

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500371

研究課題名(和文) 新規情報学的手法によるインフルエンザを含む人獣共通感染症ウイルスゲノム配列の解析

研究課題名(英文) Genomic sequence studies of zoonotic disease viruses including influenza viruses with a novel bioinformatics method

研究代表者

池村 淑道 (Ikemura, Toshimichi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス研究科・客員教授

研究者番号：50025475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは人獣共通感染症ウイルスであり、トリ由来株のヒトでの大流行が危惧されている。このウイルスの全ゲノム配列を対象に、連続塩基組成のBLSOM解析を行い、この組成が宿主ごとに明確に異なることを見出した。直接にトリから、あるいはブタを経由してヒト集団へ侵入した株に注目すると、ヒトでの流行を繰り返す過程で、連続塩基組成が方向性のある変化をしていた。この知見を基に、トリ由来株のヒト集団での流行のリスク評価法を開発し、全トリ由来株についての危険株の予測を行った。昨年から西アフリカで流行しているエボラウイルスについても、週単位で観察出来る、方向性のある連続塩基組成の変化を見出した。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus presents significant threat to public health, and its pandemics has often been initiate by introduction of this virus from animal sources. Prediction of genomic sequence changes and surveillance of potentially hazardous strains that will cause new pandemics are important issues. We analyzed genome sequences with oligonucleotide BLSOMs and found the composition to differ between avian and human strains. Oligonucleotide composition of the pandemic H1N1/09 was different from that of human seasonal strains, and directional changes in composition in the pandemic strains toward seasonal human strains were observed even within the first pandemic year. This study developed new strategies for surveilling potentially hazardous strains that will cause new pandemics among humans. By similarly analyzing all ebolavirus genome sequences available, we have also found the time-dependent directional changes in oligonucleotide composition during the recent pandemic in West Africa.

研究分野：ゲノム情報解析

キーワード：インフルエンザ 人獣共通感染症 ゲノム配列解析 ビッグデータ ウイルス オリゴヌクレオチド
核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 2009年から流行を開始した新型インフルエンザ(H1N1/09)や昨年から西アフリカで流行しているエボラのように、人類は常に感染症の危険に曝されている。インフルエンザH1N1/09株は比較的弱毒株であったため、大きな被害なしに済んだが、世界的流行の速さは恐るべきものであった。インフルエンザH5N1株のような強毒株の流行も懸念されている。このような世界的規模での脅威について、ゲノム情報解析分野で開発された新手法で新規性の高い研究開発を行うことの社会的・科学的な意義は大きい。申請者が開発したゲノム情報解析手法を用い、インフルエンザを含む人獣共通感染症ウイルスに関して蓄積している多量な配列情報を対象に、大規模ゲノム情報解析を行い、ヒト集団で感染を開始した人獣共通感染症ウイルスのゲノム配列について、その配列変化の方向性を検出・予測する方法の開発を計画した。

(2) 塩基配列解読のための実験技術の飛躍的な発展により、ゲノム配列情報のデータベースへの蓄積は爆発的な増加を見せ、インフルエンザウイルスに限っても、その社会的な重要性から1万を超える株の完全ゲノム配列が解読されている。従来から使用されて来た配列相同性検索だけでは、これらの多量な配列情報の全体像を把握し、効率よく新規発見を行うことは困難になっている。計算機能力の向上だけでは解決出来ない問題であり、配列相同性検索を補完する新規なゲノム情報解析技術の導入が望まれている。我々が特許化したオリゴヌクレオチド組成を解析するBLSOM(一括学習型自己組織化マップ)は、大量ゲノム配列情報からの知識発見に優れた能力を持ち、世界的にも普及をはじめている。

2. 研究の目的

(1) インフルエンザウイルス以外にも、2003年に流行した重症急性呼吸器症を引き起こすSARSウイルス、昨年から西アフリカで流行したエボラウイルス、最近、韓国で流行しているMERSウイルスは、いずれもゲノムがRNAである。これらのウイルスは、自然宿主が人間以外の動物であることから、人獣共通感染症と呼ばれ、ワクチン接種等の方法で地球上からこれらウイルスを撲滅することは、不可能と考えられている。ゲノムがRNAであるウイルス類の場合、ゲノム塩基配列は速い速度で変化しており、ワクチンや核酸医薬を含む薬剤が開発された場合でも、その有効性が失われやすい。さらには、それらウイルスの診断にはRT-PCR等のPCRを中心とした分子生物学的な手法が主流となっており、使用されるプラマーオリゴヌクレオチドのデザインが重要であるが、ゲノム塩基配列が速く変化することは大きな支障となる。我々のグループが開発したBLSOM法を用いて人獣共通感染症ウイルスゲノムの

オリゴヌクレオチド組成を解析する。自然宿主動物からヒトへと感染し、その後のヒト-ヒト感染に伴って起こるゲノム配列変化の方向性や特徴を知り、その変化を生む分子機構を研究することの社会的な意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) ゲノム配列解析の分野は情報爆発の時代を迎えたが、情報が大量化すれば、多様な側面からの知識獲得が可能になり、予測であればその能力が高まると考えられる。我々の開発したBLSOMは、教師なしの学習アルゴリズムを基礎にしており、特定のモデルや予備知識なしに新規な知識発見を可能にする。加えて、優れた画像表示能を備えており、大量情報から知識発見において、強力な手段を提供している。データベースに収録されている全インフルエンザ株について、ゲノム配列の3~6連塩基頻度、並びに遺伝子のコドン頻度を対象にBLSOM解析を行い、これら頻度組成の宿主生物への依存性の検出と、その依存性を生む分子機構を研究する。

(2) 新型株H1N1/09については、特に詳細な解析を行い、ゲノム配列の変化方向を分子進化学的視点で解析して、変化方向の検出と予測を可能にした。この成果を基礎に、近い将来にヒトで流行を起こしやすい、危険なトリ由来株のサーベイ法の開発を行う。

4. 研究成果

(1) ウイルスの増殖は不可避的に多様な宿主の因子(例えばヌクレオチドやアミノ酸やtRNAプール)に依存しており、ウイルスRNA類の宿主タンパク質との結合も考えられ、加えて、宿主側の種々の抗ウイルス機構からの回避も重要である。それらの依存性や回避プロセスがウイルスゲノム配列に見られる、宿主別の特徴を生む原因と考えられる。データベースに収録されている全インフルエンザ株について、ゲノム配列の連続塩基頻度、並びに遺伝子のコドン頻度を対象にBLSOM解析を行い、これら頻度組成の宿主生物別の特徴を明らかにし、その宿主依存性を生む分子機構を研究した。ヒト集団内で新規に流行しているインフルエンザウイルス株は、元は異なる宿主(トリやブタ)で流行していた株がヒト集団内で流行するようになった。このウイルス株に対する抗体を、大半のヒトが持っていない場合には、世界的な大流行が起こる可能性が高くなる。インフルエンザウイルスのゲノム配列の時系列的な変化を詳細に調べることにより、新たな宿主に適應するための変化機構を推測することが可能になり、ウイルスの予防や治療対策に基盤情報を提供出来るようになった。2009年にパンデミックを引き起こした新型H1N1株(H1N1/09株)の連続塩基組成を解析したところ、従来の季節性ヒト由来株(H1N1株及びH3N2株)とは連続塩基組成が明瞭に異なることが見られた

が、流行開始から1年後のH1N1/09株の連続塩基組成を調べたところ、流行開始直後と比較して連続塩基組成が季節性株に明瞭に近づいていることが見られた (Iwasaki et al., DNA res, 18, 2011; Iwasaki et al., Lecture Notes in Computer Science, 2011)。連続塩基組成の変化がウイルスのヒト細胞内での能率的な増殖に適応して行く過程と思われるので、ウイルスゲノム進化の予測を行い、その予測を短期間後に検証することが可能と考えた。事実、2年後(2013年)に、最初の論文の発表後に配列が決定されたH1N1/09株の連続塩基組成を解析したところ、最初の論文で予測した方向性のある変化が、正に継続的に起こっていた (Iwasaki et al. BMC Infect Dis. 13, 2013)。ウイルスゲノムに起こる個々の突然変異はランダムなプロセスではあるが、新しい宿主細胞で能率的な増殖を行う過程で、方向性のある変化を蓄積してきた結果と言える。

(2) ヒトで流行しているインフルエンザウイルス株はトリで流行している株と比較して、A及びUに富んだ連続塩基(例えば2連や3連塩基)を好む傾向が見られ、1塩基組成の明瞭な影響が存在していた。細胞中のヌクレオチドプールについての宿主別の差異や、宿主の体温の差等が原因と考えられる。BLSOM解析を行う連続塩基を、4連、5連、6連と長くしていくことで、ウイルスがヒト細胞に適応するための多様な機構を知る手掛かりが得られると予想した。これらのどの連続塩基についても、宿主ごとの明確な分離が見られた。ヒトを宿主として流行しているA型及びB型株で共通して好まれている連続塩基も存在していたことから、ヒト宿主への適応に重要なオリゴヌクレオチドの候補と推定した。H1N1/09株に見られた方向性のある変化については、その変化方向の一般性を検証する目的で、季節性流行株であるH1N1やH3N2やH3N2に関して、公開されている全ゲノム配列の時系列解析を行ったところ、H1N1/09株に見られた変化の方向性の大半が、これらの亜型でも観察された (Iwasaki et al., Advance in Viral Genome Research, 2013)。ヒト細胞中での能率的な増殖に関係した共通の分子機構に起因する変化と考えられる。これらの知見を基礎に、世界の各地で採取されているトリ由来株の全ゲノム配列を対象に連続塩基組成の解析を行い、ヒト集団内での流行のしやすさに関するリスク評価を行った。具体的には、ヒトでの流行初期の株類で、異なった亜型で共通して好まれる(あるいは嫌われる)連続塩基に注目し、それらはヒトでの流行の開始に有利(あるいは不利)な連続塩基の候補とした。言い換えれば、ヒトでの流行初期のヒト由来株と連続塩基の頻度が似ているトリ由来株類に着目し、未だヒト集団で流行したことの無い亜型である場合、ヒト集団内にて新規な流行を引

き起こすリスクの高い危険株として推定した (Iwasaki et al. BMC Infect Dis. 13, 2013; Iwasaki et al. Advance in Viral Genome Research, 2013)。

(3) BLSOM解析を行う連続塩基を、4連、5連、6連と長くしていくと、1塩基組成の宿主特異性では説明出来ない特徴が明らかになった。例えば、A及びUに富んだ連続塩基を好むヒト由来株についても、5連塩基になるとGやCだけからなる連続塩基を好む傾向が見られた。5連や6連のオリゴヌクレオチド類は多様なタンパク質と結合する能力を持つので、5連や6連塩基のBLSOM解析はウイルス核酸と宿主タンパク質との配列特異的な結合に関しての情報を提供する可能性が考えられる。核酸とタンパク質との結合を検出する目的の情報解析技術として、既に多様な知見が蓄積しているヒトゲノムを対象に、5連塩基組成のBLSOM解析を行ったところ、セントロメア付近の領域に転写因子結合配列が密集して存在することを見出した (Iwasaki et al., Chromosome Res, 21, 2013)。インフルエンザウイルスRNAと宿主由来の因子間の相互作用の検出にもオリゴヌクレオチドBLSOMが適用出来ると考えられるので、この視点での研究を更に進める予定である。

種々の人獣共通感染症を引き起こす微生物を媒介するとして、吸血性のマダニが注目されている。北大の実験グループとの共同研究として、国内外で採取されたマダニ試料由来のメタゲノム配列について、4連塩基組成のBLSOM解析を行い、従来はマダニに想定されていなかったウイルス類を特定した (Nakao et al. ISME J., 2013)。

(4) 本基盤研究は、当初は3年間の研究を予定していたが、人獣共通感染症ウイルスであるエボラウイルスが西アフリカで流行を開始したことから、その社会的な重要性を考え、インフルエンザの研究で開発した情報解析技術を用いて、エボラウイルスの解析を4年目に行った。インフルエンザウイルスと同様に、ヒトでの流行の開始時からオリゴヌクレオチド組成には方向性のある変化が見られ、その変化は週単位の解析でも検出可能なほどに明瞭な方向性を示していた。オリゴヌクレオチドは、ウイルスの診断に使われているRT-PCR等のプライマーとして用いられており、核酸医薬(therapeutic oligonucleotide)としても期待されている。エボラウイルスのゲノムにおいて、ヒト集団内での流行に伴って出現頻度を減少させる、あるいは増加させるオリゴヌクレオチドを予測しておくことは、この致死率の高いウイルスの正確な診断や核酸医薬のデザインにおいて重要な基盤情報となる。エボラウイルスの解析結果は、2015年5月にパリのパスツール研究所で開催された「Taskforce Infectious Disease: Ebola Paris 2015」において発表を行い、論

文を準備中である。なお、別の種類の人獣共通感染症 RNA ウイルスである MERS についても同様な研究開発が可能である。インフルエンザウイルスで開発した技術が、人類が抱えている新たな危機の対策に有効な手段を提供出来ると確信しているので、この方向の研究を更に発展させる予定である。

<引用文献>

Yuki Iwasaki, Takashi Abe, Kennosuke Wada, Masae Itoh and Toshimichi Ikemura. Prediction of Directional Changes of Influenza A Virus Genome Sequences with Emphasis on Pandemic H1N1/09 as a Model Case. DNA Research, 18, 125-136, 2011.

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)

Yuki Iwasaki, Kennosuke Wada, Masae Itoh, Toshimichi Ikemura and Takashi Abe. A Novel Bioinformatics Strategy to Predict Directional Changes of Influenza A Virus Genome Sequences. Lecture Notes in Computer Science, 6731/2011, 198-206, 2011.

Iwasaki Y, Abe T, Wada Y, Wada K, and Ikemura T. Novel bioinformatics strategies for prediction of directional sequence changes in influenza virus genomes and for surveillance of potentially hazardous strains. BMC Infect Dis., 13, 386, 2013. doi:10.1186/1471-2334-13-386.

Yuki Iwasaki, Kennosuke Wada, Yoshiko Wada, Takashi Abe and Toshimichi Ikemura. Notable clustering of transcription-factor-binding motifs in human pericentric regions and its biological significance. Chromo. Res. 21, 461-474, 2013.

Nakao R, Abe T, Nijhof AM, Yamamoto S, Jongejan F, Ikemura T, and Sugimoto C. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. ISME J. 7, 1003-1015, 2013.

[学会発表](計 26件)

Yuki Iwasaki, Kennosuke Wada, Masae Itoh, Toshimichi Ikemura and Takashi Abe. Prediction of Directional Changes of Influenza A Virus Genome Sequences using BLSOM with Emphasis on Pandemic H1N1/09.

Society for Molecular Biology and Evolution, 2011, Kyoto, Japan, Jul-11.

Yuki Iwasaki, Takashi Abe, Kennosuke Wada, Yoshiko Wada, Kouki Yonezawa and Toshimichi Ikemura. Novel bioinformatics strategies to analyze influenza virus genome signature and its evolution from massive viral genome sequences, using Batch-Learning Self Organizing Map (BLSOM). SMBE2013, Chicago, USA, 2013/7/10-12

Yuki Wada, Kennosuke Wada, Daisuke Isoda, Yuki Iwasaki, Shigehiko Kanaya and Toshimichi Ikemura. Big data bioinformatics for designing therapeutic oligonucleotides for ebolavirus disease. Taskforce Infectious Disease: Ebola Paris 2015. Institut Pasteur - Paris, France, May 28-29, 2015.

[図書](計 1件)

Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Kennosuke Wada, Yoshiko Wada and Takashi Abe. Novel bioinformatics method to analyze more than 10,000 influenza virus strains easily at once: Batch-Learning Self Organizing Map (BLSOM). Advance in Viral Genome Research. Borrelli Y. and Giannini Y. ed., Chapter 4. Nova Science Publishers, 2013, ISBN: 978-1-62808-723-9.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池村 淑道 (IKEMURA, Toshimichi)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス研究
科・客員教授
研究者番号：50025475

(2) 研究分担者

阿部 貴志 (ABE Takashi)
新潟大学・自然科学研究科・准教授
研究者番号：30390628

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：