

同義置換速度/同義置換速度比推定にあたる影響を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

本研究目的を遂行するためには、ウイルスは遺伝子数が少ないため適当でないと考えられたため、ゲノム配列が決定されている脊椎動物 10 種を用いることとした。ヒト、チンパンジー、オランウータン、マカク、マウス、ウシ、オポッサム、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュのゲノムから 3,222 セットの蛋白質をコードするオーソログの塩基配列領域を Ensembl Genes 57 より BioMart を利用して取り出して以下の解析に用いた。

2. 方法 1

蛋白質をコードする塩基配列領域は、アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法と、塩基配列とアミノ酸配列それぞれで多重整列を作成してからそれらの間で共通に多重整列されているコドン座位を抽出するという方法で、コドン配列の多重整列を作成した。そしてそれぞれのコドン配列の多重整列を用いて、ペアワイズで配列間で非同義置換速度/同義置換速度比を推定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 結果 1

アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法によって得られたコドン配列の多重整列を用いて非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定されることが明らかになった。

D. 考察

以上の結果が得られた原因としては、アミノ酸配列の多重整列作成における誤り、3 塩基を単位としない挿入・欠失によるアミノ酸配列と塩基配列それぞれで作成された多重整列の不整合が考えられた。

E. 結論

非同義置換速度/同義置換速度比推定には、アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法は推奨されないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshiyuki Suzuki: Overestimation of nonsynonymous/synonymous rate ratio by reverse-translation of aligned amino acid sequences. *Genes & Genetic Systems*, 2011, 86:123-129.

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究）

分担者研究報告書

分担研究課題：国内で流行するノロウイルスゲノムの包括的解析

分担研究者：本村和嗣（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

研究要旨：本研究では、自然界でのノロウイルスの分子進化機序を明らかにすることを目的とし、直近5年間に全国各地で発生した計395のGroup II (GII) ノロウイルス感染症例について、ウイルスゲノム全長の配列情報を取得し、ゲノム配列の進化系統、ゲノム構造を調べた。解析の結果、(1) 遺伝情報の異なる8種類のGII.4亜株が日本で流行したこと、(2) その中でも特定の株（2006b亜株）が、5シーズンにわたって、日本国内で大流行したこと（260/335:77.6%）がわかった。(3) 昨年、流行したGII.2について、計23のウイルスゲノム全長の配列情報を取得した。3種の亜株が検出された。そのうち、2種はキメラウイルスでORF1がGII.15もしくはGII.15様であり、ORF2と3はGII.2であった。(4) GII.3については、計34のGII.3感染症例について、ウイルスゲノム全長の配列情報を取得した。全て、キメラウイルスでORF1がGII.12であり、ORF2と3はGII.3であった。

A. 研究目的

我々は、科学的知見に基づくヒトノロウイルスの感染症対策に役立てるために、全国の衛生研究所と国立感染症研究所（ウイルス第二部と病原体ゲノム解析研究センター）が協力して「Norovirus Surveillance Group of Japan」を立ち上げ、2006年より国内で流行したヒトノロウイルスの全ゲノム情報の収集と解析を実施している。解析情報には、流行株の性質を規定する全ゲノムの配列情報に加えて、流行株の遺伝的特徴、蛋白質の構造と機能の特徴、自然界での経時変化の特徴などが含まれる。昨シーズンは、例年に比べ、GII.4以外にGII.2, GII.3が流行していた。今年度は、新たにGII.2, GII.3も加え、日本で流行するヒトノロウイルス全長ゲノムを包括的に解析し、流行株の(1) 種類、分布、動態、(2) 特異的変異、(3) 構造の特徴、(4) 発生機構を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2006年05月15日から2011年03月10日の間に、20の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてノロウイルス感染症と確定した469症例を対象とした。糞便中のノロウイルスゲノムRNAを抽出した。糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルスRNAを抽出した後、G2SKFとOligo dT₃₀SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、4種のGII/4特異的プライマーを用いて相互に重複するNoVゲノムcDNA断片2種（約5.3kb, 2.5kb）をPCR増幅した。ABI3730 (Applied Biosystems) を用い、direct sequence法により、塩基配列を調べた。395の糞便試料について、ヒトノロウイルス全長ゲノム（約7.5 kbps）の塩基配列を得た。ゲノム配列の進化系統を近隣接合法、最尤法により推定した。

（倫理面からの配慮について）

なし

C. 研究結果

我々は、現在、2006年から2011年までの5年間に日本で流行したノロウイルス流行株のゲノム全長の解析を行っている。これまでに国立感染症研究所ウイルス二部と全国各地の衛生研究所の協力を得て、計395株の全ゲノム情報（約 30×10^5 塩基）を取得した。

系統樹解析の結果、(1) 遺伝情報の異なる8種類のGII.4亜株が日本で流行したこと（図1、色付きの楕円で囲んだ株）、(2) その中でも特定の株（2006b亜株）が、5シーズンにわたって、日本国内で優勢な流行株であったこと（260/335:77.6%）がわかった。(3) GII.4に関して、2010/2011秋冬期に新規の亜株は出現していなかった。GII.4 2009a 変異亜株（NewOrleans_U.S._2008）が昨シーズンに引き続き検出された。(4) GII.2について、3種の亜株が検出された。そのうち、2種はキメラウイルスでORF1がGII.15もしくはGII.15様であり、ORF2と3はGII.2であった。カプシド蛋白質には、過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が生じていた。(5) GII.3については、キメラウイルスでORF1がGII.12であり、ORF2と3はGII.3であった。カプシド蛋白質P2領域には、過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が生じていた。

D. 考察

2006/07年に日本を含め世界で大流行した2006b亜株は、2007/8年秋冬期以降も、主要な国内流行株であった。5年間全体の80.7%（260/335）を占めていた。一方で、2006bの占有率は年々減少している。減少している理由には、2006b亜株は、過去5シーズンにわたり、ヒト集団内で大流行しているため、ヒト集団免疫の強化に因る可能性が考えられる。今後、ヒト集団の免疫淘汰圧から逃避できた、遺伝子型や新亜株の流行、それに伴い遺伝子亜型の置換がおこる可能性があるかもしれない。我々は、自然界ではキメラウイルスが頻繁に発生してい

ることを報告した。昨年、流行したGII.2、GII.3はキメラウイルスであった。以前、報告した通り、ゲノム組換え点は、全て、複製蛋白質と構造蛋白質の境界領域に存在することが明らかとなった。これにより、複製蛋白質とカプシドの遺伝情報が効率的に交換され、新たな性質（免疫逃避能と増殖能）を獲得した変異ウイルスが発生し、その中で免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが、ヒト集団内で広がったと推察している。

E. 結論

2011/2012秋冬期に、ヒトノロウイルスの流行規模が縮小している。現在、流行しているGII.4の中に、新規亜株が存在しているのか、また、2006b亜株の占有率の変動について興味がある。また、昨年、出現していたGII.2やGII.3の今シーズンの挙動について興味を持っている。最終年度は、過去6シーズンの総括をし、流行発生のメカニズムについて理解を深めたい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中智之先生（堺市衛生研究所）、野田衛先生（国立医薬品食品衛生研究所）、吉澄志磨先生（北海道立衛生研究所）、三上稔之先生（青森県環境保健センター）、斉藤博之先生（秋田県健康環境センター）、蛇口哲夫先生（岩手県環境保健研究センター）、植木洋先生（宮城県保健環境センター）、田村務先生（新潟県保健環境科学研究所）、滝澤剛則先生（富山県衛生研究所）、篠崎邦子先生（千葉県衛生研究所）、吉田徹也先生（長野県環境保全研究所）、小林慎一先生（愛知県衛生研究所）、東方美保先生（福井県衛生環境研究センター）、内野清子先生（堺市衛生研究所）、入谷展弘先生（大阪市立環境科学研究所）、福田伸治先生（広島県立総合技術研究所保健環境センター）、飯塚節子

先生（島根県保健環境科学研究所）、山下育孝先生（愛媛県立衛生環境研究所）、船津丸貞幸先生（佐賀県衛生薬業センター）、岩切章先生（宮崎県衛生環境研究所）

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Ivo N. SahBandar, Kiyomi Takahashi, **Kazushi Motomura**, Zubairi Djoerban, Iman Firmansyah, Katsuhiko Kitamura, Hironori Sato, Herdiman T. Pohan, Shigehiro Sato “The Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis” AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Jan;27(1):97-102

2). **本村和嗣** “ノロウイルスの生き残り戦略” Medico Vol. 42 No.2 p. 32-35: 2011年2月号, 協和企画

3). **本村和嗣** “ノロウイルス感染症” 臨床とウイルス Vol 39 p.115-p.122: 2011年7月

4). 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐 紅、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金 南希□、菅原裕美、佐藤 彩、今井正樹、小田切孝人、田代真人、**本村和嗣**、横山 勝 柊元 巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之 “2010/11シーズンのインフルエンザ分離株の解析” 病原微生物検出情報月報 Vol. 32 p. 317-323: 2011年 11月号

2. 学会発表

1). 岡智一郎、横山勝、**本村和嗣**、村上耕介、脇田隆宇、佐藤裕徳、片山和彦 “ Role of conserved amino acid residues in the protease among different genera of Caliciviruses” 第131回日本薬学会 2011年3月28-31日 静岡

2). **本村和嗣**、横山勝、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、佐藤裕徳

“ゲノミクスと計算科学の手法によるノロウイルスGII/4 進化様式の解析 “ 第85回日本感染症学会総会 ワークショップ 2011年4月21-22日 東京

3). **Motomura, K.**, Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. “ Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature” 15th International Union of Microbiological Sciences, Virology Division 2011 Sep. 12th-16th Sapporo

4). **本村和嗣** “2006-2011年シーズンに国内で流行したノロウイルスの全長ゲノム解析” 平成 23年度 地方衛生研究所全国協議会近畿支部 ウィルス部会研究会 教育講演 2011年9月30日 奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

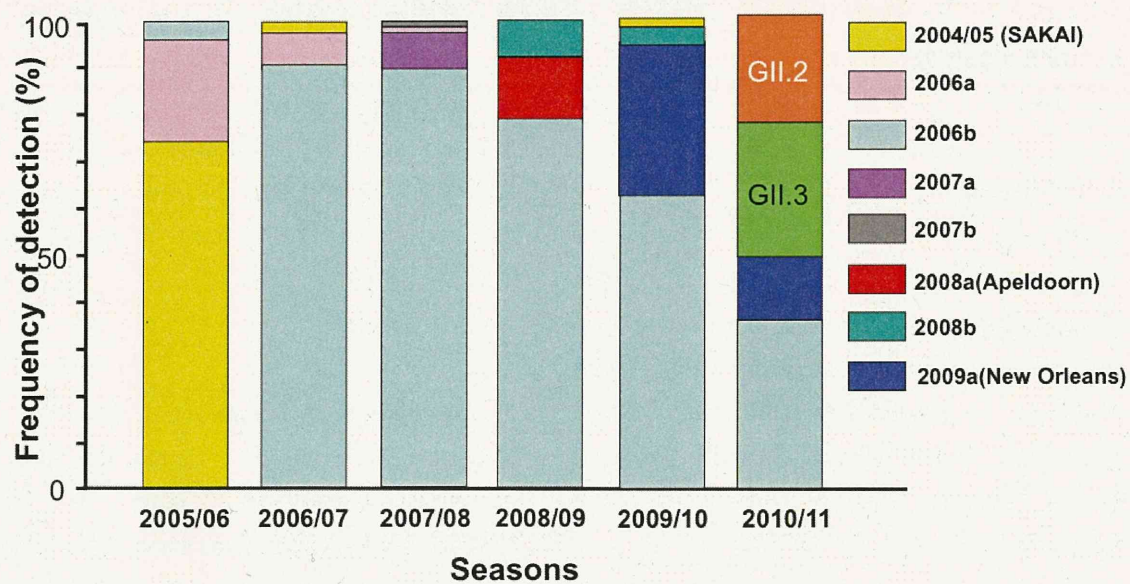
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

日本におけるGII.4亜株の年次推移



平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究分担報告書

サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位の推定

研究分担者 横山 勝

国立感染症研究所

病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

下痢症ウイルス分子の抗原部位や高度に保存される機能部位の情報は、ウイルス検出系開発の基盤となる。本研究では、構造情報および配列情報をもとに、ノロウイルスやサポウイルスの主要抗原となるカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を推定する新しい手法の開発を行う。本年度は、サポウイルスカプシド蛋白質について、1D-3D プロファイル法による解析を行った。その結果、サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位として、4 つが明らかになった。それらは、カプシド蛋白質の最上部表面や、隣接するカプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスやサポウイルスのカプシド蛋白質は感染受容体と相互作用すると考えられるので、カプシド蛋白質は感染受容体との相互作用を保つために、アミノ酸変異は抑制されるはずである。しかしその一方、カプシド蛋白質は免疫のプレッシャーを受けるため、抗原変異が必要である。したがって、カプシド蛋白質のアミノ酸変異には規則性があると考えられる。

下痢症ウイルス分子の抗原部位や高度に保存される機能部位の情報は、ウイルス検出系開発の基盤となる。本研究では、構造情報および配列情報をもとに、ノロウイルスやサポウイルスの主要抗原となるカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を推定す

る新しい手法の開発を行う。

本年度は、サポウイルスカプシド蛋白質について、1D-3D プロファイル法による解析を行い、多様性解析の結果と比較することで、サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位を推定した。

B. 研究方法

1. アミノ酸配列

1D プロファイルや多様性解析には、サポウイルスカプシド蛋白質のアミノ酸配列(N=107)を用いた。

2. 立体構造

3D プロファイルに用いるサポウイルスカプシド蛋白質の立体構造は、統合計算化学システム MOE (CCG 社, カナダ) を用いて、ホモロジーモデリング法により構

築した。ターゲット配列にはサポウイルス Mc10 株カプシドのアミノ酸配列を、鋳型にはネコカリシウイルスカプシド蛋白質 (PDB code: 3M8L) を用いた。サポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデルは、ホモロジーモデリング法により得られたサポウイルスカプシド蛋白質分子モデルを、鋳型の二量体の位置情報をもとに配置することにより構築した。

3. 1D-3D プロファイル解析

サポウイルスカプシド蛋白質のアミノ酸配列を用いて、PSSM (Position-specific scoring matrix) を求めた。これを 1D プロファイルとした。一方、サポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデルから算出した、それぞれの座位におけるアミノ酸の生起確率から PSSM を求めた。これを 3D プロファイルとした。1D プロファイルと 3D プロファイルの共分散を求め、サポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデルに表示した。

4. 多様性解析

Shannon の情報エントロピーを指標として、カプシド全長のアミノ酸残基の多様性を解析した。得られたエントロピーをサポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデルに表示した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. サポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデル

ホモロジーモデリング法により構築したサポウイルスカプシド蛋白質二量体分子モデルは、S ドメイン、P1 ドメイン、およ

び P2 ドメインからなる。S ドメインと P1 ドメインは長いリンカーのより結ばれている。P2 ドメインの大部分はループ構造であった。

2. 1D-3D プロファイル解析

ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、1D プロファイルと 3D プロファイルの共分散を表示した。(図 1) 共分散の大きさは、赤と青のグラデーションで表現している。より赤ければ共分散はより大きく、より青ければ共分散はより小さい。シアンは挿入欠失変異部位を示す。大きい共分散を示す部位は、カプシド全体に存在している。比較的小さい共分散を示す部位は、D365、F383、I428、S470 の周辺のアミノ酸座位に見られた。D365、F383、I428 はカプシド蛋白質の最上部表面に位置し、S470 は隣接するカプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する。

3. 多様性解析

ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、エントロピーを表示した。(図 2) エントロピーの大きさは、黄緑と青のグラデーションで表現している。より黄緑であればエントロピーはより大きく、より青ければエントロピーはより小さい。P2 ドメインに大きいエントロピーを示す部位が集中している。P1 ドメイン、S ドメインとウイルス内部側になるにしたがい大きいエントロピーを示す部位は減少する。D365 や I428 周辺の部位は、カプシド蛋白質の最上部表面に位置しているが、エントロピーは小さい。カプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する S470 周辺の部位もエントロ

ピーは小さい。

D. 考察

1D-3D プロファイル解析において、1D プロファイルは、実際に観測されたアミノ酸配列をもとに得られた、ある座位におけるあるアミノ酸の生起確率から計算された PSSM であるので、測定値であると考えられる。一方、3D プロファイルはカプシド蛋白質二量体構造より計算された、ある座位におけるあるアミノ酸の生起確率から得られた PSSM であるので、理論値であると考えられる。ゆえに、1D-3D プロファイル解析とは測定値と理論値を比較することで、アミノ酸の生起確率が構造的な制約のみで決定されているかどうかを判断する解析法である。したがって、共分散が大きいアミノ酸座位、すなわち測定値と理論値の間に相関が見られるアミノ酸座位は、アミノ酸の生起確率が構造的な制約でのみで決まることを意味し、共分散が小さいアミノ酸座位、すなわち測定値と理論値の間に相関が見られないアミノ酸座位は、アミノ酸の生起確率が構造的な制約以外の要因、たとえば抗原部位や機能部位であることで決まることを意味する。

1D-3D プロファイル解析の結果、比較的小さい共分散を示す部位が、D365、F383、I428、S470 の周辺のアミノ酸座位に見られた。これらの部位が抗原部位や機能部位である可能性が考えられる。これらの部位のうち、F383 周辺は多様性解析の結果、大きいエントロピーを示していた。このことは F383 周辺が、アミノ酸変異する規則性は、構造的な制約ではないことを示唆している。ゆえに、F383 周辺は抗原部位であると推定される。

D365、I428、S470 周辺部位は多様性解析の結果、小さいエントロピーであり、アミノ酸がより保存されていた。これは D365、I428、S470 周辺はアミノ酸が保存されることが機能的に重要であることを示唆していると考えられる。ゆえに、D365、I428、S470 周辺は機能部位であると推定される。ここで、D365、I428、S470 周辺の位置を見てみると、D365 と I428 周辺はカプシド蛋白質の最上部表面であることから、感染受容体などとの結合に関与する部位であるかもしれない。S470 周辺はカプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置することから、S470 周辺は二量体-二量体結合に関与する部位であると思われる。

E. 結論

本研究により以下の結果が得られた。

(1) エントロピーが小さく、共分散が小さい部位が見出された。これらの部位は機能部位であると推定される。(2) エントロピーが大きく、共分散が小さい部位が見出された。これらの部位は抗原部位と推定される。以上より、1D-3D プロファイル法により、サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takanashi S, Chen N, Shen Q, Jung K, Zhang Z, Yokoyama M, Lindesmith L, Wang Q, Saif LJ Characterization of the emerging GII.g/GII.12 norovirus from a gastroenteritis outbreak in US in 2010. J. Clin. Microbiol., 49:3234-3244, 2011.

2. 学会発表

(1) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Kanda T, Sato H. STRUCTURAL FEATURES FOR THE SUBSTRATE RECOGNITION BY SAPOVIRUS 3C-LIKE PROTEASE. XV International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Hokkaido, Japan, 9/11-16, 2011.

(2) Motomura K, Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H.

STRUCTURAL DYNAMICS OF NOROVIRUS GII.4 GENOME IN NATURE.

XV International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Hokkaido, Japan, 9/11-16, 2011.

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

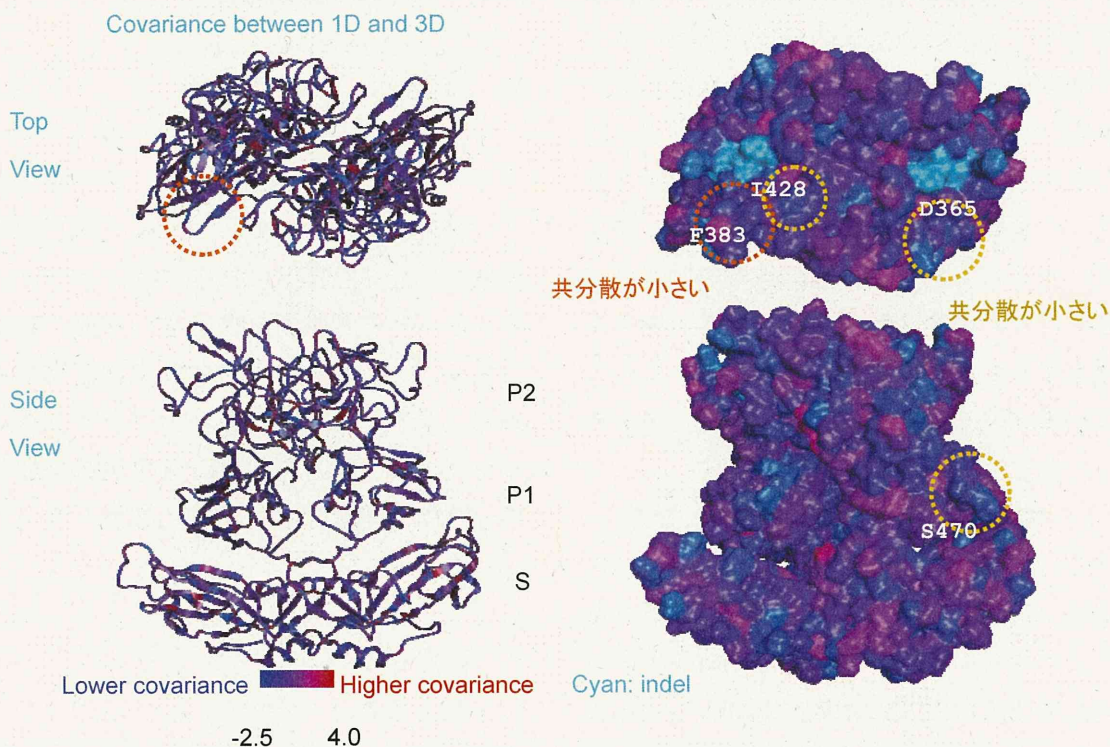


図1. サポウイルスカプシド蛋白質の1D-3D プロファイル解析。ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、1Dプロファイルと3Dプロファイルの共分散を表示した。

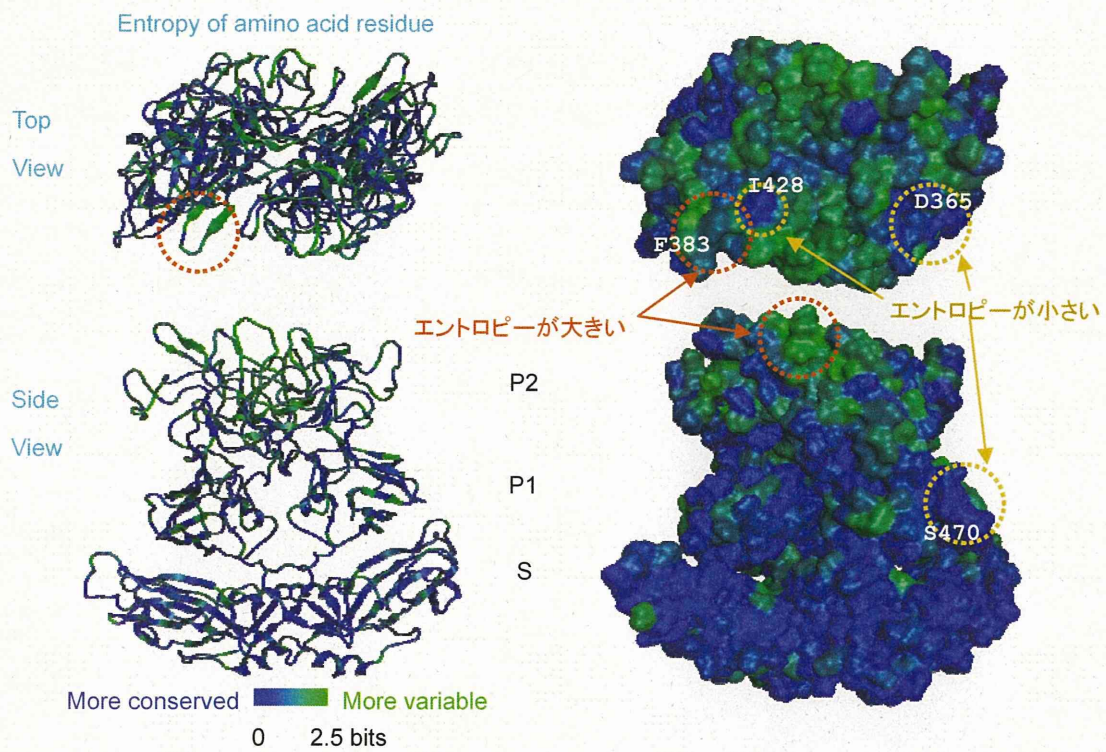


図2. サポウイルスカプシド蛋白質の多様性解析。ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、エントロピーを表示した。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究分担報告書

ノロウイルス中空粒子および抗血清の作製、 ウイルス定量システム法の開発

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	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

研究要旨

ヒトに感染するノロウイルスは、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。本研究では、免疫沈降に用いる抗ノロウイルス抗体、それを作製する抗原として、ウイルス様中空粒子を供給すること、さらに、ノロウイルス検出システムの開発と、それに用いる標準物質の開発を行う。本年度は、ノロウイルスの遺伝子組み換え解析に対応した標準プラスミド DNA の開発と、新たな検出システムを構築に着手し、ノロウイルスの新規分子疫学的解析手法の確立を行った。

A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus; NoV) はヒト、ブタ、ウシ、マウスに感染する。ヒトノロウイルス (hNoV) は、冬季ウイルス性胃腸炎、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとして知られている。NoV は構造蛋白質 (VP1) をコードする領域の塩基配列情報に基づき、5 つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV) に分別されることが知られている。このうち、ヒトに感染するのは、GI、GII、GIV である。GIII はウシ、GV はマウスに感染する NoV である。NoV GI, GII は、更に複数の genotype クラスターに分別可能であり、2010 年現在、GI には genotype が 17 以上、GII には genotype が 19 以上存在することが報告されている。

hNoV のゲノムには 3 つの ORF が存在する。ORF1 には、非構造タンパク質がコードされており、ウイルスの複製に必要な酵素群を供給する。ORF2, 3 には、構造タンパク質がコードされており、ウイルスの粒

子の構成成分を供給する。hNoV は、ORF1 と ORF2 のジャンクション部分でゲノムの組み替えを高頻度に起こし、ゲノム組み替え体 (キメラウイルス) が出現することが知られている。キメラウイルスの割合は、現在、全長ゲノム塩基配列が明らかにされている GI, GII の genotype の 50% に近いと予想される。キメラウイルスは、ウイルスの病原性や、抗原性を劇的に変化させると考えられており、毎年繰り返される hNoV 流行の原因の一つと考えられる。

現在、ゴールドスタンダードとして世界的に広く使用されている hNoV の genotyping 法は、ORF2 の 5' 末端 300 塩基ほど (キャプシド N/S 領域) を用いており、hNoV の抗原性を反映することができるとされている。しかし、本方法は、ORF1 領域をカバーしておらず、キメラウイルスの解析はできない。キメラウイルスの検出には、少なくとも ORF1-ORF2 ジャンクション領域よりも 500~800nt 上流からキャプシド N/S 領域までの 1000nt 以上の

遺伝子配列解析が必要になる。

本年度は、上記領域を含む全長約 1500nt をクローニングした新しいスタンダードプラスミドを作製するとともに、標的領域を増幅可能な GI, GII それぞれのユニバーサルプライマーをデザインし、新たな検出システム構築を試みた。

B. 研究方法

1. 便検体

埼玉県衛生研究所より、譲渡され、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で保管管理されている NoV 陽性便検体パネルを用いた。本パネルは、譲渡後も国立感染症研究所にて新規 genotype 便検を補充し、現在報告されているほぼすべての genotype を含むパネルとして継続的に維持している。

2. hNoV の全塩基配列解析

Genogroup GI の genotype クラスターのうち、全塩基配列の決定されていないクラスターを選択し、そのクラスターに属する野外流行株の全塩基配列を決定した。また、genogroup GII の genotype クラスターについても、同様に野外株を選択した。合計 18 株のゲノム全長塩基配列を PCR direct sequence, 5' RACE, 3' RACE を用いて決定した。CaliciWeb データベース上に登録された全長塩基配列と、18 株の新規塩基配列を Clustal W を用いてアライメントした。

全長塩基配列は、genome 5' 末端から、ORF1-ORF2 ジャンクション領域まで、ORF2-3' end までの 2 領域（非構造タンパク質領域と構造タンパク質領域）に分けて、再度 Clustal W でアライメントし、Kimura 2 パラメーター法を用いて、genetic distance を算出した。それぞれの領域の分子系統樹を近隣結合法（NJ 法）によって作製した。

3. プライマーデザインと RT-PCR

全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1-ORF2 ジャンクション領域上流約 1 Kb 付近に、新規 sense プライマーを設計した。設計した新規プライマーと、G1SKR または G2SKR を用いて RT-PCR を行い、約 1300~1000 bps の増幅産物を確認した。

2. プライマー

全長塩基配列のアライメントより、genome 5' 末端から約 4100 塩基付近の領域(ORF1-2 ジャンクション領域から約 1 Kb 上流)に認められた高度保存領域にプライマーをデザインした。プライマーは、GI, GII それぞれにデザインした。GI プライマーを今に示した。 NVGIuni4223S20 (5'-AARAATGAYGAYTGGAATGG-3')、 NVGIuni4271S29 (5'-CARGCDGCVCAYGCHAAYARYATGTWTGA-3')、 NVGIuni4274S26 (5'-GCDGCNCAYGCHAAYARYATGTWTGA G-3')、 NVGIuni4442S23 (5'-GGNCCVTTYTGTGABGCYATAAA-3')。 GII プライマーを以下に示した。 NVGIIuni4229S23 (5'-GTDGGNAWGAAYAWRAATGARGA-3')、 NVGIIuni4292S20 (5'-CAYTATGAYGCWGAYTAYTC-3')、 NVGIIuni4295S26 (5'-TATGAYGCWGAYTAYTCNMGNTGGGA-3')、 NVGIIuni4769S19 (5'-CGNGAYCCNGCDGGNTGGT-3')

3. 標準プラスミド

キメラウイルス検出、解析に対応する GI および、GII の標準プラスミドは、ORF1-ORF2 ジャンクション領域よりも 500~800nt 上流からキャプシド N/S 領域までの 1000-1400nt の遺伝子配列を含む必要がある。そこで、GI.1 NV68 prototype Norwalk virus (accretion number; M87661) のゲノム全長塩基配列情報を用い、4265nt - 5796nt を合成して、pdTOPO ベクターに組み込んだ pdTOPO-NoVGI-NV68RdCap と、GII.4 Saga1 (accretion number; AB447456) のゲノム全長塩基配列情報を用い、4167nt - 5621nt を合成して、pdTOPO-NoVGII-SagaRdCap を作製した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。組換え DNA 実験

は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

C. 研究結果、考察

新たな hNoV 18 株の全長塩基配列の解析により、GI. 1-14, GII. 1-10, 12, 15, 16, 18, のゲノム全長のアライメントに初めて成功した。hNoV の GI, GII, GIV をすべてアライメントした場合、プライマーをデザイン可能な塩基配列の高度保存領域を見いだせなかった。GI のみをアライメントすると、genome 5' 末端から約 1000 nt-1200 nt, 4100nt - 4500 nt, 5100 nt - 5400 nt に高度に塩基配列の保存された領域が存在することが明らかになった。GII の場合も、ほぼ同様の位置に高度に塩基配列の保存された領域が存在した。これらの領域は、それぞれ、N-terminal protein - NTPase ジャンクション領域, RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の N-terminal 領域, ORF1-2 ジャンクション領域に対応していた。ORF1-2 ジャンクション領域を除く 2 つの領域は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列が高度に保存され領域であるため、コドン 1, 2 の塩基配列保存性が高く、コドン 3 に多様性が認められた。RdRp に認められる特徴的な YGDD モチーフは、すべての RNA をゲノムに持つウイルスの RdRp に普遍的に存在することが知られている。しかし、驚いたことに、このモチーフよりも上流の領域に高度に塩基配列の保存された領域が初めて発見された。

hNoV のゲノム組み替えを解析するためには、ゲノム組み替えのブレイクポイントである ORF1-2 ジャンクション領域の上流 1000 nt から Capsid N/S 領域 300 nt ほどの約 1000 nt - 1300 nt の塩基配列を決定し、ORF1 領域、Capsid N/S 領域それぞれに分子系統解析を実施するのが望ましい。そこで、RdRp N-terminal 領域から Capsid N/S 領域の約 1300 nt を増幅するために、RdRp N-terminal 領域に sense プライマーを GI, GII それぞれにデザインした。プライマーは、多様性の認められたコドン 3 に混合塩基を組み入れ、20 - 30 nt の長さとし、SKR シリーズとの組み合わせで Semi-nested RT-PCR が実施可能であるように配置した。

逆転写並びに PCR は、transcripter high fidelity

RT (Roche), GXL DNA polymerase (TAKARA) を用いた検討の結果、SKR シリーズとの semi-nested RT-PCR により、GI では、約 1100 nt、GII では、約 1000 nt の増幅産物が得られることが明らかになった。

コントロールとして用いた GI, GII それぞれのコントロールプラスミド、さらにそれらから T7 RNA polymease を用いて、インビトロで合成した合成 RNA スタンダードを用いた検討では、検出感度が $10^{\sim}100$ copies/test tube であり、SK シリーズプライマーセットを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。

本プライマーセットは、SK シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR の代替として使用可能であり、かつ、キメラウイルスの解析、検出にも対応できると考えられた。しかし、本研究結果は、代表的な genotype に対する試験結果であり、GI, GII の混合感染事例、GI の異なる genotype の混合感染事例、GII の異なる genotype の混合感染事例、レアな genotype に対する検討を行う必要がある。また、genogroup IV に対するプライマーは、本クラスターに属する genotype が一種類のみであることから、本研究の対象としていない。従って、本研究で新たに構築した検出システムでは、GIV は検出できない可能性がある。

D. 結論

本研究で、新たに 18 株の NoV 全塩基配列解析に成功した。18 株には、データベースに報告されていない NoV genotype, GI.13, GI.10, GI.19, GII.5, GII.6, GII.11, GII.12, GII.14, GII new genotype HK299, Yuzawa2011 が含まれている。これらの全長配列の解析により、全 GI, GII genotype クラスターの内、約 70% の全長配列が明らかにされた。本研究により、NoV のゲノム組み替えの解析に必要な、ORF1 にコードされる RdRp 領域の YGDD モチーフ上流の塩基配列のアライメントが可能となり、そこから Capsid N/S 領域の RT-PCR による増幅が可能となった。本研究により構築された、キメラウイルス解析に対応したプライマーセット、標準プラスミドを用いた分子疫学は、今後、新たなノロ

ウイルスの分子疫学手法として広く普及することが期待される。

E. 研究発表

英文論文発表のみ

1. Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547. 2010.
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., 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 Res.* vol. 90, 9-16, 2011.
4. Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol.* Vol. 55, 108-14. 2011.
5. Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology.* Vol. 52, 181-4, 2011.
6. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus

protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.

7. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J of Virol.* Vol.86, 284-92, 2012.
8. Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* Vol.61, 35-40, 2012
9. Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., Katayama K., Murata K., Kwong P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* published ahead of print 25 Jan. 2012.

G. 知的所有権の出願・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

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究分担報告書

バキュロウイルスタンパク質発現系を用いた サポウイルス様中空粒子の作成

研究分担者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
	李 天成	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
	片岡 紀代	国立感染症研究所	感染病理部
	北元 憲利	兵庫県立大学	
	田中 智之	堺市衛生研究所	
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	
	石田 勢津子	北海道立衛生研究所	
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所	
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所	
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所	
	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

研究要旨

サポウイルス(Sapovirus; サポウイルス)はノロウイルスと同様、急性胃腸炎を引き起こす。近年、サポウイルスによる大規模な集団食中毒事例も報告されており、ノロウイルスと同様の検出体制の整備が求められている。ヒト由来のサポウイルスはいまだに培養細胞での増殖ができない。サポウイルスの検出は主に核酸検出系が用いられているが、臨床検体からの迅速なサポウイルス抗原検出系の開発や、食品からのサポウイルス濃縮法の開発につながるサポウイルス特異抗体の作製も重要な課題である。我々は、サポウイルスに対する特異抗体の作成とサポウイルスの抗原性評価を目的として、サポウイルス様中空粒子 (virus-like particles: VLPs) の作成に取り組んでいる。今年度は新たに 5 株のサポウイルス VLPs の発現に成功した。サポウイルスの網羅的な抗原パネルの作成は着実に進行している。

A. 研究目的

サポウイルスは小型球形のノンエンベロープウイルスで、ノロウイルスと同様、乳幼児

から高齢者まで年齢を問わず急性胃腸炎を引き起こす。核酸検出系を用いた検討により、サポウイルスのウイルス核酸排泄量は 10^{6-}

¹¹copies/g 糞便と高レベルで、症状回復後も通常1、2週間、最大1か月程度排泄が続く例があるなど、ノロウイルスと同様の特徴を有する。近年開発された高精度なサポウイルス核酸検出系の導入により、サポウイルスによる急性胃腸炎患者が従来考えられていたよりも高頻度であることが明らかになってきた。サポウイルスの主な感染ルートはヒト-ヒト感染と考えられているが、サポウイルス汚染食材が原因と推察される大規模食中毒事例 (IASR Vol. 31 p. 322-323; 2010年11月号、<http://idsc.nih.gov/iasr/31/369/dj3697.html>) や、加熱不十分な貝の喫食によるノロウイルス、サポウイルス混合食中毒事例 (Iizuka et al., *Journal of Medical Virology* 82:1247-1254, 2010) も報告されており、ノロウイルス同様、サポウイルス検出の重要性がクローズアップされている。サポウイルスのゲノムはプラス1本鎖のRNAで構造タンパク質コード領域全長塩基配列を用いた解析により、少なくとも5つの遺伝子群 (genogroup) (GI, GII, GIII, GIV, GV) に、GI, GII はさらに7つの遺伝子型 (genotype) に分類される (Oka et al., *Arch Virol.*, 2011 Nov 11, [Epub ahead of print])。これまでにGI, GII, GIV, GVに属する合計16のgenotypeがヒトから検出されている。ヒト由来のサポウイルスは培養細胞や実験動物での増殖系が確立されていない。そのため、サポウイルスの検出は主に reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、リアルタイム RT-PCR 法が用いられている。

一方で、迅速安価な検出法としてのサポウイルス抗原検出系の開発、さらに、食品からのサポウイルス濃縮法の開発を目指したサポウイルスに対する特異抗体の作製も重要な課

題である。

サポウイルスのウイルス粒子は、1種類の構造タンパク質の180量体であると考えられている。構造タンパク質コード領域を発現させることで、ウイルスゲノムを持たないウイルス様中空粒子 (virus-like particles: VLPs) を作製できる。このVLPsは患者糞便から検出されるサポウイルスと同じ形態を示し、同一の抗原性を示すと考えられている。

研究分担者が所属する研究室ではこれまでに昆虫細胞発現系を用いて9株 (GI.1 Mc114株 [Genbank/DDBJ/EMBL accession no. AY237422]、GI.5 Yokote1株 [AB253740]、GI.6 Nichinan株 [AB455803]、GII.3 Syd53株 [DQ104360]、GII.3 D1711株 [AB522391]、GII.3 20082029株 [AB630068]、GIV Syd3株 [DQ104357]、GIV SW278株 [DQ125333]、GV NK24株 [AY646856])、カイコ発現系 (サナギ破碎液) を用いて1株 (GII.2 Mc10株 [AY237420])、さらに哺乳動物細胞を用いて2株 (GII.2 Mc10株 [AY237420]、GII.3 C12株 [AY603425]) のサポウイルス VLPs の発現に成功している。

このうち6株 (GI.1、GI.5、GII.2、GII.3、GIV、GV) のVLPsをウサギ、もしくはモルモットに免疫して作製したポリクローナル抗体を用いた検討から、異なるgenogroup (GI、GII、GIV、GV) に属するサポウイルス株間では抗原性が異なること (Hansman et al., *Emerging Infectious Diseases*, 13 (10) : 1519-1525, 2007)、さらに同じgenogroup内でも異なるgenotypeに属する株間では抗原性が異なることを明らかにしてきた (Hansman et al., *Journal of Clinical and Microbiology*, 45 (4) : 1347-1349, 2007、Oka et al., *Microbiology and Immunology*, 53 (7) :

417-420, 2009)。

さらに本研究班の北元憲利 兵庫県立大学教授、田中智之 堺市衛生研究所所長らによって、サポウイルス GI.1 Mc114 株、GI.5 Yokotel 株、GII.3 Syd53 株、GIV Syd3 株、GV NK24 株 VLP を免疫抗原としたモノクローナル抗体が複数得られている。昨年度本研究班で作製に成功した 3 株の VLPs (GI.6 Nichinan 株、GII.3 D1711株、GII.3 20082029 株)も新たな免疫抗原、あるいは抗体の反応性評価に使用されており、高精度なサポウイルス抗原検出系構築に向けた有用なツールとなっている。

本年度はさらに緻密なサポウイルス VLP パネル作成を目指し、新たな genotype を含む 8 株のサポウイルス VLPs 発現コンストラクトを作製し、そのうち 5 株について VLPs 発現を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

6 つの衛生研究所との共同研究によって国内の急性胃腸炎事例から検出されたサポウイルスのうち、GI. 2、GI. 3、GI. 7、GII. 3、GII. 4、GII. 7、GIV に属する株を選択した。

2. 方法

○サポウイルス VLPs 発現コンストラクトの作製

サポウイルス GI. 2 Nobeoka 株 [AB455802]、GI. 3 OH08021 株 [AB623037]、GI. 7 D1714 株 [AB522390]、GII. 3 Kushiro 株 [AB455793]、GII. 3 Nayoro 株 [AB455794]、GII. 4 Kumamoto6 株 [AB429084]、GII. 7 20072248 株 [AB630067]、GIV Yakumo 株 [AB455795] の構造タンパク質コード遺伝子の開始コドンから

ゲノム末端までの cDNA 領域に対応する約 2.3 kb を Infusion Cloning kit (Clontech) を用いて、バキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 (Orbigen) のマルチクローニングサイト (Not I および Bam HI 間) にクローニングした。精製した plasmid のシークエンスによって、得られたクローンがデータベース登録配列と一致することを確認した。

○サポウイルス VLPs 発現用組換えバキュロウイルスの作製

8% FCS 添加 Grace medium を用いて培養した Sf9 細胞を 6 ウェルプレートに移し、培地を ExCell-405 (2 mL/ウェル) に置換した後、Lipofectin Reagent (Invitrogen) を用いて上記 plasmid (1-2 μ g) と BaculoGold (BD Bioscience) (0.5 μ g) を co-transfect した。一晩培養後、各ウェルに 8% FCS 添加 Grace medium 2 mL を加え、合計 4 mL/ウェルとし、さらに 7 日間培養した。

この培養上清を別途 8% FCS 添加 Grace medium を用いて T75 フラスコ 3 枚に培養した Sf9 細胞に添加し、さらに 7 日間培養した。この培養上清 (約 35 mL) を VLPs 発現用組換えバキュロウイルスのシード (種) とした。これらの操作をそれぞれ、サポウイルス 8 株 (GI. 2 Nobeoka 株、GI. 3 OH08021 株、GI. 7 D1714 株、GII. 3 Kushiro 株、GII. 3 Nayoro 株、GII. 4 Kumamoto6 株、GII. 7 20072248 株、GIV Yakumo 株発現用) について行った。

調製したシードウイルス液は遮光し、4°C に保存した。一部はマイナス 80°C にマスターストックとして保存した。

○昆虫細胞を用いたサポウイルス VLPs の発現

調製したシードウイルス液を、T75 フラスコ 20 本に培養した Tn5 細胞に 500 μ L ずつ添加し (multiplicity of infection 10 程度に相当)、7 日後に培養上清 (約 300 mL) を回収した。回収した培養上清を 4 $^{\circ}$ C で 10000 xg、60 分間遠心し、細胞破砕物およびバキュロウイルスを沈殿させた。その後、遠心上清を Beckman Coulter 社の Sw32-Ti ローターを用いて、4 $^{\circ}$ C で 32,000 rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブにそれぞれ 300 μ L の ExCell-405 を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。その後、この溶液 (合計約 2 mL) を 4 $^{\circ}$ C で 10000 xg、30 分間遠心し沈殿残渣を除去し、上清を Beckman Coulter 社の TLA55 ローターを用いて 4 $^{\circ}$ C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに各 100 μ L (合計約 200 μ L) の ExCell-405 を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置溶解後、4 $^{\circ}$ C で 10000 xg、5 分間遠心し沈殿残渣を除去した。MilliQ 水 に 2.1 g の塩化セシウムを溶解し、VLP を含む ExCell-405 溶液約 200 μ L を加え、合計約 5 mL とした後、Beckman Coulter 社の Sw55-Ti ローターを用いて 10 $^{\circ}$ C で 35,000rpm、24 時間超遠心を行った。超遠心後、250 μ L \times 20 本の分画を回収した。各分画 10 μ L を 40 μ L の PBS で希釈後、SDS-PAGE を行い、サポウイルス構造タンパク質に相当する約 60 kDa のバンドが存在する分画を確認し、VLPs を含むと考えられる分画を ExCell-405 で約 1.2 mL に希釈後、Beckman Coulter 社の TLA55 ローターを用いて 4 $^{\circ}$ C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに ExCell-405 を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。得られた溶液 (50~150 μ L) を用いて VLP の濃度の確認と、VLPs の電子顕微鏡観察を行った。この操作を 5 株 (GII.3 Kushiro 株、GII.3

Nayoro 株、GII.4 Kumamoto6 株、GII.7 20072248 株、GIV Yakumo株) について行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者が存在せず、倫理面への配慮は不要である。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

C. 研究結果

新たなサポウイルス 8 株について VLPs 発現コンストラクトおよびシード組換えバキュロウイルスを作製した。このうち 5 株 (GII.3 Kushiro 株、GII.3 Nayoro株、GII.4 Kumamoto6 株、GII.7 20072248株、GIV Yakumo株) の VLP の発現を試み、いずれも発現に成功した。電子顕微鏡観察により、これら VLPs はサポウイルスに特徴的な形態を有していた。VLPs の収量は T75 フラスコ 20 枚 (培養上清 約 300 mL) あたり、GII.7 20072248 株が 260 μ g、GII.3 Kushiro 株が 20 μ g、GII.3 Nayoro 株および GII.4 Kumamoto6 株がそれぞれ 15 μ g、GIV Yakumo 株が 30 μ g であった。

D. 考察

昨年度までの検討では GII 株および GIV 株の VLPs 発現効率が GI 株、GV 株と比較して低かったため、今年度さらに複数株の発現を試みたが、検討した GII.3、GII.4 そして GIV 株はいずれの株も発現量が低かった。しかし、GII.7 株は GI 株と同程度の収量が得られたため、GII 株でも株 (あるいは genotype) によっては比較的高い発現量が得られる例があることが初めて明らかとなった。

また、昨年度発現に成功したサポウイルス GI.6 Nichinan 株 の VLPs を免疫抗原として

得られた複数のモノクローナル抗体のうち 4 クローンが、今年度発現に成功した VLPs を含め、検討した 9 つの genotype (GI.1、GI.5、GI.6、GII.2、GII.3、GII.4、GII.7、GIV、GV) に対応する 15 株のサポウイルス VLPs すべてに対して強い反応性を示すことが確認されたことから (本年度の北元憲利分担研究者の報告書を参照)、サポウイルス構造タンパク質中に共通エピトープが存在する可能性が強く示唆された。この結果により、各 genogroup、genotype に対応する特異抗体を作製せずとも高精度のサポウイルス抗原検出系を構築できる可能性がでてきた。

サポウイルスの場合、ノロウイルスと比較して VLPs の収量が少なくとも 1/10 程度低いことから、VLPs の大量発現系の確立という課題は残っているものの、このような継続的な取り組みを通じて、実用的なサポウイルス抗原の迅速検出系の開発、食品からのサポウイルス濃縮法の開発の可能性が見えてきた。

E. 結論

本年度の研究で、新たなサポウイルス GII、GIV 株、合計 5 株について VLP を作製することに成功した。特に GII.4 と GII.7 株に対する VLPs の作出に世界で初めて成功した。

これまでにヒトから検出されている 16 の genotype のうち、9 つ (GI.1、GI.5、GI.6、GII.2、GII.3、GII.4、GII.7、GIV、GV) のサポウイルス VLPs の発現を達成した。

サポウイルスの網羅的抗原パネル作成を目指した取り組みは着実に進行している。

F. 研究発表

論文発表

1) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K.

Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol., 2011 Nov 11, [Epub ahead of print]

2) 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 Res., 2011 Apr;90(1):9-16.

学会発表

1) Katayama K, Oka T, Hansman GS, Murakami K, Wakita T.

Norovirus as gastrointestinal flu.

IUMS 2011、2011 年 9 月、札幌

2) Oka T, Hansman GS, Murakami K, Todaka R, Wakita T, Katayama K, sapovirus study group of Japan.

Human sapovirus classification scheme based on pairwise distance analysis of complete capsid nucleotide sequences.

IUMS 2011、2011 年 9 月、札幌

3) Shimoike T, Takagi H, Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K.

Visualization of murine norovirus replication complex in RAW264.7 cells.

IUMS 2011、2011 年 9 月、札幌

4) Murakami K, Oka T, Todaka R, Wakita T,

Matsuda T, Katayama T.
Microscopic analysis of human
norovirus-like particles bound to Caco-2
cells.

IUMS 2011、2011年9月、札幌

5) Shimoike T, Takagi H, Oka T, Murakami
K, Wakita T, Katayama K.

Sub-localization of Murine Norovirus
proteins and its genome RNA.

American Society for Cell Biology、2011
年12月、Denver

6) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、脇田隆
字、松田幹、片山和彦

分化ヒト腸管由来培養細胞へのノロウイルス
の結合様式の解析

日本分子生物学会第34回年会、2011年12月、
横浜

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