

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450405

研究課題名(和文) 日本在来牛および黒毛和種の比較解析による牛白血病感受性・抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Determination of bovine leukemia virus susceptible and resistant gene by the comparison of Japanese native cattle with Japanese Black cattle

研究代表者

竹嶋 伸之輔 (Takeshima, Shin-nosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット・研究員

研究者番号：60342812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：黒毛和種の有する牛白血病感受性・抵抗性遺伝子と日本在来牛である口之島牛および見島牛の遺伝子領域を次世代シーケンサーを用いてリシーケンスし、その比較により疾患感受性遺伝子の起源を探った。12頭の口之島牛、11頭の見島牛および10頭の黒毛和種のBoLA領域のSNPを解析したところ、感受性BoLAハプロタイプは日本在来牛が有するハプロタイプと近縁の遺伝子であったが、抵抗性遺伝子遺伝子は共通性が乏しく、海外から流入してきた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We sequenced bovine major histocompatibility complex region for 12 of Kuchinoshima cattle, 11 of Mishima cattle and 10 Japanese black cattle by target re-sequencing method using Next generation sequencer to determine whether the susceptible/resistant genotype for bovine leukemia virus were originated from Japanese native cattle or not. PCA analysis showed that susceptible gene were came from Japanese native cattle but resistant gene were introduced from foreign country.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：日本在来牛、ウシ主要組織適合遺伝子複合体(BoLA) 疾患感受性 ゲノムリシーケンス 牛白血病ウイルス 口之島牛 次世代シーケンサー 見島牛

1. 研究開始当初の背景

牛白血病ウイルス(BLV)は悪性Bリンパ腫である地方病性牛白血病(EBL)を惹起するレトロウイルスである。BLVは抗体が陽転しても体内から排除されずに持続感染し、大きく3つの病態を示す。感染牛のおよそ70%は長期間、全く臨床症状を示さない無症候性キャリアー、30%はCD5陽性Bリンパ球が増加する持続性リンパ球増多症(PL)、そして一部の感染牛(5%以下)は5年から10年の潜伏期間を経て白血病を発症し、必ず死に至る。また、免疫機能の低下し、他の感染症に対する易感染性や、産肉・繁殖力の低下を伴うことから、畜産界に与える被害は甚大である。しかし、発症率は低いと、牛白血病浄化対策が軽視されてきた結果として、最近その発生件数が世界的に急増しており、更なる増大が懸念されている。

実際、国内では1980年および1982年にそれぞれ、乳牛で3.7%、4.2%、肉牛では7.4%、6.0%であったのに対し、2007年度の調査では平均抗体陽性率は28%、そのうち乳用牛は35%、肉用牛は12%と急激な感染率の上昇が確認されている。それに伴い、牛白血病の発生件数は1999年の169件から2008年の1040件への急増している。また、BLVは我が国だけでなく、世界中に分布しており、現在、地方病性牛白血病は国際獣疫事務局(OIE)のリスト疾患の一つに挙げられている。申請者らは、BLV感染の世界的動向を知るために、牛生産で世界有数の南米大陸のアルゼンチン、ペルー、パラグアイ、ボリビア、チリにおいて、平成16年から平成19年の4年間に亘り、12品種、約3000頭の採材を行い、BLV検出を実施した。その結果、アルゼンチンで約60%、ペルーで約40%、ボリビアで約40%、パラグアイで70%、チリで約25%の牛にBLV感染が認められた。また、フィリピンでの調査報告によるとスイギュウで27.6%ものBLVの感染率が報告されており、ウシは更に高い感染率である事が予想されている。このように、BLV感染は世界的レベルで拡大している。

このようにBLVの感染が蔓延してしまった結果、隔離/淘汰によるBLVの排除が大変困難となってきており、近年有効なBLV対策が切実に求められるようになってきた。

申請者らはこれまで、EBLの発症に抵抗性/感受性を示す遺伝性の要因としてウシ主要組織適合遺伝子複合体(BoLA)クラスII DRB3遺伝子の多型性が強く関連していることを明らかにしてきた。BoLA-DRB3遺伝子はウシゲノムのなかで、最も多型性に富む遺伝子で、現在130種類もの対立遺伝子が報告されている。そこで我々は、日本で飼育されている主要な肉牛である黒毛和種、および主要な乳牛であるホルスタイン種において、それぞれ白血病に抵抗性および感受性を示すBoLA-DRB3アレルの探索を行った。その結果、ホルスタイン種において明確な発症感受性アレルおよび抵抗性アレルは見いだされなかったが、黒毛和種においては明らかに抵抗性を示すアレルとしてBoLA-DRB3*0701、DRB3*1101、DRB3*0902を、そしてホモで有すると有意に白血病を発症しやすいBoLA-DRB3*1601を見いだすことに成功した。さらに、申請者らの開発したBLVプロウイルスロードを正確に定量可能なBLV-CoCoMo-qPCR法を用いて、抵抗性個体および感受性個体のウイルスロードを測定したところ、抵抗性個体では有意にウイルスロードが低く、感受性個体では逆にウイルスロードが高い事を明らかにした。この事は、抵抗性牛は自らが発症しにくいだけでなく、他のウシへ感染させる可能性も低く、逆に感受性牛は発症しやすいだけでなくその牛群の感染源となる危険性を孕んでいる事を示している。

一方、申請者らは、黒毛和種のBoLA-DRB3アレルのアレル頻度はホルスタイン種のアレル頻度と非常に良く似ている事を明らかにした。しかしながら、ホルスタイン種では発症/抵抗性に関与するBoLA-DRB3遺伝子が見つからない事から、ウイルスロードの制御能を有するMHCアレルは黒毛和種特有のものである可能性が考えら

れた。そこで、さらに詳細に *DRB3* 遺伝子周辺に存在する多型遺伝子 *DQA1* のタイピングも行い、ハプロタイプを決定し、頻度を解析したところ、*DRB3-DQA1* ハプロタイプはホルスタイン種と黒毛和種でかなり異なっていることを明らかにした。加えて、感受性 *DRB3*1601* アリルを有するハプロタイプは *1601A*, *1601B*, *1601C* の3種類存在するが、このなかで BLV プロウイルスロードの上昇に 関与 する の は *1601B* (*DRB3*1601-DQA1*10012*) のハプロタイプのみであることを明らかにした。一方、同じく黒毛和種牛の調査において BLV プロウイルスロードの上昇を有意に抑制する効果を示す *0902B/C* および *1101A* ハプロタイプも同定された。牛白血病を制御する遺伝子の本体を探るためには、これらのハプロタイプの起源を探ることが非常に有効であると考えられる。

黒毛和種牛は、明治以降日本在来種に西洋種を掛け合わせて各地域で作製された改良和種をもとに役肉兼用種として改良が進められ、その過程で黒毛和種、褐毛和種、無角和種の和牛3品種が成立したとされている。

2. 研究の目的

本研究では、褐毛和種や無角和種、そして、現在まで残されている、祖先種である日本在来種の鹿児島県口之島産・口之島牛および山口県見島産の見島牛の BoLA-*DRB3* 遺伝子および *DQA1* 遺伝子の頻度調査、および BLV の感染状況を調査し、疾患感受性 / 抵抗性 MHC ハプロタイプの起源を探ると共に、その遺伝子の本体を突き止め、BLV 抵抗性遺伝子を指標とした牛白血病を発症しにくいウシを作出するという育種戦略、および発症前診断技術の開発の基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

黒毛和種、その祖先種および日本在来牛をもとに成立した和種のゲノムを収集し、牛白血病抵抗性および感受性を示す BoLA クラス II ハプ

ロタイプを有する個体をそれぞれの品種から特定する。これらのハプロタイプを有するウシのクラス II 領域の全塩基配列を次世代シーケンサーにより決定し、牛白血病感受性および抵抗性遺伝子の起源を探る。

黒毛和種、口之島牛および見島牛のゲノムを収集し、BoLA-*DRB3* および BoLA-*DQA1* 遺伝子のタイピングを行い、BoLA クラス II ハプロタイプの予測を行った。

1) 和牛および日本在来種のサンプリング

黒毛和種 10 頭、口之島牛 39 頭および見島牛 11 頭のゲノム DNA を収集した。

2) BoLA-*DRB3* および *DQA1* タイピング

1) で得られたゲノム DNA を用いて、申請者らの開発した PCR-sequence based typing (SBT) 法を用いて *DRB3* および *DQA1* 遺伝子のアリルをタイピングした。ウシゲノムより PCR にて *DRB3* および *DQA1* 遺伝子の exon 2 の増幅を行い、ABI キャピラリーシーケンサーを用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定する。得られた配列は母方および父方由来の 2 種類の塩基配列を含んでいるため、申請者がウシ用に調整した AssignATF ソフトウェアを用いて解析を行い、アリルの決定を行う。

3) *DRB3-DQA1* クラス II ハプロタイプの決定

2) で得られたアリル情報と、これまで申請者が収集したホルスタイン種および黒毛和種のもつハプロタイプ情報、さらに次世代シーケンサーを用いた古典的 BoLA 遺伝子タイピング法を用いて、収集したウシサンプルの BoLA ハプロタイプを決定した。

4) 摘発とプロウイルスロードの測定

3 つの品種の中から感受性 / 抵抗性ハプロタイプを持つ個体を選定し、次世代シーケンサーを用いた MHC クラス II 領域のリシーケンスにより感受性 / 抵抗性 BoLA 遺伝子の起源を推定した。

4. 研究成果

A) 口之島牛、見島牛および黒毛和種のゲノム遺伝子の収集と遺伝子タイピング

口之島牛 39 頭、見島牛 11 頭および黒毛和種 10 頭のゲノム DNA を収集し、それらの BoLA 遺伝子型およびプロウイルス量の測定を行った(表 1)。その結果、興味深いことに 1 頭を除く全ての個体で DRB3*0201 ホモ型であり、3314 の一頭のみ、DRB3*2801 ホモ型であった。

(表 1) 口之島牛 39 頭の BoLA-DRB3 アリル型

牛番号	BoLA-DRB3 アリル型
3247-1	*0201/*0201
4553	*0201/*0201
4686	*0201/*0201
4491	*0201/*0201
3366	*0201/*0201
4624	*0201/*0201
4556	*0201/*0201
4665	*0201/*0201
3265	*0201/*0201
3865	*0201/*0201
3314	*2801/*2801
4228	*0201/*0201
4687	*0201/*0201
TM23	*0201/*0201
TM47	*0201/*0201
TM53	*0201/*0201
TM55	*0201/*0201
TM57	*0201/*0201
TM59	*0201/*0201
TF16	*0201/*0201
TF28	*0201/*0201
TF32	*0201/*0201
TF34	*0201/*0201
TF36	*0201/*0201
TF38	*0201/*0201
TF40	*0201/*0201
TF48	*0201/*0201
TF50	*0201/*0201
TF54	*0201/*0201
TF56	*0201/*0201
TF60	*0201/*0201

さらに、日本在来牛で、海外の遺伝子の交配が行われていない見島牛 11 頭(M-1 ~ M-11) のゲノム DNA も入手した。

続いて、感受性遺伝子型を有する黒毛和種および抵抗性遺伝子型を有する黒毛和種 10 頭について、次世代シーケンサーをもちいて BoLA クラス I およびクラス II 遺伝子のアリルタイピングを行った(表 2)。

(表 2) 黒毛和種の BoLA 遺伝子型

牛番号	BoLA 遺伝子型(クラス I-クラス II)	抵抗性/感受性
S1	AH128A-DH1601D ホモ型	感受 ^a
S2	AH128A-DH1601D ホモ型	感受 ^a
S3	AH128A-DH1601A/AH020B-DH1601D	-
S4	AH128A-DH1601A/AH020B-DH1601D	-
S5	AH128A-DH1601A/AH020B-DH1601D	-
S6	AH128A-DH1601D ホモ型	感受 ^a
N1	AH020B-DH1501A/AH???-DH2703F	抵抗 ^b
N2	AH020B-DH1501A/AH121A-DH0503A	-
N3	AH020B-DH1501A/AH???-DH1201D	-
N4	AH020B-DH1501A/AH???-DH2703F	抵抗 ^b

a, DH1601D が 1601B に相当する感受性クラス II ハプロタイプ。ホモ型で感受性遺伝子型。
b, DH2703F が抵抗性遺伝子 BoLA-DQA1*0204 を含むクラス II ハプロタイプ。ヘテロ型/ホモ型両者とも抵抗性型。

B) ウシ主要組織適合遺伝子複合体のリシークエンス法の確立

ウシゲノムリファレンスとして、bostau6(UMD_3.1) を選択し、23 番染色体 25,155,544-31,621,350 までの、BoLA 領域全長を含む ELOVL5 から HFE 遺伝子までの領域にプローブを設計した。繰り返し配列を除いた Coverage は 71.2%、全標的領域の塩基配列は 4,868,659bp であった。本プローブを用いて、ウシゲノムより作製した次世代シーケンシング用のライブラリーから BoLA 領域を含む配列をハイブリダイゼーションにより抽出し、Mi-seq により 300bp pair-end でシーケンシングを行った。得られたショートリードシーケンシングは bwa により UMD_3_1 リファレンスゲノムに貼り付けた。

C) ウシ BoLA 領域のリシークエンスと主成分分析による感受性/抵抗性遺伝子の起源の推定

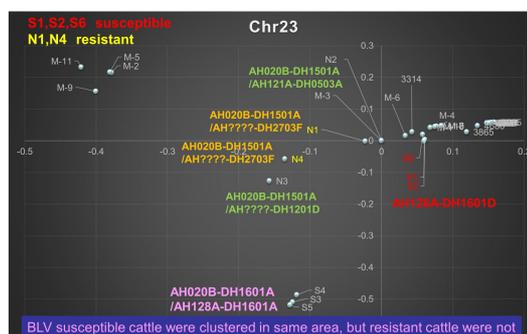


図 1 BoLA 領域の主成分分析

口之島牛 39 頭のほぼ全頭が同じクラス II 遺伝子のホモ型であったため、ほぼ全ての遺伝型が同じである可能性が強く示唆された。そこで、表 1 の太字で示した 12 サンプルを選択し、次世代シーケンス解析に用いた。また、見島牛 11 頭および黒毛和種 10 頭も同様に BoLA 領域のリシーケンス解析に供した。全 33 サンプルの BoLA 領域の変異情報の取得に成功し、それらを用いて、主成分分析を行った(図 1)。

今回使用した感受性遺伝子は、見島牛 11 頭中 7 頭、口之島牛 12 頭全ておよび黒毛和種 10 頭中 5 頭が有する BoLA 遺伝子型と最も近縁な遺伝子である事が示され、感受性遺伝子は日本在来牛全体に浸透している遺伝子である事が示唆された。

一方、抵抗性の 2 頭(N1 および N4)は BoLA 全体ではあまり共通性は見られなかったが(図 1) クラス II 領域は共通である事が示された(図 2)。この抵抗性遺伝子は、口之島牛や見島牛で検出された遺伝子型とは大きく異なる遺伝子型である事が示された。

PCA analysis for BoLA class II region

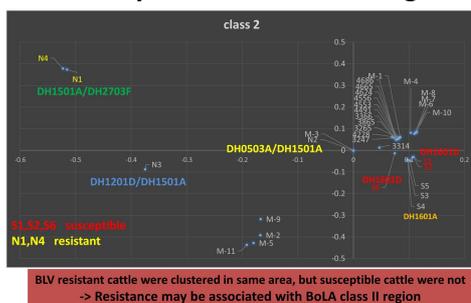


図 2 BoLA クラス II 領域の主成分分析

以上の解析から、抵抗性遺伝子は日本在来牛由来ではなく、明治以降に海外から流入してきた遺伝子であるノに対し、感受性遺伝子は日本在来牛が古来から有する遺伝子である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Takeshima S-n., Watanuki W., Ishizaki H., Matoba K., and Aida Y. “Development of a direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers, Arch. Virol., 161(6):1539-46, 2016. DOI:10.1007/s00705-016-2806-y 査読あり

2. Polat M., Takeshima S-n., Hosomichi K., Kim J., Miyasaka T., Yamada K., Arainga M., Murakami T., Matsumoto Y., Diaz V. B., Panei J. C., Gonzalez T. E., Kanemaki M., Onuma M., Giovambattista G. and Aida Y. “A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis”, Retrovirology, 13:4, 2016. DOI:10.1186/s12977-016-0239-z 査読あり

3. Takeshima S-n., Giovambattista G., Okimoto N., Matsumoto Y., Rogberg-Munoz A., Acosta T. J., Onuma M. and Aida Y. “Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations”, Tissue Antigens, 86(6):419-30, 2015. DOI:10.1111/tan.12692 査読あり

4. Polat M., Aida Y., Takeshima S-n., Aniwashi J. and Halik M. “The diversity of major histocompatibility complex class II DRB1 gene in sheep breeds from Xinjiang, China”. Tissue Antigens, 85: 50-57, 2015. DOI:10.1111/tan.12480 査読あり

5. Ohno A., Takeshima S-n., Matsumoto Y. and Aida Y. “Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014”, Virus Res., 210:283-290, 2015. DOI:10.1016/j.virusres.2015.08.020 査読あり

6. Polat M., Ohno A., Takeshima S-n., Kim J., Kikuya M., Matsumoto Y., Mingala C. N., Onuma M., and Aida Y. “Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle.” Arch. Virol., 160:285-296, 2015. DOI:10.1007/s00705-014-2280-3 査読あり

7. Takeshima S-n., Kitamura-Muramatsu Y., Yuan Y., Saito S. and Aida Y. “BLV-CoCoMo-qPCR-2: Improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve.” Arch. Virol., 160:1325-1332, 2015. DOI:10.1007/s00705-015-2377-3 査読あり

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹嶋伸之輔(Shin-nosuke Takeshima)

国立研究開発法人理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット・研究員

研究者番号：60342812