

た(図 3)。しかし、 $1.0 \times 10^2$  コピー/g 以下ではバンドが不明瞭であった。明確なバンドが認められた  $3.5 \times 10^3$  コピー/g のレーンからバンドを切り出してシーケンスを解析したところ、汚染に用いた NoV の塩基配列であることが確認できた。同様に 35 コピー/g のレーンから 344bps 近傍に位置する部分のゲルを切り出し、そこに含まれる DNA 断片のシーケンスを解析したところ黄色ブドウ球菌(ブ菌)の 16s リボソームの塩基配列であった。

## 2. 問題点の理論的検討

逆転写反応も PCR も、起点はハイブリダイゼーションであることから、反応系を単純すると 2 種類の分子の会合ということになる。従って、そこには会合定数(K)というものが存在し、さらにはそれぞれの分子の濃度が関係するため、質量作用の法則から、

$$K = \frac{[PT]}{[P][T]}$$

で表される。ここでは、[P]と[T]はそれぞれプライマーとテンプレートが反応系中で独立して存在している濃度、[PT]はそれらが会合して生じたハイブリダイゼーション分子の濃度とする。この式から、ハイブリダイゼーションが成立した分子の濃度を求めると、

$$[PT] = K[P][T]$$

となる。実際の反応に当てはめると、K がプライマーの特異性に相当し、理想的な特異反応ならば K が大きくなり、非特異反応ならば小さくなる。ところが、非特異反応において K が小さかったとしても、[T]が圧倒的に

大きければ、結果として[PT]も大きくなる。本研究で直面している問題は、NoV の[PT]よりもブ菌の[PT]がはるかに大きいということに帰結する。食品汚染の NoV は「何コピー・・・」といった数字で論じられているのに対して、パントラ法で投入されるブ菌は肉眼で見える量であることから天文学的なコピー数になることが当然のごとく予想される。従って、個々のプライマーの特異性や PCR の反応条件(いずれも K に影響)にのみ着目しても解決には至らない。例えば、非特異反応の割合が 1 万分の 1(K に相当)である一方で、量的な差が 1 億倍([T]に相当)あったならば、プライマーの特異性が容易に相殺されてしまうことになる(NoV とブ菌の量的な差はもっと大きい)。

## 3. 逆転写反応専用プライマーの考案

個々のプライマーの特異性や PCR の反応条件の改良では問題に対応できないことから、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の 3 段階の反応を一つのものとして俯瞰することで解決の糸口を見出した。すなわち、非特異反応にも種類があり、本来ならばそれぞれの反応段階における非特異反応の内容が違うはずである。ところが、実際には NoV とブ菌の圧倒的な初期濃度差が解消されることなく最後まで反映されていた。そこで、逆転写反応に用いるプライマーの影響を比較しながら、最終的に NoV の遺伝子のみが検出される方法を模索した。

ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、 $10^5$  コピー/g のような高濃度汚染サンプルでは高い回収率が得られるものの、低濃度汚染になるにつれ急激に回収率が落ちて、PEG 沈澱法の方が好成績になるという逆転

現象がすでに観察されている(東方美保、他:平成20年度厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」報告書)。図4のレーン3~6に示したとおり、ポテトサラダをベースとした100コピー/g以下の低濃度汚染サンプルでは、semi-nested RT-PCRを行ってもバンドが観察されず、semi-nested real-time PCRでも増幅が認められなかった。

G2SKRのようなPCRと同じNoV特異的プライマーを使うと、ブ菌の遺伝子が最後まで混入することが昨年度の研究で明らかになっており(図3)、今年度改めて行った検討でも同様の結果であった(図4レーン8~11)。ランダムプライマーで逆転写反応を行った場合と比べて、semi-nested real-time PCRでは増幅が認められたが、電気泳動で明瞭なバンドが観察できず、遺伝子解析は困難であった。ゲル上で薄く見えるバンドを切り出してシーケンスしたところ、レーン8と9はノイズが多すぎて判読不能であり、レーン10と11からはブ菌の16Sリボソームの配列が検出された。

以上の結果から、逆転写反応の段階でPCRとは異なる専用プライマーを用いることが重要と考えられたため、表1に示すとおり逆転写反応専用プライマーを設計した。設計にあたっては現行のreal-time PCRの原著(Kageyama T., et. al., J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003)に記載のあるウイルス株の配列を参照し、G1SKRやG2SKRより3'側に保存領域を求めたが、全てのウイルス株をカバーできる領域は見つからなかった。そこで、ウイルス株を部分的な相同性を指標に2~3のグループに分割し、それぞれに対応するプライマーを混合

使用する方針をとった。次にこうして得られたプライマー配列がAT-richでTmが低く、そのままでは反応効率に影響するため改良を加えた。PANR-G2では塩基長を長くすることで十分なTmを確保することができた。PANR-G1は、塩基長を長くすると縮重度(特異性に影響する)がランダムプライマーと変わらなくなることから、LNA(Locked Nucleic Acid)修飾(Elmén J., et. al., Nuc. Acid Res., 33, 439-447, 2005)を使って強制的にTmを上昇させた。このような方針で設計された逆転写反応専用プライマーを用いてcDNAを合成し、semi-nested RT-PCRを行ったところ、図5Aに示すとおり35コピー/gの汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが観察され、それをシーケンスしたところ最初に添加したNoVのものであることが確認された。また、2nd.PCRをreal-time PCRで行った結果とも一致した。

#### 4. PCRの反応系の検討

逆転写反応専用プライマーを用いることで、ブ菌遺伝子の混入を抑制し、遺伝子解析可能なNoV増幅断片を得ることが可能になった。一方で、現在用いられているPCRの反応系は10年以上前のプロトコルを踏襲しており、より高度な機能を付加された最新の酵素を活用できていない。そこで、パントラ法の開発を機にPCR反応系の改良を試みた。図5Bにはホットスタート機能を備えた酵素を用いたタッチダウンPCRによるsemi-nested RT-PCRの効果を示した。従来の反応系(ノーマルPCR)である図5Aと比べると増幅バンドがより明瞭になっているのがわかる。そのバンドをシーケンスしたところ、添加したウイルスのものであることが確

認できた。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致している。図 5A と図 5B の semi-nested real-time PCR の反応液を回収して電気泳動を行ったものが図 6 である。1st.PCR をノーマル PCR で行った図 6A と比べて、ホットスタート&タッチダウン PCR を行った図 6B の方が非特異的なバンドが少ないのがわかる。この差は、real-time PCR の機器画面における蛍光強度(増幅カーブの高さ)の違いとなって現れる。

#### 5. NoV-GI への対応

これまでの検討で、逆転写反応専用プライマーによる cDNA 合成と、ホットスタート&タッチダウン PCR が有効であることが判明したため、引き続き NoV-GI に対する検討を行った。逆転写反応専用プライマーは表 1 に示したとおりである。ポテトサラダを用いた検討では、35 コピー/g の汚染レベルまで semi-nested RT-PCR により明瞭なバンドが認められた(図 7)。このバンドをシークエンスしたところ、添加ウイルスのものであることが確認された。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致した。一方で、逆転写反応専用プライマーである PANR-G1a は、十分な Tm を確保するために LNA 修飾を用いていることから、図 8 においてその効果を検証した。LNA 修飾をしていない PANR-G1a の配列で合成したプライマーでは増幅が弱いことがわかる(図 8 レーン 4)。

#### 6. 実事例への適用例

平成 24 年 3 月 17~19 日にかけて島根県浜田市で発生した弁当による食中毒事例に本法を適用し、ノロウイルス検出に加えて遺

伝子解析にも成功した。詳細は、本報告書の、「飯塚節子、他: パンソルビントラップ法による食品中からのノロウイルス遺伝子の検出 - 弁当屋を原因施設とした集団ノロウイルス食中毒事例から -」を参照されたい。

### D. 考察

#### 1. 混入するブ菌遺伝子の功罪

本法は食品乳剤にブ菌を投入して、菌体表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA にブ菌の遺伝子が大量に混入してくるという性質がある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果がある。このことは、サザンブロットハイブリダイゼーション等において、極微量のプローブに大量のサケ精子 DNA を添加するのと同じ理由である。その一方で、検出された遺伝子をさらに詳しく解析しようとする際に妨害物質になるという問題がある(図 3)。純粋な Protein A を固定化したビーズを使用すると、キャリアーの効果が得られなくなることに加えて、単位体積当たりの表面積が小さい(粒子径が大きい)ことから、十分な感度が得られないことがわかっている。従って、ブ菌遺伝子のキャリアーとしての長所を活かしつつ、遺伝子解析の障害とならないような方法を考案する必要があった。

#### 2. 逆転写反応と PCR で使用するプライマーと、検出プロセスで起こり得る反応

逆転写反応や PCR には多くの種類のプライマーが用いられるが、本研究の課題においては個々のプライマーの特異性を検討しても有効な策が打ち出せないことは、

$$[PT]=K[P][T]$$

の式から明らかである(Kのみを最適化しても、圧倒的に大量に存在するブ菌の[T]には抗し得ない)。そこで、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCRの3段階の反応を一つのものに見なして、どのような反応が起こっているかを理論的に検討し、実験で確認する作業を行った。ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、100コピー/g以下の低濃度汚染サンプルでは、全く増幅が起こらなかった(図4レーン3~6)。この場合は、NoVもブ菌も含めて反応系に存在する全てのRNAが基質となるため、逆転写酵素の能力をはるかに超えてしまった(酵素反応速度が飽和した)状態になっているものと考えられる。オリゴ(dT)を用いた逆転写反応も同様と予測される。

G2SKRのようなPCRと同じNoV特異的プライマーを使うと、ランダムプライマーよりはブ菌に対するKが小さくなるため、相対的にNoVのRNAを逆転写する割合は増えることが予想される。しかし、ブ菌に対する非特異反応もゼロではなく、元々ブ菌の[T]が圧倒的に大きいため、無視できないくらいのブ菌由来cDNAが生じることになる。そのcDNAは末端がG2SKRの配列になっているため、1st. PCRではホモロジー100%で効率よく増幅される。最初から多かったブ菌の遺伝子がこの段階でさらに増えるため、NoVのPCR産物に混入して解析の障害となる(図4レーン8~11)。

本研究で考案した逆転写反応専用プライマーでcDNAを合成した場合、上記のごとく非特異反応はゼロではないためブ菌の

cDNAが生じるところまでは同じである。しかし、それに続く1st. PCRの段階でCOG2FとG2SKRが"初めて"反応系に加えられるところに意義が見出される。1st. PCRでもブ菌の非特異増幅反応が起こるものの、それは逆転写反応時の非特異反応とは違う、新しい種類の反応の1からのやり直しとなる。2nd. PCRに移行した際も、ブ菌由来の非特異増幅反応は別の種類のものになる。ここまでを総括すると逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCRの3段階の反応において、NoV遺伝子だけが連続したプロセスで効率よく増幅をはたし、ブ菌の非特異反応は2か所の矢印の部分でリセットされるため、結果として天文学的な初期濃度の差を超えることが可能になるものと考えられた。このことは、図5と図7において、遺伝子解析可能なNoVの増幅断片が得られたことで確認できた。検出限界は、NoV-GIとNoV-GIIのいずれも食品1g当たり35コピーであり、前年度の結果(図2)が再現された。また、島根県浜田市の食中毒事例に適用されたことで、実用に耐えるものであることが証明された。

### 3. PCR反応系の見直し

現在NoV検出のために常用されているPCR反応系は、10年以上前に作成されたプロトコルを踏襲しており、最新の生命工学の成果を享受できていない部分もある。かつては、PCRに用いる耐熱性DNAポリメラーゼに関して選択の余地はほとんど無かったが、近年は反応速度・正確性・阻害物質耐性などの機能を付加した酵素を目的に応じて使い分けることが可能となっている。本研究の目的が、ブ菌の遺伝子由来する非特異反応の抑制であることから、ホットスタート

機能を備えた酵素によるタッチダウン PCR を用いることでさらなる改善が見込めるものと期待された。こうした改善は、図 5B に示すとおり、増幅バンドの明瞭化として観察することができた。また、real-time PCR においてコピー数算定に直接関与する Ct 値(増幅曲線の横軸)のみが着目され、蛍光強度(縦軸)はあまり重視されてこなかったという問題がある。しかし、蛍光強度が低い状態での運用は、実事例の大部分を占めると想定される低レベル汚染サンプルにおいて、検出結果が不安定になるため看過し得るものではない。蛍光強度低下の原因には様々な要素があるが、非特異反応によって DNA ポリメラーゼの活性が NoV 遺伝子以外の増幅に奪われる(競合阻害)ことが大きく影響している。図 6 に示すとおり、ホットスタート&タッチダウン PCR によって、増幅時の非特異反応は大幅に抑制されており、real-time PCR における蛍光強度を確保することに寄与するものと考えられた。

#### 4. LNA 修飾塩基導入の効果

NoV-GI に対応した逆転写反応専用プライマーである PANR-G1 を構成するオリゴヌクレオチド PANR-G1a には LNA 修飾塩基が用いられた。この措置は、PANR-G2 のように塩基長を延ばすことでは Tm を確保できない事情(変異が多すぎてランダムプライマーと同じになる)によるものである。LNA 修飾の効果を検証するために、修飾を施していないオリゴヌクレオチドと比較したものが図 8 であり、レーン 3 と 4 を比較すると増幅効率の違いは明らかである。

#### 5. まとめと今後の課題

本研究で得られた知見を総括すると、パントラ法によって抽出された RNA については、図 9 に示したプロセスで検出を試みるのが妥当と考えられる。ここに記載したプライマーは、将来の状況によって柔軟に変更し得るが、PCR で用いるプライマーとは異なる逆転写反応専用プライマーを設定することが、検出後に遺伝子解析を実施するのに不可欠である。ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、遺伝子解析まで踏み込むためには逆転写反応専用プライマーの設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してることが想定される。本研究では遺伝子解析可能な RNA を得る手法を開発することができたが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食(調理から盛り付けのプロセスを経たもの)を保存するという原則を、事業者周知する必要がある。

## E. 結論

前年度に浮上した、抽出 RNA の遺伝子解析が困難であるという問題に対して解決策を見出した。PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出された遺伝子のシーケンスを確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 斎藤博之：食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発、日本食品微生物学会雑誌、29(1)、32-37、2012

### 2. 学会発表

1) 斎藤博之、須藤恒久、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法による食品中のウイルス遺伝子検出における血液製剤と感染者血清の利用、第 53 回日本臨床ウイルス学会、2012、大阪

2) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：自家調製したパンソルビン相当品を用いた食品中の病原ウイルス検出法の検討、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012、福岡

3) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪

4) 飯塚節子、斎藤博之、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出 - 弁当屋を原因施設とした集団ノロウイルス食中毒事例から -、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪

5) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：黄色ブドウ球菌から自家調製したパンソルビン相当品による食品中の病原ウイルス検出法の検討、秋田応用生命科学研究会第 21 回講演会、2012、秋田

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

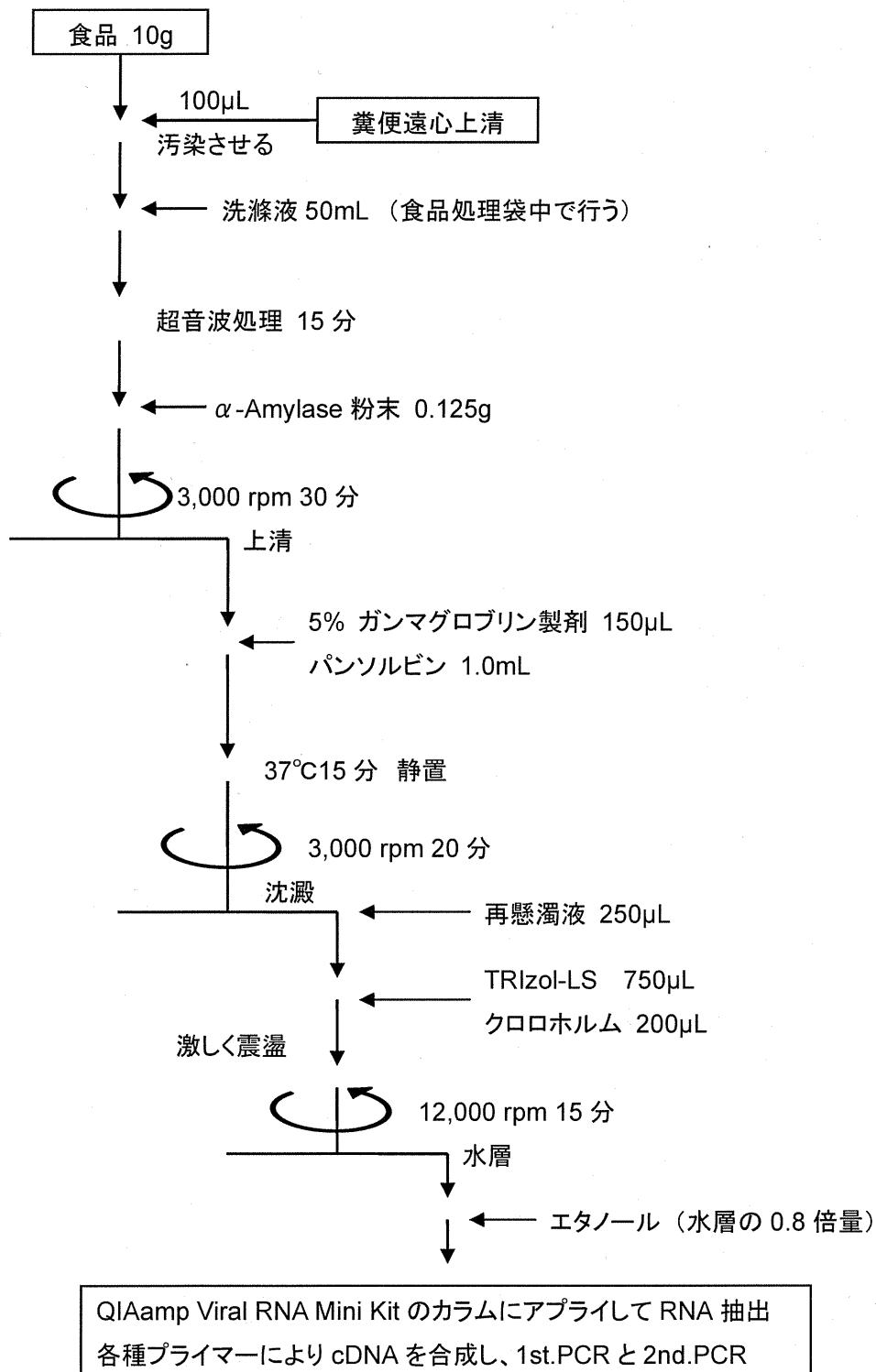


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

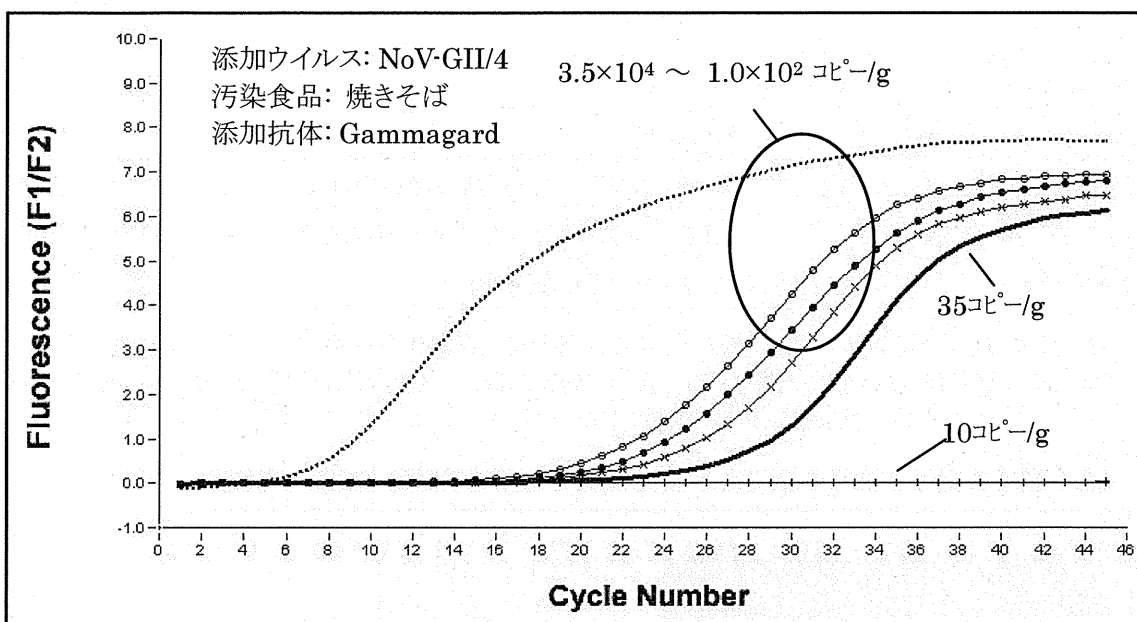


図 2 Nested real-time PCR の増幅曲線 (平成 23 年度報告書より再掲)

1st. PCR をプライマーCOG2F / G2SKR にて実施し、その増幅産物をプライマー・プローブセット COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で検出した。

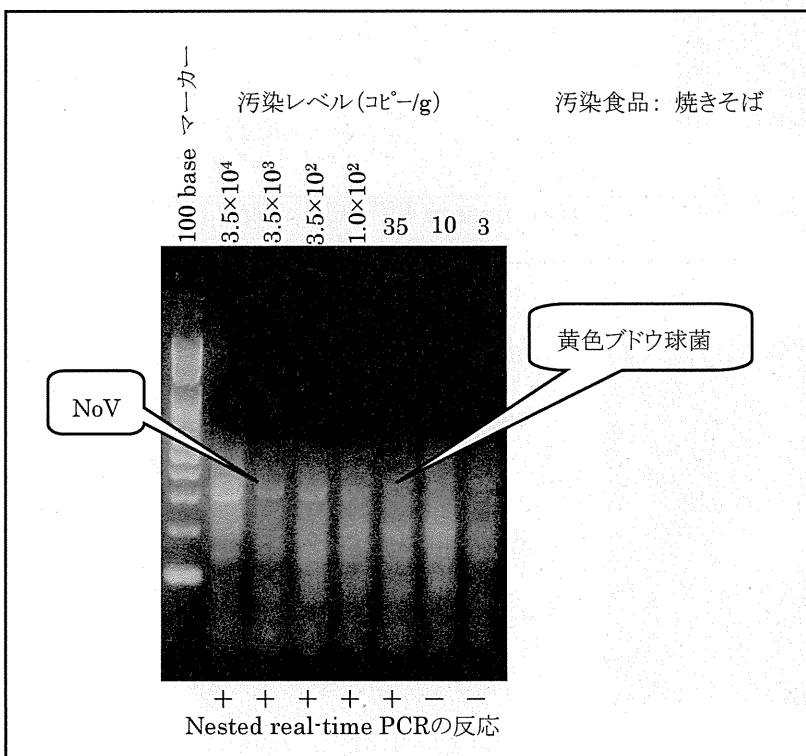


図 3 Semi-nested RT-PCR 増幅産物の電気泳動パターン (平成 23 年度報告書より再掲)

図 2 の 1st. PCR 産物を、プライマーG2SKF / G2SKR を用いた 2nd. PCR で再増幅した。



表 1 逆転写反応専用プライマーの配列

名称	配列 (5'→3')	設定位置
PANR-G1a	GT <u>B</u> CKMAC <u>A</u> T <u>C</u> AGCAATCA	5800←5818
PANR-G1b	GGKTCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA	5800←5827
PANR-G2a	TCYARWKKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT	5502←5539
PANR-G2b	ARDGTCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT	5502←5536
PANR-G2c	CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT	5502←5530

PANR-G1a と PANR-G1b の設定位置は、Norwalk68 株の配列に相当する塩基番号で表記した。PANR-G2a、PANR-G2b、及び PANR-G2c の設定位置は、Camberwell 株の塩基番号で表記した。PANR-G1a の配列中のアンダーラインで示した塩基 (C) は LNA 修飾で合成した。

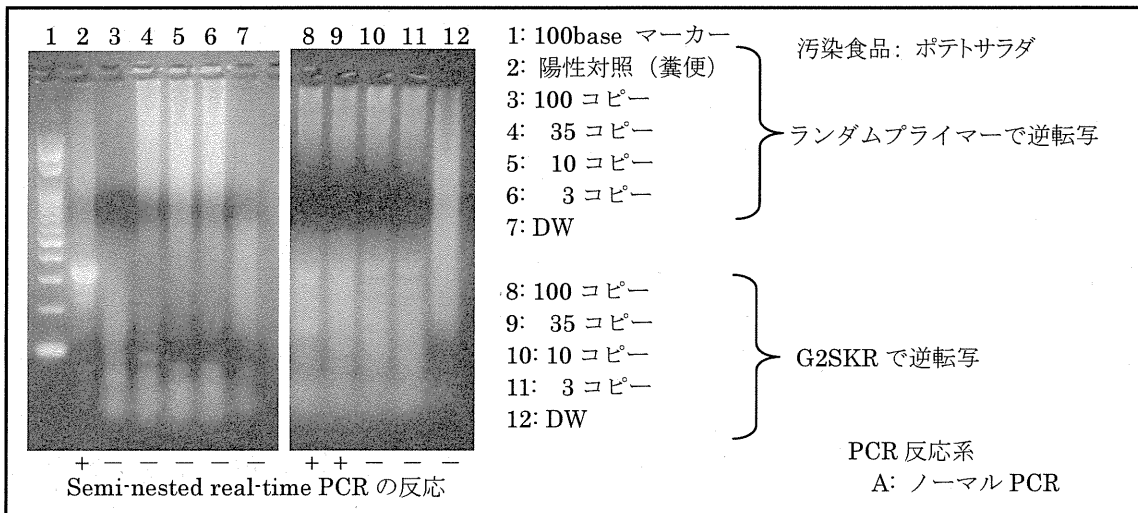


図 4 従来の逆転写方法による semi-nested RT-PCR (NoV GII/4)

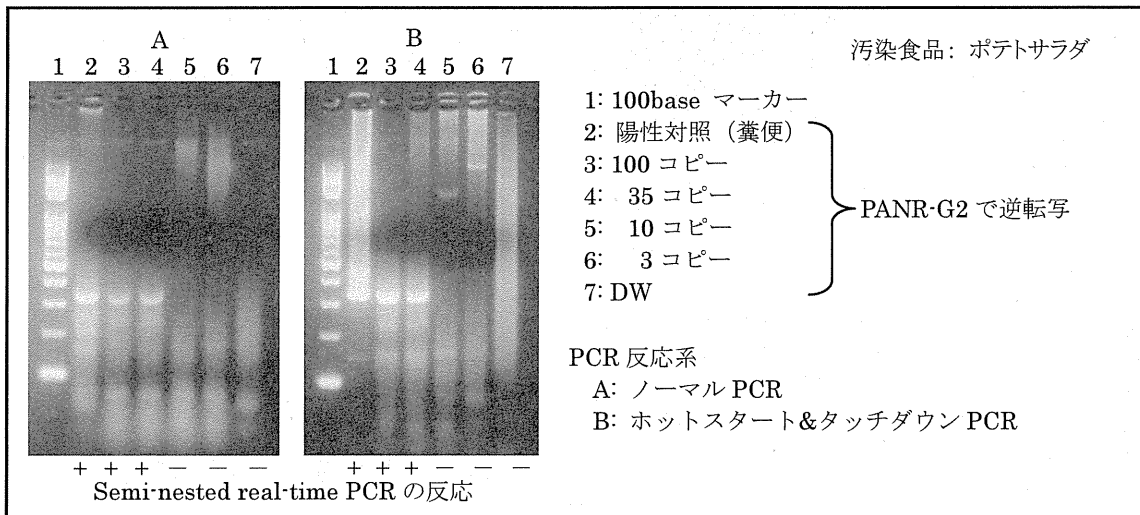


図 5 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV GII/4)

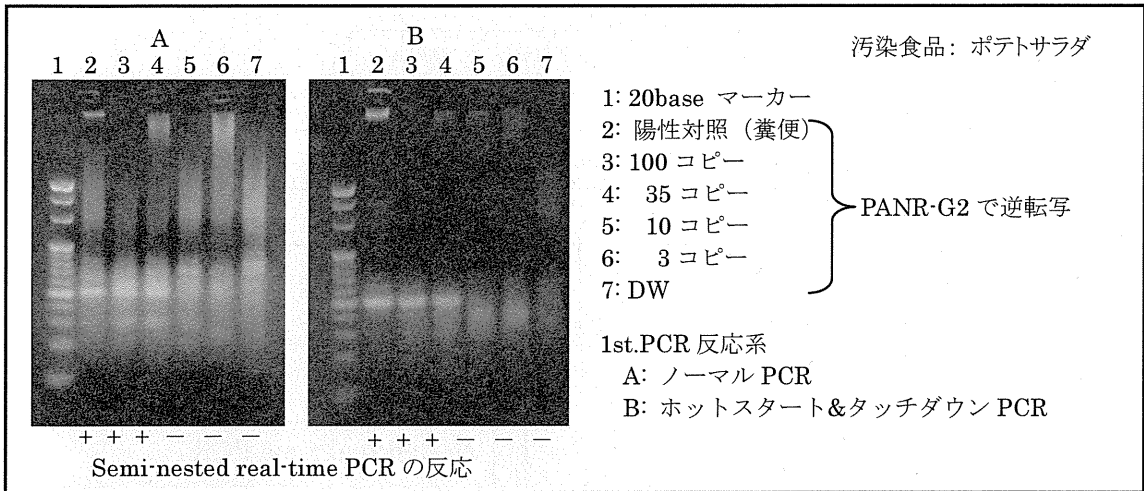


図 6 1st. PCR 反応系の semi-nested real-time PCR への影響 (NoV GI/4)

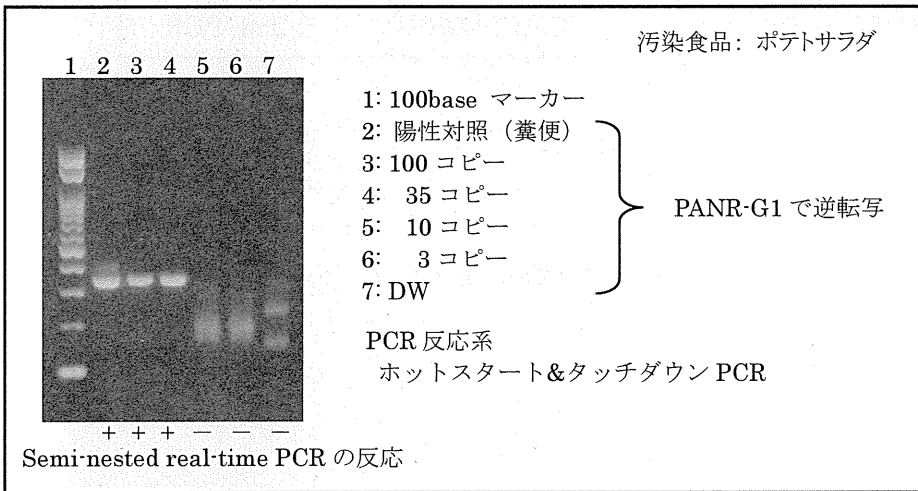


図 7 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV GI/4)

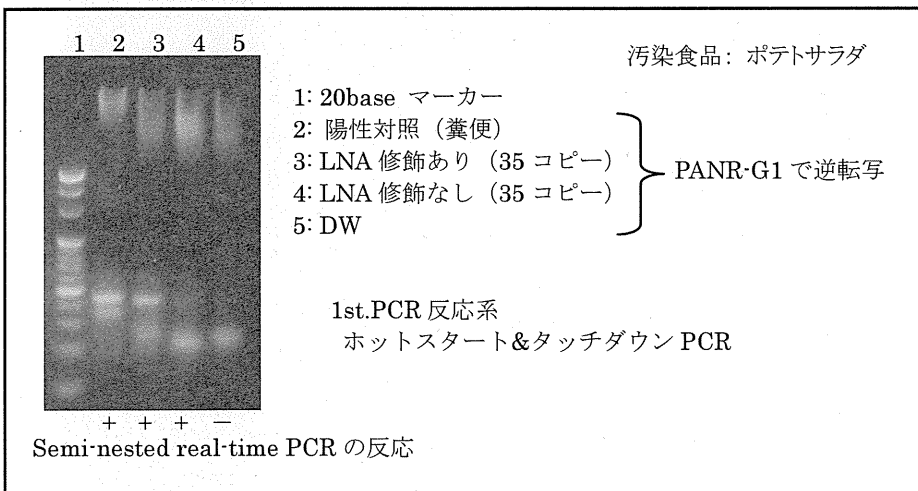


図 8 Semi-nested real-time おける LNA 修飾塩基の効果 (NoV GI/4)

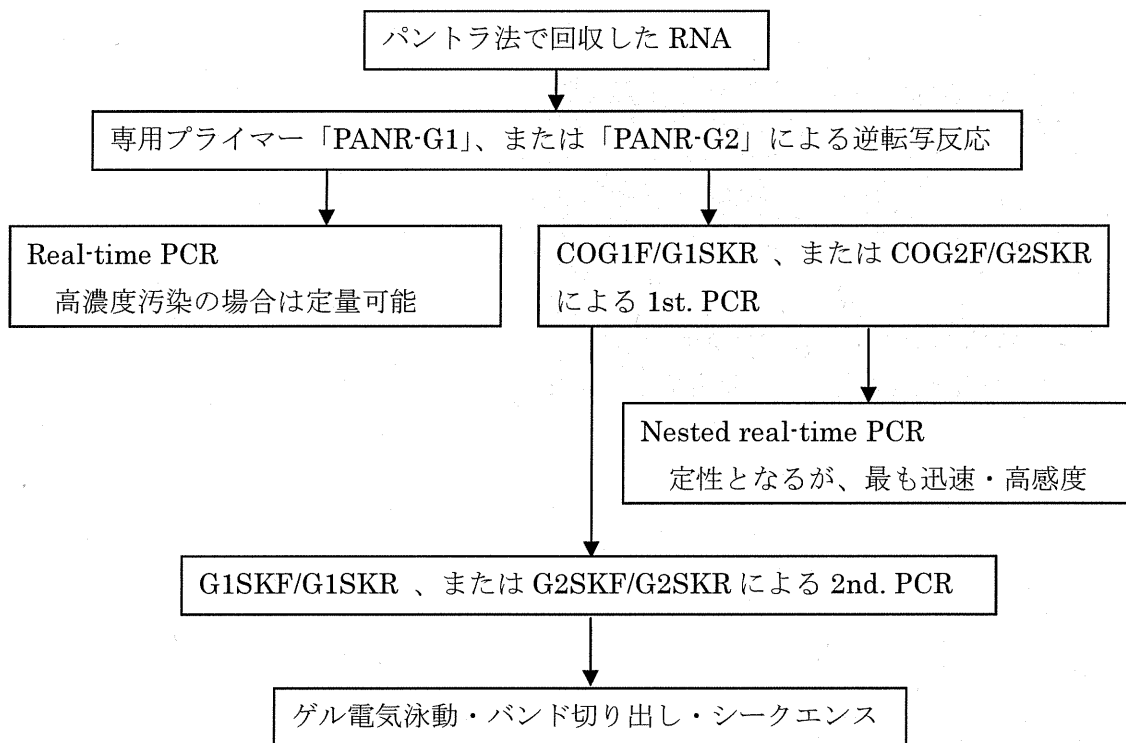


図9 パントラ法による RNA 抽出後のプロセス

## ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

研究分担者 鈴木 善幸 名古屋市立大学

### 研究要旨

ノロウイルスのゲノムがコードする構造蛋白質、非構造蛋白質の進化において起こったアミノ酸置換に働いた自然選択圧を検出できる方法を開発した。蛋白質の進化系統樹において、ある枝で祖先アミノ酸から子孫アミノ酸へのアミノ酸置換が観察されたとする。このアミノ酸置換には、正の自然選択が働いた、負の自然選択が働いた、あるいは自然選択が働かなかったと考えられるが、それぞれの場合について、逆向きの置換には、負の自然選択が働く、正の自然選択が働く、あるいは自然選択が働かないと考えられる。したがって、もとのアミノ酸置換に働いた自然選択圧は、その後の進化において逆向きの置換に働いた自然選択圧を検出することによって検出できると考えられる。この方法をノロウイルスに応用することにより、ノロウイルスの進化において正の自然選択が働いたアミノ酸置換を特定できると考えられる。

### A. 研究目的

「ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発」という研究項目名のもと、

(1) ノロウイルスゲノム配列について、構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれで系統樹を作成することによる、領域間でゲノム組み換えのないクラスターとしての遺伝子型分類体系の確立、(2) 構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれでのノロウイルスゲノムに働く自然選択圧の検出、を主な目的として研究を行う。

ノロウイルスのゲノムがコードする構造蛋白質、非構造蛋白質に働く自然選択

圧を検出することは、これらの蛋白質の機能の推定に役立つと考えられる。これまで自然選択圧の検出はある進化時間内に生じた同義置換数と非同義置換数を統計学的に比較することによってなされてきた。この方法において生物学的に興味深い正の自然選択は、非同義置換数が同義置換数よりも多く生じた場合に推測されるが、これは連続して適応進化が起こっていることを前提としており、断続的に起こる適応進化を検出することは不可能であった。

本研究においては、ノロウイルスに働く自然選択圧の検出に資するため、断続

的に起こった適応進化を検出できる方法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 材料

本研究を遂行するに当たって解析されるべき配列は、数が多いことならびに単独のアミノ酸置換の効果が実験的に明らかにされていることが条件と考えられ、これらの条件を満たす例としてインフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質における糖鎖付着部位を産生するアミノ酸置換に働いた自然選択を検出することとした。Influenza Virus Resource より H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスがコードするヘマグルチニン遺伝子の塩基配列を全て (3,206 本) 取り出し、ギャップ、曖昧な塩基、終止コドンが入っている配列などを除去し、2,043 本の配列を以下の解析に用いた。

### 2. 方法 1

任意の蛋白質の系統樹において、ある枝で祖先アミノ酸から子孫アミノ酸へのアミノ酸置換が観察されたとする。このアミノ酸置換には、正の自然選択が働いた、負の自然選択が働いた、あるいは自然選択が働かなかったと考えられるが、それぞれの場合について、逆向きの置換には、負の自然選択が働く、正の自然選択が働く、あるいは自然選択が働かないと考えられる。したがって、もとのアミノ酸置換に働いた自然選択圧は、その後の進化において逆向きの置換に働いた自然選択圧を検出することによって推測できると考えられる。

### 3. 方法 2

材料で得られた配列を方法 2 の方法で解析することにより、糖鎖付着部位を産生したアミノ酸置換に働いた自然選択圧を検出した。

(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

### 1. 結果 1

糖鎖付着部位産生後の進化において、糖鎖付着部位を産生したアミノ酸置換と逆向きのアミノ酸置換には負の自然選択圧が働いていることが統計的に支持され、糖鎖付着部位を産生したアミノ酸置換には正の自然選択が働いた、すなわち糖鎖付着部位産生は H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスの進化において適応的であったことが支持された。

## D. 考察

本研究により、任意のアミノ酸置換に働いた自然選択圧を検出できる方法が確立できたので、この方法をノロウイルスに応用することにより、ノロウイルスの進化において正の自然選択が働いたアミノ酸置換を特定できると考えられる。

## E. 結論

任意のアミノ酸置換に働いた自然選択圧を検出できる方法を開発し、H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスヘマグルチニンの進化において糖鎖付着部位を産生したアミノ酸置換には正の自然選択が働いたことが支持された。

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshiyuki Suzuki: Positive selection for gains of N-linked glycosylation sites in hemagglutinin during evolution of H3N2 human influenza A virus. *Genes & Genetic Systems*, 2011, 86:287-294.

### 2. 学会発表

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 国内で流行するノロウイルスの全ゲノム解析

研究分担者

佐藤裕徳

病原体ゲノム解析研究センター

### 研究要旨

本研究では、国内に流行するノロウイルスの全ゲノム情報の収集と解析を主目的とし、検査やサーベイランス組織と連携して食品中の病原ウイルスのリスク管理に役立てることをめざした。最終年度は、過去5年間に収集した全ゲノム情報を用いてパンデミックウイルス GII.4\_2006b の多様性を解析した。その結果、国内の GII.4\_2006b 変異ウイルス集団の塩基配列の多様度は年々増加したが、変異の大半は同義置換で、アミノ酸置換が強く抑制されていることがわかった。少なくともパンデミックウイルスについては検査の有効性も保証され、薬剤等のよい標的となる可能性が高まる。引き続き、新たな流行株でこの発見の一般性を検証することが、ノロウイルスの検査と制御法開発にとって重要となる。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 感染症の制御は、社会的に重要な課題の一つと位置づけられる。NoV は、汚染食材の飲食等で感染が短期間に拡大し、食品産業や公共施設(高齢者施設、ホテル、医療施設、学校)などに深刻な被害をもたらす。現時点で NoV 感染の予防・治療に有効なワクチン・薬剤は無い。このため、まずノロウイルス感染症の予防に関する正しい知識を国民に広める啓蒙活動が重要となる。そこで重要となるのは、ノロウイルスに関する正確な科学情報である。

ウイルスのゲノムには、ウイルスの形と性質を規定する情報が格納されている。これらの情報は、ウイルスの遺伝子検査や血清学的検査の有効性の検討、変異型ウイルスの蛋白質立体構造や生物学的性質の変化の検討、さらにはワクチン・薬剤の開発など、ノロウイルスのリスク評価や感染予防対策を科学的に進める際に必須の基盤情報となる。国内の NoV 流行株の全ゲノム解析情報を継続的に収集・解析することにより、流行株の種類、地理的分布、ゲノム構造、遺伝子と蛋白質の多様性、特徴的変異、変異が蛋白質立体構造と性質に与える影響など、NoV 検査や対策を科学的に進める際に極めて重要な基盤情報が得られると期待される。

さらに、広範な分野で応用が進んでいる「計

算科学的アプローチ」をゲノム解析に取り入れることで、検査系の開発と改良に有用な流行株蛋白質の立体構造や生物学的性質の情報が得られると期待される。計算科学とは、計算機を駆使して科学上の問題を解決する先端的な学問分野で、第三の科学形態として実験/観測と理論の間を補間し、実験では難しい事象の解析が可能となる。すでに様々な分野で応用が進み、その有効性が高く評価されている。我々は、この技術を主としてヒト免疫不全ウイルス (HIV) 蛋白質の立体構造解析に応用し、変異ウイルスの性質変化予測に極めて有効であることを示してきた。

そこで本研究では、この計算科学の技術をゲノム解析技術と組み合わせる独自の統合解析プラットフォームを構築し、NoV の全ゲノム解析を包括的に実施することとした。地方衛生研究所と国立感染症研究所を主体とする国内サーベイランス組織「Norovirus Surveillance Group of Japan (NSGJ)」の協力を得て感染者の糞便試料を収集し、国内の主要な NoV 流行株の全ゲノム解析情報を包括的・継続的に収集・解析し、NoV の検査や感染予防対策を科学的に進める際に必要となる基盤情報の取得に役立てることとした。

最終年度は、過去5年間に流行したパンデミックウイルス GII.4\_2006b の多様性について解析し、得られた新知見について疫学的、ウイルス学的インパクトを考察した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2006/7年シーズンに国内外で大規模な流行をもたらした、少なくとも国内では流行を5年間もの間継続した GII.4\_2006b を解析対象とした。これまでの研究で得たノロウイルス GII 株の全ゲノム配列 (n=395) のうち、全長の分子系統解析により GII.4\_2006b と判定した配列を解析に用いた (n=258)。これらは、論文に公表した配列 [1, 2] と、それ以降 (2010-2011年) に収集した未報告の配列を含む。

## References

- [1] *J. Virol.* 82:11247-11262, 2008.  
 [2] *J. Virol.* 84:8085-97, 2010.

### 2. 方法

(1) 多様性の解析：配列集団の遺伝距離 (genetic distance) の算出は MEGA を用いた。また、NoV 蛋白質アミノ酸配列の個々のサイトの多様性は、情報エントロピーを指標として定量化した。情報エントロピーは、以下の Shannon entropy ( $H(i)$ ) を求める計算を実行する自作プログラムを用いて算出した。

$$H(i) = -\sum_{x_i} p(x_i) \log_2 p(x_i)$$

$$(x_i = G, A, I, V, \dots)$$

(2) 選択圧の種類や作用部位の解析：コドンの同義置換/非同義置換率の算出、中立性の検証 (Tajima 's D test)、などの解析は MEGA または自作のプログラムを用いた。

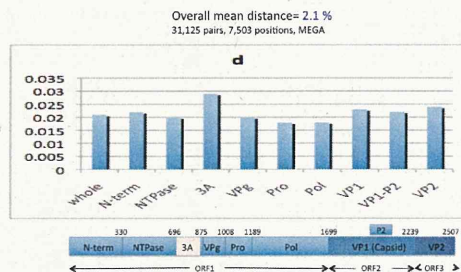
(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. ゲノム配列の多様性 図1. 2

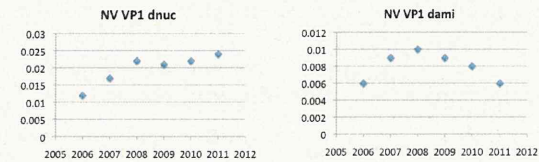
図1. GII.4\_2006b ゲノムと遺伝子の多様性



GII.4\_2006b ゲノム (7503 塩基) の平均遺伝距離は、約 0.021 であった (図1)。すなわ

ち、GII.4\_2006b ゲノム配列集団の中から任意の2つを取り出して比較すると、平均 158 サイトで塩基が異なる。遺伝子ごとの平均遺伝距離に大きな違いは無かった。すなわち、どの遺伝子も同程度の多様性があった。

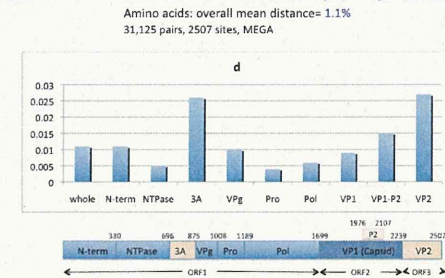
図2. GII.4\_2006b カプシド多様性の推移



GII.4\_2006b 変異集団は、流行の間にゲノムの塩基置換を蓄積し、集団内でのゲノム多様性は年々増大していった (図2左)。

### (2) 蛋白質の多様性

図3. GII.4\_2006b 蛋白質の多様性



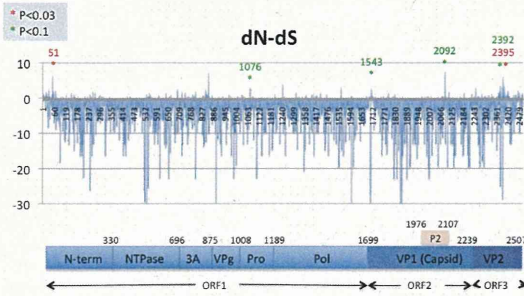
ノロウイルスゲノムからは、8種の蛋白質が作られる。これらの蛋白質のアミノ酸配列の多様性は、大きく異なっていた (図3)。保存度が最も高かったのは酵素 (NTPase, 3C<sup>Pro</sup>, 3D<sup>Pol</sup>) であった。3A と VP2 は、多様度が最も高かった。平均距離は約 0.005 前後であった。例えば 181 アミノ酸残基からなるプロテアーゼでは、5年間に収集した配列の中から任意の2つを取り出して比較すると、平均1カ所異なる。一方、機能不明の3AとVP2のアミノ酸配列の多様性は、8種の蛋白質の中で最も高かった (平均距離=約 0.025 前後)。例えば 268 アミノ酸残基からなる VP2 では、任意の2つを取り出して比較すると、平均7カ所異なる。興味深いことに、カプシドのアミノ酸配列の多様性は、3A や VP2 より低かった (平均距離=約 0.009)。540 アミノ酸残基からなるカプシドでは、任意の2つを取り出して比較すると、平均5カ所異なる。

カプシド蛋白質の多様性は 2008 年をピークに年々減少した (図2右)。すなわち、流行



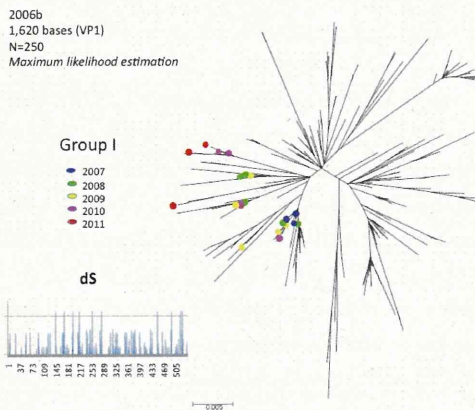
初期にはカプシドの多様性は増大したが、流行を継続する間に、多様性は減少した。

図4. GII.4\_2006b カプシド遺伝子の同義・非同義置換



ゲノムに生じた変異の大半は同義置換であり、アミノ酸置換は強く抑制されていることが判明した(図4)。カプシド蛋白質の Tajima's D test においても、新たに生じた変異を除去する負の淘汰がおきていることを示唆する結果を得た。

図5. VP1 塩基配列の系統樹(色つきの検体はアミノ酸配列が同一)



2006年に存在した GII.4\_2006b 変異集団の一部(約9%)は、カプシドの塩基置換を蓄積したが、アミノ酸配列の変化が全く無いまま、5年間、繰り返し全国各地に流行した(図5)。他の亜株については配列情報が少なく、解析できなかった。

#### D. 考察

1. NoV パンデミック株の変化の制約について  
 包括的な全ゲノム解析の実施により、過去5年間、GII.4\_2006b が国内で最も優勢なウイルスとして全国的な流行を繰り返したことを明確にした。GII.4\_2006b の流行規模は年々縮小したとはいえ、全国的流行に伴って形成

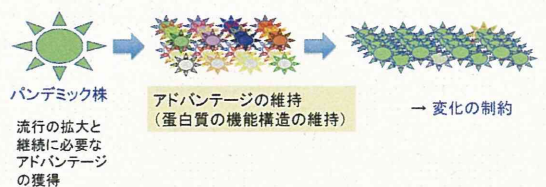
されるはずの集団免疫を逃避して5年間もの間流行を継続したことはたいへん興味深い。後述するように、GII.4\_2006b は、本質的に、抗体逃避等力の優れたウイルスなのかもしれない。

興味深いことに、GII.4\_2006b の流行の拡大と継続の過程で、ウイルス蛋白質の変化が強く抑制されていることが判明した。すなわち、国内の GII.4\_2006b 変異ウイルス集団は、年々、塩基配列レベルの多様度を増加させたが、コドンに生じる変異のほとんどは同義置換で、アミノ酸置換が強く抑制されていることがわかった。その結果、一般には抗原として多様性が高いと想定されているカプシド蛋白質ですら、GII.4\_2006b 変異集団ではよく保存されていた。

なぜ GII.4\_2006b でアミノ酸置換が抑制されているのか、その理由はまだよくわからない。可能性として、以下を考えている。2006/2007 シーズンに爆発的に流行した GII.4\_2006b は、その時点ですでに感染・増殖能、免疫感受性、感染伝播能力等について最高レベルの生存能力を獲得していた。これを維持するために、アミノ酸置換が抑制された。変化したものは、生存能力が低下、消失して淘汰された。

メカニズムが何であれ、本研究の結果は、検査やワクチン・薬剤開発研究にとって朗報となる。今後は、パンデミックウイルス蛋白質の変化の制約に一般性があるのかを明らかにすることが重要となる。もし一般性があれば、少なくともパンデミックウイルスについては検査の有効性も保証される。薬剤等のよい標的となる可能性が高まる。現在、2012/3 秋冬季シーズンに、GII.4\_2006b に代わり、新たな GII 株が流行の兆しを見せている。今後、これら新たに出現した株が全国的・継続的に流行するようであれば、同様に変化の制約が生じるのかを検証して行きたい。

2006b蛋白質:強い変化の制約のもとに進化する  
 \* 流行の拡大と継続に必要なアドバンテージを維持するために蛋白質の変化は抑制されるのかもしれない



## E. 結論

一般的な想定に反し、GII.4\_2006b の蛋白質は、流行を継続する間に大きな変化をしないことがわかった。一般には抗原として多様性が高いと想定されているカプシド蛋白質ですら、GII.4\_2006b 変異集団ではよく保存されていた。少なくともパンデミックウイルスについては検査の有効性も保証され、薬剤等のよい標的となる可能性が高まる。引き続き、新たな流行株でこの発見の一般性を検証することが、ノロウイルスの検査と制御法開発にとって重要となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、佐藤裕徳：ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ。感染症学雑誌。2012 86(5):563-8.
- 2) 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣：ノロウイルス流行の基礎知識と検査法(カラー図説)、特集：食中毒の基礎と臨床-疾患メカニズムから予防まで-日本臨牀、70 巻 8 号, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝、椎野禎一郎、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan：パンデミックノロウイルスの変化の制約。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日(火-木)、大阪.
- 2) 本村和嗣、中村浩美、佐藤彩、大出裕高、佐藤裕徳：次世代シーケンサーを用いた家族内感染例におけるノロウイルス準種解析。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日(火-木)、大阪.
- 3) 三好龍也、内野清子、本村和嗣、佐藤裕徳、田中智之：堺市におけるキメラ型ノロウイルスの検出状況。第60回日本ウイルス学

会学術集会。2012年11月13-15日(火-木)、大阪.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、「Norovirus Surveillance Group of Japan (NSGJ)」に所属する先生方、並びにその関係者に多大なご協力をいただきました。包括的全ゲノム塩基配列決定の出発材料となる NoV 感染者の糞便試料は、全てこの組織の先生方、並びにその関係者により収集していただきました。本研究は、この組織のご協力なくしては、開始することすらできませんでした。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

片山和彦(国立感染症研究所)、岡智一郎(国立感染症研究所)、田中智之先生(堺市衛生研究所)、野田衛先生(国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨先生(北海道立衛生研究所)、三上稔之先生(青森県環境保健センター)、斉藤博之先生(秋田県健康環境センター)、蛇口哲夫先生(岩手県環境保健研究センター)、植木洋先生(宮城県保健環境センター)、田村務先生(新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則先生(富山県衛生研究所)、篠崎邦子先生(千葉県衛生研究所)、吉田徹也先生(長野県環境保全研究所)、小林慎一先生(愛知県衛生研究所)、東方美保先生(福井県衛生環境研究センター)、内野清子先生(堺市衛生研究所)、入谷展弘先生(大阪市立環境科学研究所)、福田伸治先生(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、飯塚節子先生(島根県保健環境科学研究所)、山下育孝先生(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸先生(佐賀県衛生薬業センター)、岩切章先生(宮城県衛生環境研究所)

## サポウイルスカプシド蛋白質の動的性質

研究分担者 横山 勝

国立感染症研究所

病原体ゲノム解析研究センター

### 研究要旨

下痢症ウイルス分子の抗原部位や高度に保存される機能部位の情報は、ウイルス検出系開発の基盤となる。本研究では、構造情報および配列情報をもとに、ノロウイルスやサポウイルスの主要抗原となるカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を推定する新しい手法の開発を行う。本年度は、サポウイルスカプシド蛋白質の、構造情報のひとつである動的性質を調べた。その結果、P2 ドメインにゆらぎが適度に大きい部位が見られた。適度にゆらぎが大きいこの部位は抗体等と結合しやすく、この部位は抗原部位や機能部位であると考えられる。

### A. 研究目的

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

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

本年度は、サポウイルスカプシド蛋白質の、構造情報のひとつである動的性質を調べた。

### B. 研究方法

#### 1. 分子動力学計算

分子動力学計算に用いるサポウイルスカプシドの初期構造は、統合計算化学システム MOE (CCG 社, カナダ) を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。ターゲット配列にはサポウイルス Mc10 株カプシドのアミノ酸配列を、鋳型にはネコカリシウイルスカプシド (PDB code: 3M8L) を用いた。分子動力学計算には Amber10 の pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN を用いた。分子動力学計算は生理的条件下 (1 気圧, 37°C) で行い、シミュレーション時間は 20 ns とした。

## 2. 解析

分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを用いて、AmberTools の ptraj モジュールにより、RMSD (root mean square deviation: 平均二乗偏差)、RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ)、および DCCM (Dynamics Cross Correlated Motion: 動的相互相関運動) を計算した。(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. サポウイルスカプシド蛋白質の構造

サポウイルスカプシドの分子動力学計算を行い、10ns から 20ns の平均構造を調べた、ウイルス粒子内側から S ドメイン、P1 ドメイン、P2 ドメインと並ぶ。S ドメインと P1 ドメインは約 60Å、S ドメインと P2 ドメインは約 90Å 離れ、ドメイン間はゆるくつながれている。S ドメインと P1 ドメインは複数の  $\beta$  シートからなるが、P2 ドメインは  $\beta$ -turn- $\beta$  の 1 つのみである。

### 2. サポウイルスカプシド蛋白質のゆらぎ

サポウイルスカプシドの動的性質を知るために、RMSF を調べた。(図 1) S ドメインと P1 ドメインは比較的 RMSF が小さい。S ドメインの RMSF は大きくても 4Å 以下である。P1 ドメインは P2 ドメイン近傍に 1 つ RMSF が 8Å 近くある部位があるが、それ以外は S ドメインと同程度に RMSF は小さい。P2 ドメインの RMSF は、S ドメインや P1 ドメインに比べ大きく、約 4Å~10Å の部位が 5 つある。これらのゆらぎが適度に大きい部位は抗体等と結合しやすいと考えられる。

### 3. サポウイルスカプシド蛋白質における相関運動

サポウイルスカプシドで相関運動する残基は知るために、DCCM 解析を行った。(図 2) S ドメインや P1 ドメインは、それぞれのドメイン内の残基は正の相関運動を示すものが多い。P2 ドメインでは、RMSF の大きい部位のうち、F383 を含むループや I428 を含むループに注目すると、それらのループ内は正の相関運動であり、P1 ドメインとは負の相関運動を示していた。したがって、これらのループは機能的に P1 ドメインとリンクしている可能性が考えられる。

## D. 考察

昨年度の報告で、F383 近傍や I428 近傍は 1D-3D プロファイルの共分散の絶対値が小さく、抗原部位や機能部位の候補であった。本研究におけるカプシド蛋白質の動的性質の結果でも、抗原部位や機能部位であること示唆された。エントロピー解析の結果から、F383 近傍の情報エントロピーが大きいことから、F383 を含むループは抗原部位であると考えられる。I428 近傍の情報エントロピーが小さいことから、I428 を含むループは機能部位であると考えられる。

## E. 結論

サポウイルスカプシド単量体の分子動力学計算を生理的条件下 (1 気圧、37°C) で行い、RMSF および DCCM を調べた。以下の結果が得られた。(1) P2 ドメインに揺らぎが適度に大きい部位が見られた。適度に揺らぎが大きい、この部位は抗体等と結合しやすいと考えられる。(2) この部位に含まれる残基は