

FIG. 6. 3-D locations of the subtype-specific amino acids in the capsid P domain dimer. Structural models of the capsid P domain dimers of recent NoV subtypes were constructed by homology modeling as described previously (38). The 2007b and 2008b capsid models were not included because their ORF2s were classified as belonging to the same phylogenetic group as ORF2 of 2006b due to putative genome recombination (Fig. 3 and 4), and their capsid proteins had no signature or only a single signature in the P2 domain with 2006b (Fig. 5). Orange arrows and letters indicate locations and types of the unique amino acids in each GII/4 subtype at the time of its first outbreak season. Putative functional sites for virus entry into the cells are highlighted. Blue-dotted ovals, the fucose ring binding sites formed by the P domain dimer (8, 13); cyan chain, an RGD motif (60) on the β 2 sheet of the P domain.

DISCUSSION

In this study, we have examined the possible involvement of genome recombination in the generation of new outbreaks of the NoV GII/4 variants. We first analyzed the evolutionary lineage of the GII/4 variants that were present in Japan during 2006 to 2009 and clarified their temporal and geographical distribution. We showed the following: (i) that at least 7 monophyletic GII/4 subtypes were present in humans during the 3-year period, (ii) that 3 to 4 subtypes were cocirculated in each NoV season, and (iii) that the 2006b subtype had spread and persisted more effectively in human communities than the other GII/4 subtypes during the study period (Fig. 1 and 2). These and other findings on the recent GII/4 subtypes (32, 38, 53, 54) consistently support the notion that the 2006b subtype had some selective advantages over the other GII/4 subtypes, which allowed it to quickly spread throughout human communities at the time of its initial appearance in the early winter of 2006. Our study additionally suggests that the possible advantages of the 2006b subtype remained effective over the subsequent 2 years in Japan. However, we could not obtain evidence for genome mosaicism with the 2006b subtype using the available sequence data set of the NoV genogroups, genotypes, and subtypes reported to date (2, 7, 25, 38, 53, 65, 71). Therefore, it is not clear whether genome recombination played a significant role in the generation of new large-scale outbreaks. Because information on the entire genome sequences of NoV is very limited at present, further genome study of NoVs is necessary to clarify this issue.

We then analyzed the GII/4 subtypes to determine whether they showed genome mosaicisms. We demonstrated clearly and for the first time that intersubtype genome recombination is common in the new NoV GII/4 outbreaks: 4 of the 7 new

GII/4 subtypes (2007a, 2007b, 2008a, and 2008b) were mosaics comprised primarily of sequences of the recently prevalent distinct GII/4 subtypes, and 1 (2004/05) was made up of GII/4 and GII/12 genotypes (Fig. 3 and 4). Because of the genome mosaicism, the number of monophyletic clusters of the new variants in the phylogenetic trees differed depending on the region of the genome studied; the numbers of clusters were 7, 7, 5, and 4 for the near-full-length genome, ORF1, ORF2, and ORF3, respectively. Sequences of 11 randomly selected genome segment clones all exhibited bootscanning-plot profiles identical to those obtained with the direct sequencing data except in one case, suggesting dominance of the specific mosaic genomes in the corresponding stool specimens. Phylogenetic-tree, bootscanning-plot, and informative-site analyses consistently provided the same conclusions in regard to genome mosaicism: these virus genomes encoded capsid proteins whose evolutionary lineages were distinct from those of nonstructural proteins. The good agreement of the results by the two sequencing strategies and by three evolutionary methods strongly suggests that the mosaic genomes made from multiple GII/4 subtypes were indeed constantly arising *in vivo* and became the dominant species in infected individuals in some of the NoV GII/4 outbreaks.

We failed to find evidence for the genome mosaicism of the 2006a and 2006b subtypes by using available NoV sequences. These subtypes are unlikely to be the intergenotype or intergenogroup recombinants, because their ORF1, ORF2, and ORF3 sequences constantly showed the strong monophyly within the GII/4 cluster out of the other genotypes and genogroups at their first (38) and successive outbreaks (Fig. 3A). However, the possibility of intersubtype recombination among as-yet-defined classes of GII/4 subtypes remains undetermined for the 2006a and 2006b subtypes.

Interestingly, the mosaic genomes that caused the new NoV GII/4 outbreaks all had the putative recombination breakpoints with the highest statistical significance in the ORF1/2 boundary region ($P \leq 0.000001$) (Fig. 3B and 4). This breakpoint location is consistent with previous reports on intergenogroup and intergenotype recombination (1, 10, 11, 17, 21, 22, 25, 40, 41, 44–46, 49, 57, 63, 64, 66), suggesting the presence of a common hot spot for generation and survival of recombinant NoVs in nature. To a lesser extent, a putative recombination event around the ORF2/3 boundary was identified in 1 of 7 new variant subgroups (Fig. 4A, 2007a). A recombination event around the ORF2/3 junction has also been reported for GII/4 variants circulating in Cairo, Egypt, between 2006 and 2007 (24). The ORF1/2 boundary region is highly conserved in NoV GII/4, as shown previously by very low scores of Shannon entropy within the reported GII/4 sequences (38). This and our present findings on the presence of the putative parent GII/4 sequences of the mosaic genomes suggest that the ORF1/2 mosaic genomes we identified were generated by homologous recombination, as seen in other single-stranded, positive-sense RNA viruses, including poliovirus (20), foot-and-mouth disease virus (36), brome mosaic virus (9, 39), turnip crinkle virus (70), and tomato ringspot virus (52). If this were the case, the intersubtype recombination at the ORF1/2 boundary region would occur and generate variable recombinant viruses *in vivo* more frequently than the intergenotype and intergenogroup recombination would, because the boundary region and neighboring sequences are more similar within the NoV subtype than within the genotype and genogroup. Our results are consistent with this possibility.

The presence of putative recombination at the ORF1/2 boundary region has a direct impact on the modes of NoV subtype evolution *in vivo*. First, the presence of the breakpoint at this region drives independent evolution of ORF1 and ORF2/3 nucleotide sequences and thus of nonstructural and capsid proteins (Fig. 3), leading to divergent evolution of the NoV GII/4 genome (Fig. 1). Second, the presence of the breakpoint allows concurrent acquisition of new mutation sets that arise independently in ORF1 and ORF2/3 among distinct GII/4 subtypes. However, further study is necessary to clarify whether the genome recombination indeed confers any fitness advantage to the virus within a mixed NoV variant population in nature.

The high levels of sequence homology of the ORF1/2 boundary region (38) also suggest that the region is functionally and/or structurally very important for NoV replication and receives strong selective constraints against diversity for NoV survival in nature. Consistently, this region is indicated to contain an important functional motif that regulates capsid expression from a full-length genome in bovine NoV (37). Thus, the ORF1/2 boundary region may be a multifunctional region critical for both replication and evolution of NoVs.

The relatively high detection frequency of the ORF1/2 mosaic genomes in the new GII/4 subtypes (5 of 7) was rather unexpected, because multiple factors, such as retention of virion stability, viral infectivity, and viral replication capabilities in human cells, should restrict the generation of viable hybrid viruses. The present findings therefore raise the possibility of large-scale coinfections by distinct lineage groups of NoVs and of natural selection for the particular ORF1/2 hy-

brid viruses. The former possibility remains to be clarified but is feasible (57) if one considers the high stability of the NoV virion outside the host, as well as NoV transmission modes, i.e., ingestion of contaminated food and water, direct person-to-person contact, and exposure to contaminated airborne vomitus droplets in a semiclosed community (15).

The latter possibility of natural selection also remains to be clarified. However, it is possible that some of the unique mutations identified in each ORF1/2 hybrid genome at the time of their outbreaks (Fig. 5) may be involved in the survival of the hybrid viruses. In this regard, it is noteworthy that the hybrid viruses had multiple mutations in the N-term, NTPase, 3A-like, Vpg, 3C^{pro}, and 3D^{pol} proteins. These proteins are likely to function primarily in NoV replication in host cells (19). Therefore, acquisition of an appropriate mutation set in ORF1 might confer some advantages in replication of the hybrid viruses in particular hosts. It should also be noted that the 2007b and 2008b subtypes encoded the VP1 and VP2 proteins from 2006b (Fig. 3 and 4). VP1 plays critical roles in binding to the putative infection receptors (8, 60, 61) and antibody neutralization (33, 34). The VP2 protein is also essential for the production of infectious virions in caliciviruses (56). Therefore, acquisition of an appropriate mutation set in ORF2 and ORF3 of 2006b might confer some advantages in infection and/or immune escape of the hybrid viruses at some outbreaks.

Computer-assisted modeling studies provide a structural basis for addressing the potential selective advantages of the capsids of the new GII/4 subtypes. We showed that unique capsid amino acids of the 7 GII/4 subtypes identified in this study were preferentially positioned on the outer surface loops of the protruding P2 domain and were more abundant in the dominant subtypes (Fig. 6). This is also a common characteristic of the past epidemic GII/4 subtypes (32, 38, 53). These findings suggest that physicochemical changes in the capsid surface are a prerequisite for effective virus spread of NoV GII/4 in humans. The specific mutations around the outer surface loops of the protruding P2 domain can modulate the local electrostatic environment and shape of the exposed capsid surface by changing the chemical properties and the size of side chains, respectively. Therefore, acquisition of an adequate set of capsid P2 mutations might be able to decrease antibody affinity without decreasing affinity to the infection receptors of GII/4. This would confer an advantage to the variants that would allow them to spread in human communities in the presence of immunity against precirculated variants. To effectively gain such a set of P2 domain mutations, as well as those of nonstructural proteins, genetic recombination around the ORF1/2 boundary region may be an ideal mechanism. Establishment of a tissue culture system to support effective replication of human NoVs, as well as a reverse genetics system to study the roles of mutations in NoV infection and replication, will be critical to clarify each of these possibilities.

It should be noted that despite the prolonged dominance of the 2006b subtype, the magnitudes of NoV epidemics in Japan have gradually declined since 2007: the total numbers of reported NoV infection cases during October and March of 2007–2008 and 2008–2009 showed more than 2- and 5-fold decreases, respectively, compared with the same period in 2006–2007 under the same surveillance system (Infectious Disease Surveillance Center [<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index>]

.html]). These observations may imply that biological niches within human communities that support replication of the 2006b subtype have gradually been shrinking in Japan since 2007. A possible explanation for this phenomenon is that immunity against the 2006b subtype has been gradually strengthened in human populations due to the persistence of the 2006b infections in Japan. Nevertheless, none of the new GII/4 variant subtypes were able to replace the 2006b epidemic in the 2007/2008 and 2008/2009 seasons. In addition, two of the four new putative recombinants (2007b and 2008b), which appeared in the 2007/2008 and 2008/2009 seasons, gained ORF2/3 of 2006b. These observations may imply that 2006b still had some selective advantages over other GII/4 variant subgroups in the 2008/2009 seasons. Further follow-up study is necessary to address these possibilities.

Our findings on genome mosaicism may have an impact on epidemiological and virological studies of NoVs. For example, mosaicism could influence the validity of NoV classification, which is based on the sequences of parts of the NoV genome. Because hybrid viruses that cause epidemics seem to share a recombination breakpoint around the ORF1/2 boundary region, this junction segment may be useful for monitoring the prevalence of hybrid NoVs in nature. The genome mosaicism could also impact measurement of the mutation rates of NoVs in nature: careful selection of the genome segments that contain no recombination breakpoints would be critical to measure the nucleotide substitution rates. Continual accumulation of information on the complete genome sequences of NoVs in natural and living environments will provide genetic bases for dealing with these issues and illustrate mechanisms by which NoV evolves to generate and sustain new epidemics in human populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Shiino for helpful comments and suggestions.

This work was supported by grants for Research on Food Safety from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan, and for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices from the Japan Health Sciences Foundation.

REFERENCES

- Ambert-Balay, K., F. Bon, F. Le Guyader, P. Pothier, and E. Kohli. 2005. Characterization of new recombinant noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5179–5186.
- Ando, T., J. S. Noel, and R. L. Fankhauser. 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses." *J. Infect. Dis.* **181**(Suppl. 2):S336–S348.
- Baker, D., and A. Sali. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* **294**:93–96.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, T. Mitra, C. Hammer, M. Garfield, and K. Y. Green. 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J. Virol.* **77**:10957–10974.
- Bertolotti-Ciarlet, A., S. E. Crawford, A. M. Hutson, and M. K. Estes. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J. Virol.* **77**:11603–11615.
- Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. Prasad, and M. K. Estes. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* **76**:4044–4055.
- Bok, K., E. J. Abente, M. Realpe-Quintero, T. Mitra, S. V. Sosnovtsev, A. Z. Kapikian, and K. Y. Green. 2009. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J. Virol.* **83**:11890–11901.
- Bu, W., A. Mamedova, M. Tan, M. Xia, X. Jiang, and R. S. Hegde. 2008. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J. Virol.* **82**:5340–5347.
- Bujarski, J. J., and P. Kaesberg. 1986. Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature* **321**:528–531.
- Bull, R. A., G. S. Hansman, L. E. Clancy, M. M. Tanaka, W. D. Rawlinson, and P. A. White. 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1079–1085.
- Bull, R. A., M. M. Tanaka, and P. A. White. 2007. Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* **88**:3347–3359.
- Cannon, J. L., L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, L. Saxe, R. S. Baric, and J. Vinje. 2009. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J. Virol.* **83**:5363–5374.
- Cao, S., Z. Lou, M. Tan, Y. Chen, Y. Liu, Z. Zhang, X. C. Zhang, X. Jiang, X. Li, and Z. Rao. 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J. Virol.* **81**:5949–5957.
- Choi, J. M., A. M. Hutson, M. K. Estes, and B. V. Prasad. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:9175–9180.
- Estes, M. K., B. V. Prasad, and R. L. Atmar. 2006. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:467–474.
- Etherington, G. J., J. Dicks, and I. N. Roberts. 2006. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus. *Virology* **345**:88–95.
- Fukuda, S., Y. Sasaki, S. Takao, and M. Seno. 2008. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J. Med. Virol.* **80**:921–928.
- Glass, P. J., L. J. White, J. M. Ball, I. Leparc-Goffart, M. E. Hardy, and M. K. Estes. 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* **74**:6581–6591.
- Hyde, J. L., S. V. Sosnovtsev, K. Y. Green, C. Wobus, H. W. Virgin, and J. M. Mackenzie. 2009. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J. Virol.* **83**:9709–9719.
- Jarvis, T. C., and K. Kirkegaard. 1992. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.* **11**:3135–3145.
- Jiang, X., C. Espul, W. M. Zhong, H. Cuello, and D. O. Matson. 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch. Virol.* **144**:2377–2387.
- Jin, M., H. P. Xie, Z. J. Duan, N. Liu, Q. Zhang, B. S. Wu, H. Y. Li, W. X. Cheng, S. H. Yang, J. M. Yu, Z. Q. Xu, S. X. Cui, L. Zhu, M. Tan, X. Jiang, and Z. Y. Fang. 2008. Emergence of the GII.4/2006b variant and recombinant noroviruses in China. *J. Med. Virol.* **80**:1997–2004.
- Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1548–1557.
- Kamel, A. H., M. A. Ali, H. G. El-Nady, A. de Rougemont, P. Pothier, and G. Belliot. 2009. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1037–1045.
- Katayama, K., H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, and N. Takeda. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* **299**:225–239.
- Katoh, K., G. Asiminos, and H. Toh. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol. Biol.* **537**:39–64.
- Katpally, U., C. E. Wobus, K. Dryden, H. W. Virgin IV, and T. J. Smith. 2008. Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *J. Virol.* **82**:2079–2088.
- Khamrin, P., S. Takanashi, W. Chan-It, M. Kobayashi, S. Nishimura, N. Katsumata, S. Okitsu, N. Maneekarn, O. Nishio, and H. Ushijima. 2009. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J. Virol. Methods* **157**:219–222.
- Kojima, S., T. Kageyama, S. Fukushi, F. B. Hoshino, M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, and K. Katayama. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* **100**: 107–114.
- Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**:1789–1796.
- Lanave, C., G. Preparata, C. Saccone, and G. Serio. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* **20**:86–93.
- Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, A. D. Lobue, J. L. Cannon, D. P. Zheng, J. Vinje, and R. S. Baric. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* **5**:e31.
- Lochridge, V. P., and M. E. Hardy. 2007. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J. Virol.* **81**:12316–12322.
- Lochridge, V. P., K. L. Jutila, J. W. Graff, and M. E. Hardy. 2005. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J. Gen. Virol.* **86**:2799–2806.
- Martin, D. P., C. Williamson, and D. Posada. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**:260–262.
- McCahon, D., and W. R. Slade. 1981. A sensitive method for the detection and isolation of recombinants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **53**:333–342.
- McCormick, C. J., O. Salim, P. R. Lambden, and I. N. Clarke. 2008. Trans-

- lation termination reinitiation between open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 enables capsid expression in a bovine norovirus without the need for production of viral subgenomic RNA. *J. Virol.* **82**:8917–8921.
38. Motomura, K., T. Oka, M. Yokoyama, H. Nakamura, H. Mori, H. Ode, G. S. Hansman, K. Katayama, T. Kanda, T. Tanaka, N. Takeda, and H. Sato. 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006–2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J. Virol.* **82**:11247–11262.
 39. Nagy, P. D., and J. J. Bujarski. 1996. Homologous RNA recombination in brome mosaic virus: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers. *J. Virol.* **70**:415–426.
 40. Nayak, M. K., G. Balasubramanian, G. C. Sahoo, R. Bhattacharya, J. Vinje, N. Kobayashi, M. C. Sarkar, M. K. Bhattacharya, and T. Krishnan. 2008. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology* **377**:117–123.
 41. Nayak, M. K., D. Chatterjee, S. M. Nataraju, M. Pativada, U. Mitra, M. K. Chatterjee, T. K. Saha, U. Sarkar, and T. Krishnan. 2009. A new variant of norovirus GII.4/2007 and intergenotype recombinant strains of NVGII causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *J. Clin. Virol.* **45**:223–229.
 42. Okada, M., T. Tanaka, M. Oseto, N. Takeda, and K. Shinozaki. 2006. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch. Virol.* **151**:1635–1641.
 43. Ozawa, K., T. Oka, N. Takeda, and G. S. Hansman. 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3996–4005.
 44. Phan, T. G., K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, S. Takashi, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J. Med. Virol.* **79**:1388–1400.
 45. Phan, T. G., T. Kuroiwa, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, T. Nishimura, F. Yagyu, S. Okitsu, W. E. Muller, N. Maneekarn, and H. Ushijima. 2006. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J. Med. Virol.* **78**:971–978.
 46. Phan, T. G., S. Nishimura, K. Sugita, T. Nishimura, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin. Lab.* **53**:567–570.
 47. Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**:287–290.
 48. Ray, S. C. 1999. Simplot for Windows, version 2.5. Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD.
 49. Reuter, G., K. Krisztalovics, H. Vennema, M. Koopmans, and G. Szucs. 2005. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks—emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *J. Med. Virol.* **76**:598–607.
 50. Robertson, D. L., B. H. Hahn, and P. M. Sharp. 1995. Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* **40**:249–259.
 51. Rohayem, J., J. Munch, and A. Rethwilm. 2005. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J. Virol.* **79**:4977–4990.
 52. Rott, M. E., J. H. Tremaine, and D. M. Rochon. 1991. Comparison of the 5' and 3' termini of tomato ringspot virus RNA1 and RNA2: evidence for RNA recombination. *Virology* **185**:468–472.
 53. Siebenga, J. J., H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R. J. Siezen, and M. Koopmans. 2007. Epochal evolution of GGI.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* **81**:9932–9941.
 54. Siebenga, J. J., H. Vennema, D. P. Zheng, J. Vinje, B. E. Lee, X. L. Pang, E. C. Ho, W. Lim, A. Choudekar, S. Broor, T. Halperin, N. B. Rasool, J. Hewitt, G. E. Greening, M. Jin, Z. J. Duan, Y. Lucero, M. O'Ryan, M. Hoehne, E. Schreier, R. M. Ratcliff, P. A. White, N. Iritani, G. Reuter, and M. Koopmans. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* **200**:802–812.
 55. Smith, J. M. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* **34**:126–129.
 56. Sosnovtsev, S. V., G. Belliot, K. O. Chang, O. Onwudiwe, and K. Y. Green. 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.* **79**:4012–4024.
 57. Symes, S. J., I. C. Gunesekere, J. A. Marshall, and P. J. Wright. 2007. Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination. *Arch. Virol.* **152**:1075–1086.
 58. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
 59. Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:11030–11035.
 60. Tan, M., P. Huang, J. Meller, W. Zhong, T. Farkas, and X. Jiang. 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol.* **77**:12562–12571.
 61. Tan, M., M. Xia, Y. Chen, W. Bu, R. S. Hegde, J. Meller, X. Li, and X. Jiang. 2009. Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One* **4**:e5058.
 62. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
 63. Tsugawa, T., K. Numata-Kinoshita, S. Honma, S. Nakata, M. Tatsumi, Y. Sakai, K. Natori, N. Takeda, S. Kobayashi, and H. Tsutsumi. 2006. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J. Clin. Microbiol.* **44**:177–182.
 64. Vidal, R., P. Roessler, V. Solari, J. Vollaire, X. Jiang, D. O. Matson, N. Mamani, V. Prado, and M. L. O'Ryan. 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2271–2275.
 65. Wang, Q. H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk, and L. J. Saif. 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1874–1881.
 66. Waters, A., S. Coughlan, and W. W. Hall. 2007. Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology* **363**:11–14.
 67. Worobey, M., and E. C. Holmes. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt. 10):2535–2543.
 68. Xi, J. N., D. Y. Graham, K. N. Wang, and M. K. Estes. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* **250**:1580–1583.
 69. Yang, R., S. Kusagawa, C. Zhang, X. Xia, K. Ben, and Y. Takebe. 2003. Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. *J. Virol.* **77**:685–695.
 70. Zhang, C. X., P. J. Cascone, and A. E. Simon. 1991. Recombination between satellite and genomic RNAs of turnip crinkle virus. *Virology* **184**:791–794.
 71. Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**:312–323.

ノロウイルス感染症

本村和嗣, 佐藤裕徳 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第二室
田中智之 堺市衛生研究所

1. はじめに

ノロウイルスは、我が国においては、毎年秋冬期に流行する感染性胃腸炎の病原となる¹⁻⁴⁾。本稿では、はじめにノロウイルス感染症の理解に役立つ科学的知見を要約する。次に、我々の全ゲノム解析研究を通じて得られた流行株の分子疫学情報の一部を紹介したい。

2. ノロウイルス感染症と疫学の基礎知識

(A) ノロウイルス感染症の特徴

ノロウイルスは、特に、人の密集する閉鎖空間で集団食中毒を発生させる。ホテル、学校、医療施設、高齢者施設、米国ではクルージング客船内などでの集団発生が報告されており、医療や社会活動に甚大な被害をもたらす。経口摂取後、小腸（空腸、回腸）上皮細胞に感染し、40～48時間潜伏時間を経て発症する⁵⁾。ヒトに対して嘔吐、下痢などの急性胃腸炎症状を起こすが、致死的ではなく、その多くは数日の経過で自然に回復する。糞便中には、7～10日の間継続的に排出されることが報告されている⁵⁾。

(B) 感染経路

ウイルス粒子がヒト体外の環境下で安定なため、ノロウイルスの感染経路は、他の病原体と比べ、多様である。(i) ウイルスに汚染した食品（飲食店、ホテル、旅館等で提供される料理、仕出弁当、給食など）や水（飲料水、氷菓

子、プールの水など）の飲食、(ii) ヒト-ヒトの接触（高齢者施設の介護スタッフ、幼稚園や保育施設の保育士、稀にスポーツ競技など）、(iii) 汚染物表面（トイレのドアノブや水栓）や吐瀉物由来飛沫の接触、(iv) 塵埃感染—ノロウイルスが埃とともに周辺に散乱し、比較的狭い空間あるいは空調設備を介して感染することが報告されている⁶⁻⁹⁾。(v) ノロウイルスの流行がみられた施設の調理従事者の約6.6%に、不顕性感染（感染が成立していながら臨床的症状を示さない）事例が報告されている¹⁰⁾。不顕性感染が一般的な現象であれば、感染者が自覚しないまま食材や日用品を汚染し、ヒトに接触する事態がしばしば生じている危険性がある。急速に感染事例が広がり、人によっては病原性を発現する可能性がある¹⁰⁻¹³⁾。

(C) 自然界での分布状況と自然宿主

河川、下水、下水処理水などの水環境、二枚貝などの水中生物でノロウイルスの遺伝子が検出される^{1,3)}。しかし、ノロウイルスが水中生物で増殖する証拠はない。水環境、水中生物で検出されるウイルス遺伝子は、ヒトが排出し河川に流入したウイルスに由来すると推察されている。また、ヒトで流行するノロウイルスが他の動物でヒト同様に活発に増殖するという明確な証拠はない¹⁴⁾。インフルエンザウイルスと違い、ヒトで流行するノロウイルスにヒト以外の自然宿主が存在するのかは明らかにされていない

Norovirus infection

Kazushi MOTOMURA, Hironori SATO Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases

Tomoyuki TANAKA Sakai City Institute of Public Health

別刷請求先：本村和嗣 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

Tel : 042-561-0771 Fax : 042-567-5632

い。

(D) 我が国の流行発生状況

例年、ヒトノロウイルス感染症は、11月から3月をピークにして全国的に流行している¹⁵⁾。厚生労働省による食中毒統計（2009年食中毒発生状況）によると、ヒトノロウイルスによる食中毒は、*Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* に次いで発生件数が多く、総患者数のうち53.7%に達し、届け出があった食中毒患者数では第1位である¹⁶⁾。2006/7秋冬期に日本を含めた世界の感染性胃腸炎の個別事例と集団発生事例が激増した。我が国でも、感染症発生動向調査や病原微生物検出情報によると感染症例報告数は前年度の4～5倍に達し、10月～2月の間の集団発生事例報告数も過去最悪となった。2007/8秋冬期～2009/10秋冬期の感染症例報告数は、例年通りになっている¹⁵⁾。

3. ノロウイルスの基礎知識

(A) ノロウイルス粒子の特徴と分類

ノロウイルス粒子は、電子顕微鏡下で、直径30～38nmの正二十面体で、32個のコップ状のくぼみのある球形粒子として観察される¹⁷⁾。ウイルスの中では小さい部類に属する。ウイルスは、キャプシド蛋白質（VP1とVP2蛋白質）に覆われており、エンベロープを持たない。このためノロウイルス粒子は物理化学的安定性に優れている。米国で行われたボランティア実験では、ウイルス粒子10～100個の摂取で感染成立することが明らかとなっている¹⁾。この性質が、多様な感染経路を発生させる（(C)感染経路の項参照）。ノロウイルスは、キャプシド遺伝子配列の違いをもとに、Group I～Vの5つのグループに分けられる¹⁸⁾。このうち、GI、GII、GIVがヒトに感染する^{3,19-21)}。GIIIはウシ²²⁾、GVはマウスに感染する²³⁾。

(B) ノロウイルスのゲノムと蛋白質

ノロウイルスのゲノムは、3'末端にポリA配列が付加した約7.5～7.7kbの一本鎖プラスRNAで、3つのopen reading frame(ORF)をコードする²⁴⁾。

ORF1からは6種の蛋白質ができる²⁵⁾。これらは、酵素(RdRpと3CLpro)や非構造蛋白質としてウイルスの細胞での複製に働くと考えら

れている。RdRpはRNAを鋳型としてウイルスゲノムを複製するポリメラーゼ、3CLproはORF1由来前駆体蛋白質を切断して6種の成熟蛋白質をつくるプロテアーゼである。切断されて成熟するORF1由来蛋白質として、3Cpro、3DRdRpの他にN-term、NTPase、3A like、VPgがある。しかしながら、ヒトノロウイルスには細胞や動物を用いた感染・増殖系がないため、ウイルスの感染・増殖におけるこれらの蛋白質の役割を知ることは難しい。

ORF2は、ウイルス粒子の外殻の構成単位となるキャプシド蛋白質VP1(約57kD)をコードする²⁶⁾。Estesらは、1999年に精製したVP1からなるVLPの低温凍結電子顕微鏡像(解像度約22Å)を得ることに成功し、ウイルス粒子の大まかな形状が判明した²⁷⁾。同時に、VP1のX線結晶構造解析にも成功した(解像度約3.4Å)²⁷⁾。両成果の知見を併せることにより、ウイルス粒子の外殻はVP1蛋白質二量体が90対集まって形成されること、VP1はshell領域(S domain)とprotruding領域(P1-1,P1-2,P2)から構築されること、などVLPと構成単位の精密な立体構造が判明した。S domainは、キャプシド蛋白質のウイルス粒子形成に働く。P2 domainは、ウイルス粒子の最外郭に位置しており、中和抗体の標的になりうる。また、感染受容体の候補分子の結合に働くと考えられる。

ORF3は、約25kD前後のVP2蛋白質をコードする²⁸⁾。VP2が発現することで、VP1蛋白質の発現、安定性が增强されるという報告がある²⁹⁾。VP1蛋白質と相互作用部位は特定されている³⁰⁾。しかし、VP2蛋白質の立体構造は明らかになっておらず、その機能は確定していない。

4. ノロウイルスの分子疫学

(A) 流行の原因となるウイルス亜株、周期性、しくみ

ヒトに感染するノロウイルスGI、GII、GIVのうち、特に、GIIは大きな流行の原因となる。GIIは、さらにキャプシド遺伝子配列の違いをもとに、細かく分類される。その中でもGIIの4型(以下GII/4と略記)は、近年の感染性胃腸炎の世界的な流行をおこすウイルスとして注目されている¹⁻⁴⁾。1990年代後半以降、少な

くとも4回(1995/96, 2002/03, 2004/05, 2006/07), 世界で周期的に大流行をきたしている³¹⁾. これらの流行では, 例外なく, 従来の株とキャプシドが異なる新型GII/4亜株が出現していた. このため周期性が生じる要因は, インフルエンザウイルス同様, 抗原変異の蓄積(抗原連続変異)によるもの, とする説が提唱されている. また, ヒト社会に形成されるノロウイルスに対する集団免疫が, ヒトノロウイルスのキャプシドの変化(抗原変異)を促進させると推察されている³¹⁻³³⁾. しかしながら, なぜ, 近年, 特定の遺伝子型—GII/4型—のみが世界的に大流行するのか? については, 依然として謎のまま残されている.

(B) 新型GII/4株の検出

我が国で流行するノロウイルス亜株の実態調査の一環として, 2006年よりノロウイルスのゲノム全長の塩基配列情報を蓄積している. 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 of Japan」を立ち上げ, 全国各地で発生した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. 我々は, 2006年から2009年春の間に日本で流行したノロウイルスGII/4株のゲノム全長の塩基配列(N=199)をもとに, 近接接合法による系統樹解析をおこなった. この解析により, この間, 遺

伝情報の異なる7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), その中でも特定の株(2006b株)が大流行したこと(177/199: 89%)(図1, 水色の楕円で囲んだ株), などがわかった³³⁾.

(C) 新型GII/4株の流行の動態

次に, 同定された7種のGII/4亜株の検出頻度の年次推移を調べた(図2). その結果, 我が国でノロウイルスが大流行した2006/07秋冬期に, 2006b株がそれまでの流行株(2004/05株)と入れ替わって全国規模で大流行し, その後も全国各地の流行の原因となったことがわかった³³⁾. また, 2006b株は, 2005/06秋冬期にも, 限局的ではあるが日本国内で流行を発生させていたこともわかった. さらに系統樹解析から, 2006b株は, 同時期に, ヨーロッパや北米でも大規模な流行の原因となっていたことがわかった. すなわち, 2006~07年にかけて, 2006b株が従来の流行株と入れ代わって世界的流行(パンデミック)を引き起こしたことが判明した^{31, 32)}.

2006b株は, その後2007/08~2008/09秋冬期にも引き続き優勢な変異株として国内に流行した. しかし, 2006/07秋冬期に比べると流行の規模は徐々に縮小している(図2). 2007/08秋冬期に新たなGII/4変異株(2007aと2007b), 2008/09秋冬期にも新たなGII/4変異亜株(2008a

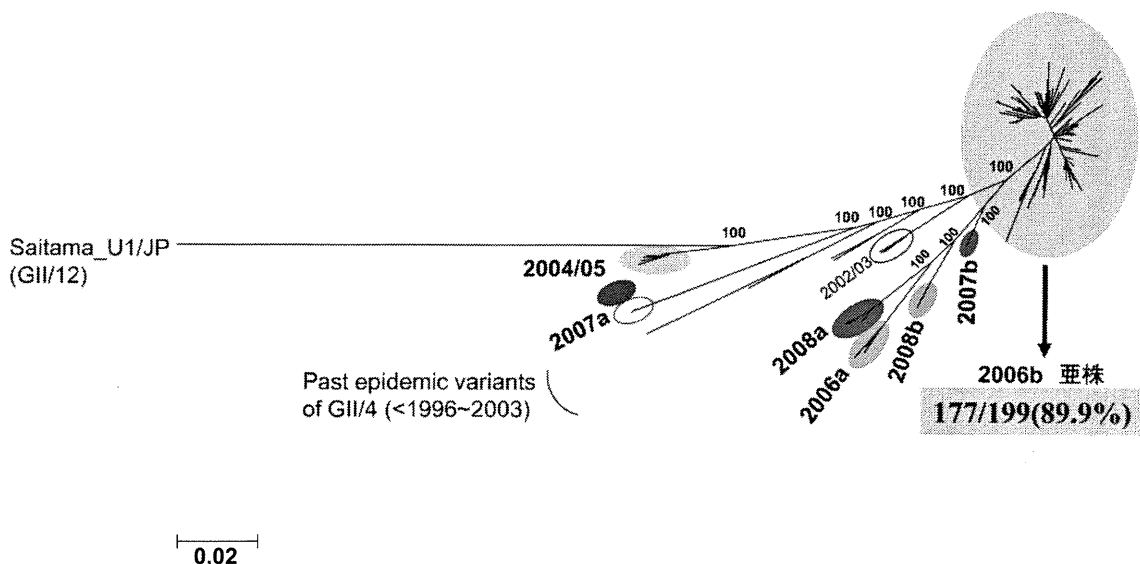


図1 ノロウイルスGII/4株の進化系統樹
2006~2009秋冬期に国内で検出された株(N=199, 色付きの楕円で囲んだ株), および2006年以前に国内外で検出されたノロウイルスGII/4株の全長ゲノム配列を用いて, 近接接合法により作成した.

と2008b) が出現していた。しかしながら、これらの4種はいずれも、局地的かつ一過性の流行に留まった³³⁾。

(D) ゲノム組換えウイルスの流行

我々の検出したGII/4亜株の全ゲノム構造を詳細に調べた。複数の異なる解析アプローチ (bootscanning plots 法, 探索的系統分析法, 情報部位分析法) により, ゲノム組換え点を探索

した。興味深いことに, 2007年以降に出現した4種のGII/4新亜株2007a, 2007b, 2008a, 2008bは, いずれも直近に流行した亜株間のゲノム組換えウイルスであることがわかった (図3)。さらに, これらのウイルスはすべて共通のゲノム組換え点をもっていた³³⁾。すなわち, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bゲノムには, いずれもORF1/ORF2の境界領域に統計学的に有為と判定される推定組換え点が存在した (図3, 矢印, $p < 0.01$)。ORF1/ORF2境界領域は, ウイルスの増殖にとって重要な働きをする (サブゲノム, キャプシドの大量生産) 領域で, 遺伝的に近縁なノロウイルス間で高度に保存されている³⁴⁻³⁹⁾。この高度保存性が, ORF1とORF2間での効率的な相同組換え反応に役立っている可能性が高い。

以上の解析から, ノロウイルスは, 頻繁に直近に流行した別系統のウイルス間で, 複製蛋白質とキャプシドの遺伝情報を入れ替えていることが示唆された。二枚貝等のノロウイルス汚染食材等には, しばしば異なる遺伝子型のノロウ

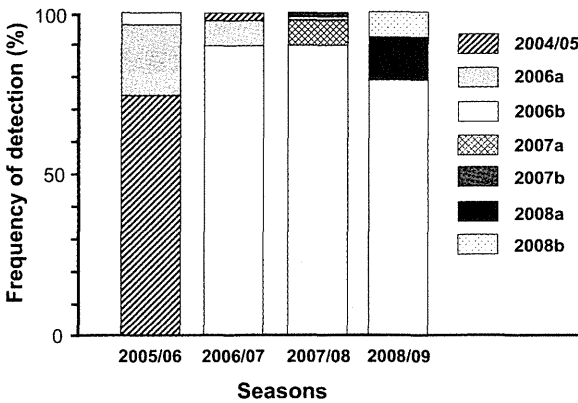


図2 日本におけるGII/4株の検出頻度の年次推移

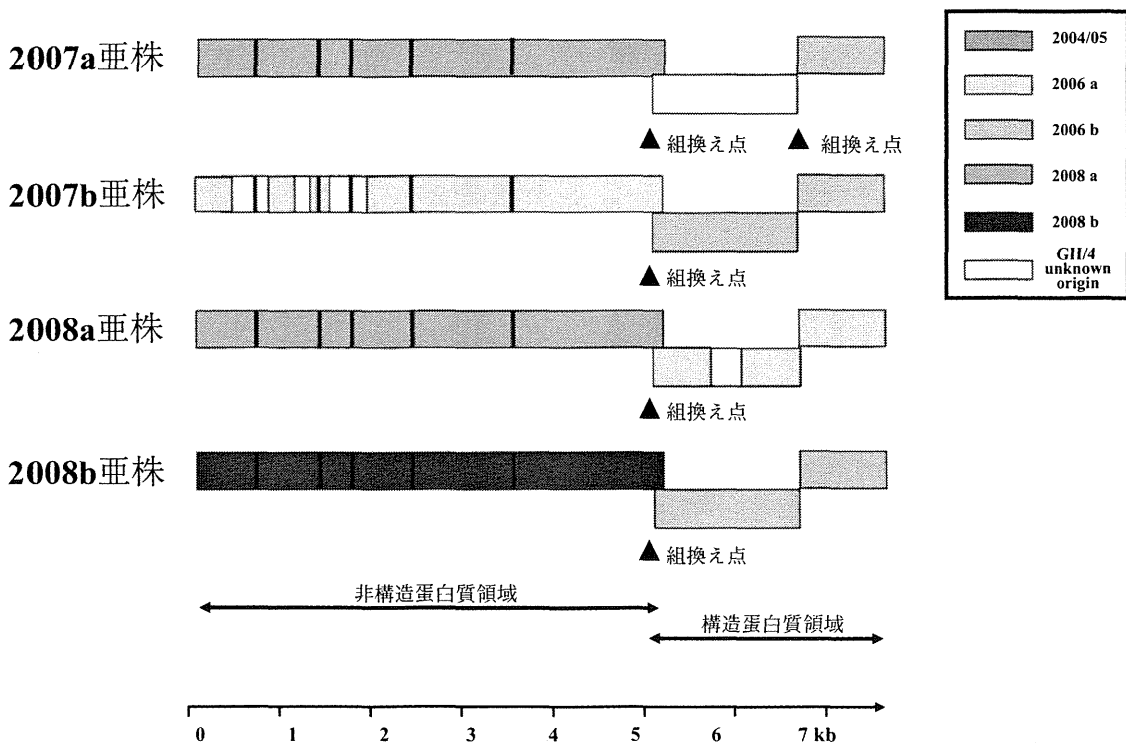


図3 2007年以降に出現した4種のGII/4新亜株のゲノム構造 bootscanning plots 法, 探索的系統分析法, 情報部位分析法により, ゲノム組換え点を探索した。組換え点は, すべての株でORF1/2の境界領域に存在した ($p < 0.01$)。

ウイルスが検出される⁴⁰⁻⁴⁴。したがって、感染に伴い、別系統のノロウイルスの重感染が頻繁におきている可能性がある。重感染は、ゲノムの相同組換えを誘発する。これにより、キャプシドと複製蛋白質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、その中で環境への適応度の非常に高いものが流行を引き起こすと考えている。

(E) G II/4 2006b 亜株に特徴的な変異

我々の解析から、2005年末に国内にマイナーな変異株として出現した2006b株は、1年のうちに、急速に広がり、3年にわたって、日本国内で優勢な株として流行したことがわかった³³。2006b株は、それまで流行していたノロウイルスと比べて、何らかの選択的優位性を獲得したウイルスと考えられる。2006b亜株の8種の蛋白質には、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27ヶ所生じていた³²。これらの変異が優位性の獲得に関与していたと推察される。

興味深いことに、ウイルス粒子を形成するタンパク質の最外郭に位置するキャプシド蛋白質P2ドメイン領域に7ヶ所もの変異が集積していた(図4)。P2ドメインは、粒子の表面に露出しており、抗体の攻撃を容易に受けうる。2006bで見出されてP2ドメインの変異の中には、抗原性を変化させて集団免疫からの逃避能を高めるものが含まれている可能性が高い³²。実際、それらの変異の一つは、マウスノロウイルスでは、中和抗体からの逃避能を高める変異であった⁴⁵。また、P2ドメインは、感染受容体への結合を司る領域である。7ヶ所の変異の中には、感染受容体への結合親和性や特異性を変化させることでウイルスの感染力や細胞指向性を変化させるものもあるかもしれない³²。2006bは、免疫逃避能と感染能をバランスよく変化した変異株と推察される。

5. さいごに

ノロウイルスは物理化学的安定性が高いこと、自然環境や生活環境下に普遍的に存在すること、高い感染力を持つこと、しばしば不顕性感染者がウイルス粒子を排出していること、な

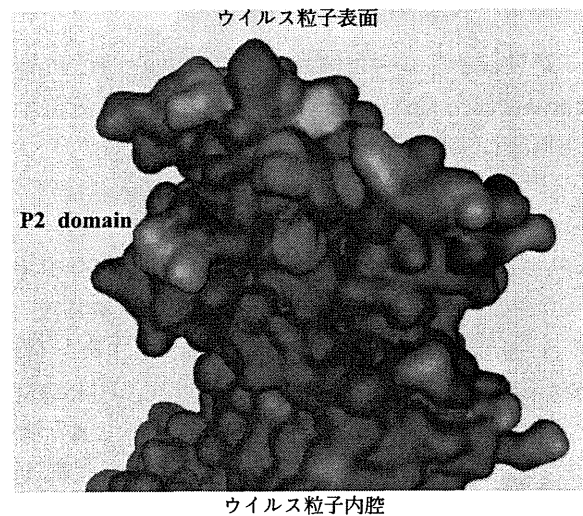


図4 G II/4 2006b株のキャプシド蛋白質の立体構造モデル

キャプシドタンパク質二量体のモデルは、1995～1996年に流行したG II/4株のP domainのX線結晶構造(PDB:2OBS)を鋳型として、Molecular Operating Environment(MOE)の解析ツールを用いてホモロジーモデリング法により構築した。キャプシド蛋白質は二量体が最小単位で、計90の二量体分子が集合してウイルス粒子をつくる。図は、キャプシド蛋白質二量体の3つのドメイン(P1,P2,S)のうち粒子の最外郭に位置するP2を表示した。

2006b亜株に特徴的なアミノ酸残基部位(赤色)

どがわかっている。このことから、ヒトは、幼児の頃から頻繁にノロウイルスに感作されている可能性が高い。また、ヒト社会では、特に直近に流行したノロウイルス変異株に対する集団免疫が形成されている可能性が高い^{46,47}。キャプシドP2領域に多数の変異をもち、抗原性が大きく変化したウイルスが出現すれば、ヒト社会の中で感染が広がり易いと考えられる。

ノロウイルスのゲノム複製装置には、エラーを校正するしくみはない。高い変異率、ゲノム組換え率、感染力、増殖能が組み合わさり、ヒト社会では、日々膨大な数の変異ウイルスが発生していると推察される。それらの大半は、集団免疫で淘汰されるであろう。一方で、宿主側の防御システムが選択圧となって抗原変異株が選択され、広がるのかもしれない。今後は、ゲノム解析や血清疫学的手法などの様々な解析アプローチにより、ノロウイルス流行のしくみについて理解を深め、成果を基に流行を制御する手段を開発していきたい。

謝 辞

糞便試料を供与していただきました Norovirus Surveillance Group of Japan の member である地方衛生研究所の先生方に深謝いたします。

吉澄志磨 (北海道立衛生研究所), 三上稔之 (青森県環境保健センター), 高橋知子, 蛇口哲生 (岩手県環境保健研究センター), 植木 洋 (宮城県保健環境センター), 篠崎邦子 (千葉県衛生研究所), 吉田徹也 (長野県環境保全研究所), 田村 努 (新潟県保健環境科学研究所), 滝澤剛則 (富山県衛生研究所), 東方美保 (福井県衛生環境研究センター), 小林慎一 (愛知県衛生研究所), 入谷展弘 (大阪市立環境科学研究所), 内野清子 (堺市衛生研究所), 福田伸治 (広島県立総合技術研究所保健環境センター), 伊藤文明 (広島市衛生研究所生物科学部), 飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所), 山下育孝 (愛媛県立衛生環境研究所), 船津丸貞幸, 増田久人 (佐賀県衛生薬業センター), 松岡由美子 (熊本市環境総合研究所), 岩切 章 (宮崎県衛生環境研究所)

参考文献

- 1) Estes MK, Prasad BV, Atmar RL : Noroviruses everywhere : has something changed? *Curr Opin Infect Dis* 19(5) : 467-474, 2006
- 2) Glass RI, Parashar UD, Estes MK : Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 361(18) : 1776-1785, 2009
- 3) Hutson AM, Atmar RL, Estes MK : Norovirus disease : changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 12(6) : 279-287, 2004
- 4) Koopmans M : Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 21(5) : 544-552, 2008
- 5) Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK : Norwalk virus infection of volunteers : new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 170(1) : 34-43, 1994
- 6) Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO : Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 124(3) : 481-487, 2000
- 7) Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO : A school outbreak of Norwalk-like virus : evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 131(1) : 727-736, 2003
- 8) Gellert GA, Wateman SH, Ewert D, Oshiro L, Giles MP, Monroe SS, Gorelkin L, Glass RI : An outbreak of acute gastroenteritis caused by a small round structured virus in a geriatric convalescent facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 11(9) : 459-464, 1990
- 9) Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE, Pinsky PF, Chacon D, Walmsley S, Schonberger LB, Phillips A, Forward K, Goldman C, Brunton J, Fraclik RA, Carter AO, Gary Jr WG, Glass RI, Low DE : 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am J Epidemiol* 127(6) : 1261-1271, 1988
- 10) Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS : Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45(12) : 3996-4005, 2007
- 11) Gallimore CI, Cubitt D, Du Plessis N, Gray JJ : Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 42(5) : 2271-2274, 2004
- 12) Garcia C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G : Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 44(8) : 2997-3000, 2006
- 13) Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, Brown DW, Fathima M, Moses PD, Gray JJ, Kang G : Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol* 79(5) : 544-551, 2007
- 14) Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M, Takizawa T : Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. *J Clin Microbiol* 48(4) : 1215-1222, 2010
- 15) 国立感染症研究所感染症情報センター : 病原微生物検出情報 (IASR). ノロウイルス感染症 <http://idsc.nih.gov/jp/disease/norovirus/index.html>

- 16) 厚生労働省 : 病因物質別食中毒発生状況. 食中毒統計資料 (2) 過去の食中毒発生状況
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 17) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thomhill TS, Kalica AR, Chanock RM : Visualization by immune electron microscop. of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10(5) : 1075-1081, 1972
- 18) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS : Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2) : 312-323, 2006
- 19) Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N : Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 87(Pt 4) : 909-919, 2006
- 20) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K : Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 42(7) : 2988-2995, 2004
- 21) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N : Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299(2) : 225-239, 2002
- 22) Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, EI-Attar L, Gallimore C, Brown DWG, Green J, Bridger JC : Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses : a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol* 77(4) : 2789-2798, 2003
- 23) Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt : Murine norovirus : a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80(11) : 5104-5112, 2006
- 24) Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK : Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250(4987) : 1580-1583, 1990
- 25) Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY : In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 77(20) : 10957-10974, 2003
- 26) Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK : Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66(11) : 6527-6532, 1992
- 27) Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK : X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286(5438) : 287-290, 1999
- 28) Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparco-Goffart I, Hardy ME, Estes MK : Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74(14) : 6581-6591, 2000
- 29) Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK : The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1 : a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77(21) : 11603-11615, 2003
- 30) Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK : Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3(ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol* 77(6) : 3569-3577, 2003
- 31) Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, De Bruin E, Van Der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M : Epochal evolution of GG II .4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 81(18) : 9932-9941, 2007
- 32) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, Yoshizumi S, Mikami T, Saito H, Ueki Y, Takizawa T, Uchino K, Noda M, Kondo R, Matsuoka Y, Funatsumaru S, Kobayashi S : Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus G II /4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82(22) :

- 11247-11262, 2008
- 33) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, Yoshizumi S, Mikami T, Saito H, Ueki Y, Takahashi A, Hebiguchi T, Shinozaki K, Yoshida T, Tamura T, Takizawa T, Toho M, Kobayashi S, Uchino K, Iritani N, Iizuka S, Itoh F, Fukuda S, Kondo R, Yamashita Y, Funatsumaru S, Matsuoka Y, Iwakiri A : Divergent Evolution of Norovirus G II/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol* 84(16) : 8085-8097, 2010
- 34) Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK : Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(29) : 10327-10332, 2005
- 35) Herbert TP, Brierley I, Brown TD : Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 77(Pt 1) : 123-127, 1996
- 36) Herbert TP, Brierley I, Brown TD : Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 78(Pt 5) : 1033-1040, 1997
- 37) Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N : Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 151(7) : 1291-1308, 2006
- 38) Meyers G : Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* 278(36) : 34051-34060, 2003
- 39) Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin IV HW : Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* 2(12) : pp. e432, 2004
- 40) Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H : Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol* 51(2) : 177-184, 2007
- 41) Phan TG, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Okitsu S, Ushijima H : Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab* 53(9-12) : 567-570, 2007
- 42) Saitoh M, Kimura H, Kozawa K, Nishio O, Shoji A : Detection and phylogenetic analysis of norovirus in *Corbicula fluminea* in a freshwater river in Japan. *Microbiol Immunol* 51(9) : 815-822, 2007
- 43) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T : Genetic analysis of noroviruses taken from gastroenteritis patients, river water and oysters. *Water Sci Technol* 50(1) : 51-56, 2004
- 44) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T : Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res* 39(18) : 4271-4280, 2005
- 45) Lochridge VP, Hardy ME : A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol* 81(22) : 12316-12322, 2007
- 46) Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinjé J : Herd immunity to G II .4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol* 83(11) : 5363-5374, 2009
- 47) Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS : Mechanisms of G II .4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med* 5(2) : pp.e31, 2008

ノロウイルス 生き残り戦略

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

ノロウイルスとその感染症の特徴

— 本日は、ノロウイルスとその感染症について伺います。ノロウイルスは2000年代に入ってから感染性胃腸炎の原因ウイルスのトップになっています。一番有名なのは2006年から2007年に世界的に大流行がありました。特に冬場の感染症として注意しなければならないものの1つです。

ノロウイルスは、かつてはNorwalk virusとかSRSV (small round structured virus, 小型球形ウイルス)と呼ばれていましたが、2000年頃からノロウイルスという名前が使われています。

まず、ノロウイルスの特徴を教えてください。

本村 電子顕微鏡下で、直径30~38nmで、32個のコップ状のくぼみのある球形粒子として観察されます。ウイルスのなかでは小さい部類に属します。ウイルスは、キャプシド蛋白質に覆われています。物理的に安定性の高いウイルスなので大変感染力が強いです。

— その感染症の特徴はどうでしょうか。

本村 世界的に見て4~5年おきに流行を繰り返すというのが、本感染症の流行の特徴です。国立感染症研究所の疫学情報によると、日本では、ノロウイルスは毎年11月から3月に流行しています。感染力が強いウイルスなので、密封された空間で大流行をきたすことが知られています。社会的、経済的に甚大な被害をもたらす感染症です。

潜伏時間が35~48時間で、症状としては激しい嘔吐と下痢が同時に起こります。そして、だいたい5日間で症状が治まります。

— 子どもの場合でも死亡例は報告されていないですね。

本村 ロタウイルスと異なり、子どもの死亡例はいまのところ報告はありません。報告があるのは、高齢者が嘔吐物をのどに詰まらせて死亡した

という二次的な死亡例です。ノロウイルス感染症そのものによる死亡例はまだ報告はありません。

— 集団感染を起こしてきますが、どのぐらいのウイルス量が感染すると発症するのですか。

本村 以前に米国で行われたボランティア実験では、ウイルス粒子10~100個を経口摂取すると感染が成立すると言われていました。

— そうしますと、発症したときにウイルスを検出しようとしても、そのぐらいのウイルス量だと見つからない場合もありますか。

本村 糞便中1gあたり1,000万個から1億個のウイルス粒子があれば、遺伝子検査、迅速診断キットで検出できます。

— そこまでの量にならないと検出できないのでは、ウイルスが確認できなくて診断がつかないということもあるのですか。

本村 原因がわからないということもあります。学術的報告はございませんが、ウイルス量と症状は相関するのではないかと推測しています。

ノロウイルスによる集団感染の現状

— ノロウイルスによる集団感染の現状はどのようになっていますか。

本村 集団感染事例は食中毒によるものと、最近ではヒトからヒトに感染する場合があります。ウイルス粒子が10~100個、経口的に体内へ入るだけで感染が成立しますので、ヒト-ヒト感染による集団感染拡大もあります。不顕性感染からの拡大は起こりえます。2007年に、日本の研究グループが、ノロウイルスの流行が見られた施設の調理従事者約6.6%に不顕性感染事例が見られたことを報告されています。

— 日本の感染者数はどのような状態になっていますか。

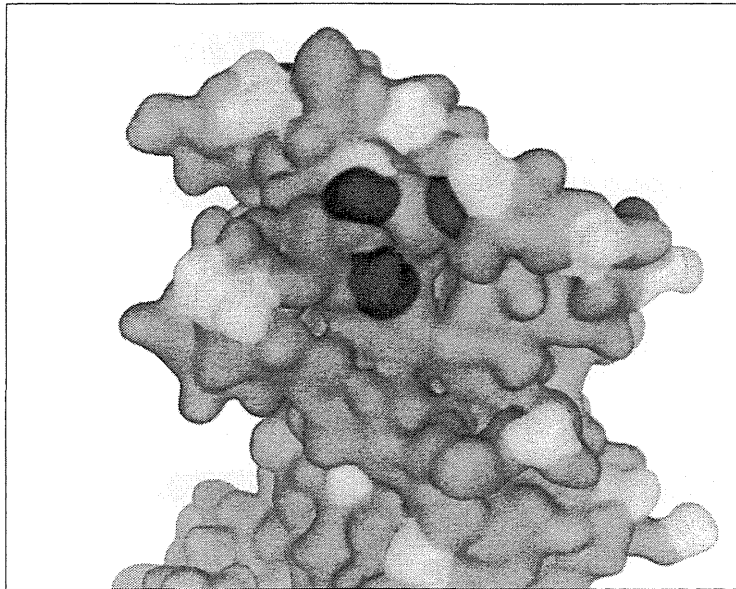


図1
ノロウイルスのキャプシド蛋白質の立体構造
結晶構造をもとに、2006-2007秋冬期に世界的に大流行したGII/4 EU-2006b亜株の分子モデルをホモロジーモデリング法により構築した。キャプシド蛋白質は二量体が最小単位で、計90の二量体分子が集合してウイルス粒子をつくる。図は、キャプシド蛋白質二量体の3つのドメイン (P1, P2, S)のうち粒子の最外郭に位置するP2ドメインを表示した。色の濃い部分およびうすい部分がGII/4_2006b亜株に特徴的なアミノ酸残基部位。

本村 実態調査は行われておりませんので、正確には不明です。国立感染症研究所の疫学情報によると、直近で2006-2007年に日本で大流行した際、感染者実数は例年の4～5倍、1,000万人以上いたのではないかと推測しておりました。

なぜ集団のなかで感染が持続するのか

— ヒトの集団感染が起こる理由はわかりましたが、なぜ集団のなかで感染が持続するのかということが一番問題になるかと思えます。最近の知見をお話しいただきたいと思えます。

本村 いままでわかっているだけで過去4回、世界的に大流行をきたしていますが、直近では2006-2007年の大流行が有名です。私どもの研究成果から、ウイルスのゲノム解析、遺伝子配列解析より、大流行するウイルスは一番外側にあるキャプシド蛋白質が変わっている、特にヒトの抗体が認識する抗原認識部位が大きく変わっていることがわかってきました。つまり、ヒトが持っている抗体が機能しないことが考えられます。それが原因で世界的に大流行を起こしているのです。

— 特定のウイルスが大流行するのですね。

本村 ノロウイルスにはグループが5つありますが、2006-2007年に大流行したのはグループIIの4型(GII/4)です。グループIIはさらに細か

く18型に分かれていますが、そのなかで4番目のGII/4型は、最近、ヒト集団のなかで大流行をきたしている原因ウイルスだと言われています。

— グループIIでも、ほかのものの報告例はほとんどないのですか。

本村 まれにはありますが、約8割はGII/4型です。そのなかで2006-2007年には2006a亜株、2006b亜株の2つが検出されています。これは世界的にイギリス、オーストラリア、オランダ、アメリカ、香港、日本、ほぼ同時期に認められたウイルスです。

2006b亜株が特に世界的に大流行をきたしていますが、それを詳しくゲノム解析してみると、ウイルスのなかで一番外側にあるキャプシド蛋白質で変異の蓄積がみられていました。

図1は、コンピュータ解析したキャプシド蛋白質の立体構造図です。ウイルスの一番外側の、濃い色とうすい色で示したところが変異の蓄積がみられた部分で、そこはヒトの抗体が認識する部位と言われています。過去にヒトが持っていた抗体が、こういう部分を認識できなかったため、免疫淘汰圧からの逃避ができ、大流行したと考えられます。

— 最近のゲノム解析によっていろいろなことが解析されつつあるのですね。

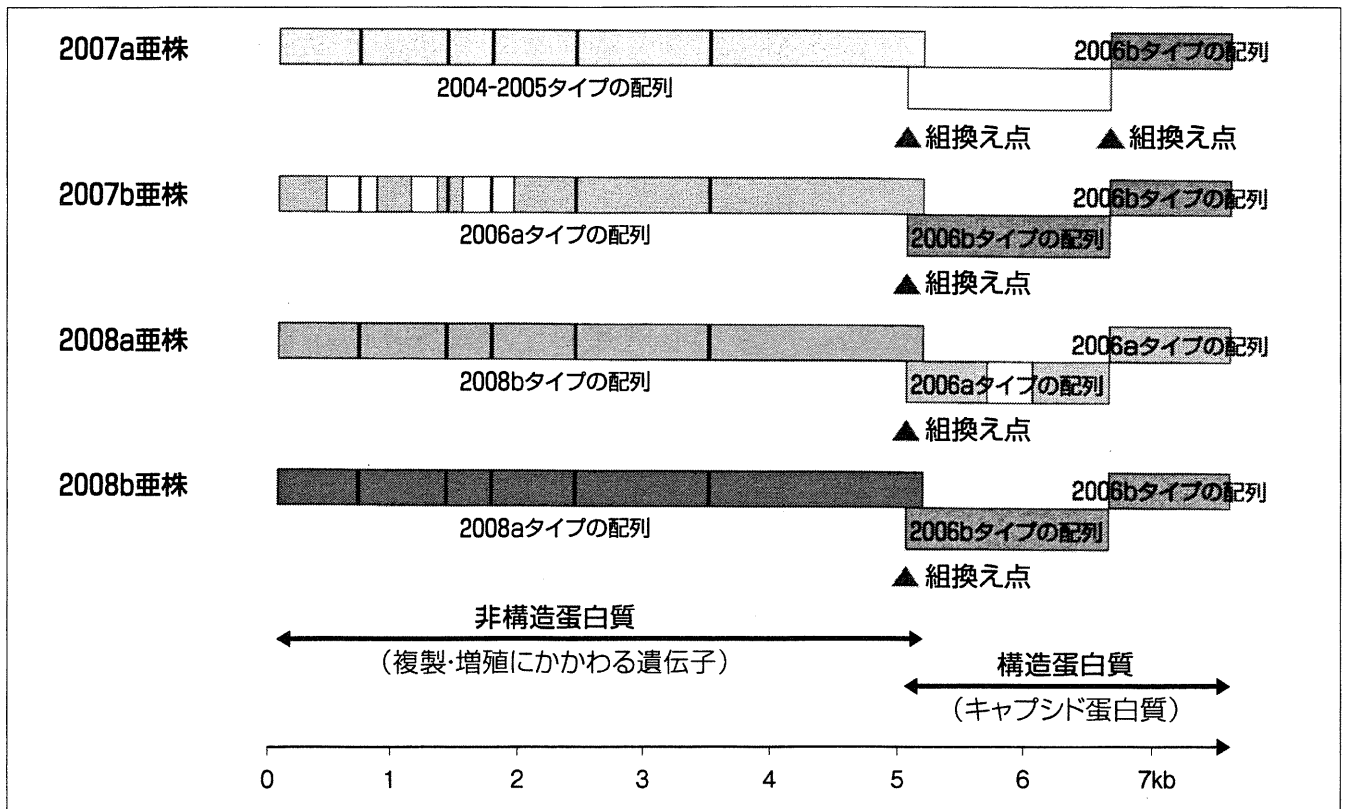


図2 GII/4亜株の遺伝子構造
非構造蛋白質領域は増殖・複製に重要な領域、構造蛋白質領域はキャプシド蛋白質で、(1)抗体の攻撃からの逃避、(2)感染細胞への吸着、(3)ウイルス粒子の安定性に重要な領域である。非構造蛋白質領域と構造蛋白質領域の境目で、ゲノム組換えが起こり、多様なGII/4亜株が新生する。

本村 われわれは2006-2007年以降 2010年まで日本の流行株の特徴を調べていますが、2006b亜株は、その後も日本で流行する大部分を占めています。感染者数は毎年減ってきていますが、8割は2006b亜株で、いまだに跋扈しています。

—生き残り戦略ということになると、2006b亜株のウイルスが一番生き残るのはなぜですか。

本村 詳しくはまだわかっていませんが、1つは、ほかのものよりも複製・増殖能に優れているウイルスではないかということが示唆されます。また、ヒトの抗体から逃れる免疫逃避能力も優れていることが示唆されます。おそらくいままで出現したウイルスのなかで、そうした能力に一番優れているタイプではないかと推測しています。

—ウイルス株のタイプについて、少し詳しくお話してください。

本村 私どもの研究成果から、検出頻度は低い

ですが、2006b亜株とは違うタイプが、2007年と2008年に2種類ずつ出現しています。2007a亜株、2007b亜株、2008a亜株、2008b亜株です。図2は遺伝子構造を示したのですが、2007a亜株は、前のほうは2004-2005年に流行したウイルス亜株と相同性の高い配列です。ここは主に複製・増殖にかかわる遺伝子領域です。後ろのほうはキャプシド蛋白質つまり抗原部位にあたりますが、2006b亜株と相同性の高い配列です。2007b亜株は前のほうは2006a亜株と相同性の高い配列を持っていて、後ろのほうは2006b亜株と相同性の高い配列を持っています。このように、いろいろな組み合わせを持ったウイルスが出現してきています。

非構造蛋白質領域は増殖・複製に重要な領域、構造蛋白質領域はキャプシド蛋白質で、(1)抗体の攻撃からの逃避、(2)感染細胞への吸着、(3)ウイルス粒子の安定性に重要な領域ですが、過去に

流行した亜株の前後をうまく組み合わせながら、そのときの組み合わせで一番相性がよいウイルスが出現していると推測しています。

— 免疫から逃避する能力とウイルスの感染能力、増殖能力のバランスの問題であって、うまくバランスを保持したウイルスが生き残るのですね。

流行の予測

— 生き残ったウイルスの特徴がわかってきましたが、このような研究から、次にどのような流行が起こってくるかという予測はできるのでしょうか。

本村 いま、予測に一番注目しているのは、抗原認識部位の変異数です。この箇所に変異が多く起きていればいるほど、流行が拡大するのではないかと考えられます。

— 人間の持っている抗体から逃れることができるウイルス株が残るから、集団のなかの感染が広がりやすくなってくと推定されているわけですか。

本村 私どもは全国の衛生研究所の先生方と共同研究をしていて、毎年日本全国でノロウイルスに感染した患者の糞便試料を100検体いただいて解析していますが、モニタリングの段階で検出されることを期待しています。その年に発生頻度が少なく、変異の蓄積のあるウイルスが発生していたら、その株の挙動に注目し、翌年の大流行につながるかどうか、調査、解析を行っています。

— 予測することと予防との兼ね合いはどのようなのですか。

本村 天気予報のように、「今シーズンは低頻度ですが、新しい変異株が検出されています。翌シーズン、流行が予想されます」という予測をし、注意喚起が促されることを目指しています。

医療従事者・施設スタッフの ノロウイルス感染予防

— 医療従事者や施設スタッフのノロウイルス感染予防のポイントを教えてください。

本村 迅速に判断して、感染が広がらないように、医療従事者や施設スタッフの方はマスクを着用したり、手指消毒することが重要です。

— 手洗いと消毒ですね。

本村 11～3月に流行しますので、特に11～3月に嘔吐、下痢症が出た場合はノロウイルスではないかと考えて、嘔吐物には0.1%ぐらいの次亜塩素酸をかけて処理をします。入院患者さんが布団に嘔吐した場合は、洗濯するのは難しいので、スチームアイロンで高熱処理をすることが重要だと思います。

迅速診断キットが開発されていますが、まだ保険適用されていません。病院、施設によっては迅速診断キットがないところもありますので、症状からすぐスタッフが判断して、それ以上感染が拡大しないように対応することが重要だと思います。

ノロウイルス感染の抑制に向けて

— ノロウイルスの感染を抑制する方法は何か考えられているのでしょうか。治療薬などはどうですか。

本村 治療薬はまだ開発されておられません。米国ではワクチンが開発されていて、いま臨床試験を行っています。

— 臨床試験はどの段階まで進んでいるのですか。

本村 米国ではphase I / IIが終わりました。開発中のワクチンでは、20～25%の感染阻止率です。また、ワクチンを投与することによって5割ぐらいの人は症状が軽減するのではないかとされています。感染阻止ができる20%に、症状が軽減する50%を合わせると、だいたい6～7割の人たちには何らかの恩恵があると思います。ワクチンにはノロウイルスの中空粒子が用いられています。

日本での開発はこれからです。日本におけるワクチン導入については、米国の成績を見てから検討するのではないかと思います。輸入するということでも対応できます。

— 大変貴重なお話をありがとうございました。

Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B

Tohru Suzuki, Kazufumi Kuga, Ayako Miyazaki and Hiroshi Tsunemitsu

Viral Disease and Epidemiology Research Division, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

Correspondence

Tohru Suzuki
tohru_suzuki@affrc.go.jp

Porcine rotavirus B (RVB) has frequently been detected in diarrhoea of suckling and weaned pigs. Moreover, epidemiological studies using ELISA have demonstrated high antibody prevalence in sera from sows, indicating that RVB infections are widespread. Because it is difficult to propagate RVBs serially in cell culture, genetic analysis of RNA segments of porcine RVBs other than those encoding VP7 and NSP2 has been scarcely performed. We conducted sequence and phylogenetic analyses focusing on non-structural protein 1 (NSP1), using 15 porcine RVB strains isolated from diarrhoeic faeces collected around Japan. Sequence analysis showed that the porcine NSP1 gene contains two overlapping ORFs. Especially, peptide 2 of NSP1 retains highly conserved cysteine and histidine residues among RVBs. Comparison of NSP1 nucleotide and deduced amino acid sequences from porcine RVB strains demonstrated low identities to those from other RVB strains. Phylogenetic analysis of RVB NSP1 revealed the presence of murine, human, ovine, bovine and porcine clusters. Furthermore, the NSP1 genes of porcine RVBs were divided into three genotypes, suggesting the possibility that porcine species might be an original host of RVB infection. Of nine strains common to those used in our previous study, only one strain was classified into a different genotype from the others in the analysis of VP7, in contrast to the analysis of NSP1, where all belonged to the same cluster. This fact suggests the occurrence of gene reassortment among porcine RVBs. These findings should provide more beneficial information to understand the evolution and functions of RVBs.

Received 14 July 2011

Accepted 8 August 2011

INTRODUCTION

Rotaviruses are a major cause of severe gastroenteritis in humans. These viruses are also ubiquitous and responsible for a significant proportion of neonatal diarrhoeal illness in domestic animals, particularly in cattle and pigs. These viruses belong to the family *Reoviridae*, with their genome containing 11 segments of dsRNA. Six structural proteins (VP1–4 and VP6–7) encapsidate the dsRNA to assemble infectious triple-layered particles. Five (sometimes six) non-structural proteins (NSP1–6) are associated primarily with rotavirus dsRNA replication, transcription, cellular pathology and virus-particle maturation (Pesavento *et al.*, 2006).

On the basis of genetic and antigenic studies, rotaviruses are classified into seven species, commonly termed groups (A–G). In addition, novel rotaviruses (ADRV-N, B219 and

J19) distinct from known rotaviruses A (RVA), B (RVB) or C (RVC) were recently identified as the cause of an outbreak of sporadic diarrhoea among adults (Yang *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). RVB infections in humans have been reported in China, India, Bangladesh and Myanmar (Hung *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985; Krishnan *et al.*, 1999; Sanekata *et al.*, 2003; Kelkar & Zade, 2004; Aung *et al.*, 2009). These viruses have been also isolated from a variety of animal species, including cattle, pigs, rats and lambs (Chang *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1999; Tsunemitsu *et al.*, 1999; Barman *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2007; Kuga *et al.*, 2009). Bovine RVBs have been detected in sporadic cases and outbreaks of diarrhoea in calves and adult cows from India, Japan and the USA (Chang *et al.*, 1997; Tsunemitsu *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2007). On the other hand, porcine RVBs have been identified in gastrointestinal diseases of suckling and weaned pigs, and shown to cause acute, transitory diarrhoea in experimentally inoculated gnotobiotic pigs (Theil *et al.*, 1985; Janke *et al.*, 1990). Furthermore, seroepidemiological surveys of RVB infections using ELISA in cattle and pig farms in Japan and the UK demonstrated high antibody prevalence in sera (Brown *et al.*, 1987; Tsunemitsu *et al.*, 2005). RVBs are shed at a low level,

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the nucleotide sequences of 15 porcine RVB strains determined in this study are AB646350–AB646364.

A supplementary figure and table are available with the online version of this paper.

and serial propagation of RVBs in cell culture is rarely successful, with the exception of one porcine RVB strain (Sanekata *et al.*, 1996). These facts might be an obstacle to studying the molecular biology of RVBs.

Full-genome analysis is useful for understanding the ecology and evolution of pathogens. Recently, the full genome of human RVBs was analysed (Yamamoto *et al.*, 2010). Our knowledge of the genome of porcine RVBs has not reached further than analyses of the VP7 and NSP2 genes. Further information on the remaining segments is required to understand the origin and genetic relatedness of porcine RVBs. Moreover, the accumulation of such genome information might be important for investigation of gene transmission and/or reassortment among RVBs.

NSP1 has several interesting properties that warrant investigation, particularly in RVAs. Immunofluorescent staining showed that NSP1 is distributed throughout the cytoplasm, in contrast to most other viral proteins, which are localized in viroplasm (Hua & Patton, 1994). NSP1 is not required for virus replication because mutant viruses with truncated NSP1 can grow in cell culture (Hundley *et al.*, 1985; Taniguchi *et al.*, 1996). Notably, NSP1 can interact with interferon (IFN) regulatory factor 3 (IRF3), IRF5 and IRF7, host key transcription factors that might be essential for early IFN secretion in response to virus infection, and target them for proteasome degradation (Graff *et al.*, 2002, 2007; Barro & Patton, 2005, 2007). Moreover, NSP1 also inhibits activation of NF- κ B by inducing proteasome-dependent degradation (Graff *et al.*, 2009; Arnold & Patton, 2011). These findings suggest that NSP1 plays a role in modulating host immune responses in order to replicate viruses successfully.

Identification of genes in RVBs depends largely on sequence comparison with RVAs and between RVBs. In contrast to the NSP1 genes of RVAs and RVCs, the equivalent gene of RVBs contains two ORFs, except for that of ovine RVB, which has three ORFs (Shen *et al.* 1999). The deduced amino acid sequences encoded by ORFs 1 and 2 appear not to contain a zinc-finger motif, commonly present in NSP1 of RVAs and RVCs and assumed to be essential for the function of the protein (James *et al.*, 1999). Instead of a zinc-finger motif, a cysteine- and/or histidine-rich region is highly conserved in NSP1 peptides, particularly peptide 2 (Kobayashi *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2010). Interestingly, the conserved cysteine and histidine region is also conserved in ADRV-N, but the NSP1 gene has only one ORF (Yang *et al.*, 2004). In RVAs, the NSP1 protein is considered to be highly divergent among strains both within and between species (Hua *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2003). Despite this high divergence, previous studies have shown the presence of clusters according to the species of origin (Dunn *et al.*, 1994; Kojima *et al.*, 1996). Similarly, the NSP1 sequences of bovine RVBs exhibited low similarities to those of human and murine RVBs, but not ovine RVB, and phylogenetic analysis also suggested the presence of species-specific clusters (Ghosh *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2010). On the other hand, we previously found that some porcine and bovine RVBs clustered into the bovine genotype (tentatively defined as G3) by VP7 genotyping (Kuga *et al.*, 2009). Therefore, the genetic relationship of porcine RVBs with other RVBs in NSP1 remains unclear.

In the present study, we determined the nucleotide sequences of several porcine RVB NSP1 genes in order to investigate their evolution. Moreover, sequence comparison of NSP1 of

Table 1. Sequence identities (%) of NSP1 peptides 1 (upper right) and 2 (lower left) among genotypes divided by phylogenetic analyses

Genotype*	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
A1		67.3–68.2	40.6	42.6	41.1	35.6	35.6–40.6
A2	62.5–63.8	91.6–99.4	36.6–37.6	35.6–37.6	35.8–36.8	38.6–40.6	38.6–45.5
A3	47.4	45.1–45.7		64.4–65.3	58.9	47.5	47.5–54.7
A4	44.5–44.8	43.4–44.4	64.0–64.6	99.4–100	56.8	44.6	42.6–49.5
A5	48.0	44.7–45.6	62.3	59.4		61.1	64.2–67.4
A6	48.0	43.8–44.7	57.7	56.2–56.6	73.8		62.4–68.4
A7	44.8–47.0	42.5–45.6	52.6–56.6	55.6–56.9	69.4–72.8	72.8–76.2	81.9–99.1

*Each genotype includes strains as shown in Fig. 1.

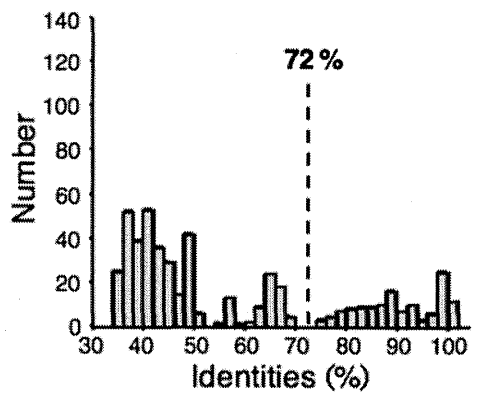
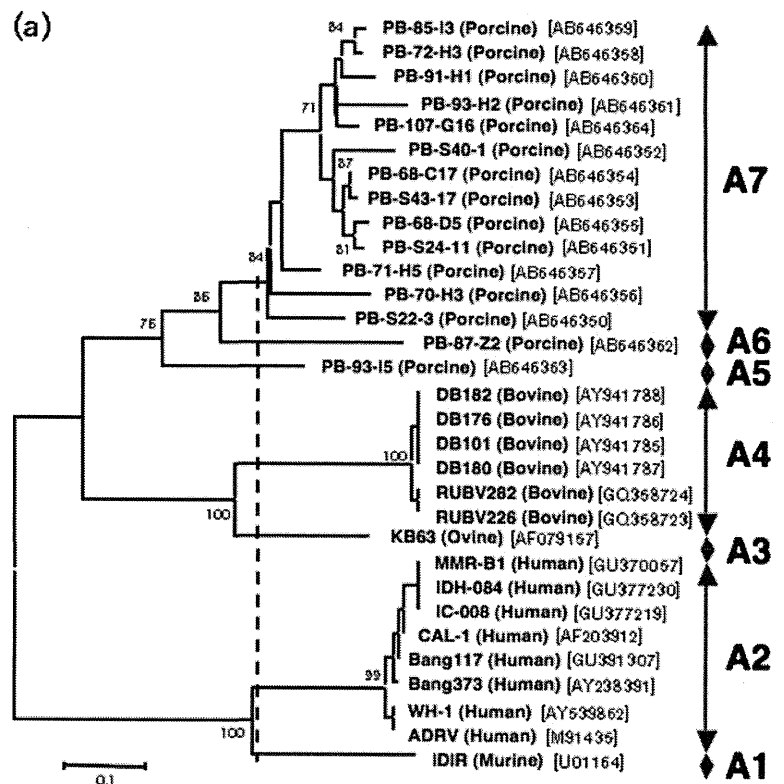
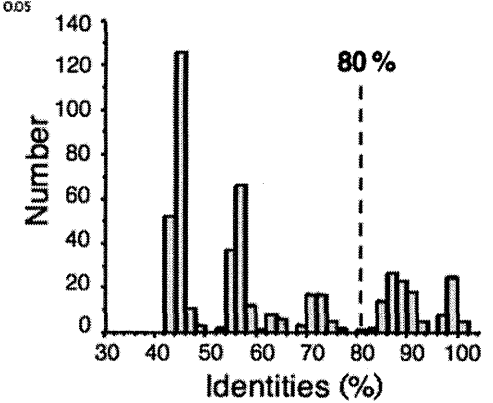
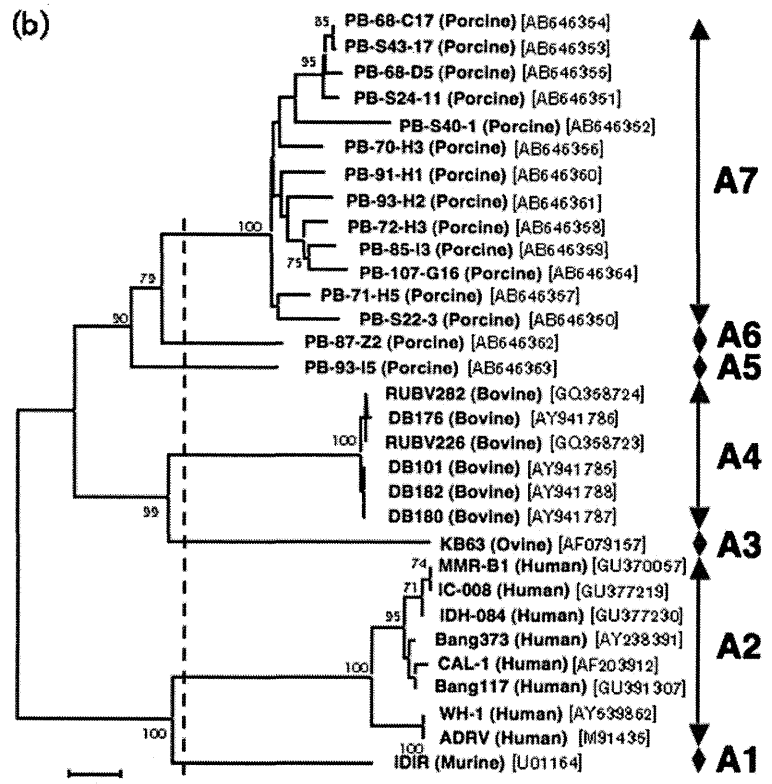


Fig. 1. Phylogenetic trees and distributions of pairwise identity frequency among RVBs on NSP1 peptides 1 (a) and 2 (b) at amino acid level. The phylogenetic dendrograms were constructed by the neighbour-joining method with the MEGA 5 program. Percentage bootstrap support (per 1000 replicates) is indicated by values at each node; bootstrap values of <70% are not indicated. Bars, 0.1 substitutions per site (a); 0.05 substitutions per site (b). The cut-off values for genetic classification are estimated on the basis of frequency distribution constructed by plotting the calculated sequence identities of each sequence pair according to the definition recommended by the Rotavirus Classification Working Group (Matthijnssens *et al.*, 2008b). The dotted line represents the division of genotypes with cut-off values of 72 and 80% identity in peptides 1 and 2, respectively. Of three peptides encoded by the NSP1 gene of ovine RVB strain KB63, peptides 1 and 2 corresponding to those of other RVB strains are used in these analyses. NSP1 genotypes (A1–A7) of RVB strains are indicated on the right. GenBank accession numbers of NSP1 genes from RVBs published previously and determined in this study are shown in brackets.

RVBs with those of RVAs, RVCs and novel rotaviruses including ADRV-N would provide useful information for our understanding of diversity and function.

RESULTS

Sequence analysis of NSP1 genes from two porcine RVB strains, PB-93-I5 and PB-107-G16

The full-length NSP1 genes of porcine RVB strains PB-93-I5 and PB-107-G16 were 1279 and 1278 nt longer, respectively, than those of other RVB strains. The 5' and 3' ends of both porcine RVB strains started with GG and ended with AAAAACC, which are sequences common to other RVB strains (Kobayashi *et al.*, 2003). They also contained two overlapping ORFs encoding peptides 1 and 2, the same as other RVBs [except for an ovine RVB strain (KB63)], in contrast to those of RVAs and RVCs, which have one ORF. The lengths of peptide 1 were variable between the two strains and other RVBs, including human, bovine, ovine and murine strains (Supplementary Fig. S1, available in JGV Online). In contrast, peptide 2 was almost the same length for all RVB strains, excluding KB63, and contained notably conserved cysteine and histidine residues. Sequence identities of the NSP1 gene between the two porcine RVB strains were 68.8% in nucleotide sequence, and 66.3 and 72.2% in deduced amino acid sequences of peptides 1 and 2, respectively. Comparison of NSP1 genes of porcine RVB strains with those of human, bovine, murine and ovine RVB strains indicated low sequence similarities of 53.8–64.4% in nucleotide, 35.8–58.9% in peptide 1 and 44.7–62.3% in peptide 2 sequences (Table 1).

Sequence identification of NSP1 genes from several porcine RVB strains

The ORFs of NSP1 genes from 13 porcine RVB strains were amplified and sequenced by RT-PCR using the oligonucleotide primers described elsewhere (see Methods). The PCR products were 1190 nt in length, and contained two overlapping ORFs. Substantial diversity in NSP1 nucleotide sequences (67.4–98.9% identity) was shown among the 13 porcine RVB strains, which were more divergent than human (91.1–99.6%) and bovine (98.4–100.0%) RVB strains. Moreover, comparison of the NSP1 nucleotide sequence among RVBs, including human, bovine, ovine and murine strains, indicated that porcine RVBs were clearly distinct from other RVBs (53.0–63.7% identity). NSP1 amino acid sequences among porcine RVBs exhibited relative variability in peptide 1 (74.3–99.0% identity) and peptide 2 (81.9–99.1%), compared with peptide 1 (97.2–100.0 and 99.0–100.0%) and peptide 2 (91.6–99.4 and 99.4–100.0%) among human and bovine strains (Table 1). Furthermore, comparisons of sequence at the amino acid level among RVBs, including RVB strains from other species, definitively distinguished porcine RVBs from other RVBs (34.7–58.9% identity in peptide 1 and 42.5–62.3% in peptide 2). Although