

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590556

研究課題名(和文) ヒトノロウイルスの病原性発現機構の研究

研究課題名(英文) Study of human norovirus replication and pathogenicity

研究代表者

片山 和彦 (Katayama, Kazuhiko)

国立感染症研究所・国立感染症研究所・室長

研究者番号：60342903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：リバースジェネティクスシステム(RGS)は、HuNoVのポリプロテイン翻訳から粒子形成に至る全ての行程を細胞内で再現できる。我々は、G11.P3-G11.3 U201株に加えて、G11.P4-G11.4 Saga1株、G11.P4-G11.3 TCH04-577、G1.P1-G1.1 NV68株、マウスノロウイルス(MNV)のRGS構築にも成功した。また、GFP遺伝子の内包、ゲノムの遺伝子操作に成功し、複製行程でVP1、VP2が強い細胞障害能を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established a new reverse genetics system driven by a mammalian promoter, that functions without helper virus. The complete genome of the HuNoV G11.3 U201, Saga1, TCH, NV68 and also MNV-S7 strain was cloned downstream of an EF-1 alpha mammalian promoter. These constructs produced progeny viruses produced from cells that contained the complete NoV genomic RNA, VP1, VP2 and VPg were detected in isopycnic gradients of CsCl at the same density as native infectious NoV particles from a patient's stool. A GFP reporter construct containing the GFP gene in ORF1 produced complete virions that contain VPg linked RNA. RNA from virions containing the encapsidated GFP genomic RNA was successfully transfected back into cells producing fluorescent puncta indicating that the encapsidated RNA is replication competent. Our results are useful to develop of an antiviral medicine which targeted these in future.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：病原性 細胞内同多 機能

1. 研究開始当初の背景

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、経口でヒト腸管に特異的に感染し、嘔吐下痢などの症状を引き起こす。近年、患者総数上昇傾向にあり、2007 年の統計では 27,616 人に達する史上最悪の患者数が報告され深刻な社会問題となっている (食中毒統計 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>)。更に、米国では年間 2300 万人の患者及び、5 万人の入院患者が発生している (Emerg. Infect. Dis. 5:607-625, 1999)。近年、欧米では HuNoV の病原性が変化し、死亡率が上昇傾向にあることが報告され始めた (第 4 回国際カリシウイルス学会)。HuNoV はヒト以外の動物に感染せず、培養細胞で増殖させることもできない。これが、HuNoV 研究の強固な障壁となっており、発見以来 40 年が経過するが、ウイルスの感染増殖機構、病原性発現機構など不明な部分が多く残されている。

我々の構築した HuNoV のリバーシジェネティックシステム (RGS) は、哺乳類培養細胞内で HuNoV のウイルス遺伝子を発現させ、新生ウイルス粒子 (progeny virus particle; PVPs) を産出することが可能なシステムである。本システムは、HuNoV のゲノム翻訳から蛋白質合成、ウイルス粒子径性から放出に至る全ての行程を培養細胞内部で再現できる。我々は、本システムによりウイルスゲノムに遺伝子レベルの改変を加え、狙った部分の機能をノックアウトするなどウイルス蛋白質機能解明や病原性発現機構解明のための分子レベルの研究基盤を提供することに成功した。2003 年にヒトノロウイルスに極めて近縁なマウスノロウイルス (MNV) が免疫不全マウスの脳内から発見された (Science vol. 299(5612):1575-8, 2003)。MNV は、マウスに対する病原性は不明だが、マウスマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 細胞で増殖可能であるため、HuNoV の surrogate としての

利用に期待が持たれている。MNV に HuNoV の RGS を応用し、システム構築に成功すれば、MNV の細胞内での自然な MNV 複製を追跡し、RGS による細胞内動態と比較検討することで、RGS が自然な MNV 複製をどの程度再現できるか評価できる。さらに、HuNoV の RGS との比較検討により、包括的なウイルス蛋白質の細胞内動態、機能の解明が期待できる。

2. 研究の目的

我々が世界に先駆けて構築に成功した HuNoV の RGS は、HuNoV の細胞内におけるゲノム翻訳から蛋白質産生、ゲノム複製、新生粒子 (progeny virus virion; PVP) に至る行程を再現できる。本システムの成功により、ウイルス蛋白質に遺伝子レベルで変異を導入すること、GFP 等のレポーター遺伝子でラベルすることなどが可能となった。本研究では、HuNoV の RGS を用いた HuNoV の病原性発現機構、抗ウイルス薬開発の基盤となるウイルス蛋白質の細胞内動態、機能解明を目指す。

3. 研究の方法

HuNoV は、すでに RGS に成功した G11.P3-G11.3 U201 株に加えて、G11.P4-G11.4 Saga1 株、G11.P4-G11.3 TCH04-577, G1.P1-G1.1 NV68 株を用いた。これらの株は、全塩基配列を決定後、cDNA を合成し、U201 株のインフェクシャスクローンと同様に pKS435gateA3 ベクターにクローニングし、pHuNoV_{U201F}、pHuNoV_{Saga1F}、pHuNoV_{TCH04-577F} を構築した。

MNV のインフェクシャスクローン構築には、2002 年遠矢幸伸現日本大学教授 (元東京大学大学院農学生命研究科准教授) によってマウスより分離された MuNoV-S7 株を MNV として用い、pMNV_{S7F} を得た。マウス RAW264.7 細胞、ヒト HEK293T 細胞は、ATCC より購入した。HuNoV, MuNoV S7 の各種タンパク質、Nterminal protein (NS1-2), NTPase (NS3), 3A-like

protein; p22 (NS4), VPg (NS5), protease (NS6), RNA dependent RNA polymerase; RdRp (NS7), Capsid protein; VP1, minor structural protein; VP2 は、それぞれ標的領域を pKS435gateA3 ベクターにクローニングして、単独発現用プラスミドを作製した。また、大腸菌で発現させ、精製して、結晶構造解析、抗体作製に用いるため、pCold ベクターにクローニングした。大腸菌による蛋白質発現は、pCold の発現プロトコールに従って行った。精製蛋白質は、ウサギとモルモットに免疫して抗体（抗血清）を作製した。抗体はそれぞれ由来のウイルス株名と部位で表記した。下記に U201 の例を示した（Nterm-U201, NTPase-U201, 3A-like-U201, VPg-U201, Protease-U201, RdRp-U201, VP1-U201, VP2-U201）複製中間体である MuNoV2 本鎖 RNA の検出には、抗 2 本鎖 RNA 抗体（dRNA MoAb）を用いた。これらの抗体とは別に、U201 株、Saga-1 株、TCH04-577 株のウイルス様中空粒子（VLP）をバキュロウイルス発現システムで作製し、それらを用いた抗 VLP 抗体も作製した。抗体はそれぞれ、VLP-U201, VLP-Saga1, VLP-TCH04-577 とした。MNV-S7 株の中和抗体は、HuNoV と同様に、MNV-VLP をバキュロウイルス発現システムで作製し、それをウサギ、モルモットに免役して得た。

4. 研究成果

1) HuNoV の RGS における各種ウイルス蛋白質のウイルス複製における細胞内局在と機能の解明を目指し、各種抗体を用いた蛍光免疫染色により細胞を染色し、細胞内局在を調べたところ、protease を除く、Nterminal protein (NS1-2), NTPase (NS3), 3A-like protein; p22 (NS4), VPg (NS5), RNA dependent RNA polymerase; RdRp (NS7) の核近傍のベジグル内部に共局在することが明

らかになった。protease (NS6)、RdRp (NS7) は、共局在する分子もあるが、細胞質内に分散した染色像も観察された。この傾向は、U201, TCH04-577, Saga1, NV68 の全てで同様の傾向を示した。また、COS7, 293T, 293, Huh7, Huh7.5.1, Caco2 のいずれの細胞においても同様の染色像を示した。構造タンパク質 Capsid protein; VP1, minor structural protein; VP2 の発現は、細胞質全体に顆粒状の染色像が認められた。

MNV の RGS においても、COS7, 293T, 293, Huh7, Huh7.5.1 で同様の染色像を示した。RAW 細胞内部での各種蛋白質局在は、RAW 細胞のトランスフェクション効率が低く、結果が得られなかった。

MNV の RAW への自然感染では、構造タンパク質 Capsid protein; VP1, minor structural protein; VP2 の局在を除いてほぼ同様の傾向を示した。興味深い事に、VP2 が Nterminal protein, NTPase, 3A-like protein; p22, VPg, RdRp と共局在することが明らかになった。VP1 と VP2 の発現は、RGS と自然感染では、発現量に大きな差がある可能性がある。

2) HuNoV の細胞毒性を発現する遺伝子又は蛋白質領域を特定するため、genome 上に存在する 3 つの ORF をそれぞれ発現させ、細胞の CPE を観察した。ORF1(非構造タンパク質)を発現させると、細胞内に多数の空砲（ベジグル）が表れ、強い CPE が誘導された。ORF2 (VP1) の単独発現では、弱い CPE が誘導された。ORF3 (VP2) の単独発現は、激しい CPE と細胞の変形が誘導された。ORF2 に GFP 遺伝子を導入した pHuNoV_{U201F-ORF2GFP} を COS7, 293T に導入すると、GFP シグナルの上昇と共に激しい CPE を生じることが明らかになった。この傾向は、それぞれの ORF の単独発現と異なっていた。Protease の活性発現に必要なモチーフ GDGG を GDGG に変更し、活性を無くした protease mutant ORF1, pHuNoV_{U201F} の protease mutant を作製し、それぞれ細胞に与える影響を調べ

たところ、いずれのコンストラクトも CPE を誘導しなかった。しかし、活性のある protease を単独発現するプラスミドを co-transfection すると、強い CPE が誘導された。しかし、protease を単独発現するプラスミドの単独トランスフェクションでは、弱い CPE が誘導されたのみであった。

以上をまとめると、各種 ORF にコードされた蛋白質が複製の行程で、相互作用することにより、効率の良いウイルス複製のため、細胞内の構造に作用し構造変化（ベジグル形成など）を与えることにより、強い CPE が誘導されることが示唆された。

MNV を RAW に MOI=1.0 で自然感染させた場合、48 時間後に強い CPE が誘導される。これは、MNV の自然感染が、ウイルス複製の最終段階で細胞に CPE を誘導し、複製の完了したウイルスを細胞外に効率よく放出させるために有利に働く可能性がある。

HuNoV の RGS において、インフェクシャスクロンのみにその傾向が認められ、プロテアーゼミュータントには認められなかったのは、興味深い現象である。

3) RGS で作出される新生ウイルス(Progeny virus; PV)は、HuNoV では、密度 $1.38 \sim 1.40 \text{ g/cm}^3$ を示した。MNV はそれよりも軽く密度 $1.36 \sim 1.38 \text{ g/cm}^3$ を示した。両者とも VLP よりも重く、粒子内部に VPg, VP2, genome RNA を内包していた。これらの PV より抽出した RNA は細胞内で自己複製可能であった。また、MNV の PV は、RAW 細胞に感染し、増殖可能で有り、感染性がある事が明らかになった。

HuNoV の ORF1 領域に、自身の protease で切断可能なモチーフを GFP の両端に配置した pHuNoV_{U201F-NTP/GFP/3A} は、ORF1 ポリプロテイン翻訳後に GFP を切断除去できるため、非構造タンパク質の機能が保たれ、GFP 遺伝子を組み込んだ genome を内包した PV を産生する。この PV から抽出した RNA を細胞に導入すると、GFP の発光シグナルが認められることが明ら

かになった。現在同様の原理で RGS を利用した GFP 遺伝子を内包した MNV の作製を試みている。HuNoV の GFP 遺伝子内包 PV は、感受性細胞の検索に有用である。

PV から抽出された RNA を protease A 処理すると、細胞内で自己複製する能力を失うことから、PV に内包されている RNA は(ウィルスもしくは宿主)蛋白質の修飾を受けている (Journal of Virol.vol81(22):12238-48,2007) ことが示唆された。この蛋白質は、VPg もしくは VP2 である可能性が高い。そこで、VPg の拡散修飾が予想されるアミノ酸残基・チロシンをアスパラギン酸に置き換えたミュータントコンストラクトを作製し、PV の産生能に与える影響を調べる予定である。

4) ウィルス複製複合体は、Nterminal protein, NTPase, 3A-like protein; p22, VPg, RdRp, VP2 から成ることが示唆された。また、蛋白質翻訳には VPg と VPg に結合する宿主蛋白質 eIF4E, eIF4G が重要である事が RGS を用いた免疫沈降試験によって示唆された。HuNoV 及び MNV の VPg, VP2, RdRp の X 線結晶構造解析を進めた結果、RdRp の構造解析には成功したが、それ以外は蛋白質の結晶が得られず、難航している。そこで、VPg の結晶化の際、宿主蛋白質 eIF4 または、eIF4G との共結晶化を試みている。

結合する蛋白質が相互干渉することによって制御されていることが知られている。NoV, SaV においてもゲノム 3' 末端に特徴的な RNA の高次構造が予測されている。全長 cDNA の VPg, 5' 末端の RNA 塩基配列、3' 末端の RNA 塩基配列を改変したコンストラクトを作製し、ゲノムレプリケーション、トランスレーションに与える影響を研究することで、機能の解明を図る。

5) MNV と HuNoV は、細胞内動態が非常によく似ていることが明らかになった。また、両ウイルスとも RGS が 293T 細胞を用いて稼働

した。今後、これらの結果から、キメラ遺伝子を構築し、マウスに感染可能な HuNoV_{VP1-Pmnv} キメラウイルスの作出を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(英文)

1. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.
2. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.
3. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL and Estes MK. A plasmid based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *PNAS* 2014. in press.

(邦文)

1. 片山和彦 ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム 感染症 vol. 253, p12-13, p19-21, 2013.

2. 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム 食と健康 10月号 p9-17, 2013.

[学会発表](計 12 件)

(国際学会)

1. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013.Japan-Taiwan joint meeting. Shinjuku, Tokyo, JAPAN.
2. Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4_2006b. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12-15, 2013, Beijing, China.
3. Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12-15, 2013, Beijing, China.
4. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12-15, 2013, Beijing, China.
5. Kazuhiko Katayama^{1,2}, Reiko

Takai-Todaka², Akira Nakanishi³, Kosuke Murakami^{1,2}, Tomoichiro Oka², Susana Guix¹, Tyler M. Sharp¹, Robert L. Atmar¹, Sue E. Crawford¹, and Mary K. Estes¹ A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12-15, 2013, Beijing, China.

6. Kosuke Murakami¹, YoungBin Park¹, Chie Kurihara², Tomoichiro Oka¹, Takashi Shimoike¹, Reiko Takai-Todaka¹, Takaji Wakita¹, Tsukasa Matsuda³, Ryota Hokari² and Katayama Kazuhiko¹ Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
7. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

(国内)

1. 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第54回日本臨床ウイルス学会 平成25年6月7日 岡山県倉敷市
2. 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤

裕徳. 分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.

3. 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂苅量太、松田幹、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズム 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
4. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦 カリシウイルスのリバースジェネティクスシステムを用いた感染性粒子の研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
5. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013

3. その他

なし