23．ロタウイルスのゲノム分節解析の基盤形成と大阪市における流行状況調査

○山元誠司（大阪市立環境科学研究所）

【 研究目的 】

ロタウイルス A（RVA）は 11 本の分節化ゲノムを有し、小児の感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。RVA の遺伝子型別はそのうちの 2 分節（G 型、P 型）に基づいて行われるのが主流であるが、近年、それでは判別できない分節の組み合わせを有する RVA の流行が確認されている。そこで本研究では、11 本分節を効率よく型別できるシステムを構築し、流行している RVA 遺伝子型の正確な把握に寄与することを目的とする。

【 研究の必要性 】

RVA は分節化ゲノムという性質上、2 種類の RVA が同一細胞に感染した際に遺伝子再集合（リアソートメント）により異なるゲノムの組み合わせをもったウイルス（リアソータント）が出現することがある。現在、RVA の遺伝子型別は 2 種類の分節（G 型および P 型）に基づいて行われているが、大阪市における我々の調査では 2012 年以降、それでは判別できない新しい遺伝子構成を有する RVA の流行が確認されている。それらはリアソートメントによって出現したと考えられるため、流行している RVA の遺伝子型を正確に監視するためには、RVA に含まれる 11 本分節ゲノム全ての配列を解読（シークエンス）する必要がある。日本では 2011 年以降、2 種類の RVA 生ワクチンが使用されている（ロタリックスおよびロタテック）。これらのワクチンは定期接種に向けてその効能が注目されており、それを評価するためにも RVA の流行やウイルスの変化を正確に把握する必要がある。また、先行してこれらのワクチンを導入した国では、ワクチン株と野生株のリアソータントの検出が報告されており、日本でもワクチン接種率の増加に伴ってこれが生じ得る。したがって、この 11 本分節ゲノム解析は、それらリアソータントの出現を監視する上でも重要であるが、それにはかなりの労力とコストを要するため、安価に且つ効率よく行う方法の確立が求められている。

【 研究計画 】

RVA の 11 本分節ゲノムには VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 の蛋白質がコードされており、その遺伝子型の組み合わせは Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx（x は数字）と表記される。それぞれの分節ゲノムの増幅は既報のプライマーにて行えるが（Fujii, *Microbiol Immunol*, 2012）、11 本それぞれを精製してシークエンスを行うことは労力とコストが大きいため、逆転写、PCR、シークエンスそれぞれのステップについて、効率的に行う実験系を検討した。さらに、その方法を用いて、大阪市において検出された RVA の 11 本分節遺伝子型別を随時行い、流行株の特徴および変遷を調査した。

【 実施内容・結果 】

感染性胃腸炎患者由来の RVA 陽性便検体は、大阪市感染症発生動向調査事業より供与された。10%乳剤に調製した糞便検体 140 μL より QIAamp Viral RNA mini kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出した。表 1 に示した 100 μM プライマーのうち、VP4 の F2 と R2 を除くプライマー22 種類を等量ずつ混合し、逆転写用プライマーとした（各 4.5 μM）。そして図 1 に示す手順に従って逆転写反応および PCR を行い、シークエンス鋳型 DNA を精製した。PCR 産物の一部は 0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅産物の確認を行った（図 2）。また、精製した鋳型 DNA および表 1 に示すプライマーを用いてシークエンスを行い、塩基配列を決定した。得られた RVA 塩基配列による各分節の遺伝子型決定には、RotaC（http://rotac.regatools.be/）を用いた。なお、RotaC による遺伝子型別には 500 bp 以上の配列が必要である。分子系統樹解析は VP7 遺伝子の塩基配列を元に、MEGA6 ソフトウェアを用いて実施した。また塩基配列の一致率の計算には GENETYX（ゼネティクス）を用いた。今回、逆転写反応からシークエンス鋳型 DNA 精製までの条件検討を重ねた結果、図 1 に示す手順には下記 3 点の改善が認められた。

表1 本研究で使用したプライマー

標的遺伝子	方向	塩基配列5´→3´	PCR産物の大きさ(bp)	文献
VP7	F	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC	1062	Fujii, *Micrbiol Immunol*, 2012
	R	GGGGGTCACATCATACAATTCT		
VP4	F	GGCTATAAAATGGCTTCGCT	2362	
	R	GGGGGTCACATCCTC		
	F2	ATGATTCGACTACAGTRGAACC	--	本研究にて設計
	R2	GGTGTTTCACCATGAAATGTCC		
VP6	F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1356	Fujii, *Micrbiol Immunol*, 2012
	R	GGTCACATCCTCTCACT		
VP1	F	GGCTATTAAAGCTRTACAATGG	3302	
	R	CACATCTAAGCACTCTAATCTTG		
VP2	F	GGCTATTAAAGGCTCAATGG	2717	
	R	TTGGCGTTTACARTTCGTTCA		
VP3	F	TGCGTTTTACCTCTGATGGTG	2591	
	R	TCACATCATGACYAGTGTGTTAAG		
NSP1	F	GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTG	1564	
	R	CTAGGCGCTACTCTAGT		
NSP2	F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTC	1058	
	R	GGTCACATAAGCGCTTTCTATTC		
NSP3	F	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTG	1050	
	R	GGTCACATAACGCCCCTATAG		
NSP4	F	CTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAGAG	750	
	R	AAGACCATTCCTTCCATTAAC		
NSP5	F	GGCTTTTAAAGCGCTACAGT	663	
	R	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGA		

各標的遺伝子のシークエンスに用いた配列を灰色にて示す。

① PCR 産物を混合した後に精製することで、核酸精製キットの使用数を削減した

② ①の条件において、VP4 の増幅に用いるプライマーはシークエンスに不適であったため、新たなシークエンス用プライマーを設計し（表 1、F2 および R2）、VP4 の抗原決定基となるスパイク領域（VP8*）のシークエンスが常時確実に行えるようになった（※F2 および R2 は、遺伝子型 P[4]と P[8]の塩基配列をベースに設計）

③ VP1～3 および NSP1～5 のシークエンス解析において、forward（F）プライマーでは解析結果の質が悪い（波形が汚い）遺伝子が複数あったが、一律に reverse（R）プライマーを用いることで解析結果が改善された

次に、この方法を用いて 2008/2009～2014/2015 シーズンの RVA 株について VP7、VP4、VP6 の 3 遺伝子型（G-P-I 遺伝子型）を決定した（表 2）。この中で、現在日本において広く流行が確認されている典型的な G1-P[8]-I1、G2-P[4]-I2、G3-P[8]-I1、G9-P[8]-I1 および非典型的な G1-P[8]-I2 の RVA 株

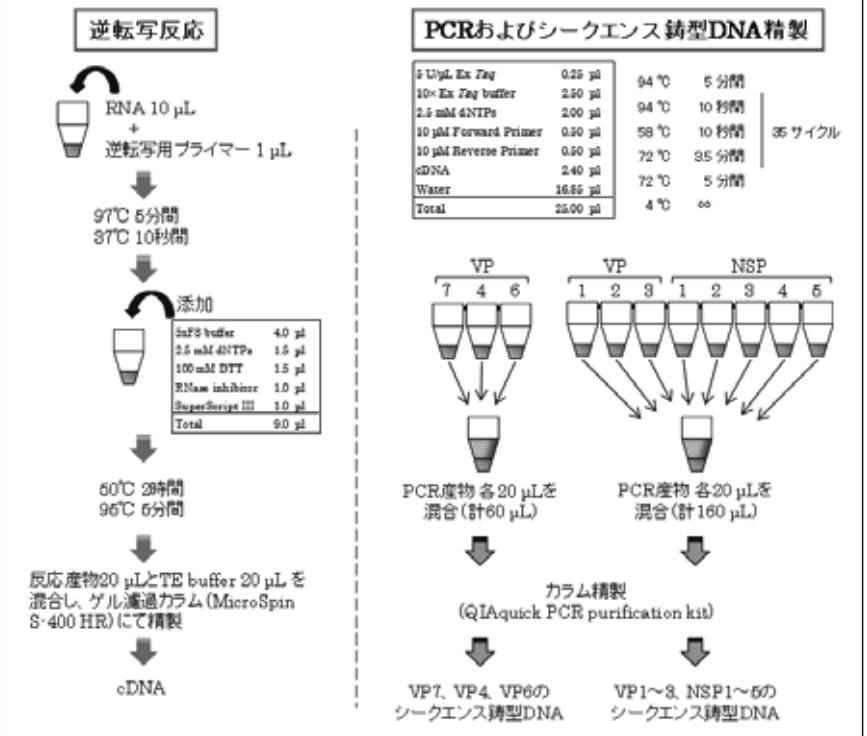

図 1 逆転写反応からシークエンス鋳型 DNA 精製までのフロー

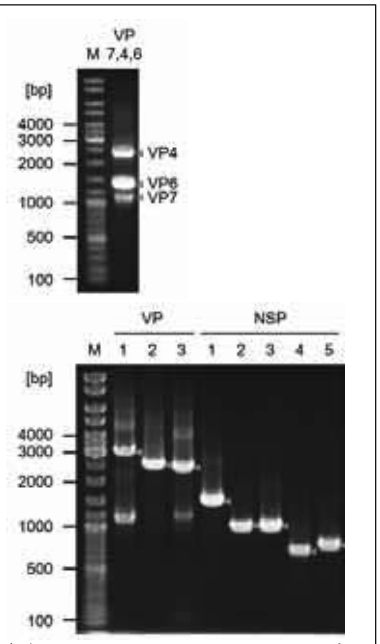

図 2 RT-PCR による RVA 各分節の増幅の一例。VP7、VP4、VP6 のシークエンス鋳型（上)および他 8 遺伝子それぞれの PCR 産物（下）の電気泳動写真。M：マーカー。

について、残りの 8 分節のシークエンス解析を試みた。その結果、解析に用いたすべての株についてシークエンス解析結果が良好であり、決定した遺伝子型は G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1、G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2、G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2、G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1、G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 であった。

大阪市における RVA 株には、2011/2012 シーズンから新たに検出され始めた 2 つの遺伝系統がある。一つは非典型的な G1-P[8]-I2 遺伝子型を有する G1（2012 株）(Yamamoto, *Emerg Infect Dis*, 2014)、もう一つは典型的な G9-P[8]-I1 遺伝子型を有する G9（2012 株）であり（Yamamoto, *J Med Virol*, 2015)、それぞれの VP7 遺伝子自体が大阪市でこれまでに検出されていた G1（土着株）および G9（土着株）とは異なる系統に分類されるのが特徴である（図 3)。これらの 11 分節の遺伝子それぞれについて、初めて検出された 2011/2012 シーズンと直近の 2014/2015 シーズンとの一致率を解析した。2014/2015 シーズンの G9（2012 株）の VP4 および VP6 遺伝子における一致率は 96.7~97.8%とやや低く（図 4A 緑色)、変異の蓄積もしくはリアソートメント

表 2 大阪市にて検出されたRVA株のG-P-I遺伝子型

G-P-I遺伝子型	シーズン							合計（全体に占める割合）
	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	
G1-P[8]-I1	4	3	1	3	16	0	5	32 (31%)
G1-P[8]-I2	0	0	0	4	11	4	3	22 (21%)
G2-P[4]-I2	0	1	2	0	1	6	0	10 (10%)
G3-P[8]-I1	0	3	11	1	0	0	1	16 (15%)
G3-P[8]-I2	0	0	0	0	0	2	0	2 (2%)
G9-P[4]-I2	0	0	0	6	0	0	0	6 (6%)
G9-P[8]-I1	4	0	2	3	2	1	4	16 (15%)
合計	8	7	16	17	30	13	13	104 (100%)

がその原因と考えられた。また、NSP1 および NSP3 遺伝子における一致率は 83.6~93.3%と低く（図 4A 白色）、こちらはリアソートメントがその原因であると考えられた。一方、2014/2015 シーズンの G1（2012 株）は、すべての遺伝子において一致率は高いまま（>98%）保たれていた（図 4 B 赤色）。

【 考察と今後の課題 】

本研究では、RVA の 11 分節ゲノムを安価に効率よく増幅し、シークエンスを行う方法を検討した。その結果、11 本分節それぞれのシークエンス解析を問題なく実施するための PCR 産物精製用カラムを僅か 2 個まで減らし、差し引き 9 個の精製用カラムの節約を達成した。この効果はカラム節約だけにとどまらず、精製したシークエンス鋳型 DNA のチューブ数自体を削減させたことで、実験のハンドリングを容易にしただけでなく保管場所の占有面積縮小化にも貢献するものである。実際には VP7、VP4、VP6 遺伝子の塩基配列を解析することでその RVA 株が典型株か否かはある程度判断でき、その後必要に応じて残りの 8 分節を解析することが、PCR 試薬などを節約する点で効率的であると考えている。今後は、逆転写用のプライマーをランダムプライマーにて置換可能か否かを検討し、cDNA の精製に使用するゲル濾過カラムの節約に取り組む予定である。

2011/2012 シーズンに出現した G1（2012 株）および G9（2012 株）は 2014/2015 シーズンも引き続き検出された。前者の分節は全て高度に保存されていたが、これはリアソートメントが生じていないからではなく、リアソータントが流行できない、即ち複製能や伝播力などにより規定される「適応度」を高く維持するには現在の保存された分節の組み合わせが重要であるのかもしれない。一方、後者はリアソートメントを経て分節の組み合わせが変化、あるいはそれを有する株が外

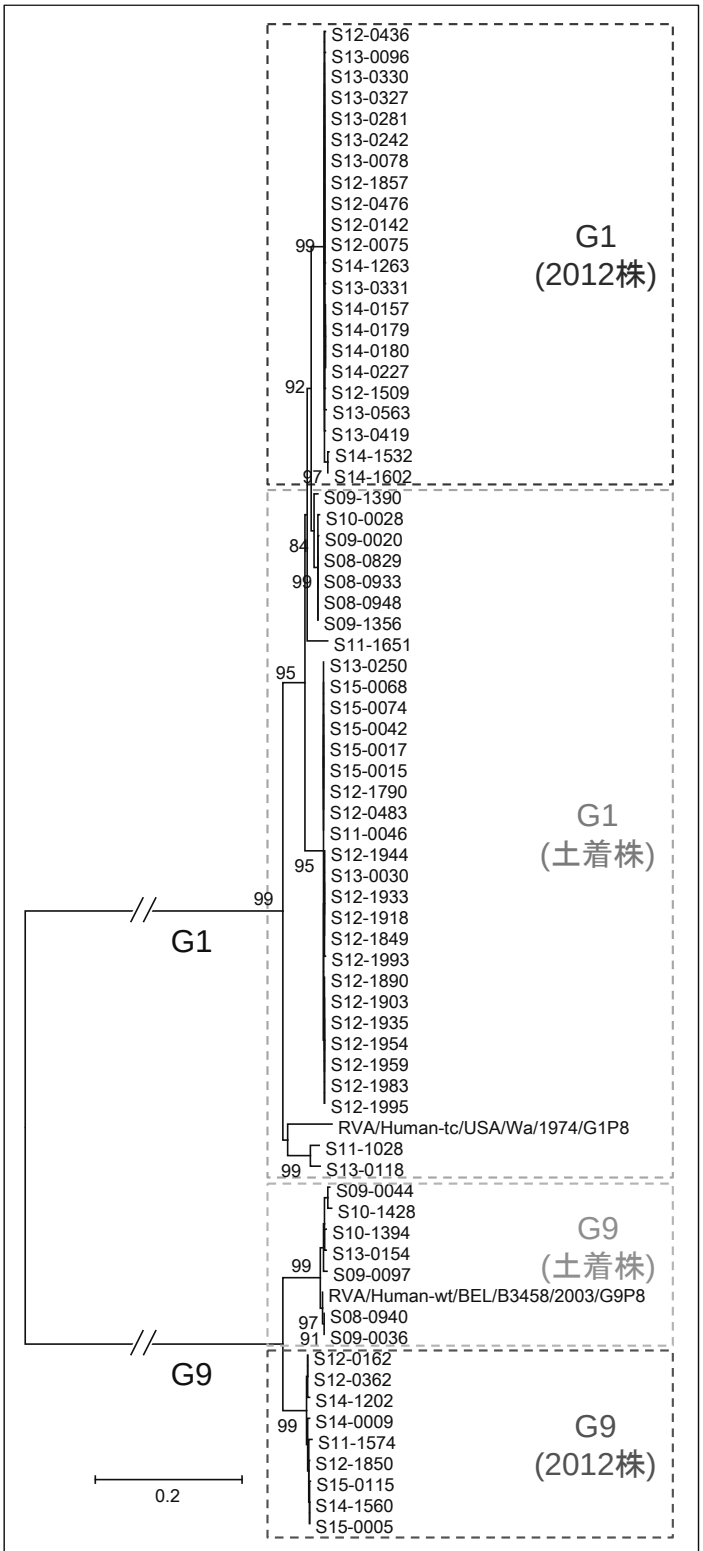

図 3 最尤法による G9 株および G1 株の VP7 遺伝子（862 bp）の分子系統樹解析。

A

	G9(2012株)	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
2011/2012	S11-1574	99.7	99.3	99.7	100	99.9	99.5	99.5	99.7	99.7	99.6	99.8
	S12-0162	99.6	99.4	98.7	99.9	98.1	98.4	99.5	99.0	100	98.4	98.1
	S12-0362	99.6	99.4	98.7	99.9	98.1	98.5	99.5	99.0	100	98.3	98.1
2014/2015	S14-1560	99.8	96.7	97.8	99.2	98.0	99.7	83.6	98.8	93.3	98.5	99.8
	S15-0005	99.8	96.7	97.8	99.2	98.2	99.8	83.6	98.8	93.1	98.5	99.8
	S15-0115	99.7	96.8	97.8	99.2	98.2	99.8	83.6	98.8	93.1	98.2	99.8

B

	G1(2012株)	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
2011/2012	S12-0120	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2013/2014	S14-0026	99.8	99.7	99.8	99.9	100	99.8	99.7	100	99.8	99.7	99.5
2014/2015	S14-1532	99.4	99.7	99.5	99.7	99.5	98.9	98.9	99.7	99.8	98.5	99.3
	S14-1602	99.5	99.7	99.4	99.7	99.5	99.0	98.9	99.7	99.7	98.3	99.3

図 4　G9（2012 株）（A）および G1（2012 株）（B）の各分節の一致率。赤色は一致率>98%、緑色は一致率 95～98%、白は一致率≤95%を示す。

から入り込んできたかもしれないが、いずれにせよ流行株となりうる適応度を有していたと考えられる。それを検証するために、今後も継続して RVA 流行株の遺伝子構成の変遷を解析することが必要である。

【 引用文献 】

Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K. 2012. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 56:630-638.

Yamamoto SP, Kaida A, Kubo H, Iritani N. 2014. Gastroenteritis outbreaks caused by a DS-1-like G1P[8] rotavirus strain, Japan, 2012-2013. Emerg Infect Dis 20:1030-1033.

Yamamoto SP, Kaida A, Ono A, Kubo H, Iritani N. 2015. Detection and characterization of a human G9P[4] rotavirus strain in Japan. J Med Virol 87:1311-1318.

【 経費使途明細 】

合成オリゴ費	72,030 円
PCR 試薬費	27,216 円
電気泳動関連試薬費	66,420 円
核酸精製キット費	11,880 円
シークエンス関連試薬費	24,624 円
解析ソフトおよび情報収集費	80,834 円
消耗品費（綿、チューブ他）	16,996 円
合計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円