

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461528

研究課題名(和文) ノロウイルス全遺伝子型診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic methods for all genotypes of norovirus.

## 研究代表者

白土 東子(堀越東子)(Shirato, Haruko)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60356243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：18遺伝子型25株のウイルス様中空粒子を用い、表面プラズモン共鳴装置を用いた糖鎖-ウイルス相互作用の解析系、赤血球および糖転移酵素遺伝子改変細胞を用いた糖鎖-ウイルス相互作用の解析系の確立を試みた。次にこれらの解析系を用いて、ノロウイルスの糖鎖認識に最も重要な糖鎖エпитオプの同定、ウイルス上の糖鎖結合ドメインの同定を目指した。その結果、糖鎖認識の特異性と運動しているアミノ酸の割り出しを行うことが出来た。また、解析に用いた18遺伝子型以外の15遺伝子型についてもアミノ配列の解析を行い、全33遺伝子型に共通の糖鎖結合ドメインの候補配列を絞り込むことが出来た。

研究成果の概要(英文)：I attempted to establish two analytical methods to evaluate the carbohydrate-norovirus (NoV) interaction: surface plasmon resonance by using the virus-like particles (VLPs) of 25 strains from 18 genotypes and assays using red blood cells or cells modified on the glycosyltransferase gene. Then, using these analytical systems, I aimed at identifying the carbohydrate epitopes important in recognition by NoV and the carbohydrate-binding site on the virus. In addition, I analyzed the amino acid sequences of 15 genotypes, except the 18 genotypes used for this analysis, and narrowed down the candidate sequence of the carbohydrate-binding domain common to all 33 genotypes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 血液型抗原 診断 検出

### 1. 研究開始当初の背景

本研究課題において解析対象としたノロウイルスは、嘔吐下痢症の原因ウイルスであり、世界各地で集団感染を引き起こしている。わが国では、ウイルス性集団食中毒発生事例の95%以上を占め、患者数は毎年約9,000人で推移している(厚生労働省食中毒統計)。食品を介した感染以外に、ヒト-ヒト伝播も多く、成人ではほぼ100%が感染を経験する。一般には軽症で経過するが、高齢者、乳幼児においては下痢、嘔吐による脱水あるいは誤嚥性肺炎で重症化し、死に至ることがある。2004年年末~2005年年明けに高齢者施設における集団感染事例が報告され、12人の死亡例が出たことは、社会に大きなインパクトを与えた。ヒトに感染するヒトノロウイルスはヒトを唯一の感受性動物とし、感染モデル動物も培養細胞での増殖系も確立しておらず、感染様式や複製のメカニズム等の解析は進んでいない。診断方法も定まっておらず、ワクチンも開発されていない。

ノロウイルスは小腸上皮に発現する血液型抗原を識別して感染する細胞を決めている。血液型抗原とは、抗原構造をもった糖鎖の総称であり、ABO式、ルイス式血液型抗原などが含まれる。赤血球表面だけでなく、腸管上皮細胞などにも発現されている。よって、ノロウイルス感染への感受性はその人の血液型によって異なる。

### 2. 研究の目的

ノロウイルスに属するウイルスは2つの遺伝子群、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) に大別され、さらにそれぞれは15と18の遺伝子型、すなわちGI.1-GI.15とGII.1-GII.18、計33遺伝子型に分類される。各遺伝子型はそれぞれ異なった抗原型に対応しており、極めて多様性を持った集団として存在する。これが、ノロウイルスの診断、検出を困難にしている要因である。さらに、血液型抗原への結合も遺伝子型によって異なる。例えば、O抗原に強く結合する遺伝子型もあれば、O抗原には結合しないがA抗原には強く結合する遺伝子型もある。

本研究課題ではノロウイルス全遺伝子型が認識する共通糖鎖エпитオプの絞り込み、ウイルス上の結合ドメインの絞り込みを目指した。糖鎖上のエпитオプ、ウイルス上の結合ドメインの情報は、血液型抗原に結合するというノロウイルス共通の性質を利用した全遺伝子型に対応可能な診断方法、検出方法の確立につながる。

### 3. 研究の方法

ノロウイルス粒子の便への排出量は決して多くなく、解析に十分なウイルス粒子の調製は困難である。そこで、ウイルス様中空粒子(Virus-like particle: VLP)の調製が有用であるが、VLP発現は容易ではなく、現在までに米国および英国で発現が報告されて

いるのは約15株に留まっている。これに対し、研究代表が所属する研究室では18遺伝子型25株のVLP発現に成功している。本研究課題において、これらVLPを用い、表面プラズモン共鳴機器(Surface Plasmon Resonance (SPR))を用いた糖鎖-ウイルス相互作用の解析系、赤血球および糖転移酵素遺伝子改変細胞を用いた糖鎖-ウイルス相互作用の解析系の確立を目指した。次にこれらの解析系を用いて、ノロウイルスの糖鎖認識に最も重要な糖鎖エピトープの絞り込み、ウイルス上の糖鎖結合ドメインの絞り込みを目指した。更に、NoVの血液型抗原認識の変異と流行拡大の相関性を明らかにするため、流行拡大前の株のVLPの発現、流行拡大後の株のVLPの発現、および、これらの株の血液型抗原との結合解析を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) ノロウイルス認識糖鎖エピトープの同定

SPR解析機器を用いた糖鎖-ウイルス相互作用解析系を用い、18遺伝子型25株が共通して認識する糖鎖構造の詳細を調べた。合成糖鎖H type 1 (Fuc 1-2Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)、H type 2 (Fuc 1-2Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)、A type 1 (GalNAc 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)、A type 2 (GalNAc 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)、B type 1 (Gal 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)、B type 2 (Gal 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-biotin)各糖鎖構造に関して、Kd値の算出、比較を行い、糖鎖-ノロウイルス相互作用に重要な糖鎖エピトープを絞り込んだ。さらに、遺伝子型毎の糖鎖認識パターンとウイルスアミノ配列の比較から、糖鎖認識の特異性と連動しているアミノ酸の割り出しを行った。解析に用いた18遺伝子型以外の15遺伝子型に関してもアミノ配列の解析を行い、全33遺伝子型に共通の糖鎖結合ドメインの候補配列を絞り込んだ。

#### (2) 糖転移酵素遺伝子改変細胞を用いた糖鎖-ウイルス相互作用解析系の検討

糖鎖エピトープの同定には合成糖鎖を用いた解析が不可欠である。その一方で合成糖鎖では結合の検出できない遺伝子型株がある。これらの遺伝子型株は血液型抗原に結合しないわけではなく、合成糖鎖を用いたSPRやEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assayでは生体内糖鎖の密集度(multivalency)を再現できておらず、結合に至っていない可能性が高い。本研究課題において、血液型抗原の合成に関わる糖転移酵素遺伝子を強発現させた細胞株では合成糖鎖非結合株も合成糖鎖結合株同様にその細胞への結合量が上昇することを明らかにした。糖転移酵素遺伝子改変細胞を用いた解析系の確立は、生体内糖鎖のmultivalencyを再現する実験系として有効

であるばかりでなく、感染価簡易測定法の確立に繋がる。

### (3)赤血球凝集反応試験の NoV 診断への応用の試み

ウイルス粒子数と HA 価の間には一定の関係があるため、HA 試験は多くのウイルスで粒子数や感染価の簡易測定として代用されている。HA 試験がノロウイルスの診断、検出にも応用可能かどうかの検討を試みた。VLP の血液型抗原認識が、生ウイルスのそれと同じであることを確認するため、初めに、試験に用いる 18 遺伝子型 24 株の VLP の大量調製および精製を行なった。次に、糞便からの生ウイルス粒子の精製方法の検討を行った。数検体の患者糞便から生ウイルス粒子の精製を試み、2 検体から電子顕微鏡で確認できる程度のウイルス粒子を精製することが出来た。しかし、これら粒子では赤血球の凝集を認めることは出来なかった。ウイルス量、ウイルスの精製度など、HA 試験に適した更なる条件検討が必要である。

### (4)流行株発現の試み

ノロウイルスの流行拡大前後の疫学解析と、流行したウイルス株の血液型抗原への結合能の解析が両立されている報告はこれまでにない。2002 年頃から 2014 年 12 月までの 10 年以上もの間、日本を含め世界的に流行していたのは G11.4 遺伝子型であった。G11.4 遺伝子型に属するウイルス株は、他の遺伝子型に比べて結合できる血液型抗原の種類が多いだけでなく、それぞれの血液型抗原への結合力も強く、O、A、B 抗原に強く結合する。G11.4 遺伝子型が世界的に優勢であったのは、血液型が O、A、B 型全ての個体への感染が可能であったためと考えられている。研究代表者はネパールにおいて 2009 年を境に急激に流行を拡大させた G11.13 遺伝子型株に着目し、流行拡大前の株の VLP の発現、流行拡大後の株の VLP の発現、および、これらの株の血液型抗原との結合解析を試みた。現在は注目されていない、疫学的に劣勢な遺伝子型であっても、血液型抗原結合能の変異により大流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公衆衛生戦略を策定する上で大きな意義がある。

以上、(1)-(4)の解析によって得られる糖鎖エピトープの同定は、血液型抗原に結合するというノロウイルス共通の性質を利用した全遺伝子型に対応可能な診断方法、検出方法の確立に繋がる。さらに、ウイルス上の糖鎖結合ドメインの同定は、糖鎖-ウイルス相互作用をターゲットとした感染阻害剤、不活化ワクチン開発に繋がる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計 2 件)

- ・ S. Komoto, E. Wandera Apondi, M. Shah, E. Odoyo, J. Nyangao, M. Tomita, M. Wakuda, Y. Maeno, H. Shirato, T. Tsuji, Y. Ichinose, K. Taniguchi., Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes., Infection, Genetics and Evolution, 査読有, Vol. 27, 2014, pp.277- 293, doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.002.
- ・ K. Higo- Moriguchi, H. Shirato, Y. Someya, Y. Kurosawa, N. Takeda, K. Taniguchi., Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigens., Journal of Medical Virology, 査読有, Vol. 86, 2014, pp. 558- 567, doi: 10.1002/jmv.23734.

### [学会発表](計 5 件)

- ・ 久保田智巳、石田豊和、白土東子、結晶構造を基にしたノロウイルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との結合エネルギー解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ・ 石田豊和、久保田智巳、白土東子、ノロウイルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との糖鎖認識機構、2014 年 9 月 21 日-2014 年 9 月 24 日、広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)
- ・ 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松久、久保田智巳、結晶構造解析と QM/ MM 計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- ・ 染谷雄一、守口匡子、白土東子、奥野良信、黒澤良和、武田直和、谷口孝喜、ヒト型抗ノロウイルス抗体によるノロウイルス粒子-血液型抗原相互作用の阻害、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ・ 久保田智巳、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、武田直和、成松久、白土東子、結晶構造解析と QM/ MM 計算の組み合わせによるノロウイルスのルイス抗原結合解析、第 32 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5 日-2013 年 8 月 7 日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

〔図書〕(計2件)

- ・ 白土東子、最新医学社、最新医学、第70巻11月増刊号、2015、pp. 2311-2319、「ノロウイルスと血液型抗原」
- ・ 白土東子、公益社団法人宮城県獣医師会、宮城県獣医師会会報、第68巻1号、2015、pp. 5-12、「ウサギカリシウイルス、ヒトカリシウイルスの宿主特異性と血液型抗原」

6. 研究組織

(1)研究代表者

白土 東子 (Shirato, Haruko)  
国立感染症研究所・ウイルス第二部・  
主任研究官  
研究者番号：60356243