

201225017B

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22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成25(2013)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22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成25(2013)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

ノロウイルスの感染、複製機構

片山 和彦 13

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、混合感染の解析

本村 和嗣 25

マウスノロウイルスの培養細胞での増殖馴化に伴う遺伝子配列変化の解析、
および新規ヒトポリオーマウイルスのレポーターシステムと中和抗体検定法の開発

中西 章 29

ブタB群ロタウイルスの遺伝子解析及びノトバイオート豚を利用した感染モデルの確立と病態解析

恒光 裕 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
E型肝炎ウイルスレプリコンの構築およびレプリコン包埋VLP作成の検討

石井 孝司 39

新規ヒトポリオーマウイルス、ボカウイルスの構造タンパク質発現およびその応用
ラットE型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必要な領域の同定

李 天成 45

B型肝炎ウイルスS抗原の分泌機構の研究
子宮頸癌の治療薬を目指した特殊ペプチドによるE6AP阻害剤の開発

勝二 郁夫 51

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 急性胃腸炎、小児呼吸器感染症、肝疾患等の原因因子でありながら、培養細胞での感染増殖系が確立されていない病原ウイルス群について、ウイルス様粒子(VLP)、近縁動物ウイルス、シュードビリオンなどを駆使して、ウイルス生活環に関する知見を蓄積させた。また、病態モデル、診断系の作出、阻害剤探索など感染症対策に資する基盤的知見を得た。主な研究成果は以下の通り。
ノロウイルス: ヒトノロウイルス(HuNoV)に加え、より産生効率の高いマウスノロウイルス(MuNoV)、ネコカリシウイルスのリバースジェネティクスシステムを構築。MuNoV はヒト細胞株でも感染性粒子作出に成功。MuNoV の増殖馴化に関与する遺伝子変異を同定。食中毒事例等由来の新鮮糞便検体を用いて各種培養細胞株への HuNoV 感染感受性を解析。次世代シーケンサーにより、HuNoV の混合感染の実態、ヒト-ヒト間伝播に伴う NoV 株の淘汰選択を解明。

ロタウイルス: B 群ロタウイルス(RoV)の遺伝子型分類基準を確立。ノトバイオトブタによる B 型 RoV 感染病態モデルを樹立、遺伝学的、抗原性の異なるウイルス株間での病原性の違いを見出。

ポリオーマウイルス: KIPyV, WUPyV の VLP を作製し、抗体検出系を確立、我が国健常人における抗体保有率を解析。KIPyV, WUPyV の pseudovirion を作製し中和抗体測定系を樹立。JCV, BKV, MCPyV と糖脂質糖鎖との相互作用を詳細解析。MCPyV の糖脂質糖鎖依存的な感染機構を解明。

ボカウイルス: ボカウイルス 3 種類の VLP を作製し、抗体検出用 ELISA 法を樹立。

E 型肝炎ウイルス: 新規 HEV 感染性クローンを取得。HEV 吸着侵入感受性の異なる細胞クローン種を単離。各種レポーターを有するレプリコンの構築に成功、レプリコンを VLP に包埋させる方法を樹立。ラット HEV の VLP 作製に成功、粒子形成に必要なアミノ酸領域を同定。

B 型肝炎ウイルス: HBV S 粒子の分泌効率決定基が PreS2 翻訳開始域に点在することを証明。

パピローマウイルス: 子宮頸癌特異的治療薬の開発を目指し、E6/E6AP と結合、p53 のユビキチン化を阻害する環状 N-メチルペプチドを取得。

分担研究者

片山 和彦 国立感染症研究所 室長
田中 智之 堺市衛生研究所 所長
本村 和嗣 国立精神・神経研究センター
室長
恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長
李 天成 国立感染症研究所 主任研究官
石井 孝司 国立感染症研究所 室長
中西 章 国立長寿医療研究センター 室長

勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授

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の基盤研究を包括的に行う。

B. 研究方法

1. ノロウイルス

1-1. リバースジェネティクスシステム(RGS) :

ヒトノロウイルス (HuNoV) プラスミド pKS-U201F を HEK293T 細胞へトランスフェクションし、6 時間または 12 時間にアクチノマイシン D 処理を行った。新生ウイルス粒子は、細胞を 3 回の凍結解凍後、10000g にて 20min の遠心操作で得られた上清から抽出精製した。

マウスノロウイルス (MuNoV) は、遠矢幸伸准教授 (東京大学大学院農学生命研究科) により分離された MuNoV-S7 株を用いた。MuNoV S7 株の各タンパク質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)。

pKS-U201F を骨格として、HuNoV U201 genome 部分を MuNoV genome cDNA, ネコカリシウイルス (FCV) genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pKS-MuNoVF, pKS-FCV-F を構築した。それぞれの感受性細胞 (MuNoV は RAW264.7 細胞、FCV は CRFK 細胞) を 6 well ディッシュに 70%コンフルエントになるように培養し、4ug の pKS-MuNoVF または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清を回収し、TCID50 を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量した。

1-2. MuNoV 感染モデル

MuNoV S7 株を RAW264.7 細胞で 2 代、3 代、13 代継代したウイルス材料から RNA 抽出、cDNA 合成に MuNoV 遺伝子配列を決定した。この cDNA を pKS53R MNV S7 (MuNoV S7 野生型全長含)の一部と交換した。得られたプラスミドより作製した試験管内転写物の 5' 末端に ScriptCap system (Epicentre) により Cap 構造を付加した。Lipofectamin2000 (Invitrogen) あるいは TransIT mRNA transfection kit (Takara) により 293T 細胞にトランスフェクションして組

換えウイルスを作製した。トランスフェクション後 24 時間にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させた。

1-3. 細胞培養によるノロウイルス分離 :

HuNoV 流行事例から得られた新鮮な糞便材料 (G II.4, G II.13, G I.4) を用いた。10% 乳剤化後、3,000rpm、10 分間および 8,500rpm、30 分間遠心した後、上清を 30% ショ糖液に重層し、36,000rpm、2 時間超遠心した。沈渣を PBS (-) に suspend し、ろ過後のウイルス検体にアセチルトリプシンまたはペプシンを種々の濃度で添加、インキュベートした。感染実験には、ヒト膵臓がん由来 PANC-1 細胞、ヒト大腸がん由来 CaCo-2 細胞及びヒト結腸がん由来 Co-1 細胞を用いた。

1-4. HuNoV の混合感染、周期的流行機序の解析 :

2010 年 3 月-2012 年 3 月までの 2 年間で 5 回、HuNoV 感染による胃腸炎を発症した成人女性を対象とした。糞便中の HuNoV の Capsid 遺伝子 shell 領域の 5' 末端領域の配列を次世代シーケンサー-FLX 454 (Roche) により網羅的に解析した。

種々の流行株について HuNoV 中空粒子を作出するため、組換えバキュロウイルスベクターを作製した。組換えバキュロウイルスは、カイコ幼虫、蛹へ感染させた。HuNoV 中空粒子は、カイコ幼虫体液、蛹磨砕液中より、スクロース密度勾配遠心法及び塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって精製した。

2. ロタウイルス

2-1. ブタ B 群ロタウイルス (RoV) の NSP1 及び NSP2 に関する遺伝学的解析 :

国内の 11 農場より採取した B 群 RoV 陽性ブタ糞便 28 検体のうち、PB-93-I5 および PB-107-G16 株について single primer amplification 法により NSP1 および NSP2 遺伝子の全塩基配列を決定した。次いで、それら 2 株の塩基配列を基に特異的プライマーを設計

し、残りの株について RT-PCR 法で遺伝子検出を行った。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を決定した。

2-2. ノトバイオートブタを用いた B 群 RoV 感染実験：

RoV の主要構造蛋白質である VP6 に関して、遺伝学および抗原学的に相違が認められたブタ B 群 RoV 2 株（前述）をそれぞれノトバイオート豚（3 日齢）に同量経口接種した。接種 1 日後から経時的に腸管および主要臓器を採取し、ウイルス学的検査および病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査では、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて両株間における病原性の相違を比較解析するとともに、他のロタウイルスとの病理組織学的な相違についても比較解析した。

3. ポリオーマウイルス

3-1. ウイルス様粒子の作製：

各ポリオーマウイルス (JCV, BKV, MCPyV, WUPyV, KIPyV) の構造タンパク質 VP1 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。形成され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。

3-2. psudovirion によるポリオーマウイルス感染モデル：

研究分担者中西が開発した psudovirion system により、各ポリオーマウイルス（前述）のカプシドをもつ psudovirion を以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin を

ターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。

4. ボカウイルス

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、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、VLP 形成を透過型電子顕微鏡観察等で解析した。精製粒子を抗原とした抗体 ELISA を確立し、健常人における感染状況を調査した。精製 VLP をウサギに免疫して HBoV, HBoV2, HBoV3 の抗原性を比較した。

5. E 型肝炎ウイルス

5-1. E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染細胞系：

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。そのため、single cell cloning を行い、得られた多数の細胞株について HEV の感染増殖性を Real-time PCR 法および ELISA 法で解析した。

5-2. HEV レプリコンの構築：

HEV の感染性クローン 83-2 の構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換した cDNA を作製し、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA を合成した。本 RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコン RNA を導入することで、構造蛋白中にレプリコン RNA が包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

5-3. ラット HEV の粒子形成解析

ラット HEV (GU345042) の構造蛋白をコードする ORF2 cDNA を合成した。N あるいは C 末端領域、さらに両末端を部分欠失したラット HEV 構造蛋白遺伝子を PCR で増幅して組換えバキ

ユロウイルスを作製し、前述と同様に粒子形成の有無およびその形状を電子顕微鏡で観察した。

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、溝上センター長より供与)のPreS1, PreS2, S領域の変異体を作製し、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抗原分泌効率をELISA法で解析した。

7. ヒトパピローマウイルス

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、mRNA 鋳型依存的に天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で E6AP の HECT ドメインに結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅教授との共同研究)。得られた特殊ペプチドの E6AP 阻害活性を Prx1 および p53 を基質にして in vitro ユビキチン化アッセイで評価した。ユビキチン経路の構成蛋白質を得るために、His₆-E1, MEF-E6AP を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Hi5 細胞に感染させ、各組換え蛋白質を発現した。細胞から Ni-NTA または FLAG-beads で各蛋白質をアフィニティ精製した。His₆-UbcH7 を大腸菌 BL21 (DE3) で、GST-11E6, GST-16E6 を大腸菌 DH5α で発現し、Ni-NTA または精製した。これらの組換え蛋白質を用い、HPV E6 蛋白質の in vitro ユビキチン化を解析した。

(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た。ヒト由来臨床材料の使用にあたっては、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

続きを行い、承諾を得た上で実施した。提供試料、個人情報 は 厳格に管理保存されている。

C. 研究結果

1. ノロウイルス

1-1. MuNoV 感染モデルの確立と増殖機構の解析：

MuNoV 感染後 6 時間ほどで細胞内に非構造タンパク質が発現し、その後、構造タンパク質の発現が認められた。感染後 6 時間から培養上清中のウイルス RNA タイターが上昇し、48 時間後まで上昇は続いた。以上から、ウイルスの増殖サイクルは 6~8 時間であることが明らかとなった。MuNoV の RNA 複製中間体は複製複合体とともに感染初期に細胞質全体に広がるが、感染 6 時間後には、複製複合体とともに核周辺に共局在した。MuNoV の RNA 複製中間体には N-terminal protein, VPg, RNA polymerase の他に構造タンパク質と考えられていた VP2 が含まれていた。さらにウイルス粒子にパッケージされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子を構成する構造タンパク質 VP1 と細胞周辺部に移動し、共局在することが明らかになった。

1-2. HuNoV の RGS：

HuNoV の RGS において、プラスミドからの mRNA の合成をアクチノマイシン D によって停止させ、MuNoV で観察された、ウイルスタンパク質による自己制御を誘導した。トランスフェクション後 12 時間でのアクチノマイシン処理では、新生ウイルス粒子の精製画分に新生ウイルス粒子は認められなかったが、6 時間でのアクチノマイシン処理では、電子顕微鏡観察により、ウイルス粒子が確認された。T75 フラスコ 1 枚から、電子顕微鏡で観察可能なレベルのウイルス粒子産生に成功した。アクチノマイシン処理を行わない場合、電子顕微鏡で粒子を確認するためには、T225 フラスコ 20 枚の培養細胞が必要である。本年度の研究により、HuNoV のリバーシジェネティクスにおいて、225 x 20/75=60 倍のウイルス産生効率の向上に成功した。

1-3. MuNoV、FCV の RGS を利用した増殖機構の解析：

HuNoV と全く同様の MuNoV のリバーシジェネティックシステムを構築することができた。MuNoV のリバーシジェネティックシステムは、感受性細胞であるマウス RAW264.7 細胞は勿論、ヒト細胞株 HEK293T を用いて muNoV の感染性粒子を作出することが可能であった。

さらに、樹立した RGS が、HuNoV、MuNoV だけでなく、カリシウイルスに対するユニバーサルなシステムとなり得るか否かを検証するため、FCV のゲノム全長をクローニングし、pKS-FCV-F を作製、同様の検討を行った。pKS-FCV-F は感受性細胞へのトランスフェクションによって 10^8 TCID₅₀/mL 以上の感染性ウイルス粒子を産生した。非感受性細胞 HEK293T へのトランスフェクションでは、48 時間後に 10^{1-2} TCID₅₀/mL のウイルスを産生したが、ウイルス産生量は MuNoV の 1/10-1/100 程度であった。電子顕微鏡観察で HEK293T から産生されたウイルス粒子が確認された。このウイルス粒子は、中和抗体で中和可能であった。

1-4. MuNoV の増殖馴化に伴う遺伝子配列変化の解析

MuNoV が培養細胞で増殖馴化する過程を解析した。MuNoV S7 株を RAW264.7 細胞で 2 代、3 代、13 代継代し、ウイルス遺伝子の配列変化を詳細に調べた所、増殖馴化の過程では、元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列へ収束することが観察された。この遺伝子変化には細胞内増殖に適したゲノム配列が選択と、特定の配列の adaptive mutation が関与していることが示唆された。RAW264.7 細胞への馴化配列の中で MuNoV 6158 位のチミン(T)をシトシン(C)に変異させた組換え MuNoV を RAW264.7 細胞に感染させ、増殖したウイルスの配列をみると同位がチミン

(T)に戻ったもののみ検出された。他の変異ではこの様なリバータントはみられなかったため、MuNoV nt6158 の C から T への変異 (Vp1 aa301 T から I へ)は RAW264.7 細胞での MuNoV S7 株の増

殖に必須であることが示唆された。

1-5. 細胞培養によるノロウイルス分離：

11 種の細胞株に HuNoV 検体を接種し経時的観察を行った。保存状態の違った便検体、感染ウイルス量、ウイルス材料のトリプシン前処理の必要性等を検討した。RD 細胞に HuNoV GI.4 を接種した場合に CPE 変化様に見える変性細胞が存在したが蛍光抗体法で HuNoV 陽性所見は見られなかった。いずれの場合もウイルス遺伝子量は二週間を超えて消失した。消化系酵素によるウイルスの感染性向上の可能性を考えトリプシン、ペプシン処理を試みた。しかし、ウイルス増殖の目安となる細胞変性効果はいずれの実験条件下でも見られなかった。培養上清中および細胞内の HuNoV 遺伝子量を測定したが、継代培養において遺伝子レベルは減少の一途であった。Coα-1 細胞への GII.4 検体の接種例において、封入体様の構造が蛍光抗体法で観察された。

1-6. HuNoV 感染症における宿主応答と周期的流行機序の解析：

ダイレクトシーケンシング法で1感染者から1つのゲノム全長の配列情報を得た。幼児は ORF1がGII.12、ORF2-3がGII.3のキメラウイルス、母親はGII.4の2006亜株であり、遺伝子型が不一致であった。キャプシド遺伝子シエル領域の網羅的な遺伝子解析の結果、幼児では、得られた配列のうちGII.3が99.9%を占めており、GII.4が0.02%、GII.2が0.004%検出された。一方、母親では、GII.4が67.6%、GII.2が32.3%、GII.3が0.005%検出された。(v) 母子間で配列の検出割合は異なるが、検出された各遺伝子型の配列はほぼ一致していた。

2006年以降、遺伝情報の異なる8種類のGII.4亜株が日本で流行したことがわかっている。このうち5種類の2004/05亜株、2006a亜株、2006b亜株、2007a亜株、2009a亜株のVLP作製は成功した。2008a亜株のVLPは作製できなかった。

1-7. HuNoV 混合感染の解析：

2年間に亘ってHuNoVに5回感染した症例を使って混合感染の解析を行った。合計186869断片、約 4.75×10^7 塩基の配列情報を取得した。配列情報を詳細に解析した結果、1年以内に、頻回に、GII.2_GII.15、GII.4 2006b亜株に感染していたことが明らかとなった。臨床症状は、一回目感染時は、発熱、嘔吐、下痢の典型的急性胃腸炎症状を呈したが、二回目以降、症状は軽減傾向であった。しばしば異なる遺伝子型のノロウイルスが混合感染していることがわかった(3/5症例)。明らかなキメラウイルスは検出できなかった。

2. ロタウイルス

2-1. ブタB群RoVのNSP1及びNSP2に関する遺伝学的解析：

ブタB群RoV 15株のNSP1遺伝子は他の動物由来B群RoVと同様に、2つのORF領域(ペプチド1および2)を有した。NSP1ペプチド1および2アミノ酸配列の一致率はブタB群RoV株間と既知の他動物由来株との間で大きく異なった。一方、NSP2タンパク質のアミノ酸配列の比較を行った結果、全ての株で共通するヒスチジン領域がC末端部保存されていた。系統樹解析の結果、NSP1ペプチド1および2は共に由来動物種で明確に区別され、それぞれ7つの遺伝子型に分類された。特に、ブタB群RoV株はそれらの遺伝的多様性を反映していずれも3遺伝子型に分類された。NSP2はブタB群RoV株は3遺伝子型に分類された。

2-1. ノトバイオートブタを用いたB群RoV感染実験：

B-93-I5およびPB-107-G16株接種群ともに、全ての個体で水様性下痢が認められ、特に107-G16株接種群では極度に衰弱する個体も認められた。いずれの株接種群ともに、接種後1日より、特に空腸で絨毛萎縮が認められた。107-G16株接種群では絨毛萎縮に加えて、粘膜上皮細胞の壊死・脱落や合胞体形成といった特異的な病変が十二指腸から空腸にかけて進行的に観察された。一方、93-I5接種群では接種後2

日からすでに萎縮した絨毛の回復が観察された。

電子顕微鏡的検査において、107-G16株接種群では接種後1日の十二指腸および空腸で、93-I5株接種群では接種後2日の空腸でそれぞれウイルス粒子が観察され、それらは特に合胞体内部、絨毛の先端部及び頸部に存在していた。

本実験に用いた両株は遺伝学的相違に加えて、病原性においても顕著な相違を示すことが明らかとなった。

3. ポリオーマウイルス

3-1. VLPの作製と抗体検出系の樹立：

WUPyVまたはKIPyVのVP1組換えバキュロウイルスをSf9, Tn5細胞へ感染させ3日後にVP1タンパク質を検出した。しかしその発現レベルはこれまでのポリオーマウイルス(JCV, BKV, MCPyV)に比べかなり低かった。感染細胞の培養上清からは41と39kDaのタンパク質が得られた。41kDaタンパク質は 1.30 g/cm^3 分画に分布し、直径約50nmの球形粒子が観察された。39kDaタンパク質は 1.29 g/cm^3 分画に分布し、直径約22nmから50nmまで数種類の直径の異なる粒子が存在した。KIPyV-LPを用いて抗体検出ELISAを開発し我が国の健常人におけるKIPyVに対する抗体保有率を調査した。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53%が抗体を有することが明らかとなり、乳幼児の約20%でKIPyV感染歴を有する可能性が示された。

3-2. 新規ヒトポリオーマウイルスの感染増殖系探索にむけたpsudovirionシステムの開発：

pCMV-Gluc2をパッケージするWUPyV、KIPyV psudovirionを、それぞれ15cmディッシュ20枚分の293T細胞から作製、精製した。SDS-PAGE/銀染色から、Vp1(~40Kd)、Vp3(~30kDa)、ヒストンコアタンパク質(~20kDa)が認められた。各バンドの濃さとおおよその予想されるDNAコピー数とは矛盾しない比率であった。293T, TC7, Vero細胞についてpsudovirionの

導入効率を比較した。293T, TC7 への導入では SV40 pseudovirion には及ばないものの、WUPyV、KIPyV 共にいずれの細胞にも与えたコピーDNA 量の増加に沿ってシグナルの増加が検出された。一方、Vero 細胞への導入では、WUPyV、KIPyV pseudovirion による pCMV-Gluc2 の導入は SV40 pseudovirion によるものとほぼ同程度の Gluc 発現誘導がみられ、WUPyV、KIPyV は Vero 細胞で比較的よく感染できる可能性が示唆された。

3-1. 新規ポリオーマウイルスの中和抗体検出法の開発：

WUPyV、KIPyV の pseudovirion を大量に作製・精製した。pCMV-Gluc2 をパッケージする WUPyV、KIPyV pseudovirion を、それぞれ 15cm ディッシュ 10 枚分の 293T 細胞から作成し、2 回の 27-39% Optiprep 密度勾配遠沈によって分画精製し、そして pseudovirion を含むフラクションを Amicon Ultra 15 (MWC0 100kDa, Millipore) で濃縮した。Vero 細胞あたり 1,000 コピーDNA にあたる WUPyV、KIPyV pseudovirion を導入し、同時にヒト血清 (Sigma-Aldrich, H4522) あるいはウサギ血清の希釈系列を加え、48-60 時間後に細胞上清の Gluc の活性を測定した。この結果、WUPyV、KIPyV 共にヒト血清添加区で 1/40 希釈で Gluc の活性の低下が観察され、ヒト血清による感染阻害と考えられる効果がみられた。一方ウサギ血清では、同様の阻害効果はみられなかった。

3-2. 糖脂質糖鎖を介したヒトポリオーマウイルス感染様式の解析：

BKV、JCV、MCPyV の各 capsid 蛋白 VP1 をバキュロウイルスで発現させポリオーマウイルス VLP (BKV-LP、JCV-LP、MCPyV-LP) を作製、精製しシアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドとの結合解析を行った。その結果、BKV-LP と JCV-LP は 2 残基以上のシアル酸を有する GD1a、GD1b、GD2、GD3、GT1a、GT1b、GQ1b と高親和性を示すなど、よく似た性質を有することが示されたが、シアル酸を 1 残基しか持たない GM1、GM2 は JCV-LP のみと結合した。一方、MCPyV-LP

はこれらと異なり、一連の糖脂質のうち GM3、GD3 のみとの結合が認められた。メルケル細胞癌組織では、ガングリオシドのうち、GM3、GD3 を高発現するとの報告があり、MCV 感染の組織特異性を規定する要因となる可能性が考えられる。

さらに、SV40 をベースにしてポリオーマウイルス capsid 蛋白を交換できる pseudovirion を利用して MCPyV の感染モデルの作出を試みた。作製した MCPyV VP1 を持つ pseudovirion は、マウスメラノーマ細胞 MEB4 に対して感染性を示し、そのガングリオシド欠損変異株 GM95 には感染しなかった。一方、GM95 細胞にあらかじめ GD3 を添加しておいた場合、MCV pseudovirion は感染性を示すことが見出された。

4. 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 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。

5. E 型肝炎ウイルス

5-1. HEV 感染細胞系：

全長 HEV 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 (ORF2、キャプシド蛋白) 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。それぞれの細胞に HEV 83-2 株を接種し、約 2 ヶ月間培養を行い、培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ、一部の細胞株は 2 ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず、HEV が感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。

5-2. HEV レプリコンの構築：

HEV 感染性クローンの構造蛋白遺伝子 (ORF2 領域) をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の upstream に HCV IRES を挿入しなかった場合、また、HCV IRES を持つ場合にも Luciferase をレポーターとした場合には複製活性を認めなかった。サイズが小さい SecNanoLuc (分泌型の Luciferase) をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した。

HEV 構造蛋白を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作製した。その中には構造蛋白の分泌が比較的良好なクローンがあった。これらの細胞クローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。上記のフラクションを RNase A 処理後に RNA を抽出し、構造、非構造蛋白それぞれの領域の RT-PCR を行っ

たところ、本フラクションの RNA は RNase A 抵抗性であり、構造領域のみが PCR で増幅されたことから、レプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された。

5-3. ラット HEV の粒子形成解析

組換えバキュロウイルス発現システムを用いてラット HEV の構造蛋白を発現し、VLPs の作製に成功した。N 末端から 12 個のアミノ酸を欠失し発現させることによってバキュロウイルス感染細胞内から直径約 23nm の中空粒子と 35nm の非中空粒子を得た。35nm の粒子はネイティブな HEV と形態が類似し、粒子内にはウイルス RNA が取り込まれていた。また、N 末端から 100 個のアミノ酸を欠失させた上に、C 末端から 593 番目まで 52 個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなくなった。したがって、粒子形成には C 末端は 593 番目のアミノ酸まで必要であることが明らかとなった。

6. B 型肝炎ウイルス

HBV-Aeus 株 pSV-AAA, HBV-Cat 株 pSV-CCC および PreS1, PreS2, S 領域を組換えた変異体プラスミド pSV CCC-MT1 から pSV CCC-MT13 まで作製した。HBsAg の上清中への分泌量は pSV-AAA と比較して pSV CCC-MT9, pSV CCC-MT13 が最も高値となり、day 4 で約 80ng/mL と pSV-AAA の 2 倍、genotype C の pSV-CCC の約 4 倍まで分泌効率が向上していた。Aeus 株 PreS2 では ATGCAGTGAAT (MQWN), CAT PreS2 では ATGCAATGGAAC (MQWN), CAT PreS2-MT9 では ATGCAACTCCAC (MQLH), CAT PreS2-MT13 では ATGCAGTGAAC (MQWN) という配列になっており、同義置換でも分泌効率に差があることから、開始コドン周囲の塩基配列が分泌効率に関与する可能性が示された。

7. ヒトパピローマウイルス

HPV 感染に起因する子宮頸癌の特異的治療薬の分子基盤の構築を目指し、HPV16E6/E6AP に

よる癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発および E6 のユビキチン化機構の解析を行った。RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを 8 種類得た。その中から、環状 N-メチルペプチド CM₁₁-1 および CM₁₁-1S が E6AP のユビキチンリガーゼ活性を強く抑制することを明らかにした。また、E6 のユビキチン化機構の解析から、in vitro において E6AP が HPV11 および HPV16 の E6 のユビキチン化させることを示した。

D. 考察

1. ノロウイルス

株化細胞を用いた HuNoV の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、近縁の MuNoV の感染増殖系におけるウイルスタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、HuNoV の RGS との比較検討を行った。

MuNoV は、感染後の時間経過に応じて、発現するウイルスタンパク質の局在が変化していた。このことは、MuNoV の自然感染、複製増殖では、新生されたウイルスタンパク質が、新生 mRNA の転写、ORF1 タンパク質の転写などを自己制御していることを示唆した。つまり、ウイルス自身が複製の行程を制御し、さらに宿主細胞のタンパク質輸送などもコントロール下に起き、効率の良い自己複製を行っている可能性がある。HuNoV の RGS では、通常、断続的に新生 mRNA がプラスミドから供給される。本研究では、プラスミドからの新生 mRNA の合成を一定時に停止させ、HuNoV の自然感染を模倣することを試みた。その結果、トランスフェクション後 6 時間に RNA 依存的 RNA 合成を停止されることにより、非制御時に比べ約 60 倍の新生ウイルス粒子産生が認められた。また、HuNoV においてもウイルスの複製サイクルは 6 時間以上、12 時間未満であると考えられた。

片山らが開発した pKS ベクターによるノロウイルス、カリシウイルスの RGS は、非感受性細

胞から感染性粒子を作出することが可能であることが明らかとなった。このシステムは、ウイルス表面のレセプター結合部位を入れ替えたキメラウイルス作製、ディフェクティブなワンステップ感染性粒子作製 HuNoV, MuNov, FCV とのキメラウイルスの作製など、新たな遺伝子操作による感染性粒子構築を可能とするとともに、GFP, VENUS などの蛍光レポーターを組み込み、細胞の挙動観察を行うなど、多面的な応用が可能である。HuNoV の推定上のレセプター結合部位を MuNoV のレセプター結合部位と入れ替えた感染性粒子を作出することによって、マウス感染モデルを樹立することが可能になるものと期待される。

HuNoV はヒトの小腸で増殖する。つまり、ヒト小腸細胞に HuNoV に対する受容体が存在していると考えられる。従って、ウイルス分離に用いる培養細胞としてはヒトの腸管由来細胞が適当と考えられる。しかし、これまで CaCo-2 等のヒト腸管由来細胞を用いた HuNoV 分離の試みは不成功であった。細胞への HuNoV 吸着にはヒト血液型物質が大きな役割を果たしているという数多くの報告がある。また、分泌型物質陽性の場合、HuNoV に感染しやすいという報告もある。細胞への HuNoV 吸着に関する詳細な分子生物学的解析と各細胞株についての血液型物質発現、分泌性などの解析が必要と思われる。

HuNoV は、免疫応答、周期的流行機序は十分に明らかにされていない。家族内感染が想定される症例における HuNoV GII 準種の実態について解析した。親子間で亜株、遺伝子型の種類と頻度が異なっていたことから、複製能と免疫逃避能に優れたウイルスが、ヒト個体内で優位に存在することが示唆された。また、ヒトは 1 年間に何回もノロウイルスに感染することが示唆された。感染した 3 回の主要な遺伝子型、亜株は、異なっていた。抗体の交差反応が期待できない可能性がある。ノロウイルスがヒト-ヒト間で感染する場合に、ウイルス粒子の安定性、ウイルスの複製能、ウイルスの病原性、免疫淘汰圧からの逃避能、何れかの因子に優位性のあ

るウイルスが選択されて、ヒト集団内で感染拡大する可能性がある。

HuNoV 混合感染の実態を解明するため、次世代シーケンサーを用いて網羅的にウイルス遺伝子解析を行い、感染者には、しばしば異なる遺伝子型の HuNoV が混合感染していること、不顕性感染時にも混合感染が認められることがわかった。今後、カプシド蛋白質から成る HuNoV-LP を用いて、様々な遺伝子型の VLP に対する糞便試料中の IgA 抗体を測定することにより、混合感染下において免疫系によってウイルスが淘汰される実態がより明らかになるものと期待される。

MuNoV が培養細胞で増殖馴化する過程を解析した。MuNoV S7 型の RAW264.7 細胞への増殖馴化の過程で、ゲノム遺伝子配列の変化がみられ、その変化は元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列への収束を伴うものであると考えられた。今後は、次世代シーケンサーなどの利用によって RAW264.7 細胞継代に伴うより詳細な遺伝子プールの変化を解析することにより、MuNoV の細胞馴化の過程の全容を明らかにすることが必要である。これらの知見は HuNoV の細胞培養系開発への糸口となることが期待される。

2. ロタウイルス

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。遺伝学的性状や病原性等に関してほとんど未解明なブタ B 群 RoV について、宿主の免疫制御に関わる NSP1 遺伝子および複製時のヌクレオチドのホメオスタシスに関わる NSP2 遺伝子の塩基配列を国内外を通じて初めて解読した。NSP1 および NSP2 共に、ブタ B 群 RoV 株間と既知の他動物由来 B 群 RoV 株との間でアミノ酸配列の一致率はそれぞれ大きく異なったことから、遺伝的に極めて多様であることが示唆された。

ノトバイオートブタによる感染実験から、PB-93-I5 株と PB-107-G16 株は遺伝学的および抗原学的相違に加えて、病原性においても顕著な相違を示すことが明らかとなった。小腸組織

内における B 群 RoV の分布と病理組織学的特徴が明らかとなった。また、ノトバイオート豚は本ウイルスの病原性を探究する上で好適なモデル動物であることが示された。

3. ポリオーマウイルス

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて種々のポリオーマウイルスの VLP の作製に成功した。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立し、血清疫学解析法を確立した。この方法を利用して、呼吸器疾患患者における IgM 抗体の推移などの血清疫学解析を詳細に行うことにより、ヒトポリオーマウイルス感染に起因する疾患を明らかにすることが期待される。

WUPyV, KIPyV psudovirion を使用して Vero 細胞への pCMV-Gluc2 導入の際、ヒト血清存在下で感染（遺伝子導入）阻害効果を観察することができた。ヒト血清中の中和抗体価を因ることによって WUPyV, KIPyV の感染病理に関してより詳細な検討を加えることが可能になった。psudovirion 作製系の改良などでより鋭敏な中和抗体検定系の確立が可能になるものと思われる。

4. 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。今回、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。

5. E 型肝炎ウイルス

HEV の感染性クローンを取得することができ

たため、本クローンを用いた RGS の実験を行うことによって、HEV の感染性を規定するウイルス要因、さらに、ウイルス複製の分子機構が明らかになる者と期待される。

PLC/PRF/5 細胞のサブクローニングの HEV 感受性を調べ、感受性株、非感受性株を複数クローニングすることができた。また、これらの株に HEV が感染できない原因は、細胞内での HEV 複製ができないためではなく HEV の細胞への吸着、侵入過程に問題があるためであることが解析結果から示唆された。これらの細胞株を解析することにより、感染性を規定する宿主側因子が見出されるものと期待される。

HEV のレプリコンの構築に成功した。また、PLC/PRF/5 細胞に構造遺伝子発現プラスミドとレプリコン RNA を導入することにより、レプリコンを包埋した粒子を取得できる可能性が示唆された。本レプリコンやレプリコンを包埋した粒子は、HEV の感染、増殖過程の解析や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

先進国においても、E 型肝炎はすでに土着していて、人畜共通感染症として注目されている。最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型の HEV は続々発見されていたが、これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序および抗原性、病原性は未だに明らかではない。本研究では、組み換えバキュロウイルスを利用してラット HEV の粒子形成解析を行った。N 末端から 12 個のアミノ酸を欠失した rat HEV ORF2 の発現によってネイティブな HEV と類似する直径を持つ粒子の作製に成功した。ウイルス様粒子形成には ORF2 C 末端 593 番目アミノ酸まで必須であることが明らかになった。これらの結果は rat HEV 粒子の三次構造解析に有用である。また、大きな粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、rat HEV のパッケージングに関する情報が得られることが期待される。

6. B 型肝炎ウイルス

HBV genotype A の HBV-Aeus 株は genotype C の HBV-Cat 株に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に

高い。分泌効率が異なるクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較したところ、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示された。そこで、更に詳細に解析するために 13 種類の変異プラスミドを作製し、HBs 抗原分泌効率を比較検討した。その結果、preS2 の遺伝子配列の違いで S 抗原の上清への分泌量が著しく変化することが判った。

MT9(ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)では preS2 の開始コドンより下流の+7-+10 位に変異が導入されており、この変異により pSV-CCC と比較して約 4.4 倍まで分泌量が向上した。また、MT13(ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAC)では+6 位へのひとつの塩基置換のみで分泌効率が約 4.2 倍に向上した。この二種類の変異を組み合わせると更に向上するかどうか更に検討すれば、高効率の分泌系を樹立できる可能性が示された。

7. ヒトパピローマウイルス

HPV に持続感染している患者に対する特異的な抗ウイルス薬は未だ存在しない。RaPID system で環状 N-メチルペプチドを作製する技術は E3 リガーゼ阻害剤を作製するのに強力な技術となることが初めて示された。HPV 11E6, 16E6 のユビキチン化反応が E6AP により促進されることが示された。近年、16E6 の脱ユビキチン化酵素として USP15 が同定されたが、今回樹立した *in vitro* ユビキチン化系と精製 USP15 を用いることで、USP15 の活性測定、阻害剤探索に応用可能であると考えられた。

E. 結論

急性胃腸炎、小児呼吸器感染症、肝疾患等の原因因子でありながら、培養細胞での感染増殖系が確立されていない病原ウイルス群について、ウイルス様粒子、シュードビリオン、近縁動物ウイルスモデルなど種々の新規技術、実験ツールを開発、取得した。今後、これらを駆使して、ウイルス生活環、病態発現の分子機構解析、血清疫学的解析、更に、診断・予防・治療法

の開発研究の進展が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

「研究成果の刊行に関する一覧表」を参照のこと

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

ノロウイルスの感染、複製機構

分担研究者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	室長
研究協力者	下池 貴志	国立感染症研究所	ウイルス第二部	主任研究官
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	研究員
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第二部第一室	非常勤職員

研究要旨 ヒトノロウイルス (HuNoV) の複製機構研究のため、近縁のマウスノロウイルス (MuNoV) のタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、自然な MuNoV 感染増殖と HuNoV のリバーシジェネティクスシステムとの比較検討を行った。MuNoV の RNA 複製中間体、複製複合体の経時的な細胞内局在の変化とともに感染初期に細胞質全体に広がるが、感染 6 時間後には、複製複合体とともに各周辺に移動し共局在することが明らかになった。さらにウイルス粒子にパッケージングされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子を構成する構造タンパク質 VP1 と細胞周辺部に移動し、共局在することが明らかになった。MuNoV の RNA 複製中間体には N-terminal protein, VPg, RNA polymerase の他に構造タンパク質と考えられていた VP2 が含まれていた。更に、HuNoV と全く同様の MuNoV ののリバーシジェネティクスシステムを構築した。MuNoV のリバーシジェネティクスシステムは、感受性細胞であるマウス RAW264.7 細胞は勿論、ヒト細胞株 HEK293T を用いて muNoV の感染性粒子を作出することが可能であった。

A. 研究目的

本研究は、培養細胞で増殖させることのできないヒトノロウイルス (HuNoV) を研究対象とし、培養細胞を用いた効率の良い HuNoV 増殖システム構築を行うことを目的としている。我々の構築した HuNoV のリバーシジェネティクスシステムは、プラスミドに組み込んだ HuNoV の cDNA をほ乳類細胞に導入し、HuNoV ウイルスゲノムが内包されたウイルス粒子を産出することが可能である。しかし、電子顕微鏡で粒子を確認するには、225cm² の培養フラスコ 20 枚ほどのスケールを必要とする。HuNoV は、通常、感染者の糞便中に 10⁵⁻⁹ 乗/g 程度の濃度で含まれており、自然宿主であるヒト体内では、非常に効率よ

く増殖していると考えられる。

初年度は、HuNoV がどのように細胞内で増殖し、自然な増殖がリバーシジェネティクスシステムとどのように異なるのかを調べるため、培養細胞で増殖させることが可能な、マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内動態を調べた。2 年目は、MuNoV のタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、自然な MuNoV 感染増殖と HuNoV のリバーシジェネティクスシステムとの比較検討を行った。最終年度は、MuNoV やネコカリシウイルス (FCV) のリバーシジェネティクスシステム (RGS) を構築し、自然な感染増殖との比較検討を行うことを目的とした。

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。マウスRAW264.7細胞、ヒトHEK293T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 dRNA 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. HuNoVのRGS

T75フラスコにHEK293T細胞を70%コンフル

エントになるように培養し、40ugのHuNoV pKS-U201F(リバースジェネティックスに用いるプラスミドコンストラクト)をトランスフェクションした。トランスフェクションから6時間後、または12時間にアクチノマイシンD処理を行い、さらに24時間後にフラスコごと -80°C で凍結した。細胞並びに細胞上清に含まれる新生ウイルス粒子は、3回の凍結解凍後、10000gにて20minの遠心操作で得られた上清から、以下の操作で抽出精製した。

新生ウイルスの抽出精製は、上記操作で得られた上清を、SW32Tiローターにより31000rpm, 3時間の遠心を行い、ペレット得た後、ペレットをCsCl浮上密度勾配遠心にかけて、密度 $1.36\text{--}40\text{g/cm}^3$ のフラクションを回収することで精製した。

4. MuNoV, FCVのRGS

HuNoV pKS-U201Fを骨格として、HuNoV U201 genome部分をMuNoV genome cDNA, FCV genome cDNAにInFusion cloning systemを用いて置き換え、pKS-MuNoVF, pKS-FCV-Fを構築した。それぞれの感受性細胞(MuNoVはRAW264.7細胞、FCVはCRFK細胞)を6wellディッシュに70%コンフルエントになるように培養し、4ugのpKS-MuNoVFまたはpKS-FCV-Fをトランスフェクションした。上清を回収し、TCID50を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス粒子量を定量した。

HEK293T細胞は、6wellディッシュに70%コンフルエントになるように培養し、4ugのpKS-MuNoVFまたはpKS-FCV-Fをトランスフェクションした。上清に含まれる感染性ウイルス粒子量はTCID50を測定することで定量した。

電子顕微鏡観察に用いた新生ウイルス粒子は、T75フラスコ10本分のHEK293T細胞を用いて、調整した。トランスフェクション後48時間の培養上清を回収し、10000gにて20minの遠心操作で得られた上清から、以下の操作で精製した。

上記操作で得られた上清を、SW32Tiローターにより31000rpm, 3時間の遠心を行い、ペレ

ット得た後、ペレットを CsCl 浮上密度勾配遠心
にかけ、密度 1.36-40g/cm³ のフラクションを回
収することで精製した。

5. 電子顕微鏡観察

感染性粒子は、前述の操作で回収したフラク
ション全量を DW で 10 倍に希釈し、SW55Ti ロータ
ーにて 3600rpm, 3 時間の遠心を行ってペレット
として回収した。その後、50ul の DW に再懸濁し、
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、酢酸ウ
ラン染色を用いたネガティブ染色で行った。

C. 研究結果

マウスノロウイルスは、感染後 6 時間ほどで、
細胞内に非構造タンパク質が発現し、その後、
構造タンパク質が発現が認められる。また、ウ
イルスの増殖を培養上清のリアルタイム RT-PCR
でモニターしたところ、感染後 6 時間からウイ
ルス RNA タイターが上昇し、48 時間後まで上
昇が続くことから、ウイルスの増殖サイクルが 6~8
時間であることを昨年明らかにした。本年度は、
感染後 13 時間で感染細胞を固定し、免疫染色に
用い RNA 複製複合体を観察した。Nterm, NTPase,
VPg, RdRp とウイルス RNA 複製中間体である
double stranded RNA は、細胞の各周辺部に大
きなドット上の構造物を形成し、複製複合体と
して存在していた。興味深い事に、構造タンパ
ク質 VP2 も共局在していた。ウイルス粒子にパ
ッケージングされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子
を構成する構造タンパク質 VP1 と細胞周辺部で、
共局在していた。VPg, VP2 は、細胞周辺部では
検出できなかった。

MuNoV の自然な感染動態と RGS による MuNoV
タンパク質の細胞内動態を比較検討し、HuNoV
の RGS にフィードバックするため、MuNoV の RGS
用プラスミド pKS-MuNoV-F を構築し RGS の検証
を行った。MuNoV 感受性細胞である RAW264.7 に
pKS-MuNoV-F をトランスフェクションし、48 時
間後に上清を回収して感染性ウイルス産生の有
無を確認したところ、10⁶TCID₅₀/mL の感染性ウ
イルス粒子濃度を示した。

HuNoV の RGS では、トランスフェクション後
6 時間でアクチノマイシン D を加えることでプ
ラスミドからの RNA 供給を完全に停止させ、
HuNoV の自然感染を模倣すると、非制御状態の
約 60 倍の新生ウイルス粒子産生効率の向上が
認められた。そこで、感染性ウイルス粒子産生
効率の向上を目指し、MuNoV の RGS でも同様の
制御を試みた。RAW 細胞はアクチノマイシン D
処理により致命的なダメージを受け、上清への
ウイルス放出が完全に停止することが明らか
になった。

HuNoV では、感受性培養細胞がないため、
HEK293T 細胞、COS7 細胞などを RGS に用いて、
新生粒子産生を行っている。MuNoV においても
これらの非感受性細胞で新生粒子産生が可能
で有り、かつ、それらが感染性を有するかどう
かを検討した。HEK293T 細胞に pKS-MuNoV-F を
トランスフェクションし、24 時間後、48 時間
後、72 時間後に細胞上清を回収して、細胞上
清中に含まれる感染性ウイルス粒子量を測定
した。24 時間後は 0-10 TCID₅₀/mL、48 時間後、
72 時間後では 10³~10⁴ TCID₅₀/mL の感染性ウ
イルスが認められた。上清に含まれるウイルスは、
MuNoV に対する中和血清で中和可能であった。

トランスフェクション後 48 時間と 72 時間
ではウイルス量の差が認められなかったため、48
時間後に上清を回収し、上清中に含まれる感
染性ウイルス粒子を電子顕微鏡で確認した。T75
フラスコ 10 枚分の上清から、前述の精製方法
に従ってウイルスを精製し、電子顕微鏡で粒子
を確認したところ、RAW で増殖させたウイルス
と同様の粒子が確認された。これらの感染性粒
子が、HEK293T 細胞に感染できるか否かを、免
疫染色を用いて調べた。トランスフェクション
後 48 時間の上清を回収し、それを新たな 293T
細胞の感染させた。24 時間後に HEK293T 細胞
を固定し、 α Nterm, α RdRp, α VP1 でウイ
ルスタンパク質の検出を試みたが、染色された細
胞は認められなかった。

ここまでの、結果をまとめると、MuNoV の RGS
は、種のバリアを超え、非感受性細胞 HEK293T
細胞で完全な感染性粒子の産生が可能である