

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16203

研究課題名(和文) 宿主個体群遺伝構造に応じた新興病原ウイルスの進化プロセスの解明

研究課題名(英文) Effect of the genetic structure of a host species on the evolution of an emerging pathogenic virus

研究代表者

内井 喜美子(Uchii, Kimiko)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：90469619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：2004年に同一株が琵琶湖へと人為導入されたコイヘルペスウイルス(CyHV3)をモデルとし、宿主コイの個体群遺伝構造の違いに応じた病原体の進化プロセスの評価を試みた。CyHV3への抵抗性は、日本在来系統のコイで低くユーラシア大陸産の外来系統で高いことが知られる。そこで宿主個体群遺伝構造の指標として、環境DNA分析により在来/外来遺伝子型頻度を定量的に解析したところ、琵琶湖の地域間で差異が検出された。CyHV3の4つの病原性遺伝子については、CyHV3導入後数年内は地域間での変異は検出されなかった。導入10年後以降については、1つの遺伝子のみ解析した結果、地域間での遺伝変異は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：A single strain of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3), which causes lethal disease in common carp, was introduced to Lake Biwa in 2004. The susceptibility to CyHV3 differs between common carp genotypes, where Japanese native strains are less resistant to the virus. I tried to evaluate the difference in mutation pattern of virulence-related genes of CyHV3 between host carp populations with different genetic structures, i.e., frequency of native and non-native genotypes. Using environmental DNA analysis, differences in population genetic structure were detected between local populations. However, no difference was found in mutation rate of the four CyHV3 genes.

研究分野：生態学

キーワード：野生生物感染症 新興感染症 環境DNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年の野生生物新興感染症の世界的な発生増大は (Daszak *et al.* 2000)、生物多様性への重大リスクとなっている。生態系における野生生物新興感染症の動態や、それによる野生生物絶滅リスクの評価は、保全学的に喫緊の課題である。感染症動態は宿主と病原体の密接な相互作用によって駆動される。新興感染症は、しばしば人為拡散によって同一の病原体が複数の地域に同時に導入される。そのような場合、宿主個体群間の遺伝的構造の違いは、宿主-病原生物相互作用を通じ、感染症動態に大きな影響を与えられ考えられる。宿主個体群の遺伝的構造の違いが、新興感染症の動態に及ぼす影響の評価は、新興感染症動態メカニズムの解明において重要な課題の一つである。

コイヘルペスウイルス (*Cyprinid herpesvirus 3*; CyHV3) 感染症は、1990年代に初めて出現し、2003年以降、日本の養殖および野生のコイ (*Cyprinus carpio*) に蔓延した (Matsui *et al.* 2008)。当初日本に導入された CyHV3 はすべて同一の遺伝子型を持っており (Kurita *et al.* 2009)、単一クローンに由来した可能性が極めて高い。宿主となるコイにおいては、日本固有の在来系統とユーラシア大陸から人為導入された外来系統の間で、CyHV3 への抵抗性が異なることが知られる (Ito *et al.* 2014)。したがって、コイ個体群における在来 / 外来遺伝子頻度は、CyHV3 との相互作用を左右する重要な宿主個体群遺伝構造となると考えられる。琵琶湖においては 2004 年春季に CyHV3 によるコイの大量死が発生したが、発生前の北西部、東部、南部のコイ地域個体群について、mtDNA における在来コイと外来コイ由来の遺伝子頻度が明らかにされている。発生以前の在来遺伝子頻度は、北西部個体群において高く (約 90%)、東部は中程度 (約 60%)、南部は低頻度 (<50%) であった (馬淵ら 2010)。し

たがって、遺伝的構造を異にする北西部、東部、南部のコイ地域個体群に CyHV3 が同時に導入されたと想定できる。このような特徴を持つ CyHV3 感染症を用いることにより、宿主個体群の遺伝的構造に応じた新興感染症動態の違いを検証できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、宿主個体群間の遺伝的構造の違いに応じた病原体の変異・進化プロセスを、CyHV3 感染症をモデルとして評価することを目的とした。とくに、宿主の個体密度依存的に伝播する病原体に想定される強毒性から弱毒性への進化に着目し、宿主個体群における在来 / 外来遺伝子頻度が、CyHV3 の弱毒化に及ぼす影響について検証することを目的とした。宿主個体群遺伝構造解析においては、報告者が開発済みの環境 DNA を用いたミトコンドリア DNA (mtDNA) における在来 / 外来遺伝子頻度の迅速推定法 (Uchii *et al.* 2016) を、従来の mtDNA を標的とした手法から、核遺伝子座における在来 / 外来遺伝子頻度の推定にまで拡張することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 宿主個体群遺伝構造の解析

CyHV3 導入前および CyHV3 導入後早期 (2006-2007 年) における琵琶湖の地域個体群における mtDNA の在来 / 外来遺伝子頻度は、先行研究により報告されている (馬淵ら 2010; Uchii *et al.* 2013)。そこで本研究ではまず、CyHV3 侵入後 10 年以降のコイ地域個体群の遺伝的構造を、mtDNA を対象として開発された環境 DNA 手法 (Uchii *et al.* 2016) を用いて解析した。琵琶湖の各調査地点より水を採取し、吸引ろ過 (500 mL / フィルター) により GF/F フィルター (GE Healthcare Japan) 上に環境 DNA を捕集した。その後、DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) を用いて抽出した環境 DNA を鋳型とし、在来

DNA と外来 DNA 間の一塩基多型を区別するプローブ（一塩基多型部のみを RNA で置き換えた DNA プローブ）と RNA 分解酵素を用いたリアルタイム PCR により、在来 / 外来遺伝子頻度を定量した。本手法を用いれば、在来（または外来）DNA の割合が 5% から 95% の間で定量可能であることが分かっている。

さらに、迅速な遺伝構造解析を可能とする環境 DNA 分析を、核遺伝子にまで拡張するための手法開発を行なった。母系遺伝をする mtDNA に比べ、核 DNA を標的とすることにより、より正確な遺伝構造を推定することができると考えられる。そこで Uchii et al. (2016) で用いたリアルタイム PCR 法を核遺伝子座に適用し、在来 / 外来遺伝子頻度の定量性を標準 DNA を用いた実験で検証した。さらに開発した環境 DNA 手法を用い、在来コイと外来コイを異なるバイオマス比で飼育した水槽水より抽出した環境 DNA における在来 / 外来遺伝子頻度を測定し、実際のバイオマス比との整合性について検証した。

#### (2) CyHV3 の遺伝解析

CyHV3 の病原性に関わる遺伝子として、チミンキナーゼ (TK) 遺伝子と 3 つの膜糖タンパク質遺伝子を選定した。TK 遺伝子には CyHV3 系統間で変異が生じていると同時に (Kurita et al. 2009) その不活化は、CyHV3 に近縁な *Ictalurid herpesvirus 1* を含む様々なヘルペスウイルスの病原性を低下させることが知られる (Zhang & Hanson 1995)。宿主細胞への侵入に関与するウイルス膜上の糖タンパク質はウイルス病原性に影響するが、CyHV3 においては 3 つの膜糖タンパク質遺伝子における変異が報告されている (Han et al. 2013)。

遺伝子解析には、琵琶湖の各地域において、CyHV3 導入後早期 (2006-2007 年) および導入後 10 年以降の段階に採集されたウイルス DNA 試料を用いた。導入後早期の CyHV3 試料

はコイ組織から抽出されたものであり、導入後 10 年以降の CyHV3 試料は、琵琶湖の各調査地点より採取した水からろ過濃縮法にてウイルス粒子を回収することにより得たものである。これらの試料を用い、CyHV3 の対象 4 遺伝子を先行研究 (Kurita et al. 2009; Han et al. 2013) により設計されたプライマーを用いて PCR 増幅した後、サブクローニングにより各遺伝子につき 20 から最大 50 個程度のクローンを分離した。得られたクローンの塩基配列を決定し、強毒性の KHV-J 株からの変異の有無を判定し、各遺伝子の変異頻度を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 宿主個体群遺伝構造と CyHV3 の遺伝変異の関係

mtDNA を標的とした宿主個体群遺伝構造解析においては、CyHV3 導入前および導入後早期において、琵琶湖の地域個体群間での差異が報告されている。本研究で実施した、CyHV3 侵入後 10 年以上を経た 2014-2017 年に採取された環境 DNA 試料を用いた遺伝構造解析においても、各地域個体群間で導入前・導入後早期と同様の差異が検出された。ただし、侵入前と比較して、在来遺伝子頻度は全体的に低下していた。

CyHV3 の遺伝解析においては、CyHV3 導入から数年以内は、対象とした 4 遺伝子については地域間で変異は見られなかった。導入 10 年後以降においては、環境水から十分量の CyHV3 を回収することが困難であったため、一つの遺伝子のみ解析した結果、地域間での遺伝変異は見られなかった。このように、宿主の地域個体群間での遺伝的構造の差異は検出されたものの、本研究期間中に、宿主個体群遺伝構造に応じた CyHV3 の遺伝変異の差異を検出することはできなかった。

(2) 環境 DNA を用いた個体群遺伝構造解析法の核遺伝子座への拡張  
 在来遺伝子型および外来遺伝子型の標準 DNA を異なる割合で混ぜた混合液を用いた実験により、一塩基多型を区別するプローブと RNA 分解酵素を用いたリアルタイム PCR によって、在来（または外来）DNA の割合がおよそ 10-90% の範囲において、在来 / 外来遺伝子頻度を正確に定量することができた。本リアルタイム PCR 手法を用いて、在来コイと外来コイを異なるバイオマス比で飼育した水槽水より抽出した環境 DNA を分析したところ、実際のコイのバイオマス比と DNA 比の間には、ほぼ 1:1 の有意な相関が検出された（図 1）。したがって、環境 DNA 分析を用いた、核遺伝子座を標的とした宿主遺伝構造解析の有効性が示された。

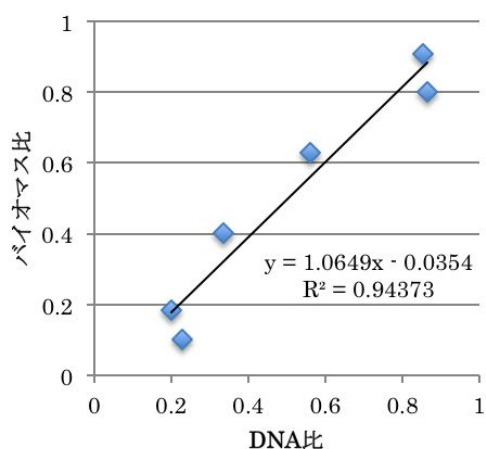


図 1. 核遺伝子座を標的とした環境 DNA 分析より定量された在来 / 外来 DNA 比と、実際のコイのバイオマス比（在来 / 外来）の関係。

< 引用文献 >

Daszak P et al. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-Threats to biodiversity and human health. *Science* 287(5452): 443-449  
 Matsui K et al. (2008) Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater*

*Biology* 53(6): 1262-1272

Kurita J et al. (2009) Molecular epidemiology of koi herpesvirus. *Fish Pathol* 44(2): 59-66

Ito T et al. (2014) Differences in the susceptibility of Japanese indigenous and domesticated Eurasian common carp (*Cyprinus carpio*), identified by mitochondrial DNA typing, to cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Vet Microbiol* 171(1-2): 31-40

馬淵ら (2010) 琵琶湖におけるコイの日本在来 mtDNA ハプロタイプの分布. *魚類学雑誌* 57(1): 1-12

Uchii K et al. (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16(2): 415-42

Uchii K et al. (2013) An emerging infectious pathogen endangers an ancient lineage of common carp by acting synergistically with conspecific exotic strains. *Animal Conservation* 16(3): 324-330

Zhang HG & Hanson LA (1995) Deletion of thymidine kinase gene attenuates channel catfish herpesvirus while maintaining infectivity. *Virology* 209(2): 658-663

Han JE et al. (2013) Identifying the viral genes encoding envelope glycoproteins for differentiation of *Cyprinid herpesvirus 3* isolates. *Viruses-Basel*, 5(2): 568-576

5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

Uchii K, Doi H, Yamanaka H, Minamoto T (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and

non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA. Ecology and Evolution 7(20): 8515-8522.

(DOI:10.1002/ece3.3346) 査読有

内井喜美子(2017)環境DNAによる外来種および希少種の迅速な検出. 環境技術 46:630-635. 査読無

源利文, 内井喜美子, 高原輝彦, 土居秀幸(2017)環境DNAモニタリング手法の課題と展望. 環境技術 46:648-652. 査読無

[学会発表](計4件)

内井喜美子, 源利文. 環境DNAを用いて宿主と病原生物の動態を探る. 第65回日本生態学会, 2018年

内井喜美子, 土居秀幸, 山中裕樹, 源利文. 核DNAマーカーを用いた環境DNA分析. 日本陸水学会第82回大会, 2017年

内井喜美子, 土居秀幸, 山中裕樹, 源利文. 核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析. 第64回日本生態学会, 2017年

内井喜美子, 土居秀幸, 源利文, 山中裕樹. 環境DNA研究におけるSNPマーカーの活用. 日本陸水学会第81回大会, 2016年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内井 喜美子 (UCHII, Kimiko)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号: 90469619