













## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	本谷 匠 (DV14007 実験動物学)																
学位論文題目	ノロウイルスの主要抗原遺伝子 (VP1 遺伝子) の分子進化および分子疫学に関する研究																
担当者	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 15%;">主査</td> <td style="width: 35%;">北里大学教授</td> <td style="width: 15%;">胡 東良</td> <td style="width: 35%; text-align: right;"></td> </tr> <tr> <td>副査</td> <td>京都産業大学教授</td> <td>前田 秋彦</td> <td style="text-align: right;"></td> </tr> <tr> <td>副査</td> <td>北里大学准教授</td> <td>田邊 太志</td> <td style="text-align: right;"></td> </tr> <tr> <td>副査</td> <td>北里大学准教授</td> <td>高野 友美</td> <td style="text-align: right;"></td> </tr> </table>	主査	北里大学教授	胡 東良		副査	京都産業大学教授	前田 秋彦		副査	北里大学准教授	田邊 太志		副査	北里大学准教授	高野 友美	
主査	北里大学教授	胡 東良															
副査	京都産業大学教授	前田 秋彦															
副査	北里大学准教授	田邊 太志															
副査	北里大学准教授	高野 友美															

### 論文審査の要旨 (3,000 字以内)

ノロウイルス(NoV)は、ウイルス性下痢症の主要な病原体として知られ、日本を含めて世界的に毎年多数の患者発生が報告されている。NoV の主要抗原遺伝子(VP1 遺伝子)は、遺伝学的に多様であるとともに、進化速度が非常に速いことが示唆されている。現在、NoV は VP1 遺伝子配列を基にして 7 遺伝子群(Genogroup)に分類され、主に GenogroupI(GI)と GenogroupII(GII)のウイルスがヒトから検出され、さらに GI は 9 遺伝子型(GI.1-GI.9)、GII は 22 遺伝子型(GII.1-GII.22)に細分類されている。NoV の流行は GII が大半を占め、その中でも GII.4 は少なくとも約 20 年前から主流型となっていることが報告されている。NoVGII.4 の長期にわたる流行の原因には、主要抗原をコードしている VP1 遺伝子の進化が関与していると思われるが不明な点が多い。そこで、本研究では、世界

中で採取された NoVGII.4 株の *VPI* 遺伝子の全長塩基配列を使用して種々のバイオインフォマティクス技術を基盤とする詳細な分子進化学的解析を行った。また、茨城県において検出された NoVGII の分子疫学に関する研究を併せて行った。

第1章として、1974年から2015年に発生したノロウイルス GII.4 variant における *VPI* 遺伝子の分子進化を研究した。本研究に使用した *VPI* 遺伝子塩基配列は、Genbankに登録されている世界中の株をNCBIから引用した。すべての株をNorovirus Genotyping Toolで遺伝子型別し、*in silico*分析が可能なデータセットにするために、98.9%以上の同一性を有する配列を除外し466株とした。データセットに用いた株間には組み換えがないことを確認した。解析はBEAST2を使用した時系列系統解析、進化速度解析、Similarity解析、系統間距離解析、選択圧解析、B-cellエピトープ予測、各NoVGII.4 variantの立体構造作成と解析結果のマッピングおよびBayesian Skyline Plot(BSP)解析を行った。NoVGII.4 variantの分子進化学的解析から、GII.4の共通祖先は1840年にGII.20と分岐し、その後1932年にGII.4遺伝子型が出現し、1980年以降GII.4は14種類のvariantと7つのクラスターを形成しながら分岐を繰り返した。NoVGII.4 *VPI* 遺伝子の進化速度はvariantごと、ドメインごとに異なった。*VPI* 遺伝子のSimilarityはShellドメインでは高かった(>85%)が、P2ドメインでは低かった(>75%)。NoVGII.4全体の系統発生距離は $0.210 \pm 0.105$ (平均 $\pm$ 標準偏差)、variantごとの平均値は0.0163から0.0698の範囲内で、variantごとに異なっていた。構造解析により推定された立体配座エピトープのうち4つの領域はP2ドメインの外面に位置し、以前の*in vitro*研究によって同定された領域と重複していた。GII.4のすべての株で正の選択部位を推定したところ、ShellドメインおよびP1ドメインで検出されたが、P2ドメイン上には見出されなかった。負の選択部位は、合計369残基が推定され、その割合はP1ドメインで他のドメインよりも有意に高かった。また、NoVGII.4 variantごとに正の選択部

位を推定したところ、3種類(Den Haag 2006b、New Orleans 2009、Sydney 2012)の variant においてP2ドメイン上に推定された。また、BSP解析により、GII.4のゲノムポピュレーションサイズは2段階で増加しており、さらに3種類(Den Haag 2006b、New Orleans 2009、Sydney 2012)の variant において増加した。今回の研究結果から、胃腸炎の大流行を引き起こしたGII.4は、P2ドメインに集中して変異を重ね、非常に速い進化速度で集団免疫から逃れるためにEscape mutantとなる14の variant を生み出すとともに、独自に進化してヒトに順化していった結果、蔓延していった可能性がある。また、Similarity解析とドメインごとの進化速度の差異から、P2ドメインは他のドメインよりも早い進化速度で変異を重ね、免疫を逃れられる構造に進化したことが推察された。さらに、B-cellエピトープがP2ドメインに集中するとともに、アミノ酸置換はエピトープ周辺に多数存在することから、B細胞はP2ドメインに生じたアミノ酸置換部位を主に認識する可能性があることも示唆された。加えて、選択圧解析の結果から、GII.4の機能的な部位がP1ドメインに多く存在すること、variantごとに選択圧を受ける場所が異なることが推察された。BSP解析では、新たなGII.4 variant が発生したことで、さらなる感染拡大が生じ、GII.4が段階的に主要な流行を作るようになった可能性が考えられた。

次に、第2章として茨城県で検出されたNoV GIIの分子疫学解析を実施した。茨城県において、2012年9月から2017年8月までの5シーズンでサーベイランスにより収集された5,275検体の糞便のうちNoV GII陽性となった2,243検体の患者情報を使用した。すべての株はNorovirus Genotyping Toolで遺伝子型別し、50事例以上発生したGII.2 (171事例)、GII.4 (248事例)、GII.6 (63事例)、GII.17 (77事例)、その他のGII遺伝子型 (39事例)の合計598事例分の情報についてその内容を比較解析した。事例内容は1)幼稚園・保育園など幼児施設2)小学校3)老人福祉施設4)病院5)食中毒疑い事例6)その他に分類した。その結果、遺伝子型ごとにみると、GII.4

は毎シーズン検出事例数が減少していった。一方、2013/2014シーズンにはGII.6、2014/2015および2015/2016シーズンにはGII.17、2016/2017シーズンはGII.2が流行した。GII.17は他の遺伝子型よりも若干遅れ、2月から3月にピークがあった。また、GII.2およびGII.6の感染者の年齢はGII.4およびGII.17の年齢と比較して有意に低く、幼稚園や保育園における感染症事例が多かった。GII.4がシーズンごとに事例数が減少した原因に、集団免疫などが関与したことが考えられた。また、各遺伝子型の事例内容には差があり、特にGII.2およびGII.6の感染が小児に多いことは、これらの遺伝子型が、大人の集団では広範な免疫が獲得されているため広く流行することが出来なかった可能性がある。今後もGII.4を含めてすべての遺伝子型で新たな変異の獲得による流行の可能性はある。

本研究により、GII.4はP2ドメインを中心に変異を重ねたことでそれぞれのvariantが異なる抗原性を有する進化機序により、ヒトに順化し、蔓延したことが推察された。また、NoVの各遺伝子型、GII.4の各variantは免疫と深く関与した流行があったことが推察された。本研究で得られたデータは、年々蓄積するデータを加えることによって、NoVに対するワクチンの開発および正確度の高い流行予測に資することが可能であろう。

著者のこれまでの研究に対する真摯な姿勢と高い学識が読み取れ、研究者として十分な資質を備えていると判断された。よって、本論文は博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認め、審査委員一同は合格と判定した。