

human rotaviruses by full genome sequencing of G3P[4] and G2P[4] strains co-circulating in India. *Trop Med Health* 41(1): 13-20, 2013

10) Do LP, Nakagomi T, Doan YH, Kitahori Y, Nakagomi O. Molecular evolution of the VP7 gene of Japanese G2 rotaviruses before vaccine introduction. *Arch Virol* 159: 315-319, 2014

## 2. 学会発表

- 1) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011
- 2) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011
- 3) 伊藤陽里、中込とよ子、中込 治 : 京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院に起因する疾病負担とその評価, 第 52 回日本臨床ウイルス学会、津市、6 月 11 日、12 日、2011
- 4) 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.
- 5) 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.

6) 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.

7) 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

8) 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

9) 西村直子, 野口篤子, 伊藤陽里, 辰巳正純, 大場邦弘, 中込治, 中込とよ子, 藤井克樹, 片山和彦. 我が国で流行したロタウイルスの遺伝子型の全国分布. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷

10) 中込治, 中込とよ子. 連続して流行する同一の遺伝子型 (G12P[6]) 内でのロタウイルス株の進化: ネパールでの分子疫学的観察. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷

11) Doan YH, Gauchan P, 中込とよ子, 中込治. Continued circulation of multiple G2 strains with virtually identical VP7 genes before vaccine introduction in Nepal. 第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月, 長崎

12) Tran ATL, 吉田レイメント, 中込とよ子, Gauchan P, 有吉紅也, Dang AD, 中込治, Vu TD. A high incidence of intussusception revealed by a retrospective hospital-based study in Nha Trang, Vietnam between 2009 and 2011. 第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月, 長崎

13) Doan YH, 中込とよ子, 中込治. わが国で検出された G2 ロタウイルス株の全ゲノムレベルでの分子進化解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸

14) 中込治, 中込とよ子. ネパールにおけるロタウイルス B の分子疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸

15) Nakagomi O, Alam MM, Pun SB, Gauchan P, Yokoo M, Doan YH, Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Pandey BD. 2013, 11. The first identification of Rotavirus B from children and adults with acute diarrhoea in

Kathmandu, Nepal. Vaccines for Enteric Diseases (VED 2013), Bangkok, Thailand

16) Do LP, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, Systematic Literature Review on the Global Distribution of Rotavirus Genotypes. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013, Tokyo

17) Nakagomi O. 2013, 3. To what extent will selection pressure after mass rotavirus vaccination influence circulating rotavirus strains? 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore

#### 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

平成 23-25 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  
「網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」  
総合研究分担報告(平成 23～25 年度)

ロタウイルスの分子疫学とロタウイルス胃腸炎の  
入院率に関する基盤的情報

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
研究協力者	三浦 忍 伊藤陽里 野口篤子 高橋 勉	由利組合総合病院 公立南丹病院 秋田大学・大学院医学系研究科・小児科学講座

### 研究要旨

わが国に導入されたロタウイルスワクチンがおよぼす効果と野生株に与える影響について全国レベルで評価する基盤的方法を確立することを目的として、3年間の研究期間の各年度に以下の3つの個別の課題を設定して研究を行った。すなわち、1(2011): ワクチン導入後の増加が先行する導入国で報告されている G2 株の地球規模で見た分子進化学的変遷、2(2012): 過去の保存株にある G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析を通して全ゲノム解析の有用性の実証、3(2013): 疾病負担評価に最も重要なロタウイルス胃腸炎による入院率の算出である。1では、ロタウイルス G2 株の VP7 遺伝子の系統関係を確立し、1つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな進化をしていることを明らかにした。2では、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を示した。3では、わが国の 5 歳未満児におけるロタウイルス胃腸炎による入院率には地域差があるが、5 歳になるまでに、約 20 人から 50 人に 1 人がロタウイルス胃腸炎に罹患し、その治療のために、入院を余儀なくされていることを明らかにした。

#### A. 研究目的

わが国に導入されたロタウイルスワクチンがおよぼす効果と野生株に与える影響について全国レベルで評価する一環と

して、3年間の研究期間の各年度に以下の3つの個別の課題を設定して研究を行った。すなわち、1(2011): ワクチン導入後の増加が先行する導入国で報告されて

いる G2 株の地球規模で見た分子進化的変遷を明らかにすること、2 (2012): 過去の保存株にある G3P[4]型ロタウイルスの出現機構の解析を通して全ゲノム解析の有用性を示すこと、3 (2013): 疾病負担評価に最も重要なロタウイルス胃腸炎による入院率を算出すること、である。

## B. 研究方法

1. ネパールで 2004/2005 年の流行期に採取した 67 株の G2 株のうち、45 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列を決定した。過去 34 年間にわたり DNA データベースに登録されている 339 株の G2P[4]株の VP7 遺伝子分節の塩基配列情報にもとづき、MEGA4 により分子系統解析を行った。

2. インドで分離された G3P[4] 株 (107E1B) および G2P[4] 株 (116E3D) から QIAamp Viral RNA mini kit によりゲノム RNA を抽出し、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。

3. 公立南丹病院 (京都府南丹地区) および由利組合総合病院 (秋田県由利地区) において、ロタウイルス胃腸炎 (24 時間以内に 3 回以上の通常よりゆるい便が 3 行以上あるか、他の疾患で説明できない激しい嘔吐がある発症後 7 日以内の症例で、便検体中にロタウイルス抗原を検出した症例) を抽出し、これらの病院のキャッチメント地区の 5 歳未満の小児人口を母集団として、ロタウイルス胃腸炎による入院率を計算した。

(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. ネパールで検出された 45 株の G2 VP7 遺伝子とデータベースに登録されている 339 株の G2 VP7 遺伝子にもとづき作成した分子系統樹の解析の結果、(1) 4 つの系統といくつかの亜系統の存在、(2) 分子系統と、ウイルスの中和抗原部位にある 4 つのアミノ酸残基 (87, 96, 213, 242) との間の対応関係、(3) 系統 IVa とその亜系統である IVa-3 が近年の優勢株であること、(4) 最近は、すべて系統 IVa となり、その 3 分の 2 を IVa-3 であること、(5) 2004 年以降に G2 株が急増したネパールの株はすべて IVa-3 であったが、ブラジルでは 2006~2007 年を境に IVa-1 から IVa-3 への変遷が起こっていたことが明らかになった。

2. G3P[4] のロタウイルス株 (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、G2P[4] 株 (116E3D) G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であることが分かった。これら 2 つのウイルス株の VP7 遺伝子以外の遺伝子分節の塩基配列の一致率を計算したところ、99.83-100% であり、不一致な塩基数は各分節で 2 塩基以下であった。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

3. 京都府南丹地区および秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率は、それぞれ、3.9 人/1000 人・年および 11.4 人/1000 人・年であった。

#### D. 考察

1. 本研究の結果として得られた、すべてのネパール株で 96 番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンへの置換を有している観察事実を、過去 34 年における G2VP7 遺伝子の分子系統進化の中に位置づけると、この変化が系統 IVa に特徴的に起こっており、近年の G2 株はすべて系統 IVa になっていた。この現象は 96 番目のアミノ酸置換により、系統 IVa 株が選択的優位性を獲得したためであると思われる。

2. 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。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。本研究によ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を示す robust な証拠を得た。

3. 本研究班の統一基準によって明らかになった京都府南丹地区でのロタウイルス胃腸炎入院率は 3.9 人/1000 人・年は、秋田県由利地区における入院率である

11.4 人/1000 人・年の約 3 分の一に相当する入院率であり、ロタウイルス胃腸炎の入院率には明らかな地域差が存在することが示された。その一方で、それぞれの地区での既報の入院率（南丹地区では 5.1 人/1000 人・年、由利地区では 13.7 人/1000 人・年）とは類似し、ほぼ同様の地域差があったことには、大きな意義がある。

#### E. 結論

1. ロタウイルス G 2 株の VP7 遺伝子は、1 つの系統の中から新しい系統が出現し、それが優位となり、その中からまた新たな系統が出現するというダイナミックな変化の中で進化しているものと思われる。

2. 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を示した。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、野生株との間で遺伝子分節再集合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。

3. わが国の 5 歳未満児におけるロタウイルス胃腸炎による入院率には地域差があるが、5 歳になるまでに、約 20 人から 50 人に 1 人がロタウイルス胃腸炎に罹患し、その治療のために、入院を余儀なくされていると推測された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表

1) Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA,

- Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7 of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005: a global and evolutionary perspective. *Arch Virol* 2011 156(11):1969-1978.
- 2) 中込とよ子、中込 治：ロタウイルス感染症：最新医学 66(12)： 2641-2648, 2011
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gómara M, Nakagomi O, Cunliffe NA. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997-2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. *J Gen Virol* 94 (6): 1273-1295, 2013
- 7) Nakagomi T, Kato K, Tsutsumi H, Nakagomi O. The burden of rotavirus gastroenteritis among Japanese children during its peak months: an internet survey. *Jpn J Infect Dis* 66 (4): 269-275, 2013
- 8) Gauchan P, Nakagomi T, Sherchand JB, Yokoo M, Pandey BD, Cunliffe NA, Nakagomi O. Continued circulation of G12P[6] rotaviruses over 28 months in Nepal: successive replacement of predominant strains. *Trop Med Health* 41 (1): 7-12, 2013
2. 学会発表
- 1) Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Doan YH, Witte D, Ngwira B, Todd S, Steele AD, Neuzil KM, Han HH, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains detected during a clinical trial of a human rotavirus vaccine in Blantyre, Malawi. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011
- 2). Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Possible implication of amino acid substitution D96N in the VP7 gene of G2P[4] strains emerging in Nepal and

- elsewhere in the context of the evolution of of G2 strains. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011
- 3) Bhattachan P, Nakagomi T, Cunliffe NA, Yokoo M, Pandey BD, Sherchand JB, Nakagomi O. Successive replacement of G12P[6] rotavirus stains over 2 years in Nepal. XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011
  - 4) Nakagomi O, Doan YH, Nakagomi T, Cunliffe NA. A global and evolutionary perspective of the G2 VP7 genes of rotavirus strains detected over the last 34 years: 4th European Rotavirus Biology Meeting, Reggio Calabria, Italy, 2-5 October, 2011
  - 5) Nakagomi O, Nakagomi T. Emergence of G2 rotaviruses in Brazil as re-evaluated from the perspective of molecular epidemiology: 2nd European Expert Meeting on Rotavirus Vaccination, Padova, Italy, 12-13 April, 2011
  - 6) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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
  - 11) 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
  - 12) Nakagomi T. 2013, 3. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Singapore.
  - 13) Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, 3. Genomic characterization of the first G8 human rotavirus detected in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the

- Pacific Rim, Singapore.
- 14) Gauchan P, Sasaki E, Nakagomi T, Nakagomi O. 2013, 1. Re-appraisal of the Burden of Rotavirus Hospitalization in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013, Tokyo.
  - 15) Nakagomi T, Nakagomi O. Estimating the risk of intussusceptions during the first week after the first dose of the monovalent human rotavirus vaccine to Japanese infants 6-20 weeks of age. Vaccines for Enteric Diseases (VED 2013), Bangkok, Thailand.
  - 16) 大城亮作, 中込とよ子, 中込治. 成人の急性下痢症におけるロタウイルス A の陽性割合 : a systematic review. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷
  - 17) 伊藤陽里, 中込とよ子, 中込治, 藤井克樹, 片山和彦. 京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院率. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷
  - 18) 三浦忍, 野口篤子, 藤井克樹, 中込治, 片山和彦, 中込とよ子, 高橋勉. 秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 倉敷
  - 19) 中込とよ子, 中込治, 堤裕幸, 加藤一也. アンケート調査により得た直接非医療費と生産性損失に基づくロタウイルスワクチン予防接種の費用対効果. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会, 2013 年 11 月, 津
  - 20) 中込とよ子, 中込治. Super-short pattern をもつ特異なヒトロタウイルス AU19 の全ゲノムレベルでの解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸

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

平成 23-25 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  
「網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築とワクチン評価」  
総合研究分担報告(平成 23～25 年度)

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  
研究協力者 ゴッシュ ソウ 札幌医科大学医学部衛生学講座  
ビック

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、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。本研究では主にアジアに分布する主要な遺伝子型および稀で非定型的な遺伝子型のヒトロタウイルスを対象に全遺伝子配列を決定することにより全遺伝子分節の遺伝子型および遺伝学的系統を解析し、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明することを目的とした。解析の対象としたのは、主要な遺伝子型としては中国におけるG3P[8]およびG1P[8]株、非定型的遺伝子型ではG1P[9] (K8株、日本)、G3P[9] (L621、E2451株、中国) G4P[10] (57M株、インドネシア)、G9P[19] (Mc323、Mc345、タイ) のロタウイルス株である。中国(武漢市)におけるG1P[8]、G3P[8]株の全遺伝子分節は、同一の遺伝子型(Wa遺伝子群)に属していたが、G3P[8]ロタウイルスの長期間にわたる観察では非構造蛋白遺伝子を中心に時折異なる系統が出現し、様々なアレル配座(allele constellation)が見られ、他のロタウイルス株との間でリアソートメントが起きていることが示唆された。G3P[9]株はAU-1遺伝子群に属し、ネコ/イヌロタウイルスとの関連が示唆され、G1P[9]株はヒトWaおよびAU-1遺伝子群間の、G4P[10]株はWaおよびDS-1遺伝子群間のリアソータントであると考えられた。G9P[19]株はブタロタウイルスにきわめて近かった。以上より、非定型的ヒトロタウイルスは、主要遺伝子群間で形成されたリアソータントまたは動物ロタウイルスが伝播したもの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リアソートメント(遺伝子再集合)を起こすことも知られる。従来、VP7、VP4遺伝子の解析に基づいて動物-ヒト間での伝播やロタウイルス間のリアソートメントを調べた報告は多数あるが、それ以外の遺伝子分節についてはあまりよく調べられていない。そのような自然界でのロタウイルスの動態を明らかにするには全遺伝子配列にもとづく解析が必要である。

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学的位置づけをより明確にすることができる。そこで

最近、分子疫学的研究に全遺伝子配列に基づく解析が頻繁に行われるようになってきている。

本研究では、日本を取り巻くアジアにおけるヒトロタウイルスの分子疫学的状況を明らかにすることを目的として、定型および非定型のロタウイルス株の全遺伝子配列に基づく系統解析を行った。定型のロタウイルス株として、最近まで10年以上にわたり中国において主要な遺伝子型であったG3P[8]、その後の優勢な型G1P[9]のヒトロタウイルス、非定型のロタウイルスとして、G1P[9](K8株、日本)、G3P[9](L621、E2451株、中国)G4P[10](57M株、インドネシア)、G9P[19](Mc323, Mc345、タイ)の各型のロタウイルスを対象とした。これらのウイルス株について全遺伝子配列を決定し、各遺伝子分節の分子進化の様態や、世界中のヒトまたは動物ロタウイルス株との関連を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

中国のG1P[8]、G3P[8]、G3P[9]ロタウイルスは、共同研究機関である湖北省・武漢市疾病対策予防センターにおいて収集・保管されているものを用いた。同センターでは市内5か所の病院から下痢便検体を供与されており、ロタウイルスの検出とG/P型別が行われている。G1P[8]株は、2004、2005、2009年に検出された計3株、G3P[8]株は2000年から2013年までの計33株(毎年概ね1-3株)、G3P[9]株は現在までに検出された2株(2006年および2011年)を研究対象とした。非定

型的ロタウイルス K8 株 (G1P[9])、L621、E2451 株 (G3P[9])、57M 株 (G4P[10])、Mc323、Mc345 株 (G9P[19]) は札幌医科大学衛生学講座に以前から保存されている組織培養分離株を用いた。

## 2. 方法

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。

(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. G3P[8]株 (中国)

解析した 33 株はすべて G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 遺伝子型を有し、Wa 様遺伝子群に属していた。全 11 分節の塩基配列は、一部の株を除き互いに高い一致率 (>95%) を示した。VP6 遺伝子、NSP1 遺伝子、NSP2 遺伝子、NSP3 遺伝子では株間での多様性が認められた (一致率: 83-100%)。VP7, VP2, VP3

遺伝子はすべての株が単一の系統に属し、一致率は極めて高かった (98-100%)。各遺伝子分節の主系統は本研究の全期間 (約 12 年間) にわたり概ね保持されていたが、VP1, VP4, VP6, NSP1-NSP5 遺伝子において時折異なる系統が出現し、さまざまなアレル配座 (allele constellation) が見られた。最も顕著な変化が見られたのは NSP1 遺伝子であった。解析された多くの G3P[8]株はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) では類似した RNA パターンを示したが、泳動度が大きく異なる 2 種類の第 5 遺伝子分節 (NSP1 遺伝子) が観察され、泳動度の遅いもの、早いものをそれぞれ E-A1-1、E-A1-2 と名付けた。E-A1-1 は研究期間全体を通じて認められたが、E-A1-2 は 2006-2007 シーズンに現れ急増したものの 2009-2010 年以降減少していった。E-A1-1、E-A1-2 の NSP1 遺伝子は、系統樹ではそれぞれ A1-1、A1-2 の系統に分類された。A1-1 はさらに 2 つの亜系統 A1-1a、A1-1b に区別された。A1-1 系統には Y0 株をはじめ米国の G3P[8]株や古い G1P[8]株が含まれ、古くから維持されてきた系統であると考えられた。A1-2 系統には比較的新しい G1, G3, G9, G12 株が含まれ、A1-1 より後に拡がった系統であると考えられた。異なる遺伝子分節で非主系統が同時に存在する株が少数見られた (例: VP1 と NSP2 遺伝子、VP4 と VP6 遺伝子、など)。しかし多くの株では、各遺伝子分節における非主系統への置換は遺伝子分節間で規則性はなく、分節毎に独立して起きていることが示唆され、それら非主系統の遺伝子の多くは中国以外の G3 または他の遺伝子型株とク

ラスターを形成していた。

## 2. G1P[8]株 (中国)

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。

## 3. G3P[9]株

G3P[9]ロタウイルス 2株 (L621 および E2451) の遺伝子型は、G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6であった。これら2株のVP1, VP3, VP4, VP6, NSP2, NSP5遺伝子は遺伝学的にきわめて近く高い一致率 (>97%) を示したが、VP7 と NSP1

遺伝子ではやや低く、さらに低い一致率はVP2 (87%), NSP3 (86%) and NSP4 (92%) の各遺伝子で見られた。系統遺伝学的にAU-1 遺伝子群のプロトタイプ AU-1 株と同じクラスターに属した遺伝子は、L621株ではVP4, VP6, NSP1 遺伝子、E2451株ではVP2, VP4, VP6, NSP1, NSP3, NSP4 遺伝子のみであった。これら2株のVP4, VP7, NSP4 遺伝子は典型的なネコ/イヌロタウイルスのそれにきわめて近く、VP1, VP3, VP6, NSP3, NSP5 遺伝子もネコ/イヌロタウイルスと共通の起源をもつと考えられた。2株のNSP1 遺伝子はグアナコのロタウイルスと高い一致率を示し、L621株のVP2 遺伝子はウマ、サル、ウサギロタウイルスと、2株のNSP2 遺伝子はウサギロタウイルスとクラスターを形成していた。

## 4. G1P[9]株

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。

## 5. G4P[10]株

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なった。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遺伝子群に属するウイルスが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。

#### 6. G9P[19]株

G9P[19]の Mc323, Mc345 株の全遺伝子分節に基づく遺伝子型は、G9-P[19]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1に属し、ほぼ同一のRNAパターンを示した。これら2株間の遺伝子配列の一致率

は、NSP5 遺伝子を除き、96.2-98.8%と高かった。NSP5 遺伝子は Mc345 株においてリアレンジメントが起きていることがすでにわかっており、一致率は95.0%とやや低かった。Mc323, Mc345 株のVP7, VP4 遺伝子の配列は既に決定されている。VP4 遺伝子はタイにおけるブタ P[19]ロタウイルスのそれと同じ系統に属し、VP7 遺伝子は殆どのヒト G9 ロタウイルスが属する系統とは異なる系統に属しており、これにはタイのブタロタウイルスが含まれていた。Mc323, Mc345 株のVP6 遺伝子はブタロタウイルスに特徴的な I5 型に属し、系統樹でもタイのブタロタウイルスのVP6 遺伝子と同じクラスターに属した。Mc323, Mc345 株のVP2, VP3, NSP1-4 遺伝子は、いずれもブタロタウイルスに近縁であり、それらと同一のクラスターを形成していた。Mc323, Mc345 株のVP1, NSP5 遺伝子は既知のヒトロタウイルス、ブタロタウイルスとの関連は明白ではなかったが、主要なヒトロタウイルス株のそれらとは同じクラスターには含まれていなかった。以上をまとめると、Mc323, Mc345 株の遺伝子分節は、VP1, NSP5 を除き、ブタロタウイルス、しかもこれらの株が見つけれられたタイのウイルスに極めて近縁であった。VP1, NSP5 遺伝子との関連は明らかではないが、少なくとも通常のヒトロタウイルスとは遺伝学的に近い関係にはないので、動物ロタウイルスに由来している可能性が残されている。結論として、Mc323, Mc345 株はブタロタウイルスがヒトに直接感染したウイルスであることが示唆された。

#### D. 考察

G3P[8] ヒトロタウイルス株の分子疫学的研究は、主流株の全ゲノムにおける変異を長期間解析したものであり、アジアでは初めての研究である。これにより、G3P[8] ヒトロタウイルスが同時期の Wa 遺伝子群ロタウイルスとの間でリアソートメントを起こしながら変異を蓄積させてきた様態が明らかとなった。またリアソートメントを起こした遺伝子は主に非構造蛋白遺伝子であり、自然界ではより頻繁に変異が起きていると考えられた。中でも NSP1 遺伝子の変化は顕著であり、A1 遺伝子型に属する一つのクラスターの増加が数年間観察され、集団免疫の回避やウイルス増殖における何らかの利点を獲得したことが推測される。VP4 ではクラスターの変化が見られたものの、VP7 は観察期間を通じて変化は見られず、遺伝学的にきわめて安定であると考えられた。ロタウイルスの優勢な G/P 型が数年間持続した後、他の型に置き換わることはよく報告されており、これは優勢な型に対する免疫応答が集団において高まることが一因と理解されている。しかし中国の G3 ロタウイルスでは長年これが優勢でありつつも VP7 遺伝子は変化を見せておらず、その後 G1, G9 へと主要な型がシフトしている。このことは VP7 への免疫応答が優勢な G 型の変化の主たる要因ではないことを示唆している。

今回調べられた G3/G1P[8] 株の遺伝子配列は、VP7, VP4 遺伝子を含め、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ことも今回の研究で明らかになった。従って今後も継続的な調査を行うことが必要であると考えられる。

G3P[9] はヒトロタウイルスにおける稀な AU-1 遺伝子群において特徴的な G/P 型である。AU-1 株の遺伝子型は G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 であるが、今回の解析で NSP5 遺伝子型 H6 も H3 とともに AU-1 遺伝子群ヒトロタウイルスで共通な型であることが示された。また AU-1 遺伝子群に属する株は、ネコ/イヌロタウイルス株との関連が強く、それらからの直接伝播や共通の祖先ウイルスから分子進化した可能性が考えられるほか、ウマやウサギなど他の動物に由来または関連する遺伝子分節も含まれていると考えられた。したがって AU-1 遺伝子群のロタウイルスはネコ/イヌ及びその他の動物種のロタウイルスの遺伝子分節が再集合による、複雑な遺伝学的背景を有すると考えられた。一方 G9P[19] ロタウイルスはブタからの直接的な感染が示唆された。また G1P[9] 株、G4P[10] 株は、Wa、DS-1、または AU-1 遺伝子群間のリアソートメントであることが示唆された。したがって、非定型的ヒトロタウイルス株の成因は主に動物からの感染、または遺伝子群間のリアソートメントであり、ヒトにおける増殖・適合性は低いと考えられる。しかしそのようなロタウイルスがさらなる変異

により新興ウイルス株としてヒト集団の中で拡がる可能性もあり、非定型的ウイルス株についても監視してゆくことが必要と思われる。

## E. 結論

中国・武漢市における主流型 G3P[8] ヒトロタウイルスを12年間にわたり追跡し、その全遺伝子の分子進化を解析した。その結果、非構造蛋白遺伝子を中心にリアソートメントにより変異が蓄積する様態が明らかとなった。G1P[8]株はWa 遺伝子群に属し、アジアの他の国の同型ウイルスと近縁であった。G3P[9]株はAU-1 遺伝子群に属し、ネコ/イヌロタウイルスとの関連が示唆され、G1P[9]株はヒト Wa および AU-1 遺伝子群間の、G4P[10]株は Wa および DS-1 遺伝子群間のリアソータントであると考えられた。G9P[19]株はブタロタウイルスにきわめて近かった。以上より、非定型的ヒトロタウイルスは、主要遺伝子群間で形成されたリアソータントまたは動物ロタウイルスが伝播したものであると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Wang Y-H, Pang B-B, Zhou X, Ghosh S, Tang W-F, Peng J-S, Hu Q, Zhou D-J, Kobayashi N. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. *Infect Genet Evol*, 2013, 16:103-112.
- 6) Ghosh S, Urushibara N, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Kobayashi N. Whole genomic analyses of asymptomatic human G1P[6], G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains reveal intergenogroup reassortment events and genome segments of artiodactyl origin. *Infect Genet Evol*, 2013, 16:165-173.
- 7) Wang YH, Pang BB, Ghosh S, Zhou X, Shintani T, Urushibara N, Song YW,

He MY, Liu MQ, Tang WF, Peng JS, Hu Q, Zhou DJ, Kobayashi N. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. PLoS ONE, 2014, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Kobayashi N, Ghosh S, Paul SK, Nagashima S. Full-genomic analysis of human rotavirus strains which have VP4 genes belonging to a rare P[8] subtype (P[8]B). 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- 2) Gosh S, Adachi N Gatheru Z, Nyangao J, Ishino M, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of human G2P[4] rotavirus strains from Africa. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- 3) Yamamoto D, Kawaguchiya M, Ghosh S, Ichikawa M, Numazaki K, Kobayashi N. Full genomic analysis of rare G6P[9] human rotavirus detected in Japan. 15th International Congress of Virology, 2011, Sapporo.
- 4) Ghosh S, Shintani T, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis of a rare human G1P[9] rotavirus strain. 9<sup>th</sup> Japan-China Conference of Virology, 2012, Sapporo (June 13, Hokkaido University)
- 5) 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 34<sup>th</sup> Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, 2012, Sapporo (Oct.18).
- 6) 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 13<sup>th</sup> Asia-Pacific congress of Clinical Microbiology and Infection, 2012, Beijing (Oct.27).
- 7) Kobayashi N, Ghosh S. Interspecies transmission of rotaviruses evidenced by whole genomic sequence analysis. The 17<sup>th</sup> FAVA (Federation of Asian Veterinary Association) congress, 2013, Taipei (Jan.5)
- 8) 鷲見紋子、小林宣道. 感染症と気象変動の相関構造に関する研究。ーインド・コルカタにおけるロタウイルスの流行動態を例としてー。第64回北海道公衆衛生学会 2012年11月9日、札幌。
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 小林宣道、Ghosh S、新谷 つづみ、Wang Y-H、Zhou X、Pang BB. 全遺伝子配列に基づく中国の主流型 G3P[8]ヒトロタウイルスの12年間にわたる分子進化様態の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10日、神戸.

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

## リバース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

ロタウイルスは、タンパク質分解酵素による VP4 の開裂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。リバース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 の解析を行い、以下の結果を得た。1. VP4 の開裂の意義を検討する目的で、細胞外に存在するトリプシンと同様に細胞内に存在するフェーリンにも感受性が生じるように、VP4 の開裂部位にフェーリン認識配列を導入し、得られたウイルスの性状を検討した。本ウイルスは、親株と比較して増殖能が低く、トリプシンを与えないと、プラーク形成も観察できなかった。細胞内で、VP4 が開裂すると、細胞外への放出効率が悪くなることが示唆された。2. 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、リバースジェネティクス系を利用してこれら 3 ヶ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。3. ロタウイルスのリバースジェネティクス系の改良のための試みの一貫として、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスの遺伝子操作系の確立を試みた。その結果、L929 細胞および BHK-21 細胞において、11 個のプラスミドを同様に共導入したところ、組換えレオウイルスの回収が可能であった。

### 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

(dsRNA) 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解明されていない。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もわからない。そこで、点変異の蓄積あるいは組換えによる毒力復帰があり得るのかもよくわからない。

こうした背景のもと、本研究では、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て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、リバーシジェネティクス系を用いて、VP4 上の3ヵ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。

VP4 上のトリプシン切断領域にフェーリン様プロテアーゼ認識配列を導入した

組換えロタウイルス (KU//rVP4-R247Furin) を作製し、トリプシン非存在下でのロタウイルスの多段階増殖の可能性を試みた。

また、現時点では、VP4 しかリバーシジェネティクス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。その試みの一貫として、レオウイルスのリバーシジェネティクス系の検討を行った。哺乳類オルソレオウイルス（レオウイルス）は、10本の分節二本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムとして保有し、多分節 dsRNA ウイルスの複製機構および病原性を解析する上で優れたモデルである。近年、cDNA のみから感染性レオウイルスの作製を可能にする遺伝子操作系が開発され、従来の系では困難であった任意のウイルスゲノム改変を可能にした。T7 RNA ポリメラーゼを発現している培養細胞にレオウイルスゲノムをコードする T7 プラスミドを導入することで、感染性レオウイルスを作製できる。これまで、T7 RNA ポリメラーゼの供給は、組換えワクシニアウイルス rDIs-T7pol あるいは BHK-T7 細胞の使用に限られてきた。本研究では、さらに幅広く応用できる T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスの遺伝子操作系の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 細胞

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。ヒト大腸 adenocarcinoma 細胞株 LoVo 細胞は Ham's F12 培養液 + 10%FCS で培養した。

#### 組換えウイルスの調製

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。

サル RV SA11 株の VP4 遺伝子上のトリプシン切断領域 (244IHRYR247) にフェーリン認識配列 (244RHRR247) を導入したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築した。COS-7 細胞にプラスミドを導入し、ヘルパーウイルスとしてヒト RV KU 株を感染させた後に、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 KU//rVP4-R247Furin を単離した。対照として、KU//rVP4 を用いた。

レオウイルス 3 型 (T3D) のゲノムをコードする 10 個の T7 プラスミドと T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド pC-T7pol を L929 細胞あるいは BHK-21 細胞に共導入し、5 日間培養後にプラークアッセイで組換えレオウイルスを回収し

た。

ヘルパーウイルスとしては、ヒトロタウイルス KU 株 (G1P[8]) を利用した。

#### 部位変異の導入

部位変異は、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を利用して、行った。

#### 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): 296FKPANYQYTYTRDGE EVT313 と 444LDRLYGLPAADPNNGKE460 を KLH に結合し、ウサギに免疫して得た。

#### ウェスタンブロットティング

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。

#### (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

#### 結果1

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。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