HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニジマスのウイルス感染時およびpolyriboinosinic-polyribocytidylic acid (PIC) 投与時における血中タンパク質の発現変動に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	西川, 翔太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13536号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74270
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shotaro_Nishikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：西川　翔太郎

学 位 論 文 題 目

ニジマスのウイルス感染時および polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (PIC) 投与時における血中タンパク質の発現変動に関する研究

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は，1877 年に日本に移植されて以来，海面・内水面の両方で養殖が盛んに行われており，内水面養殖においては主要な対象魚種となっている。伝染性造血器壊死症（IHN）およびサケ科魚ヘルペスウイルス病（OMVD）は，ニジマスに大量死を引き起こすウイルス性疾病であり，病理組織学的知見は豊富であるものの，症状の発生機序ならびに病態生理学的知見は未だ乏しい。近年，質量分析技術とバイオインフォマティクス等の周辺技術の発達により血中タンパク質の動態を網羅的に解析する技術が構築されてきた。血液は身体の生理状態をリアルタイムに反映するため，罹病魚の病態把握にも有用と考えられる。疾病依存的に含有量が変動するタンパク質を探索することができれば，よい疾病バイオマーカーになりえる。

また，ウイルス感染症対策は，診断に加え，予防も重要であり，最近では自然免疫賦活剤の利活用が注目されている。Polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (PIC) はポリイノシン (poly-I) とポリシチジン (poly-C) の二本のヌクレオチド鎖から構成される合成二本鎖 RNA であり，魚類に投与した場合病原ウイルスに対し抵抗性を付与する作用がある。魚類においては PIC の自然免疫賦活作用と水温に相関があることが報告されており，投与量によっては毒性を示す場合もあることから，PIC 投与後の魚類に与える生理学的影響を明らかにし，より効果的な処方を設定することが必要である。

以上の背景により，本研究第 1 章では IHN および OMVD の病態の基礎的知見を得ることを目的として，ウイルス感染によるニジマス血漿中のタンパク質発現プロファイルならびに生化学成分への影響を，二次元電気泳動ならびに生化学検査により明らかにした。第 2 章では，飼育水温ならびに PIC の塩基長が PIC の自然免疫賦活作用に与える影響を明らかにするとともに，第 3 章では PIC 投与により生じる生理学的変化を検討した。

第 1 章では，IHNV あるいは OMV に人為感染させたニジマスを作出し，ウイルス感染前後の血漿を二次元電気泳動により展開し，感染症発症による血中タンパク質の変動を比較するとともに，発症により増加するタンパク質を探索した。二次元電気泳動により展開した 6 枚のゲルにおいて 4422～5083 スポットが検出され，IHNV 感染前後における血漿群間で比較したところ，324 スポットで強度の増加，276 スポットで強度の減少が確認された。また，OMV 感染前後においては 368 スポットで強度増加，246 スポットで強度減少が確認された。両疾病に共通して，免疫に関与するタンパク質である補体因子 C3，プレセレベリン様タンパク質，インテレクチン，アポリポタンパク質 A-I-1，物質の移動を担う輸送タンパク質（アルブミン，ハプトグロビン，ヘモグロビンサブユニット β，セロトランスフェリン），エネルギー代謝に関与するタンパク質（乳酸脱水素酵素，クレアチンキナーゼ，ビオチニダーゼ，3’(2’), 5’-ビスリン酸ヌクレオチダーゼ，リンゴ酸脱水素酵素），クロマチンを構成する主要タンパク質のひとつであるヒストン H2B，High mobility

protein B，シグナルトランスインデューサーおよびアクチベーター，卵黄タンパク質の前駆体であるビテロジェニンならびに細胞骨格を構成するタンパク質であるケラチンが増加していた。血液の生化学成分 19 項目について測定したところ，クレアチニン，乳酸脱水素酵素，アラニンアミノトランスフェラーゼ，尿素窒素，アスパラギン酸トランスフェラーゼおよびリンの血漿中濃度の増加が示された。これらの多くは哺乳類においては肝臓の障害発生を示すものであり，本試験においてはウイルス感染によって肝臓への障害が生じていることが示唆された。また，ウイルス感染により急性期タンパク質の産生量が増加することも明らかとなった。

第 2 章では，冷水魚であるニジマスにおいて自然免疫と PIC の塩基長ならびに飼育水温の関係性を明らかにすることを目的とし，自然免疫活性化の指標である Mx 遺伝子について，PIC 投与されたニジマスを高水温ならびに低水温で飼育したときの脾臓における発現量を経時的に解析するとともに，塩基長の異なる 6 種類の PIC を投与した場合のニジマス脾臓における Mx 遺伝子発現量を解析した。その結果，PIC 投与後に高水温で飼育したニジマス群における Mx 遺伝子発現量は投与 1 日後にピークが見られ，投与 3 日後には対照群における Mx 遺伝子発現量と同程度まで低下していたのに対し，低水温飼育では Mx 遺伝子発現量の減少は緩やかで，投与 10 日後でも最大発現時の 30%以上の値で維持されていた。PIC 投与による Mx 遺伝子発現量すなわち抗ウイルス状態の維持は飼育水温の影響を受けることが示され，低水温下での PIC 投与が有効であると考えられた。ニジマスにおいて Mx 遺伝子発現量は PIC の塩基鎖長に非依存的であることも示され，哺乳類とは異なる動態を示すことが明らかとなった。一方で，魚体サイズによって PIC に対する許容量が変化し，低水温下では魚体 1 kg あたり 16.7 mg で致死毒性を示すことが明らかとなった。

第 3 章では，本研究で示されたニジマスの PIC に対する許容量（8.3 mg/kg fish）以下であり，Mx 遺伝子の有意な発現量増加が認められている量（3 mg/kg fish）の PIC 投与時の生理・生化学的影響を明らかにするため，PIC 投与前後のニジマス血液の生化学成分を比較するとともに，血液中におけるタンパク質発現プロファイルを解析した。PIC 投与した個体には病理組織学的所見として肝臓の壊死が観察された個体もみられたことに加え，アンモニア，カルシウム，アラニンアミノトランスフェラーゼ，尿素窒素，アスパラギン酸トランスフェラーゼ，クレアチンフォスフォキナーゼ，マグネシウム，総タンパク質，アルブミンの血漿中濃度が有意に増加していることが示された。また，PIC 投与によりヘモペキシン様タンパク質，フィブリノーゲン γA，アポリポタンパク質 A-I-1，補体因子 B/C2，ケラチン，クレアチンキナーゼ，ビテロジェニン，ハプトグロビン，high mobility group protein が変動していることが明らかとなり，PIC 投与により肝臓に障害が生じる可能性が示された。本試験では IFN は検出されなかったが，PIC 投与により IFN 産生の指標である Mx 遺伝子の発現量増加が認められており，IFN 過剰産生が生じることによって活性化した免疫細胞による自己免疫疾患を発症している可能性が考えられた。

魚類ウイルス病の診断を行う際，外観症状や内臓器官の観察を行い，病変部より分離・培養したウイルスを同定することが基本である。しかし近年，簡易診断キットの開発や分子生物学的技術の普及に伴い，病原体の分離・培養を行わず病原体特異遺伝子あるいはタンパク質のみが実施される傾向にある。死因に繋がらない病原体を検出することで誤った診断がなされる危険を避けるためにも，特定の病原体を検出するような手法だけでなく，病原体の分離を伴わない，宿主の健康状態に基づく感染症発症の予兆を診断するような手法の開発・導入が必要である。本研究において明らかとなったウイルス感染症における病態生理学的知見ならびに PIC に関する基礎的知見が魚類感染症の防除･防疫対策に結び付き，ひいてはサケ・マス類の安定生産につながることを期待する。