

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22658059

研究課題名（和文）RNA アプタマーを用いた魚類ウイルス感染症の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of growth inhibition of fish pathogenic virus by RNA aptamers

研究代表者

青木 宙（東京海洋大学 海洋科学技術研究科 特任教授）（Aoki, Takashi）

研究者番号：00051805

研究成果の概要（和文）：

ウイルス性出血性敗血症の起因ウイルス（VHSV）およびヒラメラブドウイルス病の起因ウイルス（HIRRV）に対する RNA アプタマーは、魚類病原性ウイルス VHSV あるいは HIRRV に対し強い親和性が認められた。RNA アプタマーを産生する遺伝子を形質転換した *Rhodovulum sulfidophilum* は、培地中に VHSV あるいは HIRRV に親和性のある RNA アプタマーを大量に生産した。VHSV 感染ヒラメを RNA アプタマーを生産する *R. sulfidophilum* を含む海水中で飼育したところ、VHSV 症を発症せず、魚類ウイルス感染を防御出来ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The selected RNA aptamers against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and hirame rhabdovirus (HIRRV) showed highest specificity and affinity for the respective fish pathogenic viruses.

Hirame natural embryo (HINAE) cells treated with the viruses and the corresponding RNA aptamers showed a decrease in incidence of cytopathic effect (CPE) compared to controls (treated only with virus).

Rhodovulum sulfidophilum transformed with genes encoding for VHSV- and HIRRV-aptamers produced their extracellular aptamers on a large scale. When fish was cultured in seawater containing *R. sulfidophilum* which produces VHSV-RNA aptamers, fish mortality during VHSV challenge decreased. It reveals that the recombinant *R. sulfidophilum* can be a powerful tool for prevention of virus infection in fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：(1) RNA アプタマー (2) 魚類病原ウイルス (3) ウイルス性出血性敗血症 (4) ヒラメラブドウイルス病 (5) SELEX 法 (6) *Rhodovulum sulfidophilum* (7) Marine Biotechnology (8) ヒラメ

1. 研究開始当初の背景

世界各地で魚介類養殖場および種苗生産施設においてウイルス病が多発し、その被害は、相当な額に及んでおり、有効な治療法あるいは予防法の開発が急務となっていた。抗体に代わるウイルスやタンパク質を標的物質として特異的に結合する RNA アプタマーは、分子認識が可能な生体物質として注目を浴びていた。また、その当時は、RNA アプタマーは、化学合成により作製されていたが、不安定で、製造コストは高価であった。菊池らによりエビの養殖場の汚泥から分離された海洋性光合成細菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) が、核酸 (DNA や RNA) を菌体外に排出することを発見した。次いで、この菌を使って RNA アプタマーを生産する方法が開発されたので、その手法を取り入れ、RNA アプタマーの生産を試みた。研究開始当初は、魚病ウイルスに特異的に結合する RNA アプタマーは、見付かっておらず、また、RNA アプタマーを用いて魚類のウイルス病の治療が可能かどうか、まったく解明されていなかった。

2. 研究の目的

魚類病原ウイルスを標的とする RNA アプタマーを SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法 (試験管内人工進化法) を用いて検出し、魚類病原ウイルス病に対する新規治療剤の開発を行う。魚病ウイルスに対する RNA アプタマーを海洋性光合成細菌 (*Rhodovulum sulfidophilum*) を使って大量生産を行った。次いで、生産した RNA アプタマーが魚類病原性ウイルスに対し強い親和性があるかどうか調べ、さらに、RNA アプタマーを生産する *R. sulfidophilum* を用いてウイルス感染魚の治療が可能であるかどうか *in vivo* で検討した。

今回の研究目的は、*R. sulfidophilum* が産生する RNA アプタマーが、魚類ウイルス病に対して RNA 分子標的薬として有効であるかどうかであった。

3. 研究の方法

(1) 海産魚病原性ウイルス；ウイルス性出血性敗血症の起因ウイルス (VHSV) およびヒラメラブドウイルス病起因ウイルス (HIRRV) は、HINAE 細胞を用いて培養した。魚類ウイルス病 (ウイルス性出血性敗血症, ヒラメラブドウイルス症) の起因ウイルスに対する RNA アプタマーを SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法 (試験管内人工進化法) を用いて作出した。ランダム配列の RNA ライブラリーから標的物質である各ウイルスに結合した RNA 配列のみを選出し、次いで、逆転写、PCR による cDNA 断片の増幅を行った。これらを鋳型として転写を行い、RNA ライブラリーを作製し、再度、各ウイルスと混合し、標的ウイルスと結合する RNA 断片を検出した。同じ操作を十数ラウンド繰り返して行い、標的ウイルスと強く結合する RNA アプタマーを見付けた。

(2) 菊池らが開発したプラスミドベクター pHSR2 にこの DNA を組み込み、組換えプラスミド DNA を海洋細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* に形質転換した。得られた導入株がウイルスを標的とする RNA アプタマーを生産しているかどうかを確認した。次いで、各ウイルスの RNA アプタマーを大量生産し、VHSV および HIRRV 2 種類の魚類ウイルスに対して親和性を有するかどうか検証した。

(3) ウイルス性出血性敗血症の起因ウイルス (VHSV) を標的とする 3 種類の RNA アプタマー (F1、F2、C6) を産生する *R. sulfidophilum* と RNA アプタマーの配列を持たない empty ベ

クターを保持する *R. sulfidophilum* (コントロール区) を培養した。これらの培養液を海水に混入した。次に、平均魚体重 6.4g のヒラメを浸漬法により VHSV を感染させ、これら感染魚を RNA アプタマーを産生する *R. sulfidophilum* と RNA アプタマーの配列を持たない empty ベクターを保持する *R. sulfidophilum* を含む水槽に移し、10日間飼育を行い、死亡の有無を観察した。

4. 研究成果

魚類ウイルス病：ウイルス性出血性敗血症の起因ウイルス (VHSV) およびヒラメラブドウイルス病の起因ウイルス (HIRRV) に対する RNA アプタマーを SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法 (試験管内人工進化法) を用いて検出できた。検出した各 RNA アプタマーは、魚類病原性ウイルス VHSV あるいは HIRRV に対し強い親和性が認められ、分子標的薬として有効であることが確認できた。得られた3種類 (F1、F2、C6) の VHSV に結合する RNA アプタマーを含む培地で VHSV を感染させ、培養した HINAE 細胞は、まったく細胞変性が認められなかった。一方、VHSV を感染させ、培養した HINAE 細胞に PBS で加えた HINAE 培養細胞は、細胞変性が認められた (図 1)。

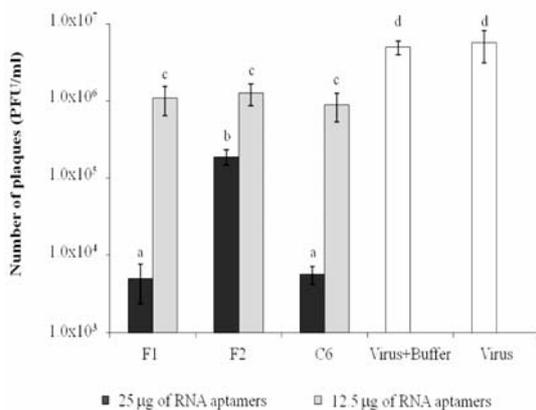


図 1 VHSV に対して親和性の高い3種類の RNA アプタマー (F1、F2、C6) による HINAE 細胞への VHSV 感染抑制。2種類の量 (12.5 および 25 µg) の RNA アプタマーを実験に使用し、すべての RNA アプタマーが対照区と比べ、濃度依存的かつ有意にウイルス感染を抑制した。

ヒラメラブドウイルス病起因ウイルス (HIRRV) を標的とする RNA アプタマーは、4種類 (H1、H2、H3、H4) 検出された。VHSV の RNA アプタマーと同様に、RNA アプタマーを含む培地で HIRRV を感染させ、培養した HINAE 細胞は、まったく細胞変性が認められなかった (図 2)。

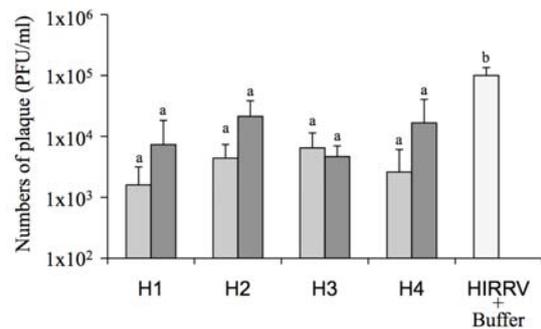


図 2 HIRRV に対して親和性の高い4種類の RNA アプタマー (H1、H2、H3 および H4) による HINAE 細胞への HIRRV 感染抑制。2種類の濃度 (0.25 および 0.5 nmol) の RNA アプタマーを実験に使用し、すべての RNA アプタマーが対照区と比べ、有意にウイルス力価を減少させた。

次いで、両 RNA 分子を逆転写、PCR 反応で、相補的な DNA を合成した。菊池らが開発したプラスミドベクター pHSR2 にこの DNA を組み込み、組換えプラスミド DNA を *R. sulfidophilum* に形質転換した。形質転換株は、培地中に魚病ウイルス VHSV あるいは HIRRV に親和性のある RNA アプタマーを生産した (図 3)。RNA アプタマーを化学合成ではなく、海洋細菌を使用することにより、大量に生産することを、可能とした。

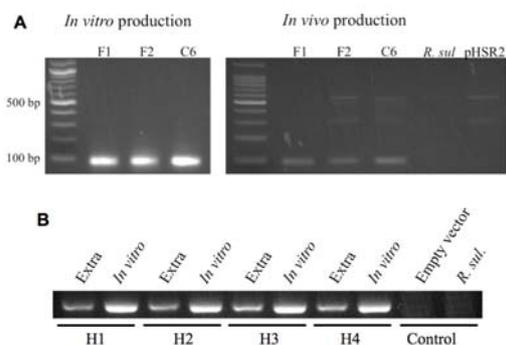


図 3 *R. sulfidophilum* により産生された

RNA アプタマーの RT-PCR 法を用いた検出。VHSV (A) および HIRRV (B) に親和性のある RNA アプタマーは、*R. sulfidophilum* によってそれぞれ液体培地中へ産生されることが確認された。図中の「*In vitro*」は、T7 RiboMAX キットを用いて人工合成された核酸を示し、「*In vivo*」あるいは「Extra」は *R. sulfidophilum* から分泌された核酸を示す。

VHSV に感染させたヒラメを VHSV に結合性のある RNA アプタマー産生する *R. sulfidophilum* を含む海水中で飼育したところ、VHSV を発症せず、生存した。今後、RNA アプタマー産生する *R. sulfidophilum* を用いることにより、魚類ウイルス病を防御出来ることが明らかとなった(図 4)。

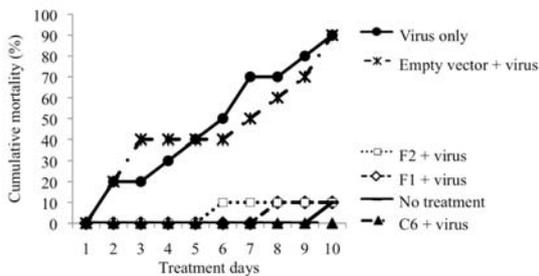


図4 VHSV 親和性 RNA アプタマー (F1、F2、C6) を産生する *R. sulfidophilum* を添加した海水中におけるヒラメを用いた VHSV 感染実験。試験は 10 日間継続し、全てのアプタマー産生 *R. sulfidophilum* 区は、対照区と比べ累積死亡率が低かった。

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 2 件)

- 1) Porntep Punarak, Mudjekeewis D. Santos, Seong Don Hwang, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Yo Kikuchi, Takashi Aoki (2012) RNA Aptamers Inhibit the Growth of the Fish Pathogen Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV), *Marine Biotechnology*, Online 22, April, 2012, DOI 10.1007/s10126-012-9448-1
- 2) Seong Don Hwang, Naoko Midorikawa, Porntep Punarak, Yo Kikuchi, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki (2012)

Inhibition of hirame rhabdovirus (HIRRV) growth by RNA aptamers. *Journal of Fish Diseases* (投稿中)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Seong Don Hwang, Porntep Punarak, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki: Inhibition of hirame rhabdovirus (HIRRV) growth by newly developed RNA aptamers. 平成 24 年度日本魚病学会春季大会、東京海洋大学、東京、平成 24 年 3 月
- 2) Porntep Punarak, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki: Antiviral ability of RNA aptamers against Hirame rhabdovirus. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学 (品川キャンパス)、平成 23 年 3 月
- 3) Aoki Takashi, Seong Dong Hwang, Porntep Punarak, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, : Virulence inhibition of fish virus by RNA aptamers. 15th EAFF International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Split, Croatia, September 12-16, 2011.
- 4) Porntep Punarak, Mudjekeewis D. Santos, Seong Don Hwang, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki. : Study on protection of RNA aptamers against viral hemorrhagic septicemia virus infection in Japanese flounder. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会、長崎大学文京キャンパス、平成 23 年 9 月
- 5) Porntep Punarak, Mudjekeewis D. Santos, Hiromichi Suzuki, Yo Kikuchi, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Takashi Aoki: Growth inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus by RNA aptamers. 平成 22 年度日本水産学会大会、京都大学吉田キャンパス、平成 22 年 9 月 23-24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 宙 (東京海洋大学)
研究者番号: 00051805

(2) 研究分担者

廣野 育生 (東京海洋大学)
研究者番号 : 00270296

近藤 秀裕 (東京海洋大学)
研究者番号 : 20314635