

201028049A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の
開発と予防診断法に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の
開発と予防診断法に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と
予防診断法に関する研究

鈴木 哲朗 1

II. 分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の解析

片山 和彦 11

標準的ウイルス分離法を用いたノロウイルス分離の試み

田中 智之 21

ノロウイルス感染症における宿主応答と周期的流行機序の解明

本村 和嗣 27

B群ロタウイルスの構造蛋白質の解析およびVLPの作出

恒光 裕 31

組換えバキュロウイルスを用いたヒトボカウイルス構造蛋白の発現
およびその応用

李 天成 35

E型肝炎ウイルス粒子の感染性を規定する因子の解析

石井 孝司 39

新規ポリオーマウイルスの感染増殖系探索にむけたレポーターシステム
の開発とウイルスの細胞指向性を決定するカプシドの機能解析

中西 章 43

B型肝炎ウイルスS抗原の分泌機構の研究

勝二 郁夫 47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総括研究報告書

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 ノロウイルス：ヒトノロウイルス (HuNoV) の感染増殖モデルとして、マウスノロウイルス (MuNoV) の感染増殖系を樹立した。細胞内のウイルス蛋白分布、RNA 合成などノロウイルス複製機構に関する多くの知見を得た。HuNoV の免疫応答、流行機序解析に用いるため、2006-2007 年流行 HuNoV 株の発現バキュロウイルスを作製しウイルス様粒子を得た。

ロタウイルス：B 群ロタウイルス (RoV) cDNA のクローン化、分子系統樹解析を行い、主要株の VP2 発現組換えバキュロウイルスを作製した。B 群 RoV は遺伝学および抗原学的に複数の亜群に分類される可能性が示された。

ボカウイルス：3 種類のボカウイルス構造蛋白からそれぞれ形成される中空粒子の発現、精製に成功した。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立した。

E 型肝炎ウイルス (HEV)：新たに単離した HEV 遺伝子型 3 の全長 cDNA が感染性クローンであることを明らかにした。

ポリオーマウイルス：細胞指向性の決定は、ウイルス粒子表面を構成する VP1 のみではなく、粒子内部に存在する VP2/3 も関与することを見出した。メルケル細胞ポリオーマウイルス MCV の感染トロピズムが糖脂質糖鎖との結合性に関連することが初めて示された。

B 型肝炎ウイルス (HBV)：preS2 の開始コドン付近に 1 塩基または 4 塩基の変異を導入することにより、細胞上清中の S 抗原産生が著しく向上することが明らかになった。Meddle S の効率的な発現が、small S の発現、分泌効率に関与する可能性が示された。

分担研究者

田中 智之 堺市衛生研究所 所長
恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長
勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授
中西 章 国立長寿医療研究センター 室長
石井 孝司 国立感染症研究所 室長
片山 和彦 国立感染症研究所 室長
李 天成 国立感染症研究所 主任研究官
本村 和嗣 国立感染症研究所 主任研究官

A. 研究目的

培養細胞での感染増殖系が確立されていない

ためにウイルス学的研究に制約があり、その感染症対策が十分でないウイルスについて、1) ウイルス様粒子 (VLP) を利用した抗原抗体診断法の開発と血清疫学解析、2) 実験モデルの開発とウイルス生活環の解析、3) 宿主免疫応答の解析とワクチン開発、を包括的に行う。

B. 研究方法

1. ノロウイルス

1-1. マウスノロウイルス (MuNoV) 感染増殖モデル：

2002 年に東京大学大学院農学生命研究科の遠

矢幸伸准教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株を用いた。MOI 0.01 で RAW264.7 細胞に感染させ、12 時間後に固定、もしくは以後の処理を行う事で観察に用いた。MuNoV 蛋白質とゲノム複製中間体である二本鎖 RNA の観察には、冷メタノール固定した細胞を用いた。また、MuNoV のゲノム RNA 合成を観察するためには、アクチノマイシン D 処理を行い、細胞の RNA 合成を止めた後、BrU を細胞にトランスフェクションし、MuNoV ゲノム RNA より RdRp にてトランスクリプションされる一本鎖 RNA に BrU を取り込ませた。その後、細胞を冷メタノール固定し、抗 BrU 抗体を用いた免疫染色を行った。細胞の免疫染色は、一次抗体に標的物特異的抗血清、もしくはモノクローナル抗体を用い、二次抗体に一次抗体を認識する蛍光物質ラベル抗体を用いた。

1-2. 細胞培養によるノロウイルス分離：

ウイルス材料は 2009/10 シーズンのノロウイルス GII/4 陽性糞便、T2：2010 年 2 月 15 日採取 (5.98×10^4 copy/well)、T7：2010 年 2 月 16 日採取 (7.10×10^7 copy/well) を用いた。さらに 2010/2011 シーズンに採取された比較的新鮮な材料、Mi (NV GI.2 および GII.13 が混合； 3.9×10^6 copy/グラム)、To (GII.4 3.2×10^5 copy/グラム) を用いた。

1-3. ノロウイルス中空粒子の作製：

糞便中のノロウイルスゲノム RNA を抽出、プライマー G2SKF と Oligo dT30SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いて cDNA を合成した。GII/4 特異的プライマーを用いて NoV ゲノム cDNA 断片約 2.5kb を PCR 増幅し、バキュロウイルスベクターへ組み込んだ。組換えバキュロウイルス感染カイコ幼虫体液検体を 30% スクロース液に重層させ、26000xg、3 時間の超遠心後、沈降画分を得た。EX-CELL 405 培養液で溶解後、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法を用いて、12 分離画分を得た。白いバンドが見られた分画を抽出し電子顕微鏡観察した。

2. ロタウイルス

2-1. ブタ B 群ロタウイルス (RoV) の主要カプシ

ド蛋白質 VP6 に関する遺伝学的解析：

国内の 9 農場より採取した B 群 RoV 陽性ブタ糞便 10 検体を材料に、既知のウシ GBR VP6 遺伝子の塩基配列を参照に設計した特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法により遺伝子検出した。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンシング法および 5'RACE 法を用いて、VP6 遺伝子の全塩基配列を決定した。

2-2. VP6 に関する抗原学的解析：

ブタ B 群 RoV Kyushu 株および PB-93-I5 株について、バキュロウイルス発現系を用いて組換え VP6 蛋白質を作製した。ノトバイオトブタに対して B 群 RoV 計 5 株を実験的に投与した後、感染耐過血清を回収して抗血清に用いた。間接蛍光抗体法を用いて、組換え VP6 蛋白質と抗血清の組み合わせによる反応性の相違 (抗体価) を定量・比較し、ブタ B 群 RoV 間における抗原性の相違を検討した。また、ウシ B 群 RoV Nemuro 株由来の組換え VP6 蛋白質および抗血清を用いた間接蛍光抗体法、さらに間接 ELISA 法によって、ブタ B 群 RoV 株との抗原学的関連性を検討した。

2-3. ウシ B 群 RoV Nemuro 株の VLP 作製：

既知のウシ B 群 RoV VP2 遺伝子の塩基配列を参照に特異的なプライマーを作出し、RT-PCR 法により遺伝子検出、増幅を行った。VP2、VP6、VP7 それぞれについて組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞 Tn5 に感染させた後、感染細胞あるいは細胞上清を回収し、各種蛋白質の発現を確認した。

3. ボカウイルス

三種類のヒトボカウイルス (HBoV, HBoV2, HBoV3) ゲノムの構造蛋白領域 VP2 遺伝子をもつ組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製し、昆虫細胞 Sf9 及び Tn5 で発現させた。ウイルス蛋白の発現、ウェスタンブロット法、粒子形成を透過型電子顕微鏡観察等で解析した。ウイルス様粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。精製粒子を抗原とした抗体 ELISA を確立し、健康人における感染状況を調査した。精製粒子をウサギに免疫して HBoV,

HBoV2, HBoV3 の抗原性を比較した。また、マイナー構造蛋白 VP1 の遺伝子も持つ組換えバキュロウイルスを作製し、VP2 の組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、VP1 と VP2 が共存するウイルス粒子の作製を試みた。

4. E 型肝炎ウイルス

E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染ブタの肝臓より組織乳剤を作成し、PLC/PRF/5 細胞に感染させ、増殖した HEV 株 83-2 (genotype 3) を取得した。RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を取得し、連結して全長 cDNA を構築した。5'端に導入した T7 promoter を用いて全長 RNA を合成した。

5. ポリオーマウイルス

surrogate capsid system により、WUV、KIV あるいは MCV のカプシドをもつレポーター粒子を作成した。CAG プロモーター下流に各後期遺伝子 (VP1, VP2) コード領域を組み込み、pCAG WUV, pCAG KIV, pCAG MCV を作製した。これらの (1)DNA いずれかと (2)SV40 T 抗原を発現するコンストラクト (pCI Ts)、(3)SV40 複製開始点をもつレポーター遺伝子発現カセットをもつレポーターDNA と共に 293T 細胞にトランスフェクションし、3 日後に細胞を回収した。各細胞抽出液を Nuclease 処理の後、27-39% Optiprep (Beckman SW50, 45,000rpm, 3.5hours, 10°C) の連続密度勾配遠沈により分画し、それぞれのレポーターDNA をパッケージした粒子を回収した。SEAP 等の活性、また蛍光観察により各レポーター粒子の遺伝子導入性を検証した。

6. B 型肝炎ウイルス

B 型肝炎ウイルス (HBV)-Aeus, HBV-Cat 株 (国立国際医療センター、溝上センター長から供与) の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を PCR 法で作製し、pSV プラスミドにサブクローニングしたものを、Huh7 細胞にトランスフェクトし、細胞内および培養上清中への HBs 抗原の発現、および分泌を ELISA 法で解析した。また、HBV-Aeus 株の PreS2-S 領域開始部分の変

異体を作製し、Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で解析した。細胞上清中への HBs 抗原分泌効率は ELISA 法で解析した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. ノロウイルス

1-1. MuNoV モデルの確立と増殖機構の解析：
HuNoV の感染増殖機構の解明を目指し、ノロウイルスの中でも株価細胞で感染増殖可能なマウスノロウイルス (MuNoV) をモデルとして MuNoV の細胞内での複製機構を解析した。MuNoV 感染細胞において、構造タンパク質 VP1 は、細胞質全体に顆粒状に認められたが、核周辺部にスポット状に集合していた。非構造蛋白質 VPg は、核周辺部にスポット状に認められ、VPg と VP1 の局在は、核周辺部では一致していた。また、核周辺部のスポットには、VPg と RdRp も同様に認められた。2 本鎖 RNA を検出したところ、VPg と局在が非常に良く一致した。MuNoV 感染細胞の核周辺部にはベジグルの新生が観察され、その内部にウイルス様粒子が多数観察された。

1-2. 細胞培養によるノロウイルス分離：

11 種の株化細胞、保存状態の違った便検体、

感染ノロウイルス量、ウイルス材料のトリプシン前処理の必要性、6代までのblind passage等について検討した。その結果、いずれの検討においてもノロウイルスの細胞内増殖は認められなかった。すなわち、接種後、観察期間中に細胞変性効果は観察できず、また培養上清中のウイルス遺伝子量は速やかに減少した。

1-3. ノロウイルス感染症における宿主応答と周期的流行機序の解明：

ノロウイルス中空粒子を抗原に用いて、感染者糞便試料中にある、過去に流行したノロウイルス GII/4 亜株に対する特異的 IgA 抗体について解析する。今年度は、カイク蛋白質発現系を用いて、GII/4 2006a 亜株、2006b 亜株の中空粒子作製を試みた。(1) カイク蛹磨砕液で、1.322g/ml~1.329g/mlに相当する分画に白いバンドが見られた。(2) 2006a 亜株、2006b 亜株共に、電子顕微鏡所見で、径 38-42nm の均一なドーナツ状の粒子が得られた。(3) 一部、径 32-35nm の感染性粒子に近い構造をもつ粒子が認められた。

2. RoV

2-1. ブタ B 群 RoV の主要カプシド蛋白質 VP6 に関する遺伝学的解析：

ブタ B 群 RoV 株間における VP6 遺伝子のアミノ酸配列一致率は 65-99%、また他の動物種由来株とのアミノ酸配列一致率は 67-83%であった。他の動物由来種を含めた VP6 アミノ酸配列の分子系統樹解析において、B 群 RoV はヒト、ラットおよび一部のブタ由来株を含む遺伝子群 (G1) と、ウシおよび残りのブタ由来株を含む遺伝子群 (G2) に大きく区別されることがわかった。

2-2. VP6 に関する抗原学的解析：

G1 由来の PB-kyushu 株 VP6 蛋白質に対して、G1 由来の抗血清では極めて高い反応性が認められたが、G2 由来の抗血清ではほとんど反応性が認められなかった。一方、G2 由来の PB-93-I5 株 VP6 蛋白質に対しては G1 由来ではなく、G2 由来の抗血清が高い抗体価を示した。ウシ B 群 RoV Nemuro 株由来の VP6 蛋白質を抗原とした間接蛍光抗体法および間接 ELISA 法を行った結果、遺

伝学的解析においてウシ B 群 RoV と同一群 (G2) 由来のブタ抗血清は両アッセイ法において高い反応性を示した。

2-3. ウシ B 群 RoV Nemuro 株の VLP 作製：

VP2、VP6、VP7 遺伝子をそれぞれを組み込んだバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞 Tn5 で発現させた結果、VP2、VP6 はそれぞれ分子量約 100kDa、45kDa の蛋白質を効率よく発現したが、約 30kDa の VP7 は低発現にとどまった。次いで、VP2/6 および VP2/6/7 の各種組合せにおける VLP の粒子形成を試みたが、いずれも収量は極めて少なく、また各種タンパクの発現も VP6 を除き著しく低かった。

3. ボカウイルス

組換えバキュロウイルス感染 Tn5 細胞では 60.5 kDa の VP2 蛋白質が効率よく培養上清に放出された。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、電子顕微鏡観察したところ、比重 1.30 g/cm³ 分画に直径約 22nm の球形中空粒子構造が認められた。精製粒子をウサギに接種し抗 HBoV-VP2、HBoV2-VP2、HBoV3-VP2 抗血清を作製し、三種類のボカウイルスの抗原性を比較した結果、異なる抗原性を示すものの、交叉反応も示された。これらの VLP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人におけるヒトボカウイルス抗体保有率を解析した。その結果、若年層から高い抗体保有率を示し、健常成人の約 90%がヒトボカウイルス抗体陽性であることが明らかとなり、多くの場合、乳幼児期に感染する可能性が考えられた。

ボカウイルスの構造蛋白質 VP1 と VP2 を共発現し、精製したウイルス粒子から分子量 75kDa の VP1 と 60.5kDa の VP2 蛋白質が検出された。粒子構成成分として VP1 は VP2 に比べマイナーであることが示された。

4. HEV

合成した全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入したところ、導入後 1 週間から培養上清中に HEV 抗原蛋白質 (ORF2、キャプシド蛋白質) の分泌が観察され、この RNA

は細胞内で増殖することが確認された。また、この培養上清を naïve な PLC/PRF/5 細胞に添加したところ、2 週間目から培養上清中に HEV 抗原蛋白の分泌が確認されたことから、本クローンは感染性を有することが確認できた。

PLC/PRF/5 に HEV を感染させ、抗 HEV 抗体を用いて蛍光抗体染色を行うと、長期間培養後も HEV に感染していない細胞が見られ、この細胞株はヘテロな集団であることが推測された。そこで、PLC/PRF/5 細胞から single cell cloning により約 100 株を取得した。現在、各株の HEV 感受性について検討している。

5. ポリオーマウイルス

5-1. surrogate capsid system を利用した WUV, KIV レポーター粒子の作製及びその感染性解析；

surrogate capsid system を利用して、初めて WUV, KIV カプシドを持つレポーター粒子を作製し、293T, CV-1, BSC-1 細胞を用いてその感染性(遺伝子導入性)を明らかにした。また、ポリオーマウイルスの細胞指向性を規定するカプシドの機能解析を行うため、細胞指向性が異なるウイルス間でのハイブリッドカプシドウイルスを作製して、その細胞指向性を解析したところ、細胞指向性の決定は、ウイルス粒子表面を構成する VP1 のみではなく、粒子内部に存在する VP2/3 も関与することを見出した。

5-2. MCV レポーター粒子の作製と糖鎖依存的な感染機構の解析；

ポリオーマウイルスの細胞への接着、侵入には、細胞表面の存在するシアル酸含糖脂質が重要な役割を果たすことが SV40 などで知られている。しかしながら、近年発見された MCV, WUV, KIV といった新規ウイルスでは感染機構は全く不明である。そこで、MCV VP1 発現組換えバキュロウイルスを利用して産生、精製した MCV 様粒子を使って種々の糖脂質糖鎖との結合能を SPR 法(ピアコア法)によって解析した。その結果、MCV 粒子は調べた 13 種類の糖鎖の中で GD3, GM3 と高い親和性を示すことを見出した。それに比べて親和性は低いものの GD2, GM2 において

も MCV との結合が認められた。

次に、このような糖鎖結合性が MCV の感染に関連するかを明らかにするため、前述と同様の手法で、MCV のカプシドを持つレポーター粒子を作製した。MCV 感染が糖脂質に依存するかどうかを調べるため、293T 細胞をあらかじめスフィンゴ糖脂質合成阻害剤 D-PPMP で処理しておくとし、レポーター粒子の感染は阻害されること、この阻害は粒子感染後に D-PPMP を添加した場合では認められないことから、MCV 感染が糖脂質依存的であることが示唆された。感染機構についてさらに詳しく解析するため、糖脂質欠損細胞株(マウスメラノーマ) GM95 を用いた。まず、MCV レポーター粒子が parental のメラノーマ細胞には感染するものの、GM95 には極めて感染効率が低いことを確認した。SPR 解析の結果から、MCV との結合性が異なる 4 種類の糖脂質を選択し、これらをそれぞれ GM95 細胞に添加した。そこへ MCV レポーター粒子を接種すると添加した糖脂質によって感染性に差が出ることを示された。すなわち、GD3>>GM3>GT1b>GM1 の順に MCV の感染性を上昇させた。

バキュロウイルスで作製した MCV 様粒子を抗原とする抗体 ELISA 法を用いて血清疫学解析を行った。高齢者患者について抗 MCV 抗体保有率を解析し、エイズ患者で保有率が低いこと、肺癌患者で高い傾向が見られることを見出した。

クライオ電子顕微鏡解析より MCV の粒子構造を見出し、原子構造、粒子径などで既存のポリオーマウイルスとの近似点と相違点を示した。

6. HBV

各遺伝子型の HBs 抗原を効率良く産生する方法を開発するために、HBs 抗原の分泌効率を規定する遺伝子領域を解析した。分泌効率の異なる株 HBV-Aeus と HBV-Cat のキメラプラスミドの解析から、HBV-Cat の preS1-preS2 領域を HBV-Aeus の配列に置換すると S 抗原が効率よく分泌できることが明らかとなった。両株間の

遺伝子配列を詳細に比較したところ、Large S, Middle S, Small S 蛋白質の翻訳開始点における Kozak 配列周辺に違いが認められた。そこで、翻訳開始点周辺の遺伝子配列が S 抗原の発現および分泌効率に及ぼす影響を明らかにするために、9種類の変異体プラスミドを作製し解析した。その結果、preS2 の開始コドン付近に 1 塩基または 4 塩基の変異を導入することにより、細胞上清中の S 抗原産生が著しく向上することが明らかになった。

D. 考察

1. ノロウイルス

ヒトノロウイルス (HuNoV) は、ヒトに感染し急性胃腸炎を引き起こす。HuNoV はヒト体内で効率よく増殖するが、株化された培養細胞を用いた感染増殖システムは確立されていない。そのため、ウイルスの病原性、感染増殖機構の解析が遅れており、未だ有効な抗ウイルス剤、感染制御方法の開発に至っていない。そこで、HuNoV の感染増殖機構の解明を目指し、ノロウイルスの中でも株価細胞で感染増殖可能なマウスノロウイルス (MuNoV) をモデルとして MuNoV の細胞内での複製機構を解析した。MuNoV 感染細胞では、核周辺部にウイルスタンパク質が蓄積する現象が特徴的であった。これは HuNoV の p22 タンパク質発現細胞に認められる現象と酷似しており、MuNoV, HuNoV とともに細胞のタンパク質の膜輸送システムを破壊する可能性が考えられた。

培養細胞系による HuNoV 分離の今年度の試みは不成功に終わった、この結果から、これまでの実験において、HuNoV レセプターを発現する細胞を見つけることが出来なかったこと、また我々が感染に用いた材料中に感染性を有する分子が極めて少なかったこと、が考えられる。実験条件の再検討を行う予定である。

HuNoV は、免疫応答、周期的流行機序は明らかにされていない。患者検体の抗 HuNoV-IgA 抗体、ウイルス遺伝的系統等を網羅的に解析することにより、ノロウイルスの周期的流行のしくみについて理解を深めることを目指している。

本年度は、カイク蛋白質発現系を用いて、2006a 亜株と 2006b 亜株の中空粒子を作製した。次年度は、感染者の糞便試料中にある特異的 IgA 抗体を正確に検出するために、感染性粒子を反映する中空粒子の作成に取り組む。

2. RoV

乳幼児下痢症の原因である RoV は、A 群以外には培養系が確立されていない。本研究では、B 群 RoV の VLP を作製、抗原抗体測定系を樹立し血清疫学解析を行う。

B 群 RoV の VP6 は遺伝的多様性に富み、さらに遺伝学的にも抗原学的にも複数の群に分類されることが示唆された。しかしながら、そのデータが示す生物学的意義が同一種間内の多様性を意味するのか、あるいは別種であることを意味するのかについてはこれまで他のロタウイルスにおいて類似した報告がないため、更なる解析および検討を重ねた後に結論付ける必要がある。また B 群 RoV は A 群 RoV のように科学的根拠に基づく分類法が確立されていないため、今後も継続的に詳細な解析を行い、確固たる分類基準を早急に整備する必要がある。少なくとも本研究はその方向性を示す一助となると考えられた。

3. ボカウイルス

ヒトボカウイルスはパルボウイルス科の一種で、小児下気道感染症から検出された新しい直鎖一本鎖 DNA ウイルスである。最近、さらに三種類の近縁ウイルス (HBoV2, HBoV3, HBoV4) が発見され、さまざまな小児呼吸器疾患や腸管感染症など関連していると推測されている。しかしながら、その詳細はについて未だ十分に解析されていない。抗体や抗原の検出法が確立されていないため疫学情報も不十分である。今年度、組換えバキュロウイルス発現システムで三種類のボカウイルス構造蛋白からそれぞれ形成される中空粒子の発現、精製に成功した。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立した。

4. HEV

現在樹立されている HEV の培養系は非常に限定的であり、生活環研究に汎用されるに至っていない。本研究では、効率の良い HEV 培養系を確立し、複製増殖に必要な宿主因子を明らかにする。

取得した HEV 感染性クローンを用いて reverse genetics の実験を行い、特に HEV の感染性を規定する領域の解析、感染細胞内でのウイルス複製機構の解析を行うことを予定している。

また、PLC/PRF/5 細胞のクローニングにより得られた多数の細胞株の HEV 感受性を調べ、その中で効率よく HEV が感染できる細胞を選択し、培養細胞系の確立を目指す。また、感染できる細胞とできない細胞を比較解析することにより、宿主側で HEV 感染に重要な役割を果たすと考えられる因子の解析を行いたい。

5. ポリオーマウイルス

近年、3 種類の新規ヒトポリオーマウイルス (MCV、KIV、WUV) が同定されたが、どのような疾患と関連するか、また感染の分子機構は明らかにされていない。本研究グループではすでに MCV 様粒子の作製に成功し MCV の血清疫学解析を行った。また、研究分担者中西が確立したポリオーマウイルスの surrogate capsid system を駆使して、MCV、KIV、WUV の細胞感受性、感染機構の解析を行っている。今年度、MCV、KIV、WUV のカプシドをそれぞれ有するレポーター粒子の作製に成功し、感染性解析のツールが整った。さらに、MCV については、糖脂質依存的な感染を示すとともに、GD3 など結合性の高い糖脂質が効率のよい感染に寄与する可能性が示された。一般にメラノーマ、メルケル細胞など皮膚の細胞では糖脂質群の中で GM3、GD3 が高発現しているとされている。ポリオーマウイルスの感染トロピズムが糖鎖との結合性に関連することが初めて示された。

6. HBV

近年、B 型肝炎ウイルス (HBV) においてウイル

ス遺伝子型と感染慢性化、発癌性との関連が明らかとなり、慢性化度の高い A 型の比率が高まっている。また、B 型肝炎ワクチンに対するエスケープ変異の出現も問題である。全遺伝子型に有効な HBV ワクチンの開発に対する社会的ニーズが高まっている。HBV の S 抗原はワクチンおよび診断系に用いられており、効率良い発現系が重要であるが、HBV の S 抗原分泌機構は必ずしも十分に解明されていない。

今年度、preS2 の開始コドン付近に 1 塩基または 4 塩基の変異を導入することにより、細胞上清中の S 抗原産生が著しく向上することが明らかになった。Meddle S の効率良い発現が、small S の発現、分泌効率に関与する可能性が示された。

E. 結論

本年度の研究成果より以下の展開、進展が期待される。

- 1) ノロウイルスの複製増殖機構に関する新規知見の蓄積。
- 2) B 群 RoV、ボカウイルス各遺伝子型の抗原抗体診断法の開発。
- 3) 効率がよく汎用性の高い HEV 増殖系の確立。
- 4) 新規ポリオーマウイルス 3 種の感染機構の解明と診断系の確立。
- 5) 遺伝子型特異的な HBV 抗原検出法、全遺伝子型に有効な B 型肝炎ワクチン開発のための基盤技術の確立。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (研究代表者分)

論文発表

1. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T.: Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of

- extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
2. Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T.: Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.
 3. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y.: Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*. 6:e15967, 2011.
 4. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K.: Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: Polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J. Hepatol.* 54:432-438, 2011.
 5. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.
 6. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 84: 5824-5835, 2010.
 7. Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer Res* 16: 957-966, 2010.
 8. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 54:206-220, 2010.
 9. Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun.* 395: 565-571, 2010.
 10. Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T. Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients. *Clin Immunol* 135: 459-465, 2010.
 11. Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLOS Pathog.* 6; e1000885, 2010.
 12. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem.* 111: 676-685, 2010.
 13. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411-420, 2010.

H. 知的所有権の出願・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。

Ⅱ. 分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の解析

研究分担者 片山和彦 国立感染症研究所 ウイルス第2部第1室
研究協力者 下池貴志 国立感染症研究所 ウイルス第2部第1室

研究要旨 ヒトノロウイルス (HuNoV) は、ヒトに感染し急性胃腸炎を引き起こす。HuNoV はヒト体内で効率よく増殖するが、株化された培養細胞を用いた感染増殖システムは確立されていない。そのため、ウイルスの病原性、感染増殖機構の解析が遅れており、未だ有効な抗ウイルス剤、感染制御方法の開発に至っていない。本研究では、HuNoV の感染増殖機構の解明を目指し、ノロウイルスの中でも株価細胞で感染増殖可能なマウスノロウイルス (MuNoV) をモデルとして MuNoV の細胞内での複製機構を解析した。

A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus; NoV) は小型球形のノンエンベロープウイルスで、ヒトに急性胃腸炎を引き起こす。特に人に感染する NoV (Human NoV; HuNoV) は、冬期に多発する非細菌性集団食中毒や、流行性急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られている。NoV のゲノムはプラス1本鎖の全長約 7600 塩基の RNA で、少なくとも5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV) に分類される。これまでに GI, GII, GIV がヒトから検出されている。GIII はウシから、GV はマウスから分離された。本報では GI, II, IV をヒトノロウイルス (HuNoV)、GV をマウスノロウイルス (MuNoV) とする。HuNoV はヒトにのみ感染増殖するが、培養細胞や実験動物での増殖系が確立されていない。そのため、ウイルスの病

原性、感染増殖機構の解析が遅れており、未だ有効な抗ウイルス剤、感染制御方法の開発に至っていない。一方、MuNoV は、マウスの細胞 RAW264.7 を用いた感染増殖が可能であること、マウスでの感染増殖が可能であることから、HuNoV のモデルとして期待されている。しかし、MuNoV は、マウスの下痢を起こさず、その病原性もはっきりとしないことから、厳密な意味では HuNoV の病原性発現機構解析のモデルにはならない可能性がある。

本研究では、MuNoV 感染増殖システムを用いた細胞内動態解析を行い、その結果を、リバーシジェネティクスを用いた HuNoV の細胞内動態と比較検討することで、HuNoV の感染増殖機構を研究することを目的とした。本年度は、MuNoV 感染 RAW264.7 細胞における

MuNoV の細胞内動態を解析した。

B. 研究方法

1. 材料

2002 年に東京大学大学院農学生命研究科の遠矢幸伸准教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株をウイルスとして用いた。RAW264.7 細胞は、ATCC より購入した。MuNoV S7 株の各種タンパク質、Nterminal protein, NTPase, VPg, RNA dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 は、それぞれ標的領域を大腸菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して抗 MuNoV 血清を作製した (α Nterm, α NTPase, α VPg, α RdRp, α VP1, α VP2 と表記する。)複製中間体である MuNoV2 本鎖 RNA の検出には、抗 2 本鎖 RNA 抗体 (α dsRNA MoAb) を用いた。

2. MuNoV 蛋白質検出の検出

MOI 0.01 で RAW264.7 細胞に MuNoV-S7 株を感染させ、12 時間後に固定、もしくは以後の処理を行う事で、観察に用いた。MuNoV 蛋白質とゲノム複製中間体である二本鎖 RNA の観察には、冷メタノール固定した細胞を用いた。また、MuNoV のゲノム RNA 合成を観察するためには、アクチノマイシン D 処理を行い、細胞の RNA 合成を止めた後、BrU を細胞にトランスフェクションし、MuNoV ゲノム RNA より RdRp にてトランスクリプシ

ョンされる一本鎖 RNA に BrU を取り込ませた。その後、細胞を冷メタノール固定し、抗 BrU 抗体を用いた免疫染色を行った。

細胞の免疫染色は、一次抗体に標的物特異的抗血清、もしくはモノクローナル抗体を用い、二次抗体に一次抗体を認識する蛍光物質ラベル抗体を用いた。

免疫染色した細胞の観察は、蛍光顕微鏡を用いて行い、標的蛋白質、核酸の細胞内局在の解析にはオリンパス社の DSU ユニット IX-80 デコンボリューションシステムと、ツァイス社の共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

3. 電子顕微鏡観察

感染細胞は同様に調整し、感染後12時間でグルタルアルデヒド固定し、オスミウム染色後、樹脂に包埋した。その後、薄層切片を作成し、電子顕微鏡観察に用いた。電子顕微鏡観察は、国立感染症研究所感染病理部に依頼した。

C. 研究結果

本研究において、MuNoV 感染細胞において、構造タンパク質 VP1 は、細胞質全体に顆粒状に認められたが、核周辺部にスポット状に集合していた。非構造蛋白質 VPg は、核周辺部にスポット状に認められ、VPg と VP1 の局在は、核周辺部では一致していた。また、核周

辺部のスポットには、VPg と RdRp も同様に認められた。Nterm, NTPase, VP2 も、核周辺のスポット部分に協局在が認められた。さらに、 α dRNA MoAb を用いて、2 本鎖 RNA を検出したところ、VPg と局在が非常に良く一致した。つまり、2 本鎖 RNA は、VPg とともに核周辺に大きなスポットとして認められた。BrU でラベルされた 1 本鎖 RNA は、細胞質全体にブロードに染色されたが、核周辺にスポット状にも染色された。BrU でラベルされた 1 本鎖 RNA の局在は RdRp とよく一致していた。

感染細胞の電子顕微鏡写真では、MuNoV 感染細胞は、非感染細胞に比べ細胞質に空砲状の構造物（ベジグル）が数多く認められ、その中にウイルス様の粒子が多数認められた。また、ベジグル中のウイルス様粒子の中には、ベジグル内包へ出芽するよう見られる者も存在していた。MuNoV 非感染細胞では、それらは確認されなかった。

D. 考察

MuNoV 感染細胞では、MuNoV にコードされているウイルスタンパク質が発現されており、核周辺部に認められるベジグルに局在が一致していた。ベジグルには 1 本鎖 RNA だけでなく、複製中間体である 2 本鎖 RNA が存在しており、ウイルスゲノムの複製が、核周辺のベジグルで進行していることが考えられ

た。

本年、我々は、HuNoV では、非構造タンパク質 p22 が、タンパク質の小胞体で合成されたタンパク質の輸送システムを破壊し、小胞体とゴルジ体の間、つまり核周辺部にウイルスタンパク質を蓄積させる機能があることを PLoS ONE に報告している。MuNoV でも、HuNoV と同様に核周辺部ベジグル内部と思われる構造物内部にウイルスタンパク質が蓄積する現象が観察された。MuNoV 感染細胞には、電子顕微鏡観察において、核周辺部にベジグルが多数出現し、その内部にウイルス様粒子が認められた。ポリオウイルスなどのピコルナウイルスでは、ウイルス感染細胞では、細胞質に多数のベジグルが新生され、その内部でウイルスの複製が行われていることが知られている。免疫電子顕微鏡観察で、ベジグル内部に観察されたウイルス様粒子、核周辺部に局在が認められたウイルスタンパク質がベジグル内部に存在すること等を確認する必要があるが、MuNoV もポリオウイルス同様、新生ベジグル内部でウイルス複製を行っている可能性がある。これは、類似性が認められた HuNoV でも同様だと考えられた。

MuNoV 感染細胞では、細胞内部のタンパク質の膜輸送システムが破壊され、正常な機能を失っている可能性があり、これが細胞に認められる強い CPE を誘

導していると思われた。HuNoVでも、ウイルス感染が細胞のタンパク質輸送システムを破壊することが考えられ、これが激しい胃腸炎症状と何らかの関係があるのかもしれない。

E. 結論

1. MuNoV 感染細胞において、細胞の核周辺部にウイルスタンパク質の局在を認めた。MuNoV 感染細胞の核周辺部にはベジグルの新生が観察され、その内部にウイルス様粒子が多数観察された。核周辺部にウイルスタンパク質が蓄積する現象は HuNoV の p22 タンパク質発現細胞に認められる現象と酷似しており、MuNoV, HuNoV とともに細胞のタンパク質の膜輸送システムを破壊する可能性がある。

F. 研究発表

論文発表

- (1) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Research*. [Epub ahead of print]
- (2) Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5(10) e13130, 2010.
- (3) Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases *Microbiol Immunol*. 2011.Feb; 55 (2): 108-114.
- (4) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Feb; 52 (2): 181-184.
- (5) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses.

- J. Virol. Methods. 2010
Nov;169(2):269-73.
- (6) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. Environ Sci Technol. 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
- (7) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. Microbiol Immunol. 2010 Aug;54(8):483-6.
- (8) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. J. Virol. 2010 Aug;84(16):8085-97.
- (9) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish J. Med. Virol. 2010 Jul;82(7):1247-54.
- (10) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan Appl Environ Microbiol. 2010 Apr;76(8):2461-7
- (11) Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. J. Med. Virol. 2010 Apr;82(4):720-6.
- (12) 岡智一郎, 片山和彦, 小林慎一, 飯高順子, 野田衛 “愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較” 病原体微生物情報 (IASR) Vol.

31 No. 11 (No. 369), 2010 年 11
月号 p13-p14

学会発表

- (1) Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan 16th Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Phillippines
- (2) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦. カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- (3) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦. ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合

同大会. 2010 年 12 月 7-10 日、神戸

- (4) 野田衛、片山和彦、石井孝司、岡智一郎、多田有希、山下和予、三瀬敬治、地方衛生研究所、中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦. 「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」第 31 回日本食品微生物学会総会、2010 年 11 月 11 日-12 日、滋賀
- (5) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛. 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第 31 回日本食品微生物学会総会、2010 年 11 月 11 日-12 日、滋賀
- (6) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之. サポウイルスに対する単クローン抗体の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日-9 日、徳島
- (7) 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦. 関西で同時多発的に発生し