

- 月 (招待講演)
2. Ohka S, Tan SH, Fujii K, Kaneda S, Nakamura H, Fujii T, Ong KC, Wong KT, Koike S: hSCARB2-dependent neural pathway for EV71 transmission. The XVIII th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2014). Blankenberge, Belgium、2014年3月
  3. 小池智: エンテロウイルス 71 受容体による種特異的、組織特異的感染の制御機構 第 87 回日本生化学会大会. 京都市、2014年10月
  4. 藤井健、小池智: EV71 の非神経組織での増殖は I 型インターフェロンにより抑制されている. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014年11月
  5. 小池智、藤井健、Tanel Mahlakovi, Peter Staeheli、永田典代: Role of type III interferon in intranasal infection of poliovirus in PVR transgenic mice. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014年11月
  6. 大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、石田欣二、藤井健、萩原恭二、花木賢一、 Pele Choi-Sing Chong, 小

池智: エンテロウイルス 71 の感染初期過程解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014年11月

## 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

表 1: 毒力比較に用いた EV71 株

	ウイルス	分離年	Genotype	患者における病原性
1	BrCr	1970	A	髄膜炎
2	Nagoya	1973	B1	手足口病
3	Bulgaria	1975	B1	致死性脳炎
4	Hungary	1975	B1	致死性脳炎
5	86-11316(NETH)	1986	B2	手足口病
6	SK-EV006	1997	B3	致死性脳炎
7	C7-Osaka	1997	B4	致死性脳炎
8	02363(THAI)	2002	C1	手足口病
9	KED005	1997	C1	致死性脳炎
10	1095-Shiga	1997	C2	手足口病
11	Isehara	1999	C2	手足口病
12	001-KOR-00(KOR)	2000	C3	弛緩性麻痺
13	209-VN(VN)	2006	C5	致死性脳炎

表 2: 毒力と VP1-145 および温度抵抗性の相関性比較

毒力*	ウイルス	Genotype	VP1-145	温度抵抗性**
1	Isehara	C2	E	Tr
2	Nagoya	B1	E	Tr
7	BrCr	A	E	Tr
9	Hungary	B1	E	Ts
12	THAI	C1	E	Ts
13	VN	C5	E	Tr
3	KOR	C3	Q	Ts
4	Bulgaria	B1	A	Tr
5	SK	B3	G	Tr
6	C7	B4	G	Tr
8	1095	C2	G	Ts
10	NETH	B2	Q	Ts
11	KED005	C1	Q	Ts
14	CVA16		V	Ts

VP1-145 アミノ酸が E（上段）を持つ株、それ以外の株（下段）を分別し病態スコア順に纏めた。

\*図 1A  $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub> 接種の病態スコア順位

\*\*Tr : 温度抵抗性、Ts : 温度感受性

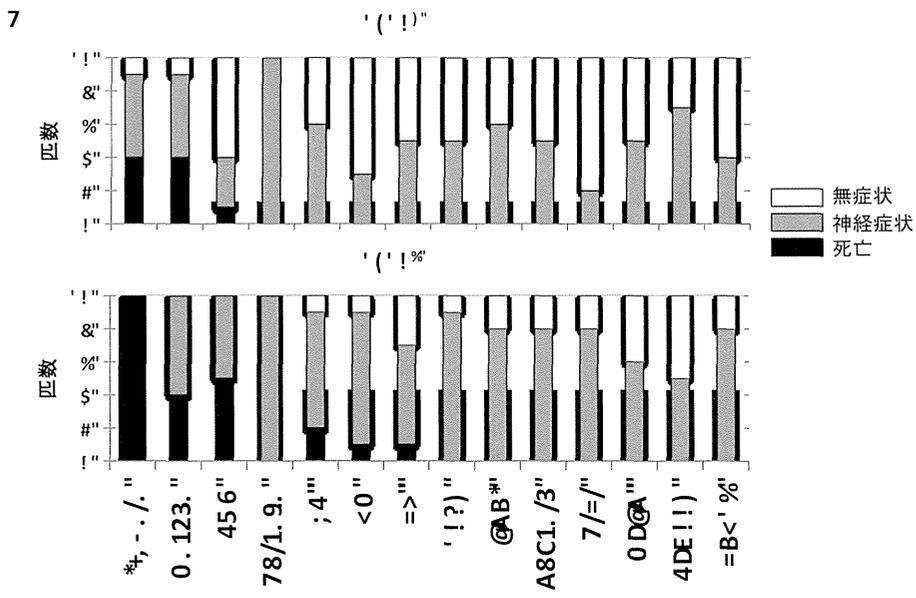
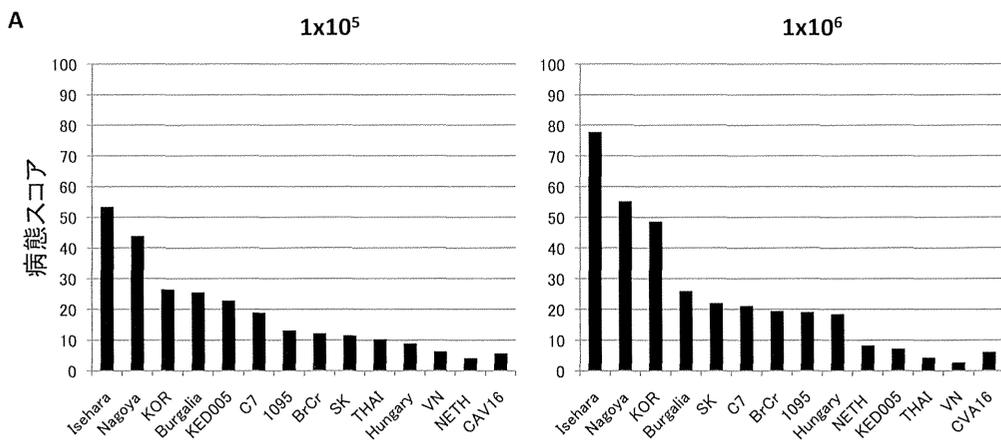


図 1:EV71 13 株の毒力比較

6-7 週令の Tg-10 マウスに脳内接種後、3 週間観察を行った。(A) 病態を観察し、無症状：0、よろめき歩行：1、四肢不自由：2、麻痺：3、瀕死：4、死亡：5 として病態スコアを算出した。3 週間観察期間中の病態スコアを積算し、病態スコアの高い順に示した。(B) 病態発現率、死亡率の比較。

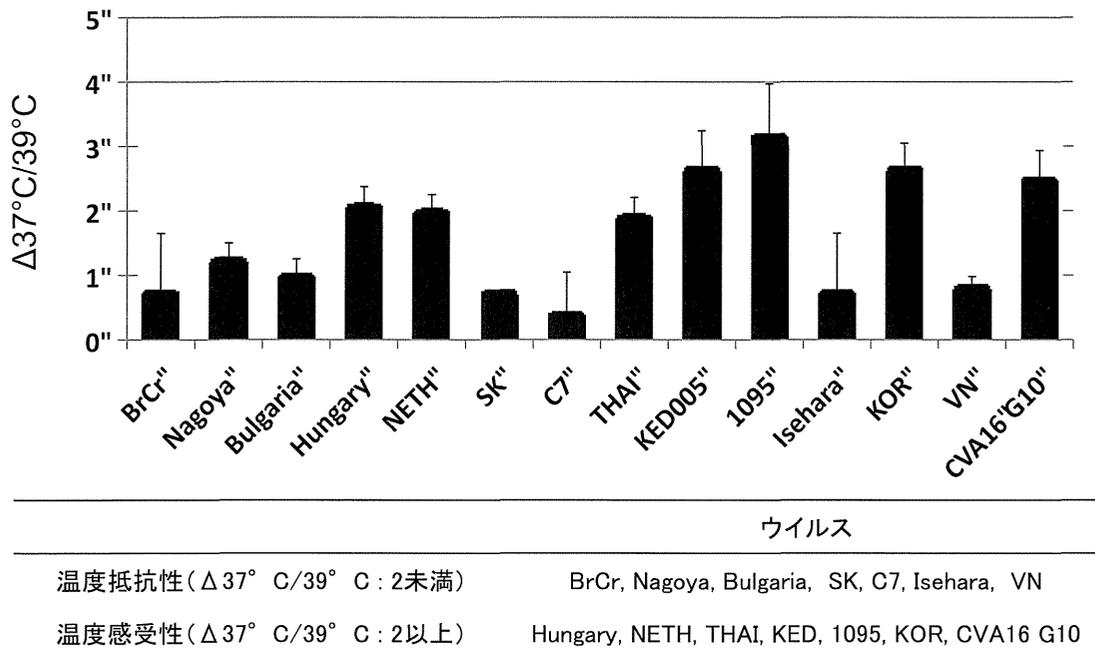


図 2: EV71 温度に対する抵抗性の比較

37°Cと 39°Cにおける各ウイルスのウイルスカ価をマイクロタイトレーション法により決定し、ウイルスカ価の比 ( $\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$ ) を算出した。 $\Delta 37^\circ\text{C}/39^\circ\text{C}$ が 2 未満と温度抵抗性、2 以上を温度感受性株とした。

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）

分担研究報告書

ノロウイルスチバ株 VLP の X 線結晶構造解析

分担研究者 長谷川 和也

(公財)高輝度光科学研究センター 副主幹研究員

研究要旨

ノロウイルス チバ株のウイルス様粒子(VLP)の X 線結晶解析法による構造研究を行った。良質な VLP 結晶を得る条件を見つけ、分解能 3.5 Å までの回折データを得ることに成功した。しかし、結晶格子中での VLP 粒子の分子充填様式を検討したところ、通常形成される直径 38 nm の VLP は充填できず、一回り小さい直径 23 nm の VLP が結晶化した可能性が示唆された。結晶化中に 38nmVLP 粒子が壊れ 23nmVLP が形成されたと推測される。今後は、23 nm VLP の構造解析を行いつつ、38 nm VLP の結晶化条件の探索をすすめ、その構造解析を行う予定である。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の主たる原因であるノロウイルス感染症には、現在、効果的な治療薬・ワクチンが存在しない。本研究は、ノロウイルス VLP の全体構造を X 線結晶構造解析法により決定し、ノロウイルス感染症の治療薬・ワクチンの開発に向けた分子科学的な基盤情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

ノロウイルスのキャプシドは VP1 タンパク質で形成される。培養・精製中に VP1 の N 末端領域が分解されることを防ぐため、チバ株の 3 重変異体 VP1 が形成する VLP (Someya et. al, *J. Gen. Virol.* (2011))を用いて結晶化を行った。

VLP の結晶化は、ウイルスの立体構造に関するデータベース VIPERdb (<http://viperdbscripps.edu>)に登録されている結晶化条件を参考にし、PEG とイオンを組み合わせた条件を中心にスクリーニングを行った。

回折データ測定は大型放射光施設 SPring-8 のタンパク質結晶解析ビームライン BL41XU で行った。広角領域の回折強度を精度よく測定するため、高感度 CCD 検出器 MX225HE を低ノイズモードで用いて回折像を記録した。得られた回折データの処理は HKL2000(Otwinowski *et al.*, *Methods in Enzymology* (1997))を用いた。

(倫理面への配慮)

感染性のないVLPを対象にした基礎研究で有り、本研究を行うに当たって倫理面の問題は無いと考える。実験に用いたVLPおよび試薬等の取り扱いについては、分担研究者の所属の規定に従っている。

### C. 研究結果

初期スクリーニングで得た結晶は形状がいびつであり、せいぜい9 Å分解能の回折反射を示す程度であった。しかし、この結晶を種結晶としてマイクロシーディングを行ったところ、大きさ200μm×100μm×30μmのきれいな単結晶を得ることができた。これにより、回折反射の分解能が向上し、3.5Å分解能までの回折データを測定することに成功した。

得られた結晶の空間群は $I2_12_12_1$ で、格子定数は $a=291\text{Å}$ ,  $b=311\text{Å}$ ,  $c=350\text{Å}$ であった。空間群とVLPの直径を基に結晶格子中のVLP充填モデルを検討すると、直方体の単位格子の各頂点、および、中心にVLPを配置することが妥当であった。しかし、この充填モデルから計算される粒子の直径は280 Åであり、感染性粒子と同じサブユニット配置を持つ直径38nmのVLPよりも小さい事がわかった。

### D. 考察

ノロウイルスのVP1は、直径38nmのVLPと、23nmのVLPの2種類のVLPを形成することが知られている(White

*et al., J. Virology*(1997))。38nmVLPは、正二十面体の各面にVP1が9個配置するT=3というサブユニット配置を持つ。それに対して、23nmVLPは各面にVP1が3個配置するT=1というサブユニット配置を持つ。電子顕微鏡では23nmVLPの外径が26nm~27nmと見積もられており(White *et al., J. Virology*(1997))、我々のVLP充填モデルから計算される値とよく一致する。したがって、今回得た結晶は23nmVLPの結晶であると考えられる。

結晶化に用いたVLPは、精製後に電子顕微鏡で観察して、粒子サイズが38nm程度であることを確認している。それにもかかわらず、23nmVLPが結晶化した理由を以下の様に推察している。

ノロウイルスVLPはpH3~7の領域で安定であり、pHが8を超えると4次構造が壊れその一部が23nmVLPを形成することが報告されている(Ausar *et al., J. Biol Chem.* (2006))。それに対して、今回見つけた結晶化条件のリザーバーのpHは8近辺であった。また、結晶を仕込んでから析出するまでに少なくとも1ヶ月以上の長い時間が必要であった。これらのことから、結晶を仕込んだ後に38nmVLPが徐々に壊れ、その一部が23nmVLPを形成し結晶として析出したと考えられる。

### E. 結論

今回得られた結晶は23nmVLPの結晶であると示唆された。このVLPは、感染

性粒子と異なるサブユニット配置を持つものの、38nmVLP との構造比較によりキャプシド形成機構に関する知見が得られると予想される。今後は、23nmVLP の構造解析を進めつつ、38nmVLP の結晶化条件を探索し、その構造解析を行う予定である。

F. 研究発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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）  
「不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている  
新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究」  
分担研究報告書

## ノロウイルスVLPおよび抗原決定部位の構造解析に関する研究

研究分担者 染谷 友美

（独）理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 上級研究員

研究協力者 重松 秀樹 同センター 上級研究員

協力研究者 岩崎 わかな 同センター 専任研究員

### 研究要旨

新規腸管ウイルスの一種、ノロウイルスのワクチン開発を目的とし、ワクチン抗原として有用な部分が粒子構造上の何処に位置するのかを明らかにするために、電子顕微鏡による立体構造解析を目指す。各種遺伝子型のノロウイルス VLP を電子顕微鏡観察し、精密立体構造解析に適したサンプルの判別を行った。また、VLP 構成タンパク質である VP1 の大腸菌無細胞タンパク質合成および精製を行い、均一性と純度の高いサンプル調製に成功した。

### A. 研究目的

近年、アジア諸国では、エンテロウイルス71、E 型肝炎、ノロウイルス等、新規腸管ウイルスワクチン開発が積極的に進められている。我が国はこれら腸管ウイルス感染症に関する多くの優れた基礎的研究成果を有するが、国内の具体的なワクチン開発研究はいまのところあまり進められていない。本研究課題では、新規腸管ウイルスワクチン開発のための研究基盤整備に関する研究を行う。

研究分担者の染谷らは、厚生労働省科学研究委託費 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業において他の

研究分担者らが網羅的に作製しているノロウイルスのウイルス様中空粒子 (VLP) を利用し、構造解析に適したVLPを選別して構造解析を行う。ノロウイルス遺伝子群I (GI) は、遺伝子群II (GII) に対して構造解析が遅れており、ワクチン抗原として有用な部分が粒子構造上の何処に位置するのか明らかになっていない。そこで本研究では、我が国で流行したノロウイルスGIのVLPの構造解析を試みる。また、抗原決定部位を担うと考えられているVP1タンパク質のPドメインについても、大量発現・精製条件を検討し、VLP構造解析の進捗状況に応じて結晶構造解析に進めるように備える。

本研究でノロウイルスのワクチンシーズを開発し、国産のワクチンシーズを供給することで、企業のワクチン開発への参入を促し、下痢症ウイルスに対する感染制御を行うことで、国民の健康と経済的な効果に貢献できると期待される。

## B. 研究方法

### B-1. VLPの電子顕微鏡観察

組み換え発現・精製されたノロウイルス genogroup I 株のウイルス様中空粒子 (VLP) の電子顕微鏡観察は、負染色により行った。市販の酢酸ガドリニウムを主成分とする染色剤、EMステイナー (日新EM) の20%希釈液を用いた。炭素薄膜被服電子顕微鏡グリッドをあらかじめ親水処理した後に、各種VLP溶液を滴下、1分間後にろ紙にて大部分を吸い取り、続けてEMステイナー20%溶液を滴下、1分後に吸い取り5分間の放置・乾燥後に電子顕微鏡観察に供した。染色試料は、透過型電子顕微鏡Tecnai F20 (FEI) を用い、Eagle2k CCDにより約60,000倍の倍率で画像を取得した。

### B-2. VP1タンパク質の合成と精製

VP1タンパク質のN末端側領域 (NtS, アミノ酸4-226位)、Pドメイン (アミノ酸227-544位)、及び全長領域 (1-544位) について、PCR断片を鋳型とした大腸菌無細胞タンパク質合成を60  $\mu$ lの微量スケールで行い、可溶性発現量を検討した。良好なサンプルについては、pETベクターに組み込み、プラス

ミドを鋳型とした中量～大量合成を行った。Niアフィニティー精製、SUMOプロテアーゼ消化、Reverse IMAC、ゲルろ過の各ステップにより精製した。

(倫理面への配慮：非該当。ヒトゲノム・遺伝子解析研究、疫学研究、臨床研究等、人を対象とした研究を行っていないため。)

## C. 研究結果

### C-1. 各種VLPの電子顕微鏡観察

分担者の感染症研究所染谷博士により作成されたノロウイルスVLPのうち、Kashiwa株 (Genogroup I, genotype 3; GI. 3)、WUG1株 (GI. 6)、および、これらの比較対照となるGII株について、電子顕微鏡による構造解析に適した均一な粒子を形成しているかを、負染色により観察した (Fig. 1)。一部の株において、密度勾配遠心の高密度画分では、比較的均一な粒子が観察されたが粒子径が30 nm以下と、予想より小さな粒子が多く見られた。その他の画分には、30-40 nmの粒子径のもの、30 nm以下のもの、構造不定型なものが混在していた。

### C-2. VP1タンパク質の合成と精製

ノロウイルス表面を構成し抗原性を決定する部位と考えられているVP1タンパク質のPドメインについて結晶構造解析を実施するための準備段階として、ノロウイルス Chiba株 (GI. 4) のVP1全長及びN末端側領域 (NtS)、Pドメインが、大腸菌無細胞タン

パク質合成系で発現可能かをそれぞれ検討した。まず、PCR断片を鋳型とした微量合成により、簡便な発現チェックを行った。その結果、いずれの領域も発現が確認された (Fig.2-A)。次に、大量合成のための鋳型として、上記の遺伝子断片を組み込んだプラスミドを作成した。プラスミドを鋳型として9 mlスケールで合成を行い、Niアフィニティーカラムとゲルろ過カラムによって精製を行った。その結果、非常に均一性と純度の高いサンプルの調製が可能であることが示された (Fig.2-B, C)。

#### D. 考察

ワクチン抗原として有用な部分が粒子構造上の何処に位置するのかを明らかにするためには、ウイルス粒子またはウイルス様中空粒子 (VLP) の精密な立体構造情報が必要となる。精密構造を得る手段としては X 線結晶構造解析が一般的であるが、X 線解析のためには結晶化が必須である。しかし、VLP のような巨大な分子集合体の結晶化は極めて難しく、多種の VLP 構造解析に対応することができない。そのため、本研究では異なる構造解析手法を用いることにした。近年の電子顕微鏡解析技術および機器の発展は目覚ましく、ウイルスや VLP の立体構造を、X 線結晶構造に近い 3 Å 台の分解能で決定できた例が報告されている。

まず、同研究班の共同研究者 (分担者) である国立感染症研究所の染谷博士により、ノロウイルス遺伝子群 I (GI) 各種遺伝子型

VLP のバキュロウイルス発現系の構築、大量調製が行われ、次いで VLP の粒子径を粗分画するために、iodixanol 密度勾配遠心分画が行われた。当該サンプルを負染色により電子顕微鏡観察したところ、推定粒子径と異なる粒子径や不定形のもが混在していることがわかった。この結果から、いずれの株も VLP を形成しているものの、電子顕微鏡による構造解析用サンプルとしては、粒子径ごとに分離できる更なる精製過程を、株により設定する必要性が示された。このように、VLP 調製担当者と観察担当者が密に連携することで、電子顕微鏡を用いた精密構造解析を達成できると考えられる。

一方、VP1 タンパク質およびその部分タンパク質については、結果の項に述べたとおり、大腸菌無細胞タンパク質合成系にて非常に均一性と純度の高いサンプルの調製が可能であることが示された。本調製方法は、GI.4 (Chiba 株) 以外のノロウイルス GI 遺伝子型の VP1 にも適用可能であると考えられる。調製法の最適化を行っても VLP の品質や均一性が上がらないサンプルについては、VP1 (P-domain) の結晶化および結晶構造解析を達成することで、その詳細構造の一部を解明できると期待される。また、抗体との複合体として共結晶構造解析を行うことで、中和抗体の抗原認識部位情報や、その認識機構が解明できると考えられる。

#### E. 結論

各種遺伝子型のGI-VLPについて、電子顕

微鏡観察の結果から、粒子径を揃えるための更なる精製手法の必要性が示唆された。VLP構成タンパク質であるVP1の全長および部分タンパク質の無細胞タンパク質合成を確認し、均一性が高く高純度のVP1調製方法を確立した。

#### F. 健康危険情報

非該当

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanabe H, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hosaka T, Hato M, Fujii Y, Nakamura Y, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Okada-Iwabuchi M, Iwabuchi M, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T, Yokoyama S: Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. *J Struct Funct Genomics*. **16**: 11-23, 2015
- 2) Takeo K, Tanimura S, Shinoda S, Osawa S, Zahariev I, Takegami N, Ishizuka-Katsura Y, Shinya N, Takagi-Niidome S, Tominaga A, Ohsawa N, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yokoyama S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Allosteric regulation of  $\gamma$ -secretase activity by a phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 10544-10549, 2014

3) Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T: Molecular pathogenesis of spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol. Med.* **6**: 1028-1042, 2014

4) Shigematsu H, Iida K, Nakano M, Chaudhuri P, Iida H, Nagayama K. Structural characterization of the mechanosensitive channel candidate MCA2 from Arabidopsis thaliana. *PLoS One*. **9**: e87724, 2014

5) Shigematsu H, Sigworth FJ. Noise models and cryo-EM drift correction with a direct-electron camera. *Ultramicroscopy*. **131**: 61-69, 2013

6) Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang HW. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. **20**: 662-670, 2013

##### 2. 学会発表

- 1) 田辺弘明、松田貴意、池田眞理子、染谷友美、横山茂之、白水美香子：大腸菌無細胞タンパク質合成系によるオスモチンの大量生産系の確立。第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月
- 2) 保坂俊彰、吉澤晋、染谷友美、Rojan Shrestha, Muhammad Muddassar, Kam Y. J. Zhang, 羽藤正勝、小暮一啓、岩崎渉、白水美香子、横山茂之：青色光を吸収するプロテオロドプシンの2.0 Å結晶構造解析。第

87回日本生化学会大会、京都、2014年10月

3) 篠田雄大、新屋直子、伊東夏織、大沢登、寺田貴帆、平田邦生、河野能顕、山本雅貴、木村(染谷)友美、横山茂之、白水美香子：ウェルシュ菌内毒素Clostridium perfringens enterotoxinによる、密着結合内クロードインアッセムブリーの破壊機構の構造基盤。第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月

4) 篠田雄大、新屋直子、伊東夏織、桂(石塚)芳子、大沢登、寺田貴帆、平田邦生、河野能顕、山本雅貴、富田泰輔、石橋洋平、平林義雄、染谷友美、白水美香子、横山茂之：無細胞タンパク質合成技術を利用した結晶構造解析用ヒト膜タンパク質生産の体系的な手法。平成26年度日本結晶学会年会、東京、2014年11月

5) 岩田 想、木村 香菜子、島村 達郎、南後 恵理子、田中 智之、西澤 知宏、濡木 理、田中 里枝、鈴木 守、榊田 哲哉、菅原 道泰、登野 健介、城地 保昌、亀島 敬、

Changyong Song、初井 宇記、矢橋 牧名、山下 恵太郎、保坂 俊彰、田辺 弘明、羽藤 正勝、有馬 登志、染谷 友美、白水 美香子、潘 東青、中津 亨、加藤 博章、溝端 栄一、北郷 悠、高木淳一、山中保明、藤原孝彰、山下鮎美、小林淳：自由電子レーザーを用いた膜蛋白質の系統的構造解析。第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月

### 3. 総説

1) Kimura-Soyema T, Shirouzu M, Yokoyama S: Cell-free membrane protein expression. *Methods Mol. Biol.* 1118: 267-273, 2014

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し\_

図表

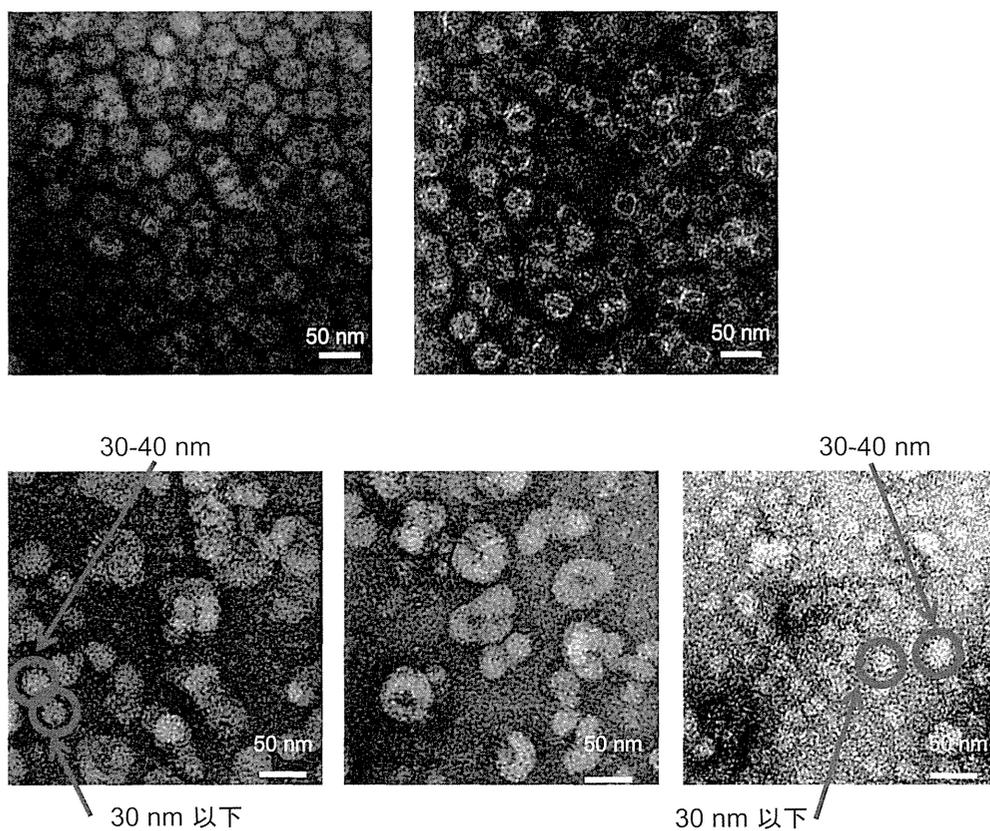
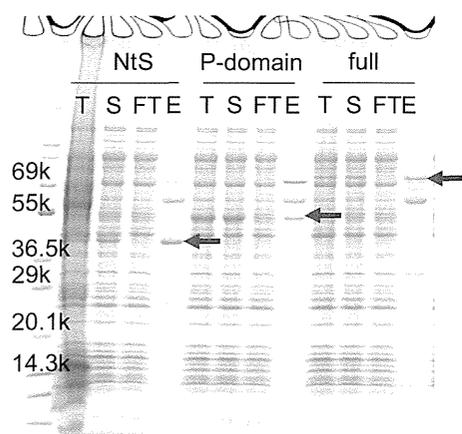


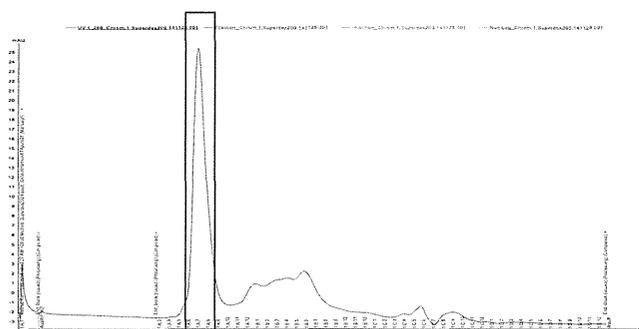
Fig. 1. VLPの電子顕微鏡観察像。iodixanol密度勾配遠心後の異なる画分を染色した。上段はGII、下段はGIを代表例として各1例載せた。いずれも左側が密度勾配上方（低密度側）より得られた画分の像。

図表

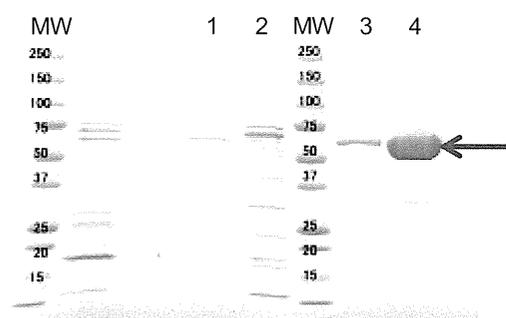
(A)



(B)



(C)



MW:分子量マーカー  
 1: protease添加によるタグ切断  
 2: Ni-resinへの吸着  
 3: 回収したゲルろ過画分  
 4: 3の濃縮液 (1.6 μg分)

Fig.2 VP1の大腸菌無細胞タンパク質合成と精製。(A) PCR断片を鋳型とした無細胞合成による発現確認。T: 合成反応液、S: 反応液の遠心上清、FT: Niレジンのflowthrough、E: Ni-eluate。VP1のN末端を1番目のアミノ酸として、NtS: 4-226、P-domain: 227-544、Full: 1-544。(B) ゲルろ過クロマトグラフィー。(C) 精製過程のサンプル電気泳動図。

厚生労働科学研究費

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

不活化ポリオワクチンの有効性・安全性の検証及び国内外で進められている新規腸管ウイルスワクチン開発に関する研究 (H25-新興-一般-012)

ノロウイルスワクチンに関する研究

担当責任者	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	染谷雄一	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	岡智一郎	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	藤井克樹	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研究員
研究協力者	芳賀 慧	国立感染症研究所ウイルス第二部研究員
研究協力者	高橋宜聖	国立感染症研究所免疫部第四室室長
研究協力者	中西 章	国立長寿医療センター老化制御研究部遺伝子治療研究室室長
研究協力者	村田和義	自然科学研究機構生理学研究所 准教授
研究協力者	戸高玲子	国立感染症研究所ウイルス第二部非常勤職員
研究協力者	朴英 斌	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	団 海燕	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	藤本 陽	国際厚生事業団 流動研究員
研究協力者	三木 元博	国立感染症研究所ウイルス第二部協力研究員

研究要旨：ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとしてもよく知られている。HuNoV 感染症による患者数は数万人規模に達するなど、社会的、経済的ダメージは極めて深刻である。HuNoV はヒトの体内以外で増殖できない。つまり、HuNoV はヒトが感染源で有り、ヒトが維持し、ヒトからヒトへの伝播形態によって大規模な流行を起こしている。HuNoV の流行基盤であるヒト-ヒト感染を効果的に予防することができれば、HuNoV の流行、大規模食中毒を防ぐことが可能になる。そのため、ワクチン開発並びに実用化が切望されている。

本研究では、HuNoV のウイルス様中空粒子 (VLP) を基盤とした第一世代ワクチンのシーズ開発を目的とするが、第二世代ワクチンとしてリバーシジェネティックスの手法を応用したノロウイルスの弱毒化生ワクチン、第三世代としてノロウイルスの中和エピトープを抗原としたペプチドワクチンなどの HuNoV ワクチンなども対象とした研究を行う。

## A. 研究目的

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、感受性株化培養細胞が無く、インビトロで増殖させることができない。しかし、HuNoV の構造タンパク質をコードする領域をバキュロウイルスベクターにクローニングし、ウイルス様中空粒子 (VLP) を作り出すことが可能である。VLP は、感染性 HuNoV 粒子と同様の抗原性を有しているとされており、ワクチンの抗原として利用できる。

HuNoV は、GI~GVI の 6 種類の遺伝子グループが存在する。そのうち、HuNoV は GI, GII, GIV である。GI, GII には、それぞれ 17 種類以上の遺伝子型 GI. 1~GI. 17、GII. 1~GII. 22 が存在しており、遺伝学的にも、抗原性の面でも非常に多様である。HuNoV 粒子表面に存在する突起部分 (P domain) には、アミノ酸の超可変領域が有り、毎年のように抗原性を微妙に変化させる。同じヒトが、1 年に複数回 HuNoV 感染を受けること、毎年冬季に流行を繰り返すことは、このような抗原の多様性、変化の速さに一因がある。一方、米国で実施されたボランティアへの HuNoV (患者便から精製したウイルス) の接種試験や、我が国における家族内感染に関する疫学データから、一度感染したウイルスと同じ遺伝子型のウイルスには、再感染しにくいことが報告されている。つまり、これらの報告は、HuNoV 感染者が獲得した免疫が、再感染もしくは、発症を予防することを示しており、HuNoV ワクチンの可能性を示唆している。

本研究では、HuNoV の VLP を基盤とした第一世代ワクチン、第二世代ワクチンとしてリバースジェネティックスの手法を応用した HuNoV の弱毒化生ワクチン、第三世代として HuNoV の中和エピトープを抗原としたペプチドワクチンなどの HuNoV ワクチンの開発研究を行う。

(本研究は、そのほかの研究補助金によりサポートされている研究内容を分断して記載すると内容の把握が難しいと考えられるため、厚生労働科学研究委託費 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究 (H26-新興実用化 - 一般 - 017)、 “下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究” (H26-新興実用化 - 一般 - 004) によって実施された研究も合わせて記載した。)

## B. 研究方法

### 1. 第一世代 VLP ベースワクチンシーズの開発

#### <HuNoV-VP1 領域のクローニング>

HuNoV GI については、GI. 1 から GI. 9 に至までデータベース上の塩基配列に基づき、遺伝子配列を合成し、シャトルベクターにクローニングした。HuNoV GII に関しては、GII. 11, 18, 19 は、ブタのウイルスであるため除外し、それ以外の遺伝子型を GI と同様にクローニングした。HuNoV 遺伝子は、シャトルベクターから、Bac to Bac システ

ムを用いてバキュロウイルスゲノムのポリヘドリンプロモーター下流にサブクローニングした。

＜HuNoV-VP1 発現バキュロウイルスの作製並びにシードウイルスの作製＞

作製したバキュロウイルスゲノムは、Sf9 細胞にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを産生させた。次に、培養上清に放出された組換えバキュロウイルスを、プラークアッセイにてプラーク純化した。純化したプラークを Sf9 で増殖させることでマスターシードウイルス候補を作製した。さらに、マスターシードウイルス候補は、Hi5 細胞を用いて VLP を発現させ、電子顕微鏡観察にて VLP 製造能力があることを確認した。作製したマスターシードウイルス候補は、濃縮後に次世代シーケンサーにより全長塩基配列を決定し、HuNoV インサート配列と、バキュロウイルス遺伝子配列を確認し、変異を持たないことを確認した後、マスターシードウイルスとした。次世代シーケンサーの解析パターンは、フィンガープリントのように、シードロットシステムの品質管理試験に利用できる。マスターシードウイルスは、プラークアッセイにて pfu を測定後、 $10^7 \sim 10^8$  pfu/mL のウイルス液として $-80^\circ\text{C}$ にストックした。

＜VLP の作製＞

それぞれの HuNoV の遺伝子型の VLP は、Hi5 細胞を用いて作製した。概略を以下に記した。

シードウイルスを Sf9 細胞にて増殖させ、ワーキングシードを作製してストックした。

ワーキングシードを Hi5 細胞に感染させ、プロテアーゼ阻害剤を感染 3 日後に投入し、感染 7 日目まで培養した。感染 7 日目にハーベストし、上清中のバキュロウイルスを 20000g、20 分間の遠心にて沈降させて除去した。上清に含まれる VLP は、30%のスクロースクッションを用いて SW32Ti ローターにて 30000rpm で超遠心操作を行い、ペレットとして沈降させ、回収した。その後、VLP を PBS(+)に再懸濁し、CsCl の浮上密度勾配遠心 (SW55Ti ローター、35000rpm, 24 時間) にて分離精製した。その後、CsCl を除去し、再度 PBS(+)に懸濁し、VLP 液として、 $-80^\circ\text{C}$ に小分け分注して保管した。一部分を抗血清作製のためのウサギ、モルモットの免疫に用いた。また、モノクローナル抗体の作製、スクリーニングにも用いた。

＜ウサギ抗血清；ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の作製＞

定法にて VLP をウサギ、モルモット、マウスにそれぞれ免疫し、抗 VLP ウサギ血清、抗 VLP モルモット血清をポリクローナル抗体として得た。ポリクローナル抗体の交差反応性を VLP-ELISA にて調べ、交差反応性のある VLP に関しては、それぞれの遺伝子型 VLP に特異的なモノクローナル抗体の作成を行った (表 1)。モノクローナル抗体の特異性は ELISA によって確認した。

＜NGS による塩基配列解析＞

マスターシードバキュロウイルス液から抽出した DNA より、イルミナ社の NexteraXT キットを用いて、cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、

CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行いマスターシードのゲノム上の核酸変異、アミノ酸変異、quasispecies の頻度を検出した。

以下、新興・再興感染症に対する画期的な新規ワクチン開発および実用化に関する研究 (H26-新興実用化 - 一般 - 017) 報告書より引用

#### <抗体検出 ELISA>

VLP を 96 ウェルプレートにコーティングし、定法にて ELISA を行った。IgG, IgA2 等の抗体の検出には、それぞれの抗体特異的 POD ラベル二次抗体を用いた。

#### 2. 小児 HuNoV 感染患者の時系列解析

##### <患者ならびに検体>

研究協力者のご子息がノロウイルスに感染したため、保護者の同意を得て便検体のサンプリング、解析を行った。対照児は、1歳5ヶ月の男児で、急な発熱、嘔吐、下痢の症状が認められた。クイックナビ・ノロ (デンカ生研) にてノロウイルス陽性を確認した後、4月18日より、5月13日まで27日間経過観察を行いながら13サンプルの(便検体)を採取した。

##### <QRT-PCR>

QRT-PCR, どちらの方法についても、我々が2002年、2004年に開発し、報告した方法が世界のゴールドスタンダードとなっている。従って、これらの方法を用いて患者便中の HuNoV -RNA の定量を行った。

##### <抗体検出 ELISA>

前出に同じ。

#### <分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、サンプリング日時を入力の上、解析を施行した。具体的には、アライメント後、トレーサーにて時系列系統の解析パラメーターを設定した。その後、ベイジアンモンテカルロ法にて、進化速度、時系列を加味した分子系統解析を施行した。

#### <臨床症状のスコアリング>

Vesikari clinical scoring system に準拠して、体温、嘔吐症状、下痢症状、腹痛などの臨床症状の記録より、臨床症状のスコアリングを行った。

### C. 研究結果・考察

#### 1. 第一世代 HuNoV-VLP ベースワクチンシーズの開発

##### (1) HuNoV-VP1領域のクローニング

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングした HuNoV GI の GI.1 から GI.9、HuNoV GII の GII.1 から GII.22 までの (GII.11, 18, 19 は、ブタのウイルスであるため除外した) ORF2, 3 領域は、それぞれ2~3 クローンの全塩基配列を決定し、デザイン通りのクローンである事を確認した。以上により現在、2014年の時点で、論文上に報告されている全ての遺伝子型のVLP作製準備が整った。

##### (2) HuNoV-VP1発現バキュロウイルスの作製並びにシードウイルスの作製

大腸菌-バキュロウイルスシャトルベクターよりバキュロウイルスのゲノムに HuNoV の配列を Bac-to-Bac システムにより移し、組み換えバキュロウイルスゲノムを作製した。こ

のゲノムをSf9細胞にトランスフェクションし、イルミナ社のDNAシーケンスようキットのプロトコールに従って、次世代シーケンスを実施した。以上により、フィンガープリンティングによる均一性を満たしたシードウイルスの作製が終了した。

### (3) VLPの作製

シードウイルスより作製したワーキングシードと、Hi5細胞を用いてVLPの大量発現（ミリグラムオーダー）作業を行った。ハイライトされたVLP（ウサギ血清、モノクロが作製中となっている）以外のVLPについては、抗体作製に足るVLPの作製が終了した。作製中のVLPについては、来年度も引き続き作業を行う。

### (4) ウサギ抗血清（ポリクローナル抗体）、モノクローナル抗体の作製

それぞれの抗原（VLP）に特異的な抗体（VLP特異的抗体）は、原薬の品質管理だけではなく、数種類のVLPを混合して免役するHuNoVの多価ワクチンを想定した場合、VLP混合後の混合比確認のため必須である。そのためには、ウサギ抗血清の特異性を明らかにする必要がある。免疫源として使用したVLP以外のVLP、つまり、異なる遺伝子型のVLPに交差反応するか否かを、VLP-ELISAを用いて調べた。表2の結果より、GI. 3, 6, GII. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13は特異性が高いことが予想された。これらの遺伝子型については、モノクローナル抗体準備の必要性が無いことが明らかになり、モノクローナル抗体作製対象から除外した。GII. 3, 4に関しては特異性が高いことが予想されたが、両遺伝子型共にバリエーション（亜株）の微妙な抗原性の違いによって流行が引き起

こされることが報告されているため、バリエーション特異的VLPとそれを識別可能な抗体が必要になる可能性がある。そこで、これらについては、バリエーション特異的モノクローナル抗体を作製することとした。

モノクローナル抗体作製が必要と判断された遺伝子型に関して、定法に従ってモノクローナル抗体作製を実施した。各種遺伝子型、バリエーション特異的抗体のクローニングは終了したが、各クローンのスクリーニングは未だ進行中である。

現段階では、GI. 5, 7, 9, GII. 9, 15, 20, 21, 22の抗体は作製途中である。今後、全てのVLPが揃ったところで、再スクリーニングを実施し、ウサギ血清、もしくはモノクローナル抗体の特異性を再確認する必要がある。

### (4) 仮想VLPワクチンの力価試験法の開発研究

ワクチンの品質管理試験において、原薬、最終小分け製品までの工程管理試験で想定されるVLPに対する品質管理に使用する抗原、抗体についての開発研究は順調に進行している。しかし、ワクチンの力価試験、つまりワクチンの能力を測る試験に関しては、来年度以降に開発研究を進める必要がある。現時点で想定している力価試験法は、ワクチン接種した動物体内で誘導される抗体が、VLPの細胞への吸着を阻害可能か、否かを測定する方法である。具体的には、”ワクチン候補を動物に摂取し、接種後4週間ほどで採血を行う。その後、HuNoVに見立てたVLPと血清の希釈系列を反応させ、VLPが標的細胞もしくは、標的糖鎖に結