

List of VLPs

	VLPs	Genogroup	Cluster
1)	r124	G I	Norwalk
2)	rCV	G I	Chiba
3)	r258	G I	Southampton
4)	r645	G I	Desert Shield
5)	W18	G I	W18
1)	r104	G II	Lordsdale
2)	r47	G II	97K47
3)	r7K	G II	94m7K
4)	r445	G II	94m7K
5)	r76	G II	Hawaii
6)	r485	G II	Hawaii
7)	r754	G II	Snow mountain
8)	r809	G II	Mexico
9)	rSh5	G II	Mexico
10)	r18-3	G II	Mexico
11)	r336	G II	Mexico
12)	r1152	G II	Mexico
13)	r10-25	G II	10-25
14)	rU25	G II	U25
15)	rAlph23	G II	Alphatron

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

Norwalk virus の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析

分担研究者 片山和彦 国立感染症研究所 ウイルス第2部
協力研究者 岡智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨 NVの予防衛生を推進するためには、ウイルスの複製機構などNVの基礎的研究が必須である。しかし、NVは実験動物系、*in vitro*における培養細胞系も見いだされておらず、NVの感染及び増殖機序の解析が遅れている。本研究では、ゲノム全長の塩基配列を明らかにしたU201株を基に、作成したプラスミドクローンを用いて、哺乳類細胞内におけるNVゲノムの転写翻訳機構を調べた。哺乳類細胞に完全長のゲノムRNAを導入しても、5'末端に修飾を施さないRNAは翻訳されることが確認された。また、細胞内で組み換えワクチニアウイルスを用いて、5'末端にキャップが施されたRNA大量に供給した場合、NVゲノムRNAのORF1にコードされるウイルス蛋白質が翻訳されるが、それ以降のORF2及びORF3は翻訳されることが明らかになった。ORF2及びORF3をコードする約2.3KbのNV-RNAを細胞内に供給すると、ORF2に加えORF3も翻訳されることも明らかになった。近縁のウイルスであるネコカリシウイルスでは、ゲノムRNAから翻訳されたORF1にコードされるウイルス蛋白質が主体となり、宿主細胞内でORF2とORF3を含むサブゲノムRNAを転写し、そこからORF2とORF3コード蛋白質が供給されることが明らかにされている。NVの場合、この行程に何らかの問題があり、ゲノムRNAを供給してもウイルスのレプリケーションサイクルが稼働していないことが示唆された。本研究により、NVの宿主特異性は、宿主細胞内におけるゲノムの転写翻訳機構が因子の一つである可能性が示された。

A. 研究目的

ウイルス性急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られる Norwalk virus (NV) は、ヒト以外に感染せず、実験動物系、*in vitro* における培養細胞系も見いだされていない。そのため、NV の感染及び増殖機序の解析が遅れている。本研究では、ゲノム全長の塩基配列を明らかにした U201 株を基に、U201 ゲノム全長 cDNA を含むプラスミドクローンを作成し、このクローンから構築した各種プラスミドクローンをを用いた哺乳類細胞へのトランスフェクションにより、細胞内での NV ゲノムの転写翻訳について調べた。

B. 研究方法

1. インビトロで合成した NV-RNA のトランスフェクション

哺乳類細胞に直接 NV-RNA を供給するため U201 株の cDNA を合成し、long RT-PCR により T7 プロモーター下流に U201 のゲノム cDNA を直結したゲノム供給用クローン pT7-U201full を作製した (図 1、2)。さらに、T7 プロモーター下流に U201 ORF2 からゲノム末端までを直結したクローン pT7U201ORF23、T7 プロモーター下流に U201 ORF3 からゲノム末端までを直結したクローン pT7U201ORF3 を作成した。また、U201 ゲノムの ORF1 上にコードされる RNA dependent RNA polymerase

(RdRp) 遺伝子を削り、代わりに EGFP をレポーターとして組み込んだクローン pT7U201fullORF1EGFP も作成し、レポーターとして使用した。これらクローンより、5' 末端にキャップ構造を付加した RNA と、付加しない RNA を合成し、哺乳類細胞にトランスフェクションした。キャップ依存的翻訳を確認するコントロールとして、T7 プロモーター下流に EGFP を挿入した pT7EGFP を作成した。トランスフェクションのコントロールとして T7 プロモーター下流に EMCV-IRES と EGFP を挿入した pT7IRES-EGFP も作成した。このプラスミドから転写される RNA は、キャップ非依存的翻訳 (IRES 依存的翻訳) によって RNA から EGFP を翻訳するため、トランスフェクション効率示すコントロールとなる。トランスフェクション実験を行う哺乳類細胞には 293T 細胞と、COS7 細胞を用いた。

トランスフェクション後の細胞は、37℃の CO₂ インキュベーターで 24 時間、及び 48 時間培養した後、抗 ORF1 抗体、抗 ORF2 抗体、抗 ORF3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで U201 蛋白質の発現を確認した (図 1)。

2. T7RNA 遺伝子組込プラスミドを用いた NV-RNA の細胞内合成

細胞内で U201 ゲノムを転写させるため、CAG プロモーター下流に T7RNA polymerase をクローニングした

pCAGT7poly と、前述の各種 U201 クロームを哺乳類細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞は、37℃の CO₂ インキュベーターで 24 時間、及び 48 時間培養した後、抗 ORF1 抗体、抗 ORF2 抗体、抗 ORF3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで U201 蛋白質の発現を確認した (図 2)。

3. リコンビナントワクチニアウイルスを用いた NV-RNA の細胞内合成

上記プラスミドを U201 ゲノム末端の polyA 配列以降に組み入れた制限酵素 Mlu I 切断部位で切断して直鎖状にした後、哺乳類細胞にトランスフェクションした。また、同時に T7RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクチニアウイルスを感染させ、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給し、NV-RNA を大量に細胞内で合成させた。トランスフェクション後の細胞は、37℃の CO₂ インキュベーターで 24 時間、及び 48 時間培養した後、抗 ORF1 抗体、抗 ORF2 抗体 (抗 VLP 抗体)、抗 ORF3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで U201 蛋白質の発現を確認した (図 3)。

C. 研究結果および考察

1. RNA トランスフェクション

pT7EGFP、pT7IRES-EGFP よりキャップ構造を付加した RNA とキャップ構造

を付加しない RNA を合成し、トランスフェクションの効率と 293T 細胞内における RNA の挙動をモニターした。キャップ構造を付加した RNA をトランスフェクションした 293T 細胞は、293T 細胞内で EGFP-RNA、IRES-EGFP-RNA とともに EGFP が翻訳され、蛍光が認められた。しかし、キャップ構造を付加しなかった RNA をトランスフェクションした 293T 細胞は、IRES-EGFP-RNA のみに蛍光が認められた (図 4)。

pT7U201full, pT7U201ORF23, pT7U201ORF3, pT7U201fullORF1-EGFP よりキャップ構造を付加した RNA とキャップ構造を付加しない RNA を合成し、合成した RNA を 293T 細胞にトランスフェクションして蛍光顕微鏡観察とウエスタンブロッティングを行った。キャップ付加の如何に関わらず U201fullORF1-EGFP-RNA をトランスフェクションした 293T 細胞のみに EGFP による蛍光のシグナルが認められたが、シグナルはコントロールである EGFP、IRES-EGFP に比べ微弱であった。しかし、この結果から U201full とほぼ同じサイズの RNA が、コントロールよりは効率が悪いが、細胞内にトランスフェクションされていることが確認された (図 4)。

次に、RNA トランスフェクション後 48 時間培養した細胞をハーベストし、抗 ORF1 抗体、抗 ORF2 抗体、抗 ORF3

抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。RNA へのキャップ付加の如何に関わらず、各種 ORF 由来の蛋白質のシグナルは認められなかった。以上の実験結果は、COS7 細胞でも全く同様であった。

キャップを付加した U201full-RNA, U201ORF23-RNA, U201ORF3-RNA をトランスフェクションした細胞からウエスタンブロッティングでシグナルが認められなかったことから、RNA トランスフェクションでは、トランスフェクションの効率が悪く、導入した RNA 由来の蛋白質の発現レベルがウエスタンブロッティングの検出感度に届いていない可能性がある。

2. プラスミドトランスフェクション

293T 細胞および COS7 細胞内に RNA を大量に供給するため、CAG プロモーター下流に T7 RNA ポリメラーゼを組み込んだプラスミド pCAGT7pol を前述のプラスミドとコトランスフェクションした。本法は、細胞内にプラスミドの形で供給された pCAGT7pol から T7 RNA ポリメラーゼが翻訳され、それによってコトランスフェクションしたプラスミドより T7 プロモーター配列下流の配列が大量に RNA として転写されるため、細胞内に大量の目的 RNA を供給できる。pT7IRES-EGFP, pT7U201fullORF1-EGFP トランスフェクション後 48 時間の 293T 細胞では、

EGFP の蛍光シグナルが認められた。しかし、IRES を持たないプラスミドをトランスフェクションした 293T 細胞ではシグナルが認められなかった。この結果によって、コトランスフェクションした pCAGT7pol から翻訳された T7 RNA ポリメラーゼがプラスミドの T7 プロモーター配列下流を RNA として転写し、RNA の IRES により EGFP の翻訳が起こっていること、IRES を持たない RNA が合成される pT7EGFP は、293T 細胞内で翻訳されないことが示された (図 5)。

ウエスタンブロッティングの結果、pT7U201full, pT7U201ORF23, pT7U201ORF3 いずれのプラスミドをトランスフェクションした 293T 細胞からもシグナルが認められなかった (図 5)。これらの結果から、pCAG-T7poly で T7 polymerase を 293T 細胞内に供給して転写させた U201 ゲノム RNA には、それ自身に翻訳開始機能が無いことが示唆された。以上の結果は、COS7 細胞でも全く同様であった。

3. 組換えワクチニアウイルスを用いた発現

293T 細胞および COS7 細胞内で転写される RNA の 5' 末端にキャップ構造を付加するため、T7RNA ポリメラーゼ遺伝子を組み込んだ組換えワクチニアウイルスを用いて、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給した。

組換えワクチニアウイルスを感染させた後、プラスミドトランスフェクションを施行し 24 時間後の細胞を観察した結果および、ウエスタンブロッティングを行った結果を示した (図 6)。

EGFP の蛍光は IRES を有するプラスミド pT7IRES-EGFP, pT7-U201fullORF1-EGFP はもちろんのこと、IRES を持たないプラスミド pT7EGFP をトランスフェクションした細胞にも認められた。この結果から、組換えワクチニアウイルスを用いて、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給した場合、細胞内でワクチニアウイルス由来のキャッピング酵素により、T7RNA ポリメラーゼで転写された RNA にキャップ構造が付加され、EGFP の翻訳が起きたと考えられた。

次にウエスタンブロッティングの結果を示した (図 6)。pT7U201full, pT7U201ORF23, pT7U201ORF3, pT7U201fullORF1-EGFP をそれぞれトランスフェクションした細胞を 24 時間後にハーベストし、抗 ORF1 抗体で検出したところ、pT7-U201full をトランスフェクションした細胞から約 59kDa のバンドが検出された。本実験で用いた ORF1 抗体は大腸菌で発現させた 59kDa の U201RNA ポリメラーゼに対する抗体であることから、pT7U201full をトランスフェクションした 293T 細胞内では、キャップの付

加された U201full genome RNA の転写、翻訳、さらには、ORF1 前駆体蛋白質の切断が起こり 59kDa の U201RNA ポリメラーゼが発現されていることが示された。

抗 ORF2 抗体で検出したところ、pT7U201full をトランスフェクションした細胞にはシグナルが認められなかったが、pT7U201ORF23 をトランスフェクションした細胞に 57kDa のシグナルが認められた。次に抗 ORF3 抗体で検出したところ、pT7U201ORF3 をトランスフェクションした細胞に 27kDa のシグナルが認められた。さらに興味深いことに、pT7-U201ORF23 をトランスフェクションした細胞にも 27kDa のシグナルが認められた。この結果から、pT7U201ORF23 から転写される RNA は ORF2 のストップコドンで翻訳が停止し、57kDa の ORF2 蛋白質を翻訳するばかりでなく、何らかのメカニズムによって 27kDa の ORF3 蛋白質の翻訳も行っている可能性が示唆された。以上の結果は、COS7 細胞でも全く同様であった。

NV の近縁のウイルスである Vesivirus に属するネコカリシウイルス (FCV) では、ゲノム RNA (約 7.6 kb) から ORF1 を、ORF2 の上流から感染細胞内で転写される約 2.3 kb のサブゲノム RNA から ORF2 が翻訳される。NV では、細胞内でサブゲノム RNA が転写

されるかどうか明らかにされていないため、どのように ORF2 および ORF3 が翻訳されるのかも不明である。ワクチニアウイルスを用いた系で、pT7U201full をトランスフェクションした細胞内に ORF2 のシグナルが認められなかったことは、ORF1 を翻訳可能なゲノム RNA を細胞内に導入しても、ORF2 の翻訳が起らないことを示唆していた。pT7-U201ORF23 をトランスフェクションした細胞の場合、メカニズムは不明だが ORF2 と ORF3 が翻訳されることが明らかになった。仮に、pT7U201full をトランスフェクションした細胞内で、ゲノム RNA からサブゲノム RNA が供給されていたなら、ORF2 と ORF3 の翻訳産物が確認できたはずである。今後、ノーザンブロッティングでサブゲノム RNA の確認をする必要があるが、NV の場合、サブゲノム RNA の転写、翻訳に ORF1 から供給されるウイルス蛋白質以外の宿主蛋白質が必要とされるのかも知れない。本研究で使用した 293T 及び COS7 細胞は、両者とも全く同じ結果を示した。NV 感染部位とされるヒト腸管上皮細胞で検討する必要があるが、細胞によってサブゲノムの転写翻訳に差があるなら、これが NV の宿主特異性を決定する一つの因子なのかもしれない。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigeyuki Kojima, Tsutomu Kageyama, Shuetsu Fukushi, Fuminori B. Hoshino, Michiyo Shinohara, Kazue Uchida, Katsuro Natori, Naokazu Takeda, Kazuhiko Katayama., Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses., *Journal of Virological Methods* vol 100 p107-114, 2002.
2. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, and Takeda N. Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* vol 299, p225 □ 239, 2002.
3. Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino B. F., Takeda N. & Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* in press.
4. 片山和彦：ノーウォークウイルス診断法の進歩. ワールドフォーカス No. 43 p1-2, 2003

5. 片山和彦：新世紀の感染症学：カリシウイルス。日本臨牀 p468-474, 2003.
6. 白土東子、片山和彦：新世紀の感染症学：ノロウイルス。日本臨牀 p475-479, 2003.
2. 学会発表
 1. 片山和彦、白土東子、岡智一郎、小嶋慈之、影山 努、福士秀悦、武田直和、宮村達男：Norwalk-like virus の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析。第 50 回日本ウイルス学会学術総会、札幌、平成 14 年 10 月 16 日
 2. 白土東子、片山和彦、田村 克、名取克郎、岡智一郎、武田直和、宮村達男：ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討。第 50 回日本ウイルス学会学術総会、札幌、平成 14 年 10 月 16 日
 3. 松原尚子、片山和彦、白土東子、岡智一郎、小川智子、武田直和、浜野国勝、福士秀悦、小嶋慈之、影山 努、高井玲子、星野文則、宮村達男：バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現。第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 14 年 12 月 11 日
 4. K. Katayama, H. Horikoshi-Shirato, T. Oka, K. Natori, N. Takeda, and T. Miyamura : GENOTYPING OF "NORWALK-LIKE VIRUSES" BASED ON PHYLOGENETIC ANALYSES OF 18 FULL GENOME SEQUENCES. INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGY, Paris, France, Aug 1, 2002.
 5. 片山和彦：下痢症ウイルス (Norwalk-like viruses を中心として)。国立公衆衛生院 平成 14 年度特別課程ウイルスコース講義 平成 14 年 8 月 17 日

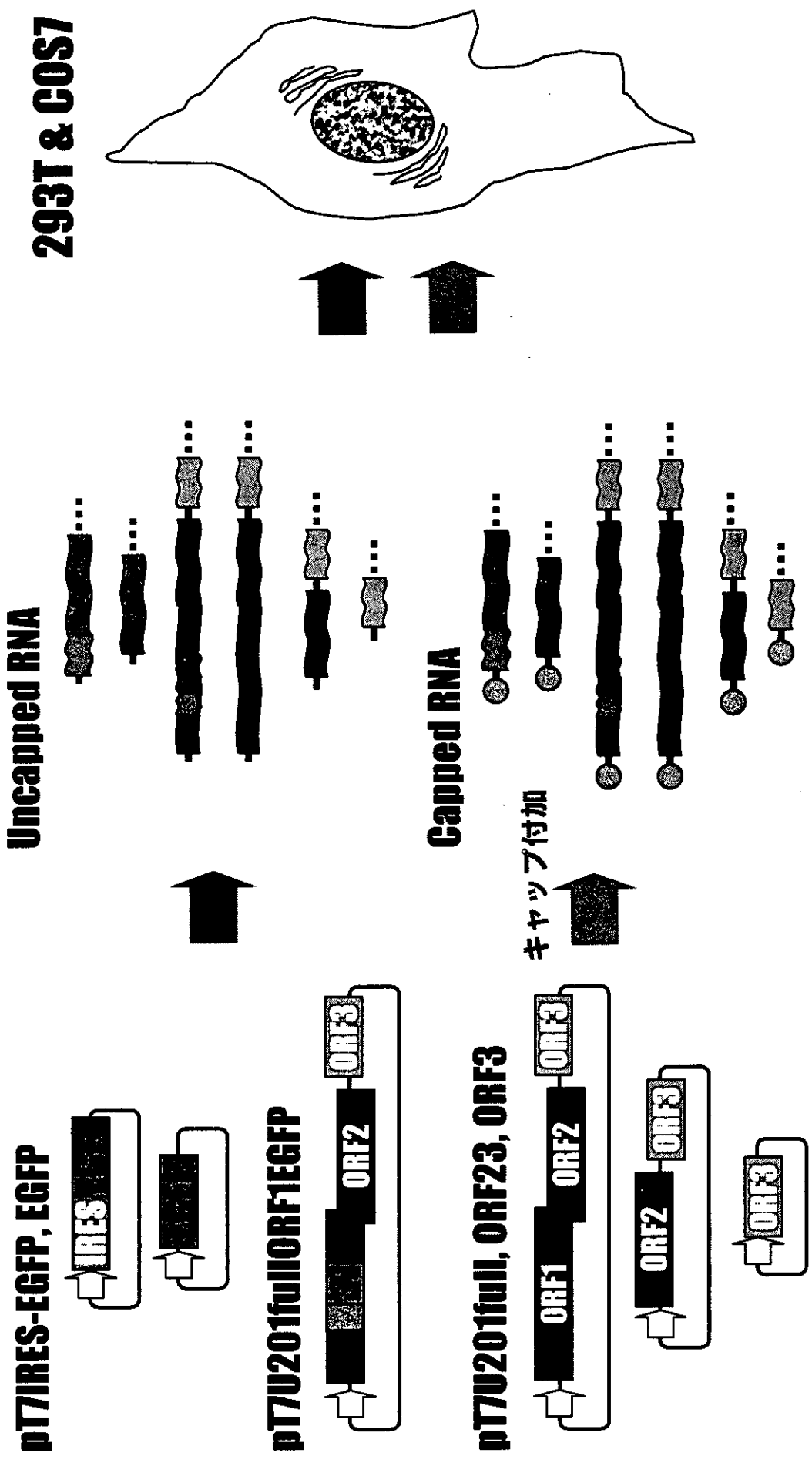
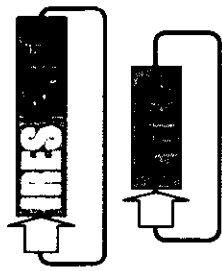


図1. RNAトランスフェクション

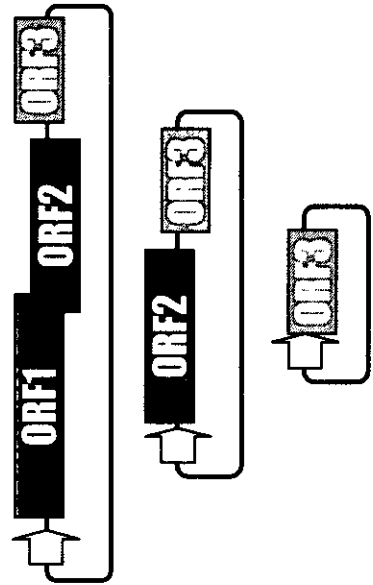
pT7IRES-EGFP, EGFP



pT7U201fullORF1EGFP



pT7U201full, ORF23, ORF3



pCAGT7poly



+



細胞内にT7 RNA ポリメラーゼを供給し、RNAを合成

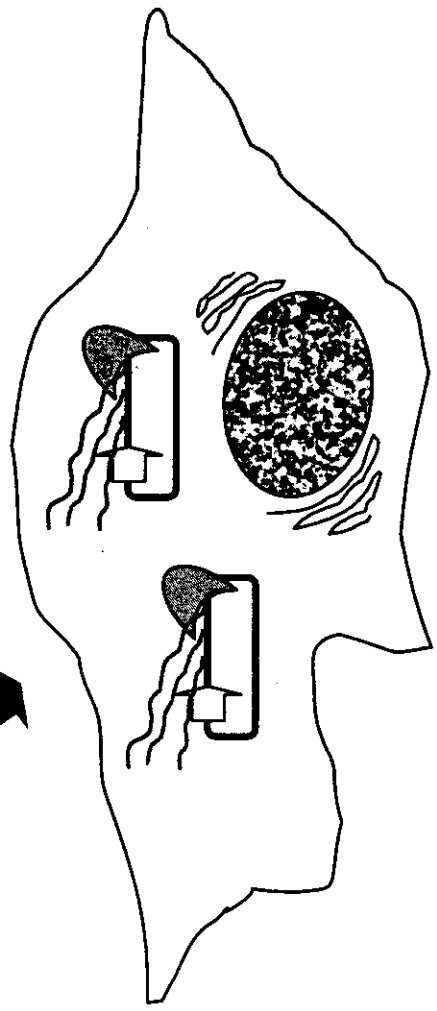
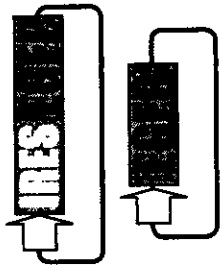


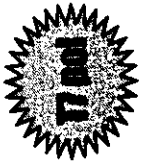
図2. プラスミドのコトランスフェクション法

pT7IRES-EGFP, EGFP



+

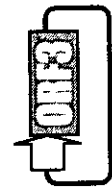
rワクチニアT7pol



pT7U201fullORF1EGFP



pT7U201full, ORF23, ORF3



ほぼ全ての細胞内にT7 RNA ポリメラーゼを供給し、RNAを合成する。RNAはキャップ附加を受ける。

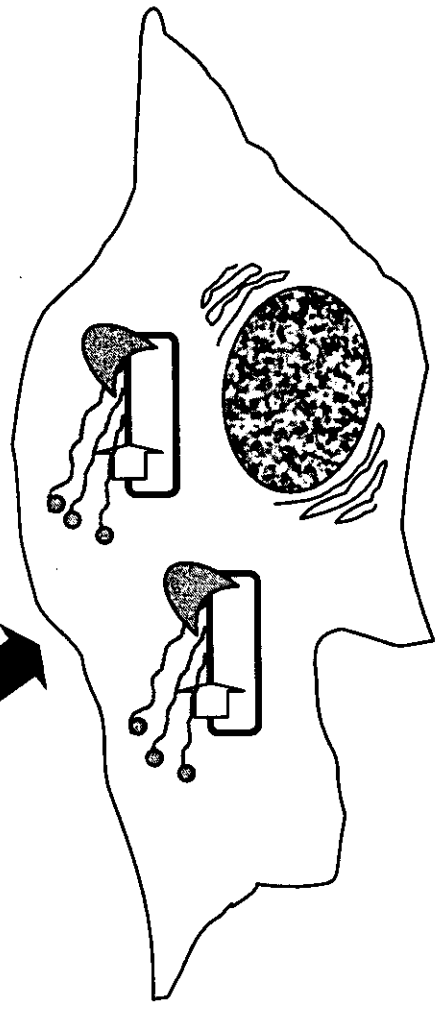


図3. リコンビナントワクチニアウイルス法

Uncapped RNA



Capped RNA



図4. RNAトランスフェクション法



<p>...</p> <p>pT7U201full</p> <p>W.B. αORF1</p> <p>(X)</p>	<p>...</p> <p>pT7U201ORF23</p> <p>W.B. αORF2</p> <p>(X)</p>	<p>...</p> <p>pT7U201ORF3</p> <p>W.B. αORF3</p> <p>(X)</p>
---	--	---

図5. プラスミドのコトランスフェクション

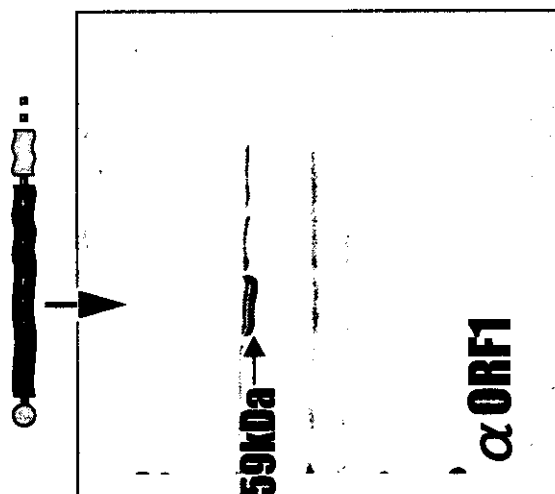
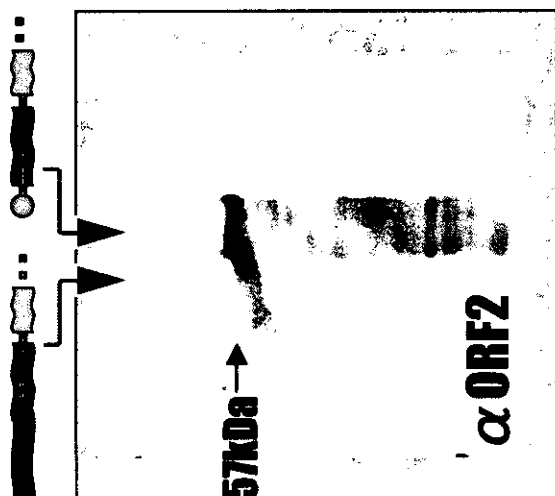
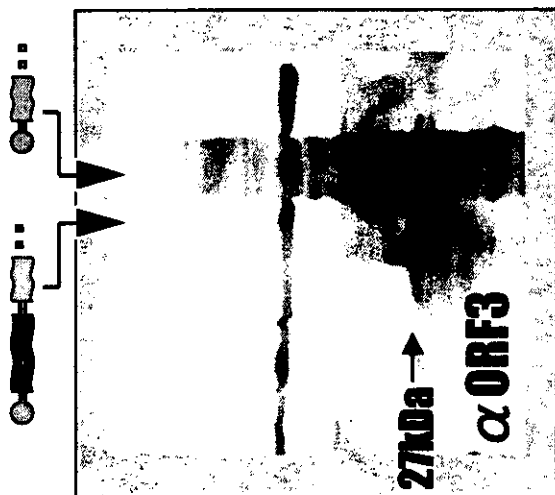
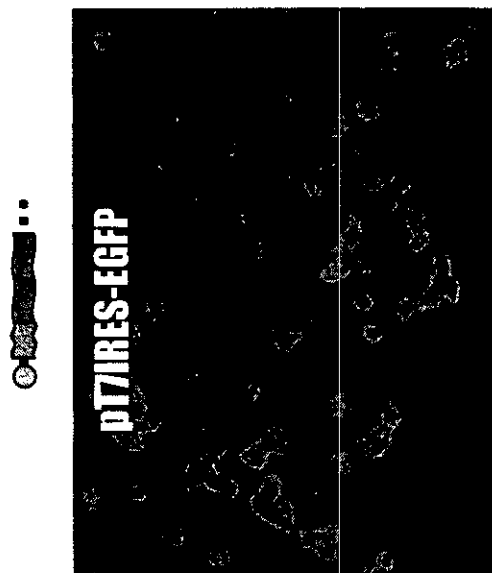
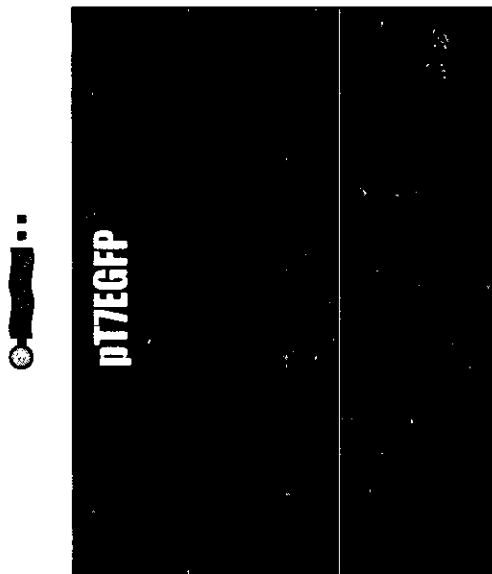
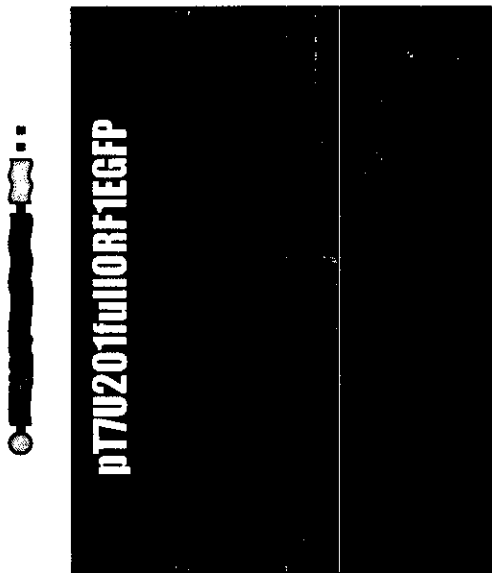


図6. リコンピナントワクチニアウイルス法

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

チバウイルス 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析と
X線結晶構造解析による 3次元立体構造の解明

分担研究者 染谷 雄一 国立感染症研究所・ウイルス第2部・主任研究官

研究要旨 ノロウイルス（ノーウォーク様ウイルス）感染による急性胃腸炎に対して有効な治療薬の創出を目指し、ノロウイルスのひとつ、チバウイルスが有する 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析を行った。3C 様プロテアーゼによる切断活性の至適 pH は 9.0 から 9.5 とアルカリ側で、至適温度は 26 ～ 37 °C であった。また、NaCl の存在、非存在はほとんど活性に影響しなかった。SH 試薬のひとつ、PCMB はプロテアーゼと 1 : 1 で結合し、活性を完全に阻害することが分かった。3C 様プロテアーゼの立体構造解明に向け、X線結晶構造解析を行った。現時点で、4.5 Å 程度の解像度の結晶学的データが得られ、電子密度図の作成を行うことができた。更に高解像度のデータを得るため、更なる解析を進めている。

A. 研究目的

生カキなどの喫食に伴うノロウイルス（ノーウォーク様ウイルス）感染による急性胃腸炎は毎冬流行し、大きな社会的問題となっている。しかし、ウイルス増殖を抑えるといった、根本的な治療に導く有効な治療薬はない。ノロウイルスはゲノム上に 3C 様プロテアーゼのほか、RNA ヘリカーゼ、RNA ポリメラーゼといったウイルスゲノムの複製に関わると思われる酵素を持っている。これら酵素の阻害剤は急性胃腸炎治療薬の候補として期待できる。そこで、本研究では、ノロウイルスのひとつである、チバウイルス

の 3C 様プロテアーゼに着目し、まず、その生化学的性状に関する解析を行った。次いで、3次元立体構造の解明を目指し、精製した 3C 様プロテアーゼを結晶化し、X線結晶構造解析を行った。

B. 研究方法

1. 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析

チバウイルス 3C 様プロテアーゼをコードする遺伝子を N 末端あるいは C 末端に His タグが付加するよう大腸菌発現ベクターに組み込んだ（それぞれ、pT7HisPro、pT7Pro-His）。大腸菌

BL21-CodonPlus (DE3)-RIL に導入後、可溶性画分より TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて HisPro あるいは Pro-His を精製した。また、プロテアーゼ活性検出のための基質として、ヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ認識切断配列を介した GST-GFP 融合タンパク質、および、チバウイルスの 3CD 領域の N 末端に His タグを付加し、更にプロテアーゼ活性を消失させた His3CD-C139A タンパク質を用いることにした。GST-GFP は大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL/pT7GST-GFP の可溶性画分より、Glutathione-Sepharose (Pharmacia) を用いて精製した。His3CD-C139A は BL21-CodonPlus (DE3)-RIL/pT7His3CD-C139A の可溶性画分より TALON Metal Affinity Resin を用いて精製した。

精製酵素標品と精製基質を適当な緩衝液中で混合し、反応を開始した。活性の検出は、反応液を SDS-PAGE で分離することにより行った。

2. X線結晶構造解析による3次元立体構造の解明

N 末端に His タグを導入した 3C 様プロテアーゼをコードするプラスミド (pT7HisPro) を大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株に導入し、IPTG 添加により発現を誘導した。菌体を超音波破碎後、超遠心により可溶性画分を調製した。この画分より TALON Metal Affinity Resin を用いて目的タンパク質

(HisPro) を精製した。結晶化は、2 M 硫酸アンモニウム、5 %イソプロパノールを含む試薬で行った。得られた結晶を用いて SPring-8 にて結晶学的データの収集を行った。なお、結晶構造解析は東京工業大学生命理工学部田中信夫教授との共同研究である。

C. 研究結果

1. 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析

(1) 至適 pH の検索

pH 6.0 から 10.0 まで、0.5 刻みで調製した 50 mM BisTrisPropane-HCl、0.1 M NaCl 中で、基質 (GST-GFP あるいは His3CD-C139A、5 μ M) と酵素 (HisPro あるいは Pro-His、10 μ M) を混合し、37 $^{\circ}$ C、16 時間反応させた。すべての条件で基質の切断が認められたが、pH 9.0、9.5 で最も多くの基質が切断されていた。

(2) 至適温度の検索

50 mM BisTrisPropane-HCl (pH 9.0)、0.1 M NaCl、5 μ M 基質、10 μ M 酵素の条件で、4、15、26、37、48 $^{\circ}$ C、16 時間反応させた。26 $^{\circ}$ C および 37 $^{\circ}$ C で最も多くの基質が切断されていた。このときの活性を 100 % とすると、4、15 $^{\circ}$ C では 40 % 程度であった。また、48 $^{\circ}$ C でも有意の活性が検出された (30 % 程度)。

(3) NaCl の影響

50 mM BisTrisPropane-HCl (pH 9.0)、0.1 M NaCl、5 μ M 基質、10 μ M 酵素の条件と、50 mM BisTrisPropane-HCl (pH

9.0)、5 μ M 基質、10 μ M 酵素の条件で、基質の切断量を比較したが、顕著な差は認められなかった。

(4) PCMB の効果

50 mM BisTrisPropane-HCl (pH 9.0)、0.1 M NaCl、5 μ M 基質、10 μ M 酵素の条件で、PCMB (p-クロロマーキュリ安息香酸) の濃度を変化させ、37 $^{\circ}$ C、16 時間反応させた。5 μ M PCMB の存在下でプロテアーゼ活性がほぼ完全に阻害された。

2. X線結晶構造解析による3次元立体構造の解明

2 M 硫酸アンモニウム、5 %イソプロパノールを含む試薬で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により得られた結晶を Spring-8 にてX線照射実験を行い、結晶学的データの収集を行った。また、PCMB を浸潤させた結晶についてもデータの収集を行った。現在、4.5 \AA 程度の解像度のデータを得、これに基づいた電子密度図の作成を行うことができている。

D. 考察

1. 3C 様プロテアーゼの生化学的性状の解析

チバウイルス 3C 様プロテアーゼの活性測定に用いた今回の条件では、長時間の反応にもかかわらず、基質の切断が完全には行われなかった。実際に反応が遅いこと、あるいは、実験条件が必ずしも至適でなかったことが考えられる。至適 pH が 9.0-9.5 とアルカリ側に寄っていた。

これが感染細胞内での切断に関してどのような意味を持つかは現時点では分からないが、興味深い。PCMB が酵素分子とモル比で 1 : 1 で存在するときに完全に酵素活性を阻害したことは酵素 1 分子あたり 1 箇所の PCMB 高親和性結合部位があることを示唆している。3C 様プロテアーゼの活性中心は Cys139 残基であるので、この側鎖 SH 基であると思われる。

2. X線結晶構造解析による3次元立体構造の解明

電子密度図上での位置にどの原子が帰属できるのか、現在検討中である。最終的に 2 \AA を切る高解像度の立体構造を得るため、今後、良好な結晶を得られる条件を詳細に検討する。

E. 結論

本研究により、初めてノロウイルス 3C 様プロテアーゼの性状が明らかになった。この結果と、近い将来得られると期待される X線結晶構造により、活性中心の原子レベルでの理解が可能になり、さらには、詳細なプロテオリシスの分子機構が明らかになると期待される。更に、構造情報に基づいたプロテアーゼ阻害剤の開発が可能になり、将来的に治療薬として用いられる物質の創出につながるものと期待される。

F. 研究発表

(1) 染谷雄一、武田直和、宮村達男 「ノ

ロウウイルス（ノーウォーク様ウイルス）3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と生化学的性状の解析」日本薬学会第123年会 2003年3月、長崎

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ノロウイルスの組織特異性を決定する因子の検討

分担研究者 白土 東子 国立感染症研究所・ウイルス第2部・研究員

研究要旨 ウイルス性急性胃腸炎の主たる原因ウイルスであるノロウイルスは、ヒト小腸特異的に感染し増殖すると報告されている。効果的な予防法確立のためにも感染機序の解明、特にレセプター分子の同定が必須である。そこで、レセプター分子の同定を目的とし、サブトラクションによる空腸特異的な cDNA クロンの単離を試みたところ、25 種類の cDNA クロンを得た。これらの中には細胞表面分子も 6 種類含まれていた。次いで、ノロウイルスが吸着しない細胞を用いて空腸特異的な cDNA の発現、スクリーニングを行うため、ウイルスが吸着しない細胞の同定を試みたところ、浮遊性の培養細胞株にはほとんど吸着しないことが明らかになった。また、ノロウイルスの吸着する細胞株と吸着しない細胞株上の表面分子発現パターンを比較したところ、両細胞株間で分子の発現パターンが大きく異なることが判った。さらに詳細な解析を行うことにより、レセプター分子を解明したい。

A. 研究目的

ノロウイルスは、ウイルス性急性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり、ヒト小腸に感染し増殖すると報告されている。しかし、*in vitro* における培養細胞系も動物実験系もいまだ見いだされていない。感染機序の解析を行うためにも、培養系の確立が必須であり、そのためにもレセプター因子の同定が緊急の課題と考えられる。そこで、ノロウイルスのレセプター分子の同

定を目的とし、空腸を用いてサブトラクションを行い、空腸特異的に発現する cDNA クロンの単離を試みた。次いで、ノロウイルスが吸着しない細胞株への空腸特異的な cDNA の導入発現、発現クロンのスクリーニングを行うため、ウイルスが吸着しない細胞の同定を試みた。

B. 研究方法

1. 空腸特異的な cDNA の単離

空腸剖検材料より mRNA を抽出し、SMART PCR cDNA Synthesis Kit (CLONTECH)を用いて2本鎖cDNAを合成した。次に PCR-Select cDNA Subtraction Kit (CLONTECH)を用いてPCRによるサブトラクションを行った。サブトラクトする側の組織として今回は同一個体由来の回腸を用いた。サブトラクションにより得られたクローンの塩基配列を決定し、ヒトcDNAを対象としたデータベース検索を行った。

2. ノロウイルスが吸着しない細胞の同定

ウイルスが吸着しない細胞を選択するため、ウイルス様中空粒子と各種細胞株との結合を Binding assay により解析した。血清学的に異なる2種類のノロウイルス (7k/94株、47/97株)のORF2組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn-5 に接種し非標識、³⁵S 標識 VLP (r7VLP、r47VLP) を調製した。動物細胞株として、付着性の細胞2株、Caco-2 (ヒト結腸由来)、MDCK (イヌ腎臓由来)、浮遊性の細胞5株、MOLT-4、MT-2、Jurkat、U937 (ヒトリンパ球由来)、P388 (マウスリンパ球由来) を用いた。

3. ノロウイルスの吸着する細胞と吸着しない細胞上の表面分子発現量の

比較

2で同定したノロウイルスの吸着しない細胞上の表面分子の発現パターンを Flow cytometry により検討し、ウイルスの吸着する細胞上のそれと比較した。156種類の抗体を用い、136種類のCD分子について検討した。

C. 結果

1. 空腸特異的な cDNA の単離

サブトラクションの結果、空腸特異的な cDNA クローンを25種類得た。これらの中には細胞表面分子も6種類含まれていた。

2. ノロウイルスが吸着しない細胞の同定

r7VLP、r47VLPともに付着性の細胞株、Caco-2、MDCKに吸着した。これに対して、浮遊性の細胞株については、MT-2以外のMOLT-4、Jurkat、U937、P388には、ほとんど吸着しなかった。

3. ノロウイルスの吸着する細胞と吸着しない細胞上の表面分子発現量の比較

MT-2とMOLT-4上での細胞表面分子の発現量を比較したところ、136種類中43種類の細胞表面分子がMT-2で発現が高かった。

D. 考察