

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06410

研究課題名(和文)牛白血病ウイルス野生株における伝播性および病原性を決定する遺伝的特徴の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic characters relating to transmissibility and pathogenesis in bovine leukemia virus wild-type strains

研究代表者

村上 裕信 (Murakami, Hironobu)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：60620929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛伝染性リンパ腫ウイルスの株ごとのウイルス性状とそれを決定づける遺伝的特徴について解析を行った。伝播性および病原性について *in vitro* でウイルス産生量および形質転換誘導能を評価し、それぞれ伝播性および病原性に関連する一塩基多型を検出した。その結果、伝播性と病原性で異なる結果になった。さらに、キメラウイルスによる伝播性および病原性関連領域を解析し、上記結果と統合して解析を行った。その結果、伝播性には175番目塩基の多型が、病原性には複数の多型の関与が示唆された。さらなる解析では、病原性に関連する多型が複数存在するにも関わらず、細胞に与える影響が類似していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛伝染性リンパ腫ウイルスは日本国内に蔓延しているウイルスであり、経済的損失が拡大しているため、その制御が非常に重要である。本研究では、感染拡大リスクが高い高伝播性株である175C株を同定したため、簡便な検査が可能となった。一方、病原性に強く関連する変異は認められなかったが、強毒株感染において特異的な宿主反応が認められたことから、宿主因子を標的とした簡便な検査法の確立が有用であることが考えられた。上記の結果は、BLVの感染拡大および発症リスクを簡便に検査することが可能であることを示していることから、BLV感染制御の新たな手法を提示する基礎的知見になりうる。

研究成果の概要(英文)：Specific genetic variations associated with viral traits were analyzed to be applied for the control of bovine leukemia virus (BLV). Viral productivity and transformability *in vitro*, which are related to transmissibility and pathogenicity, respectively, were analyzed. These results were shown different specific polymorphisms related to transmissibility and pathogenicity. Next, transmissibility and pathogenicity-related genome region in BLV were analyzed using chimeric viruses. The above both data suggested that the nucleotide 175 in the LTR region would be associated with transmissibility, while the pathogenicity is influenced by multiple genetic polymorphisms. Further study demonstrated that the same gene expression pattern was detected in each group such as mock, low, and high pathogenicity strains regardless of different genetic character. Therefore, the transmissibility and pathogenicity could be estimated by viral genetic characters and host gene expression levels, respectively.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：牛伝染性リンパ腫ウイルス 伝播性 病原性 変異 感染性分子クローン

1. 研究開始当初の背景

我が国における牛伝染性リンパ腫(BL)の発生件数は届出伝染病に指定された1998年と比較すると約40倍以上に激増しており、2021年は4,375頭の発生がある。EBLの大部分は、牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)感染に起因する地方病性BL(EBL)である。さらに、国内のBLV感染牛の割合は全飼養牛の30~40%(120~160万頭)にのぼり、経済的損失が今後も増加し続けることが懸念されている。BLVは一度感染すると染色体にプロウイルスとして組込まれ、体内から排除することが不可能なウイルスであるため、経済的損失を軽減させるためにはBLVの感染拡大阻止およびEBL発症予防が必要である。そのためには、BLV感染牛の摘発淘汰や分離飼育が有効であるが、感染率が高く狭い飼育面積の農場が多い我が国では、隔離やBLV感染牛の全淘汰は物理的・経済的に困難である。そのため、高汚染地域でも有効かつ実行可能な対策の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、我々の最近の報告から明らかになってきたBLV株間の伝播性および病原性の違いに着目し、その伝播性と病原性を決定する遺伝的特徴を特定する。この事により、感染拡大や経済的損失に大きく関与する株を農場から効率的に排除することが可能となる。本研究を達成することにより、感染率が高い農場であっても効率的にBLVの感染制御および経済的損失を低減させる新たなBLV対策を確立することが可能となる。

3. 研究の方法

(1)ウイルス性状の評価

EBL発症牛および未発症牛の血液または腫瘍塊からDNA抽出後、BLVゲノムをPCRにより増幅し、pSMART-LC-AmpにBLV全長ゲノムを挿入し、感染性分子クローンを作成し、ウイルス性状解析に用いた。ウイルス産生量の測定では、上記分子クローンを293T細胞に導入し、ウイルス上清からRNA抽出し、それらRNAからcDNA合成後、定量PCR(qPCR)を行い、ウイルスRNAコピー数を測定した。ウイルスの病原性評価では、分子クローンをNMuMG細胞に導入後、マトリゲルを用いた3次元(3D)培養を行い、ウイルスの形質転換誘導能の有無を評価した。上記のウイルス性状とウイルスゲノム配列をもとに遺伝子多型を検出し、それら多型とウイルス性状の関連性について、ソフトウェアRを用いて統計解析を行った。

(2)遺伝子改変ウイルスの作製

キメラウイルスの作出には、異なるウイルス性状を示した感染性分子クローンを鋳型として、各遺伝子、micro RNA(miRNA)領域をPCRで増幅後、各増幅領域をIn-Fusionによりライゲーションした。

変異導入ウイルスの作出には、塩基置換を導入したプライマーを用いて、感染性分子クローン全長をPCRで増幅し、上記と同様の手順でライゲーションすることにより行った。

レポーターウイルス作出には、HiBiTタグ配列およびGSリンカー配列を導入したプライマーを用いて、感染性分子クローンをPCRで増幅し、上記と同様の手順でライゲーションした。

上記のプラスミドは大腸菌に導入後、プラスミド抽出を行い、感染性分子クローンを生成した。

(3)遺伝子改変ウイルスのウイルス産生量の評価

キメラウイルスおよび変異導入ウイルスにHiBiT配列を導入後、レポーターウイルスを作成し、それらのウイルスを293T細胞に導入した。ウイルス産生量はNano Glo HiBiT Lytic Detection Systemを用いて、その化学発光をルミノメーターで測定した。

4. 研究成果

(1)ウイルス性状に関連する遺伝的特徴の解析

感染性分子クローンを用いて、ウイルス産生量および形質転換誘導能を測定した結果、株により異なるウイルス性状を示すことが明らかになった。そこで、ゲノムの欠損が認められないクローン107株を選抜し、ウイルスゲノム全長解析を行った結果、222箇所が多型が認められた。

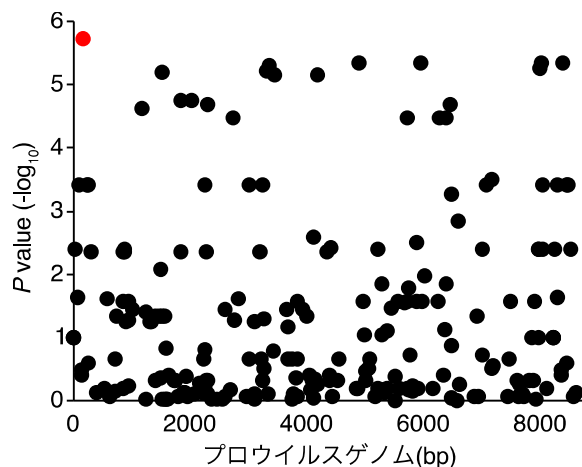


図1. ウイルス産生量と関連する一塩基多型の解析

次に、伝播性に関連するウイルス産生量と多型について解析した結果、87 箇所の一塩基多型が有意にウイルス産生量に影響をもたらすことが明らかになり、最も P 値が低い多型は 175 番目塩基であった ($P = 2 \times 10^{-6}$) (図 1)。

次に上記 222 箇所の多型とウイルスの形質転換誘導能を解析した結果、gag 領域の 104 番目のアミノ酸置換を伴う 1 箇所の多型が有意に ($P = 0.0108$) 影響をもたらすことが明らかになった (図 2)。しかし gag 領域が 104D の株の多くが形質転換陰性を示すわけではないため、病原性に関連する共通した変異ではない可能性も考えられた。

以上の結果から、伝播性および病原性に関連する遺伝的特徴は異なることが示唆された。

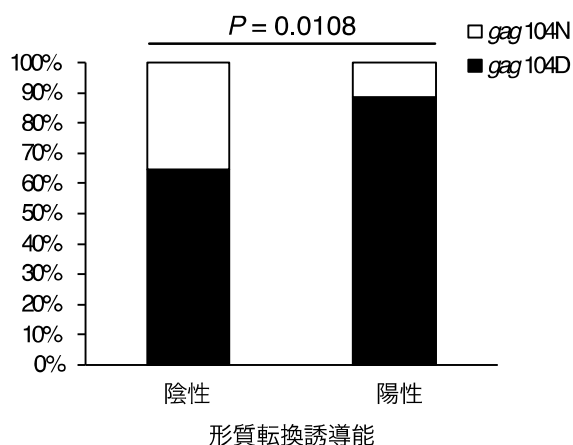


図2. 形質転換能と関連する一塩基多型の解析

(2)伝播性に関連する遺伝的特徴の解析

伝播性に関連する遺伝的特徴を詳細に解析するため、ウイルス産生量の異なる 2 株を用いて、各ゲノム領域を組換えたレポーターキメラウイルスを作出した。それらウイルス産生量を評価した結果、LTR 領域がウイルス産生に関与することが明らかになった。また、LTR 領域の 1 塩基の置換がウイルス産生量を大きく変化させることを明らかにした。この置換の位置はゲノムの 175 番目塩基の T から C への置換であり、上記の解析と一致した。そのため、175 番目塩基が T である (175T) 株と C である (175C) 株は異なる伝播性を示すことが示唆された。

農場において伝播性が異なるかを明らかにするため、175 番目塩基置換を検出する簡易検査法の確立を行い、rhAmp 法により簡便に検査できることを明らかにした。その手法を用いて、2013 年から 2019 年に 1 農場から経時的に採血して得られたサンプルのジェノタイプングをした結果、2013 年から 175C 株が有意に増加していることが分かった (図 3)。175C 株のウイルス産生量は 175T 株よりも高いことから、in vitro で得られた結果と一致しており、175C 株が高伝播性株であることが明らかになった。

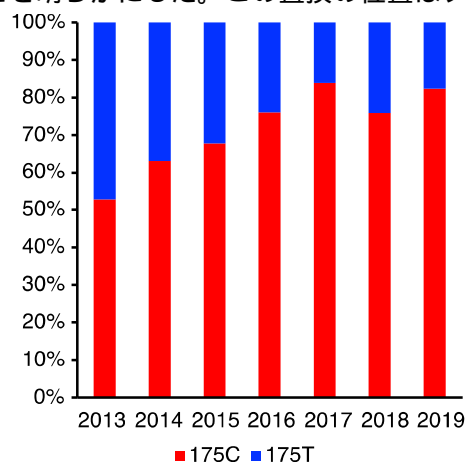


図3. 農場内における175T/C株感染牛の推移

(3)病原性に関連する遺伝的特徴の解析

病原性に関連する遺伝的特徴を詳細に解析するため、病原性の異なる 2 株を用いて、各ゲノム領域を組換えたキメラウイルスを作出し、その病原性を評価した。その結果、親株により病原性に関連する領域が gag-pro-pol 領域である場合や miRNA 領域である場合など、病原性に関連する共通した領域が認められないことが明らかになった。そのため、病原性に関連する領域および多型は複数存在することが示唆された一方、gag-pro-pol 領域の組換えで病原性が変化することは、gag の 104 番目のアミノ酸置換と病原性に関する解析と一致している。この結果は、主な病原性関連領域として推定されている Tax や miRNA 領域以外に、gag 領域も病原性に関連することを示唆する新たな知見となった。

病原性に関連する領域が複数存在することから、異なる位置の多型により、病原性発揮メカニズムが異なることが考えられた。そこで、遺伝的に近い強毒および弱毒株を 3 株ずつ NMuMG 細胞に導入し、その遺伝子発現パターンを次世代シーケンズにより解析した。その結果、遺伝的に近い株同士でも異なる遺伝子発現パターンを示し、さらに、病原性ごとに類似した遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった (図 4)。このことは、病原性

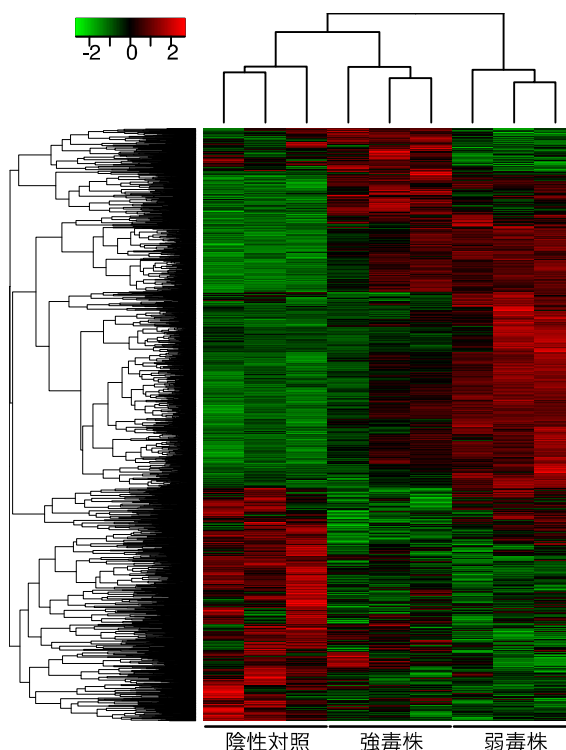


図4. 病原性の異なる株の遺伝子発現パターン

性ごとに類似した遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった (図 4)。このことは、病原性

に関連する多型が複数存在しても、細胞に与える影響は類似していることを示している。以上の結果から、病原性に関連する遺伝的特徴は *gag* 領域の 104D が最も強く関連するが、多くの強毒株に共通したものではなかった。一方で、強毒株の細胞への影響は共通性が見いだせることから、病原性の評価には、感染により発現量が変化する宿主因子の検出が有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17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 Takeuchi Ippei, Nasukawa Tadahiro, Sugimoto Ryosuke, Takemura-Uchiyama Iyo, Murakami Hironobu, Uchiyama Jumpei	4. 巻 298
2. 論文標題 Analyses of propagation processes of Staphylococcus aureus bacteriophages S13 and S25-3 in two different taxonomies by definitive screening design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198406 ~ 198406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2021.198406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nasukawa Tadahiro, Sugimoto Ryosuke, Uchiyama Jumpei, Takemura-Uchiyama Iyo, Murakami Hironobu, Fukuda Ken, Matsuzaki Shigenobu, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 172
2. 論文標題 Purification of membrane vesicles from Gram-positive bacteria using flow cytometry, after iodixanol density-gradient ultracentrifugation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research in Microbiology	6. 最初と最後の頁 103792 ~ 103792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resmic.2020.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakubo Hirofumi, Kamisuki Shinji, Suzuki Kei, Izaguirre-Carbonell Jesus, Saito Shiki, Murata Hiroshi, Tanabe Atsushi, Hongo Ayumi, Murakami Hironobu, Matsunaga Sachihito, Sakaguchi Kengo, Sahara Hiroeki, Sugawara Fumio, Kuramochi Kouji	4. 巻 85
2. 論文標題 SQAP, an acyl sulfoquinovosyl derivative, suppresses expression of histone deacetylase and induces cell death of cancer cells under hypoxic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SATO Reiichiro, MERCIER Christoph Koch, AIHARA Naoyuki, KAWAI Kazuhiro, MURAKAMI Hironobu, YASUDA Rie, SATOH Hiroyuki, YOKOYAMA Taiki, YAMADA Kazutaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Diagnosis of a sublingual abscess in a Japanese Black calf using computed tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1497 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Hironobu, Yajima Yusuke, Sato Fumiaki, Kamisuki Shinji, Taharaguchi Satoshi, Onda Ken, Roh Sanggun, Uchiyama Jumpei, Sakaguchi Masahiro, Tsukamoto Kenji	4. 巻 548
2. 論文標題 Development of multipurpose recombinant reporter bovine leukemia virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2020.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Kazuki, Tsurukawa Yukine, Kamisuki Shinji, Shibasaki Hisanobu, Iguchi Keita, Murakami Hironobu, Uchiyama Jumpei, Kuramochi Kouji	4. 巻 72
2. 論文標題 Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, Pestalotiopsis microspora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 793 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0213-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukami Keijiro, Uchiyama Jumpei, Igarashi Hirota, Murakami Hironobu, Osumi Takafumi, Shima Ayaka, Ishihara Genki, Nasukawa Tadahiro, Une Yumi, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 366
2. 論文標題 Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnz095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Hironobu, Todaka Haruna, Uchiyama Jumpei, Sato Reiichiro, Sogawa Kazuyuki, Sakaguchi Masahiro, Tsukamoto Kenji	4. 巻 537
2. 論文標題 A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 WATANABE Aiko, MURAKAMI Hironobu, KAKINUMA Seiichi, MURAO Koki, OHMAE Kaori, ISOBE Naoki, AKAMATSU Hirohisa, SETO Takahiro, HASHIMURA Shinji, KONDA Kunitoshi, SHINOZUKA Yasunori, KAWAI Kazuhiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanuki Sonoko, Takeshima Shin-nosuke, Borjigin Liushiqi, Sato Hirotaka, Bai Lanlan, Murakami Hironobu, Sato Reiichiro, Ishizaki Hiroshi, Matsumoto Yasunobu, Aida Yoko	4. 巻 50
2. 論文標題 Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13567-019-0724-1	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 Murakami Hironobu, Suzuki Takehiro, Tsuchiya Kiyoto, Gatanaga Hiroyuki, Taura Manabu, Kudo Eriko, Okada Seiji, Takei Masami, Kuroda Kazumichi, Yamamoto Tatsuo, Hagiwara Kyoji, Dohmae Naoshi, Aida Yoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Protein Arginine N-methyltransferases 5 and 7 Promote HIV-1 Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 355 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12030355	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 Uchiyama Jumpei, Murakami Hironobu, Sato Reiichiro, Mizukami Keijiro, Suzuki Takehito, Shima Ayaka, Ishihara Genki, Sogawa Kazuyuki, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 240
2. 論文標題 Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 108547 ~ 108547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetmic.2019.108547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Kazuki, Tsurukawa Yukine, Kamisuki Shinji, Shibasaki Hisanobu, Iguchi Keita, Murakami Hironobu, Uchiyama Jumpei, Kuramochi Kouji	4. 巻 72
2. 論文標題 Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, Pestalotiopsis microspora	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 793 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0213-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Hironobu, Todaka Haruna, Uchiyama Jumpei, Sato Reiichiro, Sogawa Kazuyuki, Sakaguchi Masahiro, Tsukamoto Kenji	4. 巻 537
2. 論文標題 A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukami Keijiro, Uchiyama Jumpei, Igarashi Hiroataka, Murakami Hironobu, Osumi Takafumi, Shima Ayaka, Ishihara Genki, Nasukawa Tadahiro, Une Yumi, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 366
2. 論文標題 Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnz095	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 WATANABE Aiko, MURAKAMI Hironobu, KAKINUMA Seiichi, MURAO Koki, OHMAE Kaori, ISOBE Naoki, AKAMATSU Hirohisa, SETO Takahiro, HASHIMURA Shinji, KONDA Kunitoshi, SHINOZUKA Yasunori, KAWAI Kazuhiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0285	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 Watanuki Sonoko, Takeshima Shin-nosuke, Borjigin Liushiqi, Sato Hirotaka, Bai Lanlan, Murakami Hironobu, Sato Reiichiro, Ishizaki Hiroshi, Matsumoto Yasunobu, Aida Yoko	4. 巻 50
2. 論文標題 Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13567-019-0724-1	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

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上舞琴, 紙透伸治, 塚本健司, 村上裕信
2. 発表標題 牛白血病ウイルス複製阻害剤の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 舞琴, 柴崎 久宣, 紙透 伸治, 塚本 健司, 村上 裕信
2. 発表標題 抗牛白血病ウイルス活性を有する化合物によるウイルス増殖機構の解析
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------