

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05943

研究課題名（和文）牛伝染性リンパ腫ウイルスの感染評価系の構築とエンベロープ多様性の解析

研究課題名（英文）Analysis of Bovine leukemia virus envelope diversity development of its evaluation system

研究代表者

小林 朋子 (Tomoko, Kobayashi)

東京農業大学・農学部・准教授

研究者番号：30647277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）は1878年に報告され、その後世界中に蔓延した。BLVはエンベロープ配列の多様性から11種類の遺伝子型に分類され、それらの遺伝子型の分布は地理的に偏りがあることが報告されている。本研究では、アジア各地から採取したウシ科動物について、BLV配列を取得し、系統地理学的解析を行った。その結果、BLVは家畜ウシ系統と在来牛系統の二つに分かれること、ヤク由来BLVの特定のアミノ酸変異がヤクへの適応進化を示していることが明らかとなった。また、BLV感染定量法の開発を試み、テトラシステインタグ挿入BLVの作製と感染性評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、BLVのエンベロープ配列の多様性が、宿主であるウシ科動物の種類と関連すること、また、ヤクが新たな感染宿主として、家畜牛由来のウイルスが適応進化していることを示した。そして、世界的な牛の貿易によりBLVが世界中に拡散したことを示した。さらに、BLV感染を定量できるような実験系の構築を目指した。その結果、非特異的反応がみられる場合もあるが、タグ付きタンパク質を発現するウイルス粒子により、感染細胞が特異的に蛍光を発することを示した。これらの解析結果は、ウイルスの適応進化や世界的な拡散過程をあきらかにするだけでなく、感染定量化についても可能となった。

研究成果の概要（英文）：Bovine leukemia virus (BLV) was first reported in Germany in 1878 and spread globally with increased cattle trade. BLV, an enveloped virus is classified into 11 genotypes with specific geographic distributions. This study aimed to analyze BLV envelope sequence diversity and host relationships and develop a method to evaluate this diversity's impact on BLV infectivity. Using the PAML4.8 site model, five amino acid sites in Yak-derived BLV sequences showed positive selection, suggesting adaptation to Yaks.

To develop a quantitative infectivity assay, a tetracysteine tag was inserted into the BLV genome to create an infectious clone (pBLV-TCtag). HeLa cells infected with the supernatant and treated with ReAsH showed higher fluorescence, but non-specific fluorescence indicated a need for refinement. The study showed BLV envelope proteins evolve for optimized infection in different hosts and developed a quantitative infection assay, though further improvement is needed.

研究分野：ウイルス学

キーワード：牛伝染性リンパ腫ウイルス 牛伝染性リンパ腫 レトロウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫は、1878年にドイツのメーメル地方で地方病的に報告されてから、牛の流通の活発化と共に世界中に蔓延した。20世紀半ばには、ほとんどの国において牛伝染性リンパ腫が報告されるようになった。原因ウイルスである牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) は 8720bp の一本鎖 RNA をゲノムとする、エンベロープウイルスである。BLV のエンベロープ配列は、BLV ゲノム中で最も多様性に富むことから、遺伝子型の分類に使われている。これまでに、エンベロープの配列多様性から、BLV は 11 種類の遺伝子型に分類され、各遺伝子型の分布地域には偏りがあることが報告されている。実験感染では、BLV は様々な動物に感染可能であるが、自然感染するのは主にウシ科動物だけである。BLV は、家畜ウシ (*Bos taurus*) 以外にも、アジアにのみ生息しているアジア在来牛、暑熱地域にて主に飼養されているゼブ牛 (*B. indicus*)、高地に生息するヤク (*B. grunniens*) など、多様な地域に適応した在来牛にも感染していることが報告されている。これらの感染宿主であるウシ科動物の地域分布と、エンベロープ配列による BLV 遺伝子型の地域分布には、何らかの関連がある可能性がある。なぜなら、エンベロープ蛋白質は、細胞への結合から侵入という BLV 感染の最初のステップに関連する蛋白質であり、BLV が様々な宿主に感染する中で、それぞれの宿主に適応してエンベロープの構造を変化させ、より感染効率のよい形に変化していることが考えられるからである。つまり、最も世界に蔓延しているような遺伝子型は、世界で最も飼養頭数の多い家畜ウシ (*Bos taurus*) に効率よく感染するようなエンベロープ配列をもつ可能性がある。しかしながら、エンベロープ配列の違いが本当に宿主域と関連しているのか、また、遺伝子型の違いが宿主受容体への適応の結果なのか、については、不明のままであった。

遺伝子型によるウイルスの感染性の違いは、ウイルスゲノム全長を発現するようなプラスミドを作製し、さらに作製したプラスミド上にて、エンベロープ配列をさまざまな遺伝子型のエンベロープに置換することにより、評価できる。作製したプラスミドを細胞に形質転換し、各遺伝子型のエンベロープ配列をもつウイルス粒子を作製し、標的細胞に感染させ、感染率を評価する。BLV に関しても BLV ゲノムを発現するプラスミドがいくつか報告されており、配列自体に人為的に遺伝子を導入することは容易である。しかし、感染を定量化できるような実験系がほとんどなく、標的細胞への感染率を評価することが難しかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、BLV エンベロープ配列の多様性と感染宿主との関連を系統地理学的に解析し、その意義を考察するとともに、その多様性の BLV 感染性への影響を評価できるような、BLV 感染定量法の検討を目的とした。

3. 研究の方法

アジア在来牛から BLV 配列を取得し、系統地理学的解析を行うため、11 カ国で収集された 256 頭のゼブ牛 (*B. indicus*)、16 頭の在来牛 (*B. taurus*)、268 頭のヤク (*B. grunniens*)、および 8 頭の水牛 (*Bubalus bubalis*) の DNA を使用した。さらに、マダガスカル島の 37 頭のゼブ牛の DNA についても解析を行った。

4. 研究成果

これらのうち、ブータン、カンボジア、ラオス、ミャンマー、フィリピン、ベトナム、およびマダガスカル島のゼブ牛の DNA、カザフスタンの在来牛、および中国、ネパール、パキスタンのヤクの DNA から PCR 法により BLV 遺伝子が検出された。そこで、BLV エンベロープ配列を得るために PCR により 1304bp の断片を増幅し、シーケンス解析を行った。得られた配列を、GenBank に登録

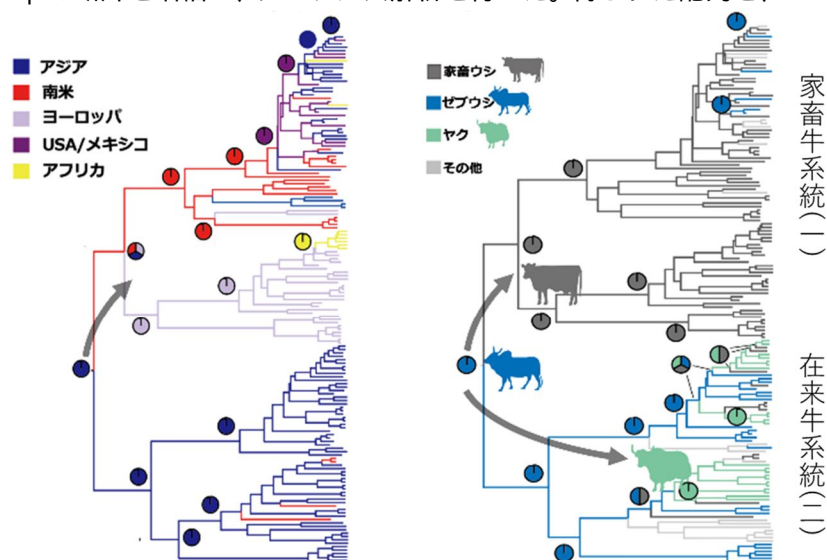


図 1. 地域情報および宿主情報を加味した系統地理学的解析

されている BLV エンベロープ配列のうち宿主および採取地域情報が付随している配列と共に、最尤法による系統解析を行った。その結果、これらの配列は、大きくふたつの系統、すなわち家畜ウシ系統（系統1）と、在来牛系統（系統2）に分けられることが分かった（図1）。この系統2に分類された63配列について、エンベロープ配列上の正の選択を受けたアミノ酸部位を検出するため、PAML4.8サイトモデルを用いて解析を行った（図2）。その結果、ヤク（*B. grunniens*）由来 BLV エンベロープ配列について、宿主のレセプター結合部位と推定される部位に存在する5アミノ酸について、非同義置換/同義置換の値が1.0以上であり、これらのアミノ酸については、ヤクへの感染に適応した結果であることが示唆された。時間軸を考慮した系統解析の結果からも、ヤク由来 BLV 配列の共通祖先の存在時期は比較的最近であることから、BLV はエンベロープを変化させながら宿主域を拡大しヤクに適応してきたことが示唆された。また、様々な BLV 配列の系統解析を、宿主情報および地域情報と共に解析したことにより、BLV の共通祖先配列が、アジアのゼブ牛由来であることも明らかとなった。

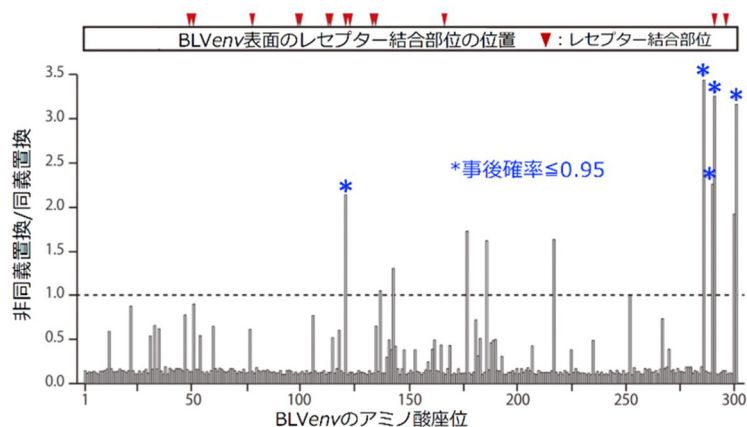


図2. ヤク由来BLVのレセプター結合部位とそれぞれのアミノ酸における選択圧解析

次に、BLV 感染性への影響を評価できるような、BLV 感染定量法の検討を行うため、テトラシステインタグ配列を BLV ゲノム上に挿入し、感染を定量可能な BLV 感染性分子クローン (pBLV-TCtag) の作製を目指した。作製した分子クローンを 293 細胞に形質転換し、上清中に放出されたウイルス RNA をリアルタイム PCR により定量したところ、テトラシステインタグを導入していない感染性分子クローンと同程度のウイルス RNA が検出された。この上清を HeLa 細胞に感染させ、テトラシステインタグと結合すると蛍光を発する ReAsH を反応させ、フローサイトメーターにより蛍光強度の測定を行った。その結果、TCtag 挿入 BLV を感染させた細胞は感染していない細胞と比較すると高い蛍光強度を示すことが分かった（図3）。しかしながら、この定量系では、ReAsH による非特異的な蛍光が検出され、TCtag 挿入 BLV を導入していない細胞においても蛍光が検出される場合があり、今後さらなる詳細検討が必要であることが示された。

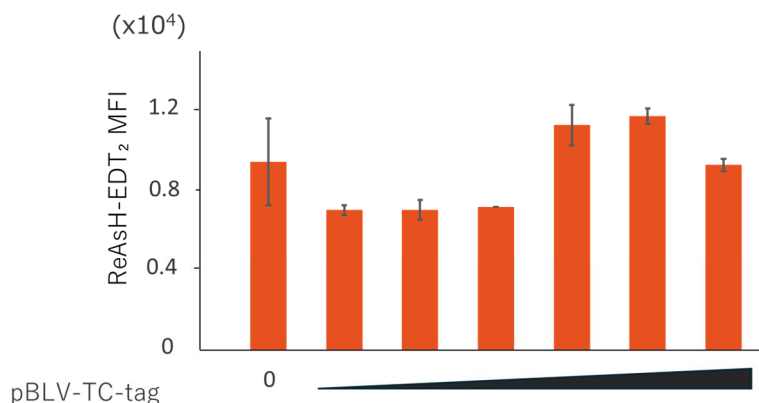


図3. テトラシステインタグ付加BLV粒子の感染性解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishikaku Kohei, Yonezawa Takahiro, Nishibori Masahide, Harada Masashi, Kawaguchi Fuki, Sasazaki Shinji, Torii Yasushi, Imakawa Kazuhiko, Kawai Kuniko, Liu Jianquan, Mannen Hideyuki, Kobayashi Tomoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Phylogenomics and Spatiotemporal Dynamics of Bovine Leukemia Virus Focusing on Asian Native Cattle: Insights Into the Early Origin and Global Dissemination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.917324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 NISHIKAKU Kohei, NOGUCHI Tatsuo, MURAKAMI Satoshi, TORII Yasushi, KOBAYASHI Tomoko	4. 巻 84
2. 論文標題 Molecular analysis of bovine leukemia virus in early epidemic phase in Japan using archived formalin fixed paraffin embedded histopathological specimens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 350 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hossain Md Belal, Kobayashi Tomoko, Makimoto Sakurako, Matsuo Misaki, Nishikaku Kohei, Tan Benjy Jek Yang, Rahman Akhinur, Rajib Samiul Alam, Sugata Kenji, Ohnuki Nagaki, Saito Masumichi, Inenaga Toshiaki, Imakawa Kazuhiko, Satou Yorifumi	4. 巻 97
2. 論文標題 Clone Dynamics and Its Application for the Diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01542-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西角 光平, 稲永 敏明, 西 明仁, 米澤 隆弘, 野口 龍生, 鳥居 恭司, 今川 和彦, 小林 朋子	4. 巻 26 (2)
2. 論文標題 褐毛和種におけるBoLA-DRB3遺伝子の多様性解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The journal of veterinary epidemiology	6. 最初と最後の頁 108-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kohei Nishikaku, Tatsuo Noguchi, Satoshi Murakami, Yasushi Torii, Tomoko Kobayashi	4. 巻 84
2. 論文標題 Molecular analysis of bovine leukemia virus in early epidemic phase in Japan using archived formalin fixed paraffin embedded histopathological specimens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 350-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 牧元 櫻子、Md Belal Hossain、松尾 美沙希、大貫 永輝、Akhinur Rahman、西角 光平、鳥居 恭司、稲永 敏明、今川 和彦、佐藤 賢文、小林 朋子
2. 発表標題 RAIS法による牛伝染性リンパ腫の発症診断法の検討
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 真琴、須田 義人、草間 和哉、今川 和彦、小林 朋子
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)感染に関するゲノムワイド関連解析
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 朋子
2. 発表標題 畜産の発展と牛伝染性リンパ腫ウイルスの過去・現在・未来
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林朋子、塩崎翔太、西角光平
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルスの血中プロウイルス量の推移および牛伝染性リンパ腫発症との関連
3. 学会等名 第61回獣疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西角光平、佐々木瞭、牧元櫻子、野口龍生、鳥居恭司、小林朋子
2. 発表標題 ELISpot法を用いた牛伝染性リンパ腫ウイルス特異的免疫応答の解析
3. 学会等名 第61回獣疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧元櫻子、Md Belal Hossain、松尾美沙希、大貫永輝、 Akhinur Rahman、佐藤賢文、小林朋子
2. 発表標題 BLV感染細胞のクローナリティを指標とした牛伝染性リンパ腫発症診断方法の検討
3. 学会等名 第59回獣疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------