

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580261

研究課題名(和文)トラフグ口白症病原体の正体をつきとめる - ゲノムからのアプローチ -

研究課題名(英文)Taxonomic determination of kuchijirosho virus by genomic analysis.

研究代表者

宮台 俊明 (Toshiaki, Miyadai)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：20157663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：Rapid determination system for Viral RNA (RDV)法によってトラフグの口白症ウイルスのゲノムをクローニングし結果、約1000塩基のRNA断片を3クローン得ることに成功した。この配列は口白症に感染した脳と脊髄に高発現し、病態の進行に伴い発現量が増加することから、口白症ウイルスゲノムあるいは少なくとも口白症関連RNAである。

研究成果の概要(英文)：Kuchijirosho virus infects cultured fugu (Takifugu rubripes) and occurred epizootic outbreaks in aquaculture farm in Japan. Physicochemical characterization and electron microscopic observation suggested that kuchijirosho virus can belong to Genus Flavivirus, or at least Flaviviridae.

We tried to RT-PCR amplification using 20 sets of PCR primer which are universal to Flavivirus, Hepacivirus, or Pestivirus; however, any virus-specific nucleotide sequence was amplified.

"Rapid Determination System for Viral RNA Sequences" method was adopted to determine unknown virus genome nucleotide sequence. We succeeded first to clone 3 cDNA fragments from brains of kuchijirosho-infected fugu. Although These RNAs appeared in only kuchijirosho-affected brain, it is not clear that these RNAs are derived from kuchijirosho genome itself. So, we call these RNAs "kuchijirosho-associated RNA, KAR". To determine nucleotide sequence of whole genome, we are now performing next generation sequencer.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ウイルス トラフグ 口白症 魚病 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) トラフグの致死性の疾患である口白症は1982年に報告され、トラフグ養殖に甚大な被害をもたらした。本疾病はウイルス病であると推測されたが、ウイルス種は未だに特定されていない。ウイルス性疾患に対する有効な対策は、発症前の早期発見とワクチン接種による免疫学的防御である。

(2) しかし、ウイルス種が同定されていないため、ワクチンを作製することができず、発症個体を遺棄するしか対処方法がない現状にある。

2. 研究の目的

申請者は、本ウイルスがヒトC型肝炎ウイルスに極めて類似する性状を持つことを見出した。そこで、本研究ではこの特性を手掛かりにして、口白症病原体の全ゲノムを解読することにより、その種を特定し、口白症の早期発見やワクチンの開発に資することを目指す。

3. 研究の方法

(1) C型肝炎を含むフラビウイルス科のゲノムの各属に共通する塩基配列を元にPCRプライマーを作製して、PCR法によって口白症ウイルスゲノム断片を増幅する。

(2) ウイルスゲノムの塩基配列が全く不明の場合、そのゲノムの一部をPCRによって増幅する方法を用いて、口白症ウイルスゲノム断片を増幅を行う。

(3) 次世代シーケンサーを用いて、網羅的に口白症ウイルスゲノム断片の配列を決定する。

4. 研究成果

(1) フラビウイルス科の3属それぞれのウイルスゲノム配列と一致するプライマー(ユニバーサルプライマー)を用いて、口白症ウイルスゲノムのPCR増幅を試みた。結果、増幅した核酸の塩基配列は全てフラビウイルスと相同性を持たないため、口白症ウイルスは既知のフラビウイルスではなく、少なくともユニバーサルプライマーの配列は持たないことがわかった。

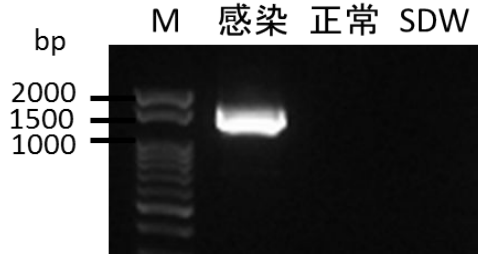
(2) そこで、塩基配列情報が皆無のウイルスゲノムをクローニングする方法(RDV法)を用いて、口白症ウイルスゲノム断片のクローニングを試みた。

その結果、約1000塩基のRNAを3断片クローニングすることに成功した。この3つの断片をA、B、Cと称する。このRNAは正常魚では発現せず、口白症ウイルスに感染した個体の脳および脊髄で発現していた。また、症状の悪化に伴い発現量は増加し、瀕死魚で最も高い発現を認めることができた。図には3断片のうちA断片のRT-PCR増幅断片の電気泳動像を示した。

これらのA、B、C断片は口白症ウイルスゲノム断片であるかどうかは不明である。少なくともトラフグを含む全生物の塩基配列

データベースには登録されていない。そこで、この断片を口白症関連RNA(kuchijirosho associated RNA, KAR)と呼称することにした。

断片A



これまで、口白症は症状から診断が行われてきた。また、口白症感染魚の脳を摘出して磨碎濾液を作製し、これを健康なトラフグに筋注して、口白症の症状が現れることを確かめて、確定診断とした。しかし、明瞭な診断基準がなかったのだが、本研究により明らかにされたように、KARの発現を認めた場合に口白症と確定診断することを提唱する。

他の疾患、あるいは複数の地域で発生したいわゆる口白症の全てにKARが発現するかどうかは、今後検討する必要がある。

フラビウイルスは1本鎖RNAウイルスである。もしKARが1本鎖RNAゲノムの部分的配列であるのならば、異なる断片上の塩基配列をもとにプライマーを設計してRT-PCRを行えば、断片間の塩基配列も得られるに違いない。しかし、この試みは成功しなかった。また、断片両端に未読の配列が存在することは容易に想定されたので、両端の伸長反応を試みたのだが、これも成功しなかった。すなわち、KARは完全長ウイルスゲノム断片ではない可能性がでてきた。

上記の実験結果を踏まえ、全ゲノム解読を完成させるためには、次世代シーケンサーを用いて、網羅的解析を行い、ウイルスゲノム断片の情報を集める必要がある。

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5件)

Maki Ohtani, Toshiaki Miyadai,
Functional analysis of fish BCL-6 and
Blimp-1 in vitro: Transcriptional
repressors for B-cell terminal
differentiation in fugu (*Takifugu
rubripes*), *Molecular Immunology*, 査
読有、48、Issues 6-7、2011、818-825、
DOI:10.1016/j.molimm.2010.10.018
Tomoyuki Odaka, Shigeyuki Tsutusi,
Ryuichi Sugamata, Hiroaki Suetake,
Toshiaki Miyadai, Yuzuru Suzuki, Tasuku
Watanabe, Osamu Nakamura, The

plasmablast-like leukocyte in the kidney of fugu (*Takifugu rubripes*). Fish & Shellfish Immunology, 査読有、30(2)、2011、682-690. doi: 10.1016/j.fsi.2010.12.018, Toshi Kon, Tadashi Isshiki, Toshiaki Miyadai, Yoshiharu Honma, Milky hemolymph syndrome associated with an intranuclear bacilliform virus in snow crabs *Chionoecetes opilio* from the Sea of Japan, Fisheries Science, 査読有、77(6)、2011、999-1007. DOI: 10.1007/s12562-011-0405-0 Takashi Kamiya, Wataru Ka, Satoshi Tasumi, Ayumi Oka, Takayoshi Matsunaga, Naoki Mizuno, Masashi Fujita, Hiroaki Suetake, Shigenori Suzuki, Sho Hosoya, Toshiaki Miyadai, Sumanty Tohari, Sydney Brenner, Byrappa Venkatesh, Yuzuru Suzuki, Kiyoshi Kikuchi, A trans-species missense SNP in amhrII is associated with sex determination in the tiger pufferfish (fugu), PLoS Genetics, 査読有、8 (7)、2012、e1002798, 1-10、On line. doi: 10.1371/journal.pgen.1002798. Kaneda M, Odaka T, Suetake H, Tahara D, Miyadai T, Teleost IL-6 promotes antibody production through STAT3 signaling via IL-6R and gp130, Developmental and Comparative Immunology, 査読有、38 (2)、2012、224-231、DOI:10.1016/j.dci.2012.02.002

〔学会発表〕(計 39 件)

藤井崇文ほか 4 名、ヒラメの腎臓および脾臓におけるウイルス感染に対する応答の比較、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 26 日 - 3 月 30 日、東京海洋大学

森本嵩也ほか 4 名、ウイルス性出血性敗血症に対するホルマリン不活化ワクチンを接種されたヒラメにおける免疫関連遺伝子の発現、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 26 日 - 3 月 30 日、東京海洋大学

Kiyoshi Kikuchi ほか 6 名、Fine mapping of the sex-determining locus in fugu, The International Symposium on Genetics in Aquaculture XI, June 24-30, 2012, Auburn University Hotel and Conference Center, Auburn University, Alabama.

M. Kaneda ほか 3 名、Teleost IL-6 promotes antibody production through STAT3 signaling via IL-6R and gp130, 12th Congress of ISDCI, July 9 (Mon) - 13 (Fri), 2012, Fukuoka,

H. Tauchi ほか 7 名、A fish chemokine expressed in the secondary lymphoid

organs in fugu *Takifugu rubripes*, 12th Congress of ISDCI, July 9 (Mon) - 13 (Fri), 2012, Fukuoka, T. Odaka ほか 6 名、The Plasmablast-like Leukocyte in the Kidney of Fugu (*Takifugu rubripes*). 12th Congress of ISDCI, July 9 (Mon) - 13 (Fri), 2012, Fukuoka Tomoki Maeda ほか 3 名、Molecular Cloning and Expression Analysis of CD27 from Fugu, *Takifugu rubripes*, Proceedings of the 14th International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources. November 29 - December 1, 2012, Obama Campus, Fukui Prefectural University Tomoyuki Odaka ほか 2 名、Functional Analysis of Basophil in Fugu (*Takifugu rubripes*), Proceedings of the 14th International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources, November 29 - December 1, 2012, Obama Campus, Fukui Prefectural University, Shigeyuki Tsutsui ほか 9 名、N-acetyl-d-glucosamine-binding immunoglobulin m of fugu (*Takifugu rubripes*) inhibits the growth of fish pathogenic bacteria: a novel function of teleost antibody, First International Conference of Fish and Shellfish Immunology, June 25-28, 2013, Vigo, Spain.

小高智之ほか 3 名、トラフグ好塩基球はマスト細胞への分化能を持つ、平成 26 年度日本水産学会春機大会、2013 年 3 月 27 日 ~ 31 日 (発表 28 日) 北海道大学 函館市

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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

宮台 俊明 (MIYADAI, Toshiaki)
福井県立大学・海洋生物資源学部・教授
研究者番号：20157663

(2) 研究分担者

末武 弘章 (SUETAKE, Hiroaki)
福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授
研究者番号：00334326

(3) 連携研究者

一色 正 (ISSHIKI, Tadashi)
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号：30378319

北村 真一 (KITAMURA, Shin-ichi)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授
研究者番号：40448279

竹内 健司 (TAKEUCHI, Kenji)
福井大学・医学部・助教 (学内講師)
研究者番号：40236419