

E. 結論

マイクロチップ電気泳動は dsRNA を安定して分離できるが、11 セグメントの分離能力は RNA-PAGE の方が高かった。マイクロチップ電気泳動装置を用いたロタウイルス RNA パターン解析系は、異なる施設の泳動結果を高精度に比較できるため、RNA パターン解析による全国多施設によるロタウイルス流行株の疫学調査に有用と思われた。今後、さらに多くのサンプルを分析しするとともに、他社のキャピラリー型電気泳動装置の応用も検討する。

L. 健康危険情報

なし

M. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K.

Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012 Sep;56(9):630-8.

2. 学会発表

1) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、脇田隆字、松田幹、片山和彦

Immunofluorescence microscopic analysis of human norovirus VLP bound to differentiated Caco-2 cells

日本農芸化学会 2012 年度大会、平成 24 年 3 月 22-26 日 京都

2) Naoyuki Miyazaki, David Taylor, Grant Houseman, Kosuke Murakami, Kuniaki Nagayama, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata

単粒子クライオ電子顕微鏡解析によるサポウイルスキャプシドの 8-Å 構造

第 50 回日本生物物理学会年会、平成 24 年 9 月 22-24 日 名古屋

3) 藤井克樹、下池貴志、高木弘隆、Dennis

Francis、村上耕介、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦

RT-PCR による A 群ロタウイルスの全 11 セグメントの増幅法の構築

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 13-15 日 大阪

4) 高木弘隆、藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、下池貴志、小林宣道、片山和彦

A 群ロタウイルス (RVA) の分離・増殖における感受性細胞株のクローニングによる検討

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 13-15 日 大阪

5) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田幹、片山和彦

ノロウイルス VLP の Caco-2 細胞への結合に關与するタンパク質の探索

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 13-15 日 大阪

6) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦

カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベースリバーシジェネティックシステム

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 13-15 日 大阪

7) 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦

マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質とそのゲノム RNA の局在

第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 13-15 日 大阪

8) 戸高玲子、岡智一郎、村上耕介、下池貴志、藤井克樹、朴英斌、高木弘隆、脇田

隆字、中西章、片山和彦

Development of plasmid DNA
transfection-based reverse genetics
system for murine norovirus and feline
calicivirus

第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24
年 12 月 11-14 日 福岡

9) 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、藤井
克樹、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、松田
幹、片山和彦

Screening for candidate receptor on
Caco-2 involved in norovirus binding by
mass spectrometry from different
approaches

第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24
年 12 月 11-14 日 福岡

10) YoungBin Park, Reiko Todaka,
Takashi Shimoike, Kosuke Murakami,
Yoshiki Fujii, Takaji Wakita, Kazuhiko
Katayama

Evaluation of two newly developed human
norovirus detection system direct
RT-PCR and BLEIA

第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24
年 12 月 11-14 日 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

平成 24 年度（第二年度）研究分担報告書

ロタウイルスの分子疫学的基盤情報として electropherotype の有用性に関する研究 G12P[6]型ロタウイルスの分子進化

研究分担者 中込 治

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座

研究要旨

ロタウイルスワクチンの導入によってロタウイルス下痢症患者から検出される野生ウイルス株に何らかの影響が及ぼされることが予想されている。このような問題の解析のために臨床分離株にもとづく分子疫学基盤構築が要求されるのであるが、これは単にロタウイルスの G および P 遺伝子型の変化のみではなく、全ゲノムに基づいたウイルス「株」の変化を追跡する必要がある。このような「株」のレベルでの同定と解析のために electropherotyping という 11 分節の 2 本鎖 RNA からなるゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動に基づく解析法が使われる。本研究では、electropherotyping により、どのようなロタウイルスの分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に、同一の G および P 遺伝子型（G12P[6]型）の中におけるウイルス株の分子進化を electropherotyping により解析した。G12P[6]型のロタウイルスが連続して優勢遺伝子型として流行しているネパールにおいて、2007 年 11 月から 2010 年 2 月までの 28 か月間に検出され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により electropherotype を決定できた 147 検体の G12P[6]型ロタウイルスを解析した。その結果、ネパールでは、単一の G12P[6]株が連綿として流行しているのではなく、一時期には 1 つの優勢株が少数の劣勢株とともに一定期間（約 6 か月）流行し、これが新たな優勢株に次々と置き換わっていくというダイナミックなしかたで進化していることがわかった。このように electropherotyping は比較的単純な解析法でありながら、重要な分子疫学情報を提供することが可能であり、全ゲノム塩基配列解析によって、さらにどのような情報を取得すべきかについて有用な示唆を与えるものである。

A. 研究目的

ロタウイルス下痢症は、乳幼児を中心に流行する普遍的な病気であるが、2～3%の症例で強い脱水症を起こし、入院治療を余儀な

くされるため、その疾病負担は先進国であっても大きい。この大きな疾病負担の軽減を目的とするワクチンが開発され世界各国で定期接種に導入されている。その一方で、ロタウ

イルスワクチンにより野生株による感染そのものがなくなるわけではないので、ワクチンの導入により、ロタウイルス下痢症患者から検出される野生ウイルス株に何らかの影響が及ぼされることが予想されている。

このような問題に取り組むために重症例から収集された臨床分離株にもとづく分子疫学基盤構築が要求されるのであるが、これは単にロタウイルスの G および P 遺伝子型の変化のみではなく、全ゲノムに基づいたウイルス「株」の変化を追跡する必要がある。このような「株」のレベルでの同定と解析のために electropherotyping という 11 分節の 2 本鎖 RNA からなるゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動に基づく解析法が使われる。

本研究では、研究班の他の研究グループが行っている古典的ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかわるマイクロチップ電気泳動法による electropherotyping が確立すれば、どのようなロタウイルスの分子進化情報が得られるのか、という有用性の一例を示すことを目的に、同一の G および P 遺伝子型 (G12P[6] 型) の中におけるウイルス株の分子進化を electropherotyping により解析した。

B. 研究方法

ネパールの首都カトマンズにある同国最大の小児病院であるカンティ小児病院において、2007 年 11 月から 2010 年 2 月までの 28 か月間に検出された 539 のロタウイルス陽性検体を出発材料とした。便検体の 10% 乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により

ゲノム RNA を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりゲノム 11 分節の electropherotype を調べ、electropherotype が同一の検体を同一のウイルス株と定義した。遺伝子型 G12P[6] のロタウイルスの同定は reverse-transcription PCR 法により、185 検体を同定した。このうち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により electropherotype を決定できたものは 147 検体であった。

C. 研究結果

28 か月の期間中に検出された G12P[6] 型のロタウイルス検体で electropherotype を決定できた 147 検体を 15 の electropherotype に分類することができた。すなわち、28 か月間に G12P[6] という遺伝子型は同一であるが、15 株の異なるロタウイルスが流行していたことがわかった (図 1)。このうち、出現頻度が 10% 以上あった優勢株は、electropherotype が LP1, LP24, および LP27 の 3 株であり、それぞれの相対出現頻度は 10%, 32% および 38% であった。

LP1 は 2007 年 11 月から 2008 年 4 月まで流行し、この期間の G12P[6] ウイルスの 62% を占めた。LP24 は 2008 年 10 月に出現し、2009 年の 3 月まで優勢株として流行し、この期間の G12P[6] ウイルスの 79% を占めた。LP27 は、LP24 がまだ優勢を保っていた 2009 年 3 月に初出現し、翌月には 60% を占めるようになり、2010 年 2 月には 100% を占めるまでになった。LP27 が出現していた期間全体では、G12P[6] ウイルスの 67% を占めた (図 2)。

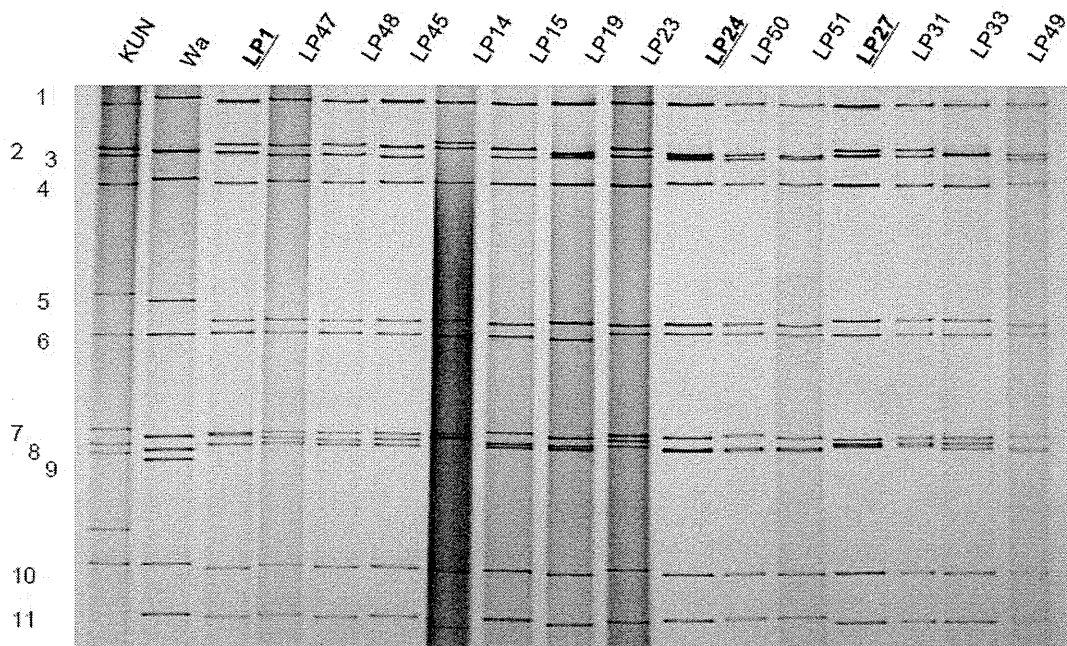


図1. ネパールで28か月間の調査期間中に検出された147のG12P[6]という同一の遺伝子型ではあるが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による electropherotyping により15に区別されるロタウイルス株。左端のKUNとWaはそれぞれshort RNA patternおよびlong RNA patternをもつ標準株のウイルスである。それぞれの株名、すなわち、electropherotypeは各レーンの上に示した。標準株であるWaの11分節の2本鎖RNAの位置をゲルの左端に分節番号で示した。ゲルは10%のポリアクリルアミドゲルで銀染色をしたものである。

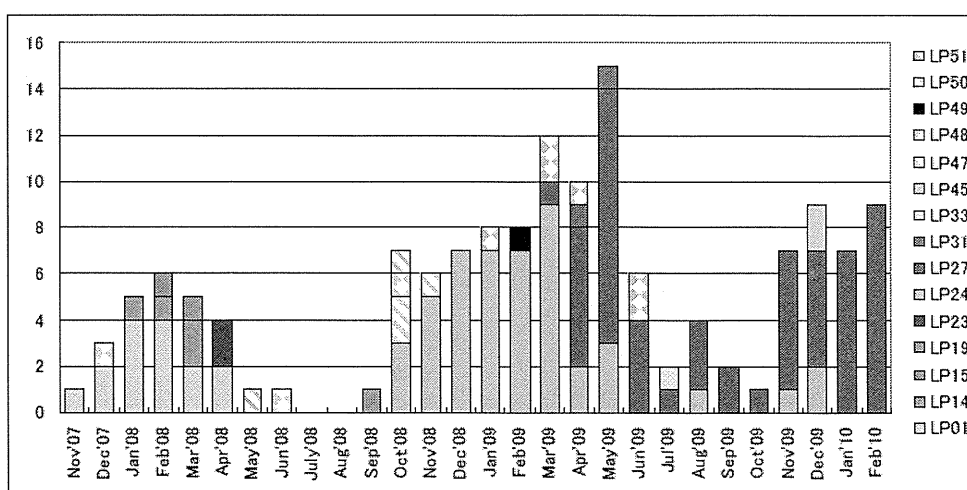


図2. ネパールで28か月間の調査期間中に検出された15のG12P[6]ロタウイルス株の継時的出現状態。LP1, LP24, およびLP27の3株が次々に置き換わるよう出現していることがわかる。

D. 考察

ネパールでは G12P[6]型のロタウイルスが連続して優勢遺伝子型として流行しているが、本研究により、これが単一の G12P[6]株が連続して流行しているのではなく、一時期には1つの優勢株が少数の劣勢株とともに一定期間流行し、これが新たな優勢株に次々と置き換わっていくというダイナミックな変化をしていることがわかった。このようなダイナミックな変化に関しては、Doan et al (Arch Virol 156:1969-1978, 2011)が G2 型ロタウイルスの VP7 遺伝子の 34 年間にわたる変化をデータベースに登録されたすべての G2 型ロタウイルス塩基配列情報を解析することにより発見している。本研究は、このようなダイナミズムがウイルスの「遺伝子分節」レベルだけではなく、ウイルス「株」のレベルでも起こっていることを明らかにしたと考える。

ロタウイルスは、次々に出現するウイルス株のプールの中から、そのときの条件にもっとも適したウイルス株が選択され、優勢を占め、これが一時期続くと、また新しいより適したウイルス株によってとってかわられるという進化のしかたをしているものと考えられる。

E. 結論

本研究により electropherotyping は、比較的単純な解析法でありながら、重要な分子疫学情報を提供することが可能であることが示された。本法を活用することにより、全ゲノム塩基配列解析によって、さらにどのような情報を取得すべきかについて有用な示唆が得

られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA: Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. *Vaccine* 30 Suppl 1: A140-151, 2012
- 2) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene. *Infect Genet Evol*, 12:1202-1212, 2012.
- 3) Matthijssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M: Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines* 11(11): 1347-1354, 2012
- 4) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン. *メディカル・テクノロジー* 40(9): 1005-1008, 2012

2. 学会発表

- 1) Nakagomi O. How diverse are rotavirus strains circulating in low-income countries where the vaccine efficacy is low? June 19-20, 2012. The 46th Joint Working Conference on Viral Diseases. The

Japan – United States Cooperative Medical Science
Program. Beppu, Japan.

- 2) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi T.
Genotype G2 strains in Japan in the global and
evolutionary context. September 19-21, 2012. The
10th International Rotavirus Symposium. Bangkok,
Thailand.
- 3) Nakagomi O. Molecular epidemiology of
gastroenteritis viruses from the global perspective.
December 10-12, 2012. The 6th Nagasaki
Symposium on Tropical and Emerging Infectious
Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical
Symposium. Nagasaki, Japan.
- 4) 木下さやか、中込とよ子、中込 治. 秋田県由
利地区における過去10年間のロタウイルス胃腸
炎入院発生率の変動. 平成 24 年 6 月 16～17 日
第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市
- 5) 中込 治、中込 とよ子. ネパールで急激に増加
した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 平成 24
年 11 月 13 日～15 日 第 60 回日本ウイルス学会
学術集会, 大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

平成 24 年度（第二年目）研究分担報告書

ロタウイルスの分子疫学的基盤情報としての全ゲノム解析の有用性に関する研究

G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析

研究分担者 中込とよ子

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学講座

研究要旨

わが国でもロタウイルスワクチンが導入されたことにともない、どのようなロタウイルス野生株が分布し、それがどう変化して行くのか、臨床分離株にもとづく分子疫学基盤構築が必要である。もっとも重要な情報の 1 つは G および P 遺伝子型の分布と変化であるが、この中で見つかる非通常株の出現機構の理解には全ゲノム解析が必要である。本研究では、サーベイランスで得られる非通常株の全ゲノム解析によりどのような分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に行った。すなわち、かつてインドで分離された G3P[4]株(107E1B)と G2P[4]株(116E3D)の全ゲノムを解析により、「107E1B 株は、G2P[4]株が同時期に流行していた G3 ヒトロタウイルスから VP7 遺伝子を遺伝子分節再集合の機序により獲得したものである」ことを示すことを目的とした。107E1B の遺伝子型構成は G3P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2、116E3D は G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であった。すなわち 107E1B は VP7 を除き 116E3D と同じ DS-1 型の遺伝子型構成であった。これら 2 株の遺伝子分節（VP7 以外）の塩基配列は、99.83-100%の一致率であり、どの分節でもわずか 2 塩基以下が不一致であった。一方、107E1B の VP7 遺伝子はヒトロタウイルス G3VP7 遺伝子の 76%が所属する主要な系統に属し、かつ、2004 年に登録されたインドのロタウイルス株 RMC437 と 99.3%の一致率であった。この全ゲノム解析の結果、107E1B と 116E3D の 2 株は同一クローンに属することが分かり、同時期に流行しているロタウイルス株間で遺伝子分節再集合が起こっていることが示された。

A. 研究目的

ロタウイルスは乳幼児における重症下痢症の原因としてもっとも重要な病因である。ロタウイルスはレオウイルス科の一員であ

り、11 本の分節状 RNA をゲノムとするため、異なるウイルス株が同一の宿主に感染することにより、遺伝子分節の再集合体 genetic reassortant が形成されることが知られて

いる。ロタウイルスの防御免疫にはウイルス粒子の2つの表面抗原が関与し、その遺伝子型はG型およびP型として定義され、その地域的および継時的変化とその要因の探究がロタウイルスの分子疫学基盤構築のめざすところである。

わが国におけるヒトロタウイルスの臨床分離株では、その95%以上がG1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]の5つに集約されるが、混合感染が多い発展途上国の乳幼児下痢症症例からは、多くの例外的な組み合わせのウイルス株(非通常株)が分離され、これらはgenetic reassortantであると解釈されている。すなわち、G3P[4]というウイルス株はG2P[4]とG3P[8]という2つの異なる遺伝子型をもつウイルスが混合感染をした結果genetic reassortantが生じたためであると考えられている。また、実験的混合感染においてもgenetic reassortantが形成されることが確認されている。しかし、実際の野生株において、このようなgenetic reassortantの形成を直接証明した研究はない。

本研究では、非通常株の全ゲノム解析によりどのような分子進化情報が得られるのかという一例を示すことを目的に、インドで分離されたG3P[4]のロタウイルス株(107E1B)とG2P[4]株(116E3D)の全ゲノム解析を行い、「107E1B株は、G2P[4]株が同時期に流行していたG3ヒトロタウイルスからVP7遺伝子をgenetic reassortmentの機序により獲得したものである」ことを明らかにした。

B. 研究方法

本研究で使用したG3P[4]株(107E1B)およびG2P[4]株(116E3D)は、1993年にインドのニューデリーで分離された株であり、そのゲノムはかつてポリアクリルアミドゲル電気泳動法とRNA-RNA hybridization法により解析されている(Nakagomi T, Gentsch JR, Das BK, Kumar R, Bhan MK, Glass RI, Nakagomi O. Arch Virol 147:2187-2195, 2002)。

ゲノムRNAはQIAamp Viral RNA mini kitにより抽出し、ロタウイルス遺伝子分子節のよく保存されている末端の塩基配列をもとに各分節の全長を増幅できるプライマーを設計し、RT-PCRにより全遺伝子分節のDNAを増幅した後、オートシーケンサーにより塩基配列を決定した。塩基配列の分子系統解析はMEGA5.0を用いた。

C. 研究結果

G3P[4]のロタウイルス株(107E1B)とG2P[4]株(116E3D)についてすでに報告されているVP7遺伝子を除く、10遺伝子分節のそれぞれ90-100%のコード領域の塩基配列を決定した。全ゲノム分類による107E1Bの遺伝子型構成はG3P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であることが分かった。一方、116E3DのそれはG2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2であることが分かった。すなわち107E1BはVP7を除き116E3Dと同じDS-1 genogroup backgroundのウイルスであった。これら2

つのウイルス株の VP7 遺伝子以外の遺伝子 99.83–100%であり、不一致な塩基数は各分節の塩基配列の一致率を計算したところ、節で2塩基以下であった(Table 1)。

Table 1 The lengths of nucleotide sequences of the 11 genome segments of reference strain DS-1, 107E1B, and 116E3D, and the percent nucleotide sequence identity between the cognate genome segments of 107E1B (G3P[4]) and 116E3D (G2P[4])

Gene segments	VP7**	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Length of the entire coding regions* (nucleotides) of DS-1 as reference	981	2328	1194	3267	2640	2508	1482	954	942	528	603
Length of 107E1B nucleotide sequences determined in this study	981	2227	1108	3225	2481	2487	1347	898	842	528	603
Length of 116E3D nucleotide sequences determined in this study	981	2202	993	3186	2478	2485	1392	884	905	509	603
Percent nucleotide sequence identity (between 107E1B and 116E3D)	73.0	99.91	99.9	99.94	100	100	100	100	99.88	100	99.83
Number of nucleotide mismatches (between 107E1B and 116E3D)	264	2	1	2	0	0	0	0	1	0	1

* The coding region includes the stop codon.

** The nucleotide sequences of the VP7 gene are available in the DNA databases (accession numbers AB081594 for 107E1B and AB081593 for 116E3D)

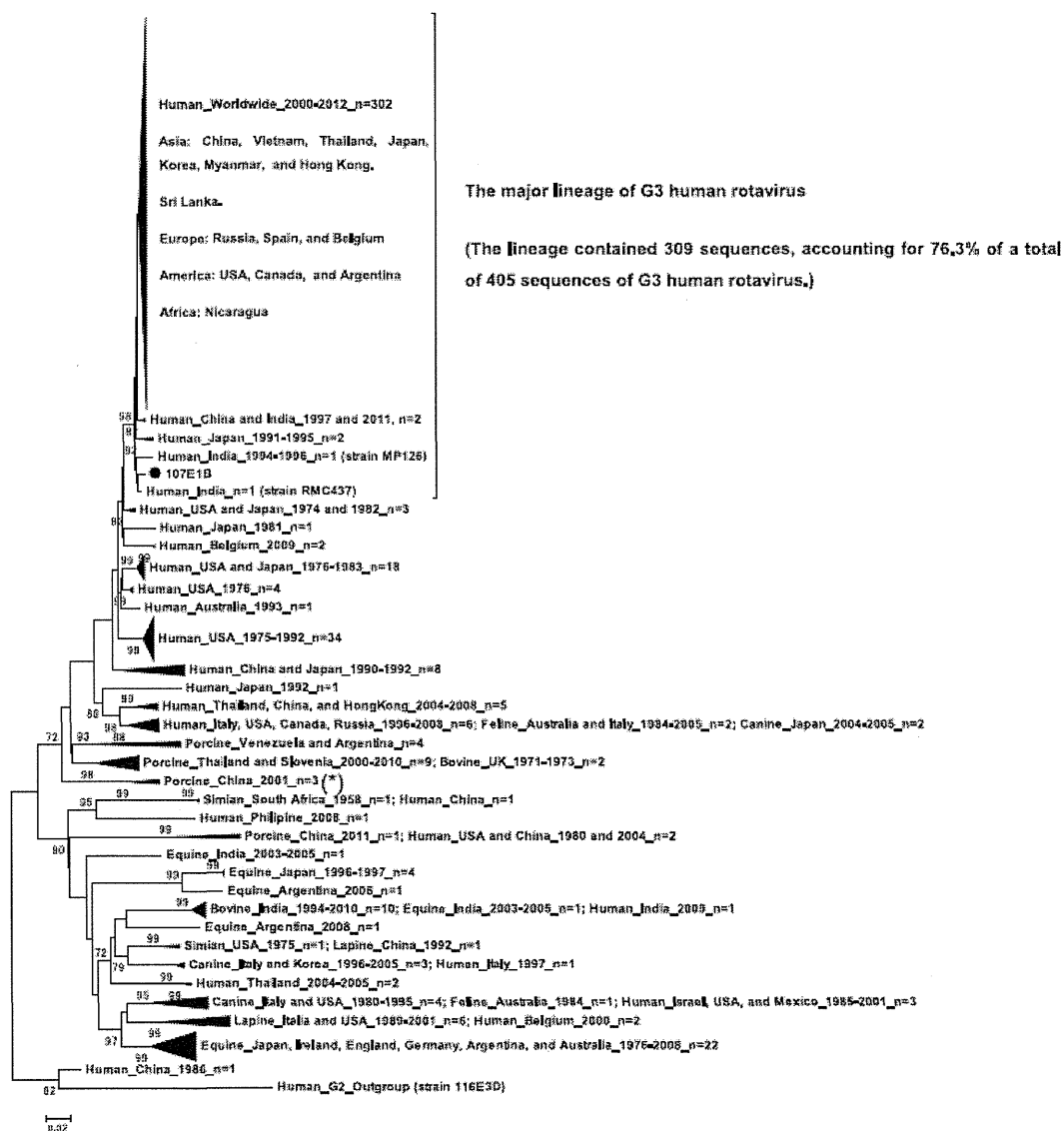


Fig. 1. DNA データベースに登録されているヒトおよび動物に由来する G3 ロタウイルスの

株の VP7 遺伝子の N-J 法による系統樹。

一方、107E1B の VP7 遺伝子の分子系統解析を行ったところ、この遺伝子はヒトロタウイルス G3VP7 遺伝子の 76%が所属する主要な lineage に属し、かつ、2004 年に登録されたインドのロタウイルス株 RMC437 と 99.3%の一致率であることがわかった (Table 1)。

D. 考察

インドで分離された G3P[4]株である 107E1B および G2P[4]株である 116E3D の全ゲノム解析の結果から、107E1B は、典型的な DS-1 genogroup の株である 116E3D が同時期に流行している G3 ヒトロタウイルス株から VP7 遺伝子を genetic reassortment により獲得したものであることが示された。本研究で解析した 2 つのウイルス株の VP7 遺伝子分節を除く、10 遺伝子分節において塩基配列の不一致が 2 個以下であることから、これら 2 つのウイルスが同一クローンに属するものであることが証明された。

本研究は同時期に流行しているロタウイルス株間で genetic reassortment が起こっていることを示す robust な証拠を提供した初めての研究である。

E. 結論

本研究によりサーベイランスで得られる非通常株の全ゲノム解析によって、このような株の出現機構を明らかにすることができることが示された。わが国で使用されて

いるロタウイルスワクチンは被接種者の便中に排泄されることが知られており、野生株との間で genetic reassortment を起こすことが想定される。本研究は、そのような検体が検出された場合、何をどう証明すればよいのかということに関する有用な基盤情報を提供するものである。

N. 健康危険情報

なし

0. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Duncan Steele A, Neuzil KM, Cunliffe NA: Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. *Vaccine* 30 Suppl 1: A140-151, 2012
- 2) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. Repeated circulation over 6 years of intergenogroup mono-reassortant G2P[4] rotavirus strains with genotype N1 of the NSP2 gene. *Infect Genet Evol*, 12:1202-1212, 2012.
- 3) Noguchi A, Nakagomi T, Kimura S, Takahashi Y, Matsuno K, Koizumi H, Watanabe A, Noguchi H, Ito T, Ohtsuka M, Uemura N, Takeda O, Komatsu A,

Kikuchi W, Komatsu M, Fukaya H, Miura S, Toda H, Nakagomi O, Takahashi T: Incidence of intussusception as studied from a hospital-based retrospective survey over a 10-year period (2001-2010) in Akita Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 65(4): 301-305, 2012

- 4) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン. *メディカル・テクノロジー* 40(9): 1005-1008, 2012

2. 学会発表

- 1) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Iturriza-Gomara M, Ngwera B, Nakagomi O, Cunliffe N. Full-genome analysis of G8 rotavirus strains in Malawi over a 10-year-period. D November 27 - December 1, 2012. The 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. Puerto Rico, USA.
- 2) Nakagomi O, Do LP, Doan YH, Nakagomi T. Genotype G2 strains in Japan in the global and evolutionary context. September 19-21, 2012. The 10th International Rotavirus Symposium. Bangkok, Thailand.
- 3) Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. Identification by full genome analysis of a bovine rotavirus

transmitted directly to, and causing diarrhea in a human child. December 10-12, 2012. The 6th Nagasaki symposium on tropical and emerging infectious diseases and the 11th Nagasaki-Singapore medical symposium. Nagasaki, Japan.

- 4) 木下さやか、中込とよ子、中込 治. 秋田県由利地区における過去 10 年間のロタウイルス胃腸炎入院発生率の変動. 平成 24 年 6 月 16~17 日 第 53 回日本臨床ウイルス学会, 豊中市
- 5) 中込 治、中込 とよ子. ネパールで急激に増加した GII.13 ノロウイルス株の分子基盤. 平成 24 年 11 月 13 日~15 日 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業）

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

平成24年度 研究分担報告書

アジアのヒトロタウイルスの全ゲノム配列に基づく分子疫学的解析

研究分担者 小林宣道

札幌医科大学・医学部・衛生学講座

研究要旨

ロタウイルスは小児下痢症の主要な原因ウイルスであり、開発途上国では多くの乳幼児死亡を起こしていると推定され、その重症化の予防のためワクチンが世界的に用いられている。またロタウイルスは哺乳動物、鳥類に広く分布し、稀に異なる動物種間での伝播が起こることが報告されている。今年度の本研究では(1)中国における最近の主流行型G1P[8]ヒトロタウイルス、(2)非定型的G1P[9]型ヒトロタウイルス株（K8株、日本）、(3)非定型的G4P[10]型ヒトロタウイルス株（57M株、インドネシア）について全遺伝子配列を決定し、世界に分布するヒトロタウイルスまたは動物ロタウイルス、および現行のワクチン株との関連を解析することを目的とした。中国・武漢市において乳児、幼児、成人の下痢症例便検体から分離された3株のG1P[8]株の全遺伝子分節は、1株のNSP3遺伝子分節を除き、互いに遺伝的にきわめて近縁で、近年アジアで検出されたヒトロタウイルスと同じクラスターに属していた。乳児からの分離株E1911が持つNSP3遺伝子は、インドで報告されたブタ様ヒトロタウイルスに近縁であり、遺伝子再集合に起因してブタロタウイルスに由来することが示唆された。中国のG1P[8]株の外殻蛋白VP7、VP4における中和抗原部位を現行の1価および5価ワクチンのそれと比較すると、数個のアミノ酸の違いが認められた。G1P[9]型ヒトロタウイルスK8株は、ヒトロタウイルスのWa遺伝子群、AU-1遺伝子群間の遺伝子再集合体、G4P[10]型ヒトロタウイルス57M株はヒトロタウイルスWa遺伝子群とG8P[10]株間の遺伝子再集合体であると考えられた。

A. 研究目的

ロタウイルス（A群）は5歳未満の小児における重症下痢症の主要な原因ウイルスであり、先進国、発展途上国を問わず世界中に広く分布している。また広く哺乳動物、鳥類にも分布している。ロタウイルスはレオウイルス科の一員であり、11本の分節化

した2本鎖RNAをゲノムとして有する。ウイルス粒子の最外層を構成する2種の構造蛋白VP7、VP4の遺伝子配列により遺伝子型（各々G型、P型）が区別され、ロタウイルスの疫学的調査に用いられている。ヒトではG1-G4、G9、P[4]、P[6]、P[8]が普遍的に多いことが知られ、それぞれの動物種に

においても高頻度にみられる遺伝子型がある。ヒトロタウイルスには2種類の主要な遺伝子群、Wa および DS-1 遺伝子群があり、そのほか比較的稀に見られる AU-1 遺伝子群が知られる。

ロタウイルスは稀に異なる動物種間で感染・伝播することがあり、ヒト、動物個体における混合感染により遺伝子分節の遺伝子再集合（リアソートメント）を起こすことが知られる。自然界におけるロタウイルスの遺伝子分節の動態を明らかにするには全遺伝子配列の解析が必要である。2008年にロタウイルスの11本の全遺伝子分節に基づく遺伝子型別が提唱された。これにより、VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5の各遺伝子に対応する各々の遺伝子型を合わせたG-P-I-R-C-M-A-N-T-E-H遺伝子型としてロタウイルス株の遺伝子学的性状が表記されることとなった。これに加えて各遺伝子分節の系統解析を行うことにより、ロタウイルス株の遺伝子学的位置づけをより明確にすることができる。

今年度の本研究では、(1)中国における最近の主流型G1P[8]ヒトロタウイルス、(2)非定型的G1P[9]型ヒトロタウイルス株(K8株、日本)、(3)非定型的G4P[10]型ヒトロタウイルス株(57M株、インドネシア)について全遺伝子配列を決定し、世界に分布するヒトロタウイルスまたは動物ロタウイルス、および現行のワクチン株との関連を解析することを目的とした。中国においては、現在世界的に用いられている1価ワクチン、5価ワクチンが使用されていない。今後それらのワクチンが導入される場合に

備え、主流型の野外株の全ゲノムに基づく遺伝子学的状況を把握することは有意義である。G1P[9]のK8株、G4P[10]の57M株は30年以上前に分離された非定型的ヒトロタウイルスであり、長い間それらの由来が分かっていなかった。そこで今回、全遺伝子配列に基づく遺伝子型・系統解析を通じて、これらの非定型的ヒトロタウイルスがどのように形成されたかを調べた。

B. 研究方法

中国でのG1P[8]ロタウイルス3株は、それぞれ乳児、幼児、成人に由来するRVA/Human-wt /CHN/E1911/2009/G1P[8]、RVA/Human-tc/CHN/ R588/2005/G1P[8]、RVA/Human-tc/CHN/Y128/ 2004/G1P[8]を用いた。これらの株が検出された疫学調査結果についてはすでに論文で報告されている(Arch Virol, 152:669, 2007; Arch Virol, 156:2221, 2011)。これら中国のロタウイルス株の解析は、武漢市疾病対策予防センター(Wuhan CDC)との共同研究として行なわれたものである。一方非定型的ヒトロタウイルスは、1977年に日本で分離されたK8株(RVA/Human-tc/JPN/K8/1977/G1P[9])、1980年にインドネシアで分離された57M株(RVA/Human-tc/IDN/57M/1980/G4P[10])を研究対象とした。これらのロタウイルスの検出、分離についてはすでに論文発表されており(Arch Virol, 81:1, 1984; Microbiol Immunol, 28:719, 1984)、札幌医科大学医学部衛生学講座に保管されていた組織培養液を用いて解析を行った。

ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA mini kitにより抽出し、RT-PCRにより各ロタウイルス遺伝子の全長または互いに重複する末端

配列を有し全長をカバーする複数の部分配列を増幅した。PCR産物はWizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製し、BigDye Terminator ver. 3.1 cycle sequencing kitを用いてダイデオキシ法によるシーケンス反応を行い、配列をABI Prism 3100 genetic analyzerにより決定した。得られた遺伝子配列は、GenBankに登録されている代表的なG型、P型ヒトロタウイルス株、動物ロタウイルスの配列情報と比較し、MEGA ver. 5を用いて多数の既知遺伝子配列とともに系統解析を行った。

C. 研究結果および考察

(1) 中国のG1P[8]株の解析

3株のG1P[8]ヒトロタウイルスE1911, R588, Y128は、Wa遺伝子群（Wa様遺伝子配座、G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1）に属し、E1911株のNSP3遺伝子を除き、遺伝学的に互いに近縁で密接な関係が見られた。このことから乳児、幼児、成人の間で同一のロタウイルスが伝播したことが示唆された。これらの全ゲノムはG1P[8]のプロトタイプ株や他の古い株よりも、近年アジアや世界中で検出されヒトに普遍的に見られるG1-4, 9型のWa遺伝子群ロタウイルスに密接に関係していた。T1遺伝子型のNSP3遺伝子において、R588株、Y128株は通常のWa遺伝子群ヒトロタウイルスと同じクラスターに属していたが、E1911株のNSP3遺伝子はブタロタウイルス様ヒトロタウイルス株（RMC321, mcs-13, mani-97）に近く、それらと同じクラスターに含まれていた。中国武漢市周辺におけるブタロタウイルスの遺伝子配列情報がないためその由来は明確にはわからないが、ブタロタウイルスが

G1P[8]ヒトロタウイルスと同時に感染し、遺伝子再集合によりNSP3遺伝子がブタのウイルスから取り込まれたことが示唆された。VP7, VP4の中和抗原領域のアミノ酸配列を比較すると、1価および5価ワクチンのG1-VP7, P[8]-VP4とG1P[8]株の間で幾つかのアミノ酸の違いが認められた。今回調べられたG1P[8]株の遺伝子配列は、VP7, VP4を含め、すでに1価、5価ワクチンを導入している国々のロタウイルスのそれにきわめて近縁であり、それらのワクチンは中国においても有効であると考えられた。ただしそれらのワクチン（あるいはそのVP7, VP4成分）の元になっているロタウイルス株は、20年以上前に分離されたものであり、現在の野外流行株には変異の蓄積により、アミノ酸の違いが生じているのも事実である。従って今後も継続的な調査、解析を行うことが必要であると考えられる。

(2) G1P[9]ヒトロタウイルスK8株の解析

日本で分離されたヒトロタウイルスK8株は、Wa遺伝子群に属するG1-VP7とAU-1遺伝子群に属するP[9]-VP4を持つユニークな株である。その全遺伝子を解析した結果、全遺伝子型は、G1-P[9]-I1-R3-C3-M3-A1-N1-T3-E3-H3と決定された。系統解析も行った結果、VP6, VP7, NSP1, NSP2遺伝子はWa遺伝子群に、VP1-4, NSP3-5遺伝子はAU-1遺伝子群に属することが判明し、AU-1遺伝子群のウイルスが遺伝子再集合によりWa遺伝子群の4遺伝子分節を獲得したウイルス（異なる遺伝子群間のリアソータント）であることが示唆された。

(3) G4P[10]ヒトロタウイルス57M株の解析

G4P[10]ロタウイルス57Mは、G8P[10]の69M株とともにインドネシアで検出、分離されたロタウイルスで、11遺伝子分節の電気泳動パターンにおいてNSP5遺伝子の移動度がDS-1遺伝子群のそれよりも遅い”supershort”パターンを示すことが特徴的である。69M株の全遺伝子配列はすでに早い時期に報告されているが、今回の研究では59M株の全遺伝子解析を行うとともに、69M株の遺伝子構成についても再検討を行った。57M株の遺伝子型は、G4-P[10]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T2-E1-H2と決定され、系統解析の結果も合わせると、この株はWa遺伝子群が69M株様のVP4, NSP3, NSP5を獲得した遺伝子再集合体であることが判明した。69M株は従来の文献ではDS-1遺伝子群に属するヒトロタウイルスとされてきたが、今回改めて系統解析を行ったところ、NSP1, NSP3, NSP5遺伝子は典型的なDS-1遺伝子群に属していたのに対し、VP1-3, VP6, NSP2, NSP4は偶蹄類のロタウイルス（または偶蹄類様P[14]ヒトロタウイルス株）に近縁であった。すなわち69M株はDS-1遺伝子群に属する典型的なヒトロタウイルスではなく、DS-1遺伝子群と偶蹄類ロタウイルスの遺伝子再集合体であると考えられた。ただしP[10]-VP4の由来は明らかではなかった。以上の知見から、57MはヒトロタウイルスのWa遺伝子群、DS-1遺伝子群の間の遺伝子群間リアソータントであり、そこにP[10]-VP4遺伝子を取り込まれた稀な成因によるウイルスであることが示唆された。

D. 結論

中国の主流型 G1P[8]ヒトロタウイルス 3株は Wa 遺伝子型に属し、最近アジアや世界に分布するロタウイルスに近縁であった。ブタロタウイルスからの遺伝子再集合によると思われる NSP3 遺伝子が 1 株に検出された。非定型的 G, P 遺伝子型の G1P[9]ロタウイルス K8 株、G4P[10]ロタウイルス 57M 株はいずれも Wa 遺伝子群、DS-1 遺伝子群に属するヒトロタウイルスの間で形成された遺伝子再集合体であることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 21) Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:471-477.
- 22) Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet Microbiol*, 2012, 158:410-414.
- 23) Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenogroup reassortment events. *J Gen Virol*, 2012, 93:1700-1705.
- 24) Shintani T, Ghosh S, Wang Y-H, Zhou X, Zhou D-J, Kobayashi N. Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China. *Viruses*, 2012, 4:1289-1304.
- 25) Mukherjee A, Mullick S, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. The first identification of rare human group A rotavirus strain G3P[10] with severe infantile diarrhea in eastern India. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:1933-1937.
- 26) Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Chanda S, Nandi S, Bagchi P, Nayak MK, Chakrabarti O, Kobayashi N,

- Chawla-Sarkar M. Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection. *J Biol Chem*, 2012, 287:35004-35020.
- 27) Bagchi P, Nandi S, Chattopadhyay S, Bhowmick R, Halder UC, Nayak MK, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Identification of common human host genes involved in pathogenesis of different rotavirus strains: an attempt to recognize probable antiviral targets. *Virus Res.* 2012, 169:144-153.
- 28) Ghosh S, Urushibara N, Kawaguchiya M, Shintani T, Kobayashi N. The origin of two rare human P[10] rotavirus strains. *Infect Genet Evol*, 2013, 13:292-300.
- 29) Sumi A, Rajendran K, Ramamurthy T, Krishnan T, Nair GB, Harigane K, Kobayashi N. Effect of temperature, relative humidity, and rainfall on rotavirus infections in Kolkata, India. *Epidemiol Infect*, 2013, in press (2012, Epub ahead of print)
2. 学会発表
- 1) Ghosh S, Shintani T, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a rare human G1P[9] rotavirus strain. 9th Japan-China Conference of Virology, 2012, Sapporo (June 13, Hokkaido University)
- 2) Chawla-Sarkar M, Bhowmick R, Bagchi P, Kobayashi N. Modulation of both cell survival and apoptotic pathways during virus infection by rotavirus encoded non structural-4 (NSP4) and non structural-1 (NSP1) proteins. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, 2012, Sapporo (Oct. 18).
- 3) Kobayashi N, Wang YH, Zhou X, Pang BB, Liu MQ, Peng JS, Hu Q, Zhou DJ, Ghosh S. Molecular epidemiological analysis of G3P[9] rotaviruses from diarrheal patients in China. The 13th Asia-Pacific congress of Clinical Microbiology and Infection, 2012, Beijing (Oct. 27).
- 4) Kobayashi N, Ghosh S. Interspecies transmission of rotaviruses evidenced by whole genomic sequence analysis. The 17th FAVA (Federation of Asian Veterinary Association) congress, 2013, Taipei (Jan. 5)
- 5) 鷺見紋子、小林宣道. 感染症と気象変動の相関構造に関する研究. インド・コルカタにおけるロタウイルスの流行動態を例として. 第64回北海道公衆衛生学会 2012年11月9日、札幌.
- 6) ゴッシュ ソウビック、漆原範子、川口谷充代、新谷つづみ、小林宣道. Whole genomic analysis of a rare human G4P[10] rotavirus strain. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月14日、大阪.
- 7) 小林宣道、ゴッシュ ソウビック、新谷つづみ、ワン ユアンホン. Whole genomic analysis of G3P[9] rotaviruses from diarrheal patients in China. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月14日、大阪.
- 8) 新谷つづみ、ゴッシュ ソウビック、ワン ユアンホン、小林宣道. 全遺伝子配列に基づく中国のG1P[8]ロタウイルス株の系統遺伝学的解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月14日、大阪.
- F. 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（新型インフルエンザ新興・再興感染症研究事業）

「ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」

平成 24 年度 研究分担報告書

分担研究タイトル

リバーシジェネティクス系を利用した、ロタウイルスの外層タンパク質 VP4 の
トリプシン開裂部位の解析

研究分担者 谷口 孝喜 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学
研究協力者 河本 聡志 藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学

研究要旨

平成 23 年度に引き続き、リバーシジェネティクス系を利用して、ロタウイルスの外層タンパク質 VP4 の解析を行った。ロタウイルスは、タンパク質分解酵素による開裂：VP4→VP8* + VP5* により感染性を獲得する。生体内では、腸管でのトリプシンにより、この活性化は行われている。本研究では、VP4 のトリプシン開裂部位のアルギニン残基 231, 241, 247 の感染性獲得における意義を検討するために、リバーシジェネティクス系を利用してこれら 3 ヲ所の各アルギニン残基に変異を導入した組換えロタウイルスを作成し、各残基の重要性を感染性ウイルスを用いて検討した。その結果、R247 が感染性獲得に最も重要であることが示された。さらに、リバーシジェネティクス系の効率の向上のための試みを行った。

A. 研究目的

ロタウイルスは、直径 80nm の球状で、三層の構造をとり、最内層であるコアは、VP1, VP2, VP3 から、内層は VP6 から、外層は VP7 と VP4 からなる。コアに含まれるゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA 遺伝子で構成されている。ロタウイルスは、乳幼児嘔吐下痢症の病原体であり、開発途上国では、年間 60 万人の乳幼児の死亡の原因となっている。わが国のような先進国においては、死亡例は少ないものの、重篤な例は多く、入院に占める率は高い。また、胃腸炎以外の疾患との関連が強く示唆されており、特に、脳症・脳炎といった中枢神経系疾患との関連も注目されている。

ロタウイルスの病原性の基盤は明確でない。つまり、ロタウイルスのどの遺伝子のどの領域がロタウイルスの病原性に関与するのかが明確でない。したがって、ワクチンの弱毒化の機構はわからない。そこで、毒力復帰があり得るのか、組換えによる病原性の復帰があり得るのかもよくわからない。さらには、免疫の仕組みもよくわかっていない。こうして、実用的なワクチンの開発が先行した形になっている。病気を起こさないから、弱毒となった、良く効くから、こうした免疫が働いているのだろうといった推測に基づいている。今後、こうした基本的な問題に対して、解析を進める必要があるだろう。

本研究では、こうした背景のもと、各遺伝子の機能を解析することを目的としている。まずは、ロタウイルスの外層タンパ

ク質で、感染防御抗原である VP4 タンパク質の機能の解析を進める。解析の方法として、われわれが世界に先駆けて開発したリバーシジェネティクス系を利用した。

エンベロープウイルスの多くは、表面スパイク蛋白質が宿主プロテアーゼによって切断、活性化されて膜融合活性を獲得することはよく知られているが、非エンベロープウイルスであるロタウイルスも外殻（外層）スパイク蛋白質 VP4 がトリプシンで VP8*と VP5*に切断され活性化されることで感染性を獲得する。今回、ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系を用いて、VP4 上の 3 ヲ所のトリプシン切断部位 R231、R241、および R247 の重要性を検討した。

また、現時点では、VP4 しかリバーシジェネティクスの系が利用できない現状であるので、他の遺伝子に活用できるような改良も試みた。

B. 研究方法

VP4 遺伝子を含む T7 プラスミドの調製

部位変異は、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を利用して、行った。SA11 株の VP4 切断領域内の各アルギニン残基をヒスチジン残基あるいはリジン残基に置換したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築した。

細胞とウイルス

サル腎臓由来細胞株 COS-7、MA104 およ

び CV-1 細胞は、Eagle's MEM + 5%FCS で培養した。

KU//rVP4 (VP4 遺伝子のみ SA11 株由来で他の遺伝子はすべて KU 株由来) を親株として用いた。COS-7 細胞に各プラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしては、ヒトロタウイルス KU 株を感染させた後、KU 株 VP4 に対する中和モノクロン抗体存在下で培養を行い、cDNA 由来 VP4 遺伝子を有する組換えロタウイルス：KU//rVP4-R241K, KU//rVP4-R231K, KU//rVP4-R247K, および KU//rVP4-R231K, R247K を作成した。

抗血清

抗ビリオン抗体は、精製 SA11 ビリオンをモルモットに免疫し得た。抗 VP5 抗体は、2 種の合成ペプチド (SA11 VP5 配列由来) : 296FKPANYQYTYTRDGEEVT313 と 444LDRLYGLPAADPNNNGKE460 を KLH に結合し、ウサギに免疫して得た。

ウェスタンブロッティング

精製ビリオンを SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF 膜にトランスファーした。ウイルスタンパク質は、抗ロタウイルスビリオンか抗ロタウイルス VP5 のポリクロナール抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体で反応させ、化学発光により検出した。

C. 研究結果および考察

ロタウイルスのスパイクタンパク質 VP4 のトリプシン開裂部位には高度に保存されたア

ルギニン残基 R231、R241、および R247 が存在する。これまでに、野生型ウイルスを用いたトリプシン処理において、トリプシンに対する感受性 (切断しやすさ) は、R241>R231>R247 の順序であった。また、バキュロウイルス発現系を用いたウイルス様空粒子を使用した、細胞侵入試験において、細胞侵入には、R247 の切断だけで十分であり、R231 や R241 の切断は必須ではないとの可能性が示されている。そこで、まず R241 をヒスチジンに変異を加え (R241H)、その増殖能を、CV-1 細胞におけるプラーク形成能より検討した。R241H 変異株は野生株と同程度の増殖能およびトリプシン依存性を示した。一段階増殖曲線においても顕著な違いは見られなかった。したがって、アミノ酸 No.241 のアルギニン残基での切断はロタウイルスの感染性の獲得には必須ではないことが示された。

ついで、R231, R241, R247 を R231K, R241K, R247K に変異を導入した組換えロタウイルスを作成した。アルギニン残基の C 末端ペプチド結合を特異的に切断するアルギニルエンドペプチダーゼおよびリジン残基の C 末端ペプチド結合を特異的に切断するリシルエンドペプチダーゼを利用して、231, 241, 247 の切断の意義を確認した。

アルギニルエンドペプチダーゼ処理による感染性獲得を検討した。KU//rVP4-R241K および KU//rVP4-R231K では、アルギニルエン