

集団発生については、全 11 分節の塩基配列の解析を更に進めて、系統樹を作成する事により詳細な検討を加える。上記の検討を継続する事により、北海道におけるロタウイルス遺伝子型の変遷の検討が可能であり、今後のワクチン戦略に貴重なデータとなると考えられる。

## F. 研究発表

### 2. 論文発表(発表誌名巻号・頁・発行年記入)

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 津川毅. ロタウイルス～その病原性とワクチンについて～(第 55 回日本臨床ウイルス学会、2014.6.14-15. 札幌)
- 2) 津川毅. ロタウイルスの病原性とワクチン制御(日本ウイルス学会北海道支部第 48 回夏季シンポジウム、2014.7.12-13. 美瑛)
- 3) 津川毅. ロタウイルスワクチン(第 26 回ウ

イルス性下痢症研究会、2014.11.9. 東京)

4) Tsugawa T. Molecular biological mechanism of rotavirus virulence and vaccine (第 62 回日本ウイルス学会、2014.11.10-12. 横浜)

5) 近藤謙次、津川毅、堤裕幸. 乳児院におけるロタウイルス胃腸炎 8 流行の分子生物学的解析(第 62 回日本ウイルス学会、2014.11.10-12. 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  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## 家畜の A 群ロタウイルス及び糞便由来の新規ウイルスの分子疫学解析

担当責任者	水谷 哲也	東京農工大学	教授
研究協力者	長井 誠	東京農工大学	特任准教授

### 研究要旨

ロタテックのウシへ感染および新たなリアソータントの出現を監視する。さらに、ブタやウマにおいても同様の監視をすることにより、家畜間の感染環を把握する。この研究の過程で、ロタウイルスの検出法や遺伝子型の判定方法を開発し、ロタウイルスの研究に貢献する。

#### A. 研究目的

家畜のロタウイルスを監視することにより、ヒトを含めたロタウイルスがどのように生物の間で蔓延していくかを把握することを目的とする。解析に次世代シーケンサーを用いることにより、ロタウイルスのリアソータントの検出のみならず、家畜の糞便に含まれる様々なウイルス（新規ウイルスも含む）が発見される可能性があるため、RNA ウイルスを対象とした Virome 解析を実施する。

#### B. 研究方法

家畜の糞便から直接 RNA を抽出し、次世代シーケンス、RNA PAGE および RT-PCR を実施した。ロタテックの遺伝子配列を見分けるため、遺伝子解析ソフトを用い、ロタテックの遺伝子配列を参照としたマッピングによる簡便な解析法を確立し、これを用いて野外サンプルの解析を実施した。

#### C. 研究結果

ウシの下痢便について解析を行ったが、ロタテックの侵入は認められなかった。ブタおよびウマロタウイルスの解析でもロタテックの侵

入を認めなかったが、ブタロタウイルスではヒトロタウイルスとの遺伝子再集合の可能性を示すスーパーショート RNA 泳動パターンを示す株が 3 株検出され、ウマロタウイルスではウシロタウイルスと相同性の高い NSP4 遺伝子を保有する株が 20 株認められた。

また、ある県のウシの下痢便から新規ピコルナウイルスと考えられるウイルスが見つかり、遺伝子解析の結果、中国のコウモリ、イヌおよびネコから検出された未分類のウイルスとともにピコルナウイルス科内で独立したグループを形成した。

#### D. 考案

次世代シーケンスを用いたロタテック遺伝子の簡便検出法を確立し、野外材料に応用した。今回調査した限りにおいては、ロタテックはわが国のウシに感染していないことが確認されたが、今後、監視を継続していくことは必要と考えられる。ブタロタウイルスおよびウマロタウイルスの解析から、日本国内のヒトおよび家畜間に異種間伝播が起こっている可能性が示唆され、家畜のロタウイルスのモニタリングも今後続けていく必要があると思われる。

ウシの下痢便から検出された新規のピコルナウイルスはサペロウイルスおよびエンテロウイルスと近縁であるが、中国で検出された未分類のピコルナウイルスとともに新しい属を形成することが示唆された。今後、このウイルスがウシの下痢症と関連があるか、検討する必要がある。

## E. 結論

今回確立した次世代シーケンスを用いたロタテック遺伝子の検出法は、今後ロタテックの家畜への感染をモニタリングしていく上で有用である。わが国の中で、ヒトおよび家畜間の異種間伝播が発生している可能性を認めたことから、今後も監視が必要である。ウシの下痢便から検出されたピコルナウイルスは、これまで確立されている属には分類されない新規ウイルスであり、ウシへの病原性を検討する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

Makoto Nagai, Saya Shimada, Yoshiki Fujii, Hiromitsu Moriyama, Mami Oba, Yukie Katayama, Shinobu Tsuchiaka, Sachiko Okazaki, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Satoshi Koyama, Junsuke Shirai, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol* (in press)

Manabu Nemoto, Makoto Nagai, Hiroshi Tsunemitsu, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Furuya, Junsuke Shirai, Takashi Kondo, Yoshiki Fujii,

Reiko Todaka, Kazuhiko Katayama, Tetsuya Mizutani. Whole genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s. *Arch Virol* (in press)

## 2. 学会発表

### 国内会議

1. 根本 学、長井 誠、恒光 裕、大松 勉、白井淳資、近藤高志、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦、水谷哲也. 日本で分離された G3 および G14 型ウマロタウイルスの全ゲノム解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日

2. 長井 誠、島田紗彩、藤井克樹、森山裕充、大場真己、片山幸枝、土赤 忍、岡崎祥子、大松 勉、古谷哲也、小山哲史、片山和彦、白井淳資、水谷哲也. スーパーショート RNA 泳動パターンが認められた H2 NSP5 遺伝子型のブタロタウイルスの検出. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日

### 国際会議

なし

## 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

## 電子顕微鏡による下痢症ウイルスの構造解析

担当責任者 村田和義 自然科学研究機構生理学研究所 准教授

### 研究要旨

ノロ/サポウイルスウイルス様粒子（VLP）をクライオ電子顕微鏡により高分解能構造解析し、分子モデルの構築および多種下痢症ウイルスとの構造比較を行った。また、ロタウイルス粒子の宿主細胞内での構造を電子線トモグラフィーにより解明し、その形成過程の一端を明らかにした。

#### A. 研究目的

下痢症ウイルスの正確な立体構造を解明し、ワクチンや予防・治療薬の開発につなげる。

そこからウイルス粒子像を切り出し、アライメントして平均化し、未成熟のウイルス粒子の構造を再構築した。

#### B. 研究方法

##### 1) ノロ/サポウイルス VLP の高分解能構造解析

バキュロウイルス発現系により作製したノロ・サポウイルス VLP を精製し、電顕グリッド上で氷包埋してクライオ電子顕微鏡にセットして、解析に十分な数の高分解能電顕画像を取得した。これらを単粒子解析法により画像解析し、粒子の構造を三次元再構成した。得られた構造を多種のウイルスのそれと構造比較するとともに、ホモロジーモデリング法により、ウイルスキャプシドの分子構造構築を試みた。

##### 2) 宿主内ロタウイルスの電子線トモグラフィー

ロタウイルスを宿主細胞に感染させて、ウイルスが複製されるタイミングで試料を化学固定・樹脂包埋した。次に、ウイルス全体が含まれる程度の厚さ（150 nm）の厚さで超薄切片を作製し、これを 200kV の電子顕微鏡にセットして、複製されたウイルスの連続傾斜像を撮影し、電子線トモグラフィーにより立体再構築した。

#### C. 研究結果

##### 1) ノロ/サポウイルス VLP の高分解能構造解析

マウスノロウイルス（MNV）S7 株 VLP の粒子像約 5000 枚から 20Å 分解能の三次元構造を得た。このキャプシド構造は P-, S-ドメインの間の隙間が小さく、これまで知られている MNV GV.1 よりもヒト NV GI.1 に近いことがわかった。また、サポウイルス VLP の粒子像約 5000 枚から 8 Å 分解能の三次元構造を再構成し、これに構造的に近い Vesivirus の構造モデルを使ってホモロジーモデリングを行い、分子モデルを構築した。

##### 2) 宿主内ロタウイルスの電子線トモグラフィー

複製されたロタウイルスを含む宿主細胞樹脂切片のトモグラムから 15 個のウイルス粒子を切り出し平均化した結果、未成熟の粒子では、キャプシドの外側にある VP4 が見られなかった。また、ウイルスの中心に格納された 11 本ある RNA セグメントがキャプシドの 5 回対称

軸から伸びているような形態が観察された。

#### D. 考案

ノロ/サポウイルス VLP の高分解能クライオ電顕構造解析から、ウイルスの構造は、感染宿主の種類に異存せず、多様であることがわかった。このことから感染宿主を決める要因は、キャプシドの全体構造よりも局所的な構造に依存することが考えられた。また、未成熟ロタウイルスの宿主内での構造解析から、宿主内ではキャプシド構造自体が不完全で存在していること、RNA セグメントが比較的分離したかたちで存在していることが示唆された。今後はさらに高い分解能で解析を進め、宿主を選択する領域の同定と、ウイルス粒子形成過程の構造的な詳細を解明する予定である。

#### E. 結論

下痢症ウイルスの構造は、遺伝子型に依存して、宿主特異性を越えて多様な形態を取っており、未だ予測不可能な構造要素が多いことがわかった。これらを一つ一つ解明することによって、感染の分子機構を明らかにし、近い将来、

効率的なワクチンの作製や、予防・治療薬の開発につなげて行けるものとする。

#### F. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）  
なし
2. 学会発表  
国内会議：日本生物物理学会第 52 回年会シンポジウム 口頭発表（H26.9.26 札幌）  
国際会議：新学術領域「動的秩序と機能」第 4 回国際シンポジウム ポスター発表（H27.1.11 志摩）

#### 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

## ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの発現精製と結晶構造解析

担当責任者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部 研究員（流動研究員）

### 研究要旨

ノロウイルスに標的ウイルスを絞り、病原性変化への影響が示唆されている ORF1 にコードされた RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の X 線結晶構造解析を行った。大腸菌で RdRp を発現し、結晶化したヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の RdRp、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の RdRp は、ポリメラーゼとしての酵素活性を有することを確認した。その後、シンクロトロンにより X 線回折データを収集し、コンピュータプログラムによりリフレクションパターンより立体構造を構築した。構築に成功した構造と、データベース上に報告されている他の遺伝子型に由来する構造を比較したところ、全ての RdRp はクローズドコンフィグレーションであった。微細なアミノ酸配列の違いがわずかな構造の違いを導き、RNA 合成効率に影響する可能性があるが、今回の結晶構造解析の結果から推測することは困難であった。

### A. 研究目的

ヒトノロウイルス (HuNoV)、マウスノロウイルス (MNV) など、下痢症ウイルス研究において、ウイルスの複製効率に直接関係する、ポリメラーゼ (RdRp) の構造を決定することは、タンパク質の機能、そのタンパク質によるウイルス複製効率の変化、ひいては病原性を予測する上で、極めて重要である。RdRp の構造を決定し、ウイルスの病原性に与える影響を調べることを目的として研究を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. RdRp の準備

コールドショックプロモーター下に 5'末端に His-tag と Trigger factor (TF) を配置し、その直下流に RdRp コード領域が繋がるようにクローニングした。このプラスミドクローンを用いて、His-tag と Trigger factor (TF) 融合タンパク質として低温管理下において、大腸菌で過剰

発現させた。次に、His-Tag を利用して Ni-column にて、His-tag-Trigger factor (TF) 融合タンパク質を精製した。さらに、ゲル濾過によって His-tag-Trigger factor (TF) 融合タンパク質を精製した後、Thrombin を用いて His-tag-Trigger factor (TF) を RdRp から切り離し、再びゲル濾過にて RdRp のみを精製した。RdRp の *in vitro* 転写活性の測定、結晶構造解析には、この RdRp を用いた。

#### 2. 鋳型 RNA

当研究班の担当責任者である下池によって調整された 6 種類の鋳型 RNA (下記に示した) を用いて活性測定を行った。

1. +400 RNA: MNV ゲノム RNA の 5'末端から 400nt の領域
2. -400 RNA: +400 領域と相補な配列
3. +1S RNA: HuNV の 5'末端から 100nt の領域
4. -1A RNA: +1S 領域と相補な配列
5. +3S RNA: HuNV ゲノム RNA の 3'末端から

100nt 上流領域から 3'末端までの配列

6. -3A: +3S と相補な配列

### 3. RdRp による *in vitro* 転写反応系

精製 RdRp, 鋳型 RNA (5pmol)に NTPs (2mM), MnCl<sub>2</sub> (2mM), Tris · HCl pH7.5 (20mM)を加え、30°C、1 時間反応させ、鋳型から合成される新生二本鎖 (ds) RNA を検出することにより活性の有無を調べた。

### 4. RdRp の結晶構造解析

約 100mg の精製 RdRp を用いて、結晶化を試みた。分子結晶化は、キアゲンの結晶化キットのコンディションに従って最適化を行った。得られた結晶は、小型のビーム装置により事前テストし、質の良いリフレクションを取得可能な結晶を選択した。質の良いリフレクションを取得可能な結晶の結晶化条件に基づき、再度 50–100mg の精製 RdRp を結晶化し、シンクロトロンビームラインにて X 線のリフレクションパターンを取った。定法に従ってリフレクションパターンより高次構造の構築を行った。

## C. 結果および考察

### 1. RdRp の転写活性

高度に精製した RdRp は、HuNoV, MNV とともに、我々の研究グループの先行研究 (Journal of Virology. 2004) で報告された条件において、-1A RNA: +1S 領域と相補な配列を有するマイナス鎖 RNA を用いたときのみ、新生 RNA 合成が認められた。この結果により、発現精製した RdRp は、酵素活性のあるネイティブな構造を保っていることが示唆された。RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフ: GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無しで *de novo* RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。

### 6. RdRp の結晶構造解析

HuNoV U201 の RdRp は、最終的に 58kDa の単一分子として精製可能であった。約 100mg の精製 RdRp で結晶化を試みたところ、幾つかの結晶を得た。これらの結晶の内、最も大型かつ安定したリフレクションパターンを持つものを、小型のビーム装置によりテストし、質の良いリフレクションを取得可能な結晶を選択した。得られた結晶化条件に基づき、再度結晶化し、十分に成熟した大きく安定な結晶を得た。これを筑波のビームラインに持ち込み、リフレクションパターンを取得した。得られたリフレクションパターンは構造再構築に用い、2.2Å の構造を得た。これによって、Norovirus genotype GII.3 の RdRp の構造を初めて解くことに成功した。

構築に成功した構造と、データベース上に報告されている他の遺伝子型に由来する構造を *in silico* で比較したところ、全ての RdRp はクローズドコンフィグレーションであることが明らかとなった。クローズドコンフィグレーションの RdRp は本来、RNA を抱き込んだ状態だが、我々の RdRp には、いかなる RNA も結合していなかった。RdRp の形状、アミノ酸残基と RNA の結合様式を明らかにし、遺伝子型によって異なる RdRp のアミノ酸多様性、構造変化がウイルスの病原性変化に影響を与えるか否か、分子疫学の標的領域になり得るか否かを解析するためには、RNA と結合したクローズドコンフィグレーションの RdRp の構造を決定する必要がある。

解析した GII.3 の RdRp の構造は、クローズドコンフィグレーションであったが、PDB ファイルとしてデータベース上に既報の MNV の RdRp、HuNoV GII.4 の RdRp と構造が類似していた。微細なアミノ酸配列の違いがわずかな構造の違いを導き、RNA 合成効率に影響する可能性があるが、今回の結晶構造解析の結果から推

測することは困難であった。今後、インビトロで二重鎖 RNA の合成活性を調べるなど、生化学的検討を行って比較検討する必要がある。結晶構造解析に用いた RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフ:GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無しで *de novo* RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。現在、CAUCUUCAUUCAC との共結晶化、GUGAAUGAAGAUG との共結晶化、この部分の完全二重鎖との共結晶化を進め、RNA を抱き込んだオープンコンフィグレーションの RdRp の結晶の作製を試みている。

培養細胞で増殖させることが可能なマウスノロウイルス (MNV) の S7 株についても RdRp の発現と結晶化に成功した。しかし、MNV の RdRp の結晶は、ヒトノロウイルス U201 株の結晶よりも脆く、リフレクションパターンに乱れが生じたため、10Å を若干下回る程度の解像度しか得られなかった。そこで、さらに大量かつ高純度の RdRp を作製し、ラージスケールでの結晶化を進めた結果、U201 株と同様の結晶構造を解くことができた。しかし、その構造は驚くほど類似性が高かった。さらに、ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフを認識可能である事が明らかになった。今後、RNA と RdRp の結合様式を可視化できれば、結合ならびに RNA の合成効率に影響を与える微細なアミノ酸変化を特定して、分子疫学に応用できるかもしれない。

#### E. 結論

HuNoV GII.3 U201 株, MNV-S7 株の RdRp を大腸菌で発現し、精製することに成功した。これらの RdRp には、RNA の転写活性があり、活性のあるネイティブな RdRp であることが分か

った。結晶構造解析の結果、ヒトノロウイルス (HuNoV) GII.3 U201 株の RdRp、マウスノロウイルス (MNV) S7 株の RdRp は、クローズドコンフィグレーションで

あることが明らかになった。結晶構造解析に用いた RdRp は、ヒトノロウイルスのゲノム 5'末端にタイプを超えて保存されている RNA モチーフ:GUGAAUGAAGAUG のコンプリメンタリー鎖 CAUCUUCAUUCAC に反応し、プライマー無しで *de novo* RNA 合成をスタートする特性があることが判明した。CAUCUUCAUUCAC との共結晶化、GUGAAUGAAGAUG との共結晶化、この部分の完全二重鎖との共結晶化を進め、RNA を抱き込んだオープンコンフィグレーションの RdRp の結晶の作製、構造解析を行う必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
(国際学会)
  - (6) Katayama K, Park YB, Takai-Todaka R, Haga K. Investigation of Human Norovirus evolution in human body. Japan-Taiwan joint meeting. Taipei, Taiwan. Sep 11, 2014.
  - (7) Katayama K and Park YB. A plasmid based human norovirus reverse genetics system. International meeting of the federation of Korean microbiological societies (MSK) symposium Oct 29-31, 2014.
  - (8) Miki M, Park YB, Haga K, Doan HY, Suzuki Y and Katayama K., Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei Taiwan., Jan 29, 2015.



(国内学会)

(4) 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 平成26年11月11日

(5) 下池貴志、朴英斌、戸高玲子、脇田隆字、片山和彦 ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの *in vitro* 転写活性 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 平成 26 年 11 月 11 日

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

## ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* RNA 合成系の構築

担当責任者 下池貴志 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

### 研究要旨

ノロウイルスの複製機構を明らかにするため研究を行っている。しかし、ヒトノロウイルスが効率よく増殖する簡単な系は未だに見出されていない。今年度はノロウイルスの複製（ゲノム RNA 転写）機構を明らかにするためにヒトノロウイルスの RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の RNA 転写活性が放射性同位体を用いずに測定出来る *in vitro* 系を構築した。この系は一本鎖 RNA を特異的に切断、分解する RNase を用いて、合成された RNA と鋳型 RNA とが形成した二本鎖 RNA のみを検出することにより、合成された RNA を検出する独特な系である。その結果、1. RdRp の転写活性は、鋳型の配列特異的で、ゲノム RNA の 5'末端、或いは 3'末端領域の配列が重要であることが明らかとなった。2. RdRp 転写活性は RdRp 濃度、及び反応時間増加に伴い増加し、NaCl の濃度増加に伴い減少することが明らかとなった。3. この RdRp は面白いことに、他の RNA ポリメラーゼの活性に必要な MgCl<sub>2</sub> は不要で、その代わり MnCl<sub>2</sub> 要求性で、2mM 付近が活性最大となった。4. また、この RdRp の転写活性は NaCl の濃度増加に伴い減少した。今後この系を用いてノロウイルスゲノム RNA 配列の違いによって起こる RdRp のアミノ酸配列の違い、また、鋳型 RNA 配列の違いによる RNA 合成速度の違いを調べ、ノロウイルスの流行株との関連が明らかになることが考えられる。更にこの系を用いてヒトノロウイルス RdRp に対する阻害剤のスクリーニングに使用できることが期待される。

### A. 研究目的

ノロウイルスの複製機構を明らかにするため研究を行っている。今年度はノロウイルスゲノム RNA の複製（転写）機構を調べるため、ヒトノロウイルス（HuNV）の RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の転写活性を放射性同位体を用いずに測定出来る *in vitro* 系を構築した。

### B. 研究方法

#### 1. RdRp の準備

コールドショックプロモーター下に 5'末端に His-tag と Trigger factor (TF) と融合させた形で RdRp をコードする cDNA をクローニング

し、低温にすることにより His-TF-RdRp を大腸菌で過剰発現させ、最初に Ni-column、次にゲル濾過カラムで His-TF-RdRp を精製し、その後 Thrombin で TF と RdRp との間を切断し、再びゲル濾過カラムで高度に精製し、*in vitro* 転写反応に用いた（図 1）。

#### 2. 鋳型 RNA の準備

以下に示す 6 種類の鋳型 RNA を準備した。その方法は、以下の 6 種類の RNA に対応する cDNA をマウスノロウイルス（MNV）、ヒトノロウイルス（HuNV）ゲノム cDNA より PCR で増幅し、T7 promoter 下にクローニングしたプラスミドを作製し、これらのプラスミドを鋳型

DNAにし、T7 polymeraseを用いて6種類のRNAを *in vitro* 合成し、フェノール/クロロフォルム処理後、ゲル濾過カラムにより精製した(図2)。

鑄型 RNA:

1. +400 RNA: MNV ゲノム RNA の 5'末端から 400nt の領域
2. -400 RNA: +400 領域と相補な配列
3. +1S RNA: HuNV の 5'末端から 100nt の領域
4. -1A RNA: +1S 領域と相補な配列
5. +3S RNA: HuNV ゲノム RNA の 3'末端から 100nt 上流領域から 3'末端までの配列
6. -3A: +3S と相補な配列

また、二本鎖 RNA (dsRNA) は、それぞれの相補的 RNA を等量混ぜ、96°Cで 10 分間加熱し、その後自然冷却で徐々に室温まで温度を下げ、互いに相補鎖 RNA を anneal させることにより作製した。

### 3. RdRp による *in vitro* 転写反応系

この系は一本鎖 RNA を特異的に切断、分解する RNase を用いて、合成された RNA と鑄型 RNA とが形成した二本鎖 RNA のみを検出することにより、合成された RNA を検出する独特な系である(図3)。

精製 RdRp, 鑄型 RNA (5pmol)に NTPs (2mM), MnCl<sub>2</sub> (2mM), Tris · HCl pH7.5 (20mM)を加え、30°C、1 時間反応させた。その後、反応液を二等分し、一方は、6x sample buffer (0.02% BPB, 0.01% Xylene Cyanol, 10% Glycerol in TBE buffer)を加え、native PAGE を行い、Sybr Green II で染色し、RNA を検出した。このとき+鎖、-鎖鑄型 RNA、及びこれら鑄型から作製した二本鎖 (ds) RNA をマーカーとして反応液と同時に泳動し、これらの泳動位置と比較することにより、合成された RNA を調べた。一方、残り半分の反応液に RNase (RNase A と RNase T1 のカクテル、或いは RNase S1)を加え、30°C、30 分反応させ、一本鎖 RNA を選択的に分解させた。このとき同時にマーカーとして+鎖、-鎖鑄型

RNA、及びこれら鑄型の dsRNA も RNase 処理し、RNase 処理後の反応液と一緒に native PAGE、染色し、二本鎖 RNA を検出した(図3)。

## C. 研究結果

### 1. RdRp による *in vitro* RNA 合成反応系の構築 (図4)

精製 RdRp に鑄型 RNA (+400, 或いは-400)を加え、30°C、1 時間反応させた。反応液の半分を native PAGE し、染色、検出した。残り半分の反応液に RNase を加え、30°C、30 分反応後、native PAGE を行い、染色、検出を行った。その結果、

i) native PAGE により鑄型 RNA (一本鎖 RNA) と dsRNA とは分離出来る (dsRNA の方が早く泳動される) ことが明らかとなった(図4AのマーカーRNAs)。

ii) RNase 処理により一本鎖 RNA は分解し、dsRNA のみが残ることが明らかとなった(図4B)。

iii) RdRp を加えない場合、dsRNA は生成されないことが明らかとなった。

iv) 鑄型-400 RNA からは dsRNA が生成され、鑄型+400 RNA からは dsRNA は生成されなかった。

以上のことより、RdRp は鑄型 RNA を基にして RNA を合成し、合成された RNA は鑄型に対して相補な配列のため、過剰に存在する相補的な鑄型 RNA と二本鎖 RNA (dsRNA) を形成する。そこで、二本鎖 RNA を特異的に切断、分解する RNase 処理により、一本 RNA は分解されたが、dsRNA は分解されず、RNase 処理後の native PAGE で dsRNA のバンドが検出された。面白いことにこの RNA 合成反応は鑄型特異的であり、-400 RNA の場合に新規 RNA (+RNA) が合成されることが明らかとなった。

### 2. *in vitro* RNA 合成における RdRp 濃度依存性 (図5)

加える RdRp を 0, 1, 2, 5, 10 $\mu$ g と増加させるにつれて、生成される dsRNA 量が増加した (RNase 処理後のみでなく、処理前でもその様子が明らかである)。

### 3. RdRp による in vitro RNA 合成における反応時間依存性 (図 6)

RdRp による RNA 合成反応の反応時間依存性を調べた。その結果、用いた条件では、30 分反応させると生成 RNA が検出出来ることが明らかとなった。RNase 処理後の dsRNA のバンドを定量したところ、反応 1 時間では、反応 30 分の場合の約 2 倍の RNA が合成されることが明らかとなった (図 6C)。

### 4. RdRp による in vitro RNA 合成反応における MnCl<sub>2</sub> 濃度依存性 (図 7)

RdRp による RNA 合成反応では MnCl<sub>2</sub> の濃度が 2mM あたりがいちばん活性が高いことが明らかとなった。MnCl<sub>2</sub> の代わりに MgCl<sub>2</sub> を用いたが、RdRp の RNA 合成活性は見られなかった (データは示さず)。

### 6. RdRp による in vitro RNA 合成反応における NaCl 濃度依存性 (図 8)

RdRp による RNA 合成反応は NaCl の濃度が低いほど活性が高かった。(なお、RdRp の精製時、RdRp 用 buffer に 100mM NaCl を加えたので、RdRp による RNA 合成反応で NaCl の濃度が 4mM が最小となっている。)

### 7. RdRp による in vitro RNA 合成反応における鋳型 RNA 依存性 (図 9)

図 4 で示した RdRp 鋳型特異的 RNA 合成反応を更に詳しく調べた。

i) 鋳型 RNA の長さを縮め、HuNV ゲノム RNA の 5'末端 100nt を鋳型として用いた場合 (図 9A) : 図 4 の結果と同様に、鋳型 RNA が -100nt (-1A) RNA の場合にのみ RdRp によって dsRNA が生成された。

ii) HuNV ゲノム RNA の 3'末端 100nt を用いた場合 (図 9B) : RNase 処理前は、一見、鋳型

RNA が +100nt (+3S), -100nt (-3A) どちらの場合でも dsRNA が生成されたかのようにあるが、RNase 処理によって、鋳型 RNA が +100nt (+3S) RNA の場合のみ dsRNA が検出され、鋳型が +100(+3S) の場合 RdRp によって dsRNA が生成されたことが明らかとなった。

## D. 考案

1. 精製 RdRp と in vitro で合成した鋳型 RNA を用いて相補的な RNA が合成された。しかし、このままだと鋳型 RNA と合成された相補鎖 RNA とは長さが同じなので、PAGE では分離出来ないが、この合成された相補的な RNA は過剰に存在する鋳型 RNA と二本鎖を形成するので、ここに一本鎖 RNA を特異的に切断する RNase (RNase A, RNase T1, 或いは RNase S1) を作用させることにより、二本鎖 RNA のみを検出することが可能になった。即ち、RdRp による RNA の合成を dsRNA の量で知ることが可能となり、放射性同位体を用いずに RdRp の RNA 合成について調べることの出来る in vitro の系を構築することが出来た。

2. この RdRp による RNA 合成反応は鋳型依存적であることが明らかとなった。

RdRp はウイルスゲノム RNA の末端 (5'末端、3'末端共に) を認識して、そこから鋳型 RNA の 3'→5'方向に移動して、(5'→3'方向に) RNA を合成してゆくと考えられる。従って、ゲノム RNA の途中の配列が 3'末端になった鋳型 RNA からは RNA が合成されないと考えられる。ただ現在のところ、鋳型 RNA の配列を認識しているのか、構造を認識しているのかは分からない。

図 3 で用いた鋳型 RNA (+400, -400) は、MNV の配列で、一方 RdRp は HuNV の RdRp であるが、それでも RNA が合成されたのは、HuNV と MNV の 5'末端の配列は良く保存され、且つホモロジーが高い (5'末端 24nt のうち 20nt が一致)

ためだと考えられる。

今後、この系を用いてゲノム RNA 配列の違いによって起こる RdRp のアミノ酸配列の違い、また、鋳型配列の違いによる RNA 合成速度の違いを調べ、ノロウイルスの流行株との関連を調べる予定である。更にこの系は RdRp に対する阻害剤のスクリーニングにも使用できることが期待される。

#### E. 結論

今年度、放射性同位体を用いない、RdRp による RNA 合成系を構築することが出来た。

今後、この系を用いて RdRp のアミノ酸の違い、或いは、鋳型 RNA の配列の違いによる RNA 合成速度、合成の正確さの違いを調べることが可能と考えられる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年記入) :  
なし

2. 学会発表

国内会議 : 「ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの *in vitro* 転写活性」 第62回 日本ウイルス学会学術集会、2014年11月 横浜

国際会議 : なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

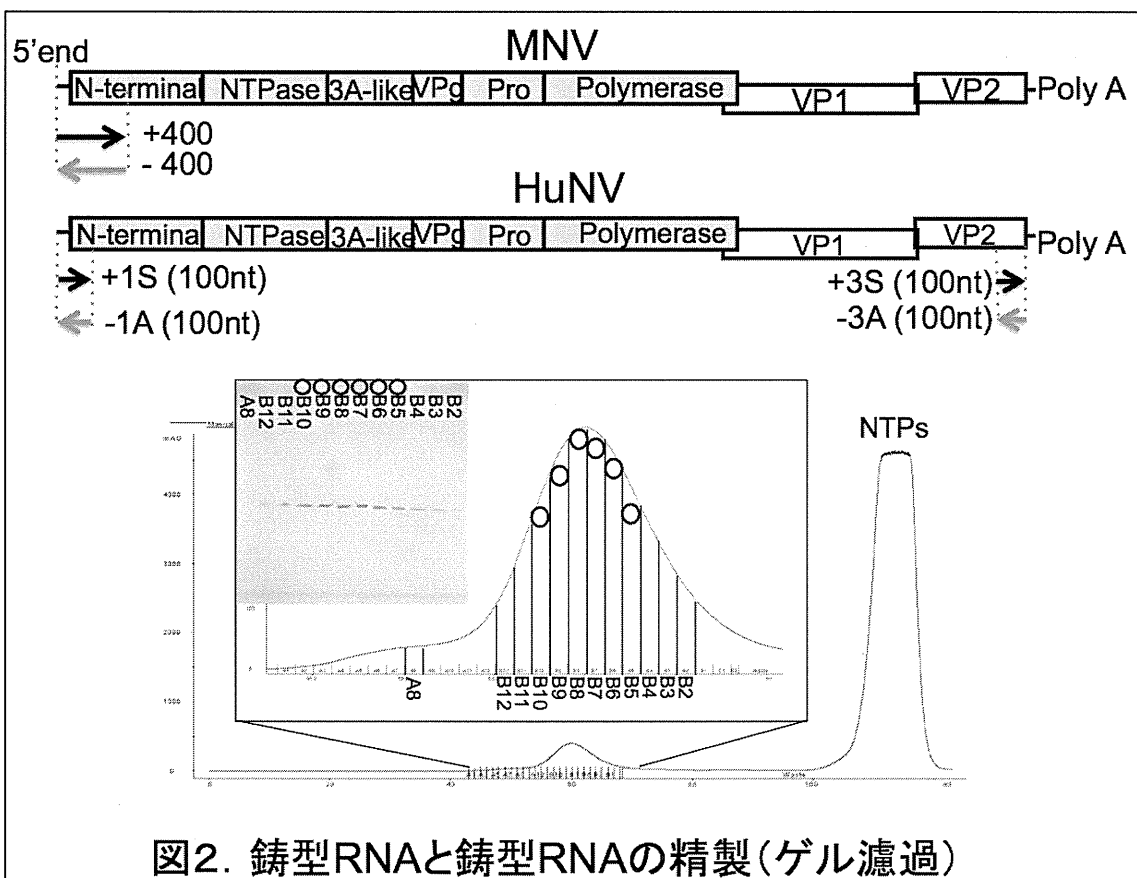
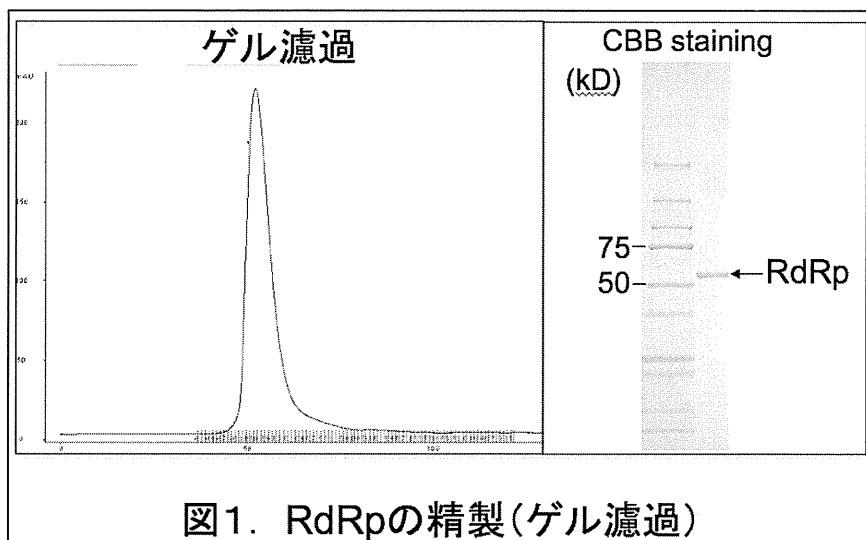
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



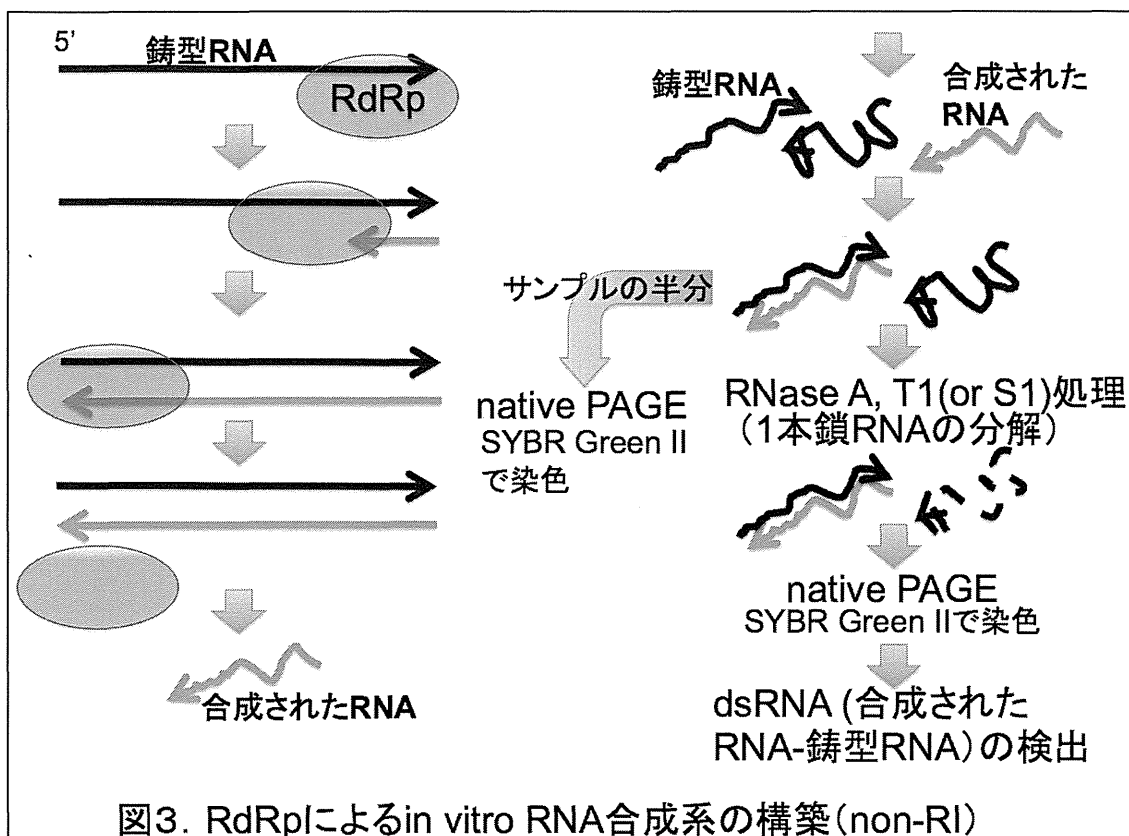


図3. RdRpによるin vitro RNA合成系の構築(non-RI)

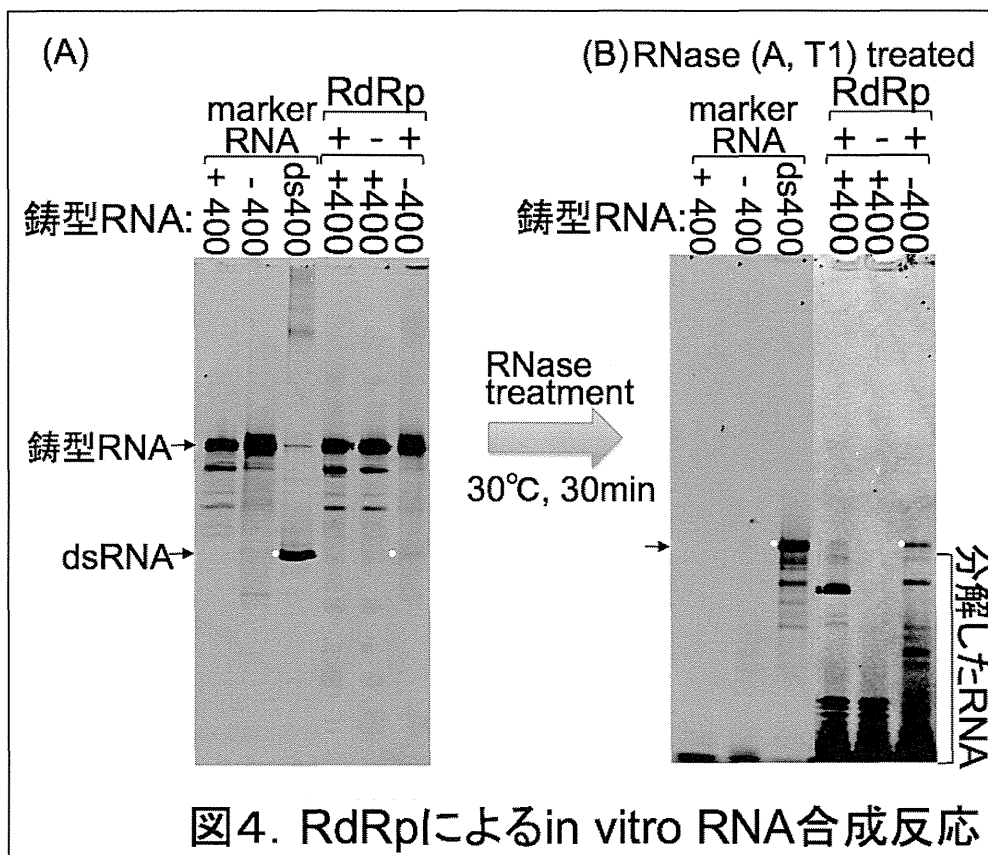
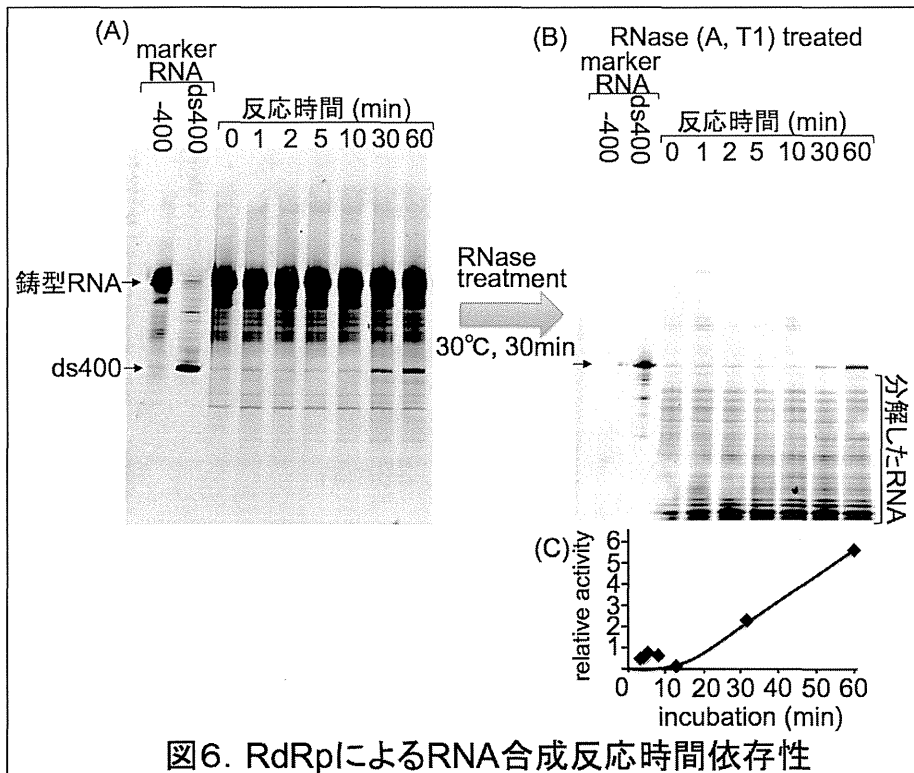
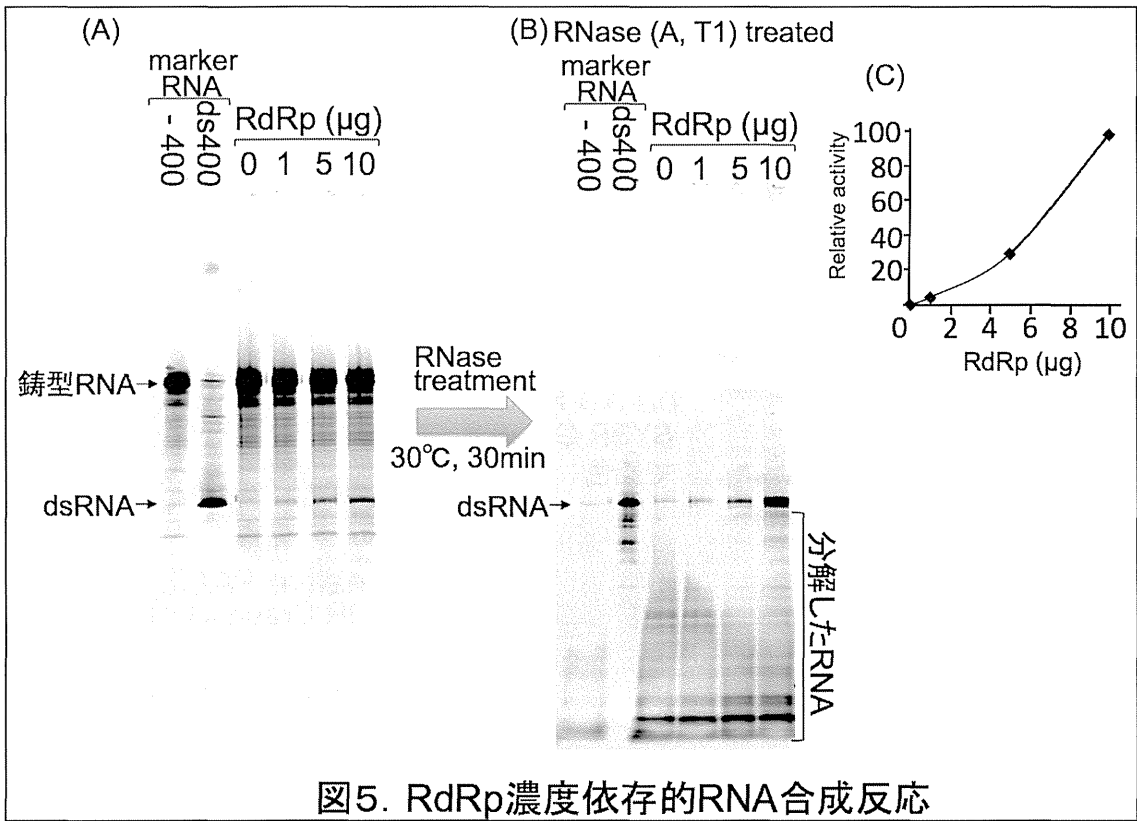
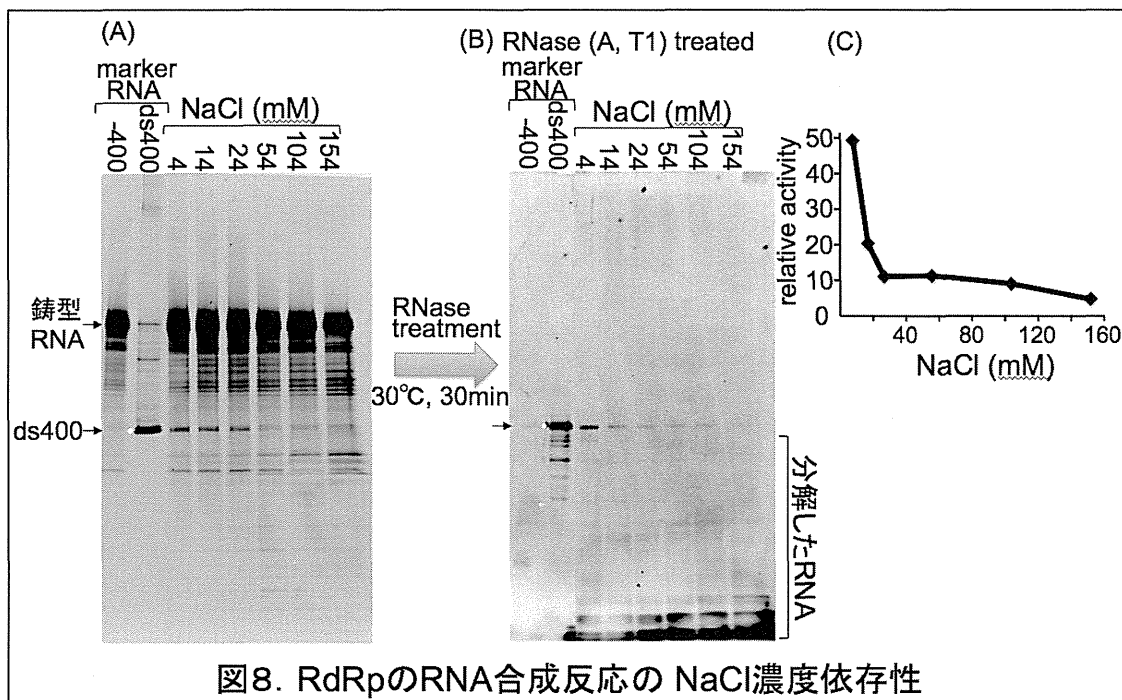
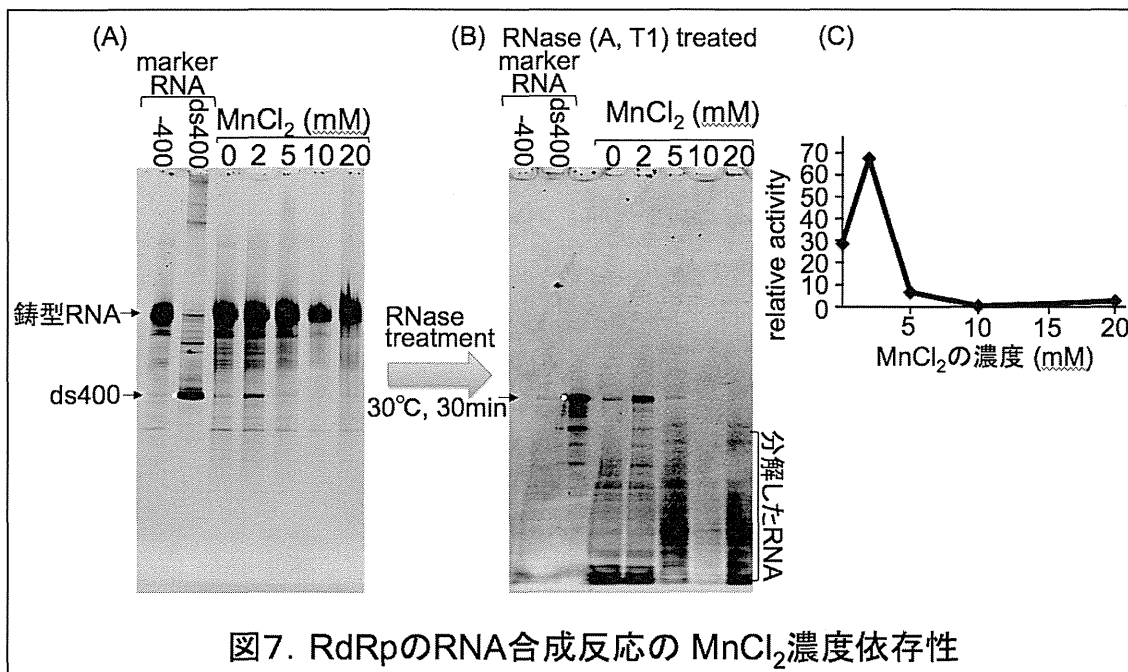


図4. RdRpによるin vitro RNA合成反応







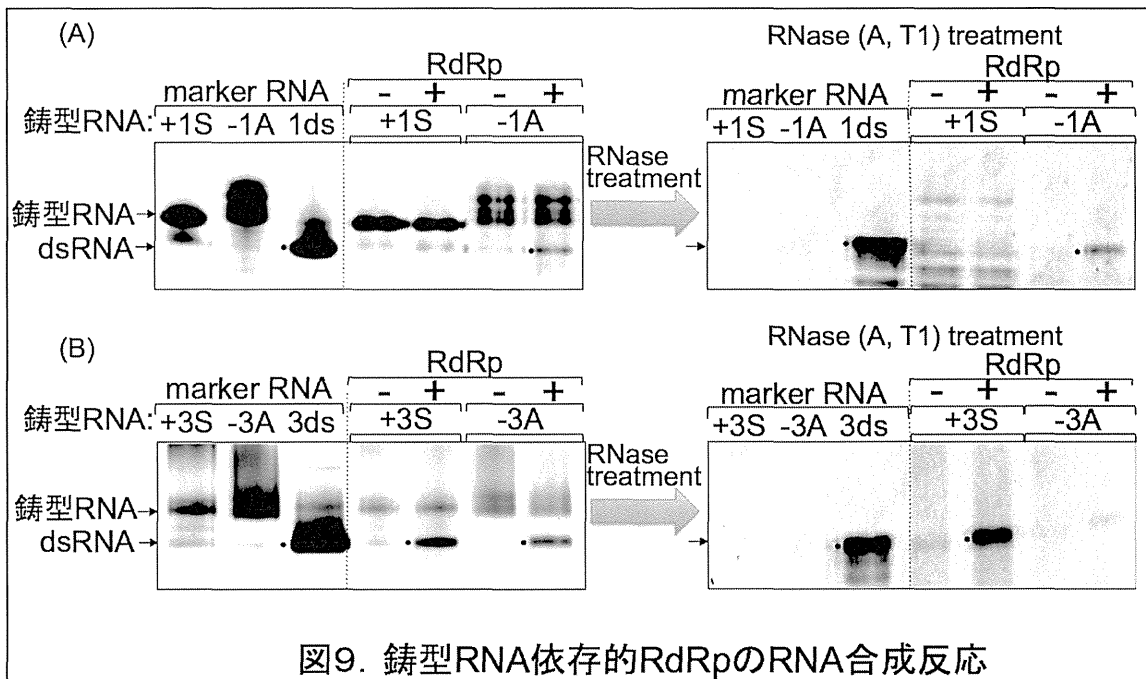


図9. 鑄型RNA依存的RdRpのRNA合成反応

## ノロウイルスタンパク質の構造と機能に関する研究

担当責任者 染谷 雄一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

### 研究要旨

ノロウイルスに由来する全てのタンパク質の三次元立体構造を明らかにするためにそれぞれのタンパク質を発現する系を大腸菌あるいは昆虫細胞で構築する。近い将来ノロウイルスワクチンが導入されることを考えると、VP1 タンパク質、および、それにより構築されるウイルス様中空粒子（VLP）の構造解析が急務である。Genogroup I に属するすべてのノロウイルス株の VLP を生産する昆虫細胞発現系を構築した。また、我が国で頻繁に分離される GI.4 および GI.6 の株について、VP1 タンパク質の P ドメインの大腸菌発現系を構築した。

### A. 研究目的

ノロウイルスによる嘔吐下痢症を征圧するためには、治療薬、予防薬が必要である。ノロウイルスに由来するタンパク質の立体構造と機能を明らかにすることは、治療薬、予防薬を創出する一助となると考える。昨今ノロウイルスワクチンの導入が求められており、現に数社がその開発を行っている。従って、ノロウイルス粒子、あるいは、それを構成する VP1 タンパク質の立体構造を解明することは VP1 タンパク質にある抗原性領域の構造生物学的理解にのみ留まらず、ワクチンの有効性を分子レベルで評価するよりどころとなると考えられる。本研究では、特に Genogroup I のノロウイルスに着目し、ウイルス様中空粒子（VLP）および VP1 タンパク質中の P ドメインの構造解析に向けた準備を行った。

### B. 研究方法

1. Genogroup I の 9 つ全ての Genotype に属するノロウイルス株の VLP を昆虫細胞で得られるよう、VP1 タンパク質をコードする ORF2 を（株

によっては VP2 タンパク質をコードする ORF3 も共に）バキュロウイルストランスファクターにサブクローニングし、SF9 細胞で組換えバキュロウイルスを作成した。得られた組換えバキュロウイルスを HighFive 細胞に感染させ、培養後の上清から VLP を回収する。

2. 我が国で頻繁に分離される GI.4 および GI.6 の株については、それぞれの P ドメインを SUMO 融合タンパク質として発現するプラスミドを作製した。

### C. 研究結果

1. VLP 調製のための組換えバキュロウイルスの作成

以下の Genogroup I のノロウイルス株について組換えバキュロウイルスを SF9 細胞で作成した。

GI.1 Seto (Aichi124-89) (Lab. stock より)

GI.2 Funabashi258 (Lab. stock より)

GI.3 Kashiwa645 (Lab. stock より)

GI.4 Chiba407 (Lab. stock より。また、昆虫細胞

コドンに至適化した遺伝子を合成)  
GI.5 SzUG1 (遺伝子合成)  
GI.6 WUG1 (遺伝子合成)  
GI.7 Winchester (遺伝子合成)  
GI.8 KY531 (片山和彦室長より)  
GI.9 Vancouver730 (遺伝子合成)

## 2. VLP の調製

組換えバキュロウイルスを HighFive 細胞に感染させ、6 日後に培養上清を回収した。超遠心 (45Ti, 40k rpm, 4°C, 1 hr) で VLP を沈殿させ、りん酸カリウムバッファー (pH 6.5) に懸濁した。50%(w/v) ショ糖溶液上に 15%(w/v) ショ糖溶液を載せ、その上部に再懸濁した VLP を載せ、超遠心 (SW55Ti, 50k rpm, 4°C, 1 hr) を行い、50%(w/v) ショ糖溶液上部の VLP を回収した。次いで、Iodixanol の不連続密度勾配 (15%, 30%, 45%, 60%(w/v)) に回収した VLP を載せ、再度超遠心 (SW55Ti, 50k rpm, 4°C, 1 hr) を行った。それぞれの層の間のバンドを個別に回収し、りん酸カリウムバッファー (pH 6.5) に希釈してから超遠心 (SW55Ti, 50k rpm, 4°C, 1 hr) を行い、適量のりん酸カリウムバッファー (pH 6.5) に懸濁した。

得られた VLP 画分は、高輝度光科学研究センター、および、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターに提供し、X 線結晶構造解析、電子顕微鏡単粒子解析の試料とする。

## 3. 大腸菌での P ドメイン発現系

GI.4 Chiba407、および、GI.6 WUG1 について、それぞれの P ドメイン領域を大腸菌で大量に得るため、大腸菌コドンに至適化した遺伝子を合成し、SUMO 融合タンパク質として発現するプラスミドを作成した。

今後、作成したプラスミドを導入した大腸菌から目的のタンパク質 (His-tag が付加された SUMO-P ドメイン融合タンパク質) を TALON

レジンで精製し、SUMO プロテアーゼで SUMO と P ドメインの間を切断して P ドメインタンパク質を遊離させることを試みる。得られた P ドメインタンパク質は理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターに提供し、X 線結晶構造解析の試料とする。

## D. 考案

Genorougp I の 9 つ全ての Genotype に属するノロウイルス株の VLP を調製するための準備が整ったが、構造解析のための試料とする VLP はサイズが均一であることが望ましい。GI.4 Chiba 株については、VP1 タンパク質の N 末領域と S ドメインの境界に三重変異が導入しており、均一な VLP 試料を得ることができる (Someya et al. J Gen Virol 2011, 92(10):2320.)。現在までに Chiba 株の他に数株の VLP を調製したが、その粒子像を電子顕微鏡で観察する必要がある。しばしば、通常サイズ (38 nm) とともに小さい粒子 (23 nm) も生産されるので、Chiba 株同様それぞれの遺伝子への変異導入が必要になるかもしれない。あるいは、VLP 調製過程を見直し、ショ糖密度勾配遠心や Iodixanol 密度勾配遠心を行う際、何らかの工夫が必要になるかもしれない。

## E. 結論

Genorougp I の 9 つ全ての Genotype に属するノロウイルス株の VLP を発現する組換えバキュロウイルスを作成し、VLP 調製のための準備が整った。

Genogroup I の種々の株の中でも我が国分離頻度の高い GI.4 および GI.6 は、P ドメインタンパク質の発現系を大腸菌で作成した。