

A. 研究目的

ロタウイルスは、主に乳幼児が罹患する急性胃腸炎の原因ウイルスのひとつで、年明けから春先に流行のピークが見られる。幼稚園や小中学校だけでなく病院、老人介護施設などの施設でも集団感染を引き起こす。また、ロタウイルスで汚染された食品の摂取による食中毒事例も散見される。

ロタウイルスは、コア、内殻、外殻の3層で構成され、コア内に11本の分節二本鎖RNA (double-stranded RNA : dsRNA) を有する。内殻を構成するVP6の抗原性によりA-G群に分類され、このうちA-C群がヒトに感染する。さらにA群は、スパイクを構成するVP4、外殻を構成するVP7の遺伝子型によって、それぞれP[1]-P[35]、G1-G26に分類される。

ロタウイルスは便中へ多量に排出され、糞便1gに含まれるウイルスは 10^{10-11} 個にも及ぶ。そのため、糞便中の抗原を検出するイムノクロマト法が、ロタウイルスの検出法として広く使われており、現在までに多数の迅速診断キットが市販されている。しかし、これらの多くはA群ロタウイルスを対象として開発されているため、A群以外のウイルスを検出することができない。そのため、全てのロタウイルスを検出する方法としてPCR法が用いられる。PCR法は、ロタウイルスを高感度に検出できることから、糞便のみならず血液、髄液からの検出にも使用される。しかし、群、遺伝子型ごとにプライマーを用意する必要があるため作業が煩雑で、多検体の処理に適していない。

前述のように、ロタウイルスは便中に大量

に存在することから、患者便検体から抽出したゲノムRNAをアクリルアミドゲルで電気泳動すると、エチジウムブロマイドあるいは銀染色により11本の分節を可視化することができる(RNA-PAGE)。RNA-PAGEの泳動パターンは群および遺伝子型によって特徴があり、泳動パターンによる大まかな群、遺伝子型分類が可能である。RNA-PAGEは、安価で一度に多数の検体を処理できるため、分子疫学的手法として古くから用いられている。

このように、ゲノムの泳動パターンから種を分類するシステムは、食品由来感染症起因菌を解析する「パルスネット」として実用化されている。しかしロタウイルスは、RNA-PAGEの泳動条件が統一されておらず、また施設ごとの泳動パターンが異なることから、各遺伝子型の泳動パターンを網羅したデータが存在していない。日本では2011年からロタウイルスワクチンが導入されており、分子疫学を強力に推進させるためにも、ロタウイルスを迅速かつ簡便に分類するシステムが求められる。

RNA-PAGEは、泳動条件が異なると泳動パターンに差が生じるため、施設間で簡単に比較することができない。近年、微小基板上に作製した微細な流路内で電気泳動を行う「マイクロチップ電気泳動」が実用化され、DNAやRNAを分離することが可能となった。この手法で使用されるマイクロチップや試薬は高精度で管理されているため、施設間誤差が小さいという特徴があり、各施設で得られた泳動パターンを容易に比較可能である。そこで本研究では、マイクロチップ電気泳動をRNA-PAGEの代替法として使用することを目的

とし、その泳動条件について検討を行った。

B. 研究方法

1. ロタウイルス dsRNA

ロタウイルス患者の便検体 (KN-6、NT-9) から、TRIzol LS Reagent (Invitrogen) と Direct-zol RNA MiniPrep キット (ZYMO Research) を用いてゲノム dsRNA を抽出した。

2. RNA-PAGE

抽出した RNA は、DEPC 処理した DW にて懸濁し、RNA-PAGE dye を添加した後、10%アクリルアミドゲル (ATTO)、Tris/Glycine SDS buffer にて SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルは SYBR-Gold (Invitrogen) で染色し、トランスイルミネーターにて、RNA のバンドを検出した。

3. マイクロチップ電気泳動

抽出した RNA は、DEPC 処理した DW にて懸濁し、マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA MCE-202: 島津製作所) により分析した。泳動には、MultiNA 専用の試薬キットを使用した; DNA-500 キット、DNA-1000 キット、DNA-2500 キット、DNA-12000 キット (島津製作所)。蛍光色素は、SYBR-Gold (Invitrogen) および GelStar (Takara) を使用した。装置の操作は取扱説明書に準じて行った。施設間誤差の検証実験では、試薬キットに含まれる低分子量マーカーおよび高分子量マーカーの移動度を 0%、100%とし、各セグメントの移動度を数値化して比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来の便材料を用いた研究

であるため、倫理委員会に研究内容を申請し、承認を受けた後に検体採取並びに解析を行った。

C. 研究結果

患者便検体から抽出した KN-6 株および NT-9 株のゲノム RNA を RNA-PAGE により分離し、SYBR Gold で検出した。その結果、セグメント 10, 11 の移動度から、KN-6 がショートタイプ、NT-9 がロングタイプと判別された。また 2 株間でセグメント 2, 3, 4 および 7 の移動度がわずかに異なっていた。

次に、NT-9 株および KN-6 株を用いて、MultiNA によるマイクロチップ電気泳動の条件検討を行った。MultiNA の専用試薬キットは DNA/ssRNA の泳動用に最適化されていることから、DNA 用キット (DNA-500 キット、DNA-1000 キット、DNA-2500 キット、DNA-12000 キット) により dsRNA を泳動可能であるかどうかを検証した。その結果、いずれのキットも dsRNA を分離可能であり、特に DNA-12000 キットが各セグメントを最も分離できることを明らかにした。続けて dsRNA を検出する蛍光色素 (SYBR-Gold、GelStar) の検討を行ったところ、GelStar に比べて SYBR-Gold の方が明瞭なバンドを検出できた。さらに SYBR-Gold の濃度を 1、2、3 倍と変更して泳動した。SYBR-Gold の濃度を 2 倍にしたところ、シグナル強度が増加したことから、バンドを明瞭に検出することができた。一方で濃度を 3 倍にしたところ、シグナルに加えてノイズも増加し、バンドが不明瞭になった。

DNA-12000 キット、および 2 倍濃度

SYBR-Gold の条件下で、KN-6 および NT-9 のマイクロチップ電気泳動を行った結果、セグメント 10, 11 の移動度からショートタイプ、ロングタイプを判別できた。しかし、セグメント 1-4、セグメント 7-9 は分離度が悪く、それぞれが 1 つのクラスターとして検出された。KN-6 のセグメント 5 は NT-9 に比べ、移動度がわずかに遅いように見えたが、バンドが鮮明でないことから判別できなかった。

施設間誤差を検証するため、NT-9 を 3 台の装置で測定した。装置 1 台につき 4 枚のマイクロチップをセットし、各チップ 3 回ずつの測定を行った。合計 36 回の試験について各セグメントの移動度を比較したところ、標準偏差は 0.5 以下であり、測定値間で大きな誤差が認められなかった。しかし、セグメント 1-4 はお互いに距離が近く、各セグメントのエラーバーが重複していた。

C. 考察

マイクロチップ電気泳動は主に DNA および ssRNA を対象としており、ロタウイルスゲノムのような dsRNA の検討は行われていない。そこで本研究では、DNA 用試薬により dsRNA を泳動する条件を検討した。今回使用した MultiNA には DNA 用に 4 種類、RNA 用に 1 種類の専用試薬キットが開発されており、このうちいずれの DNA 用キットでも dsRNA を泳動可能であった。岡山県環境保健センターの葛谷らが RNA 用キットを検討したところ、同様の結果が得られた（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、網羅的ロタウイルス分子疫学基板構築

とワクチン評価 [H24-新興一般-005]）。しかし、RNA 用キットでは還元剤としてホルムアルデヒドを使用するため、DNA 用キットの方が安全面で優れていると考えられた。

泳動条件の検討を重ねた結果、DNA-12000 と SYBR-Gold (2 倍濃度) の組合せが最も分離能が高く、明瞭なシグナルを取得できた。しかし、この条件でも RNA-PAGE に比べると分離能が悪く、特にセグメント 2, 3、セグメント 7-9 は各セグメントが重なってしまい、判別が困難であった。MultiNA における DNA の泳動分離能は、1,000-12,000 bp の範囲において 20% である。本研究で対象としているサンプルが dsRNA であることから直接の比較が難しいが、マイクロチップ電気泳動においてロタウイルス dsRNA はこのレンジに入ることから、分解能が装置の性能の上限に達している可能性がある。なお、一般に、泳動距離を長くすることで分離能が改善されるが、マイクロチップ電気泳動ではチップ上の泳動距離を変更することが不可能であるため、これ以上の改善は難しいと考えられた。

次に施設間誤差を検証するため、3 台の装置でそれぞれ 4 枚のマイクロチップをセットし、各マイクロチップで 3 回の測定を実施した。「研究方法」で記述した通り、各セグメントの移動度を数値化し、合計 36 回の測定値を比較したところ、各測定値で誤差がほとんど認められなかった。このことから、マイクロチップ電気泳動は、異なる施設でも dsRNA を安定かつ正確に分離できることが示唆された。しかし、セグメント 1-4 のエラーバーが重複していたことから、移動度のみでは比較が難

しくなると予想された。これを解決する方法として、セグメント間の距離を算出し、この数値を組み合わせて評価することも考えられた。今後はさらに多くのサンプルデータを蓄積することで、セグメント 2, 3 およびセグメント 7-9 が未分離の状態でも、高精度に群・遺伝子型を分類するための条件を検討する。

E. 結論

マイクロチップ電気泳動によりロタウイルス dsRNA の安定した泳動パターンを取得できることが示唆された。今後は、さらに多くのサンプルを分析することで、比較する指標の検討、再現性について検討していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 細胞への結合に関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）

「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの
構築に関する研究」

平成 24 年度研究分担報告書

ロタウイルスの RNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類法の検討

研究分担者 藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGE のバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5 の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。この結果から、RNA-PAGE によるパターン分類法を利用して、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ロタウイルス (RV) は乳幼児の重症胃腸炎の最大の原因であり、我が国における年間の患者数は 70-80 万人、入院数は 7-8 万人におよぶと推定されている。時に腎炎や腸重積、脳炎・脳症などの重篤な合併症を引き起こすこともあり、年間数人から 10 人前後の患者が、RV が原因で命を落としている。また、RV は教育施設や老人施設などで集団感染を引き起こす事も多く、食中毒の原因として検出される事例も散見されており、公衆衛生上も問題視されている。

RV はコア、内殻、外殻の三層構造を有するウイルスであり、そのゲノムは 11 分節からなる二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) で構成されている。RV のゲノムは非常に多様性が高く、11 本の遺伝子分節それぞれに多数の遺伝子型が存在している。実際にヒトの間で流行している RV 株も地域や時期によって大きく異なる事があり、非常に多彩な様相を呈している。ウイルス株の遺伝子型を記載する場合には、11 分節の遺伝子型を VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 (Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx - Ex - Hx) の順に羅列する方法が取られているが、それぞれの株の遺伝子型を全て決定するには多大な労力と時間を要する。従って、RV の流行株を詳細に幅広く把握するのは容易ではない。

地研などの検査室では、RV の検出法としては ELISA 法や RT-PCR 法およびシーケンス解析を行うことが通例となっているが、RV 研究者の間では、ポリアクリルアミドゲル電気泳

動 (RNA-PAGE) によりウイルスゲノムを直接検出できる事がよく知られている。RV 感染患者の便 1g には 10 の 10 乗~12 乗もの大量のウイルス粒子が存在している為、便検体から抽出した RNA について RNA-PAGE を行うと 11 本の遺伝子分節に由来するバンドを容易に検出できる。しかも、そのバンドパターンは遺伝子型の違い或いは僅かな塩基配列の違いにより泳動度が異なって現れる。この性質を利用し、RV の流行株を容易に把握するシステムを構築するため、RNA-PAGE の各種条件および検体間のバンドパターンと遺伝子型の相関性について検討を行った。

B. 研究方法

本実験には、当研究室にて保管している全国の病院から収集した RV 胃腸炎による入院症例の便検体を用いた。便検体から 10%PBS 懸濁液を調製し、TRIzol[®] LS Reagent (Life technologies) および Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO Research) を使用してウイルス RNA の抽出を行った。RNA-PAGE には、10%ポリアクリルアミドゲル (アトー) を用い、Tris/Glycine buffer にて 30 mA、100 min 電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 10000 倍希釈した SYBR-Gold (Life technologies) で 60 min 染色し、トランスイルミネーターにて RNA のバンドを検出した。また、一部の検体についてはウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定して RNA-PAGE パターンとの関連性を検討した。

C. 研究結果および考察

RNA-PAGE に用いるサンプル RNA の抽出方法について検討を行った結果、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) では、ほとんど RNA のバンドを検出できなかった。一方、TRIzol[®] LS Reagent (Life technologies) を用い、インプロパノール沈殿または Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO Research) で抽出するとバンドが明確に検出され易かったため、この TRIzol[®] LS Reagent を用いる方法をスタンダードとして採用した。

塩基配列解析の結果から、本研究に使用した検体の VP7 遺伝子型は G1、G3、G9 の 3 種類のみである事が判明した。この内、RNA-PAGE で明確なバンドが検出された 123 検体について、そのバンドパターンを比較解析した。RNA-PAGE により、RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で検出された (サイズは株により異なるため、およその値で示している)。VP2 と VP3 のバンドは近接しているため、株によっては 1 本のバンドとして検出された。概ね C1-M1 タイプは 2 本の分離したバンドとして検出できるが、C2-M2 タイプは分離できずに 1 本のバンドであるかのように見える傾向があった。NSP1 と VP6 のバンド間隔についても遺伝子型による違いが見られ、I1-A1 タイプは I2-A2 タイプと比較して明らかに間隔が狭かった。VP7、NSP2、NSP3 のバンドも近接しているため、バンドの数が実際より少なく見える事が多かった。およその傾向とし

ては、N1-T1 タイプはバンドが 1 本+2 本 (1 本目と後の 2 本の間と比較的大きな隙間がある) に分かれ、N2-T2 タイプは 2 本+1 本に分かれていた。VP7 遺伝子型の傾向で見ると G1 タイプは比較的バンドの間隔が広く、G1 > G9 > G3 の順に間隔が狭くなっていた。また、G9 には比較的間隔の広い株と、間隔が狭く 3 本のバンドがほぼ 1 本に重なっている株の 2 種類が認められた。NSP5 については H2 タイプのみ 820 bp 前後のサイズがあるため、他のタイプと容易に区別することができた。

E. 結論

RV の塩基配列解析の結果と RNA-PAGE のバンドパターンとの比較から、RNA-PAGE によりウイルス株の遺伝子型をある程度推測する事が可能であると考えられた。この PAGE パターン分類法を利用すれば、RV 流行株を広範囲かつ簡便に調査するシステムを構築可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012; 56:630-638.
- 2) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S,

Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. J Imm Method 2012, 384:81-91

2. 学会発表

- 1) 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(大阪) 2012年11月13-15日
- 2) 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(大阪) 2012年11月13-15日
- 3) 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細胞への結合に関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(大阪) 2012年11月13-15日
- 4) 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クスシステム 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2012年11月13-15日
- 5) 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(大阪) 2012年11月13-15日

- 6) 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(福岡)、平成24年12月11-14日
- 7) 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(福岡)、平成24年12月11-14日
- 8) 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(福岡)、平成24年12月11-14日
- 9) 藤井克樹: ロタウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会第24回学術集会(大阪) 2012年11月12日
- 10) 藤井克樹: ロタウイルスゲノム解析と分子疫学 衛生微生物技術協議会第33回研究会(横浜) 2012年6月28-29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 24 年度 厚生労働省新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築
に関する研究」

平成 24 年度研究分担報告書

研究分担者 三瀬敬治：札幌医科大学医療人育成センター
GutVirus Web の構築

研究要旨

前研究班で構築された CaliciWeb は、ノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）、サッポロウイルス（サポウイルス、SaV）等のカリシウイルスを対象としたデータベース、疫学情報サイト CaliciWeb は、本年度観察された NoV GII.4 2012 変異株の大流行を捕らえ、注意喚起を行うなど、NoV の流行制御、予防衛生に多大な貢献を果たした。本ウェブサイト構築された NoV, SaV 等の Calici virus に特化したサブデータベースは、国内外を問わず、利用者数も多く、研究者の間で重要な位置を占めている。本研究班では、CaliciWeb を引き継ぐだけでなく、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスを新たに加えて GutVirus Web を中心として拡大整備し、流行予測プログラムの開発・ページへの組み込みを行いつつさらなる充実を図る。本年度は、ロタウイルスの分子疫学の基盤構築のため、データベースにロタウイルスの情報を収載し、利用できるようにした。

A. 報告

下痢症ウイルスデータベース並びに情報共有サイトの構築と改良維持

1. カリシウェブの運用

平成 25 年 1 月 29 日現在ユーザー登録数は 236 人、ウイルスデータベースの登録データ数 46,216 件、うちカリシウイルス 21,675 件、ロタウイルス 25,891 件である。これは平成 24 年と比較して、登録者数 34 人、ウイルス総データ数約 9,000 件、カリシウイルス約 4,000 件、ロタイウスル約 5,000 件の増加であった。

過去 1 年におけるカリシウェブトップページへのアクセス数は約 9,200 回、カリシウイルスおよびロタウイルスデータベースへのアクセス数は約 8,600 回であった。これは一昨年度と比較して、トップページで 3,600 回、データベースで 6,200 回増加し

ている。データベースが多く利用されてきていることが示されている。

2. カリシウェブの改善と GutVirusWeb への再構築

平成 22 年度に公開したカリシウェブに対して今年度行い、公開した変更点は以下の通り。

英語表記のページを作成し、国際的な運用の準備が進んだ。(図 1)

国際的な情報発信を行うに当たり、セキュリティポリシーの見直しを行った。

ダウンロードに登録した共有データを、登録メンバーとしてログインした者のみダウンロードできるレベル、ログインしなくてもダウンロードできるレベルの二段階に管理者が設定できるように機能強化を行った。

- ・フォーラムの書き込みストップ機能
- ・クローズドフォーラムのタイトルをログイン前ユーザーでも見えるようにした。
- ・記事タイトルのツリー表示時に、折りたたみ表示が出来る機能の追加を行った。

3. 系統樹作成サービス「楽しカリシ」の運用

カリシウェブ内のプライベートフォーラムを用いて、平成 21 年 7 月から開始した系統樹作成サービス「楽しカリシ」は順調に解析データを増やし、平成 25 年 1 月 29 日現在の登録者数 83 解析データ数 157 である。

4. 今後の計画

平成 25 年度以降の計画は以下の通りである。

- ・英語でのフォーラム運用
公開された英語メニューを利用し、カリシウェブを国際的情報交換の場として運用する。
- ・総合的 GutVirusWeb への展開

カリシウイルスのデータベースからスタートしたカリシウェブであるが、多くの要望から平成 23 年度にロタウイルスのデータベースを追加した。さらに多種のウイルス登録の要望もある。今後、総合的な国際ウイルス性腸炎情報サイト、「GutVirusWeb」として発展的に展開していく。

B. 健康危険情報

なし

C. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

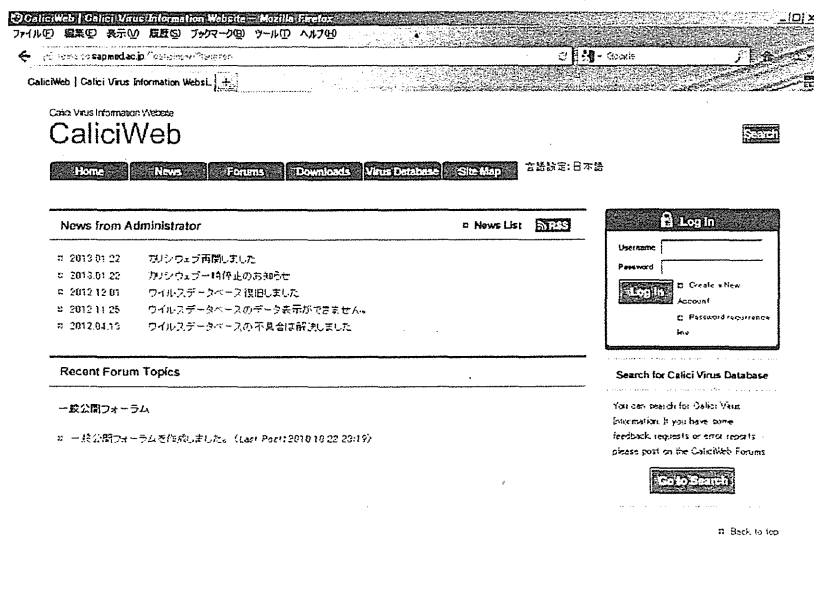


図 1. 英語表記のトップページ

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）

「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」

平成 24 年度研究分担報告書

ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化機構の解明

研究分担者 鈴木 善幸

名古屋市立大学 大学院システム自然科学研究科

研究要旨

ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節に分かれているため進化の過程で遺伝子再集合により新たな流行株が産生されることがあり、遺伝子再集合による進化を予測・制御することは医学的に重要と考えられる。そこで本研究課題においては、ロタウイルスの遺伝子再集合による進化機構を解明することを目的とする。本研究課題を遂行するにあたり、ロタウイルスと同様に分節型のゲノムを持ち同様の遺伝子再集合による進化機構を有すると考えられ、ロタウイルスよりも国際塩基配列データベースに登録されている配列数が多いインフルエンザウイルスについても並行して解析を行うことは有用であると考えられる。本年度においては、インフルエンザウイルスのゲノム分節において 5' 末端と 3' 末端が塩基対を形成しているのか、またどのように塩基対を形成しているのかを検討することを目的として解析を行った。インフルエンザウイルス 506 株のゲノム配列を Influenza Virus Resource より取得しそれぞれのゲノム分節の両端の相補性を検討したところ、4-7 塩基が相補的であること、相補的な塩基対はゲノム分節ごとに特異的であることが明らかになった。また、それぞれのゲノム分節において両末端の相補的な塩基対は高度に保存されているが、6 番目のゲノム分節についてのみ相補性は保存されているものの塩基対の保存性は比較的低く、共進化していることが明らかになった。6 番目のゲノム分節の系統樹解析により、末端の配列は系統的に離れた株間で共有されている場合が多く観察された。以上の結果から、インフルエンザウイルスのそれぞれのゲノム分節の両末端は塩基対を形成していることが確かめられ、株間で遺伝子組換えが生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ロタウイルスのゲノムは2本鎖RNAであるが11本の分節に分かれている。そのため、進化の過程で遺伝子再集合により新たな流行株が産生されることがあり、ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化を予測・制御することは医学的に重要であると考えられる。この目標を実現するための基礎研究として、本研究課題においては、ロタウイルスにおける遺伝子再集合による進化機構を解明することを目的とする。

一般に進化は、生物集団中に突然変異によって変異体が生じ、それが自然選択や遺伝的浮動によって広まっていくことによって起こる。したがって、遺伝子再集合による進化を考える上でもこれらの機構を考えることが重要となる。遺伝子再集合による進化を考える場合、変異体の産生機構としてはパッケージング機構、自然選択圧としてはゲノム分節がコードする蛋白質の抗原性や相互作用などが挙げられる。

ロタウイルスのパッケージング機構は不明である。しかしながら、パッケージングには各ゲノム分節の末端が重要であると考えられている。先行研究において、各ゲノム分節の塩基配列は末端で塩基多様度が低下している、すなわち保存性が高くなっていることが報告されているが、この結果はあまり明確でなく、より多くの配列を用いた再解析が必要と考えられる。

現在考えられているパッケージング機構においては、ロタウイルスの各ゲノム分節の両末端には相補的な塩基が存在して塩基対を形

成し、さらに2次構造を形成するだろうと考えられている。しかしながら、これらの構造がどのようにパッケージングに関与するのかわかっておらず、これらの塩基対や2次構造を用いたパッケージングモデルを構築する必要がある。

一方、自然界で観察されたロタウイルス株の配列解析から進化の過程でどのような遺伝子再集合体が産生され生き残ってきたのかを推測することにより、ロタウイルスのパッケージング機構や変異体の適応度に関する情報が得られると考えられるが、それも容易ではなく、例えばインフルエンザウイルスにおける解析では、進化の過程で全ての組合せのゲノム分節が組換えられたことまでは明らかにされているが、どの組合せのゲノム分節が組換えられやすいかといった相対頻度の推定まではできていない。

このような状況を踏まえ、本研究課題においては、ロタウイルスのゲノム分節末端に働いている自然選択圧の検出、進化の過程でゲノム分節間に生じた遺伝子再集合の相対頻度の推定、ロタウイルスのパッケージング機構のモデル構築を目標とする。

本研究課題を遂行するにあたり、ロタウイルスと同様に一本鎖RNA（マイナス鎖）ではあるが分節型のゲノムを持ち、同様の遺伝子再集合による進化機構を有すると考えられ、さらにロタウイルスよりも国際塩基配列データベースに登録されている配列数が多いインフルエンザウイルスについても並行して解析を行うことにより、ロタウイルスの遺伝子再集合による進化機構について有用な仮説が得

られるのではないかと考えられる。

したがって、本年度においては、インフルエンザウイルスのそれぞれのゲノム分節において、5' 末端と 3' 末端が塩基対を形成しているのか、またどのように塩基対を形成しているのかを検討することを目的として解析を行った。

B. 研究方法

1. 配列データ

全ゲノム分節の塩基配列が全長にわたって決定されているインフルエンザ A 型ウイルス 506 株について、ゲノム配列を Influenza Virus Resource より取得した。これらの株は、トリ、イヌ、環境、ウマ、ネコ、ヒト、ブタから由来しており、ヘマグルチニンについての H1-H16 の亜型のうち 14 亜型、ノイラミニダーゼについての N1-N9 の亜型のうち 8 亜型を含んでいる。

2. 配列解析

上で得られたインフルエンザ A 型ウイルス 506 株について、それぞれのゲノム分節の 5' 末端の 14-21 番目の塩基座位における塩基の頻度、3' 末端の 13-20 番目の塩基座位における塩基の頻度、さらに 5' 末端と 3' 末端の間においてこれらの塩基座位が相補的である頻度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

インフルエンザ A 型ウイルスのそれぞれのゲノム分節の 5' 末端の 14-21 番目の塩基座位と 3' 末端の 13-20 番目の塩基座位における塩基の保存性は 90%以上と高いことが明らかになった。さらに、ゲノム分節の両末端の間では 4-7 塩基が相補的であること、相補的な塩基対はゲノム分節ごとに特異的であることが明らかになった。

また、それぞれのゲノム分節において両末端の相補的な塩基対は 90%以上と高度に保存されているが、6 番目のゲノム分節については、相補性は保存されているものの相補的な塩基対の保存性は比較的低く、両末端において相補的な塩基対が共進化していることが明らかとなった。また、6 番目のゲノム分節の系統樹解析により、末端の配列は系統的に離れた株の間で共有されている場合が多く観察された。

D. 考察

以上の結果から、インフルエンザ A 型ウイルスのそれぞれのゲノム分節の両末端は塩基対を形成していること、相補的な塩基対は保存性が高いことが確かめられた。このことから、ゲノム分節のそれぞれは保存されたパンハンドル構造を形成していることが支持される。

また、6 番目のゲノム分節において系統樹解析を用いて共進化のパターンを詳細に解析することにより、共進化は異なる株間で遺伝子組換えが生じて起こっている可能性が示唆された。

E. 結論

インフルエンザ A 型ウイルスのそれぞれのゲノム分節は高度に保存されたパンハンドル構造を形成する。またインフルエンザ A 型ウイルスゲノムにおいては遺伝子組換えが起きている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. *Infection, Genetics and Evolution* 2013, 13:175-179.

2. 学会発表

1) Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Positive selection for gains of N-linked glycosylation sites in hemagglutinin during evolution of H3N2 human influenza A virus. *SMBE 2012*, Dublin, Ireland, June, 2012.

2) Yoshiyuki Suzuki and Yuki Kobayashi: Positive selection for gains of N-linked glycosylation sites in hemagglutinin during evolution of H3N2 human influenza A virus. *Influenza2012: One Influenza, One World*, Oxford, UK, September, 2012.

3) Yoshiyuki Suzuki : Roles of N-linked

glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. The 1628th Biological Symposium, National Institute of Genetics, Mishima, Japan, November, 2012.

4) 鈴木 善幸 : ウイルスの進化学的研究. 名古屋大学、名古屋、2012.5.

5) 鈴木 善幸 : Evolution of endogenous Borna-like nucleoprotein elements. 日本進化学会第14回大会ワークショップ「ゲノム構造進化の分子機構」、南大沢、2012.8.

6) 鈴木 善幸 : Reassortment in evolution of viruses with segmented genomes. ウイルス性下痢症研究会第24回学術集会、中之島、2012.11.

7) 鈴木 善幸 : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. 京都懇談会、京都大学、2012.11.

8) 鈴木 善幸 : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ「ウイルス進化の統合生物学的研究」、福岡国際会議場・マリメッセ福岡、福岡、2012.12.

9) 鈴木 善幸 : Roles of N-linked glycosylation and net-charge of hemagglutinin in influenza virus evolution. 第22回生物多様性研究センターセミナー、名古屋市立大学、名古屋、2013.1.

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）
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」
平成 24 年度研究分担報告書

ノロウイルスタンパク質の構造解析

研究分担者 朴 三用 横浜市立大学
研究分担者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

本研究は、発現タンパク質のデザイン、結晶化、X線構造解析など全てのステップにおいてX線による構造解析の高度な技術・知識を有する横浜市立大学の朴三用教授の指導の下、実施された。本報告書は、連名とする。

研究要旨

本研究で構築を目指す GutVirusWeb は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。ノロウイルスにおいて、ORF1 にコードされる VPg, ORF3 にコードされる VP2 は、構造タンパク質と非構造タンパク質の性質を併せ持つことが予測されている興味深い多機能タンパク質である。本分担研究では、分子構造の明らかにされていないこれら 2 種類のタンパク質の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化することを試みた。ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の VPg, VP2、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の VPg, VP2 のコドンで大腸菌用に最適化して遺伝子人工合成を行った。人工合成フラグメントは、pCold ベクターにクローニングしコールドショックによる大量発現をおこなった。VPg, VP2 タンパク質共に不要化画分へ移行しやすく、可溶化画分に回収されたタンパク質も、透析中に析出しやすい傾向があった。

A. 研究目的

前研究班の研究活動では、CaliciWeb では、NoV、SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティクスによる解析を行った。CaliciWeb は現在、グローバル NoV net work の NoroNet とのコラボレーシ

ョンも実現しつつある。さらに、本研究活動により提案された NoV の病原性変化を対象とした非構造タンパク質領域をターゲットとした、NoV の新規分類方法が提案されている。本研究では、構築を目指す GutVirus Net は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造

のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。本分担研究では、分子構造の明らかにされていないVPg, VP2の2種類のタンパク質のX線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化することを試みた。ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201株のVPg, VP2、マウスノロウイルス (MNV) S7株のVPg, VP2のコードを大腸菌用に最適化して遺伝子人工合成を行った。

B. 研究方法

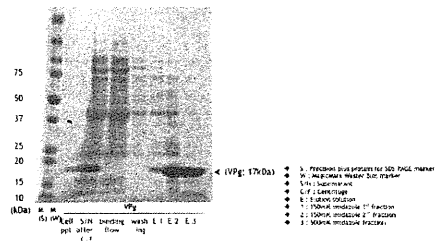
HuNoV U201株のVPg, VP2, MNV-S7株のVPg, VP2コード領域を大腸菌のコードに最適化して、人工合成し、pCold-TF, pColdにInFusion cloning systemによってクローニングした。これらが大腸菌 BL-21 に transformation して、HisTag タンパク質の発現を行った。コールドショックによる大量発現は、30℃にて6時間から8時間の増殖の後、IPTG を添加し、12℃にて一晩発現させた。大腸菌は、超音波処理し、細胞を破砕した後、上清を分取してタロンビーズに結合させて精製した。溶出にはイミダゾールを用いた。

C. 研究結果および考察

HuNoV U201 の HisTag-VPg は、17 kDa の Band として可溶性画分に発現し、タロンビーズによる精製の結果、17 kDa のメインバンドを精製可能であった。

Results

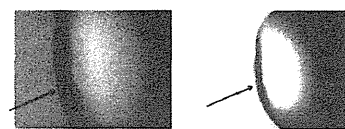
Norovirus GII-3 (U201) VPg (pCold 1 vector : BL21 codon plus com. cell)
His-tag column purification test (SDS-PAGE)



VPg をゲル濾過カラムで再度精製し、透析濃縮後、結晶化を試行したところ、結晶用の構造物を得た。本結晶用構造物にスクリーニング用 X 線を照射し、回析パターンを調べたところ、結晶の純度不十分、もしくは disorder site があるため解析可能な回析パターンは得られなかった。

Results

Norovirus GII-3 (U201) VPg
Protein structure screen test (small scale)



QIAGEN screening kit : IC5G+ A-1

Crystallization condition : 0.2M Li2SO4, 0.1M Na-acetate, 50%(v/v) PEG400

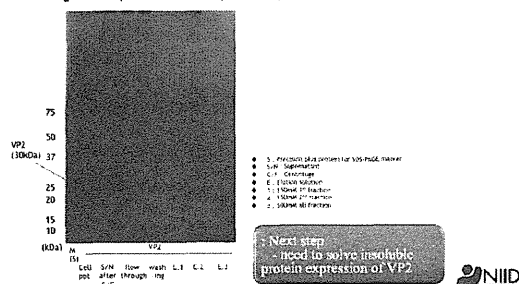
: The molecular weight of the correct size was confirmed by mass spectrometry
: However, failed to analysis crystal structure using this VPg protein
- increasing protein concentration was impossible



発現させた HuNoV U201 VP2 は、30 kDa, 34 kDa の 2 本のバンドを形成した。これらをタロンビーズでの精製を試みたところ、溶出中に 34 kDa のバンドのほとんどと、30 kDa のバンドの半量以上が消失した。

Results

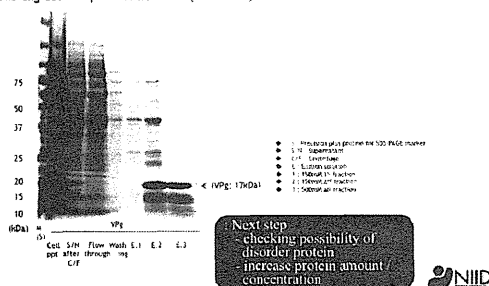
Norovirus GII-3 (U201) VP2 (pCold 1 vector / BL21 codon plus com. cell)
His-tag column purification test (SDS-PAGE)



次に、MNV の VPg と VP2 の発現を試みた。MNV VPg は、HuNoV と同様に 17 kDa のメインバンドが検出できた。しかし、MNV VPg の場合、その他に 15, 10 kDa の 2 本のバンドが確認された。全ての発現産物は、大部分が不溶性画分に存在していた。可溶性画分の発現タンパク質をタロンビーズによって精製したところ、17 kDa のメインバンドと 15 kDa のバンドが回収された。

Results

Murine norovirus VPg (pCold 1 vector / Arctic Ex. com. cell)
His-tag column purification test (SDS-PAGE)



結晶化のため、ゲル濾過により、2つのバンドの分取を試みたが、完全に単離することは困難であった。MNV VP2 の発現量は、可溶性画分には極めて微量な VP2 が含まれるのみであり、そのほとんどが不溶性画分に移行することが明らかになった。微量な可溶性画分の VP2 をタロンビーズによって精製したところ、VP2 を回収できなかった。

E. 結論

ヒトノロウイルス (HuNoV) GII. 3 U201 株の VPg, VP2、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の VPg, VP2 のコドンが大腸菌用に最適化して遺伝子人工合成を行った。人工合成フラグメントは、pCold ベクターにクローニングしコールドショックによる大量発現をおこなった。VPg, VP2 タンパク質共に不要化画分へ移行しやすく、可溶化画分に回収されたタンパク質も、透析中に析出しやすい傾向があった。単独の発現は、難しく、困難が予想された。次年度は、protease 等結晶構造が解析された安定した構造を持つタンパク質と組み合わせた融合タンパク質として発現させ、可溶化と結晶化を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 rotavirus based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 2012; 56:630-638.

2. 学会発表

- 1) 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(大阪)2012年11月13-15日

- 2) 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(大阪)2012年11月13-15日
- 3) 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細胞への結合に関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(大阪)2012年11月13-15日
- 4) 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クスシステム 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月13-15日
- 5) 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(大阪)2012年11月13-15日

- 6) 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(福岡)、平成24年12月11-14日
- 7) 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(福岡)、平成24年12月11-14日
- 8) 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(福岡)、平成24年12月11-14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 24 年度)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<p><u>Masakado</u> <u>Matsumoto</u>, Reiji Hiramatsu, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzukil, Yoshio Miwa, Mitsutaka Yabutani, Yuhki Nagai, Michiyo Tsuchiya, Makiko Noda, Akihiro Nagata, Keiko Kawakami, Tomoko Shima, Norio Tatsumi and Hiroko Minagawa</p>	<p>Phenotypic and Genetic Analyses of <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> Lior Serotype 76 Isolated from Chicken Meat and Clinical Specimens.</p>	<p>pn. J. Infect. Dis.</p>	66	72-75	2013
<p>Taguchi M, Kawahara R, <u>Seto K</u>, Harada T, Kumeda Y</p>	<p>Extended-Spectrum β-Lactamase- and AmpC β-Lactamase-Producing <i>Salmonella enterica</i> Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011.</p>	<p>Jpn. J. Infect. Dis.</p>	65	555-557	2013
<p>Ooka T, <u>Seto K</u>, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T</p>	<p>Clinical Significance of <i>Escherichia albertii</i>.</p>	<p>Emerg Infect Dis.</p>	18	488-492	2012