

令和 7 年 5 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K05819

研究課題名（和文）トラフグ口白症新規遺伝子産物を活用した感染機序の解明とワクチンの開発

研究課題名（英文）Studies on infection mechanism of the kuchijirosho virus and development of a vaccine against kuchijirosho with novel gene products detected in kuchijirosho-affected Fugu Takifugu rubripes

研究代表者

一色 正（ISSHIKI, Tadashi）

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：30378319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：口白症感染魚に特異的に発現する3つのRNA断片(Kuchijirosho-Associated RNAs: KARs)を利用した研究により、以下の成果が得られた。1)口白症原因ウイルスはアーティキュラウイルス目アムヌーンウイルス科に属すると推察された。2)発現プラスミドに導入された各KARに由来するタンパク質(約50 kDa)の大腸菌数株における発現が確認された。3)KARsに対するISHシグナルは本症病魚の脳全体の神経細胞の核を中心に検出され、症状の進行に伴い発現域が脳全体へ拡大する傾向がみられた。4)リコンビナントワクチンおよびDNAワクチンの感染防御効果はほとんど確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口白症に関する研究は原因ウイルス種が不明なまま停滞していた。しかし、本研究により本症原因ウイルスの全ゲノムの解読に成功したことから、その各分節ゲノムの遺伝子産物を解析・応用することで、ウイルス学的に宿主細胞への感染に直接関わるウイルスレセプターや宿主細胞内でのウイルスの複製機構が解明できるとともに、得られた知見により、ワクチン候補や抗ウイルス薬の標的を特定できることから、口白症のワクチンや治療薬の開発へと活用できる。また、ゲノム情報を用いた本ウイルスの検出技術を駆使して、養殖場でキャリアとなっている宿主魚を突き止め、ウイルスの伝播経路を解明することで、感染環の遮断に繋がる知見が得られる。

研究成果の概要（英文）：The following are the main findings of this study with Kuchijirosho-Associated RNAs(KARs):1) Genome sequencing and analysis of the kuchijirosho causative virus identified a novel member of Amnoonviridae. 2) Recombinant KAR proteins (approximately 50 kDa) were expressed in a few strains of Escherichia coli. 3) Intensity and area of ISH signals targeting the KARs were developed mainly in the nuclei at different regions of the brain by the progression of disease in Fugu.4) Little protective efficacy of both a recombinant vaccine and a DNA vaccine against kuchijirosho was observed. These findings will provide an initial step for further understanding the virus infection mechanism and development of a control measure against Kuchijirosho.

研究分野：魚病学

キーワード：口白症 ウイルス トラフグ KAR ワクチン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 口白症は1982年以前からトラフグ養殖場において発生していた、主に脳に障害をもたらすウイルス感染症であり、致死性が強いいため、魚類防疫上重要視されている。しかし、本症の原因ウイルス種は同定されていない。また、ウイルス粒子が感染魚体内に観察できず、*in vitro*培養もできないことから、ワクチンの製造に必要な大量のウイルス粒子を調製できない。このように本症に関する研究は原因ウイルス種が不明なまま停滞しており、防除法は確立されていない。

(2) 我々の研究により、未知ウイルスの核酸をクローニングする方法であるRDV法を応用し、感染脳を材料として口白症特異的に発現する3つのRNA分節(Kuchijirosho-Associated RNA: KAR-A, B, C)が特定された。これらKARsは口白症感染魚の脳内で症状の進行とともに増加することから、口白症に関連するRNAであることが判明し、KARsを標的にした確定診断法の確立にもつながった。しかし、各KARの塩基配列およびアミノ酸配列は、データベース上のどの配列とも相同性を示さなかった。そのため、口白症原因ウイルスは今までに発見されていない新規のウイルス種と推測された(Katou et al., *Fish Pathol.*, 2021)。

2. 研究の目的

(1) 口白症原因ウイルスの全ゲノムの塩基配列を解読することにより、本ウイルスの分類学的位置を確定する。

(2) KAR組換えタンパク質(rKAR)を作製し、KAR遺伝子およびKARタンパク質の発現様式と性状を解析するとともに、それらを指標として本ウイルスの感染機序を解析する。

(3) KAR遺伝子の情報を基に、口白症に対するリコンビナントワクチンやDNAワクチンの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 口白症に実験感染させたトラフグ3尾の脳をプールし、Direct-zol RNA Microprep Kitを用いてRNAを抽出した。DNBSEQ-G400 RSを用いたRNA-seqにより約13Gbのペアエンドリード(150 bp)を取得し、fastp v0.23.2によりアダプタートリミングを行った。Bowtie2 v2.4.5でインデックス化したトラフグのゲノムデータを参照配列とし、hostile v1.1.0により宿主由来のリードを可能な限り除去した。残ったリードをmetaSPAdes (SPAdes genome assembler v.4.0.0)でアセンブルし、コンティグ配列を構築した。カバレッジ情報やBLAST解析の結果を基にウイルスゲノムを推定し、Geneious primeソフトウェアを用いて当該配列の末端領域を補正した。また、RNA合成酵素PB1サブユニットをコードする遺伝子配列を用いて分子系統解析を行った。

(2) ①rKARの作製：pCR4-TOPOあるいはpCRII-TOPOへサブクローニングしたKAR-A, -B, -CをPCRにより増幅し、各KAR cDNA断片を発現ベクターpET-22b(+)へ組み込み、*E. coli* BL21 (DE3)へ導入して形質転換後にインサートが確認されたものを培養し、IPTGによって発現誘導を行った。誘導後の菌液を遠心して集菌し、上清および沈殿物をサンプルとした。*E. coli* BL21 (DE3) pLysS, Rosetta-gami B, Rosetta-gami B (DE3) pLysSにおいても同様にして発現誘導を行い、誘導後の菌液を遠心して集菌した後に沈殿物に対して超音波破碎およびグアニジン塩酸溶液による変性処理を行い、再度遠心して集菌した上清および沈殿物をサンプルとした。得られたサンプルはSDS-PAGEに供し、CBB染色を施した。このとき目的産物と考えられるバンドが検出された場合は、これをウエスタンブロッティング(WB)に供した。また、変性処理によって可溶化が確認されたサンプルは、コバルトレジンを用いたHisタグ精製に供し、目的タンパク質の高純度精製を試み、精製物をWBに供した。さらに、精製rKAR-Bタンパク質に対するマウスポリクローナル抗体を作製した。

②実験感染トラフグの脳におけるKARsの局在解析：口白症原因ウイルスのトラフグに対する実験感染で得られた病態の異なる病魚の脳を用いて組織切片を作製し、免疫組織化学(IHC)および*in situ* hybridization (ISH)に供して、KARタンパク質およびKAR遺伝子の脳における局在を探索した。IHCはrKAR-Bに対するマウスポリクローナル抗体を用いて行った。ISHはDIG標識したKAR特異的cRNAプローブを用いて行い、検出したKARの陽性シグナルを観察して、病態別にシグナル強度の評価を試みた。

(3) リコンビナントワクチンは、rKAR-Bタンパク質の粗精製物をアジュバントと混合して作製した。また、対照の接種原は形質転換以外の処理を同様に行った*E. coli* BL21、およびPBSをそれぞれ同様にアジュバントと混合して作製し、*E. coli* BL21培養菌液、およびアジュバント混合PBSとした。試験区は接種原に基づいてワクチン区、*E. coli* BL21培養菌液区、アジュバント混合PBS区、およびPBS区を設けた。一方、DNAワクチンはKARsを発現ベクターpcDNA3.1に組み

込んだ KAR プラスミド (pcDNA3.1-KAR-A, -B, -C) を作製した。試験区には、各 KAR プラスミドを接種するワクチン区 (KAR-A 区, -B 区, -C 区), ならびに発現ベクターおよび PBS を接種する対照区 (空プラスミド区および PBS 区) を設けた。ワクチン試験では、各接種原溶液を該当する試験区のトラフグに腹腔内接種もしくは筋肉内接種し、21~25 日間飼育して免疫の誘導を行った。その後、口白症魚脳磨砕濾液を筋肉内接種して攻撃し、17~21 日間の累積死亡率に基づく有効性を判定した。

4. 研究成果

(1) メタアセンブルにより構築された 46,758 コンティグのうち 8 コンティグが著しく高いカバレッジを示し、3 本の KAR もここに含まれていた。これらのコンティグの両末端には共通のモチーフ配列が認められ、また一つの配列はエンベロープタンパク質をコードしていた。以上のように、8 コンティグのうち 3 本の KAR を除く 5 コンティグは、口白症ウイルスの新規ゲノム配列である可能性が高く、当該ウイルスは 8 本の分節ゲノムを有すると考えられた。さらに、PB1 遺伝子の分子系統解析により、本ウイルスはアーティキュラウイルス目アムヌーンウイルス科に属すると推察された (図 1)。本研究により、口白症ウイルスの全ゲノムの解読に成功したことから、その各分節ゲノムの遺伝子産物を解析・応用することで、ウイルス学的に宿主細胞への感染に直接関わるウイルスレセプターや宿主細胞内でのウイルスの複製機構が解明できるとともに、得られた知見により、ワクチン候補や抗ウイルス薬の標的を特定できることから、口白症のワクチンや治療薬の開発へと活用できる。また、ゲノム情報を用いた口白症ウイルスの検出技術を駆使して、養殖場でキャリアとなっている宿主魚を突き止め、ウイルスの伝播経路を解明することで、感染環の遮断に繋がる知見が得られる。今後、本症の解明は飛躍的に進むと思われる。

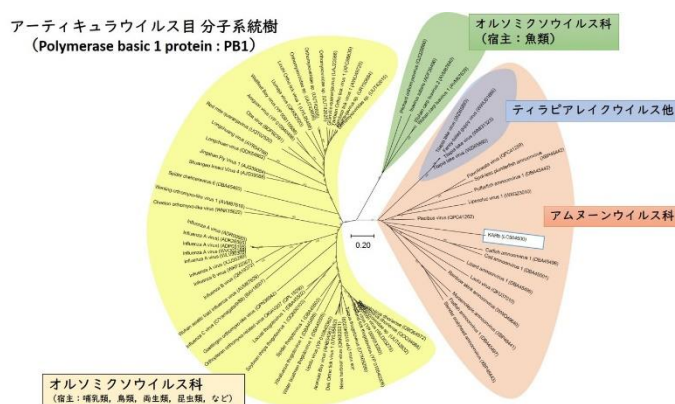


図1 Polymerase basic 1 protein (PB1) 遺伝子の分子系統解析に基づくアーティキュラウイルス目の分子系統樹。口白症原因ウイルスはアムヌーンウイルス科に属するウイルスと近縁であることを示している。

(2) ①SDS-PAGE および CBB 染色の結果、rKAR-B は *E. coli* BL21 (DE3) および Rosetta-gami B (DE3) pLysS において、ならびに rKAR-A および rKAR-C は Rosetta-gami B (DE3) pLysS においてそれぞれタンパク質の発現が確認された。これらに対して WB を行った結果、抗 His タグ抗体との抗原抗体反応が確認され、各タンパク質の分子量はいずれも約 50 kDa であった (図 2-4)。こ

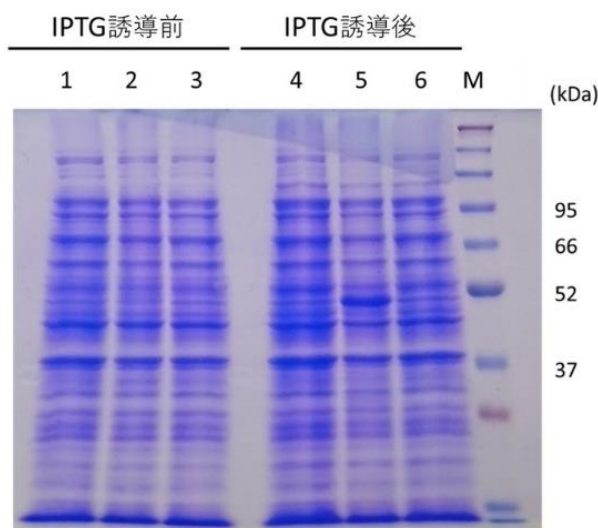


図2 *E. coli* BL21 (DE3) における IPTG による発現誘導の SDS-PAGE の結果。

レーン: 1: rKAR-A (IPTG 誘導前), 2: rKAR-B (IPTG 誘導前), 3: rKAR-C (IPTG 誘導前), 4: rKAR-A (IPTG 誘導後), 5: rKAR-B (IPTG 誘導後), 6: rKAR-C (IPTG 誘導後), M: マーカー。KAR-B を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 培養菌液に対して IPTG 誘導を行い、その後の菌液を泳動すると、約 50 kDa の位置に IPTG 誘導前には見られないバンドが検出された。

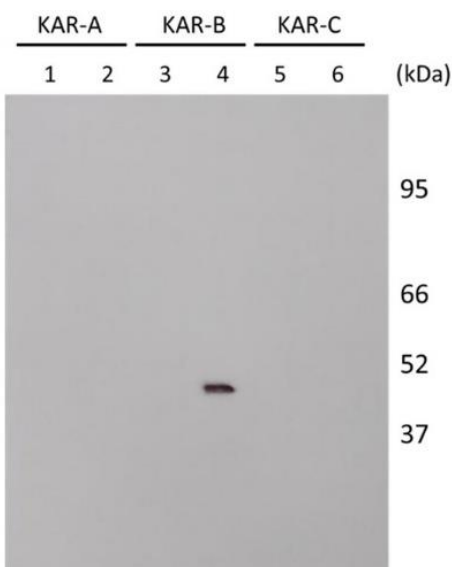


図3 *E. coli* BL21 (DE3) における IPTG による発現誘導の WB 結果。

レーン: 1: rKAR-A (IPTG 誘導前), 2: rKAR-A (IPTG 誘導後), 3: rKAR-B (IPTG 誘導前), 4: rKAR-B (IPTG 誘導後), 5: rKAR-C (IPTG 誘導前), 6: rKAR-C (IPTG 誘導後), M: マーカー。

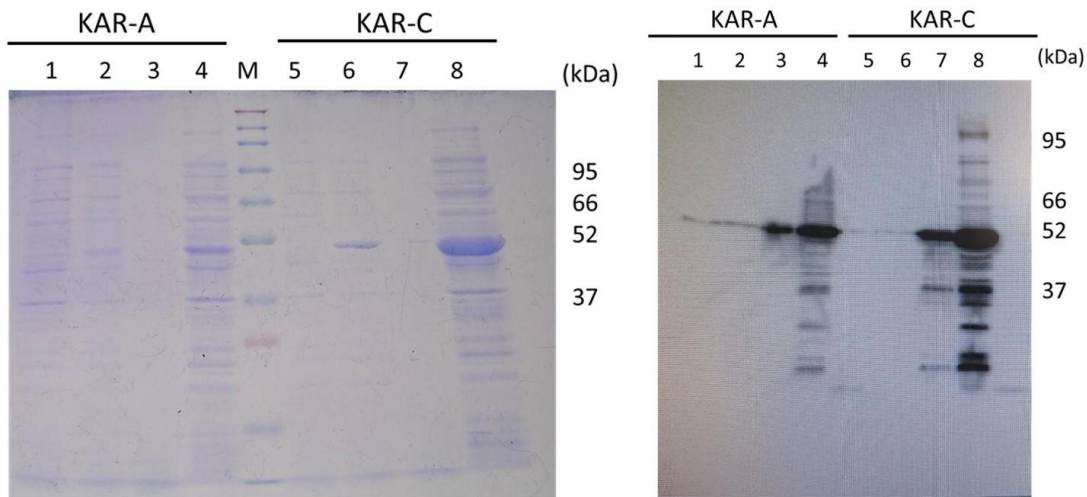


図4 *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)pLysSにおけるIPTGによる発現誘導のSDS-PAGE (左)およびWB(右)の結果。レーン: 1: rKAR-A (IPTG誘導前), 2: rKAR-A (IPTG誘導後), 3: rKAR-A (可溶画分), 4: rKAR-A (不溶画分), M: マーカー, 5: rKAR-C (IPTG誘導前), 6: rKAR-C (IPTG誘導後), 7: rKAR-C (可溶画分), 8: rKAR-C (不溶画分)。

表1 各*E. coli*株におけるKARsの発現レベル

<i>E. coli</i> 株	KAR		
	KAR-A	KAR-B	KAR-C
BL21(DE3)	—	++	—
BL21(DE3)pLysS	—	ND	—
Rosetta-gami B	—	ND	—
Rosetta-gami B(DE3)pLysS	++	++	+++

+++; 強発現, ++; 中発現, +; 弱発現, —; 未発現, ND; データなし。

*: WBによる発現レベルの評価を未実施

の結果は, KAR に由来する産物が得られたことを示している。また, His タグ精製の結果, *E. coli* BL21(DE3)により発現した rKAR-B の変性処理後溶液の精製物において, 約 50 kDa の位置にバンドが認められた。これら rKAR の作製結果の概要を表 1 に

示した。本研究により, KAR 由来組換えタンパク質が獲得された。したがって, KAR は一連の発現領域をコードしており, 口白症関連タンパク質の発現に必要な情報を持ち, かつ口白症の感染機構に関与している可能性が高いと考えられた。

②IHCの結果, KAR タンパク質の陽性反応は確認されなかった。しかし, ISHの結果, KAR-A および KAR-B の遺伝子の陽性シグナルはともに脳全体の神経細胞で検出され, 重篤な個体ほど発現範囲やシグナル強度が増加し, 症状の進行に伴い発現域が脳全体へ拡大する傾向がみられた(表2)。また, 神経細胞における両 KAR の陽性シグナルは細胞質よりも核で強く発現し, 核小体に局在することもあった(図5)。これらのことから, KARs の局在は病魚脳内における本ウイルスの感染動態および伝播経路を示唆しており, 本ウイルスのゲノム RNA は核内で発現・増加しているのではないかと考えられる。したがって, 口白症ウイルスは KARs を分節ゲノムとして有する, アーティキュラウイルス目に分類されるウイルスである可能性が高いと推察される。これは, (1)で得られた結果を支持するものである。今後の課題として, KAR プローブの感度の改善や脳組織以外の組織での ISH 実施, あるいは KAR-C における細胞内局在を調べるなど, ウイルスの詳細な感染動態および増殖機構を明らかにする必要がある。

表2 実験感染魚の脳部位別病態別のISHシグナルの強度評価

標的遺伝子	脳部位	実験感染魚の病態			
		健常	未発症	発症	瀕死
KAR-A	全体	—	++	++	+++
	終脳	—	+	++	+++
	間脳	—	++	++	+++
	中脳	—	++	++	+++
	小脳	—	+	++	++
	延髄	—	++	++	+++
KAR-B	全体	—	++	+++	+++
	終脳	—	++	++	+++
	間脳	—	++	++	+++
	中脳	—	++	+++	+++
	小脳	—	+	++	++
	延髄	—	++	+++	+++

+++; 強発現, ++; 中発現, +; 弱発現, —; 未発現。

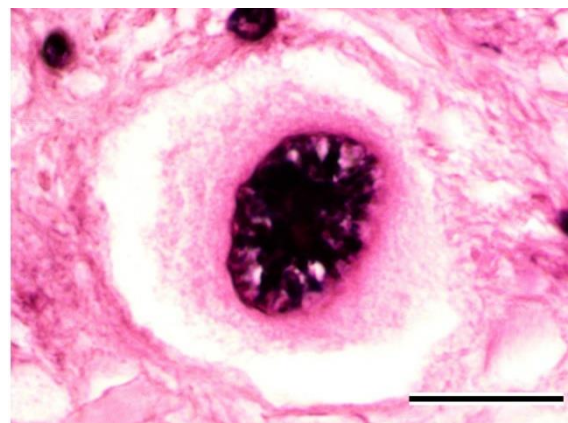


図5 延髄の大型神経細胞におけるISHシグナルの光学顕微鏡写真。重篤な個体では, 細胞質が萎縮し, 核膜および核小体における強度のシグナルが観察される。スケール=20 μm。

(3) リコンビナントワクチンの有効性試験の結果、全ての試験区における累積死亡率が 100%、および有効性を示す RPS が 0%となり、口白症に対する本ワクチンの防御効果は確認されなかった(表 3)。一方、DNA ワクチンの有効性試験の結果、KAR-A 区における累積死亡率は対照区および他のワクチン区のそれらよりも低く、対照区に対する RPS は 60%以上であったこと、および生残魚の症状は他の区のそれらと比べてやや軽微であったことから、KAR-A プラスミドを用いた DNA ワクチンの有効性が期待された。しかし、KAR-A 区の効果を再び検討した結果、有効性試験における KAR-A 区の累積死亡率は対照区のそれとほぼ同様(95~100%)、および RPS は-5.3%あるいは 0.3%であった。これらの結果から、口白症に対するいずれの DNA ワクチンの防御効果も確認されなかったと判断された(表 4)。一方、今回の研究によって、トラフグ組織における目的プラスミド DNA の発現、トラフグに対する当該プラスミドの安全性、およびワクチン効果判定法(攻撃試験)などの口白症に対する DNA ワクチンの開発に必要な基礎的知見を得ることができた。今後、口白症ウイルスのゲノム解読が進められ、感染防御抗原遺伝子が明らかになった際には、本研究で得られた基礎的知見を応用することで、口白症の防除に有効な DNA ワクチンや組換えワクチンを開発する研究を進める必要がある。

表3 口白症に対するリコンビナントワクチンの有効性

試験区	試験群	累積死亡率 ^{*1}		RPS ^{*2} (%)
		群別	平均	
ワクチン区	1	100.0	(7 / 7)	100.0
	2	100.0	(8 / 8)	
E. coli BL21 培養液区	1	100.0	(7 / 7)	100.0
	2	100.0	(7 / 7)	
アジュバント混合PBS区	1	100.0	(6 / 6)	100.0
	2	100.0	(4 / 4)	
PBS区	1	100.0	(5 / 5)	-
	2	100.0	(4 / 4)	

*1: %(死亡尾数/供試尾数).

*2: Relative percentage survival (RPS)_i=(1-各区累積死亡率/PBS区累積死亡率)×100

表4 口白症に対するDNAトワクチンの有効性

試験区	試験群	累積死亡率 ^{*1}		RPS ^{*2} (%)
		群別	平均	
KAR-A区	1	100.0	(10 / 10)	94.7
	2	88.9	(8 / 9)	
空プラスミド区	1	100.0	(1 / 1)	100.0
	2	100.0	(2 / 2)	
PBS区	1	100.0	(10 / 10)	95.0
	2	90.0	(9 / 10)	

*1: %(死亡尾数/供試尾数).

*2: Relative percentage survival (RPS)_i=(1-各区累積死亡率/PBS区累積死亡率)×100

<引用文献>

①Tsuyoshi Katou, Mayuka Kitamura, Tomoki Maeda, Tomoyuki Odaka, Fumio Takizawa, Hiroaki Suetake, Tadashi Isshiki and Toshiaki Miyadai, Exogenous RNA segments detected specifically in the brain of kuchijirosho (snout ulcer disease)-infected fugu *Takifugu rubripes*: Molecular diagnosis tool for kuchijirosho, *Fish Pathology*, 56, 2021, 6-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 一色 正
2. 発表標題 海産魚介類のウイルス病における病原体と病理に関する研究
3. 学会等名 令和6年度日本魚病学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 永田 みのり, 一色 正, 末武 弘章, 瀧澤 文雄, 宮台 俊明
2. 発表標題 口白症関連RNA (KAR) のリコンビナントタンパク質の作製
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米加田 徹, 渡邊 駿太郎, 石橋成豊, 宮台俊明, 末武弘章, 瀧澤文雄, 仲山 慶, 北村真一, 一色 正
2. 発表標題 トラフグ口白症原因ウイルスのゲノム解析
3. 学会等名 令和7年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 棚尾 咲, 永田みのり, 宮台俊明, 末武弘章, 瀧澤文雄, 仲山 慶, 北村真一, 一色 正
2. 発表標題 口白症実験感染トラフグにおける口白症関連RNAの局在
3. 学会等名 令和7年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2025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
研究分担者	末武 弘章 (SUETAKE Hiroaki) (00334326)	福井県立大学・海洋生物資源学部・教授 (23401)	
研究分担者	瀧澤 文雄 (TAKIZAWA Fumio) (60822913)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授 (23401)	
研究分担者	仲山 慶 (NAKAYAMA Kei) (80380286)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師 (16301)	

	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
研究協力者	宮台 俊明 (MIYADAI Toshiaki)		
研究協力者	米加田 徹 (MEKATA Thoru)		

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
---------	---------