

II. 分担研究報告

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

分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の研究

カリシウイルスのリバースジェネティクス

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 朴 英斌 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 昨年度構築したHuNoV GII.3 U201株、GII.4 Saga1株、TCH04-577株、GI.1 NV68株、murine norovirus (MNV) S7株の感染性クローンのうちU201株、MNV-S7株の感染性クローンにGFP遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込むことに成功した。また、小腸のオルガノイド（エンテロイド）を導入し、ヒトノロウイルス感受性細胞の研究を開始した。

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 のリバース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。我々の開発した、HuNoV のリバースジェネティクスシステム (RGS) は、株化細胞内に HuNoV のゲノムを発現させ、ウイルス蛋白質の合成、ゲノムの複製、新生ウイルス粒子産生までを再現できるシステムである。しかし、新生ウイルス粒子の感染性は、HuNoV 感受性細胞が無い場合、検証することができない。

完全な RGS を構築するためには、HuNoV に近縁で、感受性細胞の存在するマウスノロウイルス (MNV)

を代替ウイルスとして用いて研究を進め、その結果を HuNoV に反映させるとよい。昨年度は、MNV-S7 株の cDNA、FC-F4 株の cDNA を EF-1 alpha promoter vector に組み込み HuNoV と全く同様なプラスミドコンストラクトを構築し、RGS の検証を行った。さらに、MNV の RGS を用いて、遺伝子改変感染性ウイルスを作出し、感染性粒子の性状解析、VPg, VP2 の機能解析を行った。本年度は、非構造タンパク質領域もしくは構造タンパク質領域に GFP 等の蛍光たんぱく質やルシフェラーゼなどの蛋白質を組み込み、ウイルスの非構造タンパク質の機能解析、ノロウイルス感染の機序解明のための研究に使用することを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2002 年遠矢幸伸現日本大学教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株を MNV 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, protease, RNA dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 に対する抗体は、各タンパク質を大腸

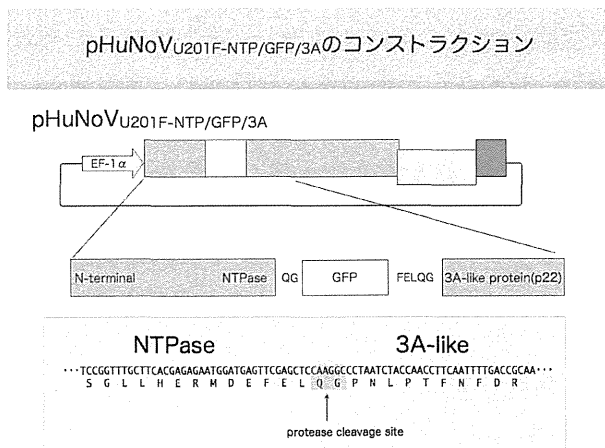
菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して作製した (α Nterm, α NTPase, α VPg, α Protease α RdRp, α VP1, α VP2 と表記する。)

2. MuNoV、HuNoV の RGS

pHuNoV_{U201F} (旧称: HuNoV pKS-U201F) を骨格として、U201 株 cDNA 部分を MNV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pMNV_{S7F} (旧称: pKS-MNV-F) を構築した。株化細胞 (HEK293T) を 6 well ディッシュに 90%コンフルエントになるように培養し、4ug の HuNoV pKS-U201F 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、感受性細胞がある MNV は RAW264.7 細胞株に感染させ TCID50 を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス titer を定量した。

3. 遺伝子エンジニアリング

RGSでは、プラスミドを細胞内にトランスフェクションすると、EF-1 α プロモーター下流に挿入したHuNoV, MNVのゲノムがドライブされる。その後、ウイルスの複製サイクルが再現されて、感染性粒子が放出される。我々は、GFP等の蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子を作るべく、ORF1に GFP遺伝子を導入した。GFP遺伝子の5'側、3'側それぞれに自身のコードするproteaseで切断されるよう、protease認識モチーフを導入した (図1)。

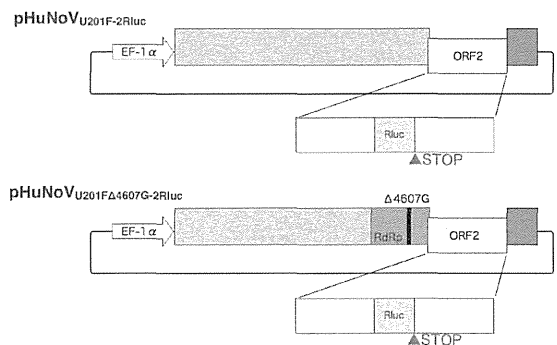


(図1)

NoVの特徴の一つに、sub-genomic RNAの合成がある。NoVが感受性細胞に感染するとORF1が翻訳され、非構造タンパク質が合成される。非構造タンパク質にはRdRpが含まれている。RdRpが合成されて成熟すると、ゲノムRNAの転写に加え、

ORF2,3をコードするsub-genomic RNAが大量に転写され始める。Sub-genomic RNAの合成量をモニターすればRdRpの活性を測定できると考えられる。そこで、我々は、細胞内でRdRpの活性を可視化してモニターするために、ORF2にGFPを導入した (図2-1)。一方、RdRpのYGDDモチーフ (活性を発揮するために必須なアミノ酸モチーフ) を崩したミュータントpHuNoV_{U201F} Δ 4607G-2GFPを作製して陰性コントロールとした。

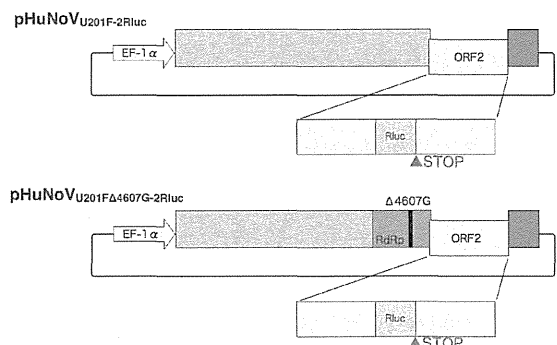
Rlucの導入 (pHuNoV_{U201F}-2Rluc)



(図2-1)

また、活性を数値化するために、ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) やナノルシフェラーゼ (Nluc) をレポーターとして導入した (図2-2)。

Rlucの導入 (pHuNoV_{U201F}-2Rluc)



(図2-2)

4. GFP ならびにルシフェラーゼの検出

細胞内で発現した GFP の検出にはオリンパス社ライブセルイメージャーLCV110 を用いた。

ルシフェラーゼを導入したプラスミドを細胞 (Cos7 or 293T) にトランスフェクションした後、24-32 時間後にハーベストして、ルシフェラーゼ

活性を測定した。

5. ヒトエンテロイドの導入準備

近年、ヒトの小腸バイオプシに含まれる腸管上皮細胞の幹細胞を増殖させ、様々なサプリメントを与えつつ培養することで、ヒト腸管組織をマトリジェルという特殊なジェルの中で増殖、組織再構築を行わせることが可能となった (Sato T et. Al. Science 340:1190-1194. 2013) . このインビトロで無限に増殖可能となったヒト腸管組織のオルガノイドをエンテロイドと呼称する。

今年度は、本技術の開発者であり、かつ本研究班の分担研究者でもある慶応大学の佐藤俊朗准教授、杉本真也博士によって樹立されたエンテロイドの導入準備を行った。

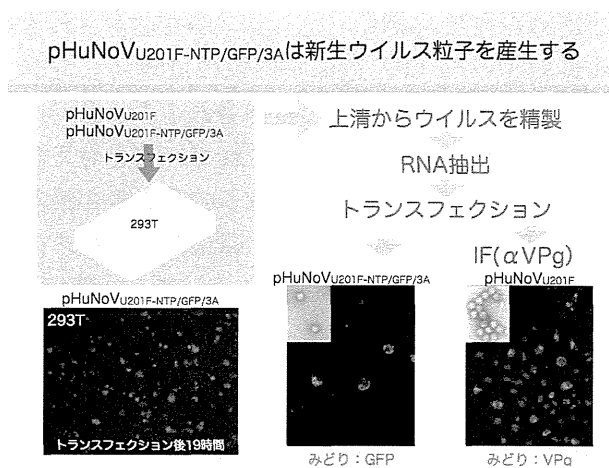
Wnt 溶液、Notch シグナル、上皮成長因子 (EGF)、Bone morphogenetic protein: BMP 阻害物質の内、Wnt 以外は、購入後、小分け分注を行い、-80℃に小分け分注した。Wnt 溶液については、必要に応じて慶応大学佐藤准教授の教室より分与されることとなった。その他の市販サプリメントも購入後、同様に小分け分注して保管した。

ヒトエンテロイド培養技術の研修は、研究打ち合わせを兼ねて、2 回実施し、実技研修後、受け入れ先である感染研ウイルス第二部の受け入れ環境を整備した。

C. 結果と考察

(1) 蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子作製の試み

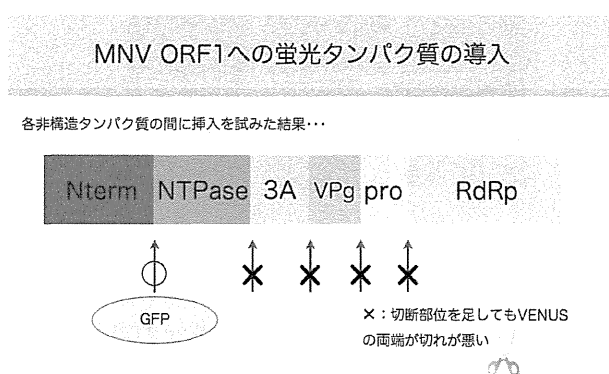
GFP 遺伝子を NTPase コード領域と 3A-like protein コード領域の間に挿入したコンストラクト pHuNoV_{U201F-NTP/GFP/3A} を、細胞のトランスフェクションすると、細胞内部にブロードに GFP の発光が認められた。上清からウイルスを精製し、電子顕微鏡で観察すると、図 3 に示したように新生ウイルス粒子が観察された。新生ウイルス粒子産生効率は、pHuNoV_{U201F} と比較すると 1/10 から 1/100 程度であった。新生ウイルス粒子から RNA を抽出し、抽出した RNA を細胞内にトランスフェクションすると、細胞に GFP のシグナルが認められた。この結果は、新生ウイルス粒子は GFP が挿入されたゲノムを内包しており、そのゲノムは細胞内で自己複製が可能であることを示唆していた。



(図 3)

HuNoV は、感受性株化細胞が無い場合、新生ウイルス粒子の感染性を確かめることができない。そこで、MNV を用いて、GFP 遺伝子の挿入を試みた。

図 4 に示したように、6 種類の非構造タンパク質のプロテアーゼによる切断点に GFP の挿入を試みたところ、N-terminal protein と NTPase の間のみ GFP 遺伝子の受け入れが許され、それ以外の場所は RGS が稼働しなかった。



NtermとNTPaseの間に蛍光タンパク質を挿入する

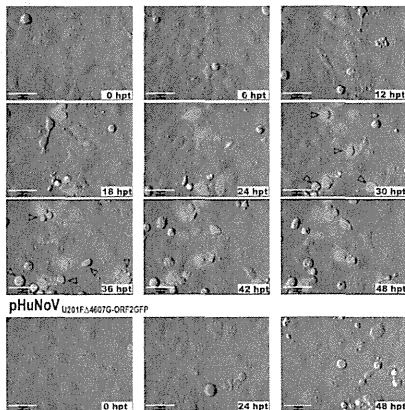
(図 4)

N-terminal protein と NTPase の間に GFP を挿入したクローン pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTP} を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に上清を回収した。回収した上清を MNV 感受性細胞である RAW264.7 細胞に感染させ、GFP の蛍光を観察したところ、感染後 3 時間から GFP の発光が始まり、感染後 12 時間、24 時間と異なる細胞に GFP の発光が観察された。さらに、この培養上清を継代培養したところ、GFP の蛍光を発する細胞数の減少

が認められた。pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTF} から産生される感染性粒子への GFP 遺伝子内包には成功したが、GHFP 遺伝子は複製過程で排除されるか、リバータントの出現によって、淘汰されていると考えられた。今後、GFP 内包感染性粒子の感染後の培養上清に存在すると思われる新生感染性ウイルスのゲノム塩基配列を解析し、その情報を pMNV_{S7F-Nterm/GFP/NTF} にフィードバックすることで、継代可能な GFP 遺伝子内包ウイルスの作製を試みる。

(2) 細胞内 RdRp 活性測定法構築の試み

RdRp の活性測定のため、GFP を ORF2 に組み込んだ pHuNoV_{U201F-2GFP} とネガティブコントロール pHuNoV_{U201F Δ4607G-2GFP} を、それぞれ COS7 細胞にトランスフェクションして、GFP の発現をライブセルイメージャー LCV110 で観察した (図 5)。

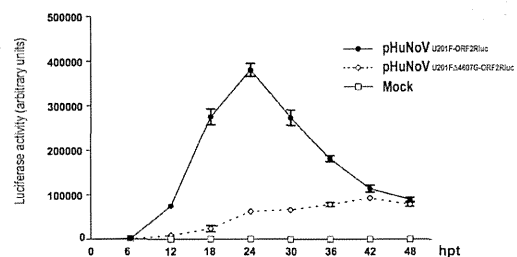


(図 5)

トランスフェクション 12 時間後から GFP の発色が認められ、GFP が発現している細胞の数、発色強度は、30, 36 時間に最大になった。それに対し、pHuNoV_{U201F Δ4607G-2GFP} トランスフェクション細胞には、48 時間後に至っても GFP の発色は認められなかった。RdRp の活性を GFP の発色によって可視化し、ライブセルイメージャーによってモニター可能となった。

次に、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201F Δ4607G-2RS} を用いてルシフェラーゼによる RdRp 活性の定量化を検討した (図 6)。pHuNoV_{U201F-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から上昇を始め、24 時間でピークに達した後、42 時間後にはバックグラウンドと同レベルにまで低下した。他方、pHuNoV_{U201F Δ4607G-2RS}

トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から徐々に上昇を始めたが、42 時間でピークに達した後、48 時間後に向けて低下した。ピーク時の 24 時間では、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201F Δ4607G-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性の差は 8 倍程度の開きがあり、24 時間後には RdRp 活性の定量、活性差測定が可能であると思われる。



(図 6)

(3) ヒトエンテロイドの導入準備

ヒトエンテロイド継代培養の技術研修が終了した。また、導入準備も整った。今後、国立感染症研究所所内倫理審査にかけ、審査通過後、エンテロイドを導入する予定である。

D. 結論

ヒトノロウイルス U201 株、ネズミノロウイルス MNV-S7 株の感染性クローンに GFP 遺伝子を導入し、感染すると細胞が GFP のシグナルを発する GFP-Tagged progeny virus を産生することに成功した。この新生ウイルスは、感受性細胞の探索、スクリーニングに有用である。また、機能タンパク質 (RdRp) の活性測定システムを構築した。本システムによって、RdRp の活性差を測定することで、HuNoV の病原性を調べることができるとも思われる。小腸のオルガノイド (エンテロイド) を導入準備が整った。HuNoV 感受性細胞樹立に向けた研究を加速すると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
2. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. J. Vet. Med. Sci. 76(7), 1045-50, 2014.
3. Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol, in press, 2015.

邦文

1. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol. 35 No. 3 Mar. 2014.
2. 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版 IASR ノロウイルス特集号 vol. 35 No. 7 July 2014.

3. 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策救命救急 vol. 17 No. 1 12-15, 2014.
4. 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No. 4723, 59-60, 2014.
5. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 10-12, 2014
6. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 14-19, 2014
7. 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策ICTジャーナル vol. 9 No. 4 2014.
8. 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.
9. 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.

G. 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。

ノロウイルス複製機構について

研究分担者 染谷 雄一 国立感染症研究所・ウイルス第二部

培養細胞や実験動物では増殖させることができないヒトノロウイルスの遺伝子複製機構、粒子複製機構を明らかにすることを目的に、RNA レプリコン系の構築を試みた。レプリコン候補遺伝子には、ノロウイルス非構造タンパク質遺伝子（ORF1）に加え、HCV IRES 依存に発現する薬剤耐性遺伝子が含まれる。in vitro 合成した RNA を培養細胞に導入したが、現在のところ薬剤耐性細胞は得られていない。一方、ノロウイルスの構造タンパク質遺伝子（ORF2, ORF3）を含むプラスミドを Vero 細胞に導入し、薬剤で選択したところ、耐性を示す細胞を得た。今後、この薬剤耐性細胞で ORF2 および ORF3 タンパク質が発現しているか調べる。

A. 研究目的

ヒトに感染して嘔吐下痢症を引き起こすノロウイルスは培養細胞や実験動物を用いて増殖させることができない。そのためノロウイルスの生活環の大部分は未だ解明されていない。ノロウイルス遺伝子複製機構および粒子複製機構を解明することを目指し、RNA レプリコンの作成とキャプシドタンパク質を安定に恒常的に発現する細胞株の樹立を試みた。また、ノロウイルスの構造タンパク質遺伝子を恒常的に発現鎖得る細胞株の樹立を試みた。

B. 研究方法

すでに全塩基配列が解明されているヒトノロウイルスチバ株（GI.4）を用いた。また、細胞培養が可能なげっ歯動物ノロウイルス MNV1 株についても同様の操作を行った。両

ウイルス株の RNA レプリコン候補遺伝子作成のため、国立感染症研究所・ウイルス第二部 石井孝司室長より分与された C 型肝炎ウイルス（HCV）JFH-1 株由来の IRES 支配下に置かれた薬剤耐性遺伝子ネオマイシン耐性遺伝子（Neo）断片、E GFP 融合 Neo 断片、分泌型 NanoLuc（secNLuc）遺伝子断片を用いた。また、別の薬剤耐性マーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子（Puro）のほか、薬剤耐性遺伝子に融合させるレポーターとして、ホタルシフェラーゼ遺伝子（FLuc）、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子（RLuc）を用いた。

C. 研究結果

1. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 1
チバ株の非構造タンパク質遺伝子（ORF1）

下流に HCV IRES 依存の Neo 遺伝子を有する一連のレプリコン候補遺伝子は、昨年度作成した。

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo-Tt …①

pT7CVORF1-HCVIRES-GFPNeo-Tt …②

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo2-Tt … ③

(③は①の改変体で、Neo の N 末端に相当する領域に AscI 部位および Bsp119I 部位をもつ。)

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucNeo-Tt …④

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucNeo-Tt …⑤

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucNeo-Tt …⑥

③の Neo に換えて Puro を導入した、pT7CVORF1-HCVIRES-Puro-Tt … ⑦ を作成した。⑦の AscI-Bsp119I 部位に EGFP、FLuc、RLuc、NLuc を挿入し、

pT7CVORF1-HCVIRES-EGFPNeo-Tt …⑧

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucPuro-Tt …⑨

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucPuro-Tt …⑩

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucPuro-Tt …⑪

を作成した。

2. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 2

E 型肝炎ウイルス (HEV) の RNA レプリコン系では、HCV IRES を含まずに secNLuc 遺伝子を HEV ORF1 下流に置いたものでも成功している。これと同様の候補遺伝子を昨年度作成している。

pT7CVORF1-secNLucNeo-Tt … ⑫

pT7CVORF1-dsNLucNeo-Tt … ⑬

⑫の遺伝子から発現する secNLucNeo 融合タンパク質は細胞外へ放出されることになり、細胞に Neo 耐性を付与することはできない。

HEV の RNA レプリコンで secNLuc の導入のみで成功した事例を考えると、secNLuc をコードする塩基配列が重要であることが考えられる。そこでシグナル配列に対応する塩基配列を残しつつ NLuc 本体のみを発現するよう新たな開始コドンが付与した⑬を作成した。更に⑬の Neo を Puro に置き換えた、

pT7CVORF1-dsNLucPuro-Tt … ⑭

を作成した。

3. げっ歯動物ノロウイルス RNA レプリコン候補遺伝子

げっ歯動物ノロウイルスは培養細胞で増殖が可能であるので、その遺伝子を利用して複製可能な RNA レプリコンを作り出すことが可能であると期待される。また、ヒトノロウイルスの RNA レプリコン作成において良い対照となると思われる。

げっ歯動物ノロウイルス MNV1 株に由来するレプリコン候補遺伝子は昨年度作成した。

pBMT7MNV1NS-HCVIRES-Neo-Tt …⑮

pBMT7MNV1NS-HCVIRES-GFPNeo-Tt…⑯

4. RNA レプリコン候補遺伝子の細胞への導入

チバ株由来遺伝子を含む候補遺伝子②、および、MNV1 株由来遺伝子を含む候補遺伝子⑯から、in vitro で Cap 構造を付加した RNA を合成した。これを OptiPRO 無血清培地に馴化した Vero 細胞にトランスフェクションし、200 µg/mL の G418 で選択したが、薬剤耐性を示す細胞は得られなかった。

5. 構造タンパク質を恒常的に発現する培養細胞株の樹立

昨年度、pEBMulti-Bsd および pEBMulti-Ble (和光純薬; EB ウイルス由来の遺伝子を含み、細胞に導入した際エピゾームとして複製する) にチバ株 ORF2 (VP1 タンパク質) および ORF3 (VP2 タンパク質) を含む遺伝子断片を挿入したプラスミドを作成した。

pEBAgCVORF2,3-Bsd …⑰

pEBAgCVORF2,3-Ble …⑱

これらのプラスミドにおいて ORF2, ORF3 の発現を制御するのは CAG プロモーターである。これをヒト EF1- α プロモーターに置き換えたプラスミド、

pEBEFCVORF2,3-Bsd …⑲

pEBEFCVORF2,3-Ble …⑳

も作成した。

MNV1 株についても同様に、以下のプラスミドを作成した。

pEBEFMNV1VP-Bsd …㉑

pEBEFMNV1VP-Ble …㉒

以上 6 種のプラスミドをそれぞれ OptiPRO 無血清培地に馴化した Vero 細胞にトランスフェクションし、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のブラストサイジン S、あるいは、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼオシンで選択を続けたところ、継代可能な薬剤耐性細胞株を得ることができた。

D. 考察

今回レプリコン候補遺伝子から調製した合成 RNA では薬剤耐性を示す Vero 細胞を得ることができなかったが、トランスフェクション試薬を用いた遺伝子導入であったため、細胞への RNA 導入量が少なかった可能性がある。今後、エレクトロポレーションで合成 RNA を

Vero 細胞に導入したい。また、PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞 (ヒト肝がん由来)、Huh-7 (ヒト肝がん由来)、Caco-2 (ヒト結腸がん由来)、COLO-320 (ヒト結腸がん由来)、HeLa (ヒト子宮頸がん由来)、HEK293 (ヒト胎児腎由来) 等を試す。

チバ株、あるいは、MNV1 株の構造タンパク質を導入し、薬剤で選択して耐性を獲得した Vero 細胞はそれぞれの構造タンパク質の発現を確認する必要がある。

E. 結論

ノロウイルスチバ株および MNV1 株の RNA レプリコン候補遺伝子を作成した。

ノロウイルスチバ株および MNV1 株の構造タンパク質遺伝子を有するプラスミドを Vero 細胞に導入し、薬剤耐性を示す細胞株を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

本年度はなし

2. 学会発表

本年度はなし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用登録新案

なし

3. その他

なし

マウスノロウイルスのベクター化に関する研究

分担研究者 中西 章 国立長寿医療研究センター

老化制御研究部遺伝子治療研究室・室長

研究協力者 吉田和央 国立長寿医療研究センター

老化制御研究部遺伝子治療研究室・流動研究員

研究要旨 現在ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス (MuNoV) を用い、そのベクター化の試みを行った。VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によってウイルス遺伝子発現の誘導を観察できた。この結果は、MuNoV ベクター化への可能性を開くもので有り、MuNoV の感染増殖系を利用した HuNoV カプシドタンパク質解析系開発への糸口となる。

A. 研究目的

ヒトノロウイルス (HuNoV) による集団感染の流行により毎年日本は甚大な人的、経済的な負担を余儀なくされている。特に高齢者への感染は、死亡例をしばしば引き起こすことから、高齢者医療にとってその感染予防・防御は不可欠である。しかしながら、HuNoV の感染増殖を支持する細胞が見つからないため、その感染制御・予防につながる基礎研究は遅れている。本研究では、ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス (MuNoV) を用い、HuNoV カプシドタンパク質機能を解析できる実験系を構築すべく、MuNoV のウイルスベクター化を試みた。

ウイルスベクター化には一般的にウイルス増殖を阻害せずかつウイルス増殖とは独立に構造タンパク質 (カプシドタンパク質) をトランスに補完する実験系を作成することが必要である。しかしこれまでの研究から、トランスに発現させたカプシドタンパク質はウイルス増殖を顕著に阻害することが明らかになっている。このため本年度は、種々の発現ベクターの中から、MuNoV 感染性粒子の形成を阻害しないようなカ

プシドタンパク質発現方法を検討した。またウイルスベクター化のためには、トランスでカプシドタンパク質を補完しつつ、ウイルス増殖を損なわずにカプシドタンパク質発現を抑制 (例えばその遺伝子コード配列の除去) するシステムを構築する必要がある。しかし、主要カプシドタンパク質 VP1 をコードする配列の遺伝子操作は、殆どの場合 MuNoV RNA 複製を阻害するような現象が見られ、VP1 コード配列の操作は、そのままでは難しいことが予想された。一方、非主要カプシドタンパク質 VP2 コード配列 (ORF3 配列) は、前年度の研究結果あるいは Thorne et al. JVI (2012) の結果にもあるように、ウイルス増殖を阻害せずに遺伝子操作が可能とされる数少ない領域と考えられている。本年度は、この領域を標的として遺伝子操作を試み、VP2 を発現できない変異体に対してトランスに VP2 を供給した状態で粒子形成、そしてウイルス遺伝子発現 (ウイルス増殖) が可能か検討した。

B. 研究方法

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS

MuNoV S7 DNA (国立感染症研究所片山和彦先生より分与)を元にして、同じEF1 α プロモーターで発現する pKS MNV ORF23、pKS MNV ORF3、プロモーター部分を HCMV immediate early promoter と SV40 early promoter を組み合わせたものに交換した pSCMV MNVORF23、pSCMV MNVORF3、そして HCMV immediate early enhancer ~Chicken beta actin promoter ~beta-globin splicing signal のハイブリッドプロモーター (CAG プロモーター) より発現する pCAG MNV ORF23、pCAG MNV ORF3、最後に SV40 early promoter より発現する pSG MNV ORF23、pSG MNV ORF3 を作成した。

MuNoV ORF3 の欠損変異体として、VP2 コード領域 (208a. a.) の 4-105a. a.、53-156a. a.、115-205a. a.、そして 4-205a. a. コード部分を欠損したそれぞれ Δ N、 Δ M、 Δ C、 Δ を作成、また点変異体として、VP2 の 7、10 番目のコドンをストックコドンに置換した変異体 (ORF3 stop +) を作成した。

これらの pKS MNV S7 DNA そしてその変異体を単独に、あるいは pKS MNV ORF23 DNA 等と共に、293T 細胞にトランスフェクションによって導入し、24-48 時間後にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させた。48 時間後に細胞を固定し、MuNoV 遺伝子発現の有無を VP1/VPg の免疫染色により確認し、293T 細胞上清の感染性粒子の存在を検証した。ORF2、ORF3 の発現レベルは、モルモット抗 VP1、あるいはモルモット抗 VP2 抗体を使用し Western blot により検出、発現量を比較した。

Mouse Stem Cell Virus (MSCV) ベクターでの VP2 発現を行うため、MSCV-IRES-EGFP の IRES 上流に ORF3 コード領域を挿入した MSCV-VP2-IRES-EGFP を作成した。MoMuLV の gag-pol 遺伝子を恒常発現する 293gp 細胞に対して、VSV-G を発現する pCMV-VSV-G と MSCV-VP2-IRES-EGFP をトランスフェクションして作成した MSCV ベクターを RAW264.7 細胞に導入することにより、MuNoV を発現する RAW VP2 細胞を作成した。

C. 研究結果

MuNoV 増殖を阻害しないでカプシドタンパク質を共発現できる条件を検討するため、293T 細胞にトランスフェクションにて感染性粒子を形成させる実験系を利用した。まず、MuNoV 感染性ゲノム配列をコードする pKS MNV S7 を各種カプシドタンパク質発現 DNA と共に 293T 細胞へ導入した。次に、その細胞上清を RAW264.7 細胞へ共培養し、出現する MuNoV VP1/VPg 陽性細胞の数から感染性粒子の存在を検証した。pKS MNV 7 と共に、pKS MNV ORF23、pSCMV MNVORF23、pCAG MNV ORF23、pSG MNV ORF23、それぞれを導入した 293T 細胞上清を RAW264.7 細胞と共培養した際、pKS MNV ORF23 の場合を除き、VP1/VPg 陽性細胞の出現は抑制されていた。Western blot で発現する ORF3 の量を検出し、293T 細胞へ導入する際に pKS MNV S7 との量比を変えるなど、のアプローチを行ったが、例えば SV40 promoter による弱い発現誘導であっても、ORF23 の発現は感染性粒子形成に抑制的に働いた。一方、感染性 MuNoV ゲノムと ORF3 の共発現については、pKS MNV ORF3、pSCMV MNVORF3、pCAG MNV ORF3、pSG MNV ORF3 などそれぞれの ORF3 発現ベクターと pKS MNV S7 と共に 293T 細胞に導入しその細胞上清を RAW264.7 細胞と共培養した場合、pCAG MNV ORF3 との共導入の場合以外では、pKS MNV S7 単独導入された細胞上清を使用した場合とほぼ同程度の VP1/VPg 陽性 RAW264.7 細胞が観察できた。つまり ORF3 のみの共発現は ORF2 が共存する場合に比べて感染性粒子の形成の抑制は軽いと考えられた。以上の実験結果から、293T 細胞での VP1 タンパク質の共発現に使用するプロモーターとして EF1 α (pKS MNV S7 由来) が適切であり、VP2 の共発現は量の多少に関わらずウイルス増殖への影響は小さいと思われた。

ORF3 の欠損変異、 Δ N、 Δ M、 Δ C、 Δ 、そして点変異 stop + の各変異体を 293T 細胞にトランスフェクションし、その細胞上清を RAW264.7 細胞に共培養させることにより感染性粒子の形成を調べた。全ての変異体について 293T 細

胞に導入した際の細胞上清には、RAW264.7細胞をVP1/VPg陽性にできるものはなく、感染性粒子の形成は見られなかった。以上の変異体についてさらに、293T細胞へpKS MNV ORF23あるいはpKS MNV ORF3との共導入を行い、293T細胞内でのVP2の補完を試みたが、その細胞上清の中にはRAW264.7細胞をVP1/VPg陽性にできるものはなかった。しかし同じ上清をRAW VP2と共培養したところ、293T細胞への ΔN , ΔM , stop+の各変異体とpKS MNV ORF3の共導入、 ΔM とpKSMNV ORF23の共導入で得られたその細胞上清にはRAW VP2細胞でウイルス遺伝子発現を示すVP1/VPg陽性細胞の出現が認められた。

D. 考察

トランスでウイルス遺伝子産物を補完するシステムを検討するため、種々のプロモーターを利用したカプシドタンパク質発現が、MuNoV感染性粒子の形成に及ぼす影響を検討した。その結果、EF1 α , HCMV/SV40, CAG, SV40の各プロモーターによるORF23の共発現は、EF1 α プロモーターによる場合を除き、どのプロモーターでもORF23を発現すると感染性粒子形成の抑制が見られた。一方、ORF3の共発現は、CAGプロモーターの場合を除き、感染性粒子形成を抑制しなかった。これらの結果は、VP1タンパク質発現量の制御は感染性粒子形成に必要であることを意味している一方でVP2の共発現については、その発現量の多少については粒子形成への影響は小さいことが明らかになった。許容できるVP2の発現量のウィンドウが広いことは、今後VP2の補完によるベクター作成も可能であることが予想できる。

実際、293T細胞内での組換えMuNoV粒子の形成過程、そしてpermissiveな細胞(RAW264.7細胞)内でウイルス遺伝子発現での過程、の両方にVP2を補完した場合、ゲノム自身にVP2を欠損していても、ウイルス遺伝子発現を開始できることが示された。このことは、VP2は構造タンパク質としての役割だけではなく、ウイルス遺伝子発現に対しても機能的な役割を果たしていることが示唆される。また、VP2コード領

域のC末端部分の欠損については、VP2が補完されていてもウイルス遺伝子発現が見られなかった。ノロウイルスのゲノム配列は解析が進んでいないこともあり、RNA二次構造をとって機能的なシスエレメントとして機能している領域が各所に存在していることが考えられる。同様な結果はFeline Calicivirusでも報告されており(Sosnovtsev et al. JVI 2005)、VP2のC末端部分の配列にはこのようなシスエレメントが存在している可能性がある。

E. 結論

VP2コード領域を欠いた複製欠損型MuNoV変異体は、VP2の共発現によりウイルス遺伝子発現を誘導することが出来た。この結果は、ノロウイルスにおいて初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になったことを示しており、HuNoVカプシドタンパク質機能を解析できる実験系としてのMuNoVベクター系の構築へ前進した。

F. 研究発表

論文発表

Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 111: E4043-E4052 (2014)

学会発表

1. Nakanishi A, Tange S, Tasaki H, Zhou Y. Association of autophagic process during human astroviral infection. **American Society for Virology** (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, United States

2. 中西 章、山本真由子. ポリオーマウイルスの細胞感染効率はVp2/3が関与する細胞内移行ステップに影響される. 第62回日本ウイル

ス学会学術集会 2014年11月12日 横浜

3. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西 章、脇田隆字、片山和彦. レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月11日 横浜

4. Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A. Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes. 第37回日本分子生物学会 2014年11月27日 横浜

5. Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. **17th International Conference on Emerging Infectious Diseases** (2015) Jan. 29. Taipei, Taiwan

G. 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。

ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団の包括的遺伝系統解析

担当責任者 氏名：本村 和嗣 所属：大阪大学微生物病研究所 日本—タイ新興再興感染症共同
研究センター 役職：特任准教授 (常勤)

研究要旨

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。我々は、ヒト集団における優位なノロウイルスの特徴を抽出するため、集団食中毒が発生した4集団を対象にした。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス配列を包括的に収集し、遺伝子型および亜株の比較を行った。本解析で優位に検出されたGII.4 2006b亜株は、どの集団でもウイルスコピー数が高く、複製能・増殖能に優れたウイルスである可能性が示唆された。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供したい。

A. 研究目的

ノロウイルスは、河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中に、多様な遺伝子型が混在している。飯塚らは、第60回本学会にて、2012年3月に発生した集団食中毒事例の原因汚染食材よりパンソルビントラップ法を用い、原因微生物として、ノロウイルス GII.2 と GII.4 を検出したと報告した。本研究では、本集団食中毒発生事例のノロウイルス感染者体内におけるウイルス亜集団の実態を明らかにすることを目的とする。次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス カプシド遺伝子シェル領域 (330bps, 24 検体) の配列情報を収集し、感染者体内に存在する亜株、遺伝子型の種類と頻度を解析した。

ヒト集団におけるノロウイルス感染伝播、拡大の解明となる基盤情報が得られる。

個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重

要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2012年3月に島根県で発生した集団食中毒事例を対象に解析した。原因施設調理従事者 (n=7) から、汚染食材を介して、原因施設弁当喫食者 (n=9)、関連施設 A 料理喫食者 (n=3)、関連施設 B 料理喫食者 (n=6) と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、糞便に PBS を加え 10% 懸濁液を作成し、11000×g、20 分間遠心の後、その上清を RNA 抽出液とした。この RNA 抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、ノロウイルス RNA を抽出した後、G2SKR (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いて cDNA を合成した。cDNA を template にして、カプシド遺伝子シェル領域を PCR で増幅した。ION TORRENT (Life technologies) を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-house の配列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調

べ比較した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) カプシド遺伝子シエル領域の配列情報 (1503418 配列: 約 5.0×10^8 塩基 / 25 検体) を取得した。(ii) シエル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、25 検体中 23 検体で検出された。(iii) 食中毒事例では原因施設調理従事者群 (n=7) は 7 種、原因施設弁当喫食者群 (n=9) は 7 種、関連他施設 A 料理喫食者群 (n=3) は 4 種、関連他施設 B 料理喫食者群 (n=6) は 5 種の、異なる遺伝子型と亜株が検出された。(iv) 2012 年秋冬期に大流行した GII.4 2012 Sydney は、個体内に微小集団 (0.1 - 22.0 %) として、13 例で検出された。(v) 2006b は、調理従事員発症者群で 7 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.2×10^9 copies/g であった。弁当喫食者で 9 名中 9 名検出され、平均ウイルスコピー数は 6.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 A 料理喫食者群は、3 名中 3 名検出され、平均ウイルスコピー数は 4.4×10^9 copies/g であった。関連他施設 B 料理喫食者群は、6 名中 6 名検出され、平均ウイルスコピー数は 1.8×10^9 copies/g であった。

D. 考案

集団食中毒事例では、シエル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染が多いことがわかった (23/25 例)。2006b 亜株は、原因施設調理従事者群 (n=7)、種、原因施設弁当喫食者群 (n=9)、関連他施設 A 料理喫食者群 (n=3)、関連他施設 B 料理喫食者群 (n=6)、以上、4 群で、平均ウイルスコピー数が、 10^9 copies/g で極めて高かった。このことにより、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイ

ルス亜集団が抽出されるボトルネックが生じている可能性が示唆された。2012-2013 秋冬期に日本国内で流行した GII.4 2012 Sydney が、ヒト個体内で、微小集団として、2012 年 3 月に存在していることが判明した。今後、先端技術を用いたゲノム情報収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行監視、および、流行予測の基盤情報となることが期待される。ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

E. 結論

今年度は、次世代シーケンサーを用いて、個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにした。次年度は、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイルスが流行形成するという作業仮説を証明するために、VLP を作成して、温度変化、pH 変化への安定性の比較、VLP を用いた IgA 抗体価の動態を加えて、検証を続けていきたい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

飯塚節子先生 (島根県保健環境科学研究所)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel Hum Mol Genet. Vol.9 2014 p1-p12

2. 学会発表

国際学会

1. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
2. **Motomura K.**, Introduction of application study on NGS. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
3. **Motomura K.**, Yokoyama M., Ode H., Oka T., Katayama K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Takeda N., Norovirus Surveillance Group of Japan. Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
4. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. Asian-African research forum on emerging and reemerging infections. :2014; Sendai
5. **Motomura K.**, Takeda N., Distribution of Norovirus Genotypes through Genomic Analysis in Japan and Thailand. JGRID Vietnam-Thailand seminar :2014; Hanoi
6. **Motomura, K.**, Ode, H., Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Takeda N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute gastroenteritis IUMS :2014; Montreal
7. Sato H., Yokoyama M., Nakamura H., **Motomura, K.**, Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks IUMS :2014; Montreal

8. **Motomura, K.**, Norovirus Surveillance Group of Japan. Genetic evolution of norovirus for survival in human population as a strategy DASAN Conference :2014; Kyungju

9. Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., **Motomura K.**, Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I. Dominant mutations in ORA11 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel World Muscle Society ;2014; Berlin

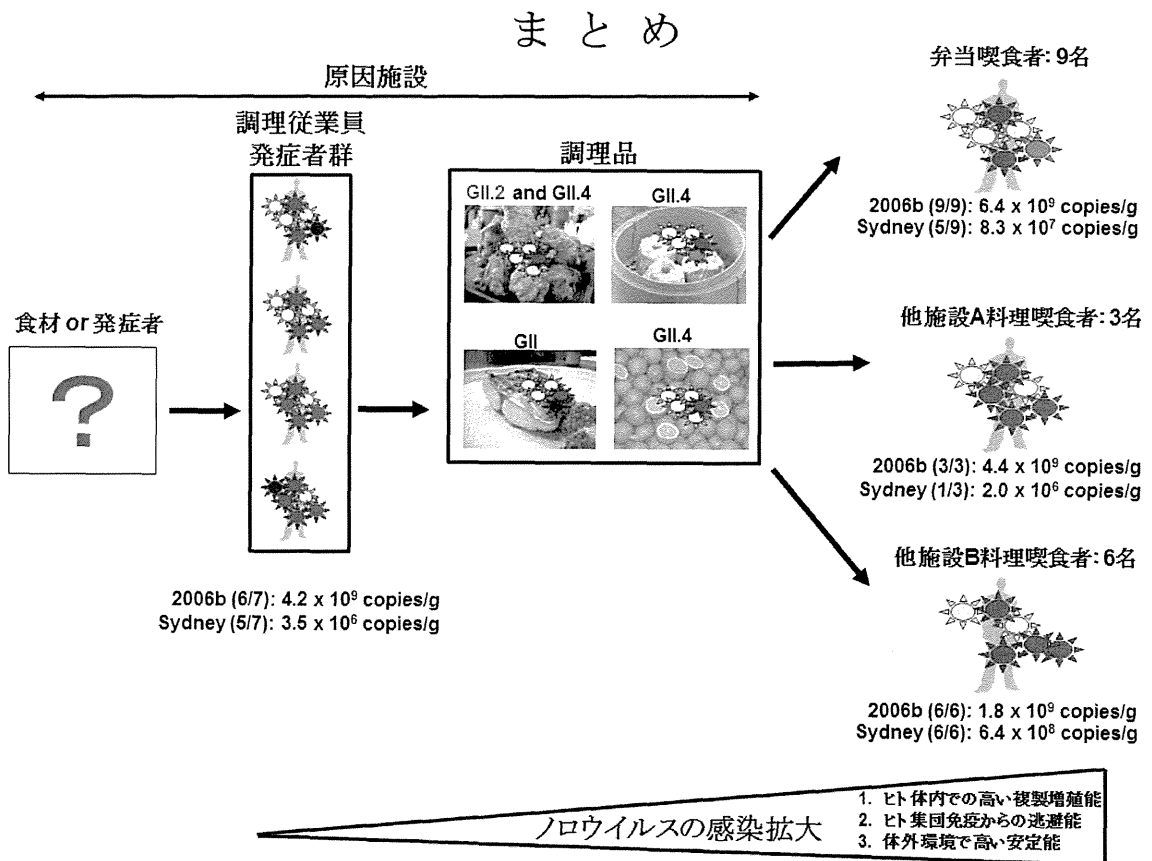
国内学会

10. **本村和嗣**、横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス感染者体内における混合感染の解析 第88回日本感染症学会学術集会 ;2014; 福岡
11. **本村和嗣**、飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和、ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
12. 佐藤裕徳、横山勝、**本村和嗣**、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
13. Saeng-aroon S., Locket R., Plipat T., Sangkitporn S., Kondo M., Takebe Y., Nakayama E., Takeda N., **Motomura K.**, Shioda T., Distribution of HIV-1 subtypes in female sex workers recently infected with HIV-1 in Thailand. 第62回日本ウイルス学会学術集会. ;2014; 横浜
14. 佐藤裕徳、**本村和嗣**、横山勝 ノロウイルスの多様性と進化の制約 第37回日本分子生物学会. ;2014; 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図 1



野生ネズミ由来ノロウイルスの遺伝子解析

分担研究者 遠矢 幸伸 日本大学 生物資源科学部 教授

研究協力者 佐藤 豪 日本大学 生物資源科学部 助手

研究要旨 韓国の済州島で捕獲された野生のチェジュセスジネズミの腸管内容物より検出された新規ノロウイルス（NoV）の性状解明を目的として、そのゲノムの塩基配列の解析を行い、3' 側 2,876 塩基の配列を決定した。得られた塩基配列を用いた系統樹解析では、実験用マウス由来 NoV とは独立した野ネズミ由来の NoV の枝をハンガリーのセスジネズミやスコットランドのモリアカネズミ由来の NoV とともに形成し、新規 NoV のグループを構成することが示された。

A. 研究目的

ヒト NoV は培養細胞での増殖が不可能であるが、実験用マウス由来の NoV は培養細胞での増殖が可能であるため、実験モデルとして活用されている。一方、マウス以外の野生げっ歯類にも遺伝学的に異なる NoV が存在することが新たに報告され、マウス由来 NoV とは宿主特異性なども異なる可能性が示唆されている。昨年度は、動物由来新規ノロウイルス（NoV）の分離を目標として、逆転写（RT）-PCR 法によるウイルスゲノムの検出を試みたところ、韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物より、新規 NoV 遺伝子が検出された。そこで、本年度はチェジュセスジネズミ由来 NoV のゲノム解析を進めた。

B. 研究方法

昨年度の研究で NoV 遺伝子が検出された 4 検体のチェジュセスジネズミ由来腸管内容物を用いた。PBS を用いて各検体を 10%乳剤とし、15,000 rpm、5 分間遠心した上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した。RT-PCR は昨年度に決定した ORF3

内の領域の塩基配列をもとにデザインしたプライマー並びに各種ネズミ由来 NoV の塩基配列から推定される配列に基づくプライマーを用い、PrimeScript II Reverse Transcriptase (TAKARA) を使用して cDNA 合成を行い、PCR には PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA) を使用した。その後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) で染色、観察した。増幅産物が得られた場合は、DNA バンドを精製し、塩基配列を常法に従い決定した。

得られた塩基配列情報は ATGC-Win ver. 7 および Genetyx-Win ver. 11 (株式会社ゼネティクス) を用いてアセンブルし、系統樹は MEGA ver. 6 を使用して作成した。

C. 研究結果

チェジュセスジネズミ由来腸管内容物 4 検体のうち、1 検体 (No. 76) において、ORF2 及び ORF3 を含む NoV ゲノムの 3' 側領域 2,867 塩基の配列を決定できた。ORF2 全領域の配列を用いた系統樹解析を行ったところ、実験用マウス由来 NoV とは別のクラスターをヨーロッ

パの野生ネズミから検出された NoV と形成した。特に、ハンガリーのセスジネズミで検出された NoV に比較的近縁で、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは別のクラスターを形成した。

実験用マウス由来 NoV、野生げっ歯類由来 NoV との相同性を調べたところ（塩基/アミノ酸）、ORF2 は、実験用マウス由来とは 76.4%–77.9% / 82.6%–85.0%、野生げっ歯類由来とは 78.8%–86.9% / 85.7%–92.4%であった。また、アミノ酸配列における変異を調べると、P2 領域において変異が多く認められた。

ORF2 領域上には第 14–652 塩基 (639 nt) に推定 ORF4 領域が確認され、スコットランドのモリアカネズミの NoV (Apo 450) の推定 ORF4 (618 nt) より 21 塩基長かった。相同性は、実験用マウス由来 MNV とは 84.5%–85.8% / 61.5%–64.7%、ハンガリーのセスジネズミ由来 NoV とは 92.0%–93.6% / 79.3%–83.5%、スコットランドのモリアカネズミの NoV とは 85.8% / 69.9%であった。

D. 考察

本研究では、韓国の済州島において固有種であるチェジュセスジネズミから新たな NoV 遺伝子が検出された。系統解析の結果、この NoV 遺伝子が既知のどの系統とも異なることが示唆された。これまでにスコットランドでモリアカネズミ、ハンガリーでセスジネズミ、日本でアカネズミとクマネズミという野生げっ歯類から NoV 遺伝子が検出されていることから、NoV は広範な地域において、多様な種類のげっ歯類に保持されている可能性が示された。

NoV の ORF2 領域は、カプシド蛋白をコードする領域で shell domain (S) と protruding domain (P) に分けられる。P は P1 と P2 のサブドメインに分けられ、P2 はウイルスの最表層に飛び出し S–P1–P2–P1 の順に並んでいる。ウイルスの遺伝型によって構造が微妙に変化しており、すなわち P2 領域は抗原性や細胞レセプターに関係し遺伝型による違いを微細形態学的に反映している。野生げっ歯類由来 NoV は、その P2 領域を

実験用マウス由来 NoV と比べると多くのアミノ酸が異なっていた。このことから、野生げっ歯類由来 NoV は実験用マウス由来 NoV とは抗原性や細胞レセプターが異なっていると推定される。加えて、チェジュセスジネズミの NoV の ORF2 内にも ORF4 領域が同定され、実験用マウス由来 NoV と同様の宿主の免疫抑制とウイルス複製に影響する機能を有すると考えられる。

E. 結論

チェジュセスジネズミから検出された NoV ゲノムの塩基配列 (2,876 塩基) を決定し、マウス由来の NoV とは異なる特性を有する NoV であることが示唆された。培養細胞での分離はまだできていないが、今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして非常に期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus. *J. Virol. Methods.* 207: 178–81 (2014)
2. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K, Tohya Y. Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *J Vet Med Sci.* 76: 1045–50 (2014)

G. 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。

ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立

分担研究者 佐藤 俊朗 慶應義塾大学医学部 消化器内科 特任准教授

研究要旨 食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因となるノロウイルスは，腸管上皮細胞に感染すると考えられているが，培養細胞感染系が確立されておらず，その感染メカニズムは明らかでない．我々はヒト腸管上皮細胞の培養技術を世界に先駆けて開発し，この培養技術を用いて，ノロウイルス培養細胞感染系の確立を目指す．

培養ヒト腸管上皮細胞は培養細胞株と異なり，細胞ストレス感受性が極めて高いため，ウイルス感染等の処置に対する抵抗性を示したが，我々は三種のウイルス（レンチ，アデノ，レトロウイルス）の GFP 発現ベクターを用いて，ヒト腸管上皮細胞に対するウイルス感染条件の最適化に成功した．また，ノロウイルス研究者の培養上皮細胞感染系開発のための基盤的な整備を行い，本年度は，ヒト腸管上皮細胞の供与に関する倫理申請の承認を得た上，腸管上皮細胞培養技術，ウイルス感染プロトコールの直接指導などを行った．今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される．

A. 研究目的

本研究課題であるノロウイルスは，食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因として有名だが，培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないウイルスで，ヒトが唯一の感受性動物と考えられている．ヒトの空腸の上皮細胞に感染して繊毛の萎縮と扁平化，さらに剥離と脱落を引き起こして下痢を生じると考えられているが，このような現象がどのようなメカニズムによるものなのかは不明であり，感染拡大を防ぐ有効な手段がないのが現状である．腸管上皮細胞の培養が困難であったため，このようなメカニズムの解明はすすんでいなかった．我々は，2009年に世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養系の確立を報告し，2011年にはヒト腸管上皮幹細胞の培養系を確立した．本研究では，このヒト腸管上皮幹細胞培養を用い，ノロウイルスの培養細胞感染系を確立することで，治療・予防につなげることを目的とする．

B. 研究方法

ヒト腸管上皮粘膜より腸管上皮陰窩を採取し，マトリゲルに包埋し，ヒト腸管上皮幹細胞培養に最適化した培地（Advanced DMEM/F12, EGF, Noggin, R-spondin, A83-01, SB202190, Wnt-3A）により培養を行う．培養により腸管上皮細胞は三次元組織様構造体オルガノイドを形成し，永続的な培養が可能となる．

GFP 発現カセットを有する自己不活型第三世代レンチウイルスベクターより高力価ウイルス上清を作成し，ヒト腸管上皮幹細胞のウイルス感染システムを確立する．当研究室では病原性ウイルスの取り扱いが困難であるため，倫理申請を行った上で，ノロウイルス研究者への培養腸管上皮細胞の供与，培養指導を行い，感染プロトコールの構築に関して宿主側の培養条件のアドバイスを行っていく．