

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580351

研究課題名 (和文) RNA 干渉作用によるネコ伝染性腹膜炎ウイルス複製制御機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of regulation on feline infectious peritonitis virus replication by RNA interference.

研究代表者 田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：50291159

研究成果の概要：

fcwf-4 細胞の FIPV 感染実験においてウイルス複製に影響を与える ncRNA の分離・同定を試みた。マイクロ DNA アレイによる miRNA の解析を行い、hsa-miR-494 がウイルス感染時に 2.1 倍上昇することが明らかとなったが、hsa-miR-593, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-17 はそれぞれ 0.11 倍, 0.34 倍, 0.44 倍と発現が減少した。現在、生理学的機能を解析中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ウイルス，感染症，ネコ，ncRNA

1. 研究開始当初の背景

ネコ伝染性腹膜炎 (FIP) はワクチン開発が未だ成功しておらず、効果的な治療も確立されていない疾患で、一度発症すると致死的な経過をたどる。また、同じウイルス株をネコに実験感染させても、個体によって病原性が発現するものと発現しないものがあり、同じ培養細胞を用いてもウイルス株によって感染複製効率が異なるということから、ウイルス複製を制御している細胞側およびウイルス側因子の存在が考えられる。

このウイルス病は、複雑な免疫機構を介して発症することが報告されている。FIP は高ガンマグロブリン血症を特徴とし、抗体がウイルス複製を増強させることもわかっている。免疫に関わる各サイトカインの応答も感染ネコによって異なり、一概に免疫系だけが発症に関与しているとも考えがたい。一方、

本ウイルスに対する宿主感受性の違いや異なる細胞株間におけるウイルス複製効率の違いに関する報告は、国内外問わず、極めて少ない。このため、ウイルス複製制御因子を解析し、病原性発現機構を明らかにすることが切望されている。

近年、網羅的トランスクリプトーム解析の結果、約 53% もの転写 RNA が蛋白質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) であることが明らかとなった。この中には RNA 干渉に関わる siRNA, miRNA も存在する。

siRNA および miRNA は発生、分化、細胞増殖制御に重要な役割を担っていることが明らかとなっており、線虫の細胞内在性 RNAi によってウイルス (霊長類泡沫状ウイルス・猫鼻気管炎ウイルス・水疱性口炎ウイルス) の複製が抑制されることが示されてい

る。このシステムは免疫系・インターフェロン系を介さない新たな生体防御系と位置づけられる。さらにウイルスがコードしている miRNA も発見され、ウイルス miRNA がウイルスの転写を直接制御、あるいは宿主の遺伝子を制御することにより、ウイルス自身の遺伝子複製を調節していることも報告されている。このようにある種のウイルス因子は、細胞の RNA 干渉作用を巧みに阻害し、ウイルスを効率的に増殖あるいは持続感染状態に維持できるよう調節しているものと考えられる。

2. 研究の目的

ウイルス複製制御に影響を与える細胞内在性あるいはウイルス由来の因子 (siRNA および miRNA あるいはそれらを不活性化する因子) を分離・同定し、ウイルス複製制御機構を解析することで病原性発現機構を明らかにする。具体的には以下のことを行う。

- (1) 細胞およびウイルス由来の miRNA・siRNA ライブラリーの作成と発現細胞のクローニングをおこなう。
- (2) ウイルス複製を制御する miRNA・siRNA のスクリーニングと同定およびウイルス複製制御における生理学的な役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) fcwf-4 細胞に FIPV を感染させ、24 時間後に総 RNA を抽出した。同時に非感染細胞からもスモール RNA を抽出して、cDNA 合成後、DNA マイクロアレイを行った。

(2) fcwf-4 細胞に FIPV を感染させ、24 時間後に総 RNA を抽出した。その後、市販の miRNA 分離キットを用いて感染細胞由来の miRNA ライブラリーを構築した。これを大腸菌にトランスフォーメーションし、ランダムにシーケンスを行った。

上述のシーケンスされたクローンに関し、Sanger Institute miRBase Targets による解析を行った。

4. 研究成果

ウイルス複製に影響を与える細胞内在性あるいはウイルス由来の ncRNA の分離・同定を行った。ネコの ncRNA データバンクは未だ確立されていないため、すでに報告されているヒトのデータバンクを利用し、miRNA マイクロ DNA アレイによる miRNA の解析を行った。ネコ胎児由来細胞株 fcwf-4 細胞による FIPV 感染実験の結果、hsa-miR-494 がウイルス感染時に 2.1 倍上昇することが明らかとなった。また、hsa-miR-593, hsa-miR-193a-3p,

hsa-miR-17 が 0.11 倍, 0.34 倍, 0.44 倍と発現が減少した。現在、Sanger Institute miRBase Targets を用いて生理学的意義を解析中である。さらに fcwf-4 を用いた FIPV 感染細胞由来の ncRNA ライブラリーを構築した。この遺伝子プールからランダムに遺伝子シーケンスを行い、現在までに 1 種類の新規の ncRNA を得ている。この ncRNA はデータベースに存在しないものなので、ネコ特異的、あるいは FIPV 特異的なものである可能性が高い。今後、本遺伝子の生理学的意義を解析していく必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Mori A, Kenyon PR, Mori N, Yamamoto I, Tanaka Y, Suzuki N, Tazaki H, Ozawa T, Hayashi T, Hickson RE, Morris ST, Blair H, Arai T. Changes in metabolite, energy metabolism related enzyme activities and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) populations in beef heifers with two differing liveweight change profiles in New Zealand. *Vet Res Commun.* 2008 Feb;32(2):159-66. Epub 2007 Sep 12. PubMed PMID: 17849230.
2. Tanaka Y, Mori A, Tazaki H, Imai S, Shiina J, Kusaba A, Ozawa T, Yoshida T, Kimura N, Hayashi T, Kenyon PR, Blair H, Arai T. Plasma metabolite concentrations and hepatic enzyme activities in pregnant Romney ewes with restricted feeding. *Res Vet Sci.* 2008 Aug;85(1):17-21. Epub 2007 Oct 24. PubMed PMID: 17920647.
3. Mori A, Urabe S, Asada M, Tanaka Y, Tazaki H, Yamamoto I, Kimura N, Ozawa T, Morris ST, Hickson R, Kenyon PR,

- Blair H, Choi CB, Arai T. Comparison of plasma metabolite concentrations and enzyme activities in beef cattle raised by different feeding systems in Korea, Japan and New Zealand. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007 Sep;54(7):342-5. PubMed PMID: 17718805.
4. Yamada O, Tamura K, Yagihara H, Isotani M, Azakami M, Sawada S, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Light-chain multiple myeloma in a cat. *J Vet Diagn Invest.* 2007 Jul;19(4):443-7. PubMed PMID: 17609361.
5. Arai T, Kusaba A, Takeguchi A, Tanaka Y. Ozawa T, Yoshida T, Sako T, Hayashi T, Blair H. Comparison of plasma metabolite concentrations and peripheral leukocyte enzyme activities in sheep fed on different diets in New Zealand and Japan. *Vet Res Commun.* 2007 Aug;31(6):681-4. Epub 2007 Jan 24. PubMed PMID: 17252317.
6. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y. Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified staphylococcus intermedius strains. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2770-8. Epub 2007 Jun 27. PubMed PMID: 17596353; PubMed Central PMCID: PMC2045239.
7. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y. Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary

teaching hospital. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr;45(4):1118-25. Epub 2007 Jan 31. PubMed PMID: 17267624; PubMed Central PMCID: PMC1865850.

〔学会発表〕(計 3 件)

RNAi 法によるネコ伝染性腹膜炎ウイルスM 遺伝子の発現抑制
杉林 加奈(代表), 第144回 日本獣医学会学術集会, 北海道 酪農学園大学, 2007年 8月

RNAi 法によるネコ伝染性腹膜炎ウイルス3C Lpro 蛋白質の発現抑制
小澤 世里香(代表), 第144回 日本獣医学会学術集会, 北海道 酪農学園大学, 2007年 8月

リアルタイムPCR法を用いた猫伝染性腹膜炎の診断
谷戸 三紗(代表) 第144回 日本獣医学会学術集会, 北海道 酪農学園大学, 2007年 8月

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

名称: ネコ免疫不全ウイルス(FIV)の予防および治療剤
発明者: 田中 良和
権利者: 学校法人 日本医科大学
種類: 特許
番号: 2007-271539
出願年月日: 2007年10月18日
国内外別: 国内

名称: ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIP)の予防および治療剤
発明者: 田中 良和
権利者: 学校法人 日本医科大学
種類: 特許
番号: 2008-001419
出願年月日: 2008年1月8日
国内外別: 国内

名称: ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIP)の予防および治療剤
発明者: 田中 良和
権利者: 学校法人 日本医科大学
種類: 特許
番号: 2008-001382
出願年月日: 2008年1月8日
国内外別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：50291159

(2) 研究分担者 (2007 年度)

盆子原 誠 (BONKOBARA MAKOTO)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：50343611

(3) 連携研究者 (2008 年度)

盆子原 誠 (BONKOBARA MAKOTO)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：50343611