

養殖ニホンウナギに発生するウイルス性血管内皮壊死症魚から分離した ビルナウイルスの Segment A ゲノムの塩基配列の解析

小野信一*1・若林耕治*2・永井 彰*3

Sequence of genome segment A of a birnavirus isolated from cultured Japanese eel
with viral endothelial cell necrosis of eel

Shin-ichi ONO, Kouji WAKABAYASHI and Akira NAGAI

Abstract

A birnavirus (Eel Birnavirus Japanese; EBVJ) has been isolated from cultured Japanese eel (*Anguilla japonica*) infected with gill disease characterized by viral endothelial cell necrosis of eel (VECNE) in Japan. The cDNA sequence (3,041bp) of almost complete region in segment A including the large open reading frame (ORF) from EBVJ was determined, and compared to the sequences of the other twenty-six strains of birnavirus. The size of the large ORF and small open reading frame (small ORF) in segment A of EBVJ was 2,916bp and 411bp respectively, and also VP2/NS junction region was 310bp long. Comparing the segment A nucleotide sequence exhibited that EBVJ had high homology (87.4% homology) with N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). In addition, EBVJ showed the highest homology with Ab strain of IPNV as comparing nucleotide sequences at VP2 (95.0% homology) and VP2/NS (96.8% homology) junction regions. Amino acid sequence of EBVJ was also very similar to Ab strain in VP2/NS junction region. Analysis of molecular phylogenetic trees among EBVJ and twenty-six strains of birnaviruses revealed that EBVJ was very close to Ab strain and belonged to genogroup II including Ab, C1, C2, C3, TE2, Sp, N1 and Fr, 21 strains of IPNV.

緒 言

現在、養殖ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) に大きな被害を与えている疾病はウイルス性の鰓病である。このなかでウイルス性血管内皮壊死症 (VECNE; Viral endothelial cell necrosis of eel) については、その自然感染魚から楠田ほか (1989a)、増田・小野 (1999) らによってビルナウイルスに属するウイルスが分離されている。魚類由来のビルナウイルスにはサケ科魚類の伝染性膵臓壊死症ウイルス (IPNV; Infectious pancreatic necrosis virus) がよく知られている (Wolf et al., 1960)。ウナギでは Eel virus european (EVE) をはじめ、いくつかのビルナウイルスが知られている (Sano et al., 1976, Hudson et al., 1981, Nam-Sil Lee et al., 1999)。また、ブリの腹水症ウイルス (Yellowtail ascites virus YAV) など海水魚由来のビルナウイルスもいくつか分離されており、これらは海産魚由来ビルナウイルス

(Marine fish derived birnaviruses, MABV) と総称されている (Kusuda et al., 1989b, Kusuda et al., 1993, Nakajima et al., 1993, Suzuki et al., 1998a)。他に、魚類以外に貝類からもビルナウイルスが分離されている (Suzuki et al., 1998b, 1998c)。

ビルナウイルスは2本鎖RNAをゲノムに持つ直径約60nmで正二十面体のRNAウイルスである。このゲノムはSegment AとSegment Bの二つに分かれている。Segment AのLarge open reading frame (Large ORF) はウイルス主要構造タンパク質 (VP2)、ウイルスプロテアーゼ (NS) 及びウイルス副構造タンパク質 (VP3) 遺伝子を、Small open reading frame (Small ORF) はVP5遺伝子をそれぞれコードしている。またSegment BはRNAポリメラーゼ (VP1) 遺伝子をコードしている (Dobos 1977, Duncan and Dobos 1986, Manning and Leong, 1990)。IPNVでは核酸の解析が進み、Duncan and Dobos (1986) がJasper株からSegment AのLarge ORFの塩基配列を明らかにし

2003年10月1日受理

*1 東海大学海洋学部水産学科

*2 東海大学海洋学部・現国際ペットワールド専門学校講師

*3 東海大学名誉教授

ている。さらに Havarstein *et al.* (1990) はこれをもとに IPNV N1 株の Segment A の全ての塩基配列を決定し、他のビルナウイルスと比較検討を行った。Segment A の VP2/NS ジャンクション領域は変異が起こりやすく、各種ビルナウイルスを同じプライマーを使って増幅が可能な領域であるため、ビルナウイルスの遺伝的な変異の解析とゲノグルーピングに適している領域である。このため IPNV と MABV では VP2/NS ジャンクション領域のアミノ酸配列をもとにビルナウイルスのゲノグルーピングが行われている (Heppell *et al.*, 1992, 1993, Hosono *et al.*, 1996)。しかし、ウイルス性血管内皮壊死症から分離されたビルナウイルス核酸の解析はなされていない。

そこで本研究では、増田・小野 (1999) がニホンウナギのウイルス性血管内皮壊死症の自然感染魚より分離したビルナウイルスから核酸を抽出し、Blake *et al.* (1995) 各種の水棲生物由来ビルナウイルスの検出用に設計した 4 組のプライマー (PrA, PrC, PrD) を用いて RT-PCR を試みたところ、目的とするサイズの DNA 断片が増幅された。この DNA 断片の塩基配列をもとに新たに 6 種類のプライマーを設計し、本ウイルスの Segment A のなかの、Large ORF を含むほぼ全領域の塩基配列を決定した。さらにその塩基配列及びアミノ酸配列を 26 種類のビルナウイルスと比較し、VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列とアミノ酸配列のそれぞれについて増田・小野 (1999) が分離したウイルス (以後本ウイルスを EBVJ; Eel birnavirus Japanese とする) と 26 種類のビルナウイルス間での系統樹の推定を試みたので、これらの結果について報告する。

材料及び方法

細胞培養とウイルス

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の鰓うっ血症の自然感染魚から分離した EBVJ は 10% 濃度の Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO), 10U/ml ペニシリン (Meiji Seika), 及び 50µg/ml 硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika) を添加した Leibovitz's L-15 培地 (GIBCO) で生育したニホンウナギ鰓由来上皮細胞 (Eel Swimbladder Epithelial cell, ESE cell) を用いて培養した。本ウイルスを接種してから約 40 時間後、Cytopathic effect (CPE) により剥離した細胞を含む培養液を 800 × g, 5 分間で遠心分離し、その上清を EBVJ の核酸の抽出に使用した。

核酸の抽出

EBVJ の核酸 (RNA) の抽出には、「QIAamp Viral RNA Mini kit」(QIAGEN) を使用した。すなわち Carrier RNA を含む Buffer AVL 560µl を 1.5ml マイクロチューブに取り、これに EBVJ を含む培養液 140µl を添加し 15 秒間のボルテックスで振とう後、室温で 10 分間インキュベートした。次に 99.5% エタノール 560µl をサンプルに添加し、15 秒間ボルテックスした。QIAamp スピнкаラムを 2ml コレクションチューブに挿入し、これにサンプル 630µl を注入して、

6,000 × g で 1 分間、遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した。この QIAamp スピнкаラムに 500µl の Buffer AW1 を添加し 6,000 × g で 1 分間、遠心分離した。これに 500µl の Buffer AW2 を添加し 20,000 × g で 3 分間遠心分離した。QIAamp スピнкаラムを 1.5ml マイクロチューブに移し Buffer AVE 60µl を添加した。室温で 1 分間インキュベートした後 6,000 × g で 1 分間、遠心分離し EBVJ の核酸 (RNA) を抽出した。

プライマーの選択

EBVJ の genome segment A の増幅用プライマーとして、Blake *et al.* (1995) が Aquatic birnaviruses の検出に使用した 4 組のプライマー (PrA, B, C, D) を用いた。次に、これら PrA, B, C, D によって得られた EBVJ の塩基配列や IPNV の N1 株の塩基配列をもとに 6 種類のプライマー (PrE, G, H, I, L, O) を新たに設計した (Fig. 1)。プライマーの設計には Primer Express 1.0 (Perkin Elmer Applied Biosystems) を用いた。プライマーの合成は Amersham pharmacia biotech Co. に依頼した。

RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR は「RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1」(TaKaRa Co.) を使用した。逆転写反応は、RNase free 純水 8.5µl, 25mM MgCl₂ 4µl, 10 × RNA PCR buffer 2µl, 10 mM dNTP Mixture 2µl, RNase Inhibitor (40U/µl) 0.5 µl, AMV Reverse Transcriptase XL (5U/µl) 1µl, 20~50µM アンチセンスプライマー 1µl, EBVJ の RNA 溶液 (約 0.2µg/µl) 1µl を混合し全量を 20µl とした後、サーマルサイクラー Gene Amp System 2400 (Perkin Elmer Co.) によって伸長反応 (30°C, 10分), 逆転写反応 (55°C, 30分), 逆転写酵素の失活 (99°C, 5分), 冷却 (5°C, 5分) を 1 サイクル行った。

PCR 反応は、純水 64.5µl, 25mM MgCl₂ 6.0µl, 10 × RNA PCR buffer 8.0µl, TaKaRa Taq (5U/µl) 0.5µl, 20~50µM センスプライマー 1µl を混合し全量を 80µl とした後、逆転写反応産物 (20µl) に加え全量を 100µl とし、94°C, 2分, 94°C, 30秒, 55~60°C, 30秒, 72°C, 1分30秒の 3 行程を 1 サイクルとして計 35 サイクル行った。

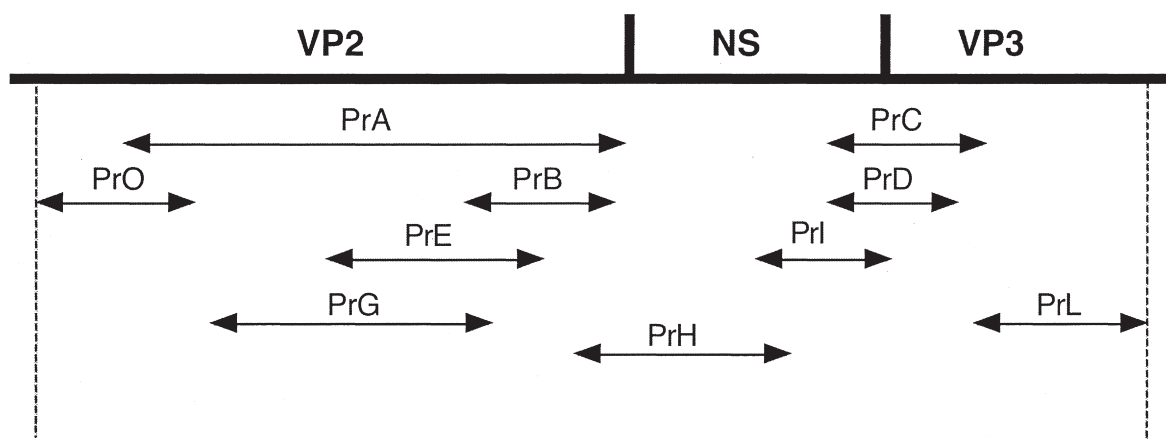
電気泳動

RT-PCR によって増幅された PCR 産物は 2.0% アガロースゲルを用い 50V, 1 時間, TAE 溶液中で電気泳動した。泳動後、ゲルを臭化エチジウムブロマイド溶液 (EtBr, 10mg/ml) で 30 分染色し、トランスイルミネーターで EBVJ の cDNA 断片を確認した。

ダイレクトシーケンス

サイクルシーケンスはフェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した EBVJ の cDNA を用いた。これには「ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing

PCR Fragments Genome Segment A(3,097bp)



Primer Sequences

PrA (nucleotide 148-1327)	PrG (nucleotide 298-883)
PrA1 5'-TGAGATCCATTATGCTTCCAGA-3'	PrG1 5'-GATCACGGATAGGCGCTCACTACAG-3'
PrA2 5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'	PrG2 5'-ACGACCCCAACGCAGACGTCAGTT-3'
PrB (nucleotide 804-1327)	PrH (nucleotide 1253-1720)
PrB1 5'-GCCGACATCGTCAACTCCAC-3'	PrH1 5'-ACTCCTCAAGAACATGGTGA-3'
PrB2 5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'	PrH2 5'-GGAAGCTCGACTTCTCTGTA-3'
PrC (nucleotide 2136-2474)	PrI (nucleotide 1629-2233)
PrC1 5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'	PrI1 5'-GACTCCTGGGCCAGCGGCGG-3'
PrC2 5'-ATCCTCCTTTGACCACTCATAC-3'	PrI2 5'-ATCAGGTGTGCGCCAGGGA-3'
PrD (nucleotide 2136-2309)	PrL (nucleotide 2400-3041)
PrD1 5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'	PrL1 5'-AAGCTTCTCAGGCTCATGTC-3'
PrD2 5'-TCTCATCAGCTGGCCAGGTAC-3'	PrL2 5'-TAGTCGTTACACCTCAGCGT-3'
PrE (nucleotide 632-978)	PrO (nucleotide 1-263)
PrE1 5'-ACCATACGTCGACTAGAGG-3'	PrO1 5'-GGAAAGAGAGTTTCAACG-3'
PrE2 5'-CGCCCTGTAGTTGTCTGCG-3'	PrO2 5'-TCCTGAGTCCGAGACTTCTA-3'

Fig. 1. Relative location of amplification target sequences for primers. PrA, PrB, PrC, PrD, PrE, PrG, PrH, PrI, PrL and PrO on genome segment A of EBVJ, and the primer pair sequences.

Ready Reaction kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS] (Perkin Elmer Applied Biosystems) を使用した。純水10 μ l, Terminator Ready Reaction Mix. 8 μ l, センスまたはアンチセンスプライマー (10pmol/ μ l) 1 μ l, テンプレートcDNA (100ng/ μ l) 1 μ lを混合し全量を20 μ lとした。反応は96°Cのホットスタートで開始し, 96°C, 10秒, 55°C, 5秒, 60°C, 4分の3行程を1サイクルとして計25サイクル行った。サイクルシーケンス生成物はエタノール沈殿によって精製し, Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) 12 μ lに溶解した。95°Cのヒートブロックで2分間のヒートショッ

クを加えた後, 氷上で10分間静置した。これを ABI PRISM 310 (Perkin Elmer) オートシーケンサーによってダイレクトシーケンスした。ポリマーは Performance Optimized Polymer 6 (Perkin Elmer) を使用した。

オートシーケンサーによって得られたEBVJのLarge ORFを含むほぼ全域のSegment Aの塩基配列は, コンピューター上で整列, 編集作業を行った。

EBVJ と他のビルナウイルスの塩基配列, アミノ酸配列の比較

“DNA Data Bank of Japan, DDBJ” (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) から塩基配列の検索によって得られた26種類のビルナウイルスとEBVJの塩基配列及びアミノ酸配列の間でのパーセントホモロジーを求めた。パーセントホモロジーはSegment A, VP2及びVP2/NSジャンクション領域(310塩基)に相当する部分で比較した。このなかで、VP2領域についてはEBVJのSegment Aの塩基配列、117塩基から1,539塩基までの1,422の塩基配列を推定した。本研究でEBVJと比較の対象としたウイルスはHeppell *et al.* (1993), Hosono *et al.* (1996) が検討したIPNVの19株, MABVの5株, 及びニワトリの伝染性砂嚢壊死症 (Infectious bursal disease virus, IBDV) の2株の計26株であった (Table 1)。

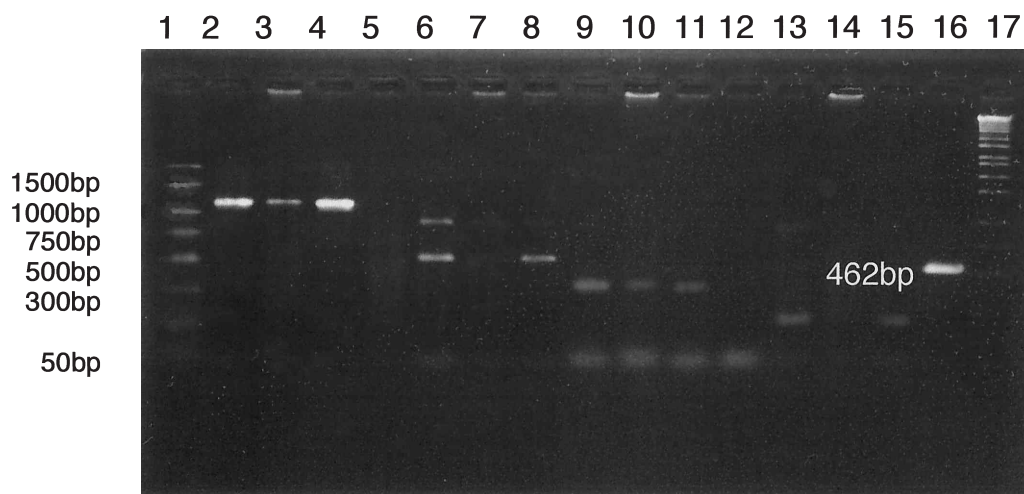
分子系統樹

ビルナウイルスのVP2/NSジャンクション領域の塩基配列をもとに最尤法 “Maximum likelihood method, ML method” (Felsenstein, 1981) により分子系統樹を推定した。また、アウトグループにはIBDVである52/70株とCu-1株

を用いた。最尤法の計算は「PUZZLE 4. 0.2」(Strimmer and Haeseler, 1996, 1997) によった。塩基配列, およびアミノ酸配列の尤度の計算にはそれぞれ「HKY85モデル」(Hasegawa *et al.*, 1985), 「Jones-Taylor-Thornton (JTT) モデル」(Jones *et al.*, 1992) を使用した。分子系統樹の作成には表示ソフトである「Tree view」を用いた。

結 果

Blake *et al.* (1995) が設計した4組のプライマー (PrA, B, C, D) によって、鰻うっ血症 (VECNE) の自然感染魚から分離したEBVJの核酸の増幅を試みた。その結果、3回別々に分離したウイルスから4種類全てのプライマーでDNAの増幅が見られた。これらのcDNA断片の大きさはPrA, Pr塩基rC, PrDのそれぞれで1,180塩基, 524塩基, 339塩基, 174塩基であった。また、ネガティブコントロールとしたESE cellからも同様に核酸を抽出してRT-PCRを行ったがウイルス核酸は増幅されなかった。これら4組のプライマーによって増幅されたEBVJのcDNA断片の大きさ



- Lane 1 : Maker
- Lane 2~4 : Primer A
- Lane 5 : Negative control
- Lane 6~8 : Primer B
- Lane 9~11 : Primer C
- Lane 12 : Negative control
- Lane 13~15 : Primer D
- Lane 16 : Positive control RNA
- Lane 17 : Maker(λ -EcoT 14 I/Bgl II digest)

Fig. 2. Typical agarose gel electrophoresis showing the detection of the virus (EBVJ) isolated from the viral endothelial cells necrosis eel in infected ESE cell cultures by RT-PCR assay with four primer sets. Amplified RT-PCR products were analysed by electrophoresis on 2.0% agarose gel in TAE buffer at 50V for 1hour. The four primers (Pr. A, B,C, D) were selected on the basis of published sequences of the cDNAs of genome segment A of the Ja and N1 strains of IPNV.

は, Blake *et al.* (1995) が IPNV とその他の水棲生物由来ビルナウイルスで増幅した DNA 断片の大きさとほぼ一致していた (Fig. 2).

ダイレクトシーケンス法によって EBVJ の Segment A の Large ORF を含む塩基配列のほぼ全領域に相当する 3,041塩基を決定した (Fig. 3). Large ORF は今回決定した Segment A の 117塩基から始まり 3,032塩基までの 2,916塩基であった. また Small ORF は 67塩基から 508塩基までの 441塩基であった. VP2/NS ジャンクション領域は Segment A の 1,425塩基から 1,734塩基までの 310塩基であった. Large ORF は全部で 972個のアミノ酸によってコードしていた. このなかで疎水性アミノ酸は 484個で全体の約 50% を占めていた. NS 領域では疎水性アミノ酸が約 57% を占めていたが, VP2 や VP3 領域では疎水性アミノ酸の占める割合はそれぞれ 48%, 46% であった. 一方, VP3 領域では親水性アミノ酸が約 36% を占めていた.

EBVJ と他のビルナウイルス 26 株の Segment A, VP2 及

び VP2/NS ジャンクション領域に相当する部分をパーセントホモロジーによって比較した. Table 1 に示したビルナウイルスの中で Segment A 全体, 及び VP2 領域の塩基配列が公開されている IPNV の 16 株と, EBVJ との塩基配列を比較した.

Segment A 全体の塩基配列を各種ビルナウイルス株間で比較したところ, EBVJ は IPNV の N1 株ともっとも高いパーセントホモロジーを示した. その値は 87.4% であった. 一方, EBVJ は IPNV の Ja(D) 株や MABV の Y-6 株では, パーセントホモロジーはそれぞれ 79.0%, 79.2% であり, N1 株や Sp 株に比べて低かった (Table 2).

Segment A の VP2 領域の塩基配列を各種ビルナウイルス株間で比較したところ, EBVJ は IPNV の Ab 株との間で 95.0% のもっとも高いパーセントホモロジーを示した. また, EBVJ は MABV の Y-6 株とは 81.9% で IPNV の Sp, N1, Ab, C2 株よりも低い値であった. IPNV の He 株は IBDV の 2 株を除くと EBVJ ともっとも低いパーセントホモロジ

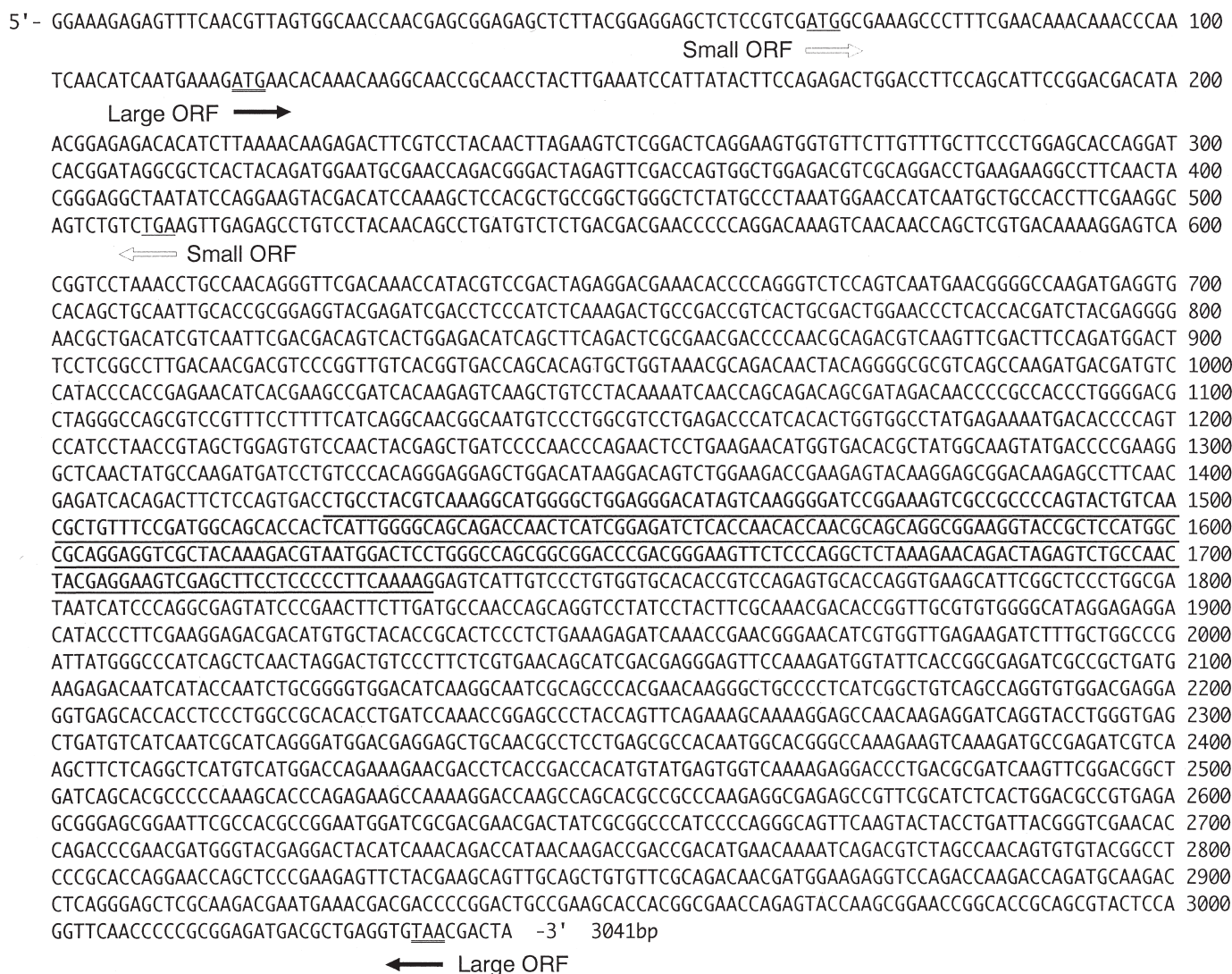


Fig. 3. Nucleic acid sequence of segment A (3,041bp) in aquatic birnavirus isolated from viral endothelial necrosis of eel of cultured Japanese eel. This virus was tentatively designated as Eel birnavirus Japanese (EBVJ). The Large open reading frame (2,916bp) is contained from nucleotide #117 to #3,032, and small open reading frame (411bp) is nucleotide #67 to #508 in this sequence. And 310bp (nucleotide #1,425 to #1,735) of VP2/NS junction region is indicated by underline

Table 1. List of birnavirus strains analyzed for comparison with EBVJ. Nineteen strains of IPNV and five strains of MABV and two strains of IBDV.

	Strain	Abbreviation	Genogroup of IPNV *	Reference	DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers
IPNV	LWVRT 60-1 (VR-299)	LW	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1995)	L40584
	Powder Mill (VR-883)	PM	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13987
	LAR-A89	LAR	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13985
	TN1-P89	TN1	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13990
	Jasper (Dobos)	Ja(D)	I	Duncan and Dobos (1986)	M18049
	TN3-A89	TN3	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13991
	TN9-A89	TN9	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13992
	West Buxton (VR-877)	WB	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13993
	ART-H82	ART	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13978
	Jasper (ATCC)	Ja(A)	I	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13984
	d'Honnincthun (VR-876)	Fr. 21	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1995)	L40582
	Sp	Sp	II	Tseng, C.-C. <i>et al.</i> (1996)	U56907
	N1	N1	II	Havarstein <i>et al.</i> (1990)	D00701
	Ab (VR-1319)	Ab	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1995)	L40580
	tellina-2 (VR-1321)	TE2	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13989
	Canada1 (VR-1322)	C1	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13979
	Canada3 (VR-1324)	C2	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1993)	L13981
Canada2 (VR-1323)	C3	II	Heppell, J <i>et al.</i> (1995)	L40581	
Hecht (VR-1320)	He	III	Heppell, J <i>et al.</i> (1995)	L40583	
MABV	SY	SY		Hosono, N <i>et al.</i> (1996)	D61385
	Y-6	Y-6		Suzuki, S <i>et al.</i> (1998a)	AB006783
	H-1	H-1		Hosono, N <i>et al.</i> (1996)	D61386
	H-2	H-2		Hosono, N <i>et al.</i> (1996)	D61387
	Y-7H	Y-7H		Hosono, N <i>et al.</i> (1996)	D61388
IBDV	52/70	52/70		Bayliss, C.D. <i>et al.</i> (1990)	D00869
	Cu-1	Cu-1		Bayliss, C.D. <i>et al.</i> (1990)	D00867

* See Heppell, J. *et al.* (1993)

Table 2. Percentages of homology between whole segment A nucleotide sequences obtained from EBVJ, three strains of IPNV, a MABV strain and two strains IBDV. EBVJ showed the highest homology with N1 strain of IPNV. Two strains of IBDV showed lower homology than aquatic birnaviral strains IPNV, MABV, and EBVJ.

Strains	EBVJ	Ja(D)	Y-6	Sp	N1	52/70
Ja(D)	79.0					
Y-6	79.2	84.5				
Sp	87.0	78.9	79.4			
N1	87.4	79.5	79.6	98.4		
52/70	50.4	49.9	50.1	49.3	48.9	
Cu-1	50.6	44.9	50.5	49.4	48.9	97.4

ーを示した (Table 3).

次に, Segment A の VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列を比較したところ, EBVJ は IPNV の Ab 株との間で 96.8% の最高値を示した. VP2/NS ジャンクション領域は IPNV の中でも EBVJ とのホモロジーが高い株と低い株に分かれ, 明らかな差が認められた. すなわち, EBVJ と IPNV の Fr. 21, Sp, N1, TE2, C1 及び C3 株との間では 88.1~87.7% であり, EBVJ と IPNV の LW, PM, LAR, TN1, Ja(D), TN3, TN9, WB, ART, He 株及び Ja(A) 株との間では 71.4~74.3% であった. EBVJ と MABV の 5 株を比較すると 73.2~74.8% であり, IPNV の Ja(D) 株などと同程度の値であった. IBDV の 2 株を除いてもっともパーセントホモロジーが低かったのは IPNV の ART 株であった. 各ビルナウイルス間の VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列を比較した場合と Segment A 全体の塩基配列を

比較した場合のパーセントホモロジーの差は小さく平均で 2.50% (SD, ±2.49) を示した (Table 4).

EBVJ 及び他のビルナウイルス 26 株のアミノ酸配列を VP2/NS ジャンクション領域に限定して比較した (Fig. 4). Fig. 4 では IPNV の Ja(D) 株のアミノ酸配列を基本として置換した状況を示してある. VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列で EBVJ ともっともパーセントホモロジーが高かったのは Ab 株であった. 次にアミノ酸配列を比較したところ, VP2/NS ジャンクション領域では, EBVJ と Ab 株は 14 番目と 36 番目の 2 つのアミノ酸に違いが見られるだけであった. また, EBVJ, Ab, Fr. 21, Sp, N1, TE2, C1, C2, C3 株では C2 株の一部を除く 12 箇所に各株に共通したアミノ酸の変異が見られた. これを Ja(D) 株からのアミノ酸の置換と仮定して比較したところ, 中性アミノ酸から疎水性及び親水性への置換は 3 カ所で生じていた. また, 親水性

Table 3. Percentages of homology between VP2 nucleotide sequences obtained from EBVJ, seven strains of IPNV, a MABV strain and two strains of IBDV. EBVJ showed the highest homology with Ab strain of IPNV. N1 and Sp strains that showed relatively high homology comparing whole Segment A nucleotide sequences from EBVJ were lower values than Ab.

Strains	EBVJ	LW	Ja(D)	Y-6	Sp	N1	Ab	C2	He	52/70
LW	80.1									
Ja(D)	80.1	100.0								
Y-6	81.9	84.5	84.5							
Sp	87.9	81.2	81.2	83.5						
N1	87.7	80.9	80.9	83.6	97.8					
Ab	95.0	80.9	80.9	82.3	88.2	88.3				
C2	83.7	80.0	80.0	82.5	85.5	85.2	83.9			
He	76.3	74.4	74.4	76.1	78.0	78.0	75.6	76.9		
52/70	54.8	54.6	54.6	55.3	54.3	54.4	54.7	54.2	52.6	
Cu-1	54.8	55.0	55.0	56.3	54.9	54.7	55.4	54.5	52.6	97.3

Table 4. Percentages of homology between VP2/NS junction region nucleotide sequences obtained from EBVJ, nineteen strains of IPNV, five strains of MABV and two strains of IBDV. EBVJ showed the highest homology 96.8% with Ab strain of IPNV.

Strains	EBVJ	LW	PM	LAR	TN1	Ja(D)	TN3	TN9	WB	ART	Ja(A)	SY	Y-6	H-1	H-2	Y-7H	Fr.21	Sp	N1	Ab	TE2	C1	C3	C2	He	52/70
LW	74.0																									
PM	74.3	99.7																								
LAR	74.3	98.4	98.7																							
TN1	74.0	100	99.7	98.4																						
Ja(D)	74.0	100	99.7	98.4	100																					
TN3	72.9	90.3	90.6	90.6	90.3	90.3																				
TN9	72.3	89.7	90.0	90.6	89.7	89.7	96.8																			
WB	73.0	90.3	90.0	90.6	90.3	90.3	90.6	91.6																		
ART	71.4	89.0	89.0	89.0	89.0	89.0	91.3	91.9	91.6																	
Ja(A)	73.6	91.6	91.9	92.3	91.6	91.6	90.0	90.3	89.7	89.0																
SY	74.2	78.1	78.4	78.7	78.1	78.1	80.6	80.6	80.3	80.0	78.7															
Y-6	74.8	78.7	79.0	79.4	78.7	78.7	79.7	81.0	80.6	80.0	79.4	98.1														
H-1	73.5	78.7	79.0	79.4	78.7	78.7	80.0	81.3	80.0	80.0	78.7	97.7	98.4													
H-2	73.9	78.4	78.7	79.0	78.4	78.4	79.7	81.0	80.0	79.4	79.0	98.1	97.4	97.7												
Y-7H	73.2	77.4	77.7	78.1	77.4	77.4	79.4	81.3	79.0	79.4	78.1	98.1	97.4	97.7	98.1											
Fr. 21	87.7	74.6	74.9	75.2	74.6	74.6	73.2	71.9	73.0	70.7	72.3	73.2	73.9	72.9	73.2	72.3										
Sp	87.4	74.3	74.6	74.6	74.3	74.3	72.6	71.6	72.7	70.4	72.0	72.9	73.5	72.6	72.9	71.9	99.4									
N1	87.1	73.6	74.0	74.3	73.6	73.6	72.6	71.6	72.3	70.1	72.0	72.6	73.2	72.3	72.6	71.6	99.0	99.0								
Ab	96.8	74.9	75.2	75.6	74.9	74.9	73.2	72.6	74.0	72.3	73.3	75.8	75.8	75.2	75.8	74.8	89.4	89.0	88.7							
TE2	88.1	72.7	72.7	73.0	72.7	72.7	72.6	71.6	73.0	71.7	72.0	73.9	74.5	73.5	73.9	72.9	86.5	86.5	86.8	90.6						
C1	88.1	73.6	73.6	74.0	73.6	73.6	72.6	71.6	72.7	71.1	72.0	74.8	74.8	74.5	74.5	73.9	84.8	84.8	85.2	90.6	92.3					
C3	88.1	73.6	73.6	74.0	73.6	73.6	72.6	71.6	72.7	71.1	72.0	74.8	74.8	74.5	74.5	73.9	84.8	84.8	85.2	90.6	92.3	100				
C2	82.3	71.9	72.3	72.9	71.9	71.9	74.5	73.5	73.5	72.3	72.9	75.5	76.1	75.2	75.2	74.5	82.6	81.9	82.3	82.3	81.3	80.6	80.6			
He	72.2	72.5	72.8	72.8	72.5	72.5	72.2	72.8	72.3	73.6	70.5	72.5	73.8	73.2	73.5	72.4	74.9	75.2	74.6	72.5	71.6	71.3	71.3	72.5		
52/70	48.9	50.4	50.7	49.0	50.4	50.4	49.1	47.1	49.0	49.5	50.7	49.2	50.5	49.8	48.7	47.7	49.3	50.0	49.7	47.9	47.6	48.9	48.9	48.0	49.6	
Cu-1	49.2	51.1	81.8	52.5	51.1	51.1	50.2	50.3	49.3	52.0	51.4	48.7	51.4	51.9	49.3	51.0	48.8	49.2	49.2	49.0	49.0	49.2	49.2	48.3	50.7	97.8

アミノ酸と疎水性アミノ酸との間の相互の置換は5カ所で認められた。一方、水棲生物由来ビルナウイルスはニワトリ由来のビルナウイルスであるIBDVと比較した場合、多くのアミノ酸の置換が起っていた (Fig. 4)。

EBVJ と他のビルナウイルス26株のVP2/NS ジャンクション領域の塩基配列及びアミノ酸配列をもとに最尤法 (ML method) で分子系統樹を推定した (Fig. 5 Fig. 6)。分岐の信頼性を評価するブートストラップ確率 (%) を数値で示した (Felsenstein, 1985)。塩基配列から分子系統樹を推定した場合、EBVJ にもっとも近くで接続している株はIPNVのAb株であった (ブートストラップ確率 96%)。またEBVJはIPNVのAb, N1を含む8株と共に1つのグループを形成していた。このグループはHeppell *et al.* (1993)のIPNVのゲノグループIIに相当していた。一方、このグ

ループとは別に、IPNVのJa(D), LWを含む10株はグループを形成していた。これはIPNVのゲノグループIに相当していた。MABVのY-6株を含む5株もグループを形成し、Hosono *et al.* (1996)のMABVのグループを形成していた (Fig. 5)。

次にアミノ酸配列から分子系統樹を推定した場合、今回調べたビルナウイルス群は大きく3つのグループに分かれ、塩基配列で系統樹を推定した場合と同様にゲノグループが確認できた。すなわち、IPNVのゲノグループIはJa(D), LWを含む10株であった。IPNVのゲノグループIIにはAb, N1を含む8株に加えてEBVJが属していた。MABVのグループはIPNVのゲノグループIの近くに位置していた。IPNVのゲノグループIIIとされるHe株は他のビルナウイルスから独立している一つのグループとして認められた。

Strains	20	40	60	80	100
IPNV Ja(D)	LPTSKAWGWRDLVRGIRKVA	APVLSTLFPMAAPLIGAADQ	FIGDLTKTNSAGGRYLSHAA	GGRYHDVMDSWASGSEAGSY	SKHLKTRLESNNYEEVELPK PTK
Ja(A)T.....G.....T.T...N.S.....
ARTR...T...T...S.....
LAR
TN1S.....
TN3S.....
TN9S.....
LW
WBR...T...T.....
PM
HeI.KQ..RI.....M.....M.....AS...N...K..LET...NT.RF..MS..K...T.....R.ER
N1I.....M.....A...H.M...K...LE...GPD.KF..RA..N...A...P..S.
SpI.....M.....A...Y.M...K...LE...GPD.KF..RA..N...A...P..S.
Fr.21I.....M.....A...H.M...K...LE...GPD.KF..RA..N...A...P..S.
C2I.....I.....A...N.M...HHR...E...KQD.RF..QS..N...A...P..Q.
C1I.....V...L...N..A...R.M...K...LE...GPD.KF..LA..NK...T...P..S.
C3I.....V...L...N..A...R.M...K...LE...GPD.KF..LA..NK...T...P..S.
TE2I.....V...L...N..A...R.M...K...LE...GPD.KF..QA..NK...T...A..S.
AbI.....V...L...N..A...R.M...K...LE...GPD.KF..QA..N...A...P..S.
EBVJI.K.....L...N..A...R.M...K.....GPD.KF..QA..N...A...P..S.
MABV Y-6I.....A...T...T.....TDT.RF..RN..D.....M..P..
SYQ.....I.....A...T...T.....TDT.RF..RN..D.....M..P..
H-1Q.....I.....A...T...T.....TDT.RF..RN..D.....I..P..
H-2Q.....I.....A...T...T.....TDT.RF..RN..D.....M..P..
Y-7HQ.....I.....V.....I...A...T...T.....TDT.RF..RN..D.....M..P..A.
IBDV 52/70KIAG.F.FK.II.A..RI..V..V.....P...AH.IGEGVDY.LGDEAQAASGTAR..S.KARAASGRIRQLTL.ADKGYEVVAN.FQVPQNP.VDGILAS
Cu-1KIAG.F.FK.II.A..RI..V..V.....P...AH.IGEGVDY.LGDEAQAASGTAR..S.KARAASGRIRQLTL.ADKGYEVVAN.FQVPQNP.VDGILAS

Fig. 4. Amino acid sequence deduced from the 310bp cDNA fragments obtained from EBVJ and the corresponding portion on the twenty-six published sequence of IPNV, MABV and IBDV. Homology to the Ja(D) strain of IPNV is indicated by dots. EBVJ and IPNV genogroup? specific variation are boxed.

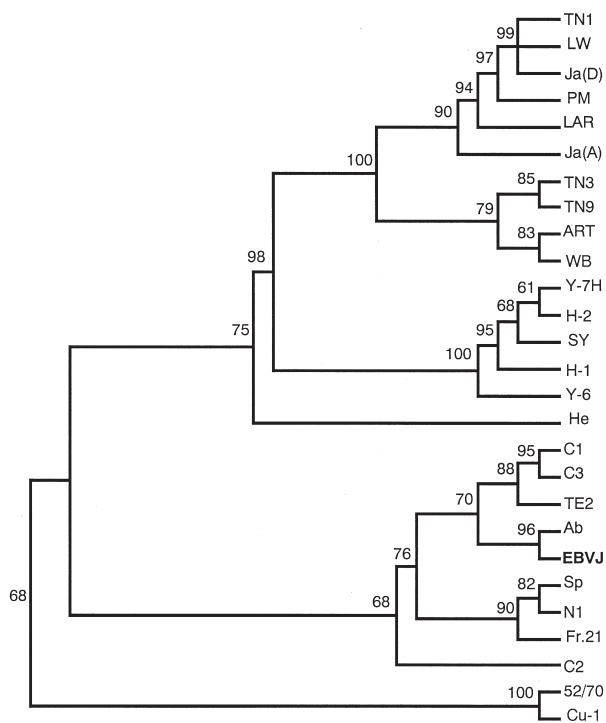


Fig. 5. Phylogenetic tree representing the relationships between aquatic birnavirus as determined by nucleotide sequence homology. EBVJ was the most closely related to Ab strain of IPNV. The numerical values are bootstraps of diverging point.

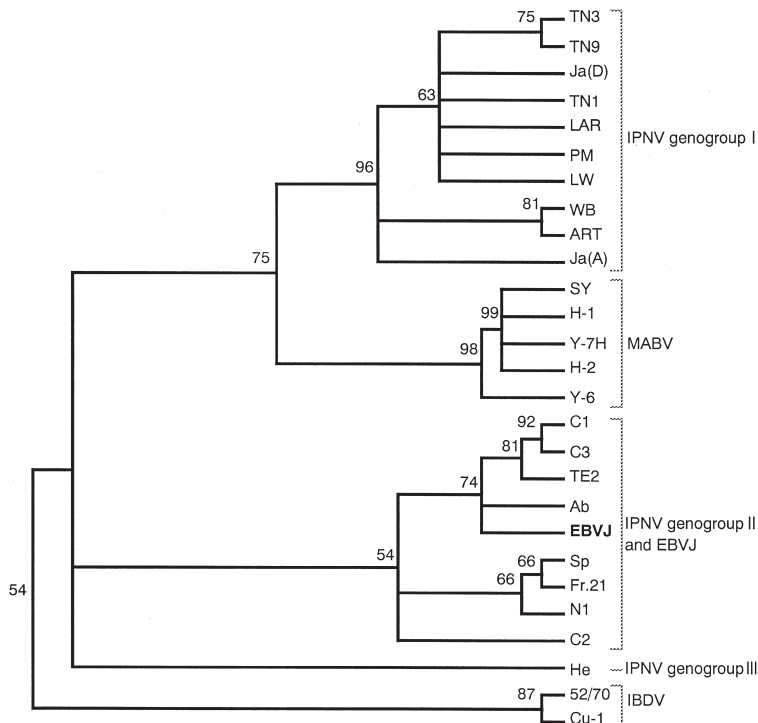


Fig. 6. Phylogenetic tree representing the relationships between aquatic birnaviruses as determined by amino acid sequence homology. IPNV and MADV genogrouping was described at Heppel, J. *et al.* (1993) and Hosono, N. *et al.* (1996). IPNV genogroup? contained EBVJ. The numerical values are bootstraps of diverging point.

(Fig. 6).

考 察

ニホンウナギの鰓うっ血症 (VECNE) の自然感染魚から分離されたビルナウイルス (EBVJ) の Segment A の内 Large open reading frame (Large ORF) を含むほぼ全領域の3,041塩基の塩基配列を決定した。EBVJ の Segment A に含まれる Large ORF の塩基数は2,916塩基であった。これは IPNV の N1 株, Jasper (Dobos) 株, MABV の Y-6 株など, 他のビルナウイルスの Large ORF の塩基配列の長さとも一致していた。また, EBVJ の Small open reading frame (Small ORF, VP5) は IPNV の Ab 株と同じ塩基数であった (Havarstein *et al.*, 1990, Duncan and Dobos, 1986, Heppell *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1998a)。さらに EBVJ は Blake *et al.* (1995) が IPNV などの水棲生物由来ビルナウイルスの検出に用いているプライマーで検出されたことから, IPNV に類似していることが示唆された。そこで EBVJ と, すでに Segment A の全領域あるいは部分的に塩基配列が公開されている他のビルナウイルス26株の塩基配列及びアミノ酸配列をアライメントした後, そのパーセントホモロジーによって相同性を調べた。

Havarstein *et al.* (1990) はビルナウイルスの Segment A 全体と VP2 領域の比較を IPNV の Jasper (Dobos) 株と N1 株, 及び IBDV の 002-73 株について行っている。これに従って EBVJ と他のビルナウイルスを Segment A 全体の塩基配列で比較した場合, IPNV の N1 株とのパーセントホモロジーがもっとも高い値であった。一方 IPNV の Ab 株は Segment A の全領域の塩基配列が明らかになっていないので比較することはできなかった。しかし Ab 株の VP2 領域と VP2/NS ジャンクション領域は EBVJ とのパーセントホモロジーが96.8%以上であり, 今回調べたビルナウイルスの中ではもっとも高い値を示した。ビルナウイルスの VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列は変異が起りやすい領域とされている (Heppell *et al.*, 1992, 1993)。従ってこの領域の類似性が高いことから EBVJ が Segment A 全体でも Ab 株との高い類似が示唆される。

そこで Segment A の VP2 領域の塩基配列を比較したところ, EBVJ は IPNV の Ab 株ともっともパーセントホモロジーが高かった。VP2 遺伝子は, ビルナウイルスの主要構造タンパク質をコードし, 抗原決定基を含んでいると推測されている (Azad *et al.*, 1987, Barrie *et al.*, 1992, Becht *et al.*, 1988, Caswell-Reno *et al.*, 1986, Christie and Havarstein, 1988, Heppell, J. *et al.*, 1995, Suzuki, S. *et al.*, 1998a)。IPNV の LWVRT60-1 (VR-299) 株と Jasper (Dobos) 株の VP2 領域の塩基配列は100%のホモロジーを示しており, その血清型は2株とも A1 型で一致していた (Heppell *et al.*, 1993)。しかし, EBVJ と今回調べたビルナウイルスの VP2 領域の塩基配列間では100%のホモロジーを示す例が他になく, また97.8%と高い値を示す IPNV の Sp 株と N1 株のそれぞれの血清型が A2 型, A10 型と異なっていることなどが

ら, VP2 領域の塩基配列の相同性とその血清型は必ずしも一致しないと思われる。

株間の正確な比較を行うためには, より長い領域の塩基配列が必要であるが Heppell *et al.* (1993) は IPNV の N1 株と Jasper (Dobos) 株を比較し, アミノ酸配列の間のパーセントホモロジーが Segment A の Large ORF と VP2/NS ジャンクション領域で類似していることから, VP2/NS ジャンクション領域を使うことである程度の比較ができるとしている。EBVJ と他のビルナウイルス26株の塩基配列についても Segment A と VP2/NS ジャンクション領域を比較すると, その差が平均で2.50% (SD; $\pm 2.49\%$) と小さいことから, EBVJ を含めて各種ビルナウイルスの比較には VP2/NS ジャンクション領域を使用することが有効であると思われた。そこで VP2/NS ジャンクション領域の塩基配列間を比較すると EBVJ は IPNV の Ab 株とパーセントホモロジーがもっとも高いことから, 今回比較したなかでは Ab 株に近縁のウイルスであると考えられる。

VP2/NS ジャンクション領域のアミノ酸配列について, Heppell *et al.* (1993) は相同性の高い IPNV 株間では, 同じ箇所に共通したアミノ酸の変異を持つことを示している。EBVJ の VP2/NS ジャンクション領域のアミノ酸配列は IPNV の Ab 株と非常に類似していた。さらに, EBVJ は Heppell *et al.* (1993) が行ったゲノグループングでグループ II に属する IPNV 株と共通したアミノ酸配列を持っていた。これらの IPNV は EBVJ と塩基配列, アミノ酸配列の比較で高いパーセントホモロジーを示した株であった。特に EBVJ と Ab 株との比較では, 14番目と36番目の2つのアミノ酸が置換しているだけであった (Fig. 10)。また海産魚由来のビルナウイルスである MABV で IPNV とは異なる特異的なアミノ酸の変異が見つかっている (Hosono *et al.*, 1996)。貝類から分離されたビルナウイルスでも VP2/NS ジャンクション領域でアミノ酸配列が比較され, その結果 MABV のアミノ酸配列に非常によく似ていることが示されている (Suzuki *et al.*, 1998b, 1998c)。EBVJ のアミノ酸の置換は VP2/NS ジャンクション領域の中でも後半部の NS 側に多かった。Havarstein *et al.* (1990) はビルナウイルスの NS 領域は, 株によって変異が大きい領域であることを示したが, これは EBVJ でも認められた。

さらにビルナウイルス間での EBVJ の位置関係を詳しく調べるために分子系統樹の推定を行った。Heppell *et al.* (1993) は IPNV のゲノグループングを行い Jasper (Dobos), LWVRT 60-1 株などで構成されるグループ I と, Ab, N1 株などで構成されるグループ II と, Hecht 株などで構成されるグループ III に分けた。このなかで EBVJ は IPNV のグループ II に属していた。Hosono *et al.* (1996) はこのゲノグループングを MABV でも行い, IPNV とは独立したグループを形成していることを報告している。また Suzuki *et al.* (1998a) は IPNV と MABV の8株の VP2 領域のアミノ酸配列全体を使って分子系統樹を推定し, ゲノグループの関係が VP2/NS ジャンクション領域のアミノ酸配列を用いて推定した場合と類似することを報告した。今回,

最尤法を用いたアミノ酸配列による分子系統樹の推定では Heppell *et al.* (1993), Hosono *et al.* (1996) が UPG 法 (unweighted pairgroup method) で推定した系統樹と類似した結果を得た。また、塩基配列をもとに最尤法で系統樹を推定する場合はアミノ酸に変化を与えない同義置換も情報を持ち、より詳細な異同を調べることができると一般に考えられている (宮田編, 1998)。そこで今回、アミノ酸配列の他に塩基配列をもとに分子系統樹の推定を行った。塩基配列をもとに推定した場合、EBVJ は IPNV の Ab 株にもっとも近く、ビルナウイルスのゲノグループ II に属することが確認された。

EBVJ は IPNV と宿主が異なり、増田・小野 (1999) により温度耐性などの性状が IPNV とは異なることが報告されている。本研究では EBVJ は塩基配列のパーセントホモロジー、アミノ酸配列の特徴、及び分子系統樹から IPNV のゲノグループ II の株と非常に近縁であり、特に Ab 株にもっとも近いことが明らかとなった。Segment A 全体の塩基配列の比較では、EBVJ は IPNV の N1 株とパーセントホモロジーが高かったが、Ab 株の Segment A 全体の塩基配列が明らかになれば、EBVJ は Ab 株にもっとも高い値を示すと思われる。また EBVJ は IPNV のゲノグループ I や MABV の株とは相同性が低かったことから、IPNV のゲノグループ II に由来していると考えられる。また、Blake *et al.* (1995) は水棲生物由来ビルナウイルスの検出に使った 4 組のプライマー、PrA, B, C, D を使って RT-PCR を用いてウナギから分離されたビルナウイルスである European eel virus (EEV) の核酸の増幅を行った結果、PrC では増幅されなかったことを報告している。EBVJ はこれら 4 組のプライマーの全てで検出されたことから、EEV とは異なるウイルスであると思われる。他にも、楠田ほか (1989 a) らが分離したウイルスを含めて、今までにいくつかのウナギ由来のビルナウイルスが報告されているが、その塩基配列などが明らかにされているものはほとんどなく、ウイルス間の異同を調べるためにも、これらのウイルス核酸の解析が必要である。

謝 辞

実験魚の提供をいただいた、静岡県榛原郡吉田町、丸榛吉田うなぎ漁業協同組合養鰻研究所前所長西尾和民氏と見崎禎久所長のご協力、ご厚意に深謝致します。

EBVJ のダイレクトシーケンスと分子系統樹作成に適切なご助言いただいた、NCIMB Japan Co. LTD 技術部、下村謙悟博士に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

Azad, A. A., Jagadish, M. N., Brown, M. A. and Hudson, P. J. (1987): Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of birnavirus. *Virology*, 161, 145-152.

- Barrie, R. J., Mason, C. L. and Leong, J. C. (1992): Identification of a conserved antigenic domain in the major capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. NOAA Technical Rep., NHFS, 111, 15-19.
- Bayliss, C. D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R. W., Papageorgiou, A., Muller, H. and Bournsnel, M. E. (1990): A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.*, 71, 1303-1312.
- Becht, H., Muller, H. and Muller, H. K. (1988): Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 69, 631-640.
- Blake Sharon L., William B. Schill, Philip E. Mcallister, Ming-Kuang Lee, John T. Singer and Bruce L. Nicolson (1995): Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. of Clin. Microbiol.*, 33 (4), 835-839.
- Caswell-Reno, P., Reno, P. W. and Nicholson, B. L. (1986): Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.*, 67, 2193-2205.
- Christie, K. E., Havarstein, L. S., Djupvik, H. O., Ness, S. and Endresen, C. (1988): Characterization of a new serotype of infectious necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Archives of Virology*, 103, 167-177.
- Dobos, P. (1977): Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. virol.*, 21, 242-258.
- Duncan, R. and P. Dobos (1986): The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Research*, 14, 5934.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17, 368-376.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22, 160-174.
- Havastein L. S., K. H. Kalland, K. E. Christie and C. Enderesen (1990): Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae. *J. of Gen. Virol.*, 71, 299-308.
- Heppell, J., Berthiaume, L., Tarrab, E., Lecomte, J. and Arella, M. (1992): Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis viruses strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.*, 73, 2863-2870.
- Heppell, J., Berthiaume L., Corbin F., Tarrab E., Lecomte J. and Arella M. (1993): Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment from Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virology*, 195, 840-844.
- Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L. and

- Arella, M. (1995): Strain Variability and localization of the important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 214, 40-49.
- Hosono N., Suzuki S. and Kusuda R. (1996): Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A. *J. Fish Dis.*, 19, 295-302.
- Hudson, EB., Bucke, D., Forrest, A. (1981): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from eels *Anguilla anguilla* L. In the United Kingdom. *J. Fish Dis.*, 4, 429-431.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.*, 8, 275-282.
- 楠田利一, 一色 正, 川合研児 (1989a): 鰻弁中心静脈脈のうっ血症状を呈する養殖ウナギ病魚から分離されたウイルス. *水産増殖*, 37, 43-48.
- Kusuda, R., Kado, K., Takeuchi, Y. and Kawai, K. (1989b): Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Suisan Zoushoku*, 37, 115-120.
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. and Suzuki, S. (1993): Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Fish Pathol.*, 28(2), 91-92.
- Manning, D. S., and Leong, J. C. (1990): Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 179, 16-25.
- 増田友香, 小野信一 (1999): 養殖ニホンウナギのウイルス性血管内皮壊死症魚から分離されたウイルスの性状. *東海大学紀要海洋学部*, 48, 37-50.
- 宮田 隆編 (1998): 分子進化—解析の技法とその応用—, 共立出版株式会社, 東京, 196pp.
- Nakajima, K., Maeno, Y., Arimoto, M., Inoue, K. and Sorimachi, M. (1993): Viral deformity of yellowtail fingerlings. *Fish Pathol.*, 28(3), 125-129.
- Nam-Sil Lee, Nomura Y. and Miyazaki T. (1999): Gill lamellar pillar cell necrosis, a new birnavirus disease in Japanese eels. *Dis. of Aquat. Org.*, 37, 13-21.
- Sano T. (1976): *Viral Diseases of Cultured Fishes in Japan*. *Fish Pathol.*, 10(2), 221-226.
- Strimmer, K., and A. von Haeseler. (1996): A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.*, 13, 964-969.
- Strimmer, K., and A. von Haeseler. (1997): A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 6815-6819.
- Suzuki, S., Kimura, M. and Kusuda, R. (1998a): The complete nucleotide sequence of the polyprotein and VP5 gene of a marine birnavirus. *Fish Sci.*, 64, 428-433.
- Suzuki, S., Nakata, T., Kamakura, M., Toshimoto, M., Furukawa, Y., Yamashita, Y., Kusuda, R. (1998b): Isolation of birnavirus from *Agemaki* (jack knife clam) *Sinonovacula consticta* and survey of the virus using PCR technique. *Fish Sci.*, 63, 563-566.
- Suzuki, S., Kamakura, M., Kusuda, R. (1998c): Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Sci.*, 64, 342-343.
- Tseng, C.-C., Lo, C.-F. and Kou, G.-H. (1996): Establishment and characterization of a IPNV SP strain persistent infection cell line. *Chu-Fang Lo, National Taiwan University, Zoology, Taipei, Taiwan*, 107.
- Wolf, K., Seniezko, SF., Dunbar, RCE., Pyle, E. (1960): Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, 105-108.

要 旨

養殖ニホンウナギのウイルス性血管内皮壊死症魚からビルナウイルスに属するウイルスが分離されている (増田・小野, 1999)。そこで, 本ウイルス (EBVJ; Eel birnavirus Japanese) の Genome Segment A の塩基配列の解析を行うとともに, IPNV, MABV などの魚類や他動物由来のビルナウイルスとの塩基配列の相同性や分子系統樹から, 本ウイルスと既知のビルナウイルス26株の異同について検討した。RT-PCR 法およびダイレクトシーケンス法により, EBVJ の Segment A ゲノムの Large ORF を含むほぼ全領域にあたる3,041bp の塩基配列を決定した。Large ORF は2, 916bp であり, これは IPNV の N1 株や MABV の Y-6 株と一致していた。また, Small ORF (VP5) の塩基数は441bp で IPNV の Ab 株と同じ塩基数であった。Segment A 全体での塩基配列を比較すると, IPNV6 株中, N1 株が最も高く, その相同性は87.4%であった。ビルナウイルスの遺伝的な変異の解析によく用いられている VP2/NS 接合領域では, 26株中で Ab 株が EBVJ と最も相同性が高く, 塩基配列で96.8%, アミノ酸配列で, 98.1%であった。この領域から推定した分子系統樹では, EBVJ は Ab 株に最も類似し, IPNV のゲノグループ II に属していると推定した。