

後半約 60%)。最も identity が低かったのは約 6000 塩基から 500 塩基ほどの領域であった。この領域は後述する SaV の構造蛋白質をコードする領域に相当する。

次に SaV のアミノ酸配列の特徴を明らかにする目的で、ORF1 のアミノ酸配列に ORF2 のアミノ酸配列をたして一本にしたコンバインドポリペプチド配列を作成した。全塩基配列を決定した 9 株と MC, Br 株のコンバインドペプチドを Clustal W でアライメントし、アミノ酸の Similarity plot 解析を行った。NoV についても同様に ORF1 から ORF3 までを結合したコンバインドポリペプチドを用いて解析を行い SaV と比較した。その結果、SaV では、RHDV や FCV で報告されている NTPase に必須のアミノ酸モチーフ配列 G-PG-GKT、Protease に必須のモチーフ配列 GDCG-PY、RNA dependent RNA polymerase に必須のモチーフ配列 GLPSD、YGDD が NoV とほぼ同様の位置に完全に保存されていることが明らかになった (図 4)。SaV において、NoV の VP1 領域に相当するのは、ORF1 の 1720 番目のアミノ酸 M 残基から ORF1 最後のアミノ酸 Q 残基までであると予想された。SaV の VP1 はアライメントした全ての株で N 末端の 3 アミノ酸残基 MEG が保存されていた。NoV の VP1 領域にはアミノ酸の相同性が 20% を下回る相同性の低い領域が認められることが明らかにされている。SaV の VP1 にも NoV と同様アミノ酸残基の相同性の低い領域が認められた (図 4)。

NoV では、非構造蛋白質 コード領域である ORF1 と構造蛋白質 (VP1) コード領域である ORF2 のジャンクション領域に最も高度に保存された塩基配列が存在し、ここを起点にゲノムの組換えが起きることが示唆されている。SaV は ORF1 にコードされる非構造蛋白質に続いて、ORF1 の 3' 末端に VP1 がコードされていると予想されており、NoV とゲノムの構造が異なっている。しかし、SaV の最も高度に塩基配列が保存された領域は非構造蛋白質と VP1 のジャンクション領域に位置しており、SaV でも NoV と同様にゲノムの組換えが起きている可能性がある。そこで、本研究で用いた 9 株をゲノム組換えを検出することができる SimPlot で解析した。図 5 には SakaiC12 株のゲノム塩基配列を基準配列として Mc10 株と相同性を比較した SimPlot の結果を示した。SakaiC12 株は非構造蛋白質コード領域では Mc10 株と約 90% の相同性を示したが、VP1 領域では約 70% の相同性しか示さなかった。このような急激なゲノム相同性の変化は、NoV の組換え株で観察された変化と同様であった。図には示さないが、SakaiC12 株と他の SaV 株とを比較した場合、このような変化は観察されなかった。SimPlot 解析での急激なゲノム相同性の変化は、ゲノムの組換えを意味する。この結果から、SaV においても NoV と同様に、非構造蛋白質コード領域と VP1 コード領域の境界を基点に、ゲノム組換えが起きている可能性が示唆された。

ゲノム全長塩基配列が決定され、データベースに報告されている NoV 19 株と SaV の MC, Br 株に加え、本研究でゲノム全長を決定した SaV 9 株を用いて分子系統解析を行った。前述の方法に従い作成した NJ 法による分子系統樹を図 6 に示した。ヒトから同定された NoV は大きく 2 つのゲノグループ (GI, GII) クラスタを形成した。SaV は MC 株, Mc114, N21, Thai50, Thai74 が一つのクラスタを、Br 株, Mc2, ChiangMai, SakaiC12, Sakaew15 が一つのクラスタを形成した。ブタから分離されたウイルスである Cowden 株はこれら 2 つのクラスタとは異なるクラスタに位置していたが、NK24 株も Cowden 株と同様にいずれのクラスタにも属さず独立したクラスタを形成していた。この結果、人に感染する SaV には少なくとも 3 つのゲノグループ (GI, GII, GIII) が存在することが示唆された。

#### D. 考察

SaV のゲノム全長のうち最も塩基配列が保存された領域は、構造蛋白質領域の直前であり、NoV の ORF1-ORF2 ジャンクション領域 (リアルタイム PCR の標的領域) に相当していた。この領域には、本研究で解析した SaV 株全てで 100% 近く保存された 100 塩基ほどの領域が存在し、NoV 同様、高感度 SaV 核酸検出法の絶好の標的領域となると思われた。この領域の塩基配列を用いればゲノグループに依存しないブロードレンジな核酸検出系を構築

できる可能性がある。

SaV のゲノム塩基配列の相同性の平均値は、NoV よりも高い値を示した。しかし、図 4 の分子系統樹の NoV クラスタと SaV クラスタを比較しても、横軸方向の枝長に有意な差を見いだせなかった。NJ 法で描いた分子系統樹の横軸方向の枝の長さは、遺伝学的距離を表している。従って、ゲノグループ間の遺伝学的距離は NoV と SaV 間であまり差がないと考えられた。今回解析に用いた株の約 1/3 が MC 株クラスタに属していたことが塩基配列やアミノ酸の相同性の平均値を押し上げた理由かもしれない。

SaV の塩基配列の相同性は 5100 塩基を境に低下していた。また、ゲノムの中で最も相同性の低い領域が 5100 塩基以降に存在していた。この傾向は NoV でも観察されている。NoV は 5100 塩基以降に VP1 蛋白質をコードしておりこの領域の塩基配列の多様性が、アミノ酸配列の多様性をもたらし、さらには多様な NoV の抗原性をもたらしていると考えられている。SaV も NoV 同様、構造蛋白質コード領域の多様性がウイルスの抗原性に多様性をもたらす可能性がある。また NoV と同様 SaV でも、非構造蛋白質と VP1 コード領域の境界でゲノムの組換えが起きている可能性が示された。一般にウイルスはゲノムの組換えにより進化の速度を加速させ、爆発的な流行を引き起こしたり、スピーシーズバリアーを突破して新たな宿主に広がったりすることが知られている。構

造蛋白質領域の組換えによる劇的な変化が、NoV ばかりでなく SaV の流行に関係する可能性がある。今後、NoV 共々分子疫学調査を進め、ゲノムの組換えについて詳細に調べていく必要がある。

SaV のゲノム全長を用いた分子系統解析から、SaV には少なくとも 3 つのゲノグループが存在することが明らかになった。NoV では、2 つのゲノグループの存在が明らかにされた後、分子進化遺伝学的解析によりゲノムの組換えを考慮に入れ、かつウイルスの抗原性をも考慮に入れた VP1 領域を用いたゲノタイプング法が確立された。現在では、その方法に基づきそれぞれのゲノグループに GI/1~14、GII/1~17、合計 31 種類のゲノタイプの存在が明らかにされている。SaV にもそれぞれのグループにゲノタイプが複数存在すると考えられる。しかし、未だデータベース上の塩基配列の数が不足しており、十分な分子進化遺伝学的解析が行えない。今後ゲノムの組換えの影響および、ウイルスの抗原性に考慮しながら、どの領域を用いてゲノタイプングを行うのか、塩基配列データの充実を図りながら取り組む必要がある。

## E. 結論

本研究により、SaV のゲノム全体像が把握できた。高感度核酸検出システムを構築する際、ターゲットとする領域を特定できた。SaV の分子系統解析により、少なくとも遺伝学的に異なる 3 つのグループが

存在することが明らかになった。また、構造蛋白質領域に核酸塩基配列、アミノ酸配列ともに相同性の低い領域が存在することが明らかにされた。SaV も NoV と同様ウイルス粒子の抗原性が多様である可能性が示唆された。さらに、NoV と同様に非構造蛋白質と構造蛋白質コード領域の境界でゲノムの組換えが起きていることが示唆された。今後、これらの結果を考慮に入れ、ゲノタイプング法を確立しつつ SaV の分子疫学を進める必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 片山和彦：ノーウォークウイルス診断法の進歩. ワールドフォーカス No. 43, 2003.
- (2) 片山和彦：カリシウイルス. 新世紀の感染症学, 日本臨牀 61 増刊号 3, 2003.
- (3) 白土東子, 片山和彦：ノロウイルス. 新世紀の感染症学, 日本臨牀 61 増刊号 3, 2003.
- (4) 武田直和, 白土東子, 岡 智一郎, 片山和彦, 宇田川悦子, 名取克郎, 宮村達男：カリシウイルスの命名変更について. IASR vol. 24 No. 12, 3 □ 4, 2003.
- (5) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス（ノロウイルス、サポウイルス）総論. IASR vol. 24 No. 12, 4 □ 6,

2003

- (6) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, and Katayama K. A broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative RT-PCR. *J Clin Microbiol* 41:1548-1557.
- (7) Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K., Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus., *J Virol* 2004 78:3889-3896.
- (8) Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H., Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand., *J Clin Microbiol* 2004 42:1305-1307.

## 2. 学会発表

- (1) 片山和彦：カリシウイルスの分子疫学。衛生微生物技術協議会 第24回研究会，福岡，平成15年7月11日。
- (2) K. Katayama : Analysis of

Norovirus replication using full-length genome. THIRTY-SEVENTH JOINT WORKING CONFERENCE ON VIRAL DISEASES US-Japan Cooperative Medical Science Program

- (3) 片山和彦：カリシウイルスの分類について 第15回ウイルス性下痢症研究会 平成15年10月26日
- (4) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和：Genetic Classification and Expression of a Novel Sapovirus Genotype. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日
- (5) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和：Molecular Characterization of a Novel Recombinant Norovirus. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日
- (6) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 牛島廣治, 福士秀悦, 影山努, 高井玲子, 白土(堀越)東子, 片山和彦, 武田直和, 宮村達男：サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29.
- (7) 白土(堀越)東子, 名取克郎, 鎌田公仁夫, 影山努, 岡智一郎, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和：

Norovirus と血液型物質との結合.  
第 5 1 回日本ウイルス学会学術集  
会, 京都, 2003 年 10 月 27-29 日

(8) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子,  
小嶋滋之, 影山努, 高井玲子, 福  
士秀悦, 宮村達男, 武田直和 :  
Norovirus (NV) Full-length cDNA  
クローンを用いた複製機構の解析.  
第 5 1 回日本ウイルス学会学術集  
会, 京都, 2003 年 10 月 27-29 日

(9) 片山和彦, Hansman Grant, 岡智一  
郎, 牛島廣治, 宮村達男, 武田直  
和 : 新たに全塩基配列を決定し得た  
Sapovirus (SV) 4 株を用いたゲノム  
塩基配列の解析. 第 5 1 回日本ウイ  
ルス学会学術集会, 京都, 2003 年  
10 月 27-29 日

(10) 小嶋滋之, 影山努, 高井玲子, 星  
野文則, 福士秀悦, 武田直和, 片  
山和彦 : Norovirus VLP の遺伝子デ  
リバリーベクター化への試み. 第  
5 1 回日本ウイルス学会学術集会,  
京都, 2003 年 10 月 27-29 日

(11) 高井玲子, 福士秀悦, 影山努, 小  
嶋滋之, 星野文則, 名取克郎, 武  
田直和, 片山和彦 : Norovirus 濃縮  
法の検討. 第 5 1 回日本ウイルス  
学会学術集会, 京都, 2003 年 10 月  
27-29 日

(12) 影山努, 小嶋滋之, 高井玲子, 星  
野文則, 福士秀悦, 篠原美千代,  
内田和江, 岡智一郎, 武田直和,  
片山和彦 : Norovirus の多様性およ

びその疫学的な意義について. 第 5  
1 回日本ウイルス学会学術集会,  
京都, 2003 年 10 月 27-29 日

(13) Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama,  
Grant Hansman, Haruko Shirato,  
Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa,  
Etsuko Utagawa, Katsuro Natori,  
and Tatsuo Miyamura : Genetic and  
Antigenic Diversity of  
Noroviruses. Workshop on Emerging  
Enteric Viral Diseases, Seoul,  
Korea, 20 November, 2003.

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

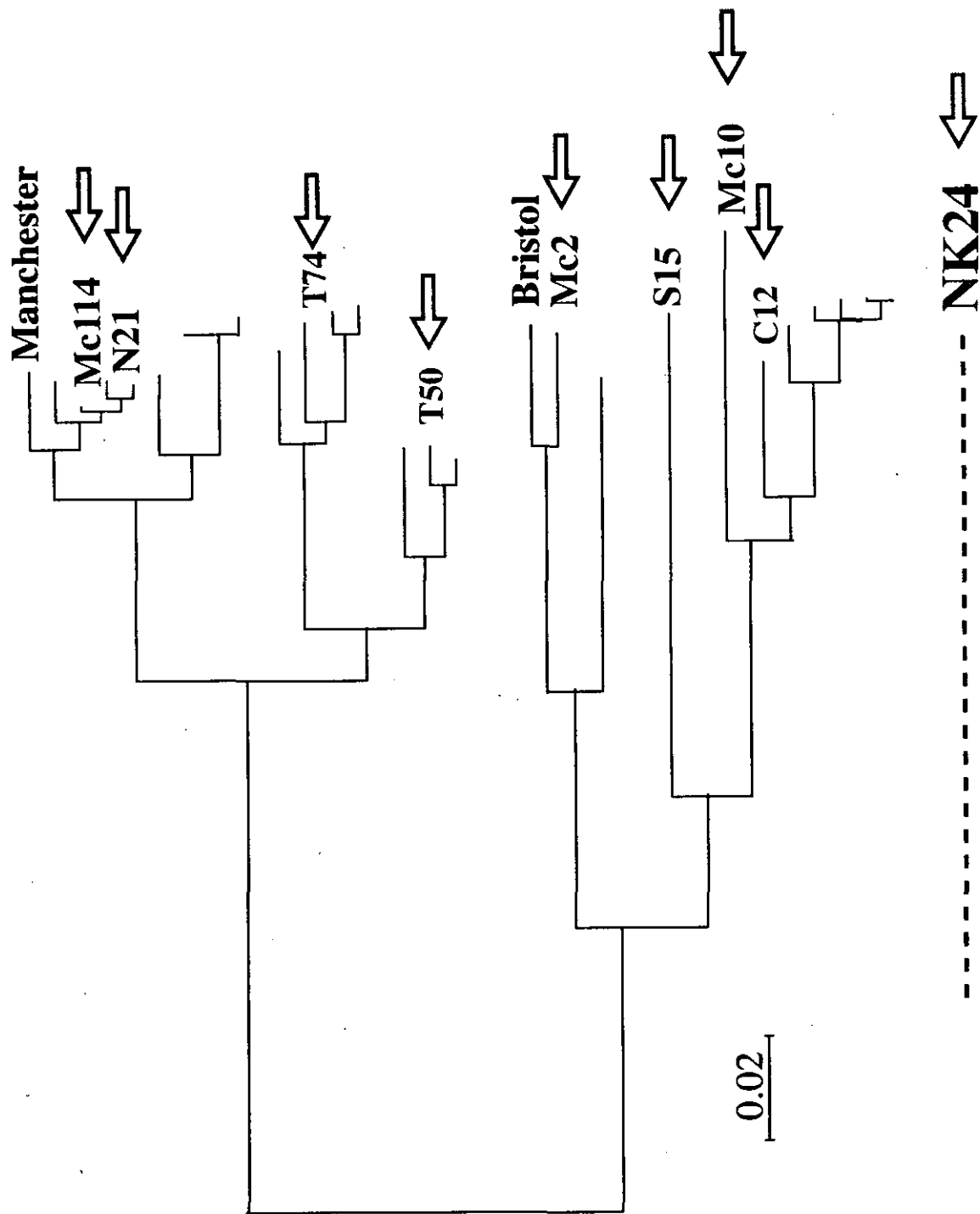
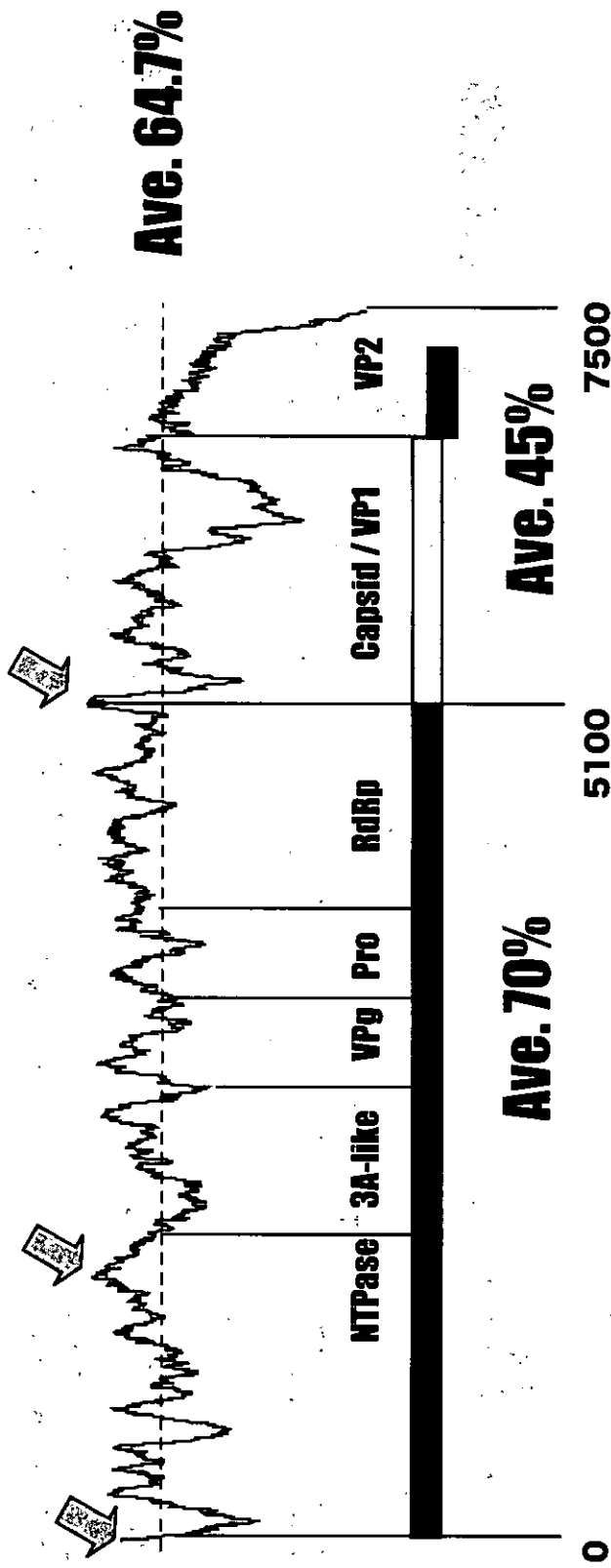


図1. 4265~5038塩基を用いたNJ法による分子系統樹。  
 全塩基配列の決定を試みた株を矢印で示した。



# Sapovirus



# Norovirus

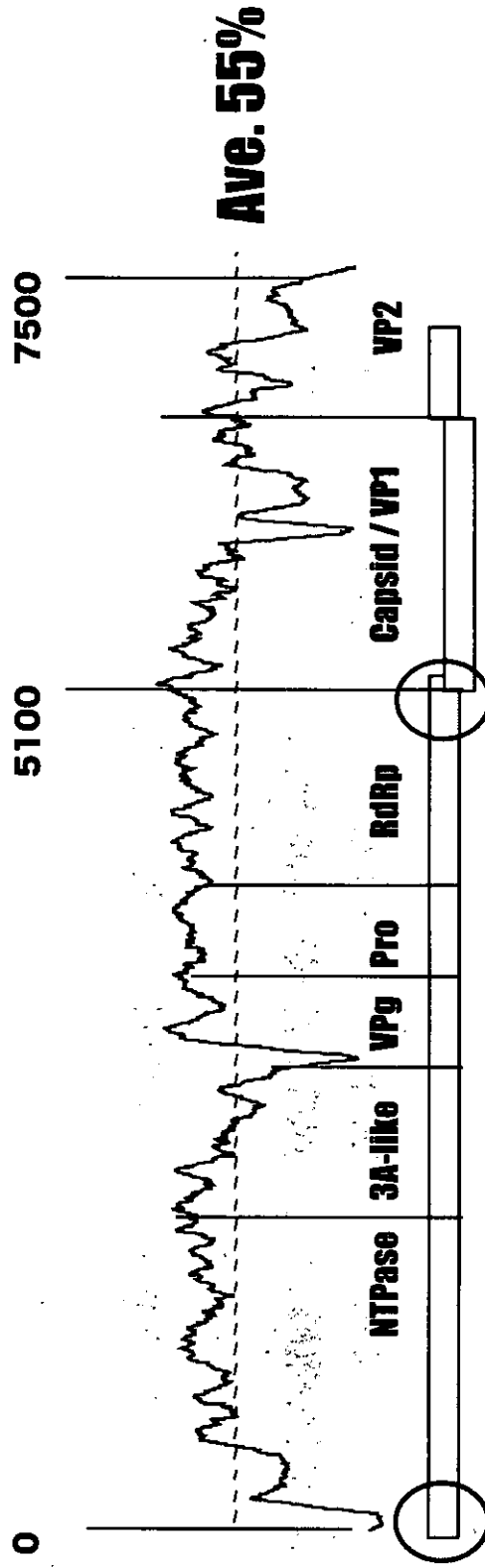
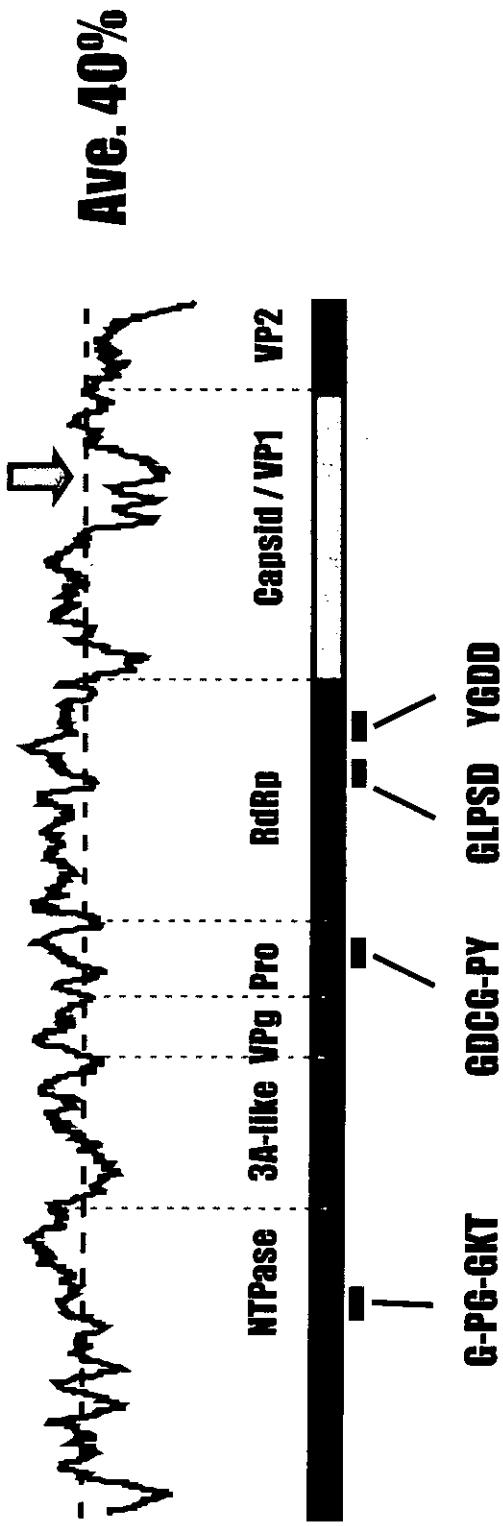


図3. Similarity plotを示した.プロットの下方にはゲノムの模式図を示した.縦軸は相同性を表し、上に行くほど相同性が高い。矢印で相同性が高かった領域を示した。相同性の平均値を波線を示した。NoVで同じ塩基配列モチーフが現れる部分を○で示した。



# Sapovirus

VP1領域の相同性が低い



# Norovirus

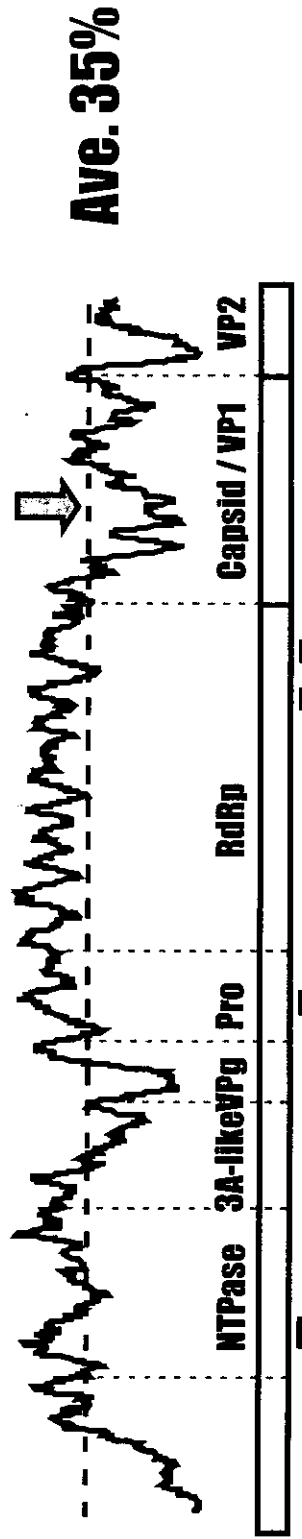
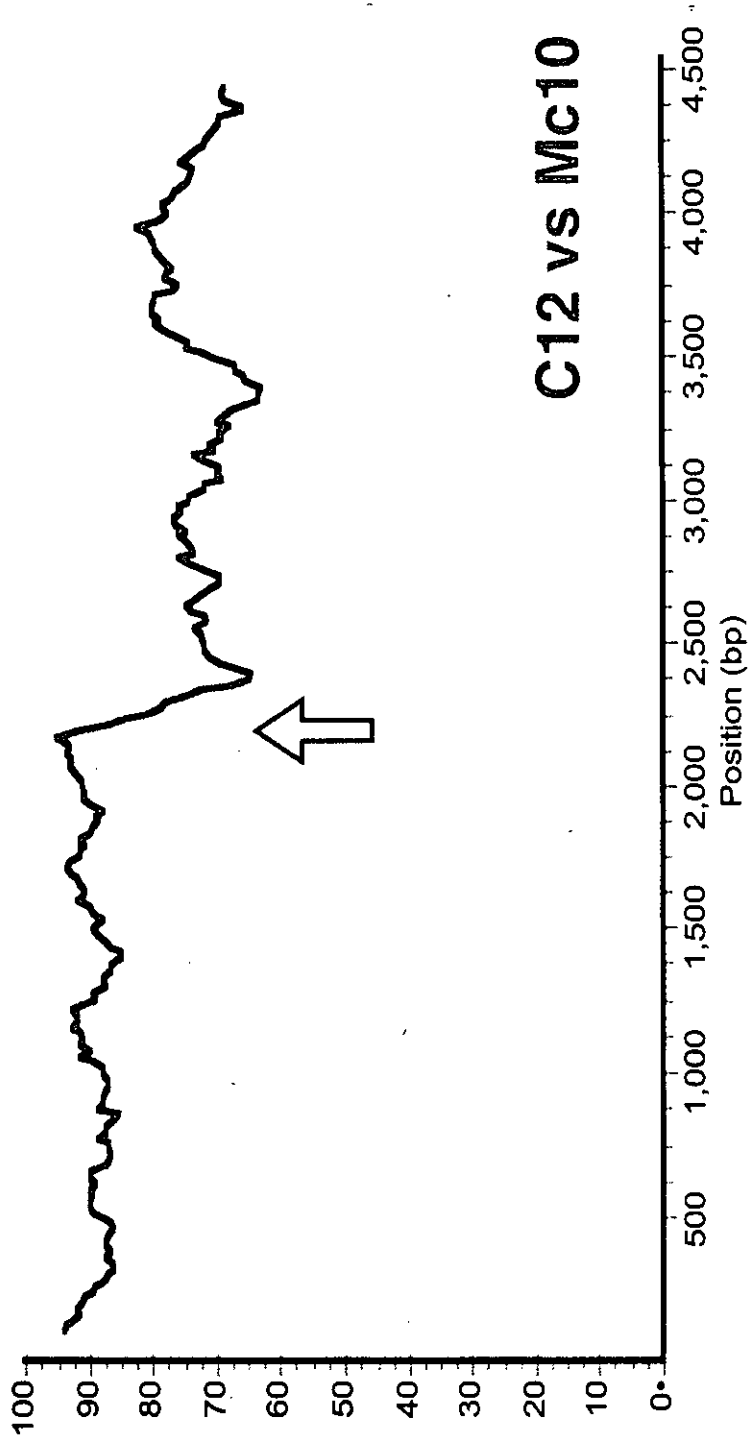


図4. コンバインドポリペプチドのSimilarity plotを示した。VP1領域に認められた相同性の低い領域を矢印で示した。



Window: 200 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, J-C Correction: Off

図5. SimPlot解析の結果を示した。基準配列としてSakaiC12株を用い、Mc10株との相同性を幅200塩基のwindowを、20塩基ずつスライドさせてJC法で相同性を算出して結果をプロットした。縦軸は相同性、横軸は塩基数を示した（組換え点をクロールズアップしたのでプロットのスタートがゲノムの5'末端ではない）。予想された組換え点を矢印で示した。

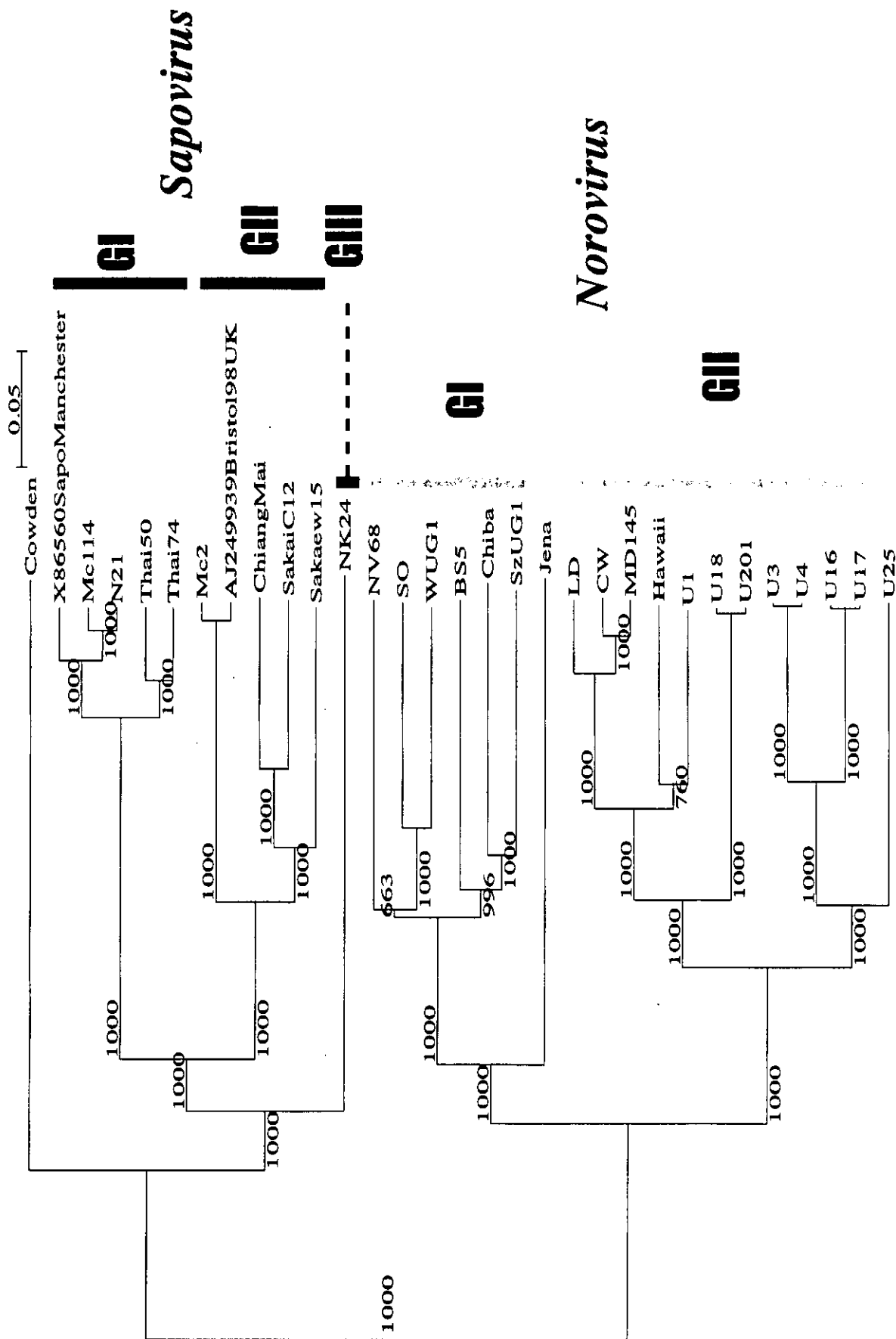


図6. *Sapovirus*、*Norovirus*のゲノム全長塩基配列を用いたNJ法による分子系統樹。  
この図ではMc10株をChiangMai株と表記した。

厚生労働科学研究費補助金(振興・再興感染症研究事業)  
「食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究」  
分担研究報告書

Sapovirus (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現ならびに部位特異抗体の作製

分担研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

### 研究要旨

ウイルス性急性胃腸炎の原因ウイルスである Sapovirus (SV)の予防衛生対策を検討するためには、SV の診断法の開発とあわせて、SV の各機能タンパク質の性状の検討等を含めた基礎的研究が重要である。SV のゲノム上には2つのオープンリーディングフレーム (ORF)が存在し、ORF1 はアミノ酸残基数約 2250 の巨大なポリペプチドを、ORF2 はアミノ酸残基数約 165 の塩基性ポリペプチドをコードする。SV の ORF1 は翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼにより NTPase、VPg、プロテアーゼ、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp)といった非構造タンパク質と、構造タンパク質 Capsid (VP1) にプロセッシングされ、それぞれの機能を発現すると考えられているが、SV のポリペプチドのプロセッシングパターンおよび SV の各機能タンパク質の活性については、いまだ実験的に証明されていない。

本研究では、これらの課題について検討するため、まず大腸菌を用いて SV の ORF1 および ORF2 に対応する16種類の領域についてポリペプチドの網羅的な発現を試み、15種類について発現を確認した。そのうちSV の ORF1 のそれぞれ異なる領域に対応する8種類、および ORF2 に対応する1種類、合計9種類のリコンビナントタンパク質を用いて、SV ゲノムのほぼ全域 (ORF1 の 83%、ORF2 の 100%) にわたり部位特異抗体を作製した。また、アミノ酸モチーフ (YGDD) から SV の RdRp に対応すると推測される領域については、可溶性の GST 融合タンパク質が得られたため、この融合タンパク質を用いて酵素活性の検討を行い、RdRp 活性を検出することに成功した。

#### A. 研究目的

Sapovirus (SV)は Norovirus と同様、ヒト感染性胃腸炎の原因ウイルスであるが、細胞や、モデル動物などでの増殖系がないため、その感染、複製、および増殖機構はいまだ明らかでない。

SV はカリシウイルス科に属するプラス一本鎖 RNA ウイルスで、全長約 7500 塩基からなる。SV の ORF1 は翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼにより NTPase、VPg、プロテアーゼ、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp)といった非構

造タンパク質と、構造タンパク質 Capsid (VP1) にプロセッシングされ、それぞれの機能を発現すると考えられるが、SV のポリペプチドのプロセッシングパターンおよびSV の各機能タンパク質の活性については、いまだ実験的に証明されていない。上記の課題を検討するための第一段階として、今回、大腸菌を用いてSV の ORF1 および ORF2 に対応するポリペプチドの網羅的な発現、ならびにそれらに対する抗体の作製を行った。

## B. 研究方法

### サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現

ゲノム全塩基配列を決定した SV (チェンマイ株: Mc10) の cDNA を鋳型として、SV の ORF1 および ORF2 ポリペプチドに対応する16種類の遺伝子領域を PCR 法によって増幅し、それぞれヒスチジンタグ融合タンパク質およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現させるために、pDEST17 および pDEST15 ベクター (Invitrogen 社) に組み込んで、大腸菌に導入した。これら大腸菌を LB 培地中、37°C で OD が 0.6-0.8 になるまで培養後、終濃度が 0.2% (w/v) となるようにアラビノースを添加し、さらに 37°C で3時間培養し、リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。タンパク質発現の確認は、誘導前後の菌体を用いて SDS-PAGE /クマシー染色で行い、タンパク質の可溶性の検討は、菌体を phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) に懸濁後、超音波破碎処理し、遠心上清に存在したものを可溶性と判断した。

### SV ORF1 および ORF2 に対する部位特異抗体の作製

上記発現タンパク質のうち、ORF1 の異なる領域に対応する8種類および ORF2 に対応する1種類、合計9種類のヒスチジンタグ融合タンパク質を 8M 尿素変性条件下で TALON affinity resin (Clontech 社) を用いて精製した後、4M 尿素/ PBS に透析した。精製したリコンビナントタンパク質を、ウサギに免疫し、抗血清を得た。各抗血清の特異性は、免疫に用いた9種類のリコンビナントタンパク質を SDS-PAGE し、ウェスタンブロット法によって検討した。

### SV RdRp 活性の検出

SV の RdRp に対応すると推測される領域を含む GST 融合タンパク質を、菌体の超音波破碎処理後の、PBS (pH7.4) 可溶性画分からグルタチオンセファロース (Amersham Biosciences 社) を用いて精製し、SV Mc10 ゲノムの polyA tail を含む 3' 末端配列のプラス1本鎖 RNA (約 540nt) を鋳型として、既報の NV の RdRp 活性検出法 (Fukushi S. *et al*, Journal of Virology, *in press*) に基づいて検討を行った。

## C. 研究結果

### サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現

今回、大腸菌での発現を試みた 16 種類の SV 遺伝子領域のうち、15 種類についてリコンビナントタンパク質の発現が認められた。本研究で調製した大腸菌リコンビナントタンパク質はヒスチジンタグ融合タンパク質、GST 融合タンパク質いずれも、そのほとんどが不溶性であったが、アミノ酸モチーフ (YGDD) から SV の RdRp に対応すると考えられる領域についてのみ、可溶性の GST 融合タンパク質を調製することが可能であった。

## SV ORF1 および ORF2 に対する部位特異抗体の作製

上記リコンビナントタンパク質のうち、SV の ORF1 のそれぞれ異なる領域に対応する8種類、および ORF2 に対応する1種類、合計9種類のリコンビナントタンパク質を用いて、SV ゲノムのほぼ全域 (ORF1 の 83%、ORF2 の 100%) にわたり部位特異抗体を作製した。ウェスタンブロット法により、各抗体がそれぞれの領域を特異的に認識することを確認した。

## SV RdRp 活性の検出

アミノ酸モチーフから SV の RdRp に対応すると推測される領域を含む GST 融合タンパク質を、SVMc10 ゲノムの polyA tail を含む 3' 末端配列のプラス1本鎖 RNA (約 540nt) を鋳型として反応させたところ、RdRp 活性を有することが示された。

## D. 考察

### サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現

発現を試みた16種類のタンパク質のうち、15種類について発現を確認した。発現が認められなかった1種類の領域 (NTPase モチーフ上流領域) は、SV ORF1 の中で最も疎水性が高く、そのため大腸菌に対し毒性を生じたことが推測された。この領域は他のカリシウイルス (Rabbit hemorrhagic disease virus, Feline calicivirus) でも発現が出来ないことが報告されていることから、この領域が構造的、機能的に各カリシウイルス間で保存されていることが予想された。今回発現したヒスチジンタグ融合タンパク質および GST 融合タンパク質は RdRp 領域を除き不溶性であったため、その他の酵素 (NTPase、プロテアーゼ等) の活性の検討には、異なる発現系

(ベクター、宿主) を用いる必要があると思われる。

## SV ORF1 および ORF2 に対する部位特異抗体の作製

本研究で作製した部位特異抗体は SV ゲノムのほぼ全域 (ORF1 の 83%、ORF2 の 100%) をカバーすることから、各産物の検出のみならず、SV ORF1 プロセッシング産物の同定、マッピングに有用と思われる。現在、SV の ORF1 のプロセッシングパターンの解析を試みている。

## SV RdRp 活性の検出

アミノ酸モチーフから RdRp をコードすると推測される領域については、可溶性の GST 融合タンパク質を用いて RdRp 活性を検出することに成功した。今後、RdRp 活性の特異性、至適条件等についてさらに検討を進める。

## E. 結論

本研究により、SV のプロセッシング解析に有用な SV ゲノムのほぼ全域にわたる部位特異抗体を作製した。また、アミノ酸モチーフから SV ORF1 中には複数の機能タンパク質 (NTPase、VPg、プロテアーゼ、RdRp) の存在が予測されていたが、本研究により、はじめて実験的に RdRp 活性を検出することに成功した。今後、他の機能タンパク質も含めて、さらに詳細に検討を試みる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 武田直和、白土東子、岡 智一郎、片山和彦、宇田川悦子、名取克郎、宮村達男：カリシウイルスの命名変更について、病原

微生物検出情報 (IASR) Vol. 24, No. 12, 2003.

(2) Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K., Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus., J of Virol 2004 78:3889-3896.

## 2. 学会発表

(1) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 牛島廣治, 福士秀悦, 影山努, 高井玲子, 白土(堀越)東子, 片山和彦, 武田直和, 宮村達男: サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(2) 片山和彦, Hansman Grant, 岡智一郎, 牛島廣治, 宮村達男, 武田直和: 新たに全塩基配列を決定し得た Sapovirus (SV) 4株を用いたゲノム塩基配列の解析. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(3) 福士秀悦, 小嶋滋之, 影山努, 高井玲子, 星野文則, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦: Norovirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発現と酵素活性について. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(4) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子, 小嶋滋之, 影山努, 高井玲子, 福士秀悦, 宮村達男, 武田直和: Norovirus (NV) Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(5) 白土(堀越)東子, 名取克郎, 鎌田公仁

夫, 影山努, 岡智一郎, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: Norovirus と血液型物質との結合. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(6) 影山努, 小嶋滋之, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 篠原美千代, 内田和江, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦: Norovirus の多様性およびその疫学的な意義について. 第51回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 2003年10月27-29日

(7) Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama, Grant Hansman, Haruko Shirato, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Etsuko Utagawa, Katsuro Natori, and Tatsuo Miyamura: Genetic and Antigenic Diversity of Noroviruses. Workshop on Emerging Enteric Viral Diseases, Seoul, Korea, 20 November, 2003.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ノロウイルスと血液型物質との結合に関する研究

分担研究者 白土 東子 国立感染症研究所・ウイルス第2部・研究員

研究要旨：Norovirus (NV) が血液型物質（型物質）を認識するとの報告がなされている。しかし、プロトタイプである Norwalk virus/68 (NV/68) のみ、またはそれを含むほんの数株でしか解析が行われていない。そこで、型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討した。GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の Virus-like particles (VLPs) を用い、唾液中の型物質との結合を ELISA にて解析した。その結果、GI の 4 株、また GII の 7 株の VLPs は dose-dependent に唾液と結合し、これらの株の結合に型物質が関与していることが示唆された。一方、GII において唾液中に全く結合しないウイルスが 4 株、また、その結合量が唾液中の型物質と相関しない株が 1 株認められ、結合に型物質以外の因子を必要とするウイルス株の存在が示唆された。さらに詳細な解析を行うことにより、型物質の NV 感染における役割を明らかにしたい。

A. 研究目的

NV は、ウイルス性急性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり、ヒト小腸に感染し増殖すると報告されている。しかし、in vitro における培養細胞系も動物実験系もいまだ見いだされていない。感染機序の解析を行うためにも、培養系の確立が必須であり、そのためにもレセプター因子の同定が緊急の課題と考えられる。近年、VLPs を用いたレセプター分子の解析が行われ、NV/68 のレセプターが腸管上皮に発現される H 型物質であるとの報告がなされた。しかし、詳しい解析がなされ

ているのはプロトタイプである NV/68 のみである。NV/68 以外の GI 株については報告がなく、また GII に属する株についても 7 株報告があるものの、それぞれ株間での詳しい比較解析は行われておらず GII 全体での結合パターンを考察するに至っていない。そこで、GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の VLPs を用い、Saliva-VLP binding assay (ELISA-based) により唾液中の型物質と VLPs との結合を検討した。

B. 研究方法



ABO 式血液型物質は赤血球以外にも腸管上皮細胞などに発現されており、さらに唾液中にも分泌されている。今回、唾液中の型物質とウイルスとの結合を解析した。

#### 1. 唾液中の型物質の検出

日本人である健常人 20 歳代から 60 歳代の成人男女から採取した唾液を用いた。採取後、直ちに 100℃、10 分間加熱処理を行い、その後 13,000g、5 分間にて遠心し、その上清を回収した。上清中の H、A、B 各型物質の有無を赤血球凝集阻止反応により調べ、それぞれのサンプルの血液型を判定した。具体的には、抗 H レクチン、抗 A 抗体、抗 B 抗体（以上全て gamma Biologicals, Inc.）それぞれ 1000 1、500 1、500 1 と等量の唾液を 26℃で 10 または 20 分間反応させた後に、500 1 の O 型、A1 型、B 型赤血球 (gamma Biologicals, Inc.) を加え 26℃で 5 分間インキュベーションを行った。125g、1 分間にて遠心後、穏やかに振とうし、肉眼的検査により凝集阻止の有無を調べた。

#### 2. 唾液と VLPs との結合量の測定

唾液と VLPs との結合量を Saliva-VLP binding assay (ELISA-based) にて検出した。加熱、遠心後の唾液上清サンプルを 50 mmol/L, pH 9.6, carbonate/bicarbonate buffer にて階段希釈し、Polystyrene plate (Thermo Labsystems) に加え、37℃で一晩コーテ

ィングを行った。5% skim milk (SM) /PBS にて、室温で 1 時間ブロッキングを行った後に、rNV VLPs (0.5 〇 g/mL in 1% SM/PBS-T (0.05% Tween 20/PBS)) を加え、37℃で 1 時間インキュベーションした。次いで rabbit anti-rNV VLPs antiserum (at 1/2000 in 1% SM) を加え 37℃で 1 時間、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories Inc.) を加え 37℃で 1 時間インキュベーションを行った。0-phenylenediamine (Sigma) を基質として加え発色させた後に、492 nm にて吸光度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

唾液の使用は、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会での承認、提供者からのインフォームド・コンセントを得た上で行った。

#### C. 研究成果

##### 1. 唾液中の型物質の検出

凝集価 1:32、1:256、1:256 の抗 H レクチン、抗 A 抗体、抗 B 抗体を用いた赤血球凝集阻止試験において、抗 H レクチン、O 型赤血球を用いた場合にのみ明らかな凝集阻止を示したサンプルを O 型唾液、抗 H レクチン、O 型赤血球さらに抗 A 抗体、A1 型赤血球を用いた場合に凝集阻止を示したサンプルを A 型唾液、抗 H レクチン、O 型赤血球さらに抗 B 抗体、B 型赤血球を用いた場合に凝集阻止を示したサンプル

を B 型唾液、いずれの組み合わせにおいても凝集阻止を示したサンプルを AB 型唾液とした。31 サンプル中 29 サンプルは凝集阻止を示し、その内訳は、A 型 10 サンプル、AB 型 6 サンプル、B 型 6 サンプル、O 型 7 サンプルであった。また、2 サンプルは凝集阻止を示さなかった。

## 2. 唾液と VLPs との結合量の測定

GI の 4 株、また GII の 7 株の VLPs は dose-dependent に唾液と結合した。型物質量の少ない唾液検体への結合量は低かった。GI では O 型唾液への結合が高く、逆に GII では O 型唾液への結合が低かった。一方、GII において唾液に全く結合しないウイルスが 4 株、また、その結合量が唾液中の型物質と相関しない株が 1 株認められた。

## D. 考察

今回、NV の GI に属する 4 株、GII に属する 12 株、計 16 株の VLPs を用い、型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討した。その結果、以下のような点が明らかになった。1) GI の 4 株、また GII の 7 株の結合に型物質が関与している。2) GI に属するウイルス株の結合には、H 型物質が重要である。3) GII に属するウイルス株の結合には GI とは異なり、H 型物質以外の型物質が重要である。4) 結合に型物質以外の因子を必要とするウイルス株が存在する。

## E. 結論

NV は遺伝学的、血清学的に多様であるため、ワクチンによる予防は困難であるが、レセプターへの結合を阻害する薬剤による予防は効果が期待できる。また、ウイルス増殖系確立のためにもレセプターの同定は必須である。今回の結果から、ウイルス株により結合に用いる型物質の種類が異なること、さらに、結合に型物質以外の因子を必要とするウイルス株が存在することが示唆された。さらに詳細な解析を行い、型物質の NV 感染における役割を明らかにするとともに、第 2 のレセプターの存在についても検討したい。

## F. 研究発表

### 1. 誌上発表

(1) 白土東子、片山和彦：ノロウイルス、新世紀の感染症学、日本臨牀 61 増刊号 3, 2003.

(2) 武田直和、白土東子、岡智一郎、片山和彦、宇田川悦子、名取克郎、宮村達男：カリシウイルスの命名変更について、IASR vol. 24 No. 12, 3 □ 4, 2003.

### 2. 学会発表

(1) 白土（堀越）東子、名取克郎、鎌田公仁夫、影山努、岡智一郎、片山和彦、宮村達男、武田直和「Norovirus と血液型物質との結合」第 51 回日本ウイルス学会学術集会総会、2003 年 10 月 27-29 日、京都

(2) 片山和彦、岡智一郎、白土東子、小

嶋慈之、影山努、高井玲子、福士秀悦、  
宮村達男、武田直和「Norovirus (NV) の  
Full-length cDNA クローンを用いた複製  
機構の解析」第 51 回日本ウイルス学会学  
術集会総会 (同上)

(3) 岡智一郎、小川智子、Hansman Grant、  
牛島廣治、福士秀悦、影山努、高井玲子、  
白土 (堀越) 東子、片山和彦、武田直和、  
宮村達男「サポウイルス (SV) がコード  
するポリペプチドの網羅的発現」第 51 回

日本ウイルス学会学術集会総会 (同上)

(4) Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama,  
Grant Hansman, Haruko Shirato,  
Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Etsuko  
Utagawa, Katsuro Natori, and Tatsuo  
Miyamura : Genetic and Antigenic  
Diversity of Noroviruses. Workshop on  
Emerging Enteric Viral Diseases,  
Seoul, Korea, 20 November, 2003.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* 2004;78: 3817-3826.
2. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41: 1548-1557. Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 2004;48: 201-204.
3. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K: Co-Existence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Norovirus Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 2004: in press.
4. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and Identification of a Novel Human Parechovirus. *J. Gen. Virol.* 2004: in press.
5. Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42: 1305-1307.
6. Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, Katayama K: Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus Poly(A)- and Primer-independent RNA Polymerase of Norovirus. *J. Virol.* 2004;78: 3889-3896.
7. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of vorions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch. Virol.* 2003;148: 1659-1670.
8. Sasaki J, Taniguchi K. The 5' -end sequence of the genome of Aichi virus, a Picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol* 77 (6) :3542-3548, 2003
9. Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi K. Functional analysis of the stem-loop structures at the 5' end of the Aichi virus genome. *Virology* 39 (11) :3969-3975, 2003
10. Sasaki J, Nagashima S, Taniguchi K. he Aichi virus leader protein is involved in viral RNA replication and encapsidation. *J Virol* 77 (11) : 10799 - 10807, 2003
11. Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K. Close relationship between G8 bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol* 41 (8 ) :3945-3950, 2003
12. Wakuda M, Nagashima S, Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Kobayashi N, Taniguchi K. Serological and genomic characterization of a G12 human rotavirus in Thailand. *J Clin Microbiol* 41 (12 ) :5764-5769, 2003
13. Sanekata T, Ahmed MU, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 41 (5) :2187-2190, 2003
14. Kohmoto S, Tsuji S, Ibrahim MS, Li Y, Warachit J, Taniguchi K, Ikuta K. The Vpu protein