

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、225cm<sup>2</sup> 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 10<sup>5-9</sup> 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

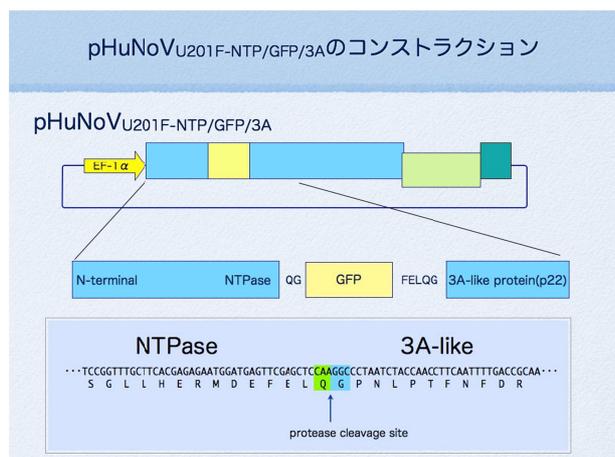
菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して作製した ( Nterm, NTPase, VPg, Protease RdRp, VP1, VP2 と表記する。)

## 2. MuNoV、HuNoV の RGS

pHuNoV<sub>U201F</sub> (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<sub>S7F</sub> (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

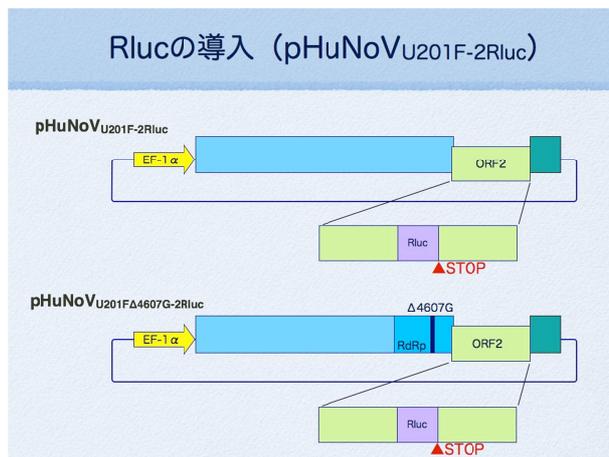
RGSでは、プラスミドを細胞内にトランスフェクションすると、EF-1 プロモーター下流に挿入したHuNoV, MNVのゲノムがドライブされる。その後、ウイルスの複製サイクルが再現されて、感染性粒子が放出される。我々は、GFP等の蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子を作るべく、ORF1に GFP遺伝子を導入した。GFP遺伝子の5'側、3'側それぞれに自身のコードするproteaseで切断されるよう、protease認識モチーフを導入した(図1)。



(図1)

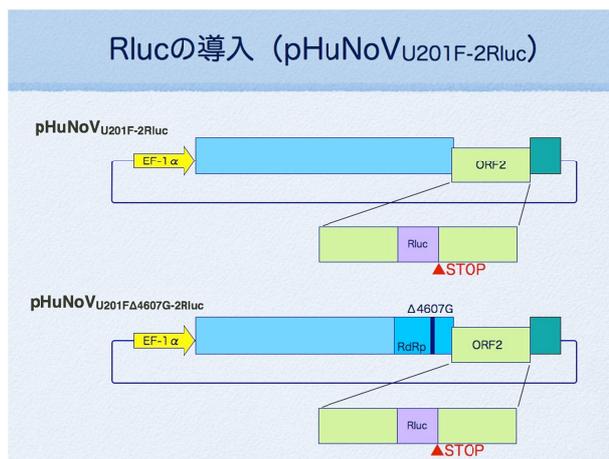
NoVの特徴の一つに、sub-genomic RNAの合成がある。NoVが感受性細胞に感染するとORF1が翻訳され、非構造タンパク質が合成される。非構造タンパク質にはRdRpが含まれている。RdRpが合成されて成熟すると、ゲノムRNAの転写に加え、

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<sub>U201F</sub> Δ4607G-2GFPを作製して陰性コントロールとした。



(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)。



(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、ヒトの小腸パ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。

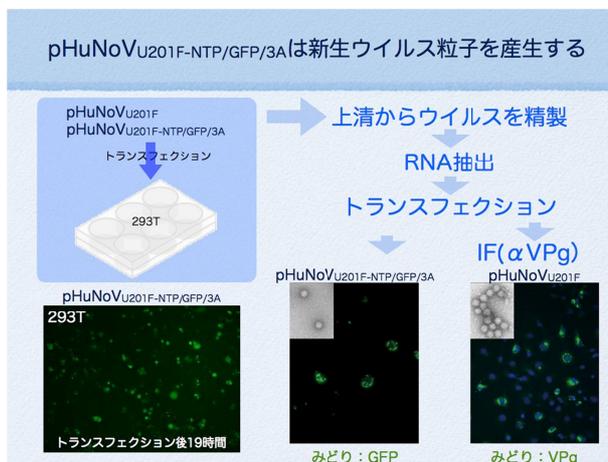
Wnt 溶液、Notch シグナル、上皮成長因子(EGF)、Bone morphogenetic protein: BMP 阻害物質の内、Wnt 以外は、購入後、小分け分注を行い、-80 に小分け分注した。Wnt 溶液については、必要に応じて慶応大学佐藤准教授の教室より分与されることとなった。その他の市販サプリメントも購入後、同様に小分け分注して保管した。

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

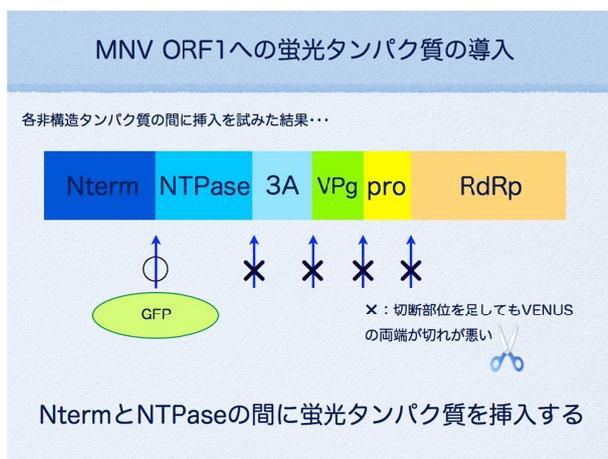
GFP 遺伝子を NTPase コード領域と 3A-like protein コード領域の間に挿入したコンストラクト pHuNoV<sub>U201F-NTP/GFP/3A</sub> を、細胞のトランスフェクションすると、細胞内部にブロードに GFP の発光が認められた。上清からウイルスを精製し、電子顕微鏡で観察すると、図 3 に示したように新生ウイルス粒子が観察された。新生ウイルス粒子産生効率は、pHuNoV<sub>U201F</sub> と比較すると 1/10 から 1/100 程度であった。新生ウイルス粒子から RNA を抽出し、抽出した RNA を細胞内にトランスフェクションすると、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。



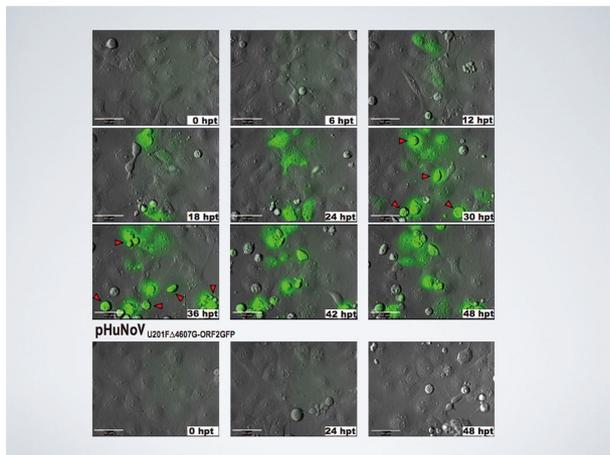
(図 4)

N-terminal protein と NTPase の間に GFP を挿入したクローン pMNV<sub>S7F-Nterm/GFP/NTP</sub> 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<sub>S7F-Nterm/GFP/NTP</sub> 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<sub>S7F-Nterm/GFP/NTP</sub> 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<sub>U201F-2GFP</sub> とネガティブコントロール pHuNoV<sub>U201F-4607G-2GFP</sub> 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)。

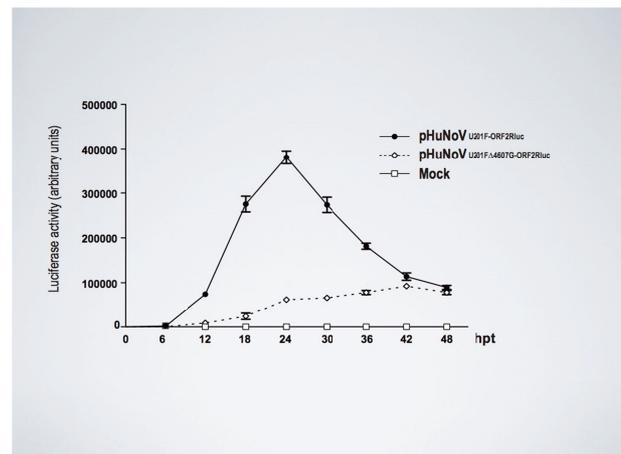


(図 5)

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<sub>U201F-4607G-2GFP</sub> 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<sub>U201F-2RS</sub>、pHuNoV<sub>U201F-4607G-2RS</sub> 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<sub>U201F-2RS</sub> 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<sub>U201F-4607G-2RS</sub>

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<sub>U201F-2RS</sub>、pHuNoV<sub>U201F-4607G-2RS</sub> 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た。



(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.
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.

#### 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.

## 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。