

## 広島市におけるノロウイルス GII/4 のカプシド蛋白質

### P2 ドメインの解析 (2006~2010 年)

阿部 勝彦      田中 寛子      藤井 慶樹      井澤 麻由  
山本美和子      橋本 和久      野田 衛\*

2006年~2010年に検出された Norovirus(NoV)GII/4 のカプシド蛋白質をコードする ORF2 の P2 ドメインの遺伝子解析を行い、分子モデルによる検討を行った。調査期間中の NoV GII/4 は大きく 3 つのクラスターに分類され、2006b クラスターに属する株が最も多かった。2006b クラスターの P2 ドメインを含むアミノ酸配列から分子モデルをつくり、事例数の多さで重要なアミノ酸置換部位を推定した結果、10 以上の事例で原因となった株には P2 ドメインの中でも特定の部位にアミノ酸置換が存在し、その部位が特に重要なことが示唆された。

キーワード： ノロウイルス， GII/4 ， P2 ドメイン， 分子モデル

#### はじめに

NoV は小児の散発性感染性胃腸炎の主要原因ウイルスであるとともに、高齢者施設等の集団感染症や食中毒等の最も重要な原因ウイルスである。2006 年の NOV 流行以降、その多くが GII/4 であったことが明らかにされている<sup>1)</sup>。これまでに、厚生労働省通知の NoV 検出法<sup>2)</sup>にある G2-SKF/G2-SKR で増幅される ORF2 上流の保存領域について遺伝子解析を行ったところ、ほぼ同一アミノ酸配列の GII/4 が検出され、疫学解析に向いていないことが分かっている<sup>3)</sup>。そのため、NoV GII/4 株間の違いをより詳しくみる目的で、NoV 遺伝子の中で最も変異に富む ORF2 の P2 ドメインの遺伝子解析を行ってきた<sup>3, 4)</sup>。最近、X 線構造解析により NoV のカプシド結晶構造が明らかにされ<sup>5)</sup>、ホモロジーモデリング法<sup>6)</sup>によりオリジナルのアミノ酸配列から分子モデルを構築することができるようになった。これまで、市内で検出された NoV GII/4 の P2 ドメインは、短い期間にいろいろな部位にアミノ酸レベルで変異をおこした株が検出されている<sup>3, 4)</sup>が、変異を起こす部位に特徴がみられるのかが疑問であった。今回、ホモロジーモデリング法を用いて P2 ドメインの 2 量体分子モデルを構築し、解析したので報告する。

#### 方 法

#### 1 調査対象事例

2006 年 5 月~ 2010 年 12 月に当所において、食中毒、有症苦情、高齢者施設等の集団感染症および感染症発生动向調査事業の小児感染性胃腸炎等の糞便から検出された NoV を対象とした。

#### 2 NoV の検出と遺伝子型別

NoV 検出は、Kageyama ら<sup>7)</sup>のリアルタイム PCR 法で行い、NoV 陽性検体は P2 ドメインを含む領域を増幅するプライマー(GII-5a/GII-2Ra<sup>8)</sup> : 571bp)で増幅後、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。本文中、図中のアミノ酸番号は Loadsdaile 株(アクセション No. X86557)をもとに番号振りした。

#### 3 ホモロジーモデリング法による分子モデル作成と解析

解析の結果 GII/4 に分類され、決定した塩基配列からアミノ酸変換後に、異なるアミノ酸配列の株について、分子モデルによる解析を検討した。分子モデル作成は、横山らの方法を参考に、蛋白質構造データベース(PDB)に登録されている NoV GII/4 のカプシド P ドメイン結晶構造(20BR.pdb)をモデルテンプレートとして、WEB(SWISS-MODEL Workspace<sup>6)</sup>)上で当所解析の NoV アミノ酸配列を重ね合わせることで単量体の立体構造を得て、それをもとに同 20BR.pdb を参考に 2 量体構造を構築した。系統樹解析結果から、2006 年 5 月に初めて市内で検出された GII/4 のアミノ酸配列

\*: 現 国立医薬品食品衛生研究所

(2061601F)と比較して、異なるアミノ酸を色分けすることにより、P2 ドメイン上の変異部位の確認を行った。

#### 4 P2 ドメイン上の重要部位の推定

アミノ酸配列上のどの位置が流行に関連するのかを推定するために、便宜的に以下のような方法を用いた。すなわち食中毒、有症苦情、高齢者施設等の集団感染症については患者数の多少にかかわらず1事例=1とカウントし、小児感染性胃腸炎患者は1人=1とカウントすることとした。なぜなら、食中毒や高齢者施設等の集団発生時にはNoVを保有する1人の患者が原因となると考えられるため、1事例は1患者由来NoVとカウントするためである。市内で初めて検出された2006bである2061601Fの配列を基準配列とし、解析した株と基準配列と比較して、異なるアミノ酸置換部位が3か所あれば、その3か所の置換部位は事例数+患者数カウントのスコアを持つ置換部位とした。全ての異なるアミノ酸配列の株を整理後、そのアミノ酸置換部位を持つ合計スコアを、そのアミノ酸部位の重要度を推定する尺度として用いた。

#### 結果及び考察

今回解析した領域のアミノ酸配列での系統樹解析の結果、細かくは43種類の異なるアミノ酸配列(サブグループ)、大きくは3つのクラスターに分

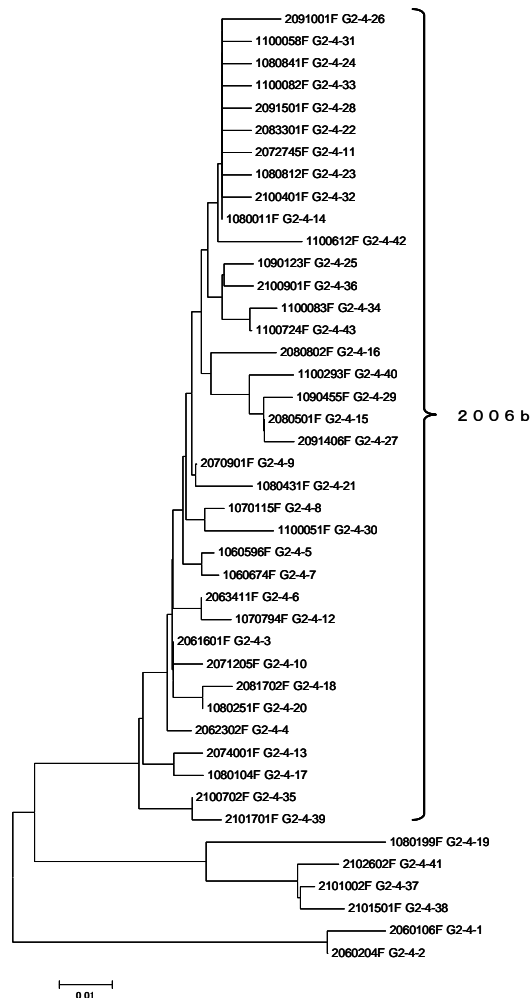


図1 GII/4 P2 ドメインを含む領域(190 アミノ酸)による系統樹

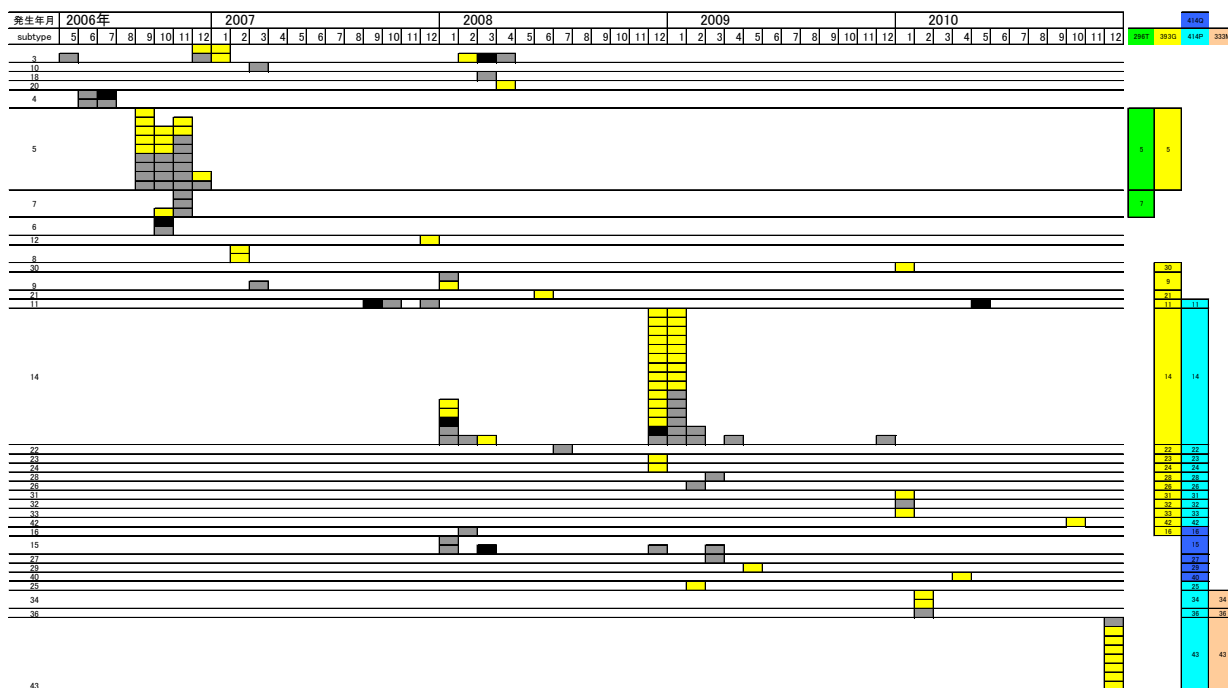


図2 GII/4 2006bサブグループ別月別事例発生状況

\*黄色は小児感染性胃腸炎、灰色は高齢者施設等の集団感染症、黒は食中毒及び有症苦情。右端の帯は結果及び考察で述べる、最も重要なアミノ酸変異部位を持つサブグループを示す。

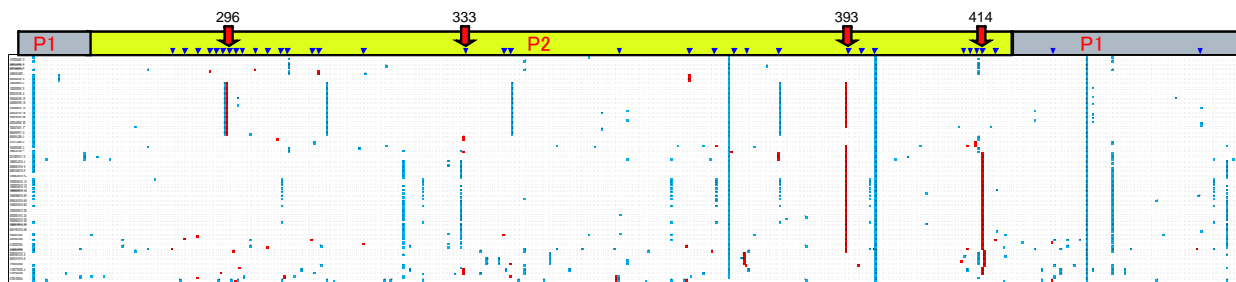


図3 GII/4 2006b サブグループの全ての異なる塩基配列の株

\*最上部の帯はP1, P2 ドメインの位置を示す。三角はアミノ酸変異のあるアミノ酸を示し、最も大きな帯中の青(淡色)は同義変異の塩基を、赤(濃色)は非同義変異の塩基を示す。矢印は本文中の最も重要なアミノ酸変異部位を示す。

類され、2006b と称されるクラスターに属する NoV が最も多かった(図1)。

2006b クラスターに属するサブグループ別に事例の発生状況(図2)をみると、サブグループ5, 14, 43 は多くの事例と患者が発生し流行したことが分かるが、その他のほとんどのサブグループは1~数件の検出に留まり、中には数カ月おきに繰り返し検出されるサブグループもあった。

2006b クラスターに属するサブグループの異なる塩基配列の株を図3に示した。非同義変異の塩基は赤で、またそのアミノ酸変異箇所を三角で示した。解析した領域のアミノ酸変異箇所のほとん

どがP2 ドメインに存在した。次にアミノ酸変異箇所のみ抜き出して比較した(図4)。2006b 基準株とした 2061601F から異なるアミノ酸置換である S393G(393 番目のアミノ酸 S:セリンが G:グリシンに変異したという意味)、H414PまたはH414Q、P357D については、異なるサブグループ間でみられるアミノ酸置換で、獲得した変異がしばらく保持されたものと考えられた。しかしそれ以外のほとんどのアミノ酸置換はサブグループ間でばらばらで、一定していなかった。

次に実施する分子モデル上の重要なアミノ酸置換部位を推定するために、便宜的に以下のような

LDのORF2でのNO	P2ドメイン																																	P1ドメイン	
	287	289	291	293	295	296	297	298	300	302	304	305	309	310	317	333	339	340	357	358	372	375	377	382	393	395	397	411	412	413	414	416	425	448	
#2061601F.G2-4-3	3	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2071205F.G2-4-10	10	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2081702F.G2-4-18	18	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080251F.G2-4-20	20	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2062302F.G2-4-4	4	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1060596F.G2-4-5	5	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1060674F.G2-4-7	7	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2063411F.G2-4-6	6	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1070794F.G2-4-12	12	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1070115F.G2-4-8	8	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100051F.G2-4-30	30	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2070901F.G2-4-9	9	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080431F.G2-4-21	21	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2072745F.G2-4-11	11	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080011F.G2-4-14	14	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2083301F.G2-4-22	22	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080812F.G2-4-23	23	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080841F.G2-4-24	24	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2091001F.G2-4-26	26	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2091501F.G2-4-28	28	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100058F.G2-4-31	31	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2100401F.G2-4-32	32	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100082F.G2-4-33	33	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100612F.G2-4-42	42	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2080802F.G2-4-16	16	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2080501F.G2-4-15	15	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2091406F.G2-4-27	27	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1090455F.G2-4-29	29	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100293F.G2-4-40	40	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1090123F.G2-4-25	25	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100083F.G2-4-34	34	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2100901F.G2-4-36	36	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1100724F.G2-4-43	43	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2074001F.G2-4-13	13	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#1080104F.G2-4-17	17	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2100702F.G2-4-35	35	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
#2101010F.G2-4-39	39	R	D	T	I	G	S	R	N	T	N	A	S	N	N	I	V	K	G	P	S	E	F	T	K	S	T	R	R	N	V	H	V	T	D
第17ミ/酸実果	K	G	I	T	S	L	S	D	S	T	A	S	S	S	I	R	A	D	N	O	L	A	H	S	A	O	G	G	D	A	E	A	N	N	
高齢者事例	0	0	0	1	1	18	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	2	3	1	0	5	2	38	0	0	1	0	0	22	1	1	1		
食中毒	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	2	4	0	0	0	4	0	1	0			
サーベイ	1	1	2	0	0	12	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	2	0	44	1	1	0	4	3	49	0	0			
第27ミ/酸実果	H														M					G	D														
高齢者事例	0														2					2	0								6						
食中毒	0														0					1	0							1							
サーベイ	0														0					0	1							2							
合計スコア	1	1	2	1	1	20	2	1	1	1	1	2	1	2	1	10	1	2	4	7	2	1	9	4	26	1	1	1	4	3	75	1	3	1	

図4 GII/4 2006b サブグループの異なるアミノ酸変異箇所

\*異なるアミノ酸変異箇所のみを抜き出して表示した。上部の番号は Loadsdaile 株のアミノ酸番号をもとに番号付けした。GII/4 2006b の元と考えた 2061601F と異なるアミノ酸を色付けした。事例及び患者数のカウント値及び合計スコアを最下段に示し、合計スコア 4~9 事例の重要な変異部位、10 以上の最も重要な変異部位をそれぞれ色付けした。

分類を行った。すなわち、事例数+患者数カウントの合計スコアを計算した結果、1~3事例しか検出されていない「あまり重要でない変異」部位、4~9事例を起こした「重要な変異」部位、10以上の事例の原因となった「最も重要な変異」部位の3つに分類した。「最も重要な変異」部位は296T, 393G, 414P, 333Mの4か所であった(図4)。アミノ酸配列上の4か所の「最も重要な変異」部位の位置はそれぞれ離れており、特徴はわからなかった。

ホモロジーモデリング法で分子モデルをつくり(図5)、全てのサブグループのアミノ酸置換部位を視覚的に確認するとともに、事例数の合計スコアにより変異部位を「あまり重要でない変異」部位、「重要な変異」部位、「最も重要な変異」部位の3つに色分けした。その結果、4か所の「最も重要な変異」部位のうち、3か所は明らかにP2ドメインの外側辺縁に位置し、残る1か所も上端辺縁に位置し、これらはP2ドメイン上でも、より外に飛びだしたところに位置していることが分かった。「最も重要な変異」部位以外でも外側辺縁に位置している「あまり重要でない変異」部位もあったが、NoV カプシドの機能上、有効な変異ではなかったのかもしれない。NoV が流行するためには、NoV が自身の抗原性を変異させることでヒトの抗体から逃れ、感染を容易に成立させることが必要である<sup>10)</sup>。抗原性を変異させる最も効果的な方法は、抗原認識されるカプシド表面に位置するP2ドメインを変異させることと考えられるが、最近P2ドメインはヒト腸管細胞と結合するためのレ

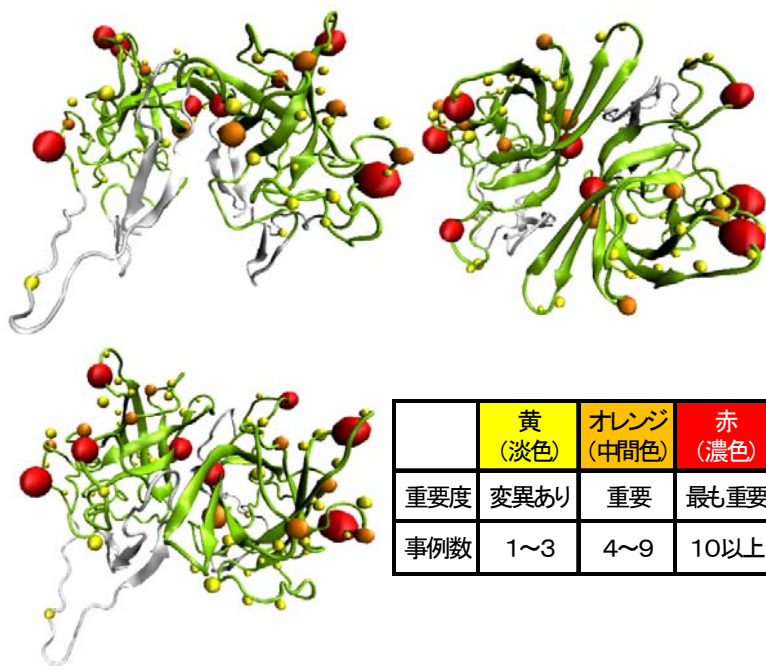


図5 Pドメイン分子モデルにおけるアミノ酸変異部位

\*左上は分子モデルを真横から、右上は真上から、左下は斜め上方からそれぞれ見た図。本文中の重要度により表のとおり、アミノ酸変異部位を色分けして球で表示し、最も重要な変異部位のアミノ酸は球を大きく表示した。

セプターでもあり、抗原性を変えすぎるとレセプターとしての機能も失われる可能性がある」と報告されている<sup>10)</sup>。

これらのことから、今回判明した「最も重要な変異」部位はレセプターとしての機能も失うことなく、効果的に抗原性を変化させ、流行株となったと推測される。しかも、これら4か所の変異は独立して効果を発揮したのではなく、296Tと393Gの変異獲得で2006/2007シーズン、393Gを残したまま296Tを失い414Pの変異獲得により2007/2008~2008/2009の2シーズン、414Pを残したまま393Gを失い333Mを獲得し2009/2010~2010/2011シーズンにそれぞれ流行を起こしていた(図2, 図6)。

NoVの流行は世界規模で共通のクラスターが流

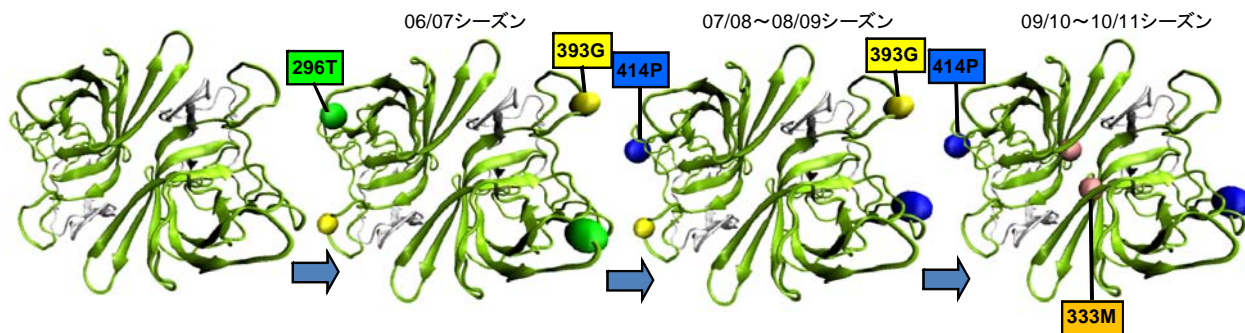


図6 P2ドメイン上の最も重要なアミノ酸変異の変遷

行株となることが知られており<sup>11)</sup>、広島市内で検出されたNoVも市外または海外から持ち込まれている可能性もあり、同一のNoVが変異を繰り返して同一地域でいつまでも存在している訳ではないと考えられる。しかし、NoV GII/4 2006bは規模の大小はあるが5シーズンも流行を続けており、市外から新たなNoVが持ち込まれたと考えたとしても、市内住民の抗体から逃れられなければ流行できないはずである。どのアミノ酸変異も同じように見えたが、実は効果的な変異部位がそこに存在し、その部位にアミノ酸変異を持つNoVが市内に持ち込まれるか、もしくは市内で感染を繰り返しているNoVが変異することにより、新たな流行を引き起こすのかもしれない。

#### 文 献

- 1) ノロウイルスの流行 2006/07~2009/10シーズン, 病原微生物検出情報月報, 31, 312~314(2010)
- 2) ノロウイルスの検出法について, 厚生労働省医薬品食品保健監視安全課長通知(2003), 食安監発第1105001号
- 3) 阿部 勝彦 他: 2006年5月~2008年4月に広島市で流行したノロウイルス GII/4 の分子疫学について, 広島市衛研年報, 27, 35~40(2007)
- 4) 阿部 勝彦 他: 広島市におけるノロウイルス検出状況(2006年1月~2008年12月), 広島市衛研年報, 28, 81~83(2009)
- 5) 横山 勝: 2004年~2009年に国内で流行したノロウイルス GII/4 のキャプシド蛋白質分子モデル, 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中のウイルスの制御に関する研究」平成21年度総括・研究分担報告書, 71~74(2010)
- 6) Prasad BV et al: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid, *Science*, 286, 287~290(1999)
- 7) Arnold K et al: The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics*, 22, 195~201 (2006)
- 8) Kageyama T et al: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 41, 1548~1557 (2003)
- 9) 吉澄志磨 他: 2005/06 及び 2006/07 シーズンのノロウイルスによる胃腸炎集団発生について, 北海道衛研所報, 57, 91~95(2007)
- 10) Motomura K et al: Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII.4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history, *J Virol*, 82, 11247~11262(2008)
- 11) Siebenga JJ et al. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006, *J Virol*, 81, 9932~9941(2007)