

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010-2011

課題番号：22790142

研究課題名（和文） ノロウイルス、サポウイルス感染症制御のための機能的ウイルス受容体の同定

研究課題名（英文） Attempts to identify functional receptor for caliciviruses

研究代表者 岡 智一郎 (Oka Tomoichiro)

国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究者番号 50356242

研究成果の概要（和文）：

ヒト小腸由来 cDNA ライブラリーの発現スクリーニングを行い、ヒト由来のカリシウイルス（ノロウイルスもしくはサポウイルス）のリコンビナントウイルス様中空粒子に結合する細胞因子を検索した。また、培養細胞での増殖が可能なネコカリシウイルスを用いて、プラスミドを細胞に導入するだけでウイルスの産出が可能な新規リバーシジェネティクス系を構築することに成功した。本検出系はヒト由来カリシウイルスの感染性粒子作出にも使用出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To identify calicivirus functional receptors, cellular factors binding to human Norovirus or Sapovirus-like particles have been screened using expression screening of human small intestine cDNA library. A novel plasmid-based reverse genetics system for feline calicivirus has been established. This system could be used for the production of infectious human calicivirus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

ヒト由来のカリシウイルス（ノロウイルス、サポウイルス）は、臨床所見に基づいて、小腸で速やかにかつ大量に増殖すると考えられている。しかし、これまでに多くの研究者が様々な培養細胞、培養条件を検討してきたにもかかわらず、いまだに再現可能な培養細胞を用いた増殖系が確立されていない。

また、ヒト由来カリシウイルスの培養細胞

を用いた増殖系が確立されていないため感染実験のためのウイルス供給源として、糞便検体そのもの、あるいは糞便から超遠心などで部分精製したウイルスを用いざるを得ない状況にある。糞便検体は夾雑物も多く、培養細胞への毒性を示すことがあるなど、感染実験を円滑に進める上での問題が多い。

一方で、動物由来のカリシウイルスの中にはマウスノロウイルスや、ブタサポウイルス

、そしてネコカリシウイルスのように培養細胞での増殖系が確立されているものがある。このうち、ネコカリシウイルスについては細胞表面に存在する機能性受容体もすでに同定されている。

2. 研究の目的

ヒト由来のカリシウイルス（ノロウイルス、サポウイルス）の増殖系を確立することを最終目標に、まず、ヒト由来カリシウイルスが結合する細胞因子を検索する。現時点では培養細胞で再現性のある増殖系が確立されていないため、従来試みられていない手法として、これらのウイルスが増殖すると考えられている組織由来の遺伝子を解析対象とする。また培養細胞での増殖が可能なマウスノロウイルス、ブタサポウイルスについても、これらのウイルスが増殖可能な培養細胞を用いて感染受容体因子の検索を目指した検討を試みる。

さらに、ヒトカリシウイルスの感染性ウイルス作出につながる基盤技術を確認することを目標に、培養細胞でのウイルス増殖が可能で、評価が容易なネコカリシウイルスをモデルウイルスとして、新規のリバースジェネティクス系の構築も試みる。

3. 研究の方法

ヒト由来のノロウイルス、サポウイルスが感染、増殖すると考えられている小腸の cDNA ライブラリーを保有するレトロウイルスを作成し、マウス由来浮遊細胞 (P3U1) に感染させた。その後、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞発現系にて調製したウイルス様中空粒子に結合する細胞を検索、クローニングし、これらの細胞が保有するヒト由来遺伝子の配列を解析した。

また、マウスノロウイルスが増殖可能な RAW264.7 細胞の cDNA ライブラリー保有レトロウイルスを作成し、マウスノロウイルス非感受性細胞に遺伝子を導入した。

ブタサポウイルスは LLC-PK 細胞にコール酸の一種を加えることで初めてウイルスの増殖が可能となる。そのため、コール酸非添加と添加の培養細胞からそれぞれ RNA を抽出し、遺伝子発現発現の違いを DNA マイクロアレイで解析した。

ネコカリシウイルスの新規リバースジェネティクス系構築のため、ヒト Elongation Factor-1 α プロモーターを有する哺乳動物細胞発現ベクター pKS435 にネコカリシウイルス F4 株のゲノム cDNA をクローニングした。ウイルス増殖の特異性を評価するため、試験管内でプロテアーゼ活性に必須なアミノ酸残基に変異を導入したクローンも同時に作成した。これらの plasmid をネコカリシウイルスが増殖可能な CRFK 細胞に transfect し、

培養上清への感染性ウイルスの産生を評価した。

4. 研究成果

ヒト小腸由来の cDNA ライブラリーから、ノロウイルスもしくはサポウイルスのリコンビナントウイルス様中空粒子に結合する因子を見いだした。これらの遺伝子がコードするタンパク質は膜貫通ドメインを有すると考えられた。また、ノロウイルスとサポウイルスでは結合した因子が異なっていた。得られたヒト由来遺伝子の配列は部分配列であったため、データベース登録配列との相同性に基づき、全長に相当する配列を入手後、薬剤選択が可能で哺乳動物細胞用発現ベクターを用いて発現コンストラクトを安定発現する培養細胞を作成している。今後、これら受容体候補因子の安定発現細胞について、ノロウイルス、サポウイルスの感染、増殖能を評価する。

また、マウスノロウイルスが増殖する細胞の cDNA ライブラリーを、マウスノロウイルスが増殖しない細胞に発現させ、新たに構築したリアルタイム PCR 法を用いてマウスノロウイルス増殖能を獲得する細胞の検索を進めている。

ブタサポウイルスの増殖が可能な細胞へのコール酸非添加、添加条件で発現が亢進し、膜結合ドメインをコードする遺伝子として、6つの遺伝子を同定した。今後、これらの遺伝子がブタサポウイルスの感染、増殖に必須であるか検討を行う。

ネコカリシウイルスのフルゲノム cDNA を保有する plasmid を培養細胞に transfect することで、ウイルスを回収することが出来る新規リバースジェネティクス系を構築することに成功した。ウイルスプロテアーゼ活性部位に変異を導入した plasmid からはウイルスは回収されなかった。本研究により、従来法のように *in vitro* での RNA 合成や capping 操作などが不要になり、簡便かつ効率的にウイルスを調製することが可能となった。また、ウイルスがコードするタンパク質の機能評価にも有用であることが示された。この新規リバースジェネティクス系を応用することで、今後、ヒト由来カリシウイルス（ノロウイルス、サポウイルス）の感染性ウイルスを調製できる可能性がある。本研究で同定した受容体候補因子の検討に、臨床検体由来のウイルスだけでなく、リバースジェネティクス系を組み合わせた検討を進める。

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 3 件)

Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K.

Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells

Antiviral Research 90 (1) 9-16. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.02.002>

Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K.

Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus protease

Microbiology and Immunology. 55(2):108-14. 2011.

doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00295.x

Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K.

Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses

Journal of Virological Methods. 169 (2) 269-273 2010.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.018>

[学会発表] (計 9 件)

Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T.

Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan

16th Federation of Asian Veterinary

Associations Congress 2011.

2011 年 2 月 フィリピン

村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦

ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会

2010 年 12 月 神戸

岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦

カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会

2010 年 12 月 神戸

高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、岡智一郎、片山浩之、片山和彦、杉山和良

マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討

第 58 回日本ウイルス学会学術集会

2010 年 11 月 徳島

北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之

サポウイルスに対する単クローン抗体の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会

2010年11月 徳島

村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦

ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析

第58回日本ウイルス学会学術集会

2010年11月 徳島

岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦

ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築

第58回日本ウイルス学会学術集会

2010年11月 徳島

岡 智一郎

カリシウイルスの新知見

ウイルス性下痢症研究会第22回学術集会

2010年11月 徳島

Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K.

Antiviral Development

Fourth International Conference on Caliciviruses.

October 16-19, 2010. 10.16-19, チリ

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 岡 智一郎
(Oka Tomoichiro)
国立感染症研究所 ウイルス第2部
主任研究官

研究者番号：50356242

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：