農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Serotype identification of bluetongue virus isolates in Japan based on genetic and phylogenetic characterization

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 白藤, 浩明, 梁瀬, 徹, 加藤, 友子, 山川, 睦 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002265

研究紹介

遺伝学的解析によるブルータングウイルス日本国内分離株の血清型の同定

白藤浩明[1)]，梁瀬　徹[1)]，加藤友子[2)]，山川　睦[1)]

Serotype identification of bluetongue virus isolates in Japan based on genetic and phylogenetic characterization

Hiroaki SHIRAFUJI[1)], Tohru YANASE[1)], Tomoko KATO[2)] & Makoto YAMAKAWA[1)]

要　約

本研究では，1985～2008年に日本国内で分離されたブルータングウイルス（Bluetongue virus：BTV）の遺伝子解析および分子系統樹解析を実施した。外殻カプシドの構造タンパク質VP2をコードするゲノム分節2の分子系統樹が血清型1～24に完全に一致した分岐を示すことを踏まえて（Maan et al., J. Gen. Virol. 88, 621-630 (2007)），本研究ではそのゲノム分節2を解析の対象とし，BTV日本国内分離株の血清型の同定を試みた。遺伝子解析の結果，分節の長さやオープンリーディングフレームの位置，5'および3'末端の塩基配列を含む遺伝学的特徴によって，供試株は6つのグループに明瞭に分類された。さらに，これらの6つのグループは，分子系統樹解析による血清型1から24の参照株や野外株との比較の結果，それぞれ血清型2，3，9，12，16および21であることが明らかになった。本研究の結果により，国内には少なくとも6つの血清型のBTVが存在することが明らかとなった。本研究の結果は，日本および他の近隣アジア諸国におけるBTVの疫学を理解し，より効果的な疾病制御対策を講じる上で有益と考えられる。

背　景

ブルータングウイルス（Bluetongue virus：BTV）は，レオウイルス科オルビウイルス属に分類されるウイルスであり，ヒツジ，ウシ，ヤギ，シカおよび野生の反芻動物に感染する[12, 14)]。感受性動物がBTVに感染した場合，不顕性感染に終わることも多いが，発症例では発熱，元気消失，食欲減退，顔面浮腫，流涎，嚥下障害，鼻汁漏出，呼吸困難等の症状を示し，舌や口唇，口腔・鼻腔粘膜に腫脹や潰瘍形成が見られる[14)]。ブルータング（Bluetongue：BT）という病名は，感染動物の舌がチアノーゼによって青紫色を呈して腫大することに由来するが，実際にこのような症状が観察されることは少ない。我が国においてBTは家畜伝染病予防法により届出伝染病に定められている。また，本疾病による生産性の低下や死亡が直接的な経済的損失の原因となることに加え，流行地域からの感受性動物の移動制限や牛精液および受精卵の輸出制限による貿易上の損失，さらには診断や防疫にかかる費用も甚大な金額となりうることから[16)]，国際獣疫事務局のリスト疾病（OIE-listed disease）に定められている。これまでのところ，2008年および2010年にそれぞれ分離・同定された血清型25および26を含め[7, 9)]，BTVには26の血清型が確認されており[12)]，アジア・オーストラリアには16の血清型の存在が報告されているが[4)]，我が国に分布するBTVの血清型は一部を除いてそのほとんどが不明であった[6)]。

BTVは10分節からなる2本鎖RNAゲノムを有しており，7つの構造タンパク質（VP1-VP7）および4つの非構造タンパク質（NS1-NS4）をコードしている[1, 2, 13)]。その中で，ウイルス粒子の最外層に位置する血清型特異抗原VP2をコードするゲノム分節2は，分子系統樹解析によって血清型1～24に完全に一致した分岐を示すことが明らかになっている[10, 12)]。このことにより，ゲノム分節2の遺伝学的解析および分子系統樹解析を実施することによってBTVの血清型を同定することが可能となり，参

1）農研機構 動物衛生研究所 温暖地疾病研究領域（九州支所）
2）農研機構 動物衛生研究所 動物疾病対策センター 疾病診断室（九州支所駐在）

表 1. 供試した BTV 日本国内分離株の株名，分離年，継代歴，地理的由来，分離材料および同定された血清型

株名	分離年	継代歴 *	地理的由来（県名）	分離材料	血清型 †
173	1985	HL6	熊本	牛赤血球	16
KY63	1987	BHK2-HL4	鹿児島	牛赤血球	16
ON89-1	1989	HL6	沖縄	牛赤血球	21
ON90-2	1990	HL6	沖縄	*Culicoides* spp. §	12
ON90-4	1990	HL8	沖縄	牛血液	16
TO2-1	1994	ECE1-V3-HL9	栃木	羊赤血球	21
ON-6/B/98	1998	HL6	沖縄	牛血液	3
MZ-1/C/01	2001	HL6	宮崎	*Culicoides* spp.	16
KSB-31/C/01	2001	BHK6	鹿児島	*Culicoides* spp.	16
NS-1/E/02	2002	C2-HL5	長崎	牛赤血球	16
ON-2/C/03	2003	BHK5	沖縄	*Culicoides brevitarsis*（オーストラリアヌカカ）	9
MZ-1/C/07	2007	HL6	宮崎	*Culicoides* spp.	2
KSB-6/C/08	2008	BHK5	鹿児島	*Culicoides maculatus*（ミヤマ（シガ）ヌカカ）	16
KSB-7/C/08	2008	BHK5	鹿児島	*Culicoides* spp.	16

* 継代歴の略称は以下の通り。HL：HmLu-1 細胞，BHK：BHK-21 細胞，ECE：発育鶏卵，V：Vero 細胞，C：C6/36 細胞（ヒトスジシマカ由来）。

† 分子系統樹解析により同定（図 1 および 2 参照）。

§ *Culicoides* 属のヌカカ（種は未同定）。

照株やそれに対する抗血清を使用した交差中和試験に代わる血清型同定法として有用と考えられている。そこで本研究では，BTV 日本国内分離株の遺伝学的特徴を明らかにし，血清型を同定することを目的として，ゲノム分節 2 を対象とした遺伝学的解析を実施することとした。

材料と方法

供試ウイルス株

日本国内で 1985 ～ 2008 年に分離された 14 株の BTV を供試した（表 1）。全 14 株中 13 株は，九州地方あるいは沖縄県においてウシ血液やヌカカから分離されたもので，残る 1 株（TO2-1 株）は，1994 年に栃木県にて BT 国内初発例が確認された際に感染ヒツジから分離されたものである [6]。全ての供試株は培養細胞（BHK-21 あるいは HmLu-1）を用いて増殖させ，約 90% の単層細胞に細胞変性効果が認められた時点で感染細胞を回収した。

Full-length amplification of cDNAs（FLAC）法による cDNA の合成および遺伝子解析

本研究では，Maan ら（2007）の報告に従い，BTV 感染細胞からの 2 本鎖 RNA の抽出・精製および Full-length amplification of cDNAs（FLAC）法によるゲノム分節 2 全長の cDNA 合成を行った [11]。FLAC 法の概要を説明すると，まず T4 RNA ligase 1（New England Biolabs）を用いて 2 本鎖 RNA の 3’ 末端にアンカープライマー（p-GACCTCTGAGGATTCTAAAC / iSp9 / TCCAGTTTAGAATCC-OH）を結合させた。その後，アンカープライマーが結合した 2 本鎖 RNA について，1% アガロースゲルの電気泳動により各ゲノム分節を分離させ，ゲノム分節 2 部分のゲルを切り出した。切り出したゲルより，アンカープライマーが結合した 2 本鎖 RNA を RNaid Kit（BIO 101）を用いて抽出し，ThermoScript RT（Life Technologies）を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。その後，FLAC 法により合成した cDNA を鋳型として，5-15-1 プライマー（5’-GAGGGATCCAGTTTAGAATCCTCAGAGGTC-3’）および KOD -Plus- Ver.2（東洋紡）を用いた PCR を実施し，PCR 産物の塩基配列をダイレクトシークエンス法により決定した。さらに，MEGA4 を用いて近接接合法による分子系統樹解析を実施した [17, 18]。

表 2. 供試した BTV 日本国内分離株のゲノム分節 2 および VP2 の特徴
保存された 5’ および 3’ 末端の 6 塩基は太字，開始および終止コドンは下線にて示す。

株名	分節の長さ（塩基数）	ORF（塩基数）	VP2 分子量（kDa）	GC 含量（%）	5' 末端配列（+ 鎖）	3' 末端配列（+ 鎖）
173	2935	22-2901	112.3	41.8	**GTTAAA**AACGTTAGCCTGGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCTGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
KY63	2935	22-2901	112.3	41.8	**GTTAAA**AACGTTAGCCTGGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCTGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
ON89-1	2922	18-2885	110.2	41.8	**GTTAAA**TTAGTCTCGTG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>CCCTAGTGACATAGGGTGCACGGACTAATCA**ACTTAC**
ON90-2	2904	17-2869	109.8	43.6	**GTTAAA**AGTTGCGAGG<u>ATG</u>	<u>TGA</u>GCCCTTGACAAGGCTCCCTCGCGGCTTCA**ACTTAC**
ON90-4	2935	22-2901	112.3	41.6	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCTGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
TO2-1	2922	18-2885	110.2	42.0	**GTTAAA**TTAGTCTCGTG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>CCCTAGTGACATAGGGTGCACGGACTAATCG**ACTTAC**
ON-6/B/98	2934	21-2900	111.7	41.4	**GTTAAA**AACGTTGCCCGGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>CCCCGTGACAAGGGTTGGGCACGCTTTC**ACTTAC**
MZ-1/C/01	2935	22-2901	112.1	41.9	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCCGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
KSB-31/C/01	2935	22-2901	112.0	41.9	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCCGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
NS-1/E/02	2935	22-2901	112.1	41.9	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCCGTGACAGGGATTGGGCGCGTTTAC**ACTTAC**
ON-2/C/03	2921	18-2885	110.2	41.8	**GTTAAA**AGTTATCTAGG<u>ATG</u>	<u>TAG</u>TCCCAGTGACATGGGGCTCCTAGAGCTTAC**ACTTAC**
MZ-1/C/07	2943	18-2906	111.4	42.5	**GTTAAA**ACAGTCTCGCG<u>ATG</u>	<u>TGA</u>CCTGCGTGACTGCAGGCCCGCGATCTGTTAC**ACTTAC**
KSB-6/C/08	2935	22-2901	112.0	42.0	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCCGTGACAGGGATTGGGCGCGTTCAC**ACTTAC**
KSB-7/C/08	2935	22-2901	112.0	42.0	**GTTAAA**AACGTTAGCCTAGAG<u>ATG</u>	<u>TAA</u>TCCCGTGACAGGGATTGGGCGCGTTCAC**ACTTAC**

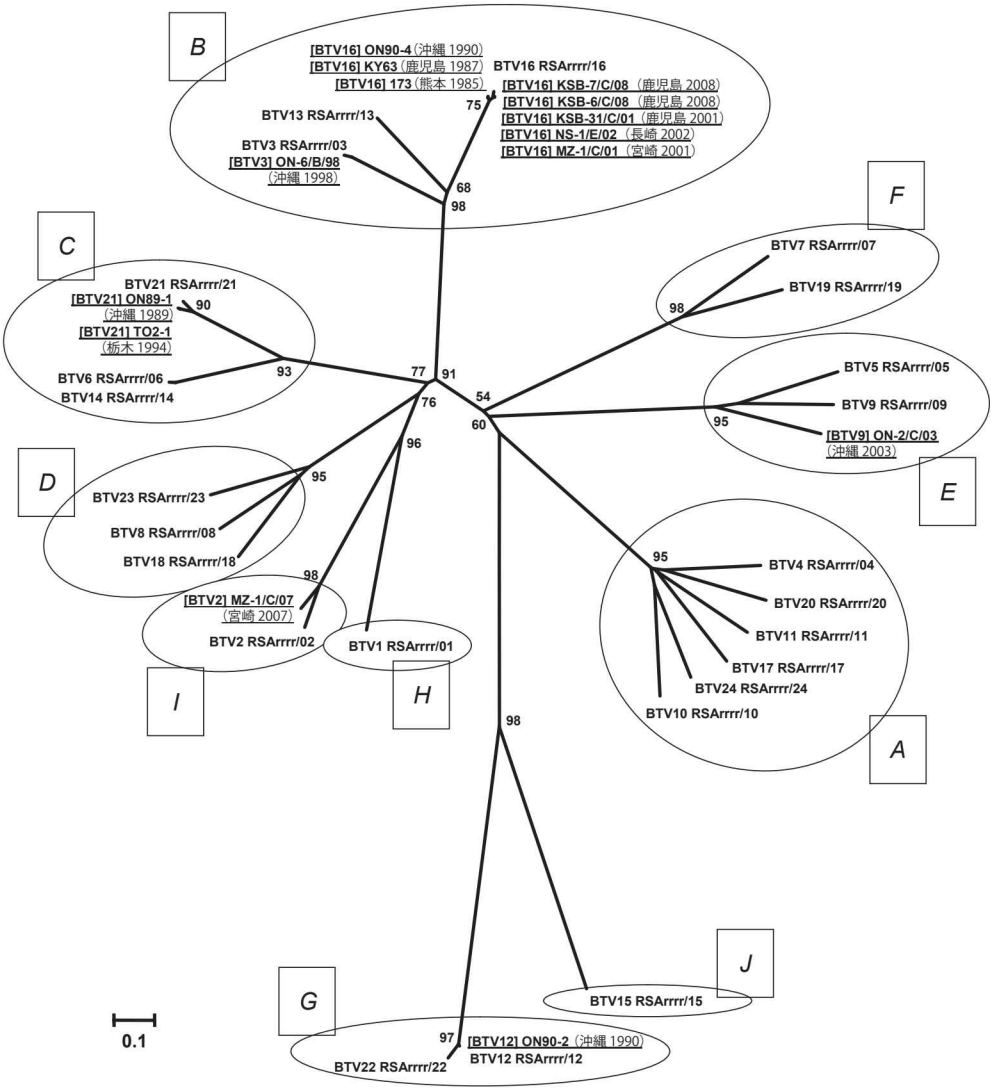


図 1. ゲノム分節 2 全長の核酸配列に基づく BTV 日本国内分離株および血清型参照株の分子系統樹
A ～ J の 10 nucleotypes に分類される BTV の中で [10]，本研究にて供試した BTV 日本国内分離株を下線で示す。本研究によって同定された血清型については，各供試株の株名の前に括弧書きにて示す。系統樹上の数値は Bootstrap 値を表す（1,000 回演算，百分率にて示す）。

結　果

供試したBTV国内分離株のゲノム分節2の特徴を表2に示した。ゲノム分節2の全長は2,904～2,943塩基であり，GC含量は41.6～43.6%であった。終止コドンの配列は保存されておらず，TAA，TAG，TGAの3種類が確認された。5’非翻訳領域の長さは17～21塩基であり，3’非翻訳領域は34～37塩基であった。全ての供試株において，5’末端（5’-GTTAAA…-3’）および3’末端（5’…ACTTAC-3’）の6塩基はそれぞれ保存されていた。オープンリーディングフレーム（Open reading frame：ORF）の長さは2,853～2,889塩基であり（終止コドンを含む），VP2は950～962アミノ酸残基，VP2の分子量は109.8～112.3kDaであった。全供試株間における核酸およびアミノ酸配列の相同性は，それぞれ41.85～99.93%および26.88～100%であった。

供試株および血清型参照株（血清型1～24）のゲノム分節2の塩基配列から分子系統樹を作成した結果，供試株はnucleotype B，C，E，G，Iの5つに分類された（図1）[10]。これら5つのnucleotypeについて，外国で分離された野外株の塩基配列を加えてnucleotype別の分子系統樹を作成したところ，供試株は血清型2，3，9，12，16，21のいずれかの血清型参照株および野外株に近接して分類された（図2）。また，各供試株と，それらの株に最も近接して分類された上記6つの血清型の参照株との関係を確認したところ，核酸配列の相同性は68.79～99.00%，アミノ酸配列の相同性は73.30%～99.37%であり，また，ゲノム分節やORFの長さが多くの例で一致していたことに加え，アミノ酸残基の挿入および欠失，システイン残基の配置は完全に一致していた（データ示さず）。

考　察

日本国内では，主に九州地方や沖縄県において，アカバネウイルスや牛流行熱ウイルスといった様々な牛のアルボウイルスが幾度となく流行し，肉用牛や乳用牛の生産阻害要因となってきた。その一方でBTVは，数多くのウイルス分離例や抗体陽性例が日本国内で認められていたものの，国内のヒツジやウシにおける感染例の多くが軽症あるいは無症状であったこともあり，国内で分離されたBTVの多くはその性状が十分に解析されていなかった。しかし，日本国内で分離されたBTVのシークエンス解析をすることにより，その遺伝学的特徴のみならず，血清型ならびに外国分離株との関連性を明らかにすることが可能となることから，本研究ではBTV国内分離株のゲノム分節2の解析を実施した。

ゲノム分節2の分子系統樹解析による血清型参照株や外国分離株との比較により，BTV日本国内分離株が5つのnucleotypes（B，C，E，G，I）に分類されると同時に，6つの血清型（2，3，9，12，16，21）に分類されることが明らかになった。また，本研究によって同一血清型と判定された日本国内分離株と血清型参照株あるいは外国分離株の相同性は，以前に報告された同一血清型株間の相同性（核酸レベルで69～100%，アミノ酸レベルで73～100%）と非常に近い値であった[10]。このことから，交差中和試験の代替法として，FLAC法と分子系統樹解析によるBTV血清型の同定が有用であることも確認された。

本研究により，供試したBTV日本国内分離株の遺伝学的性状が一様でなく，少なくとも6つの血清型が日本国内に存在することが明らかとなり，由来の異なるBTVの株が日本国内に分布していることが示唆された。しかしながら，我が国におけるBTVの流行動態を理解する上では，他のゲノム分節のシークエンス解析や媒介節足動物の採集・同定など，さらなる調査・研究が必要である。とくに，アジア太平洋地域におけるBTVの分子疫学に活用されることの多いゲノム分節3および10については[3, 5, 8, 15, 19]，筆者らが解析を進めているところであり，我が国におけるBTV流行動態を知る上で貴重な知見が得られるものと期待される。今後，このような研究を通じてBTVの実態を的確に把握し，BTに対するより効率的な診断および予防体制を整えることが必要である。

謝　辞

本研究は平成20～21年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

参考文献

1）Attoui, H., Maan, S., Anthony, S., et al.: Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy. In: Bluetongue (Biology of Animal Infections) (Mellor, P., Matthew, B. & Mertens, P., eds.), 1st ed., 23-52, Elsevier, London (2009).

2）Belhouchet, M., Mohd Jaafar, F., Firth, A.E., et al.: Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. PLoS One 6, e25697 (2011).

3）Bonneau, K.R., Zhang, N., Zhu, J., et al.: Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from the United States and the People's Republic of China. Virus Res. 61, 153-160 (1999).

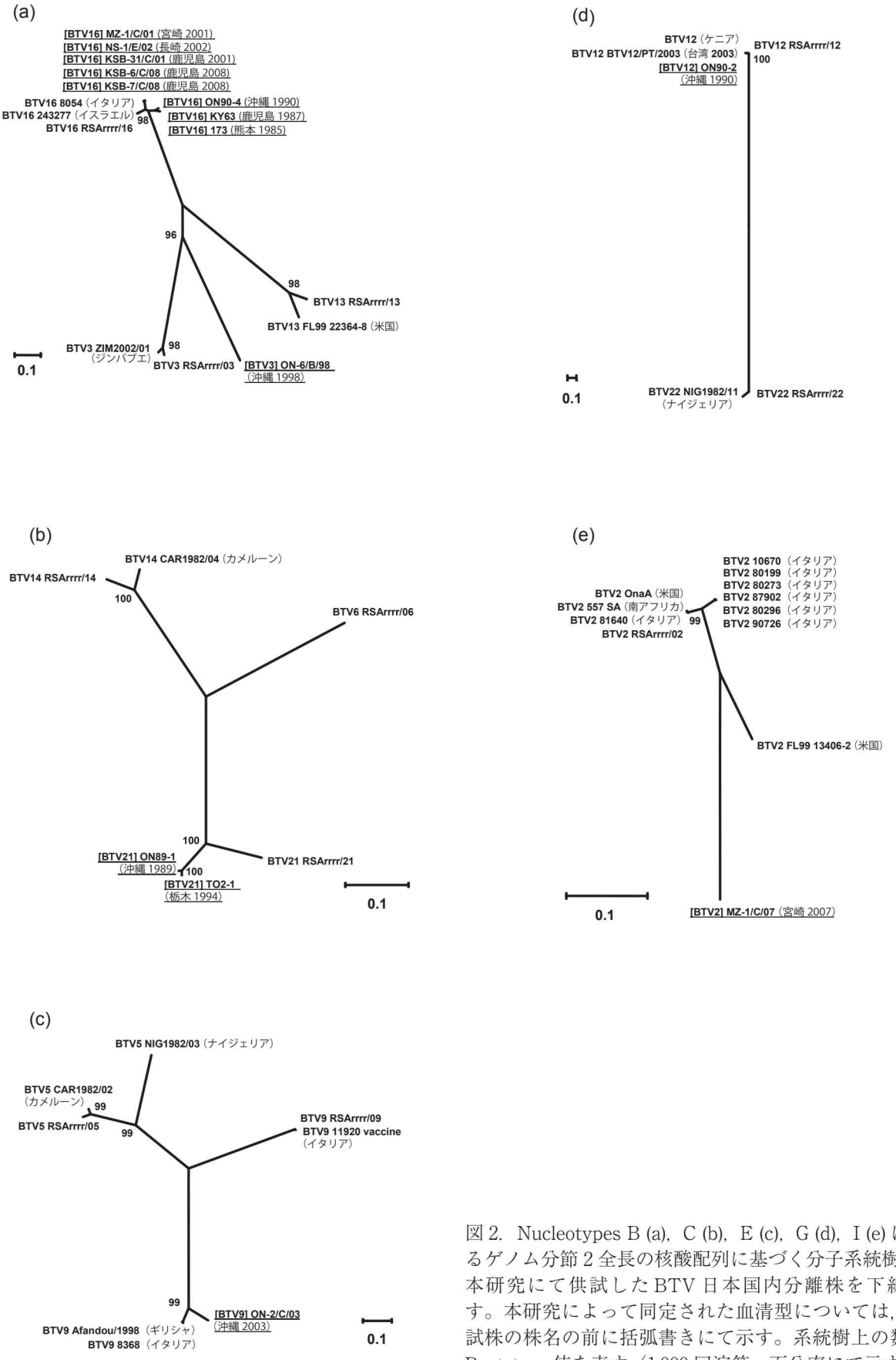


図 2. Nucleotypes B (a), C (b), E (c), G (d), I (e) におけるゲノム分節 2 全長の核酸配列に基づく分子系統樹
本研究にて供試した BTV 日本国内分離株を下線で示す。本研究によって同定された血清型については，各供試株の株名の前に括弧書きにて示す。系統樹上の数値は Bootstrap 値を表す（1,000 回演算，百分率にて示す）。

4) Daniels, P., Lunt, R. & Pritchard, I.: Bluetongue viruses in Australasia and East Asia. 223-234. In: Bluetongue (Biology of Animal Infections) (Mellor, P., Matthew, B. & Mertens, P., eds.), 1st ed., 223-234, Elsevier, London (2009).
5) Desai, G.S., Hosamane, M., Kataria, R.S., et al.: Sequence analysis of the S10 gene of six Bluetongue Virus isolates from India. Transbound. Emerg. Dis. 56, 329-336 (2009).
6) Goto, Y., Yamaguchi, O. & Kubo, M.: Epidemiological observations on bluetongue in sheep and cattle in Japan. Vet. Ital. 40, 78-82 (2004).
7) Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., et al.: Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. Emerg. Infect. Dis. 14, 1855-1861 (2008).
8) Lee, F., Ting, L.J., Jong, M.H., et al.: Subclinical bluetongue virus infection in domestic ruminants in Taiwan. Vet. Microbiol. 142, 225-231 (2010).
9) Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., et al.: Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. Emerg. Infect. Dis. 17, 886-889 (2011).
10) Maan, S., Maan, N.S., Samuel, A. R., et al.: Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. J. Gen. Virol. 88, 621-630 (2007).
11) Maan, S., Rao, S., Maan, N.S., et al.: Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. J. Virol. Methods 143, 132-139 (2007).
12) Mertens, P.P.C., Maan, S., Samuel, A., et al.: Orbivirus, Reoviridae. In: Virus Taxonomy, Eighth Report of the ICTV (Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A., eds.), 466-483, Elsevier/Academic Press, London (2005).
13) Mertens, P.P.C., Ross-smith, N., Diprose, J., et al.: The structure of bluetongue virus core and proteins. In: Bluetongue (Biology of Animal Infections) (Mellor, P., Matthew, B. & Mertens, P., eds.), 101-133, Elsevier, London (2009).
14) OIE. Bluetongue. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed., 158-174, Office International des Epizooties, Paris (2008).
15) Pritchard, L.I., Sendow, I., Lunt, R., et al.: Genetic diversity of bluetongue viruses in south east Asia. Virus Res. 101, 193-201 (2004).
16) Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., et al.: Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Vet. Res. 39, 46 (2008).
17) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., et al.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599 (2007).
18) Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680 (1994).
19) Zhang, Y., Du, X., Li, W., et al.: Genetic diversity of the S10 RNA segment of field and vaccine strains of bluetongue virus from the P. R. China. Arch. Virol. 155, 281-286 (2010).

Summary

Serotype identification of bluetongue virus isolates in Japan based on genetic and phylogenetic characterization

Hiroaki SHIRAFUJI [1)], Tohru YANASE [1)], Tomoko KATO [2)] & Makoto YAMAKAWA [1)]

We conducted genetic and phylogenetic analyses of genome segment 2 (Seg-2), which encode serotype-specific structural proteins of the outer capsid, of bluetongue virus (BTV) isolated in Japan from 1985 through 2008. The Japanese strains of BTV were clearly sorted into 6 groups by several genetic characteristics of Seg-2 including segment length, open reading frame length, and 5'- and 3'- terminal sequences, and they were identified as serotypes 2, 3, 9, 12, 16 and 21 by phylogenetic comparisons with Seg-2 of reference and field strains of 24 serotypes (1 to 24). Thus, our present study revealed that at least 6 serotypes of BTV were isolated in Japan. Our data would be beneficial for understanding BTV epidemiology and for taking better control measures against bluetongue in Japan and its neighboring countries in the Asia-Pacific region.