

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 ...

pT7CVORF1-HCVIRES-GFPNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo2-Tt ...

( は 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 ...

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucNeo-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucNeo-Tt ...

の Neo に換えて Puro を導入した、

pT7CVORF1-HCVIRES-Puro-Tt ...

を作成した。 の AscI-Bsp119I 部位に EGFP、FLuc、RLuc、NLuc を挿入し、

pT7CVORF1-HCVIRES-EGFPPuro-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucPuro-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucPuro-Tt ...

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucPuro-Tt ...

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 ...

pT7CVORF1-dsNLucNeo-Tt ...

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 を作成した。更に の Neo を Puro に置き換えた、 pT7CVORF1-dsNLucPuro-Tt ... 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 ...

pBMT7MNV1NS-HCVIRES-GFPNeo-Tt...

## 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、および、MNV1 株由来遺伝子を含む候補遺伝子から、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 ...

pEBAgCVORF2,3-Ble ...

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 $\alpha$  プロモーターに置き換えたプラスミド、

pEBEFCVORF2,3-Bsd ...

pEBEFCVORF2,3-Ble ...

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 ...<sup>①</sup>

pEBEFMNV1VP-Ble ...<sup>②</sup>

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  $\mu$ g/mL のプラストサイジン S、あるいは、250  $\mu$ g/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