

55(4):19-24, 2005.

西尾治. ノロウイルスの感染と遺伝子迅速検査の現状と期待. *The Medical Journal*. 915:11, 2005.

西尾治. ノロウイルスによる感染症と食中毒. *日本医事新報*. 4221:105, 2005.

西田知子, 岡本玲子, 中尾利器, 松村健道, 大瀬戸光明, 西尾治. 山口県内におけるノロウイルス胃腸炎集団発生事例および市販生食カキの汚染状況. *獣医公衆衛生研究*. 7:24-25, 2005.

西尾治. 広範囲 血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか—ノロウイルス. *日本臨床*. 63 巻増刊号 7:332-333, 2005.

西尾治, 山下育孝, 宇宿秀三. ノロウイルスによる食中毒, 感染症. *食品衛生研究*. 55(10):7-16, 2005.

西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一. ノロウイルスによる食中毒について. *食品衛生学雑誌*. 46:235-245, 2005.

2. 学会発表

西尾治: 食品を介するノロウイルスによる食中毒の現状と対策, 第 46 回日本臨床ウイルス学会、福岡市、2005 年 6 月 3-4 日

杉枝正明、愛木智香子、秋山美穂、西尾治:

Norovirus による集団発生事例について、第 46 回日本臨床ウイルス学会、福岡市、2005 年 6 月 3-4 日

杉枝正明、稲吉恵、足立聡、三輪好伸、増田高志、愛木智香子、秋山美穂、西尾治: *Norovirus* による集団発生事例について、平成 17 年度地方衛生研究所全国協議会第 20 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、前橋市、2005 年 9 月 29-30 日

原俊吉、大石陽子、山上隆也、小澤茂、西尾治: 2004 年度冬季に山梨県内の高齢者施設で発生したノロウイルス急性胃腸炎集団事例、平成 17 年度地方衛生研究所全国協議会 第 20 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、前橋市、2005 年 9 月 29-30 日

秋山美穂、愛木智香子、西尾治、山下育孝、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子、田中俊光、宇宿秀三: 輸入食品のノロウイルス汚染状況について、日本食品衛生学会第 90 回学術講演会、さいたま市、2005 年 10 月 20-21 日

西尾治: ノロウイルスによる感染症、食中毒の現状と予防、平成 17 年度獣医公衆衛生講習会、山口市、2005 年 11 月 5 日

山下育孝、豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子、田中俊光、愛木智香子、秋山美穂、西尾治: 輸入生鮮魚介類及び急性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス (NV) の分子疫学的解析、第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005 年 11 月 20-22 日

西田知子、中尾利器、岩田祐之、秋山美穂、
愛木智香子、西尾治：山口県内で発生した
ノロウイルスによる胃腸炎、第 53 回日本ウ
イルス学会学術集会、横浜市、2005 年 11
月 20-22 日

秋山美穂、愛木智香子、杉枝正明、入谷展
弘、吉澄志磨、西田知子、田中俊光、中込
治、岡部信彦、西尾治：ノロウイルスの
Mexico 株類似リコンビナント株の国内での
検出状況、第 53 回日本ウイルス学会学術集
会、横浜市、2005 年 11 月 20-22 日

愛木智香子、杉枝正明、山下育孝、福田伸
治、吉澄志磨、西田知子、田中俊光、岩切

章、田村務、大矢英紀、秋山美穂、岡部信
彦、西尾治：欧米で流行している G 2/4 変
異型ノロウイルスの国内での検出状況、第
53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、
2005 年 11 月 20-22 日

松岡由美子、平野敬之、小河正雄、愛木智
香子、秋山美穂、西尾治：熊本市、佐賀県、
大分県で検出されたノロウイルス (NV) の
分子疫学について、第 53 回日本ウイルス学
会学術集会、横浜市、2005 年 11 月 20-22
日

哺乳動物細胞を用いたサポウイルス様中空粒子の発現

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(Sapovirus; SaV)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。SaV は構造遺伝子領域の塩基配列に基づき、現在5つの genogroup (GI-GV)に分類されている。SaV についてはバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞での virus-like particles (VLPs)の作製が報告されている。我々は昆虫細胞で発現させた VLPs を用いて SaV が抗原的にも多様性を有することを明らかにしてきた。多様な SaV の抗原もしくは抗体を効率的に検出するためには、ノロウイルスで行われてきたのと同様に、異なる株の VLPs を網羅したパネルを作製することが重要である。しかし、我々の検討では、昆虫細胞を用いた発現系での VLP の発現量が著しく低い、もしくはまったく認められない SaV 株が存在した。そこで、本研究では、昆虫細胞発現系での VLPs 作製が困難な SaV 株について哺乳動物培養細胞を用いた VLPs 発現系を構築した。

A. 研究目的

サポウイルス(Sapovirus; SaV)はカリシウイルス科に属し、ヒトおよびブタに急性胃腸炎を引き起こす。SaV は構造遺伝子領域の塩基配列に基づき、現在5つの genogroup (GI-GV)に分類されている。ブタ由来の特定の SaV 株 (GIII)では細胞培養系が報告されているものの、ヒト由来の SaV 株 (GI,II, IV, V)は、細胞培養系も実験動物系も報告されていない。

SaV についてはバキュロウイルス発現系を用いて virus-like particles (VLPs)の作製が報告されている(これまでに合計7株 : GI 3 株、GII 1 株、GIII 1 株、GV 1 株)。このうちの3株(GI-Mc114, GII-C12, GV-NK24)は我々の研究グループが

発現に成功した株である。我々はさらに、抗 Mc114 VLPs 抗体、抗 NK24 VLPs 抗体、および大腸菌発現蛋白抗体を用い、少なくとも SaV GI, GII, GV VLPs 間では抗原性が異なることを明らかにしている (Hansman et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Arch. Virol. 150 (1) : 21-36, 2005)。

しかし、GII C12 株については電子顕微鏡観察で VLPs の発現が確認できたものの、抗体作製に十分な VLPs 発現量が得られなかった。また、その他のGII Mc10株については、VLPの形成がまったく認められなかった。

遺伝的に多様な SaV 株の抗原性の違いを評価するためには異なる genogroup、genotype に属す

る株を網羅した VLPs パネルの作製が求められる。本研究では、バキュロウイルス発現系では VLPs の発現が困難であった SaV GII Mc10 株について、哺乳動物培養細胞 (293T、COS7)における VLPs 作製を試みた。

B. 研究方法

1. サポウイルス GII Mc10 株 VLPs 発現用プラスミドの作製

サポウイルス(Sapovirus; SaV) GII Mc10 株 (SaV Mc10: GenBank Accession Number AY237420) の全長 cDNA clone (SaV Mc10 full-length/pUC19) を鋳型として、サポウイルスの構造遺伝子の開始コドンからゲノム末端までの領域 (nt5174-7458) を、5'側に BamHI 切断部位および T7 promoter 配列を付加したセンスプライマーと、3'側にポリ A テイルおよび BglII 切断部位を付加したアンチセンスプライマーを用いて PCR 法によって増幅し、制限酵素 BamHI、BglII で切断後、マルチクローニングサイトを改変したクローニングベクター pUC19 の BamHI/BglII 部位に挿入し、大腸菌 DH5 α に導入した。作製した plasmid (SaV Mc10 T7 capsid-genome end/pUC19) は目的通りの塩基配列を有することを確認した。

2. 哺乳動物培養細胞でのサポウイルス VLPs の発現

COS7 細胞 (サル由来: 理化学研究所細胞銀行より購入)、293T 細胞 (ヒト由来: American Tissue Culture Center より購入) を 10% Fetal calf serum、100units/ml ペニシリン G、100 μ g/ml のストレプトマイシン G を含有する DMEM (Invitrogen) 中

で培養した。6 ウェルプレートに 60%コンフルエントとなるように細胞を播種し、37°C で 1 晩、培養した。翌日、培地を吸引除去後、細胞を Phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) で 2 回洗浄し、各ウェルに 0.1 plaque forming unit (PFU) に相当する T7 RNA Polymerase 遺伝子保有組み換えワクチニアウイルス (Dr. B. Moss より分与) を添加後、37°C、1 時間保持した。その後、組み換えワクチニアウイルスを含む無血清培地 OPTI-MEM (Invitrogen) を除去し、上記の DMEM を添加、Effectene Transfection Reagent (QIAGEN 社) を用い、各ウェルに 1 μ g ずつ、SaV Mc10 T7 capsid-genome end/pUC19 をトランスフェクトした後、37°C で 48 時間、培養した。培養後の細胞培養上清を除去し、各ウェルに 300 μ l ずつ OPTI-MEM を加え、セルスクレーパーで細胞を剥がした。回収した細胞は -80°C と室温での凍結融解を 3 回繰り返して細胞を破壊したのち、4°C で 2300 \times g、5 分間、遠心し、細胞破砕物を沈殿させた。その後、VLPs を回収するため、Beckman Coulter 社の Sw32-Ti ローターにセットし、10°C で 31,000rpm、2 時間、超遠心を行って、VLPs を沈殿させた。上清を除去後、遠心チューブに 500 μ l の OPTI-MEM を加え、4°C で 1 晩静置し、VLPs を溶解させた。その後、4°C で 2300 \times g、5 分間、遠心し沈殿残渣を除去後、上清を 5-30% (wt/vol) のスクロースのグラディエント溶液に重層し、Beckman Coulter 社の Sw41 ローターにセットし、10°C で 25,000rpm、2.5 時間超遠心を行った。その後、遠心チューブ内の溶液を約 500 μ l ずつ、22 のフラクションに分画した。これら分画の一部 (20 μ l) を使用し、糖度測定計でスクロース濃度を計測後、各フラクションに PBS 550 μ l を加え、

Beckman Coulter 社の TLA55 ローターにセットし、4°Cで45,000rpm、3時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに20μlのPBSを加え、4°Cで1晩静置した。各分画についてそれぞれ1μlを用い、SDS-PAGE /クマシー染色法、抗VP1抗体を用いたSDS-PAGE /ウェスタンブロット法、および電子顕微鏡観察を行い、構造タンパク質およびVLPの存在を検出した。

3. 精製VLPに対する抗体の作製

SaV GII Mc10株VLPsに対する抗血清を調製するため、精製したVLPs 5μgを含むPBS溶液(500μl)を等量の完全アジュバンドと混合し、ウサギ1羽に皮下注射した。1か月後、4°Cに保存しておいたVLPs 5μgを含むPBS溶液(200μl)を静脈内に投与し、2週間後、採血を行い、SaV GII Mc10株VLPsに対する抗血清を得た。モルモットにも同様に免疫して抗血清を作製した。得られた抗血清の力価は精製したGII Mc10 VLPsを50ng/ウェルずつ固相した96ウェルプレートを用いて、段階希釈した抗血清を添加、その後、酵素標識抗ウサギ抗体、もしくは酵素標識抗モルモット抗体を用いて検出した。

C. 研究結果

昆虫細胞発現系ではVLPsの発現が困難であったSaV GII Mc10株のVLPsを作製するため、T7 promoter配列下流にSaV Mc10株のサブゲノムの開始コドンと推定される部位からゲノム末端までを組み込んだ plasmid (SaV Mc10 T7 capsid-genome end/pUC19)を作製した。この plasmidをあらかじめT7 RNA polymerase 遺伝子を有する組み換えワクチニアウイルスを感染させ

たCOS7もしくは293T細胞にtransfectした。本研究で用いた発現系では目的遺伝子がT7 RNA polymeraseによって大量に転写される。転写されたmRNAは、さらにワクチニアウイルスのキャッピング酵素によって、発現した目的遺伝子のmRNAの5'末端にcap構造が付加され、効率的なタンパク質の翻訳がおこる。本研究では、COS7および293T細胞においてSaV GII Mc10株のVLPs発現に成功した。なお、VLPsはいずれも培養細胞内にのみ認められた。293T細胞とCOS7細胞におけるVLPs発現効率の比較を行った結果、COS7細胞の方がVLPsの生成効率がよかったため、本研究ではCOS7細胞を用いてSaV GII Mc10株VLPsの大量調製を行った。VP1抗体を用いたSDS-PAGE /ウェスタンブロット法で22.9-17.8% (wt/vol)のスクロース濃度範囲でSaVの構造タンパク質に相当する、単一の60kDaのバンドを認めた。また、ピーク分画についてはSDS-PAGE /クマシー染色法で単一の60kDaのバンドを認めた。さらにこのピーク分画について電子顕微鏡観察を行ったところ、直径が41-46nmのVLPsが観察できた。今回の検討では6ウェルプレート10枚あたり約10μgの精製VLPsが得られ、発現実験を複数回行うことで、ウサギおよびモルモットでの特異抗血清の作製も可能であった。得られた抗血清の力価はそれぞれ、128,000倍、1,024,000倍であった。今後、SaV GII Mc10 VLPsおよびこのVLPsに対する抗血清を用いて、他のgenogroupのSaV VLPsとの交差反応性を検討する。

D. 考察

本研究では昆虫細胞でのVLPs発現が困難であ

った SaV 株について、哺乳動物培養細胞を用いた VLPs の作製に成功した。特定の株で昆虫細胞での発現が困難である理由は現時点では不明であるが、我々の検討では genogroup II に属する株において、昆虫細胞での VLPs 発現効率が極端に悪いが発現せず、また他の研究グループも genogroup II の株に対する VLP 作製の成功例がないことから、genogroup によって VLPs の形成に要求される因子が異なる可能性も考えられる。本研究では昆虫細胞でまったく VLPs の形成ができなかった SaV GII Mc10 株について検討を行い、VLPs 発現に成功した。今後、昆虫細胞で発現したものの、発現量が著しく低かった GII C12 株や、その他の genogroup に属する株についても本発現系が有用か検討を行い、昆虫細胞発現系で作製した VLPs とともに、SaV の genogroup 間、genotype 間の抗原性の違いを検討していく。

E. 結論

本研究により、昆虫細胞での VLPs の発現が困難であった SaV 株について、哺乳動物細胞を用いて VLPs を作製する系の確立に成功した。SaV は多様な抗原性を有することが示唆されることから、本研究で構築した哺乳動物細胞発現系は、昆虫細胞発現系とともに SaV VLPs の発現系として有望である。ノロウイルス (NoV) の場合、異なる genogroup、genotype に対する VLPs 作製、それらに対する特異抗体の作製によって、抗原性の違いが詳細に解析され、高感度の NoV 抗原、抗体検出系の開発にはずみがついた。そのため、本研究で新たに確立した SaV VLPs 発現方法は、SaV の高感度抗原抗体検出系の確立のための

網羅的な SaV VLPs 作製に有用性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Ushijima H., Miyamura T., and Takeda N..

Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein.

Journal of Virology. 79(12):7283–90, 2005.

(2) Hansman GS., Matsubara N., Oka T., Ogawa S., Natori K., Takeda N., and Katayama K.

Deletion analysis of the Sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles.

Archives of Virology. 150 (12): 2529–2538, 2005.

(3) Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Miyamura T., and Naokazu Takeda.

Cleavage activity of the Sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. Archives of Virology.

150 (12): 2539–2548, 2005.

(4) Hansman GS., Takeda N., Oka T., Oseto M., Hedlund KO., and Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses.

Emerging Infectious Diseases. 11 (12) :1916–1920, 2005.

(5). Oka T., Hansman GS., Katayama K., Ogawa S., Nagata N., Miyamura T., Takeda N.

Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells

Archives of Virology. 151(2): 399-404, 2006.

(6) Wu FT., Oka T., Katayama K., Wu HS., Donald Jiang DS., Miyamura T., Takeda N., and Hansman GS.

Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005.

Archives of Virology. In press

(7) Hansman GS., Natori K., Shirato-Horikoshi H., Ogawa S., Oka T., Katayama K., Tanaka T., Miyoshi T., Sakae K., Kobayashi S., Shinohara M., Uchida K., Sakurai N., Shinozaki K., Okada M., Seto Y., Kamata K., Miyamura T. and Takeda N.

Genetic and antigenic diversity among noroviruses.

Journal of General Virology. In press

(8) Katayama K., Hansman GS., Oka T., Ogawa S., Takeda N.

Investigation of Norovirus replication in a human cell line.

Archives of Virology. In press

学会発表

(1) 岡智一郎, 片山和彦, 小川智子, Hansman Grant, 影山努, 宮村達男, 武田直和: sapovirus ORF1 の切断部位の決定.

第125回 日本薬学会学術集会, 東京, 2005 年

3 月 30 日.

(2) 岡智一郎, 片山和彦, Hansman S. Grant, 武田直和

ノロウイルス、サポウイルスに関する新知見

第17回ウイルス性下痢症研究会、東京、2005 年 11月19日

(3) 宮下佳奈, Hansman Grant, 片山和彦, 岡智一郎, 濱野國勝, 宮村達男,

武田直和

ノロウイルス粒子形成に必須なアミノ酸残基の同定

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005 年11月20日.

(4) 高井聡, Hansman Grant, 岡智一郎, 濱野國勝, 宮村達男, 武田直和, 片山和彦

ノロウイルス様中空粒子の形成に影響を与えるアミノ酸残基の解析

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005 年11月20日.

(5) Hansman Grant, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和

Formation of sapovirus small virus-like particles

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005 年11月20日.

(6) 岡智一郎, 山本真民, 片山和彦, Hansman Grant, 小川智子, 宮村達男,

武田直和

サポウイルス ORF1 の切断点の解析

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年11月20日。

(7) 山本真民、岡智一郎、小川智子、片山和彦、
Hansman Grant、濱野國勝、
宮村達男、武田直和

サポウイルスプロテアーゼの性状解析

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年11月20日。

(8) 岡智一郎、Hansman Grant、片山和彦、小川
智子、永田典代、宮村達男、
武田直和

哺乳動物細胞を用いたサポウイルス様中空粒子
の発現

第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年11月20日。

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

ノロウイルスと血液型抗原との結合に関する研究

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：Norovirus (NoV) 全体の総括的な血液型抗原結合パターンを明らかにするため、NoV GIに属する4株、4クラスター、NoV GIIに属する10株、7クラスター、計11クラスター14株のNoV VLPsを用い、Carbohydrate-VLPs binding assayにより血液型抗原との結合パターンを検討した。その結果、1) 同じジェノグループに属する株には結合パターンに共通項があること、2) 糖鎖のわずかな構造の違いがウイルスの結合量を左右していることが明らかになった。さらに詳細な解析を行うことにより、血液型抗原上のウイルス結合部位を明らかにしたい。

A. 研究目的

NoVは、ウイルス性急性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり、ヒト腸管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。近年、VLPsを用いたレセプター分子の解析が行われ、NoVのプロトタイプであるNV/68株が腸管上皮に発現される血液型抗原の1つ、H型抗原に結合することが報告された。しかし、NoVに属するすべてのウイルス株が同じ血液型抗原を認識するわけではなく、NoV全体の総括的な結合パターンは理解されているとは言い難い。私たちは、昨年度までに、Saliva-VLP binding assayにより、以下のことを明らか

にしている。1) GIに属するVLPsは4株すべてが唾液と結合した。これに対し、GIIのVLPsは7株が唾液に結合し、3株は結合しなかった。唾液中には血液型抗原が分泌されており、これによりGIに属する4株、GIIに属する7株は血液型抗原と結合することが示唆された。2) GIの4株では共通してB型唾液への結合が低かった。一方、GIIの7株ではB型唾液への結合が高いなど、同じジェノグループに属する株には共通項があった。今年度は、合成糖鎖を用いたCarbohydrate-VLP binding assayにより、VLPsが認識する血液型抗原についてさらに詳細な解析を行った。

B. 研究方法

1. 完全体血液型抗原とVLPsとの結合の解析

4 種類の合成糖鎖、A、B、Le^a、Le^b 型抗原(Glycotech corporation)と VLPs との結合を Carbohydrate-VLP binding assay (ELISA-based)にて検出した。ビオチンラベルされた合成糖鎖を Tris-buffered saline にて 10μg/ml に調製し、Streptavidin-precoated microwells (Thermo Labsystems) に加え、37°Cで2時間コーティングを行った。5% skim milk(SM)/PBS にて、4°Cで一晩ブロッキングを行った後に、rNoV VLPs (1 μg/mL in 1% SM/PBS-T (0.05% Tween 20/PBS)) を加え、37°Cで1時間インキュベーションした。次いで rabbit anti-rNoV VLPs antiserum (at 1/2000 in 1% SM) を加え 37°Cで1時間、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories Inc.) を加え 37°Cで1時間インキュベーションを行った。O-phenylenediamine (Sigma) を基質として加え発色させた後に、492 nm にて吸光度を測定した。なお H 型抗原については手に入れることが出来ず、解析は行っていない。

2. 不完全体血液型抗原と VLPs との結合の解析

3 種類の合成糖鎖、Di-H 抗原 (完全体の H 抗原より N-acetylglucosamine が除かれたもの)、Di-A 抗原 (完全体の A 抗原より Fucose が除かれたもの)、Di-B 抗原 (完全体の B 抗原より Fucose が除かれたもの) (Glycotech corporation)と VLPs との結合を Carbohydrate-VLP binding assay に

て検出した。ビオチンラベルされた合成糖鎖を Tris-buffered saline にて 2.5μg/ml に調製し、Streptavidin-precoated microwells に加え、その結合量を上記と同様の方法にて検出した。

C. 研究成果

1. 完全体血液型抗原と VLPs との結合の解析

NoV GI の VLPs はすべて合成糖鎖と結合した。GI/1 クラスターのウイルス株は A、Le^b 型抗原に結合した。GI/2、3、4 クラスターの株は A、Le^a、Le^b 型抗原に結合した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、GI では共通して A、Le^b 型抗原に結合しやすいことが明らかとなった。NoV GII の VLPs は 4 株が合成糖鎖に結合し、10 株は結合を検出することが出来なかった。GII/4 に属する株は、A、B、Le^a、Le^b 型抗原、GII/6 は、B、Le^a、Le^b 型抗原、GII/5 は、A、B、Le^b 型抗原に結合した。GII/14 は B 型抗原に結合した。以上のことにより、GII では共通して B 型抗原に結合しやすいことが明らかとなった。また、Saliva-VLPs binding assay では血液型抗原との相互作用が示唆されたにもかかわらず、今回の合成糖鎖を用いた実験系では結合の確認できない株が 4 株、Saliva-VLPs binding assay、Carbohydrate-VLP binding assay とともに結合が確認できなかった株が 2 株存在した。

2. 不完全体血液型抗原と VLPs との結合

の解析

完全体の糖鎖と結合した GI 4 株、GII 4 株について、不完全体糖鎖との結合を解析した。8 株とも Di-H 抗原とは結合しなかった。また、完全体の A 型抗原と強い結合能を示した GI の 4 株は、不完全型の A 抗原への結合が弱くなる傾向にあった。また、完全体の B 型抗原と強い結合能を示した GII の 4 株は、不完全型の B 抗原への結合が完全に失われていた。

D. 考察と結論

NoV は遺伝学的、血清学的に多様であるため、ワクチンによる予防は困難であるが、レセプターへの結合を阻害する薬剤による予防は効果が期待できる。今回、GI 4 株、GII 10 株の NoV VLPs を用いた Carbohydrate-VLPs binding assay により、1) 同じジェノグループに属する株には血液型抗原認識パターンに共通項があること、2) 血液型抗原のわずかな構造の違いがウイルスの結合量を左右していることが明らかになった。今後、さらに詳細な解析を行い、血液型抗原上の NoV 結合部位を明らかにすることにより、血液型抗原への結合を阻害する薬剤の開発を目指したい。

D. 研究発表

1. 誌上発表

- (1) Kamata K., Shinozaki K., Okada M., Seto Y., Kobayashi S., Sakae K., Oseto M., Natori K.,

Shirato-Horikoshi H., Katayama K., Tanaka T., Takeda N., Taniguchi K. Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *Journal of Medical Virology*. 76(1): 129-136, 2005

- (2) Hansman GS., Natori K., Shirato-Horikoshi H., Ogawa S., Oka T., Katayama K., Tanaka T., Miyoshi T., Sakae K., Kobayashi S., Shinohara M., Uchida K., Sakurai N., Shinozaki K., Okada M., Seto Y., Kamata K., Nagata N., Tanaka K., Miyamura T., Takeda N. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *Journal of General Virology*. 2005 *in press*.
- (3) 白土（堀越）東子、岡 智一郎、片山和彦、武田直和：ノロウイルス研究の最近の動向。感染・炎症・免疫 35(2): 106-117, 2005. 医薬の門社
- (4) 白土（堀越）東子：誰もが感染の危機！！ノロウイルス。食と健康 49(11): 53-57, 2005. 社会法人日本食品衛生協会
- (5) 米山徹夫、李天成、白土（堀越）東子、武田直和：食品産業従事者のためのウイルス基礎知識。ジャパンフードサイエンス 印刷中

2. 学会発表

- (1) 白土（堀越）東子、小川智子、
鎌田公仁夫、影山 努、片山和彦、
宮村達男、武田直和「ノロウイルスの最近の動向」衛生微生物
技術協議会第 26 回研究会、2005
年 7 月 7-8 日、福井
- (2) Hansman Grant、白土（堀越）東
子、小川智子、岡 智一郎、片山

和彦、宮村達男、武田直和
「 Cross-reactivity among 26
different genogroup I and
genogroup II norovirus virus-like
particles」第 53 回日本ウイルス
学会学術集会、2005 年 11 月 20-22
日、横浜

研究成果の刊行に関する一覧表

- Nagashima, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: The 5' Ω terminal region of the Aichi virus genome encodes *cis*-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 79(11): 6918-6931, 2005.
- Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K.: Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods* 126:165-169, 2005.
- Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B. J, Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with that of other subtypes. *Microbes Infect.* 7(2):139-147, 2005.
- Kamata, K., Shinozaki, K., Okada, M., Seto, Y., Kobayashi, S., Sakae, K., Oseto, M., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Katayama, K., Tanaka, T., Takeda, N., Taniguchi, K.: Expression and antigenicity of virus-like particles of Norovirus and their application for detection of Noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.* 76:129-136, 2005.
- Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S. G., Taniguchi, K., Sack, D. A., Ranst, M. V., Azim, T.: Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 43(9):4460-4465, 2005.
- Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR.: High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol.* 80(3):1513-1523, 2006
- Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K.: Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
- Okada M et al.: Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:4391-4401
- Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O, Ayata M, and Ogura T: Genotyping of norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan, *Microbiology and Immunology*, 49, 275-283 (2005)
- Hirakata Y, Arisawa K, Nishio O, Nakagomi O. Multifactorial spread of gastroenteritis

- outbreaks attributable to a single genogroup II norovirus strain from a tourist restaurant in Nagasaki, Japan. *J Clin Microbiol.* 43:1093-1098, 2005.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic of Sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 150:371-377, 2005.
- Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Ushijima H., Miyamura T., and Takeda N.. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *Journal of Virology.* 79 (12) :7283-90, 2005.
- Hansman GS., Matsubara N., Oka T., Ogawa S., Natori K., Takeda N., and Katayama K. Deletion analysis of the Sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Archives of Virology.* 150 (12) : 2529-2538, 2005.
- Oka T., Katayama K., Ogawa S., Hansman GS., Kageyama T., Miyamura T., and Naokazu Takeda. Cleavage activity of the Sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Archives of Virology.* 150 (12) : 2539-2548, 2005.
- Hansman GS., Takeda N., Oka T., Oseto M., Hedlund KO., and Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerging Infectious Diseases.* 11 (12) :1916—1920, 2005.
- Oka T., Hansman GS., Katayama K., Ogawa S., Nagata N., Miyamura T., Takeda N. Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Archives of Virology.* 151 (2) : 399-404, 2006.
- Wu FT., Oka T., Katayama K., Wu HS., Donald Jiang DS., Miyamura T., Takeda N., and Hansman GS. Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Archives of Virology.* In press
- Hansman GS., Natori K., Shirato-Horikoshi H., Ogawa S., Oka T., Katayama K., Tanaka T., Miyoshi T., Sakae K., Kobayashi S., Shinohara M., Uchida K., Sakurai N., Shinozaki K., Okada M., Seto Y., Kamata K., Miyamura T. and Takeda N. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *Journal of General Virology.* 2006: 87, 909-919.
- Katayama K., Hansman GS., Oka T., Ogawa S., Takeda N. Investigation of Norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology.* In press
- Tracy Dewese Parker, Noritoshi Kitamoto, Tomoyuki Tanaka, Anne M. Hutson and Mary K. Estes. Identification of Genogroup I and Genogroup II Broadly Reactive Epitopes on the

Norovirus Capsid. J. Virol. 2005;79:7402-7409

Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Mitsuko Matsuo, Yoshiharu Ikeda, Hisayoshi Yoshida, Hisako Sibata, Fumitoshi Fujii, Tomoyuki Tanaka. Laboratory and Epidemiology Communications: The Characteristics of Norovirus Outbreaks at Non-epidemic Season. 2006: JJID (in press)

M. Okada, T. Tanaka, M. Oseto, N. Takeda and K. Shinozaki. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. Archiv. Virol. Published online: 9 March 2006

田中智之 「ノロウイルス感染症の迅速診断」臨床とウイルス 2005: 33 (3) ;126-130

田中智之、三好龍也、内野聖子、武田直和。新興・再興感染症の感染制御の実際 ノロウイルス。治療学 2006. 40 (2), 79-82

椛島由佳, 伊藤 雅, 山下照夫, 藤浦 明, 榮 賢司: 臨床とウイルス. 33: 228-233, 2005

山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、愛木智香子、秋山美穂、西尾 治。散发性胃腸炎と胃腸炎集団発生からのノロウイルス検出状況－愛媛県、病原微生物検出情報, 26 : 327-329, 2005

山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄、杉枝正明、古屋由美子、愛木智香子、秋山美穂、西尾 治。輸入生鮮魚介類からのノロウイルス検出状況とその遺伝子型、病原微生物検出情報, 26 : 337-338, 2005

斎藤博之 他、簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行、病原微生物検出情報、Vol. 26、No. 6、14-15、(2005)

斎藤博之 他、エンテロウイルスの血清型別同定における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の応用、臨床とウイルス 33、No. 4、220-227 (2005)

斎藤博之、ノロウイルス胃腸炎の疫学調査における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の利用、食中毒検査と診療の落とし穴、第2章、中山書店 (2006)

斎藤博之、ノロウイルス胃腸炎の流行拡大防止、食中毒検査と診療の落とし穴、第5章、中山書店 (2006)

久保英幸、改田 厚、入谷展弘、村上 司: 2000-2002年に世界的流行の認められたエコーウイルス 13型の大阪市での分離株を含む遺伝子系統樹解析, 生活衛生, 49, 144-151 (2005)

入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 西尾 治, 久保英幸, 改田 厚, 村上 司, 綾田 稔, 小倉 壽 :
市販生カキからのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの検出, 生活衛生, 49, 279-287 (2005)

西尾治, 古屋由美子, 大瀬戸光明. ウイルス性食中毒の予防ーノロウイルス, A型肝炎ウイルスー,
食品衛生研究. 55 (4) :19-24, 2005.

西尾治. ノロウイルスの感染と遺伝子迅速検査の現状と期待. The Medical Journal. 915:11, 2005.

西尾治. ノロウイルスによる感染症と食中毒. 日本医事新報. 4221:105, 2005.

西田知子, 岡本玲子, 中尾利器, 松村健道, 大瀬戸光明, 西尾治. 山口県内におけるノロウイルス
胃腸炎集団発生事例および市販生食カキの汚染状況. 獣医公衆衛生研究. 7:24-25, 2005.

西尾治. 広範囲 血液・尿化学検査免疫学的検査ーその数値をどう読むかーノロウイルス. 日本臨床.
63 巻増刊号 7 :332-333, 2005.

西尾治, 山下育孝, 宇宿秀三. ノロウイルスによる食中毒, 感染症. 食品衛生研究. 55 (10) :7-16,
2005.

西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木洋, 入谷展弘, 篠原美千代,
木村博一. ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌. 46:235-245, 2005.

白土(堀越) 東子, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和 : ノロウイルス研究の最近の動向. 感染・炎
症・免疫 35 (2) : 106-117, 2005. 医葦の門社

白土(堀越) 東子 : 誰もが感染の危機!! ノロウイルス. 食と健康 49 (11) : 53-57, 2005. 社会法
人 日本食品衛生協会

米山徹夫, 李天成, 白土(堀越) 東子, 武田直和 : 食品産業従事者のためのウイルス基礎知識. ジ
ャパンフードサイエンス 印刷中

The 5'-Terminal Region of the Aichi Virus Genome Encodes *cis*-Acting Replication Elements Required for Positive- and Negative-Strand RNA Synthesis

Shigeo Nagashima, Jun Sasaki,* and Koki Taniguchi

Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine,
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

Received 1 June 2004/Accepted 25 January 2005

Aichi virus is a member of the family *Picornaviridae*. It has already been shown that three stem-loop structures (SL-A, SL-B, and SL-C, from the 5' end) formed at the 5' end of the genome are critical elements for viral RNA replication. In this study, we further characterized the 5'-terminal *cis*-acting replication elements. We found that an additional structural element, a pseudoknot structure, is formed through base-pairing interaction between the loop segment of SL-B (nucleotides [nt] 57 to 60) and a sequence downstream of SL-C (nt 112 to 115) and showed that the formation of this pseudoknot is critical for viral RNA replication. Mapping of the 5'-terminal sequence of the Aichi virus genome required for RNA replication using a series of Aichi virus-encephalomyocarditis virus chimera replicons indicated that the 5'-end 115 nucleotides including the pseudoknot structure are the minimum requirement for RNA replication. Using the cell-free translation-replication system, we examined the abilities of viral RNAs with a lethal mutation in the 5'-terminal structural elements to synthesize negative- and positive-strand RNAs. The results showed that the formation of three stem-loops and the pseudoknot structure at the 5' end of the genome is required for negative-strand RNA synthesis. In addition, specific nucleotide sequences in the stem of SL-A or its complementary sequences at the 3' end of the negative-strand were shown to be critical for the initiation of positive-strand RNA synthesis but not for that of negative-strand synthesis. Thus, the 5' end of the Aichi virus genome encodes elements important for not only negative-strand synthesis but also positive-strand synthesis.

Picornaviruses are small, nonenveloped, icosahedral viruses, and this virus family includes many human and animal pathogens, including poliovirus, rhinovirus, hepatitis A virus (HAV), and foot-and-mouth disease virus (38). Their genomes comprise single-stranded positive-sense RNAs of 7,200 to 8,500 nucleotides (nt) and consist of a 5' untranslated region (UTR), a single coding region, a 3' UTR, and a poly(A) tail from the 5' end. After its release into the cytoplasm of infected cells, the genomic RNA serves as an mRNA for the synthesis of a long polyprotein, which is cleaved into functional proteins by virus-encoded proteinases. The positive-strand genomic RNA also acts as a template for the synthesis of negative-strand RNA, which is then transcribed into positive-strand RNA. The newly synthesized positive-strand RNA is packaged into capsid proteins to form virions.

The 5' UTR of the picornavirus genome is very long (620 to 1,200 nucleotides in length) and contains several secondary and tertiary structural elements (38). This region contains sequences that control genome replication and translation (40). The 5' ends of the genomes of enteroviruses and rhinoviruses fold into a cloverleaf-like structure (39, 50). In poliovirus, this structure functions as a *cis*-acting element for RNA replication and forms a ribonucleoprotein (RNP) complex by interacting with viral protease polymerase precursor polypeptides, 3CD, and a host protein, poly(rC)-binding protein (PCBP) (2, 3, 16,

36). In addition, this 5'-end RNP complex interacts with the 3' poly(A) tail through binding to poly(A)-binding protein and the formation of this circular RNP complex is required for the initiation of negative-strand RNA synthesis (7, 20, 26). On the other hand, the 5' ends of the genomes of cardio-, aphtho-, hepato-, and parechoviruses fold into stem-loop and pseudoknot structures (11, 13, 17, 24). The 5' end of the genome of human parechovirus 1 consists of two stem-loops (SL-A and SL-B) and a pseudoknot structure (pk-C), and these structures are critical for RNA replication (34). Additionally, the pseudoknot structure formed at the 5' end of the mengovirus genome plays an essential role in viral RNA synthesis (27). However, there is no evidence showing which step these structures are required for, i.e., positive- or negative-strand RNA synthesis during RNA replication.

Aichi virus, which is associated with acute gastroenteritis in humans (47), is a member of the genus *Kobuvirus* of the family *Picornaviridae* (37, 48). Computer-assisted prediction of its RNA secondary structure suggested the formation of three stem-loop structures (SL-A, SL-B, and SL-C) within the 120 nucleotides of the 5' end of its genome. We have already investigated the functions of these structures and have shown that all three stem-loop structures are critical for viral RNA replication (33, 42). In addition, the nucleotide sequence of the stem segment in the middle part of SL-A has been shown to be important for viral RNA encapsidation (43).

In this study, we further characterized the 5'-terminal *cis*-acting replication elements of Aichi virus. We found an additional essential structural element, a pseudoknot structure, which is formed through base-pairing interaction between the

* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan. Phone: 81-562-93-2486 Fax: 81-562-93-4008. E-mail: jsasaki@fujita-hu.ac.jp.

loop region of SL-B (nt 57 to 60) and a sequence downstream of SL-C (nt 112 to 115). Using a chimeric virus whose 5' UTR consists of the Aichi virus 5'-terminal sequence and the encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosome entry site (IRES), the 5'-terminal region required for RNA replication was mapped. The results indicated that the 5'-end 115 nucleotides including the pseudoknot are the minimum requirement for RNA replication. In addition, using a cell-free translation-replication system, we examined which step the structural elements at the 5' end of the genome are required for, i.e., negative-strand synthesis or positive-strand synthesis. The results showed that the formation of all three stem-loop structures is required for negative-strand RNA synthesis. Furthermore, a specific nucleotide sequence in the lower part of the stem of SL-A or its complementary sequences at the 3' end of the negative-strand RNA was shown to be critical for the initiation of positive-strand RNA synthesis but not for that of negative-strand RNA synthesis. Thus, these results indicate that the 5' end of the Aichi virus genome encodes RNA elements important for not only negative-strand synthesis but also positive-strand synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Vero cells were grown in Eagle's minimum essential medium containing 5% fetal calf serum (growth medium) at 37°C.

Aichi virus cDNA clones and replicons. pAV-FL is an infectious cDNA clone of Aichi virus (42). pAV-FL-Luc is a replicon in which the capsid-coding region is replaced with a firefly luciferase gene (33).

Plasmid. (i) pAV-FL-Luc-3Dmut. The PstI (nt 6771)-HindIII [just downstream of the poly(A) tract] fragment of pAV-FL was subcloned in pUC118, generating pUP-H. To change the GDD motif (23) of the 3D RNA-dependent RNA polymerase to Gly-Ala-Ala, PCR-based mutagenesis was performed with primers 7626D-A-P (5' GCCGTCATCTACGCTACGGAA) and 7625D-A-M (5' GGCACCGTACGCCAGGATGT) by using pUP-H as a template. The PCR product was self-ligated, and the nucleotide sequence between the PstI and HindIII sites of the derived plasmid was confirmed. The PstI-HindIII fragment with the GDD-GAA mutation was substituted for the corresponding fragment of pAV-FL-Luc to yield pAV-FL-Luc-3Dmut.

(ii) Hammerhead ribozyme-containing plasmids. An Aichi virus-specific *cis*-active hammerhead ribozyme was designed based on the ribozyme used for the poliovirus cDNA clone (19). First, a hammerhead ribozyme in which stem I (8) comprised 8 bp was introduced to the 5' end of the Aichi virus genome. Using pU5'Eco, which contains the T7 promoter and the 5'-end 391 nucleotides of the Aichi virus genome (42), as a template, PCR-based mutagenesis was performed with primers 5' rzm-P (5' GGCCGAAAACCCGGTATCCCGGGTCTTGA AAAGGGGGTGGGGGGG) and 5' rzm-M (5' TTTCGGCCTCATCAGT TGAAAAGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTC). The PCR products were self-ligated, and the nucleotide sequence of the derived plasmid, termed pU5'Eco-5' rzm-8bp, was verified. To construct a hammerhead ribozyme with stem I comprising 22 bp, PCR was carried out with primers 5' rzmP-2 (5' CCC CTTTCAACTGATGAGGCCGAAAG) and 5' rzmM-2 (5' TGGGGGGGC CCTATAGTGAGTCGTATTACA) by using pU5'Eco-5' rzm-8bp as a template. The PCR products were self-ligated, and the derived plasmid was termed pU5'Eco-5' rzm. The EcoRI fragment of pU5'Eco-5' rzm was substituted for the corresponding fragment of pAV-FL, an Aichi virus full-length cDNA clone (42), generating pAV-FL-5' rzm.

We previously reported that the 5'-end sequence of the Aichi virus genome is UUUGAAAAG (42). However, only two, not three, uridine residues exist at the 5' end of most picornavirus genomes. We designed the hammerhead ribozyme of pAV-FL-5' rzm so as to obtain *in vitro* transcripts with two uridine residues at the 5' end. As described in the Results section, transcripts derived from pAV-FL-5' rzm generated viable viruses in the cell-free replication system. In addition, we constructed a full-length cDNA clone with a hammerhead ribozyme to produce transcripts with three uridine residues at the 5' end. The *in vitro* transcript with three uridine residues produced positive-strand RNAs in the cell-free replication system, but the amount was less than that produced by the transcript with two uridine residues at the 5' end (data not shown). This suggests that the accurate 5'-end sequence of the Aichi virus genome is UUUGAAAAG. Since we deter-

mined the 5'-end sequence of the Aichi virus genome by sequencing plasmids obtained through 5' rapid amplification of cDNA ends in the previous study (42), the 5'-terminal nucleotide of the three uridine residues would be added independent of the template by using reverse transcriptase (12). In this study, we used a full-length cDNA clone harboring a hammerhead ribozyme, which produces transcripts with two uridine residues at the 5' end (see Fig. 6A). On the other hand, the *in vitro* transcript synthesized from pAV-FL, which has no hammerhead ribozyme, has three uridine residues at the 5' end of the genome, following two guanine residues; that is, the transcripts have three nonviral nucleotides, GGU, at the 5' end (see Fig. 6A and C). The nucleotide numbers given in this study are for the sequence with two uridine residues at the 5' end.

Site-directed mutagenesis. An EcoRI fragment of pAV-FL was subcloned into pUC118. The resultant plasmid contains the T7 promoter sequence and the 5'-end 391 nucleotides of the genome. Single mutations were introduced into this plasmid by inverse PCR as described previously (42). The primer pairs used for construction of the mutants and their sequences were as follows: for mut112-118, primers A (5' CCATACTCCCCCACCCTTTTGT; plus sense) and B (5' cagagcTTTAATTCCTCCGAACAGGTTCC; minus sense); for mut157-163, primers C (5' cagggcTGATCTTGACTCCCCACGGAAAC; plus sense) and D (5' ACATACCTAGTTACAAAAGG; minus sense); for mut120-124, primers E (5' TCCCCCACCCTTTTGTAACTA; plus sense) and F (5' catacGGTGCC CGTTAATTCCTCCGAACA; minus sense); and for mut151-155, primers G (5' catacTGTCCTGTGATCTTGACTCC; plus sense) and H (5' TTAGTTA CAAAAGGGGGTGGGGGGAGTA; minus sense). Double mutations were introduced by inverse PCR into the plasmid that had a mutation at nt 112 to 118. The sequences of the primers were as follows: for mut112-118/157-163, primers C and D; for mut55-60/112-118, primers I (5' cagagcGACCACCGTTACTCCA TTCAGCT; plus sense) and J (5' CAGACCACCGAAAAGAGGGTGA; minus sense); for mut55-58/112-118, primers K (5' cagaCGGACCACCGTTACT CCATTCAGCT; plus sense) and J; and for mut57-60/112-118, primers L (5' gacGACCACCGTTACTCCAATTCAGCTTC; plus sense) and M (5' ACCAG ACCACCGAAAAGAGG; minus sense). In these primer sequences, the mutated nucleotides are indicated by lowercase letters. The nucleotide sequences of the derived plasmids were confirmed, and then the EcoRI fragments were ligated into pAV-FL and pAV-FL-Luc from which the EcoRI fragment had been removed, yielding various mutant full-length cDNA clones and replicons. In addition, the EcoRI fragments of mut112-118, mut112-118/157-163, and mut55-58/112-118 were ligated into pAV-FL-Luc-3Dmut from which the EcoRI fragment had been removed, yielding mut112-118-3Dmut, mut112-118/157-163-3Dmut, and mut55-58/112-118-3Dmut, respectively.

Aichi virus-EMCV chimera replicons containing a luciferase gene. (i) pAV/EMCV-Luc5'-385. pAV-FL has been linearized with HindIII for *in vitro* transcription; however, a HindIII site exists in the EMCV IRES. To linearize chimeric replicons, a unique MluI site was introduced downstream of the poly(A) tail as follows. The Aichi virus sequence spanning from nt 6735 to the HindIII site downstream of the poly(A) tail was amplified by PCR with primers 6735P (5' AAACAACCCGCTCCCTCAAG; plus-strand sequence from nt 6735 to 6755) and Hind-Mlu-poly(A)M (5' AAAGCTTACGCGTT₃₀GTAAGAAC AGT; HindIII and MluI sites underlined, poly(A) tract and minus-strand sequence from nt 8269 to 8279) by using pAV-FL-Luc as a template. The PCR product was digested with PstI (nt 6771) and HindIII and then cloned into the PstI-HindIII sites of pUC118, and the nucleotide sequence of the derived clone was confirmed. The PstI-HindIII fragment of this clone was substituted for the PstI-HindIII fragment of pAV-FL-Luc, generating pAV-FL-Luc-3'Mlu.

Next, the EMCV IRES was introduced into pAV-FL-Luc-3'Mlu as described below. pAV-FLΔP1 (33), which is a full-length cDNA clone with deletion of the capsid-coding region (nt 1275 to 3770), was digested with SacI and HindIII, blunt-ended, and then self-ligated to remove the SacI (upstream of nt 3771)-HindIII fragment [downstream of the poly(A) tail]. Furthermore, the region upstream of the translation initiation site (nt 386 to 742) was deleted from the derived plasmid by PCR using the Spe-385 M primer (5' TTA~~CTAGT~~ACACG CCGGGGCTAGCCCTTAA 3'; minus-strand sequence from nt 365 to 385, with the SpeI site underlined) and the Nco-748P primer (5' AACCATGGCTGCAA CACGGGTTTCACG 3'; plus-strand sequence from nt 748 to 766, with the NcoI site underlined). The PCR product was self-ligated, and the nucleotide sequence between the EcoRI (upstream of the T7 promoter) and XbaI (nt 1275) sites of the derived clone, termed pAV-FLΔP1-HindΔIRES, was confirmed. The EMCV IRES with SpeI and NcoI recognition sites at the 5' and 3' ends, respectively, was amplified by PCR with the Spe-EMCV IRES-5'P primer (5' TACTAGTTTGG AATAAGCCGGTGTGCGT 3'; SpeI site is underlined) and Nco-EMCV IRES-3'M primer (5' TCCCATGGTATCATCGTGT~~TTTTC~~AAAAGGA 3'; NcoI site is underlined) by using pIRES2-EGFP (Clontech) as a template. The PCR product was digested with SpeI and NcoI and then ligated into the SpeI-

NcoI sites of pAV-FLΔP1-HindΔIRES, generating pAV-FLΔP1-Hind/EMCV-IRES. The sequence validity of the PCR-generated region of this plasmid was confirmed. Finally, the EcoRI-XbaI fragment of pAV-FLΔP1-Hind/EMCV-IRES, which contains the T7 promoter, the Aichi virus sequence (nt 1 to 385), the EMCV IRES, and the leader protein coding region, was ligated into the EcoRI-XbaI sites of pAV-FL-Luc-3'Mlu, yielding pAV/EMCV-Luc5'-385.

(ii) **pAV/EMCV-Luc5'-385-3Dmut.** The Aichi virus sequence spanning from nt 6735 to the HindIII site downstream of the poly(A) tail containing the 3D mutations was amplified by PCR with primers 6735P and Hind-Mlu-poly(A)M by using pAV-FL-Luc-3Dmut. The PCR product was digested with PstI (nt 6771) and HindIII and then cloned into the PstI-HindIII sites of pUC118, and the nucleotide sequence and MluI site of the derived clone were confirmed. The PstI-HindIII fragment of this clone was substituted for the PstI-HindIII fragment of pAV-FL-Luc, generating pAV-FL-Luc-3'Mlu-3Dmut. The EcoRI-XbaI (nt 1275) fragment of pAV/EMCV-Luc5'-385 was ligated into pAV-FL-Luc-3'Mlu-3Dmut, from which the EcoRI-XbaI fragment had been removed, yielding pAV/EMCV-Luc5'-385-3Dmut.

(iii) **Deletion mutants of the chimera replicon.** Various lengths of the Aichi virus 5'-end sequence with EcoRI and SpeI sites at the 5' and 3' ends, respectively, were amplified by PCR. The sequences of the primers were as follows: for pAV-EMCV-Luc5'-289, primer M13-RV, which anneals to the vector sequence upstream of the T7 promoter sequence in pAV-FL, and primer Spe-289 M (5' TTACTAGTCAGCCTGTGATACGTCAGGCT; minus sense, from nt 269 to 289, with the SpeI site underlined); for pAV-EMCV-Luc5'-149, primers M13-RV and Spe-149 M (5' TTACTAGTTAGTTACAAAAGGGGGTGGG; minus sense, from nt 129 to 149, with the SpeI site underlined); for pAV-EMCV-Luc5'-115, primers M13-RV and Spe-115 M (5' TACTAGTCCCGTTAATTCCTCCGAACA; minus sense, from nt 95 to 115, with the SpeI site underlined); and for pAV-EMCV-Luc5'-111, primers M13-RV and Spe-111 M (5' TACTAGTCTTTAATTCCTCCGAACAGGTT; minus sense, from nt 91 to 111, with the SpeI site underlined). The PCR fragments were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen), and then the nucleotide sequences of the PCR-derived fragments were confirmed. A deletion mutation, from nt 149 to 289 or nt 116 to 149, was introduced by inverse PCR into pAV-FLΔP1-HindΔIRES. The sequences of the primers were as follows: for pAV-EMCV-Luc5'-385Δ149-289, primers 290P (5' TGTGAAGCCCCCGGAAGCT; plus sense, from nt 290 to 310) and 149 M (5' TAGTTACAAAAGGGGGTGGG; minus sense, from nt 129 to 149); and for pAV-EMCV-Luc5'-385Δ116-149, primers 150P (5' AGTATGTGTGCTCGTGATCCT; plus sense, nt 150 to 170) and 115 M (5' CCCGTTAATTCCTCCGAACA; minus sense, from nt 95 to 115). The PCR products were self-ligated, and then the nucleotide sequences of the resultant plasmids were confirmed. The EcoRI-SpeI fragments of the derived clones were substituted for the EcoRI-SpeI fragment of pAV/EMCV-Luc5'-385, yielding various mutant chimera replicons. In addition, the EcoRI-XbaI fragment of pAV/EMCV-Luc5'-111 was ligated into pAV-FL-Luc-3'Mlu-3Dmut, from which the EcoRI-XbaI fragment had been removed, yielding pAV/EMCV-Luc5'-111-3Dmut.

In vitro transcription. pAV-FL and its mutants were linearized by digestion with HindIII or MluI, and RNA transcripts were synthesized with T7 RNA polymerase using a T7 RiboMAX Express large-scale RNA production system (Promega). The integrity of the synthesized RNAs was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Titration of viable viruses generated from transcripts. Vero cell monolayers in 35-mm dishes were transfected with 1 μg of in vitro transcripts using Lipofectin reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. After incubation at 37°C for 6 h, the cells were washed and then 2.5 ml of growth medium was added to each dish. After incubation for 72 h, the cells were lysed by three consecutive freeze-thaw cycles and then the lysates were subjected to the plaque assay. The numbers and sizes of plaques were determined at 96 h after infection.

Luciferase assay. RNA transcripts (20 μg) containing a luciferase gene were electroporated into Vero cells as described previously (42), and then the cells were cultured in six 35-mm dishes. At various times after electroporation, cell lysates were prepared and then luciferase activity was measured as described previously (33).

Vero S10 preparation. A Vero cell S10 extract was prepared according to the method of Svitkin and Sonenberg (46) with modifications. Vero cells grown in tissue culture dishes were trypsinized and then harvested. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline and then resuspended in methionine-free Dulbecco's minimal essential medium (5×10^6 to 10×10^6 cells/ml), followed by incubation at 37°C for 2 h with rotation. After incubation, the cells were washed three times with ice-cold isotonic buffer (35 mM HEPES-KOH [pH 7.3], 146 mM NaCl, 11 mM glucose) (46) and then pelleted by centrifugation at $750 \times g$ at 4°C.

The pelleted cells were resuspended in 1.5 volumes of hypotonic buffer (25 mM HEPES-KOH [pH 7.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) (46) and then incubated on ice for 20 min. Then, the cells were broken with 30 strokes in a tightly fitting Dounce homogenizer (Wheaton) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4°C. The resultant supernatant (40 to 45 U/ml at A_{260}) was treated with micrococcal nuclease (150 U/ml) in the presence of 0.75 mM CaCl₂ for 15 min at 20°C, and then EGTA was added to a concentration of 2 mM. The Vero S10 cell extract prepared was divided into aliquots and stored at -80°C.

Virus production, RNA translation, and RNA replication in the cell-free system. The standard reaction was carried out according to the method of Svitkin and Sonenberg (46) with the exception that the salt solution used was comprised of 1.25 M KCH₃COO, 7.5 mM MgCl₂, and 2.5 mM spermidine. A 25-μl standard reaction mixture contained 12.5 μl of S10 extracts, 5 μl of the master mix (25 mM HEPES-KOH [pH 7.3], 10 mM ATP; 2 mM concentrations each of GTP, CTP, and UTP; 100 mM creatine phosphate; 1 mg/ml creatine kinase; 0.2 mM each of amino acids), 5 μl of the salt solution, and 250 ng of viral RNA. To examine the virus yield, the reaction mixture was incubated at 32°C for 15 h. After incubation, the reaction mixture was treated with RNase T₁ (400 U/ml) and RNase A (140 μg/ml) at room temperature for 1 h and then subjected to plaque assay. To label translation products, 5 μCi of [³⁵S]methionine-cysteine (Amersham) was added to 25 μl of reaction mixture. Five μl of the reaction mixture was subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gel electrophoresis, and then the gel was dried and exposed to a FujiFilm imaging plate. Radioactive signals were detected with BAS1000 or BAS2000 (FujiFilm). For the standard reaction for RNA labeling, the reaction mixture (25 μl) was incubated without the addition of CTP for 3 h and then 1 μl of 30 μM unlabeled CTP and 5 μCi of [³²P]CTP (10 mCi/ml, 3,000 Ci/mmol; Amersham) were added. After incubation for 2 h, RNA was extracted as described by Barton et al. (5). When indicated, the extracted RNA was treated with 25 U of RNase T₁ and 3.5 μg of RNase A at 37°C for 15 min. The product RNA was analyzed by nondenaturing agarose gel electrophoresis. The gel was dried, and radioactive signals were detected as described above.

RNA stability. To investigate RNA stability in cell extracts, a 10-μl reaction mixture containing the ³²P-labeled RNA transcripts (approximately 10,000 cpm) was incubated at 32°C. At various times after incubation, RNA was extracted, denatured with glyoxal, and then analyzed by 1% agarose gel electrophoresis as described by Sambrook and Russell (41). The gel was dried, and radioactive signals were detected as described above. Signal intensities were measured using a Fujix BAS 2000 phosphorimager.

RNase protection assay. To detect ³²P-labeled positive- or negative-strand RNA synthesized in the cell-free reaction, the RNase protection assay (RPA) was performed with unlabeled probes. To synthesize probes, a BamHI fragment comprising nt 4789 to 5252 of pAV-FL was subcloned into pGEM-3zf, yielding pGB4789. To synthesize a negative-strand RNA probe, pGB4789 was linearized by digestion with EcoRI and then the RNA was transcribed with SP6 RNA polymerase. For positive-strand RNA probe synthesis, pGB4789 was digested with HindIII and then a transcript was synthesized with T7 RNA polymerase. Hybridization, digestion with RNase T₁ and RNase A, and preparation of protected RNAs were carried out under the conditions described by Sambrook and Russell (41). ³²P-labeled full-length Aichi virus positive- and negative-strand RNAs were synthesized from pAV-FL and pAV-FL-neg, respectively, using a T7 Maxiscript kit (Ambion) and [³²P]CTP, and approximately 20,000 cpm of the transcribed RNAs was used as positive controls in RPA.

To detect the positive-strand RNA synthesized in the cell-free reaction, total RNA extracted from a 25-μl cell-free reaction mixture was hybridized with 500 ng of the unlabeled negative-strand probe. For detection of the negative-strand RNA synthesized in the cell-free reaction, total RNA extracted from a 25-μl reaction mixture was subjected to two-cycle RPA (35). 50 ng of the unlabeled positive-strand probe being used in the second hybridization step. After digestion with RNase T₁ and RNase A, the protected RNAs were analyzed by 3.5% polyacrylamide-7 M urea gel electrophoresis.

RESULTS

Site-directed mutagenesis of a predicted stem-loop structure downstream of SL-C. It has already been shown that three stem-loop structures formed within the 120 nucleotides of the 5' end of the Aichi virus genome are critical for viral RNA replication (33, 42). Here, we analyzed the 180 nucleotides of the 5' end using the MFOLD program (28) and another stem-loop structure (nt 111 to 164) downstream of SL-C was pre-

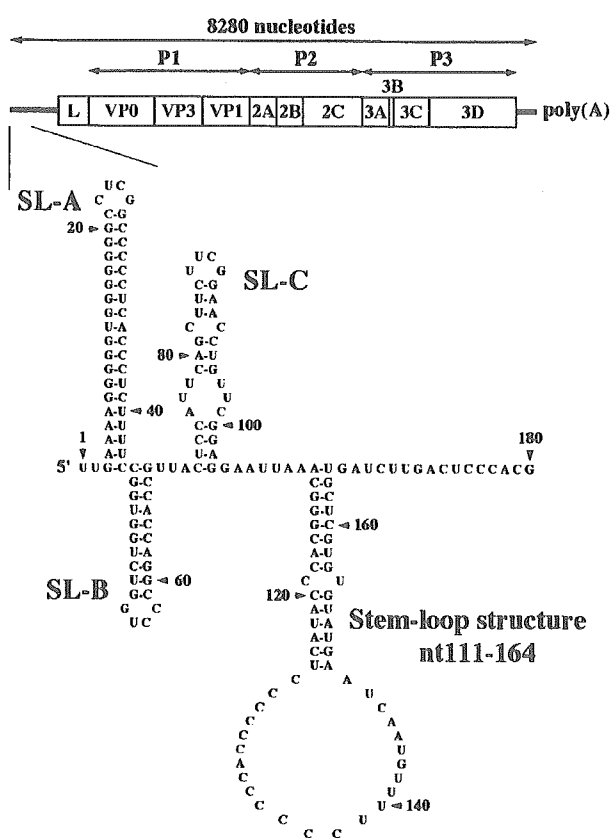


FIG. 1. Schematic diagram of the Aichi virus genome and the predicted secondary structure of the 5'-end 180 nucleotides of the genome. The thick lines and open box indicate the untranslated regions and coding region, respectively. Vertical lines within the box represent putative cleavage sites for viral proteinases. The three stem-loop structures were designated SL-A, SL-B, and SL-C, and another stem-loop structure (nt 111 to 164) downstream of SL-C was predicted.

dicted (Fig. 1). To determine whether this stem-loop structure is required for virus replication, we carried out site-directed mutational analysis using pAV-FL, an infectious cDNA clone of Aichi virus, and pAV-FL-Luc, an Aichi virus replicon harboring a luciferase gene (Fig. 2A). We introduced nucleotide changes on either side (nt 112 to 118, nt 157 to 163, nt 120 to 124, or nt 151 to 155) of the two putative helical segments to disrupt the base-pairings, yielding single mutants mut112-118, mut157-163, mut120-124, and mut151-155 (Fig. 2B). In addition, we introduced nucleotide changes on both sides of the upper stem (nt 112 to 118 and nt 157 to 163) to restore the base-pairings, generating a double mutant, mut112-118/157-163. To examine the effects of these mutations on the translation efficiency, *in vitro* transcription/translation analysis was carried out in a rabbit reticulocyte lysate. No significant differences in translation efficiency were observed among the mutants (data not shown).

RNA transcripts of pAV-FL and its mutants were transfected into Vero cells by lipofection, and the virus titers at 72 h after transfection were determined by plaque assay. On the other hand, RNA transcripts of pAV-FL-Luc and its mutants were transfected into Vero cells by electroporation and luciferase activity in the transfected cells was measured to deter-

mine the efficiency of RNA replication. Of the four single mutants, mut157-163, mut120-124, and mut151-155 exhibited efficient RNA replication and virus production in the luciferase and plaque assays, respectively (Fig. 2C and Table 1). In contrast, no increase in luciferase activity was observed in the cells transfected with mut112-118 RNA and the mutant had lost its plaque-forming ability. Additionally, mut112-118/157-163, a double mutant, also lacked the abilities to replicate and to produce viruses, in spite of maintenance of the secondary structure (Fig. 2C and Table 1). To examine RNA stability of these mutants, in which the GDD motif of the 3D RNA-dependent RNA polymerase was changed to eliminate RNA replication, were incubated in Vero cell S10 extracts over a timecourse. No significant differences in RNA stability were observed for mut112-118-3Dmut and mut112-118/157-163-3Dmut compared with that for AV-FL-Luc-3Dmut (Fig. 2D). These results suggest that folding of the stem-loop structure (nt 111 to 164) is not important but that the nucleotide sequence of nt 112 to 118 is critical for viral RNA replication.

Folding of a pseudoknot structure is critical for viral RNA replication. The previous study showed that nucleotide changes in the loop segment of SL-B (mutB-4) abolish the replication ability (33). This study suggested the importance of the nucleotide sequence of bases 112 to 118 for viral RNA replication. We compared the two sequences and found that the sequence from nt 55 to 60 of SL-B, GUCCCG, is complementary to that from nt 112 to 118, excluding the cytosine at nt 116 (lowercase), CGGGcAC. This suggests that these sequences potentially interact with each other, resulting in the formation of a pseudoknot structure (Fig. 3A). In mut112-118, which cannot replicate, the pseudoknot structure is disrupted (Fig. 3B). To determine whether folding of the pseudoknot structure is required for RNA replication, we introduced 6-nucleotide mutations into the loop region (nt 55 to 60) of SL-B of mut112-118 to restore the base-pair interaction with nt 112 to 118, excluding the guanosine at nt 116 (mut55-60/112-118) (Fig. 3B). As shown by the luciferase assay (Fig. 3C) and the plaque assay (Table 1), the RNA replication and plaque-forming abilities of this mutant were recovered, albeit there were a slight decrease in the RNA replication efficiency and a 36-fold decrease in the virus titer compared to the wild type. This indicated that a pseudoknot structure formed through interaction between nt 55 to 60 and 112 to 118 is important for RNA replication. To identify further the region forming base-pairings required for RNA replication, we introduced two kinds of 4-nucleotide compensatory mutations into the loop segment of SL-B to generate mut55-58/112-118 and mut57-60/112-118 (Fig. 3B). mut55-58/112-118 involves a 4-base-pair interaction between nt 55 to 58 and nt 114, 115, 117, and 118, while mut57-60/112-118 involves a 4-base-pair interaction between nt 57 to 60 and nt 112 to 115. In the luciferase and plaque assays, RNA replication and virus production were not observed for cells transfected with mut55-58/112-118 RNA (Fig. 3C and Table 1). No significant differences in RNA stability were observed between mut55-58/112-118-3Dmut and AV-FL-Luc-3Dmut (Fig. 2D). On the other hand, mut57-60/112-118 RNA replicated and generated viable viruses, the efficiency being similar to that in the case of mut55-60/112-118 RNA. These results indicate that the pseudoknot structure formed through interaction between nt 57 to 60 (CCCG) in the loop