

図9 パントラ法による RNA 抽出後のプロセス

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

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

研究協力者 小林 由紀 名古屋市立大学

研究要旨

「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った。平成 22 年度には、ゲノム上の異なる領域を用いて作成された系統樹を比較することにより、遺伝子組換えが起こったことならびにその系統樹上での位置を推定できる方法を開発した。平成 23 年度には、アミノ酸配列レベルに働く自然選択圧の検出において、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換して非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定されることを明らかにした。平成 24 年度には、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た。

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。

ノロウイルスにおいては、ORF1 と ORF2-3 の間で遺伝子組み換えが起こる

ことが知られているが、その頻度は未知である。平成 22 年度には、遺伝子組換えの頻度を推定するために、ノロウイルスの ORF1 と ORF2-3 それぞれの領域で作成された系統樹を比較して遺伝子組換えを検出できる方法の開発を目的とした。特に、今後ノロウイルスの配列データは爆発的に増加すると考えられ、それにともない系統樹の信頼性が低下すると考えられるが、大量の配列データから効率良く遺伝子組換えを検出できる方法の開発を目的とした。

ノロウイルスにおいては、構造遺伝

子領域・非構造遺伝子領域それぞれでの塩基配列・アミノ酸配列の多重整列において、ギャップが多く入ることが知られている。平成23年度には、ギャップを正確に入れないと自然選択圧の検出にどのような影響が出るのかを明らかにするため、自然選択圧の検出においてしばしば行われる、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換するという方法の非同義置換速度/同義置換速度比推定にあたる影響を検討した。

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き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。平成24年度には、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した。

B. 研究方法

1. 方法1

解析に用いられる配列の数が多いときでも統計的有意性を保証しながら遺伝子組換えを検出するために、4株を抽出してその系統関係を領域間で比較する。これは、4配列は系統樹作成上の最小単位であり、3

つの相互に相容れない樹形のうちの1つが支持されるからである。それぞれの領域で作成された系統樹が統計的に有意に支持されたときのみ、領域間で樹形を比較し、樹形が異なれば遺伝子組換えが起こったと推測される。さらに、系統樹において遺伝子組み換えが起こった場所は外部枝に存在すると考えられる。この方法の有用性を検証するために、インフルエンザA型ウイルスH1N1亜型782株、H3N2亜型1,663株のゲノム配列をInfluenza Virus Resourceから取り出して解析した。このウイルスのゲノムは8本の分節からなり、分節単位での組み換え(遺伝子再集合)が起こることが知られていることから、方法の有用性の検証に適していると考えられた。

2. 方法2

アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換するという方法の非同義置換速度/同義置換速度比推定にあたる影響を検討するためには、ウイルスは遺伝子数が少ないため適当でないと考えられたため、ゲノム配列が決定されている脊椎動物10種を用いることとした。ヒト、チンパンジー、オランウータン、マカク、マウス、ウシ、オポッサム、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュのゲノムから3,222セットの蛋白質をコードするオーソログの塩基配列領域をEnsembl Genes 57よりBioMartを利用して取り出して解析に用いた。蛋白質をコードする塩基配列領域は、アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法と、塩基配列とアミノ酸配列それぞれで多重整列を作成してからそれ

らの間で共通に多重整列されているコドン座位を抽出するという方法で、コドン配列の多重整列を作成した。そしてそれぞれのコドン配列の多重整列を用いて、ペアワイズで配列間で非同義置換速度/同義置換速度比を推定した。

3. 方法 3

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。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 本の配列を解析に

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. 結果 1

H1N1 亜型、H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルス両方において、8 本の分節の全てのペアにおいて系統樹の樹形に相違が認められ、進化の過程で遺伝子組み換えにおいてつねに連鎖する分節のペアはないことが明らかになった。遺伝子組み換えが検出された 4 株の組み合わせについて、8 本の分節が支持する系統樹の樹形を分類したところ、H1N1 については分節 (1, 3, 4, 6) と (2, 5, 7, 8) が異なる樹形を支持することが多かった。この遺伝子組み換えが起こった系統樹上の位置を推定したところ、2005-2007 年あるいは 2008-2009 年に分離された株が組み換え体であると推測された。実際、2008-2009 年に分離された株は組み換え体であるという報告が過去にあった。H3N2 については分節 (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) と (4) が異なる樹形を支持することが多かった。2003 年あるいは 2004-2008 年に分離された株が組み換え体であると推測され、実際 2003 年に分離された株は組み換え体であるという報告が過去にあった。

2. 結果 2

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

されることが明らかになった。

3. 結果 3

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

H1N1 亜型、H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルス両方において、分節間の組み換えは頻繁に起こっていることが分かった。また、遺伝子組み換えが起こった系統樹上の位置を信頼性良く推定できることが示唆された。

アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法によって得られたコドン配列の多重整列を用いて非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定される原因としては、アミノ酸配列の多重整列作成における誤り、3塩基を単位としない挿入・欠失によるアミノ酸配列と塩基配列それぞれで作成された多重整列の不整合が考えられた。

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

ゲノム上の異なる領域を用いて作成された系統樹を比較することにより、遺伝子組換えが起こったことならびにその系統樹上での位置を推定できる方法を開発した。この方法をノロウイルスにおける遺伝子組み換え検出に応用し、遺伝子型分類システムの開発に役立てたい。

アミノ酸配列レベルに働く自然選択圧の検出において、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換して非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定されるので、この方法は推奨されないと考えられる。

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た。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshiyuki Suzuki: A phylogenetic approach to detecting reassortments in viruses with segmented genomes. *Gene*, 2010, 464:11-16.

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

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
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」
総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

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
研究協力者	本村和嗣	同上
研究協力者	横山勝	同上

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。ゲノム解析技術と計算科学技術を組み合わせてノロウイルス全ゲノム情報の収集と解析を実施する独自の統合解析プラットフォームの構築を進めた。これを用いて 2006 年 5 月～2011 年 3 月の間に合計 395 のノロウイルス GII 株の全ゲノム情報を収集し、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)」に提供した。全ゲノム情報は、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、特異的変異、カプシドの立体構造、変異の立体配置など、ノロウイルスの検査や感染予防対策を科学的に進める際の出発点となる基盤情報の取得に役立てた。

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て活用す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。

B. 研究方法

1. 材料

本研究では、2006年05月15日から2011年03月10日の間に20の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてNoV感染症と確定した469症例の糞便試料中のNoVゲノムを解析対象とした。

2. 方法

(1) RNA抽出とPCR [1, 2]: 以下の手順で糞便中のNoVゲノムRNAを抽出した。糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、NoV RNAを抽出した後、G2SKFとOligo dT₃₀SXN (Katayama K et. al; Virology, 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、GII/4特異的プライマーを用いて相互に重複するNoVゲノムcDNA断片2~3種(約0.9, 5.3kb, 2.5kb)をPCRにより増幅した。

(2) シーケンシング [1, 2]: 合計395のNoV株の全ゲノム情報を収集した。PCR後の精製産物の塩基配列は、多くの場合ABI3730 (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により解読した。ゲノム組換えの解析の際には、必要な領域をプラスミドにクローニングした後、ABI3730を用いて塩基配列を解読した。シーケンス反応は、蛍光基質を用いたダイデオキシ法により行った。

(3) ゲノムアセンブリ [2]: 約0.9, 5.3kb, 2.5kb断片の塩基配列を基に、重複する領域を利用して全長ゲノムに再構築した。再構築にはDNAアセンブリツールStaden Packageを用いた (<http://staden.sourceforge.net>)。合計395のノロウイルスGII株の全ゲノム情報を得た。

(4) 分子系統解析 [1, 2]: NoVゲノム全長、ORF1, 2, 3などのゲノムと断片の分子系統は、MEGA (<http://www.megasoftware.net>) に搭載されている解析ツールを用い、主に近隣接合法、最尤法により推定した。

(5) ゲノム構造の解析 [2]: NoVゲノムのモザイク構造は、以下の方法で検証した。まず、ゲノム全長とORF1, 2, 3の系統樹を作製し、それら間で分岐点等、系統樹の位相が異なるサンプルを抽出した。これらは、ゲノムがモ

ザイク構造になっている可能性がある。それらについて、MEGAを用いてゲノム全長のBootscreening-plot解析を行い、組換え点を推定した。さらに、RDP3 software package に搭載されているゲノム組換え解析ツール (RDP, GENECONV, Maxchi, Chimera, 3seq, Siscanなど) を用いて、モザイク構造や組換え点の確からしさを検証した。

(6) 多様性の解析 [1]: 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。

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

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

(7) 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。

(8) 蛋白質の分子モデリング [1, 2]: カプシド蛋白質の立体構造モデルは、ホモロジーモデリング法 [3] により構築した。モデリングには、MOE (Chemical Computing Group Inc., Canada) [4] に搭載されているプログラムを用いた。MOEはカナダCCG社が独自に開発したSVL (Scientific Vector Language) を搭載する統合計算化学システムで、分子の構造・機能の解析プラットフォームを提供する [4]。モデリングの鋳型としては、以下のX線結晶構造を用いた。NoVカプシドP domain; GII/4 VA387株、解像度2.00 Å (PDB code: 2OBS) [5]、NoVカプシドP domain二量体; Norwalk virus P domain oligomer, 解像度3.4 Å (PDB code 1IHM) [6]。

References

- [1] *J. Virol.* 82:11247-11262, 2008.
- [2] *J. Virol.* 84:8085-97, 2010.
- [3] *Science* 294: 93-96, 2001.
- [4] MOE. <http://www.chemcomp.com/>
- [5] *J. Virol.* 81:5949, 2007.
- [6] *Science* 286:287, 1999.

(倫理面への配慮)

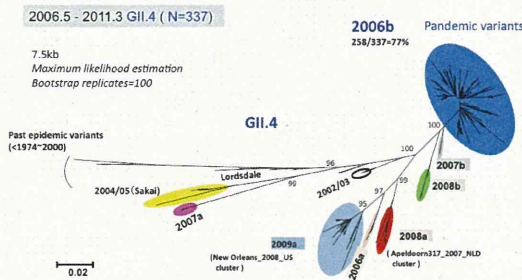
本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. NoV GII.4 流行株の種類 図1&[1]

2006年05月15日から2011年03月10日の間に20の道府県で発生し、衛生研究所においてNoV GII.4感染と診断された急性胃腸炎の孤発例あるいは集団発生事例は、ゲノム全長レベルの系統解析においてもGII.4が病原であることが確認された(一部モザイク)。この5年間に国内で流行したGII.4株は、ゲノム全長配列の近縁性を基に8種の亜株に分類されることがわかった(図1)。

図1.NoV GII.4 流行株の種類
ゲノム全長(約7.5kb)、最尤法



2. 地理的分布と年次推移 図2&[1]

本研究で特定された8種のGII.4亜株のうち、2006/7年シーズンに世界的流行をもたらしたGII.4亜株2006b(GII.4_2006b)のみが、5年間、流行を持続した(図2A)。GII.4_2006bの流行規模は2008/2009年以降、年々縮小した。GII.4_2006bの流行は、全国的なものであった(図2B)。他の7種のGII.4亜株は局地的かつ短期的流行に留まり、大半は流行の翌年に検出限度以下となった(図2A)。

図2A NoV GII.4 流行株の種類の変遷

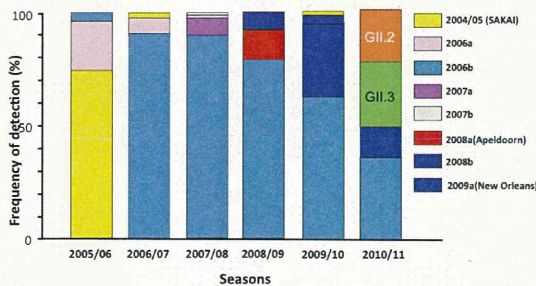
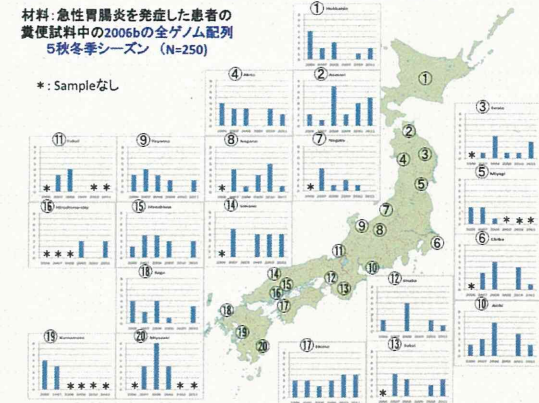


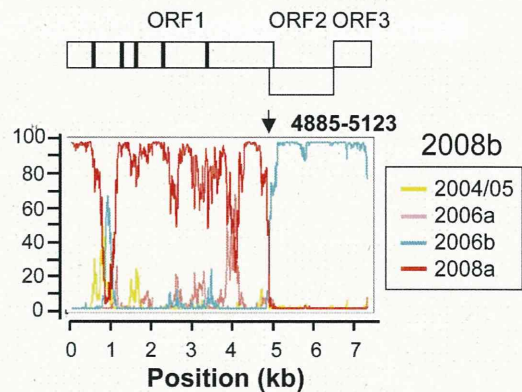
図2B NoV GII.4_2006bの地理的分布



3. ゲノム構造 図3&[1]

8種のGII.4亜株のゲノムのうち、少なくとも5種のゲノムは、異なる亜株の遺伝情報、あるいは異なる遺伝子型の遺伝情報(GII.4とGII.12)から成るモザイク構造をとることを見出した。興味深いことに、全てのモザイクゲノムに共通し、かつ信頼度の高いゲノム組換え部位($P < 0.000001$)として、ORF1とORF2の境界領域が特定された。

図3. GII.4_2006bのカプシドをもつキメラウイルスの例(2008b)



4. 遺伝子と蛋白質の多様性 図4

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年間も間継続したGII.4亜株2006bは、流行の間にゲノムの塩基置換を蓄積し、2006b集団内でのゲノム多様性は年々増大していった(図4A左)。一方で、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4A右、図4B)。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起きている

ことを示唆する結果を得た。保存度が最も高かったのは酵素 (NTPase, 3C^{pro}, 3D^{pol}) であった。カプシド蛋白質には、N-term や VPg と同程度によく保存されていた。3A と VP2 は、多様度が最も高かった。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 4C)。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。

図 4A. GII.4_2006b カプシド多様性の推移



図 4B. GII.4_2006b カプシド遺伝子の同義・非同義置換

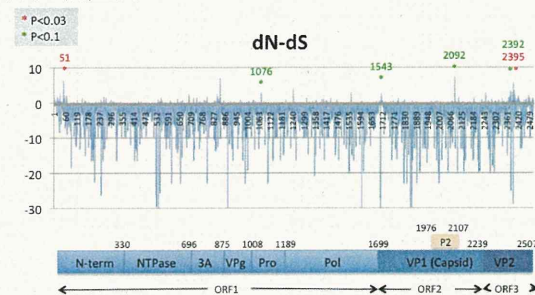
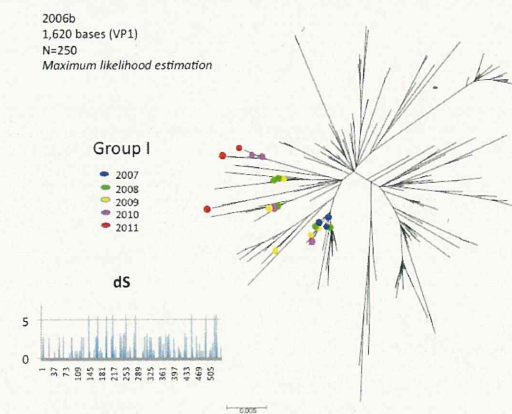


図 4C. VP1 塩基配列の系統樹 (色つきの検体はアミノ酸配列が同一)

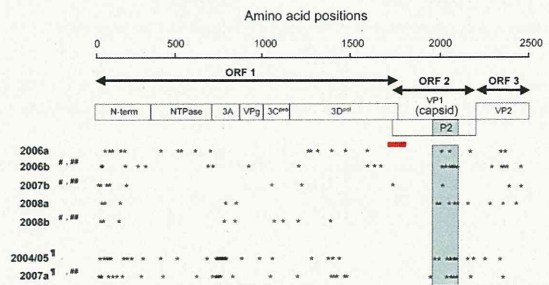


5. 特徴的変異 図 5&[1]

8 種の GII.4 亜株は、カプシド蛋白質 P2 領域に、過去の既知の GII/4 流行株には見られない特徴的なアミノ酸置換をもっていた。また、カプシドだけでなく他の蛋白質 (N-term,

NTPase, 3A, VPg, 3C^{pro}, 3D^{pol}, VP2) にも亜株に特徴的な変異が同定された。これらの変異は、一般的には流行の間維持されており、亜株を識別する "amino acid signature" としての特徴をもつことがわかった。

図 5 GII.4 亜株蛋白質の特徴的変異

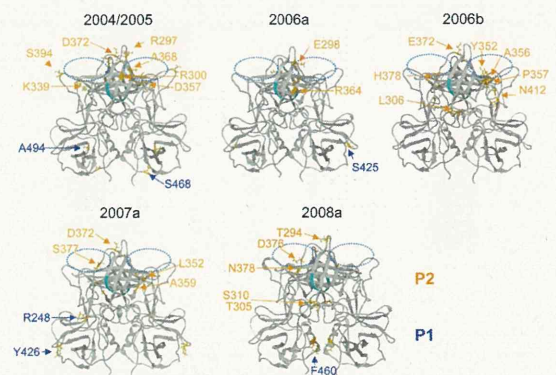


6. GII.4 亜株カプシド二量体の立体構造

図 6&[1]

我々は、ゲノム情報をもとに、任意の NoV 国内流行株のカプシドの分子モデルを迅速に構築する系を作った。カプシド遺伝子配列からアミノ酸配列を推定し、既知の X 線結晶構造解析の情報を鋳型として、ホモロジーモデリング法により、国内に流行した GII.4 亜株のカプシド蛋白質の分子モデルを構築した。これにより、カプシド蛋白質 P2 領域の変異は、想定される感染受容体結合部位の周辺に配置されることが判明した。また、P2 領域のアミノ酸置換の数は 2006b、及び 2004/2005 で最も多く、過去の GII/4 流行株には見られない特徴的なアミノ酸置換が 7 カ所特定された (図 6)。

図 6 GII.4 亜株カプシド P ドメイン二量体モデル



Reference

[1] Motomura K et al., *J Virol.* 84:8085-97, 2010.

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。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。

2. キメラ NoV について

本研究により、過去5年間に国内に流行した GII.4 株の大半は、異なる NoV 遺伝子型や

NoV 亜株の遺伝情報が入れ子になったモザイクゲノム構造をとることが明らかになった。この知見は、ゲノム全長の解析により初めて明確になったもので、疫学的、ウイルス学的インパクトをもつ重要な発見と考えられる。

(1) 疫学的インパクト

我々の得た観察結果は、自然界でキメラウイルスの発生と流行が多発していることを示唆する。今回検出されたゲノムの多くは、異なる GII.4 亜株間のキメラであった。これらは、通常 NoV の検出に用いられる短いゲノム断片の解析では、見落とされていた可能性が高い。今回のゲノム全長の解析により初めてその存在が明確になった。キメラ NoV は、これまで想定していた以上にしばしば NoV 流行の発生に関与している可能性がある。

一般に、キメラウイルスは、同一宿主への重感染、さらには同一細胞への重感染がおきることによって発生する。今回の結果から、NoV の感染源には、しばしば複数のウイルスが混在している可能性が推察される。また、混在頻度は低くても、重感染で増殖・伝播能力の高いキメラウイルスが発生すれば、急速に広がって検出されやすくなる。今後もし機会があれば、我々が整備した新型シークエンサーを用いて、汚染食材中や感染者体内に混在するウイルスの種類や混在する頻度など、NoV の感染源の実態をより詳細に解明していきたい。

(2) ウイルス学的インパクト

本研究により、ゲノム組換えの”hot spot”として、ORF1/ORF2 境界領域が特定された。相同組換えが NoV ゲノム組換えの主要なメカニズムであるならば、変化しにくい領域（相同性の高い領域）が hot spot となりうる。ORF1/ORF2 境界領域は、カプシド産生の制御に重要な働きをするとされ、比較的相同性が高い。したがって、相同組換えの hot spot の必要条件を満たす。

しかし機能的に重要で相同性の高い領域は、他にも NoV ゲノム全長に渡って多々存在する。塩基配列の相同性は、ゲノム組換えに必要なであっても、十分とは言えない。ORF1/ORF2 境界領域がしばしば組換えの hot spot として観察されるのは、その領域がウイルス間で高い相同性をもつことに加え、他の要因があるはずである。例えば、この領域は組換え反応を促進する特殊な RNA 高次構造を形成する、あるいは ORF1 と ORF2/3 を交換したウイルスは

他の領域の組換えウイルスより生存能力が高い、などの理由が考えられる。

ウイルスのゲノム組換えは、ウイルスの生物学的性質の多様性と適応能力を高めるための重要なしくみの一つである[1]。本研究により、NoVにおいても、増殖能を司る ORF1 蛋白質と、感染能、細胞指向性、抗体感受性等を司る ORF2/3 蛋白質を速やかに交換するしくみをもつことが明確になった。NoV は、このしくみにより、感染・増殖能、感染伝播能、免疫感受性を適宜調節し、常に変動する自然・体内環境における適応能力を高めているのかもしれない。

Reference

[1] 佐藤裕徳、横山勝： RNA ウイルスと変異（総説）、ウイルス、日本ウイルス学会誌、55：221-230, 2005.

3. NoV 流行株の分類と性質決定について

我が国の NoV の疫学調査においては、一般には ORF1 下流のごく短いゲノム断片の塩基配列を用いてウイルスを検出し、時には分類する。片山らの精力的な研究により、検査に必要な感度と特異性を保証する領域が選ばれており、検査の観点からは支障がない。

一方、流行株を分類し、その性質を解明していく際には問題が生じる。まず、NoV ゲノムはしばしばモザイク構造をとるため、断片の解析で同種と判定されたウイルスでも、実際は起源の異なる株であることもありうる。また、断片を用いた分類では、ゲノムの他の領域の塩基配列の特徴は考慮しない。もし未解明の領域の遺伝情報が異なれば、ウイルスの性質も異なる。断片の解析で同種と判定されたウイルスでも、実際は生物学的性質の大きく異なる株である場合もありうる。ウイルスの分類は、遺伝情報の総体、すなわち全ゲノムの情報に基づく必要があり、これが他のウイルスでも世界的基準となっている。

一方、NoV の分類に必要なゲノム全長情報は、公開されているものが世界的にも少ない。情報の大半が、我々が公開したものである。今回、合計 395 の NoV GII 株の全ゲノム情報を得た。この比較的大規模の全ゲノム情報は、NoV 分類法の検討に寄与するものと考えている。ただし、我々の取得したゲノム情報の 80% 以上は同一亜株のもの (GII. 4_2006b) である。自然界の多様な NoV ゲノムのごく一部に過ぎない。今後も機会があれば、環境中の NoV も

含めて全ゲノム情報を蓄積していきたい。

4. NoV 流行株カプシドの立体構造について

本研究では、ゲノム情報を基に、任意の NoV 変異株の蛋白質立体構造情報を迅速に取得することを目的として、ホモロジーモデリング法を実行する解析プラットフォームを整備した。これを用いて、過去 5 年間の国内 GII. 4 流行株 8 種全てについてカプシド蛋白質の分子モデルを構築した。その結果、新たに流行した GII. 4 亜株は、全てカプシド蛋白質 P2 領域の感染受容体結合部位と想定される領域の周辺に、複数のアミノ酸置換をもつことを明らかにした。

感染受容体結合部位は、ウイルスに取っての急所の一つであり、この領域を標的とする抗体は感染阻止能をもつ可能性が高い。また、その周辺に変異をもつウイルスは、抗原性や抗体感受性が変化している可能性が高い。流行が発生する条件の一つとして、カプシド蛋白質 P2 領域に複数変異を獲得することが重要と考えられる。中でも GII. 4_2006b は、カプシド蛋白質 P2 領域に 7 カ所ものアミノ酸置換を獲得していた。この比較的少量の変異の蓄積が、このウイルスの抗原性等を独特のものとし、全国的に流行した要因の一つになった可能性がある。今後も、ゲノム解析とモデリング技術を組み合わせて得られる流行株の立体配置の情報は、NoV の流行発生のリスク評価に有用と考えられる。

一方、GII. 4_2006b の長期にわたる流行の継続は、抗原変異の獲得では十分に説明できない。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。また、1. に述べたように、GII. 4_2006b カプシドのアミノ酸置換は強く制約されていた。すなわち、抗原変異の獲得で集団免疫を逃避しているとの証拠は得られなかった。これらの結果から、GII. 4_2006b のカプシドには、中和抗体の淘汰圧が十分作用していない、すなわちこのウイルスのカプシドは、抗体逃避能力が高いのではないかと考えている。

上に述べた GII. 4_2006b カプシドの性質は、カプシドの構造に起因すると考えている。すなわち、GII. 4_2006b カプシドは、他の NoV に比べ、抗体耐性度の高い構造特性をもつのではないかと考えている。今後は、我々が独自に構築してきた構造解析プラットフォーム

を用いて、GII.4_2006b カプシドに特徴的な構造特性を探索していきたい。

E. 結論

本研究では、分子生物学的手法と計算科学の技術を活用してノロウイルス全ゲノム情報の取得と解析を包括的に実施する独自の解析プラットフォームを構築し、NoV の全ゲノムと蛋白質の立体構造や多様性を解析した。その結果、NoV の検査や感染予防対策を科学的に進める際に有用な基盤情報を種々取得した。一方、興味深い未解決課題も種々浮き彫りになった。今後は、機会があれば、ノロウイルスの全ゲノム解析を継続し、成果をウイルスの検査、リスク評価、ワクチン・薬剤開発などの感染予防対策に役立てていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J. Virol.* 84:8085-97, 2010.
 - 2) 佐藤裕徳: ヒトノロウイルスの生存戦略(総説)、ウイルス、60:21-32、2010.
 - 3) 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.
 - 4) 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、金井昭夫: ゲノミクス、情報科学、計算科学とウイルス学. 第58回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム. 2010年11月7-9日(日-火)、徳島.
 - 2) 田中智之、本村和嗣、内野清子、三好達也、松尾光子、西口智子、佐藤裕徳、吉田永祥: 食中毒事例におけるノロウイルス重感染のウイルス遺伝子学的解析. 第31回日本食品

微生物学会学術総会. 2010年11月11-12日(木-金)、滋賀.

- 3) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦: カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月7-10日(火-金)、神戸.
 - 4) 岡智一郎、横山勝、本村和嗣、村上耕介、脇田隆字、佐藤裕徳、片山和彦: カリシウイルスプロテアーゼで高度に保存されているアミノ酸残基の同定および重要性の評価. 第131回日本薬学会総会、2011年3月29-31日(火-木)、静岡.
 - 5) 佐藤裕徳、本村和嗣、大出裕高、横山勝. In vivo directed evolution of HIV-1 through immune escape (免疫逃避を介しての生体内指向進化): 日本蛋白質科学会 ワークショップ「分子認識・ネットワーク解析の新たなキーワードとしての分子共進化」6月7-9日、2011年、大阪.
 - 6) 佐藤裕徳. 病原性ウイルス研究と計算科学. MOEフォーラム2011、7月13日、2011年、東京.
 - 7) 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.
 - 8) 本村和嗣、中村浩美、佐藤裕徳、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.
 - 9) 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 (宮崎県衛生環境研究所)

カリシウイルス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

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った。サポウイルスカプシド蛋白質について、1D-3D プロファイル法、エントロピー解析、および分子動力学計算を行った。その結果、サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位が明らかになった。1D-3D プロファイル解析、エントロピー解析、動的性質の情報を組み合わせることで、より予測精度が上がる可能性が高くなると考えられる。

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。それゆえ、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

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。

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、1D-3D プロファイル法およびエントロピー解析の結果と比較することで、サポウイルスカプシドの抗原部位および機能部位を推定した。

B. 研究方法

1. アミノ酸配列

1D プロファイルやエントロピー解析には、サポウイルスカプシドのアミノ酸配列(N=107)を用いた。

2. 立体構造

3D プロファイルに用いるサポウイルス

カプシドの立体構造は、統合計算化学システム MOE (CCG 社, カナダ) を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。ターゲット配列にはサポウイルス Mc10 株カプシドのアミノ酸配列を、鋳型にはネコカリシウイルスカプシド (PDB code: 3M8L) を用いた。サポウイルスカプシド二量体分子モデルは、ホモロジーモデリング法により得られたサポウイルスカプシド分子モデルを、鋳型の二量体の位置情報をもとに配置することにより構築した。

3. 1D-3D プロファイル解析

サポウイルスカプシドのアミノ酸配列を用いて、PSSM (Position-specific scoring matrix) を求めた。これを 1D プロファイルとした。一方、サポウイルスカプシド二量体分子モデルから算出した、それぞれの座位におけるアミノ酸の生起確率から PSSM を求めた。これを 3D プロファイルとした。1D プロファイルと 3D プロファイルの共分散を求め、サポウイルスカプシド二量体分子モデルに表示した。

4. エントロピー解析

Shannon の情報エントロピーを指標として、カプシド全長のアミノ酸残基の多様性を解析した。得られたエントロピーをサポウイルスカプシド二量体分子モデルに表示した。

5. 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。

6. 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二量体モデル

ホモロジーモデリング法により構築したサポウイルスカプシド二量体分子モデルは、S ドメイン、P1 ドメイン、および P2 ドメインからなる。S ドメインと P1 ドメインは長いリンカーのより結ばれている。P2 ドメインの大部分はループ構造であった。

2. 1D-3D プロファイル解析

ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、1D プロファイルと 3D プロファイルの共分散を表示した。(図 1A) 共分散の大きさは、赤と青のグラデーションで表現している。より赤ければ共分散はより大きく、より青ければ共分散はより小さい。シアンは挿入欠失変異部位を示す。大きい共分散を示す部位は、カプシド全体に存在している。比較的小さい共分散を示す部位は、D365、

F383、I428、S470 の周辺のアミノ酸座位に見られた。D365、F383、I428 はカプシド蛋白質の最上部表面に位置し、S470 は隣接するカプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する。

3. エントロピー解析

ホモロジーモデリング法により構築した、サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、エントロピーを表示した。(図1B) エントロピーの大きさは、黄緑と青のグラデーションで表現している。より黄緑であればエントロピーはより大きく、より青ければエントロピーはより小さい。P2 ドメインに大きいエントロピーを示す部位が集中している。P1 ドメイン、S ドメインとウイルス内部側になるにしたがい大きなエントロピーを示す部位は減少する。D365 や I428 周辺の部位は、カプシド蛋白質の最上部表面に位置しているが、エントロピーは小さい。カプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する S470 周辺の部位もエントロピーは小さい。

4. サポウイルスカプシドの構造とゆらぎ

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 60 Å、S ドメインと P2 ドメインは約 90 Å 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 β シートからなるが、P2 ドメインは β -turn- β の 1 つのみである。

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。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 4 Å 以下であ

る。P1 ドメインは P2 ドメイン近傍に 1 つ RMSF が 8 Å 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 4 Å~10 Å 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。

5. サポウイルスカプシドでの相関運動

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

1D-3D プロファイル解析において、1D プロファイルは、実際に観測されたアミノ酸配列をもとに得られた、ある座位におけるあるアミノ酸の生起確率から計算された PSSM であるので、測定値であると考えられる。一方、3D プロファイルはカプシド蛋白質二量体構造より計算された、ある座位におけるあるアミノ酸の生起確率から得られた PSSM であるので、理論値であると考えられる。ゆえに、1D-3D プロファイル解析とは測定値と理論値を比較することで、アミノ酸の生起確率が構造的な制約のみで決定されているかどうかを判断する解析法である。したがって、共分散が大きいアミノ酸

座位、すなわち測定値と理論値の間に相関が見られるアミノ酸座位は、アミノ酸の生起確率が構造的な制約でのみで決まることを意味し、共分散が小さいアミノ酸座位、すなわち測定値と理論値の間に相関が見られないアミノ酸座位は、アミノ酸の生起確率が構造的な制約以外の要因、たとえば抗原部位や機能部位であることで決まることを意味する。

1D-3D プロファイル解析の結果、比較的小さい共分散を示す部位が、D365、F383、I428、S470 の周辺のアミノ酸座位に見られた。これらの部位が抗原部位や機能部位である可能性が考えられる。これらの部位のうち、分子動力学計算よりゆらぎが適度に大きい部位は F383 および I428 の周辺のアミノ酸であった。これらの部位は抗体等と結合しやすいと考えられ、1D-3D プロファイル解析の結果と一致する。ゆえに、F383 および I428 の周辺の部位は抗原部位または機能部位であると推定される。

次に、F383 および I428 の周辺の部位が、抗原部位か機能部位かを検討する。エントロピー解析より、F383 周辺は大きいエントロピーを示していた。このことは F383 周辺が、アミノ酸変異する規則性は、構造的な制約ではないことを示唆している。ゆえに、F383 周辺は抗原部位であると推定される。

I428 の周辺はエントロピーが小さく、アミノ酸がより保存されていた。これは I428 周辺のアミノ酸が保存されることが機能的に重要であることを示唆していると考えられる。ゆえに、I428 周辺は機能部位であると推定される。ここで、I428 周辺の位置を見てみると、I428 周辺はカプシド蛋白質の最上部表面であることから、感染受容

体などとの結合に関与する部位であるかもしれない。

E. 結論

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った。サポウイルスカプシドについて、1D-3D プロファイル法、エントロピー解析、および分子動力学計算を行った。その結果、サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位が明らかになった。1D-3D プロファイル解析、エントロピー解析、動的性質の情報を組み合わせることで、より予測精度が上がる可能性が高くなると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol*, 84:8085-8097, 2010.

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

(3) Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano

T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T, Sato H. Structural Basis for Specific Recognition of Substrates by Sapovirus Protease. *Front. Microbio.* 3:312, 2012. (The first two authors contributed equally)

2. 学会発表

(1) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. STRUCTURAL INSIGHT INTO SUBSTRATE RECOGNITION BASED ON P4 AND P1 RESIDUES BY SAPOVIRUS 3C-LIKE PROTEASE. Fourth International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile, 10/16-19/2010.

(2) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile, 10/16-19/2010.

(3) Chan-it Wisoot, 横山 勝, Thongprachum Aksara, Khamrin Pattara, 小林正明, 沖津祥子, 牛島廣治. Emergence of a new Norovirus GII.6 Variant among Infants and Children with Acute Gastroenteritis in Shizuoka, Japan during 2008-2009. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11/7-9/2010.

(4) 岡 智一郎, 横山 勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆字, 片山和彦. カリシプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大

会合同大会 (BMB2010), 神戸, 12/7-10/2010.

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

(6) Motomura K, Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H. STRUCTURAL DYNAMICS OF NOROVIRUS GII.4 GENOME IN NATURE.

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

(7) Chen N, Wang Q, Zhang Z, Pinto P, Yokoyama M, Saif LJ. Molecular mechanism of cell culture adaptation of swine sapovirus. The 31st Annual Meeting, the University of Wisconsin-Madison, July 21 - 25, 2012.

(8) 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. 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, 大阪, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

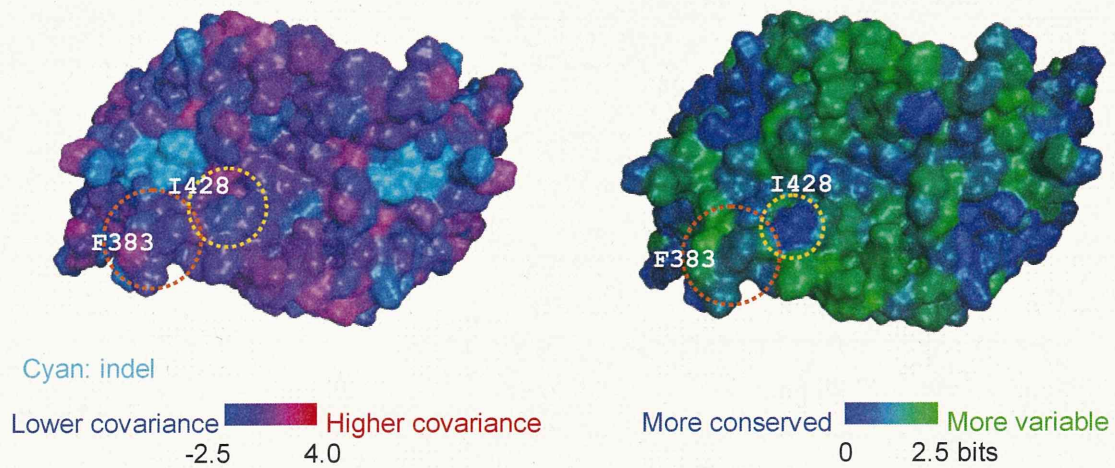


図1. サポウイルスカプシド蛋白質の 1D-3D プロファイル解析(A)とエントロピー解析(B)。サポウイルスカプシド二量体分子モデル上に、1D プロファイルと 3D プロファイルの共分散、およびエントロピーを表示した。

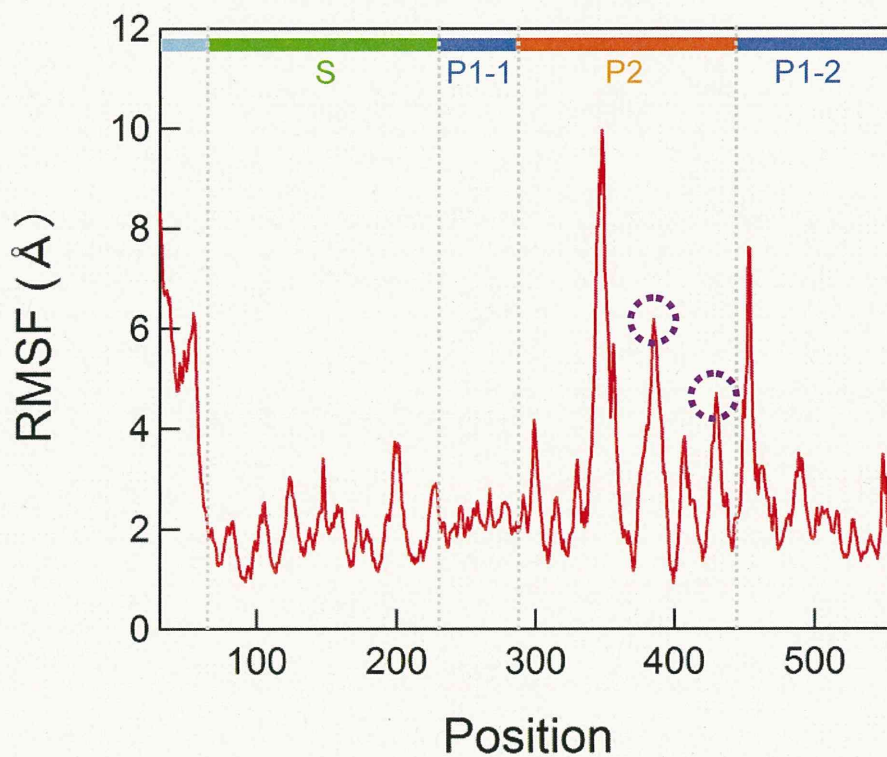


図2. サポウイルスカプシド蛋白質の各座位の $C\alpha$ の RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ)。