

論文の内容の要旨

論文題目 ハイスループットシーケンシングを利用した

新規ウイルスの検出

氏名 大場 真己

近年、次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) が感染症の研究分野で広く利用されるようになり、数多くの新しいウイルスが発見されている。NGS はハイスループットシーケンシングによりサンプル中の核酸配列を網羅的にシーケンシングするので、従来のサンガー法に比べて格段に効率良く核酸の塩基配列を決定することができる。しかし、ウイルスを NGS で解析する際には、① サンプル中の相対的濃度が低いウイルスゲノムは検出されにくい、② 1 回のランでは DNA もしくは RNA のどちらか一方しかシーケンシングができない (現在世界的に最も使用されているイリミナ社の MiSeq の場合)、③ single-stranded (ss) 構造のウイルスゲノムのシーケンシングは難しい、という問題点がある。本研究では、これらの問題点を克服するために 2 つのサンプル前処理方法を開発した。

近年、野生動物の中でもウイルスの媒介動物として翼手目 (コウモリ) が注目されている。コウモリはさまざまなウイルスのレゼルポアとして知られている。鳥類のように飛翔するが、哺乳類なので鳥類よりもヒトや家畜に感染する病原体を保有している可能性が高い。また、蚊やダニなどの病原体を媒介する節足動物に比較するとはるかに長い距離を飛ぶことができる。このように、コウモリはウイルスの伝播に重要な役割を果たしている。

私が現在所属している東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センターでは、国内のブタやウシなどの主要な家畜から NGS や網羅的リアルタイム PCR 法を用いて新規・希少ウイルスを発見してきた。このことは日本のように高度に管理されている畜産の現場においても家畜は新しいウイルスに感染 / 保有していることを示している。さらに解析を進めることで私たちの知らないウイルスを発見できる可能性は高いだろう。

以上のことから、本研究では動物の検体から NGS を用いてウイルスを検出する際の問題点を新しい方法を開発することにより解決すること、および従来の方法とこれらの新規方法を用いてコウモリとブタから新規・希少ウイルスを検出することを目的とした。

第一章では、NGS 解析においてウイルスゲノムを効率良く検出する方法を開発するために、ウイルスをそのゲノム構造から single-stranded (ss) DNA ウイルス、double-

stranded (ds) DNA ウイルス、ssRNA ウイルス、dsRNA ウイルスの4種に分けた。このうち本研究では、ssDNA ウイルスを特異的に検出できる方法の開発を目指した。

Duplex specific nuclease (DSN) は dsDNA を特異的に切断するが、ssDNA、ssRNA および dsRNA は切断しない酵素である。DSN によってサンプル内の dsDNA を分解することにより、ssDNA ウイルスゲノムの相対的な分子数を上昇させた後、ssDNA をランダムに増幅する Phi29 酵素を用いて dsDNA に変換しながら増幅し、この dsDNA を NGS で解析する方法である。本法を DSN-NGS 法と呼び、既知の ssDNA ウイルスを用いてその有用性を検証した。ssDNA はハイスループットシーケンシングのテンプレートにできないため、検証には定量性 Real-timePCR を使用した。具体的には牛の MDBK 細胞より抽出した DNA を dsDNA として、豚パルボウイルス (PPV) 生ワクチンより抽出した DNA を ssDNA として混合したサンプルを作成し、DSN 処理による影響を調べた。その結果、dsDNA (MDBK β -actin 遺伝子領域の塩基配列のコピー数) は $10^{2.5}$ copies/ μ l から 10^0 copies/ μ l に減少したが、ssDNA (PPV のコピー数) はほとんど変化が見られず、本法の有効性が示された。

また、上記の4種のゲノム構造のウイルス全てを網羅的に検出できる方法を確立することを目的に、multiplex PCR を利用した NGS の前処理方法を開発した。近年、自然界においてウイルスが本来の宿主以外の動物で見つかることが多いため、ブタやコウモリから他の動物に感染するウイルスが検出される可能性がある。そこで、multiplex PCR 法では検出対象とするウイルスを鳥類・哺乳類全般とし、縮重プライマーを用いて137属のウイルスを対象に約700本のプライマーをデザインし、multiplex PCR 反応後にすべての反応液をまとめてDNA精製し、ハイスループットシーケンシングにより解析した。本法を multiplex PCR-NGS 法と呼び、その有用性をブタ糞便抽出核酸のプールを用いて検証した。multiplex PCR-NGS 法で検出されたウイルスと従来法で検出されたウイルスの比較を行ったところ、multiplex PCR-NGS 法でプライマー設計されているウイルス属に関しては、multiplex PCR-NGS 法のほうが従来法よりも多数検出され、multiplex PCR-NGS 法の有用性が示された。

第二章では、コウモリが保有しているウイルスの検出を試みた。コウモリを吸血するダニも研究対象とした。その結果、台湾・新北市内の洞窟で採取されたユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) の糞便サンプルより、multiplex PCR-NGS 法により encephalomyocarditis virus (EMCV) が検出された。EMCV はピコルナウイルス科 Cardiovirus 属の ssRNA (+) virus であり、サルを含む広範囲の宿主に感染する。また、心筋炎、脳炎、神経疾患、生殖障害および糖尿病を引き起こす人獣共通感染症の原因ウイルスである。コンベンショナル PCR を用いたさらなる調査により、台湾、韓国および日本のユビナガコウモリが EMCV を保有していることが示され、ユビナガコウモリが東アジアにおける EMCV の自然宿主の1つである可能性が示された。新興感染症の原因ウイ

ルスのレゼルボアとして注目されているコウモリから本ウイルスが発見されたことは公衆衛生上、非常に重要である。一方、コウモリが住み着いた国内宿泊施設屋根裏の、コウモリが出入りする開口部付近で採取されたコウモリマルヒメダニの内臓と体液から Vero 細胞を用いてウイルス分離を試みた際の培養上清サンプルから、NGS 従来法によりブニヤウイルス科の新規ウイルス Soft tick bunyavirus (STV) が検出された。de novo assembly コマンド (minimum contig length 1000) により得られたすべてのコンティグに対する BLASTn 検索の結果、3つのコンティグはヒトに頭痛や発熱を引き起こす Issyk-kul virus のセグメント L (Accession No. KF892055.1), セグメント M (Accession No. KF892056.1) およびセグメント S (Accession No. 892057.1) とそれぞれ 77%, 76% および 79% の相同性を示した。また、セグメント L の塩基配列の ORF 部分のみを抽出し系統解析した結果、STV は家畜に重篤な症状を引き起こすウイルスを多く含む Nairovirus 属のクラスターに含まれることが示唆された。このウイルスの病原性は不明であるが、培養細胞に細胞傷害性を示したことから、何らかの宿主に対して病原性を示す可能性は否定できない。今後、実験動物を用いるなどして明らかにする必要があるだろう。

第三章では、国内のブタから新規・希少ウイルスの検出を試みた。ブタ糞便より従来法により新規 porcine teschovirus (PTV) を検出した。PTV はピコルナウイルス科ピコルナウイルススーパーグループ 1 に分類される Teschovirus 属のウイルスである。

Teschovirus 属には、現在 13 の血清型を含む単一種のテシオウイルス A が含まれている。PTV はポリオ脳炎、繁殖障害および胃腸障害を起こすが、健康なブタの糞便中にも検出されることが知られている。検出した新規 PTV は IV 型 internal ribosome entry site

(IRES) および保存された特徴的モチーフを有しているが、既存の PTV 株間でアミノ酸配列の相同性が高く保たれている非構造タンパク質をコードする 3C および 3D (それぞれ 93.2-100%, 95.8-100%) において新規 PTV と既存 PTV 株間のアミノ配列の相同性は低かった (77.1-81.0% および 84.3-86.7%)。これらの結果は、新たに同定されたウイルスが Teschovirus 属の新規ウイルスであることを示唆している。

また、DSN-NGS 法により、2つのブタ糞便抽出核酸サンプルプールから circovirus の 1 種である fur seal feces-associated circular DNA virus JPN1 (FSfaCV-J1) および immunodeficiency-associated stool virus (IASV) に相同性を示す porcine feces-associated IASV-like virus (PfaIV) を検出した。circovirus は環状 ssDNA ウイルスであり、哺乳動物、鳥類、爬虫類、魚類および環境から分離されている。ブタの porcine circovirus 2 (PCV-2) は離乳豚に Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) を引き起こすことが知られているが、それ以外の circovirus は病原性がないと考えられており報告は少ない。fur seal feces-associated circular DNA virus はニュージーランドのオットセイの糞便から検出されたウイルスであるが、それが日本のブタの糞便から検出されたことは非常に興味深い。本研究が日本での本ウイルスの最初の報告である。

IASVはGenBank上に unclassified の環状 dsDNA ゲノムを有するゲノム長 99,915 bp のウイルスとして登録されている。IASVはオランダのヒト免疫不全ウイルス患者の糞便から検出され、IASVのGenBankデータはKJ003983.1のみである。IASVに相同性を示すいくつかのリードがスウェーデンにおけるNGSを用いたブタの糞便抽出核酸解析データ中に見いだされているが詳細な情報は報告されておらず、IASVの病原性およびその人獣共通感染症の可能性は不明である。DSN処理後のサンプルからdsDNAウイルスのPfaIVが検出されたのはPfaIVの複製中にヘリカーゼ活性によって形成される部分的なss構造領域が存在していたためではないかと推測している。国内の85頭のブタにおけるFSfaCV-J1とPfaIVの保有率はそれぞれ76%および72.9%であり、PfaIVおよびFSfaCV-J1の両方が検出されたブタも多かった。日本のブタに広く蔓延しているこれらのウイルスが何かのきっかけで病原性を持ちうるのかどうかについては注意深く監視していく必要があるかもしれない。

本研究では、動物の検体からNGSを用いてウイルスを検出する際に起こる問題点に対し、DSN-NGS法およびmultiplex PCR-NGS法を開発して解決した。DSN-NGS法は効率的にssDNAウイルスを検出できる方法であると同時に、ライブラリー調整のキットの都合で実施困難であったssDNAゲノムのハイスループットシーケンシングも可能とする方法であることが示された。またmultiplex PCR-NGS法はウイルスゲノムの種類によらず、NGS従来法では検出できないほどにサンプル中の相対的濃度が低いウイルスであっても検出可能な方法であることが示された。実際にこれらの新規方法と従来の方法を必要に応じて使い分け、コウモリとブタから新規・希少ウイルスの検出を行ない、コウモリやブタにはまだ知られていないウイルスが相当数存在している可能性を示した。このことは、新興ウイルス感染症発生の脅威は常に存在することを明らかにしたといえるだろう。本研究で開発した方法などを用いて、コウモリやブタなどに感染しているウイルスを網羅的に検出しその情報を蓄積することは、新たなウイルス感染症の防疫に必ず役立つと考えられる。