

行政院國家科學委員會專題計畫研究成果報告

利用 RNA 雜交法及核酸定序研究台灣地區輪狀病毒之演化

Study of the evolution of rotaviruses in Taiwan by RNA hybridization and sequence analysis

計畫編號：NSC – 88 – 2314 – B002 – 257

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：李君男 執行機構及單位：國立台灣大學醫學院醫事技術學系

E-mail: cnalee@ha.mc.ntu.edu.tw

一、中文摘要

輪狀病毒是引起小兒急性腸胃炎的主要病原之一，本計畫為瞭解本地輪狀病毒之演化情形，利用 RNA 雜交試驗與分析多種基因研究本地流行之輪狀病毒之間的遺傳相關性，以期發現基因變異之來源。由 1981 年至 1998 年所搜集之輪狀病毒檢體中，至少已發現三種不同的重組輪狀病毒株。第一種重組輪狀病毒是屬於 G3P[4] 病毒，出現於 1982 年。分析此病毒之 VP7 基因，與其他類型的 G3 輪狀病毒明顯不同，有可能來自動物的輪狀病毒，其 NSP4 基因與 G2P[4] 病毒相似，故此病毒應是一種 G3 輪狀病毒與 G2P[4] 病毒產生的重組輪狀病毒株。第二種與第三種重組輪狀病毒分別屬於 G2P[4] 與 G1P[8] 病毒，其中之 G2 輪狀病毒造成 1993 年大流行，以 RNA 雜交法比較其與過去流行之輪狀病毒或國外流行之病毒之間的遺傳相關性，發現 1993 年流行之 G2 輪狀病毒有三個基因片段與之前流行之 G2 病毒有顯著之差異，經分析 VP1 基因之部分序列而確定此病毒應是經由基因重組而來。第三種重組輪狀病毒於 1995 年之流行中發現，經比較 VP6 基因，與 G3P[8] 病毒的相似性反而比其他同屬 G1P[8] 之病毒為高，再經比較 NSP4 基因，與 G2 病毒很相似。故它應為一種重組輪狀病毒株。本研究顯示台灣輪狀病毒的流行有一些與重組輪狀病毒株有關，

至於它們是否有些來自動物仍有待未來之研究。

關鍵詞：輪狀病毒、病毒演化、基因重組、基因分析

Abstract

Human rotavirus is the major etiological agent of acute gastroenteritis in children. In this study, RNA-RNA hybridization and nucleotide sequence analysis were utilized to analyze the genetic relatedness among the rotaviruses in Taiwan. Our results had shown that at least three different reassortants of rotavirus were present in Taiwan. The first reassortant was a G3P[4] virus and was recovered from a sample collected in 1982. The VP7 gene of this virus was distinct from all of the analyzed G3 rotaviruses. NSP4 gene of the G3 reassortant was similar to that of G2P[4] viruses. This reassortant was probably derived from coinfection of G3 and G2 rotaviruses. The second and third reassortants were belonged to G2P[4] and G1P[8] viruses, respectively. The G2 reassortants were responsible for the epidemic in 1993. The VP1 genes of these reassortants were distinct from those of the other G2 rotaviruses. The G1 reassortant was found in 1995. This reassortant was more closely related with G3 rotaviruses in VP6 gene than G1 rotaviruses. Further analysis of NSP4 gene revealed that the

NSP4 gene of this G1 reassortant was closely related with those of the G2 rotaviruses instead of G1 and G3 rotaviruses. This study demonstrated the presence of rotavirus reassortants in Taiwan. The origin of the genes of these reassortants will be analyzed in future studies.

Keywords: Rotavirus, evolution, genetic reassortment, genetic analysis

二、緣由與目的

輪狀病毒是引起人類和動物急性腸胃炎的主要病原之一(10,16)。輪狀病毒屬於呼腸孤病毒科(Reoviridae)之一員，病毒粒子內含有十一個雙鏈核糖核酸(dsRNA)基因片段，外由蛋白膜包圍著(7,15)。輪狀病毒的外蛋白層(Outer capsid)主要含有 VP7 及少量的 VP4 (20)，VP7 和 VP4 均分別和輪狀病毒的中和抗體之產生有關(1,9,19)，一般所謂的血清型(serotype)特異性即是由此兩種蛋白決定(12,21)，由 VP7 決定者稱為 G 血清型，取其為 Glycoprotein 之意(7)。VP7 在大多數的輪狀病毒是由第 9 個基因片段生成，少數由第七或第八個基因片段而來(6,11)。由 VP4 所決定之血清型稱為 P 血清型，取其為 Protease-sensitive 之意，VP4 是由第四個基因片段所生成(6,7)。已知之 G 血清型有十四種之多，人類輪狀病毒的 G 血清型主要有四種，G1-G4，另外四種血清型，G8、G9、G10 及 G12 較少見(5,22,28)。P 血清型之鑑定較困難，單源抗體不完整，目前多以基因分析之方式進行分型，至少可分成 19 種基因型(25)。核心(Core)結構主要由 VP1、VP2 和 VP3 組成，分由第一、二、三個基因片段所生成(2,18,20)。內蛋白層(Inner capsid)主要由 VP6 組成，VP6 是由第六個基因片段生成，是病毒粒子內含量最多之蛋白。以 VP6 之群性可將輪狀病毒分成 A-G 等七群，人類的輪狀病毒主要屬於 A 群。除了結構蛋白外，輪狀病毒有 5 個基因片段與非結構蛋白之生成有關(7)，其中第五、七、八、十一段基

因分別生成蛋白 NSP1、NSP3、NSP2、NSP5，這四種非結構蛋白均帶鹼性，具有與 RNA 結合之能力，在病毒複製過程中扮演重要之角色。第十段基因生成一 RER 透膜醣蛋白 NSP4，與輪狀病毒複製過程中之形態變化有關。

輪狀病毒之變異與演化是經由不同之機制而產生的，此三種機制為點的突變(Point mutation)亦即 drift、基因重組(Genome reassortment)亦即 shift、基因重新置換(Genome rearrangement) (7)。因輪狀病毒之基因體成片段狀，當兩種病毒同時感染一個細胞時，輪狀病毒之基因會產生重組之現象，亦即新產生之病毒其基因片段可能來自兩種病毒。研究病毒之間的差異，可以經由分析某段基因之核酸序列而能確切的瞭解此段基因之變化，但不可能將十一段基因均細做分析，耗費人力及金錢，欲瞭解病毒之間的相關性以 Northern blot 結合核酸雜交法最為實際可行，經由此種 RNA 雜交的方式，可以很快的瞭解兩個病毒十一個基因片段是否相似或那些基因片段有較大之差異。近幾年來亦因利用此法而發現一些人類輪狀病毒之流行與新產生之基因重組病毒株有關(24,29)。

小孩及嬰兒的急性腸胃炎常是由輪狀病毒引起的(3,8,13)，在國外的報告中指出在小孩三歲以前，超過百分之八十感染過此病毒(4,14)，通常之症狀是嚴重的下痢、發高燒、嘔吐及伴有脫水現象，重者必須住院，甚至導致死亡(9)，近年來更有報導指出輪狀病毒可能會引致神經性之症狀(17,19,23,26,27)，常需住院治療，故輪狀病毒感染影響民生及經濟甚鉅，先進國家積極發展疫苗，期有效控制急性腸胃炎之發生。為了解台灣地區輪狀病毒流行之狀況，本計畫利用 RNA 雜交法分析本地盛行之輪狀病毒之間的相關性，一個新的流行，其主要病毒是經由點的突變而來，或是經由與差異較大之病毒，特別是動物病毒產生基因重組而來，此種新興之病毒(Emerging virus)極可能會造成流行之狀態改變。期望經由本計畫深入研究病

毒之演化，進而瞭解一個流行是如何造成的，這將有助於未來感染之控制。

三、結果與討論

本計畫為瞭解本地輪狀病毒之演化情形，利用 RNA 雜交試驗與分析多種基因，以研究本地流行之輪狀病毒之間的遺傳相關性，以期發現基因變異之來源，是否為與動物之輪狀病毒產生基因重組之新興病毒，進而瞭解造成病毒流行之機制，這將有助於未來感染之控制。由 1981 年至 1998 年所搜集之輪狀病毒檢體中，至少已發現三種不同的重組輪狀病毒株。第一種重組輪狀病毒是屬於 G3P[4] 病毒，此種異常之 VP7 與 VP4 之組合相當罕見，出現於 1982 年。分析此病毒之 VP7 基因，與 1989 年流行的 G3 輪狀病毒相異性達 15.2% 以上，有可能來自動物的輪狀病毒，其 NSP4 基因與 1982 年流行的 G2P[4] 病毒相似，故此病毒應是一種 G3 輪狀病毒與 G2P[4] 病毒產生的重組輪狀病毒株。第二種與第三種重組輪狀病毒分別屬於 G2P[4] 與 G1P[8] 病毒，VP7 與 VP4 之組合並無異常，其中之 G2 輪狀病毒造成 1993 年大流行，以 RNA 雜交法比較其與過去流行之輪狀病毒或國外流行之病毒之間的遺傳相關性，發現 1993 年流行之 G2 輪狀病毒有三個基因片段(一、六、七)與之前流行之 G2 病毒有顯著之差異，經分析 VP1 基因之部分序列而確定此病毒應是經由基因重組而來。此病毒與澳洲的一種重組輪狀病毒株 E210(24) 在 VP7 基因與 NSP4 基因均很相似。第三種重組輪狀病毒於 1995 年之流行中發現，經比較 VP6 基因，與 G3P[8] 病毒的相似性反而比其他同屬 G1P[8] 之病毒為高，與澳洲的 E210 相似性竟高達 99.1%，再經比較 NSP4 基因，與 E210 很相似。在種系樹中與 G2 病毒聚集在一起。

第一種 G3P[4] 重組輪狀病毒在 1982 年之後未再出現，是否曾在 1982 年之前造成大流行，不得而知。此病毒有可能是動物的 G3 輪狀病毒與 1982 年流行的 G2P[4] 病毒產生的重組輪狀病毒株，它的 NSP4 基因雖然與 G2 病毒相似，但與另兩種重

組輪狀病毒株仍有所不同。後兩種重組輪狀病毒株與澳洲的重組輪狀病毒株 E210 有相似的基因，如 VR936 至少在 VP7 與 NSP4 基因與 E210 相似，R951297 至少在 VP6 與 NSP4 基因與 E210 相似。故 VR936、R951297 與 E210 之部份基因可能來自一個共同的祖先。

本研究顯示台灣輪狀病毒的流行有一些與重組輪狀病毒株有關，至於它們是否有些來自動物仍有待未來之研究。

四、計畫成果自評；

因本計畫之執行使我們更清楚的瞭解台灣地區的輪狀病毒是如何的演化。部份的結果已經發表或投稿中，仍有一些結果尚待撰寫中。我們對於 RNA 雜交試驗之結果不夠滿意，一方面與檢體之病毒量不足有關，一方面與實驗工作者之經驗有關，此技術難度較高，訓練經驗不足者達到所需之標準不易。

五、參考文獻

1. Andrew, M. E., D. B. Boyle, B. E. Coupar, P. L. Whitfield, G. W. Both, and A. R. Bellamy. 1987. Vaccinia virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 61:1054-1060.
2. Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne, and R. Scherrer. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J. Virol.* 43:1113-1117.
3. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283.

4. Black, R. E., H. B. Greenberg, A. Z. Kapikian, K. H. Brown, and S. Becker. 1982. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 145:483-489.
5. Clark, H. F., Y. Hoshino, L. M. Bell, J. Croff, G. Hess, P. Bachman and P. A. Offit. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25:1757-1762.
6. Estes, M. K., E. L. Palmer, and J. F. Obijeski. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105:123-184.
7. Estes, M. K., and J. Cohen. 1996. Rotaviruses and their replication. pp. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope (ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
8. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick. 1974. Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2:61-63.
9. Flewett, T. H. 1982. Clinical features of rotavirus infections. In *Virus Infections of the Gastrointestinal Tract*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
10. Holmes, I. H. In "The Reoviridae" (W. Joklik, Ed.), pp. 359-423. Plenum, New York, 1983.
11. Holmes, I. H. 1988. Reoviridae: the rotaviruses. p. 384-413. In E. H. Lennette, P. Halonen, and F. A. Murphy (ed.). *Laboratory diagnosis- principles and practice. Viral, rickettsial and chlamydial diseases. vol. 2.* Springer Verlag, New York.
12. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores A. Z. Kapikian, R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82:8701-8704.
13. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, et al. 1974. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serological tests. *Science* 185:1049-1053.
14. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, W. L. Cline, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, W. J. Rodriguez, D. A. Sack, R. M. Chanock, and R. H. Parrott. 1976. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N. Eng. J. Med.* 309:72-76.
15. Kapikian, A. Z., J. Flores, K. Midthun, Y. Hoshino, K. Green, et al., In "Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS" (R. M. Chanock, R. A. Lerner, F. Brown, and H. Ginsberg, Eds.), pp. 151-159. Cold Spring Harber Laboratory, Cold Spring Harber, NY, (1988).
16. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1990. Rotaviruses, pp. 1353-1404. In B.N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope (ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
17. Keidan, I., I. Shif, G. Keren, and J. H. Passwell 1992. Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous involvement during rotavirus infection. *Pediatr. Infect. Dis.* 11:773-775.
18. Kumar, A., A. Charpilienne, and J. Cohen. 1989. Nucleotide sequence of the

- gene coding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic acids Res* 17:2126.
19. Lin, S. C., H. Y. Hsu, P. J. Wang, C. N. Lee, M. H. Chang, Y. Z. Shen, and S. M. Wang. 1996. Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile seizure in childhood. *Acta Paed. Sin.* 37:204-207.
 20. Liu, M., P. A. Offit, and M. K. Estes. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32.
 21. Matsui, S., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1989. The molecular determinants of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36:181-214.
 22. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukoyama, and S. Inouye. 1985. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54:623-624.
 23. Nishimura, S, H. ushijima, S. Nishimura, H. Shiraishi, C. Kanazawa, T. Abe, K. Kaneko, and Y. Fukuyama. 1993. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 15:457-459.
 24. Palombo, E. A., H. C. Bugg, P. J. Masendycz, B. S, Coulson, G. L. Barnes, and R. F. Bishop. 1996. Multiple-gene rotavirus reassortants responsible for an outbreak of gastroenteritis in central and northern Australia. *J. Gen. Virol.* 77:1223-1227.
 25. Taniguchi, K., and S. Urasawa. 1995. Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6: 123-131.
 26. Ushijima, H., K. Bosu, T. Abe, and T. Shinozaki. 1986. Suspected rotavirus encephalitis. *Arch. Dis. Child* 1:692-694.
 27. Wong, C. J., M. T. Zane Price, and A. Bruckner. 1984. Aseptic meningitis in an infant with rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3:244-246.
 28. Wyatt, R. G., H. D. James, Jr., A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greeuherg, A. R. Kalica, J. Flores, and A. Z. Kapikian. 1983. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18:310-317.
 29. Ward, R. L., Nakagomi, O., Knowlton, D. R., Mcneal, M. M., Nakagomi, T., Clemens, J. D., Sack, D. A., and Schiff, G. M. 1990. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. *J. Virol.* 64:3219-3225.