

ヒトレスピロウイルス 1 型の膜融合蛋白遺伝子ならびに
膜融合蛋白の分子進化に関する研究

群馬パース大学大学院 保健科学研究科

19R103 高橋 知子

研究指導教員 木村 博一 教授

論文要旨（和文）

ヒトレスピロウイルス1型の膜融合蛋白遺伝子ならびに 膜融合蛋白の分子進化に関する研究

群馬パース大学大学院 保健科学研究科

19R103 高橋 知子

インフルエンザや新型コロナウイルス感染症をはじめとする呼吸器ウイルス感染症は多種類存在し、医学的・社会的に重要な感染症である。その中でも、ヒトレスピロウイルス（HRV）1型および3型感染症は、これらの呼吸器ウイルス感染症に次いで罹患頻度や重症化頻度のリスクが高く、かつ再感染を引き起こす感染症であり重要視されている。しかしながら、ほとんどの研究は、HRV3型に限られており、特にHRV1型に関する分子進化学的研究は極めて少ない。

つぎに、分子進化学は、核酸やアミノ酸などの差異や多様性を基に生命体の分子レベルでの進化の歴史を解明する学問である。また、バイオインフォマティクス技術は、生命体の分子進化を解析するための強力なツールであり進歩が著しい。近年、これらの融合により、種々のウイルスの進化学的解明のみならず感染源、感染機序、ワクチンならびに抗ウイルス薬の開発に関する研究も進んでいる。

このような背景から、本研究においては、HRV1型の主要抗原蛋白かつ当該感染症の再感染にも関与する膜融合蛋白遺伝子（Fusion protein gene, *F* 遺伝子）と膜融合蛋白（F protein, F 蛋白）に関する包括的な分子進化学的研究を行った。

本研究では、各国から収集したHRV1株について、感染時の細胞表面での膜融合と細胞侵入に重要な役割を担っているF蛋白を構成する*F*遺伝子の分子進化を明らかにするために、先駆的バイオインフォマティクス技術を用いた時系列系統解析、系統動力学解析、系統間距離解析、選択圧解析ならびにエピトープ解析を行った。

まず、世界各国で検出されたHRV1型の*F*遺伝子の全長配列を網羅的に収集し、ベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ(BMCMC)法を用いた時系列系統解析を行った。その結果、HRV1・*F*遺伝子の共通祖先は1957年に分岐し、約60年間で3つの系統を形成していることが分かった。そのうち“系統3”に属する株が1990年代後半から優勢になった。次に、ベイジアンスカイラインプロット(BSP)法による系統動力学解析では、HRV1・*F*遺伝子のゲノムポピュレーションサイズが、約80年間で倍増していることが明らかになった。この変動は、系統2および3の株の出現に対応していた。また、株間の系統間距離解析から、*F*遺伝子配列の保存性は高く、遺伝学的な多様性

はインフルエンザウイルスなどに比し、低いことが推定された。一方、選択圧解析からは、HRV1・F 蛋白には、その部位の機能、構造ならびに感染性を維持するための負の選択圧が作用していることも示唆された。さらに、F 蛋白のエピトープ解析では、ほとんどのエピトープが中和抗体結合部位に一致しなかった。このことは、HRV1 感染により、誘導された抗体がウイルスの再感染防御に寄与しないことを意味する。

以上の新たな分子進化学的知見は、は HRV の今後の感染動向予測、再感染のメカニズム解明ならびに当該感染症のワクチン開発や抗ウイルス薬の探索に寄与することが期待される。

キーワード：ヒトレスピロウイルス 1；分子進化解析；膜融合蛋白（F）遺伝子；エピトープ；再感染

目次

I. 序論	1
1. ヒトレスピロウイルスならびにヒトレスピロウイルス感染症の概要	1
1.1. ヒトレスピロウイルスの分類と構造の概要	・ ・ 1
1.2. 膜融合蛋白 (F 蛋白) の構造の特徴と機能	・ ・ 2
1.3. ヒトレスピロウイルス感染症の概要	・ ・ 3
1.4. 分子進化とバイオインフォマティクス	・ ・ 3
1.5. バイオインフォマティクスによるエピトープ解析の意義	・ ・ 5
1.6. ヒトレスピロウイルス 1・F 蛋白の分子進化とエピトープ解析	・ ・ 6
2. 本研究の目的	6
II. 材料と方法	8
1. HRV1 の塩基配列データセットの作成	8
2. ベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ (BMCMC) 法を用いた時系列系統解析 による HRV1 の <i>F</i> 遺伝子の進化系統樹の作成および進化速度の推定	9
3. HRV1 の <i>F</i> 遺伝子の系統間距離解析	12
4. 選択圧解析	12
5. HRV1・F 蛋白の三次元構造モデルの作製	13

6. HRV1・F 蛋白の三次元構造の立体構造・線状エピトープ解析	15
7. ベイジアンスカイラインプロット (BSP) 法による HRV1 の F 遺伝子のゲノムポピュレーションの動力学解析	16
III. 結果	16
1. BMCMC 法を用いた HRV 1・F 遺伝子の時系列系統解析の進化系統樹と進化速度の推定	16
2. HRV1・F 遺伝子の系統間距離	18
3. HRV1・F 蛋白の選択圧解析	18
4. ホモロジーモデリング	19
5. アミノ酸置換部位および B 細胞エピトープ領域	19
6. BSP 法を用いた HRV1・F 遺伝子の系統動力学解析結果	21
IV. 考察	22
V. 結論	29
VI. 図・表	31
VII. 補足図・補足表	47
VIII. 引用文献	50

謝辞

I. 序論

1. ヒトレスピロウイルスならびにヒトレスピロウイルス感染症の概要

1.1. ヒトレスピロウイルスの分類と構造の概要

ヒトレスピロウイルス (Human respirovirus、HRV) は、パラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*)、オルソパラミクソウイルス亜科 (*Orthoparamyxovirinae*)、レスピロウイルス属 (*Respirovirus*) に属するマイナス 1 本鎖 RNA ウイルスである¹⁾。HRV は、1950 年代後半に呼吸器疾患の小児から初めて発見され、病原性がインフルエンザウイルスに類似しているため、ヒトパラインフルエンザウイルス (Human parainfluenza virus, HPIV) と命名された^{2,3)}。また、HPIV は、ゲノム構造と抗原性の差異から 4 種 (ヒトパラインフルエンザウイルス 1~4 型) に分類されていた^{4,7)}。その後、他のパラミクソウイルス科に属するウイルスとのゲノム構造の比較により、レスピロウイルス属のヒトレスピロウイルス 1 (HRV1) および 3 (HRV3) とオルソルブラウイルス属のヒトオルソルブラウイルス 2 (Human orthorubulavirus 2、HORV2) および 4 (HORV4) に再分類された⁸⁾。HRV 粒子は、宿主細胞由来のリン脂質であるエンベロープを有し、多くの粒子は直径 150~300nm の不規則な球状を呈するが、粒子が数珠状に連結し、糸状の形態を示すこともある^{1,5,7)}。また、ウイルスゲノムの長さは、種によって異なるが 15~16kb である⁶⁾。ウイルスゲノムは、6 個の遺伝子 (N、P、M、F、HN ならび

に L) をコードしており、7 個あるいは 8 個の蛋白に翻訳される⁶⁾ (図 1)。そのうち、膜融合蛋白 (Fusion protein, F 蛋白) とヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (Hemagglutinin neuraminidase, HN) 蛋白は、HRV の主要抗原と考えられている¹⁾。これらの蛋白は、生体内において抗原蛋白として作用するだけでなく、標的細胞への感染に重要な役割を果たす⁵⁾。特に、F 蛋白は、宿主細胞への感染と当該ウイルス感染細胞にみられる合胞体 (Syncytium) 形成に関与する重要な抗原蛋白である^{9, 10)}。また、HN 蛋白は、赤血球凝集素ならびにノイラミニダーゼ活性を有し、成熟したウイルス粒子 (virion) の細胞からの出芽の際に重要な役割を果たす¹¹⁾。

1.2. 膜融合蛋白 (F 蛋白) の構造の特徴と機能

F 蛋白は、ホモ三量体で構成され、構造的に大きく頭部 (Head region) と軸部 (Stalk region) に分けることができる^{12, 13)}。F 蛋白は、感染時に軸部が伸展し、Prefusion 型から Postfusion 型に構造が大きく変化し、感染の標的となる細胞内にウイルス粒子が侵入するきっかけとなる^{12, 14)}。また、Prefusion 型と Postfusion 型の両者には抗原性の差異もみられる¹⁵⁾。さらに、HRV に対する感染は、Prefusion 型に対する抗体により防御されることが血清疫学的に示唆されているが、上述した F 蛋白の構造の差異、両者の抗原性ならびに HRV に対する感染防御の詳細については不明な点が多い。

1.3. ヒトレスピロウイルス感染症の概要

呼吸器ウイルス感染症全体の疫学解析によれば、HRV 感染症は、インフルエンザと RS ウイルス感染症について多いとされる⁵⁾。出生後 5 歳までに 70~80%が HRV の初感染を経験し、同じ種のウイルスに生涯感染（再感染）を繰り返す^{1,5,16)}。発症後、大半の例は、数日間の発熱ならびに上気道炎症状で寛解するが、一定の割合で、下気道炎（気管支炎、細気管支炎あるいは肺炎）を呈する例もみられる¹⁾。また、急性喉頭気管支炎（クループ）や肺炎の増悪による呼吸困難を伴うこともある。さらに、原因は不明であるが、各ウイルスの感染頻度は、HRV3、HRV1、HORV2、HORV4 の順に多いとされる¹⁾。このようなことから、本疾患は、公衆衛生学上、小児と高齢者に対し、RS ウイルス感染症と同様に大きな疾病負荷となっている^{1,5)}。

1.4. 分子進化とバイオインフォマティクス

チャールズ・ダーウィンは、進化生物学における先駆的な研究を行っていたが、遺伝子の本体が核酸であることが判明する半世紀以上前にこの世を去っているため、もっぱら形態学の観点から進化理論を構築した¹⁷⁾。しかし、現在においては、生物における進化の本質は、塩基配列の突然変異による形質変化にあることが分かっている¹⁸⁾。このようなことから、1960 年代以降、進化学研究の対象が形態から遺伝子へと変わっ

たことで、分子レベルでの進化に着目する分子進化学が始まった¹⁹⁾。特に、ウイルスは、遺伝的な多様性とその個体群の大きさから分子進化学の良い研究対象となっている。しかしながら、ウイルスは単に分子進化学の発展に寄与する存在ではなく、ウイルスの分子進化的解析はそれ自体が疫学的・臨床的に非常に重要な意味を持っている^{35, 82)}。例えば、インフルエンザウイルスにおいては、様々な地域で様々な宿主から分離されたウイルスの遺伝子情報が網羅的に解析され、これにより導かれる進化系統樹は、ウイルスの伝搬経路の解明、宿主に特異的な遺伝子系統の同定等に活用されている^{20, 21)}。さらに、抗原蛋白の性状や機能を解析することで、抗原性の変化を推察し、新規ワクチンの開発などにも利活用されている^{19, 22)}。このように、ウイルスの分子進化解析から、単に微生物学的なウイルスの分子レベルでの知見のみならず、感染予防・制御に有用な情報を得ることができる^{19, 22)}。一方、ウイルスの分子進化解析は、膨大な情報を合理的かつ多面的に処理する必要がある^{23, 24)}。そこで、現在の分子進化研究では、遺伝情報を情報工学や統計学などを駆使した解析が行われる^{19, 20, 22, 23)}。現在、このような生命情報に関する解析技術をバイオインフォマティクス(Bioinformatics)といい、ウイルスをはじめ、種々の微生物(細菌や真菌など)の進化学的解析に応用されている¹⁹⁻²²⁾。

1.5. バイオインフォマティクスによるエピトープ解析の意義

いうまでもなく、生体に病原体（抗原）が侵入した場合、宿主は細胞性免疫ならびに液性免疫により、異物である病原体を排除する²⁵⁾。その過程において、原因となった病原体に対する感染防御抗体である中和抗体（Neutralizing antibody, NT-Ab）を産生する²⁶⁾。NT-Abは、抗原蛋白と結合する場合、抗原全体ではなく、感染に重要な部位に結合し、宿主細胞への感染を抑制する²⁵⁾。また、抗体が結合する抗原のアミノ酸モチーフをエピトープといい、抗原抗体反応において重要な役割を果たす²⁶⁾。エピトープは、立体構造エピトープ（Conformational epitope）と線状エピトープ（Linear epitope）の2種類に分類される²⁷⁾。立体構造エピトープは、蛋白の三次元立体構造上に近接する不連続な残基から構成され、線状エピトープは抗原蛋白の直鎖状の連続したアミノ酸配列から構成される²⁸⁾。

一般に、抗原抗体反応は、ウイルス感染防御の中心的要素であるが、抗原性を示す蛋白の存在から必然的に免疫原性が誘導されるわけではない²⁹⁾。このことは、抗原蛋白に含まれるエピトープが、中和抗体によって十分に認識されない可能性があることを示す²⁹⁾。このことを拡大解釈すると、ウイルスの抗原蛋白上の中和抗体結合部位と抗原蛋白のエピトープ領域との不一致が再感染の原因のひとつとなっている可能性がある^{1,29,30)}。これまでエピトープ領域の予測は、実際に抗原のアミノ酸配列と抗体を

反応させることで解析されてきた。しかし、この方法では抗原蛋白に存在する多数のエピトープを同定することが困難である³¹⁾。一方、情報工学の発達とエピトープの構造情報が集積されたことで、抗原の網羅的なエピトープを予測することがバイオインフォマティクス技術により可能となってきた^{19,22)}。そして現在では、種々のウイルス抗原蛋白の立体構造エピトープと線状エピトープのそれぞれが予測可能になっている^{22, 31-34)}。

1.6. ヒトレスピロウイルス 1・F 蛋白の分子進化とエピトープ解析

ウイルスの分子進化的解析研究においては、上述した集団遺伝学の論理とバイオインフォマティクス技術を応用し、種々のウイルスの変異と適応に関する情報を得ることが可能となる^{19,35)}。今まで、HRV においても以前から分子進化的研究がなされてきたが、その多くは HRV3 に焦点が当てられており^{36,37)}、HRV1 についての報告はほとんどない³⁸⁾。

2. 本研究の目的

これまで述べたように、HRV1 は HRV3 と同様に、頻度の高い急性呼吸器感染症の原因となるウイルスであるが、これまで HRV の分子進化的解析の多くは、より罹患頻度

が高い HRV3 に焦点が当てられており、HRV1 の分子進化解析に関する研究はほとんどない³⁸⁾。しかし、HRV1 も他の呼吸器ウイルスと同様に、小児や高齢者において大きな疾病負荷になっている³⁹⁾。また、再感染のメカニズムについても不明な点が多い³⁹⁾。

また、既報において、HRV の F 蛋白は、膜融合の過程での立体構造の変化が融合を可能にすることが示唆されており、HRV3 における融合過程の HN 蛋白ならびに F 蛋白の相互作用について、ある程度解明が進んでいる^{14,40)}。さらに、これらの既報においては、F 蛋白は主要なウイルス抗原として、抗体に認識される結合部位（エピトープ）を有し、HRV3 の F 蛋白において、これらのエピトープと中和抗体結合部位との不一致がヒトの HRV 再感染の原因となり得ることを報告している⁴¹⁾。しかし、HRV1 の F 蛋白における詳細な立体構造に加えて、抗原エピトープと中和抗体結合部位の関係性は不明である³⁸⁾。よって、これらを解明することで、HRV3 と同様、HRV1 の F 蛋白の詳細な立体構造と、再感染の原因となる免疫逃避にも関与している可能性を示すことが可能になると思われる。

このような作業仮説のもと、本研究においては、世界各国から網羅的に収集した HRV1 株の F 遺伝子の全長塩基配列を用い、先端的なバイオインフォマティクス技術を用い、HRV1 の F 遺伝子の分子進化を明らかにすることを目的とした。

II. 材料と方法

1. HRV1 の塩基配列データセットの作成

分子進化学的研究を行う上で、まず解析に使用する株の収集が必要となる。そこで、本研究では、アメリカ国立衛生研究所・アメリカ国際医学図書館に併設の National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子塩基配列データベース (GenBank) から、2019 年 6 月 11 日までに登録されていた HRV1・*F* 遺伝子の全長配列 (位置 5060–6727 ; hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957 株の場合は 1668 塩基 ; GenBank accession number JQ901971) 計 721 株を網羅的に収集した。収集株のうち、検出・分離時期 (年) および地域に関する情報が確認できた株の配列のみを選択した。さらに塩基配列が特定できない混合塩基 (N、Y、R、あるいは V など) を持つ株は除外した。この時点で、対象とする株は 71 株となった。また、GenBank では、塩基配列が 100%一致する *F* 遺伝子が登録されている場合がある。そのため、*F* 遺伝子のヌクレオチドの一致率を、Clustal Omega⁴²⁾で算出し、99.4%以上の一致率を示した配列グループからランダムに 1 つの配列を選択し、残りの配列は除外した⁴³⁾。最終的なデータセットは 66 株となった。

66 株の HRV1 の配列の temporal signal 解析を行い、データセットが molecular clock

解析に適しているか否かを判断した。最尤法は、系統樹を作成するために **molecular evolutionary genetics analysis version 7.0** (MEGA 7) ソフトウェア⁴⁴⁾ を使用して行った。データは **TempEst** ソフトウェア (version 1.5.3)⁴⁵⁾ を用いて解析を行った。この過程を経た 66 株を本研究の最終的なデータセットとし、すべての株のデータを表 2 に示した。これらの配列は、**MAFFT version 7**⁴⁶⁾よりアライメントを行い、その後、プロトタイプ (**hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957F**) の遺伝子配列に基づいて 1668 塩基長に限定して解析に用いた。

2. ベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ (BMCMC) 法を用いた時系列系統解析による HRV1 の F 遺伝子の進化系統樹の作成および進化速度の推定

まず、ウイルスの分子進化学的研究の基盤として分子系統樹解析があげられる。分子系統樹は、生物間の分子間の系統的な関係を表しており、比喩的表現を用いれば、「ウイルス分子間の家系図」と言い換えることができる。よって、系統樹解析から、対象となったウイルスの進化過程を推定することが可能となる。本研究において、HRV1 の F 遺伝子の進化を解析するため、現在、特にウイルスゲノムの時系列の進化学的解析に有用と考えられている BMCMC 法による解析技術とそのプログラムを用いた⁴⁷⁾。BMCMC 法は、ベイズ推定において、事後確率分布の計算が極めて困難な場

合に、最新の情報を用いて事前確率分布と尤度分布を基に乱数を生成し、無作為抽出することで、事後分布を概算する方法であり、極端に複雑な進化モデルの解析をわかりやすく遂行できる系統樹再構築の手法として利用されている。今回は、ベイズ法に基づき系統樹探索と分岐年代推定を行うソフトウェアである BEAST (バージョン 2.4.8)⁴⁸⁾ の BMCMC 法を用いて、HRV1・F 遺伝子の全長配列の時系列系統解析を行った。

まず、最初に、核酸置換の最適モデルを統計的に選択するために jModelTest プログラム (バージョン 2.1.10) を用いて⁴⁹⁾ 最適置換モデルを選択した (最適置換モデル: TrN+I)。つぎに、この最適置換モデルを使用して、BEAST パッケージに実装されたパスサンプリングで、4 つの clock モデル (Strict Clock、Exponential Relaxed Clock、Log Normal Relaxed Clock、Random Local Clock) と 3 つの tree prior モデル (Coalescent Constant population, Coalescent Exponential population, Coalescent Bayesian skyline) について最適なものを決定した。その結果、Clock モデルは Log Normal Relaxed Clock、tree prior モデルは Coalescent Exponential population が選択された。この選択されたモデルの組み合わせを使用し、すべての株 (66 株) の BMCMC 解析を、BEAST ソフトウェアを使用して行った。BMCMC 解析の条件は、10,000,000 回の計算のうち 5,000 回ごとに 1 回の頻度でデータ取得を行い、系統樹解析を行った。また、系統樹解析の結果、形成が認められた系統 2 および 3 の解析は、100,000,000 回の計算のうち 2,000 回ごと

に1回の頻度で系統樹解析を行った。つぎに、各パラメータの収束を確認後、BEAST
パッケージの TreeAnnotator (version 2.4.8) ソフトウェアを使用して、数値の安定しな
い最初の10%の系統樹を削除後、最適な系統樹を作成した。最初の10%の系統樹を削
除後の解析データについては、その確かさを確認するために、Tracer (version 1.6) ソ
フトウェアを使用して有効サンプルサイズ (Effect sample size : ESS) によって評価し、
すべての項目で ESS が 200 を超えることを基準とした。BMCMC 系統樹は FigTree
(version 1.4.03) ソフトウェアを使用して編集を行い、推定分岐年代の信頼性区間に
ついて、95% Highest posterior densities (HPDs) として示した。さらに、構築された
HRV1・F 遺伝子の系統樹における株の分類は、図示された系統樹の分岐のパターンに
従った。同時に、BMCMC 系統樹によって決定された66のHRV1株および各系統の
株の進化速度を、BMCMC 法を用いて推定し、その値を Tracer ソフトウェアにより確
認した。モデル選択の限界尤度 (ML) 値と BMCMC 分析の詳細なパラメータを補足
表 S1 および S2 に示す。さらに、本研究では、系統樹により分類された各系統間の進
化速度を統計的に比較した。系統間の進化率を比較するための統計解析は、EZR ソフ
トウェア⁵⁰⁾を用いて Kruskal-Wallis 検定を用いて行った。統計解析には、10%のバー
ンイン (45,001 サンプル) 削除後の MCMC 連鎖から 2000 ステップごとに取得した進
化率を用いた。統計的有意性は、 $p < 0.05$ と定義した。

3. HRV1 の *F* 遺伝子の系統間距離解析

系統間距離は配列の相違度を表す指標である。そこで本研究では、*F* 遺伝子の遺伝的な多様性を推定するために、全 HRV1 株間の系統間距離を分析した。MEGA7 ソフトウェア⁴⁴⁾を用いた最尤法 (Maximum Likelihood method ; ML 法) により、全 HRV1 株の系統樹を構築し、枝の信頼性はブートストラップによる復元抽出を 1,000 回行うことで確保した⁴⁴⁾。ML 法の最適な置換モデルを選択するために、jModelTest プログラムを使用した。その後、ML 系統樹の各株間の系統間距離を Patristic⁵¹⁾を用いて距離行列を求め、系統ごとに平均、標準偏差およびヒストグラムを算出した。

4. 選択圧解析

塩基の突然変異は、アミノ酸の置換を伴わない同義置換 (synonymous substitution) とアミノ酸の置換伴う非同義置換 (non synonymous substitution) に分けられる。さらに、非同義置換率 (dN) および同義置換率 (dS) の速度比 (dN/dS) を基準として用いることにより、非同義置換変異の固定が自然淘汰により促進されているか、妨げられているかを推測することができる。ウイルス蛋白の機能や構造に影響を及ぼすような位置で非同義置換が起こった場合には、その機能や構造が劣化する原因となりうる¹⁸⁾。

よって、そのためにアミノ酸変異を変化させないように負の選択圧 (negative selection) により、非同義置換変異の固定速度を減少させる ($dN/dS < 1$)。一方、外部の環境因子が変化し、ウイルスがその変化への適応を必要とする場合には、同義置換よりも非同義置換が多く発生し ($dN/dS > 1$) 非同義突然変異が固定されやすくなり、正の選択圧 (positive selection) が働く。

本研究では、HRV1 の F 蛋白の選択圧部位は、Datamonkey ウェブサーバー^{52,53})を用いて各アミノ酸部位における非同義 (dN) と同義 (dS) 置換の比率を計算した⁵⁴)。正の選択部位の推定には、Single-Likelihood Ancestor Counting (SLAC)、Fixed Effects Likelihood (FEL)、Internal Fixed Effects Likelihood (IFEL)、Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation (FUBAR)⁵⁵) および Mixed Effects Model of Evolution (MEME)⁵⁶) を用いた。一方、負の選択部位推定には SLAC、FEL、IFEL、FUBAR を用いた。正の選択 ($dN/dS > 1$) および負の選択 ($dN/dS < 1$) は、SLAC、FEL、IFEL、MEME については p 値 ($p < 0.05$)、FUBAR については事後確率値 (> 0.9) に基づいて決定し、上記の 4 種類の方法で共通して判定された場合に、その部位を正または負の選択部位とした。

5. HRV1・F 蛋白の三次元構造モデルの作製

本研究では、エピトープと中和抗体結合部位を HRV1 の F 蛋白上にマッピングすることで、視覚的に両者の関係を明らかにした⁵⁷⁾。しかし、HRV1 の F 蛋白については、実験的に検証された立体構造が得られていない。そこで、BMCMC 系統樹を用いて決定した各グループの代表株について、ホモロジーモデリングを用いて、HRV1 のプレフュージョン状態の F 蛋白の三量体構造モデルを構築した (プロトタイプ、ATCC VR-94/USA/1957 株、JQ901971 ; 系統 1 : HPIV1/WI/629-008/1997 株 JQ901978、系統 2 : HPIV1/WI/629-007/1997 株 JQ901979、系統 3 : HPIV1/USA/629-D02161/2009 株 KF687308)⁵⁸⁾。ホモロジーモデリングは、標的蛋白質と比較してアミノ酸配列の相同性が高く、かつ立体構造の判明している蛋白質を鋳型として目的の蛋白質立体構造を作製する手法である。BLAST ウェブサーバー⁵⁹⁾ の結果に基づき、HRV3 F protein (Protein Data Bank accession ID: 6MJZ) の蛋白の結晶構造を鋳型として選択した。各株と鋳型のアミノ酸配列を、MAFFT version 7 を用いてアライメントした。各株の鋳型に対する配列同一性の割合は、Clustal Omega を使用して計算した⁴²⁾。鋳型配列に基づき、Modeller ソフトウェア (バージョン 10.2) を用いて三次元構造を構築した⁵⁸⁾。生成されたモデルは、CCP4 パッケージに実装された WinCoot を用いた Ramachandran プロット解析によって評価され、最も良いスコアを持つモデルが選択された。生成した構造のエネルギー最小化は、Swiss PDB Viewer (version 4.1.0)⁶⁰⁾ に実装されている

GROMOS96 を使用して行った。このようにして作製した F 蛋白は PyMOL を用いて三次元的に視覚化した⁵⁷⁾。

6. HRV1・F 蛋白の三次元構造の立体構造・線状エピトープ解析

HRV1・F 蛋白質に対するヒトの免疫防御による選択圧を評価するために、プレフュージョン状態におけるエピトープ領域を解析した⁶¹⁾。ホモロジーモデリングで作製した F 蛋白モデルの立体構造エピトープは、Disco-Topo (version 2.0)³¹⁾、ElliPro³²⁾、SEMA⁶²⁾ および SEPPA (version 3.0)⁶³⁾ を用いて分析し、カットオフ値をそれぞれ 3.7 (Disco-Topo 2.0)、0.5 (ElliPro)、0.76 (SEMA)、および 0.064 (SEPPA3.0) とした。また、4 つの手法のうち 3 つ以上の手法で共通部位が予測された領域を立体構造エピトープとして決定した。その後、LBtope³⁴⁾、BECEPS³³⁾、BepiPred (version 2.0)⁶⁴⁾ および ABCpred⁶⁵⁾ により線状エピトープを解析した。カットオフ値はそれぞれ 80% (LBtope)、0.5 (BECEPS)、0.5 (BepiPred 2.0)、0.51 (ABCpred) と設定した。連続するアミノ酸が 10 個以上あり、4 つの手法のうち少なくとも 3 つの手法で共通して推定された領域は、線状エピトープとみなした⁶⁶⁾。最後に、予測されたエピトープと過去の報告¹³⁾ で同定された中和抗体エピトープを、ホモロジーモデリングで作製した F 蛋白モデルにマッピングした。

7. ベイジアンスカイラインプロット (BSP) 法による HRV1 の *F* 遺伝子ゲ

ノムポピュレーションの動力的解析

HRV1 株の *F* 遺伝子のゲノムポピュレーションサイズの動力的解析による推移を BEAST version 2.4.8 ソフトウェアの Bayesian skyline plot 解析により推定した^{67, 68)}。適切な置換モデルおよび clock モデルを 2 に記載のとおりを選択した。本解析の Tree Prior モデルは、coalescent Bayesian skyline を共通して選択した (補足表 S2)。解析プロットは、Tracer version 1.6 ソフトウェアを用いて視覚化した。系統 1 については、属する株数が少なかった (6 株のみ) ため、前述の解析が実施できなかった⁶⁸⁾。

III. 結果

1. BMCMC 法を用いた HRV1・*F* 遺伝子の時系列系統解析の進化系統樹と進化速度の推定

HRV1・*F* 遺伝子の時系列的な進化を推定するために、BMCMC 法を用いて系統樹を作成した。本研究では、ヒトで検出された HRV1・*F* 遺伝子 (66 株) の全長塩基配列を使用した。BMCMC 系統樹を作成する前に、TempEst (バージョン 1.5.3) を用いてデータセットの時間的シグナルを推定した。系統樹上、データサンプル採取時間に対

する根 (Root) から枝 (Branch) の先端までの遺伝的距離のプロットは、遺伝的分岐とサンプリング時間間に正の相関を示し、 R^2 値は 0.87 と計算された。これらの結果から、HRV1 の 66 株のデータセットは分子時計解析に適切であることが示唆された。そこで、このデータセットを用いて BMCMC 法を実施した。図 2 に示すように、HRV1 プロトタイプ株 (hPIV1/USA/ATCC_VR-94_1957; GenBank アクセッション番号 JQ901971) と他の既存 HRV1 株の共通祖先は 1957 年に分岐し (95%HPD, 1956-1957)、最終的に 3 つの主要系統 1-3 が形成された。この最初の分岐の後、1992 年 (95%HPD, 1989-1994 年) には系統 1 の株が 3 系統の株の共通祖先からさらに分岐し、1994 年 (95%HPD, 1991-1996 年) には系統 1 の反対側で、系統 2 と系統 3 に分岐した。現在、系統 3 に属する株は広く分布し、いくつかのクラスターを形成している。

つぎに、HRV1 $\cdot F$ 遺伝子の進化速度を推定した (表 3)。全 66 株における進化速度は 8.504×10^{-4} 置換数/部位/年 (s/s/y) と推定された (95%HPD, $7.003 \times 10^{-4} \sim 1.0008 \times 10^{-3}$ s/s/y)。前述の各系統について計算した結果、系統 2 の株の進化速度は 6.580×10^{-4} s/s/y (95%HPD, $4.784 \times 10^{-4} \sim 8.4595 \times 10^{-4}$ s/s/y)、系統 3 の株の進化速度は 1.205×10^{-3} s/s/y (95%HPD, $7.159 \times 10^{-4} \sim 1.6866 \times 10^{-3}$ s/s/y) であった。検出年 (1997 年) が同じである系統 1 の株の進化速度は、株数が少なく計算できなかった。系統 3 の株の進化速度は系統 2 の株の進化速度よりも有意に速かった ($p < 2^{-16}$)。

2. HRV1・F 遺伝子の系統間距離

塩基配列に基づいて、系統間の距離と分布を評価した。全株を対象とした塩基配列対間の距離のヒストグラムにおいて二峰性の分布が見られた (図 3a)。また、系統 1 と系統 2 のヒストグラムは二峰性分布を示したが、系統 1 の系統間距離はサンプルサイズが小さいため、実際の系統の系統間距離を表していない可能性がある (図 3b および 3c)。一方、系統 3 のヒストグラムは単峰性のパターンを示した (図 3d)。本研究で調べた 66 株の HRV1 における F 遺伝子配列の各対の平均距離 (\pm SD) は 0.018575 ± 0.01227 であった。系統 1、2 ならびに 3 の系統間距離は、それぞれ 0.0022 ± 0.0012 、 0.0073 ± 0.0030 、 0.0092 ± 0.0058 であった。したがって、全体および各系統の系統間距離は、いずれも遺伝子配列が保存されていることを示す 0.02 未満であった。

3. HRV1・F 蛋白の選択圧解析

全 66 株の F 蛋白の正の選択部位と負の選択部位を同定するために、DataMonkey ウェブサーバーを用いて dS と dN の置換率を推定した。正の選択部位 (アミノ酸残基 5) を予測したのは 1 つの方法 (FUBAR) のみで、他の 4 つの方法では正の選択部位は同定されなかった。したがって、F 蛋白の正の選択部位は存在しない。一方、多くの負の選択部位が推定された。その中で、使用したすべての方法に共通し、4 つの

負の選択部位（アミノ酸部位（Site）:150、382、460 ならびに 473）が推定された（表 4）。

4. ホモロジーモデリング

中和抗体結合部位と予測される立体構造および線状エピトープとの関係を可視化するために、HRV1 のプレフュージョン状態の A 鎖、B 鎖および C 鎖を含む F 蛋白ホモ三量体 3 次元立体構造を作成した（図 4）¹⁾。まず、鋳型となった F 蛋白のアミノ酸配列は、プロトタイプおよび各系統の代表株のアミノ酸 24-98 と 126-550 をカバーしていた（図 5）。また、この範囲で、蛋白表面のアミノ酸残基は系統 1~3 の代表株においてすべて一致した。さらに、代表株に対するプロトタイプ株間の同一性は、Clustal Omega を用いた相同性解析において 96.8%と高かった。そこで、プロトタイプを構造モデルとして採用した⁴³⁾。

5. アミノ酸置換部位および B 細胞エピトープ領域

HRV1・F 蛋白の A 鎖のアミノ酸配列について、プロトタイプ株と系統 1、2 ならびに 3 の代表株を比較した。系統 1、2 あるいは 3 では 17 個のアミノ酸置換が共通して存在し、そのうち、7 個のアミノ酸残基が立体構造モデル上、蛋白表面に位置してい

た (図 5 ならびに表 5)。また、系統 1 には特有のアミノ酸置換、Glu5Lys を有することがわかった。さらに、系統 3 に特有な 4 つのアミノ酸残基 (Thr493Lys、Val526Thr、Met545Ile ならびに Arg546Lys) の置換がみられたが、いずれも立体構造モデル上、蛋白表面には位置していなかった。したがって、各系統で共通する置換領域のうち、7 残基 (Glu63Gln、Ile155Val、Leu163Phe、Asn184Asp、Arg338Lys、Arg410Lys および Arg442Gly) のみが立体構造モデル上、F 蛋白表面に位置していた。

つぎに、HRV1・F 蛋白のアミノ酸配列において予測された立体構造エピトープおよび線状エピトープ領域と既報¹³⁾の中和抗体結合部位を三量体構造モデルに示した (図 4)。HRV1・F 蛋白の立体構造および線状エピトープを解析したところ、プロトタイプ of HRV1・F 蛋白 A 鎖では、6 ヶ所の立体構造エピトープと 7 ヶ所の線状エピトープが推定された (三量体構造では 18 ヶ所の立体構造エピトープと 21 ヶ所の線状エピトープとなる) (図 4、5 ならびに表 6)。系統 1、2 あるいは 3 の株では、予測された立体構造エピトープ領域にはアミノ酸置換は見られなかったが、その近傍には、1 残基の置換 (Glu63Gln) が存在し、立体構造モデルの表面にも位置していた。また、立体構造エピトープの 1 残基 (473Ser) に中和抗体結合部位が確認され、負の選択部位とも重複していた (図 5)。線状エピトープでは、1 か所 (アミノ酸 529-552) に 4~6 残基のアミノ酸置換が見られたが、いずれも立体構造モデルの表面には位置していなか

った。また、線状エピトープ近傍でも 2 残基のアミノ酸置換 (Arg442Gly、Asn553Leu もしくは Asn553His) が見られ、1 残基 (Arg442Gly) は立体構造モデルの表面に位置していた。特筆すべきことに、HRV1・F 蛋白 A 鎖においては、6 ヶ所の立体構造エピトープのうち 5 ヶ所、すべての線状エピトープは、実験的に決定された中和抗体結合部位¹³⁾と一致しなかった。一方、立体構造エピトープの 1 残基 (アミノ酸 473) のみが一致した (図 4 ならびに 5)。

6. BSP 法を用いた HRV1・F 遺伝子の系統動力学解析結果

図 3 に示すように、HRV1 株の F 遺伝子の系統動力学を BSP 解析法を用いて解析し、有効ポピュレーションサイズ (Effective population size, EPS) の変動を解析した。すべての株の EPS は、1995 年から 2008 年の間に倍増していた (図 6a)。同様に、系統 2 の株では、2003 年から 2008 年にかけて EPS が約 2 倍に増加した (図 6b)。一方、系統 3 では、2008 年頃に一度だけ、EPS の急激な増加が観察された (図 6c)。系統 1 株の検出年は同じ (1997 年) であったため、EPS を算出できなかった。これらの EPS の時系列的動態解析の結果から、2008 年前後に全株で EPS が急増したのは、主に系統 3 の世界的感染拡大によると推察された^{69,70)}。

IV. 考察

HRV1 は HRV3 と同様に、特に小児や高齢者において、公衆衛生学上ならびに臨床医学的に重要な呼吸器ウイルスであると考えられている^{39,71-76}。しかし、分子進化学的研究も含め、これまでに報告された HRV に関する研究は、そのほとんどが、罹患頻度が最も高い HRV3 に焦点を当てているものである^{36,37}。また、HRV の F 蛋白立体構造解析による当該蛋白の機能や再感染の原因についても HRV3 のみ解明が進んでいる^{40,41}。よって、HRV1 の F 蛋白における詳細な立体構造に加え、エピトープと中和抗体結合部位の関係性はほとんど不明であった³⁸。さらに、HRV1・F 遺伝子に関するいくつかの報告は、国内または部分的な塩基長による遺伝子解析に基づく⁷⁷。このような背景から、本研究においては、様々な国の HRV1 株における全長 F 遺伝子の詳細な分子進化を明らかにするために、時系列系統解析、系統間距離解析、ゲノムポピュレーションサイズならびに F 蛋白の選択圧解析および抗原性解析を行った。その結果、BMCMC 法を用いて構築された時系列系統樹から、HRV1・F 遺伝子の共通祖先は 1957 年に分岐し、その子孫は進化を続け、3 つの系統を形成したと推定された (図 2)。また、BSP 法を用いた系統動力学解析では、F 遺伝子の有効ゲノムポピュレーションが約 80 年間で 2 倍になることが示され、このことは、2008 年頃の新たな系統 (系統 3) の出現と世界的な拡散によるものと思われた^{69,70,78}。さらに、遺伝的多様性を評価

する株間の系統距離解析では、系統間の系統学的距離は短く (<0.02 ; 図 3)、*F* 遺伝子の配列が保存されていることが示された。くわえて、選択圧解析では、HRV1・*F* 蛋白の正の選択部位は検出されなかったが、複数の負の選択部位が推定された (表 4)。また、*F* 蛋白の立体構造エピトープ領域の 1 残基 (473Ser) が中和抗体結合部位と重複することが確認され、このアミノ酸残基は負の選択部位とも重複していた。しかし、それ以外の立体構造エピトープの 5 領域とすべての線状エピトープの領域は、中和抗体結合部位と一致していなかった (図 5 および表 6)。くわえて、立体構造エピトープ領域には、アミノ酸置換が認められなかった。以上の知見は、初めての報告であると思われる³⁸⁾。さらに、これらの知見を各項目に分けて、以下に考察する。

1. HRV1・*F* 遺伝子の時系列系統解析

BMCMC 法を用いて HRV1・*F* 遺伝子の時系列系統解析を行った結果、当該遺伝子は約 60 年の間に、多くのクラスターを持つ 3 系統を形成していることが明らかになった (図 2)。そのうち、系統 3 に属する株が BMCMC 系統樹上、1990 年代後半から優勢になった^{69, 70, 78)}。既報では、2011 年から 2015 年の間、東日本の急性呼吸器感染症患者を対象にした HRV1 の *F* 蛋白全長遺伝子配列を基に ML 法による系統解析の報告では、HRV1 株は 3 つの系統を形成し、さらに調査期間 (2011-2015 年) 中は系統 3

の株が優勢であった⁷⁸⁾。この知見は、本研究の結果とおおむね一致しているが、既報では HRV1・F 遺伝子の BMCMC 法による時系列系統解析は実施されていない⁷⁸⁾。そこで、本研究では、BMCMC 法を用いて時系列の系統解析を行った結果、共通祖先と各系統の分岐年が推定可能となった (図 2)。また、山形県で分離された HRV1 のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ (HN) 糖蛋白全長遺伝子の分子疫学解析においては、近隣結合法 (NJ 法) や ML 法など異なる系統解析法を用いた結果、解析株は 2 系統に分類され、さらに多数のクラスターを形成していることが示された^{37,79)}。これらの結果は、本研究における F 遺伝子での系統解析とは異なるものであった。この差異は、F 遺伝子と HN 遺伝子は、独立して進化していることによると考えられる³⁸⁾。また、解析法の違いや解析株の地域が限定されたていることなども影響している可能性がある。^{37,79,80)}

2. HRV1・F 遺伝子の進化速度

本研究において、HRV1・F 遺伝子の平均進化速度は 8.504×10^{-4} 置換数/部位/年 (s/s/y) と推定された (表 3)。これは、以前に報告された HRV3 および RSV の F 遺伝子の進化速度と類似していた^{41,81)}。さらに、系統 3 の HRV1 株の進化速度は系統 2 のそれよりも速いことが判明したが、過去の HRV3・F 遺伝子に関する進化学的研究ではこのような差異は見られなかった⁴¹⁾。くわえて、これらの知見は、異なる属および種に属

するウイルスである RSV の *F* 遺伝子については見られない^{81, 85)}。よって、このような系統間による進化速度の差異は、HRV1・*F* 遺伝子にのみ見られる可能性がある³⁸⁾。なお、これらの進化速度の差異に関するメカニズムについては今後の研究課題であると思われる^{35, 82)}。

3. HRV1・*F* 遺伝子のゲノムポピュレーションの推移

HRV1・*F* 遺伝子の系統動力学的解析では、HRV1・*F* 遺伝子の有効ゲノムポピュレーションサイズ (EPS) が約 80 年間で倍増していることが示された (図 6)。また、これらの変動は、系統 2 および 3 の株の出現とほぼ一致していた (図 2)。過去の報告では、HRV3・*F* 遺伝子の EPS が 2000 年から 2010 年の間に一度だけ増加したことが示されており、HRV1 と HRV3 との間では EPS の推移が異なっていた。Aso ら⁴¹⁾は、診断方法の変化が影響している可能性についても言及しているが、詳細については今のところ不明であり、今後の課題と思われる⁸³⁾。

4. HRV1・*F* 遺伝子の系統間距離

図 3 に示すように、HRV1・*F* 遺伝子の株間平均系統間距離は、約 0.019 であり、HRV1 の *F* 遺伝子の株間の遺伝学的距離は比較的短いことが推察された (図 3)。これは、以前の研究で、我が国で検出された HRV1 株の *F* 遺伝子の系統間距離を約 0.018 と報告したものとほぼ一致していた⁷⁸⁾。さらに、過去の報告では、HRV3・*HN* 遺伝

子で 0.030⁸⁴⁾、HRV3・F 遺伝子で 0.033⁴¹⁾と比較的短い距離であったが、本研究における HRV1・F 遺伝子における距離はさらに短いものであった。このことから、HRV1・F 遺伝子は、HRV3 の HN 遺伝子および F 遺伝子より遺伝学的多様性が低くかつ高い塩基配列の保存性を示していると考えられた³⁸⁾。このような過去の報告と本研究の結果は、F 遺伝子を保有する様々なウイルスにおいて、遺伝学的多様性が異なっている可能性を示唆している^{81, 85)}。

5. HRV1・F 蛋白選択圧解析

一般に、正の選択圧は、細胞性免疫や体液性免疫などの宿主防御機構からの逃避 (Escape) を意味する⁸⁶⁾。また、負の選択圧は、非同義置換により抗原性や感染性の低下を回避するために生じると考えられている⁸⁷⁾。本研究では、解析に用いた HRV1・F 蛋白においては、正の選択部位は認められなかったが、複数の負の選択部位が同定された (表 4)。このことは、HRV1・F 蛋白では、その機能や構造変化を起しにくくするために負の選択圧が作用し、抗原性や感染性を維持していると考えられた⁸⁷⁾。したがって、HRV1・F 蛋白は、抗原性を維持し、抗体による認識は行われるものの、獲得免疫機構による排除自体は受けにくい可能性がある⁸⁷⁾。また、HRV3・F 蛋白についても同様の知見が報告されている³⁴⁾。さらに、HRV1・F 蛋白の負の選択部位は、三次元立体構造上、エピトープの周辺に位置していた。このことは、これらの部位が、細

胞受容体結合ドメインにおいて重要な役割を果たすことを示している⁸⁷⁾。

6. HRV1・F 蛋白のエピトープ解析と中和抗体結合部位

次に、F 蛋白における 6 つの立体構造エピトープのうち 5 つの部位とすべての線状エピトープは、中和抗体結合部位と一致していなかった (図 5)。この不一致は、HRV1 のヒト再感染の原因機序の一端を説明する^{41,79)}。また、HRV3 や RSV などの関連する呼吸器 RNA ウイルスにおいても、立体構造エピトープと中和抗体結合部位が一致しないことから、同様のメカニズムによる再感染の可能性が指摘されている^{41,88)}。

また、HRV1・F 蛋白のアミノ酸置換、立体構造エピトープ、線状エピトープおよび中和抗体結合部位との関係性についても解析を行った (図 4 ならびに 5)。アミノ酸置換は、3 系統で共通する部位が多く、系統特有の置換は少なかった。さらに、予測された立体構造エピトープや中和抗体結合部位にはアミノ酸置換はなかった。注目すべきは、実験的に決定された中和抗体結合部位のほとんどが、立体構造エピトープや線状エピトープと一致しなかった。既報によれば、感染宿主における液性免疫の応答によって生じる中和抗体は、ウイルスの感染防御において極めて重要な役割を果たすが、抗原性と免疫原性は明確に異なる¹⁾。すなわち、立体構造エピトープや線状エピトープによって誘導された抗体が標的ウイルスを中和できない可能性がある^{1,29,30)}。これらのことと本研究で得られた結果を加味すると、HRV1・F 蛋白におけるエピトープと

当該蛋白の中和抗体結合部位とは立体構造上ほとんど重複しない（図 4）。よって、HRV1・F 蛋白のエピトープと中和抗体結合部位との不一致は、他のウイルス（HRV3 や RSV）でも報告されているように、HRV1 の再感染に関与している可能性がある^{41, 81)}。

7. 本研究の課題と将来の展望

本研究には、いくつかの限界がある。まず、解析に使用可能な株が、66 株と比較的少なかったことが挙げられる。サンプル数の少なさは、統計的な正確性に影響を与える可能性がある⁸⁹⁾。しかし、本研究は、地域を限定せず、網羅的に収集した HRV1・F 遺伝子を使用しており、現時点における限界と考えられる。登録されている株数が少なかった原因として、HRV1 の分子疫学に関する研究が不足していることと、HRV1 を研究している国の数が限られていることが考えられるが、上述の通り、HRV は急性下気道感染症の主要な病原体のひとつであり、本研究を契機としたさらなる研究の発展が期待される。

次に、同定されている中和抗体結合部位の少なさが挙げられる。本研究において使用した中和抗体結合部位は、2018 年に Stewart-Jones らの報告¹³⁾で、当時のパラインフルエンザ 1~4 型について、安定した Prefusion 型の F 蛋白を作成したものをマウス等に免疫し、Postfusion 型の F 蛋白の免疫原性よりも有意に高い中和力価を得たもので

あり、F 蛋白と抗体の複合体構造から中和抗体結合部位を同定している。しかし、精度の高い抗原抗体の複合体構造を作製するためには莫大な時間と高度な技術が必要となる。そのため、実験的に判明している F 蛋白と抗体の複合体構造は少なく、十分に中和抗体結合部位が同定できているとは言い難い。このような同定されている中和抗体結合部位の少なさが、中和抗体結合部位と予測されたエピトープ領域との間の不一致を生じさせている可能性がある。一方で、エピトープ解析について本研究では、精度を高めるために複数の計算方法を使用しており、さらに立体構造のみならず線状エピトープについても解析を行っている。このように解析精度を高め予測されたエピトープ領域であっても、中和抗体結合部位と一致していなかったことは重要な知見と考えられる。F 蛋白と抗体の複合体構造解析は、ワクチンや予防薬開発の観点からも重要であり、今後の進展が期待される。

V. 結論

本研究では、様々な国から網羅的に収集された HRV1 の F 遺伝子の全長配列について、バイオインフォマティクス技術を用いて分子進化解析を行った。その結果、HRV1・F 遺伝子は、約 60 年の間に、3 つの系統を形成しながら進化してきた。また、F 遺伝子の配列は保存性が高い一方で、負の選択圧により、抗原性を維持し、長年にわたる

HRV1 感染の原動力になったと思われた。このことは、HRV3 や RS ウイルスでも確認されているが、他の F 蛋白遺伝子を有する他のウイルス、例えばヒトオルソルブラウイルスにも共通している可能性がある。さらに、F 蛋白の立体構造および線状エピトープと中和抗体結合部位の不一致は、HRV1 のヒトへの再感染に関与すると考えられた。以上のことから、HRV1 は一定の遺伝学的多様性を獲得しながら、長年にわたり進化し続け、ヒト-ヒト間の感染を引き起こしてきたことが推定される。

VI. 図・表

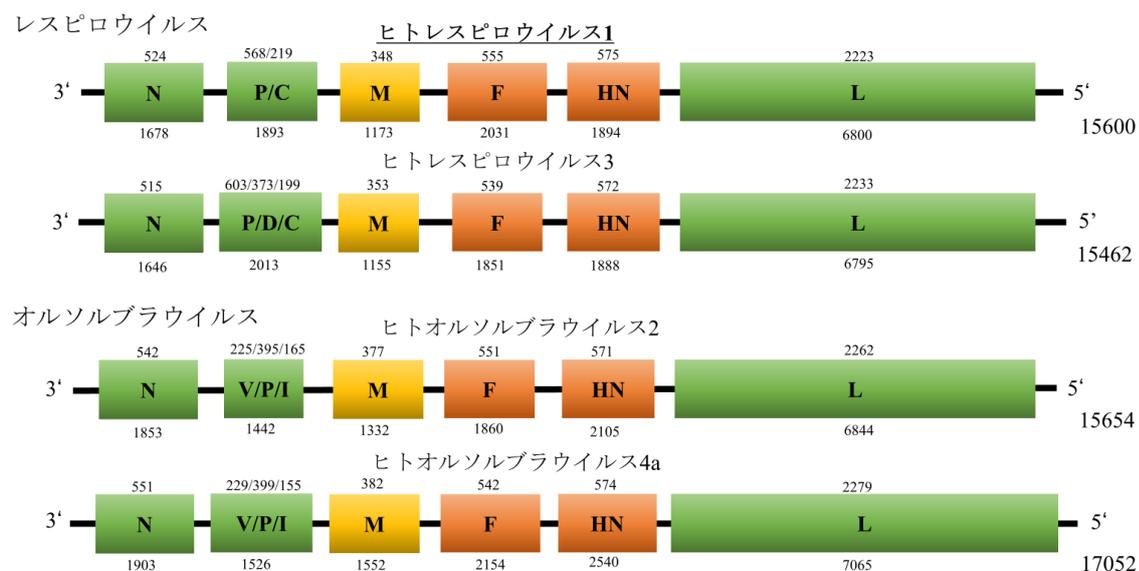


図1. ヒトレスピロウイルスおよびヒトオルソソブラウイルスのゲノム上の遺伝子構成

各ゲノムを転写方向の3' から5' に向かって示した。ゲノムは長方形で示し、ヌクレオカプシド関連のアクセサリ蛋白を緑色、膜表面糖蛋白を橙色、エンベロープ内側のマトリクス蛋白を黄色で示した。各遺伝子構成は、次の株に基づいた。

HRV1 : Washington/1964 strain (GenBank アクセッション番号 NC_006430)

HRV3 : JS strain (GenBank アクセッション番号 X11575)

HORV2 : V94 strain (GenBank アクセッション番号 AF533010)

HORV4 : Toshiba/M-25/1966 strain (GenBank アクセッション番号 AB543336)

Karron and Collins, 2013 を元に筆者作成

最適モデル: TrN+I
 分子時計モデル: Relaxed Clock Log Normal
 系統樹モデル: Coalescent Exponential Population
 連鎖回数: 10,000,000
 データ取得タイミング: 5000

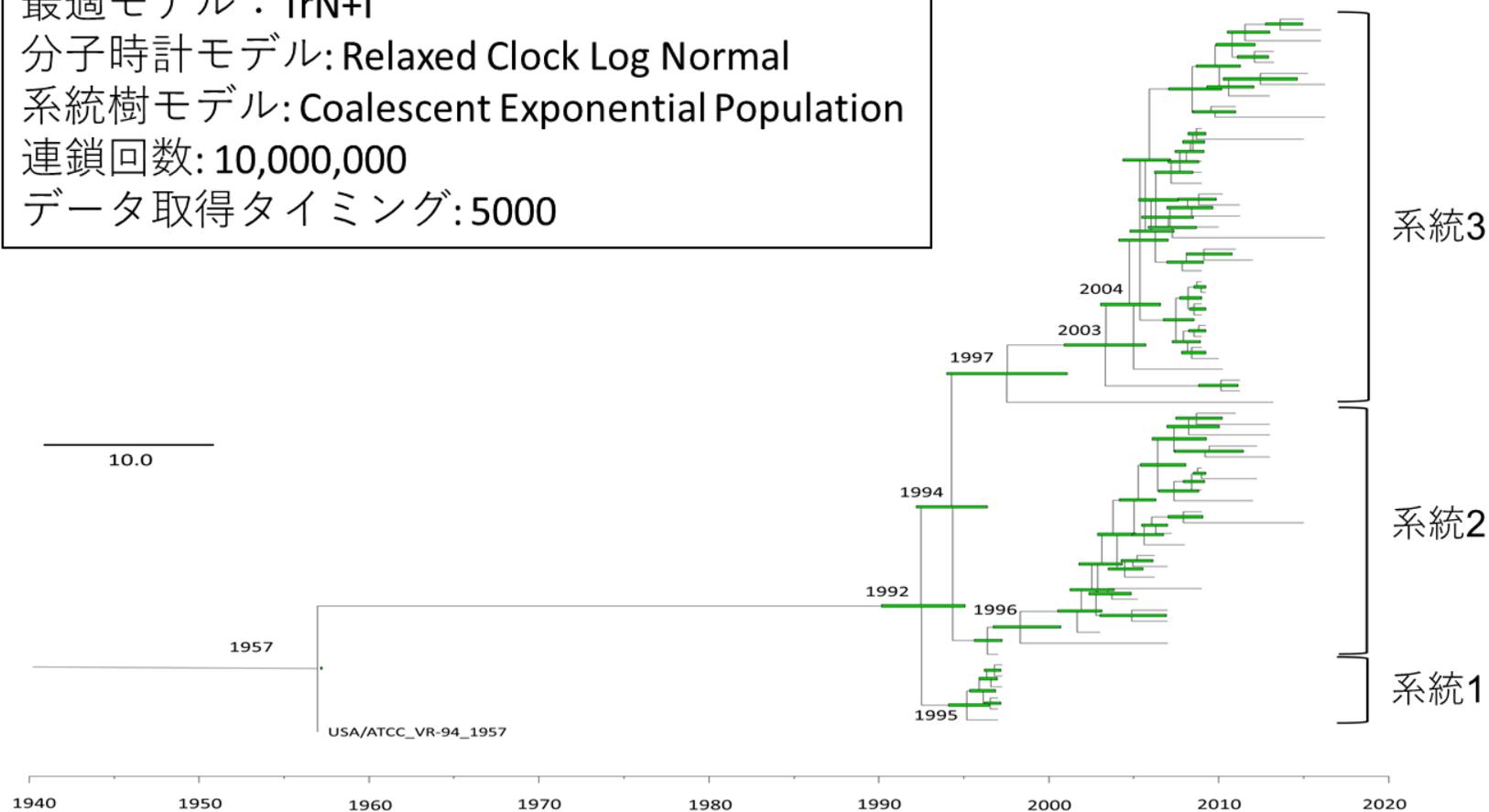
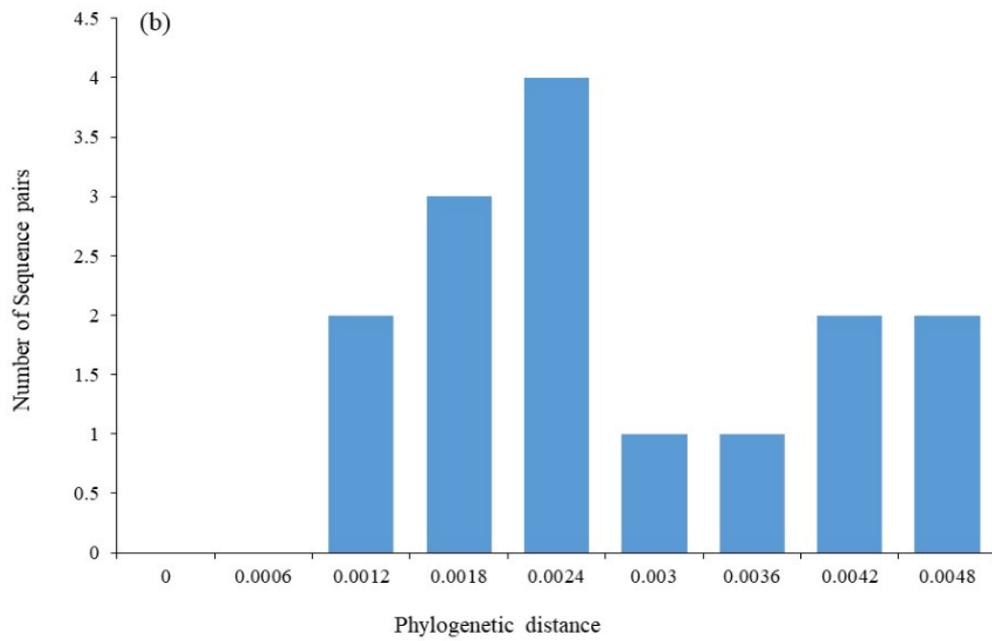
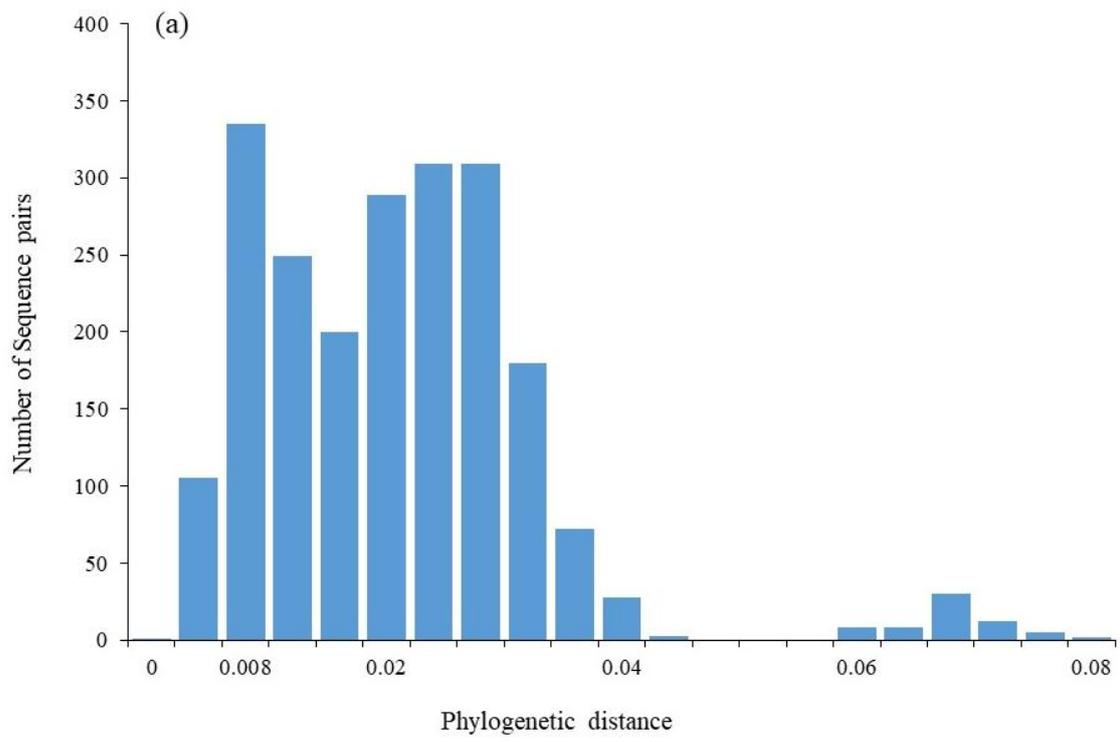


図2. ベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ (BMCMC) 法によって構築された全長 HRV1・F 遺伝子の時系列系統樹
 縮尺記号は時間 (年) を表す。緑のバーは、推定分岐年代の 95% Highest Posterior Density (95%HPD) を示す。



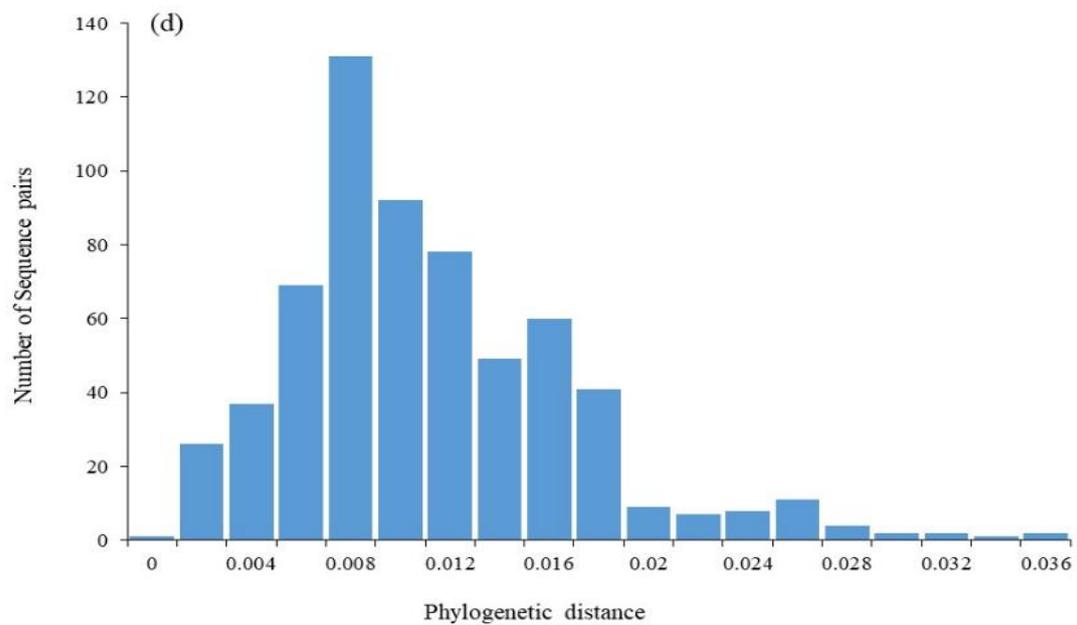
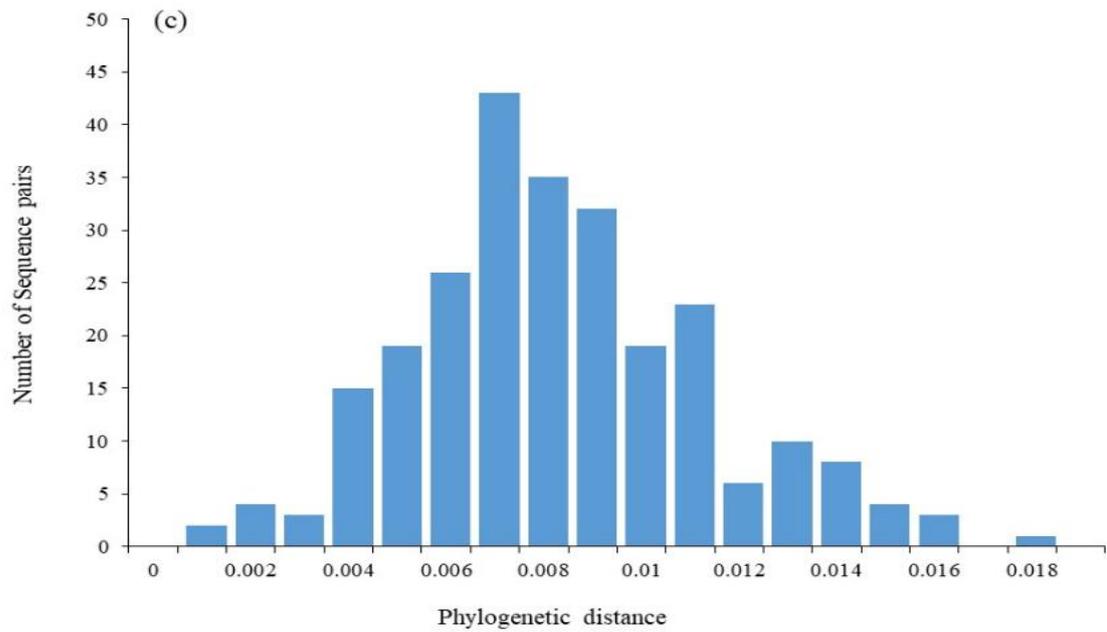


図3. HRV1 株の *F* 遺伝子の系統間距離

(a) 全 66 株、(b) 系統 1、(c) 系統 2、および (d) 系統 3 のヒストグラムを示す。

y 軸と x 軸はそれぞれ各距離に相当する配列数と系統間距離を示す。

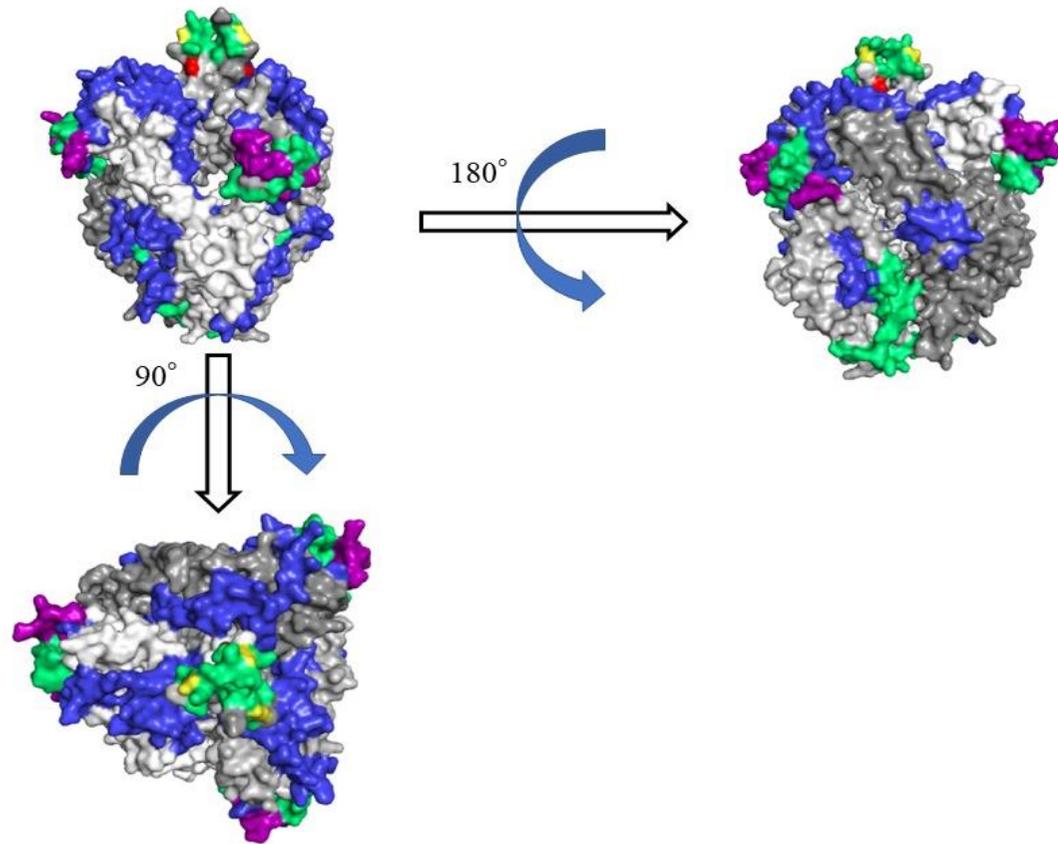


図4. HRV1株 (USA/1957) のF蛋白 (Prefusion型) の構造モデル

三量体構造を構成する糖鎖は、白色 (A鎖)、薄灰色 (B鎖)、濃灰色 (C鎖) で色分けした。立体構造エピトープと線状エピトープは、それぞれライムグリーンとTVブルーで示した。立体構造エピトープと線状エピトープが重なる部分は紫色で示す。これまでに同定されたエピトープ (中和抗体結合部位) は赤色で示し、そのうち立体構造エピトープと重なるものは黄色で示した。

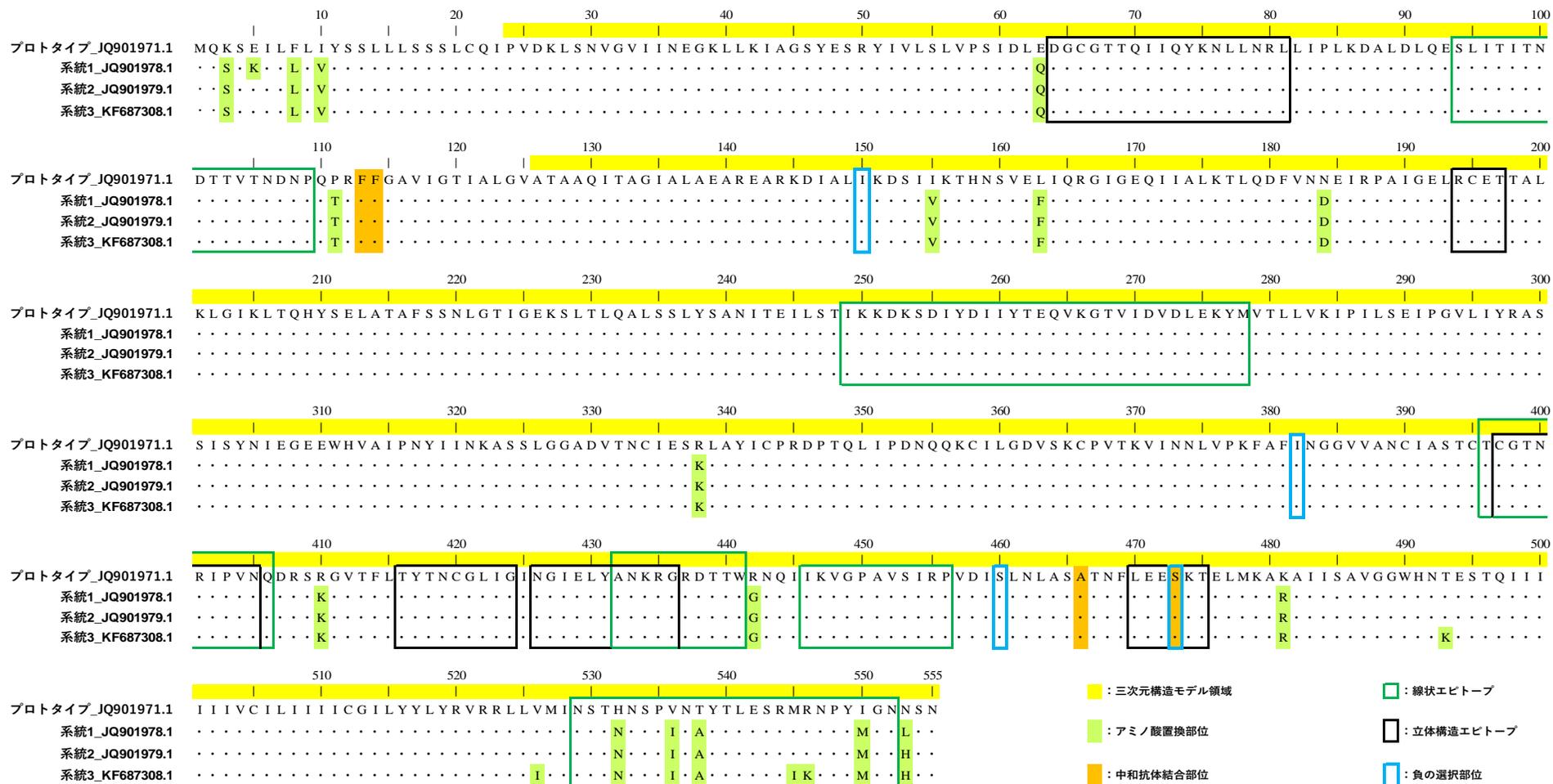
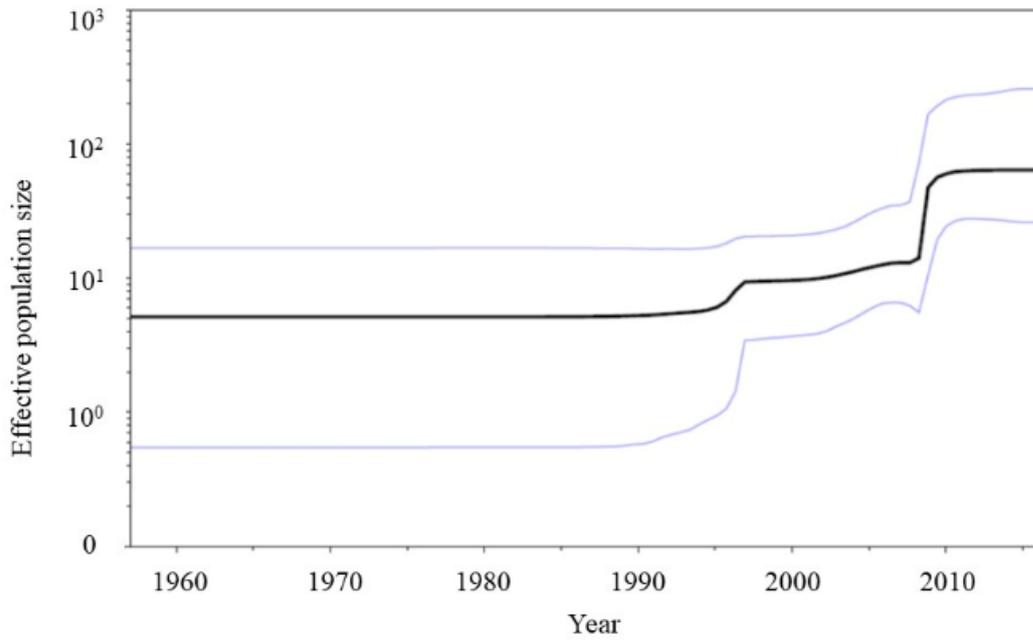


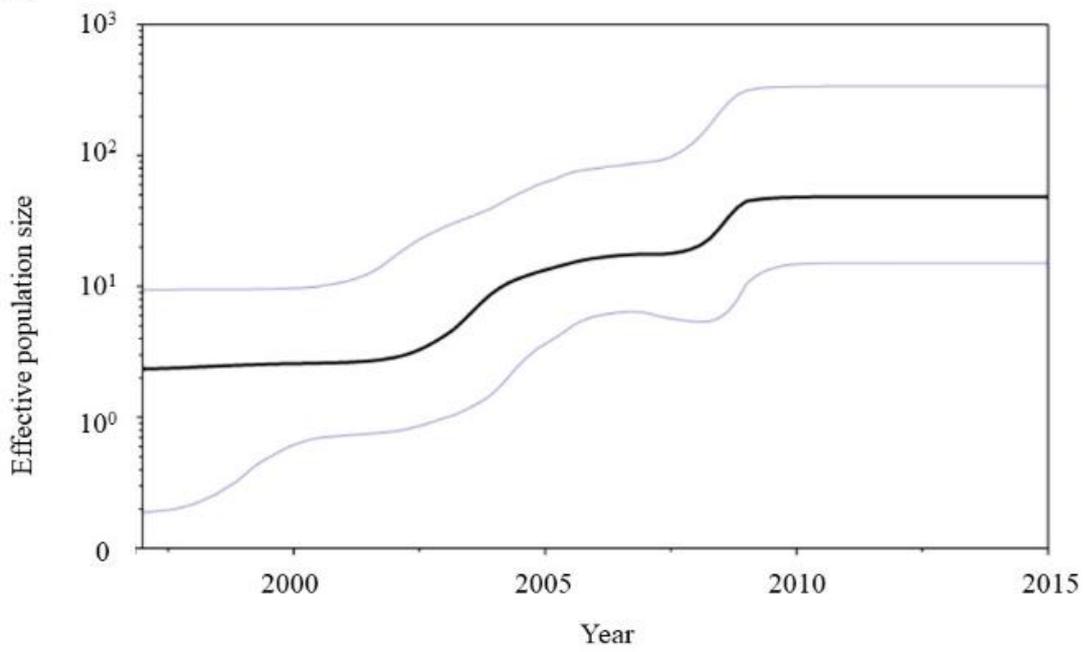
図5 本研究で検討したHRV1・F蛋白A鎖アミノ酸配列。

HRV1・F蛋白の立体構造構築に使用したアミノ酸残基番号は黄色で表示した。中和抗体結合部位と変異のアミノ酸残基は、それぞれオレンジ色と薄緑色で表示した。黒色と緑色の枠は、それぞれ立体構造エピトープと線状エピトープ部位である。青色の枠は、4つの方法（SLAC、FEL、IFEL、FUBAR）すべてで共通して検出された負の選択部位を示す。

(a)



(b)



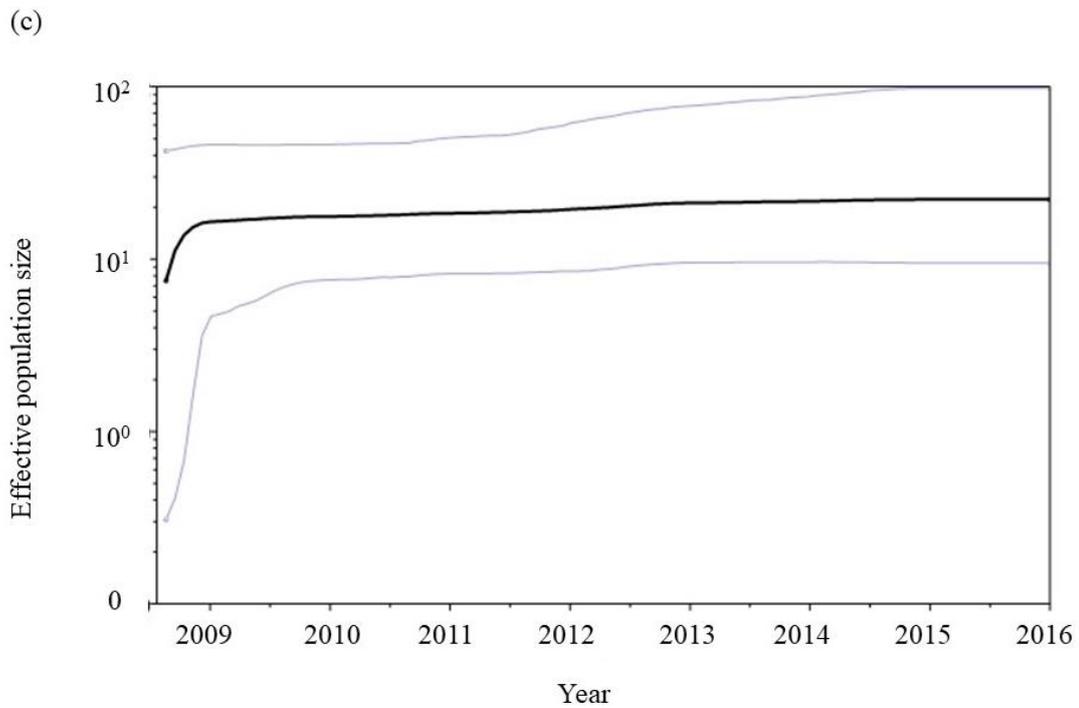


図 6. ベイジアンスカイラインプロット (BSP) 法を用いた HRV1・*F* 遺伝子のゲノムポピュレーション解析。

(a) 全 66 株、(b) 系統 2、および (c) 系統 3 のゲノムポピュレーションサイズの推移を示す。Y 軸と X 軸は、それぞれゲノムポピュレーションサイズと時間 (年単位) を示す。太い黒線は、時間の経過に伴う中央値を示す。細い青線は、95% HPD の幅を表す。

表1. ヒトレスピロウイルスおよびヒトオルソルブラウイルスの分類および種名変更

(a) ヒトレスピロウイルス1 および3

種名変更 (ICTV再定義) 年	1971年	1995年	2016年	2018年	2022年
亜科	—	パラミクソウイルス亜科	—	オルソパラミキソウイルス亜科	オルソパラミキソウイルス亜科
属	パラミクソウイルス属	パラミクソウイルス属	レスピロウイルス属	レスピロウイルス属	レスピロウイルス属
種	パラインフルエンザウイルス1 パラインフルエンザウイルス3	ヒトパラインフルエンザウイルス1 ヒトパラインフルエンザウイルス3	ヒトレスピロウイルス1 ヒトレスピロウイルス3	ヒトレスピロウイルス1 ヒトレスピロウイルス3	レスピロウイルス ラリngoトラケイティディス (Respirovirus laryngotracheitidis) レスピロウイルス ニューモニア (Respirovirus pneumoniae)

(b) ヒトオルソルブラウイルス2 および4

種名変更 (ICTV再定義) 年	1971年	1995年	2016年	2018年	2022年
亜科	—	パラミクソウイルス亜科	—	ルブラウイルス亜科	ルブラウイルス亜科
属	パラミクソウイルス属	ルブラウイルス属	ルブラウイルス属	オルソルブラウイルス属	オルソルブラウイルス属
種	パラインフルエンザウイルス2 パラインフルエンザウイルス4	ヒトパラインフルエンザウイルス2 ヒトパラインフルエンザウイルス4a ヒトパラインフルエンザウイルス4b	ヒトルブラウイルス2 ヒトルブラウイルス4	ヒトオルソルブラウイルス2 ヒトオルソルブラウイルス4	オルソルブラウイルス ラリngoトラケイティディス (Orthorubulavirus laryngotracheitidis) オルソルブラウイルス ホミニス (Orthorubulavirus hominis)

表 2. 解析に使用した株 (HRV1)

GenBank accession No.	株名	分離/検出年	発生国	系統
MH892404	t146a291_HPIV1	2013	Netherlands	2
MH892403	t146a290_HPIV1	2013	Netherlands	2
JQ902010	HPIV1/WI/629-D02071/2010	2010	USA	3
JQ902007	HPIV1/WI/629-D02039/2009	2009	USA	3
JQ902005	HPIV1/WI/629-D02209/2009	2009	USA	3
JQ902004	HPIV1/WI/629-D01575/2009	2009	USA	3
JQ902003	HPIV1/WI/629-D01145/2009	2009	USA	2
JQ902001	HPIV1/WI/629-D01790/2009	2009	USA	3
JQ902000	HPIV1/WI/629-D01463/2009	2009	USA	3
JQ901998	HPIV1/WI/629-D00387/2009	2009	USA	3
JQ901995	HPIV1/WI/629-D01809/2009	2009	USA	3
JQ901993	HPIV1/WI/629-D02130/2009	2009	USA	3
JQ901992	HPIV1/WI/629-D01202/2009	2009	USA	3
JQ901989	HPIV1/WI/629-D00712/2009	2009	USA	3
JQ901986	HPIV1/WI/629-D01681/2009	2009	USA	3
JQ901984	HPIV1/WI/629-030/2007	2007	USA	2
JQ901980	HPIV1/WI/629-009/1997	1997	USA	1
JQ901979	HPIV1/WI/629-007/1997	1997	USA	2*
JQ901978	HPIV1/WI/629-008/1997	1997	USA	1*
JQ901977	HPIV1/WI/629-006/1997	1997	USA	1
JQ901976	HPIV1/WI/629-003/1997	1997	USA	1
JQ901975	HPIV1/WI/629-001/1997	1997	USA	1
JQ901973	HPIV1/WI/629-004/1997	1997	USA	1
JQ901971	ATCC VR-94	1957	USA	prototype
MK167043	CHLA36	2016	USA	3
MH685717	E0-033	2013	Uganda	3
MG773273	HPIV1/BuenosAires/ARG/001/2016	2016	Argentina	3

表 2. (続き) 解析に使用した株 (HRV1)

GenBank accession No.	株名	分離/検出年	発生国	系統
KY967354	10D6	2015	USA	3
KY967353	10F7	2015	USA	2
KY674973	16A6	2016	USA	3
KY674967	12S10	2016	USA	3
KY674940	9P4	2016	USA	3
KX639498	NM001	2015	USA	3
KX570602	AR001	2015	USA	3
KT992807	HPIV1s/Zagreb.HR/50.13(1833)	2013	Croatia	2
KT992806	HPIV1s/Zagreb.HR/47.13(1712)	2013	Croatia	3
KT992805	HPIV1s/Zagreb.HR/46.13(1638)	2013	Croatia	3
KT992804	HPIV1s/Zagreb.HR/44.13(1564)	2013	Croatia	3
KT992803	HPIV1s/Zagreb.HR/47.12(3225)	2012	Croatia	2
KT992802	HPIV1s/Zagreb.HR/8.12(2000)	2012	Croatia	2
KT992801	HPIV1s/Zagreb.HR/3.12(1022)	2012	Croatia	3
KT992800	HPIV1s/Zagreb.HR/48.11(18491)	2011	Croatia	3
KT992799	HPIV1s/Zagreb.HR/47.11(18133)	2011	Croatia	3
KT992798	HPIV1s/Zagreb.HR/42.11(16046)	2011	Croatia	2
KT992797	HPIV1s/Zagreb.HR/38.11(14501)	2011	Croatia	3
KM190940	VIROAF9	2012	Thailand	2
KF530217	HPIV1/MEX/1521/2005	2005	Mexico	2
KF530196	HPIV1/MEX/3040/2006	2006	Mexico	2
KF687315	HPIV1/USA/32193A/2010	2010	USA: SE Wisconsin	3
KF687314	HPIV1/FRA/30384043/2010	2010	France	3
KF687313	HPIV1/FRA/29221106/2009	2009	France	2
KF687312	HPIV1/FRA/27344044/2007	2007	France	2
KF687311	HPIV1/ZAF/879/2010	2010	South Africa	3

表 2. (続き) 解析に使用した株 (HRV1)

GenBank accession No.	株名	分離/検出年	発生国	系統
KF687310	HPIV1/AUS/54/2007	2007	Australia	2
KF687308	HPIV1/USA/629-D02161/2009	2009	USA: Milwaukee, WI	3*
KF687307	HPIV1/USA/629-D00712/2009	2009	USA: Milwaukee, WI	3
KF530221	HPIV1/AUS/53/2007	2007	Australia	2
KF530212	HPIV1/USA/38081A/2011	2011	USA: SE Wisconsin	3
KF530211	HPIV1/USA/33095J/2011	2011	USA: SE Wisconsin	3
KF530208	HPIV1/FRA/26503037/2006	2006	France	2
KF530206	HPIV1/ARG/16482/2008	2008	Argentina	2
KF530205	HPIV1/AUS/57/2007	2007	Australia	2
KF530203	HPIV1/USA/38078A/2011	2011	USA: SE Wisconsin	3
KF530202	HPIV1/USA/629-2/2009	2009	USA: SE Wisconsin	2
KF530198	HPIV1/MEX/495/2003	2003	Mexico	2
KF530197	HPIV1/FRA/29342077/2009	2009	France	2

* 各系統の代表株

表 3. HRV1 全株と各系統の進化速度

	進化速度 (95% HPD) (置換数/部位/年)	有効サンプル サイズ
全 66 株	8.504×10^{-4} (7.003×10^{-4} to 1.0008×10^{-3})	220
系統 1 (6 株)	—	—
系統 2 (23 株)	6.580×10^{-4} (4.784×10^{-4} to 8.4595×10^{-4})	4053
系統 3 (36 株)	1.205×10^{-3} (7.159×10^{-4} to 1.6866×10^{-3})	954

表4. HRV1・F蛋白の選択圧解析

予測アミノ酸残基	
正の選択部位	なし
負の選択部位	150、382、460、473

※アミノ酸残基はプロトタイプ株 (JQ901971.1; hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957) に対応.

表5. HRV1・F蛋白におけるアミノ酸置換部位

系統（代表株）	アミノ酸置換	
	特有	共通
系統1 (JQ901978.1)	Glu5Lys	Lys3Ser, Phe8Leu, Ile10Val, Glu63Gln , Pro111Thr, Ile155Val , Leu163Phe , Asn184Asp , Arg338Lys , Arg410Lys , Arg442Gly , Lys481Arg, His532Asn, Val536Ile, Thr538Ala, Ile550Met, Asn553His
系統2 (JQ901979.1)	なし	
系統3 (KF687308.1)	Thr493Lys, Val526Thr, Met545Ile, Arg546Lys	

* アミノ酸残基はプロトタイプ株（JQ901971.1；hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957）に対応

表6. F蛋白の立体構造/線状エピトープ領域と中和抗体結合部位

	アミノ酸残基*
立体構造エピトープ領域	64-81, 194-197, 397-405, 416-424, 426-436, 470-475 (473)
線状エピトープ領域	94-109, 249-278, 345-367, 396-406, 432-441, 446-456, 529-552
中和抗体結合部位 (Stewart-Jones et al., 2018)	113, 114, 466, 473

* アミノ酸残基はプロトタイプ株 (JQ901971.1; hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957) に対応

VII. 補足図・補足表

補足表 S1. BEAST のパスサンプリング解析による全ての Clock Model と Tree prior models の限界尤度値

(a) 全 66 株

		Tree prior models		
		Coalescent Constant	Coalescent Exponential	Coalescent Bayesian skyline
Clock models	Strict Clock	-4878.146706	-4879.187345	-4869.313318
	Exponential Relaxed Clock	-4874.091096	-4869.953776	-4865.445637
	Log-normal Relaxed Clock	-4876.50711	-4869.938149	-4869.551611
	Random Local Clock	-4875.976546	-4871.690871	-4871.367967

(b) 系統 2 (23 株)

		Tree prior models		
		Coalescent Constant	Coalescent Exponential	Coalescent Bayesian skyline
Clock models	Strict Clock	-3081.051892	-3074.811169	-3076.934186
	Exponential Relaxed Clock	-3082.865623	-3081.329424	-3081.08494
	Log-normal	-3080.425283	-3074.586409	-3076.476875
	Random Local Clock	-3079.561745	-3074.491269	-3075.712941

(c) 系統 3 (36 株)

		Tree prior models		
		Coalescent Constant	Coalescent Exponential	Coalescent Bayesian skyline
Clock models	Strict Clock	-3472.258194	-3471.304512	-3473.178272
	Exponential Relaxed Clock	-3462.726234	-3459.647279	-3457.649676
	Log-normal Relaxed Clock	-3469.063292	-3469.975877	-3463.040816
	Random Local Clock	-3470.298825	-3469.856314	-3470.397122

*HRV1 の全 66 株のデータセットのパスサンプリングは、10,000,000 マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) chain length、5,000 logs、30 ステップごとの条件で行った。さらに、系統 1 と系統 2 のデータセットのパスサンプリングは、100,000,000 MCMC chain length、2,000 logs で 30 ステップごとにサンプリングする条件で行った。限界尤度値は、BEAST に実装されているパスサンプリングを用いて、このような条件で生成されたファイルに基づいて計算された。最大値は太字で示した。これらのモデルの組み合わせを各データセットの最終解析に適用した (表 S2 参照)。系統 1 に属する株数が少ない (6 株のみ) ため、パスサンプリングは実施できなかった。

補足表 S2. HRV1・F 遺伝子の BMCMC 解析におけるパラメータ

	Substitution Models	Gamma shape	Proportion invariant	Clock Models	Tree Prior Models	Chain Length	Log Every
All HRV1 (66) strains	TrN + I	-	0.618	Log-normal Relaxed Clock	Coalescent Exponential	10,000,000	5,000
Lineage1 (6 strains)	HKY	-	-	/	/	/	/
Lineage2 (23 strains)	HKY	-	-	Random Local Clock	Coalescent Exponential	100,000,000	2,000
Lineage3 (36 strains)	TrN + G	0.1130	-	Exponential Relaxed Clock	Coalescent Exponential	100,000,000	2,000

VIII. 引用文献

1. Ruth A.Karron PLC. Parainfluenza Viruses. In: David M. Knipe PMH, editor. Fields Virology, 6th Edition. Philadelphia, PA, USA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 996-1023.
2. Chanock RM. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exp Med.* 1956;104(4):555-76.
3. Chanock RM, Parrott RH, Cook K, Andrews BE, Bell JA, Reichelderfer T, et al. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *N Engl J Med.* 1958;258(5):207-13.
4. Abedi GR, Prill MM, Langley GE, Wikswo ME, Weinberg GA, Curns AT, et al. Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998-2010. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2016;5(1):7-13.
5. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):242-64.
6. Ruth A.Karron PLC. Parainfluenza Viruses. In: David M. Knipe PMH, editor. Fields Virology, 6th Edition. Philadelphia, PA, USA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1497-526.
7. Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, Poehling KA, Edwards KM, Griffin MR, et al. Parainfluenza virus infection of young children: estimates of the population-based burden of hospitalization. *J Pediatr.* 2009;154(5):694-9.
8. Rima BK. Re-organization of the family Paramyxoviridae 2018 [Available from: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201620&taxon_name=Respirovirus].
9. Fukushima K, Takahashi T, Takaguchi M, Ito S, Suzuki C, Agarikuchi T, et al. A I131V Substitution in the Fusion Glycoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 1 Enhances Syncytium Formation and Virus Growth. *Biol Pharm Bull.* 2019;42(5):827-32.
10. Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Ito Y. A mutant fusion (F) protein of simian virus 5 induces hemagglutinin-neuraminidase-independent syncytium formation despite the internalization of the F protein. *Virology.* 2006;347(1):11-27.
11. 入江崇 坂. パラミクソウイルスの出芽機構. *ウイルス.* 2007;57(1):1-8.
12. Robert A. Lamb GDP. Paramyxoviridae. In: David M. Knipe PMH, editor. Fields Virology, 6th Edition. Philadelphia, PA, USA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 957-95.
13. Stewart-Jones GBE, Chuang GY, Xu K, Zhou T, Acharya P, Tsybovsky Y, et al. Structure-based design of a quadrivalent fusion glycoprotein vaccine for human parainfluenza virus

- types 1-4. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(48):12265-70.
14. Porotto M, Palmer SG, Palermo LM, Moscona A. Mechanism of fusion triggering by human parainfluenza virus type III: communication between viral glycoproteins during entry. J Biol Chem. 2012;287(1):778-93.
 15. Marcink TC, Porotto M, Moscona A. Parainfluenza virus entry at the onset of infection. Adv Virus Res. 2021;111:1-29.
 16. Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. Clin Infect Dis. 2006;43(8):1016-22.
 17. Darwin C. On the origin of species : by means of natural selection2016.
 18. 渡部輝明、岸野洋久. ウイルスタンパク質変異にかかる多様化圧の空間分布. 統計数理. 2012;60(2):305-16.
 19. 伊藤公人. インフルエンザウイルスの抗原変異とバイオインフォマティクス. ウイルス. 2011;第 61 巻(第 1 号):3-14.
 20. Pappas N, Roux S, Hölzer M, Lamkiewicz K, Mock F, Marz M, et al. Virus Bioinformatics. Encyclopedia of Virology2021. p. 124-32.
 21. Seto D. Viral genomics and bioinformatics. Viruses. 2010;2(12):2587-93.
 22. Yurina V, Adianingsih OR. Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. Ther Adv Vaccines Immunother. 2022;10:25151355221100218.
 23. 岡本尚、皿井明倫. バイオインフォマティクスの過去、現在、そして未来へ向けて. Nagoya Med J. 2009;50:1-6.
 24. 中川草. 大量シーケンズ解析によって明らかになるウイルスの素顔. ウイルス. 2020;70(1):45-8.
 25. Janeway CA Jr TP, Walport M, et al. The Immune System in Health and Disease. Immunobiology, 5th edition2001.
 26. 小澤一史. 免疫組織化学の原理と基本. 日薬理誌. 2019;154:156-64.
 27. Van Regenmortel MH. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. Biologicals. 2001;29(3-4):209-13.
 28. 橘田和美. 抗原決定基 (エピトープ) . 日本食品科学工学会誌. 2006;53(7):399.
 29. Sharon J, Rynkiewicz MJ, Lu Z, Yang CY. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. Immunology. 2014;142(1):1-23.
 30. Lo YT, Shih TC, Pai TW, Ho LP, Wu JL, Chou HY. Conformational epitope matching and prediction based on protein surface spiral features. BMC Genomics. 2021;22(Suppl 2):116.

31. Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002829.
32. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Füsseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:514.
33. Ras-Carmona A, Pelaez-Prestel HF, Lafuente EM, Reche PA. BCEPS: A Web Server to Predict Linear B Cell Epitopes with Enhanced Immunogenicity and Cross-Reactivity. *Cells.* 2021;10(10).
34. Singh H, Ansari HR, Raghava GP. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PLoS One.* 2013;8(5):e62216.
35. 山口由美、五條堀孝. ウイルスの分子進化. *ウイルス.* 1996;46(1):1-6.
36. Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, et al. Human parainfluenza virus-associated respiratory tract infection among children and genetic analysis of HPIV-3 strains in Beijing, China. *PLoS One.* 2012;7(8):e43893.
37. Mizuta K, Tsukagoshi H, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Itagaki T, et al. Molecular evolution of the haemagglutinin-neuraminidase gene in human parainfluenza virus type 3 isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture, Japan. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 4):570-7.
38. Takahashi T, Akagawa M, Kimura R, Sada M, Shirai T, Okayama K, et al. Molecular evolutionary analyses of the fusion protein gene in human respirovirus 1. *Virus Res.* 2023;333:199142.
39. Branche AR, Falsey AR. Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016;37(4):538-54.
40. Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature.* 2006;439(7072):38-44.
41. Aso J, Kimura H, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Matsushima Y, et al. Molecular Evolution of the Fusion Protein (F) Gene in Human Respirovirus 3. *Front Microbiol.* 2020;10:3054.
42. Sievers F, Higgins DG. The Clustal Omega Multiple Alignment Package. *Methods Mol Biol.* 2021;2231:3-16.
43. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011;7:539.
44. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

- Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.
45. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2016;2(1):vew007.
 46. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772-80.
 47. Nascimento FF, Reis MD, Yang Z. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nat Ecol Evol.* 2017;1(10):1446-54.
 48. Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(4):e1003537.
 49. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012;9(8):772.
 50. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(3):452-8.
 51. Fourment M, Gibbs MJ. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol Biol.* 2006;6:1-5.
 52. Delport W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2455-7.
 53. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* 2005;21(10):2531-3.
 54. Weaver S, Shank SD, Spielman SJ, Li M, Muse SV, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes. *Mol Biol Evol.* 2018;35(3):773-7.
 55. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, et al. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Mol Biol Evol.* 2013;30(5):1196-205.
 56. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002764.
 57. Delano W L. The PyMOL Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org>. 2002.
 58. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2014;47:5 6 1-32.
 59. Shao N, Liu B, Xiao Y, Wang X, Ren L, Dong J, et al. Genetic Characteristics of Human Parainfluenza Virus Types 1-4 From Patients With Clinical Respiratory Tract Infection in

- China. *Front Microbiol.* 2021;12:679246.
60. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18(15):2714-23.
 61. Chang LA, Phung E, Crank MC, Morabito KM, Villafana T, Dubovsky F, et al. A prefusion-stabilized RSV F subunit vaccine elicits B cell responses with greater breadth and potency than a postfusion F vaccine. *Sci Transl Med.* 2022;14(676):eade0424.
 62. Shashkova TI, Umerenkov D, Salnikov M, Strashnov PV, Konstantinova AV, Lebed I, et al. SEMA: Antigen B-cell conformational epitope prediction using deep transfer learning. *Front Immunol.* 2022;13:960985.
 63. Zhou C, Chen Z, Zhang L, Yan D, Mao T, Tang K, et al. SEPPA 3.0-enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W388-w94.
 64. Galgonek J, Vymetal J, Jakubec D, Vondrášek J. Amino Acid Interaction (INTAA) web server. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W388-W92.
 65. Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* 2006;65(1):40-8.
 66. Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, et al. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep.* 2016;6:29400.
 67. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* 2005;22(5):1185-92.
 68. Hall MD, Woolhouse ME, Rambaut A. The effects of sampling strategy on the quality of reconstruction of viral population dynamics using Bayesian skyline family coalescent methods: A simulation study. *Virus Evol.* 2016;2(1):vew003.
 69. Beck ET, He J, Nelson MI, Bose ME, Fan J, Kumar S, et al. Genome sequencing and phylogenetic analysis of 39 human parainfluenza virus type 1 strains isolated from 1997-2010. *PLoS One.* 2012;7(9):e46048.
 70. Košutić-Gulija T, Slovic A, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D. A study of genetic variability of human parainfluenza virus type 1 in Croatia, 2011-2014. *J Med Microbiol.* 2016;65(8):793-803.
 71. Delage G, Brochu P, Pelletier M, Jasmin G, Lapointe N. Giant-cell pneumonia caused by parainfluenza virus. *J Pediatr.* 1979;94(3):426-9.
 72. Frank JA, Jr., Warren RW, Tucker JA, Zeller J, Wilfert CM. Disseminated parainfluenza infection in a child with severe combined immunodeficiency. *Am J Dis Child.* 1983;137(12):1172-4.

73. Karp D, Willis J, Wilfert CM. Parainfluenza virus II and the immunocompromised host. *Am J Dis Child.* 1974;127(4):592-3.
74. McIntosh K, Kurachek SC, Cairns LM, Burns JC, Goodspeed B. Treatment of respiratory viral infection in an immunodeficient infant with ribavirin aerosol. *Am J Dis Child.* 1984;138(3):305-8.
75. Weintrub PS, Sullender WM, Lombard C, Link MP, Arvin A. Giant cell pneumonia caused by parainfluenza type 3 in a patient with acute myelomonocytic leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 1987;111(6):569-70.
76. Wendt CH, Weisdorf DJ, Jordan MC, Balfour HH, Jr., Hertz MI. Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1992;326(14):921-6.
77. Ambrose MR, Hetherington SV, Watson AS, Scroggs RA, Portner A. Molecular evolution of the F glycoprotein of human parainfluenza virus type 1. *J Infect Dis.* 1995;171(4):851-6.
78. Tsutsui R, Tsukagoshi H, Nagasawa K, Takahashi M, Matsushima Y, Ryo A, et al. Genetic analyses of the fusion protein genes in human parainfluenza virus types 1 and 3 among patients with acute respiratory infections in Eastern Japan from 2011 to 2015. *J Med Microbiol.* 2017;66(2):160-8.
79. Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, et al. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology.* 2011;8:533.
80. 松井求. 分子系統解析の最前線. *JSBi Bioinformatics Review.* 2021;2(1):30-57.
81. Kimura H, Nagasawa K, Kimura R, Tsukagoshi H, Matsushima Y, Fujita K, et al. Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B. *Infect Genet Evol.* 2017;52:1-9.
82. 佐藤裕徳、横山勝. RNA ウイルスと変異. *ウイルス.* 2005;55(2):221-30.
83. Boskova V, Bonhoeffer S, Stadler T. Inference of epidemiological dynamics based on simulated phylogenies using birth-death and coalescent models. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(11):e1003913.
84. Takahashi M, Nagasawa K, Saito K, Maisawa SI, Fujita K, Murakami K, et al. Detailed genetic analyses of the HN gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture, Japan. *Infect Genet Evol.* 2018;59:155-62.
85. Kimura H, Nagasawa K, Tsukagoshi H, Matsushima Y, Fujita K, Yoshida LM, et al. Molecular evolution of the fusion protein gene in human respiratory syncytial virus

- subgroup A. *Infect Genet Evol.* 2016;43:398-406.
86. Barreiro LB, Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):17-30.
87. Domingo E. Virus Evolution. In: David M. Knipe PMH, editor. *Fields Virology, 5th Edition.* Philadelphia, PA, USA.: Lippincott Williams & Wilkins.; 2006. p. 3177.
88. Saito M, Tsukagoshi H, Sada M, Sunagawa S, Shirai T, Okayama K, et al. Detailed Evolutionary Analyses of the F Gene in the Respiratory Syncytial Virus Subgroup A. *Viruses.* 2021;13(12):2525.
89. Faber J, Fonseca LM. How sample size influences research outcomes. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(4):27-9.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始多大なるご指導を賜るとともに、学位取得の機会を与えていただきました群馬パース大学大学院 保健科学研究科保健科学専攻 医療科学領域 木村博一教授に心より深謝いたします。厳しく、そして熱心にご指導していただいたことで、私自身、大きく成長できたと思っております。

本研究の企画・遂行にあたり、ご指導いただきました横浜市立大学大学院 医学研究科 梁明秀教授、東京大学大学院 医学系研究科 医学部 微生物学 竹田誠教授に深謝いたします。

研究論文をまとめるにあたり、研究手法や論文作成の細部にわたりご教示いただいた杏林大学医学部 呼吸器内科 佐田充助教、群馬パース大学附属研究所 先端医療科学研究センター 白井達也研究員、同センター 木村龍介研究員、順天堂大学医学部附属順天堂医院 臨床検査部 赤川真緒技師、群馬パース大学 医療技術学部 検査技術学科 岡山香里准教授 林由里子准教授、同学部 臨床工学科 近土真由美講師に心より感謝申し上げます。最後に、終始温かく励ましてくれた家族に感謝します。

1. 主論文 (博士論文)

Takahashi T, Akagawa M, Kimura R, Sada M, Shirai T, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Takeda M, Ryo A, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the Fusion Protein Gene in Human Respirivirus 1. *Virus Research*. 2023 Aug;333:199142.

2. 副論文

Takahashi T, Kimura R, Shirai T, Sada M, Sugai T, Murakami K, Harada K, Ito K, Matsushima Y, Mizukoshi F, Okayama K, Hayashi Y, Kondo M, Kageyama T, Suzuki Y, Ishii H, Ryo A, Katayama K, Fujita K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses*. 2023 Jul 1;15 (7) :1497.

Takahashi T, Sasaki A, Takahashi M, Saito K, Kimura H. 鉄処理陽性荷電炭化物による下水処理施設放流水中のノロウイルス除去に関する研究. *日本防菌防黴学会誌*. 2013 Vol.41, No.8.

