

第11回ウイルス学キャンプ in 湯河原

平成26年9月17日

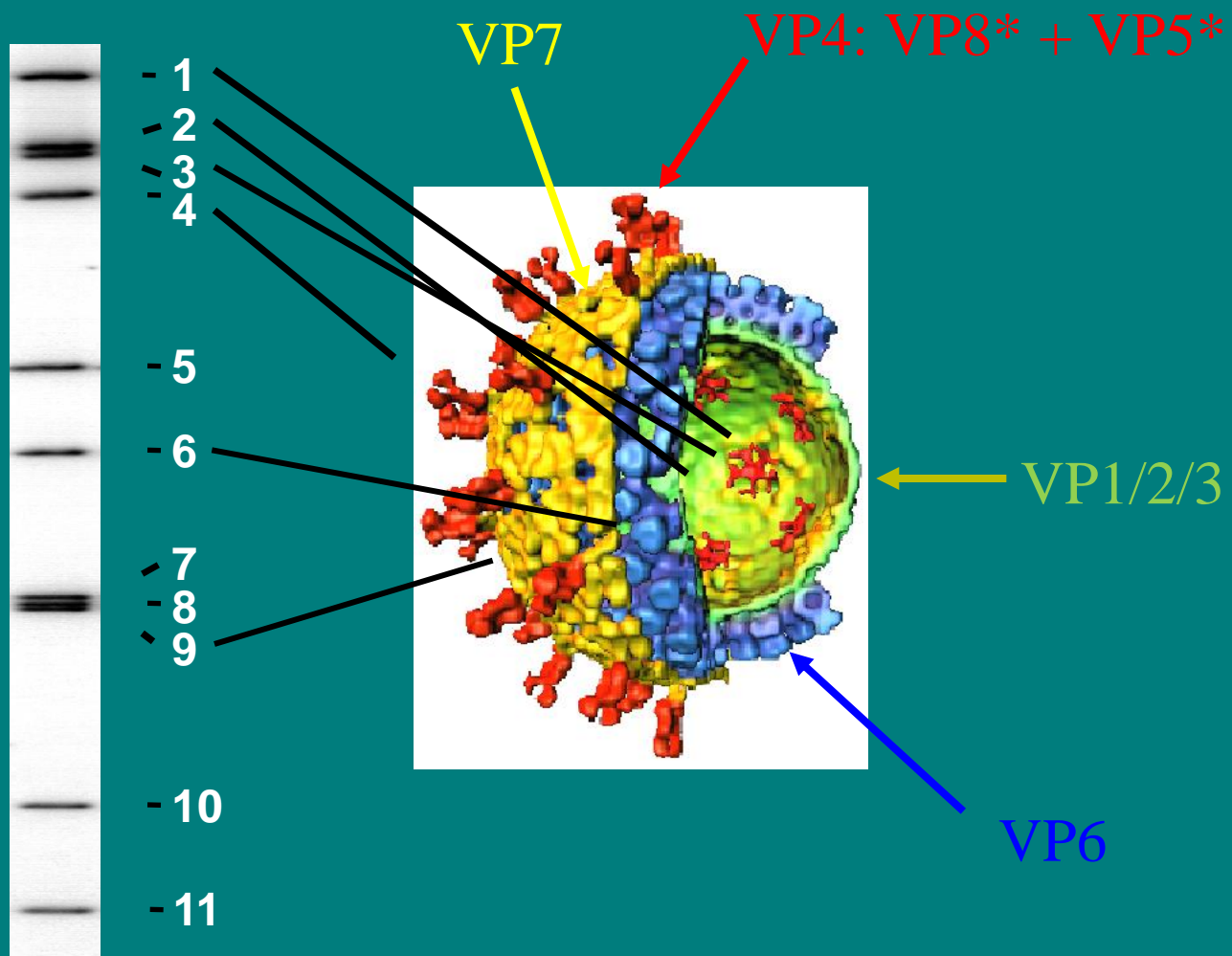
ロタウイルスの感染防御抗原の解析

藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座

谷口孝喜

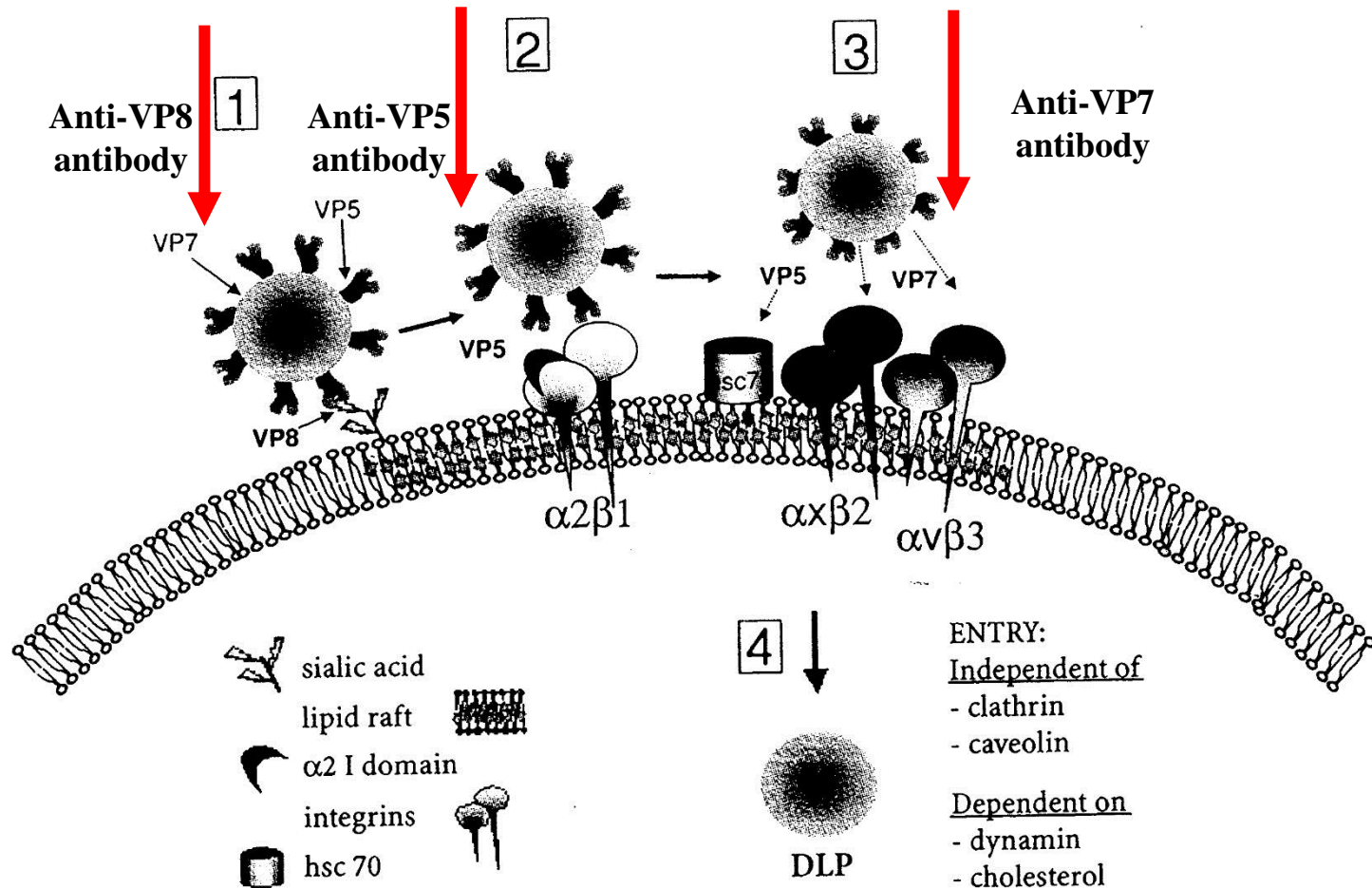
ロタウイルスゲノムは11分節のdsRNAからなる

ウイルスゲノムのPAGEパターン

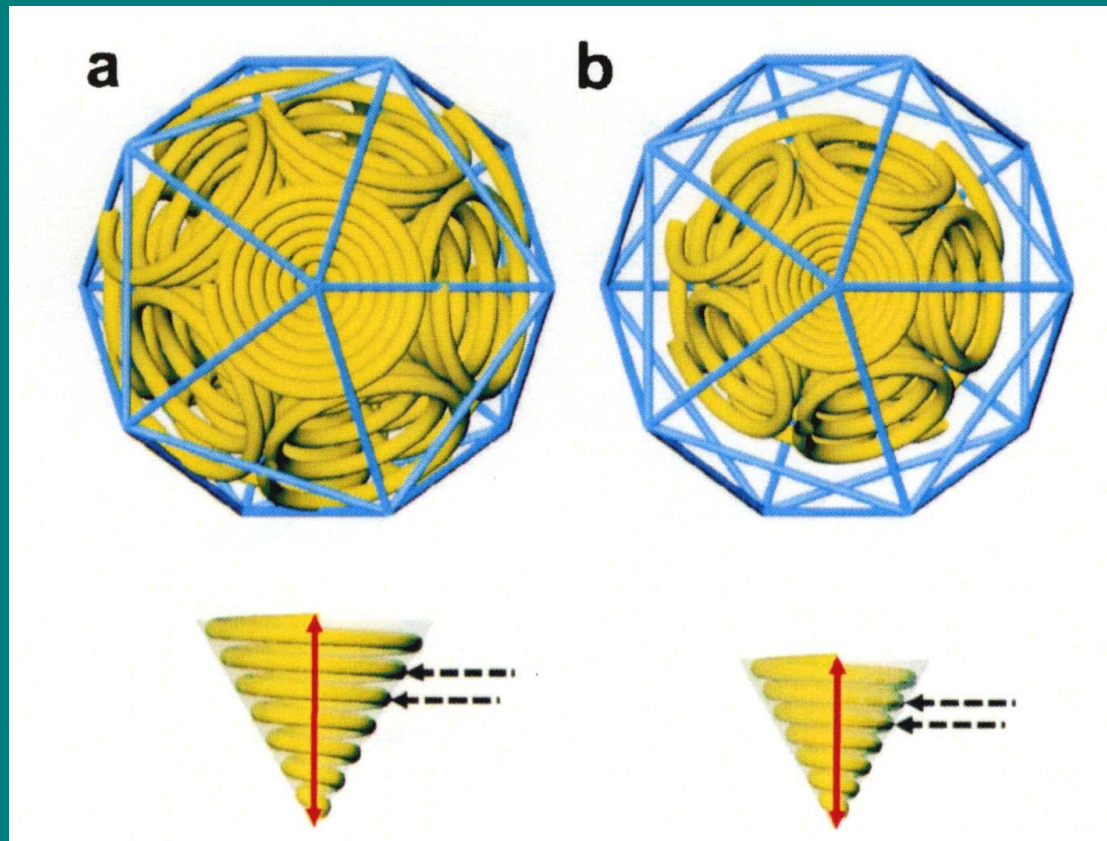


ロタウイルス感染の初期過程

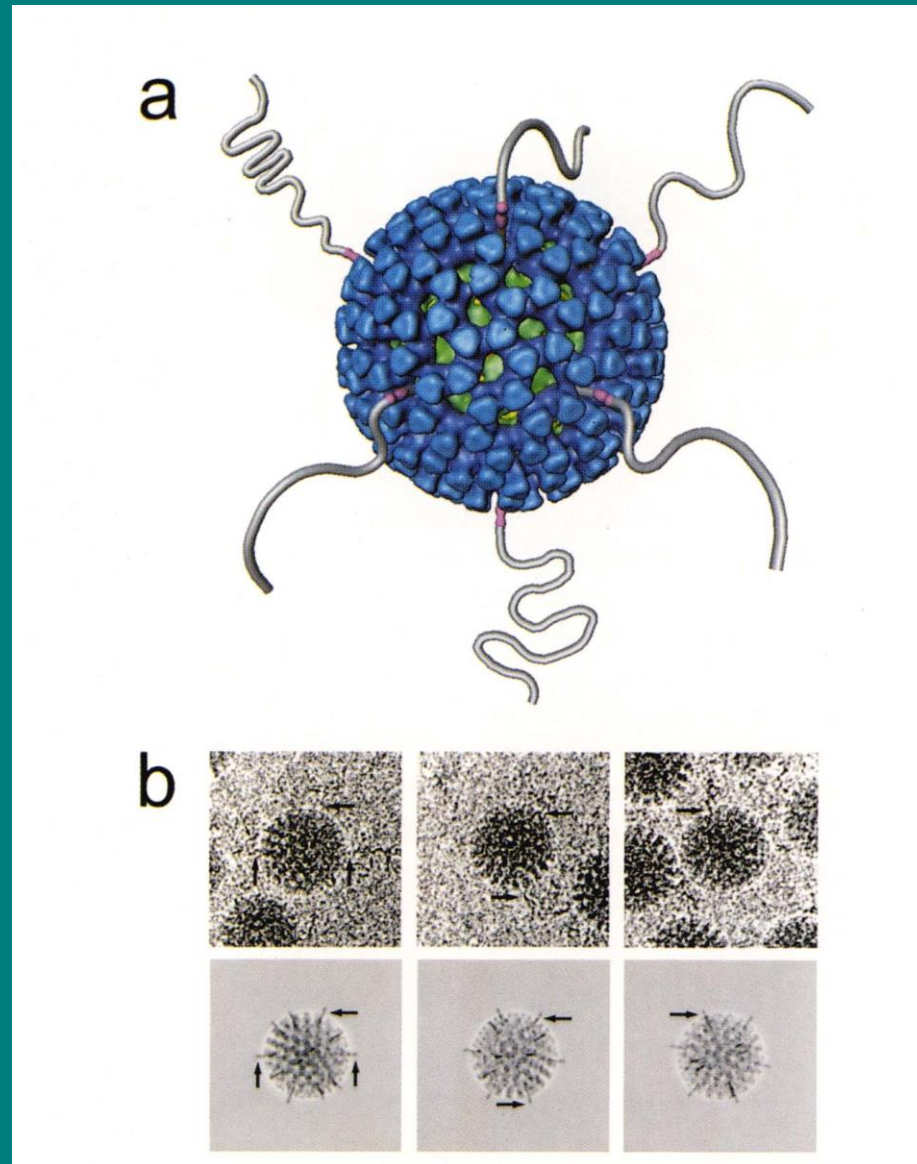
VP4 ⇒ VP8* + VP5*



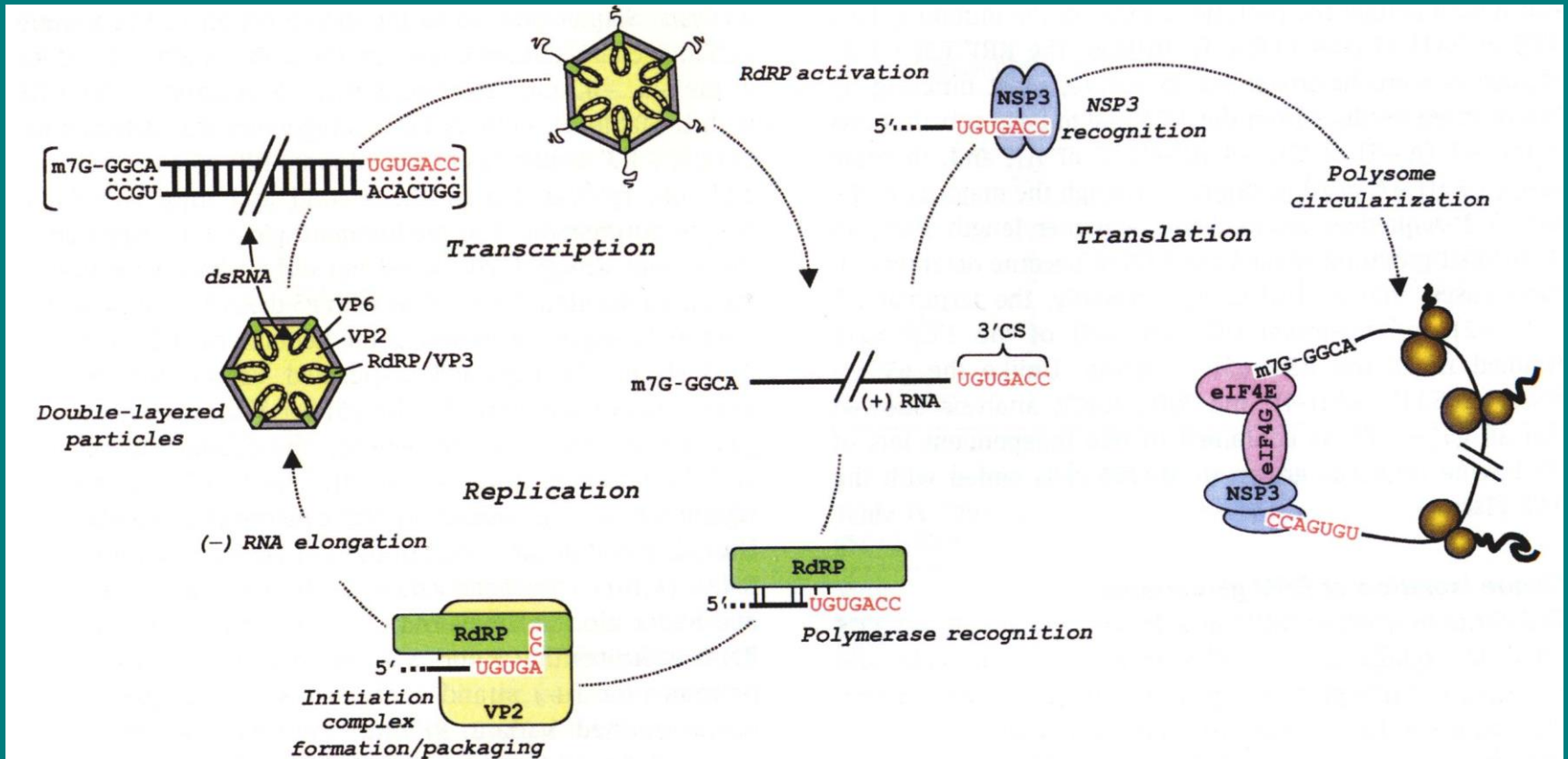
ロタウイルス粒子内におけるRNA分節のパッケージ



転写におけるmRNAの粒子からの放出



ロタウイルスの増殖サイクル



ロタウイルスの多様性のメカニズム

1. 点変異の蓄積
2. リアソートメント
(遺伝子の再集合)
3. リアレンジメント
(遺伝子の再編)

二つの独立した血清型特異性

VP7 血清型 (G 血清型、G遺伝子型) Glycoprotein

27 G タイプ

ヒトでは、G1, G2, G3, G4, G9が主要

VP4 血清型 (P 血清型、P遺伝子型) Protease sensitive

14 P 血清型 : **35** P タイプ

ヒトでは、P[8], P[4]が主要

G12ロタウイルスの地球規模での分布拡大

1990	human	strain L26	G12P[4]	the Philippines
⋮				
1998-99	human	strain T152	G12P[9]	Thailand
1999	human	strain Se585	G12P[6]	USA
1999	human	6.7%	G12P[9]	Argentina
2003	human		G12P[9]	Japan
2004	human		G12P[9]	Korea
2006	human	20%	G12P[6], P[8]	Nepal
2006	pig	strain RU172	G12P[7]	India

United Kingdom, Belgium, Brazil, Bangladesh

病原性には複数の遺伝子が関与する

接種ウイルス	各RNA セグメントの由来											プタ 頭数	下痢の 発症	ウイルスの 排泄		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
強毒株 SB-1A (プタ由来)	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	9	+	+	
弱毒株 DS-1 (ヒト由来)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	2	-	-	
60-1	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	±	+	
56-41	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	+	+	
15-22	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	-	-	VP3
14-1	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	-	-	VP4
22-1	◇	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	+	+	
36-1	◇	◇	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	◇	2	+	+	
31-1	◇	◇	◇	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	◇	2	+	+	
18-1	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	◇	2	-	-	VP7
49-27	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	●	◇	◇	◇	2	+	+	
41-27	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	●	◇	2	-	-	NSP4
5-1	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	●	2	+	+	
17-1	●	●	●	◇	●	●	●	●	●	●	●	●	5	-	-	
17-5	●	●	●	◇	●	●	●	●	◇	●	●	●	5	-	-	
17-10	●	●	●	◇	●	●	●	●	◇	◇	●	●	3	-	-	
25-3	●	●	◇	◇	●	●	●	●	◇	●	●	●	2	-	-	
13-1	●	●	◇	◇	●	●	●	●	◇	◇	●	●	3	+	+	VP3, VP4, VP7, NSP4

●: DS-1 株由来 RNA セグメント, ◇: SB-1A 株由来 RNA セグメント. a: SB-1A 株では VP7 遺伝子が RNA セグメント 9 であるが, DS-1 株では RNA セグメント 8 である

ロタウイルスの病原性に関わる遺伝子

VP3 遺伝子:グアリニルトランスフェラーゼ

VP4 遺伝子:外層タンパク質

VP7 遺伝子:外層タンパク質

NSP4 遺伝子:エンテロトキシン

ウイルス粒子の組み立て



複数の遺伝子に関連して、
腸管内でのウイルス増殖の効率性が関与

塩基配列の比較が必要

弱毒生ヒトロタウイルスワクチンは、異なる血清型の
ロタウイルスの感染防御に働くのか？

感染防御抗原の抗原エピトープ

VP7の中和エピトープ

1 64
MYGIEYTTILIFLISIILLNYILKSVTRIMDYIIYRFLITVALFALTRAQNYGLNLPITGSMD
65 128
TVYTNSTQEEVFLTSTLCLYYPTEASTQINDGDWKDSLSQMFLTKGWPTGSVYFKEYSSIVDFS
129 192
VDPQLYCDYNLVLMKYDQSLELDMSELADLILNEWLCNPMDITLYYYQQSGESNKWISMGSSCT
193 256
VKVCPLNTQTLGIGCQTTNVDSFEMVAENEKLAIVDVVDGINHKINLTTTTCTIRNCKKLGPRE
257 320
NVAVIQVGGSNVLDITADPTTNPQTERMMRVNWKKWQVFYTIVDYINQIVQVMSKRSRSLNSA
321 326
AFYYRV

VP4の中和エピトープ

1 64
MASLIYRQLLTNSYSVDLHDEIEQIGSEKTQNVTVNP GPFAQTRYAPVNWGHGEINDSTTVEPI
65 128
LDGPYQPTTFKPLTDYWILINSNTNGVVYESTNNSDFWTAVVAIEPHVIQVDRQYTVFGENKQF
129 192
NVRNDSKWKFLMFRGSSQNEFYNRRTLSDTKLVGILKYGGRIWTFHGETPRATTDSSNTAN
193 256
LNDISIIHSEFYIIPRSQESKCNEYINNGLPPIQNTRNVVPLSLSSRSIQYKRAQVNEDITIS
257 320
KTSLWKEMQCNRDIIIRFKFGNSIVKLGGLGYKWSEISYKAANYQYNYLRDGEQVTAHTTCSVN
321 384
GVNNFSYNGGSLPTDFSVSRYEVIKENSYVYVDYWDDSKAFRNMVYVRS LAANLNSVKCTGGSY
385 448
DFSIPVGAWPVMNGGAVSLHFAGVTLSTQFTDFVSLNSLRFFRFSLTVDEPSFSILRTRTVNLYG
449 512
LPAANPNNGNEYEISGRFSLISLVPTNDDYQTPIMNSVTVRQDLERQLTDLREEFNLSQEIA
513 576
MSQLIDLALLPLDMFSMFSELKSTIDLTSMATSVMKKFRKSKLATSISEMTHSLSDAASSASR
577 640
SVSIRSNISTISNWTNVSNDVSNVTNSLSDISTQTSTISKNLRLKEMITQTEGMSFDDISA AVL
641 704
KTKIDMSTQIGKNTLPDIVTEASEKFIPKRSYRILKODEVMEINTEGKVFAYKIDTLNEVPFDV
705 768
NKFAELVTNSPVISAIIDFKTLKLNLDNYGITRIEALNLIKSNPNVLRNFINQNNPIIRNRIEQ

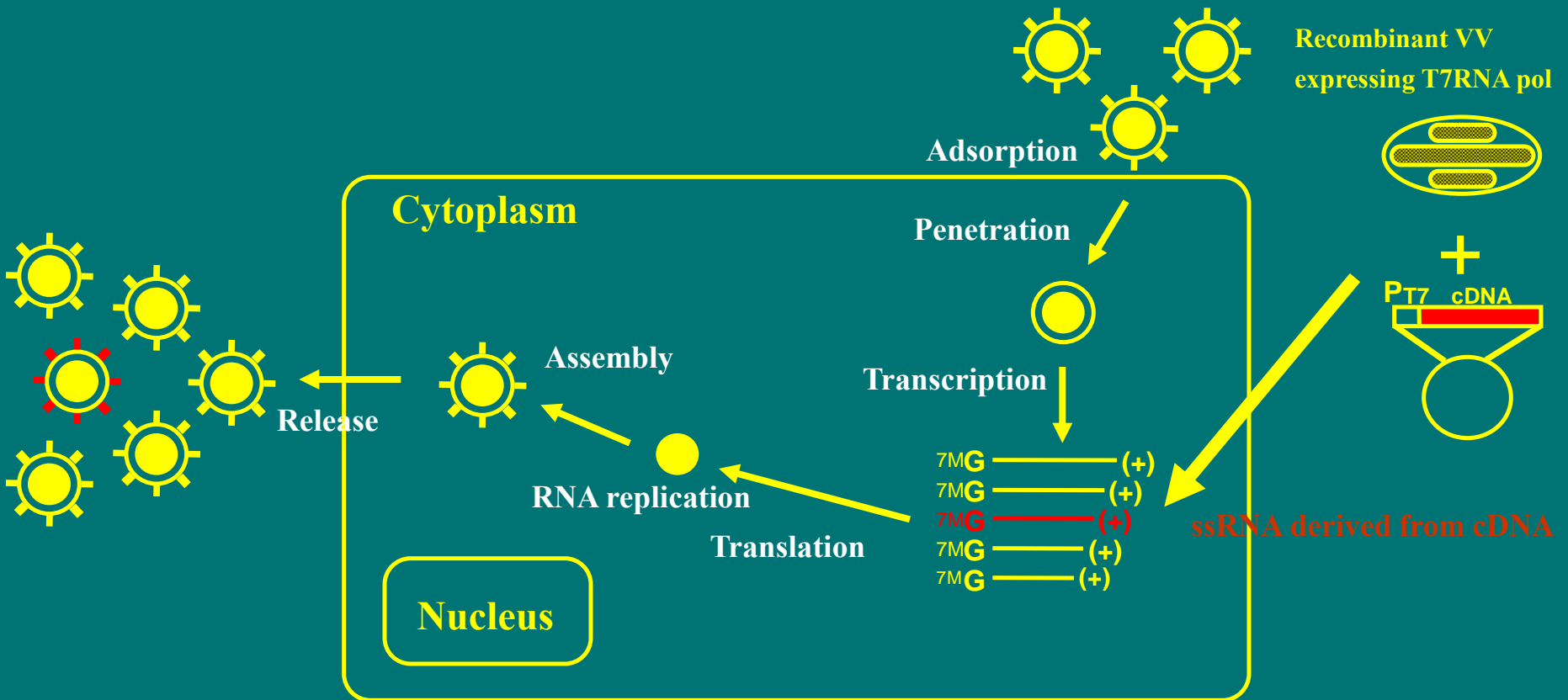
VP7上の交叉反応性中和抗体

	ウイルス株		Y0 - 4C2抗体	
	Gタイプ	宿主	中和反応	ELISA
G1	KU	ヒト	3, 200	1, 322
	S12	ヒト	3, 200	1, 096
	Wa	ヒト	6, 400	1, 324
G2	S2	ヒト	400	140
	AK - 26	ヒト	100	190
	P1	ヒト	400	68
	DS - 1	ヒト	<100	125
	HN - 126	ヒト	<100	127
G3	Y0	ヒト	$\geq 25, 600$	1, 338
	S3	ヒト	$\geq 25, 600$	922
	P2	ヒト	$\geq 25, 600$	1, 000
	AK - 35	ヒト	400	1, 364
	SA - 11	サル	$\geq 25, 600$	1, 357
G4	Hochi	ヒト	$\geq 25, 600$	1, 334
	ST-3	ヒト	6, 400	845
G6	NCDV	ウシ	<100	71

抗VP4抗体の交叉反応性: 中和反応

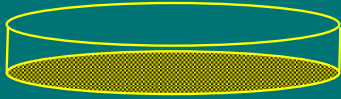
ウイルス株		中和抗体価					
		KU - 4D7	KU - 6B11 (IgG2b)	YO - 1E6	YO - 1S3 (IgG2a)	YO - 2C2 (IgG2a)	ST-1F2 (IgG2a)
G1P [8]	KU	≥25, 600	≥25, 600	6, 400	12, 800	6, 400	12, 800
	K8	<100	400	<100	<100	<100	<100
	S12	12, 800	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	3, 200	<100
	Wa	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	6, 400	≥25, 600
G2P [4]	S2	≥25, 600	400	100	<100	400	<100
	AK-26	≥25, 600	1, 600	100	<100	1, 600	400
	P1	12, 800	<100	100	<100	<100	<100
	DS-1	≥25, 600	400	400	<100	<100	<100
	HN-126	≥25, 600	400	100	<100	3, 200	<100
G3P [8]	YO	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	1, 600
	S3	6, 400	≥25, 600	3, 200	≥25, 600	≥25, 600	1, 600
	P2	12, 800	≥25, 600	6, 400	≥25, 600	6, 400	6, 400
	AK-35	12, 800	12, 800	6, 400	6, 400	6, 400	3, 200
G4P [8]	Hochi	≥25, 600	12, 800	≥25, 600	6, 400	6, 400	≥25, 600
	ST-3	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	≥25, 600	3, 200	≥25, 600
G3P [2]	SA11 (サル)	<100	≥25, 600	<100	<100	<100	<100
G6P [1]	NCDV (ウシ)	<100	≥25, 600	<100	<100	<100	<100

ロタウイルスの複製サイクル (cDNA由来dsRNAの導入)

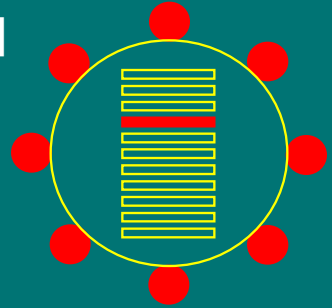


VP4遺伝子組換えロタウイルスの単離

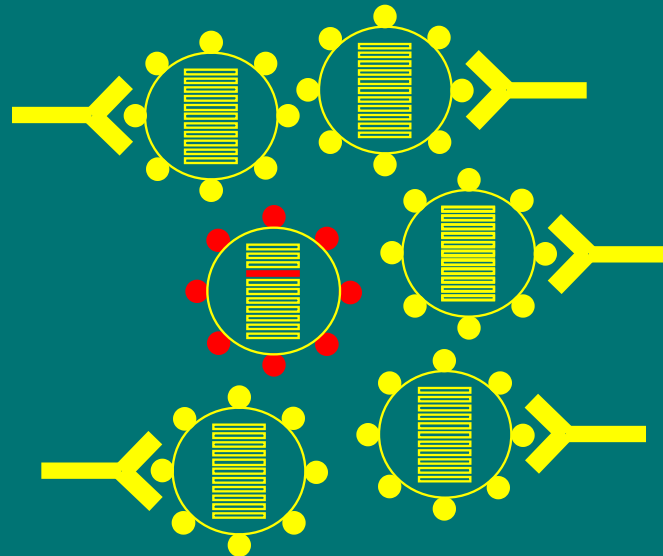
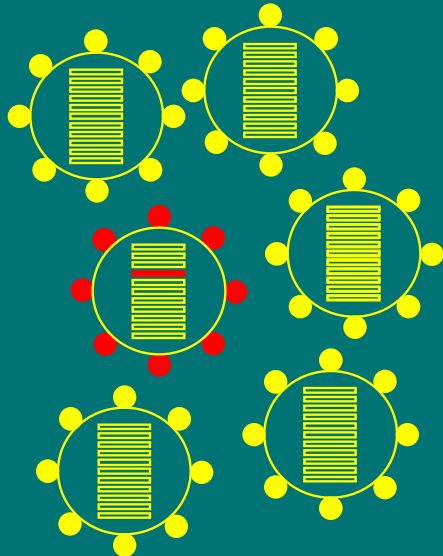
Transfected and infected COS-7 cells



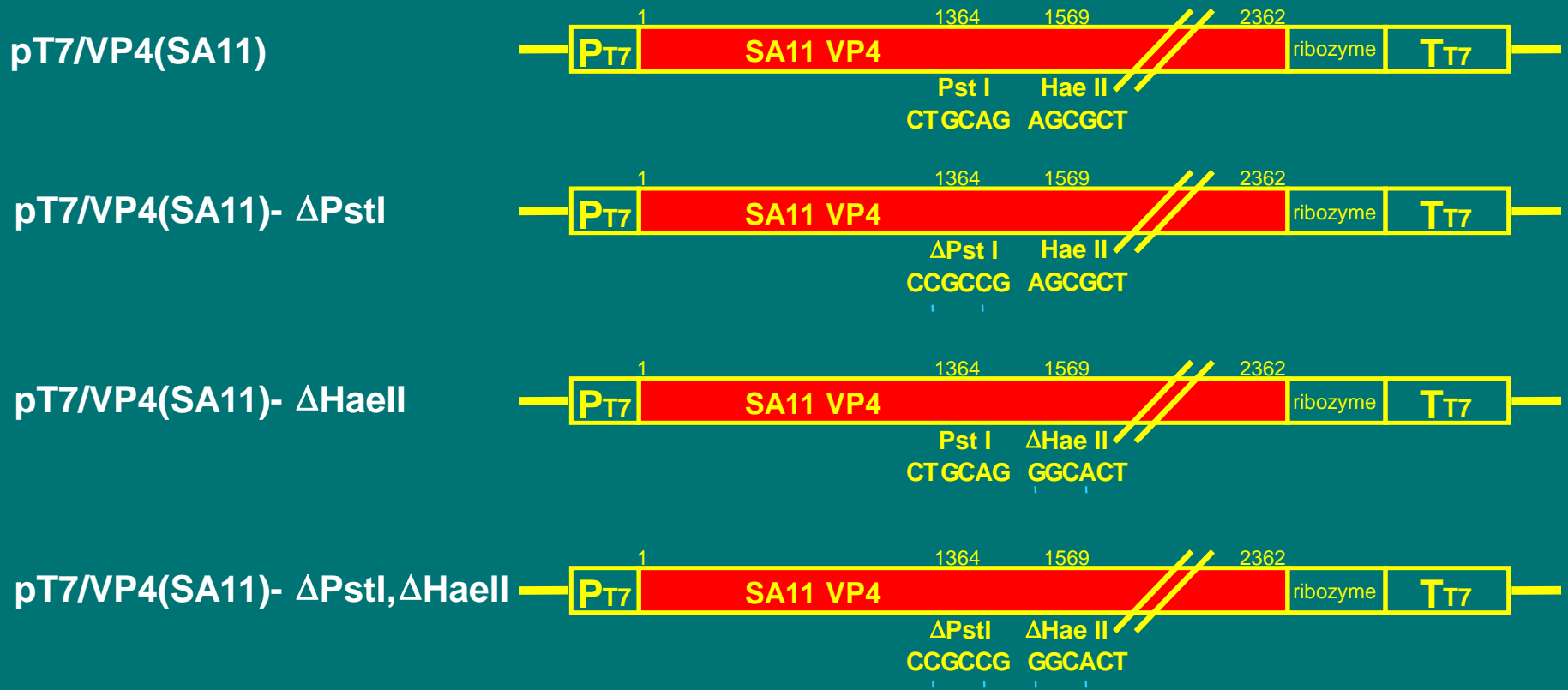
cDNA由来のVP4遺伝子分節を
保有する組換え RV
[KU//rVP4(SA11)]



ヒト RV VP4特異的中和抗体

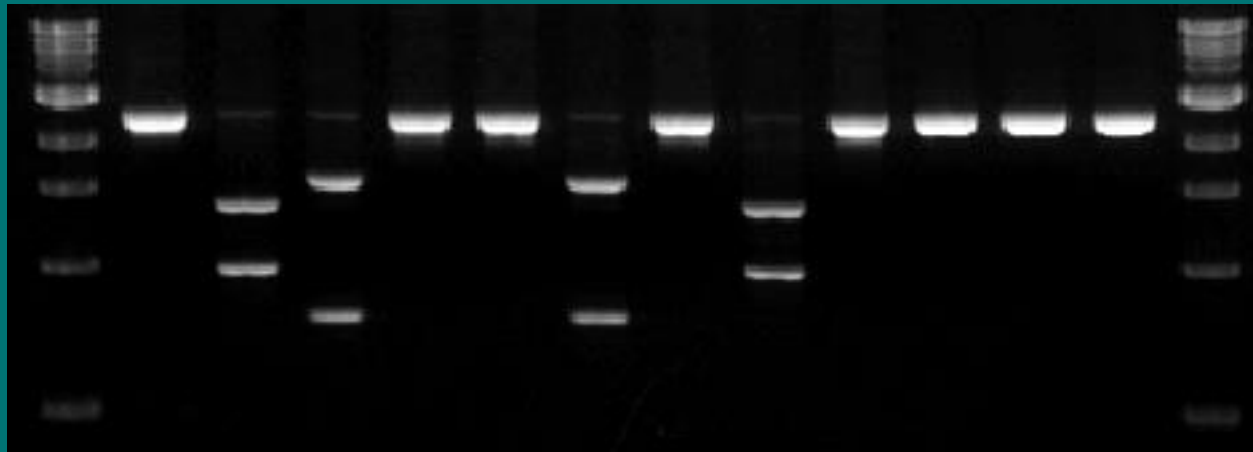


SA11 VP4 ssRNAの転写ベクターの構築



変異導入ウイルス遺伝子の制限酵素反応性の変化

	WT			$\Delta PstI$			$\Delta HaeII$			$\Delta PstI, \Delta HaeII$			VP4 gene recombinant rotavirus [KU//rVP4(SA11)]
Pst I	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
Hae II	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	

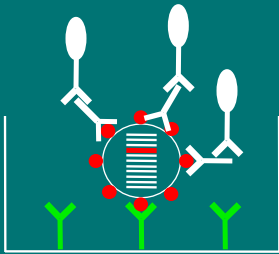


- 2,386 bp
- 1,597 bp
- 1,392 bp
- 994 bp
- 789 bp

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

回収ウイルスと抗VP4および抗VP7中和モノクロン抗体との反応

antigen capture ELISA



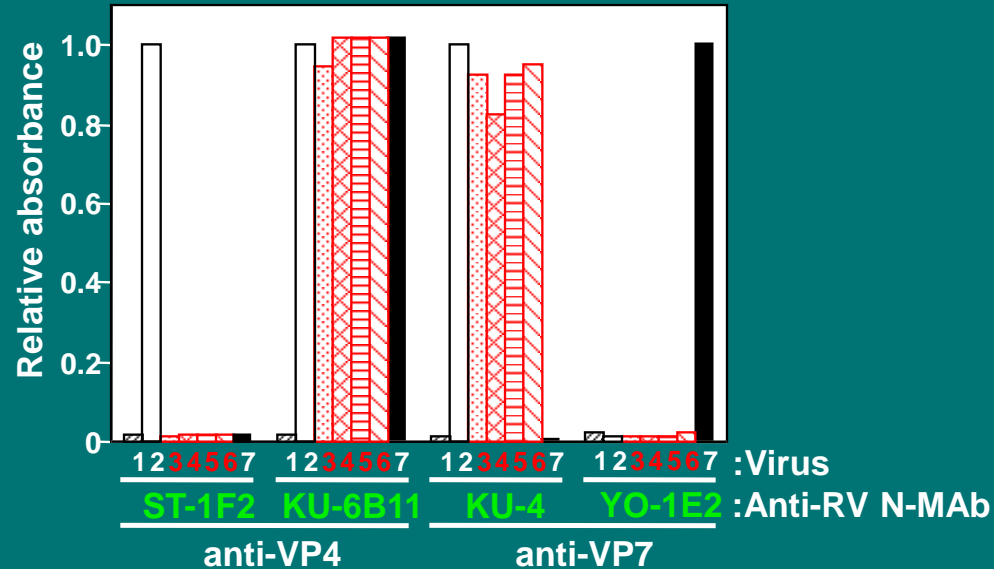
anti-VP4

anti-VP7

ST-1F2 KU-6B11

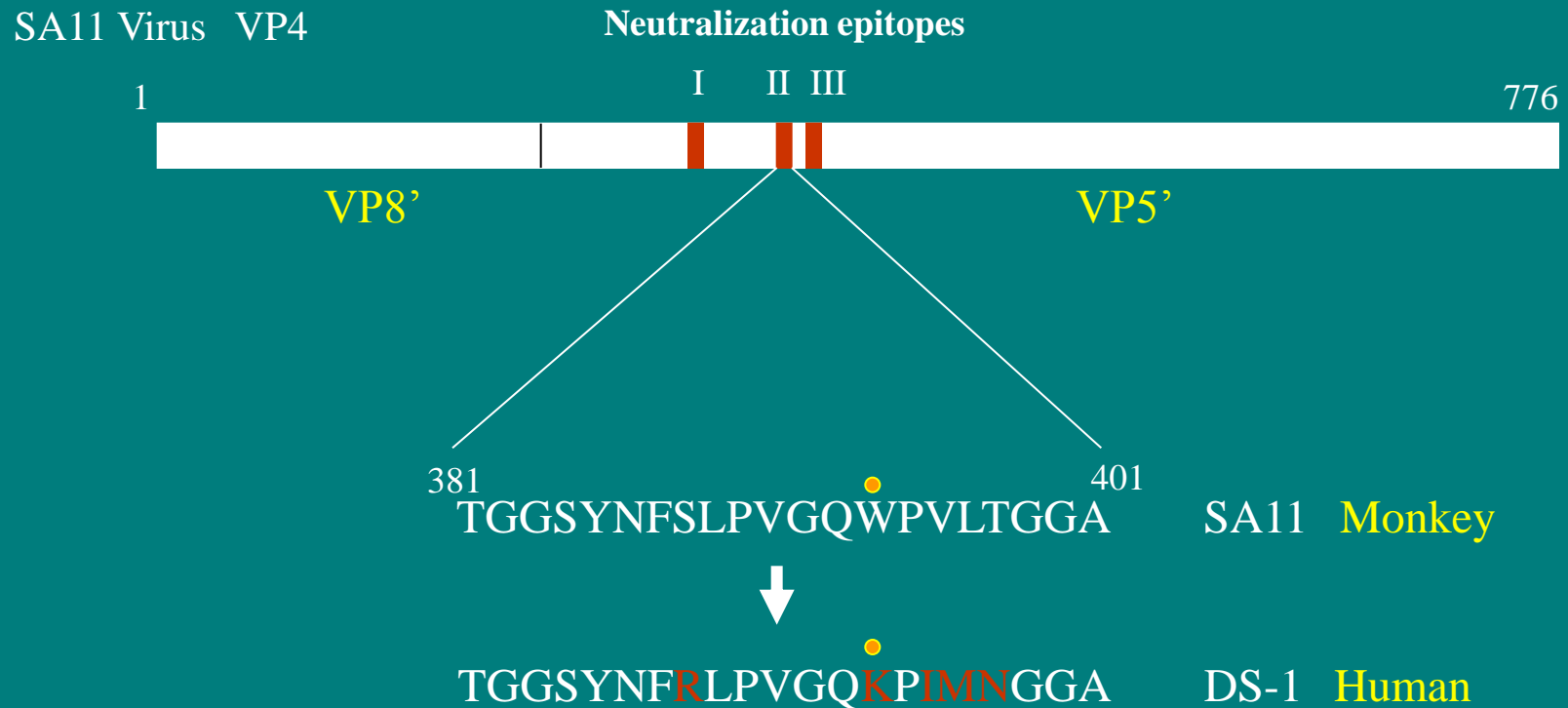
KU-4 YO-1E2

	anti-VP4		anti-VP7	
	ST-1F2	KU-6B11	KU-4	YO-1E2
KU	+	+	+	-
SA11	-	+	-	+



Rescued viruses are the KU-based transfectant viruses carrying the SA11 VP4 proteins expressed from the cDNA-derived VP4 genome

抗原モザイクのVP4を有するロタウイルスの作成



1147 1209

ACT GGA GGC AGC TAT AAT TTT AGT CTA CCA GTT GGA CAA TGG CCT GTT TTA ACT GGG GGA GCA SA11

--A --T --G --T --- --- ---A TG --C --A --TA-- ---A--AG--A-- --T --T --T DS-1

KU-SA11-4(II-DS-1)の抗原性

中和反応

ELISA

	中和反応				ELISA			
	KU	SA11	S2	KU-SA4(II-DS-1)	KU	SA11	S2	KU-SA4(II-DS-1)
S2-2F2	-	-	+++	++	-	-	+++	+++
KU-6B11	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-
YO-1E6	+++	+	-	-	+++	+	-	-
YO-2C2	+++	-	-	-	+++	-	+++	-

S2-2F2, KU-6B11, YO-1E6: epitope II

YO-2C2: epitope I