

令和元年6月4日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14973

研究課題名(和文) 魚類ノダウイルスの増殖に重要なウイルスRNA間の相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the interactions between viral RNA segments that are crucial for betanodavirus multiplication.

研究代表者

冲中 泰 (Okinaka, Yasushi)

広島大学・統合生命科学研究科・准教授

研究者番号：80363034

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)： ウイルスの分節ゲノム間相互作用は植物やほ乳類のウイルスでは徐々に解明されつつあるが、魚類ウイルスでは全く知見が無い。本研究では遺伝的に近縁だが至適増殖温度が異なる2種の魚類ノダウイルス株を用い、両株間でゲノムの一部を交換したキメラウイルスや塩基を置換したウイルスを多数作製し、分節ゲノム間相互作用の役割とそれに関わるゲノム領域を検討した。その結果、RNA1の125番目および160番目の塩基が分節ゲノム間相互作用に重要であることが示唆された。他方、RNA2の重要塩基は特定できなかった。また分節ゲノム間相互作用の低下により、ウイルスRNA複製過程が阻害された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分節ゲノムをもつウイルスは、その増殖過程で各分節ゲノムをほぼ等モル比で無駄なく合成することからも、分節ゲノム間のコミュニケーション(相互作用)が増殖に重要であることが示唆される。分節ゲノム間相互作用は植物やほ乳類のウイルスでは徐々に解明されつつあるが、魚類ウイルスでは全く知見が無い。そこで、本研究では魚類ウイルスのモデルである魚類ノダウイルスを用いて、分節ゲノム間相互作用の詳細な役割とそれに関わるゲノム領域を解明し、さらに分節ゲノム間相互作用を阻害する低分子オリゴ核酸(抗ウイルス剤)の開発へ向けた情報提供を行った。

研究成果の概要(英文)： Although interactions between viral genomic segments are well studied in plant and animal viruses, little is known about those of fish viruses. In this study, to know a role of viral segment interactions as well as the nucleotides involved in segment interactions in fish virus, we constructed many mutated fish nodaviruses, the RNA segments of which were replaced in part between genetically close RGNNV isolates with different temperature sensitivities. The levels of viral growth of these mutants at different temperatures revealed that the 125 th and 160 th nucleotides of RNA1 are involved in viral segment interactions. Furthermore, inhibition of viral segment interactions reduced the levels of viral RNA replication.

研究分野：魚病学

キーワード：ベータノダウイルス 分節ゲノム間相互作用 至適増殖温度 キメラウイルス 塩基置換ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分節ゲノムをもつウイルス(ウイルスの全遺伝情報が複数本の分節ゲノムに分かれてコードされるもの)は、その増殖過程で分節ゲノム間のコミュニケーション(相互作用)を図ることが必要である。例えば、その相互作用を通じて、各分節ゲノムは細胞内でほぼ等モル比で複製され、かつ1分子ずつ正確にウイルス粒子内に収納され、無駄が生じない。分節ゲノム間相互作用は植物やほ乳類のウイルスでは徐々に解明されつつあるが、魚類ウイルスにおいては全く知見が無い。そこで、本研究では魚類ウイルスのモデルである魚類ノダウイルス(図1)を用いて、分節ゲノム間相互作用の詳細な役割およびそれに関わるゲノム領域を解明し、分節ゲノム間相互作用を阻害する低分子オリゴ核酸(抗ウイルス剤)の開発へ向けた情報提供を行った。

魚類ノダウイルスはRNA1およびRNA2という2本の分節ゲノムを粒子内に持つ。本ウイルスは海産魚のウイルス性神経壊死症の原因体であるが、本病の抜本的な防除方法はまだない。

私は本ウイルスの遺伝子組換え系を既に構築し、ウイルス感染メカニズムの解明および新規防除法開発を目標に、長年精力的に研究を行っている。私は最近、至適増殖温度の異なる2種の魚類ノダウイルス株(SGWおよびWSB)を利用し、分節ゲノム間の相互作用がその増殖に必須である証拠を既に把握した。しかし、ウイルスRNA配列のどの部分が相互作用に関わるかは不明である。

2. 研究の目的

まず、高温適応型(SGW)および低温適応型(WSB)の2種の魚類ノダウイルス株間で、互いの分節ゲノムの一部を交換した“キメラウイルス”を作製し(図2、3)、分節ゲノム間相互作用に関わる領域を決定する。次に、判明した相互作用を示すRNA領域内で、どの塩基が相互作用に関わるかを決定する。その際、ウイルスRNAの数塩基を置換した“塩基置換ウイルス”を作製して利用する。最後に、分節ゲノム間の相互作用が、ウイルスRNA複製やウイルス粒子形成など、ウイルス増殖過程のどこに関与するかを検討する。

3. 研究の方法

研究に用いるSGWの至適増殖温度は30前後、WSBの30での増殖レベルは25におけるそれのおよそ1/1000である。また、SGWとWSBの塩基配列の相同性は96%であり、異なる至適増殖温度をコントロールする領域は絞られている。そこで、まずこれらウイルスのRNA配列の一部を互いに交換したキメラウイルスおよび一塩基を交換した塩基置換ウイルスを作製する。次に、これらを魚類培養細胞(E-11)に接種し、各ウイルスの至適増殖温度の違いを基に相互作用部位を割り出す。また、分節ゲノム間相互作用の欠損が、ウイルス増殖過程(ウイルスRNA複製、ウイルスの粒子化、ウイルス粒子の安定性など)のどこに影響を及ぼすかを、様々なウイルス学的手法を用いて解明する。

4. 研究成果

SGWおよびWSB株間でRNA配列の一部を交換したキメラウイルスの至適増殖温度の違いから相互作用部位を絞り込んだ。その結果、RNA1の5'末端から375塩基に至るわずかな領域が分節ゲノム間相互作用に関わる部位であることが判明した(図2)。他方、RNA2では611-1096塩基の領域が分節ゲノム間相互作用に関わる部位であることが判明した(図3)。次に、分節ゲノム間相互作用に実際に関与する塩基を特定するため、これら重要領域内に単一の塩基置換を有するウイルスを複数作製し、それらウイルスの増殖レベルを調べた。導入した塩基置換が致死的に働く場合が多く、本実験にはかなりの時間と労力を要したが、RNA1の5'末端から125番目および160番目の2塩基が重要であることが示唆された(データ記載省略)。しかしながら、この塩基

置換ウイルスは元の WSB に比べれば高温適応となったが SGW と同様のレベルに達しておらず、これら 2 塩基以外にも重要な部位があることが示唆された。RNA2 では、重要な 611-1096 塩基内に SGW および WSB 間で多くの多型が存在し、その多さから塩基置換ウイルスの作製に着手出来なかった。他方、分節ゲノム間相互作用の低下により、ウイルス増殖過程のどこに影響が現れるかを、様々なウイルス学的手法を用いて検討した。その結果、ウイルス RNA 複製の過程が阻害されることが判明した（図 4）。一方、分節ゲノム間相互作用の低下は、ウイルス粒子の魚類細胞への吸着やウイルス粒子の培養液中における安定性、ウイルス粒子の細胞外放出過程には影響しなかった（データ記載省略）。

以上の結果を踏まえ、研究成果の産業面への貢献として、RNA1 の 125 番目および 160 番目の塩基の相互作用をブロックするオリゴヌクレオチドを作製し、それを抗ウイルス剤として利用することができるかもしれない。

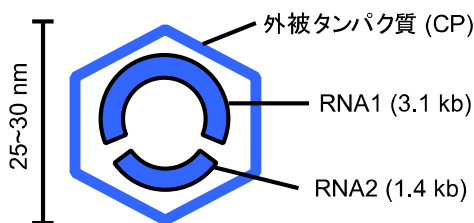


図 1 魚類ノダウイルスの構造

ウイルス名	RNA1 模式図	接種 120 時間後ウイルス量 ($\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)		
		25°C	30°C	TSI
WSB		6.9	5.0	1.9
SG1/WS2		6.6	6.6	0.0
SG1WS1-Nde I /WS2		6.7	6.5	0.2
SG1WS1-Mun I /WS2		6.6	6.6	0.0
SG1WS1-Hpa I /WS2		6.8	6.8	0.0
SG1WS1-Hind III /WS2		7.0	7.0	0.0
WS1SG1-Nde I /WS2		6.7	5.0	1.7
WS1SG1-Hpa I /WS2		6.8	5.2	1.6

図 2 . 作製したキメラ RNA1 ウイルスとその温度感受性

青は WSB RNA1、赤は SGW RNA1 を示す。また、太いバーはコード領域、細いバーは非コード領域を示す。各 RNA1 上の数値は、組換えポイントとなる塩基番号を表す。RNA1 キメラウイルスは、これらキメラ RNA1 と WSB RNA2 を有する組換えウイルスである。TSI は 25 におけるウイルス増殖量（指数）から 30 におけるウイルス増殖量（指数）を引いた値で、これがゼロに近いほど高温適応ウイルスであることを示す。

ウイルス名	RNA2模式図	接種120時間後ウイルス量 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)		
		25°C	30°C	TSI
WSB		6.9	5.0	1.9
WS1/SG2		6.8	6.9	-0.1
WS1/SG2WS2-Hpa I		6.8	4.6	2.2
WS1/SG2WS2-BamH I		6.9	6.6	0.3
WS1/SG2WS2SG2-Pst I		6.9	5.4	1.5
WS1/SG2WS2SG2-3UTR		6.6	4.9	1.7
WS1/WS2SG2-Hpa I		6.9	6.7	0.2
WS1/WS2SG2-BamH I		6.8	5.6	1.2
WS1/WS2SG2WS2-Pst I		5.8	4.8	1.0
WS1/WS2SG2WS2-3UTR		6.7	6.6	0.1

図3. 作製したキメラ RNA2 ウイルスとその温度感受性

青は WSB RNA2、赤は SGW RNA2 を示す。また、太いバーはコード領域、細いバーは非コード領域を示す。各 RNA2 上の数値は、組換えポイントとなる塩基番号を表す。RNA2 キメラウイルスは、これらキメラ RNA2 と WSB RNA1 を有する組換えウイルスである。TSI は 25 におけるウイルス増殖量(指数)から 30 におけるウイルス増殖量(指数)を引いた値で、これがゼロに近いほど高温適応ウイルスであることを示す。

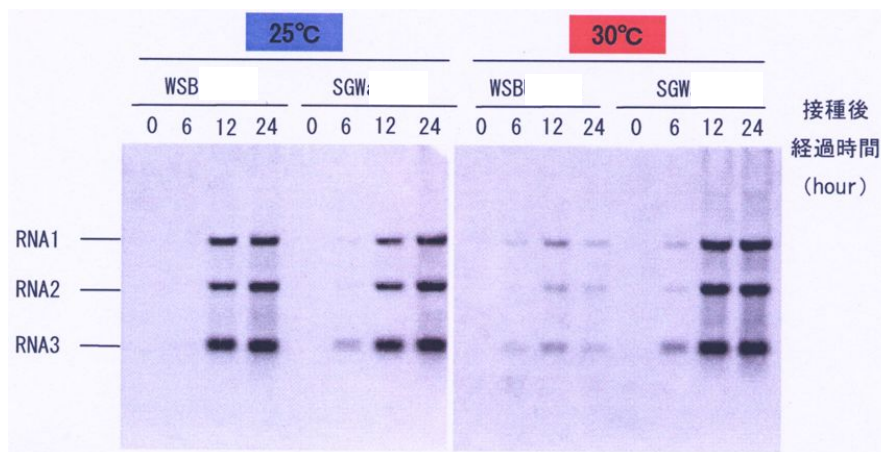


図4. ウイルス RNA 複製に対する温度の影響

WSB および SGW を E-11 細胞に接種し、25 または 30 で 0、6、12 および 24 時間培養後、細胞内のプラス鎖ウイルス RNA をノーザンプロットング法により検出した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権（特許権、実用新案権、意匠権）〕 計0件

〔その他〕 計0件