

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656325

研究課題名（和文） 組織細胞によるヒトノロウイルス培養への挑戦

研究課題名（英文） Challenges to replicate human norovirus with tissue cells

研究代表者

大村 達夫 (OMURA TATSUO)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30111248

研究成果の概要（和文）：

本プロジェクトでは、組織細胞での培養方法が確立していないヒトノロウイルスについて、組織細胞へのノロウイルスの感染確立を可能とする知見を得ることを試みた。ウイルス粒子の細胞への侵入及び脱殻過程を蛍光顕微鏡で観察する目的で、緑色蛍光タンパク質が付加したノロウイルス様中空粒子を合成することに成功したが、組織細胞への感染操作において観察に足る十分な蛍光量が確保できないことが明らかとなった。そこで、組織細胞へのノロウイルス感染が生じた際の細胞応答に着目し、ウイルス感染を迅速に検出可能な遺伝子マーカーの探索を試みた。テストウイルスとしてはポリオウイルスを用い、INT407 細胞へ感染後、12 時間後に総 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、高い変動値を示す遺伝子としてカリウムイオンの恒常性に関わる KCN4 が見出された。この結果は、ポリオウイルスが細胞に感染した際、細胞応答の 1 つとして細胞内小器官内のカリウムイオン濃度の調整が行われたことを示している。さらに、この KCN4 遺伝子はウイルス感染以外の影響、例えば重金属の存在等によっては発現量が変動しないことも確かめられた。本研究により、ノロウイルスの細胞感染を迅速に検出するために必要な遺伝子マーカーが同定されたことから、組織細胞によるノロウイルス培養実現に向けて非常に貴重な知見が得られたと言える。

研究成果の概要（英文）：

The main purpose of this project was to acquire precious knowledge for establishing the infection of human norovirus to tissue cells. We successfully constructed a norovirus-like particle with green fluorescence protein (GFP-NoVLP). GFP-NoVLP was applied for confirming the intrusion and decapsidation of human norovirus in tissue cells, but it was found that the amount of fluorescence was not enough to observe the movement of GFP-NoVLP in tissue cells. Therefore, we paid attentions to cellular responses of tissue cells against the virus infection, and tried to identify genetic markers available for the detection of virus infection. Poliovirus type 1 (PV1) Sabin strain was used as a test virus, and a transcriptome analysis of INT407 cells infected with PV1 was conducted. As a result, KCN4 gene, responsible for potassium homeostasis, was found as the most promising genetic marker for the detection of virus infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：環境水質工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：ヒトノロウイルス、培養、組織細胞

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスによる感染症被害に終息の気配はない。ノロウイルス感染症の患者数は、カンピロバクターや病原性大腸菌などの病原細菌を抑え、病因別で近年は第1位を維持している。日本では毎年11月頃から感染症の発生が報告され始め、年末から年始にかけて患者数のピークを迎え、その後春先から夏に向けて減少するという流行の季節性が認められているが、その被害を食い止める手だてがないまま対症療法に徹するしかないのが現状である。これは、ノロウイルス粒子を組織細胞で培養する術が存在しないため、その感染・複製機構を解明し、それらをターゲットとした新薬及びワクチン開発を行うことが困難であること、さらには感染性ノロウイルス粒子の水中濃度をもとにしたヒト健康影響リスクを評価することが不可能であることに起因すると考えられる。組織細胞を用いたノロウイルスの培養法は、工学・医学の分野に関わらず、その確立が待ち望まれている技術であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、組織細胞によるノロウイルス培養の実現に向けた知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

最も多くの感染症患者を発生させているノロウイルスの遺伝子型であるGII.4に着目し、GII.4の外殻タンパク質遺伝子と緑色蛍光タンパク質遺伝子を用いることで、緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子の合成を試みた。ウイルス様粒子の合成には、バキュロウイルス-昆虫細胞の組み合わせを用いた。すなわち、緑色蛍光タンパク質遺伝子及びノロウイルスGII.4外殻タンパク質遺伝子で組換えたバキュロウイルスを創出し、昆虫細胞に感染させることで緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子を合成した。その後、組織細胞の種類（ヒト由来3種類）とその培養条件（回転培養速度及び添加物濃度等）を網羅的に設定し、緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子を用いてウイルス粒子の細胞への侵入及び脱殻過程を蛍光顕微鏡で観察することで、ノロウイルスの感染・複製を可能とする組織細胞とその培養方法を見出すことを試みた。

また、組織細胞へのウイルス感染を感度よく検出するための遺伝子マーカーを同定することを目的として、ウイルス感染細胞のトランスクリプトーム解析を行った。組織細胞としてはヒト腸管由来のINT407細胞を採用し、テストウイルスとしてポリオウイルスを細胞に感染させた後、総RNAを回収した。逆

転写後、DNAマイクロアレイ（アフィメトリックス社）を用いてmRNA転写量を遺伝子ごとに測定した。対照として、ポリオウイルスを感染させていないINT407細胞におけるトランスクリプトーム解析も同時に行って結果と比較することで、ポリオウイルスの感染時に特異的に発現量が変動する遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

研究1年目には、培養不可能なノロウイルスの代替試験ウイルス粒子として、蛍光タンパク質付加ノロウイルス様中空粒子の新規合成をバキュロウイルス-昆虫細胞発現系により行った。ノロウイルスGII.4の翻訳領域ORF3の5'末端に緑色蛍光タンパク質遺伝子を付加した遺伝子を作成し、翻訳領域ORF2と共に昆虫細胞sf-9またはHigh Fiveに感染させることで緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子を合成した。その後、遠心分離により昆虫細胞を除去し、26,000×g、4℃での超遠心分離により残存するバキュロウイルスを除去した。次に、スクロースクッション法による濃縮を行ったあと、塩化セシウム密度勾配遠心法（0.37 g CsCl₂/cm³, 220,000×g, 40 hour, 4℃）により緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子を精製した。さらに、抗ノロウイルスGII.4抗体をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィを行うことで、ウイルス様中空粒子に付加されていない、外部にある緑色蛍光タンパク質を除去した。精製後の緑色蛍光タンパク質付加ウイルス様粒子に対し、透過型電子顕微鏡での観察および蛍光強度の測定を行った。その結果、昆虫細胞High Fiveを使用し、モルモット産生抗ノロウイルスGII.4抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィを行った試料の顕微鏡観察において、ノロウイルス様中空粒子が観察された。またこの試料からは微弱ながらも緑色蛍光が観測されたことから、緑色蛍光タンパク質が付加したノロウイルス様中空粒子の合成に成功したことが確認された。一方、昆虫細胞sf-9を使用した系では、本来のウイルス様中空粒子より小さいT=1粒子が数多く観察されたことから、ノロウイルス様中空粒子の合成には適していないことが明らかとなった。

研究2年目には、研究初年度に準備した緑色蛍光タンパク質付加ノロウイルス様中空粒子を用いて、ノロウイルス培養細胞への感染を観察することを試みた。組織細胞としてはヒト腸管由来のINT407細胞を採用し、緑色蛍光タンパク質付加ノロウイルス様中空粒子を滴下して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、中空粒子の観察に足る十分な蛍光量が確保できないことが明らかとなった。緑色蛍

光タンパク質付加ウイルス様粒子の合成効率が十分ではないことが理由として考えられた。そこで、さらなる取組みとして、組織細胞へのノロウイルス感染が生じた際の細胞応答に着目し、ウイルス感染を迅速に検出可能な遺伝子マーカーを探索することを試みた。テストウイルスとしてはポリオウイルスを用い、INT407 細胞へ感染後、12 時間後に総 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。対照として、ポリオウイルスを感染させていない INT407 細胞からも総 RNA を抽出し、同様な方法でトランスクリプトーム解析を行った。その結果、発現量が上昇した遺伝子数は 49, 下降した遺伝子数は 66 であることが示された。中でも特に高い変動値を示した遺伝子は、ケモカイン、ケモカインレセプター、及びイオンチャネルに関わるグループに大別された。当初は自然免疫におけるパターン認識受容体、例えば Toll 様受容体などに関わる遺伝子の発現変動が予想されたが、今回のトランスクリプトーム解析においてはパターン認識受容体関連の遺伝子においては顕著な変動が見られなかった。組織細胞は一般的に低い免疫応答を示すことが知られており、今回の結果もその影響が見られたものと考えられる。最も高い変動値を示した KCNJ4 はカリウムイオンチャネルの調節に関わる遺伝子であり、カリウムの恒常性を保つ働きがあるイオンチャネルである。ポリオウイルス 1 型感染後の INT407 細胞において KCNJ4 の発現解析を経時的に行ったところ、感染後 6 時間以内において発現量が顕著に上昇し、ウイルス感染時の濃度が非常に低い条件（細胞数 10^5 に対してウイルス 1 粒子）においても極めて高い変動値を示したことから、この KCNJ4 遺伝子が極低濃度のウイルス感染に対して敏感に反応することが示唆された。さらに、KCNJ4 遺伝子は、サンプル中にウイルス以外の夾雑物、例えば医薬品や重金属等が存在していても、ウイルスが感染していなければ発現量が変動しないことが確認された。以上の結果は、KCNJ4 がウイルスの細胞感染を検出する遺伝子マーカーとして活用可能であることを示している。本研究により、ノロウイルスの細胞感染を迅速に検出するために必要な遺伝子マーカーが同定されたことから、組織細胞によるノロウイルス培養実現に向けて非常に貴重な知見が得られたと言える。

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 1 件)

(1) Kazuki Tojo, Daisuke Sano, Takayuki

Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. A new approach for evaluating the infectivity of noncultivable enteric viruses without cell culture. *Water Science and Technology*, 2013, 67(10), 2236-2240.

doi: 10.2166/wst.2013.114

査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1) Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Microbiologically safe water management in membrane-based wastewater reuse. 1st Symposium on Innovation and Water Monitoring System with Rapid, Highly Precise and Exhaustive Pathogen Detection Technologies. Sendai, Japan. Oct. 20, 2012.

(2) Megumi Tazawa, Takayuki Miura, Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Transcriptome analysis of intestinal epithelial cells infected with poliovirus type 1. *Europic* 2012. Saint Paphael, France. Jun. 3-7, 2012.

(3) 山口諒、今井崇博、西牧宏尚、真砂佳史、大村達夫. 緑色蛍光タンパク質付加ノロウイルス様中空粒子. 第 46 回水環境学会年会. 東京. 2012 年 3 月 14-16 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 達夫 (TATSUO OMURA)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30111248

(2) 研究分担者

佐野 大輔 (DAISUKE SANŌ)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 80550368

(3) 研究分担者

真砂 佳史 (YOSHIFUMI MASAGO)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 50507895