

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34414

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26881007

研究課題名(和文) 新興病原生物の進化における宿主個体群の遺伝的構造の役割

研究課題名(英文) The role of the genetic structure of host populations on the evolution of an emerging viral pathogen

研究代表者

内井 喜美子 (UCHII, Kimiko)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：90469619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：コイヘルペスウイルス(CyHV3)感染症をモデルとし、宿主個体群遺伝構造と新興病原体の相互作用を評価するための解析手法の確立と基礎的知見の取得を行った。まず、宿主個体群の遺伝的構造を迅速に明らかにするための環境DNA手法を開発した。この手法を野外に適用し、各地のコイ個体群の遺伝的構造を迅速に評価することに成功した。また、自然水域から採取したCyHV3の遺伝子解析より、CyHV3が日本に導入された数年後には、複数の遺伝子型が出現したことを明らかとした。日本には単一系統のCyHV3が導入されたことより、導入後に遺伝的変異が生じたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the interactions between the evolution of an emerging Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3) and the population genetic structures of host common carp (*Cyprinus carpio*), I developed an environmental DNA-based method to evaluate the carp population genetic structures and performed a preliminary survey of CyHV3 genetic variations. The environmental DNA method successfully provided quantitative estimates for the proportion of genotypes in wild carp populations. CyHV3 collected from natural water bodies several years after its introduction had multiple genotypes, even though a single genotype was initially spread in Japan, suggesting that CyHV3 evolved after its introduction.

研究分野：生態学

キーワード：新興感染症 コイヘルペスウイルス 環境DNA

1. 研究開始当初の背景

近年、人為要因により、野生生物における新興感染症の発生が世界的に増大している (Daszak *et al.* 2000 Science)。新興感染症は生物多様性への重大リスクと捉えられ始め、その動態の解明や野生生物絶滅リスクの評価が保全学的に急務の課題となっているが、生態系における感染症動態や宿主との相互作用に関する知見は未だ乏しい。

病原生物の病原性と宿主の抵抗性は遺伝的に大きく支配される。僅かな遺伝的変異により病原生物が強毒化することや、宿主の抵抗性が種間や遺伝的系統間で異なることはよく知られる (Altizer *et al.* 2003)。人為的にもたらされることの多い新興感染症は急速かつ広範に蔓延するものの、原因となる病原生物は特定の遺伝系統に由来することが多く (James *et al.* 2009)、発生初期の遺伝的多様性は低い傾向にある。一方、異なる遺伝的特性を持った個体の集まりである野生宿主集団には、様々な抵抗性を持つ個体が含まれる。従って、新興病原生物が侵入した時、病原生物の増殖率や伝播速度と宿主個体群動態は、宿主個体群がどのような遺伝的構造を持つかによって大きく影響されると考えられる。したがって、宿主個体群の遺伝的構造が新興感染症動態に及ぼす影響の評価は、新興感染症の動態メカニズム解明の中でも重要な位置付けを持つ。

2. 研究の目的

コイ (*Cyprinus carpio*) を宿主とするコイヘルペスウイルス (*Cyprinid herpesvirus 3*; CyHV3) は、2003 年に単一株が日本に導入されたことが分かっている (Kurita *et al.* 2009)。したがって、CyHV3 感染症は、宿主個体群遺伝構造の違いが新興病原生物の動態に与える影響を評価するための格好のモデルとなる。CyHV3 暴露に対する宿主コイの抵抗性については、日本在来遺伝子型を持つ個

体が低く、ユーラシア大陸に由来する外来遺伝子型を持つ個体が高いことが知られる (Ito *et al.* 2014)。そこで本研究では、在来：外来遺伝子型頻度を宿主個体群遺伝構造の指標とし、これを迅速に推定するために、環境 DNA (水中に浮遊する生物由来の全 DNA) を用いた解析手法の開発を行うこと目的とした。同時に、野生宿主個体群における侵入初期の CyHV3 の遺伝情報について、基礎的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 環境 DNA を用いた宿主個体群遺伝構造解析法の開発

一塩基多型 (SNP) に基づき 2 種の DNA を高感度に判別することのできる手法として、DNA-RNA-DNA プローブと RNA 分解酵素 H を用いたリアルタイム PCR 法を採用した。まず、在来遺伝子型と外来遺伝子型を判別する SNP マーカーを探索し、その SNP を RNA とした DNA-RNA-DNA プローブを在来遺伝子型と外来遺伝子型それぞれについて設計した。これら 2 つのプローブ、コイ種特異的なプライマーセット、および RNA 分解酵素 H を用いたリアルタイム PCR を行い、2 つのプローブの Threshold Cycle 数の差 (C_T) より、在来：外来 DNA の割合を定量した。

本手法の定量性を確認するため、在来および外来 DNA を 15:1~1:15 の比率で含む混合 DNA 溶液を用い、 $C_T(C_{T\text{在来}} - C_{T\text{外来}})$ と混合比 (外来 DNA コピー数 / 在来 DNA コピー数) の検量線の作成し、その妥当性を検討した。また、本手法を用い、琵琶湖につながる長命寺川および伊庭内湖より採取した環境 DNA サンプルにおける在来：外来 DNA の割合を推定した。同時に、リアルタイム PCR 産物における在来：外来 DNA の割合をサブクローニング解析によって定量し、本手法で得られた定量結果との整合性を確認した。

なお、本手法の開発については、本研究課

題に先立って行った研究内容が一部含まれる。

(2) CyHV3 の遺伝子解析

2009 年に琵琶湖において捕獲したコイの脳組織より DNA を抽出し、Uchii *et al.* (2014) の方法に従い、CyHV3 の Direct repeat 領域をターゲットとした Nested PCR を行った。Nested PCR 産物をサブクローニングに供し、得られた複数のクローンに導入されたターゲット DNA 配列のシーケンス解析を行った。得られた配列と、Direct repeat 領域の既知配列を ClustalW によりアラインメントし、系統樹解析を行った。

4. 研究成果

(1) 環境 DNA を用いた宿主個体群遺伝構造解析法の確立

在来 DNA と外来 DNA それぞれに特異的なプローブ 2 種を用いたリアルタイム PCR より得られた C_T 値と、在来 : 外来 DNA 比の関係を図 1 に示す。鋳型 DNA 濃度の違いに関わらず両者の間には強い相関があり、また、どの DNA 濃度においてもほぼ同一の検量線が得られた。したがって、本手法を用いれば、在来 : 外来 DNA 比を 15:1~1:15 の範囲で正確に定量できることが明らかとなった。

長命寺川と伊庭内湖において採取した環境 DNA サンプルにおける在来 DNA の割合は、本手法によりそれぞれ 94% および 27% と定量された。一方、リアルタイム PCR 産物のサブクローニング解析によると、在来 DNA の割合はそれぞれ 95% と 35% であった。本手法とサブクローニング解析の間でほぼ同等の定量値が得られたことより、本手法は野外にて採取した環境 DNA サンプルにおける在来 : 外来 DNA の割合を正しく定量できることが示された。

本手法を用いれば、従来は多大な労力を要した個体群遺伝構造解析を迅速かつ広範に

実施することが可能となるため、今後、コイ個体群遺伝構造と CyHV3 の相互作用の解明に向けた研究を円滑に進めることができると期待される。

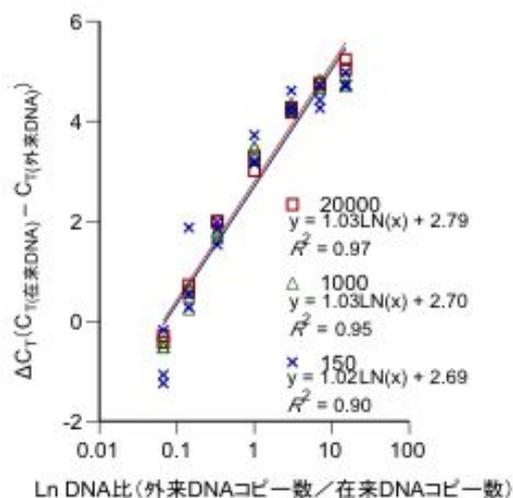


図 1. DNA 比と C_T の検量線。鋳型 DNA 濃度は以下の通り：□, 20000 コピー / 反応；△, 1000 コピー / 反応；×, 150 コピー / 反応。

(2) 侵入初期の CyHV3 の遺伝子解析

琵琶湖の野生コイに感染していた CyHV3 の Direct repeat 領域には、複数の遺伝子型が認められた。また、同一宿主個体から複数の CyHV3 遺伝子型が検出される場合があった。これらの結果より、CyHV3 が日本に導入されてから数年後には、CyHV3 に遺伝的変異が生じたことが示唆された。また、同一宿主個体が複数回の CyHV3 感染を繰り返している可能性も示された。

< 引用文献 >

- Altizer S *et al.* (2003) Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends Ecol Evol* 18(11): 589-596
- Daszak P *et al.* (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-Threats to biodiversity and human health. *Science* 287(5452):443-449.

Ito T *et al.* (2014) Differences in the susceptibility of Japanese indigenous and domesticated Eurasian common carp (*Cyprinus carpio*), identified by mitochondrial DNA typing, to cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Vet Microbiol* 171(1-2):31-40

James TY *et al.* (2009) Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathog* 5(5):e1000458

Kurita J *et al.* (2009) Molecular epidemiology of koi herpesvirus. *Fish Pathol* 44(2):59-66

Uchii K *et al.* (2014) Seasonal reactivation enables *Cyprinid herpesvirus 3* to persist in a wild host population. *FEMS Microbiol Ecol* 87(2):536-542

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Uchii K, Doi H, Minamoto T (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16(2):415-422. (DOI:10.1111/1755-0998.12460) 査読有

Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsuhashi S, Yamanaka H, Minamoto T (2015) Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLoS ONE* 10(3):e0122763. (DOI:10.1371/journal.pone.0122763) 査読有

[学会発表](計4件)

内井喜美子, 土居秀幸, 源利文, 山中裕樹. SNPの定量的解析による遺伝子型頻度

の推定. 第63回日本生態学会, 2016年3月20-24日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

酒井涼, 内井喜美子, 谷佳津治. コイヘルペスウイルスの野外における増殖/潜伏サイクル. 第65回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2015年10月17日, 大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

内井喜美子, 土居秀幸, 山中裕樹, 源利文. 環境DNA分析によるコイの季節移動の推定. 日本陸水学会第80回大会, 2015年9月26-29日, 北海道大学(北海道・函館市)

内井喜美子, 土居秀幸, 山中裕樹, 源利文. 環境DNA手法を用いた在来および外来コイの生息地利用の推定. 第62回日本生態学会, 2015年3月18-22日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

[図書](計1件)

内井喜美子, 川端善一郎. "コイヘルペスウイルス". 川端善一郎他編「感染症の生態学」, 『シリーズ現代の生態学』, 共立出版, 東京, 2016年, 356pp. (pp.241-253)

6. 研究組織

(1)研究代表者

内井 喜美子 (UCHII, Kimiko)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号: 90469619