

となるように CsCl を加えて調整した後、SW55Ti で 45000rpm、24 時間の浮上密度勾配遠心を行った。遠心後、約 200ul ずつ遠心管底部よりフラクショネーションした。各フラクシオンは、TLA55 で 45000rpm、2 時間の超遠心を行い、各フラクシオンに含まれる蛋白質を沈降させた後、解析に用いた。

4. VLP の RT-PCR

各フラクシオンより沈降させた蛋白質は、DNase、RNase で処理後、Viral RNA キットを用いて核酸を抽出し、RT-PCR に用いた。U201RNA の検出には、SKG2F、SKG2R のプライマーセットを用いた RT-PCR を行った。RT 及び PCR は下痢症ウイルス検出マニュアルに従って行った。

5. 透過型電子顕微鏡による VLP の観察

酢酸ウランによるネガティブ染色を行い、定法にしたがって観察した。

C. 研究結果および考察

1. U201 ゲノム RNA の翻訳およびプロセッシング

293T 細胞で転写される RNA の 5'末端にキャップ構造を付加するため、vTF7 のスーパーインフェクションによって、細胞内に T7RNA ポリメラーゼを供給し、pT7U201F より U201 ゲノム RNA を細胞内で合成した。スーパーインフェクション 24 時間後の細胞をハーベストし、ウエスタンブロッティングによって U201 ゲノムにコードされた蛋白質の発現を確認した (図 2)。pT7U201F をトランスフェクションした細胞内で、ORF1 にコードされたポリプロテインは、各パネルのレーン P に赤い矢印

で示したように、3A、VPg を除いて切予想されたサイズに断された (レーン P)。pT7U201F-Pro/m をトランスフェクションした細胞は、全てのパネルで 189 kDa の位置にポリプロテインのバンドが認められた (レーン M)。データには示さないが、これらの切断はトランスフェクション後 6 時間の時点で観察された。pT7U201F-Pro/m は ORF1 にコードされた protease の活性が無いためポリプロテインの切断が起きていないことが確認された。コントロールプラスミド pT7IRES-GFP をトランスフェクションした細胞 (レーン C) に認められたシグナルは、全てのレーンで認められており、非特異反応によるシグナルであることが確認された。以上の結果より、U201 ゲノム RNA の ORF1 は、細胞内で 189 kDa のポリプロテインとして翻訳され、翻訳後速やかに自身にコードされた protease の活性によって切断されることが明らかになった。

3A と VPg はそれぞれ 36 kDa の青矢印で示した中間産物が残っており、22 kDa、20 kDa の赤矢印で示した感染に切断された産物のシグナルは弱かった。抗 VP1 抗体および、抗 VP2 抗体で検出したところ、シグナルが認められなかった。これらの結果は、ORF2、3 は U201 ゲノム RNA から、翻訳されないことを示していた。

2. ノーザンブロッティングを用いた 293T 細胞内における U201 ゲノム RNA の複製の解析

図 3 にトランスフェクション後 24 時間の細胞をハーベストし、ノーザンブロッティングを行った結果を示した。各レーン上部には細胞にトランスフェクションしたプラスミド

コンストラクトから転写される RNA を略図で示した。マイナス鎖 RNA 合成を調べたところ (図 3 左)、U201 ゲノム RNA のレーンには約 7.6 kb のサイズにバンドが検出された。RdRp が翻訳されないように ORF1 の 3A-like protein から RdRp N 末端部分を IRES-GFP と入れ替えた pT7U201F-ORF1/GFP には、このバンドが認められなかった。U201 ゲノム RNA から、翻訳された RdRp がゲノム RNA を鋳型にして、転写した U201 マイナス鎖 RNA 合成が起きていることが示唆された。プラス鎖 RNA の合成を調べたところ (図 3 右)、U201 ゲノム RNA のレーンには 7.6 kb のバンドに加え 2.6 kb の位置にもバンドが認められた。2.6 kb のバンドは右隣の VP1 以降ゲノム末端までを有する RNA と同じサイズであった。一方、pT7U201F-ORF1/GFP には、7.6 kb のバンドは認められたが、2.6 kb のバンドは認められなかった。NoV 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 が翻訳されることが知られている。本研究で、NoV でも細胞内で NoV ゲノム RNA から ORF1 が翻訳され、それから産生される RdRp によってマイナス鎖 RNA の合成と、2.6 kb のサブゲノム RNA の合成が起きることが明らかになった。しかし、本システムでは、細胞内で合成されたサブゲノム RNA は翻訳されず、VP1、VP2 の合成が起きていないことが明らかになった。図 4 に本システムにおける NoV の複製の概略を示した。本システムにおけるゲノムの翻訳は、

ワクチニアウイルスによって供給されるキャッピング酵素によってゲノム RNA の 5'末端が修飾を受け、ORF1 の翻訳が開始されていたと考えられた。また、ORF1 の翻訳後、ポリプロテインの切断はきわめて速やかに起き、24 時間後にはマイナス鎖 RNA 合成、サブゲノム RNA の合成が起きるが、RdRp によって合成されたプラス鎖 RNA は翻訳されないと考えられた。これは、本システムでは 3A-VPg 間の切断が不完全であり、転写されたプラス鎖 RNA の 5'末端が VPg の修飾を受けていないことが原因であると思われた。

次に、これ以降の NoV 複製を進めるために、VP1 以降をコードしたサブゲノム RNA に相当する RNA を細胞内に pT7U201ORF23 をコトランスフェクションすることで供給した。

3. pT7U201F と pT7U201ORF23 のコトランスフェクション

293T 細胞に pT7U201F と pT7U201ORF23 をコトランスフェクションし、vTF7 をスーパーインフェクションした。その後 6, 12, 24, 48, 72 時間培養した後、細胞をハーベストし、VP1、VP2 の合成をウエスタンブロッティングで調べた (図 5)。トランスフェクション 12 時間後から、細胞中に 60 kDa の VP1 のバンド (上段) だけでなく、27 kDa の VP2 のバンド (下段) が認められ、バンド強度は 24 時間後にピークを示した。しかし、培養上清中には 72 時間後を除いてほとんど認められなかった。この結果から、VP1 と VP2 は合成された後細胞内に蓄積し、細胞外に放出されないと考えられた。本システムでは、ワクチニアの CPE の影響で 72 時間後には細胞がほぼ完全に死滅

している。72 時間後に認められた細胞上清中の VP1 及び VP2 蛋白質は、細胞内の VP1 と VP2 が細胞が破壊されることによって培養上清中に放出されたものであると考えられた。NoV においてどの様に VP1 と VP2 が転写されるのかは未だ明らかにされていない。前述のように FCV との比較から、ORF2 (VP1)、ORF3 (VP2) をコードするサブゲノム RNA が転写され、それから VP1、VP2 の翻訳が起きると考えられている。コトランスフェクションで細胞内にサブゲノム RNA を強制的に供給したところ、VP1 のみならず VP2 の翻訳も観察された。翻訳開始機構は不明だが、少なくともキャップで修飾されたサブゲノム RNA を細胞内に供給すれば、ORF2 と ORF3 が翻訳され、VP1 と VP2 が合成されることが明らかになった。次に、免疫蛍光抗体法で細胞を染色した (図 6)。VP1 を緑、VP2 を赤に染色し、共焦点レーザー顕微鏡で量蛋白質の細胞内局在を確認した。トランスフェクション 48 時間後には十分な量の VP1 と VP2 が細胞内に発現され、細胞質に共存して蓄積されることが明らかになった。本システムでは、VP1 と VP2 蛋白質、U201 ゲノム RNA などが集合し、ウイルス粒子を形成している可能性が示唆された。

4. CsCl 浮上密度勾配遠心法によるウイルス粒子の解析

コトランスフェクション後 48 時間の細胞をハーベストし、凍結融解で細胞膜を破壊して、細胞内に含まれる蛋白質を抽出した。方法に従って、CsCl による浮上密度勾配遠心を行った後、22 フラクションに分取し (図 7 最上段)、それぞれのフラクションをウエスタ

ンブロットイングと RT-PCR によって調べた。抗 VP1 抗体を用いたウエスタブロットイング (図 7 最下段) では、密度 1.271、1.318、1.389、1.448 に VP1 のバンドのピークが認められた。DNA、RNA 分解酵素で処理後、RNA を抽出し RT-PCR で分解されなかった U201RNA を検出したところ、密度 1.271 のピークには RNA が存在しないことが明らかになった。密度 1.271 には中空の VLP が、その他これより重い 3 つのフラクションには核酸を内包したウイルス粒子が認められる可能性が考えられた (図 7 中段)。そこで、これらのフラクションを電子顕微鏡で観察した。

5. 電子顕微鏡による粒子の観察

密度 1.271 (フラクション 18) には、バキュロウイルス発現系を用いて作出された VLP とよく似た VLP が観察された。これら VLP は、ノロウイルスに特徴的な表面構造を有していた。フラクション 18 は、RT-PCR で U201RNA を検出出来なかったことから、VLP は中空で、内部に核酸を内包していないと考えられた (図 8)。密度 1.318 (フラクション 11) には、直径 38nm 程度の粒子、それよりも小型の粒子、大型の粒子が観察された。しかし、これらの粒子は表面構造を持たず、不定形であった (図 8)。このフラクションには RT-PCR で U201RNA の存在が確認されたことから、粒子内に核酸が内包されていると考えられた。ヒト糞便材料から分離精製されるネイティブな NoV 粒子とほぼ等しい浮上密度 1.389 (フラクション 6) と、それより重い 1.448 (フラクション 2) には粒子が認められなかった。電子顕微鏡で粒子を観察するためには、材料内に大量に粒

子が含まれている必要がある。今回、粒子を観察出来なかったのは本システムにおける粒子合成量が十分でなかった可能性も考えられた。

学会発表

- 1) Grant S. Hansman, Katsuro Natori, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima, Naokazu Takeda, and Kazuhiko Katayama : Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 2) 影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山和彦、武田 直和：蛍光プローブを用いた HEV の高感度検出法および遺伝子型識別法の開発 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 3) 岡 智一郎、小川 智子、Hansman Grant、影山 努、片山 和彦、宮村 達男、武田 直和：サポウイルス ORF1 のプロセッシング産物の同定と切断地図の作製 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 4) 松原 尚子、グラント ハンスマン、岡智一郎、名取 克郎、武田 直和、片山和彦：サポウイルス粒子形成機構の解析 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 5) 片山和彦、白土（堀越）東子、岡智一郎、松原尚子、影山努、宮村達男、武田直和：ノロウイルス (NoV) 全長 cDNA クローンを用いた複製機構の解析 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日
- 6) 片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、牛島廣治、三好達也、田中智之、宮村達男、武田直和：Sapovirus ゲノムの解析、衛生微生物技術協議会、さいたま、平成16年7月9日
- 7) 片山和彦：ノロウイルス食中毒と予防 日本食品衛生セミナー、静岡、平成16年12月6日
- 8) Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Katsuro Natori, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima and Naokazu Takeda: Expression of Human Sapovirus Virus-like Particles. The 7th Symposium on Positive-Strand RNA viruses. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 9) Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Satoko Ogawa, Grant S. Hansman, Hiroshi Ushijima, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: In vitro Proteolytic Processing of the Sapovirus ORF1 polyprotein. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 10) Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Haruko Shirato-Horikoshi, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004

Francisco, CA. May 29, 2004

1 1) K. Katayama, T. Oka, S. Ogawa, H. Shirato, T. Miyamura, and N. Takeda: Study on Norovirus replication in vitro. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004.

1 2) G. S. Hansman, K. Natori, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004,

論文発表

【1】 Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K. Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus. *J of Virol.* 78: 3889-3896, 2004.

【2】 Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J of Clin Micro* 42: 1305-1307, 2004.

【3】 Hansman GS, Doan LT, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M,

Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 149: 1673-1688, 2004.

【4】 Kageyema T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 42: 2988-2995, 2004.

【5】 Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10: 1874-1876, 2004.

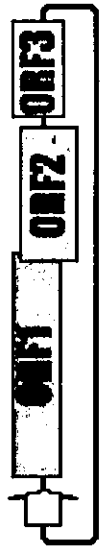
【6】 Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, and Katayama K. Norovirus and Sapovirus Infection in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 57: 276-278, 2004.

【7】 Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Archives of Virology* 150: 21-36, 2005.

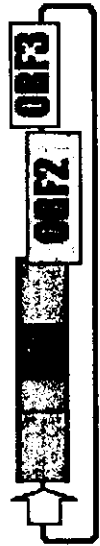
【 8 】 Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11: 180-182, 2005.

【9】 Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virology Journal* 2:13, 2005.

pT7U201F



pT7U201F-ORF1/IGFP



pT7U201F



pT7U201ORF23



pT7U201F-Pro/m



pT7GFP



pT7U201ORF3



↑: T7RNA プロモーター

■: EMCV のInternal ribosome entry site (IRES)

■: GFP 遺伝子

■: プロテアーゼモチーフ GDCGG に導入した C-G 変異

図1. プラスミドコンストラクト



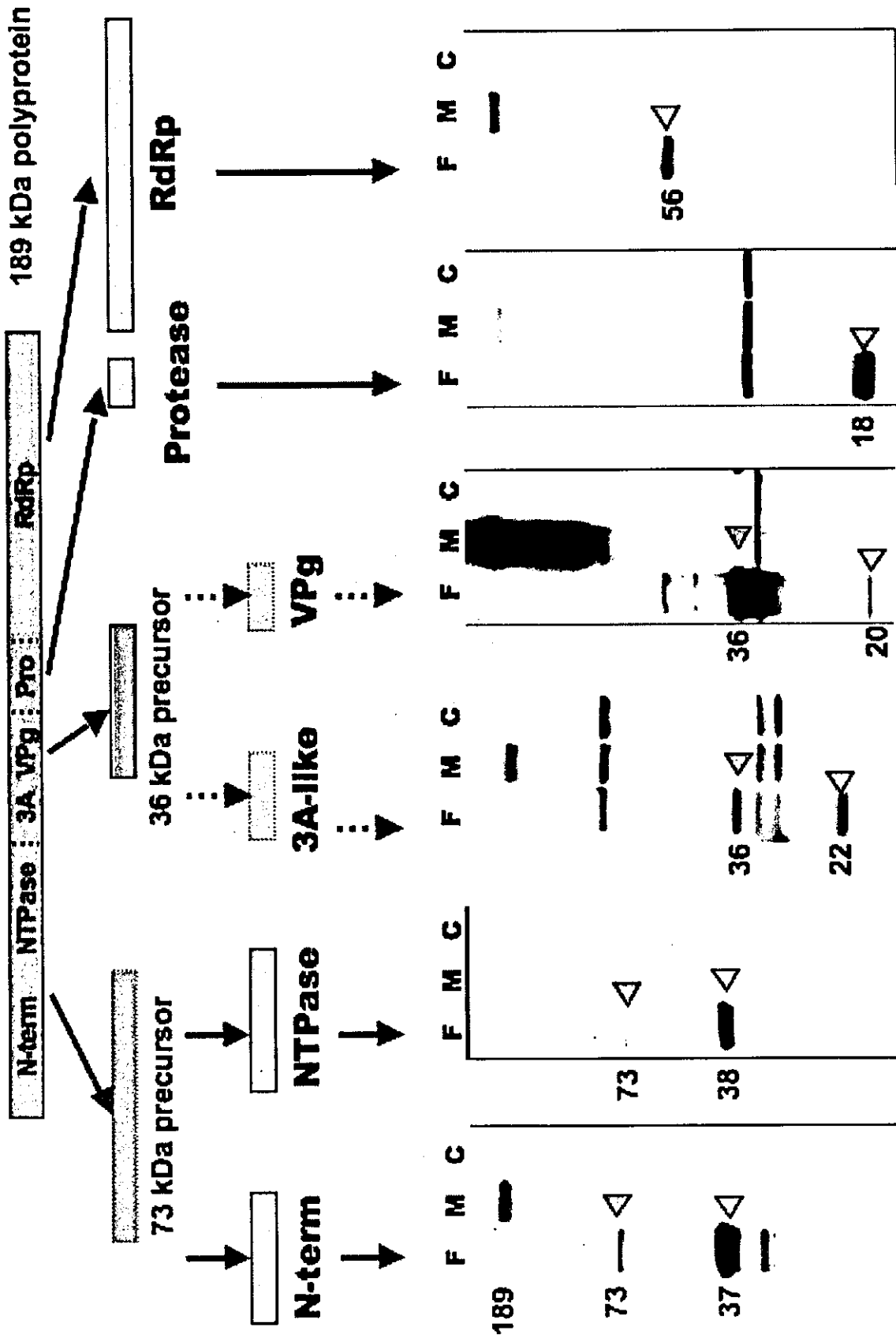
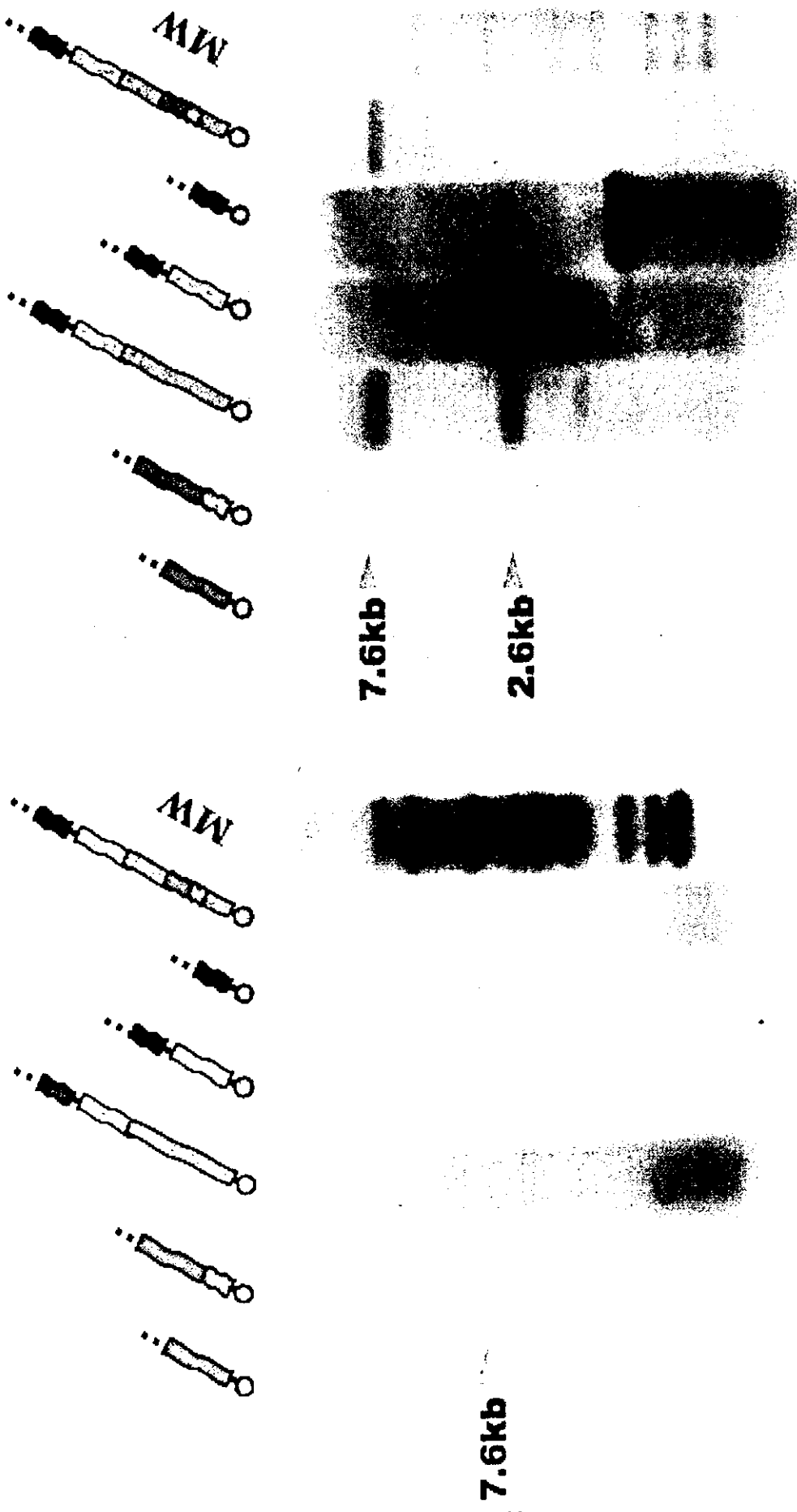


図2. ウェスタンブロットティング



図3. ノーザンブロッティング

(+) RNA 合成 (-) RNA 合成



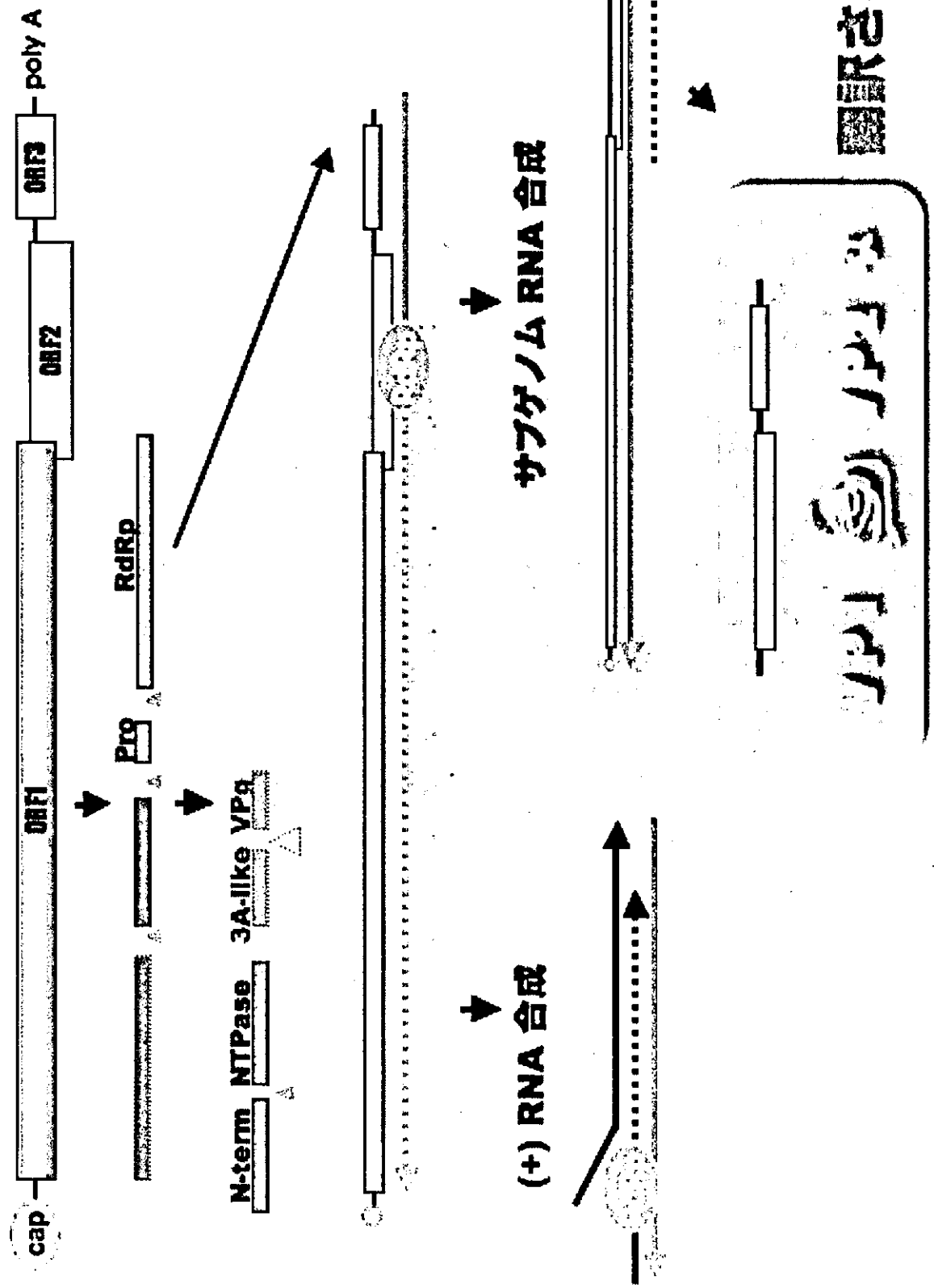
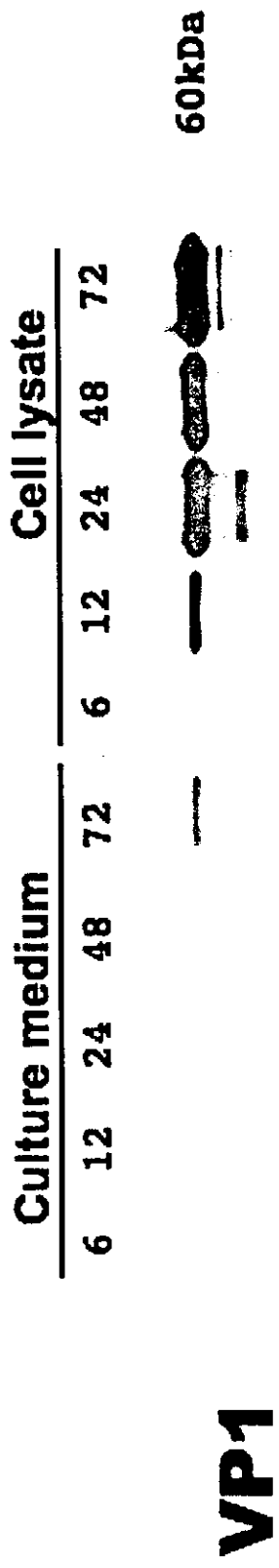
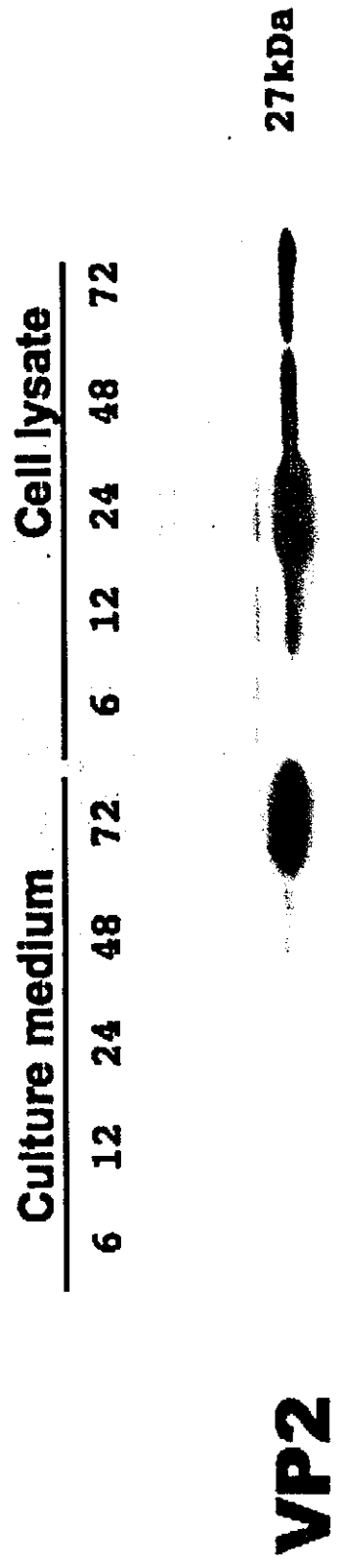


図4. VIFシステムの概略





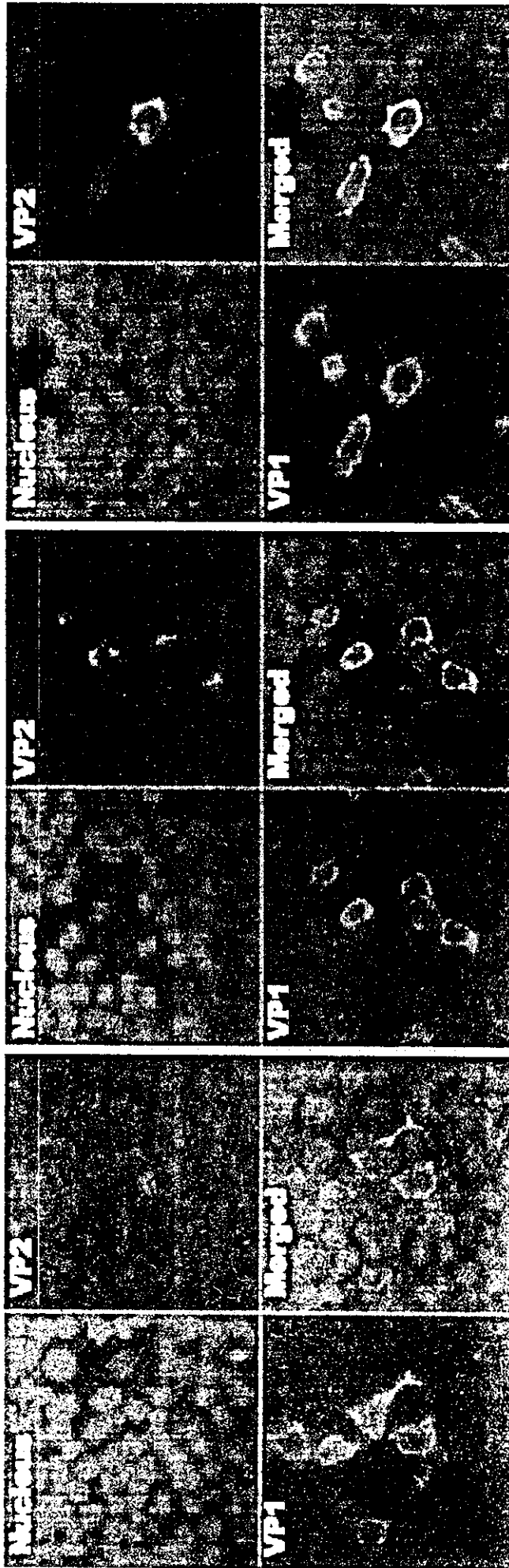
15 sec. expose



15 min. expose

図5. 293T細胞におけるVP1とVP2の合成





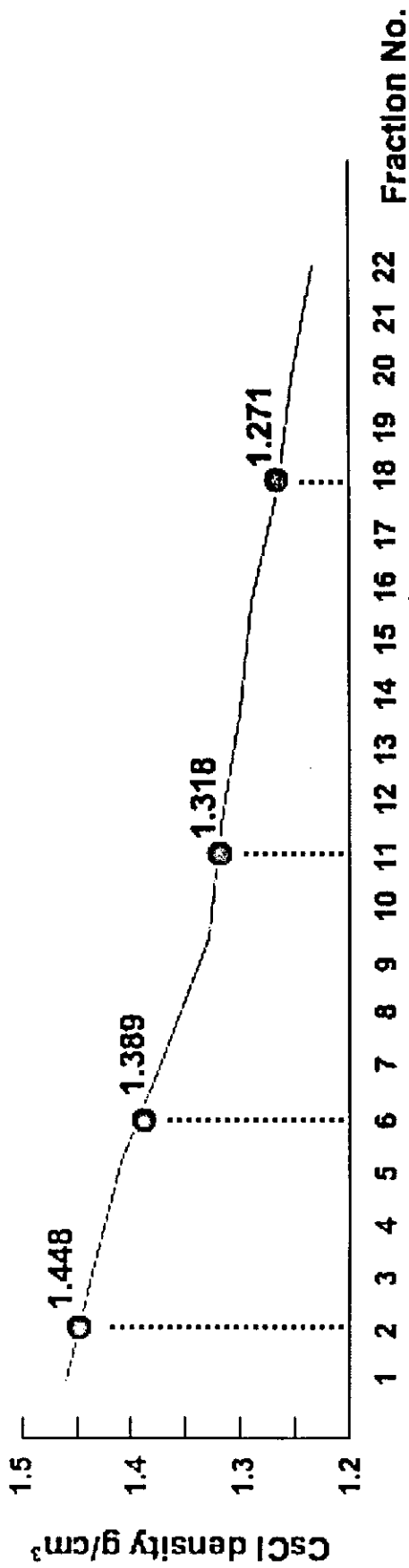
24hrs post transfection

48hrs post transfection

72hrs post transfection

図6. 免疫蛍光抗体法によるVP1 and VP2の検出





RT-PCR + + + + + + + + + + + + + + + + +

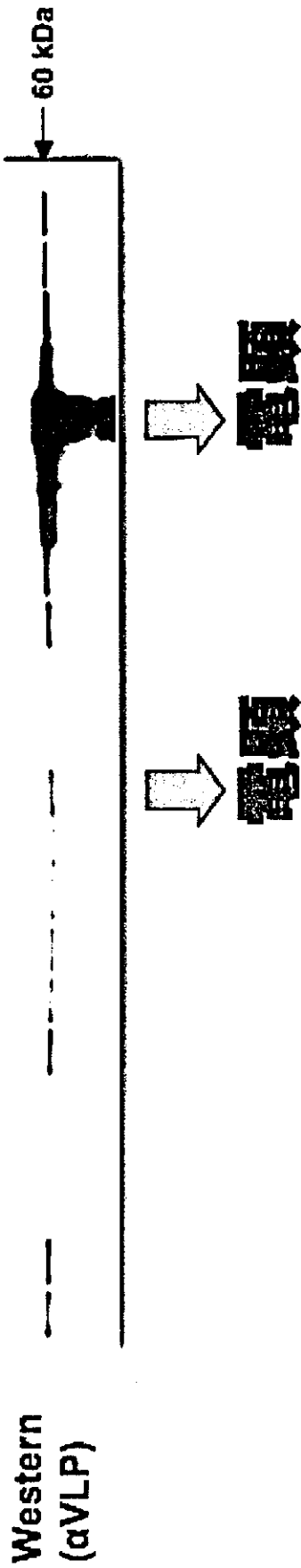
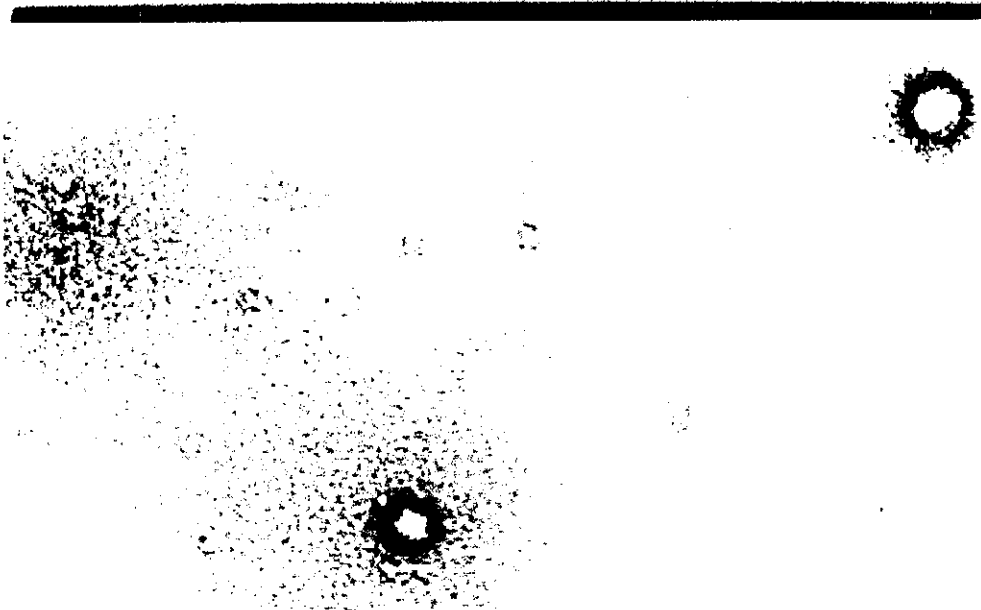


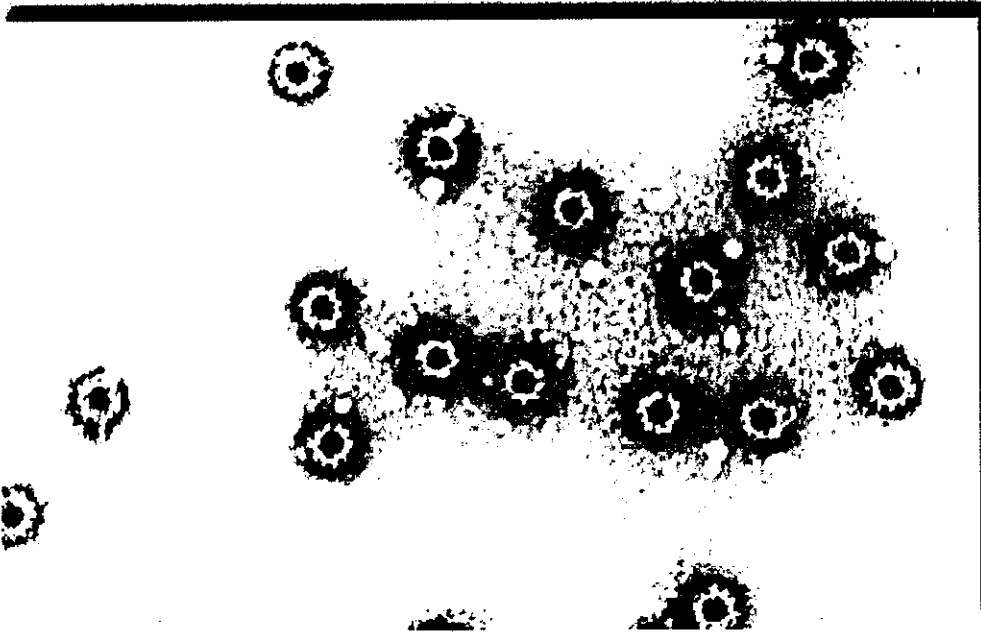
図7. 浮上密度勾配遠心法によるVLPs密度の測定

11



1.318 g/cm³

18



1.271 g/cm³

図8.7ラクシオン11と18の電顕像



サポウイルス ORF1 の切断地図の作製

分担研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨

サポウイルスはノロウイルスと同様、ヒト感染性胃腸炎の原因ウイルスとして公衆衛生上重要なウイルスである。しかしながら、細胞やモデル動物での増殖系が確立されていないことから、ウイルスそのものの基礎的な研究がほとんど進んでいない。サポウイルスはカリシウイルス科に属するプラス1本鎖 RNA ウィルスで、全長約 7500 塩基からなり、2 ないし3つのオープンリーディングフレーム (ORF)をコードする。ORF1 は約 2280 アミノ酸残基からなるが、アミノ酸モチーフから NTPase、VPg、プロテアーゼ (Pro)、ポリメラーゼ (Pol)といった非構造タンパク質と、構造タンパク質(VP1)をコードすると考えられている。本研究では *in vitro* transcription/translation system および部位特異抗体を用いてサポウイルス ORF1 の切断産物を同定し、7つの最終産物からなる切断地図(NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH)を決定することに初めて成功した。またカリシウイルスのプロテアーゼで高度に保存されているアミノ酸モチーフに変異を導入することで、この切断がサポウイルスの ORF1 にコードされる自己のプロテアーゼに依存することを証明した。さらに大腸菌リコンビナントを用いた実験から、プロテアーゼの N 末端側の切断点を同定し、サポウイルスプロテアーゼが他のカリシウイルスと同様の基質特異性を有することを明らかにした。

A. 研究目的

サポウイルスはノロウイルスと同様にヒト感染性胃腸炎の原因ウイルスである。サポウイルスの感染経路はいまだ明確でないものの、その検出例は近年の遺伝子検出系の改良にともなって増加傾向にあることから、ノロウイルスとともに今後、注目すべきウイルスである。しかしながら、ヒトから分離されたサポウイルスはノロウイルスと同様に細胞増殖系やモデル動物が報告されていない。サポウイルスの特徴を理解するためには、その遺伝子および抗原抗体検出系の開発と同時に、サ

ポウイルスゲノム産物の発現機構や、それぞれの機能の解析といった基礎的な研究も重要である。

サポウイルスのゲノム上には2ないし3つのオープンリーディングフレーム (ORF)が存在するが、ORF1 は共通してアミノ酸残基数約 2280 の巨大なポリペプチドをコードする。カリシウイルス科に属する他のウイルスに関する研究結果から、サポウイルスの ORF1 は翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼ活性により NTPase、VPg、プロテアーゼ (Pol)、ポリメラーゼ (Pol)といった非構造タンパク

質と、構造タンパク質(VP1)に自己切断(プロセッシング)されると考えられており、これらの切断産物は、それぞれサポウイルスの複製、およびウイルス粒子形成過程において重要な役割を有すると考えられる。しかしながら、サポウイルスの ORF1 がコードするポリペプチドのプロセッシング産物の同定および切断点の決定は行われていない。これらの知見は今後、サポウイルスの研究を進める上での必須情報である。そこで本研究では、*in vitro* transcription/translation の系を用いてサポウイルス ORF1 の切断地図の作製、およびプロセッシングへのサポウイルスプロテアーゼの関与の証明を行い、さらに各切断点の同定を試みた。

B. 研究方法

1. サポウイルス ORF1 の切断地図の決定

ゲノム全塩基配列を決定したサポウイルス株 (SaV Mc10: GenBank Accession Number AY237420) の cDNA をクローニングベクター pUC19 (東洋紡績) に組み込み、full-length cDNA clone (SaV Mc10 full-length/pUC19) を作製した。この plasmid を鋳型として、サポウイルス ORF1 の全長もしくは一部に対応する遺伝子領域を T7 promoter 配列を有するセンスプライマーと、終止コドンおよびポリ A テイルを有するアンチセンスプライマーを用いて PCR 法によって増幅し、この PCR 産物を鋳型として Rabbit reticulocyte *in vitro* coupling transcription/ translation system (プロメガ) を用いて ³⁵S メチオニン標識タンパク質を発現させた。翻訳産物を直接、あるいは昨年度の本研究事業で作製したサポウイルス ORF1 に対する8種類の部位特異抗体を用いた免疫沈

降法を行った後に SDS-PAGE し、さらにゲル中のタンパク質を PVDF membrane に転写した。この membrane 上のタンパク質の放射シグナルをイメージアナライザー BAS2500 (富士フィルム) で検出し、各切断産物の検出、同定を行った。

2. サポウイルス ORF1 プロセッシングへの自己プロテアーゼの関与の検討

サポウイルスプロテアーゼの活性部位と推測される GDCG モチーフのうち、C (システイン) を A (アラニン) へと置換させるように遺伝子に変異を導入した full-length cDNA clone (SaV Mc10 full-length C1171A/pUC19) を作製し、これを鋳型として上記 1. と同様に遺伝子増幅と発現産物の解析を行った。

3. サポウイルス ORF1 の切断点の解析

SaV Mc10 full-length/pUC19 および SaV Mc10 full-length C1171A/pUC19 を鋳型に p70 (Pro-Pol) および p14(VPg)-p70(Pro-Pol) に対応すると推察される遺伝子領域を PCR 法によって増幅した。なお、発現産物のアフィニティー精製を可能とするため、C 末端側に6個のヒスチジン残基(ヒスチジンタグ)をコードするようにアンチセンスプライマーを設計した。これらの遺伝子領域がコードするタンパク質を大腸菌発現ベクター、pGEX6P-3もしくはpGEX4T-1 (アマシャムバイオサイエンス) に組み込んで、大腸菌 BL21-Codon Plus(ストラタジーン) に導入し、LB 培地中、37°C で OD が 0.6-0.8 になるまで培養後、終濃度が 0.1mM となるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 3時間培養し、リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。今回作製したリコンビナントタンパク質

はいずれもN末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、C 末端側にヒスチジンタグが付加する融合タンパク質として発現する。リコンビナントタンパク質発現の確認および切断産物の有無は、誘導前後の菌体を用いて SDS-PAGE /クマシー染色法、抗 GST 抗体(アマシャムバイオサイエンス)、抗 His tag 抗体 (ロシュダイアグノシス)、および抗 VPg 抗体、抗 Pro 抗体、抗 Pol 抗体を用いた SDS-PAGE /ウェスタンブロット法によって検討した。この結果、リコンビナントタンパク質の切断が認められたものについては、切断部位を同定するため、大腸菌体を 8M 尿素/PBS (pH7.4)で溶解後、同条件下で TALON affinity resin (クロンテック)を用いて融合タンパク質の C 末端側に付加したヒスチジンタグを利用して切断産物をアフィニティー精製し、その精製産物の N 末端アミノ酸配列(5残基)を解析した(アプロサイエンス)。

C. 研究結果

1. サポウイルス ORF1 の切断地図の決定

サポウイルス ORF1 全長および一部領域の翻訳産物の解析により、SaV Mc10 ORF1 のプロセッシング産物として 10 種類(p11、p28、p35、p32、p14、p70、p60、p46、p120、および p66)のウイルス蛋白質を同定し、SaV Mc10 ORF1 の切断地図が NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH であることを明らかにした。なお、p66 は p28-p35 (NTPase)、p46 は p32-p14 (VPg)、p120 は p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)であることも確認できた。

2. サポウイルス ORF1 のプロセッシングへの自

己プロテアーゼの関与

カリシウイルスのプロテアーゼに共通して認められるアミノ酸モチーフ(GDCGモチーフ)に変異を導入した結果、ORF1 のプロセッシングは観察されなくなり、サポウイルス ORF1 のプロセッシングが他のカリシウイルスと同様にウイルス自身がコードするプロテアーゼによって行なわれることが確認された。

3. サポウイルス ORF1 の切断点の解析

SaV Mc10 の p70 (Pro-Pol)内の切断の有無の検討、および Pro-Pol 近傍の切断点を同定するため、まず p70 (Pro-Pol)に対応すると推察される遺伝子領域を pGEX-6P-3 および pGEX-4T-1 ベクターに組み込み、大腸菌で発現させたところ、pGEX-6P-3 のみリコンビナントタンパク質の切断が認められた。さらに切断産物をアフィニティー精製し、N末端アミノ酸配列を解析した結果、p70 (Pro-Pol)の切断は観察されなかったものの、予想外に pGEX-6P-3 ベクター由来のライノウイルスプロテアーゼ認識配列内部の Q/G(/は切断箇所)で切断が起きていることが明らかとなった。また、p14(VPg)-p70(Pro-Pol)に対応すると推察される遺伝子領域を pGEX-4T-1 ベクターに組み込み大腸菌で発現させたところ、リコンビナントタンパク質の切断が認められた。さらに切断産物をアフィニティー精製し、N末端アミノ酸配列を解析した結果、p14(VPg)と p70(Pro-Pol)の間の E¹⁰⁵⁵/A¹⁰⁵⁶(数字は ORF1 内部のアミノ酸番号に対応)で切断が起きていることが明らかとなった。この解析により、サポウイルス ORF1 のプロテアーゼ上流の切断点を同定することが出来た。また、今回同定した ORF1 内部の切断点付近のアミノ

酸配列について、すでに報告されているサポウイルス株および昨年度の本研究事業で片山が報告した新たなサポウイルス株と比較したところ、同定した切断部位はいずれも E/A(一部 E/G)と、保存されていることが示された。なお、サポウイルスプロテアーゼの GDCG モチーフに変異を導入したリコンビナントタンパク質ではいずれも切断は観察されなかった。

D. 考察

1. サポウイルス ORF1 の切断地図の決定

サポウイルスはカリシウイルス科に属するが、この科には他にノロウイルス、ベジウイルス、ラゴウイルスが属し、ゲノム構造の特徴から大きく2つに分けることができる。すなわち構造タンパク質が非構造タンパク質と同一の ORF にコードされるサポウイルス、ラゴウイルスと、別の ORF にコードされるノロウイルス、ベジウイルスである。

本研究で決定した SaV Mc10 ORF1 の切断地図 (NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH) は p70 を除き、サポウイルスと同様のゲノム構造を有するラゴウイルスの切断地図 (NH₂-p16-p23-p37(NTPase)-p41-p15 (VPg)-p69(Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH) と極めて類似していた。また p66、p46、p120 は中間産物と考えられるが、同様の産物がラゴウイルスだけでなく、他のカリシウイルスでも報告されている。

2. サポウイルス ORF1 のプロセッシングへの自己プロテアーゼの関与

他のカリシウイルスプロテアーゼの活性発現に必須と報告されている GDCG モチーフにアミノ酸

変異を導入することで、サポウイルス ORF1 のプロセッシングが消失したことから、サポウイルスのプロテアーゼが他のカリシウイルスと同様の活性中心を有することが示された。サポウイルスプロテアーゼの酵素学的検討、阻害剤の検索のためには、活性発現の最小領域の検索、活性の発現、基質特異性に関与するアミノ酸の同定が望まれる。

3. サポウイルス ORF1 の切断点の解析

今回同定したサポウイルス ORF1 の切断部位およびベクター由来配列内部の切断はグルタミン酸(E)もしくはグルタミン(Q)の直後で起こっており、他のカリシウイルスで報告されている切断部位の特徴と合致していた。p70(Pro-Pol) は2つの機能性タンパク質(Pro および Pol) に特徴的なアミノ酸モチーフ(GDCG および YGDD) が存在するが、本研究では大腸菌を用いた系でも、さらなる切断は観察されなかった。他のカリシウイルスでも Pro-Pol は *in vitro* translation の系では安定な中間産物として検出されているが、大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた解析ではいずれも Pro および Pol への切断が報告されている。そのため、SaV の p70 が最終産物であるのか否かについては哺乳動物細胞を用いた発現系などを用い、さらに慎重に検討する必要がある。

他のサポウイルス ORF1 の切断点を同定するためにさらに大きな領域について大腸菌での発現を試みたが、解析に十分なリコンビナントタンパク質の発現、精製には成功しなかった。今後はこの問題を克服するため、本研究で得られた知見に基づき、今後、特徴的なアミノ酸配列(Q/X もしくは E/X、X は任意のアミノ酸) を有し、サポウイ

ルス株間で高度に保存される部位の検索を行い、切断予想部位へのアミノ酸置換を導入した cDNA を作製後、*in vitro* transcription/translation system を用いて、サポウイルス ORF1 の全切断点の同定を試みる。

E. 結論

本研究により、SaV Mc10 ORF1 の切断地図が NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH であることを明らかにした。また、プロテアーゼの GDCG モチーフに変異を導入した結果、ORF1 のプロセッシングは全く観察されず、サポウイルス ORF1 のプロセッシングが自己のプロテアーゼによって行なわれることも明らかになった。また、サポウイルス ORF1 内部の1カ所の切断点を同定に成功し、サポウイルスのプロテアーゼの基質特異性が他のカリシウイルスと同様であることを示すことが出来た。今後も引き続き各切断点の同定を行い、サポウイルスの構造、非構造タンパク質の基礎的研究を進める上で、最も基本的かつ重要な知見を得ることを目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kageyama T., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino FB., Kojima S., Takai R., Oka T., Takeda N., Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to

Norovirus in Japan.

Journal of Clinical Microbiology. 42(7): 2988-95, 2004.

(2) Katayama K., Miyoshi T., Uchino K., Oka T., Tanaka T., Takeda N., Hansman GS. Novel recombinant sapovirus. Emerging Infectious Diseases. 10 (10):1874-6, 2004.

(3) Guntapong R., Hansman GS., Oka T., Ogawa S., Kageyama T., Pongsuwanna Y., Katayama K. Norovirus and sapovirus infections in Thailand. Japanese Journal of Infectious Diseases. 57(6):276-8, 2004.

(4) Hansman GS., Natori K., Oka T., Ogawa S., Tanaka K., Nagata N., Ushijima H., Takeda N., and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Archives of Virology. 150(1):21-36, 2005.

(5) Hansman GS., Katayama K., Oka T., Natori K., Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. Virology Journal. 2(1):13, 2005.

(6) Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, GS., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T. & Takeda N. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. Journal of Virology. 2005 *in press*.

2. 学会発表

- (1) Katayama K., Oka T., Ogawa S., Shirato-Horikoshi H., Miyamura T., Takeda N. : Analysis of Norovirus replication using full-length genome. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.
- (2) Hansman GS., Katayama K., Oka T., Natori K., Ogawa S., Ushijima H., Takeda N. : Expression of Human Sapovirus-like Particles. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.
- (3) Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Ushijima H., Miyamura T., Takeda N. : In vitro Proteolytic Processing of the Sapovirus ORF1 polyprotein. 7th International Symposium on Positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27-June 1, 2004.
- (4) 片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、牛島廣治、三好達也、田中智之、宮村達男、武田直和: Sapovirus ゲノムの解析, 衛生微生物技術協議会第25回研究会, さいたま市, 2004年7月8-9日.
- (5) Katayama K., Oka T., Ogawa S., Shirato H., Miyamura T., Takeda N. : Study on Norovirus replication in vitro. Second International Calicivirus Conference, Dijon, France, Nov 6-10, 2004.
- (6) Hansman GS., Natori K., Oka T., Takeda N., Katayama K. : Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Second International Calicivirus Conference, Dijon, France, Nov 6-10, 2004.
- (7) Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Miyamura T., Takeda N. : In vitro proteolytic processing and identification of the cleavage site of Sapovirus ORF1. Second International Calicivirus Conference, Dijon, France, Nov 6-10, 2004.
- (8) 岡智一郎: 7th International Symposium on positive-strand RNA viruses の報告. 第16回ウイルス性下痢症研究会, 東京, 2004年11月20日.
- (9) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子, 松原尚子, 影山努, 小川智子, 宮村達男, 武田直和: ノロウイルス全長クローンを用いた複製機構の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2004年11月21日.
- (10) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 影山努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: サポウイルス ORF1 のプロセッシング産物の同定. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2004年11月21日.
- (11) 松原尚子, Hansman Grant, 名取克郎, 岡