3’側の末端の構造ならびに塩基配列を、RACE法ならびに次世代シーケンスを用いて決定したところ、データベース上に報告されているように5’側、3’側ともに高度に保存された配列モチーフが存在していた。

・GatVirusWebの構築と維持（三瀬敬治）

前研究班で構築されたCaliciWebは、ノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV)、サッポロウイルス（サポウイルス、SaV）等のカリシウイルスを対象としたデータベース、疫学情報サイト CaliciWebは、本年度観察されたNoV GII.4 2012変異株の大流行を捕らえ、注意喚起を行うなど、NoVの流行制御、予防衛生に多大な貢献を果たした。本ウェブサイトに構築されたNoV, SaV等のCalici virusに特化したサブデータベースは、国内外を問わず、利用者数も多く、研究者の間で重要な位置を占めている。本研究班では、CaliciWebを引き継ぐだけでなく、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスを新たに加えてGatVirusWebを中心として拡大整備し、流行予測プログラムの開発・ページへの組み込みを行いつつさらなる充実を図る。昨年度は、ロタウイルスの分子疫学の基盤構築のため、データベースにロタウイルスの情報を収載し、利用できるようにした。今年度は、英語でのフォーラム運用を行い、GatVirusWeb を国際的情報交換の場として運用する予定し、外部リンクへのリンク申請など順調に研究が推移していたが、突然の外部からのサイバー攻撃により、serverが壊され、Web siteの復旧と新規立ち上げを行った。しかし、pdfのダウンロードができないなど、細かな不具合が続いていた。今年度の対応により、細かな不具合を解消すると共に、セキュリティーを向上させた。

. **健康危険情報**

なし

D. 研究発表研究発表（原著論文によるものに限る。）

1. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. Journal of virology vol. 85, 6687-701, 2011.

2. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis

for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. Journal of virology vol. 86, 284-92, 2012.

3. Hansman, GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JRH, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, and Kwong PD. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle Journal of virology vol. 86, 3635-3646, 2012.

4. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. Exp Anim. vol. 61, 35-40, 2012.

5. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, and Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol. Vol.157, 349-52, 2012.

6. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill F, Atmar RL, Katayama K, Utama B, Estes MK. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012) doi:10.1186/1743-422X-9-181

7. Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park YB and Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 56: 630-638, Sep, 2012.

8. Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T and Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. Frontiers

in Microbiology 3: Article 312, 1-10, 2012.

9. Miki M and Katayama K. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. Frontiers in Microbiology 3: Article 387, 1-6, 2012

10. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. Microbiol Immunol. 56(11):760-770, 2012.

11. Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, and Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. Arch Virol DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, Dec. 2013.

12. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. Jpn J Infect Dis. 66(5):454-7., 2013.

13. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. J Vet Med Sci. 2013 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.

14. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y,

Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, **Katayama K**. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLoS One. 2013 Jun 14;8(6): e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.

15. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, **Katayama K**, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub Apr 25, 2013.

16. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, **Katayama K**, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. Food Environ Virol. 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub Mar 23, 2013.

17. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, **Katayama K** and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. Doi: 10.1292/jvms.13-0468; J. Vet. Med. Sci. 76(7):1045-1050, 2014.

18. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, **Katayama K**, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. Infect Genet Evol. Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.

19. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, **Katayama K**, Kimura H. A food-borne outbreak of

gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. Microbiol Immunol. doi: 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.

20. Nagai M, Aoki H, Sakoda Y, Kozasa T, Tominaga-Teshima K, Mine J, Abe Y, Tamura T, Kobayashi T, Nishine K, Tateishi K, Suzuki Y, Fukuhara M, Ohmori K, Todaka R, **Katayama K**, Mizutani T, Nakamura S, Kida H, Shirai J. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan. J Vet Diagn Invest. 26(4): 547-552. [Epub ahead of print] Jul 15, 2014.

21. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. PLoS One. 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.

22. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. Vet Microbiol. 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.

23. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces

reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23;111(38);E4043-52, Epub Sep 5, 2014 .

24. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. Veterinary Microbiology 174, 577-583, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの
構築に関する研究」
平成 24-26 年度研究分担報告書

ロタウイルスの RNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類法の検討

研究分担者　藤井克樹・片山和彦　国立感染症研究所　ウイルス第二部

研究要旨

ロタウイルス(RV)は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。我々は、ロタウイルス遺伝子 11 分節の long RT-PCR 法の構築に成功した。また、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。しかし、迅速かつ高精度なロタウイルスサーベイランスには、簡便な株分類法が必須である。

RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動(RNA-PAGE)し、分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することで株鑑別が可能である。我々は、ロタウイルスの RNA-PAGE パターンに基づく簡易株鑑別法として、electrophoregram を基盤にしたパターンフィッティングの技法を用いて算出する相関係数による解析方法を開発した。現在、ロタウイルス株自動照合、分類ソフトウェアの開発が進行している。

A. 研究目的

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

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

地研などの検査室では、RV の検出法としては ELISA 法や RT-PCR 法およびシークエンス解析を行うことが通例となっているが、RV 研究者の間では、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（RNA-PAGE）によりウイルスゲノムを直接検出できる事がよく知られている。RV 感染患者の便 1g には 10 の 10 乗～12 乗もの大量のウイルス粒子が存在している為、便検体から抽出した RNA について RNA-PAGE を行うと 11 本の遺伝子分節に由来するバンドを容易に検出できる。しかも、そのバンドパターンは遺伝子型の違い或いは僅かな塩基配列の違いにより泳動度が異なって現れる。RNA-PAGE とマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の比較検討を行い、相対移動度（モビリティシフト）をパラメーターとした株判別の可能性を示した。この性質を利用し、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA による RNA-PAGE の相対移動度の蓄積に注力して研究を実施した。全塩基配列を解析済みの様々な遺伝子型の RV を用いて、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA にてバンドパターンを蓄積した。しかし、パターン蓄積量の増加に伴い、バンドの相対移動度では分別不能な株も出現した。そこで、検体のバンドパターンをパターンデータベースと照合して、バンドパターンの相関値を算出し、それを用いて株判別を実施する方法を構築した。

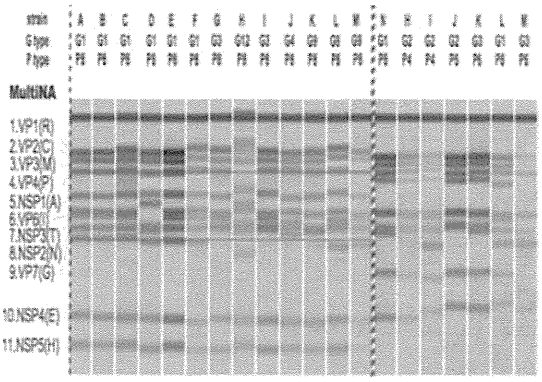
B. 研究方法

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

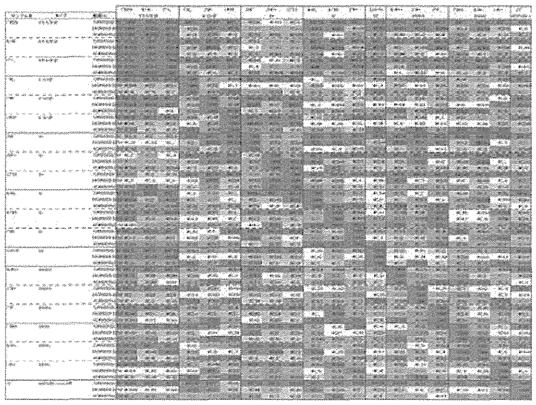
電気泳動装置 MultiNA における泳動は、DNA500 ポリマーキットを用いて行った。得られたバンドパターンは、相対移動度だけでは無く、画像と electrophoregram（泳動波形とピーク位置が示されたグラフ）の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定してパターンライブラリーに蓄積した。

C. 研究結果および考察

RV のゲノムはサイズの大きいものから順に VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp)、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp)、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) の順番で MultiNA によるパターンとして検出された（サイズは株により異なるため、およその値で示した）。MultiNA では、VP1 (3300 bp)、VP2 (2700 bp)、VP3 (2600 bp)、VP4 (2350 bp) は上部に近接したバンド群として、NSP1 (1550 bp)、VP6 (1350 bp)、NSP3 (1070 bp)、VP7 (1062 bp)、NSP2 (1059 bp) は中部に近接したバンド群として、NSP4 (740 bp)、NSP5 (665 or 820 bp) は下部に互いに独立した 2 本のバンドとして検出された（図１）。そこで、この特長を生かし、上部、中部、下部の 3 箇所に分けて、相対移動度だけでは無く、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。



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。



上記表には、一致度が高い法から低い方に赤色から青色へのグラデーションでカラーリングを施した。左上部から右下部にかけての対角線上に暖色系（特に赤の頻度が高い）ことが分かる。つまり、同じサンプルは、アッセイ間変動が多少存在しても高い相関係数を示した。逆に、異なる株は寒色系（青色）の頻度が高くなる。このようにして、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。人の目で確認する場合、煩雑に見えるが、コンピューター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。

E. 結論

MultiNA は、アッセイ間変動、チップ間変動、施設間変動がわずかしか生じなかったが、相対移動度で分別できないウイルス株も存在していた。Electrophoregram のフィッティングと、相関係数を指標にする株分別法は、その弱点を克服可能であった。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 研究発表（原著論文によるものに限る。）

1. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. Journal of virology vol. 85, 6687-701, 2011.

2. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. Journal of virology vol. 86, 284-92, 2012.

3. Hansman, GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JRH, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, and Kwong PD. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle Journal of virology vol. 86, 3635-3646, 2012.

4. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. Exp Anim. vol. 61, 35-40, 2012.

5. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, and Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol. Vol.157, 349-52, 2012.

6. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill F, Atmar RL, Katayama K, Utama B, Estes MK. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012)
doi:10.1186/1743-422X-9-181

7. Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park YB and Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 56: 630-638, Sep, 2012.

8. Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T and Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. Frontiers in Microbiology 3: Article 312, 1-10, 2012.

9. Miki M and Katayama K. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. Frontiers in Microbiology 3: Article 387, 1-6, 2012

10. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. Microbiol Immunol. 56(11):760-770, 2012.

11. Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, and Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. Arch Virol DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, Dec. 2013.

12. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. Jpn J Infect Dis. 66(5):454-7., 2013.

13. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. J Vet Med Sci. 2013 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.

14. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, **Katayama K**. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLoS One. 2013 Jun 14;8(6): e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.

15. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, **Katayama K**, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub Apr 25, 2013.

16. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, **Katayama K**, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. Food Environ Virol. 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub Mar 23, 2013.

17. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, **Katayama K** and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. Doi: 10.1292/jvms.13-0468; J. Vet. Med. Sci. 76(7):1045-1050, 2014.

18. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, **Katayama K**, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. Infect Genet Evol. Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.

19. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y,

Noda M, **Katayama K**, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. Microbiol Immunol. doi: 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.

20. Nagai M, Aoki H, Sakoda Y, Kozasa T, Tominaga-Teshima K, Mine J, Abe Y, Tamura T, Kobayashi T, Nishine K, Tateishi K, Suzuki Y, Fukuhara M, Ohmori K, Todaka R, **Katayama K**, Mizutani T, Nakamura S, Kida H, Shirai J. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan. J Vet Diagn Invest. 26(4): 547-552. [Epub ahead of print] Jul 15, 2014.

21. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. PLoS One. 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.

22. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. Vet Microbiol. 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.

23. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014 .

24. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for

bovine-to-porcine interspecies transmission. Veterinary Microbiology 174, 577-583, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」
平成 24-26 年度研究分担報告書

ノロウイルスタンパク質の構造解析

研究分担者　朴　三用　　　　横浜市立大学

研究分担者　朴　英斌　　　　国立感染症研究所ウイルス第二部第一室

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

研究要旨

本研究で構築を目指す 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 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)の X 線結晶構造解析を行うため、大腸菌で RdRp を発現し結晶化を試みたところ、ヒトノロウイルス（HuNoV）GII.3 U201 株の RdRp、マウスノロウイルス（MNV）S7 株の RdRp の結晶化に成功し、立体構造を解明した。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った。RdRp 以外の VP2, VPg を protease, GFP 等、結晶構造が解析され、熱力学的に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、可溶化並びに、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。

A. 研究目的

前研究班の研究活動では、CaliciWeb では、NoV、SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティックスによる解析を行った。CaliciWeb は現在、グローバル NoV net work の NoroNet とのコラボレーションも実現しつつある。さらに、本研究活動により提案された NoV の病原性変化を対象とした非構造タンパク質領域をターゲットとした、NoV の新規分類方法が提案されている。本研究では、構築を目指す GatVirus Net は、構造生物学的とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造

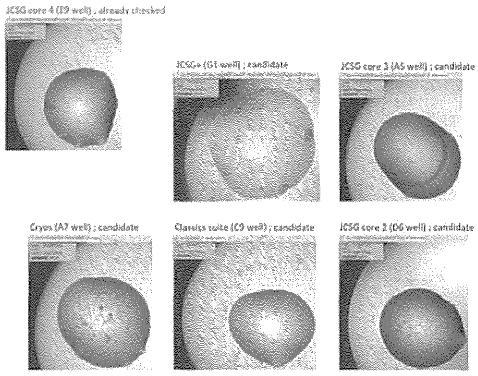
のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。昨年度より、本分担研究では、分子構造の明らかにされていないVPg, VP2の2種類のタンパク質のX線結晶構造解析を行うため、大腸菌で発現させ、結晶化することを試みたが、構造解析には至らなかった。これらの蛋白質発現は、モノクローナル抗体との共結晶化、GFPとの融合蛋白質としてバキュロウイルスを用いて発現するなど、安定した結晶を得るため検討が続いている。本年度は、ヒトノロウイルス（HuNoV）GII.3 U201株のポリメラーゼ（RdRp）,マウスノロウイルス（MNV）S7株ののポリメラーゼ（RdRp）の結晶化、並びにX線結晶構造解析を行った。

B. 研究方法

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

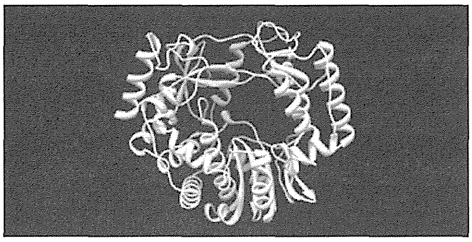
C. 研究結果および考察

HuNoV U201のHisTag-RdRpは、65 kDaのBandとして可溶性画分に発現し、タロンビーズによる精製の結果、58kDaのメインバンドを精製可能であった。約100mgのRdRpを精製し、結晶化を試みたところ、幾つかの結晶を得た。



これらの結晶の内、最も大型かつ安定したリフレクションパターンを持つものを、小型のビーム装置によりテストし、質の良いリフレクションを取得可能な結晶を選択した。得られた結晶化条件に基づき、再度50 - 100mgの精製RdRpを結晶化し、筑波のビームラインに持ち込み、リフレクションパターンを取った。

得られたリフレクションパターンは構造再構築に用い、2.2Åの構造を得た。



Norovirus genotype GII.3のRdRpの構造を初めて解くことに成功した。詳細な比較検討はこれからだが、MNV の RdRp、HuNoV GII.4のRdRpと構造が類似していた。

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in silicoで比較したところ、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明らかとなった。クローズドコンフィグレーションのRdRpは本来、RNA を抱き込んだ状態だが、我々の RdRp には、いかなるRNAも結合していなかった。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。

解析したRdRpはクローズドコンフィグレーションであったが、構造の類似性は極めて高かった。微細なアミノ酸配列の違いがわずかな構造の違いを導き、RNA合成効率に影響する可能性があるが、今回の結晶構造解析の結果から推測することは困難であった。今後、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検討する必要がある。

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を抱き込んだオープン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。この研究成果は、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。

RdRp以外のVP2, VPgをprotease, GFP等、結晶構造が解析され、熱力学的に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、可溶化並びに、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。

E. 結論

アミノ酸レベルでの HuNoV と MuNoV RdRp の比較を行ったところ、クローズドコンフィグレーションである事が明らかになった。また、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、本来あるべき姿であるクローズコンフィグレーションの RdRp の結晶の作製を試みている。RNA と RdRp の結合様式を可視化できれば、結合ならびに RNA の合成効率に影響を与える微細なアミノ酸変化を特定して、分子疫学に応用可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 論文発表研究発表（原著論文によるものに限る。）

1. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. Journal of virology vol. 85, 6687-701, 2011.

2. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. Journal of virology vol. 86, 284-92, 2012.

3. Hansman, GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JRH, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, and Kwong PD. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle Journal of virology vol. 86, 3635-3646, 2012.

4. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. Exp Anim. vol. 61, 35-40, 2012.

5. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, and Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol. Vol.157, 349-52, 2012.

6. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill F, Atmar RL, Katayama K, Utama B, Estes MK. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012) doi:10.1186/1743-422X-9-181

7. Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park YB and Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 56: 630–638, Sep, 2012.

8. Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T and Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. Frontiers in Microbiology 3: Article 312, 1-10, 2012.

9. Miki M and Katayama K. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. Frontiers in Microbiology 3: Article 387, 1-6, 2012

10. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. Microbiol Immunol. 56(11):760-770, 2012.

11. Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, and Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011.

Arch Virol DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, Dec. 2013.

12. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. Jpn J Infect Dis. 66(5):454-7., 2013.

13. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. J Vet Med Sci. 2013 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.

14. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, **Katayama K**. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. PLoS One. 2013 Jun 14;8(6): e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.

15. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, **Katayama K**, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub Apr 25, 2013.

16. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, **Katayama K**, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. Food Environ Virol. 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub Mar 23, 2013.

17. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, **Katayama K** and Tohya Y.