

学位論文要旨

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

Studies on the molecular evolution and molecular epidemiology of the *VP1* gene in norovirus

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

本谷 匠

Takumi Motoya

指導教授 佐々木 宣哉

平成29年度

2017

はじめに

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、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(VPI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、VPI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。GII.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VPI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GII.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GIIの分子疫学に関する研究も併せて行った。

材料と方法

1. GII.4株の分子進化学的解析

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を使用した進化系統樹解析、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GII.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。

2. 茨城県で検出されたNoV GIIの分子疫学解析

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。すべての株は上記の方法で遺伝子型を分類し、50事例以上発生したGII.2、GII.4、GII.6およびGII.17についてその内容を比較解析した。

結果

1. GII.4株の分子進化学的解析

GII.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。GII.4VP1遺伝子の進化速度はvariantごと、ドメインごとに異なった。VP1遺伝子のSimilarityはShellドメインでは高い(>85%)が、P2ドメインでは低かった(>75%)。GII.4全体の系統発生距離は 0.210 ± 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、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、各GII.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。

2. 茨城県で検出された NoV GII の分子疫学解析

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。

考察

1. GII.4株の分子進化学的解析

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.4variant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。

2. 茨城県で検出されたNoV GIIの分子疫学解析

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、各遺伝子型の発生集団には差があり、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、大人が既に得た免疫が感染を抑制するとともに、免疫が不十分で感受性が高い小児にのみ感染が拡大した可能性が考えられる。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がある。

結論

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。それゆえ、これらのデータは、将来効果的な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貢献する可能性があるとともに、今後も継続したデータの蓄積が必要である。