

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20610

研究課題名（和文）鳥インフルエンザウイルスの迅速な塩基配列解析法の開発

研究課題名（英文）Development of a Rapid Nucleotide Sequence Analysis Method for Avian Influenza Virus

研究代表者

奥谷 公亮（Okuya, Kosuke）

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・助教

研究者番号：10907736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：鳥インフルエンザウイルス（AIV）は、8分節のRNAをゲノムに持ち、遺伝子再集合により、性状の異なる多様なAIV株が出現する。そのため、流行株の性状を把握するためには、AIVの全遺伝子分節の解析が重要である。本研究では、AIV全遺伝子分節を標的にした迅速な塩基配列解析法を確立し、流行株の性状変化をリアルタイムに検出する系の構築を目的とした。遺伝子解析時間が短く、安価なナノポアシーケンサーFlongleに着目し、迅速な塩基配列決定法を確立した。確立した手法により、AIV分離株の全遺伝子分節を解析し、疫学調査としての有用性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、過去に分離された鳥インフルエンザウイルス（AIV）の全遺伝子解析を完了した。また、2021/22年シーズンおよび2022/23年シーズンに発生した高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析を迅速に実施し、行政と連携した高病原性鳥インフルエンザ対策に貢献した。

研究成果の概要（英文）：Avian influenza virus (AIV) is a genome containing 8 segments of RNA, which can lead to the emergence of diverse AIV strains with different characteristics due to genetic recombination. Therefore, analysis of all gene segments of AIV is crucial for understanding the characteristics of epidemic strains. In this study, a rapid nucleotide sequence analysis method targeting all gene segments of AIV was established, with the aim of constructing a system for real-time detection of changes in the characteristics of epidemic strains. We focused on the Nanopore sequencer Flongle, which is a rapid and low-cost gene analysis tool, to establish a rapid nucleotide sequence determination method. Using the established method, all gene segments of AIV isolates were analyzed and the usefulness of the method as an epidemiological investigation tool was verified.

研究分野：ウイルス学

キーワード：鳥インフルエンザウイルス 高病原性鳥インフルエンザ 遺伝子解析 ナノポアシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

AIV は、8 分節の RNA をゲノム (計約 13 kb) に持ち、表面糖タンパク質である赤血球凝集素 (HA) ならびにノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いから H1-16 亜型と N1-9 亜型に分けられている。AIV の自然宿主であるカモの越冬時期が日本における AIV 流行シーズンであり、様々な亜型の AIV が分離される。HA および NA 遺伝子以外の遺伝子分節 (PB2, PB1, PA, NP, M および NS) は内部遺伝子と呼ばれ、AIV の増殖に寄与するタンパク質を主にコードしている。一個体が同時に複数の AIV に感染・保有した場合、遺伝子再集合により、新たな性状を獲得した子孫ウイルスが産生されることが分かっている。

AIV は、性状の違いから国際的に高病原性および低病原性 AIV に分類されており、高病原性 AIV による家禽農場の経済被害は特に甚大である。AIV の流行状況および性状変化を把握するには、各遺伝子分節の遺伝子解析が必要不可欠である。しかしながら、これまでの疫学調査では、AIV の増殖性に寄与する内部遺伝子まで解読されたウイルス株は多くない。そのため、遺伝子再集合により異なる性状を獲得した AIV 株が新たに出現したか否か等を評価することが困難である。実際、2020/21 年シーズンの初期と後期では鹿児島県におけるツルの死亡個体からの AIV 分離率が異なり、AIV の内部遺伝子の構成が異なることが関連している可能性が後の調査で示唆された (未発表)。そこで本研究では、AIV 流行株の変遷を探るため、迅速な遺伝子解析法を確立し、流行株の遺伝子構成をリアルタイムに明らかにできる、新たな AIV 疫学調査法の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

AIV 全遺伝子分節の迅速かつ効率的な遺伝子解析法を確立することで、分離株の伝播経路および性状変化を AIV 流行シーズン中にリアルタイムで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 鹿児島県出水平野における野鳥のねぐらの水からの AIV 分離

希少ツル類の飛来地として知られる鹿児島県出水平野では、野鳥保護の一環として水田の一部を「ねぐら」として整備される。毎年 11 月～翌 3 月まで、ねぐらの水を毎週採取し、発育鶏卵を用いて AIV の分離を実施した。

### (2) 同時に複数の AIV 分離株を解析する方法の確立

分離株の各遺伝子分節を PCR 法にて増幅し、ナノポアシーケンサー Flongle を用いて、塩基配列を決定した。バーコード配列を付加することで、複数株の遺伝子配列を同時に解析した。

## 4. 研究成果

ナノポアシーケンサーは、ロングリードの DNA を解読することができる。そのため、比較的長い (約 3kb) AIV のポリメラーゼをコードする 3 遺伝子 (PB2、PB1 および PA) も断片化することなく、ロングリードとしてそのまま解読することができた。また、Flongle は 2Gb の遺伝子配列を決定することができるため、複数株の AIV 遺伝子分節を 1 度に遺伝子解析できると考えた。フローセル上のナノポア数にばらつきがあるものの、少なくとも 6 株の AIV の全遺伝子

分節は同時に塩基配列を決定することができた。

・2021年度

2021/22年越冬シーズン、鹿児島県出水市平野のツルのねぐらの水から鳥インフルエンザウイルス78株が分離され、本手法により、速やかに全遺伝子分節の塩基配列が決定された。分離株の内11株はH5N1もしくはH5N8亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスであった。全遺伝子分節の解析から、H5N1亜型とH5N8亜型のウイルスは各々独立して進化したことが示唆された。

・2022年度

2022/23年越冬シーズン、鹿児島県出水市のツルのねぐらの水から24株のH5N1亜型高病原性AIVが分離された。その他、H3N8亜型およびH10N6亜型のAIVも15株分離された。さらに、希少ツル種を含む野鳥110検体からH5N1亜型AIVが分離された。H5亜型HA遺伝子の系統樹解析から、鹿児島分離株は、韓国分離株と近縁であり、2021/22年シーズンに鹿児島で流行した株とは異なるクラスターに属していた。このことから、野鳥の間H5亜型高病原性AIVが感染を繰り返し、変異を重ねていることが分かった。

本研究により、比較的安価で簡便なナノポアシーケンサーFlongleを用いた、AIVの迅速な全遺伝子分節解析法を構築した。流行シーズン中に多くのAIVが分離された場合でも、効率良く分離株の遺伝子解析が進むことができた。本研究成果は世界各地におけるAIV疫学調査法に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsunaga Nonoka, Ijiri Moe, Ishikawa Kemi, Ozawa Makoto, Okuya Kosuke, Khalil Ahmed Magdy, Kojima Isshu, Esaki Mana, Masatani Tatsunori, Matsui Tsutomu, Fujimoto Yoshikazu	4. 巻 67
2. 論文標題 Avian paramyxovirus serotype 1 isolation from migratory birds and environmental water in southern Japan: An epidemiological survey during the 2018/19-2021/2022 winter seasons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13053	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 該当する
1. 著者名 Fujimoto Yoshikazu, Ogasawara Kohei, Isoda Norikazu, Hatai Hitoshi, Okuya Kosuke, Watanabe Yukiko, Takada Ayato, Sakoda Yoshihiro, Saito Keisuke, Ozawa Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Experimental and natural infections of white-tailed sea eagles ( <i>Haliaeetus albicilla</i> ) with high pathogenicity avian influenza virus of H5 subtype	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.2022.1007350	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 該当する
1. 著者名 Khalil Ahmed Magdy, Kojima Isshu, Fukunaga Wataru, Okajima Misuzu, Mitarai Sumire, Fujimoto Yoshikazu, Matsui Tsutomu, Kuwahara Masakazu, Masatani Tatsunori, Okuya Kosuke, Ozawa Makoto	4. 巻 69
2. 論文標題 Improved method for avian influenza virus isolation from environmental water samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 e2889 ~ e2897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.14639	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 該当する
1. 著者名 Okuya Kosuke, Khalil Ahmed, Esaki Mana, Kojima Isshu, Nishi Natsuko, Koyamada Donna, Matsui Tsutomu, Yoshida Yuuhei, Ozawa Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic Characterization of Avian Influenza Viruses Isolated from the Izumi Plain, Japan in 2019/20 Winter Season	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1013 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens11091013	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 Okuya Kosuke, Mine Junki, Tokorozaki Kaori, Kojima Isshu, Esaki Mana, Miyazawa Kohtaro, Tsunekuni Ryota, Sakuma Saki, Kumagai Asuka, Takadate Yoshihiro, Kikutani Yuto, Matsui Tsutomu, Uchida Yuko, Ozawa Makoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Genetically Diverse Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1/H5N8) Viruses among Wild Waterfowl and Domestic Poultry, Japan, 2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2807.212586	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 該当する

1. 著者名 Kida Yurie, Okuya Kosuke, Saito Takeshi, Yamagishi Junya, Ohnuma Aiko, Hattori Takanari, Miyamoto Hiroko, Manzoor Rashid, Yoshida Reiko, Nao Naganori, Kajihara Masahiro, Watanabe Tokiko, Takada Ayato	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural Requirements in the Hemagglutinin Cleavage Site-Coding RNA Region for the Generation of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1597 ~ 1597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10121597	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ahmed Magdy Khali, 奥谷公亮, 藤本佳万, 児島一州, 江崎真南, 李京河, 西奈津子, 正谷達膳, 松井勉, 小澤真
2. 発表標題 野鳥渡来地の環境水から紐解く鳥インフルエンザウイルスの流行動態
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥谷公亮, 峯淳貴, 所崎香織, 児島一州, 江崎真南, 宮澤光太郎, 常國良太, 佐久間咲希, 熊谷飛鳥, 高館佳弘, 菊谷祐斗, 松井勉, 内田裕子, 小澤真
2. 発表標題 2021/22年シーズン、鹿児島県で分離されたH5N1亜型およびH5N8亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝学的解析
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 江崎真南、桃原研希、児島一州、所崎香織、原口優子、松井勉、奥谷公亮、小澤真
2. 発表標題 フクロウ類における性染色体性別判定領域の遺伝子構成の解明
3. 学会等名 第28回日本野生動物医学会大会
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