

令和元年6月21日現在

機関番号：32415

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08039

研究課題名(和文)牛白血病を規定するウシ主要組織適合抗原(BoLA)ハプロタイプの網羅的多型解析

研究課題名(英文) Analysis of polymorphism of bovine major histocompatibility complex (BoLA) haplotypes associated with enzootic bovine leukemia

研究代表者

竹嶋 伸之輔 (Takeshima, Shinnosuke)

十文字学園女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：60342812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は牛白血病や乳房炎、寄生虫血症など様々な牛疾患と相関するとされるウシ主要組織適合遺伝子複合体(BoLA)領域の解析を行うための手法の開発を目的として開始した。BoLA領域は極めて多様性が高いため、本研究では特に牛白血病に関連するハプロタイプを収集し、それらの個体を用いたターゲットシーケンス法の解析に取り組んだ。本研究の最終年度において15年ぶりに改訂されたウシゲノムリファレンスシーケンスも検討し、10種類の遺伝子型を有する個体において、x70～x148倍と、十分なシーケンス深度が得られる、BoLA領域内の疾患関連SNPの探索に適していたタイピング法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要組織適合遺伝子(MHC)はヒトにおいても100にも及ぶ疾患との相関性が示されており、極めて重要な遺伝子領域である。ウシにおいても、数多くの疾病との相関性が示されており、遺伝子領域の多様性の全容をタイピングする事は重要である。本研究により示された新たなタイピング法により、これまでウシMHCのうち、一部しか明らかにできなかった多様性の全容が解析可能となり、既に多く報告されている牛白血病や、乳房炎、寄生虫血症など、真に相関する遺伝子の特定が可能となる。ワクチン戦略や抵抗性遺伝子の情報を使用したウシのブランド化、感染症対策や、これまで飼養困難だった地域でのウシの飼育などその応用範囲はとても広い。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was developing a method to analyze the bovine major histocompatibility complex (BoLA) region, which is believed to be correlated with various bovine diseases such as bovine leukemia, mastitis and parasitemia. Because the BoLA region is extremely diverse, in this study, we collected haplotypes related to bovine leukemia in particular, and worked on the analysis of target resequencing using those individuals. In the final year of this study, we also examine the bovine genome reference sequence that has been revised for the first time in 15 years. We succeeded in developing a typing method that was suitable for searching for related SNPs.

研究分野：Immunogenetics

キーワード：網羅的多型解析 ウシゲノム解析 抗病性動物 牛白血病 ウシ主要組織適合遺伝子複合体 BoLA DRB  
3 次世代シーケンサー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らはウシ宿主因子である主要組織適合抗原 (BoLA) クラス II が牛白血病ウイルス (BLV) の病態進行と強く相関する事を明らかとしてきた。しかしながら BoLA 遺伝子領域は 4MB にわたり高度に多型に富む遺伝子が密に連鎖して存在しており、ハプロタイプによりその遺伝子数や多型性が大きく異なる事から、2004 年に報告されたゲノムシーケンス配列では詳細な BoLA 領域の配列は得られておらず、BoLA 領域の解析は困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、全ゲノム解析では多様性の全貌を明らかにするのが困難な BoLA 領域に対して、網羅的解析手法を用いて BoLA 領域に絞った解析を行い、その多様性を明らかにすることを目的とした。特に、BLV に対して疾患感受性を示す事が知られている主要な BoLA ハプロタイプに集中して解析する事で、BLV 発症や BLV プロウイルス量上昇に関わる遺伝子の絞り込みを行うための基盤技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

無数に存在するハプロタイプの中から明らかに BLV 病態進行に関与しているハプロタイプを選び出し、その多型の全貌を次世代シーケンサーをもちいて明らかにすることにより、疾患関連遺伝子の同定および疾患関連ハプロタイプの簡易タイピング法の開発を行う。初年度は感受性および抵抗性アリルを有するウシゲノムの収集および BoLA 領域の次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンスの条件設定を行うため、(1) 黒毛和種牛およびホルスタイン種のゲノム DNA、500 頭の収集、(2) DRB3 および DQA1 遺伝子のアリルタイピング、(3) 収集したウシサンプルの BoLA クラス II ハプロタイプの予測、および (4) BLV 抵抗性アリルを有する個体を収集した。これらの個体を使用して次世代シーケンサーによる BoLA 領域のターゲットリシーケンス法を開発すると共に、BoLA 領域の RNAseq による発現遺伝子の解析を行った。最終年度には新規に公開されたウシゲノムリファレンスシーケンスを用いたターゲットリシーケンス法の改良を行った。

### 4. 研究成果

はじめに黒毛和種 340 頭およびホルスタイン種 504 頭より抽出した DNA を計 844 頭収集し、クラス II ハプロタイプおよびクラス I ハプロタイプを NGS 法により推定した。本サンプルより、抵抗性として DH0902A(11/1), DH0902C(0/13), DH0701A(2/11), DH1101A(86/15), DH1101D(0/4), DH1401A(29/0), DH1401C(0/8) が検出され、感受性として DH1501A(316/86), DH1501B(8/0), DH1601A(2/56), DH1601D(4, 128) が検出された (ホルスタイン種頭数/黒毛和種頭数)。これらの個体から DH1601D を有する個体 3 頭、DH1601A を有する個体 3 頭、そして DH1501A を有する個体 4 頭の計 10 頭の黒毛和種を選抜し、全 MHC 領域を含む、chr22:27,135,779-27,138,024, chr22:27,240,001-27550000 および chr23:25,155,545-31,621,350 の領域にプローブを設定し、Miseq によるターゲットリシーケンスを行った。得られたデータをウシゲノム UMD3.1 にアライメントし変異情報を検出するパイプラインを構築した。

一方、BoLA 領域は非常に多型に富み、重複遺伝子も多く存在する事から、リード長の長い Miseq によるシーケンスを行うが、十分なシーケンス深度を得るためには、BoLA 全体、約 6M 塩基対をターゲットにしてプローブを設定するとコストが莫大になってしまうという欠点があった。そこで、多検体のシーケンスを行うために、シーケンス領域をよりコンパクトにすることを目的として、牛白血病ウイルス (BLV) 感染前および BLV 感染後の MHC 領域内の遺伝子発現を RNA-seq によって解析する事で、各遺伝子の発現の有無の調査を行った。PCR-Sequence Based Typing 法を用いてウシ主要組織適合遺伝子複合体 (BoLA) -DRB3、BoLA-DQA1 を、SNP1 および SNP2 をタイピングし、牛白血病プロウイルス量を増加させるアレルである BoLA-DRB3\*1601:DQA1\*12011:SNP1\*A、SNP2\*A をホモで有する黒毛和種 5 頭について、BLV 感染牛由来白血球を静脈内注射して感染させ、そのプロウイルス量の増加を CoCoMo-qPCR 法で測定し、全ウシ遺伝子の mRNA の発現を次世代シーケンサーを用いて解析した。抗原提示に関与する MHC 遺伝子の中で、発現が強くみられたものは、BoLA-A、JSP.1、DQB、DRB3、DQA5、DQA2、DRA、NC1、DMA、DMB、TAP1 などであった。一方、BoLA-DYA、DYB、DSB といった、反芻動物特異的な MHC 遺伝子や発現が弱いとされている DRB2 の発現は非常に弱かった。驚いたことに BoLA-DQA1 遺伝子の発現は殆ど見られず、この感受性ハプロタイプの特徴である可能性が考えられた。

最終年度では、国内のウシの BoLA-DRB3 タイピングを行い、異なるハプロタイプを有する個体 10 頭 (DRB3\*12:01/14:01, \*14:01/\*16:01, \*16:01/\*16:01, \*05:03/\*12:01, \*02:01/\*15:01, \*07:01/\*10:01, \*07:01/\*09:02, \*07:01/\*14:01, \*11:01/\*12:01, \*10:01/\*11:01) を選抜し、次世代シーケンサーを用いて BoLA 領域のターゲット・リシーケンスを実施した。最終年度ではリファレンスとなるウシゲノムシーケンスとして 2018 年に新たに報告された ARS-UCD1.2 と 2004 年から用いられている UMD3.1 の比較を行った。さらに、BoLA 領域全長をカバーするプローブ設計を、遺伝子領域のみ、あるいは遺伝子のない領域も含む全領域の二種類について行い、そのタイピング効率を比較した。最終的に BoLA 領域内の疾患関連 SNP を見いだすために用いる最適なターゲットリシーケンス法として、リファレンスゲノムは ARSUCD1.2 を用い、遺伝子のない領域も含めた、ウシ 23 番染色体 6.98Mbase-7.59 および

25. 40Mbase-28.96Mbase の領域に設定したプローブを選定した。これらのプローブを用いたターゲットリシーケンスを、10種類の遺伝子型を有する個体を用いて実施し、10頭でx70~x148倍と、十分なシーケンス深度が得られた。また、得られたシーケンス情報と、サンガー法によるBoLA-DRB3遺伝子の塩基配列を比較したところ、全ての個体について正確にSNPがタイピングできていたことが確認され、本方法がBoLA領域内の疾患関連SNPの探索に適している事が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

- 1: Takehima SN, Ohno A, Aida Y. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology*. 2019 May 16;16(1):14. doi: 10.1186/s12977-019-0476-z. PubMed PMID: 31096993;PubMed Central PMCID: PMC6524304. 査読有り
- 2: Benitez OJ, Roberts JN, Norby B, Bartlett PC, Takehima SN, Watanuki S, Aida Y, Grooms DL. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. *J Am Vet Med Assoc*. 2019 Jun 1;254(11):1335-1340. doi: 10.2460/javma.254.11.1335. PubMed PMID: 31067187. 査読有り
- 3: Bai L, Yokoyama K, Watanuki S, Ishizaki H, Takehima SN, Aida Y. Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. *Arch Virol*. 2019 Jan;164(1):201-211. doi: 10.1007/s00705-018-4058-5. Epub 2018 Oct 11. PubMed PMID: 30311076. 査読有り
- 4: Murakami H, Uchiyama J, Suzuki C, Nikaido S, Shibuya K, Sato R, Maeda Y, Tomioka M, Takehima SN, Kato H, Sakaguchi M, Sentsui H, Aida Y, Tsukamoto K. Variations in the viral genome and biological properties of bovine leukemia virus wild-type strains. *Virus Res*. 2018 Jul 15;253:103-111. doi: 10.1016/j.virusres.2018.06.005. Epub 2018 Jun 18. PubMed PMID: 29913249. 査読有り
- 5: Takehima SN, Corbi-Botto C, Giovambattista G, Aida Y. Genetic diversity of BoLA-DRB3 in South American Zebu cattle populations. *BMC Genet*. 2018 May 22;19(1):33. doi: 10.1186/s12863-018-0618-7. PubMed PMID: 29788904; PubMed Central PMCID: PMC5964877. 査読有り
- 6: Polat M, Takehima SN, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J*. 2017 Nov 2;14(1):209. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4. Review. PubMed PMID: 29096657; PubMed Central PMCID: PMC5669023. 査読有り
- 7: Takehima SN, Sasaki S, Meripet P, Sugimoto Y, Aida Y. Single nucleotide polymorphisms in the bovine MHC region of Japanese Black cattle are associated with bovine leukemia virus proviral load. *Retrovirology*. 2017 Apr 4;14(1):24. doi: 10.1186/s12977-017-0348-3. PubMed PMID: 28376881; PubMed Central PMCID: PMC5379713. 査読有り
- 8: Polat M, Moe HH, Shimogiri T, Moe KK, Takehima SN, Aida Y. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. *Arch Virol*. 2017 Feb;162(2):425-437. doi: 10.1007/s00705-016-3118-y. Epub 2016 Oct 22. PubMed PMID: 27771791. 査読有り
- 9: 竹嶋 伸之輔, 大附 寛幸, 白らんらん, 間 陽子 BLV のワクチン開発 (特集 牛白血病ウイルス(BLV)に対する理研の挑戦) 獣医畜産新報 70(12) 909-916, 2017 査読有り
- 10: 間 陽子, 竹嶋 伸之輔, 陸 拾七 BLV 抵抗性・感受性の診断技術と新しい牛白血病制圧戦略 (特集 牛白血病ウイルス (BLV) に対する理研の挑戦) 獣医畜産新報 70(12);901-908,2017 査読有り
- 11: 竹嶋伸之輔 若齢牛の地方病性牛白血病 (特集 牛の疾患 : 最近のトピックス) 獣医畜産新報 70(9) 666-670,2017 査読有り
- 12: 竹嶋伸之輔・綿貫園子・間陽子 牛白血病対策の新技术に迫る(3)獣医臨床 1;26-31, 2017 査読有り
- 13: 竹嶋伸之輔・綿貫園子・間陽子 牛白血病対策の新技术に迫る(1) 獣医臨床 34;34-40, 2016 査読有り
- 14: 竹嶋伸之輔・綿貫園子・間陽子 牛白血病対策の新技术に迫る(2) 獣医臨床 12;30-35, 2016 査読有り

[学会発表](計 15 件)

1. 竹嶋伸之輔・大野歩・間陽子 ホルスタイン種における牛白血病抵抗性・感受性を規定するウシ主要組織適合遺伝子複合体クラス II アリルの同定 日本獣医師会 2018
2. 竹嶋伸之輔・佐々木慎二・Polat Meripet, 杉本喜一・間陽子 全ゲノム相関解析による牛白血病ウイルスのプロウイルス量を制御する新規宿主因子の同定 日本獣医学会 2017

3. 竹嶋伸之輔、佐々木慎二、Polat Meripet、杉本喜一、間陽子 ゲノムワイド相関解析を用いた牛白血病ウイルスの病態進行を制御する新規宿主遺伝子の同定 日本 HTLV 学会 2017
4. 竹嶋伸之輔、佐々木慎二、Polat Meripet、杉本喜一、間陽子 牛白血病ウイルスの病態進行を規定するプロウイルス量を制御する新規宿主因子の全ゲノム相関解析による同定 日本組織適合性学会 2017
5. Shin-nosuke Takeshima, Shinji Sasaki, Polat Meripet, Yoshikazu Sugimoto, Yoko Aida Chromosome 22 and chromosome 23 associated with the development of BLV infection determined by a genome-wide association study, HTLV and Related Viruses (国際学会), 2017
6. Shin-nosuke Takeshima, Shinji Sasaki, Polat Meripet, Yoshikazu Sugimoto, Yoko Aida CNTN3 rs110616206, MHC class III rs29026690 and MHC class I rs17872126 associated with the development of BLV infection determined by a genome-wide association study International Workshop on Retroviral Pathogenesis (招待講演)(国際学会), 2017
7. Shin-nosuke Takeshima, Shinji Sasaki, Polat Meripet, Yoshikazu Sugimoto, Yoko Aida Single nucleotide polymorphism in the bovine MHC region of Japanese black cattle are associated with bovine leukemia virus proviral load, International society of animal genetics (国際学会) 2017
8. Yoko Aida, Lanlan Bai, Jiyun Kim, Pan He, Yuki Matsumoto, Noriaki Okimoto, Junya Yamagishi, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Junko Kohara, Shin-nosuke Takeshima A Vaccine Targeting Bovine Leukemia Virus Susceptible Cattle Suppresses Proviral Load 第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会) 2017.3.7-2017.3.10
9. M Polat, S Takeshima, A Ohno, T Miyasaka, J Kim, M K, Y Matsumoto, K Yamada, M Arainga, T Murakami, K Hosomichi, V de la Barra Diaz, CJ Panei, ET Gonzalez, G Giovambattista, M Kanemaki, C N Mingala, HH Moe, KK Moe, T Shimogiri, M Onuma, Y Aida Molecular Genetic Analysis of Bovine Leukemia Virus (BLV) Worldwide .第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会) 2017.3.7-2017.3.10
10. Sonoko Watanuki, Shin-nosuke Takeshima, Yasunobu Matsumoto, Hiroshi Ishizaki, Kazuhiro Matoba, Yoko Aida. A novel CoCoMo Direct PCR Assay Detects Bovine Leukemia Virus from a Drop of Whole Blood 第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会) 2017.3.7-2017.3.10
11. Hiroyuki Otsuki, Saeki Negishi, Lanlan Bai, Hirotaka Sato, Shin-nosuke Takeshima, Yoshitaka Imaizumi, Yasuko Nagai, Atsushi Iwamoto, Taichi Noro, Satoshi Sakamoto, Yuki Yamaguchi, Hiroshi Handa, Eiji Oishi, Yoko Aida Development of a Bovine Leukemia Virus-like Particle Vaccine and Its Immunogenicity in Mice and Cattle 第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会) 2017.3.7-2017.3.10
12. Lanlan Bai, Hiroyuki Otsuki, Hirotaka Sato, Shin-nosuke Takeshima, Yoko Aida. Determination of Common B Cell Epitope in Bovine Leukemia Virus and Its Antibody Binding Sites 第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会)
13. Shin-nosuke Takeshima, Shinji Sasaki, Polat Meripet, Yoshikazu Sugimoto, Yoko Aida Chromosome 22 and Chromosome 23 Associated with the Development of BLV Infection Determined by a Genome-wide Association Study 第 18 回国際 HTLV 会議 (国際学会)
14. 竹嶋伸之輔・細道一善・万年英之・国枝哲夫・印牧美佐生・下桐猛・間陽子 日本在来牛と黒毛和種のウシ MHC 領域のリシーケンスによる比較 第 25 回日本組織適合性学会大会 2016.10.22-2016.10.24
15. 竹嶋伸之輔・細道一善・万年英之・国枝哲夫・印牧美佐生・下桐猛・間陽子 見島牛・口之島牛および黒毛和種のウシ主要組織適合遺伝子領域のリシーケンスによる比較解析 日本動物遺伝育種学会第 17 回大会 2016.11.5

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。