

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19246

研究課題名(和文)ネコロタウイルス様ヒトロタウイルスの起源の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the origin of feline-like human rotaviruses

研究代表者

金子 美穂(後藤美穂)(KANEKO, Miho)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：50599909

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、日本国内のネコからのロタウイルスの検出とそのG-P遺伝子型の同定を試みた。また、分離に成功したロタウイルス株(FRV537株)の全ゲノム解析を行ったところ、遺伝子型構成は既知のネコロタウイルスのものとは異なるG6-P[5]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3だった。分子系統解析の結果、すべての遺伝子分節においてウシロタウイルスとの高い相同性を示し、FRV537株はウシを本来の宿主とするロタウイルス株がネコに種間伝播した例と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国内外においてネコロタウイルスと類似の遺伝子型構成をもつロタウイルスがヒトから検出されており、ネコからの種間伝播によるものと考えられている。一方、ネコにおけるロタウイルス感染と種間伝播の実態はほとんど知られていない。

本研究では、ウシを本来の宿主とするウシロタウイルスが野猫へと種間伝播した例を見出した。一方、家猫を対象とした複数の先行研究では、野生動物や家畜動物とネコの間でのロタウイルスの種間伝播は報告されていない。野猫は家猫と比較して異種動物のロタウイルスに感染する機会が多いと考えられ、ロタウイルスの遺伝的多様性と進化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): In this study, the prevalence and genotypes of rotavirus A circulating among Japanese cats were examined. An unusual G6P[5] rotavirus A strain named FRV537, which was isolated from a stray cat, was further characterized to determine its species of origin by whole genome analysis. The genotype constellation of FRV537 was G6-P[5]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3. In addition to the high nucleotide sequence identities between FRV537 and bovine rotaviruses in each genome segment, phylogenetic analysis revealed a close relationship to bovine/artiodactyl rotaviruses. Thus, the molecular and phylogenetic evidence suggests that FRV537 was of bovine rotavirus origin.

研究分野：ロタウイルスの分子疫学

キーワード：ネコロタウイルス 種間伝播 野猫 遺伝子型 全ゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは発展途上国のみならず先進国においても乳幼児の重症下痢症の原因として最も重要な病原体である。ヒトロタウイルスの場合、11本に分節化された二本鎖 RNA ゲノムがコードする遺伝子のうち血清型を担う G 遺伝子と P 遺伝子の遺伝子型は主に 5 種類の組み合わせ (G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]) から成る。その他の 9 つの遺伝子型構成は I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (Wa 様) または I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (DS-1 様) の 2 種類が大部分を占めるが、申請者の研究グループは、日本国内において下痢症を発症した乳児から Wa 様とも DS-1 様とも異なる新規の遺伝子型構成 I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 をもつ AU-1 株を見出した。さらに、日本国内の野生のネコから AU-1 株と同一の遺伝子型構成をもつ FRV-1 株を分離した。

近年、AU-1/FRV-1 と類似の遺伝子型構成をもつ G6P[9] 株や G12P[9] 株が世界各地のヒトから検出されている。このようなネコロタウイルス様ヒトロタウイルスの由来はネコロタウイルスだと推測されているが、これまでに G6P[9] 株や G12P[9] 株と同一の遺伝子型構成をもつロタウイルスはネコからは発見されておらず、種間伝播に関する議論は想像の域を出ない。ネコロタウイルス様ヒトロタウイルスの起源を解明するためには、それらのゲノムとネコロタウイルスのゲノムの比較が必要となるが、全ゲノム配列が DNA データベース上に公開されているネコロタウイルスは 3 株しかなく、絶対的に情報が不足している。

### 2. 研究の目的

- (1) ヒトに感染例が見られネコロタウイルスに由来すると推測されている G3P[9] 株、G6P[9] 株、G12P[9] 株が日本に生息するネコから検出されるか否かを明らかにする。
- (2) ネコから検出されたロタウイルスの全ゲノム解析を行い、ネコロタウイルス間の遺伝的多様性を調べるとともに、分子系統解析により既知のネコロタウイルスやネコロタウイルス様ヒトロタウイルスとの系統学的位置関係を明らかにする。その結果から、ヒトに検出されるネコロタウイルス様ヒトロタウイルスの成り立ちを考察する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ロタウイルスの検出

日本国内のネコから採取した 57 の糞便あるいは直腸スワブ検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行った。ロタウイルスゲノムの NSP3 遺伝子に特異的なプライマーと TaqMan プローブを用いた定量 RT-PCR 法により抽出 RNA 中のロタウイルスゲノムを検出した。Ct 値が 40 未満の検体をロタウイルス陽性と判断した。

#### (2) G-P 遺伝子型の決定と全ゲノム解析

ロタウイルス陽性検体から抽出した RNA を鋳型として、ランダムプライマーと SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。G-P 遺伝子の全長あるいは部分配列の増幅を目的としてプライマーを設計し、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara) と cDNA を用いて PCR を行った。

また、ロタウイルス陽性検体の懸濁液の上清を MA104 細胞に接種し、ウイルスの分離を試みた。分離に成功した FRV537 株について、各遺伝子分節の全長を PCR により増幅した。

PCR 産物を精製後、ABI 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により塩基配列を決定した。取得した塩基配列については、RotaC 2.0 により遺伝子型構成を決定するとともに、MEGA 6 により分子系統樹の描出などの分子系統解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ロタウイルス陽性率

本研究の対象とした日本国内のネコにおいて、定量 RT-PCR 法によるロタウイルス陽性率は 19.3% (11 検体/57 検体) であった。11 のロタウイルス陽性検体のうち 10 検体の Ct 値は 36 ~ 39 の範囲であり、Ct 値が 30 未満であったのは 1 検体のみであった (FRV537, Ct=29)。英国における研究の結果 (German et al., 2015) と同様に、ネコの糞便中に排出されるロタウイルスの量はヒトの場合と比べて非常に少ないことが示唆された。

#### (2) G-P 遺伝子型の決定と FRV537 株の分離

ロタウイルス陽性検体から抽出した RNA について、各遺伝子分節の末端に設計したプライマーおよびヒトロタウイルスの G-P 遺伝子型の決定に頻用される遺伝子型特異的プライマー (G1, G2, G3, G4, G9, P[4], P[6], P[8]) を用いて RT-PCR を行ったところ、いずれの検体についても遺伝子断片の増幅は全く見られなかった。そこで、ネコロタウイルスあるいはヒトロタウイルスの G3, G6, P[3], P[9] の塩基配列を基にプライマーを設計し、様々な PCR 条件を検討した。得られた PCR 産物の塩基配列を決定した後に BLAST 検索を行ったところ、それぞれウシロタウイルスの G6 とヒトロタウイルスの G2 に対して高い相同性をもつ 2 種類の VP7 遺伝子 (G 遺伝子) の部分配列が確認された。G6 株については、全ゲノム解析の結果、G6P[5] 株 (FRV537 株) と決定された。G2 株については、P 遺伝子型を決定できなかった。PCR 産物の中にはロタウイルスの遺伝子の他にアストロウイルスやシュードモナス等の微生物の遺伝子配列が複数同

定された。

上記と並行して、ロタウイルス陽性検体について MA104 細胞によるウイルスの分離を試みたが、成功したのは検体中のウイルスゲノム量が最も多かった FRV537 株のみであった。

結果的に、本研究では G3P[9]、G6P[9]、G12P[9] 遺伝子型をもつロタウイルスはいずれも検出されなかった。検体中に存在するロタウイルスゲノムが少量であることに加え、ネコに共感染している他の微生物の存在がロタウイルスの G-P 遺伝子型の決定と MA104 細胞によるウイルス分離を困難にしていると考えられた。

### (3) FRV537 株の全ゲノム解析

分離に成功した FRV537 株の全ゲノム解析を行った。FRV537 株は無症状の西表島の野猫から検出されたロタウイルスであり、既知のネコロタウイルスとは異なる遺伝子型構成 (G6-P[5]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3) を有していた。FRV537 株の各遺伝子型はいずれもウシロタウイルスに一般的に見られるものであり、特に、G6P[5] という G-P 遺伝子の組み合わせをもつロタウイルスはそのほとんどがウシから検出されている。一方で、FRV537 株と同一の遺伝子型構成をもつウシロタウイルスはこれまでに報告されていないが、G-P 遺伝子を除いた 9 つの遺伝子分節について同一の遺伝子型構成 (I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3) を有する 3 株のウシロタウイルスが DNA データベース上に見出された。また、FRV537 株の各遺伝子分節について BLAST 検索を行ったところ、95% 以上の塩基配列一致率をもつウシロタウイルスが少なくとも 1 株は存在していた (表 1)。

さらに、分子系統解析の結果、FRV537 株はすべての遺伝子分節においてウシあるいはウシ以外の偶蹄類から検出されたロタウイルス株と近縁であることが示された (図 1)。

表1. FRV537株とウシロタウイルス株の塩基配列一致率

遺伝子	一致率 (%)	ウシロタウイルス株
VP7	96.8	JB-1
VP4	95.8	VMRI
VP6	97.9	UK
VP1	96.7	Dai-10
VP2	97.3	Tottori-SG
VP3	96.0	KJ56-1
NSP1	95.9	B223
NSP2	96.5	DQ-75
NSP3	96.2	Tottori-SG
NSP4	97.0	CHLY
NSP5	98.5	Dai-10

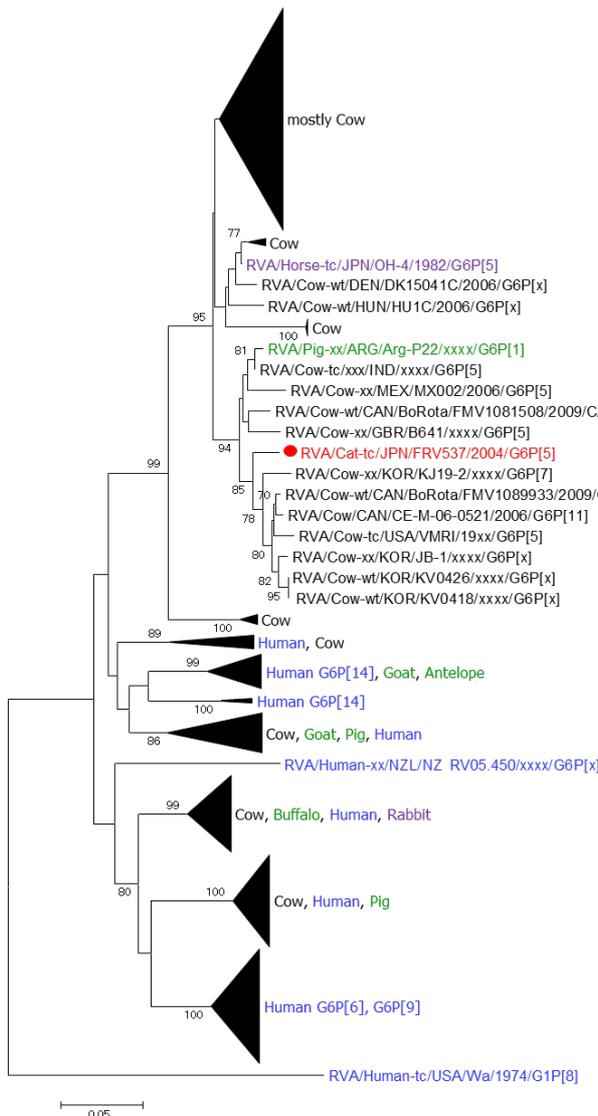


図1. 分子系統樹の一例 (G6 VP7 遺伝子)

系統樹中、遺伝子配列は検出された宿主の種により色分けしている (ネコまたはイヌは赤、ヒトは青、ウシは黒、ウシを除く偶蹄類は緑、その他は紫)。赤丸を付した FRV537 株は、ブタから検出された 1 株 (Arg-P22) を除きウシから検出された株のみから構成されるクラスターに属す。

これらの結果から、FRV537 株は、本来はウシを宿主とするウシロタウイルスがネコに種間伝播した例と考えられた。日本のネコの血清学的な調査では、G3P[9]ネコロタウイルス (FRV-1 株) に対する中和抗体をもつ家猫の 80% は G6P[5]ウシロタウイルス (0510 株) に対する中和抗体をもたなかったことが報告されている (Mochizuki et al., 1997)。つまり、家猫においては G6P[5]株の感染は稀であると考えられる。また、英国の家猫を対象とした疫学研究 (German et al., 2015) では、ネコから検出されたロタウイルスのうち 4 分の 1 以上は G6 ロタウイルスであったと報告されているが、G6P[5]株は 1 例も検出されていない。本研究において野猫から G6P[5]株が検出されたことは、野猫と家猫の間の生息環境や行動の違いを反映しているものと考えられた。野猫は家猫と比較して異種動物のロタウイルスに感染する機会が多く、ロタウイルスの遺伝的多様性と進化に寄与している可能性が考えられる。

#### <引用文献>

German AC, Iturriza-Gómara M, Dove W, Sandrasegaram M, Nakagomi T, Nakagomi O, Cunliffe N, Radford AD, Morgan KL. Molecular epidemiology of rotavirus in cats in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* vol. 53, No.2, 2015, pp. 455-464

Mochizuki M, Nakagomi T, Nakagomi O. Isolation from diarrheal and asymptomatic kittens of three rotavirus strains that belong to the AU-1 genogroup of human rotaviruses. *J Clin Microbiol.* vol. 35, No.5, 1997, pp. 1272-1275

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kaneko M, Mochizuki M, Nakagomi O, Nakagomi T. Whole genome characterization of a G6P[5] rotavirus A strain isolated from a stray cat in Japan. *Veterinary Microbiology*, 査読有, vol. 188, 2016, pp. 25-33. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.006.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kaneko M, Mochizuki M, Nakagomi O, Nakagomi T. Whole genome analysis of a G6P[5] rotavirus strain detected in a Japanese stray cat. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。