

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670223

研究課題名(和文)新規病原ウイルス単離の試み

研究課題名(英文)A trial to isolate novel pathogenic viruses

研究代表者

村松 正道 (Muramatsu, Masamichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20359813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日和見感染時に病原性を示すウイルスのうち環状DNAをゲノムにもつものが特にポリオーマウイルスで報告されている。そこでDNA抽出産物から環状DNAを強力に増幅する手法で臨床検体中に新規病原体DNAが含まれるかを検討した。既存のパピローマウイルスは期待通り増幅されたが、新種のウイルスはみつからなかった。しかし由来不明の環状DNAを見つけた。由来不明DNA同定は病原性は不明だが一定の成果と言える。

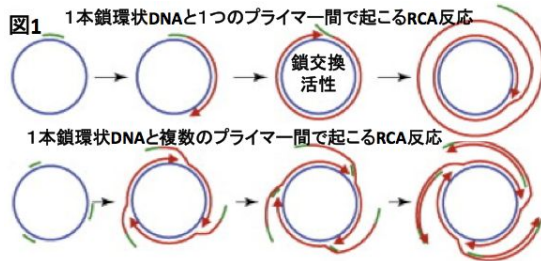
研究成果の概要(英文)：Recently, many novel polyomaviruses have been identified as a candidate pathogenic virus that is responsible for particular diseases in immune compromised patients. This study has tried to isolate novel viruses responsible for a disease by rolling cycle amplification which can strongly amplify viral circular genomic DNA. Using test samples, we set up a condition where we can amplify a very small amount of circular DNA from total DNA sample. Then, we tested series of healthy- and disease- derived samples to amplify circular DNA. Most of amplified DNA are either artifacts or mitochondrial DNA. Skin samples provide amplification of MCV polyomavirus, that is consistent with previous published reports. However, we do not find a novel polyomavirus. Origin unknown circular DNA are also found, which is a clear outcome of this study, in spite of few information of pathogenicity.

研究分野：ウイルス学 免疫学

キーワード：Circular DNA virus Polyomavirus

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 鎖交換活性を合わせもつ DNA polymerase を利用した Rolling Cycle Amplification( RCA )が、ウイルス環状 DNA の増幅や解析に導入されつつある。RCA 反応では、DNA 鎖交換活性がある DNA polymerase を終わりのない鑄型である環状 DNA に 16 時間程度反応させることで、PCR をしのご増幅効率を捻出させる ( 図 1&3、参

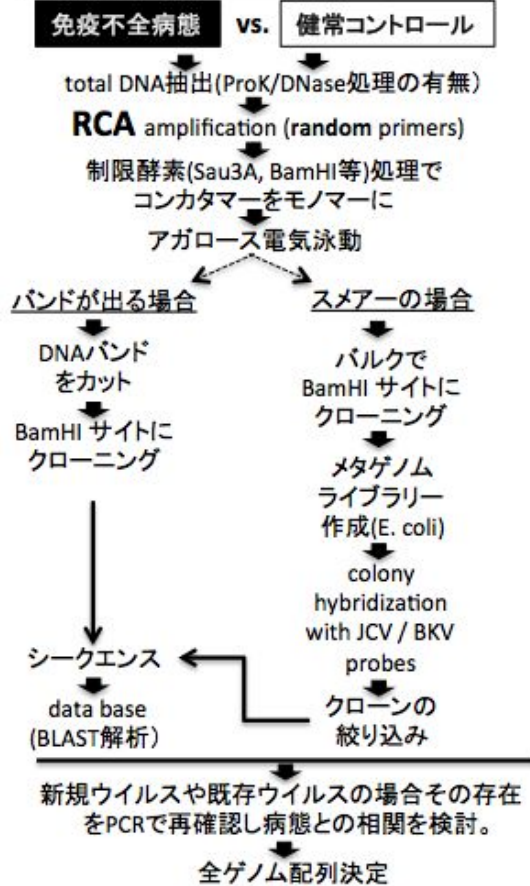


考文献 6 )。

B 型肝炎ウイルス(HBV)やパピローマウイルス (HPV)は、環状 DNA を維持しそこからすべてのウイルス産物を産生するため、ウイルスの遺伝情報を正確に捉えるには環状 DNA の配列情報が欠かせない。しかし実際には、そのコピー数は少なく中間産物が混在するなか環状 DNA 特異的な解析は難しいとされてきた。これまで申請者は、RCA 反応を利用して HBV や HPV 環状 DNA を増幅し配列解析に成功している( 参考文献 1,2 )。一方、申請者は長らく医学部に在籍しこれまで免疫学/分子生物学のエキスパートとして研究してきた。これまで抗体遺伝子座のクラススイッチ組換えを司る AID を単離し(参考文献 3)、次いで AID 欠損症は高 IgM 血症 II 型とよばれる免疫不全症の原因遺伝子座であることを共同研究で明らかにした。

- 1, *Plos Pathogens*,2013;9:e1003361.
- 2, *FEBS letter*,2013 in press.
- 3, *Cell*,2000;102;553.
- 4, *Cell*,2000;102,505.
- 5, *J. Gen. Virol* 2013, 94.482,
- 6, *Trends in Microbio* 2009, 17;205

図2 新規病原ウイルスの発見のための戦略

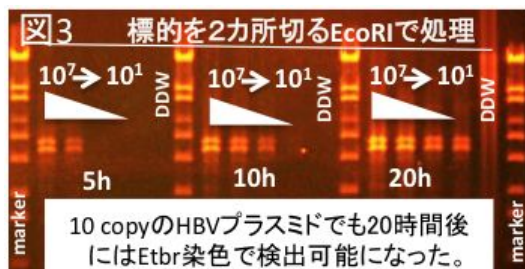


2. 研究の目的

本研究では、未知ウイルスや新たな日和見感染を起こすウイルスの環状ゲノム DNA を見つけたい。未知ウイルスの場合は危険性も考慮し配列決定までとする。

3. 研究の方法

環状 DNA を特異的に強力に増幅する RCA 法により免疫不全検体から環状 DNA ゲノムを増幅する。健常検体の増幅パターンと比較し、差がある場合はそれをクローニングする。増幅産物をプラスミドにクローニングし環状 DNA メタゲノムライブラリーを構築する。ウイルス複製開始起点や T 抗

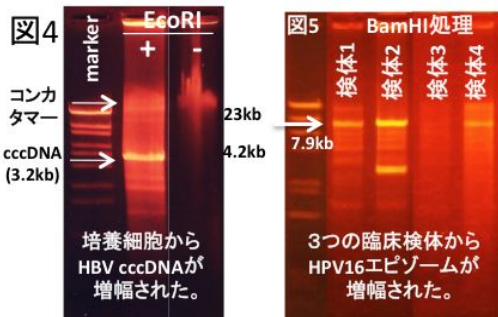


原遺伝子をもつウイルスを狙い、候補の絞り込みを行う。得られた候補ウイルス配列は臨床検体中での存在を再度確認し、また全ゲノムとその構築を決定することを目標にする。(フローチャートを図2に示す)。

#### 4. 研究成果

まずは新規ウイルス環状 DNA が臨床検体に存在する事を模擬的に作ったコントロールサンプル (HBV が培養細胞に一定量存在) を使用して環状 DNA 検出系の実験条件最適化を行った (図3)。

次に環状 DNA ウイルスが感染している検体を用いて実際のサンプルでウイルス DNA (この場合 HBV cccDNA) が、検出されるのか検討を行い検出系の作動状況の確認を行った (図4, 5)。

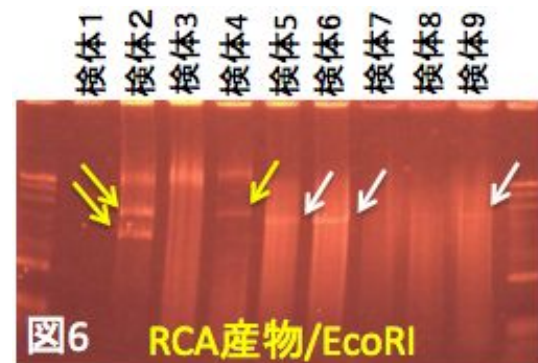


これらの実験より RCA 法が臨床検体中に存在する環状 DNA が検出可能であることを確認した。

次は様々な臨床検体をこの RCA 法にて試した。多くの検体では DNA の増幅が認められたが、多くは artifact がミトコンドリア DNA 由来である事がシーケンスの結果判明した。しかし、ある疾患群の病態サンプルを RCA 法で試験したところ、特異的増幅検出率が非常に高く、また EcoRI 切断で非常に類似したシグナルパターンを検出した。これらの DNA をクローニング後、シーケンスを決定することで DNA の由来を調べたところ、すべてあるポリオーマウイルスである事が判明した (図6の

白矢印)。

これまでこの疾患群ではポリオーマウイルスが効率的に検出される事が既に国外で報告されており、本方法論が環状 DNA が存在しそれが未知の由来であっても、増幅可能であり、この方法論が機能している事を示唆した。残念ながら、検出したポリオーマウイルスは、既に報告されており、そのサンプル群と今回検出したポリオーマウイルスでは、新規性を見いだせず、既報の追認の範囲内であった。



一方、別のサンプル群では、BLAST サーチでほとんど相同性を見いだせなかった環状 DNA が検出された。しかし、現時点では特定の疾患との相関が見いだせておらず、またポリオーマウイルスやパピロウイルスなどの病原性ウイルスに特徴的な T 抗原や replication origin らしき配列も検出されなく特定の日和見感染の原因となりうる新種ウイルスとはいえ、この DNA の由来は、ウイルスかどうか不明で今なお謎である。2年間の本研究プロジェクトは、新規病原ウイルス同定という形で終結はできなかったが、新規環状 DNA の単離という観点からは一定の成果があったと考える。

#### 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2件)

Kukimoto I, Mori S, Aoyama S, Wakae K, Muramatsu M, Kondo K.

Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia.

*J Med Virol.* Oct; 87(10):1754-60. doi: 10.1002/jmv.24215. 査読あり

Wakae K, Aoyama S, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Monjurul AM, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Nishiyama T, Muramatsu M.

Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing.

*Virology.* 2015 Sep 7;485:460-466. doi: 10.1016 査読あり

[学会発表](計2件)

村松正道 APOBEC デアミナーゼの新規抗ウイルス活性 (口頭発表)  
平成26年度 7月19日 北陸腸内細菌研究会 富山市

Kosho Wakae, Mitsuhiro Nakamura, Satoru Kondo, Hiroshi Fujiwara, Tomokazu Yoshizaki, Iwao Kukimoto, Tomoaki Nishiyama, and Masamichi Muramatsu

『Next Generation Sequencing detects APOBEC3 mediated Hypermutation in Human Papillomavirus Type 16 Genome in vivo』口頭発表  
2015 DNA tumor virus Meeting Trieste, Italy 24 July, 2015

[図書](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/wordpress/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村松 正道

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 20359813

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

若江 亨祥 (WAKAE Kosho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 70638303

近藤 悟 (KONDO Satoru)

金沢大学・付属病院・助教

研究者番号: 70436822

藤原 浩 (FUJIWARA Hiroshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 30252456

(3)研究協力者

吉崎 智一 (YOSHIKAZI Tomokazu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 70262582