	98.5	3.3	1.5	106	45.0	4.7	7.2	6.3	9.6
12	Reverse transcriptase	不明	5702	1.0	1.6	2.5	116	2.2	4.8	17.9	54.6	0.9	14.3	31.2	60.8

*印はウイルス未接種細胞で発現量が 0 であったために発現比が算出できなかったことを示す。

(4) RSIV 感染細胞のノックダウン試験

ノックダウン試験の結果を図 3 に示した。表 1 で示した 12 種類の遺伝子に対する siRNA を導入した試験区では、陰性対照と比べて培養上清中のウイルスゲノム数はほとんど差がなかった。また、ノックダウン試験の陽性対照（ウイルス複製が阻害されてウイルス量が減少すると想定）として実施した RSIV 遺伝子に対する siRNA 導入区でも、陰性対照との明確な差は確認できなかった。このことから、本試験では結果の判定ができないと判断した。追試として、ウイルス接種濃度や播種細胞数といった条件を変えても同様の結果であった。この理由を明らかにするために、RSIV 遺伝子に対する siRNA 導入区の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により解析したところ、siRNA 導入区でも遺伝子発現がほとんど抑えられていないことが確認された（データ未表示）。本研究では、siRNA 導入に関して条件の最適化を行ったものの、siRNA 導入試薬は哺乳類細胞に対して最適化された試薬であることから魚類細胞への導入効率は低いと考えられた。siRNA の導入効率が低ければ、siRNA が導入されていないウイルス感染細胞の影響が強く出てしまうため結果の判定ができなかったのではないかと推測した。この対策として、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により標的遺伝子をノックアウトし、Cas9 誘導性 DNA 二本鎖切断部位に相同組み換えにより薬剤選択マーカーをノックインすることで、ノックアウト細胞をクローン化して RSIV の増殖性を比較する必要があると考えられた。

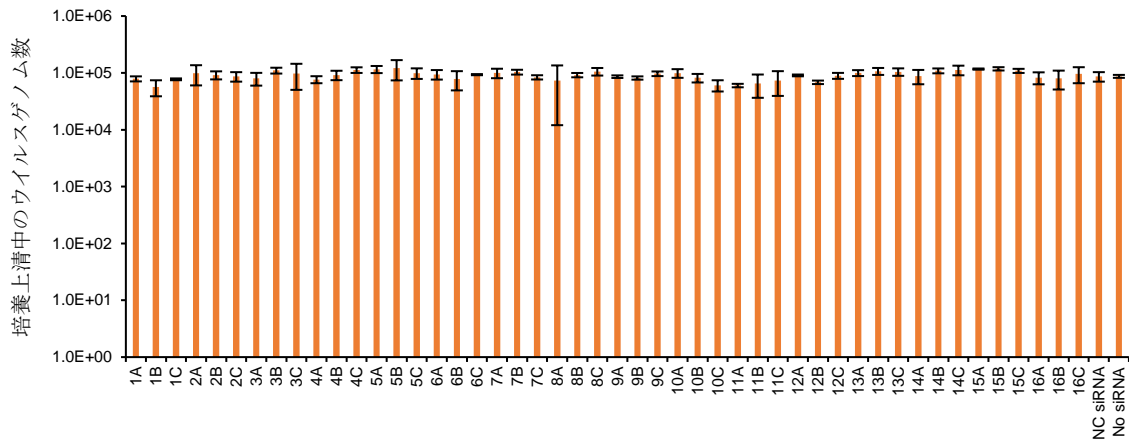


図3. siRNA 導入後の RSIV 増殖結果 (7 dpi)。

結果は $n = 3$ の平均値を示しており、バーは標準偏差を示す。No. 1 – 12 は表 1 の遺伝子 No. に対応する。No. 13 – 16 はノックダウン試験の陽性対照 (ウイルス複製が阻害されてウイルス量が減少すると想定) として実施した RSIV 遺伝子に対する siRNA 導入区を示す。各数字の後ろに記載されている A-C の記号は、各遺伝子について設計した 3 種類の異なる siRNA の導入区を示す。NC siRNA は陰性対照となる siRNA を導入した試験区、No siRNA は siRNA を導入せずにウイルス接種のみを実施した試験区を示す。

<引用文献>

- Kawato, Y., Yamashita, H., Yuasa, K., Miwa, S., Nakajima, K., 2017. Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture*. 473, 291-298.
- Xu, X., Weng, S., Lin, T., Tang, J., Huang, L., Wang, J., Yu, X., Lu, L., Huang, Z., He, J., 2010. VP23R of infectious spleen and kidney necrosis virus mediates formation of virus-mock basement membrane to provide attaching sites for lymphatic endothelial cells. *J Virol*. 84, 11866-11875.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuhiko Kawato, Hirofumi Yamashita, Kei Yuasa, Satoshi Miwa, and Kazuhiro Nakajima
2. 発表標題 Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (<i>Oplegnathus punctatus</i>) for red sea bream iridovirus
3. 学会等名 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----