

図3 各施設から報告された IS type 2 の菌株の分離日

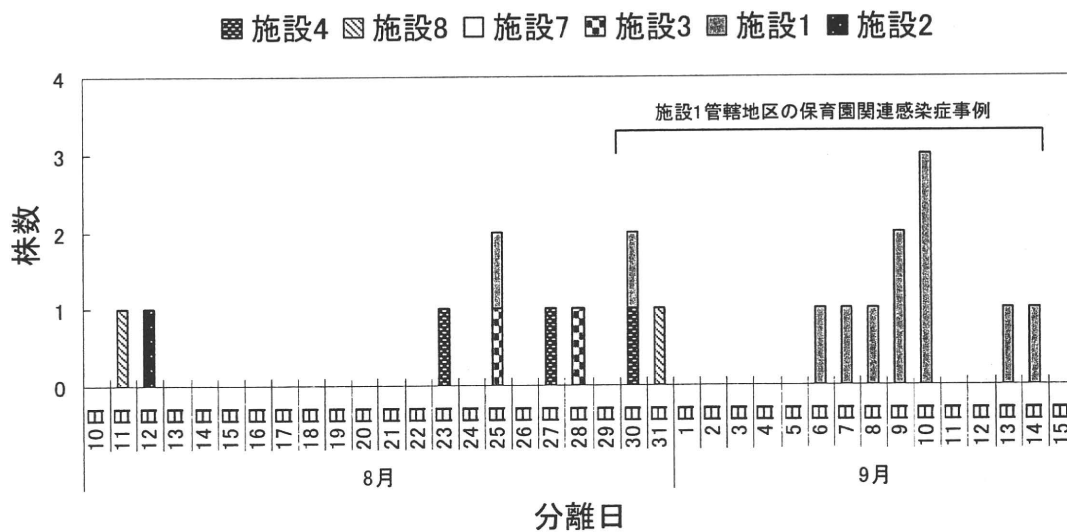


図4 各施設から報告された IS type 4 の菌株の分離日

平成 22 年度 厚生労働省研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」に関する 九州地区 研修

“*Shigella sonnei* の multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)”

場所 福岡県太宰府市向佐野 39、福岡県保健環境研究所
日時 平成 23 年 2 月 3 日(木)、11:00 – 17:30
平成 23 年 2 月 4 日(金)、9:00 – 15:30
講師 国立感染症研究所 細菌第一部 泉谷 秀昌 先生

1. 研修参加者

研修は九州地区 12 地方衛生研究所および久留米市保健所から 25 名が参加した。

2. 研修内容

泉谷先生作製プロトコール

研修に使用したプロトコールは、泉谷先生が作成されたものを使用した。

参考文献

Hidemasa Izumiya, Yuki Tada, Kenichiro Ito, Tomoko Morita-Ishihara, Makoto Ohnishi, Jun Terajima and Haruo Watanabe. 2009. Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. *Journal of Medical Microbiology* 58, 1468-1491.

【template 調製】

研修では菌株輸送の関係から、*Shigella sonnei* をTSB寒天培地などに密集発育部分から 1 μm 白金耳にて釣菌し、TE バッファー 50 μl に懸濁し、10 分間煮沸あるいは 10 分間ヒートブロックにて 95℃ で加熱した加熱処理菌液を各施設から持参した。

DNA の精製は、TOHO クリーンカラム(バクテリア DNA 用 06303x0)を用いた。(泳動時に細胞の debris が混入すると泳動が乱れるので、DNA の精製は行った方が良い。)

本キットを使用した場合、通常は培養液(1.5OD₆₀₀)0.5ml を試料とするが、本研修では各地研から持参した加熱処理菌液に、キットのバッファーB1 を 90 μl、リゾチーム溶液を 10 μl、RNaseA を 20 μl 加え、ボルテックスミキサーで混和し、60℃ の水浴中で 10 分間インキュベートした。次に、各サンプルにバッファーB2 を 2.5 μl、純水を 87.5 μl、バッファーB3 を 10 μl、DTT を 2.5 μl、EDTA を 2 μl 加え、ボルテックスミキサーで混和した後、60℃ の水浴中で 30 分間インキュベートした。予め準備したクリーンカラム(プレップバッファー 350 μl を入れ、室温で少なくとも 5 分間インキュベートし、380 × g (1900rpm) で 1 分間遠心したカラム)に、上記溶解液を 120 μl 入れ、室温で 3 分間インキュベートし、720 × g (2000rpm) で 1 分間遠心したろ過液を Template DNA とした。なお、遠心機は Centrifuge 5417R(ependorf 社製)を使用し、TOHO クリーンカラム添付書類に記載の回転数に近い回転数で遠心を行った。

【プライマー調製】

プライマー(蛍光)

SS1-F	6-FAM	TTGCCAGTACACCTCACTCG
SS3-F	NED	CTGGGAGATGAACAGGAGGA
SS6-F	PET	GAGTCGCTAAACGCTTGCTT
SS9v-F	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA
SS10v-F	VIC	GGGGGAGATCAGTATTTAGA
SS11v-F	PET	GCAATCTGTTTTTTATCGAC
SS13v-F	6-FAM	CCATTTGGCATCACCGTTGT

プライマー(非蛍光)

SS1-R	GCGTCGGCGTTAATATCACT
SS3-R	ATGCCAGCGACAAGTTTCTT
SS6-R	GGGAAATAGAGCGGACCTTT
SS9v-R	CGCGGCTGCCGGAGTATC
SS10v-R	TGATAGACGGTAATGCAGATTGTAAC
SS11v-R	CTGAGCCACCAGCAGGAGGC
SS13v-R	GCCTCACCAAAATCATCGTC

各プライマーは、TE で 100 μ M に溶解する。

【プライマーミックス】

各プライマー(100 μ M)2 μ l(計 28 μ l)を 172 μ l TE と混合した液(計 200 μ l)をプライマーミックスとする。

【PCR】

酵素は、Qiagen multiplex PCR kit #206143 (MM mix)を使用する。

反応液(μ l)

DNA	1
dH2O	11.1
MM mix	12.5
プライマーミックス	0.4
計	25

【PCRサイクルプロトコール】

95 $^{\circ}$ C	15 分	
↓		
95 $^{\circ}$ C	20 秒	
60 $^{\circ}$ C	90 秒	(35 サイクル)
72 $^{\circ}$ C	60 秒	
↓		
72 $^{\circ}$ C	10 分	

【PCR反応産物の希釈】

必要なもの

96 ウェルアッセイプレート(Falcon #353911) ※研修では 1.5ml チューブで代用した

96 ウェル PCR プレート(シークエンサー用)

Hi-Di ホルムアミド(ABI#4311320)

GeneScan600LIZ(ABI#4366589)

(プレート用遠心器)

[希釈1]

- アッセイプレート(1.5ml チューブでも可)に 12(-20)µl ずつ Hi-Di ホルムアミドを分注する。
- PCR 産物 1.5µl をアッセイプレート内または 1.5ml チューブ内で Hi-Di ホルムアミドと混合し、希釈する。

[希釈2]

- 1 ウェルあたり 10µl の Hi-Di ホルムアミドと 0.2µl の GeneScan600LIZ を混ぜる(マーカーミックス)。
- シークエンサー用プレートに 10µl ずつマーカーミックスを分注する。
- 希釈産物 1.5µl をマーカーミックスと混ぜる。
- 99°C3 分間で denature
希釈率は反応効率によって変わります。
希釈と denature は泳動直前に行った方が、望ましい。
また、PCR 反応後、時間ができるだけ経過しない方が望ましい。
サンプルがないウェルは水をいれる。
今回の研修では、PCR 反応を夕方から始め、希釈は泳動当日朝行った。

泳動【シーケンサー】

必要な物

10xRunning Buffer with EDTA (ABI#4335613)

マルチキャピラリー用 DS-33 Matrix Standard (ABI#4345833) ※初期設定に必要な

キャピラリー50cm (ABI#4331246) ※研修では 36cm を使用した

ポリマー POP-7 (ABI#4363785) ※研修では POP-6 を使用した

※ キャピラリー、ポリマーは施設の環境によって変更可

[準備]

- DS-33 Matrix Standard を使用して G5 dye set を作成。
- “Result Group”を作成
 - “Result Group”> “New”
 - ◇ “General”: 名前(例:xxx-GM)
 - ◇ “Analysis”: “GeneMapper-Generic”または “GeneMapper-3130xl”
 - ◇ “Destination”: 保存先を指定
 - ◇ “Naming”: サンプルの名前の付け方
 - ◇ “Automated Processing”:
- Protocol を作成
 - “Protocol Manager”> “New” > 名前作成
 - ◇ “Run Module”: 泳動条件設定
 - Run Module は使用しているキャピラリー、ポリマーによって異なる通常、Fragment Analysis 50_POP7_1 などのモジュールがデフォルトで入っている。
 - ◇ “Dye Set”: G5 を選択

[泳動]

- 泳動バッファー交換
- サンプルシートの作成
 - “Plate Manager”> “New”
 - ◇ プレートの名前、owner、operator を入力
 - ◇ Application: “GeneMapper-Generic”または “GeneMapper-3130xl”を選択
 - シークエンズと併用する時は “Mixed”
 - “Sample Sheet”
 - ◇ 名前の入力
 - ◇ “Sample Type”: “Sample”を選択
 - ◇ “Analysis Method”: “Microsatellite Default”を選択
 - ◇ “Panel”: “None”を選択
 - ◇ “Size Standard”: “None”を選択
 - ◇ “Results Group”: 作成したグループを選択
 - ◇ “Instrument protocol”: 作成したプロトコールを選択
- サンプルトレーの本体へのセット(PC 画面上のトレーが緑から黄色になる)
- “Run Scheduler”
 - 作成したサンプルシートを選択
 - PC 画面上のプレートにリンク(クリックするだけ)

- “Run”の条件を確認
- スタート(緑の矢印をクリック)

解析【Gene Mapper】※研修では GeneMapper®Software Version 4.0 を使用した
〔普段〕

- “File” > “Add Sample Project”
 - サンプルを選択 > 読み込み
 - “Analysis Method”、“Panel”、“Size Standard”(GS600LIZ)を選択
- “Analysis” > “Analyze” (Project 名を入力)
- サンプルを選択 > “Analysis” > “Size Match Editor” > マーカーを確認
- “Analysis” > “Display Plots” > サンプルの結果を見る
 - ◇ 必要に応じ、“Alleles” > “Editing Mode” > “Binning”
 - Marker、Bin の設定
- 最終的には“Genotype”でデータを校正し、Export

〔最初〕

- “Panel Manager” > “New Kit”
 - ◇ Kit の名前を入力 > OK
- “New Panel”
 - ◇ Panel の名前を入力 > OK
- “New Marker”
 - ◇ Marker の名前を入力 > OK
 - ◇ 蛍光色の指定 (B, G, Y, R)
 - ◇ コメント等の入力
- “GeneMapper Manager” > “Analysis Method”
 - ◇ “New” “microsatellite” > OK
 - ◇ Method の名前を入力 > OK
- “File” > “Add Sample Project”
 - サンプルを選択 > 読み込み
 - “Analysis Method”、“Panel”、“Size Standard”(GS600LIZ)を選択
- “Panel Manager” > “Bins” > “New Bin Set...”
 - Bin set の名前を入力
- “GeneMapper Manager” > “Analysis Method” > Method を選択
 - “Allele” > Bin set を選択

あとは〔普段〕と同じ

【Excel】

- 「GeneMapper」ウインドウの「Genotypes」タブに表示された Export ファイル(テキストファイル)をインポート
- フィルター等によって必要な情報 (Sample ID、マーカー、レポート数)を抽出
 - 実際には SampleID (Sample Name のこと)、Marker (SS1 や SS3 のこと)、Dye (R、G、Y、B のこと)、レポート数 (Allele に表示されている 130-10 の 10 の部分のこと)、サイズ、高さ、解析ファイル名を抽出

【BioNumerics】

- 新規データベース作成 (Access ファイルが作られる。)
- “Experiments” > “Create new character type...”
 - 名前を入力 (例:sonnei MLVA)
- “Character”に GeneMapper のマーカー名を入力
- BioNumerics 終了。
- Access ファイルを開く
 - sonnei-MLVA ファイルが作成されている
 - Key、Character、Value が SampleID、マーカー、レポート数に相当。
 - ◇ 必要に応じて蛍光色素、サイズ、高さ、解析ファイル名のカラムを作成
 - Excel からデータを貼り付ける
- Access 終了

再度 BioNumerics を立ち上げるとデータが入力されているので、これを解析する。

【トラブルとその解決法】

トラブル	推定原因	解決法	備考
GeneMapperウィンドウの「Genotypes」タブのGQ (Genotype quality)の列に赤丸印がついているが、解析不能なのか。	<p>蛍光強度不足。以下の3点が考えられる。</p> <p>① Template DNA濃度が少ない</p> <p>② プライマーミックスの添加量不足</p> <p>③ スタンダードマーカー (GeneScanTM600LIZ)の退色または添加量不足</p>	<p>① PCRのプライマーミックス添加量を2倍にする (25μl系で0.8μl)</p> <p>② スタンダードマーカーの添加量を1ウェルあたり0.25μlに増やしてみる。</p>	<p>赤丸印が表示されても、解析不能という意味ではない。必ず波形を見て、サンプルとスタンダードマーカーのピークから判断する。binの中にピークがあればたいていの場合解析可能。場合によっては再試験を行う。PCRの際のTemplate DNA量を2~10倍に増やすより、プライマーミックスの添加量を2倍にした方が良好な結果が得られた。</p>
設定されたbin以外の場所にピークが見られるが、どう解析して良いかわからない。	① 新規のピーク	① ピークがシャープで蛍光強度が充分であり、かつそのピークを挟んでいる2つのbinとの間隔が6~7塩基である場合は、新たなbinを追加し、新規のピークとして解析する。	100bp程度のPCR産物の場合は、ピークがきれいに出る。200~300bpの場合は少し汚いピークが出る場合もある。この場合はキャピラリーまたはサンプルの問題が考えられる。300bpよりも大きい産物はピークが乱れる可能性がある。
	② 汚いピーク	② スタンダードマーカーも汚い場合は、キャピラリーの問題かサンプルの問題が考えられるため、違うキャピラリーで再泳動するかDNA抽出・PCRを再度行うかする。	
GeneMapperウィンドウの「Genotypes」タブのAllele1とAllele2に数値がある場合、またはどちらかに「？」がある場合、どのように解析して良いかわからない。		Allele1または2のどちらかピークが高い方だけを採用する。ピークの高さが同じくらいであれば、リピート数が多い方を採用する。Accessに持って行くファイルにはAlleleは1つにする必要がある。SizeおよびHeightも同様	左記のような場合は、Accessに持って行くためのExcelファイルを修正する必要がある。各サンプルのAlleleは一列のみとする。Size1, 2およびHeight1, 2も同様で、採用したAlleleに対応するSizeおよびHeightの値を採用しExcelファイルを修正する。
GeneMapperウィンドウの「Genotypes」タブのAllele1とAllele2の両方に「？」がついている場合、どのように解析して良いかわからない。	<p>① 泳動がうまくいっていない。</p> <p>② PCRエラーまたはサンプルが汚い。</p>	<p>① 違うキャピラリーで再泳動してみる。例：1番のキャピラリーでの泳動結果が不良であれば、2番のキャピラリーで泳動する。</p> <p>② ①をしても改善が見られない場合は、再PCRまたは再DNA抽出を行う。</p>	

※上記対応表は、国立感染症研究所・泉谷秀昌先生に指導頂き、福岡県保健環境研究所で作成した。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

保育園で発生した2種類の腸管出血性大腸菌 O157 による集団感染事例

熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部
徳岡英亮 古川真斗 松本一俊 原田誠也

要旨

2010年9月に熊本県南部のA保育園において、EHEC O157:H7(O157)による集団感染事例が発生した。園児、職員、O157陽性者家族及び保存食等184検体の検査を行い、初発患者以外に園児と園児家族及び職員を含む11人からO157を検出した。初発園児のVT型はVT1+VT2であったが、検査を進めるうちに、VT2単独保有O157も検出された。これらの菌株についてIS-printing Systemによるパターン解析を試みたところ、それぞれの株で同じISパターンを示した。このことから今回の集団事例は、2種類のO157によるヒト-ヒト感染事例であることが判明した。

A. 事例の概要

2010年9月28日、医療機関から2歳の男子からO157:H7(VT1+VT2)が検出された旨の届出が管轄保健所にあった。患児は県南のA保育園(園児103名)の園児で、9月22日夕方に腹痛、水様性下痢の症状を呈し、24日に同病院を受診、通院治療を行っていた。

B. 検査方法

1)磁気ビーズ法

糞便をノボピオシン加mEC培地に接種し、37℃で18時間培養後、免疫磁気ビーズ法によりEHEC O157を選択濃縮し、CT-SMAC培地に塗抹後、37℃で18時間培養した。培地上に発育したコロニーについて、コロニースweepを行い、PCR法でVT遺伝子のスクリーニングを行った。

2)分離菌の同定

分離されたコロニーに対して生化学的性状検査、血清学的検査及びPCR法によるVT遺伝子の型別を行った。

3)IS-printing

添付プロトコールに従って実施し、福岡県保健環境研究所作成の解析ソフトを用い

て解析した。

C. 検査結果

園児と陽性であった患児家族、保育園職員及び保育園の保存食の計184検体について検査を実施したところ、初発患者以外に園児8人、職員1人、園児2人の家族がそれぞれ1人ずつの計11人からO157を検出した。O157陽性者11人のうち、園児3人と家族1人に腹痛や下痢の症状があり、残りの7人は全て無症状であった。

分離されたO157の内訳は、①O157:H7(VT1+VT2)が7株、②O157:H7(VT2)が6株分離で、園児E及びFからは両方が分離された(結果表)。分離した13株についてIS-printingを実施したところ、①の7株と②の6株のISパターンがそれぞれ一致した。なお、保育園の保存食からO157の検出を試みたが、不検出であった。

D. 考察

本事例では検査当初、初発患児と同じクラスから6人のO157(VT1+VT2)感染者が発見された。しかし、スクリーニングPCRでO157陽性となった分離平板から複数のコロニーをPCR検査したところ、

O157 (VT1+VT2) 以外に O157 (VT2) も検出された。O157 (VT2) は別クラスの園児や職員からも検出されており、同じ時期に 2 種類の O157 による感染症が起こっていたことが判明した。

また、このことは分離株の IS-printing 解析で O157 の種類ごとに 2 パターンに分類されたことでも証明された。

なお、今回の事例の感染源は不明であり、保存食からは不検出であったため、ヒト-

ヒト感染による感染症として処理された。

保育園における EHEC 集団感染事例や家族間の二次感染事例は数多く報告されているため、二次感染防止の徹底的な指導が必要であると思われる。今回は、同時期に 2 種類 O157 による集団感染という珍しい事例であったが、今後もこのような事例が起こりうることを想定し、慎重に検査を進める必要がある。

表1 A 保育園で発生した O157 感染症の検査結果

	分離株	毒素型	ISコード	症状	備考
患児家族 A	O157:H7	VT1+2	66458483659	有	初発患児家族 弟
園児 B	O157:H7	VT1+2	66458483659		初発患児と同クラス(りす組)
園児 C	O157:H7	VT1+2	66458483659		初発患児と同クラス(りす組)
園児 D	O157:H7	VT1+2	66458483659	有	初発患児と同クラス(りす組)
園児 E	O157:H7	VT1+2	66458483659	有	初発患児と同クラス(りす組)
	O157:H7	VT2	30653010185		
園児 F	O157:H7	VT1+2	66458483659		初発患児と同クラス(りす組)
	O157:H7	VT2	30653010185		
園児 G	O157:H7	VT2	30653010185		初発患児と別クラス(あひる組)
患児家族 H	O157:H7	VT2	30653010185		園児 G の母
園児 I	O157:H7	VT1+2	66458483659	有	初発患児と同クラス(りす組)
園児 J	O157:H7	VT2	30653010185		初発患児と別クラス(ばんび組)
園児 K	O157:H7	VT2	30653010185		保育園職員(1歳児クラス)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業）

「食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究」

研究分担報告書

ノロウイルスゲノムの分子進化

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第2部
研究協力者	下池 貴志	国立感染症研究所	ウイルス第2部
研究協力者	ハンスマン・グラント	国立感染症研究所	ウイルス第2部
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第2部

研究要旨

ノロウイルス(Norovirus; NoV)は、冬季非細菌性胃腸炎や冬季非細菌性集団症中毒の主因ウイルスとして知られている。本研究ではNoVの流行のメカニズムを解析するため、近年流行したNoV株の全塩基配列を決定し、ゲノム全長に渡る塩基配列を蓄積すると共に、得られた情報を分子遺伝学的に解析した。NoVは、非構造蛋白質領域(ORF1)構造蛋白質領域(ORF2/3)とのジャンクション領域でゲノムの組換えを起こすことが知られている。本研究の結果、NoVのORF1にコードされるp22タンパク質には、細胞のタンパク質輸送を阻害する機能があることが示唆された。毎年繰り返されるNoVの流行にORF1領域とORF2/3領域それぞれ別の要因で関係する可能性がある。

A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus; NoV)は直径約38nmの小型球形ウイルスで、冬季非細菌性胃腸炎や冬季非細菌性集団症中毒の主因ウイルスとして知られている。NoVのゲノムはプラス1本鎖のRNAで、3つのORFを持つ。ORF1には非構造蛋白質、ORF2と3には構造タンパク質がコードされている。NoVは、ORF2の塩基配列に基づき5つのgenogroup(GI, GII,

GIII, GIV, GV)に分類され、このうちGI, GII, GIVがヒトに感染する。GI, GIIにはそれぞれ15以上の遺伝的に異なるgenotypeが存在する。ヒト由来のNoVは細胞培養系や実験動物系が確立されていない。そのため、NoVの抗原性は、バキュロウイルスにNoVの構造蛋白質領域を組み込み、昆虫細胞発現系で発現して作製したウイルス様中空粒子(VLPs)を用いて調べられた。その結果、NoVのgenotype

間の抗原性は互いに異なっていることが明らかになった。現在、NoV の genotyping は、ノロウイルスの抗原性に関する情報を蓄積し、抗原検出系の作出や、分子疫学に利用するため、構造蛋白質コード領域の N 末端側約 300 塩基の塩基配列を用いて行われている。しかし、NoV は、ゲノムの ORF1 と ORF2 のジャンクション領域にゲノム組換えのホットスポットがあり、非構造蛋白質領域と構造蛋白質領域では異なる genotype となるゲノム組換え体の存在が明らかにされている。NoV の流行のメカニズムや、病原性、宿主特異性などを調べるためには、ウイルスの複製に関わる酵素群をコードしている ORF1 の塩基配列情報と、遺伝子組み換えを考慮に入れた NoV の分子進化学的解析が必要である。

NoV の genotype の内、約半数の genotype の全塩基配列が決定されていない。本研究では、全塩基配列の決定されていない genotype を中心に、全塩基配列の解析を試み、得られたゲノム全長塩基配列を用いて分子遺伝学的解析を施行した。さらに、ORF1 が NoV の病原性発現機構に関与する可能性を探るため、ORF1 にコードされている p22 タンパク質の機能を解析した。また、ORF23 領域が ORF1 領域と異なる進化メカニズムを持つ可能性があるため、VP1 のプロトウルレーディングドメイン (P domain) の結晶構造解析を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

2006 年 4 月～2007 年 3 月に施行された食品関係事業従事者の検診より、ゲノム全長遺伝子

配列が明らかにされていない NoV GII/12 型感染糞便検体 3 検体、GII/5 型感染糞便検体を 2 検体、GII/14, GII/11, GI/7 型感染糞便検体を各々 1 検体選択し、NoV ゲノム全長塩基配列解析に用いた。無症候者の NoV ゲノム全長塩基配列解析には、2009 年 1 月～2010 年 3 月までの期間において全国 240 施設からの調理従事者糞便の提供を受け、陽性を呈した検体のうち、胃腸炎症状などの症状が無く、NoV-RNA 量が 100 コピー以上であった検体 4 検体 (GI/4, GI/7, GII/2, GII/4) を使用した。

2. 方法

塩基配列の決定

NoV 陽性の糞便サンプルから RNA を定法によって抽出し、ランダムプライマーで cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、NoV GI は GISK シリーズプライマー、NoV GII は GIISK シリーズプライマーを用いて Capsid N/S (ORF2 の N 末端) 領域を RT-PCR で増幅し、塩基配列情報を得た。得られた塩基配列情報は、NoV スタンダード塩基配列 (感染研より配布) と ClustalW を用いてアライメントし、Kimura 2 parameter 法を用いて distance を算出、Neighbor-Joining 法によって genotyping を行った。全塩基配列解析は、NoV GI ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGATGATGGCGTC、NoV GII ゲノム 5' 末端及び、ORF1, 2 ジャンクションに保存されている GTGAATGAAGATGGCGTC を基点に ORF1 領域を増幅し、増幅断片をプライマーウォーキング法で sequence して得た。遺伝子組み換えの疑われた株は、ORF1, ORF2 ジャンクション領域を

含む約 2Kb を全塩基配列情報に基づいて合成した株特異的 sense primer, antisense primer を用いて、増幅し、ジャンクション領域の塩基配列を確認した。

得られた全塩基配列は、DDBJ に登録された NoV の全長塩基配列と ClustalW を用いてアラ イメントし、前述と同様に分子系統解析を行った。遺伝子の組み換えの検出には SimPlot を用いた。

P22 タンパク質の機能解析

Norwalk virus prototype NV68 株の 3A-like protein, p22 領域を哺乳類細胞プロモーターベクターにクローニングし、細胞内で発現させて免疫染色によって発現後の挙動と細胞に対する影響を解析した。

P-domain の X 線構造解析

NoV GII/10, GII/12 の P 領域を大腸菌で発現させ、分離精製した後、結晶化処理によって P の結晶を得た。P-domain に結合することが知られており、NoV のレセプター候補とされている組織血液型抗原 (HBGA) を P-domain とともに共結晶化し、HBGA と P-domain との結合様式を X 線結晶構造解析した。

C. 研究結果および考察

全長塩基配列の決定していない標準株では、昨年度と同様に高頻度に ORF1 と ORF2-3 のジャンクション領域を境に遺伝子型の異なる組換え体(キメラウイルス)になっている事がわかった。ORF2-3 の構造タンパク質領域の genotype クラスタは、GI で 17 以上、GII で 19 以上が報告されているが、ORF1 領域のクラスタ解析を行うと、GI, GII ともにそれよりも数が少ないことが明らかになった。ORF2-3 領域で

は、ことなる genotype に属する株も、ORF1 は、共通のクラスタに属する配列を有するキメラウイルスである株も散見された。ORF1 領域には、6 種類の非構造タンパク質、N-terminal protein, NTPase, 3A-like protein, VPg, protease, RNA dependent RNA polymerase が存在しており、これらがヒト細胞内におけるウイルス増殖、RNA の複製などに密接に関係していると考えられる。3A-like protein (p22) を細胞内で発現させると、核周辺部に p22 の蓄積が認められた。蓄積部分は、ER とシスゴルジの昼間部に存在し、COP によるタンパク質輸送、ゴルジ体の再生機構に著しい影響を与えていることが明らかになった。つまり、p22 の発現は、細胞内で行われているタンパク質の輸送システムに干渉し、タンパク質の逆行性輸送を阻害していることが明らかになった。この研究結果から、これらの非構造タンパク質が宿主細胞に影響を与え、病原性に関与している可能性が示唆された。つまり、ORF1 は、宿主とのより密接なインタラクションが、それらの働きに関与している可能性があり、宿主細胞内で効率よく NoV 複製を行うための選択圧を強く受けている可能性もある。ORF1 と ORF2-3 では、機能的な制約の性質が異なっており、別々の進化様式を取っているのかもしれない。

無症候者の NoV 遺伝子型は、GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 であった。無症候者に特徴的な NoV の genotype は無く、有症者と同様な genotype 分布を示していた。しかし、無症候者の GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 と有症者の GII/2, GII/4, GI/4, GI/7 の塩基配列を比較すると、塩基配列の差が複数見つかった。今後、

ORF1 にコードされている非構造タンパク質の機能と構造などの情報を加味しながら、注意深く有症者と無症候者との塩基配列の差、アミノ酸配列の違いを調べていく必要がある。

構造タンパク質 P-domain の結晶構造解析は、これまでに P1 領域は突起の柱部分、P2 領域は、もっとも外側に露出された部分とする定説を覆し、P1 領域が外側に露出する部分が存在することを明らかにした。また、HBGA との結合様式を解析した結果、全てのタイプの HBGA は、 α 1-2 フコースが P protein dimer の最上部に認められる結合サイトに同じ角度かつ同じ強さで結合することが明らかになった。HBGA の差によって NoV の結合のしやすさに差があり、故に血液型によって NoV の関与性が異なるとする仮説に裏打ちが生じる結果となった。しかし、NoV にとって α 1-2 フコースの結合が重要な役割を演じていると考えられた。 α 1-2 フコースは、ヒト消化管上皮に多量に発現されているムチンに含まれていることから、感染性粒子を消化管上にアンカーするために使用されている可能性がある。

本研究で対象とした株は、その半数以上が遺伝子組換え体（キメラウイルス）であった。NoV の遺伝子組換え体の頻度は GI, GII ともに約 50% に達し、エンテロウイルスやフラビウイルス、トガウイルスなど、その他のプラス一本鎖 RNA ウイルスよりも明らかに高い値であった。この組換え頻度は、インフルエンザ等のセグメント RNA ウィルスに観察される遺伝子セグメントのリアソートメントに匹敵していた。ヒトに感染する NoV は、培養細胞を用いて増速させるこ

とができず、モデル動物も存在しない。そのため、ORF1 と ORF2, 3 が高頻度で組み変わることで、ノロウイルスの増殖や宿主細胞への様な影響を与えており、病原性や、流行とどの様な関係があるかは、不明である。しかし、我々が解析している株は、全てヒトの体内で増殖し、排泄された表現型であることから、多様な選択圧をくぐり抜けた結果であることを考えると、遺伝子組み換えが NoV の増殖に有利に働いている可能性がある。今後、全長塩基配列が決定されていない NoV の genotype の塩基配列解析を継続し、年余にわたってデータを蓄積することが重要である。

D. 結論

NoV の ORF1 は、宿主とのより密接なインタラクションが、それらの働きに関係している可能性があり、宿主細胞内で宿主からの選択圧を強く受けている可能性が示唆された。ORF1 と ORF2-3 では、機能的な制約の性質が異なっており、別々の進化様式を取っていると考えられることから、ORF1, ORF23 は別々に配列の解析を行う必要がある。

無症候者の NoV 遺伝子は、有症者のそれとの比較で、多数の塩基配列の差が見つかった。今後、無症候者との塩基配列の差、アミノ酸配列の違いを調べていく必要がある。

構造タンパク質 P-domain の結晶構造解析により、 α 1-2 フコースが結合に主要な役割を果たしていることが明らかになった。 α 1-2 フコースは、ヒト消化管上皮に多量に発現されているムチンに含まれていることから、感染性粒子を消化管上にアンカーするために使

用されている可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

1. Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. Antiviral Research. [Epub ahead of print]
2. Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. PLoS ONE 5(10) e13130, 2010.
3. Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases Microbiol Immunol. 2011.Feb; 55 (2): 108-114.
4. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. Lett Appl Microbiol. 2011 Feb; 52 (2): 181-184.
5. Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. J. Virol. Methods. 2010 Nov;169(2):269-73.
6. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H.
7. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. Environ Sci Technol. 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
9. (7) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. Microbiol Immunol. 2010 Aug;54(8):483-6.
10. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of

- norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J. Virol.* 2010 Aug;84(16):8085-97.
11. Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J. Med. Virol.* 2010 Jul;82(7):1247-54.
12. Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2461-7
13. Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K., Takeda N, Oka T. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. *J. Med. Virol.* 2010 Apr;82(4):720-6.
14. 岡智一郎, 片山和彦, 小林慎一, 飯高順子, 野田衛 “愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較” 病原体微生物情報 (IASR) Vol. 31 No. 11 (No. 369), 2010 年 11 月号 p13-p14
- 学会発表
1. Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K., Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan 16th Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Phillipines
 2. 岡智一郎, 横山勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆字, 片山和彦. カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
 3. 村上耕介, 岡智一郎, 脇田隆字, 松田幹, 片山和彦. ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
 4. 野田衛, 片山和彦, 石井孝司, 岡智一郎, 多田有希, 山下和予, 三瀬敬治, 地方衛

- 生研究所、中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦. 「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
5. 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛. 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
 6. 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之. サポウイルスに対する単クローン抗体の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 7. 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦. 関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 8. 高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、岡智一郎、片山浩之、片山和彦、杉山和良. マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 9. 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、片山和彦. 「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroupの年次変化」. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 10. 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛. 食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 11. 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦. ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 12. 北島正章、岡智一郎、原本英司、武田直和、片山和彦、片山浩之. 国内の下水および河川水からのGenogroupIVノロウイルスの検出および遺伝子解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
 13. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦. ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島

14. 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、灘野大太、宇理須厚雄、岡智一郎、片山和彦、松田幹「母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索」日本農芸化学会中部支部第159回例会 2010年10月30日 名古屋
15. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic diversity of human noroviruses and sapoviruses in river water, Japan. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
16. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. Structural Insight into Substrate Recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like Protease. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
17. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
18. Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K. Analysis of Mechanism of Human Norovirus Binding to Caco-2 Cells. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
19. Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development Fourth International Conference on Caliciviruses. State-of-the Art October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
20. Hnasman, G.S. Chen, L. Georgeiv, I. McLellan, J.S. Katayama, K. Kwong, P.D. Crystal Structures of a rare Norovirus P-Domain in Complex with Histo-Blood Group Antigens. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
21. Sharp, T.M., GUIX, S., Katayama, K., Crawford, S.E., Estes, M.K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein P22 requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.

G. 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。

ノロウイルスの病原性に関する研究

研究分担者 染谷 雄一（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

研究要旨：ノロウイルス粒子と組織血液型抗原（糖鎖）との相互作用が感染初期に重要であることが示唆されている。しかし、相互作用に関する生化学的、構造生物学的情報は極一部の遺伝子型の株に限られており、ノロウイルス全般に普遍的であるかどうか不明である。本研究では、この相互作用に関する構造情報を得ることを目的に、いくつかの株のウイルス様中空粒子を調製し、結晶化を試みている。

A. 研究目的

ノロウイルスによる嘔吐下痢症は、種々の下痢症ウイルス感染症なかでも高頻度に発生する。現在、ノロウイルスワクチンや抗ノロウイルス薬は存在せず、その開発が待たれている。近年、ノロウイルス粒子と組織血液型抗原（糖鎖）との相互作用が注目され、感染初期に重要であることが示唆されている。非常に多くの遺伝子型を含むノロウイルスは、その遺伝子型により糖鎖結合パターンが異なる。しかしながら、これらの生化学的データを裏付ける構造生物学的データは極一部の株（ノーウォーク株；Genogroup I, genotype 1、および、VA387株；Genogroup II, genotype 4）に限られており、普遍性の理解にはほど遠い。本研究では、ウイルス粒子と糖鎖との相互作用に関する構造情報を得る目的で、いくつかの遺伝子型の株からウイルス様中空粒子（VLP）を調製し、結晶化を試みた。

B. 研究方法

ノロウイルスチバ株（GI/4）、ハワイ株

（GII/1）、ナリタ株（GII/4）、ウエノ株（GII/6）の VP1 タンパク質をコードする遺伝子領域をバキュロウイルストランスファクターに組み込み、Sf9 細胞において組換えバキュロウイルスを調製した後、それらを HighFive 細胞に感染させ、培地中より細胞外へ放出された VLP を回収した。

C. 研究結果と考察

1. 野生型チバ株 VLP の特徴

野生型チバ株 VP1 遺伝子を有する組換えバキュロウイルスから発現し、形成される VLP は大小 2 つの粒子（直径 38 nm と 23 nm）が混在し、タンパク質も大小 2 種の成分（分子量 57 kDa と 50 kDa）から成る。2 種のタンパク質の N 末端はそれぞれ、Ala4、Thr45 残基であった。

2. チバ株 VLP の均一化

均一な粒子径の VLP を得るため、Thr45 近辺に種々の変異を導入し、VLP 調製を行ったところ、Leu43-Ala44-Thr45 を

Ala-Pro-Val に置換した三重変異体から粒子径 38 nm に均一化された VLP を得ることに成功した。

3. チバ株三重変異 VLP の結晶化

組換えバキュロウイルスを感染させた HighFive 細胞培地から超遠心により VLP を沈殿させた後、30 % (w/w) CsCl を含む Grace's Insect Medium に懸濁して 24 時間超遠心し、VLP のバンドを分取した。これを更にショ糖密度勾配に重層して超遠心分離し、精製した。これを結晶化のサンプルとし、結晶化条件の検索、精密化を行っている。

D. 結論

ノロウイルス VLP 並びにその糖鎖複合体の X 線結晶構造解析による三次元理解構造の解明により、糖鎖結合阻害を標的とした阻害薬の創出が可能になるものと期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Y. Someya, and N. Takeda. (2011)

Functional consequences of mutational analysis of norovirus protease. FEBS Lett. 585(2), 369-374.

2. 学会発表

- (1) 染谷雄一、白土東子、脇田隆字「ノロウイルス様中空粒子アセンブリに影響を与えるドメイン間相互作用」第 58 日本ウイルス学会学術集会、徳島 2010 年 11 月 7-9 日
- (2) 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古川

早苗、成松久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、久保田智巳「X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析」第 58 日本ウイルス学会学術集会、徳島 2010 年 11 月 7-9 日

(3) 守口匡子、白土東子、染谷雄一、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜「ファージディスプレイ法による、ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離」第 58 日本ウイルス学会学術集会、徳島 2010 年 11 月 7-9 日

(4) 守口匡子、白土東子、染谷雄一、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜「ファージディスプレイ法による広域遺伝子型反応性ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離」日本薬学会第 131 年会、静岡 2011 年 3 月 29-31 日

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業)

「食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究」

研究分担報告書

サポウイルスの分子疫学的解析手法の確立

研究分担者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

吉澄 志磨、石田 勢津子	北海道立衛生研究所
斎藤 博之	秋田県健康環境センター
植木 洋	宮城県保健環境センター
岡田峰幸	千葉県衛生研究所
森 功次	東京都健康安全研究センター
吉田 徹也	長野県環境保全研究所
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
岩切 章	宮崎県衛生環境研究所 (現宮崎県日向食肉衛生検査所)

研究要旨

高精度なサポウイルス (Sapovirus; SaV)核酸検出系の確立にともない、SaV が急性胃腸炎患者の重要な病原因子であること、SaV の構造タンパク質コード領域の塩基配列が極めて多様であることが明らかになってきた。本研究ではSaVの遺伝子タイピング法確立を目指し、国内で検出されたSaVのうち、従来報告されている SaV 株と遺伝的クラスターが異なると考えられる株を含めた合計21株を選択し、構造タンパク質全長領域の塩基配列の決定を行った。

A. 研究目的

エンベロープウイルスで、ヒトに急性胃腸炎を引き起こす。SaV による集団食中毒事例も報告されて