

4. ヒトノロウイルスの生存戦略

佐藤 裕徳

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第二室

ヒトノロウイルスは、エンベロープを持たない易変異性 RNA ウイルスの一つで、非細菌性急性胃腸炎の主因となる。ウイルスが効率よく増殖する実験系は、まだ無い。近年、このウイルスのゲノミクスとバイオインフォマティクス研究が進み、自然界での分子進化の様式が徐々に明らかになりつつある。また、感染実験が可能な近縁のノロウイルスの研究が進み、構造生物学情報が急速に蓄積している。さらに、公衆衛生や水環境の研究が進み、ノロウイルスの生態学も進展している。本稿では、まず、ノロウイルスとその分子の基本的な特徴を要約する。次いで、近年、世界各地でノロウイルスによる胃腸炎の主因となっている GII/4 亜株の分子の構造と進化の情報を整理する。最後に、これらの知見を併せて、ヒトノロウイルスの生存戦略を議論する。

はじめに

ヒトノロウイルスは、1972年にその形態が免疫電子顕微鏡下で観察され⁵⁰⁾、ボランティアの暴露研究等で急性胃腸炎の病原であることが証明された³⁵⁾。毎年、特定の季節に世界各地で流行し、大きな社会被害をもたらす^{25, 33, 44, 58)}。米国では、推定～2,300万人/年がノロウイルスに感染し、～5万人が入院する⁶⁵⁾。感染すると激しい下痢や嘔吐が数日続き、この間、社会活動が困難になる^{25, 33, 44, 58)}。汚染食材の飲食等で感染が短期間に拡大し、高齢者施設、ホテル、医療施設、学校、食品産業などに深刻な被害をもたらす^{25, 33, 44, 58)}。最近では、2006-2007年に世界各地で流行が拡大し、我が国でも過去最大規模のノロウイルス感染事例が報告された^{120, 121)}。

ウイルスは、宿主環境の違いに応じて固有の生存戦略を進化させている。近年、感染者由来のノロウイルスの全ゲノムやカプシド遺伝子全長の塩基配列情報の解析が進み、一部のヒトノロウイルスの分子進化の実態が明らかになっ

てきた^{11, 69, 70, 100)}。また、感染実験が可能なマウスノロウイルス等を用いて、進化的に近縁のウイルスの生物学情報が急速に蓄積している¹¹⁶⁾。さらには、公衆衛生や水環境の専門家等が研究に加わることで、ヒトノロウイルスの自然や生活環境での分布の情報も急速に蓄積している^{25, 33, 44, 58)}。これら最新の知見と既知の知見を基に、ノロウイルスの生存戦略の一端を推察できるようになってきた。

1. ヒトノロウイルスの特徴

ウイルスの形、性質、分布等の情報は、ウイルスの自然生態系での生存戦略を知るための重要な手がかりを与える。

(1) ウイルス粒子の形態と進化系統分類

ヒトノロウイルスのウイルス粒子は、電子顕微鏡下で表面にコップ状のくぼみのある直径30nm前後の球形粒子として観察される⁵⁰⁾。「杯」を意味する *calix* に由来するカリシウイルス科 (*Caliciviridae*) に分類される¹⁰¹⁾。カリシウイルスには、他にサボウイルス、ラゴウイルス、ベシウイルスがある¹⁰¹⁾。最近、ウシの腸管系ウイルスのゲノム解析が進み⁸¹⁾、第5のウイルス属としてネボウイルスと命名されて国際ウイルス分類委員会 (ICTV) に承認された¹⁰¹⁾。

ノロウイルスは、カプシド遺伝子配列の類似性をもとに、Group I～V (GI～GV) の5つのグループに分類される¹¹⁹⁾。このうち、GI, GII, GIV がヒト感染の主流となる^{36, 44, 49, 53)}。GIII はウシ⁸²⁾、GV はマウス¹¹⁶⁾ に分布する。

連絡先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園4-7-1

TEL: 042-561-0771 (内線 3370)

FAX: 042-567-5632

E-mail: hirosato@nih.go.jp

(2) ヒトノロウイルス粒子の物性と生物活性

ヒトノロウイルスは、エンベロープを持たない⁵⁰⁾。水中のヒトノロウイルスは、他のエンテロウイルスに比べて塩素抵抗性が高い⁵⁶⁾。10 mg/liter の塩素含有溶液中でも、ヒトへの感染性を維持しうる⁵⁶⁾。ヒトがノロウイルスを摂取すると、しばしば激しい下痢、腹痛、嘔吐を伴う急性胃腸炎が発生する³⁵⁾。症状は一過性で、2-3日後には、症状は緩解する³⁵⁾。感染は、一般には、致死的ではない³⁵⁾。ウイルス摂取後15時間には、糞便中にウイルス抗原が検出され、その量は25-72時間でピークに達する³⁴⁾。感染者の糞便には、 $\sim 10^9$ コピー/gものノロウイルスRNAが検出される⁸³⁾。

(3) 無症候性感染者

ヒトノロウイルスの摂取後1週間の時点でも、感染者は、糞便中にウイルス抗原を排出する³⁴⁾。多くの人々が、無症候のまま、ウイルスを体外に排出していることを示す証拠が蓄積している^{29, 30, 68, 83)}。無症候性感染者のウイルス排出量は、急性感染期の患者の排出量に匹敵する⁸³⁾。英国での推計では、無症候性感染者は、人口の10%以上に達する⁸⁹⁾。

(4) 宿主域

他の動物のノロウイルスは、ヒトでは検出されない⁵⁾。一方で、農場のブタやウシの糞便中にヒトノロウイルスの遺伝子断片が検出される^{5, 113)}。日本でも、農場のブタの糞便中に検出されるが、ブタで増殖したウイルスに由来する証拠は無い⁷³⁾。実験的には、ヒトノロウイルス (GII/4^{25, 33, 44, 58)}) はブタやウシに感染する^{20, 21, 103, 104)}。家畜で新たな病原性ヒトノロウイルスが発生する可能性は否定できないが、今の所、その報告は無い。

(5) 自然・生活環境での分布

ヒトノロウイルスの遺伝子は、河川等の自然環境中や様々な生活環境中にも検出される^{25, 44)}。日本でも、河川、下水、下水処理施設の水、下水処理水等の水環境^{57, 72, 96, 112)}、二枚貝等の水中生物^{77, 86, 95, 111, 112)}、生食用食材等^{37, 76, 77)}で様々なノロウイルス遺伝子型が検出される。下水のノロウイルスの検出率は、秋冬季の流行期に増加する³⁸⁾。無症状キャリアの排出するウイルスの感染性は不明である。また、今の所、ヒトノロウイルスが二枚貝等の水中生物で増殖する明確な証拠は無い。一般には、水環境や水中生物で見つかるウイルス遺伝子は、ヒトが排出し、河川に流入したウイルスに由来すると考えられている。

(6) 流行の季節性と周期性

ヒトノロウイルスによる急性胃腸炎の流行の規模は、特定の季節に増大する^{58, 120, 121)}。ウイルス粒子の感染性、病原性、伝搬性等に影響する生物学的、環境学的、行動学

的要因の季節変動が想定されているが、正確な理由はわかっていない⁹²⁾。ヒトノロウイルス感染症は、また、周期的に大流行する¹⁰⁰⁾。1990年代後半以降、少なくとも4回(1995/96, 2002/03, 2004/05, および2006/07シーズン)の大流行が発生した¹⁰⁰⁾。周期性が生じる要因の一つに、インフルエンザウイルス同様の「抗原連続変異 (antigenic drift, 抗原ドリフト)」の機構が提唱されている^{69, 70, 100)}。また、抗原変異を駆動する選択圧として、ヒト社会におけるノロウイルスへの「集団免疫 (Herd immunity)」が提唱されている^{13, 62)}。

(7) 流行株の遺伝子型

ヒトノロウイルス GI と GII は遺伝的多様性に富み、ヒト由来試料からは、進化系統の異なる様々なウイルスが検出される^{36, 49, 53)}。その中で、Group II/Genotype4 (GII/4) は、近年、世界各地で発生する非細菌性急性胃腸炎の主因となっている^{25, 33, 44, 58)}。日本でも、2000年初頭以降は、GII/4が主流となっている^{80, 83, 85, 121)}。GII/4は、公衆衛生の観点から特に重要なウイルスと認識され、現在、重点的に解析されている^{25, 33, 44, 58)}。

2. ノロウイルス分子の構造と機能

ウイルス分子の構造と機能の情報は、ゲノムに生じた突然変異の影響や進化の方向性を理解する基盤となる。

(1) ゲノム

ノロウイルスのゲノムは、3'末端にポリ A 配列が付加した一本鎖プラス鎖 RNA (約 7.5kb) で、3種の open reading frame (ORF1, ORF2, ORF3) をコードする¹¹⁷⁾ (図 1A)。ゲノムは mRNA として機能する。ORF1 からは $\sim 1,700$ アミノ酸長のポリペプチド (約 200kD) が合成され、ウイルスのプロテアーゼ (3C^{pro}) によって切断されてウイルスの複製に関与する 6~7種類の蛋白質ができる⁸⁾ (図 1A)。ORF2 からは、カプシドタンパク質 VP1 (約 57kD) が作られる⁴⁸⁾。ORF3 からは、マイナーな構造タンパク質 VP2 (約 22kD) が作られる³¹⁾。

ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端の非翻訳領域は、4塩基しかない。ヒトノロウイルスを含むカリシウイルスでは、ORF2のすぐ上流にゲノム 5'末端と同じ繰り返し配列が存在する (図 1A)。ネコカリシウイルス¹⁵⁾が感染した細胞では、この繰り返し配列を 5'末端とし、ORF2 と ORF3 のみをコードするサブゲノムが発現する⁴¹⁾ (図 1A)。ネコカリシウイルスのサブゲノムにはウイルスの VPg タンパク質が結合し、キャップ構造に非依存的な機構で、カプシド VP1 の翻訳が進む⁴²⁾。サブゲノムの発現は、マウスノロウイルスの感染細胞¹¹⁵⁾やヒトノロウイルスゲノムの発現細胞^{1, 52)}でも示唆されており、一般には、カリシウイルスに共通する特徴でカプシドの発現量の調節に重要な役割を

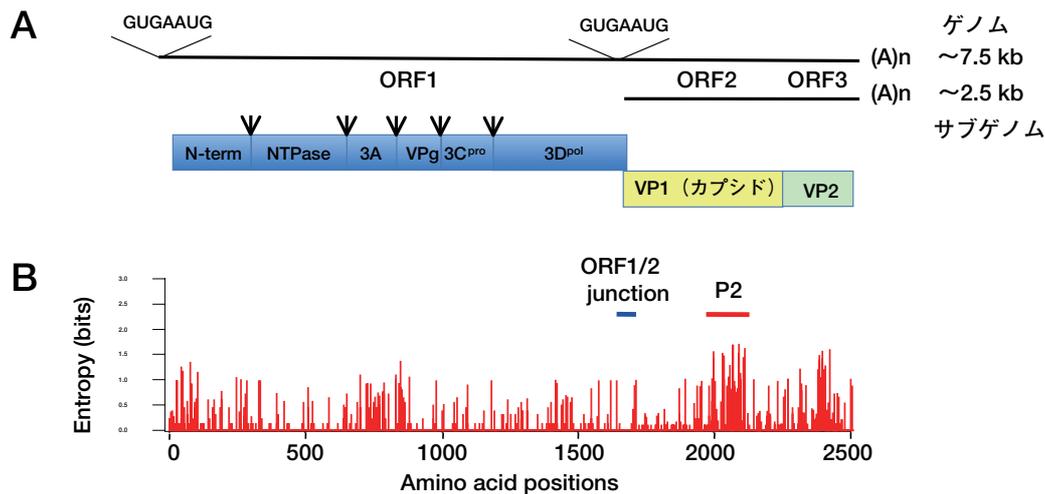


図1 ノロウイルスのゲノムとタンパク質

- A. ゲノムの一次構造と翻訳産物の種類 ノロウイルスのゲノムは、3'末端にポリ A 配列が付加した一本鎖プラス鎖 RNA (約 7.5-7.7kb) で、3 種の ORF をコードする¹¹⁷⁾。ゲノムは mRNA として機能する。ORF1 から合成されたポリペプチド (約 200kD) は、3C^{pro} によって切断されて 6 種類の成熟蛋白質ができる⁸⁾。ORF2 からは、カプシドタンパク質 VP1 (約 57kD)⁴⁸⁾、ORF3 からは、VP2 (約 22kD) が作られる³¹⁾。ORF1 翻訳産物の切断箇所を矢印で示してある。マウスノロウイルスの感染細胞¹¹⁵⁾ やヒトノロウイルスゲノムの発現細胞^{1, 52)} では、ORF2 のすぐ上流の繰り返し配列を末端とするサブゲノムが生成される¹¹⁶⁾。
- B. タンパク質の多様性の分布⁶⁹⁾ 2006/2007 年に全国各地から収集したヒトノロウイルス GII/4 亜株のゲノム情報を基に、全タンパク質のアミノ酸の可変性を調べた⁶⁹⁾。シャノンの情報エントロピー⁹⁷⁾ (縦軸) の最小値 (0) は、該当する場所で GII/4 亜株のアミノ酸が完全に保存されていることを示す。多様性が高いほどエントロピーの数値は高くなる。

すると考えられている¹¹⁶⁾。ゲノムの 3'末端にも、VP2 依存的にカプシドの産生を調節するための責任配列が存在する⁹⁾。

動植物の一本鎖 RNA ウイルスのゲノムには、ウイルスに固有の二次構造が保存されている²³⁾。マウスノロウイルスゲノムの 3'末端の非翻訳領域にも、進化的に保存される複数のステムループ構造が 2 つある²⁾。その一つは、ポリピリミジントラクト (p(Y)) を含む。p(Y) の長さは、ウイルス株間で異なり、細胞タンパク質 (PTB と PCBP) への親和性をもつ²⁾。この領域が欠損しても、ウイルスの増殖能は変わらない。しかし、他のウイルスと競合して増殖するときの適応度の低下とマウスでの病原性の低下に結びつく²⁾。

(2) 複製関連タンパク質

ORF1 由来の 6 種のタンパク質は、近縁ウイルスの情報を基に、ウイルスの複製過程で働く と推察されている^{39, 116)}。3C^{pro} とポリメラーゼ (3D^{pol}) については、抗ウイルス薬開発の観点から、生化学的研究が進んでいる。ヒトノロウイルス 3C^{pro} の高解像度 (1.5-2.8 Å) の X 線結晶構造が判明している^{74, 118)}。カリシウイルスの 3C^{pro} の基質選択機構や多様性に関する情報も蓄積している^{78, 79, 102)}。3D^{pol}

については、近縁のサポウイルス⁹¹⁾ のポリメラーゼ構造が判明している²⁸⁾。ヒトで流行するヒトノロウイルスの 3C^{pro} と 3D^{pol} は、ウイルスの他の分子に比べてアミノ酸が保存される傾向にある⁶⁹⁾ (図 1B)。今後、酵素活性の簡便迅速測定系ができれば、構造や多様性の情報を取り入れて、増殖阻害剤候補を絞り込むことも可能となろう。

(3) 構造タンパク質

ORF2 由来の VP1 単独の発現により、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作製が可能である^{6, 48)}。低温凍結電子顕微鏡解析と X 線結晶構造解析により、VLP の外形 (解像度約 22 Å) と構成単位 (解像度約 3.4 Å) の立体構造が判明している⁹⁰⁾。VLP では、180 分子の VP1 タンパク質が 90 対の二量体をつくり、それらが正二十面体対称構造をとるように集合している⁹⁰⁾。

VP1 は、shell 領域 (S ドメイン) と突出領域 (P ドメイン) から成る⁹⁰⁾ (図 2A)。S ドメインは、VP1 のアッセンブリーを司る¹⁰⁾。P ドメインは、更に P1 と P2 サブドメインに分かれる (図 2B)。P1 サブドメインは、S ドメインと相互作用し、カプシドの物理的安定性を増強する¹⁰⁾。P2 サブドメインは、ウイルス粒子の最外郭に位置し⁹⁰⁾、マウスノロウイルスでは中和抗体の標的となる¹⁰⁹⁾。また、P2

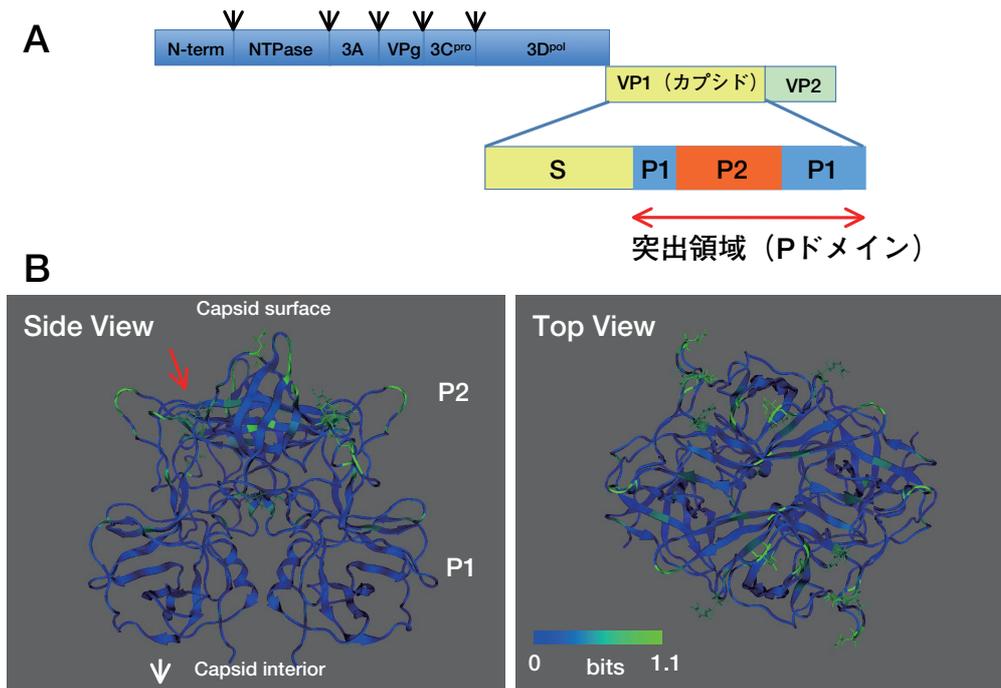


図2 ノロウイルスのカプシドの構造と多様性

A. ORF2 (VP1) の一次構造

B. GII/4 2006b 亜株の VP1 P ドメイン二量体の分子モデルと可変部位⁶⁹⁾ カプシド VP1 タンパク質は、S ドメインと P ドメインから成る⁹⁰⁾。S ドメインは、VP1 のアッセムブリを司る¹⁰⁾。P ドメインは、P1 と P2 サブドメインに分かれる。P1 サブドメインは、S ドメインと相互作用し、カプシドの物理的安定性を増強する¹⁰⁾。P2 サブドメインは、ウイルス粒子の最外郭に位置し⁹⁰⁾、マウスノロウイルスでは中和抗体の標的となる¹⁰⁹⁾。分子モデルは、1995-1996 年に流行した GII/4 株の P ドメインの X 線結晶構造 (PDB code:2OBS¹⁴⁾) を鋳型として、Molecular Operating Environment (MOE; Chemical Computing Group, Inc., Canada) の解析ツールを用いてホモロジーモデリング法³⁾ により構築した。図 1B で求めたシャノンの情報エントロピー⁹⁷⁾ の数値を構造上に表示した。青色は 2006/2007 年に流行した GII/4 亜株 2006b で保存度が高いアミノ酸、黄緑色は、多様性の高いアミノ酸を示す⁶⁹⁾。赤色の矢印は、ウイルスの感染受容体候補分子 (血液型抗原)^{45, 46, 60)} への結合溝^{12, 14, 22, 43, 108)} を示す。

サブドメインは、感染受容体の候補分子の結合溝を形成する^{12, 14, 22, 43, 108)}。

VLP は、構造解析以外にも、抗原性解析⁴⁰⁾、感染受容体候補の探索^{46, 106, 107, 114)}、感染受容体指向性の解析^{20, 43, 99)}、血清疫学研究¹³⁾、免疫学研究²⁴⁾、迅速診断法^{98, 105)}、ワクチン開発研究⁶³⁾ など、基礎と応用の幅広い研究に応用されている。

マウスノロウイルスの感染性粒子の低温凍結電子顕微鏡像と種々のカリシウイルスの VLP 構造の比較から、マウスノロウイルスの感染性粒子の構造特性が明らかにされている^{54, 55)}。VLP と感染性粒子では、P ドメインの立体配置が異なる^{54, 55)}。マウスノロウイルス型の P ドメインの立体配置は、ウサギ出血病ウイルス⁶⁷⁾ の VLP でも保存されている⁵³⁾。ヒトノロウイルスの感染性粒子の P ドメインの立体配置は、今の所、不明である。VLP の応用と結果の解釈には、VLP と感染性粒子の P ドメインの立体配置の相違

の可能性に留意する必要があるかもしれない。

VP2 は、ウイルス粒子のマイナーな構成成分とされる³¹⁾。VP2 が発現することで、VP1 カプシドの発現と安定性が増強する⁹⁾。VP1 との相互作用に関わる領域が特定されている³²⁾。感染性粒子の内部構造は明らかにされておらず、VP2 の機能についての結論は出ていない。

3. 免疫

宿主の免疫は、ウイルスの適応進化を促す駆動力の一つとなる。

(1) インターフェロン (IFN)

宿主の自然免疫は、マウスのノロウイルスの増殖制御に有効と推測されている^{18, 19, 51, 71)}。STAT1 依存的 IFN 応答は、マウスノロウイルスの感染と病態進行を抑制する^{51, 71)}。IFN により誘導される細胞環境は、このウイルスのタンパ

ク質の翻訳を阻止する¹⁹⁾。ヒトノロウイルスへの IFN の有効性を示唆する報告もある¹⁸⁾。感染後の急速なウイルス量の低下と症状緩解には、自然免疫が関与するかもしれない。無症候性感染者^{29, 30, 68, 83)}のウイルスの INF 感受性は不明である。

(2) 獲得免疫

抗体は、マウスノロウイルス感染の阻止に有効である¹⁷⁾。B 細胞機能欠損マウスは、マウスノロウイルスの腸管や全身感染を有効に阻止できない¹⁷⁾。マウスノロウイルスに対するポリクローナル抗体の受動免疫で、マウスでの増殖は阻害される¹⁷⁾。T 細胞の機能もまた、マウスノロウイルスの増殖制御に必要である¹⁶⁾。ヒトノロウイルスでは、効率的な感染・増殖の実験系が無いため、抗体の中和能を定量的に評価できない。ボランティアに VLP や感染性粒子を接種した場合は、感染受容体候補分子(血液型抗原)^{45, 46, 60)}への結合を阻害する抗体ができる^{83, 84, 69)}。接種株に特異的抗体と交差活性をもつ抗体が産生される^{4, 59, 61)}。無症候性キャリア^{29, 30, 68, 83)}のウイルスの抗体感受性は不明である。

(3) 集団レベルの免疫

ある時期にヒト集団から回収された血清は、同時期に流行した株由来 VLP の感染受容体候補分子への結合を阻害する傾向があった^{13, 62)}。これらの血清は、その後に流行した株由来の VLP の結合を阻害する活性は低い傾向にあった^{13, 62)}。

4. GII/4 亜株のゲノム進化の実態

近年、感染者由来の GII/4 のゲノム情報の蓄積が急速に進んでいる。ゲノム解析は、自然界でのヒトノロウイルスの分子進化の実態を把握し、進化の方向性を理解するための手がかりを提供する。

(1) 突然変異の蓄積速度

ノロウイルスのゲノムは、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (3D^{pol}) により合成される^{7, 27, 28, 94)}。3D^{pol}には、複製時のエラーを校正する活性は報告されていない。ゲノム複製時のエラー導入効率は、他の RNA ウイルス (~10⁻⁴塩基置換/塩基)¹²²⁾と同様に高いと推察される。

最近、1970 代の流行に関与した GII/4 と現在流行する GII/4 のカプシドの塩基配列情報を基に、カプシド遺伝子の 1 年あたりの塩基置換率(塩基置換速度)が 4.3x10⁻³塩基置換/塩基/年と推測された¹¹⁾。この値は、高変異性レトロウイルスとして知られるヒト免疫不全ウイルス (HIV) のエンベロプタンパク質 (1 ~ 9x10⁻³) やカプシドタンパク質 (1x10⁻⁴) の塩基置換速度に匹敵する¹²²⁾。また、主に宿主の DNA ポリメラーゼを用いてゲノムが複製されるヒト T リンパ球向性ウイルス (HTLV) の遺伝子の約 ~ 1 万倍、あるいは哺乳動物遺伝子の ~ 100 万倍の塩基置換速

度に相当する¹²²⁾。

(2) ゲノム組換え

ゲノム組換えは、ウイルスの迅速な形質変化に重要な役割を果たす⁸⁴⁾。ノロウイルスでも、ORF1 と ORF2 の境界領域でゲノムの組換えが起きていることが示唆されている⁴⁷⁾。日本でも同様の報告が相次ぎ、流行発生との関連が疑われている^{26, 53, 70, 85, 87, 88, 110)}。カプシド遺伝子の内部での組換えも報告されている⁹³⁾。遺伝的にごく近いノロウイルス間での報告が圧倒的多数だが、離れた系統のノロウイルス間での報告もある⁷⁵⁾。

(3) GII/4 のゲノム進化の実態

2006 年以降、国立感染症研究所と衛生研究所が協同して、全国各地の感染者糞便試料由来の GII/4 の全ゲノム情報を収集している。現在までに、公共データベースに登録されている情報の ~ 80 % に相当する 199 のゲノム配列を収集した。これらの解析により、以下の知見が得られている。

2006/2007 秋冬の急性胃腸炎事例の急増^{120, 121)}と並行して、従来の GII/4 亜株とは進化的に別系統の新型 GII/4 亜株 (subtype) が、全国的に広がった⁶⁹⁾。この亜株は、進化系統上は、同年に欧米で大流行した GII/4 亜株 (2006b) と同一起源であった。2006b は、1 年間足らずの内に、世界各地で、従来の GII/4 亜株を駆逐して、感染を広げたことになる^{69, 100)}。2009/2010 年に流行した新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm の流行と同様に、「主要流行株の世界的な置換現象」が発生した。

2006b 亜株の 8 種の蛋白質には、過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が 27 箇所生じていた⁶⁹⁾。2006b は、流行が全国に広がる過程でこれら 27 カ所の変異を保ちつつ、別の様々な部位を変化させていた⁶⁹⁾ (図 1B)。カプシド蛋白質は 7 つの 2006b 特有の変異が生じており、全て最外郭 P2 サブドメイン領域に発生していた。変異の一つは、マウスノロウイルスで中和抗体逃避能を付与した変異⁶⁴⁾が発生する領域に位置していた。同じ変異は、欧米で検出された 2006b のカプシドにも認められた¹⁰⁰⁾。2006b は、これら 7 カ所のカプシド P2 変異を保ちつつ、P2 ドメインの外環境に露出する突端領域の様々なアミノ酸を変化させていた⁶⁹⁾ (図 2B, ライトグリーン)。一方で、感染受容体候補分子の結合部位周辺のアミノ酸は、保存されていた (図 2B, 矢印)。同時期に発生し、局地的な流行に留まったもう一つの新規 GII/4 亜株 2006a では、P2 領域の従来株に無いアミノ酸置換は 2 箇所のみ認められた⁶⁹⁾。

2006-2009 の 3 年間に、2006b 以外に少なくとも 6 種の GII/4 の単系統亜株 (2004/05, 2006a, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b と命名) が急性胃腸炎の集団発生に関わった⁷⁰⁾。しかし、これら 6 種のいずれも局地的かつ一過性の流行に留まった⁷⁰⁾。この間は、2006b が優勢な GII/4 亜株 80% 以上

を占めていた⁷⁰⁾。興味深いことに、2006b への GII/4 亜株の置換現象がおきた 2006/2007 秋冬期をピークとして、国内のノロウイルスによる急性胃腸炎症例の報告数は年々減少している¹²¹⁾。

2006-2009 の間に流行した 7 種の GII/4 単系統亜株のカプシドは、全て、P2 ドメインに複数のアミノ酸置換のセットをもっていた⁷⁰⁾。変異の数は、全国的規模で流行した 2006b で最も多かった。この変異セットによりカプシド表面の物理化学的性質や抗原性が変化することが推測された⁷⁰⁾。また、7 種の GII/4 単系統亜株のうち、4 種のゲノムは、進化起源の異なる配列が組み合わさって生じたモザイクゲノムだった⁷⁰⁾。ORF1/ORF2 境界の高度保存領域は、4 種の亜株全てに共通するゲノムの組換え点となっていた⁷⁰⁾。

5. ヒトノロウイルスの生存戦略

本稿に整理した知見から、ヒトノロウイルスは、人間社会での感染と増殖に高度に適応する方向に進化を続けていることが示唆される。

ノロウイルスの変異速度 (4.3×10^3 塩基置換/塩基/年¹¹⁾) を見る限り、このウイルスは、HIV と同等の速度¹²²⁾ で変異している。ノロウイルスのゲノム複製時のエラー導入効率は不明だが、他の易変異性 RNA ウイルス ($\sim 10^4$ 塩基置換/塩基/複製)¹²²⁾ と同様に高いと推察される。ゲノム (~ 7.5 kb) をほぼ、1 回複製するごとに 1 カ所の変異が導入されることになる。糞便中に排出されるウイルス RNA の量 ($\sim 10^9$ コピー/g⁸³⁾) とノロウイルスの感染者数 (米国だけでも年間 $\sim 2,300$ 万⁶⁵⁾) から推計すると、少なく見積もっても 1 日に 10^{16} 以上の変異ウイルスが地球上で発生している。

我々が観察できるのは、発生した変異ウイルスの淘汰の結果生き残ったウイルスである。それらの特徴を見る限り、ヒトへの高い感染性、増殖能、腸管指向性、易変異性、並びに低い致死性と無症候性の持続感染能、等の生物学的性質をもつウイルスが生き残り、感染者から持続的に大量の変異ウイルスを体外環境に排出することを可能にしている。さらには、感受性生物の体外環境での安定性が高いウイルスが生き残り、下水や空調設備、向上する交通網等を利用してウイルスの汚染生物、飲食物、物品の分布を広げ、日常生活での経口感染の効率を飛躍的に高めることに成功している。

ヒトノロウイルス GII/4 のゲノム解析研究等で得られた知見から、GII/4 の周期的流行が発生するしくみの一端が示唆される。ヒト社会では、ウイルスへの日常的な暴露により、流行している GII/4 亜株の感染拡大を抑制する集団免疫が形成される可能性が高い^{13, 62)}。カプシド P2 サブド

メインに複数の変異を蓄積した新型 GII/4 亜株は、抗原性の変化により、既存の集団免疫を逃避してヒト社会に広がりやすいと推察される^{69, 70, 100)}。流行による集団免疫の形成^{13, 62)} が事実とすれば、新型 GII/4 亜株は、流行することで感受性生物の数を減らし、やがて P2 サブドメインの抗原性が変化した別の新型 GII/4 亜株に取って代わられる運命にあることが予測される。実際、1990 年代後半以降、周期的に少なくとも 4 回のノロウイルスパンデミックが発生し、その度に P2 サブドメインに複数の変異をもつ新型 GII/4 亜株が広がった¹⁰⁰⁾。また、現在、新型 GII/4 亜株 2006b が引き続き流行しているにも関わらず⁷⁰⁾、国内のノロウイルス感染症の発生事例報告数は年々減少し続けている^{120, 121)}。2006b への集団免疫が強化され、2006b 感受性生物の数が減少していることが一因かもしれない。

ゲノム解析はまた、2006b の全てのタンパク質で、過去の GII/4 流行株には見られない特徴的なアミノ酸置換が流行の過程で定着していることを明らかにした^{69, 70)}。2006b のカプシドの P2 サブドメインの 7 カ所の変異は、感染受容体候補分子の結合部位周辺に位置している⁶⁹⁾ (図 2B)。結合ポケットの構造や生化学的性質の変化により、中和抗体感受性だけでなく、カプシドの感染受容体への特異性が変化する可能性もある。また、流行株の ORF1 や ORF3 由来のタンパク質に維持される特徴的な 20 種の変異も、2006b に固有の性質を与えているかもしれない。今後、ノロウイルスタンパク質の構造機能情報が蓄積することで、流行株のゲノムに特有に生じる変異の意義について、より詳細に推察できるようになるであろう。

ゲノム解析はさらに、ゲノム組み換えウイルスが、しばしば局地的な流行の病原となっている実態を明確にした⁷⁰⁾。自然界で観察される組換えウイルスは、常に、ゲノム ORF1 と ORF2 の境界領域でゲノムを組換えていた⁷⁰⁾。この領域の塩基配列は、遺伝的に近縁なノロウイルスの間で高度に保存されている。この変化への制約は、一義的には、サブゲノムやカプシドの大量生産に基づくカリシウイルスの増殖戦略^{1, 41, 42, 52, 66, 115)} の維持に不可欠なために生じると推察される。これに加えて、この配列保存性は、ORF1 と ORF2 の間での相同組換え (homologous recombination) に役立っているかもしれない。ORF1 / ORF2 境界域でのゲノム組換えにより、別個に進化した近縁のノロウイルスの間で、複製関連遺伝子と構造遺伝子の変異セットを効率よく交換できる。これにより、複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させたウイルスが迅速に発生し、ウイルスの適応進化能力を高めているのかもしれない。

おわりに

ヒトや動物のノロウイルスゲノムの進化系統樹の分岐状

態をみると、ノロウイルスの祖先は、宿主ごとに、現存する多様なウイルスに分岐進化していった可能性が見て取れる。ヒトノロウイルスは、地球上で最も繁栄している生物の一つを自然宿主とし、宿主と宿主が作った環境に適応することで、生存に成功している。増殖の場が類似する他の下痢症ウイルスとの生存競争や棲み分けに有利な性質を持ち、ヒトと共存しながら適応進化している可能性もある。

流行発生には抗原性の変化以外にどのような要因が関与するのか、ゲノム組換えウイルスはどのようなメカニズムで生じるのか、何故、症状が激しい感染者では GII/4 が多く見つかるのか、GII/4 以外のノロウイルスの流行と分子進化の実態はどのようになっているのか、何故、ノロウイルス感染症は特定の季節に多く発生するのか、等々ノロウイルスの流行と進化に関する謎は、まだまだ多い。自然界のノロウイルスのゲノム情報を継続的に蓄積し、包括的に解析していくことで、これらの謎を解き明かすための重要な手がかりがえられるかもしれない。

謝 辞

本稿で紹介した国内 GII/4 のゲノム解析は、本村和嗣博士(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)が中心となり、国立感染症研究所ウイルス第二部、および全国 20 カ所の衛生研究所との共同 (The Norovirus Surveillance Group of Japan) で実施しました。in silico 立体構造解析は、横山勝博士と大出裕高博士(病原体ゲノム解析研究センター)が実施しました。片山和彦博士と岡智一郎博士(国立感染症研究所ウイルス第二部)には、原稿について貴重なご意見をいただきました。改めてここに深謝いたします。

文 献

- Asanaka, M., R. L. Atmar, V. Ruvolo, S. E. Crawford, F. H. Neill, and M. K. Estes. 2005. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 10327-32.
- Bailey, D., I. Karakasiliotis, S. Vashist, L. M. Chung, J. Reese, N. McFadden, A. Benson, F. Yarovinsky, P. Simmonds, and I. Goodfellow. 2010. Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *J Virol.* 84: 2859-70.
- Baker, D., and A. Sali. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science.* 294: 93-6.
- Ball, J. M., M. E. Hardy, R. L. Atmar, M. E. Conner, and M. K. Estes. 1998. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol.* 72: 1345-53.
- Bank-Wolf, B. R., M. Konig, and H. J. Thiel. 2010. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet Microbiol.* 140: 204-12.
- Baric, R. S., B. Yount, L. Lindesmith, P. R. Harrington, S. R. Greene, F. C. Tseng, N. Davis, R. E. Johnston, D. G. Klapper, and C. L. Moe. 2002. Expression and self-assembly of norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol.* 76: 3023-30.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, K. O. Chang, V. Babu, U. Uche, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and K. Y. Green. 2005. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 79: 2393-403.
- Belliot, G., S. V. Sosnovtsev, T. Mitra, C. Hammer, M. Garfield, and K. Y. Green. 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol.* 77: 10957-74.
- Bertolotti-Ciarlet, A., S. E. Crawford, A. M. Hutson, and M. K. Estes. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol.* 77: 11603-15.
- Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. Prasad, and M. K. Estes. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol.* 76: 4044-55.
- Bok, K., E. J. Abente, M. Realpe-Quintero, T. Mitra, S. V. Sosnovtsev, A. Z. Kapikian, and K. Y. Green. 2009. Evolutionary Dynamics of GII.4 Noroviruses over a Thirty-four Year Period. *J Virol.*
- Bu, W., A. Mamedova, M. Tan, M. Xia, X. Jiang, and R. S. Hegde. 2008. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J Virol.* 82: 5340-7.
- Cannon, J. L., L. C. Lindesmith, E. F. Donaldson, L. Saxe, R. S. Baric, and J. Vinje. 2009. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol.* 83: 5363-74.
- Cao, S., Z. Lou, M. Tan, Y. Chen, Y. Liu, Z. Zhang, X. C. Zhang, X. Jiang, X. Li, and Z. Rao. 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol.* 81: 5949-57.
- Carter, M. J., I. D. Milton, J. Meanger, M. Bennett, R. M. Gaskell, and P. C. Turner. 1992. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology.* 190: 443-8.
- Chachu, K. A., A. D. LoBue, D. W. Strong, R. S. Baric, and H. W. Virgin. 2008. Immune mechanisms responsible for vaccination against and clearance of mucosal and lymphatic norovirus infection. *PLoS Pathog.* 4: e1000236.
- Chachu, K. A., D. W. Strong, A. D. LoBue, C. E. Wobus, R. S. Baric, and H. W. t. Virgin. 2008. Antibody is critical for the clearance of murine norovirus infection. *J Virol.* 82: 6610-7.
- Chang, K. O., and D. W. George. 2007. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol.* 81: 12111-8.
- Changotra, H., Y. Jia, T. N. Moore, G. Liu, S. M.

- Kahan, S. V. Sosnovtsev, and S. M. Karst. 2009. Type I and type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins. *J Virol.* 83: 5683-92.
- 20) Cheetham, S., M. Souza, R. McGregor, T. Meulia, Q. Wang, and L. J. Saif. 2007. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *J Virol.* 81: 3535-44.
- 21) Cheetham, S., M. Souza, T. Meulia, S. Grimes, M. G. Han, and L. J. Saif. 2006. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol.* 80: 10372-81.
- 22) Choi, J. M., A. M. Hutson, M. K. Estes, and B. V. Prasad. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 9175-80.
- 23) Davis, M., S. M. Sagan, J. P. Pezacki, D. J. Evans, and P. Simmonds. 2008. Bioinformatic and physical characterizations of genome-scale ordered RNA structure in mammalian RNA viruses. *J Virol.* 82: 11824-36.
- 24) Donaldson, E. F., L. C. Lindesmith, A. D. Lobue, and R. S. Baric. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 8: 231-41.
- 25) Estes, M. K., B. V. Prasad, and R. L. Atmar. 2006. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis.* 19: 467-74.
- 26) Fukuda, S., Y. Sasaki, S. Takao, and M. Seno. 2008. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 80: 921-8.
- 27) Fukushi, S., S. Kojima, R. Takai, F. B. Hoshino, T. Oka, N. Takeda, K. Katayama, and T. Kageyama. 2004. Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol.* 78: 3889-96.
- 28) Fullerton, S. W., M. Blaschke, B. Coutard, J. Gebhardt, A. Gorbalenya, B. Canard, P. A. Tucker, and J. Rohayem. 2007. Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 81: 1858-71.
- 29) Gallimore, C. I., D. Cubitt, N. du Plessis, and J. J. Gray. 2004. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 42: 2271-4.
- 30) Garcia, C., H. L. DuPont, K. Z. Long, J. I. Santos, and G. Ko. 2006. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol.* 44: 2997-3000.
- 31) Glass, P. J., L. J. White, J. M. Ball, I. Leparac-Goffart, M. E. Hardy, and M. K. Estes. 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol.* 74: 6581-91.
- 32) Glass, P. J., C. Q. Zeng, and M. K. Estes. 2003. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol.* 77: 3569-77.
- 33) Glass, R. I., U. D. Parashar, and M. K. Estes. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 361: 1776-85.
- 34) Graham, D. Y., X. Jiang, T. Tanaka, A. R. Opekun, H. P. Madore, and M. K. Estes. 1994. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 170: 34-43.
- 35) Green, K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 2001. Human caliciviruses. *Fields Virology* 4th edition. (Vol.1) (Knipe, D.M. Howley, P.M. eds). 841-874.
- 36) Hansman, G. S., K. Natori, H. Shirato-Horikoshi, S. Ogawa, T. Oka, K. Katayama, T. Tanaka, T. Miyoshi, K. Sakae, S. Kobayashi, M. Shinohara, K. Uchida, N. Sakurai, K. Shinozaki, M. Okada, Y. Seto, K. Kamata, N. Nagata, K. Tanaka, T. Miyamura, and N. Takeda. 2006. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol.* 87: 909-19.
- 37) Hansman, G. S., T. Oka, T. C. Li, O. Nishio, M. Noda, and N. Takeda. 2008. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot.* 71: 1689-95.
- 38) Haramoto, E., H. Katayama, K. Oguma, H. Yamashita, A. Tajima, H. Nakajima, and S. Ohgaki. 2006. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Sci Technol.* 54: 301-8.
- 39) Hardy, M. E. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett.* 253: 1-8.
- 40) Hardy, M. E., T. N. Tanaka, N. Kitamoto, L. J. White, J. M. Ball, X. Jiang, and M. K. Estes. 1996. Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. *Virology.* 217: 252-61.
- 41) Herbert, T. P., I. Brierley, and T. D. Brown. 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol.* 77 (Pt 1): 123-7.
- 42) Herbert, T. P., I. Brierley, and T. D. Brown. 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol.* 78 (Pt 5): 1033-40.
- 43) Huang, P., T. Farkas, W. Zhong, M. Tan, S. Thornton, A. L. Morrow, and X. Jiang. 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol.* 79: 6714-22.
- 44) Hutson, A. M., R. L. Atmar, and M. K. Estes. 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12: 279-87.
- 45) Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. Y. Graham, and M. K. Estes. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis.* 185: 1335-7.
- 46) Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. M. Marcus, and M. K. Estes. 2003. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol.* 77: 405-15.
- 47) Jiang, X., C. Espul, W. M. Zhong, H. Cuello, and D. O. Matson. 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol.* 144: 2377-87.

- 48) Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham, and M. K. Estes. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 66: 6527-32.
- 49) Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama. 2004. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 42: 2988-95.
- 50) Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, and R. M. Chanock. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 10: 1075-81.
- 51) Karst, S. M., C. E. Wobus, M. Lay, J. Davidson, and H. W. t. Virgin. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science.* 299: 1575-8.
- 52) Katayama, K., G. S. Hansman, T. Oka, S. Ogawa, and N. Takeda. 2006. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol.* 151: 1291-308.
- 53) Katayama, K., H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, and N. Takeda. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology.* 299: 225-239.
- 54) Katpally, U., N. R. Voss, T. Cavazza, S. Taube, J. R. Rubin, V. L. Young, J. Stuckey, V. K. Ward, H. W. t. Virgin, C. E. Wobus, and T. J. Smith. 2010. High-resolution cryo-electron microscopy structures of MNV-1 and RHDV reveals marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol.*
- 55) Katpally, U., C. E. Wobus, K. Dryden, H. W. t. Virgin, and T. J. Smith. 2008. Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles. *J Virol.* 82: 2079-88.
- 56) Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. A. Bitsura, G. W. Gary, and J. C. Hoff. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 50: 261-4.
- 57) Kitajima, M., E. Haramoto, C. Phanuwat, H. Katayama, and S. Ohgaki. 2009. Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 49: 655-8.
- 58) Koopmans, M. 2008. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 21: 544-52.
- 59) Lindesmith, L., C. Moe, J. Lependu, J. A. Frelinger, J. Treanor, and R. S. Baric. 2005. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol.* 79: 2900-9.
- 60) Lindesmith, L., C. Moe, S. Marionneau, N. Ruvoen, X. Jiang, L. Lindblad, P. Stewart, J. Lependu, and R. Baric. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 9: 548-53.
- 61) Lindesmith, L. C., E. Donaldson, J. Leon, C. L. Moe, J. A. Frelinger, R. E. Johnston, D. J. Weber, and R. S. Baric. 2010. Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J Virol.* 84: 1800-15.
- 62) Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, A. D. Lobue, J. L. Cannon, D. P. Zheng, J. Vinje, and R. S. Baric. 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* 5: e31.
- 63) LoBue, A. D., J. M. Thompson, L. Lindesmith, R. E. Johnston, and R. S. Baric. 2009. Alphavirus-adjuncted norovirus-like particle vaccines: heterologous, humoral, and mucosal immune responses protect against murine norovirus challenge. *J Virol.* 83: 3212-27.
- 64) Lochridge, V. P., and M. E. Hardy. 2007. A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization. *J Virol.* 81: 12316-22.
- 65) Mead, P. S., L. Slutsker, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg. *Emerg Infect Dis.* 5: 841-2.
- 66) Meyers, G. 2003. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem.* 278: 34051-60.
- 67) Meyers, G., C. Wirblich, H. J. Thiel, and J. O. Thumfart. 2000. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology.* 276: 349-63.
- 68) Monica, B., S. Ramani, I. Banerjee, B. Primrose, M. Iturriza-Gomara, C. I. Gallimore, D. W. Brown, F. M. P. D. Moses, J. J. Gray, and G. Kang. 2007. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol.* 79: 544-51.
- 69) Motomura, K., T. Oka, M. Yokoyama, H. Nakamura, H. Mori, H. Ode, G. S. Hansman, K. Katayama, T. Kanda, T. Tanaka, N. Takeda, H. Sato, and t. N. S. G. o. Japan. 2008. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 82: 11247-62.
- 70) Motomura, K., M. Yokoyama, H. Ode, H. Nakamura, H. Mori, T. Kanda, T. Oka, K. Katayama, M. Noda, T. Tanaka, N. Takeda, H. Sato, and t. N. S. G. o. Japan. 2010. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol.* in press.
- 71) Mumphrey, S. M., H. Changotra, T. N. Moore, E. R. Heimann-Nichols, C. E. Wobus, M. J. Reilly, M. Moghadamfalahi, D. Shukla, and S. M. Karst. 2007. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol.* 81: 3251-63.
- 72) Nakamura, K., M. Iwai, J. Zhang, M. Obara, E. Horimoto, S. Hasegawa, T. Kurata, and T. Takizawa. 2009. Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in toyama prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 62: 394-8.
- 73) Nakamura, K., Y. Saga, M. Iwai, M. Obara, E. Horimo-

- to, S. Hasegawa, T. Kurata, H. Okumura, M. Nagoshi, and T. Takizawa. 2010. Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. *J Clin Microbiol.* 48: 1215-22.
- 74) Nakamura, K., Y. Someya, T. Kumasaka, G. Ueno, M. Yamamoto, T. Sato, N. Takeda, T. Miyamura, and N. Tanaka. 2005. A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol.* 79: 13685-93.
- 75) Nayak, M. K., G. Balasubramanian, G. C. Sahoo, R. Bhattacharya, J. Vinje, N. Kobayashi, M. C. Sarkar, M. K. Bhattacharya, and T. Krishnan. 2008. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology.* 377: 117-23.
- 76) Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, T. Munemura, T. Mikami, A. Kawamoto, M. Akiyama, Y. Kato, K. Nishi, K. Kozawa, and O. Nishio. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5782-6.
- 77) Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, and H. Kimura. 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 51: 177-84.
- 78) Oka, T., M. Yamamoto, M. Yokoyama, S. Ogawa, G. S. Hansman, K. Katayama, K. Miyashita, H. Takagi, Y. Tohya, H. Sato, and N. Takeda. 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol.* 81: 6798-806.
- 79) Oka, T., M. Yokoyama, K. Katayama, H. Tsunemitsu, M. Yamamoto, K. Miyashita, S. Ogawa, K. Motomura, H. Mori, H. Nakamura, T. Wakita, N. Takeda, and H. Sato. 2009. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology.* 394: 119-29.
- 80) Okada, M., T. Ogawa, I. Kaiho, and K. Shinozaki. 2005. Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol.* 43: 4391-401.
- 81) Oliver, S. L., E. Asobayire, A. M. Dastjerdi, and J. C. Bridger. 2006. Genomic characterization of the unclassified bovine Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology.* 350: 240-50.
- 82) Oliver, S. L., A. M. Dastjerdi, S. Wong, L. El-Attar, C. Gallimore, D. W. Brown, J. Green, and J. C. Bridger. 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol.* 77: 2789-98.
- 83) Ozawa, K., T. Oka, N. Takeda, and G. S. Hansman. 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol.* 45: 3996-4005.
- 84) Parrish, C. R., C. F. Aquadro, M. L. Strassheim, J. F. Evermann, J. Y. Sgro, and H. O. Mohammed. 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 65: 6544-52.
- 85) Phan, T. G., K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, S. Takanashi, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol.* 79: 1388-400.
- 86) Phan, T. G., P. Khamrin, M. Akiyama, F. Yagyu, S. Okitsu, N. Maneekarn, O. Nishio, and H. Ushijima. 2007. Detection and genetic characterization of norovirus in oysters from China and Japan. *Clin Lab.* 53: 405-12.
- 87) Phan, T. G., T. Kuroiwa, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, T. Nishimura, F. Yagyu, S. Okitsu, W. E. Muller, N. Maneekarn, and H. Ushijima. 2006. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 78: 971-8.
- 88) Phan, T. G., S. Nishimura, K. Sugita, T. Nishimura, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Multiple recombinant noroviruses in Japan. *Clin Lab.* 53: 567-70.
- 89) Phillips, G., C. C. Tam, L. C. Rodrigues, and B. Lopman. 2010. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol Infect.* 1-5.
- 90) Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 286: 287-90.
- 91) Robinson, S., I. N. Clarke, I. B. Vipond, E. O. Caul, and P. R. Lambden. 2002. Epidemiology of human Sapporo-like caliciviruses in the South West of England: molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *J Med Virol.* 67: 282-8.
- 92) Rohayem, J. 2009. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect.* 15: 524-7.
- 93) Rohayem, J., J. Munch, and A. Rethwilm. 2005. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J Virol.* 79: 4977-90.
- 94) Rohayem, J., I. Robel, K. Jager, U. Scheffler, and W. Rudolph. 2006. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol.* 80: 7060-9.
- 95) Saitoh, M., H. Kimura, K. Kozawa, O. Nishio, and A. Shoji. 2007. Detection and phylogenetic analysis of norovirus in *Corbicula fluminea* in a freshwater river in Japan. *Microbiol Immunol.* 51: 815-22.
- 96) Sano, D., Y. Ueki, T. Watanabe, and T. Omura. 2006. Genetic variation in the conservative gene region of Norovirus genogroup II strains in environmental and stool samples. *Environ Sci Technol.* 40: 7423-7.
- 97) Shannon, C. E. 1997. The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput.* 14: 306-17.
- 98) Shiota, T., M. Okame, S. Takanashi, P. Khamrin, M. Takagi, K. Satou, Y. Masuoka, F. Yagyu, Y. Shimizu, H. Kohno, M. Mizuguchi, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Characterization of a broadly reactive mono-

- clonal antibody against norovirus genogroups I and II: recognition of a novel conformational epitope. *J Virol.* 81: 12298-306.
- 99) Shirato, H., S. Ogawa, H. Ito, T. Sato, A. Kameyama, H. Narimatsu, Z. Xiaofan, T. Miyamura, T. Wakita, K. Ishii, and N. Takeda. 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol.* 82: 10756-67.
 - 100) Siebenga, J. J., H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R. J. Siezen, and M. Koopmans. 2007. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 81: 9932-41.
 - 101) Societies, T. V. D. i. t. I. U. o. M. 2010. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy. <http://www.ictvonline.org/>.
 - 102) Someya, Y., N. Takeda, and T. Miyamura. 2002. Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J Virol.* 76: 5949-58.
 - 103) Souza, M., M. S. Azevedo, K. Jung, S. Cheetham, and L. J. Saif. 2008. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol.* 82: 1777-86.
 - 104) Souza, M., S. M. Cheetham, M. S. Azevedo, V. Costantini, and L. J. Saif. 2007. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol.* 81: 9183-92.
 - 105) Takanashi, S., M. Okame, T. Shiota, M. Takagi, F. Yagyu, P. G. Tung, S. Nishimura, N. Katsumata, T. Igarashi, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2008. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *J Virol Methods.* 148: 1-8.
 - 106) Tamura, M., K. Natori, M. Kobayashi, T. Miyamura, and N. Takeda. 2004. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J Virol.* 78: 3817-26.
 - 107) Tamura, M., K. Natori, M. Kobayashi, T. Miyamura, and N. Takeda. 2000. Interaction of recombinant norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J Virol.* 74: 11589-97.
 - 108) Tan, M., R. S. Hegde, and X. Jiang. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.* 78: 6233-42.
 - 109) Taube, S., J. R. Rubin, U. Katpally, T. J. Smith, A. Kendall, J. A. Stuckey, and C. E. Wobus. 2010. High Resolution X-Ray Structure and Functional Analysis of the Murine Norovirus (MNV)-1 Capsid Protein Protruding (P) Domain. *J Virol.*
 - 110) Tsugawa, T., K. Numata-Kinoshita, S. Honma, S. Nakata, M. Tatsumi, Y. Sakai, K. Natori, N. Takeda, S. Kobayashi, and H. Tsutsumi. 2006. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J Clin Microbiol.* 44: 177-82.
 - 111) Ueki, Y., K. Akiyama, T. Watanabe, and T. Omura. 2004. Genetic analysis of noroviruses taken from gastroenteritis patients, river water and oysters. *Water Sci Technol.* 50: 51-6.
 - 112) Ueki, Y., D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama, and T. Omura. 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 39: 4271-80.
 - 113) Wang, Q. H., M. G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J. A. Funk, and L. J. Saif. 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 11: 1874-81.
 - 114) White, L. J., J. M. Ball, M. E. Hardy, T. N. Tanaka, N. Kitamoto, and M. K. Estes. 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol.* 70: 6589-97.
 - 115) Wobus, C. E., S. M. Karst, L. B. Thackray, K. O. Chang, S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, A. Krug, J. M. Mackenzie, K. Y. Green, and H. W. Virgin. 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2: e432.
 - 116) Wobus, C. E., L. B. Thackray, and H. W. t. Virgin. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 80: 5104-12.
 - 117) Xi, J. N., D. Y. Graham, K. N. Wang, and M. K. Estes. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 250: 1580-3.
 - 118) Zeitler, C. E., M. K. Estes, and B. V. Venkataram Prasad. 2006. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *J Virol.* 80: 5050-8.
 - 119) Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 346: 312-23.
 - 120) 厚生労働省. 2010. 病因物質別食中毒発生状況. 食中毒統計資料(2) 過去の食中毒発生状況 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>.
 - 121) 国立感染症研究所感染症情報センター. 2010. 病原微生物検出情報 (IASR) . ノロウイルス感染症. <http://idsc.nih.gov/disease/norovirus/index.html>.
 - 122) 佐藤裕徳, 横山勝. 2005. RNA ウィルスと変異. *ウィルス.* 55: 221-9.

Survival strategies of human norovirus

Hironori SATO

Laboratory of Viral Genomics, Pathogen Genomics Center,
National Institute of Infectious Diseases,
Gakuen 4-7-1, MusashiMurayama-shi, Tokyo 208-0011 Japan
E-mail: hirosato@nih.go.jp

Human norovirus is a mutable non-enveloped RNA virus capable of causing acute gastroenteritis in humans. Thus far, no experimental systems can propagate this virus in large amounts. Recent progresses in viral genomics and bioinformatics have led to a better understanding of molecular evolution of this virus in human populations. In addition, progresses in studies of the related noroviruses, those are replicable in laboratory systems, have led to a rapid accumulation of information on structural biology of norovirus. Furthermore, progresses in public health and water environment researches have led to a better understanding of viral ecology. In this review, I will first summarize fundamental characteristics of norovirus and its molecules. Then, I will summarize structure and molecular evolution of norovirus GII/4 subtype, which is now responsible for majorities of norovirus outbreaks in the world. Finally I will discuss survival strategies of human norovirus in nature by integrating the information.