

表5 ISPSの実施状況についてのアンケート集約(九州地区地衛研)

地衛研	ISPSの実施状況			備考・要望
	全株について実施	一部の株のみ実施	必要時だけ実施	
1		○		
2	○			mupidで泳動できる株数が少ないので、もう一台ほしいです。
3		○(O157のみ)		疫学的に使用されたケースがほとんどなく(行政依頼もなく)、せつかく短時間でできる手法なので、上手に運用している自治体はその手法を教えていただきたいです。他にO157以外の血清型にも対応できるとありがたいです。
4	○			
5		○先行してPFGEを実施した際は、代表株のみ対応		食中毒の迅速対応を求められる際にIS-printingは有効と考えているが、対応事例がなかなか発生しない。よって、菌株がある程度揃ったら定期的実施している状況である。
6	○			
7	○			
8	○			
9			○	
10			○	
11		○		
12	○			

表6.1 平成24年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

平成24年12月末集計時

地研 計	O群血清型																							
	O157	O26	O111	O103	O145	O91	O121	O186	O115	O126	O165	O8	O25	O55	O105	O118	O119	O148	O153	O169	O172	O185	OUT	
1	125	61	14	3	20	13	3	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5
2	85	44	3	1	8	15	7	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3
3	18	13	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4	78	17	36	4	10	0	0	2	6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
5	36	20	3	2	2	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
6	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	38	31	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
8	27	5	15	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	9	7	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	59	17	12	18	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11	101	21	9	59	2	1	1	1	0	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
12	21	18	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
合計	601	258	95	94	58	35	11	7	6	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20

表6.2 平成25年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

平成25年12月末集計時

地研	計	血清型毎の腸管出血性大腸菌の分離菌株数															
		O157	O26	O111	O103	O121	O91	O145	O146	O183	O115	O156	O136	O28	O128	O130	OUT
1	80	22	43	1	4	1	5	2									2
2	139	21	9	81	12	4	3	2	2		1			1	1		2
3	18	14	2					1									1
4	68	52		3	1	9	1										2
5	59	26	25	2	2	1		1	2								
6	11	8	1		1			1									
7	28	19	7				1										1
8	70	30	35		4												1
9	3	2									1						
10	74	4	41		24	3						2					
11	44	15	8	2	6	2	0	0		4	1	3				1	2
12	9	3	3														3
合計	603	216	174	89	54	20	10	7	4	4	3	3	2	1	1	1	14

表6.3 平成26年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

地衛研	O血清型別の分離菌株数																	計	
	O157	O26	O111	O103	O121	O91	O145	O183	O115	O136	O55	O128abc	O165	O124	O6	O8	O172		OUT
1	27	4		2	2	1	1		1		1		1			1		1	42
2	28	24	1	1	1	3	1												59
3	39	5					2												46
4	39	3	1	6		1	1		1	1							1		54
5	67	34	12	23				1											137
6	2																		2
7	11	4		2	1	1	1												20
8	25	31	2	1															59
9	4	1	45																50
10	4	2	1		4					1	1								13
11	8	23	8	2	2		1			1			1	1	1				48
12	1	10	5	3															19
合計	255	141	75	40	10	6	7	1	2	1	3	1	2	1	1	1	1	1	549

表7 EHEC患者の男女別年齢構成

年齢	患者数(人)			
	男	女	総計	
0	0	1	1	(0.2 %)
1	31	30	61	(15.0 %)
2	25	21	46	(11.3 %)
3	25	19	44	(10.8 %)
4	15	19	34	(8.4 %)
5	14	17	31	(7.6 %)
6	9	6	15	(3.7 %)
7	2	3	5	(1.2 %)
8	8	2	10	(2.5 %)
9	2	3	5	(1.2 %)
10～19	8	13	21	(5.2 %)
20～29	9	23	19	(4.7 %)
30～39	4	18	31	(7.6 %)
40～49	7	7	23	(5.7 %)
50～59	7	5	13	(3.2 %)
60～69	6	7	11	(2.7 %)
70～79	2	3	26	(6.4 %)
80～89	2	4	8	(2.0 %)
90～99	1	0	3	(0.7 %)
合計	177	201	407	(100 %)

表 8.1. 平成 24 年度に九州地区地衛研で確認された EHEC 集団発生事例数
(平成 24 年 12 月集計時)

地研事例計	集団事例計	O157以外計	O群血清型					
			混合3 O157	混合1 O26	混合1 O111	混合9 O103	混合9 O145	混合9 O186
1	5	(4)	1 (農村体験)	1 (保育所)		2 (W飲食店、K食肉)*	1 (保育所)	
2	2	(1)	1 (仕出し弁当)			2 (W飲食店、K食肉)*	1 (保育所)	
3								
4	4	(3)	1 (共同生活施設)	1 (保育所)		1 (施設)		1 (施設)
5	1	(0)	1 (保育所)					
6								
7	1	(0)	1 (焼肉店)					
8	2	(1)	1 (保育所)		1 (幼稚園)			
9								
10	5	(5)		2 (保育所)	1 (保育所)	2 (保育所)		
11	2	(2)			2 (保育所)			
12	1	(0)	1 (保育所)					
事例合計	23	(16)	7	4	4	5	2	1

* 地研1と2のO103集団発生2事例はいずれも同一事例

** 家庭内での集団発生例は含まれず

表8.2 平成25年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例数

平成25年12月集計時

地衛研	O群血清型毎の事例数									
	O157	(概要)	O26	(概要)	O103	(概要)	O111	(概要)	O121	(概要)
1	1	(高校食中毒疑い)	1	(保育園)						
2					1	(保育園)	1	(保育園)		
3	1	(Y県S市焼肉店成型肉 レアステーキ)								
4	9	(家庭)×5、(保育園及び 家庭)×2、(高齢者福祉施 設)×1、(BBQ)×1					1	(家庭内)	2	(家庭内)×1、(保育園 及び家庭)×1
5	1	(保育所)	2	(保育所)						
6	1	(家族内)								
7										
8	1	(保育園)	2	(保育園)						
9										
10			2	(保育園、1事例はO103と の混合感染)	1	(保育園、O26との 混合感染)				
11										
12										
合計	14		7		2		2		2	

表8.3 平成26年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

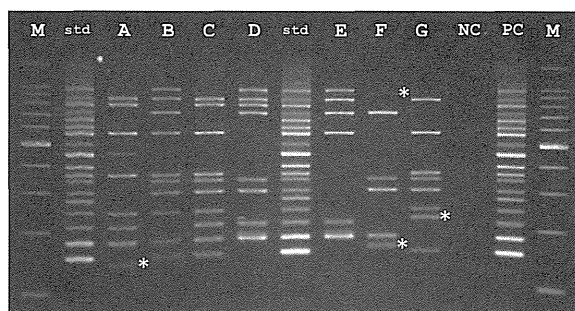
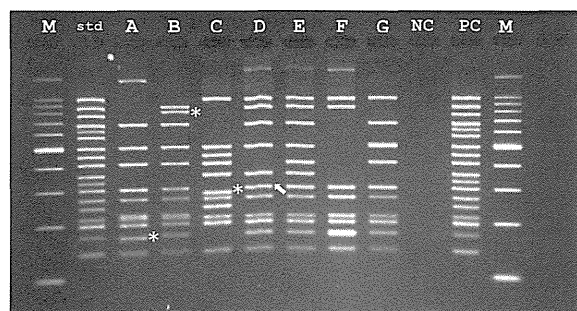
地衛研	O血清型別のEHEC集団発生事例							
	O157	(概要)	O26	(概要)	O103	(概要)	O111	(概要)
1								
2	2	(高校)× 1、(保育 所)×1	1	(保育所)				
3	1	(高齢者福 祉施設)						
4	1	(保育園)			1	(保育園)		
5	1	(保育園及 び家庭)	1	(保育園及 び家庭)	1	(保育園及 び家庭)		
6	1	(家族内)						
7								
8	1	(保育園)	1	(保育園)				
9							1	(保育所)
10								
11								
12			1	(保育園)			1	(保育園)
合計	7		4		2		2	

表 9 各施設の誤判定と正解率(平成 24 年度)

Lab.	試薬 Lot	精度管理試料番号							施設毎の正解率
		A	B	C	D	E	F	G	
1	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
2	0651A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
3	1404A	1-16*	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
4	2101A	1-16*、2-03	1-03*	2-02	2-02、2-05	—	—	—	3/7 (43%)
5	0651A	—	—	—	1-12	—	—	—	6/7 (86%)
6	2101A	1-16*	1-03*	—	—	—	—	—	5/7 (71%)
7	05122J5	1-16*	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
8	2101A	1-16*	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
9	2101A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
10	05122J5	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
11	2101A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
12	2351A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
各試料の正解率		3/12 (25%)	10/12 (83%)	11/12 (92%)	10/12 (83%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	

* 明瞭なエクストラバンドを誤判定したものを示す

菌株番号	1st set																2nd set																			
	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
A	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
B	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
C	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
D	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
E	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
F	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
G	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1



* :エクストラバンド

↖ :エクストラバンドではあるが、通常のアガロースゲル電気泳動では見分けることは困難(6bpほど小さい)

図 2 精度管理(ISPS)の結果(平成 25 年度)

表 10 各施設の誤判定と正解率(平成 25 年度)

Lab.	試薬 Lot	精度管理試料番号							施設毎の 正解率
		A	B	C	D	E	F	G	
1	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
2	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
3	1404A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
4	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
5	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
6	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
7	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
8	2601A	—	—	—	—	2-01	—	—	6/7 (86%)
9	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
10	05122J5	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
11	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
12	2601A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
各試料の正解率		11/12 (92%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	11/12 (92%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	

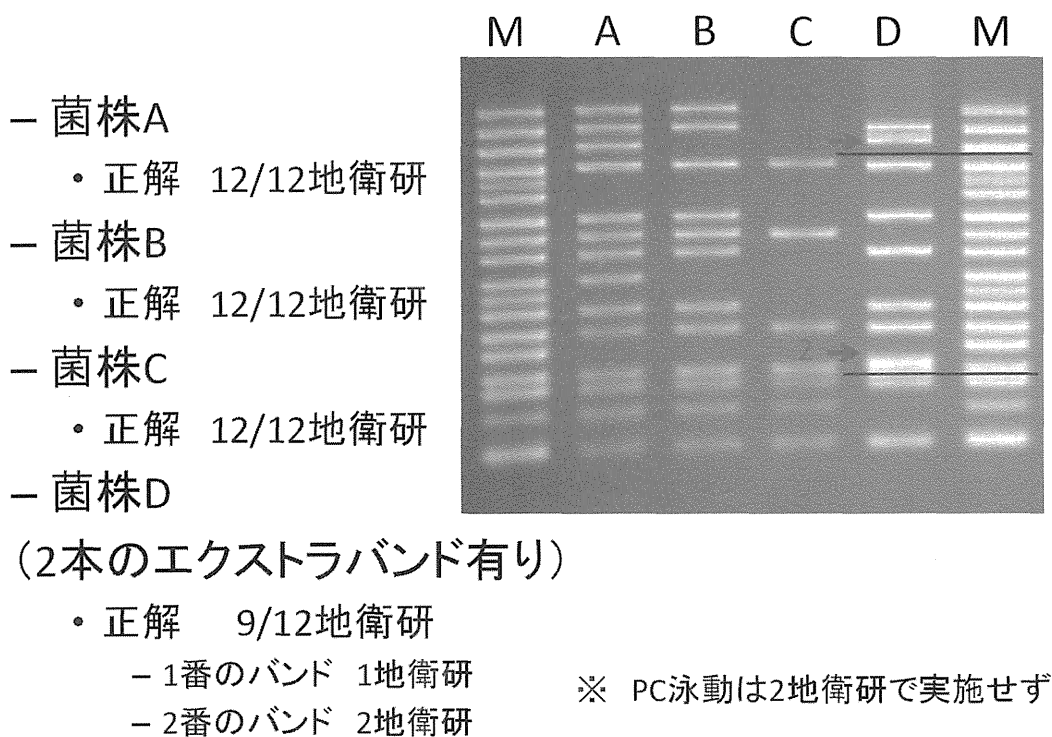


図 3 精度管理 (ISPS) の結果 (平成 26 年度)

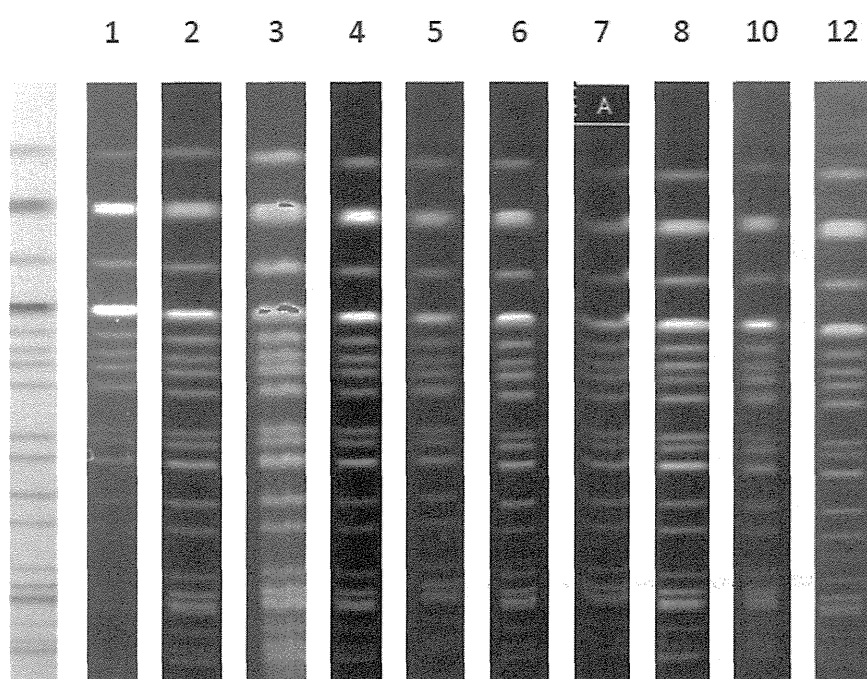


図 4.1 平成 26 年度精度管理 (PFGE) の結果 (菌株 A)

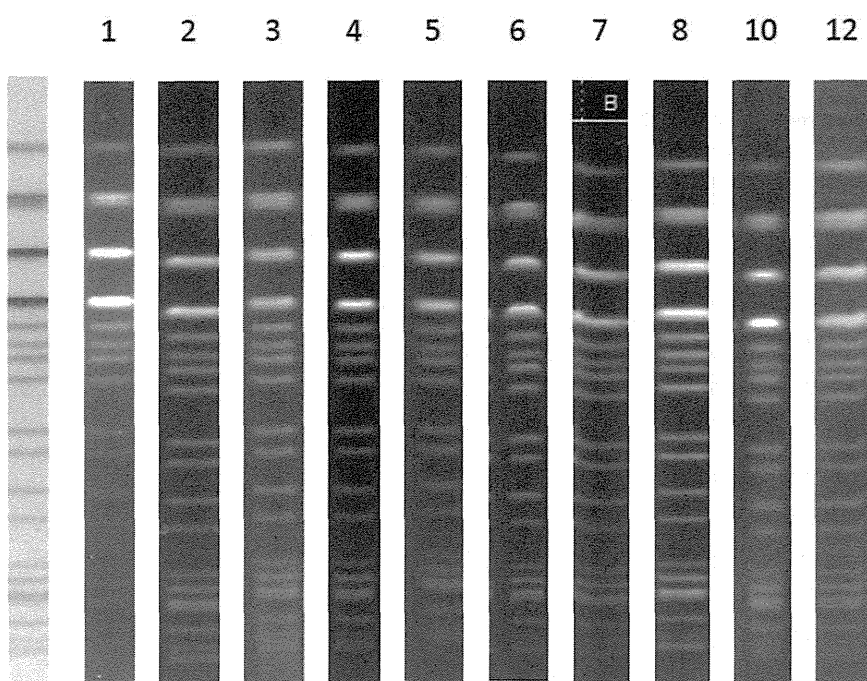


図 4.2 平成 26 年度精度管理 (PFGE) の結果 (菌株 B)

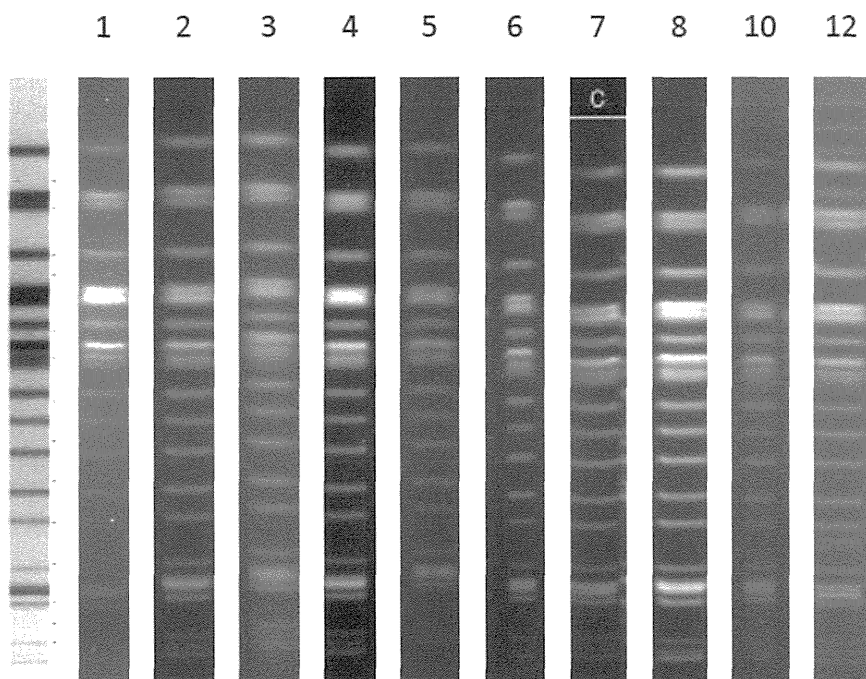


図 4.3 平成 26 年度精度管理 (PFGE) の結果 (菌株 C)

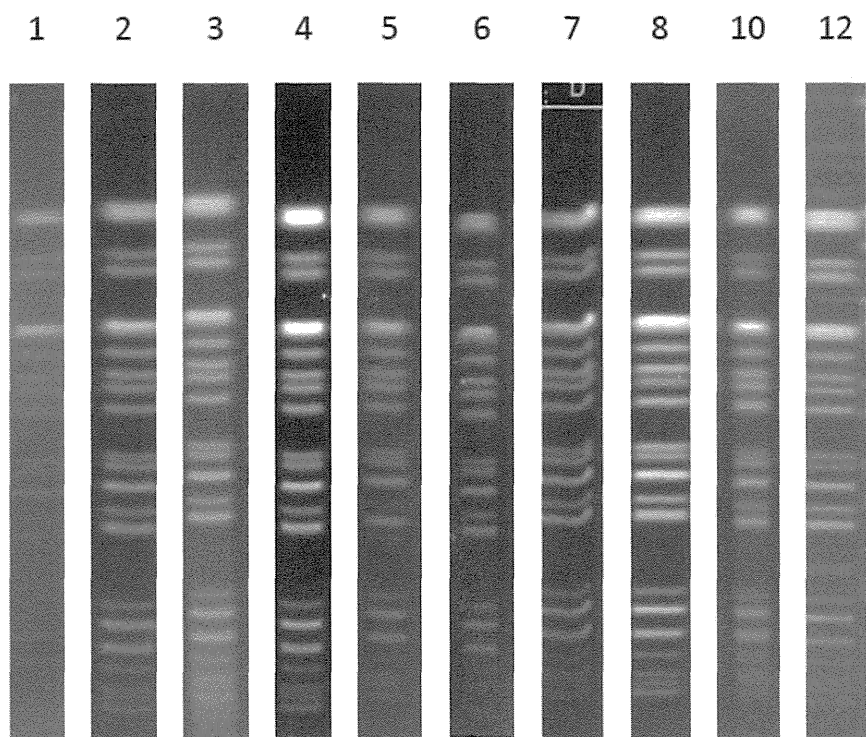


図 4.4 平成 26 年度精度管理 (PFGE) の結果 (菌株 D)

表 11 平成 26 年度精度管理 (PFGE) の結果 (バンド数)

地衛研	菌株			
	A	B	C	D
1	19	20	21	18
2	21	20	22	21
3	19	17	18	19
4	18	17	18	19
5	19	18	19	20
6	22	21	22	21
7	20	20	22	21
8	20	19	20	21
10	19	18	19	19
12	24	23	24	23

IS-printing では、数%の割合でエクストラバンドが見られます。エクストラバンドのほぼ全ては、IS が移動する際に生じる IS 挿入部位前後の領域での欠損・挿入によるものです。これらによる判定の差を解消するために、電気泳動法マニュアルの試案を作成しました。

1. 用意する物

(ア) 電気泳動槽

① Mupid-exU (ADVANCE 社製)

(ア) TBE バッファー

(イ) 25mM NaOH

(ウ) 1M Tris-HCl (pH 7.0-8.0)

(エ) 必要に応じて用意する物

① 耐熱ゲルメーカーセット

1. ゲルメーカーセット EXU-HR (ADVANCE 社製) *

*Mupid-exU に対応

② アガロースゲル溶解用容器

1. Bench Pint 250mL、又は、500ml (フナコシが販売)

<http://www.funakoshi.co.jp/contents/6740>



写真 Bench Pint 250 mL

2. サンプルの調製

(ア) アルカリ溶解法

- ① 大きさ 1 mm 程度の菌体を 50 μ l の 25 mM NaOH 水溶液に懸濁
 1. 検査に必要な場合、釣菌を先に行う。
 2. 1 コロニーを全てディスポーザブル白金耳で掻き取る。
- ② 95° C で 5 分間加熱
- ③ 4 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 7.0~8.0) を加えて中和する。
- ④ 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 1 μ l を PCR のテンプレートとする。

3. PCR 反応

PCR 反応は、サーマルサイクラーの温度条件の除き、試薬添付のマニュアルに従う。

サイクル条件 (1st set / 2nd set 共通)

96 °C · 2 min

↓

96 °C · 20 sec	} 20 cycles
62 °C* · 30 sec	
68 °C · 1 min	

Ramp rate (温度変化率) は、2 °C/sec 程度に設定する。

* 試薬添付のマニュアルではアニーリング温度が 64°C に設定されているが、1st set の上から 6 番目 (1-06) のバンドと 2nd set の上から 9 番目 (2-09) のバンドの増幅が弱いことから 62°C に変更した。アニーリング温度が 62°C でも 1-06 と 2-09 のバンドが薄い場合、また、*eae* と *hlyA* のバンドが薄い場合には、60°C で反応を行う。

4. 電気泳動 (1st set / 2nd set 共通)

(ア) 3 % アガロースゲル電気泳動作成

ゲル作製のアガロースは NuSieve GTG : SeaKem GTG = 2 : 1 で使用する。

- ① ゲル 1 枚あたり以下の材料を容器* に入れ電子レンジで加熱する。

NuSieve GTG	2.0 g
SeaKem GTG	1.0 g
0.5 × TBE	100 ml

＊アガロースゲル溶解用容器（Bench Pint 500 mL）を使用する
と、

加熱時の突沸が防げ、気圧がかかる為、きれいに溶ける。

- ② 沸騰したら電子レンジを止めて、溶液を軽く攪拌する。（火傷に注意）
- ③ 再度、電子レンジで沸騰するまで加熱する。
 1. 耐熱ゲルメーカーセットを使用しない場合は、45℃の温水中に放置し、50-60℃（手で触れるくらい）まで冷やす。室温で放熱しても構わない。
- ④ ゲルメーカーを水平な台に置き、コームをセットする。
 1. コームは6mm幅*を使用する。

＊検体数が多い場合は、2mm幅を使用しても構わない。ただし、事前にPCR産物の希釈濃度の検討が必要。
 2. ゲルトレイはゲルトレイ大を使用する。
 3. 必要に応じて台の水平を水平器で確認する。

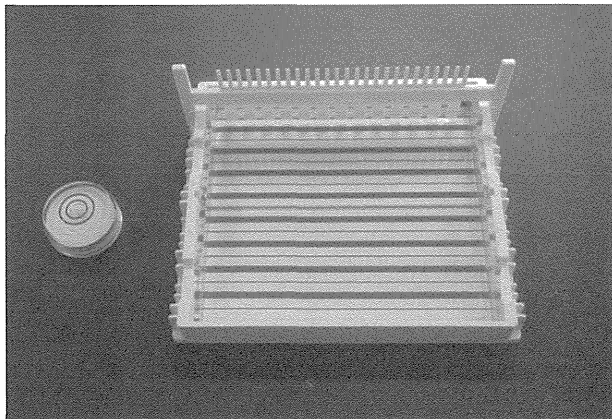


写真 ゲルトレイの組み立てと水平器

- ⑤ 溶解したアガロースゲルをゲルメーカーに流し込む。
 1. 耐熱ゲルメーカーセットを使用する場合には、沸騰直後のアガロースゲルを流し込んでも構わない。
 2. 流し込んだゲルの表面に泡や埃がある場合には、ピペットチップの先端でゲルの端に移動させる。

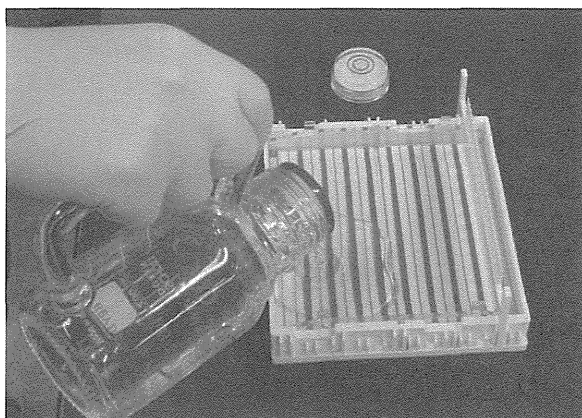


写真 ゲルトレイへのゲルの流し込み

- ⑥ 室温で 20～30 分間放置する。
 - 1. 気温が高い季節には、さらに氷上で 10 分間程度冷やす。
- ⑦ ゲルの上に 0.5×TBE を少量加えてから、コームをゆっくり引き抜く。
 - 1. 液体をかけておくとウェルに泡が入りにくくなる。

(イ) 電気泳動

- ① 電気泳動槽に 0.5×TBE を 300 ml 注ぐ。
- ② 作成したアガロースゲルをゲルトレイごとセットする。
 - 1. ゲルトレイの下に空気が入らないように注意してセットする。
- ③ アガロースゲルが泳動バッファーに浸かっている場合は、アガロースゲルが浸る程度に 0.5×TBE を追加する。
- ④ PCR 産物を 2-5 倍に蒸留水や 0.5×TBE で希釈する。
 - 1. 希釈する倍率は、施設にて検討を行って決定する。
 - 2. 試薬添付のマニュアル通りの方法で、非常に太いバンドであった施設は、希釈倍率 5 倍を推奨する。
- ⑤ 希釈した PCR 産物 5 μ l に 6×Loading Dye を 1 μ l 添加し、アプライする。
 - 1. PCR サンプル 4～5 レーン毎にマーカを設定する。
 - 2. サンプルが多い場合、26 本コームを使用することも可能。その場合は、ウェルへのアプライ量は 2 μ l とする。
- ⑥ 100V で 90～99 分間泳動を行う。
 - 1. 気温の低い冬には、時間を長く設定する。
- ⑦ エチジウムブロマイドで 20 分間染色を行う。
 - 1. 電気泳動に使用した 0.5×TBE もしくは精製水 300 ml に、2 μ g/ μ l のエチジウムブロマイドを 45 μ l 加え、染色液(最終濃度:0.3 μ g/ml)とする。

- ⑧ 精製水で脱色 20 分間
- ⑨ 精製水で脱色 20 分間
- ⑩ 装置で撮影する。

(ウ) 結果判定

- ① ポジティブコントロールのバンドが全て現れていることを確認する。
 - 1. 1st set の上から 6 番目 (1-06) のバンドと 2nd set の上から 9 番目 (2-09) のバンドの増幅が弱くなりやすいことから、特に注意する。
 - 2. *eae* と *hlyA* のバンドが薄い場合は、アニーリング温度をさらに 2℃下げ 60℃とし、再検査を実施する。アニーリング温度が改善されない場合には、反応チューブやサーマルサイクラーを変更し、再検査する。
- ② サンプルの両端にあるマーカーのバンドに定規などを当てながら、バンドの判定を行う。もしくは、PC で電気泳動写真を開き、直線を引きながら判定を行う。

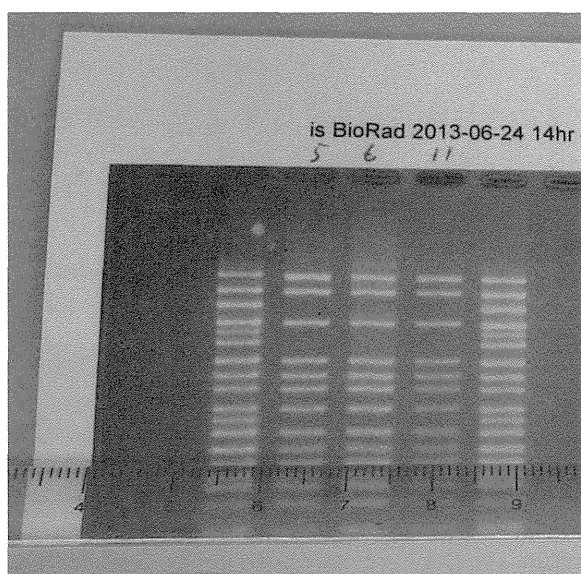


写真 定規を利用した判定方法

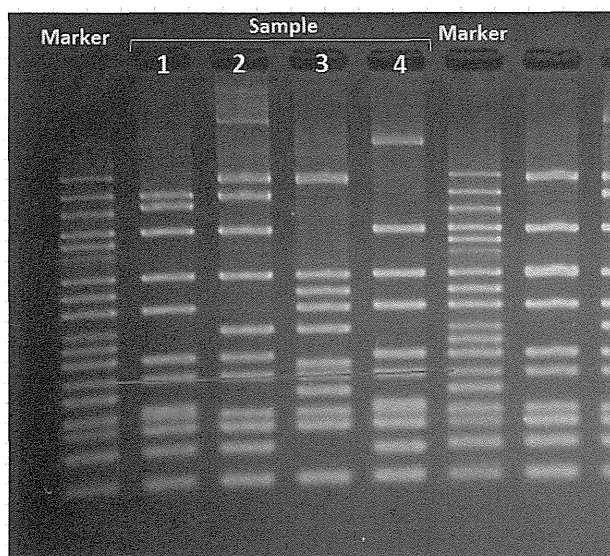


写真 Excel を使った判定方法の一例
図形で直線を画像上に描画した

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）
「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 24-26 年度研究分担報告書

下痢症ウイルスの総合データベース構築総括

研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 室長
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 教授
研究分担者 三瀬 敬治 札幌医科大学医学部衛生学人材育成センター 講師
研究協力者 芳賀 慧 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 任期付き研究員
研究協力者 デニス フランシス・エコー ガーナ野口研究所 研究員

研究要旨

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てきた。ロタウイルス遺伝子データベースを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用を開始した。急性胃腸炎の原因ウイルスであるサポウイルスはノロウイルス同様、塩基配列の多様性に富む。国内外におけるサポウイルスの検出例増加に伴い、検出されたサポウイルス株のタイピング手法を確立した。ロタウイルスの全遺伝子セグメントの網羅的解析並びに分子疫学に次世代シーケンサーを導入し、ハイスループットな全遺伝子配列解析システムの構築に成功した。ヒトノロウイルス及びネズミノロウイルスの非構造蛋白質である RNA dependent RNA polymerase の結晶化に成功し、立体構造が明らかになった。RdRp の形状、アミノ酸残基と RNA の結合様式を明らかにし、遺伝子型によって異なる RdRp のアミノ酸多様性、構造変化がウイルスの病原性変化に影響を与えるか否か、分子疫学の標的領域になり得るか否かを解析するためには、RNA と結合したクローズドコンフィグレーションの RdRp の構造を決定する必要がある。構造解析に成功した RdRp のインビトロ活性測定システムを構築し、異なる遺伝子型の RdRp の活性差を評価可能とした。

A. 研究目的

下痢症を引き起こすウイルス感染症は、毎年、世界的規模で数十～数百万人規模の流行を引き起こす。特にノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）感染症は、我が国においても、大規模なウイルス性食中毒を引き起こすことが知られている。また、ロタウイルス（RV）は乳幼児の深刻な下痢症の原因ウイルスとして知られていたが、近年、脳炎の遠因となることも疑われている。さらに、成人に感染し、重篤な嘔吐下痢症を引き起こすなどの新たな問題点も報告されている。

我が国において、これらのウイルス感染症は、平成 18 年度から平成 23 年度まで、申請者の継続した NoV 等のヒトに感染するカリシウイルスの構造タンパク質領域（ウイルス粒子を形成するタンパク質）の遺伝子配列の解析と蓄積、それを利用した分子疫学の推進によって、流行のメカニズムの研究、感染予防法の開発が行われてきた。特に、NoV 等のヒトに感染するカリシウイルス遺伝子データ蓄積に特化した CaliciWeb は、我が国のみならず、国外からも広く利用され、感染経路の特定やワクチン開発等に活用されてきた。しかし、CaoliciWeb では、近年爆発的に流行した NoV GII.4 や、脳炎を起こす RV など、ウイルスの病原性の変化に対応することが困難である。これらウイルスの病原性に関わるタンパク質を特定し、さらに高度な分子疫学的手法を構築するためには、臨床データとリンクした網羅的な遺伝子配列解

析に加え、ウイルスタンパク質の機能を構造生物学的に解析し、これらの研究成果を反映させることのできる新たな分子進化遺伝学的分子疫学を構築する必要がある。さらにこれらのウイルスでは、遺伝子の組み換えや（リコンビネーション）、入れ替え（リアソート）が高頻度で起きる。本研究班ウイルス分野においては、上記要素を加味したウイルスの病原性変化が予測可能な分子疫学解析ツールの開発と、それを搭載した下痢症ウイルス遺伝子の網羅的分子疫学用データベース、GatVirusWeb の構築を目指した。さらに、次世代シーケンサーを用いた配列解析プラットフォームの構築を目指した。

B. 研究方法、結果及び考察

・ノロウイルスタンパク質の構造解析（朴英斌、朴三用ら）

本研究で構築を目指す GatVirusWeb 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。昨年度は、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。し

かし、単独の発現は、難しく、困難が予想された。今年度は、可溶性タンパク質として発現しやすい RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の結晶化と、構造解析に取り組んだ。

リバースジェネティックスシステムが稼働しているヒトノロウイルス GII.3 U201 株の RdRp 領域を大腸菌へのコドン最適化を行った後、pCold 発現ベクターに組み込み、大量発現を行った。U201-RdRp は、可溶性画分に大量に発現され、mg オーダーで調整することが可能であった。結晶化の条件を最適化し、安定した RdRp の結晶を得ることに成功した。得られた結晶は、筑波のシンクロトロンを用いて X 線を照射し、リフレクションパターンを取得した。リフレクションパターンより、コンピューターにより 3D 構造を構築した。構築に成功した構造と、データベース上に報告されている他の遺伝子型に由来する構造を比較したところ全ての RdRp はクローズドコンフィグレーションであることが判明した。クローズドコンフィグレーションの RdRp は本来、RNA を抱き込んだ状態で形成される形状であるが、我々の RdRp には、いかなる RNA も結合していなかった。さらに、RdRp の構造の類似性は極めて高く、微細な構造の違いが RNA 合成効率に影響するか否かは、インビトロで二重鎖 RNA の合成活性を調べるなど、生化学的検討を行って比較する必要があると思われた。

結晶構造解析に用いた RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5' 末端にタイプを

超えて保存されている RNA モチーフ：GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無しで de novo RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。現在、CAUCUUCAUUCAC との共結晶化、GUGAAUGAAGAUG との共結晶化、この部分の完全二重鎖との共結晶化を進め、RNA を抱き込んだクローズドコンフィグレーションの RdRp の結晶の作製を試みている。

培養細胞で増殖させることが可能なマウスノロウイルス (MNV) の S7 株についても RdRp の発現と結晶化に成功した。しかし、MNV の RdRp の結晶は、ヒトノロウイルス U201 株の結晶よりも脆く、リフレクションパターンに乱れが生じたため、10 Å を若干下回る程度の解像度しか得られなかった。さらに大量かつ高純度の RdRp を作製し、ラージスケールでの結晶化を進めた結果、U201 株と同様の結晶構造を解くことができた。しかし、その構造は驚くほど U201 や既報のヒトノロウイルス、マウスノロウイルスの RdRp を類似性が高かった。さらに、ヒトノロウイルスのゲノム 5' 末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフを認識可能である事が明らかになった。

以上から、ヒトノロウイルスのリバースジェネティックスの技術により作出できる感染性ウイルスの RdRp をエンジニアリングすることが可能となった。ウイルス増殖効率を左右する微細な構造変異の部位、つまり病原性を考慮に入れた分子疫学タ

ーゲット領域の候補を見いだすことに繋がる成果が得られた。

昨年度より試みた、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、可溶化と結晶化する試みは失敗した。現在、VP2 は eIF4E, G との共結晶化、VPg は VP1 との共結晶化を試みている。

・PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析、ロタウイルス RNA-PAGE の分子疫学への応用 (村上、藤井)

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、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。ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(RNA-PAGE)により分節ごとに分離される。RNA-PAGE の泳動パターンは、群および遺伝子型ごとに特徴があることから、泳動パターンから大まかな分類が可能である。RNA-PAGE は安価で多検体を処理できる方法として有用であるが、泳動条件の違いにより泳動パターンに差が生じることから、異なる施設間での比較が容易でない。この問題点を解決するため、本分担研究では、施設間誤差の小さいマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) に着目し、この手法によるロタウイルス dsRNA の分離を検討し

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。今年度は、これを解決する方法として、泳動の電圧調整、ポリマーの選択を行い、再現性の高い手法を確立した。互いに異なる塩基配列を有するサンプルの RNA-PAGE data と MultiNA のデータを蓄積することで、MultiNA がより高精度に群・遺伝子型を分類できることが明らかとなった。最終的に、MultiNA に機種を絞り込み、自動パターン認識、識別プログラムの開発に着手した。本実験には、共同研究者より提供されたユニークな RNA-PAGE パターンを示したロタウイルス陽性便検体を用いた。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。マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA における泳動は、DNA500 ポリマーキットを用いて行った。得られたバンドパターンは、相対移動度だけではなく、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いた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パターンライブラリーに蓄積した。

MultiNA による相対移動度は、時にアッセイ間差が株間差を上回る場合が有り、RV 株の中には相対移動度で分別できない株を経験した。そこで、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積データを基盤として、上部、中部、下部の electrophoregram を互いにフィッティングさせることで、その相関係数を算出した。electrophoregram を互いにフィッティングを行い、相関係数を指標にすることで、株分けが可能であると思われた。コンピュータ上での計算速度は極めて速く、本方法により、地理的に離れたラボ間でのデータ比較が容易になり、今後展開されるであろうロタウイルスの流行株把握に対して極めて有用なツールとなり得る。現在、この方法に基づく自動判定プログラムのスクリプト開発を行っている。

・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 (鈴木、片山)

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。昨年度、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ところ、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。本年度、ロタウイルスのリアソータント解析に本方法の応用を試みるため、本研究プロジェクトで蓄積を開始したロタウイルスの種々の遺伝子型の次世代シーケンス (NGS) データ (約 300 株分) より 5' , 3' 近傍の塩基配列を抽出し、ゲノムセグメントごとにアライメントした。また、データベース上に報告のある塩基配列とも比較検討を行った。

ロタウイルスの遺伝子セグメントは、VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5 である。これらをそれぞれ NGS データとデータベース上のシーケンスをアライメントしたところ、NGS データに数~数十塩基に及ぶオーバーハングがある可能性が見いだされた。仮に、オーバーハングが実在するとした場合、インフルエンザとは異なる機序で遺伝子セグメントの組み合わせが決まり、リアソータントが生じている可能性がある。本年度、遺伝子セグメントの 5' 側。