

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790433

研究課題名（和文）ノロウイルス不活化マーカーの検索と食品衛生現場への応用

研究課題名（英文）Diagnostic application of the NoV-histo blood group antigen interaction

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

研究成果の概要（和文）： ノロウイルス（NoV）に属するウイルスは 33 の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、NoV 診断を困難にしている最大の要因である。しかし、血液型抗原に結合するという NoV 共通の性質を利用することにより、検出、診断方法の確立が可能になる。本研究課題において、表面プラズモン共鳴解析、フローサイトメトリー解析および X 線結晶構造解析による NoV 認識糖鎖エピトープの同定を行った。

研究成果の概要（英文）： Since NoV forms many antigenically diverse groups, identification of the common NoV binding epitopes on host cells should be useful for the screening and diagnosis of NoV. In this study, I analyzed the recognition sites on histo blood group antigens by NoV with surface plasmon resonance assay, flow cytometry assays and x-ray crystallographic.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	0	1,400,000
2009 年度	900,000	0	900,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ウイルス、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス（NoV）はヒトを唯一の感受性動物とし、感染様式や複製のメカニズム等の分子レベルでの解析は進んでいない。ウイルス培養系も確立されておらず、効果的な抗ウイルス薬、ワクチンも開発されていない。さらに食品衛生の現場に必要な情報

である「ウイルス検出方法」、「失活条件」も正確には定まっていない。

NoV 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、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、NoV 検出法確立を困難にしている最大の要因である。

2. 研究の目的

近年、小腸上皮に発現する血液型抗原に NoV が吸着することが報告された。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、Lewis 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。

血液型抗原に結合するという NoV 共通の性質を利用すれば、簡便な検出法の確立、失活条件の検討が可能になる。本研究課題は NoV 糖鎖認識機構の詳細を明らかにし、NoV 検出法の確立と応用、病態発現機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Lewis 抗原への結合の解析

血液型抗原は末端の構造によって ABO 型、Lewis 型に区別され、さらに内部の linkage によってタイプ 1、2 に区別される。腸管上皮には主にタイプ 1 抗原が、赤血球上には主にタイプ 2 抗原が発現しているとされる。研究代表者は、NoV が ABO 抗原において、A、B、O エピトープの識別のだけでなく、タイプ 1、2 構造の識別も行っていることを明らかにしている。本研究課題において、Lewis 抗原においてもタイプ 1、2 構造の識別が行われているかを明らかにするため、Virus-like particles (VLPs) を用い、表面プラズモン共鳴解析 (SPR) により血液型抗原との結合パターンを検討した。GI に属する 5 遺伝子型から 5 株、GII に属する 8 遺伝子型から 11 株、計 13 遺伝子型 16 株の NoV VLPs を用いた。4 種類の Monovalent 糖鎖、Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (Lewis-a:タイプ 1 構造)、Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (Lewis-b:タイプ 1 構造)、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (Lewis-x:タイプ 2 構造)、および Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (Lewis-y:タイプ 2 構造) との結合を検出した。

(2) 糖鎖遺伝子改変細胞を用いた結合解析

細胞上の血液型抗原においてもタイプ 1、2 構造の識別が行われているかを明らかにするため、Lewis 抗原のタイプ 1 構造の合成に関与する糖鎖遺伝子 N-acetylglucosamine- β 1, 3-galactosyltransferase 改変細胞への VLP の結合パターンを Flow Cytometry 解析 (FCM) により検討した。VLP は(1)同様に 13 遺伝子型 16 株を用いた。

(3) X 線結晶構造解析による結合解析

プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI/1) 株は α 1-2 フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立するが、不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから、NoV と血液型抗原との結合には α 1-2 Fuc が不可欠と言われている。一方、 α 1-2 Fuc を含まず α 1-4 Fuc を含む Lewis-a 抗原のみを腸管上皮に発現する非分泌型個体にも感染する NoV 株が存在することが知られているが、その糖鎖認識機構の詳細は明らかではない。NoV の Lewis-a 認識機構を明らかにするため、Lewis-a 結合能を有する GI/2 株のキャプシド P ドメインと Lewis-a 複合体の X 線結晶構造解析を行った。Lewis-a との比較のため、Lewis-b, Lewis-x, tetra-A (タイプ 1), tetra-B (タイプ 1), tri-H (タイプ 1) の導入も行った。キャプシド P ドメインは GST 融合タンパクとして大腸菌で発現させた。プロテアーゼ消化により GST アフィニティカラムから P ドメインを回収し、ゲルろ過で精製した。精製 P ドメインを hanging-drop 蒸気拡散法により結晶化し、さらに浸漬法により糖鎖を結晶に導入した。

4. 研究成果

(1) SPR による解析の結果、ABO 抗原同様に Lewis 抗原においてもタイプ 1、2 構造の識別が行われていることが明らかとなった。糖鎖を固定したチップ上に VLPs を 20 μ l/min にて 120 秒間流し、結合を SPR にてモニターした。16 株中 5 株 (5 遺伝子型) の VLP と糖鎖との結合を検出した。Lewis-b または Lewis-y 抗原に結合した 5 株において、その結合速度はタイプ 1 構造 (Lewis-b) よりタイプ 2 構造 (Lewis-y) の方が高く、ABO 抗原の結果と一致した。Lewis-a または Lewis-x 抗原に結合したのは CV (GI/4) 株、W18 (GI/8) 株の 2 株であった。W18 (GI/8) 株の結合速度はタイプ 1 構造 (Lewis-a) よりタイプ 2 構造 (Lewis-x) で高く、ABO 抗原の結果および Lewis-b/y 抗原の結果と一致した。しかし、CV (GI/4) 株の結合速度は Lewis-x より Lewis-a で高く、これまでの結果と一致しなかった。血液型抗原のタイプ 1、2 構造を識別することによって、NoV は自らの組織特異性を決定している可能性がある。

(2) FCM による解析の結果、タイプ 1、2 構造の識別が行われていることを細胞上において証明することが出来た。また、NoV の GII/4 遺伝子型株が、他の遺伝子型株に比べ結合できる血液型抗原の種類が多く、またそれぞれの血液型抗原への結合力が強いことを細胞上において確認することが出来た。GII/4 遺伝子型株は、日本も含め世界中で流行している株である。GII/4 遺伝子型株の血液型抗原

への結合力の強さがこの株の伝播力の強さに結びついている可能性がある。

(3) X線結晶構造解析において、tetra-B (type 1)を除いて、糖鎖との複合体の構造モデルを得ることに成功した。各構造を比較したところ、フコースとの相互作用には3つの結合様式があることが明らかとなった。また既に報告されている NV/68 株の penta-H (type 1), tri-A 複合体構造と比較したところ、Fuc とキャプシドタンパク質との相互作用に違いが見られた。特に Lewis-a との相互作用には両株間で保存されていない残基が重要な役割を果たしていた。さらに立体構造に基づく糖鎖との相互作用の解析結果は、ELISA による相互作用解析結果と一致していた。

以上の研究成果によって、糖鎖構造を見分けるといふ NoV 共通の性質を利用した検出、診断方法の確立が可能になる。また、NoV は宿主体内における感染標的細胞が明らかにされていないことから、本研究課題における解析結果は、糖鎖発現を指標とした NoV 感染標的組織・細胞の同定に繋がるばかりでなく、感染拡大機序の解明と予測に繋がる。

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)

- 1) H. Shirato. Norovirus and Histo-blood Group Antigens. Japanese Journal of Infectious Diseases, 64, 95-103, 2011, 査読有り
- 2) H. Shirato, S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, Z. Xiaofan, T. Miyamura, T. Wakita, K. Ishii and N. Takeda. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. Journal of Virology, 82, 10756-10767, 2008, 査読有り

[学会発表] (計18件)

- 1) 染谷雄一：ファージディスプレイ法による広域遺伝子型反応性ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離。日本薬学会第131年会、2011年3月、静岡県
- 2) 久保田智巳：ノロウイルスによるフコース認識の分子基盤。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、兵庫県
- 3) 白土東子：糖鎖ライブラリーとそれを利用したノロウイルスの糖鎖認識機構の解析。第8回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2010年11月、東京都

4) 守口匡子：ファージディスプレイ法による、ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島県

5) 染谷雄一：ノロウイルス様中空粒子アセンブリに影響を与えるドメイン間相互作用。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島県

6) 白土東子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島県

7) 白土東子：ノロウイルスによる血液型抗原の識別。第5回糖鎖産業技術フォーラム、2010年9月、神奈川県

8) Haruko Shirato: Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul 2010. Seoul National University in Seoul, 2010. 7

10) 染谷雄一：ノロウイルス中空粒子の昆虫細胞での発現。日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山県

9) 染谷雄一：ノロウイルス様中空粒子の大きさに影響を及ぼすアミノ酸残基置換。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京都

11) 熊谷安希子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月、東京都

12) 熊谷安希子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析。第29回日本糖質学会年会、2009年9月、岐阜県

13) 白土東子：ノロウイルスによる血液型抗原の識別。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山県

14) 白土東子：ノロウイルスによる血液型抗原タイプ1、2構造の識別。第28回日本糖質学会年会、2008年8月、茨城県つくば市

15) 成松久：ノロウイルスの結合する糖鎖構造。第12回日本神経ウイルス研究会学術集会、2008年7月、鹿児島県

[図書] (計1件)

1) 白土東子、武田直和、石井孝司 「ノロウイルスと血液型抗原との結合」 総ページ数7ページ、遺伝子医学MOCK11、株式会社メディカルドゥ

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：