

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 27 日現在

機関番号: 16301

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2011~2012

課題番号: 23780195

研究課題名(和文) リンホシスチスウイルス感染による宿主細胞の肥大化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of lymphocystis cell formation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* experimentally infected with lymphocystis disease virus

研究代表者 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: 40448379

研究成果の概要(和文): リンホシスチス病は、ヒラメ養殖に甚大な被害をもたらしている。本病は最も古くから知られている魚類ウイルス病にも関わらず、その発症機構については不明な点が多い。本研究では、ヒラメにリンホシスチスウイルス(LCDV)を実験感染し、宿主魚類の遺伝子発現変化を経時的に調べ本症の発生機構を考察した。ウイルス感染後 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42 および 56 日目 (dpi) にそれぞれの区から 5 個体ずつ実験魚をサンプリングした。ヒラメの遺伝子発現量変化は、マイクロアレイ実験で調べた。その結果、28dpi までは、ほとんどの遺伝子で発現量変化は認められなかった。しかしながら、42dpi では、900 個以上の遺伝子において発現量変化が観察された。これらのほとんどは発現が抑制されており、特にアポトーシス誘導および細胞周期調節に関連する遺伝子群の発現が抑制されていた。本研究で得られた遺伝子発現変化は、DNA 腫瘍ウイルスに感染した宿主のものと酷似していたことから、リンホシスチス細胞の形成は腫瘍形成と類似した機構によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文): Lymphocystis disease virus (LCDV) is the causative agent of lymphocystis disease (LCD). In this study, we investigated the mechanisms of lymphocystis cell (LCC) formation in the fin of the fish infected with LCDV by microarray experiments. LCCs firstly appeared in the fish at 21 days post infection (dpi). The microarray detected a few gene expression changes until 28 dpi. However, the number of expression changed genes dramatically increased between 28 and 42 dpi in which LCCs formation was active. From the microarray data analyses, apoptosis-related genes and cyclin-dependent kinase (CDK) 1 gene were down-regulated, whereas cell fusion and collagen related genes were up-regulated at 42 dpi. Together with the observation of morphological changes of LCCs in previous reports, it is suggested that the following steps are involved in LCC formation: the virus infected cells (1) experienced inhibited apoptotic death before enlargement, (2) experienced inhibited cell division by G2/M cell cycle arrest, (3) were hypertrophied by cell fusion, and (4) were surrounded by a hyaline capsule associated with the alteration of collagen fibers.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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:リンホシスチス病,リンホシスチスウイルス

1. 研究開始当初の背景

リンホシスチス病に罹患した魚類の口唇部・鱗・体表などには、直径が 1mm 以上にもなるリンホシスチス細胞(lymphocystis cell; LCC)と呼ばれる巨大な細胞塊が形成される(図 1)。このように、本病は視覚的に診断できることから、古文書にも記載されており、最も古くから知られている魚類ウイルス病である。本病は、これまでに世界の 100 種類以上の淡水魚および海水魚で発症が報告されており、日本を含む極東アジア諸国では、養殖ヒラメで多発することが知られている。

原因ウイルスのウイルス学的な研究については、LCDV を増殖するための魚類株化細胞がほとんど存在しないことから、遅々として進んでこなかった。しかしながら、1980 年代からドイツの研究チームが LCC から精製したウイルス粒子を用いて、本ウイルスは 2 本鎖 DNA をゲノムに持つウイルスであることを明らかにした。また、1997 年および 2004 年にドイツと中国の研究グループによって、ヨーロッパヒラメとヒラメに感染する LCDV の全ゲノム配列が解読された。これらのゲノムサイズは、それぞれ約 100 kbp と 200 kbp であることが明らかにされ、同種のウイルスにも関わらず、ゲノム構成は大きく異なることが報告された。また、推定される open reading frame (ORF) はそれぞれ約 100 個と 240 個とされているが、現在までに LCDV の遺伝子の中で機能が明らかになっているものは、MCP, ATPase などを含む 10 個程度に過ぎない。上記のように、本病に関する研究は古くから行われてきているものの、本病の最大の特徴である LCC の形成メカニズムに関する研究は全く進んでいない。

2. 研究の目的

本課題では、リンホシスチス病の最大の特徴である“細胞の肥大化メカニズム”を解明するために、LCDV 感染時の宿主魚類およびウイルスの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ実験で明らかにする。次に、上記の実験結果に基づき、いくつかの機能未知のウイルス遺伝子を魚類株化細胞に導入し、細胞の肥大化に関与している遺伝子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リンホシスチスウイルス感染魚の網羅的遺伝子発現解析

実験的にヒラメにリンホシスチスウイルスを感染し、鱗における遺伝子発現変化をマイクロアレイ実験で網羅的に解析した。

ヒラメ(体重約 1.0g)を 60 尾ずつ 2 区準備し、実験区には LCC 磨砕液、対照区には磨砕に用いた培地を暴露した。実験期間中、水温は 20

度に保ち、給餌は一日一回魚体重に対して 1% とした。

感染 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42 および 56 日目(dpi)にそれぞれの区から 5 個体ずつ実験魚をサンプリングした。サンプリングした実験魚の腹鰭から DNA を抽出し、リアルタイム PCR でウイルス量を相対定量した。一方、背鰭からは mRNA を抽出し、宿主およびウイルスの遺伝子発現量変化をマイクロアレイ実験で調べた。マイクロアレイ実験には、ヒラメの脾臓・腎臓・肝臓・脳・胚(3 つの異なるステージ)・魚体全体の EST 解析に基づく 13,240 プローブが搭載されたプラットフォームを用いた。また、ヒラメから分離された LCDV は既にゲノム解析が行われていることから、データベース上の推定される ORF に対してプローブを作製し、マイクロアレイのプラットフォームに搭載した。

(2) LCDV 遺伝子の機能解析

実験(1)の結果に基づき、培養細胞を用いたトランスフェクション法で、肥大化に関わるウイルス遺伝子を特定することを目的として実験を行った。

トランスフェクションを成功させるためには、DNA の導入効率を高めることが鍵となる。そこで本研究では、DNA の導入効率が最大となる最適条件を明らかにするため、株化細胞の種類、トランスフェクション試薬の種類、試薬と DNA の電荷比、さらに DNA 濃度を検討した。株化細胞はマスノスケ胚由来株化細胞(CHSE-214 細胞)またはヒラメ鱗由来株化細胞(FFN 細胞)を用い、トランスフェクション試薬は FuGENE6 Transfection Reagent (FuGENE6)または Transfast Transfection Reagent (Transfast)を用いた。DNA の導入効率は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するベクターを細胞へ導入し、GFP を発現している細胞の割合を算出することで求めた。

次に、LCC 形成時期に発現量が高かった 5 つ(053L, 007L, 019R, 081R, および 163L)の ORF 領域をクローニングし、同細胞に導入し、形態学的変化を調べた。

4. 研究成果

(1) リンホシスチスウイルス感染魚の網羅的遺伝子発現解析

21dpi から発症個体が観察され、発症率は経時的に増加し、60dpi には 92.9% に増加した。ウイルスは 14dpi に初めて検出され、28dpi から 42dpi の間に 260 倍に急増した。このことから、LCDV は感染後、約 2 週間の潜伏期を有する遅

発性ウイルスであり、ウイルス量が十分なものとなった後に LCC 形成を誘発することが明らかとなった。

マイクロアレイ実験の結果から、28dpi までは、ほとんどの遺伝子で発現量変化は認められなかった。しかしながら、ウイルスが盛んに複製していた 42dpi では、913 の遺伝子において発現量変化が観察された。これらのほとんどは発現が抑制されており (Table 1), 特にアポトーシス誘導に関連する遺伝子群の発現が抑制されていた (Fig. 1)。

Cluster A: Apoptosis related genes	Number of genes		P value
	≤ 1.5-fold down (total)	≥ 1.5-fold up (total)	
Apoptosis (0006915)	13 (68)	-0.001	
Anti-apoptosis (0006916)	10 (66)	0.002	
Activation of caspase activity (0006919)	4 (10)	0.003	
Regulation of apoptosis (0043066)	3 (12)	0.029	
Induction of apoptosis (0006917)	6 (46)	0.032	
Cluster B: Cell cycle related genes			
Cell cycle (0007049)	11 (60)	-0.001	8 (60) 0.013
Cell division (0051301)	9 (53)	0.002	7 (53) 0.020
Regulation of cell cycle (0051726)	3 (15)	0.048	
Cluster C: Cell morphology related genes			
Actin cytoskeleton organization (0030036)	14 (44)	-0.001	
Actin cytoskeleton organization (0030036)	7 (36)	0.003	5 (36) 0.039
Actin filament polymerization (0030041)	3 (4)	0.003	
Actin binding (0005584)	3 (13)	0.035	
Actin binding (0005779)			10 (101) 0.037
Cell adhesion (0007155)	10 (69)	0.003	9 (64) 0.010
Cell junction (0030054)			6 (22) 0.001
Cell-cell junction (0005911)			4 (16) 0.012
Cell-matrix adhesion (0007160)	5 (17)	0.003	
Extracellular matrix organization (0030198)	5 (17)	0.003	
Body morphogenesis (0010171)	3 (4)	0.003	
Organ morphogenesis (0009887)	6 (26)	0.003	
Epidemius development (0008544)	4 (12)	0.005	
Regulation of cell shape (0008360)	5 (24)	0.010	4 (24) 0.038
Extracellular space (0005615)	11 (99)	0.018	4 (21) 0.026
Muscle organ development (0007517)	4 (21)	0.026	4 (22) 0.030
Structural constituent of cytoskeleton (0005200)			
Keratinocyte differentiation (0030216)	5 (14)	0.001	2 (6) 0.050
Collagen binding (0005518)			

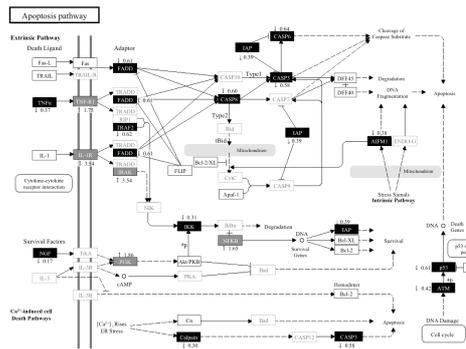


Fig. 1 Up-regulated and down-regulated genes in the virus infected cells in apoptosis pathways analyzed by the KEGG PATHWAY Database (Filters: p < 0.05, fold change > 1.5). Gray cell; up-regulated gene, black cell; down-regulated gene, white cell; not-changed gene, blank cell; no homologous gene in the microarray platform used in this study.

一般的にウイルス感染細胞はアポトーシスによる細胞死が誘導されるのに対して、LCC はアポトーシスが阻害されることが示唆された。

また、細胞周期関連の遺伝子発現にも変化が認められた。特に、G2 期から M 期の移行に関与する CDK1 遺伝子の発現が 3.9 倍減少していた (Fig. 2)。このことから、ウイルス感染細胞は細胞分裂が阻害されていたと考えられる。さらに、大部分の遺伝子発現が抑制されていたにもかかわらず、細胞融合関連遺伝子およびコラーゲン関連遺伝子の発現量は増加していた。

以上の結果から LCC 形成メカニズムを推測すると、ウイルス感染細胞はアポトーシスの誘導および細胞分裂が抑制される。その後、細胞融合が起こり、LCC の成熟期には、これまでに組織学的研究で観察されているコラーゲン繊維によって細胞の周囲が覆われることが示唆された (Fig. 3)。

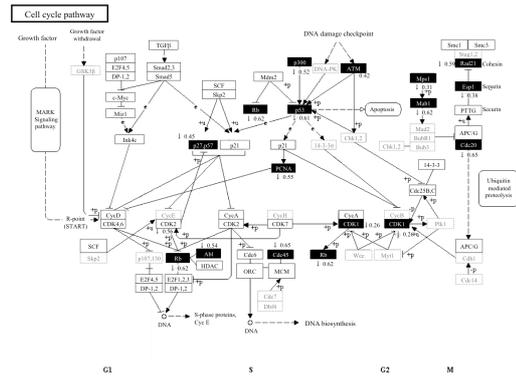


Fig. 2 Up-regulated and down-regulated genes in cell cycle pathways by the KEGG PATHWAY Database (Filters: p < 0.05, fold change > 1.5). Gray cell; up-regulated gene, black cell; down-regulated gene, white cell; not-changed gene, blank cell; no homologous gene in the microarray platform used in this study.

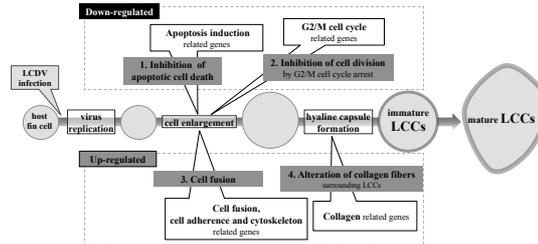


Fig. 3 The hypothesis of LCC formation process based on the results of microarray experiments.

また、ウイルス遺伝子の発現変化を調べたところ、LCC 形成時に 5 つ (053L, 007L, 019R, 081R および 163L) の遺伝子の発現が増加していることが明らかにされた。

(2) 両株化細胞において高い DNA の導入効率が得られたのは、FuGENE6 を用いた場合であった。CHSE-214 細胞において、最大の DNA の導入効率 (31.5%) が得られたのは、試薬と DNA の電荷比が 6:1 の条件下で、DNA 濃度を 0.3 μg/mL とした場合であった。一方、FFN 細胞においては、試薬と DNA の電荷比が 3:1 の条件下で、DNA 濃度を 0.5 μg/mL とした場合に、最大の DNA の導入効率 (18.3%) が得られた。これらの結果から、少なくとも、本研究で用いた魚類株化細胞におけるトランスフェクションでは FuGENE6 の使用が効果的であり、本試薬と相性が良いのは CHSE-214 細胞であることが明らかとなった (Fig. 4)。

次に、LCDV 遺伝子の機能解析のため、本研究で確立した条件でトランスフェクションを行った。LCDV 遺伝子のうち 5 つ (053L, 007L, 019R, 081R, および 163L) を、それぞれ CHSE-214 細胞に導入し、形態学的変化を調べた。本研究で解析した LCDV 遺伝子は、機能未知遺伝子のうち、全塩基配列が解明されている LCDV-1 および LCDV-C 間で相同であり、LCC の形成時期に宿主体内で発現していた遺伝子である。光学顕微鏡で供試細胞を観察したところ、各区間で明らかな形態学的変化は確認されなかった。次に、透過型電子顕微鏡で供試細胞を観察したところ、007L 以外の 4 つの LCDV 遺伝子を導入した細胞では、遺伝子の

発現に伴う細胞の形態学的変化は認められなかった。一方、007L 遺伝子を発現させた細胞では発達したゴルジ体が観察された(Fig. 5)。

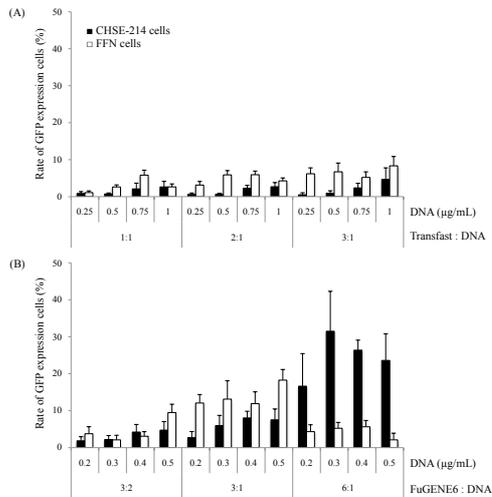


Fig. 4 Ratio of GFP expression in the two cell lines. Transfection was conducted (A) FuGENE6 and (B) Transfast. The combination between charge ratio and DNA amount was investigated in each cell line.

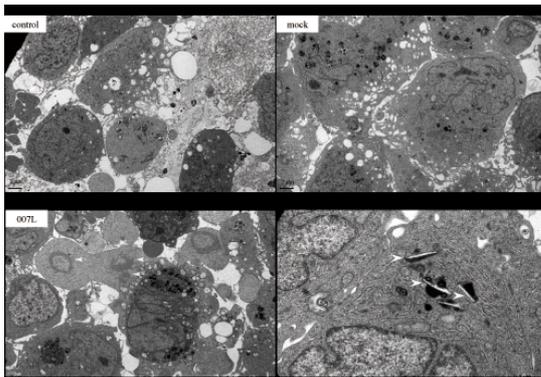


Fig. 5 CHSE-214 cells transfected with LCDV genes. (→) Golgi body, (*) rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER)

ゴルジ体はタンパク質への糖鎖付加, 脂質や多糖類の合成を行う細胞内小器官である。細胞内でのゴルジ体の存在量は細胞の需要に応じて厳密に調節されており, 細胞内で糖タンパク質, 脂質および多糖類の合成が活発に行われるとゴルジ体が発達する。本研究で着目した LCC はヒアリンキャプセルという分厚い膜で覆われており, 本膜の主成分は糖タンパク質, 脂質および多糖類であると報告されている。したがって, ヒアリンキャプセルの形成にゴルジ体の発達が重要であると考えられる。これまでに, LCC の組織学的研究により, ヒアリンキャプセルが形成される時期に細胞内小器官が発達することが報告されていることから, 本遺伝子がヒアリンキャプセルの形成に関与している可能性がある。しかしながら, 007L 遺伝子を導入した場合でも, LCC の形成を再現するには至らなかった。今後は, 他の LCDV 遺伝子について機能解析を進めるとともに, 複数の LCDV 遺伝子が LCC の形成に関与している可能性があることから, コトランスフェクションにより複数の遺伝子を細胞へ導入

し, その細胞における形態学的変化を観察する必要がある。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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:40448379

(2)連携研究者

仲山 慶(NAKAYAMA KEI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教

研究者番号:80380286