

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790134

研究課題名(和文)蚊を標的とする siRNA を利用した抗ニドウイルス薬の創製

研究課題名(英文)Development of siRNA based anti Nidovirus drug against mosquito

研究代表者

佐藤 朝光 (SATHO, Tomomitsu)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90369025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：Dak Nong Virus (DKNV) は、ベトナムにて採集されたコガタアカイエカより単離された。このDKNVは、直径が80nmのエンベロープを有する球形のウイルスであった。そして、DKNVのゲノムの長さは20256bpであり、少なくとも7個のORFを持つことが示された。DKNVは、Cavally virus and Nam Dinh virusと同じ、メソニウイルス科のアルファメソニウイルス属のアルファメソニウイルス 1に分類された。

研究成果の概要(英文)：Dak Nong Virus (DKNV) was isolated from *Culex tritaeniorhynchus* collected in Vietnam. Electron microscopic analysis showed that DKNV is enveloped, spherical virus with a diameter of 80nm. The complete genome sequence of DKNV was 20256bp and its genome appeared to contain at least seven ORFs. DKNV RdRp sequence was most similar to that of the members of the species *Alphamesonivirus*1 (Cavally virus and Nam Dinh virus) in the genus *Alphamesonivirus* of the family *Mesoniviridae*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学・微生物・感染症学

キーワード：コガタアカイエカ ニドウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

蚊は、ヒトの健康や社会に重篤な被害を与える病原性 RNA ウイルスを媒介する。例えば、4 類感染症に分類されるフラビウイルス科のデングウイルス (DENV) や日本脳炎ウイルス、トガウイルス科のチクングニアウイルスは、代表的な蚊媒介性 RNA ウイルスである。一方、近年の地球温暖化による環境変化は、蚊の生態を大きく変化させている。また、技術の進歩に伴う自然破壊は、ヒトが新しいウイルスに接する機会を増やし、突如として全く新しいウイルス感染症が新興する機会を作り出している。このような背景は、新しい蚊媒介性 RNA ウイルスによる危機が非常に高まっていることを示している。そして、我が国の公衆衛生上、蚊媒介性 RNA ウイルスに対する対策は非常に重要な課題の一つとなっている。

近年、多種類の RNA ウイルスを同時に同定することができるウイルス検出法として、Rapid determination of RNA viral Sequence (RDV) 法が開発された (Mizutani et al., *Emerg. Infect. Dis.* 2007)。私達は、この RDV 法を蚊媒介性 RNA ウイルスの同定に適用するために、蚊の一種であるヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞を用いた RDV 法 ver1.0 を構築した (Kihara et al., *J. Virol Methods*, 2007)。そして、RDV 法 ver1.0 により、タイのバンコク郊外にて野外採取されたネッタシマカの成虫から、DENV type 4 および Cell fusing agent virus を同時に検出することに成功し、その有用性を実証した。次いで、ウイルスを同定する時間を短くするために、RDV 法 ver4.0 を開発した。そして、タイのバンコク郊外にて野外採取されたネッタシマカの幼虫から、Rice stripe virus 由来の RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の配列に高い相同性を持つ塩基配列を検出した。この塩基配列の解析により、ブニヤウイルス科に属する新しい RNA ウイルスを発見し、Phasi Charoen virus (PhaV) と名付けた (Yamao et al., *Arch. Virol.* 2009)。PhaV のタイで採取されたネッタシマカの成虫雌における感染率は、20%以上であった (Sayama et al., *J Parasitol. Vector boil.* 2011)。また、国内においても、東京港野鳥公園で採取されたイナトミシオカよりトティウイルス科に属する新しいウイルスを発見し、Omono River virus と名付けた (Isawa et al., *Virus Res.* 2011)。さらに、私達は、2007 年 7 月に、ベトナムの Dak Nong にて採取されたコガタアカイエカより、RNA ウイルス由来のゲノム断片をいくつか単離することに成功した。このウイルスは、ニドウイルス目に属する新しいウイルスであることが推定され、Dak Nong Virus (DKNV) と名付けた。

### 2. 研究の目的

ニドウイルス目には、コロナウイルスなどが分類される。ヒトコロナウイルスである

229E や OC43 は、冬場のカゼの原因ウイルスとして、ほとんどのヒトが重篤になることなく感染する。しかし、2003 年から 2004 年に猛威をふるった重症急性呼吸器症候群の原因ウイルスである SARS-CoV の突然の大流行は衝撃的であった。そして、この大流行は、ニドウイルス目に属するウイルスに対する予防の重要性を暗示した。今回、ニドウイルス目に属するウイルスの予防の重要性から、新たに発見された DKNV を抗ニドウイルス薬の標的モデルとして利用するため、その特性の決定を行う。詳細には、現在単離されている DKNV 由来のゲノム断片を利用して、完全長のゲノム配列の決定を行う。また、DKNV の転写メカニズムの解明として、転写制御配列 (transcription-regulation sequence; TRS) などの決定を行う。さらに、RdRp の配列を用いて系統発生解析を行う。

### 3. 研究の方法

<ウイルスの単離>コガタアカイエカのホモジネイトを、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターに通したのち、C6/36 細胞に接種した。7 日間の培養後、上清を回収し、ウイルスストックを作製した。

<電子顕微鏡によるウイルスの観察>CPE を示した C6/36 細胞由来の培養上清を 1,600  $\times g$ 、15 分間遠心した。さらに、細胞残屑を取り除くために、12,000  $\times g$ 、30 分間遠心した。上清は、2%グルタルアルデヒドにより固定した。そして、2%リンタングステン酸を用いたネガティブ染色法により観察した。

<ウイルスゲノムの配列決定>RDV 法により単離された DKNV 由来のいくつかのゲノム断片間の配列を埋めることにより、ゲノム配列を決定した。5' -および 3' -末端配列は、Gene Racer kit を使用した RACE 法により決定した。<サブゲノム mRNA のための TRSs の同定>C6/36 細胞より、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。そして、total RNA より、Poly(A) Isolation kit を用いて Poly(A)+RNA を分離した。この RNA を用いて、DKNV のサブゲノム mRNA の 5' -末端配列を RACE 法により決定し、TRSs を同定した。

<ウイルスの転写産物の解析>ウイルスの転写産物の解析は、ノ - ザンハイブリダイゼーションにより解析した。まず、ウイルスゲノム上の 481 bp の領域を含む PCR 産物に対し、DIG RNA Labeling Kit を用いて DIG をラベルし、RNA プローブを作製した。また、感染した C6/36 細胞から抽出された total RNA を、0.8% アガロースゲルにより電気泳動した。そして、ナイロン膜へ転写した。プレハイブリダイゼーションしたのち、プローブを DIG Easy Hyb を用いてハイブリした。そして、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を用いて検出した。

<系統発生解析> DKNV およびニドウイルス目に属する 19 のウイルス由来の RdRp 上の F3、A、B、C ドメインのアミノ酸配列を用いて、系統発生解析が行われた。

#### 4. 研究成果

DKNV の電子顕微鏡による観察は、培養細胞上清中に、直径が 80nm のエンベロープを有する球形のウイルスとして存在することを明らかにした(図 1)。また、ウイルス粒子のエンベロープに突起物が存在することが確認された。

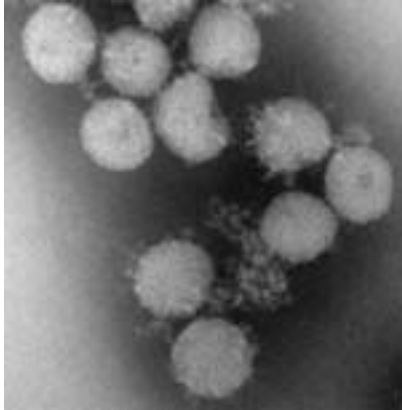


図 1 ネガティブ染色法による DKNV の観察

DKNV の 3' poly (A) tail を除いたゲノムの長さは 20256bp であった。そして、そのゲノム構成は、ニドウイルス目に属するウイルスと類似していた。特に、アルファメソニウイルス 1 に類似していた。詳細には、DKNV は、ORF1a ( bp 371-7984 )、ORF1b ( bp 8245-15744 )、ORF2a ( bp 15768-18494 )、ORF2b ( bp 15782-16450 )、ORF3a ( bp 18538-19011 )、ORF3b ( bp 18887-19237 )、ORF4 ( bp 19547-19684 ) からなる少なくとも 7 個の ORF を持っていた ( 図 2 )。

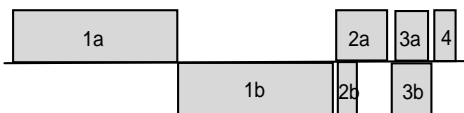


図 2 DKNV のゲノム構成の概略図

DKNV の 2 つの大きな ORF には、ニドウイルス目に属するウイルスに共通するいくつかの保存領域が存在していた。例えば、2 つの transmembrane ドメインによって挟まれた 3C-like プロテアーゼが ORF1a にコードされていた。また、RdRp ドメインおよび superfamily 1 helicase ドメインは、ORF1b にコードされていた。3' -to-5' exoribonuclease ( EXON ) および ribose-2' -O-methyltransferase ( O-MT ) は、ORF1b の C 末端領域にコードされていた。N7-methyltransferase は、EXON と O-MT の両ドメイン間に同定された。しかし、uridylylate-specific endoribonuclease は確認できなかった。

ORF2a は、908 アミノ酸からなり、スパイク糖タンパク質をコードしていることが予

想された( 図 3 )。また、推定分子量は 103.8kDa であった。ORF2b は、222 アミノ酸 ( 24.7kDa ) からなり、ヌクレオカプシドタンパク質をコードしていることが予想された。ORF3a と ORF3b は、それぞれ 157 と 116 アミノ酸からなり、分子量は、17.4kDa と 13.9kDa であることが予想された。

ORF	Predicted protein	Amino acid number (frame)		
		DKNV	CavV	NDiV
1a	Polyprotein 1a	2537 (0)	2493 (0)	2503 (0)
1b	Polyprotein 1b	2587 (-1)	2583 (-1)	2589 (-1)
2a	Spike protein	908 (+1)	900 (-1)	899 (-1)
2b	Nucleocapsid protein	212 (0)	214 (+1)	212 (+1)
3a	Glycoprotein	157 (-1)	158 (+1)	158 (-1)
3b	Matrix protein	116 (0)	116 (-1)	116 (0)

図 3 DKNV、CavV、NDiV の主要な ORF の類似性

ORF2a と 2b の発現のためのサブゲノミック mRNA2 および ORF3a と 3b の発現のためのサブゲノミック mRNA3 を生成するための TRS がウイルスゲノムの 124-144 および 26-40 の配列領域に同定された。これは、少なくとも 2 つの TRS がサブゲノミック mRNA を生成する過程に利用されることを示している。一方、サブゲノミック mRNA4 の TRS は確認されていない。

実際に、DKNV のサブゲノミック mRNA の存在を確認するために、DKNV の 3' 末端領域を用いた RNA プローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。そして、約 4.5kbp および 1.8kbp の 2 つのバンドが観察された( 図 4 )。この 2 つのバンドは、mRNA2 と mRNA3 の推定されたサイズと一致した。

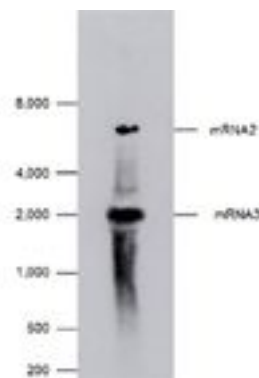


図 4 サブゲノミック mRNA のノーザンハイブリダイゼーションによる分析

DKNV の SDS-PAGE による分析は、DKNV が少なくとも 4 つの主要なタンパク質からなることを示した。これらタンパク質の分子量は、80、55、30、20kDa であった。また 29、28、16kDa からなるタンパク質も観察された。こ

れらタンパク質は、暫定的に p80、p55、p30、p20、p29、p28、p16 と名付けた。一般的に、ニドウイルス目に属するウイルスのスパイクタンパク質は粒子形成時に翻訳後修飾を受ける。DKNV においても、2 つの異なるタンパク質が ORF2a の分解によって作製されるようであった。したがって、これら二つのタンパク質を同定するために、p80、p55、p30 に対する N 末端アミノ酸解析を行った。そして、p80 と p55 のタンパク質が ORF2a の配列内にコードされていたことから、ORF2a 由来であることが示された。

ニドウイルス目に属するウイルス間における DKNV の分類上の評価を行うために、RdRp の配列を用いた系統発生解析を行った。ニドウイルス目に属するウイルスの RdRp の保存モチーフのアライメントは、DKNV の RdRp の配列がメソニウイルス科のアルファメソニウイルス属のアルファメソニウイルス 1 の種 (Cavally virus や Nam Dinh virus) に最も類似していることを示した。DKNV とアルファメソニウイルス 1 の種間において保存領域 A と C のいくつかのアミノ酸は異なっていた。しかし、系統樹解析は、DKNV が、アルファメソニウイルス 1 のクラスターに分類されること示した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Ryusei Kuwata, Tomomitsu Satho, Haruhiko Isawa, Nguyen Thi Yen, Tran Vu Phong, Phan Thi Nga, Tomokazu Kurashige, Yukihiro Hiramatsu, Yuki Fukumitsu, Keita Hoshino, Toshinori Sasaki, Mutsuo Kobayashi, Tetsuya Mizutani, and Kyoko Sawabe  
Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from Culex mosquitoes in Vietnam.  
Arch Virol. 2013 Nov;158(11):2273-84.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. ベトナム捕集蚊より分離された新規ニドウイルスの性状解析  
鎌田 龍星 佐藤朝光 伊澤晴彦 Yen, Nguyen Thi Phong, Tran Vu Nga, Phan Thi 星野啓太 佐々木年則 水谷哲也 前田健 小林睦生 沢辺京子, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10 日

〔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

佐藤 朝光 (SATHO, Tomomitsu)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号 : 90369025

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :