

野生ネズミ由来ノロウイルスの遺伝子解析

分担研究者 遠矢 幸伸 日本大学 生物資源科学部 教授

研究協力者 佐藤 豪 日本大学 生物資源科学部 助手

研究要旨 韓国の済州島で捕獲された野生のチェジュセスジネズミの腸管内容物より検出された新規ノロウイルス（NoV）の性状解明を目的として、そのゲノムの塩基配列の解析を行い、3'側2,876塩基の配列を決定した。得られた塩基配列を用いた系統樹解析では、実験用マウス由来NoVとは独立した野ネズミ由来のNoVの枝をハンガリーのセスジネズミやスコットランドのモリアカネズミ由来のNoVとともに形成し、新規NoVのグループを構成することが示された。

A．研究目的

ヒトNoVは培養細胞での増殖が不可能であるが、実験用マウス由来のNoVは培養細胞での増殖が可能であるため、実験モデルとして活用されている。一方、マウス以外の野生げっ歯類にも遺伝学的に異なるNoVが存在することが新たに報告され、マウス由来NoVとは宿主特異性なども異なる可能性が示唆されている。昨年度は、動物由来新規ノロウイルス（NoV）の分離を目標として、逆転写（RT）-PCR法によるウイルスゲノムの検出を試みたところ、韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物より、新規NoV遺伝子が検出された。そこで、本年度はチェジュセスジネズミ由来NoVのゲノム解析を進めた。

B．研究方法

昨年度の研究でNoV遺伝子が検出された4検体のチェジュセスジネズミ由来腸管内容物を用いた。PBSを用いて各検体を10%乳剤とし、15,000 rpm、5分間遠心した上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてTotal RNAを抽出した。RT-PCRは昨年度に決定したORF3

内の領域の塩基配列をもとにデザインしたプライマー並びに各種ネズミ由来NoVの塩基配列から推定される配列に基づくプライマーを用い、PrimeScript II Reverse Transcriptase (TAKARA)を使用してcDNA合成を行い、PCRにはPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA)を使用した。その後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物をSYBR safe DNA gel stain (Invitrogen)で染色、観察した。増幅産物が得られた場合は、DNAバンドを精製し、塩基配列を常法に従い決定した。

得られた塩基配列情報はATGC-Win ver.7およびGenetyx-Win ver.11(株式会社ゼネティクス)を用いてアセンブルし、系統樹はMEGA ver.6を使用して作成した。

C．研究結果

チェジュセスジネズミ由来腸管内容物4検体のうち、1検体(No.76)において、ORF2及びORF3を含むNoVゲノムの3'側領域2,867塩基の配列を決定できた。ORF2全領域の配列を用いた系統樹解析を行ったところ、実験用マウス由来NoVとは別のクラスターをヨーロッパ

パの野生ネズミから検出された NoV と形成した。特に、ハンガリーのセスジネズミで検出された NoV に比較的近縁で、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは別のクラスターを形成した。

実験用マウス由来 NoV、野生げっ歯類由来 NoV との相同性を調べたところ（塩基/アミノ酸）ORF2 は、実験用マウス由来とは 76.4% - 77.9% / 82.6% - 85.0%、野生げっ歯類由来とは 78.8% - 86.9% / 85.7% - 92.4%であった。また、アミノ酸配列における変異を調べると、P2 領域において変異が多く認められた。

ORF2 領域上には第 14 - 652 塩基（639 nt）に推定 ORF4 領域が確認され、スコットランドのモリアカネズミの NoV（Apo 450）の推定 ORF4（618 nt）より 21 塩基長かった。相同性は、実験用マウス由来 MNV とは 84.5% - 85.8% / 61.5% - 64.7%、ハンガリーのセスジネズミ由来 NoV とは 92.0% - 93.6% / 79.3% - 83.5%、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは 85.8% / 69.9%であった。

D . 考察

本研究では、韓国の済州島において固有種であるチェジュセスジネズミから新たな NoV 遺伝子が検出された。系統解析の結果、この NoV 遺伝子が既知のどの系統とも異なることが示唆された。これまでにスコットランドでモリアカネズミ、ハンガリーでセスジネズミ、日本でアカネズミとクマネズミという野生げっ歯類から NoV 遺伝子が検出されていることから、NoV は広範な地域において、多様な種類のげっ歯類に保持されている可能性が示された。

NoV の ORF2 領域は、カプシド蛋白をコードする領域で shell domain (S) と protruding domain (P) に分けられる。P は P1 と P2 のサブドメインに分けられ、P2 はウイルスの最表層に飛び出し S-P1-P2-P1 の順に並んでいる。ウイルスの遺伝型によって構造が微妙に変化しており、すなわち P2 領域は抗原性や細胞レセプターに関係し遺伝型による違いを微細形態学的に反映している。野生げっ歯類由来 NoV は、その P2 領域を

実験用マウス由来 NoV と比べると多くのアミノ酸が異なっていた。このことから、野生げっ歯類由来 NoV は実験用マウス由来 NoV とは抗原性や細胞レセプターが異なっていると推定される。加えて、チェジュセスジネズミの NoV の ORF2 内にも ORF4 領域が同定され、実験用マウス由来 NoV と同様の宿主の免疫抑制とウイルス複製に影響する機能を有すると考えられる。

E . 結論

チェジュセスジネズミから検出された NoV ゲノムの塩基配列（2,876 塩基）を決定し、マウス由来の NoV とは異なる特性を有する NoV であることが示唆された。培養細胞での分離はまだできていないが、今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして非常に期待される。

F . 研究発表

論文発表

1. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus. *J. Virol. Methods.* 207: 178-81 (2014)
2. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K, Tohya Y. Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *J Vet Med Sci.* 76: 1045-50 (2014)

G . 知的所有権の出願・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。