

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究代表者 黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長

**病原体網羅遺伝子配列を基盤とした分子疫学解析および解析法の開発**

研究分担者 木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター第6室長

研究協力者

丹羽祥一 塚越博之 吉住正和 小澤邦壽（群馬県衛生環境研究所）

調恒明（山口県環境保健センター）

筒井理華（青森県環境保健センター）

高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）

水越文徳（栃木県保健環境センター）

安達啓一（愛知県衛生研究所）

平野映子（福井県衛生環境研究センター）

吉富秀亮 芦塚由紀（福岡県保健環境研究所）

松島勇紀（川崎市健康安全研究所）

柴田伸一郎（名古屋市衛生研究所）

石井晴之 倉井大輔 皿谷健 滝澤始（杏林大学医学部第1内科学）

長澤耕男 下条直樹（千葉大学医学部小児科）

石和田稔彦（千葉大学真菌医学研究センター）

宮地裕美子（国立病院機構横浜医療センター）

菅井和子（国立病院機構福山医療センター）

松田俊二（国立病院機構愛媛医療センター）

岡崎薫（国立病院機構四国こどもととなの医療センター）

清水博之（横浜市立大学附属市民総合医療センター）

小張真吾（藤沢市民病院小児科）

森田幸雄（東京家政大学）

楠英樹 石岡大成 佐藤弘 加納和彦 関塚剛史 竹内史比古 野田雅博

（国立感染症研究所）

**研究要旨**

次世代シーケンサーを応用し、本邦において検出されたヒトライノウイルスC（HRV-C）VP1～3全長遺伝子の分子進化に関する研究を行った。時系列系統解析には Bayesian MCMC 法を用いた。株間の遺伝学的距離（*p*-distance）解析、SimPlot 解析および Positive/negative selection 解析も行った。さらに、VP1～3 蛋白の構造解析シミュレーションも行った。その結果、各々の遺伝子は独立かつ速い速度（ $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year）で進化し、検出株は 40 以上の遺伝子に分類されるとともに起源は 400～900 年前に遡ることが推定された。また、検出株はきわめて遺伝学的に多様であるだけでなく、positive selection site は検出されなかった。さらに、抗原蛋白外側に、アミノ酸置換部位がきわめて多いことも推定された。以上のことから、HRV-C の主要抗原遺伝子（VP gene）は数百年にわたり速い速度で進化しながら遺伝学的に多様化したことが示唆され

た。また、抗原蛋白は生体防御の圧力を受けにくい性質を有することも推定された。

## A. 研究目的

ヒトライノウイルス (human rhinovirus, HRV) は、種々の呼吸器感染症 (通常感冒、気管支炎および肺炎) の起因となるだけでなく、気管支喘息の発症増悪に関与することが示唆されている。実際、Johnston らの報告によれば、喘息増悪時の 80% にライノウイルスが検出されている<sup>1</sup>。

HRV は、3 つの種 (HRV-A, -B および C) に分類されている。HRV-A と B は多数の血清型に分類されており、両者を合わせて、現在 100 種類以上の血清型の HRV が同定されている。一方、HRV-C は、近年、新たに発見されたウイルスで、細胞培養が困難であるため、このウイルスの検出には、HRV-A と B と同様に遺伝子配列が比較的保存的な VP4/VP2 領域を標的とした RT-PCR を主体とした検出・解析法が用いられている。HRV-C は HRV-A と同様に遺伝学的にきわめて多様であることが示唆されているが不明な点が多い。くわえて、ウイルス抗原 (VP 蛋白) をコードしている VP1-4 遺伝子 (viral protein gene) の進化に関する不明な点が多い。しかし、株間の遺伝学的多様性のため、通常の primer walking 法での主要抗原の遺伝学的解析は極めて困難であることが予想される。そこで、我々は、既報の HRV-C 塩基配列を網羅的に解析し、新たなプライマーセットを設計するとともに、VP1-3 遺伝子全長を含む約 5.8kb の HRV-C の PCR 産物を次世代シーケンサーにより網羅解析を行い、HRV-C 臨床株 139 株の VP1-3 遺伝子の詳細な分子進化に関する解析を行ったので以下に報告する。

## B. 研究方法

検体は、2007 年 11 月から 2013 年 3 月の間に、栃木県、福井県、熊本県における感染症発生動向調査および横浜医療センターにおいて採取した急性呼吸器感染症 (ARI) 患者 2922 名の鼻咽頭ぬぐい液を使用した。

RNA は、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて抽出し、プライマーを HRV-C\_546F: 5'-

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3' と HRV-C\_6410R: 5'-CCRTCATARTTDGTRTARTCAAA-3' 使用して PrimeScript<sup>®</sup> II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (TaKaRa Bio) にて遺伝子増幅を行った。得られた DNA を Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina) でライブラリーを作成し MiSeq (Illumina) により解読を行った。得られた塩基配列は、CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) によりアライメントし、Kakusan 4 program version 4.0 (<http://www.fif-thdimension.jp/products/kakusan/>) により塩基置換モデルを選択し Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 法による解析を BEAST package version 1.8.0 を使用して行った<sup>2</sup>。さらに、Datamonkey [<http://www.datamonkey.org/>] において、positively/negatively selected sites の解析を single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL), および internal fixed effects likelihood (IFEL) の 3 つの方法で行い、MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) を使用して pairwise-distance ( $p$ -distance) を計算した<sup>3</sup>。

HRV-C の VP1, VP2, VP3 タンパク質の 3 次元構造モデルは、Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group Inc.) の 'MOE-Align' と 'MOE-Homology' を使用してホモロジーモデリングにより作成し、アミノ酸の多様性は shannon entropy scores を使用して解析した<sup>4,5</sup>。

## C. 結果

RT-PCR 法により 187 の増幅産物が得られ、NGS による解析を行ったところ、139 産物で完全長の VP1, VP2 および VP3 遺伝子完全長領域を含む解析可能な塩基配列が得られた。

まず、MCMC 法により VP1 遺伝子 (804-846nt) を解析したところ、解析株は 3 系統に分類された (図 1)。さらに 13% の divergence を基準として genotyping したところ 44 種類の遺伝子型に分類できた (図 1)。各系統の共通の祖先は、1652 年

(95% highest posterior density (HPD); 1522 年から 1769 年)に分岐した(図 1)。VP1 の進化速度は、 $3.48 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.36 \times 10^{-3}$  から  $4.60 \times 10^{-3}$ )であった。

次に、VP2 遺伝子(783–816nt)は、MCMC 法により作成した系統樹で 4 系統に分類された(図 2)。さらに VP1 遺伝子と同様に 13% の divergence を基準として genotyping したところ 43 種類の遺伝子型に分類できた。各系統の共通の祖先は、1294 年 (95% highest posterior density (HPD); 853 年から 1643 年)に分岐した(図 2)。VP2 遺伝子の進化速度は、 $1.35 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.12 \times 10^{-3}$  から  $6.46 \times 10^{-4}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子と同様に VP2 遺伝子にも幅広い多様性があることが分かった。

VP3 遺伝子(699–717nt)も同様に MCMC 法による時系列系統解析を行ったところ、3 系統に分類された(図 3)。さらに、13% の divergence を基準として genotyping したところ 42 種類の遺伝子型に分類できた(図 3)。各系統の共通の祖先は、1628 年 (95% highest posterior density (HPD); 1494 年から 1746 年)に分岐したことが推定された(図 3)。VP3 遺伝子の進化速度は、 $3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.63 \times 10^{-3}$  から  $4.91 \times 10^{-3}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子や VP2 遺伝子と同様に VP3 遺伝子も幅広い遺伝学的多様性を有することが分かった。

VP1 遺伝子の株間での塩基配列同一性(identity)は 60.2 ~ 100% であり、塩基同一性は 58.5 ~ 100% であった。さらに VP1 遺伝子における株間の塩基配列を基盤とした  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 4)。

VP2 遺伝子では株間の塩基の同一性は 60.2 から 100% であり、塩基の同一性は 58.5 から 100% であった。さらに VP1 遺伝子同様に VP2 遺伝子における株間の  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、

$0.29 \pm 0.11$  であった(図 5)。

VP3 遺伝子の株間の塩基の同一性は 60.2 から 100% であり、塩基の同一性は 58.5 から 100% であった。さらに VP3 遺伝子においても株間の  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 6)。

また、解析遺伝子の positively/negatively selected sites の解析を行ったところ、positive selection site は見られず、100 以上の negative selection site が検出された。加えて、HRV-C の VP1、VP および VP3 蛋白の 3 次元構造モデルからキャプシド内側に比べて、外側に高頻度のアミノ酸置換が生じていることが推定された(図 7)。

#### D. 考察

今回我々は、次世代シーケンス(NGS)を応用した HRV-C 臨床株 139 株の完全長 VP1-3 遺伝子の分子進化に関する研究を行った。ベイジアン MCMC 法による時系列系統解析の結果、解析株は、3 あるいは 4 系統に分類された。これらの株はさらに 40 以上の遺伝子型に細分類されることがわかった。解析株の VP1-3 遺伝子の起源は、1625、1125 および 1628 年に遡れることが示唆された。また、各々の遺伝子は、 $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と非常に速い速度で進化していることが示唆された。株間の遺伝学的距離は平均 0.3 を超えていた。また、いずれの遺伝子にも positive selection site は検出されなかった。さらに、構造解析により、キャプシド外側にアミノ酸の置換が非常に多いことも明らかになった。

今まで、HRV は、VP4/VP2 領域解析が主体に行われていた。しかし、この領域は、解析領域が短いだけでなく、主要なウイルス抗原部分ではないため、HRV-C の抗原遺伝子の全長配列を用いた総合的な進化解析を行うことが困難であった。また、HRV の VP 遺伝子は遺伝学的にきわめて多様であるため、従来法、例えば primer walking 法による全長解析は困難であることが推定される。そこで、我々は本研究において、HRV のゲノムの 5'末端に

近いVP4遺伝子領域および3'末端に近い3D遺伝子領域の保存的な部位に着目し、独自のプライマーを設計し、RT-PCR法により、VP1-3遺伝子全長を含む5.8kbのPCR産物をNGSにより解析を行う方法を考案した。その結果、この方法により大半(70%)のHRV-CのVP1-3遺伝子の全長塩基配列解析に成功した。また、先端の遺伝子解析方法により、これらの主要抗原の進化解析に成功した。

今回の時系列系統解析により、各遺伝子は、400~900年前にその起源を遡ることが示唆された。また、各遺伝子は独立かつ独自に進化していることも推定された。さらに、その遺伝学的多様性も各遺伝子により異なることも推定された。

一般に、ウイルスの主要抗原は、宿主側の生体防御の圧力などにより、positive selectionが生じ、生存に有利な子孫が宿主集団に順化・適応していくことが示唆されている。しかし、今回の結果では、解析部位に、positive selection siteが検出されなかった。このことは、HRVのVP蛋白は宿主の生体防御の圧力を受けにくい性質を有することを示す。しかし、今後詳細なエピトープ解析も含め、さらなる解析が必要であると思われる。

次に、VP1-3の構造シミュレーションにより、キャプシド内側に比し、外側に高頻度にアミノ酸置換が生じていることが明らかになった。このことは、主要抗原遺伝子の多様性が、抗原性の多様性に密接に関連していることが構造上も示している。今後、他の種、HRV-Aと比較も含めた主要抗原構造に関する研究が必要であろう。

## E. 結論

NGSを応用した本邦の呼吸器感染症から検出された139株のHRV-Cの主要抗原全長遺伝子(VP1-3遺伝子)の分子進化に関する研究を行った。その結果、HRV-Cの主要抗原遺伝子は独自かつ非常に速い速度で進化していることが明らかになった。また、多種類(40種類以上)の遺伝子型のHRV-Cが本邦の呼吸器感染症に関与していることも推定された。

## F. 参考文献

1. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 310, 1225-9, 1995.
2. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214, 2007.
3. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*. 21;2531-2533, 2005.
4. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 82;11247-62, 2008.
5. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* 84, 8085-97, 2010.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 論文発表

1. Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* in press.
2. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H,

- Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H, Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 28:183-91, 2014.
3. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget.* 5(18):8665-80, 2014.
  4. Tsujimoto S, Tsukagoshi H, Inai I, Yoshimoto Y, Daida A, Kusakawa I, Tanaka-Taya K, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Oishi K, Ryo A, Kimura H\*. Apnea, dyspnea, and wheezing in primary lower respiratory infections due to human rhinovirus in Japanese infants. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(3):1, 2014.
  5. 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.* 58(9):536-539, 2014.
  6. Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M, Kimura H, Sakai K, Kato H, Takeda M, Kubota T. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKK $\epsilon$  and TBK1 on type I IFN production. *PLoS One.* 10;9(4):e94999. 2014.
  7. Doi I, Nagata N, Tsukagoshi H, Komori H, Motoya T, Watanabe M, Keta T, Kawakami M, Tsukano T, Honda M, Ishioka T, Takeda M, Ryo A, Kuroda M, Oishi K, Kimura H. An outbreak of acute respiratory infections due to human respiratory syncytial virus (HRSV) in a nursing home for the elderly in Ibaraki, Japan, 2014. *Jpn J Infect Dis.* 67(4): 326-327, 2014.
  8. Matsunaga S, Kawakami S, Okayama A, Tsukagoshi H, Kudoh A, Matsuo I, Matsushima Y, Shimizu H, Okabe N, Hirano H, Yamamoto N, Kimura H, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 5:208, 2014.
  9. Nidaira M, Kuba Y, Saitoh M, Taira K, Maeshiro N, Mahoe Y, Kyan H, Takara T, Okano S, Kudaka J, Yoshida H, Oishi K, Kimura H. Genetic analyses of VP3, VP1, 3Cpro, and 3Dpol coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 58(4): 227-38, 2014.
  10. Mizuta K, Tsukagoshi H, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Itagaki T, Nagano M, Noda M, Kimura H\*. Molecular evolution of hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene in human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture, Japan. *J Med Microbiol.* 63(4): 570-577, 2014.
  11. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno H, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 11(1):9, 2014.
  12. Yamazaki M, Sugai K, Kobayashi Y, Kaburagi Y, Murashita K, Saito N, Niino H, Imagawa T, Tsukagoshi H, Kimura H. A child case of hypocomplementemic urticarial vasculitis due to Coxsackievirus type A9. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(1):1-5, 2014.
  13. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A.

Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 33(5):643-52, 2014.

14. Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36(1):e65-8, 2014.

## 2. 学会発表

1. 小林美保他 第 62 回日本ウイルス学会学術集会(H26 年 11 月 10-12 日)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

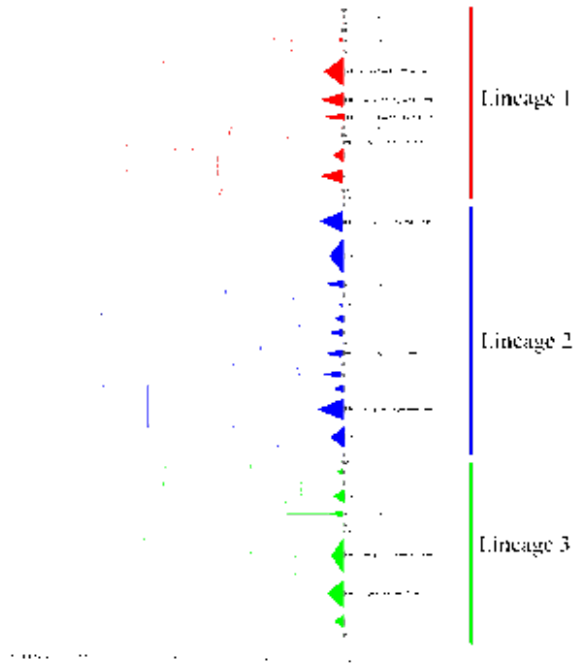


図1 VP1 遺伝子分子系統樹(MCMC法)

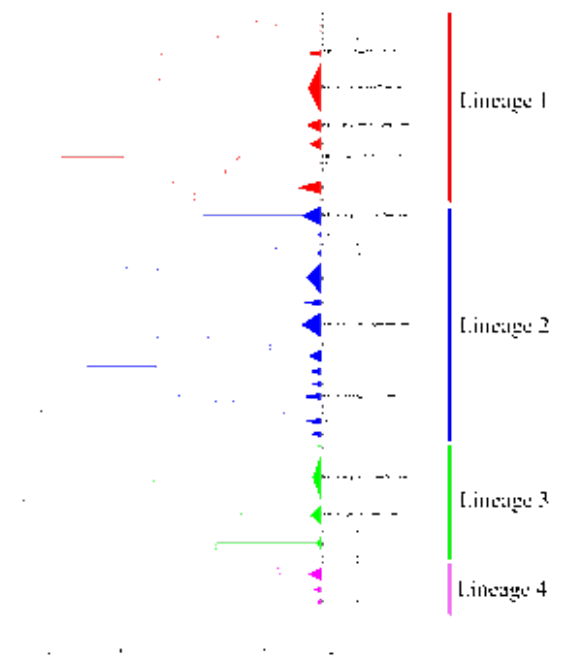


図2 VP2 遺伝子分子系統樹 (MCMC法)

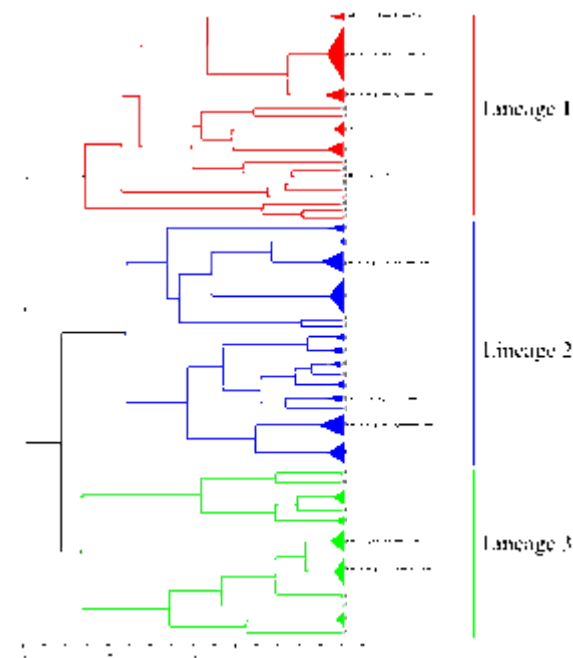


図3 VP3 遺伝子分子系統樹(MCMC法)

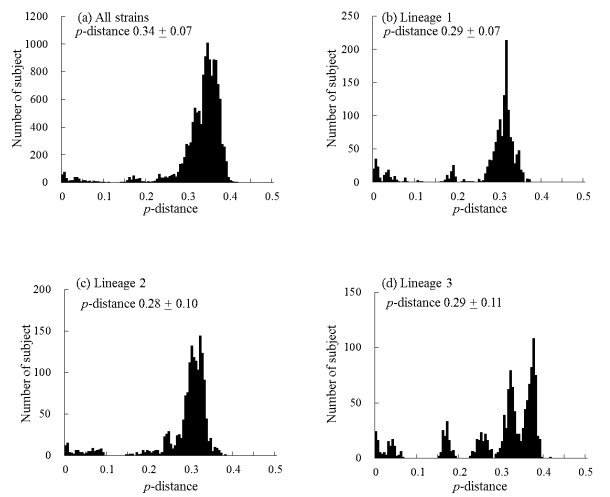


図4 VP1 遺伝子の  $p$ -distance

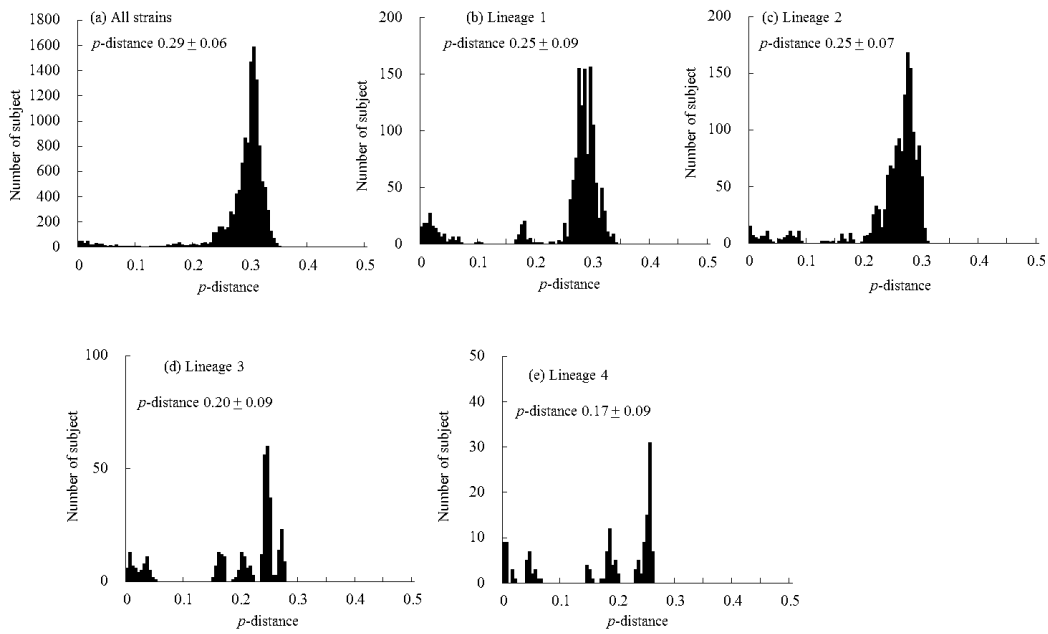


図5 VP2 遺伝子の  $p$ -distance

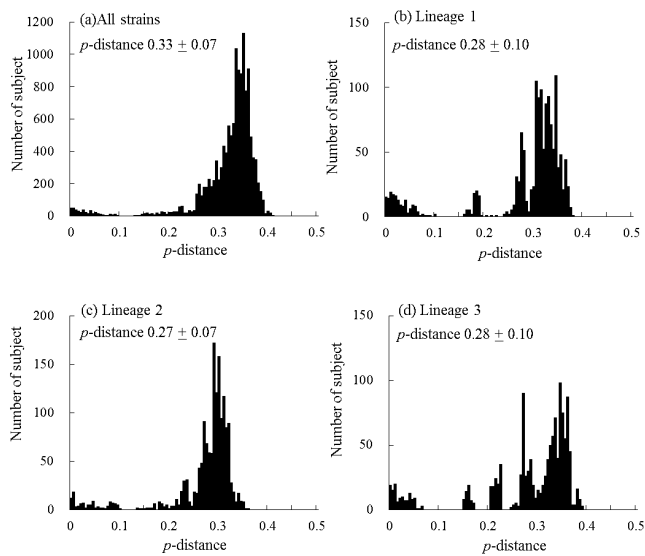


図6 VP3 遺伝子の  $p$ -distance

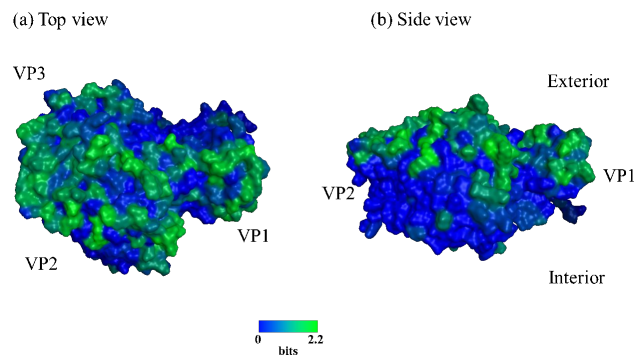


図7 VP1, VP2 および VP3 タンパク質の 3次元構造モデル