

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 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 N, M, C, 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 (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、N, M, C, 、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陽性にできるものではなく、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陽性にできるものもなかった。しかし同じ上清をRAW VP2と共培養したところ、293T細胞へのN, M, stop+の各変異体とpKS MNV ORF3の共導入、M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, HCMV/SV40, CAG, SV40の各プロモーターによるORF23の共発現は、EF1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。