

平成25年度県立大学地域貢献研究の研究成果について（~~完子報告~~・中間報告）

研究テーマ	網羅的遺伝子解析技術を用いた魚類ウイルス感染防御機構の解析
研究期間	平成25～26年度
主たる研究者	【学部・学科】海洋生物資源学部・海洋生物資源学科 【職・氏名】教授・宮台俊明

○研究目的

本研究では、ウイルス感染を防御するシステムが魚の体内でどのように働いているのかを明らかにする。

養殖魚に致死的な症状を起こすウイルスを実験対象とする。このウイルスに感染しても、飼育条件によっては症状を示さない場合（不顕性感染）がある。この条件では免疫が効率的に機能し、ウイルス増殖を抑制すると考えられる。そこで、その免疫機能を探り出し、ウイルス感染防御法の開発に役立てるのが本研究の目的である。

今までは個々の遺伝子の一つひとつ解析し、いくつかの成果を上げてきた。しかし、この方法では成果を出すまでに数年を要することもあった。また、機能不明な遺伝子の解析には踏み切れないことも多かった。そこで、次世代シーケンサーという最新手法を用いて、機能不明な遺伝子も含めて一気に数万にも上る遺伝子を数時間で解析すれば、実験手法上の障害を取り除くことができると考えた。

本研究ではこの手法を用いて、ウイルス感染免疫の実態を明らかにする。

○研究成果

トラフグの口白症（くちじろしょう）ウイルスゲノムの解読作業

かねてから行っていた、ウイルスゲノム断片の遺伝子クローニング法によって、約1,000塩基のウイルスゲノムと考えられるRNA断片（口白症関連RNA：Kuchijirosho Associated RNA, KAR-A, B, C）を3種類クローニングすることに成功した。そこで、このRNA断片の塩基配列情報をもとにして、全塩基配列を読み取ることが可能であると考え、次世代シーケンサーを用いる当初計画を変更し、解読作業に取りかかった。しかし、膨大な量の実験を行ったにもかかわらず、確証となる実験データを得るには至らなかった。

そこで、来年度は、当初の予定どおり次世代シーケンサーを採用して、全ゲノム解読を目指すことにした。

発症経過に伴う口白症ウイルスゲノム断片の発現

発症時期とウイルスゲノム断片発現との関連を把握することを目的として、3種類のウイルスゲノム断片が発現する時期を特定した。

その結果、断片Cは症状が顕在化する時期に強い発現が認められ、断片AとBは瀕死の状態になって強発現が見られた。もし、A、B、Cの各断片がウイルス粒子内のゲノムに由来するものであれば、各断片の発現時期は同調するはずである。発現に時間差が現れた事実から、各断片は

ウイルスゲノムを鋳型として合成された mRNA、もしくは粒子には入らずに細胞内にとどまっているウイルスゲノムであり、少なくともこれらの核酸が多数混入していると推測される。

この実験によって、ウイルス由来核酸の発現時期によって、口白症による感染であることを明確に診断することができるようになった。今までの診断は症状に頼っていた。例えば、腹部を膨満させたまま数分間以上元に復さない。口吻部が糜爛する。などであるが、慢性に経過した場合にはこのような症状を呈さないこともあるため、確定診断としては、口白症が疑われる個体から脳を摘出し、その磨碎濾液をトラフグに筋肉注射して、25℃で飼育する方法を採ってきた。25℃では劇症に経過し、口白症であれば10日に典型的な症状を呈する。このような方法は時間と労力がかかるが、本実験のような方法に依れば、短時間で確定診断が可能である。

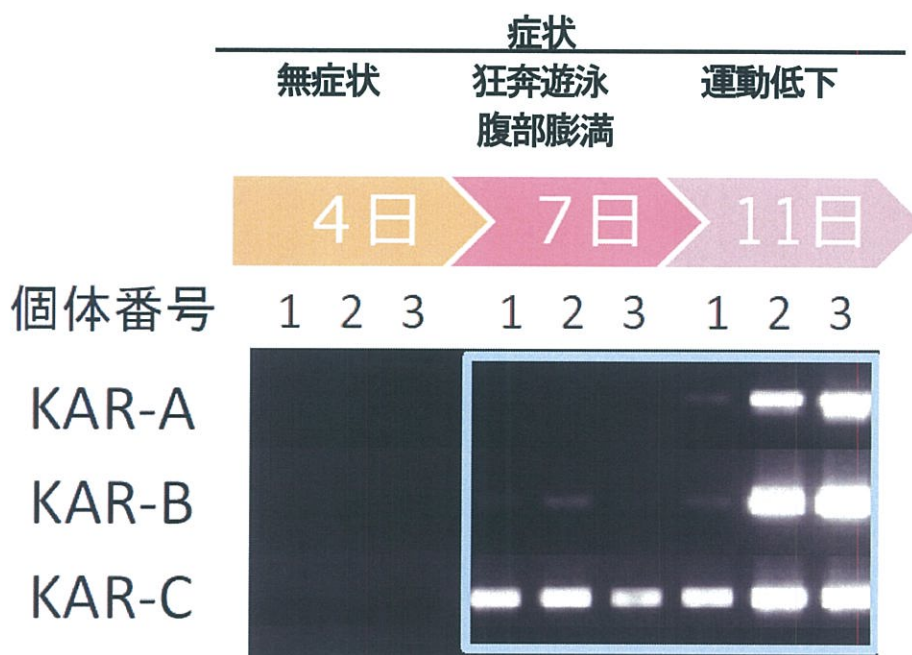


図 口白症関連 RNA の発現と症状の対応

口白症ウイルスを接種後、4、7、11日目に脳を摘出し、PCR法によって KAR-A、B、C の発現程度を示した。

○ 次年度の計画

次世代シーケンサーを用いて、多数の口白症ウイルス由来核酸断片の塩基配列情報を採取し、ウイルス種の分類を行う。また、本来の目的であるウイルス感染に伴う宿主の免疫応答を明らかにする。

※ホームページ掲載用として使用するため、A4 2枚程度で簡潔にまとめてください。
参考資料 (図、写真等) があれば添付してください。