

令和 7 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K14999

研究課題名（和文）ネコモルビリウイルスの持続感染に不完全ウイルスRNAが果たす役割の解明

研究課題名（英文）The role of incomplete viral RNA in persistent feline morbillivirus infection.

研究代表者

坂口 翔一（Sakaguchi, Shoichi）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20815279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ネコの腎臓に感染するネコモルビリウイルスが長く体内に残る仕組みを、不完全なウイルスの設計図（RNA）に注目して調べた。次世代シーケンサーを用い、網羅的な方法でRNAを詳しく調べることで、これまで見つけていなかった多様なRNAの存在が明らかになった。また、ウイルスに感染した細胞では、急性期と慢性期の両方でこの不完全なウイルスのRNAが検出された。今後、これらのRNAがウイルスに与える影響を調べることで、ネコモルビリウイルスがネコに与える影響や感染し続けるメカニズムの解明が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネコモルビリウイルスはネコの慢性腎疾患との関連が疑われており、その病態解明は動物福祉の観点からも重要である。本研究によって、持続感染を維持するウイルス側因子が明らかになれば、ウイルス性腎疾患に対する新たな診断・治療法の開発につながる可能性がある。さらに、不完全ウイルスRNAの理解は、他の慢性感染ウイルス（例：麻疹ウイルスなど）への応用も期待され、人獣共通感染症への対応強化にも貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：We investigated how feline morbillivirus, which infects the kidneys of cats, can persist in the body over time by focusing on incomplete forms of viral RNA. Using next-generation sequencing, we thoroughly analyzed the RNA and identified a wide variety of previously undetected incomplete viral RNAs. Notably, some of these RNAs were found in infected cells during both the acute and chronic phases of infection. These findings suggest that certain incomplete RNAs may play a role in maintaining long-term viral persistence. Future research will explore how these RNAs influence viral replication and host responses, which may ultimately contribute to understanding disease mechanisms and developing new treatment strategies.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ネコモルビリウイルス RNA依存性RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

ネコは他の動物と比較して泌尿器疾患にかかりやすく、特に高齢のネコではその罹患率が20%を超えると報告されている。このような背景から、ネコの泌尿器疾患の原因を明らかにし、効果的な予防・治療法を確立することは、獣医療のみならず動物福祉の観点からも重要な課題である。

近年、ネコの尿細管間質性腎炎との関連が示唆される病原体として「ネコモルビリウイルス」が注目されている。2012年にはWooらによりウイルス感染と腎疾患の有意な関連が報告され、2016年にはSharpらが感染後15か月以上にわたり尿中からウイルスRNAを検出し、同ウイルスの「持続感染」の可能性が指摘された。

ウイルスが宿主細胞に持続的に感染する過程では、ウイルスゲノムのコピーエラーに由来する「不完全ウイルスRNA (defective viral RNA)」の存在が、様々なウイルス種で報告されている。これらの不完全RNAはウイルスの増殖に抑制的に作用し、その結果、感染細胞の生存が維持されることによって持続感染が成立すると考えられている。しかしながら、不完全ウイルスRNAの網羅的な同定は技術的に難しく、ネコモルビリウイルスでもその全貌は明らかになっていなかった。

申請者は、ネコモルビリウイルスを分離し、感染性や宿主域に関する特性を明らかにするとともに、感染細胞から複数種の不完全ウイルスRNAを検出するなど、持続感染モデルの構築に成功している。また、二本鎖RNAを標的とした次世代シーケンシング(FLDS法)を用いることで、従来困難であったコピーバック型不完全RNAの網羅的解析が可能となる技術的基盤を整備した。

以上の背景から、本研究はネコモルビリウイルスの不完全ウイルスRNAを網羅的に同定・解析し、その役割を明らかにすることで、ウイルスの持続感染機構の解明を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ネコモルビリウイルスの持続感染における「不完全ウイルスRNA (defective viral RNA)」の全体像を明らかにし、これらがウイルスの増殖や宿主の免疫応答に及ぼす影響を解明することである。

ウイルスが持続感染を成立させるためには、自身の増殖を過度に行わず、宿主細胞を死滅させないように調整する仕組みが必要とされる。これまでに、麻疹ウイルスなどの他のパラミクソウイルス科ウイルスにおいて、不完全ウイルスRNAがこのような調整機構に関与することが知られており、ネコモルビリウイルスにおいても同様の機構が存在する可能性が示唆されている。

本研究では、次の3つの柱から構成される実験系を通じて、持続感染に関わる不完全ウイルスRNAの機能的役割を明らかにする。

(1) 不完全ウイルスRNAの網羅的同定

二本鎖RNA選択的シーケンシング(FLDS法, Fragmented and Primer Ligated dsRNA Sequencing)を用いて、ネコモルビリウイルス感染細胞から不完全ウイルスRNAを網羅的に抽出・解析する。

(2) 感染の経時変化に伴うRNAプロファイルと宿主応答の変化解析

急性感染期から持続感染期への遷移において、不完全ウイルスRNAの構成と宿主の免疫遺伝子発現がどのように変化するかを経時的に解析する。

(3) 人工合成RNAを用いた機能解析

同定された不完全ウイルスRNAを人工合成し、培養細胞に導入してウイルス増殖や宿主免疫応答に及ぼす影響を調べることで、その機能的意義を明らかにする。

これにより、ネコモルビリウイルスが持続感染を成立させる分子メカニズムを解明し、ひいてはウイルスによる慢性疾患の理解や新たな創薬標的の発見へとつながることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ネコモルビリウイルスの持続感染機構の解明を目的とし、特にコピーバック型の不完全ウイルスRNAに注目して、分子レベルでの網羅的解析と機能的理解を目指して以下のアプローチを実施した。

(1) 不完全ウイルスRNAの網羅的同定(一本鎖・二本鎖RNAシーケンシング)

ネコモルビリウイルスに感染させたネコ腎由来CRFK細胞からRNAを抽出し、一本鎖RNA

および二本鎖 RNA それぞれについて次世代シーケンス解析を行った。特に二本鎖 RNA については、セルロースカラム精製および超音波断片化を経て、FLDS 法によりライブラリーを調製し、ウイルス由来不完全 RNA の網羅的な同定を行った。得られた配列はリファレンスゲノムにマッピングし、不完全ウイルス RNA の多様性を解析した。

(2) 不完全ウイルス RNA の経時的変化解析

持続感染の成立過程における不完全ウイルス RNA の変化を把握するため、ウイルス接種後、急性期と持続感染成立後にウイルス感染 CRFK 細胞を回収し、不完全ウイルス RNA 発現の時系列データを取得した。

(3) 人工合成不完全ウイルス RNA による機能解析

シーケンス解析により同定された代表的な不完全ウイルス RNA について、T7 プロモーター配列を付加したテンプレートを用いて *in vitro* 転写により人工合成する作業を進めている。この RNA を CRFK 細胞に導入した後、ネコモルビリウイルスを感染させ、ウイルス力価の変化を測定することで、それぞれの RNA がウイルス複製に与える影響を解析できる。

(4) RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ配列の網羅的解析とツール開発

不完全ウイルス RNA の生成には、ネコモルビリウイルスを含むモルビリウイルスまたはパラミクソウイルス特有の、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の構造・複製機構が関与すると考えられる。そこで、公共データベースから配列データを取得し、RNA ウィルスに共通する RdRp 配列を網羅的に解析するための HMM データセット「NeoRdRp」を独自に構築した。

4. 研究成果

本研究では、ネコモルビリウイルスの持続感染において重要な役割を果たすと考えられる不完全ウイルス RNA に着目し、その網羅的同定と経時的な変動解析、さらに RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の配列解析を通じて、持続感染成立の分子メカニズム解明に取り組んだ。

まず、ネコ腎由来 CRFK 細胞にネコモルビリウイルスを感染させた実験系を用い、感染細胞から抽出した RNA について、一本鎖 RNA および二本鎖 RNA を対象とした次世代シーケンス解析を実施した。FLDS 法による二本鎖 RNA の解析では、主要な不完全ウイルス RNA の存在が強調され、一方発現量の少ない RNA については検出されない傾向がみられた。そこで一般的な RNA シーケンス法により一本鎖 RNA の解析を行ったところ、不完全ウイルス RNA を網羅的に同定することができた。これにより、PCR 方では網羅的な同定が難しい多様な不完全ウイルス RNA が明らかとなり、さらにコピーバック型構造をもつ複数の不完全ウイルス RNA のうち高発現の RNA が特定された。

次に、急性期と持続感染期にウイルス感染細胞を回収し、不完全 RNA プロファイルの経時変化を解析した。その結果、不完全ウイルス RNA の一部は急性感染期から持続感染期にかけて継続的に検出されることが明らかとなり、これらの RNA が持続感染状態の維持に寄与している可能性が示唆された。

また、同定された不完全ウイルス RNA の機能的解析に向けて、人工合成に必要なテンプレート設計および *in vitro* 転写による RNA 作製を進めた。今後はこれらを細胞に導入し、ウイルス複製や宿主応答への影響を定量的に評価する予定である。

さらに、不完全ウイルス RNA の産生に関わる複製酵素の分子特性を広く比較検討するため、RNA ウィルス由来の RdRp 配列に着目し、HMM (隠れマルコフモデル) を用いた網羅的解析ツール「NeoRdRp」を新たに構築した。このツールにより、ネコモルビリウイルスを含む多様なウィルス種における RdRp 配列の分類と比較が可能となり、不完全 RNA 生成と RdRp 構造の関係性についての解析基盤が整備された。

これらの成果により、ネコモルビリウイルスの持続感染に関わる不完全ウイルス RNA の全体像とその一部の機能的側面が明らかとなり、持続感染の成立に必要なウイルス側因子と宿主側応答の理解に向けた新たな知見を得ることができた。本研究は、慢性ウイルス感染やウイルス性腎疾患の病態解明に寄与するとともに、不完全ウイルス RNA を標的とした新たな治療戦略の可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagawa So, Sakaguchi Shoichi, Ogura Atsushi, Mineta Katsuhiko, Endo Toshinori, Suzuki Yoshiyuki, Gojobori Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Current trends in <scp>RNA</scp> virus detection through metatranscriptome sequencing data	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hufsky F., Abecasis A., Babaian A., Beck S., Brierley L., Dellicour S., Eggeling C., Elena S., Gieraths U., Ha A., Harvey W., Jones T., Lamkiewicz K., Lovate G., Lucking D., Machyna M., Nishimura L., Nocke M., Renard B., Sakaguchi S. et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 The International Virus Bioinformatics Meeting 2023	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2031 ~ 2031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v15102031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakaguchi Shoichi, Nakano Takashi, Nakagawa So	4. 巻 4
2. 論文標題 NeoRdRp2 with improved seed data, annotations, and scoring	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fviro.2024.1378695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Shoichi, Urayama Syun-ichi, Takaki Yoshihiro, Hirosuna Kensuke, Wu Hong, Suzuki Youichi, Nunoura Takuro, Nakano Takashi, Nakagawa So	4. 巻 37
2. 論文標題 NeoRdRp: A Comprehensive Dataset for Identifying RNA-dependent RNA Polymerases of Various RNA Viruses from Metatranscriptomic Data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.me22001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shoichi Sakaguchi
2. 発表標題 RNA Virus Discovery Using HMM of Large-Scale RNA-Dependent RNA Polymerase Sequence Data: NeoRdRp 2.0
3. 学会等名 The International Virus Bioinformatics Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shoichi Sakaguchi
2. 発表標題 RNA Virome analyses of metatranscriptome data using NeoRdRp
3. 学会等名 The International Virus Bioinformatics Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂口翔一, 中野隆史, 中川草
2. 発表標題 NeoRdRp 2.0: 新規大規模 RdRp シード配列データセットによるパフォーマンスの向上
3. 学会等名 第36回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂口翔一、中川草、浦山俊一、高木善弘、布浦拓郎、中野隆史
2. 発表標題 RNAウイルス特異的なVirome解析パイプラインの構築
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂口翔一、中川草、浦山俊一、高木善弘、布浦拓郎、中野隆史
2. 発表標題 RNA ウイルス叢検索データセット "NeoRdRp" を用いた海洋メタトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第35回 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoichi Sakaguchi, So Nakagawa, Takashi Nakano
2. 発表標題 Identification of diversified RNA viruses from various environments using NeoRdRp
3. 学会等名 第26回進化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂口翔一、中川草、中野隆史
2. 発表標題 包括的 RNA ウイルス検出のための HMM データセット「NeoRdRp2」を用いたメタトランスクリプトームデータ解析
3. 学会等名 第167回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2024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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------