4. 海産魚を宿主とする ssRNA ウイルス

西澤 豊彦

(広島大学生物生産学部)

はじめに

魚介類の ss-RNA ウイルスの研究は、1960年代に伝染性造血器壊死症ウイルス (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) やウイルス性出血性敗血症ウイルス (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) が RTG-2 細胞 (ニジマス生殖腺由来) や CHSE-214 細胞 (マスノスケ胚由来) などの魚類由来細胞により分離培養されてから本格的に始まった。以来、オルソミキソウイルス科、パラミキソウイルス科、ラブドウイルス科、コロナウイルス科、トガウイルス科、レトロウイルス科、カリシウイルス科、ノダウイルス科に属する様々なウイルスが報告されている。しかし、多くはサケ・マス類を中心にした淡水魚のラブドウイルスを中心に研究されたものであった³²⁾。1980年代に入ると各種海産魚介類の種苗生産および養殖が盛んになり、それに伴い新たなウイルス性の病気が次々と報告された。そのうち ssRNA ウイルス感染症としては、hirame rhabdovirus (HIRRV) を原因とするラブドウイルス感染症と魚類ノダウイルスを原因とするウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis, VNN) がよく知られる。HIRRV はヒラメ *Paralichthys olivaceus*、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii*、メバル *Sebastes inermis* などの数種の海産魚をはじめサケ科魚類の一部にも病

原性を有する^{9,10)}。また魚類ノダウイルスは、イシダイ *Oplegnathus fasciatus*、シマアジ *Pseudocaranx dentex* やキジハタ *Epinephelus akaara* など数多くの海産魚から検出されており、東南アジア、オーストラリア、タヒチ、ノルウェーおよびフランスなど諸外国での報告例を含めればその宿主域は実に15魚種以上におよぶ^{15,18)}。この様に極めて広い宿主域を有することが両ウイルスの特徴の一つで興味深い点であるが、何れにおいても宿主選択機構に関しては未だ明らかにされていない。ここでは、現在までに行われた両ウイルスに関する分子生物学的研究の概略を紹介する。

Hirame rhabdovirus (HIRRV)

代表的な魚類ラブドウイルスとしては、先に紹介した IHNV や VHSV の他に pike fry rhabdovirus (PFRV), spring viremia of carp virus (SVCV) などが知られており、構造タンパク質などの性質から IHNV および VHSV は lyssavirus 型に、PFRV および SVCV は vesiculovirus 型に分けられた。HIRRV は1984年に大量死した養成過程のヒラメから分離されたラブドウイルスで、罹病魚は体表や鰭の充出血、腹部膨満、生殖腺の鬱血、筋肉内出血などの症状を呈する^{9,10)}。HIRRV は浮遊密度が1.16-1.18g/cm³で²⁶⁾直径約80nm 長さ160-180nm の砲弾型を呈し、large protein (L タンパク質; 156kDa), glycoprotein (G タンパク質; 68kDa), nucleocapsid protein (N タンパク質; 46.4kDa) および2種類の matrix protein (M1タンパク質; 26.4kDa および M2タンパク質; 19.9kDa) の5種類の構造タンパク質と長さ約10.7kbs の ss-RNA から構成され、IHNV や VHSV と同様 lyssavirus 型に属すると報告された^{27,29)}。しかし新しい報告では、これらは属不明のラブドウイルスとして扱われている¹⁸⁾。HIRRV

Marine fish pathogenic ssRNA viruses
Toyohiko Nishizawa
Applied and Biological Science, Hiroshima University,
Kagamiyama 1-4-4, Higashi-Hiroshima, 739 Japan,
Tel: 0824-24-7978
Fax: 0824-22-7059
E-mail: jijnishi@ipc.hiroshima-u.ac.jp
〒739 広島市鏡山1-4-4

は血清学的に均一であるが、既知魚類ラブドウイルスとの間には中和交叉反応が認められない。各構造タンパク質の抗原性において HIRRV は vesiculovirus 型の魚類ラブドウイルスとは交叉反応を示さないものの、G タンパク質では IHNВ および VHSV の両ウイルスと、N および M2 タンパク質では IHNВ と各々共通抗原を有する。しかし、M2 タンパク質の抗原性は HIRRV、IHNВ および VHSV の3ウイルス間で独立している²⁷⁾。現在までに HIRRV の G、M1 および M2 タンパク質遺伝子の全長と N タンパク質遺伝子の一部の塩基配列が決定され IHNВ あるいは VHSV と比較検討されている^{4,21,22)}。M1 および M2 タンパク質のアミノ酸配列は HIRRV-IHNВ 間で81.5-86.0%と高い類似性を示すが、HIRRV-VHSV 間ではその類似性は60%以下である²¹⁾。また G タンパク質においても HIRRV-IHNВ 間で74%の類似性を示すことから⁴⁾、HIRRV は VHSV より IHNВ に近い関係にある。

ラブドウイルスの G タンパク質は N 型糖鎖をもち envelope の spike を構成し、ウイルス中和抗体を誘導する³¹⁾。魚類ラブドウイルスでも IHNВ で G タンパク質を用いたワクチンの開発研究が盛んに行われてきた。ところが HIRRV の各構造タンパク質の抗原性に関する研究過程で、G タンパク質だけでなく M1 タンパク質に対する抗血清にもウイルス中和活性が認められ、M1 タンパク質における感染防御抗原の存在が示唆された^{10,29)}。実際に IHNВ 感染耐化魚の血清中には G タンパク質および M1 タンパク質に対する抗体が高率に認めらる³⁰⁾。最近 HIRRV の中和活性を有する M1 タンパク質に対するモノクローナル抗体が得られ、M1 タンパク質における感染防御抗原の存在が証明されつつある（大迫ら、未発表）。lyssavirus の M1 タンパク質は vesiculovirus の NS タンパク質に相当するリン酸化タンパク質で、L タンパク質と共にウイルスゲノムの転写に関与することが知られているが³¹⁾、M1 タンパク質が中和抗体を誘導するという報告はほとんど無く、HIRRV の M1 タンパク質に対する抗体がどのような機構でウイルスを中和するのかは興味ある点である。一方、M2 タンパク質は envelope の成分の一つで、ウイルス粒子の脂質二重層と nucleocapsid の間を埋めており、成熟粒子形成や G タンパク質の安定化などに関与している³¹⁾。さらに vesiculo stomatitis virus (VSV) の M タンパク質では、N 末端近くに存在する塩基性アミノ酸領域に感染宿主細胞の転写阻害活性が確認されている⁵⁾。HIRRV の M2 タンパク質の N 末端近くにも塩基性アミノ酸に富んだ領域が存在し、また大腸菌細胞を用いた発現系での

M2 タンパク質の発現効率が他の構造タンパク質に比べ極端に低いことから、HIRRV の M2 タンパク質にも VSV の M タンパク質と同様の転写阻害活性があるのではないかと推察される²²⁾。

HIRRV のゲノムは少なくとも5種類のタンパク質をコードしており、各遺伝子は3'末端から N-M1-M2-G-L の順に並んでいる²⁸⁾。IHNВ ゲノムでは G タンパク質遺伝子と L タンパク質遺伝子の間に長さ570塩基の non-virion (NV) 遺伝子が見つかっている^{11,13)}。NV 遺伝子は感染細胞中で転写され12kDa のタンパク質を発現すると報告されているが、その機能は解明されていない¹³⁾。同 NV 遺伝子は HIRRV や VHSV ゲノムでも確認され、特に HIRRV-IHNВ 間では極めて高い類似性を示す¹²⁾。rabies virus のゲノムでも G タンパク質遺伝子と L タンパク質遺伝子の間に長さ約450塩基の独立した遺伝子類似領域 (remnant gene) が見つかっているが、VSV あるいは vesiculovirus 型の魚類ラブドウイルスには存在せず、NV 遺伝子は lyssavirus 型の魚類ラブドウイルスに特徴的な遺伝子だと考えられている¹²⁾。ところで、哺乳類の lyssavirus および vesiculovirus のゲノムの遺伝子結合領域には各々 WG(A)₇ および YATG(A)₇ の共通配列が存在し、構造タンパク質遺伝子の転写終結シグナルおよびポリ(A)付加シグナルとして機能している^{2,6)}。IHNВ や VHSV の魚類 lyssavirus 型ウイルスのゲノムの遺伝子結合領域には AGAYAG(A)₇ の同シグナル配列が見られるが^{33,7)}、HIRRV ゲノムの各遺伝子結合領域に見られるシグナル配列は AGATAG(A)₇ で、IHNВ あるいは VHSV よりもシグナル配列の保存性が高い。また IHNВ や VHSV のゲノムでは同シグナル配列のすぐ下流に YGGYWC の共通配列が存在するが、HIRRV ゲノムの同領域に見られる共通配列は TGGCACRTTWTGT で IHNВ や VHSV で見られる共通配列を含むばかりでなく IHNВ や VHSV に比べ長くかつ保存性が高い²²⁾。一方、哺乳類の lyssavirus における転写開始シグナルあるいはキャッピングシグナルとして AACABYMCT 配列が⁶⁾、また哺乳類の vesiculovirus の同シグナルとして AACAG 配列が知られている²⁾。VHSV の同シグナル配列は AACA ではないかという報告もあるが⁶⁾、AACA 配列は HIRRV の各遺伝子結合領域には存在するものの IHNВ の一部の遺伝子結合領域には見いだされておらず、その詳細は明らかにされていない。いずれにしても、HIRRV の遺伝子結合領域に見られる共通配列が IHNВ や VHSV に比べ長くかつ保存性が高いということは、分子進化学的に HIRRV が魚類の lyssavirus 型

図1 魚類ノダウイルスの外被タンパク質遺伝子における各PCRプライマー (F1, F2, R1, R2, R3), 増幅標的領域 (T1-T5), 保存領域および可変領域の遺伝子地図。

の祖先型ウイルスに最も近いことを示唆するものであり、さらに NV 遺伝子を含め遺伝子結合領域にみられる共通配列をより詳細に解析すれば魚類 lyssavirus 型ウイルスと哺乳類の lyssavirus との分子進化学的關係が明らかにできると考えられる。

魚類ノダウイルス

魚類ノダウイルスは種苗生産過程の海産仔稚魚に壊滅的な被害をもたらすことから産業上問題となっている。罹病魚は回転、旋回等の異常遊泳を呈し、脳・脊髓および網膜の神経細胞の壊死崩壊により空胞が形成され、神経細胞の細胞質には多数のウイルス粒子が確認される^{15,18)}。魚類ノダウイルスの分離培養系は未だ確立されていないが、シマアジ病魚から VNN 原因ウイルス (striped jack nervous necrosis virus: SJNNV) が直接純化され、その性状が明らかにされた¹⁴⁾。SJNNV は直径25nm のエンベロープをもたない球形ウイルスで、42kDa の外被タンパク質と2分節の ssRNA から構成される。ウイルスゲノムはポリ (A) 構造を持たないプラス鎖で、RNA1 (1.01x10⁶Da) には RNA ポリメラーゼ (100kDa) が、また RNA2 (0.49x10⁶Da) には外被タンパク質がコードされている。これらの性状から SJNNV がノダウイルス科に属することが明らかになった¹⁴⁾。ノダウイルス科は Nodamura virus (NoV) を基準種とする一属で構成される。同属のウイルスとして black beetle virus (BBV), flock house virus (FHV), boolarra virus (BoV), gypsy moth virus (GMV) および manawatu virus (MwV) などが知

られるが、何れも昆虫を宿主とするウイルスで脊椎動物を宿主とするノダウイルスとしては SJNNV が最初の報告である¹⁶⁾。SJNNV の外被タンパク質遺伝子は全長1,410塩基で、塩基配列番号 (nt) 17-1,036にアミノ酸340残基をコードする open reading frame が存在する (図1)²³⁾。しかし SJNNV と既知昆虫ノダウイルスの外被タンパク質遺伝子間で核酸あるいはアミノ酸レベルでの類似性は全く認められない。さらに SJNNV の外被タンパク質遺伝子の塩基配列を基に異なる5つの領域 (T1~T5) を標的とするPCRプライマーを作成し、SJNNV 以外の魚類ノダウイルス株のゲノム解析に応用した^{23,24)}。その結果、SJNNV 以外の魚類ノダウイルスからは T2および T4領域に相当する増幅産物のみが得られ、魚類ノダウイルスの外被タンパク質にはアミノ酸レベルで93%以上の高い類似性を示す保存領域と62%程度の類似性しか示さない可変領域が存在することが示された (図1)。この魚類ノダウイルスの保存領域と高い類似性を示す配列は、既知の昆虫ノダウイルスには見られず、また既存の遺伝子およびタンパク質データベースにも見つからないことから、魚類ノダウイルスはノダウイルス科に昆虫ノダウイルスとは異なるウイルス群を形成することが示唆された²⁴⁾。

一方、魚類ノダウイルスの外被タンパク質遺伝子の可変領域がPCR標的領域 T4内に存在することに着目し、日本国内外の海産魚15種から検出された25株の魚類ノダウイルスの T4領域を増幅し、株間の分子進化学的關係について解析した¹⁹⁾。魚類ノダウイルスの国内株には分子進化学的に独立した4つの系統群 (SJ, TP,

図2 魚類ノダウイルス25株の T4領域の塩基配列に基づく分子系統樹。

BF, RG 系統群) が存在し, 国外株は何れも RG 系統群と密接に関わっていることが示された(図2)。また各系統群内における核酸およびアミノ酸配列の類似性は何れも95%以上であり, 少なくとも各系統群内の株は同一ウイルスであると考えられる。また1991~1994年の間に同一施設のシマアジから検出された株を用いて推定した魚類ノダウイルスの T4領域における分子進化速度は 2.6×10^{-3} /座位/年で, 他の RNA ウイルスで報告されている分子進化速度にほぼ一致した⁸⁾。この分子進化速度に基づき推定した魚類ノダウイルスの4系統群の分岐時期は100~150年前となり, 魚類ノダウイルスは宿主が種として分岐した年代よりも遥かに新しい時期に分岐したことが示唆される。これは魚類ノダウイルスが宿主と共に進化してきたのではなく, 異なる宿主間での感染を繰り返しながら宿主範囲を広げてきたことを示している。さらに, 各系統群内における細かな分岐はここ10年の間に起こったと推察され, 海産魚の種苗の移動が頻繁に行われるようになった時期に一致することから, 魚類ノダウイルスの伝播に人為的要因が大きく関与したことが窺われる。今後, 国外を含め研究対象ウイルス株を増やすことにより, 魚類ノダウイルスの起源あるいは伝播経路などがより詳細に明らかにされるであろう。魚類ノダウイルスの株間における血清学的関係の詳細は明らかにされていない

が, 既に SJNNV に対する中和活性を有するモノクローナル抗体が得られており²⁰⁾, 現在 in vitro で発現させた各ウイルス株の外被タンパク質を用いて解析中である。

ところで, 分子進化学的解析に用いられた SJNNV の T4領域を標的とする PCR は, 何れの魚類ノダウイルス株からも同様の PCR 産物を増幅することから VNN 病魚の迅速診断法として応用され, 種苗生産現場で急速に普及しつつある。さらに, シマアジでは SJNNV の主たる感染経路が垂直感染であることが明らかにされ^{1,25)}, 卵巣および精巣を材料とした PCR 検査の結果に基づきウイルス陰性親魚だけを用いて産卵させることにより, 孵化仔魚における VNN の発生率を大幅に低下させることが可能となった¹⁷⁾。

おわりに

高等脊椎動物から無脊椎動物に至るまで様々なウイルスが報告されているが, 魚介類からも動物ウイルスとして知られるほとんどの科に属するウイルスが存在する。魚介類のウイルスの分子生物学的研究はまだ始まったばかりだが, ウイルスの進化を考える上で下等脊椎動物としての魚類あるいは水生無脊椎動物のウイルスの分子生物学的研究は大変興味深いものがある。

文 献

- 1) Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. and Furusawa, I. (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) . Fish Pathol., **27**, 191-195.
- 2) Banerjee, A.K. and Barik, S. (1992) Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. Virology, **188**, 417-428.
- 3) Benmansour, A., Paubert, G., Bernard, J. and de Kinkelin, P (1994) The polymerase-associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and an avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. Virology, **198**, 602-612.
- 4) Bjorklund, H.V., Higman, K.H. and Kurath, G. (1996) The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus; analysis of relationships with other rhabdoviruses. Virus Res., (in press) .
- 5) Black, B., Rhodes, R.B., McKenzie, M., and Lyles, D. S. (1993) The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. J.Virology, **67**, 4814-4821.
- 6) Bourhy, H., Kissi, B., and Tordo, N. (1993) Molecular diversity of the lyssavirus genus. Virology, **194**, 70-81.
- 7) Gilmore, R.D. and Leong, J.C. (1988) The nucleocapsid gene of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. Virology, **167**, 644-648.
- 8) Holand, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. and Vandepol, S. (1982) Rapid evolution of RNA genomes. Science, **215**, 1577-1585.
- 9) Kimura, T., Yoshimizu, M., and Gorie, S. (1986) A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). Dis. Aquat. Org., **1**, 209-217.
- 10) Kimura, T., Yoshimizu, M., Oseko, N. and Nishizawa, T. (1989) Rhabdovirus olivaceus (hirame rhabdovirus) . In "Viruses of Lower Vertebrates" Eds. W. Ahne and E. Kurstak, Springer-Verlag, Berlin, 388-395.
- 11) Kurath, G., Ahern, K.G., Pearson, G.D. and Leong, J. A.C. (1985) Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. J.Virology, **53**, 469-476.
- 12) Kurath, G., Higman, K.H. and Bjorklund, H.V. (1996) Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. (in preparation) .
- 13) Kurath, G. and Leong, J.A.C. (1985) Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a non-virion rhabdovirus protein. J. Virology, **53**, 462-468.
- 14) Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I. (1992) Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. Virology, **187**, 368-371.
- 15) 室賀清邦 (1995) 海産魚介類の仔稚魚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, **30**, 71-85.
- 16) Murphy, F. A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (1995) In "Virus taxonomy: 6th report of the international committee on taxonomy of viruses". Springer-Verlag, Wien, pp. 386-371.
- 17) Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (1994) Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). Fish Pathol., **29**, 177-182.
- 18) Nakai, T., Mori, K., Nishizawa, T. and Muroga, K. (1995) Viral nervous necrosis of larval and juvenile marine fish. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology Applications in Aquaculture. Asian Fisheries Soc., Special Publication, **10**, 147-152.
- 19) Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K. (1996) Molecular evolutionary relationships of fish nodaviruses based on the partial nucleotide sequence of the coat protein gene, RNA2. (in preparation)
- 20) Nishizawa, T., Kise, M., Nakai, T. and Muroga, K. (1995) Neutralizing monoclonal antibodies to striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) . Fish Pathol., **30**, 111-114.
- 21) Nishizawa, T., Kurath, G. and Winton, J.R. (1995) Nucleotide sequence of the two matrix protein genes (M1 and M2) of hirame rhabdovirus (HRV), a fish rhabdovirus. Vet. Res., **26**, 408-412.
- 22) Nishizawa, T., Kurath, G. and Winton, J.R. (1996) Molecular analysis of two matrix protein genes and three intergenic regions of hirame rhabdovirus (HIRRV), a fish rhabdovirus. (in preparation)
- 23) Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (1995) Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis (VNN) in marine fish. J.Gen.Virology, **76**, 1563-1569.
- 24) Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) . Dis. Aquat. Org., **18**, 103-107.
- 25) Nishizawa, T., Muroga, K. and Arimoto, M. (1996) Failure of polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in Striped jack spawners. J. Aquat. Ani-

- mal Health, (in press)
- 26) Nishizawa, T., Yoshimizu, M. and Kimura, T. (1991) Buoyant density of hirame rhabdovirus (HRV) in cesium chloride and sucrose. *Fish Pathol.*, **26**, 47-48.
 - 27) Nishizawa, T., Yoshimizu, M., Winton, J., Ahne, W. and Kimura, T. (1991) Characterization of structural proteins of hirame rhabdovirus, HRV. *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 167-172.
 - 28) Nishizawa, T., Yoshimizu, M., Winton, J. and Kimura, T. (1991) Comparison of genome size and synthesis of structural proteins of hirame rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus, and viral hemorrhagic septicemia virus. *Fish Pathol.*, **26**, 77-81.
 - 29) Nishizawa, T., Yoshimizu, M., Winton, J.R. and Kimura, T. (1992) Comparison of structural protein of fish rhabdoviruses. In "Salomonid Diseases" Ed. T.Kimura, Hokkaido University Press, Japan, pp. 72-79.
 - 30) Ristow, S.S., de Avila, J., LaPatra, S.E. and Lauda, K. (1993) Detection and characterization of rainbow trout antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis.Aquat.Org.*, **15**, 109-114.
 - 31) Wagner, R.R. (1987) "The rhabdoviruses" Ed. R.R. Wagner, Plenum Press, New York, pp. 99-128.
 - 32) 吉水 守 (1996) サケ科魚類および淡水魚のウイルス病. 江草・室賀編「魚病学概論」, 恒星社厚生閣, pp. 29-35