

グループ2： ウイルス

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

食品中のノロウイルス検出法の開発

分担研究者 武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨

組換えバキュロウイルスで発現した 4 種類のノロウイルス (NoV) 中空粒子に対するポリクローナル抗体を結合した磁気ビーズを作製し、その濃縮効果および特異性について検討した。この磁気ビーズの濃縮性および特異性はともに高く、また RT-PCR 阻害物質が多量に含有する抽出液からも NoV を回収することができた。食品中の NoV 検出検査法の確立に向けて、磁気ビーズを用いた NoV 濃縮精製法は有用な手段と考えられた。

協力研究者 小林慎一（愛知県衛生研究所）

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスである。食中毒の感染源および感染経路の究明には食中毒患者や推定原因食品からの病原体の検出が必須である。しかし、NoV は未だ培養が不能なウイルスであるために、その検出検査には NoV 遺伝子を検出する RT-PCR 法が用いられている。この方法で患者や調理人の糞便検体から比較的容易に NoV 遺伝子を検出できるようになったが、食品や食材についてはウイルス汚染量が少ないために多量の食品を処理する必要があり、さらに多種類の食品を取り扱う際にはコンタミネーションの問題にも注意しなければならない。また、食品によっては PCR 阻害物質が共存することがあり、PCR の効率を高めるために PCR

阻害物質の除去が課題となっている。

一方、バキュロウイルス発現系を用いて NoV ウイルス様中空粒子 (Virus-like particles: VLPs) の作製が可能となり、また VLPs を免疫源とすることで VLPs に対する高力価抗体も得られている。また、種々な性状の単クローン抗体も得られるようになった。そこで、これまで有効な手段が見出されていなかった食中毒原因食品からの NoV 検出法の確立に向けて、抗 NoV 抗体を結合した磁気ビーズの特異性および濃縮効果について検討した。

B. 研究方法

1) 組換えバキュロウイルスの調製：NoV 構造蛋白をコードする ORF2 を PCR で増幅し、5' 末端から約 300 ベースの塩基配列を解析した。発現候補株について ORF2 の約 1650bp、あるいは ORF2 から 3' 末端の poly-A までの約 2300bp を増幅した。クローニング後、定法に従って組換えバキュロウイルスを作出した。組換えバキュロウイ

ルスを Tn-5 細胞に感染させ 5 日間培養後、電気泳動による 58K 蛋白の確認と電子顕微鏡による中空ウイルス粒子の観察によって VLPs の発現を調べた。VLPs が発現できた株についてはショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって VLPs を濃縮、精製した。

2) 高力価ポリクローナル抗体の作製：約 10 μ g の精製 VLPs でウサギを 2 回免疫して抗血清を作製した。すでに作製できた VLPs 抗原と抗血清と共に ELISA 法で交叉反応試験を行ない抗原性を検討した。

3) 抗体結合磁気ビーズの調製と RT-PCR によるノロウイルス遺伝子検出：Dynabeads M-280 sheep anti-Rabbit IgG (ダイナル社) 約 1mg に対して精製ポリクローナル抗体 50 μ g を室温で 1 時間反応後、洗浄し、0.1% BSA を含む PBS (PBS/0.1%BSA) で 1mg/ml となるように調製した。食中毒患者から採取された糞便を用い 1 検体当たり 50 μ g の抗 NoV 抗体結合ビーズを 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、洗浄し、精製水 100 μ l に懸濁させた後、Trizol 試薬 (ギブコ社) で RNA を抽出した。逆転写酵素で cDNA を作製後、NoV の構造タンパクを増幅するプライマーで PCR 反応を行い、電気泳動により標的バンドの有無を確認した。

C. 研究結果

1) VLPs の作製：遺伝子の系統樹解析から発現候補株を選出し、これまでに GI で 9 株の、GII では 24 株の組換えバキュロウイルスを作出しそれぞれ VLPs を作製した。抗体 ELISA で高力価ポリクローナル抗体と精製 VLPs の交差反応をしらべたところ GI の 9 株は 9 の抗原型に、GII の 24 株は 14

の抗原型に分類された。遺伝学的な分類から GI の 9 株は 9 遺伝子型に、GII の 24 株は 14 の遺伝子型に分類されることから個々の抗原型がそれぞれの遺伝子型に対応していることが示された。2000 年にオランダで集団胃腸炎患者から遺伝的には NoV に属すが GI にも GII にも分類されない Alphantron の検出が報告され GIV に分類することを提唱する動きがあるが、本実験からは遺伝学的にも血清学的にも GII に分類されることが妥当と考えられた。

2) 抗体磁気ビーズの評価：4 種類の GI の VLPs で作製した高力価抗体を用いて磁気ビーズを作製した。4 種類の VLPs の内訳は、GI/1 Seto124 株、GI/2 Funabashi258 株、GI/3 Kashiwa645 株、GI/4 Chiba407 株である。遺伝子検査であらかじめ 1 種類のノロウイルスが含まれることがわかっている患者便材料と磁気ビーズを混合し、結合したウイルスの遺伝子をしらべたところ磁気ビーズは同種の抗原型とのみ結合し、異種の抗原型とは全く反応しないことが明らかになった。したがって、これら磁気ビーズは極めて高い特異性を有していた。次に磁気ビーズの濃縮効率を検討した。1ml、10ml、50ml の PBS/0.1%BSA に NoV 陽性 10%糞便乳剤 100 μ l を添加し磁気ビーズで回収されるウイルスを調べた。その結果、すべての検体から NoV を効率よく回収することができ、磁気ビーズの濃縮効果を確認することができた。カキ 1 個体から調製した中腸腺抽出液 0.5ml に NoV 陽性糞便 100 μ l を添加した検体からも NoV を検出することができた。従って、食品の NoV 検査において食品中の夾雑成分や PCR 阻害物質の除去に磁気ビーズは有用と考えられた。

D. 考察

本年度に発現できた株を加えると、GI で 9 株、GII で 24 株、抗原型では GI で 9 種、GII で 14 種の NoV 抗原および抗血清を持つことができた。既に実用段階にはった抗原検出 ELISA キットは遺伝子検出法の 70%前後の検出成績である。ELISA キットはまだすべての NoV の抗原型に対する抗体を含んでおらず新たな VLPs 抗原の発現によって抗原検出 ELISA 法の検出率の向上が期待できる。

食中毒の原因究明において、感染経路や感染源の特定および予防対策のためには食中毒原因食品からのウイルス検出は重要である。NoV の迅速な検査法として、RT-PCR 法と ELISA 法が実施されているが食中毒に関与した食品や水などのウイルス検査には検出感度の観点から ELISA の適用は困難であり RT-PCR 法が有利と考えられる。しかし、食中毒の検査では多数かつ多量の検体を処理する必要があり、また抽出段階での RNA 損失を抑えることや検体間でのコンタミネーションを避けるためにも簡便な食品からの NoV 遺伝子検出法を確立する必要がある。そこで、抗体を結合した磁気ビーズの濃縮効果および特異性を検討した結果、良好な結果が得られた。今回の検討はモデル実験であり、また添加回収実験は定性的な結果であるが、食品の NoV 検出検査法に抗体結合磁気ビーズは有用な手段であると考えられた。NoV は遺伝学的に多様性である。食品検査のためには何種類の磁気ビーズを準備する必要があるのかについては今後の検討課題である。また、GI と GII に特異的な単クローン抗体があるのでこれ

らを結合した磁気ビーズの有用性についても検討したい。

E. 結論

抗体磁気ビーズによって食品中のノロウイルスノ検出が可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. Arch Virol 2006;151:1635-1641.

Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. Arch Virol 2006;151:1291-1308.

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. J Gen Virol 2006;87:909-919.

2. 学会発表

Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006.11.

Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. In 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006. 8.

Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi

S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.

武田直和, 白土東子, 宮村達男: ノロウイルス感染症. 第80回日本感染症学会学術講演会. 東京, 2006. 4

白土東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

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

ノロウイルスイムノクロマトキットの開発

分担研究者 田中智之 堺市衛生研究所

研究要旨

組換えバキュロウイルスで発現したノロウイルス(NoV)中空粒子に対するモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトキットを開発した。金コロイド標識抗体、ラテックス標識抗体いずれの方法で構築した診断キットの実用化には、非特異反応を抑えることが今後の課題である。

A. 研究目的

ノロウイルスの検査診断方法には、電子顕微鏡法、抗原検出 ELISA 法、RT-PCR 法、real Time PCR 法などあるが、いずれの方法も一長一短を有している。簡便、経済的かつ多検体が同時測定できるノロウイルス抗原検出 ELISA 法は、平成 17 年 11 月 21 日、厚生労働省よりノロウイルス体外診断キットとして承認された。ノロウイルス検査方法の一つである RT-PCR 法を golden standard method として比較した場合、ELISA 法の一致率は 81%、感度 62%、特異性 99%である。しかし、本邦では特別養護老人ホームなどにおけるノロウイルスの集団感染事例が相次いで報告され、一昨年当初に見られた多数の死亡患者に匹敵する位の数の死亡例が昨年も報告されている。ノロウイルス感染の拡大防止や患者への速やかな初期対応に求められるものは、迅速且つ簡便、正確な診断である。上述の ELISA 法は、この目的

を達成する方法の一つである。しかし、測定には三時間弱が必要で、分光光度計などの機器の常備が必要である点など、真に迅速な検査対応とは云いがたい。迅速且つ簡便なイムノクロマトキット(IC kit)の開発を試みてきたが、感度、特異性に尚改良すべき点が多々見られた。一方、バキュロウイルス発現系を用いて NoV ウイルス様中空粒子 (Virus-like particles: VLPs) の作製が可能となり、また VLPs を免疫源とすることで VLPs に対する高力価抗体も得られている。また、種々な性状の単クローン抗体も得られるようになった。そこで、簡便かつ迅速な糞便からの NoV 検出法としてイムノクロマト法の開発には有用な材料も整備されてきた。これらの問題点の解析と更なる感度・特異性の向上を目指した IC kit の開発を研究課題とした。

B. 研究方法

1) ノロウイルス抗原検出 ELISA 法：

これまで報告してきた方法に準じて ELISA 法を開発した。基本的には、GI、GII それぞれを特異的且つ広範囲に認識するモノクローナル抗体を固層抗体とし、検出抗体には VLPs に対する免疫家兎血清を GI には 4 種を、GII には 10 種を用いた。愛媛県立衛生環境研究所、愛知県衛生研究所および堺市衛生研究所で食中毒事例、感染症事例から得られた糞便 690 検体を用いて評価した。

2) 特異的モノクローナル抗体の作製：抗原検出 ELISA 法の成績から検出感度をさらに高めるために反応性の低いあるいは認められない遺伝子型を認識する新たなモノクローナル抗体の作製を行った。VLPs 抗原には 1 型遺伝子群 (GI) 遺伝子型 11 の #8 株由来 VLPs および 2 型遺伝子群 (GII) 遺伝子型 6 の V63 株由来 VLPs を用いた。クローンの作製・スクリーニングは定法に従った。陽性コントロールとして、これまで抗原検出 ELISA に用いられてきたモノクローナル抗体 MAb#3912、MAb#NS14 および MAb#NV23 を用いた。

3) イムノクロマトキットの構築：

(1) GI、GII を特異的に認識するモノクローナル抗体 #3912 および #NS14 を捕獲抗体および標識検出抗体として用いてイムノクロマトキットを構築した。2.5% 便乳剤 を作製し遠心後、その上清 100ul を GI、GII それぞれのキットに滴下し 15 分後に判定した。この際の検出抗体は、これらに金コロイド標識抗体を用いた。反応生成物の

判定は目視あるいはクロマトリーダー で数値化した。ノロウイルスのコピー数とクロマトリーダーの数値について検討し特異性を検討した。検体中のノロウイルス遺伝子のコピー数は real time RT-PCR 法で調べた。

(2) 上記と同じ抗体を用いたが、検出抗体の標識にはラテックス粒子を用いた。

C. 研究結果

1) イムノクロマトの構築：RT-PCR 法を golden standard とした場合、イムノクロマトキットとの一致率は 68%、感度 75%、特異性 55%であった。これまでの成績に比較して、感度は向上したものの特異性の低下が強く認められた。RT-PCR とイムノクロマトキットの成績が一致した検体については反応性生物のクロマトリーダーでの値と目視での値はよく相関した。しかし全ての陽性検体が必ずしも一致した相関はみられず、GII 陽性検体のコピー数とクロマトリーダーでの値にも良い相関は得られなかった。コピー数 0 の検体、すなわち陰性検体で非特異的反応をみると GI に比べ GII がより強い反応の出る傾向のあることが判明した。

2) 抗体感作ラテックス粒子を用いた場合、同様に非特異的反応生成物がみられ、感度・特異性の向上に問題を残した。

D. 考察

既に実用段階にはった抗原検出 ELISA キットは遺伝子検出法の 70%前

後の検出成績である。ELISA キットはただすべての NoV の抗原型に対する抗体を含んでおらず新たな VLPs 抗原の発現によって抗原検出 ELISA 法の検出率の向上が期待できる。一方、免疫クロマトキットは RT-PCR 法との一致率が 67%、感度は 71%、特異性は 61%であった。この成績は、迅速診断方法の一つとして、厚生労働省から認可されたノロウイルス対外診断法の ELISA 法に比べてもその精度、とくに特異性は低い。この点を改良することが、今後の検討課題である。検出精度に影響する要因として、(1)検体の採取時期、(2)糞便中の非特異的反応物の除去もしくは抑制、(3)モノクローナル抗体の反応性が考えられる。(1)に関しては、今後各方面と連携して、出来るだけウイルス量の多い初期検体の搬入を心掛けなければならない。(2)については、キットの構成成分に抗マウス IgG 抗体が固相されているため、ELISA 法に用いたように正常マウス血清を前処理として添加することは不能である。現在、BSA fraction V の添加、前処理による非特異反応の影響等を検討している。

E. 結論

迅速かつ簡便なノロウイルス診断 IC キットの構築を行った。現時点では RT-PCR 法との一致率は 67%、感度 71%、特異性 61%であった。今後の改良と共に、感度、特異性の向上を図る予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang, and Mary K. Estes: High efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50:883-888

2) Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59:140-141

3) Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59: 2007-272

4) Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.

5) 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. J Gen Virol 2006;87:909-919.

6) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 世界的に見たノロウイルスの現状。臨床と微生物 2006; 33:385-391

7) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 新興・再興感染症の感染制御の実際 8. ノロウイルス. 治療学 2006; 40:79-82

8) 小林宣道、田中智之. ノロウイルス感染症. Pharma Medica 2006;24:21-25

2. 学会発表

1) Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S,

Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.

2) 三好龍也、内野清子、田中智之: ノロウイルス感染者のウイルス排泄期間と排出コピー数
第54回日本ウイルス学会学術集会。名古屋、2006. 11

G. 知的財産権の出願、登録状況
なし

日本版カリシネットの整備

分担研究者 染谷 雄一 国立感染症研究所・ウイルス第2部

我が国における、カリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎の発生状況の把握と原因ウイルスの遺伝情報のデータベース化をめざし、カリシウイルス研究者らが登録、閲覧できるホームページ（日本版カリシネット）のドラフトを作成した。

A. 研究目的

ヒトに感染して急性胃腸炎を起こすノロウイルス、サポウイルスを含むカリシウイルスは、世界中で様々な遺伝子型に分類される株が分離され、次々にDDBJ/GenBank/EMBLに登録され、その総数たるは膨大なものになっている。この無限とも言えるデータベースの中から、カリシウイルス研究者が必要とする情報を引き出すのは容易なことではない。

米国においては、カリシウイルスによるウイルス性急性胃腸炎の発生状況やその原因となったウイルスの遺伝情報を収集し、それら情報を共有することを目的として、CaliciNetと呼ばれるデータベースが作られている。

我が国においてもウイルス性急性胃腸炎、カリシウイルス感染症に特化した、情報収集、情報共有システムを実現させるために、日本版カリシネットの整備を行うことにした。

B. 研究結果と考察

現時点ではまだ試作段階ではあるが、ウイルス性急性胃腸炎の発生事例のデータベース化を目指し、地方衛生研究所等の担当者がカリシ

ネットにアクセスし、以下の項目を登録することができるシステム（ホームページ）を作成した。

- (1) 登録者名（所属、メールアドレスを含む）
- (2) 登録日
- (3) 発生都道府県
- (4) 発生日月日
- (5) 原因ウイルス名（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、その他）
- (6) 発生パターン（集団か散発か）
- (7) キーワード

登録完了によりそれぞれの事例に対し、登録IDが付与される。また、カリシネットに登録された発生事例は、以上の項目ごとに条件検索が可能であり、目的の事例を抽出することができる。

また、ホームページ上では、カリシウイルスの分子系統解析法を簡単に習得し、実行できるようにガイドした“分子系統樹の作り方”（パワーポイントファイル）が公開されている。また、カリ

シウウイルスの各遺伝子型の標準配列を公開し、ホームページにアクセスした研究者が、自由にダウンロードして分子系統解析に使用できるようにした。さらに、研究者間のコミュニケーションが図れるように掲示板形式のフォーラムサイトをもうけ、ホームページ上で意見交換ができるようにした。

今後は、特定された原因ウイルスの遺伝情報（塩基配列）の登録とデータベース化を追加するとともに、DDBJ への自動登録機能も付加する予定である。

本研究は札幌医科大学医学部衛生学教室の小林宣道教授、三瀬敬治助手の協力のもと行われた。現在、カリシネットのソフトウェアは同教室の独立したサーバー上で運営、管理されている。

日本版カリシネットホームページのアドレスは、

<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/>

である。急性胃腸炎の発生の登録、データベースの閲覧、フォーラムへの参加には、事前に登録が必要である。

Investigation of norovirus replication in a human cell line

K. Katayama, G. S. Hansman, T. Oka, S. Ogawa, and N. Takeda

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Received July 5, 2005; accepted December 21, 2005

Published online February 26, 2006 © Springer-Verlag 2006

Summary. Noroviruses (NoVs) belong to the genus *Norovirus* and are members of the family *Caliciviridae*. NoVs are the dominant cause of outbreaks of gastroenteritis, but progress in understanding the molecular characteristics of NoV and its replication strategies have been hampered by the lack of a cell culture system or a practical animal model, except for murine NoVs. To elucidate the transcription and replication of the NoV genome, a complete genome of a human NoV genogroup II strain was cloned downstream of a T7 RNA polymerase promoter and expressed in human embryonic kidney (HEK) 293T/17 cells using a T7 vaccinia virus expression system. Bands for a 7.6-kb negative-strand RNA, a 7.6-kb positive-strand genomic RNA, and a 2.6-kb positive-strand subgenomic-like RNA were found in the infected cells. However, recombinant capsid protein (rVP1) and rVP2 were not detected by Western blotting. When a construct containing VP1 and VP2 genes was co-transfected with a full-length construct, the expression of virus-like particles (VLPs) with a buoyant density of 1.271 g/cm³ was observed. We also observed round particles, 20 to 80 nm in diameter, with a buoyant density of 1.318 g/cm³. Our results indicated that NoV RNA was incorporated into the heavier particles. However, further studies are needed to investigate the antigenicity of these particles and to determine if they represent undeveloped VLPs.

Introduction

Noroviruses (NoVs) belong to the genus *Norovirus* and are members of the family *Caliciviridae*. NoVs are the dominant cause of outbreaks of gastroenteritis worldwide, usually via the contamination of foods such as oysters, shellfish, ice, and person-to-person transmission [18, 24]. Although the symptoms, which include nausea, vomiting, and diarrhea, are self-limiting, infected children may be hospitalized and require the use of intravenous therapy [10, 11]. As such, a vaccine for NoV has been developed but has yet to be approved [1, 2].

The NoV genome consists of a positive-sense, single-stranded RNA of approximately 7.6 kb in length that is organized in three open reading frames (ORFs).

Open reading frame 1 (ORF1) encodes non-structural proteins, including N-terminal protein (N-term), NTPase, 3A-like protein (3A-like), genome-linked viral protein (VPg), 3C-like protease (Pro), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). ORF2 encodes the major capsid protein (VP1), and ORF3 encodes a small protein (VP2) associated with VP1 stability. To date, all laboratory efforts to cultivate human NoV have failed [7], but expression of the recombinant VP1 (rVP1) in insect or mammalian cells can result in the formation of virus-like particles (VLPs) that are morphologically similar to native NoV [3, 5, 13, 14, 16, 28, 31]. These studies have provided valuable information, including the high-resolution atomic structure and information on antigenicity among the strains and binding factors. However, it remains unclear how similar these VLPs are to native NoV [27]. In recent studies murine NoV was successfully cultured in cultured dendritic cells and macrophages, providing the first model for a NoV [19, 33].

The three other genera of the family *Caliciviridae* are *Sapovirus*, *Lagovirus*, and *Vesivirus*, which include sapovirus (SaV), rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), and feline calicivirus (FCV) strains, respectively. Porcine SaV (PEC strain) and FCV can be grown in culture systems, although after the PEC strain was adapted to cell culture, several amino acid substitutions in the genome were detected [8, 26, 30].

The purpose of this study was to express human NoV in cultured human embryonic kidney (HEK) 293T/17 cells using a number of different constructs, including a full-length construct (pT7U201F) that was designed to produce RNA identical to the genomic RNA and a construct with only ORF2 and ORF3 genes (pT7U201-ORF23), which could be analogous to the subgenomic RNA.

Materials and methods

Design of expression constructs

NoV strain U201 (accession number AB067542) was isolated from an outbreak of gastroenteritis in 1998 [20]. The U201 strain belonged to NoV genogroup II (GI/3; Mexico cluster), and the full-length sequence was determined. To develop the expression constructs we extracted the RNA as previously described [20]. All amplifications were performed using KOD Plus polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), and the primers are listed in Table 1. cDNA was synthesized with Tx30SXN primer and Superscript III reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). A single PCR fragment of 7.6 kb was amplified with sense primer U201-1S30 and antisense primer Tx30SXN, and then cloned into pCR-Blunt-II-TOPO vector (Invitrogen). This plasmid was designated pCR-Blunt-U201-F, which contained the full-length genome of U201. Several amplification and cloning steps were performed in order to produce a full-length expression construct having a T7 RNA polymerase promoter at the 5' end and an HDV ribozyme and a T7 terminator at the 3' end. Briefly, the 5' end of pCR-Blunt-U201-F was amplified with sense primer NKT7-U201-1S30 and antisense primer U201-3852A. This fragment was digested with *NotI* and *NdeI* restriction enzymes; the corresponding fragment was termed I (U201 contained a unique *NdeI* site at position 3538). Next, we amplified the 3' end of pCR-Blunt-U201-F plasmid with sense primer U201-6405S and antisense primer Ribo24-Tx30-U201end23A; the corresponding fragment was termed II. We then amplified HDV ribozyme and T7 terminator sequences from the pT7HCV09Luc plasmid [34] with sense primer Ribo1S24 and antisense

Table 1. Primers used to design the constructs

Name	Sequence (5' to 3')	Description
Tx30SXN	GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	RT-PCR
U201-1S30	GTGAATGAAGATGGCGTCTAACGACGCTTC	Amplification
NKT7-U201-1S30	AATCGAATTCAAGCGGCCGCGGTACCGCGG <u>CCGCGGTACC TAATACGACTCACTATA</u> GTGAATGAAGATGGCGTCTAACGACGCTTC	<i>NotI</i> and <i>KpnI</i> restriction enzyme sites (underlined) and a T7 promoter site (double underlined)
U201-3852A	CCCTCAAGAGTGGCTTCACCTTCG	Amplification
U201-6405S	CAGTACTTTTCTTCCGATCACAGCTG	Amplification
Ribo24-Tx30- U201end23A	<u>GAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCTTTTT</u> TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAA GATTCTAAATCAAATTTAG	24 nucleotides of the HDV ribozyme sequence (underlined)
Ribo1S24	GGGTCCGCATGGCATCTCCACCTC	Amplification
T7term-MluAsc-A	AGGCGCGCGCC <u>ACGCGTTCCTTTCAGCAA</u> AAAACCCCTCAAG	<i>MluI</i> site restriction enzyme (underlined)
MUTforward	TAGGCACAACACCAGGTGACgGTGGGTGCC	Mutagenesis (change from c to g)
MUTreverse	GTCACCTGGTGTGTGCCTAGGTCCATGCT	Mutagenesis
ORF2forward	GGGGTACC <u>TAATACGACTCACTATAGGGGT</u> GAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCTG	<i>KpnI</i> restriction enzyme site (underlined) and a T7 promoter site (double underlined)
ORF3forward	GGGGTACC <u>TAATACGACTCACTATAGGGGATT</u> CAATAATGGCTGGAGCTTTTATAGCAGG	<i>KpnI</i> enzyme site (underlined) and a T7 promoter (double underlined)
U201-5051S	CATGGGAGGGCGATCGCAA	Detection of RNA
U201-5391A	CCTGCATAACCATTGTACAT	Detection of RNA

primer T7term-MluAsc-A; the corresponding fragment was termed III. After fragments II and III were joined in a primer-less PCR (using the 24-base overlap in primer Ribo24-Tx30-U201end23A), we digested the 5' and 3' ends with *PfI*MI and *MluI* restriction enzymes; the corresponding fragment was termed IV. Next, pCR-Blunt-U201F was digested with *NotI* and cloned into a previously *NotI*-digested modified pMT1 vector. Since this vector is a low-copy plasmid, the number of nucleotide mutations would be reduced when expressed [22]; the corresponding plasmid was termed pT7U201F/MT1. Next, pT7U201F/MT1 was digested with *KpnI* and *NdeI* restriction enzymes and fragment I was inserted; the corresponding plasmid was termed pT7U201F/MT1 + I, which contained the full-length U201 and a T7 promoter at the 5' end. Plasmid pT7U201F/MT1 + I was digested with *PfI*MI and *MluI* restriction enzymes and fragment IV was inserted; the corresponding plasmid was termed pT7U201F, which contained a T7 promoter at the 5' end and an HDV ribozyme and a T7 terminator at the 3' end. This plasmid (pT7U201F) is able to generate the full-length U201 RNA when bacteriophage T7 RNA polymerase is provided. The pT7U201F also served as a template for the development of four other NoV expression constructs. We designed a second full-length construct with a mutation in the protease "GDCG" motif (termed pT7U201F-Pro/m) in which an amino acid residue was changed from GDCG to GDGG (shown in bold), thus generating polyproteins with no protease activity. This was accomplished using

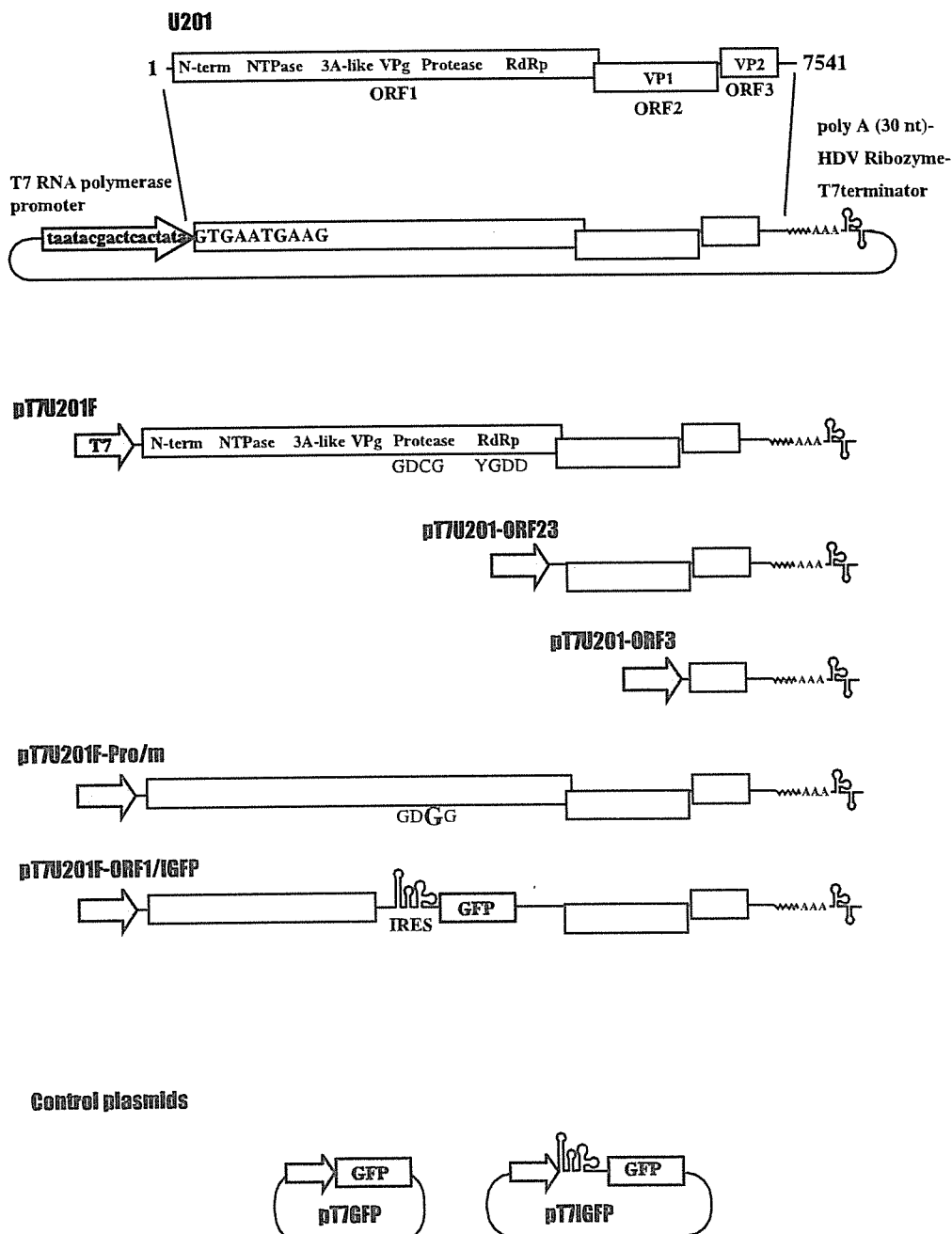


Fig. 1. The genomic organization of the NoV U201 strain, indicating the positions of the ORF1 genes (N-term, NTPase, 3A-like, VPg, Protease, and RdRp), the ORF2 gene (VP1), and the ORF3 gene (VP2). The schematics of the expression constructs are based on the genomic organization of U201: pT7U201F (genomic-like-RNA); pT7U201-ORF23 (subgenomic-like-RNA); pT7U201-ORF3 (VP2 gene only); pT7U201F-Pro/m (mutated-protease gene); pT7U201F-ORF1/IGFP (disrupted RdRp gene); pT7GFP (GFP control); and pT7IGFP (IGFP control)

a Genetailor site directed mutagenesis kit (Invitrogen) with sense primer MUTforward and antisense primer MUTreverse. We designed a third full-length construct with an EMCV-IRES and a GFP gene (termed pT7U201F-ORF1/IGFP), which was from the pIRES2-EGFP plasmid (Clontech, Palo Alto, CA). In this construct, the RdRp region (nucleotide position 2518 to 3859) was disrupted using *XhoI* and *XbaI* sites, so that an IRES-dependent GFP signal was detectable when RNA was generated by T7 RNA polymerase. We designed a construct with only ORF2 and ORF3. For this construct, the region from ORF2 to the 3' end of the genome was amplified with sense primer ORF2forward and antisense primer T7term-MluAsc-A. This fragment was cloned into modified pMT1 using the *KpnI* and *MluI* site; the corresponding plasmid was termed pU201-ORF23. We designed a construct with only ORF3. For this construct, the region from ORF3 to the 3' end of the genome was amplified with sense primer ORF3forward and antisense primer T7term-MluAsc-A. This fragment was cloned into modified pMT1; the corresponding plasmid was termed pT7U201-ORF3. All NoV constructs had a T7 RNA polymerase promoter at the 5' end, whereas at the 3' end, all constructs had a poly(A) tail, an HDV ribozyme, and a T7 terminator (Fig. 1). We also designed two control plasmids to monitor either cap-dependent or cap-independent translation of EGFP (EGFP and IRES-EGFP, respectively). EGFP and IRES-EGFP were amplified from pIRES2-EGFP and cut out with restriction enzymes. After a blunt-end reaction, the EGFP and IRES-EGFP fragments were cloned into pGEM4Z plasmid; the corresponding plasmids were termed pT7GFP and pT7IGFP, respectively. All clones were confirmed by sequencing.

Cells and expression of constructs

The human embryonic kidney (HEK) 293T/17 cells (293T) were purchased from the American Type Culture Collection, Rockville, MD, and maintained in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) containing penicillin (250 U/ml), streptomycin (250 µg/ml), and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen). Two days before the superinfection, 2.0×10^5 cells were put into a 35 mm dish and were grown in DMEM. The vTF7, a vaccinia virus recombinant that expresses the T7 polymerase (kindly provided by Bernard Moss, National Institutes of Health, Bethesda), was propagated as previously described [29]. 293T cells were infected with vTF7 at room temperature for 1 h at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. After infection, transfection of plasmid(s) was performed with Effectene transfection reagent as recommended by the supplier (QIAGEN, Valencia, CA).

Purification of VLPs

The culture medium and cells were harvested at 6, 12, 24, 48, and 72 h post-infection (hpi). The culture medium was collected and centrifuged for 10 min at $3,000 \times g$, and then further centrifuged for 1 h at $20,000 \times g$. The proteins in the supernatant were precipitated by ultracentrifugation for 3 h at 30,000 rpm (Beckman SW32Ti rotor) and resuspended in OptiMEM serum-free medium (Invitrogen). The cells were removed with a cell scraper and resuspended in OptiMEM medium. The proteins in the cells were released by freeze/thawing (three times) and then prepared as described above.

SDS-PAGE, Western blotting, Northern blotting, electron microscopy, and RT-PCR

A panel of antibodies specific for NoV non-structural proteins, consisting of N-term, NTPase, 3A-like, VPg, Pro, and RdRp, was prepared as described previously [25]. SDS-PAGE, Western blotting, Northern blotting, and electron microscopy (EM) were performed as described previously [12]. RNA was extracted from the VLPs using Isogen solution (WAKO, Osaka,

Japan) and was detected with the U201-specific sense primer U201-5051S and antisense primer U201-5391A as described previously [17, 21].

Large-scale expression of VP1

Four 6-well culture plates were used for large-scale expression of VLPs with vTF7 superinfection. The cultured cells were transfected with pT7U201F and pT7U201-ORF23 and then harvested at 48 hpi. VLPs were purified as described above but resuspended in 100 μ l OptiMEM, followed by CsCl equilibrium gradient ultracentrifugation (1.34 g/cm³) for 40 h at 45,000 rpm at 10 °C (Beckman SW-55Ti rotor). Two hundred microliters was collected from the bottom of the tube (22 fractions in total). Each fraction was concentrated for 3 h at 50,000 rpm (Beckman 55Ti rotor) and then resuspended in 20 μ l of OptiMEM and treated with RQ1 DNase and RNase A (Sigma, St. Louis, MO).

Immunofluorescence analysis

293T cells grown in 4-well tissue culture plates were infected with vTF7, transfected with plasmid DNA, and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at 6, 12, 24, 48, and 72 hpi for immunofluorescent (IF) staining. Cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 10 min prior to the addition of the antibodies. Following washing with PBS (pH 7.4), purified rabbit IgG fraction specific for the VP1 (dilution 1:4,000) or anti-VPg monoclonal antibody (MoAb) (1 μ g/ml; which was produced by *E. coli* expressed recombinant GST tagged fusion VPg protein, following the position at anti-VPg MoAb) was added and incubated at room temperature between 3 and 12 h at 4 °C. The wells were washed three times with PBS, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, affinity-purified goat antibody to rabbit IgG (dilution 1:20) (Invitrogen) was added in order to detect the primary VP1 antibody. To detect anti-VPg MoAb, affinity-purified Alexa Fluor 568-labeled goat antibody to mouse IgG (dilution 1:200) (Invitrogen) was used. For detection of primary antibody binding, slides were incubated in the dark for 1 h with FITC-labeled, affinity purified Alexa Fluor 568-labeled goat antibodies to guinea pig IgG (1:200) (Invitrogen). In addition, 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI) (Invitrogen) was used for staining of the nuclei. The slides were washed twice with PBS and then once with distilled water. One drop of antifade reagent-mounting mixture (Invitrogen) was placed on the center of each slide after staining, a coverslip was added, and the mounting agent was allowed to dry. After sealing, the slides were stored at room temperature. Images were collected using a 63 water immersion objective, zoom 1 or 2, on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) by argon-krypton laser excitation at 488 nm for FITC (green) and 568 nm for Alexa-Fluor (red). The UV fluorescence for DAPI (blue) was excited using an argon laser (364 nm). The images were analyzed in Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

Results

Expression in 293T cells

The expression of the NoV constructs in 293T cells was analyzed with a panel of purified rabbit IgG antisera that were raised against *E. coli*-expressed recombinant ORF1-encoded proteins: rN-term (amino acids 1–169 of the ORF1), rNTPase (amino acids 488–699), r3A-like (amino acids 702–878), rVPg (amino acids 879–1011), rPro (amino acids 1012–1192), and rRdRp (amino acids 1193–1707), rVP1 (complete length of the ORF2), and rVP2 (complete length of the ORF3). Samples were collected at 6, 12, 24, 48, and 72 hpi, and equal volumes were

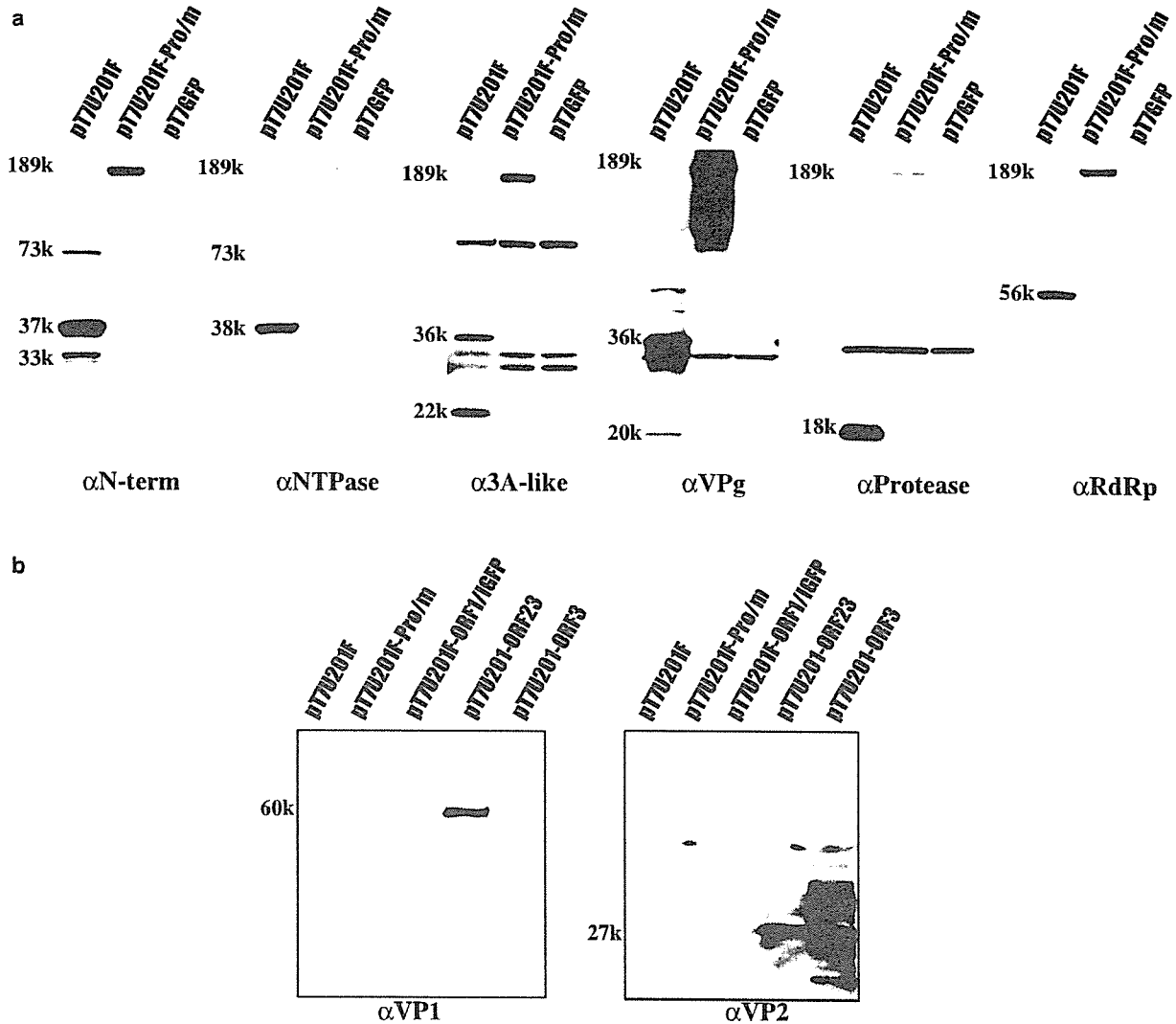


Fig. 2. Expression of NoV constructs was analyzed by antisera that were raised against the *E. coli*-expressed ORF1 proteins (N-term, NTPase, 3A-like, VPg, protease, and RdRp), the ORF2 protein (VP1), and the ORF3 protein (VP2), corresponding to 37, 38, 22, 20, 18, 56, 60, and 27 kDa, respectively. Equal volumes of samples collected 24 hpi were loaded into separate wells of a 5–20% gradient polyacrylamide gel. All ORF1 proteins were detected with the pT7U201F construct. A single polyprotein of 189 kDa was detected for the pT7U201F-Pro/m construct. The control pT7U201F-ORF1/IGFP construct showed no signals against any of these antibodies

loaded into separate wells of a 5–20% gradient polyacrylamide gel. For the full-length construct (pT7U201F), each of the ORF1-encoded proteins, i.e., rN-term, rNTPase, r3A-like, rVPg, rPro, and rRdRp was detected, as 37-kDa, 38-kDa, 22-kDa, 20-kDa, 18-kDa, and 56-kDa bands, respectively (Fig. 2, shown at 24 hpi). For the mutated-protease construct (pT7U201-F-Pro/m), a single polyprotein of 189 kDa, which corresponded to the estimated product size of the ORF1-encoded

polyprotein, was detected with the N-term, NTPase, 3A-like, VPg, Pro, and RdRp antisera. The control GFP pT7GFP construct showed no signals against any of these antibodies (data not shown). These results indicated that the ORF1-encoded protein was cleaved by the viral protease, since cleaved ORF1 proteins were not detected with the mutated-protease construct (Fig. 2a). Western blot analysis also revealed several precursor proteins with the pT7U201F construct. A precursor protein of 73 kDa was detected with the N-term and NTPase antisera; however, the 73-kDa band intensities were weaker than those of the rN-term and rNTPase proteins (37 and 38 kDa, respectively). A 33-kDa band detected with the N-term antisera was not further characterized in this study. Precursor protein bands of 36 kDa were detected with the 3A-like and VPg antisera. The band intensity of the 36-kDa and r3A-like (22-kDa) proteins were similar, whereas the band intensity of the 36-kDa protein was greater than that of the rVPg protein (20 kDa). Surprisingly, matured products appeared weakly at 6 hpi, and then the signal intensity increased over time, except in the case of r3A-like and rVPg (data not shown). In particular, the rPro-RdRp precursor was not detected in our system. These results suggested that cleavage of the 36 kDa precursor protein was slower than that of the 73-kDa precursor protein.

The rVP1 was only expressed with the pT7U201-ORF23 construct, as seen by the band of 60 kDa. The rVP2 was expressed with both the pT7U201-ORF23 and pT7U201-ORF3 constructs, as seen by the bands of 27 kDa (Fig. 2b). Neither rVP1 nor rVP2 was detected with the pT7U201F construct. Following these results, we

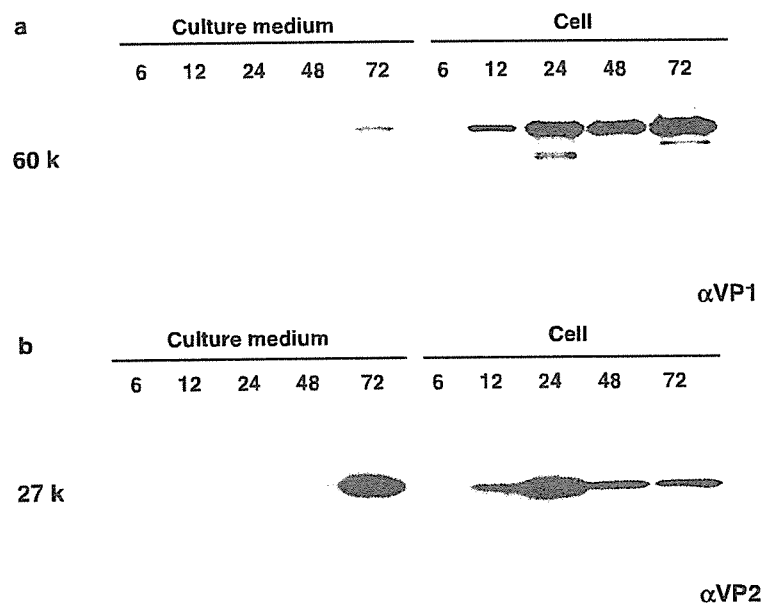


Fig. 3. The time-course expression of VP1 and VP2 in the cell lysate and culture medium that were stained at 6, 12, 24, 48, and 72 hpi. **a** VP1 was observed in the cell lysate from 12 hpi, whereas VP1 was only detected in the culture medium at 72 hpi. **b** VP2 was observed in the cell lysate and culture medium, but the exposure time was 15 min for VP2, compared to 15 s for VP1, which indicates that the translation of VP1 was faster and more efficient than that of VP2

co-transfected pT7U201F and pT7U201-ORF23 and examined the time-course expression of rVP1 and rVP2 in the cell lysate and culture medium (Fig. 3a and b). Samples were stained at 6, 12, 24, 48, and 72 hpi. The rVP1 was observed in the

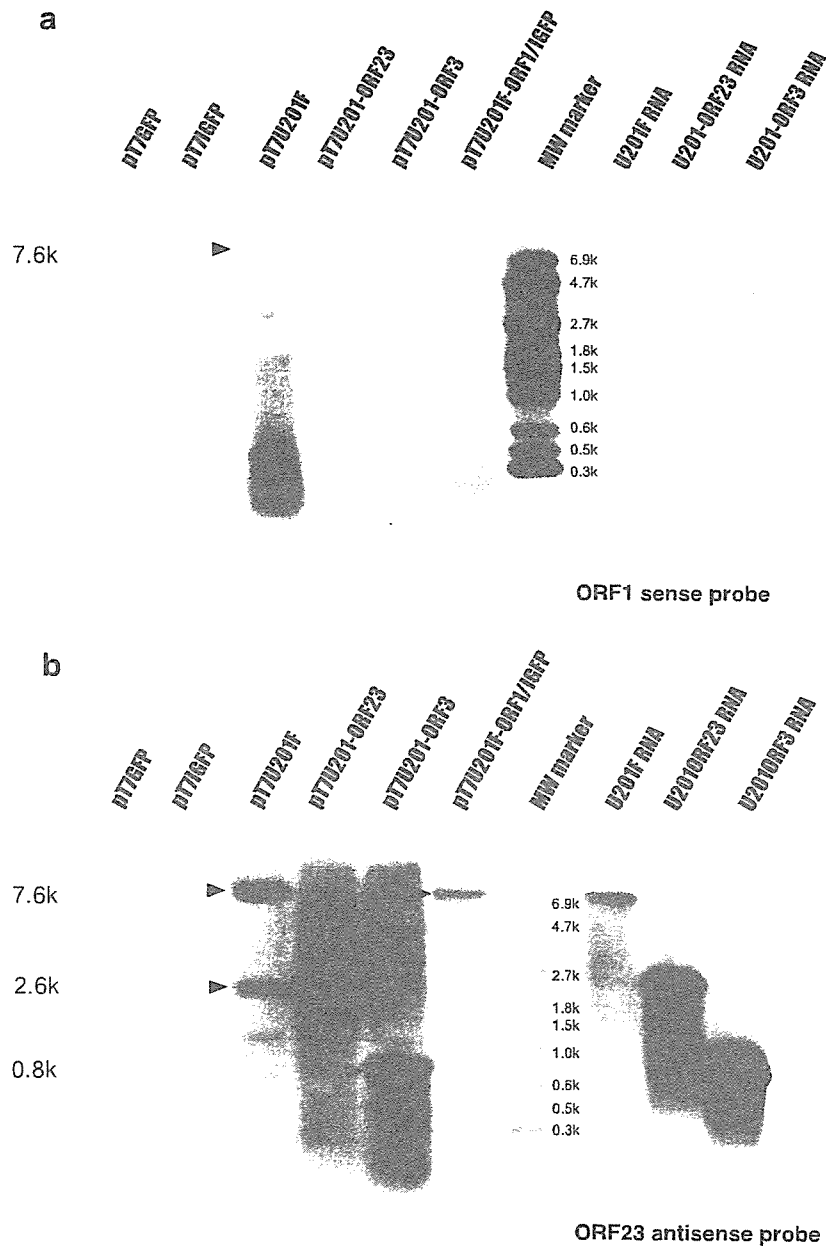


Fig. 4. Total RNA was extracted from the cells and analyzed by Northern blotting. **a** A full-length negative-strand RNA was detected with the pT7U201F construct (7.6 kb). **b** Positive-strand full-length RNA (7.6 kb) and positive-strand subgenomic RNA (2.6 kb) were detected with the pT7U201F construct; a positive-strand 2.6-kb RNA band was detected with the pT7U201-ORF23 construct; a 0.8-kb band was detected with the pT7U201-ORF3 construct; and a 7.6-kb band was detected with the pT7U201F-ORF1/IGFP construct