

ネズミノロウイルスの ORF3 配列上の 必須領域の特定と外来遺伝子導入

北里大学大学院 感染制御科学府

感染制御・免疫学履修コース ウイルス学

ウイルス感染制御学研究室

DI-21001 石山 涼翔

指導教授 片山和彦教授

目 次

1	緒言	3
2	材料と方法	6
3	結果	16
4	考察	25
5	結語	29
6	謝辞	30
7	参考文献	31
8	図表	34

【緒言】

ノロウイルス (norovirus: NoV) は、カリシウイルス科ノロウイルス属ノロウイルスノーウォークス種 (*Caliciviridae, Norovirus, Norovirus norwalkense*) に属するウイルスの総称である。ヒトに感染するノロウイルス (human norovirus: HuNoV) は、急性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、世界中で年間1億人以上の罹患者を出し続けている (Fig. 1A)(1,2)。HuNoV は、発見以来長期にわたり *in vitro* で増殖培養させることができず、マウスなどの小型感染モデル動物が存在しないため、細胞への感染、細胞内動態、宿主体内での病原性発現機構など、ウイルス学的基礎研究の進行が妨げられてきた。2016年にヒト腸管オルガノイド (human intestinal epithelial organoids: hIEOs) を用いた *in vitro* での HuNoV の増殖培養の成功が報告され、hIEOs を利用した感染増殖機構の解明や治療薬開発、ワクチン開発が進められているが、未だ上市に至っていない(3)。

2012年にマウス脳内から発見されたネズミノロウイルス (murine norovirus: MNV) は、分類学上ノロウイルスノーウォークス種に属するウイルスである (Fig. 1B)。MNV は、マウスマクロファージ由来株化培養細胞 RAW264.7 での増殖培養が可能であり、自然宿主のマウスでの病原性は不明だが、糞口感染で感染伝播することが知られている。MNV は、ノロウイルスノーウォークス種に属するウイルスの中で唯一 *in vitro* での増殖培養が可能で、小型感染動物 (マウス) を有する NoV であり、HuNoV の代替ウイルスとして研究され、NoV のウイルス学的基礎研究を進歩させた(4-7)。当研究室の芳

賀らは、2016年に MNV のタンパク質性受容体分子 CD300lf, CD300ld の同定に成功した(8)。しかし、CD300lf, ld のヒトホモログ分子は、HuNoV の受容体分子として機能しなかったことや、MNV 感染マウスはヒトと異なり胃腸炎を発症しないなど、HuNoV と MNV で異なる点も多い。MNV を代替ウイルスとして用いる場合には、HuNoV の類似性と相違性を十分に理解した上で利用する必要がある(9)。

MNV のゲノムは、5' 末端に VPg と称するウイルスタンパク質が結合したプラス一本鎖 RNA であり、全長は約 7500 塩基、3'末端にはポリ A 配列を有する。ゲノム RNA には、基本的に 3 つのタンパク質コード領域 (open reading frame: ORF)が存在する。ORF1 には非構造タンパク質(non-structural protein: NSP)がコードされている。N 末端側から、N-terminal protein: N-term、nucleoside triphosphatase: NTPase、enteroviral 3A-like protein: 3A-like、genome linked viral protein: VPg、Protease、RNA dependent RNA polymerase: RdRp の 6 種類のウイルス複製に関与するタンパク質が連なって一本のポリペプチド鎖としてコードされている (Fig. 1C)。翻訳されたポリペプチド鎖は、ポリペプチド鎖内の Protease によりシス、及びトランス切断を受け、6 種類の成熟した非構造タンパク質となる。これらのタンパク質は、NSP として N 末端側から番号が付与されており、それぞれ N-term: NS1/2 (N-terminal protein は ORF1 ポリペプチドから切断された後、さらに二次切断を受けると考えられているため、NS1/2 と表記する。)、NTPase: NS3、3A-like: NS4、VPg: NS5、Protease: NS6、RdRp: NS7 と表記すること

が推奨されている。ORF2 と ORF3 はそれぞれ構造タンパク質 major viral structural protein: VP1 と minor viral structural protein: VP2 をコードしている。MNV では、ORF2 内部に読み枠が異なる (ATG の位置が異なる) ORF4 が重複して存在している。ORF4 には、murine norovirus virulence factor 1 (VF1) がコードされており、MNV の病原性に関与していると考えられている(10)。さらに、ゲノム RNA 5'非翻訳領域 (untranslated region: UTR)近傍、ORF1 と ORF2 のジャンクション領域近傍、ORF3 の 3'領域から 3'UTR を跨ぐ領域に、RNA のステムループが存在し、ウイルスの複製増殖に重要な機能を有することが示唆されている (Fig. 1C)(11,12)。

直径約 35 nm の NoV 感染性粒子は 180 分子の VP1 (90 分子の VP1 二量体) から形成され、5'末端に VPg を結合したゲノム RNA を内包している。感染性粒子中の VP2 の分子数は不明だが(13-15)、HuNoV の VP2 は粒子内側に存在し、VP1 二量体の shell domain (S-domain) 粒子内腔側に結合することが予測されている(14)。そのため、粒子内部に 90 分子の VP1 二量体を裏打ちするように 90 分子の VP2 が結合している可能性が示されているが、感染性粒子及びウイルス様中空粒子 (virus-like particle: VLP) のウェスタンブロットティング (western blotting: WB) による VP2 の解析では、1 粒子あたり数分子の VP2 の存在が示されているのみであり、感染性粒子内に内包される VP2 の分子数は、いまだに明らかにされていない(13,15)。

NoV の VP2 は塩基性アミノ酸を多数有することから、RNA 結合タンパク質である

と考えられている (13,14,16)。HuNoV の VP2 のアミノ酸配列は多様性に富み、特定の機能、RNA 結合に必須なドメインなどは同定されていない(17)。ノロウイルス属に近縁なベジウイルス属ベジウイルス フェリス種 (*Vesivirus, Vesivirus felis*) に属するネコカリシウイルス (feline calicivirus: FCV)では、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーを用いた FCV 感染性粒子の外部構造、内部構造の解析が実施された。その結果、FCV 感染性粒子が FCV 受容体タンパク質である Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1)に結合すると、粒子の変形が誘導され、粒子内部に存在する VP2 が粒子外側に突出してポータル状の構造物を形成することが明らかにされた(18)。このことから VP2 は、感染性粒子内部に格納されたゲノム RNA を能動的に放出させる機能を有し、ゲノム RNA の宿主細胞内部への注入に重要な役割を持つ分子であることが示唆された。また、VP2 をコードしている ORF3 の 3'側の塩基配列を欠損させると新生ウイルスが産生されなくなることから、ORF3 の 3'側には、ウイルス産生に必須な核酸配列が存在することが示唆された(19)。

NoV では、プラスミド由来のリバースジェネティクスシステム (reverse genetics system: RGS)の確立により、ウイルスゲノム RNA に任意の変異を導入し、標的遺伝子の機能解析を行うことが可能になった(20)。これを受け、RAW264.7 細胞を用いた増殖培養が可能である MNV の RGS を用いて、ゲノム RNA の 5'末端から 3' 末端までの全領域を対象に、トランスポゾン媒介挿入変異導入法を用いた外来性核酸配列 (15

nucleotides: 15 nt) の挿入が許容される領域の検索が行われた。その結果、3A-like(NS4) と VP2 コード領域に 15nt の挿入許容領域が存在することが明らかにされた(21)。しかし、この研究では、VP2 コード領域は FLAG タグ (DYKDDDDK のペプチド配列からなるペプチド配列タグ (D: アスパラギン酸、 Y: チロシン、 K: リシン) のような短い配列を挿入可能なことが示されたが、FLAG タグよりサイズが長いポリペプチド鎖、一般的に広くレポーターとして利用されている Green Fluorescent Protein(GFP)などの蛍光タンパク質をコードする配列を挿入できるか否かは、検討されていない。

HuNoV, MNV において、VP1 は単独で発現させることで自己集合して VLP を形成することから、粒子外殻形成には VP2 が必須では無いことが知られている(22-24)。しかし、前述のように FCV において ORF3 の 3'側の核酸配列を欠損させると感染性粒子が形成されないこと(19)、 MNV において ORF3 の 3'側からゲノム末端の 3' UTR に形成される RNA のステムループ構造がゲノムの複製に必須であることが報告されている(11)。これらの報告から、VP2 と ORF3 の 3' 領域の核酸配列は、共に MNV の細胞内複製に重要な働きを担っていると考えられている。したがって、感染性粒子形成における VP2 の機能を解析するためには、タンパク質としての VP2 が必要なのか、ORF3 の核酸配列が必要なのかを明確に区別する必要がある。

当教室の先行研究では、それらを区別するために、VP2 と ORF3 核酸配列を別々に評価できる系を構築した。MNV の RGS により ORF3 開始コドン直後にストップコード

ンを導入し VP2 発現を停止させると、感染性粒子は産生されなかった。次に、VP2 を一過性発現ベクターからトランス供給すると、感染性粒子が産生されるようになった。しかし、ORF3 の核酸配列の大部分を欠損させた場合、VP2 をトランス供給しても感染性粒子産生はレスキューされなかった。以上の結果から、ORF3 の 3' 側の核酸配列に感染性粒子産生に必須な領域が存在することが示唆された。

このように VP2 はウイルスのライフサイクルにおいて重要な働きをしていることが考えられるが、構造タンパク質としての機能、ゲノムのパッケージングに関する機能及び立体構造の解明など詳細な研究がなされていないため、明らかになっていないところが多く残されている。VP2 の機能を明らかにすることができれば、VP2 の機能阻害を目的とした抗ウイルス剤やワクチン開発に繋がると期待できる。本研究は、RGS を利用し、ノロウイルス ノーウォークケンス種のゲノム構造に共通する 3 つのタンパク質コード領域（非構造タンパク質をコードする ORF1、VP1 をコードする ORF2、VP2 をコードする ORF3）と 3' UTR のうち、ORF3(VP2)のノロウイルスの細胞内複製に関する機能を明確にすることが目的となる。さらに、MNV の自然宿主細胞である RAW264.7 よりも安定して複製が可能となるよう、遺伝子改変を行った株化培養細胞を樹立し、RGS を利用した外来遺伝子（レポーター遺伝子）を内包する新生ウイルスの安定産生システムを構築することも目的となる。

【材料と方法】

1. 細胞株

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 HEK293T 及び HEK293GP、マウス腹水由来マクロファージ細胞 RAW264.7 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。ヒト肝癌細胞 Huh7.5.1 (ヒト肝癌由来細胞 Huh7 の RIG-I 遺伝子にミスセンス変異を有し、C 型肝炎ウイルスの JFH-1 株に対して高い寛容性を示した細胞株、Francis V. Chisari 博士によって作出) (25,26) Huh7.5.1 に MNV 受容体タンパク質である mouse CD300lf の遺伝子を導入し、恒常的に mCD300lf を発現する細胞株 (HuhCD300lf)、HuhCD300lf 細胞に MNV S7 VP2 を恒常的に発現させた細胞株 (HuhCD300VP2)、マウス由来株化培養細胞 (RAW264.7)、RAW264.7 細胞に MNV S7 VP2 を恒常的に発現させた細胞株 (RAWVP2) はそれぞれ当研究室内で作製した。RAW264.7 以外の細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM: ナカライテスク) に 56°C, 30 分の条件下で非働化した Fetal Bovine Serum (FBS: CAPRICORN) を加えた細胞培養用培地 (Table. 1) を用いて継代培養した。RAW264.7 は 60°C, 1 時間の条件下で非働化した FBS を加えた細胞培養用培地を用いて継代培養した。

2. コンストラクション作製

ORF3 欠損変異体プラスミドは MNV-S7 PP3 株の全塩基配列を pKS435 ベクターの

EF1 α プロモーター下流にクローニングした pKS MNV S7 を基に構築し、下記にまとめた。

- 1) **pMNV_{S7F} ORF3_{stop} (ORF3stop)**: ORF3 のコドン 7 (GGA) と、コドン 10 (GGA) に G→T の点突然変異を導入してストップコドン (TGA) に変換した。そのため、VP2 の翻訳が 6 アミノ酸残基までで確実に停止する。ORF3 の核酸配列は、ストップコドン導入のための点突然変異以外、野生型の核酸配列と同一に保たれており、ORF3 の核酸としての機能は保存されている。
- 2) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ N (Δ N)**: ORF3 のコドン 4 からコドン 105 までの核酸配列を欠損させ、コドン 1~3 とコドン 106~208 を連結したため、N 末端約 1/3 を欠損した VP2 変異体が翻訳される。コドン 106 以降の核酸配列に依存する機能は保存されている。
- 3) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ N_{stop} (Δ N_{stop})**: 上記 Δ N のコドン 106 (TCG) と 108 (TCG) に C→A の点突然変異を導入してストップコドン (TAG) に変換した。コドン 3 直下にストップコドン (TAG) があるため、VP2 の翻訳は 3 アミノ酸残基までで確実に停止する。 Δ N と異なり、N 末端約 1/3 を欠損した VP2 変異体の影響を受けず、コドン 106 以降の核酸配列の機能解析ができる。
- 4) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ M (Δ M)**: ORF3 のコドン 53 からコドン 156 までの核酸配列を欠損させ、コドン 1~52 とコドン 157~208 を連結したため、VP2 の中程約 1/3 を

欠損した VP2 変異体が翻訳される。コドン 1~52 と 157 以降の核酸配列に依存する機能は保存されている。

5) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ M_{stop} (Δ M_{stop}):** Δ M と同様に ORF3 のコドン 53 からコドン 156

までの核酸配列を欠損させ、コドン 1~52 とコドン 157~208 を連結したが、

ORF3stop のコドン 7 とコドン 10 に導入したストップコドンを有するため、VP2

の翻訳は 3 アミノ酸残基までで確実に停止する。 Δ M と異なり、VP2 の中程約

1/3 を欠損した VP2 変異体の影響を受けず、コドン 1~52 とコドン 157 以降の核酸配列の機能解析ができる。

6) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ C (Δ C):** ORF3 のコドン 115 からコドン 205 までの核酸配列を

欠損させ、コドン 1~114 とコドン 206~208 を連結したため、VP2 の C 末端側約

1/3 を欠損した VP2 変異体が翻訳される。コドン 1~114 と 206 以降の核酸配列

に依存する機能は保存されている。

7) **pMNV_{S7F} ORF3 Δ C_{stop} (Δ C_{stop}):** Δ C と同様に ORF3 のコドン 115 からコドン 205

までの核酸配列を欠損させ、コドン 1~114 とコドン 206~208 を連結したが、

ORF3stop のコドン 7 とコドン 10 に導入したストップコドンを有するため、VP2

の翻訳は 3 アミノ酸残基までで確実に停止する。 Δ C と異なり、VP2 の C 末端側

約 1/3 を欠損した VP2 変異体の影響を受けず、コドン 1~114 と 206 以降の核酸

配列に依存する機能解析ができる。

8) **pMNV_{S7F} ORF3Δ (ORF3Δ)**: ORF3 のコドン 4 から 205 を欠損させ、コドン 1~3 とコドン 206 以降を連結した。僅か 6 アミノ酸残基しか翻訳されないため VP2 のほぼ完全な欠損変異体である。ORF3 の核酸配列の 9 割以上を欠損しており、核酸としての機能も失っているネガティブコントロールである。

さらに、VP2 をトランスで供給するために、pMNV_{S7F} から ORF1 及び ORF2 をコードする領域を欠損させた pORF3 を構築した。また、UnaG、Venus 及び NanoLuc[®] 遺伝子を挿入した 3 つのレポーター遺伝子挿入プラスミドを構築した。ORF3 のコドン 5 からコドン 156 の塩基配列に UnaG、Venus 及び NanoLuc[®] (Nluc) 遺伝子をそれぞれ導入して pMNV_{S7F}ORF3ΔNM-UnaG (ΔNM-UnaG), pMNV_{S7F}ORF3ΔNM-Venus (ΔNM-Venus) 及び pMNV_{S7F}ORF3ΔNM-Nluc (ΔNM-Nluc) を構築した。

VP2 を発現する MSCV ベクターである MSCV-VP2-IRES-GFP は、MNV IRES GFP ベクター (Addgene #20672) の内部リボソーム進入部位 (IRES) の下流に MNV VP2 コード領域を挿入して構築した。pLVSIN-MNV VP2-IRES-puro は、pLNSIN-IRES-puromycin(8) の IRES の下流に MNV ORF3 領域を挿入して構築した。全ての DNA プラスミドの配列は SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) 及び次世代シーケンサー (Illumina) を用いて確認した。

3. RAWVP2、HuhCD300lf、HuhCD300VP2 細胞の作製

MSCV-VP2 IRESeGFP および VSV-G を HEK293GP 細胞に Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、48 時間後、HEK293GP 細胞の上清を回収し VP2 発現レトロウイルスベクターを作製した。そのベクターを RAW264.7 細胞に接種し、RAWVP2 細胞を樹立した。

pLVSIN-mCD300lf-IRES-puro(8)を改変し、ピューロマイシンの代わりにハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した pLVSIN-mCD300lf-IRES-hyg と 3 つのプラスミド (pMDLg/pRRE HIV-1、pMD2G env、pRSV-Rev (Addgene))を HEK293T 細胞にコトランスフェクションし、CD300lf を発現するレンチウイルスベクターを作製した。このレンチウイルスベクターを Huh7.5.1 細胞に接種し、0.2 mg/mL のハイグロマイシンを用いて薬剤選択を行い、HuhCD300lf 細胞を樹立した。さらに、フローサイトメトリーを用いてシングルセルクローニングを行い、HuhCD300lf C12-2 を樹立した。

pLVSIN-MNV VP2-IRES-puro と 3 つのプラスミド (pMDLg/pRRE HIV-1、pMD2G env、pRSV-Rev (Addgene))を HEK293T 細胞にコトランスフェクションし、MNV VP2 を発現するレンチウイルスベクターを作製した。この MNV VP2 発現レンチウイルスベクターを HuhCD300lf C12-2 に接種し、5 µg/mL のピューロマイシンを用いて薬剤選択し、HuhCD300VP2 細胞を樹立した。

4. 抗体

MNV S7 の ORF1 にコードされているタンパク質 (NS1/2) に対するポリクローナル抗血清は、大腸菌で発現させ精製したウイルスタンパク質を免疫したウサギ及びモルモットから回収した。また、抗 NS1/2 抗体を Capturem Protein A Miniprep Columns (TaKaRa) 及びそのプロトコルに準じた Capturem Protein A Buffer (TaKaRa) を用いて精製を行い、LYNX RAPID PLUS DyLight® 650 ANTIBODY CONJUGATION KIT (Bio-rad) を用いて DyLight 650 を標識した (DyLight 650 conjugated NS1/2 抗体)。

MNV S7 VP2 に対するポリクローナル抗血清は、VP2 の N 末端と C 末端領域のディスオーダー領域を除いたタンパク質を発現させ、精製したトランケート VP2 タンパク質を免疫したウサギ及びモルモットから回収した。MNV S7 VLP に対するポリクローナル抗血清は、組み換えバキュロウイルスで発現、精製した MNV S7 VLP を免疫したウサギ及びモルモットから回収した。

5. HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 の性状確認

HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS (-) ナカライテスク) を用いて 2 回洗浄したのち、0.5 g/L-トリプシン/0.53 mmol/L-EDTA 溶液 (ナカライテスク) を加え、37°C, 5 分, 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。DMEM を用いて均一に懸濁後、 1×10^6 cells/mL に調製したのち、細胞懸濁溶液 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、 $500 \times g$, 4°C, 3 分の条件下で

遠心した。上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁後、 $500 \times g$, 4°C , 3 分の条件下で遠心、洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、希釈した一次抗体 CD300f/LMIR3 Antibody (R&D SYSTEMS) $2.5 \mu\text{g}/\text{PBS} (-)$ 溶液を用いて細胞を均一に懸濁後、 4°C , 30 分の条件下で静置した。抗体を含む上清を除去したのち、PBS (-) を用いて細胞を懸濁し、 $500 \times g$, 4°C , 3 分の条件下で遠心して細胞を洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、二次抗体として Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞と反応させ、均一に懸濁後、 4°C , 30 分の条件下で静置した。抗体を含む上清を除去したのち、PBS (-) を用いて細胞を懸濁し、 $500 \times g$, 4°C , 3 分の条件下で遠心して細胞を洗浄した。この洗浄操作を 2 回行った。PBS (-) の上清を除去したのち、PBS (-) 1 mL を用いて均一に懸濁し FACS Melody セルソーター (BD Biosciences) 及び FlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。

6. 感染力価測定

[Tissue-Culture infectious Dose assay (TCID₅₀)]

96 well plate (TPP) に RAW264.7 を 1×10^4 cells/50 $\mu\text{L}/\text{well}$ の条件下で播種したのち、5 倍希釈系列で作製したウイルス溶液を 50 μL ずつ接種し、 37°C , 5% CO_2 の条件下で培養した。4-5 日後、ウイルス感染による細胞変性効果が観察された well を判定

し、Spearman-Karber 法を用いてウイルス力価を算出した。

[CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay]

リコンビナント MNV の細胞生存率を確認するため、CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay を用いて算出した。96 well plate (TPP) に HuhCD300VP2 を 5×10^4 cells/50 μ L/well の条件下で播種したのち、5 倍希釈系列で作製したウイルス溶液を 50 μ L ずつ接種し、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。5 日後、培養上清を取り除いたのち、PBS (-) を用いて洗浄した。洗浄後、Opti-MEM (Gibco) 100 μ L ずつ加えたのち、CellTiter-Glo 2.0 Reagent 100 μ L を加え、室温、2 分の条件下でインキュベートした。その後、各 well の溶液全量を白色プレートに移したのち、EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer) を用いて測定した。

7. SDS-PAGE 及び Western Blotting

[SDS Polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE]

Fig. 5C の実験では 2×10^5 cells/well の HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 を PBS (-) を用いて 3 回洗浄したのち、2 \times SDS sample buffer 500 μ L (Table. 2) を加え、セルスクレーパー (IWAKI) を用いて細胞を溶解させた。Fig. 11E の実験では、3 時間ごとに MNV 及び Δ NM-Venus ウイルスを感染させた 2×10^5 cells/well の HuhCD300lf を PBS (-) を用いて 3 回洗浄したのち、2 \times SDS sample buffer 500 μ L

を加え、セルスクレーパーを用いて細胞を溶解させた。それぞれ細胞溶解液を 1.5 mL マイクロチューブ (Eppendorf) に移したのち、Bioruptor (ソニック・バイオ株式会社) を用いて 15 分, High の条件下で、超音波処理を行った。その後、100°C, 10 分の条件下で加熱した。放冷後、サンプル 10 μ L を SDS-PAGE gel (ATTO) にアプライし、300 V, 20 mA, 60 分の条件下で電気泳動を行った。泳動後、Distilled Water を用いて 3 回洗浄したのち、Western Blotting を行った。

[Western Blotting]

Fig. 5C の実験では、Trans-Blot Turbo Transfer System (BIORAD) 及び Trans-Blot Turbo Transfer Pack (BIORAD) を用いて、SDS-PAGE 後のゲルからメンブレンへタンパク質を 2.5 A, 25 V, 3 分の条件下で転写した。本研究では、非特異的なバンドの減少とシグナルの増強が報告されている Can Get Signal シリーズ (TOYOBO) を溶媒として用いた。また、メンブレンへ転写後、ゲルをクマシーブリリアントブルーを用いて染色し、目的タンパク質が転写されていることを確認した。転写後、このメンブレンを PVDF Blocking reagent for Can Get Signal (TOYOBO) に 1 時間以上浸し、ブロッキングを行った。Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 for primary antibody (TOYOBO) で 1,000 倍希釈したウサギ抗 VP2 血清 5 mL を転写したメンブレンと共に Hybri-Bag Soft (コスモ・バイオ株式会社) に入れ、パッキン室温で 1 時間以上、メンブレン上に転写されたタンパク質と 1 次抗体を反応させた。その後、メンブレンを 1

×TBST (Table. 3) で 3 回洗浄、標的タンパク質と結合していない 1 次抗体を除去した。Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 for secondary antibody で 10,000 倍希釈した HRP ラベル抗ウサギ IgG 抗体 5 mL を 1 次抗体と反応させたメンブレンと共に、Hybri-Bag Soft に入れ、パッキン室温で 1 時間以上、メンブレン上に残る標的タンパク質と特異的に結合した 1 次抗体と反応させた。その後、1×TBST で 3 回洗浄後、Chemi-Lumi One L SolutionA,B (ナカライテスク) を 800 μ L ずつ混合し、混合液をメンブレンに浸し反応させた。2 次抗体に修飾されている HRP によって触媒されるケミルミネッセンス反応を行い、ChemiDoc MP Imaging System (BIORAD) を用いて化学発光を検出した。

Fig. 11E の実験では、Trans-Blot Turbo Transfer System (BIORAD) 及び Trans-Blot Turbo Transfer Pack (BIORAD) を用いて、SDS-PAGE 後のゲルからメンブレンへタンパク質を 2.5 A, 25 V, 3 分 の条件下で転写した。転写後、このメンブレンを PVDF Blocking reagent for Can Get Signal (TOYOBO) に 1 時間以上浸し、ブロッキングを行った。Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 for primary antibody (TOYOBO) で 1,000 倍希釈した Dylight 650 conjugated NS1/2 抗体及び Rhodamine conjugated Actin 抗体 (Bio-rad) 5 mL (rabbit) を転写したメンブレンと共に Hybri-Bag Soft (コスモ・バイオ株式会社) に入れ、パッキン室温で 1 時間以上、メンブレン上に転写されたタンパク質と 1 次抗体を反応させた。その後、メンブレンを 1×TBST

で3回洗浄後、ChemiDoc MP Imaging System (BIORAD)を用いて蛍光を検出した。

8. トランスフェクションを用いた変異体ウイルスの作出

変異体ウイルスを作出するために、 Δ NM-UnaG, Δ NM-Venus 及び Δ NM-Nluc プラスミドをそれぞれ HEK293T にトランスフェクションした。Opti-MEM (Gibco) 60 μ L ずつ分注した 1.5 mL マイクロチューブ (Axygen) に 1 μ g/ μ L に調製した Δ NM-UnaG, Δ NM-Venus 及び Δ NM-Nluc プラスミド をそれぞれ 1 μ L ずつ加えた。さらに、1 μ g/ μ L に調製した pORF 3 1 μ L も加えたのち、ボルテックスで混和後、マイクロ遠心機 (TOMY) を用いてスピンドウンを行い、DNA 溶液を調製した。また、Opti-MEM (Gibco) 60 μ L ずつ分注した別の 1.5 mL マイクロチューブに Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 6 μ L ずつ加えた。ボルテックスで混和後、マイクロ遠心機を用いてスピンドウンを行い、室温、5 分の条件下で静置し、Lipofectamine 溶液を調製した。その後、DNA 溶液と Lipofectamine 溶液を混合して、ボルテックスで混和後、マイクロ遠心機を用いてスピンドウンを行い、室温、20 分の条件下で静置し、DNA-Lipofectamine 溶液を調製した。前日、6 well に 1×10^6 cells/2 mL/well で播種した HEK293T の培地を新しい培地 2 mL に交換したところに、DNA-Lipofectamine 溶液 128 μ L ずつ滴下し、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。48 時間後、培養上清を 2 mL マイクロチューブに回収し、12,000 \times g, 4°C, 10 分の条件下で遠心を行い、死細

胞などを沈降させ、沈渣として除去した。さらに、0.2 µm filter を用いてフィルター除去したのち、リコンビナント MNV を回収した。

9. 次世代シーケンス解析

5回継代した各変異体ウイルス上清から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス RNA の抽出を行った。精製したウイルス RNA は、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を用いてシーケンス用ライブラリーを作製した。反応液の組成及び反応条件は添付マニュアルに沿って行った。シーケンス配列の決定は、iSeq100 i1 Reagent Cartridge v2 (Illumina) を用いて 151 bp ペアエンドリードを作製した。FASTQ ファイルは CLC Genomic Workbench 21 (Qiagen-CLC Bio) を用いて解析した。

10. ミュータントウイルスによる感染イベントの評価

[蛍光顕微鏡 BZ-X 810 (KEYENCE) による検出]

ウイルスを感染させた HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 は、PBS (-) を用いて 2 回洗浄したのち、4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液 (PFA: ナカライテスク) を加え、室温、15 分の条件下で静置し、細胞を固定した。PBS (-) を用いて 2 回洗浄し、PFA を除去したのち、0.1% に PBS (-) で希釈したポリエチレングリコールモノ-

p-イソオクチルフェニルエーテル (Triton-X: ナカライテスク) を加え、室温、1 時間の条件下で静置し、透過処理を行った。PBS (-) を用いて 2 回洗浄し、Triton-X を除去したのち、1% に希釈したウシ血清アルブミン (1% BSA/PBS (-)) (Sigma) を加え、室温、1 時間の条件下で静置し、ブロッキングを行った。1% BSA/PBS (-) を除去したのち、ウサギ抗 MNV S7 N terminal protein 抗血清 (α NS1/2) を 2,000 倍に 1 % BSA/PBS (-) で希釈した溶液を加え、室温、1 時間の条件下でインキュベートした。PBS (-) を用いて 3 回洗浄し、 α NS1/2 を除去したのち、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Absorbed Secondary Antibody Alexa Flour 568 (Invitrogen) 及び Hoechst 33342 (Invitrogen) をそれぞれ 2,000 倍に 1% BSA/PBS (-) で希釈した溶液を加え、室温、1 時間の条件下でインキュベートした。PBS (-) で 3 回洗浄したのち、蛍光顕微鏡 BZ-X 810 (KEYENCE) を用いて撮影及び解析を行った。

[フローサイトメトリー (FACS) による検出]

Δ NM-Venus ウイルスを感染させた HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 は、PBS (-) を用いて 2 回洗浄したのち、0.5 g/L-トリプシン/0.53 mmol/L-EDTA 溶液を加え、37°C, 5 分 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。DMEM を用いて均一に懸濁後、500 × g, 4°C, 3 分の条件下で遠心した。DMEM の上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁後、500 × g, 4°C, 3 分の条件下で洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、PFA を用いて均一に懸濁後、4°C, 15 分の条件下で静置し、細胞を固定

した。500 × g, 4°C, 3 分の条件下で遠心後、PFA の上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁し、200 × g, 4°C, 5 分の条件下で洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、90% メタノール（ナカライテスク）を用いて均一に懸濁後、4°C, 15 分の条件下で静置し、透過処理を行った。200 × g, 4°C, 5 分の条件下で遠心後、90% メタノールの上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁し、200 × g, 4°C, 5 分の条件下で洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、α NS1/2 を 500 倍に PBS (-) で希釈した溶液を用いて均一に懸濁後、4°C, 30 分の条件下で静置した。200 × g, 4°C, 5 分の条件下で遠心、抗体を含む上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁し、200 × g, 4°C, 5 分の条件下で洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、2 時交代として Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG（Thermo Fisher Scientific）を用いて均一に懸濁後、4°C, 30 分の条件下で静置した。200 × g, 4°C, 5 分の条件下で遠心後、上清を除去したのち、PBS (-) を用いて均一に懸濁し、200 × g, 4°C, 5 分の条件下で洗浄した。PBS (-) の上清を除去したのち、PBS (-) を用いて $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL の細胞数になるように調製後、FACS Melody セルソーター（BD Biosciences）及び FlowJo ソフトウェア（BD Biosciences）を用いて解析した。

[ケミルミネセンスによる検出]

ΔNM-Nluc ウイルスを感染させた HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 は、PBS (-) を用いて 3 回洗浄したのち、培地を Opti-MEM に交換した。Nano-Glo Luciferase Assay

Substrate に対して 50 倍量の Nano-Glo Luciferase Assay Buffer を混和した溶液を Opti-MEM と等量加え、室温、3 分の条件下でインキュベートした。白色プレート (Thermo Fisher Scientific) に移したのち、EnSight Multimode Plate Reader (PerkinElmer) を用いて測定した。

11. 中和アッセイ

[Δ NM-Venus ウイルス]

12 well plate (TPP) に細胞継代用培地 500 μ L 及び 1/100, 1/1000 に希釈した抗 MNV-VLP 抗体 500 μ L と 2×10^8 RNA copies/mL に調製した Δ NM-Venus ウイルス溶液 500 μ L をそれぞれ加え、37°C, 24 時間, 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。HuhCD300VP2 を 1×10^5 cells/mL/well になるように調製し、12 well plate 各 well に 1 mL ずつ播種し、37°C, 48 時間, 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。fluorescence の検出は、FACS を用いて方法 10 に準じて実施した。

[Δ NM-Nluc ウイルス]

96 well plate (TPP) に細胞継代用培地 50 μ L 及び 1/100, 1/1000 に希釈した抗 MNV-VLP 抗体 50 μ L と 2×10^7 RNA copies/mL に調製した Δ NM-Nluc ウイルス溶液 50 μ L を加え、37°C, 24 時間, 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。HuhCD300VP2 を 2×10^5 cells/mL/well になるように調製し、96 well plate 各 well

に 100 μ L ずつ播種し、37°C, 48 時間, 5% CO₂ の条件下でインキュベートした。

Luciferase の検出は、Nano-Glo Luciferase Assay を用いて方法 10 に準じて実施した。

12. 免疫沈降および Nested PCR

Nested-RT-PCR を用いて細胞上清中のウイルスゲノムを検出した。HEK293T 及び RAWVP2 の上清中の MNV または ORF3 欠損ウイルスを、MNV VLP 抗体と Ab-Chapcher Mag (ProteNova) を用いて免疫沈降を行った。MNV-VLP 抗体と反応したウイルス粒子を 0.1 M Glycine-HCl (pH2.8) を用いて溶出し、1 M Tris-HCl (pH8.0) を用いて溶出溶液を中和した。この溶出溶液を QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN) を用いて精製し、ウイルスゲノムを抽出した。さらに、その抽出液に Baseline-ZERO DNase (Epicenter) を加え、37°C, 1 時間の条件下でインキュベートしてプラスミド DNA を除去した。Table 4 に示した Tx30SXN と SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い、第一鎖 cDNA を合成した。さらに Table 4 に示した Tx30SXN, MNV-F1, MNV-S 及び MNV-R2 を用いて、ORF1/2 領域の nested-PCR を行い、ウイルスゲノムを検出した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動、エチジウムブロマイド染色を行い、UV トランスイルミネーターを用いて増幅しているバンドを検出した。そのバンドを Image J ソフトウェアを用いてバンド強度を解析し、標準曲線を算出した。得られた標準曲線

をもとにウイルスゲノム RNA コピー数を算出した。

ORF3 に導入した欠損は継代培養後も維持されていることを確認するために、Table4 に示した MNV6401-6420 FW 及び MNV7330-7308 RV を用いて PCR を行い、UV トランスイルミネーターを用いて増幅しているバンドを検出した。

13. リアルタイム PCR

培養上清中のレポーターウイルスの RNA コピー数は、マウスノロウイルス検出キット (TOYOBO : Cade. FIK-4M) の試薬を用いて測定した。標準物質は pKS MNV S7 1 μ g を 10¹⁰ コピー数と設定し、10 倍希釈系列で 8 段階作製した。ウイルス液及び標準物質液はそれぞれキット付属の前処理液 6 μ L に加えて懸濁したのち、プロトコルに従って調製した溶液に加えた。その後、LightCycler96 Real-Time PCR System (Roche) を用いて、培養上清中のレポーターウイルスの RNA を検出及び定量を行った。

【図表】

Table. 1 細胞培養用培地

成分	使用量
Fetal Bovine Serum (CAPRICORN 社)	50 mL
DMEM (High Glucose) (ナカライテスク)	500 mL

Penicillin-Streptomycin (ThermoFisher)

5 mL

Table. 2 2× SDS sample buffer

成分	使用量
0.5 M Tris-HCl buffer (pH6.8)	25 mL
10% SDS 溶液	40 mL
Sucrose (ナカライテスク)	10 g
BPB	10 mg
2-mercaptoethanol	10 g
MilliQ	Up to 100 mL

Table. 3 1× TBST

成分	使用量
Tris(hydroxymethyl)aminomethane [Tris] (ナカライテスク)	60.6 g
NaCl (ナカライテスク)	80.6 g
KCl (関東化学株式会社)	2 g
Tween 20 (関東化学株式会社)	2 mL
MilliQ	Up to 20L

Table. 4 Nested PCR

プライマー	配列(5'-3')
Tx30SXN	GACTAGTTCTAGATCGCGCGAGCGCCGCCCTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

MNV-F1	GCCATGCATGGTGAAAAG
MNV-S	CCGCAGGAACGCTCAGCAG
MNV-R2	CAACCACCTTGCCAGCAG
MNV6401-6420 FW	TCGACTGTGCCCTTCCACAG
MNV7330-7308 RV	TCACAAAAGGTTTCTTCCAAC

【結果】

- VP2 は感染性粒子を形成するのに必須なタンパク質

ORF3 の塩基配列に塩基挿入、欠損、置換などの変異を加えた場合、核酸配列変異依存的にウイルス複製効率の低下を導く可能性がある。VP2 のウイルスタンパク質としての機能を明らかにするためには、ウイルス複製効率に影響を与える ORF3 内の塩基配列領域を特定し、それ以外の領域に核酸変異を導入して VP2 の機能を調べる必要がある。そこで、まず初めに ORF3 の核酸としての機能を保持するために必要な領域の同定を行った。RGS を用いた実験系に使用するプラスミドとして、MNV-S7 の感染性クローンプラスミドである **pMNV_{S7F}** (MNV-S7 の野生型ウイルスを産生する) を鋳型として、8 種類のコンストラクトを作製した (Fig. 2A)。それぞれのプラスミドを HEK293T にトランスフェクションし、48 時間後に培養上清を回収し、遠心により細胞残渣などを取り除いた培養上清を RAW264.7 細胞に接種した (Fig. 2B)。MNV-S7 の感染性クローンプラスミドである **pMNV_{S7F}** をトランスフェクションした HEK293T の培養上清を RAW264.7 に感染させ、VPg 抗体 (緑色)、VP1 抗体 (赤色) でそれぞれ免疫蛍光染色したところ、VPg の緑色の蛍光と VP1 の赤色の蛍光が認められた (Fig. 2C)。VPg と VP1 の蛍光が Merge 画像では、同一細胞内に共局在しており、HEK293T の培養上清中に産生された新生ウイルス粒子 RAW264.7 に感染し、細胞内で複製増殖していることが示された (Fig. 2C)。この結果から、HEK293T の培養上清

中に産生された新生ウイルス粒子 RAW264.7 に感染し、細胞内で複製増殖していることが示された。一方、**ORF3stop**、**ΔN**、**ΔM** 及び **ΔC** をトランスフェクションした HEK293T の培養上清を RAW264.7 に感染させた場合は、VPg と VP1 の蛍光が全く観察されず、培養上清に新生ウイルス粒子が含まれていないことが示唆された (Fig. 2C)。HuNoV 及び MNV の VLP は、VP1 分子が 180 分子自己集合したものであり、ゲノム RNA、VP2 を含んでいない (22-24)。**pMNV_{S7F}** をトランスフェクションした HEK293T の培養上清を RAW264.7 に感染させ、新生ウイルス粒子を増殖させ、分離精製された MNV 粒子を SDS-PAGE で解析したところ、58 kDa の VP1 のメインバンドの他に、約 22 kDa のバンドが確認された (Fig. 2D)。約 22 kDa のバンドは、MNV-VP2 抗体を用いた WB でも検出され、VP2 であることが明らかになった (Fig. 5C Purified MNV-S7)。

以上の結果をまとめると、新生ウイルス粒子の産生には完全長の VP2 が必要であることが MNV において初めて示唆された。

- VP2 のアミノ酸 115 から 205 をコードする ORF3 配列は感染性粒子産生に必須な領域

タンパク質として完全長の VP2 が新生ウイルス粒子形成に必須であることが明らかとなったため、VP2 を細胞内にトランス供給するためのプラスミド (**pORF3**) を構築

した。次に、**pORF3** と上記による一過性の VP2 の供給により形成された新生ウイルス粒子の感染増殖能力を調べるため、組換えレンチウイルス発現システムによって VP2 遺伝子 (ORF3 のこと) を宿主ゲノム内に組み込み、VP2 が恒常的に発現する RAW264.7 (RAWVP2) を構築した。RAWVP2 の恒常的 VP2 発現は、WB によって確認された (Fig. 3B)。これらを用いて VP2 のトランス供給によって **ORF3stop** から新生ウイルスが産生されるかどうか試験を行なった (Fig. 3A)。

pMNV_{S7F} をポジティブコントロール、**pMNV_{S7FΔ4572G} (ΔRdRp)** (20) (ポジション 4572 の核酸残基 G を欠損させることにより、RdRp 配列内にフレームシフトを発生させ、RdRp が翻訳されなくなった変異体プラスミド。ゲノム複製ができない) と **ORF3Δ** (ORF3 の核酸配列のほぼ完全な欠損により VP2 を発現できない変異体) をネガティブコントロールとしてそれぞれ使用した。

pMNV_{S7F}、**ORF3stop**、**ORF3Δ**、**ΔRdRp** をそれぞれ **pORF3** と HEK293T にコトランスフェクションし、その培養上清を RAWVP2 に感染させ、VPg 抗体 (緑色)、VP1 抗体 (赤色) でそれぞれ免疫染色したところ、**ORF3stop** では **pMNV_{S7F}** と比較して陽性細胞数が少ない傾向ではあるが、VPg の緑色の蛍光と VP1 の赤色の蛍光が認められ、マージ画像から VPg、VP1 の蛍光は、同一細胞内に存在することが示された (Fig. 3C)。この結果より、VP2 を細胞内にトランス供給すると、**ORF3stop** から転写された変異体ゲノムを内包した新生ウイルスが HEK293T 上清に産生され、その上清を

RAWVP2 に感染させると、新生ウイルスの感染増殖が認められたことが示された。一方、**ORF3Δ**、**ΔRdRp** では、VPg の緑色の蛍光と VP1 の赤色の蛍光を認められず、これらの変異体では、VP2 をトランス供給しても新生ウイルスが産生されないことが示唆された。

次に、VP2 をトランスで供給する条件下で感染性粒子形成に必要な ORF3 の塩基配列を同定するため、ORF3 のコドン 4 からコドン 105 までの核酸配列を欠損させた **ΔN**、**ΔNstop**、ORF3 のコドン 53 からコドン 156 までの核酸配列を欠損させた **ΔM**、**ΔMstop**、コドン 115 からコドン 205 の核酸配列を欠損させた **ΔC**、**ΔCstop** と、**pORF3** をそれぞれ HEK293T 細胞にコトランスフェクションし、同様の実験を行った。**ΔN**、**ΔNstop**、**ΔM**、**ΔMstop** において VPg 及び VP1 の蛍光が観察された (Fig. 3D)。この結果は、**ΔN**、**ΔNstop**、**ΔM**、**ΔMstop** は、VP2 が恒常的にトランス供給される環境下では、HEK293T での新生ウイルスの産生と、RAWVP2 での新生ウイルスの感染増殖が認められることを示していた。新生ウイルス産生は **ΔNstop**、**ΔMstop** の蛍光陽性細胞数は、**ΔN**、**ΔM** と比べて変化はなかったことから、**ΔN**、**ΔM** から翻訳される VP2 変異体は、トランスで供給される完全長 VP2 の機能に影響を与えていないことが示唆された。さらに、ORF3 のコドン 4 からコドン 156 までの核酸配列の欠損は、新生ウイルスの産生と感染増殖に影響を与えないことが明らかになった。一方、コドン 115 からコドン 205 の核酸配列を欠損させた **ΔC** 及び **ΔCstop** では、VPg 及び

VP1 の蛍光が認められなかったことから、コドン 115 からコドン 205 の核酸配列を失うと完全長 VP2 がトランスで供給される環境下でも、新生ウイルス粒子は産生されないことが明らかになった (Fig. 3D)。これらの結果から、ORF3 のコドン 115 からコドン 205 の塩基配列は新生ウイルスの産生に必須であることが示唆された。

ΔC 及び $\Delta Cstop$ ではウイルスタンパク質が観察されなかったのは、非感染性粒子の形成による影響なのか、感染性粒子が形成されないことによる影響なのかは不明瞭であった。そこで、HEK293T 上清中に ΔC 及び $\Delta Cstop$ 変異体ゲノムを持つ新生ウイルス粒子が存在するかどうかを調べた。抗 VLP 抗体 (感染性粒子に結合可能な抗体) を用いて培養上清中のウイルス粒子を免疫沈降させ、MNV ゲノムの検出を試みた (Fig. 4)。ウイルスゲノムのコピー数は nested RT-PCR を用いて定量した (Fig. 4A and 3B)。Nested RT-PCR の定量性を検証するため、 10^3 コピーから 10^8 コピー/ μL の完全長 MNV-S7 genome RNA を用いて nested RT-PCR を実施し、増幅産物のバンドをゲルイメージャーで測定し、バンド強度 (Intensity) を求め検量線を描いた。バンド強度と RNA コピー量は $y=1E+15e^{-0.114x}$ と良好な近似直線が得られ、nested RT-PCR の定量性が確認された (Fig. 4A)。グラフはバンド強度測定プログラムとして用いた ImageJ (NIH からフリーソフトウェアとして供給されている) の設定上、RNA コピー量と Intensity とは逆相関として表記した。

pMNV_{S7F}、ORF3stop、 Δ N、 Δ Nstop、 Δ M、 Δ Mstop、 Δ C、 Δ Cstop、ORF3 Δ 、 Δ RdRp と pORF3 をそれぞれ HEK293T にコトランスフェクションし、その培養上清を用いて、抗 VLP 抗体による免疫沈降によって新生ウイルス粒子を精製した。さらに、HEK293T の培養上清を感染させた RAWVP2 の培養上清についても同様に新生ウイルス粒子の精製を行った。その精製溶液を用いた nested RT-PCR 定量系によって、増幅産物のバンドが検出されたのは、HEK293T 上清では、pMNV_{S7F}、ORF3stop、 Δ N、 Δ Nstop、 Δ M、 Δ Mstop であり (Fig. 4B 上段 lane 1 から 6)、 Δ C、 Δ Cstop、ORF3 Δ 、 Δ RdRp では増幅産物のバンドが検出されなかった。RAWVP2 上清でも、HEK293T 上清と同様に pMNV_{S7F}、ORF3stop、 Δ N、 Δ Nstop、 Δ M、 Δ Mstop に、増幅産物のバンドが検出され (Fig. 4B 下段 lane 1 から 6)、 Δ C、 Δ Cstop、ORF3 Δ 、 Δ RdRp では増幅産物のバンドが検出されなかった。それぞれの増幅産物の定量値は、Fig. 4B 下方の表に示した。pMNV_{S7F}、ORF3stop、 Δ N、 Δ Nstop、 Δ M の HEK293T 上清には、 10^4 /mL の新生ウイルス産生が認められた。それに対して、RAWVP2 の上清には 10^6 から 10^8 /mL と、HEK293T の約 100 倍から 10,000 倍の新生ウイルス粒子が産生されていることが明らかになった。HEK293T で産生された新生ウイルス粒子を RAWVP2 に感染させると指数関数的な粒子数の増加が確認されたことから、RAWVP2 細胞においてウイルスライフサイクルが複数回繰り返されたことを示唆していた。一方、 Δ C、 Δ Cstop、ORF3 Δ 、 Δ RdRp では、HEK293T の上清から増幅産物のバンドが検出され

なかった (Fig. 4B 上段 lane 7 から 10)。これらの結果から、**ΔC** 及び **ΔCstop** では、VP2 がトランスで供給されていても、培養上清中にウイルスゲノムを含む粒子が形成されておらず、Fig. 3 で示された **ΔC** 及び **ΔCstop** におけるウイルスタンパク質欠損は、非感染性粒子の形成によるものではないことが示唆された。

- 導入した ORF3 変異は新生ウイルスの増殖培養後も維持され、復帰変異体は出現しない

pMNV_{S7F}、**ORF3stop**、**ΔN**、**ΔNstop**、**ΔM**、**ΔMstop** の HEK293T および RAWVP2 の培養上清に、新生ウイルスとして検出されたウイルスに復帰変異体が含まれているのかを調べるため、ウイルスゲノムの ORF3 の 5' 末端と 3' 末端にプライマーを設計し、RT-PCR で増幅した増幅産物の鎖長を確認した。**ORF3stop**、**ΔN**、**ΔNstop**、**ΔM** 及び **ΔMstop** から得られた増幅産物のサイズは、それぞれのコンストラクトに対応したサイズであり、HEK293T、RAWVP2 の増幅産物サイズに差は無く (Fig. 4C “293T and ”RAWVP2”)、それぞれのトランスフェクションに用いたプラスミドコンストラクト **pMNV_{S7F}**、**ORF3stop**、**ΔN**、**ΔNstop**、**ΔM**、**ΔMstop** を鋳型として実施した RT-PCR の増幅産物とも同じサイズであった (Fig. 4C “Plasmid”)。これらの結果から、ORF3 に導入した欠損は HEK293T での新生ウイルス産生後も、RAWVP2 での増殖培養後も維持されており、復帰変異体が出現しなかったことが示された。

- Huh7.5.1/CD300lf 細胞を利用した高効率な ORF3 欠損ウイルス産生システムの構築

ORF3 欠損ウイルスを効率的に作出及び増殖させるために、一本鎖 RNA をゲノムとする HCV などのウイルスの複製増殖効率が高い Huh7.5.1 細胞(25,26) を用いた新生変異体ウイルス産生システムの構築を試みた。MNV 受容体タンパク質である CD300lf を Huh7.5.1 に導入した後、シングルセルクローニングを行い MNV 感染感受性のある Huh7.5.1/CD300lf (HuhCD300lf) を樹立した (Fig. 5A)。HuhCD300lf の細胞表面の CD300lf の発現をフローサイトメトリーで測定したところ、Huh7.5.1 から明らかに右側にシフトした CD300lf 発現細胞群として検出された (Fig. 5A)。次に、MNV-ORF3 を HuhCD300lf に導入し、シングルセルクローニングを行い、VP2 を恒常的に発現する Huh7.5.1/CD300lf/VP2(HuhCD300VP2)を樹立した (Fig. 5C)。HuhCD300VP2 の細胞表面の CD300lf の発現をフローサイトメトリーで測定したところ、HuhCD300lf と同様に、Huh7.5.1 から明らかに右側にシフトした CD300lf 発現細胞群として検出された (Fig. 5A)。Huh7 細胞に CD300lf を導入した例では、RAW264.7 細胞と同等の MNV 複製増殖能力を有することが報告されている (27)。樹立した HuhCD300lf の MNV 産生能力を算出したところ、RAW264.7 と比較して MNV 産生能力は 10 倍ほど向上に成功した (Fig. 5B)。また、HuhCD300VP2 の VP2

発現を抗 VP2 抗体を用いた WB で確認したところ、約 22 kDa の位置に VP2 のバンドが確認され、このバンドサイズは精製した MNV-S7 粒子の WB の結果と一致していた (Fig. 5C)。この樹立した HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 を用いて、ORF3 欠損ウイルスを定量的な評価を試みた。

ORF3stop と **pORF3** を HEK293T にコトランスフェクションし、48 時間培養した (Fig. 6A, P+0)。P+0 の培養上清を HuhCD300VP2 に接種し 48 時間培養した (Fig. 6A, P+1)。P+1 の培養上清を新たな HuhCD300VP2 に接種し 48 時間培養した (Fig. 6A, P+2)。P+2 で十分量の新生ウイルスが増殖培養されたことを確認するため、HuhCD300lf に P+2 の培養上清を接種し 48 時間培養した (Fig. 6A, P+3)。さらに、P+3 の培養上清を HuhCD300lf に接種し 48 時間培養した (Fig. 6A, P+4)。P+1 から P+4 の培養 48 時間後の細胞を PFA 固定して細胞内の MNV の複製に伴って発現する N-term (NS1/2) を抗 N-term (NS1/2) 抗体を用いた免疫染色法によって N-term (NS1/2) タンパク質 (赤色) を調べた。Huh7.5.1/CD300lf/VP2 (P+1) では、NS1/2 タンパク質を発現している細胞が ORF3stop で観察された (Fig. 6B に免疫蛍光染色の画像を 5C に蛍光シグナル陽性細胞の数を示した)。さらに Huh7.5.1/CD300lf/VP2 を用いて継代 (P+2) すると、陽性細胞数は、ポジティブコントロールとして用いた **pMNV_{S7F}** と比較すると半分以下の数値であったが、NS1/2 発現細胞数は増加した

(Fig. 6B and 6C(P+2))。この結果から、新たに作出した HuhCD300VP2 においても

ORF3stop から感染性を持つ新生ウイルスの作出及び増殖が可能であると示された。

次に、各 ORF3 欠損プラスミドでも感染性を獲得した新生ウイルスを産生できるかどうか調べた。**ΔN**, **ΔM**, **ΔNstop** 及び **ΔMstop** から HuhCD300VP2 への最初の継代 (P+1) で NS1/2 タンパク質を発現している細胞が観察された (Fig. 6B, 6C(P+1))。さらに、HuhCD300VP2 を用いて継代 (P+2) すると、NS1/2 発現細胞数は増加した (Fig. 6B, 6C(P+2))。しかし、その培養上清を VP2 が発現していない HuhCD300lf に接種 (P+3) すると、NS1/2 発現細胞数は減少し、さらに HuhCD300lf を用いて継代 (P+4) すると NS1/2 発現細胞は観察されなかった (Fig. 6B, 6C(P+3, P+4))。これらの結果から、ORF3 欠損ゲノムを内包した新生ウイルスの感染性はトランスで供給している VP2 に依存していることが示唆された。一方、**ΔC** 及び **ΔCstop** からは P+1 から P+4 の全てで NS1/2 タンパク質発現細胞が観察されなかったことから、**ΔC** 及び **ΔCstop** から新生ウイルスは産生されないことが示された (Fig. 6B and 6C)。この結果は、RAWVP2 と同様の結果 (Fig. 3) を示しており、HuhCD300lf 細胞を用いた ORF3 欠損ウイルスの評価でも、ORF3 のコドン 115 からコドン 205 の塩基配列はウイルス産生に必須であることが示された。

- Huh7.5.1/CD300lf 細胞を用いたレポーターウイルスの作出

これまでの実験結果では、ORF3 のコドン 4 からコドン 156 の塩基配列を欠損させても、VP2 をトランスで供給すれば、感染性粒子を産生させることができた。そこで、この欠損可能な部位に、GFP のような蛍光タンパク質またはルシフェラーゼをコードする外来性遺伝子の導入を試みた。

まず初めに、十分なウイルス量を確保するための継代数を調べるため、**ORF3stop** と pORF3 を HEK293T にコトランスフェクションし、48 時間培養した（以降、このように作出される新生変異ウイルスを **ORF3stop** ウイルスなど、作出に用いたプラスミドコンストラクトの名称で表記した）。この培養上清を HuhCD300VP2 を用いて 48 時間ごとに 5 回ウイルスの継代を繰り返した。4 回の継代に伴い、NS1/2 陽性細胞数は増加傾向を認め、5 継代目には約 40% に達した。さらに陽性細胞数の増加に伴い、**pMNV_{STF}** に比較して緩やかだが、細胞生存率の低下も観察された（Fig. 7A and 7B）。さらに、**ORF3stop** ウイルスは 5 回継代を繰り返しても、ORF3 に導入した終始コドンは維持されていた（Fig. 8A）。これらの結果から、**ORF3stop** ウイルスは **pMNV_{STF}** 産生される野生型 MNV より増殖速度が遅く、細胞へのダメージも少ないことが示され、十分なウイルス量を確保するためには少なくとも 5 回以上の継代が必要であることが示唆された。

次に、ORF3 のコドン 4 からコドン 156 の塩基配列の領域に外来性のレポーター遺伝子を導入したプラスミドの構築を試みた。レポーター遺伝子は UnaG, Venus 及び

NanoLuc を選択した (Fig. 7C)。UnaG は蛍光を発するのにビリルビンの結合が必要であるが、現存する最も分子サイズの小さい蛍光タンパク質の1つである(28)。

Venus は GFP をより蛍光輝度が 3 から 100 倍になるように改変した蛍光タンパク質である(29)。NanoLuc®(Nluc)は深海エビ (トゲオキヒオドシエビ[Oplophorus gracilirostris]) 由来のルシフェラーゼを基とし、触媒活性のある 19kDa のサブユニットを改変し、さらに本来の基質である Coelenterazine をもとに作製した Furimazine という新しい基質を用いることで発光強度と安定性を高めた酵素である (30)。これらのレポーター遺伝子挿入プラスミドと pORF3 を HEK293T にコトランスフェクションし、その培養上清を HuhCD300VP2 に接種して増殖培養を行った (Fig. 7D)。

最初に、 Δ NM-UnaG、 Δ NM-Venus の蛍光レポーターウイルスについて結果を記す。 Δ NM-UnaG、 Δ NM-Venus のレポーターウイルスを感染させると、それぞれの蛍光タンパク質に由来する蛍光シグナルが観察された (Fig. 7E)。 **Δ NM-Venus** ウイルスを 5 回継代したところ、約 10% の細胞で蛍光を検出した (Fig. 7F)。5 継代目に 40% の NS1/2 発現細胞数が観察された **ORF3stop** ウイルスと比較すると 1/4 に低下した値の結果になった。さらに、 Δ NM-Venus ウイルスを感染させた細胞に対し、NS1/2 タンパク質に対する免疫染色を行い、Venus タンパク質を同時に検出したところ、NS1/2 タンパク質と Venus タンパク質が共に発現している細胞は少ないことが示された (Fig. 7G)。このことから、挿入されたレポーター遺伝子は継代中に欠落した可能

性が考えられた。 Δ NM-UnaG ウイルスにおいても同様の現象が観察されたことから、レポーター遺伝子が継代中に欠落した可能性を調べるために、次世代シーケンサーを用いて、5回継代した Δ NM-Venus 及び Δ NM-UnaG ウイルスのゲノムを解析した (Fig. 8B, 8C)。 Δ NM-Venus ウイルスは ORF2 領域に T5691C (サイレント変異) と T6598C (ミスセンス変異: F515L) がそれぞれ全リードの 66% と 72% に確認されたが、ORF3 領域及び Venus 遺伝子に欠損やフレームシフトの変異は確認されなかった。 Δ NM-UnaG ウイルスは、挿入した UnaG 遺伝子の欠落が全リードの約 80% で確認された。よって、5回継代後、UnaG より Venus を発現している細胞数が多いのは、UnaG 遺伝子の欠落が原因だと考えられた。しかし、Venus 遺伝子は保持されており、NS1/2 発現細胞に Venus タンパク質が共に発現している細胞が少ない理由は不明であった。

次に、NS1/2 タンパク質を発現している細胞よりも Venus タンパク質を発現している細胞の方が少ないのかどうか調べるため、蛍光を発した細胞数のカウントが可能なフローサイトメトリーを用いて NS1/2 タンパク質及び Venus タンパク質を発現している細胞数を測定した。HuhCD300lf に Δ NM-Venus ウイルスを感染させ、24 時間後、NS1/2 または Venus タンパク質を発現している細胞を免疫染色法とフローサイトメトリーを用いて測定した (Fig. 9A, 9B)。NS1/2 タンパク質を発現している細胞数は 2 種類の方法で同等の数値であり、ほとんど差が確認できなかった。しかし、Venus

タンパク質を発現している細胞数は、フローサイトメトリーの方が免疫染色法の約 10 倍多く検出された (Fig. 9C)。この結果から、Venus の蛍光シグナルは NS1/2 タンパク質よりも低く、BZ-X ソフトウェアを用いたセルカウントにおいて、蛍光シグナルが低い細胞が検出されなかった可能性が考えられた。したがって、**ΔNM-Venus** ウイルスを用いた実験では、検出感度の高いフローサイトメトリーを用いて評価することにした。

最後に、継代数を 5 継代からさらに 1~3 回増加させた(P+6, P+7 及び P+8)場合でも、Venus 遺伝子を安定維持できるか否かを確認するため、以下の検討を行った。6 継代目 (P+6)、P+7 および P+8 の上清をそれぞれ回収した。その後、それぞれの上清中のウイルス RNA を測定し、 10^9 コピーの RNA が含まれる培養上清を 100 万個の Huh7.5.1/CD300lf/VP2 に感染させた感染直後 (0 時間)、24 時間培養後、48 時間培養後の Venus の蛍光が検出された細胞の割合をフローサイトメトリーで調べた (Fig. 10)。Venus 発現細胞数は、感染 24 時間後でそれぞれ 0.33%, 3.80% 及び 6.19% であり、感染 48 時間後でそれぞれ 18.9%, 24.1% 及び 25.3% であった。全ての継代数で 20% 前後の Venus 発現細胞を得られたことから、**ΔNM-Venus** ウイルスはさらに継代しても Venus 遺伝子が保持されていることが明らかになった。

- ΔNM-Venus、ΔNM-Nluc ウイルスの性状解析

レポーターウイルスの性状を明らかにするために、HuhCD300VP2 での野生型 MNV-S7 とレポーターウイルスの増殖速度を比較した (Fig. 11A)。培養上清中の RNA コピー数の増加は、MNV と比べてレポーターウイルスでは遅れて立ち上がることを示唆された。次に、**ΔNM-Venus** ウイルスが野生型 MNV と同様の性状を有しているかどうか調べるために、**ΔNM-Venus** ウイルスを Huh7.5.1, HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 にそれぞれ接種し、Venus 発現細胞数を算出した (Fig. 11B)。

HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 では、ウイルス量依存的に Venus 発現細胞数は増加したが、Huh7.5.1 では蛍光のシグナルは観測されなかった。さらに、MNV VLP で免疫したウサギの抗血清は**ΔNM-Venus** ウイルスの感染を阻害し、Venus タンパク質の発現を抑制した (Fig. 11C)。また、**ΔNM-Venus** ウイルスを HuhCD300lf に感染させ、感染 1 時間ごとに Venus 発現細胞数を算出したところ、Venus タンパク質は感染 10 時間後から検出することができた (Fig. 11D)。これらの結果は、**ΔNM-Venus** ウイルスは MNV の受容体タンパク質である CD300lf を用いた感染機構を有し、HuhCD300lf で蛍光シグナルが検出されたことから、シングルサイクルの複製で Venus タンパク質が検出することができることが示唆された。*In vivo* において MNV RNA の非特異的取り込みが報告されているが(31)、本実験では Huh7.5.1 で蛍光シグナルが検出されなかったため、培養上清中に存在するウイルス RNA の非特異的な取り込みは観察されなかった。

ΔNM-Venus ウイルスと野生型 MNV のウイルス感染の初期段階におけるウイルスタンパク質及びレポータータンパク質の発現動向を調べた。野生型 MNV 及び**ΔNM-Venus** ウイルスの RNA コピー数を調製したのち、HuhCD300lf に感染させたところ、NS1/2 タンパク質はそれぞれ 9 時間と 12 時間で検出された (Fig. 11E)。さらに、フローサイトメトリーを用いて、NS1/2 タンパク質または Venus タンパク質を発現している細胞を検出したところ、それぞれ 8 時間と 10 時間で検出された (Fig. 11F)。これらの結果から、**ΔNM-Venus** ウイルスの複製効率は MNV より低いことが示唆された。

次に、**ΔNM-Nluc** ウイルスについても同様に検証した。**ΔNM-Nluc** ウイルスを HuhCD300VP2 で 5 回継代を行い、十分な量のウイルスを確保したのち、次世代シーケンサーを用いてウイルスゲノムに挿入した Nluc 遺伝子の安定性を確認した (Fig. 8D)。**ΔNM-Nluc** ウイルスには、ORF2 領域に G5119A (ミスセンス変異：V22I) と C5821A (ミスセンス変異：P256T) がそれぞれ全リードの 76% と 96% に確認され、このうち C5821A はプラスミド内に変異が含まれていた。さらに、全リードの約 50% の Nluc 遺伝子に 1 から 5 個のアデニン残基が挿入されていた。残りの 50% は ORF3 領域及び Nluc 遺伝子に欠損やフレームシフトの変異は確認されなかった。5 回継代後の培養上清を 3 段階 (×1, ×5 及び ×25) に希釈したウイルス溶液を Huh7.5.1, HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 にそれぞれ接種し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を評価した (Fig. 11G, 11H)。HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 では、ウイルス量

依存的にルシフェラーゼ活性は増加したが、Huh7.5.1 では増加しなかった。ルシフェラーゼ活性を示した細胞の培養上清をそれぞれ HuhCD300lf 及び HuhCD300VP2 に接種し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を評価した (Fig. 11I)。HuhCD300VP2 の培養上清を接種した細胞株からはルシフェラーゼ活性の増加が確認されたが、HuhCD300lf の培養上清を接種した細胞株からはルシフェラーゼ活性は確認されなかった。さらに、MNV VLP で免疫したウサギの抗血清は Δ NM-Nluc ウイルスの感染を阻害し、ルシフェラーゼ活性を抑制した (Fig. 11J)。また、 Δ NM-Nluc ウイルスを HuhCD300lf に感染させ、感染 1 時間ごとにルシフェラーゼ活性を評価したところ、ルシフェラーゼ活性は感染 12 時間後から有意に上昇することが確認された (Fig. 11K)。これらの結果から、 **Δ NM-Nluc** ウイルスも CD300lf に依存した感染機構を有すること、ウイルスの増殖にはトランスで供給することができる細胞が必要であること、HuhCD300lf でルシフェラーゼ活性が検出されたことから、シングルサイクルの複製でルシフェラーゼ活性が検出することができることが示唆された。

最後に、レポーターウイルスが自然宿主細胞である RAW264.7 でも検出できるかどうか調べた。 **Δ NM-Venus** ウイルスでは Venus 発現細胞数は $4.20 \pm 0.25\%$ であり、HuhCD300lf より Venus 発現細胞数は少なかった (Fig. 11L)。また、 **Δ NM-Nluc** ウイルスでは HuhCD300lf の約 10 倍のルシフェラーゼ活性を示した (Fig. 11M)。

RAW264.7 で検出されたレポータータンパク質は、HuhCD300lf より低かったが、レポーターウイルスは自然宿主細胞である RAW264.7 に感染し機能することを示した。

【考察】

本研究は MNV にコードされている VP2 の役割を調べるため、リバーシジェネティクスシステムを用いて、新生ウイルス産生に必須な VP2 と ORF3 の塩基配列を別々に解析した (Fig. 12)。その結果、VP2 をトランスで供給することにより、VP2 の翻訳が停止するプラスミド (ORF3stop) から感染性を獲得した新生ウイルスの産生に成功した。さらに、ウイルスの産生に必須な領域を特定し、その領域を保持しつつ外来遺伝子に置換したレポーターウイルスの作出にも成功した。レポーター遺伝子用いられている蛍光タンパク質やルシフェラーゼをウイルスゲノムに導入し、その外来遺伝子を維持したまま継代培養させることに成功した初めての報告である。このウイルスはウイルスの複製増殖を視覚的もしくは数値的に判別することが可能であり、ウイルス複製機構の解明やノロウイルスを標的とした抗ウイルス薬のスクリーニングに活用できることが考えられる。

本研究は VP2 領域欠損ウイルスの定量的な評価を行うために、MNV の自然宿主細胞である RAW264.7 細胞よりも安定して複製を可能にする Huh7.5.1/CD300lf の樹立に成功した。RAW264.7 細胞では、HEK293T へのコンストラクトのトランスフェクション後の免疫沈降のバンド強度と RAWVP2 細胞での感染性粒子のレスキューの効率にばらつきが認められたが (Fig. 4C)、同細胞株 Huh7 に CD300lf を導入した Huh7-CD300lf から産生される MNV は感染 12 時間後の培養上清中に TCID₅₀ による

感染力価測定で 10^7 オーダーの力価が報告されており、本研究で樹立した

Huh7.5.1/CD300lf も同等レベルの安定した複製効率を達成した。

本研究で樹立した Huh7.5.1/CD300lf は RAW264.7 細胞よりも平均で約 10 倍の産生能力の増加が観察された。Huh7.5 細胞において、C 型肝炎ウイルス (HCV) の複製の効率が高いことが報告されている。この細胞では、細胞質内のウイルス RNA を認識して IRF-3 (interferon regulatory factor-3) と NF- κ B を活性化し 1 型インターフェロンを誘導する IRG-I (retinoic acid inducible gene-I) に変異があり (32)、自然免疫の機能がロックアウトされている。そのため、HCV の細胞内複製が安定して進行すると考えられている。プラス 1 本鎖 RNA ウイルスである MNV では、細胞内の複製行程で、インターフェロンを起点とする自然免疫系の活性化は、ウイルスの複製を阻害することが知られており (32)。MNV も HCV など他の RNA ウイルスと同様に Huh7.5.1 では、インターフェロン依存的複製抑制がかからないため、高効率かつ安定なウイルス複製が可能になったと考えられた。

本研究で樹立した Huh7.5.1/CD300lf は MNV が感染すると細胞は死滅する。これを利用して MTT アッセイによる MNV 感染時によって死滅する細胞数の割合を継代数 1 から 6 まで測定した。MNVS7 では 2 継代目から細胞変性効果 (CPE) が観察され、4 継代目以降ではほぼ全ての細胞が死滅したが、レポーターウイルスでは 6 継代目でも CPE は観察されなかった。HuhCD300VP2 でのレポーターウイルスと MNV

の増殖速度を比較したところ、培養上清中に放出されるウイルス RNA はレポーターウイルスでは遅れて立ち上がることが確認され、ウイルスの複製効率が低いことが示唆された。よって、MTT アッセイで設定した 48 時間ではレポーターウイルスの複製増殖が不十分であり、CPE が検出できなかったと考えられた。

VP2 をトランスで供給する条件下で感染性粒子形成に必須な ORF3 の塩基配列を同定したところ、コドン 115 からコドン 205 の核酸配列を欠損させた ΔC 及び $\Delta Cstop$ では、新生ウイルス粒子は産生されないことが明らかになった (Fig. 2D)。MNV ゲノム RNA 側の機能については、ORF3 のコドン 115 からコドン 205 の塩基配列に、3 つのステムループの二次構造が報告されており、1 つ目のステムループである SL1 は、ORF3 のコドン 166 から末端までの領域と重なっている(11)。本研究で用いた ΔC 及び $\Delta Cstop$ は、ステムループ SL1 が欠損しており、これらのコンストラクトからは新生ウイルスが産生されなかったため、ステムループ SL1 (11,12,33)を形成する塩基配列を含む領域が産生に重要であると考えられた。

抗 VLP 抗体を用いて培養上清中のウイルス粒子を免疫沈降させ、MNV ゲノムの検出を試みたところ、HEK293T の上清から増幅産物のバンドが検出されなかった。この結果から、 ΔC 及び $\Delta Cstop$ では、VP2 がトランスで供給されていても培養上清中にウイルスゲノムを含む粒子が形成されていないことが示唆された。FCV においても、VP2 をトランスで供給しても C 末端側の塩基配列を欠損させると感染性粒子が産生さ

れなかったという報告があり、本研究結果と一致している(19)。FCVは、受容体タンパク質であるJAM1に結合すると、感染性粒子が変形を起こして内部のVP2が粒子の3回転軸直下に自己集合し、ウイルスゲノムを宿主細胞内に送り込むために、粒子外部に突出したポータル状の構造を形成する(18)。FCVと近縁なMNVにおいても同様なVP2の機能が推測されるが、FCVとMNVのVP2はアミノ配列も分子量も大きく異なっており、MNVのVP2がFCVと類似した機能を有するかどうか本研究結果から考察することは困難であった。また、本研究では、培養上清中のVLPのような中空粒子存在の有無を確認しておらず、VP2がゲノムのパッケージングに必須なのか、粒子構築に必須なのかを区別することができなかった。

一方MNVでは、VP2が粒子構造の安定性に寄与しているとの報告があり(34)、VP2の欠損はウイルス粒子の構造の安定性を損なう可能性がある。しかし、VLPのような中空粒子の形成はVP1のみの自己集合で達成可能であり、VP2とウイルスゲノムが存在しなくても行われる(22,23)。しかし、FCV感染性粒子の産生の場合、VP2を欠損させると、ウイルスゲノムの複製は行われたが、感染性ウイルス粒子は産生されなかった(19)。本研究でも精製したMNV感染性粒子にVP2が存在することは示しており、MNVのVP2は、ゲノムとVP2を内包する感染性ウイルス粒子の形成(つまりパッケージング)に必須であると考えられた。

HEK293T 細胞に HuNoV の ORF2 遺伝子を導入すると VLP が形成されると報告されている。しかし、MNV では報告事例が無い。自然宿主細胞である RAW264.7 を用いた MNV の増殖培養上清から VLP が報告された事例は無い。さらに HuNoV のボランティアによる継代事例から得た便検体の解析事例でも VLP は確認されておらず、自然宿主内の複製増殖で NoV の VLP が確認された事例もない(35)。VP2 が供給されない環境下では、VLP 産生が可能だが、VP2 とゲノム RNA が存在する環境下では、中空粒子形成は困難なのかもしれない。ポリオウイルスでは、ウイルスが複製を行っている細胞内小胞構造の内部で、複製されるゲノム RNA と構造タンパク質が近接することがパッケージングと粒子構築の必須要素であることが示唆されており、パッケージング行程と粒子構築行程は感染性粒子構築に互いに必須な要素であることが報告されている(36)。以上から、NoV も類似した粒子構築機構を有する可能性がある。今後、VP2 とゲノム RNA の細胞内粒子構築にかかる機能を追跡するためには、本研究で実施した分子ウイルス学的解析手法に加え、細胞上清中の粒子を沈降密度勾配遠心、浮上密度勾配遠心、アナリティカル超遠心で精密に分取して、実際の粒子形態をクライオ電子顕微鏡観察などで分析するなど、構造生物学的研究を含む多角的な検討が必要であると考えられた。

本研究では、ORF3 欠損ウイルス及び蛍光タンパク質またはルシフェラーゼをコードする遺伝子を持つレポーターウイルスの作出に成功し、ウイルスのライフサイクル

における ORF3 及び VP2 の役割を詳細に検討するツールとして供給することに成功した。その際に用いた HuhCD300VP2 は ORF3 欠損ウイルス及びレポーターウイルスを RAW264.7 より効率良く新生ウイルスを産生させた。ORF3stop を HuhCD300VP2 で継代培養すると、5 継代目のウイルスで約 40% の細胞でウイルスタンパク質の発現が観察され、復帰変異体は検出されなかった。一方、 Δ NM-UnaG ウイルスでは UnaG 遺伝子の欠損が確認された。さらに、 Δ NM-Nluc ウイルスでは Nluc の活性に影響は与えなかったが、継代したウイルスの約 50% に Nluc 部位へのアデニン残基の挿入が認められた。しかし、 Δ NM-Venus ウイルスでは Venus 遺伝子に変異は認められなかった。これらの結果から、挿入遺伝子の安定性は、挿入遺伝子の長さや塩基配列に依存する可能性が考えられる。したがって、この系で外来遺伝子挿入ウイルスを作出する場合には、培養増殖後にウイルスゲノム内の挿入遺伝子の安定性を確認する必要がある。また、レポーターウイルスの ORF2 領域にいくつかの変異が観察された。 Δ NM-Nluc ウイルスには C5821A (ミスセンス変異: P256T) に変異が認められ、この変異はプラスミド内に含まれていた。これはコンストラクション中の PCR によるエラーや大腸菌によるプラスミド増殖中の突然変異が考えられた。その他の変異はウイルスの培養増殖中に挿入された変異と考えられたが、これまで報告されている VP2 が VP1 との相互作用する領域との関連性は確認できなかった。しかし、VP2 をコードする ORF3 の本来の長さが含まれている ORF3stop ウイルスには ORF2 領域には変異

は確認されず、ORF3 の領域の長さが異なるレポーターウイルスでは変異が確認されたことから、ORF3 の領域は変異が入った ORF2 領域の部分に影響を与えている可能性が高い。よって、ORF3 内に導入する長さや塩基配列の条件を変えることによって、新たな ORF3 の機能の発見に繋がる可能性が考えられた。

レポーターウイルスは、複製効率は野生型 MNV より低かったが、MNV のレセプタータンパク質である CD300lf を用いて感染し、MNV 抗血清によって中和され感染を阻害された。これらの結果から、レポーターウイルスは野生型 MNV と同様の性状を有しており、継代培養中にいくつかの変異は蓄積してしまうが、蛍光シグナル及びルシフェラーゼ活性が検出されていることから、レポーターウイルスとして十分に機能すると考えられた。

最後に、 Δ NM-Venus 及び Δ NM-Nluc ウイルスを、自然宿主細胞である RAW264.7 に感染させたところ、どちらのウイルスも Venus 発現細胞数及びルシフェラーゼ活性は HuhCD300lf と比べて約 1/10 に低下したが、検出は可能であった。この結果は、レポーターウイルスは *In vivo* でも機能し、マウス個体内での MNV ウイルス感染動態の研究や VP2 タンパク質の機能評価に応用できることを考えられる。しかし、本研究は MNV における VP2 の機能の解明及びレポーター遺伝子を内包したウイルス粒子の産生の成功であり、HuNoV やサポウイルスの VP2 領域はアミノ酸の長さやウイルス複製に関わる機能が異なる可能性がある。さらに、HuNoV においてはヒト腸管オル

ガノイドから産生されたウイルス粒子は継代培養できない。よって、ヒトに感染するウイルスへの応用のためには、さらなる検討が必要であると考えられた。

本システムで産生されたレポーターウイルスは、VP2 を供給しなければ新生ウイルスを産生できない高度に弱毒化された感染性ウイルスと位置づけることができる。本システムをヒトに感染するヒトノロウイルスやサポウイルスなどの他のカリシウイルスに応用できれば、VP2 が供給されない生体内では1回しか感染しない高度弱毒生ウイルスワクチンの開発につながる可能性があり、有望な新規ワクチンモダリティであると考えられた。

【結語】

MNV ゲノムの ORF3 の VP2 タンパク質の 157-208 番目をコードしている領域にウイルスゲノムの複製に必要な核酸配列が存在することが確認した。この配列を保持すれば、ORF3 の VP2 タンパク質の 4-156 番目の領域をレポーター遺伝子と置き換えても、VP2 をトランス供給すれば、レポーター遺伝子を内包した新生ウイルスを産生可能であった。このレポーターウイルスは VP2 の無い環境下で増殖不能であるが、一度だけ細胞に感染することができる。いわば、高度弱毒性ワクチンの新しいプラットフォームとして活用する可能性を示すことに成功した。また、ノロウイルスをターゲットとした抗ウイルス薬のスクリーニングやトランスで供給する VP2 を改変して VP2 の機能を解析にも活用が可能である。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、終始ご指導を賜りましたウイルス感染制御学研究室の片山和彦教授、芳賀慧講師、戸高玲子助手、近畿大学生物理工学部の中西章教授並びに同研究室の皆様、そして支えてくれた家族に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

【参考文献】

1. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(8):725–30.
2. Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg Infect Dis.* 2011 Aug;17(8):1381–8.
3. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* (1979). 2016 Sep 23;353(6306):1387–93.
4. Stephanie M. Karst, Christiane E. Wobus, Margarita Lay, John Davidson, Herbert W. Virgin I. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* (1979). 2003;299:1575–8.
5. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5104–12.
6. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev S V., Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004 Dec;2(12):e432.
7. Nice TJ, Robinson BA, Van Winkle JA. The Role of Interferon in Persistent Viral Infection: Insights from Murine Norovirus. *Trends Microbiol.* 2018 Jun 1;26(6):510–24.
8. Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, et al. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 11;113(41):E6248–55.
9. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MCW, Green K, Martella V, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology.* 2019;100(10):1393–406.
10. McFadden N, Arias A, Dry I, Bailey D, Witteveldt J, Evans DJ, et al. Influence of genome-scale RNA structure disruption on the replication of murine norovirus - Similar replication kinetics in cell culture but attenuation of viral fitness in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jul;41(12):6316–31.
11. Bailey D, Karakasiliotis I, Vashist S, Chung LMW, Reese J, McFadden N, et al. Functional Analysis of RNA Structures Present at the 3' Extremity of the Murine Norovirus Genome: the Variable Polypyrimidine Tract Plays a Role in Viral Virulence.

- J Virol. 2010 Mar 15;84(6):2859–70.
12. Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 2008 May;36(8):2530–46.
 13. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparco-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol.* 2000;74(14):6581–91.
 14. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad B V., Estes MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol.* 2013 May;87(9):4818–25.
 15. Sosnovtsev S V., Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology.* 2000 Nov 10;277(1):193–203.
 16. Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK. Two Nonoverlapping Domains on the Norwalk Virus Open Reading Frame 3 (ORF3) Protein Are Involved in the Formation of the Phosphorylated 35K Protein and in ORF3-Capsid Protein Interactions. *J Virol.* 2003 Mar 15;77(6):3569–77.
 17. Cotten M, Petrova V, Phan MVT, Rabaa MA, Watson SJ, Ong SH, et al. Deep Sequencing of Norovirus Genomes Defines Evolutionary Patterns in an Urban Tropical Setting. *J Virol.* 2014 Oct;88(19):11056–69.
 18. Conley MJ, McElwee M, Azmi L, Gabrielsen M, Byron O, Goodfellow IG, et al. Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature.* 2019 Jan 17;565(7739):377–81.
 19. Sosnovtsev S V., Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. Feline Calicivirus VP2 Is Essential for the Production of Infectious Virions. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):4012–24.
 20. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, et al. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Sep 23;111(38):E4043–52.
 21. Thorne L, Bailey D, Goodfellow I. High-Resolution Functional Profiling of the Norovirus Genome. *J Virol.* 2012 Nov;86(21):11441–56.
 22. Pogan R, Dülfer J, Uetrecht C. Norovirus assembly and stability. *Curr Opin Virol.* 2018 Aug 1;31:59–65.
 23. Sherman MB, Smith HQ, Smith TJ. The dynamic life of virus capsids. *Viruses.* 2020 Jun 1;12:618.

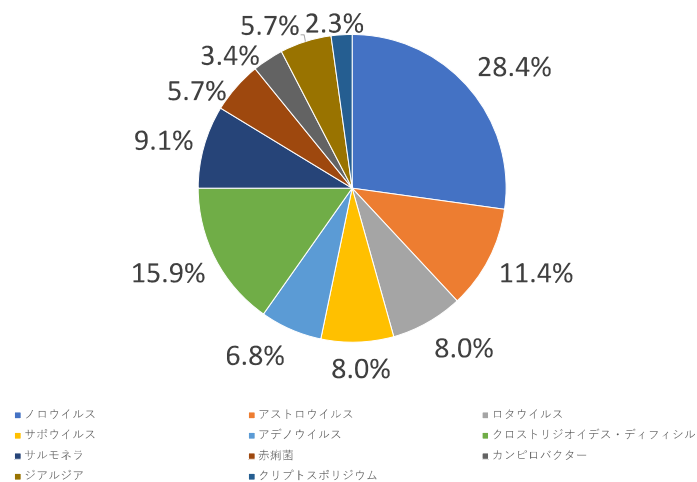
24. Song C, Takai-Todaka R, Miki M, Haga K, Fujimoto A, Ishiyama R, et al. Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS Pathog.* 2020 Jul 1;16(7):e1008619.
25. Jin Zhong, Pablo Gastaminza, Guofeng Cheng, Sharookh Kapadia, Takanobu Kato, Dennis R. Burton, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9294–9.
26. Kawamoto M, Yamaji T, Saito K, Shirasago Y, Satomura K, Endo T, et al. Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. *Front Genet.* 2020 Oct 9;11:546106.
27. Doerflinger SY, Cortese M, Romero-Brey I, Menne Z, Tubiana T, Schenk C, et al. Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog.* 2017 Oct 1;13(10):e1006705.
28. Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi Y, et al. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell.* 2013 Jun 20;153:1602–1611.
29. Takeharu Nagai, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, Atsushi Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 2002 Jan 1;20:87–90.
30. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* 2012 Nov 16;7(11):1848–57.
31. Kennedy EA, Aggarwal S, Dhar A, Karst SM, Wilen CB, Baldrige MT. Age-associated features of norovirus infection analysed in mice. *Nat Microbiol.* 2023 Jun 1;8(6):1095–107.
32. Jahun AS, Goodfellow IG. Interferon responses to norovirus infections: Current and future perspectives. Vol. 102, *Journal of General Virology.* Microbiology Society; 2021:001660.
33. López-Manríquez E, Vashist S, Ureña L, Goodfellow I, Chavez P, Mora-Heredia JE, et al. Norovirus Genome Circularization and Efficient Replication Are Facilitated by Binding of PCBP2 and hnRNP A1. *J Virol.* 2013 Nov;87(21):11371–87.
34. Lin Y, Fengling L, Lianzhu W, Yuxiu Z, Yanhua J. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: Function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *Journal of Microbiology.* 2014 Nov 1;52(11):970–5.
35. Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, et al. Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *J Virol.* 2007 Nov 15;81(22):12238–48.

36. Song Y, Gorbatshevych O, Liu Y, Mugavero JA, Shen SH, Ward CB, et al. Limits of variation, specific infectivity, and genome packaging of massively recoded poliovirus genomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Oct 10;114(41):E8731–40.

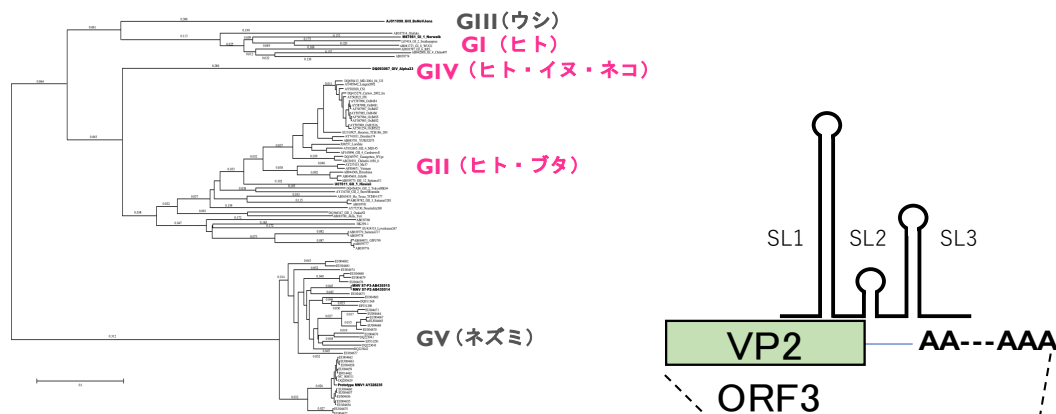
【図表】

Fig. 1

A



B



C

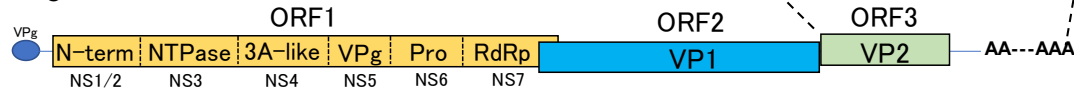


Fig. 1 ノロウイルスの概略

(A) 2004年3月15日から2005年3月13日の期間でアメリカの Kaiser Foundation Health Plan of Georgia 社に提供された外来患者の糞便検体から同定された病原体を円グラフで示した。(B) ノロウイルスのゲノム全長の塩基配列を DNA 配列やタンパク質配列の多重整列のためのツールである Clustal W を用いてアライメントを行い、近接結合法で描いた分子系統樹を示した。塩基置換推定法は Kimura に設定し、左下に遺伝的距離は 0.1 のスケールで示した。(C) ネズミノロウイルスの遺伝子構造の概略図を示した。ウイルスゲノムは 3つの open reading frame (ORF)を有しており、ORF1 は非構造タンパク質、ORF2,3 は構造タンパク質 VP1, VP2 をコードしている。ORF1 には N 末端側から N-term, NTPase, 3A-like, VPg, Protease 及び RdRp がコードしている。また、ORF2 内部に読み枠が異なる ORF4 が重複して存在している。さらに、ORF3 の 3'領域から 3'UTR を跨ぐ領域に、RNA のステムループが存在し、ORF3 側からのステムループ 1 (SL1), ステムループ 2 (SL2)及びステムループ (SL3)である。

Fig.2

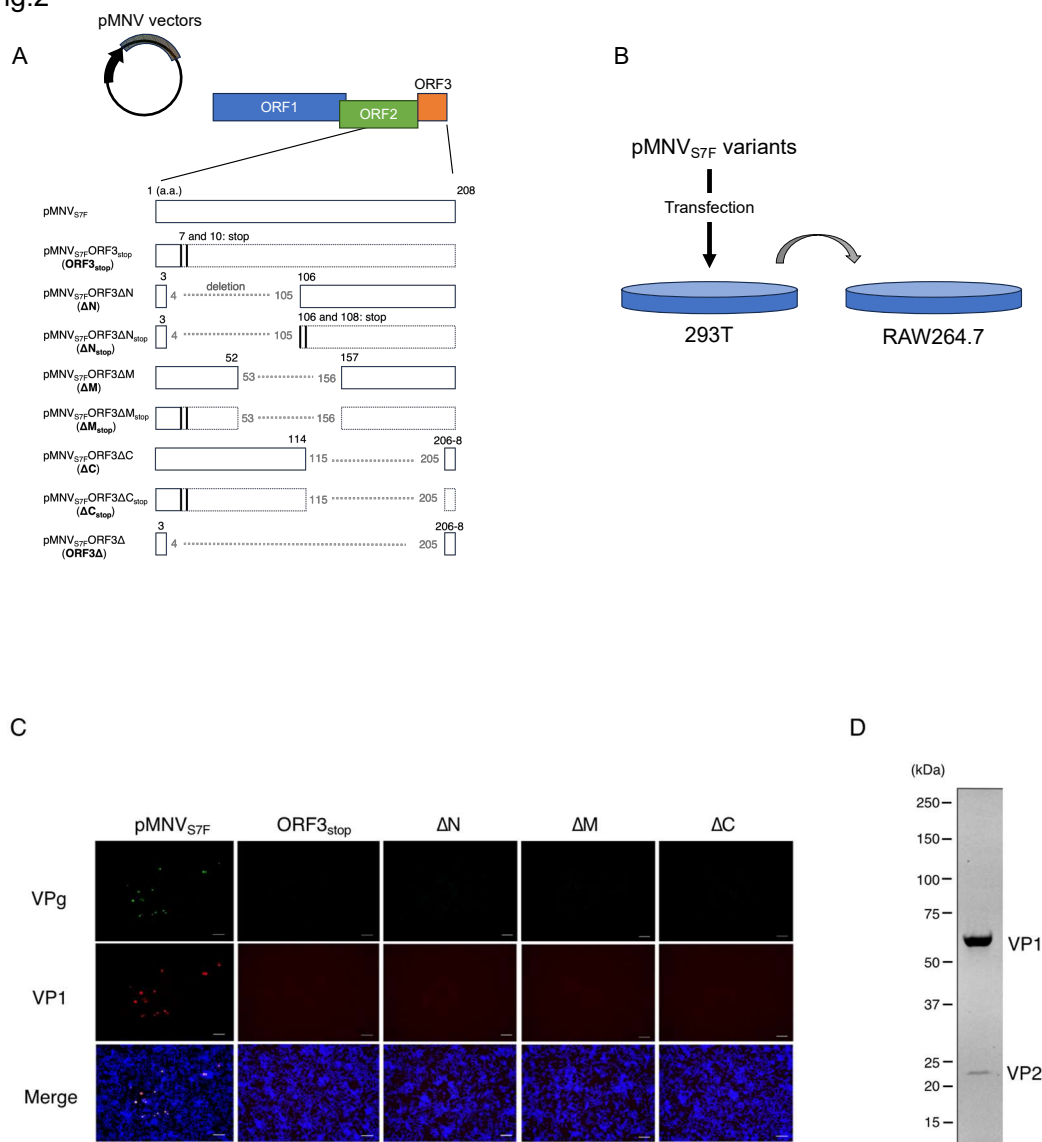


Fig. 2 VP2 を欠損すると感染性 MNV は産生されなかった

(A) pMNV_{S7F} vector の VP2 領域に挿入した変異や欠損を模式図で示した。数字は VP2 のアミノ酸(a.a.)残基の位置を示し、太い縦線はフレーム内に挿入した終始コドンの位置を示した。また、終始コドンによって翻訳されない VP2 領域は点線で示した。(B)本実験系を模式図で示した。各コンストラクトを 293T 細胞にトランスフェクションした。各コンストラクトから MNV 変異体が産生されたかどうか調べるために、トランスフェクション 48 時間後の 293T 細胞の培養上清を RAW264.7 細胞に接種した。(C) 各コンストラクトから感

染性 MNV が産生されたのか調べた。293T 細胞の培養上清を接種した RAW264.7 細胞を、24 時間培養し、MNV VPg (緑)、VP1 (赤) および核 (青) をそれぞれ染色した。図中のスケールバーは 60 μm を示している。

(D) MNV 粒子は VP1 と VP2 を含んでいる。精製・濃縮した MNV を Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (Bio-Rad) を用いて電気泳動した。タンパク質中のトリプトファン残基に共有結合したトリハロゲン化合物に UV を照射し、放出される蛍光を ChemiDoc MP イメージャーを用いて検出した。この実験は 2 度繰り返し行った。

Fig. 3

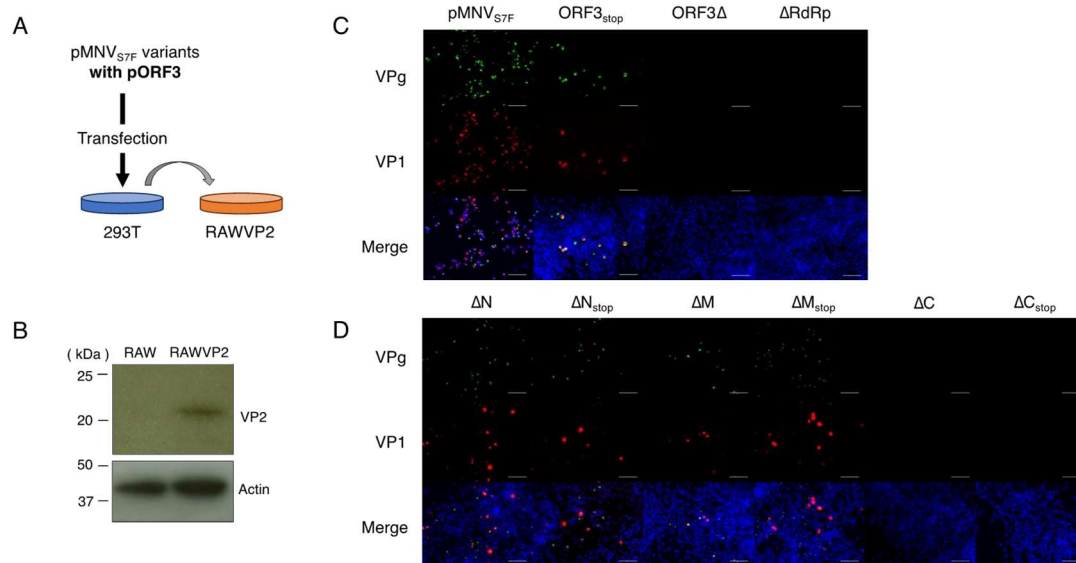


Fig. 3 VP2 のアミノ酸 115 から 205 番目をコードする塩基配列は感染性 MNV 粒子を産生するのに必要な領域である。

(A) 各コンストラクトから MNV 変異体が産生されたかどうか調べるために用いた系を模式図で示した。各コンストラクトと pORF3 を 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後、トランスフェクションした 293T 細胞の培養上清を RAWVP2 細胞に接種した。(B) RAWVP2 細胞に MNVVP2 が発現しているかどうか調べるために、MNVVP2 抗体を用いてウェスタンブロッティングした。画像の左側には分子量を示し、アクチンをローディングコントロールとして用いた。(C-D) pMNV_{S7F}、ORF3_{stop}、ORF3 Δ 及び Δ RdRp のコンストラクト (C)、 Δ N、 Δ N_{stop}、 Δ M、 Δ M_{stop}、 Δ C 及び Δ C_{stop} のコンストラクト (D) から産生された感染性 MNV を検出した。293T 細胞の培養上清を接種した RAWVP2 細胞を、24 時間培養後、免疫染色法によってウイルスタンパク質を染色し、感染した細胞を検出した。MNV VPg (緑)、VP1 (赤) および核 (青) をそれぞれ免疫染色法によって染色し、検出した。また、スケールバー 60 μ m でそれぞれ検出した画像を重ね合わせた画像を示した。

Fig. 4

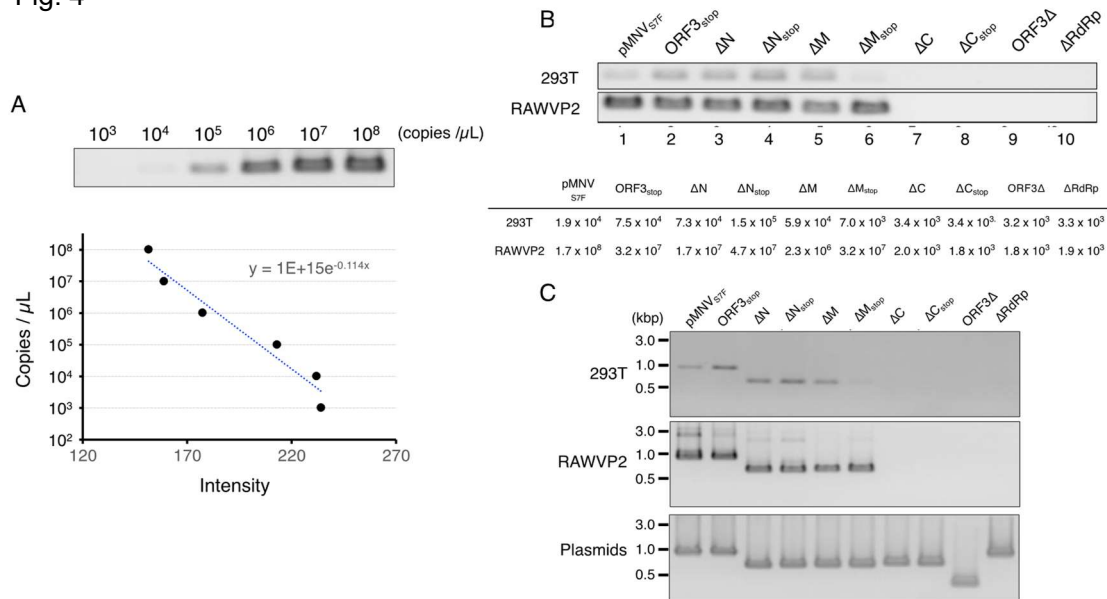


Fig. 4 培養液から抗 VP1 抗体によって免疫沈降した MNV の RNA の検出

(A) RNA コピー数を求めるための検量線 (標準曲線) の作成。 *in vitro* で合成された MNV ウイルス RNA のコピー数を $10^3 \sim 10^8$ コピー/ μL になるように調整し、ネステッド RT-PCR を行った。増幅産物を泳動し検出されたバンドの強度からコピー数を求める式を得た。ネステッド RT-PCR は、ORF1/2 境界領域を増幅した。(B) 細胞培養液中から抗 VP1 抗体を用いて免疫沈降してきたウイルス粒子の検出。各コンストラクトと pORF3 をコトランスフェクションした 293T の培養上清 (293T) とその各培養上清を接種した RAWVP2 細胞の培養上清 (RAWVP2) を用いて、抗 VP1 抗体でウイルス粒子を免疫沈降させ、ネステッド RT-PCR でウイルス RNA を検出した。各バンド強度から計算したコピー数を下の表に記載した。(C) ΔN 、 $\Delta\text{N stop}$ 、 ΔM 、 $\Delta\text{M stop}$ から産生された各ウイルスは、ORF3 上の各変異を維持していた。抗 VP1 抗体で免疫沈降したウイルスの RNA をネステッド RT-PCR で ORF3 領域全体を増幅した。上段；各コンストラクトと pORF3 をコトランスフェクションした 293T (「293T」) の培養液からの増幅産物。中パネル；RAWVP2 の培養液からの増幅産物 (「RAWVP2」)。下のパネル；ORF3 の変異を保有する各コンストラクト (「プラスミド」) からの ORF3 領域の PCR 増幅。

Fig. 5

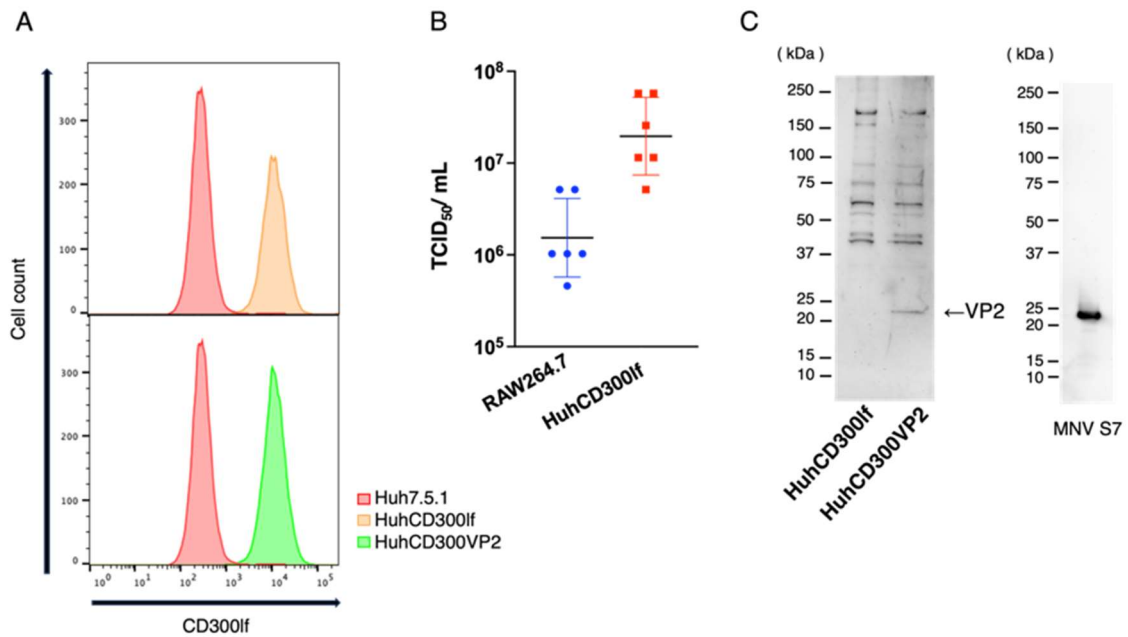
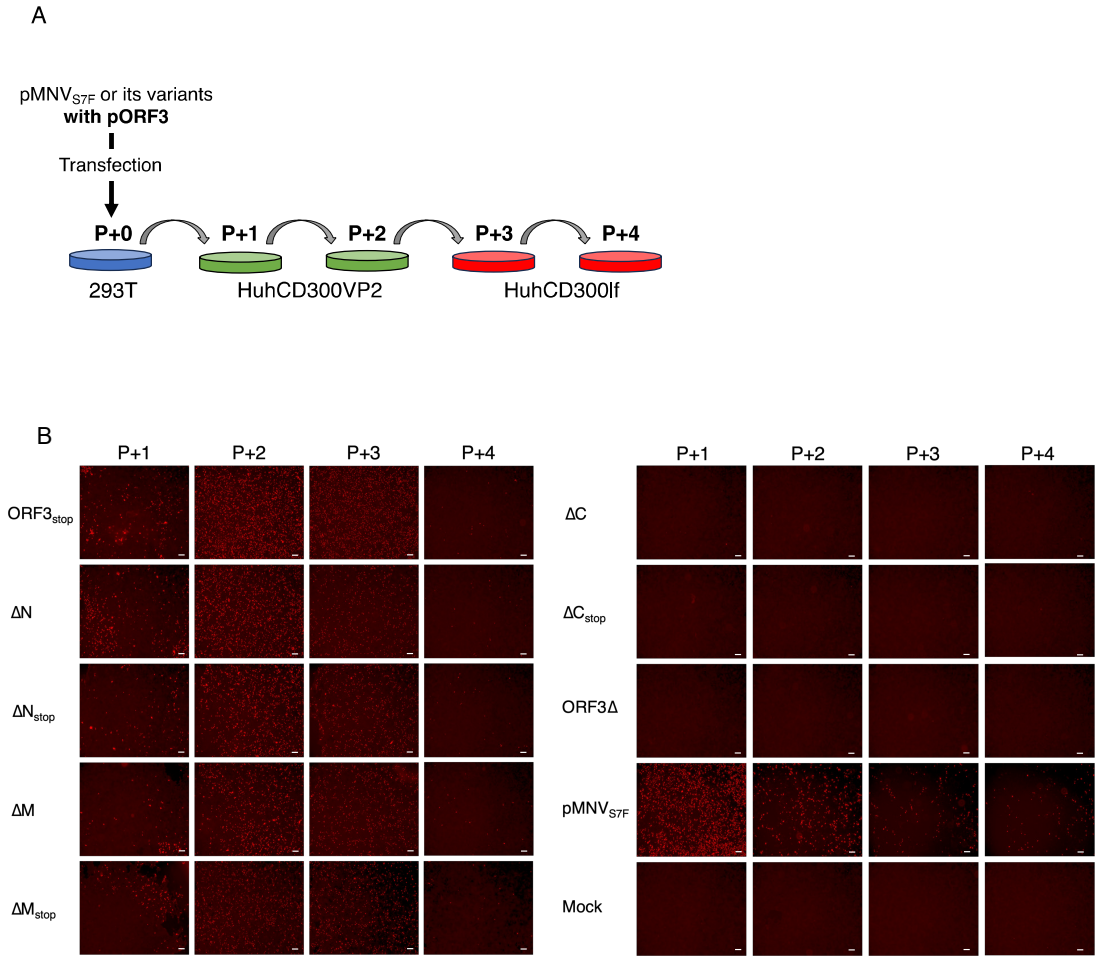


Fig. 5 Huh7.5.1、Huh7.5.1/CD300lf、Huh7.5.1/CD300lf/VP2 細胞の樹立

(A) フローサイトメトリーを用いて細胞表面に CD300lf が発現しているかどうか確認した。トリプシン処理した各細胞は、抗マウス CD300lf 抗体と Alexa647 抗ウサギ IgG を順に反応させてフローサイトメトリーを用いて解析した。(B) RAW264.7 細胞または HuhCD300lf 細胞から産生された MNV の感染力価 (TCID₅₀) を RAW264.7 細胞に感染させ算出した。それぞれのデータバーは算出した 6 つの感染力価の平均値を、エラーバーは標準偏差を示している。(C) HuhCD300VP2 細胞 (左) と精製した MNV (右) の VP2 を抗 MNV-S7 VP2 血清を用いたウェスタンブロッティング法により検出した。2 次抗体は HRP 標識した抗ウサギ IgG を用いた。Chemi-Lumi One (ナカライテスク) を用い発色し、ChemiDoc touch (Bio-rad) を用いて検出した。

Fig. 6



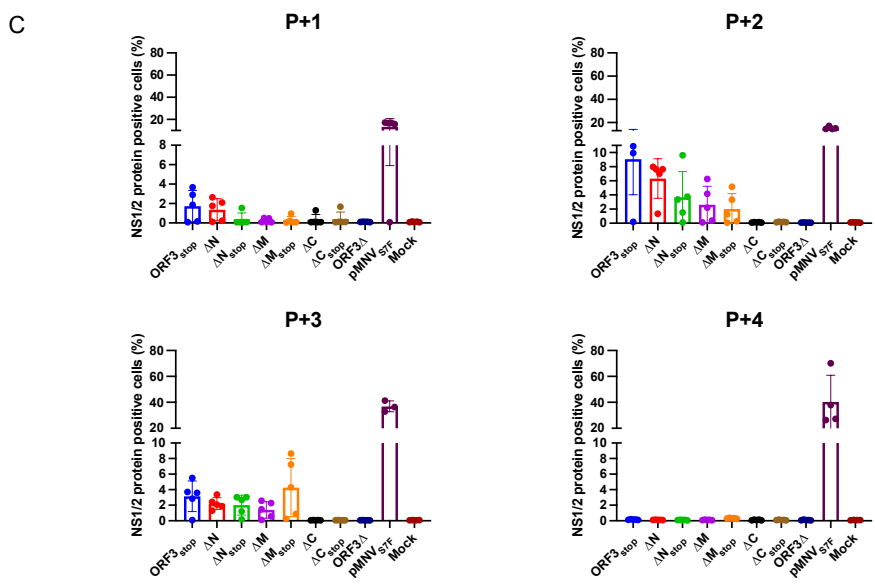


Fig. 6 Huh7.5.1/CD300lf 細胞を用いた ORF3 欠損ウイルス産生システムの構築

(A) 本実験系を模式図で示した。各コンストラクトと pORF3 を 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後、トランスフェクションした 293T 細胞の培養上清を Huh CD300VP2 細胞に接種した (P+1)。P+1 の培養上清をさらに Huh CD300VP2 細胞に接種し (P+2)、P+2 の培養上清を Huh CD300lf 細胞に 2 回接種した (P+3 及び P+4)。(B) 図 5A の模式図で示した HuhCD300VP2 細胞 (P+1 及び P+2) 及び HuhCD300lf 細胞 (P+3 及び P+4) を免疫染色法によってウイルスタンパク質(NS1/2 タンパク:赤)を染色した。各コンストラクト及び継代ごとに、5 ウェルずつ免疫染色の画像を撮影し、その中の代表的な 1 枚を示した。スケールバー 200 μm を示している。(C) NS1/2 タンパク質を発現している HuhCD300VP2 細胞 (P+1 及び P+2) 及び HuhCD300lf 細胞 (P+3 及び P+4) の数を BZ-X800 のセルカウントを用いて算出した。感染細胞数の割合は、NS1/2 発現細胞数を Hoechst 陽性細胞数で割って求めた。各ドットは陽性細胞数の割合を示し、棒グラフは NS1/2 発現細胞数の平均値を示している。また、エラーバーは標準偏差を示している。

Fig. 7

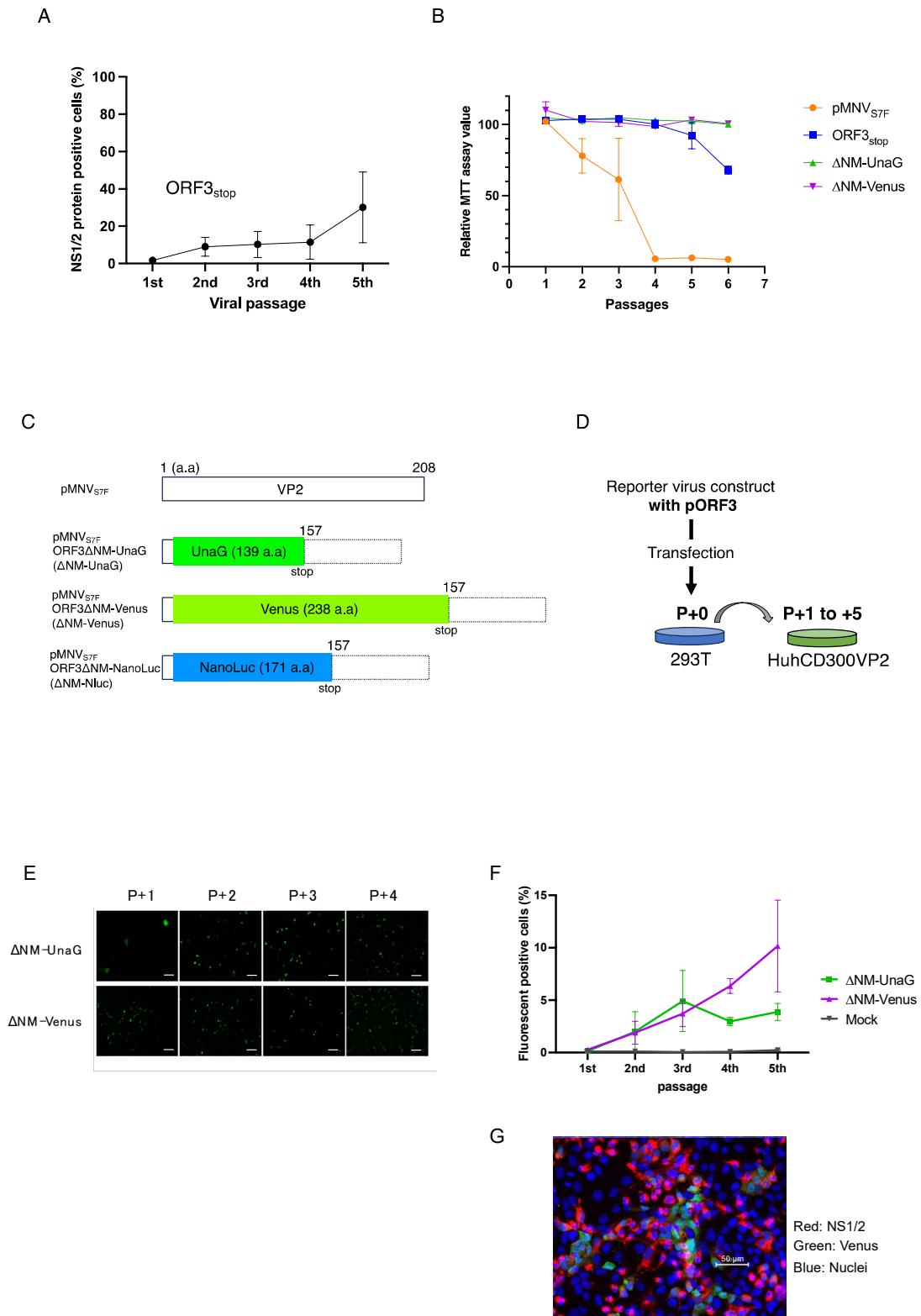
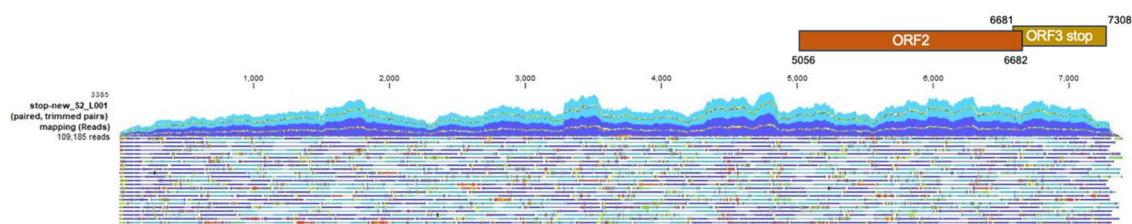


Fig. 7 HuhCD300VP2 細胞を用いた MNV レポーターウイルスの作出

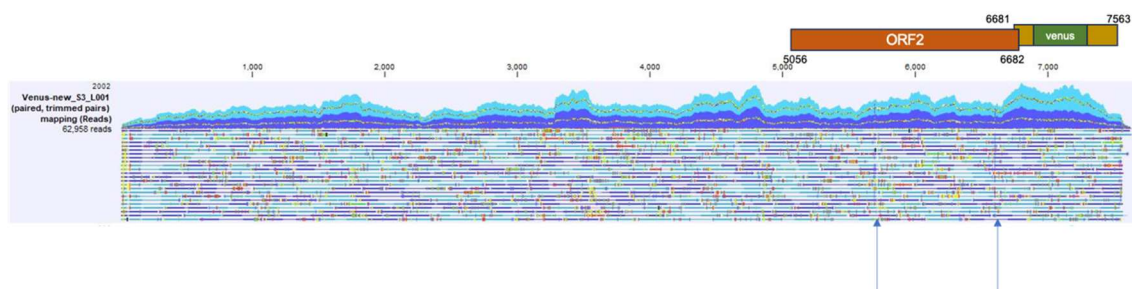
(A) 変異ウイルスは継代を繰り返すことで産生量が多くなる。ORF3stop から作出した VP2 欠損変異体ウイルスは、HuhCD300VP2 細胞を用いて 48 時間毎に 5 回継代を繰り返した。各継代において NS1/2 を発現している細胞を免疫染色によって検出した。各継代 5 ウェルずつ陽性細胞数の割合を測定した。各ドットは陽性細胞数の割合の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。(B) MNVS7, VP2 欠損変異体及びレポーターウイルスを 5 回継代培養した時の細胞生存率。各上清は HuhCD300VP2 細胞で継代を繰り返した。各継代 48 時間後の細胞の生存率を MTT アッセイにより求めた。生存率は、ウイルスを感染させた細胞の値をウイルスを感染させてない細胞の値で割ることで求めた。各ドットは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。(C) pMNV_{S7F} vector の VP2 コード領域に挿入したレポーター遺伝子を模式図で示した。レポーター遺伝子である UnaG と Venus のコード領域は緑色、NanoLuc は青色で示し、レポーター遺伝子の直後に終始コドン挿入した。数字は VP2 のアミノ酸(a.a.)残基の位置を示し、終始コドンによって翻訳されない VP2 領域は点線で示した。(D) MNV レポーターウイルスの継代培養の模式図を示した。レポーター遺伝子挿入コンストラクトと pORF3 を 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後、トランスフェクションした 293T 細胞の培養上清を Huh CD300VP2 細胞に接種した (P+1)。P+1 の培養上清を HuhCD300VP2 細胞に接種し、継代培養した (P+2 から P+5)。(E) レポーターウイルス Δ NM-UnaG 及び Δ NM-Venus 感染により、HuhCD300VP2 細胞 (P+1 及び P+5) で発現したレポータータンパク質の検出。各レポーターウイルス継代後 48 時間の細胞から蛍光シグナル検出した。スケールバーは 150 μ m を示している。(F) 各継代は、5 ウェルずつおこなっており、蛍光を発している細胞数の割合は、蛍光を発している細胞を Hoechst で染色された細胞数で割って算出した。各ドットは蛍光を発している細胞数の割合の平均値を示し、また、エラーバーは標準偏差を示している。(G) 細胞を Δ NM-Venus レポーターウイルスに感染させ、4%パラホルムアルデヒドで固定し、NS1/2 タンパク質 (赤)、Venus 蛍光 (緑)、核 (青) を検出した。スケールバーは 50 μ m を示している。

Fig. 8

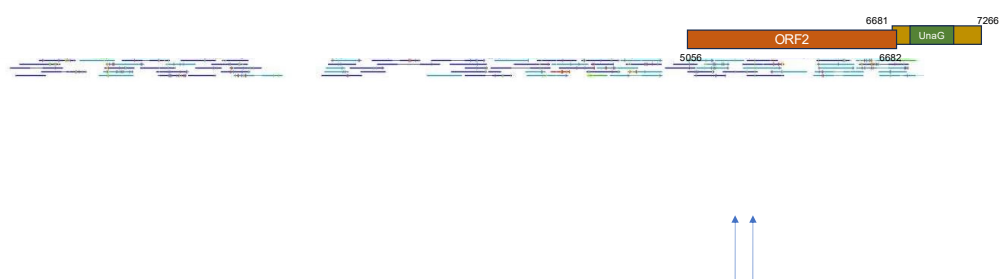
(A)



(B)



(C)



(D)

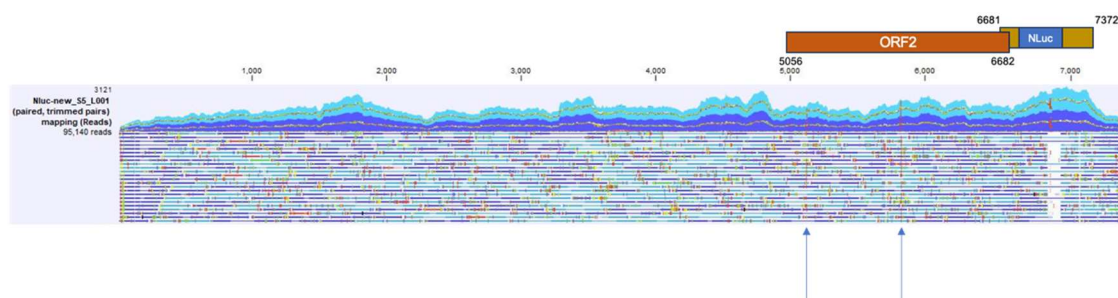


Fig. 8 MNVstop ウイルス (A) , Δ NM-Venus ウイルス (B) , Δ NM-UnaG ウイルス (C)

及び Δ NM-Nluc ウイルス (D) の全ゲノム解析

各ウイルスの全ゲノム配列を次世代シーケンサー (NGS) 及び CLC genomics workbench ver. 21 を用いて決定した。青矢印は ORF2 領域で変異していた塩基を示している。

Fig. 9

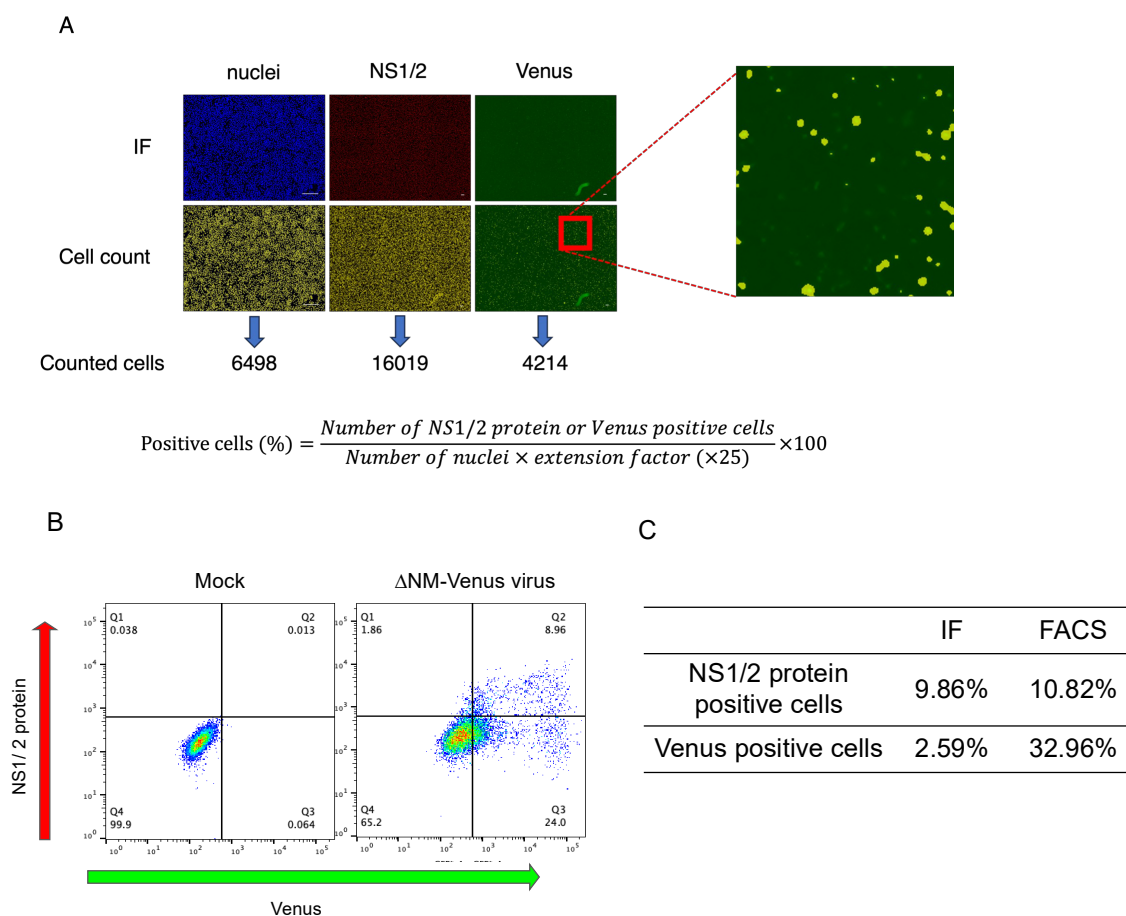


Fig. 9 NS1/2 陽性細胞数及び Venus 発現細胞数の測定方法の比較 (免疫染色後の画像解

析(IF) v.s.フローサイトメトリーを用いた解析 (FACS)

(A) IF は BZX800 により画像を撮影し、BZX ソフトウェアを用いて NS1/2 タンパク質発現細胞数および Venus 発現細胞数を測定した。撮影した画像から NS1/2 タンパク質発現細胞、Venus 発現細胞の数を測定し、画像中のトータル細胞数で割ることで求めた。トータル細胞数は、染色された核の数を数えることで求めた。核染色のシグナルは小さかったので、核数は高倍率の画像で計測し、それを 25 倍することでトータル細胞数とした。黄色の点は、BZX ソフトウェアで陽性と検出された細胞を示している。右側の拡大画像では、ソフトウェアがいくつかの Venus 陽性細胞を見逃してしまっていることを示している。(B) NS1/2 タンパク質に対する免疫染色の後、フローサイトメトリーで各タンパク質を発現している細胞を測定した。(C) IF 及び FACS から算出された NS1/2 タンパク質発現細胞数および Venus 発現細胞数を比較した。

Fig. 10

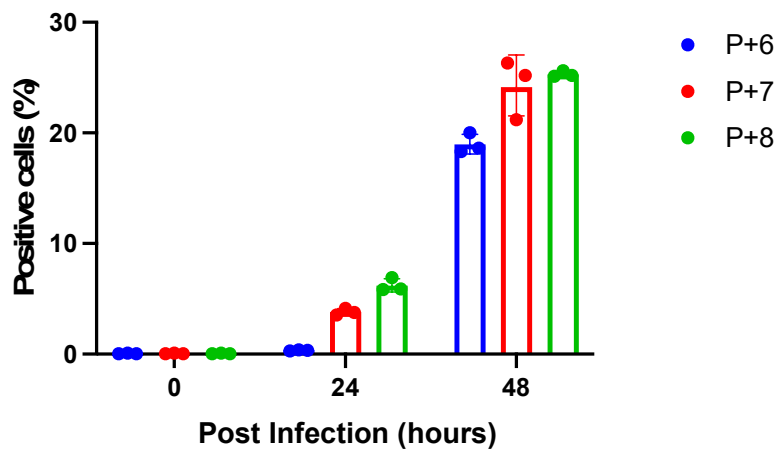
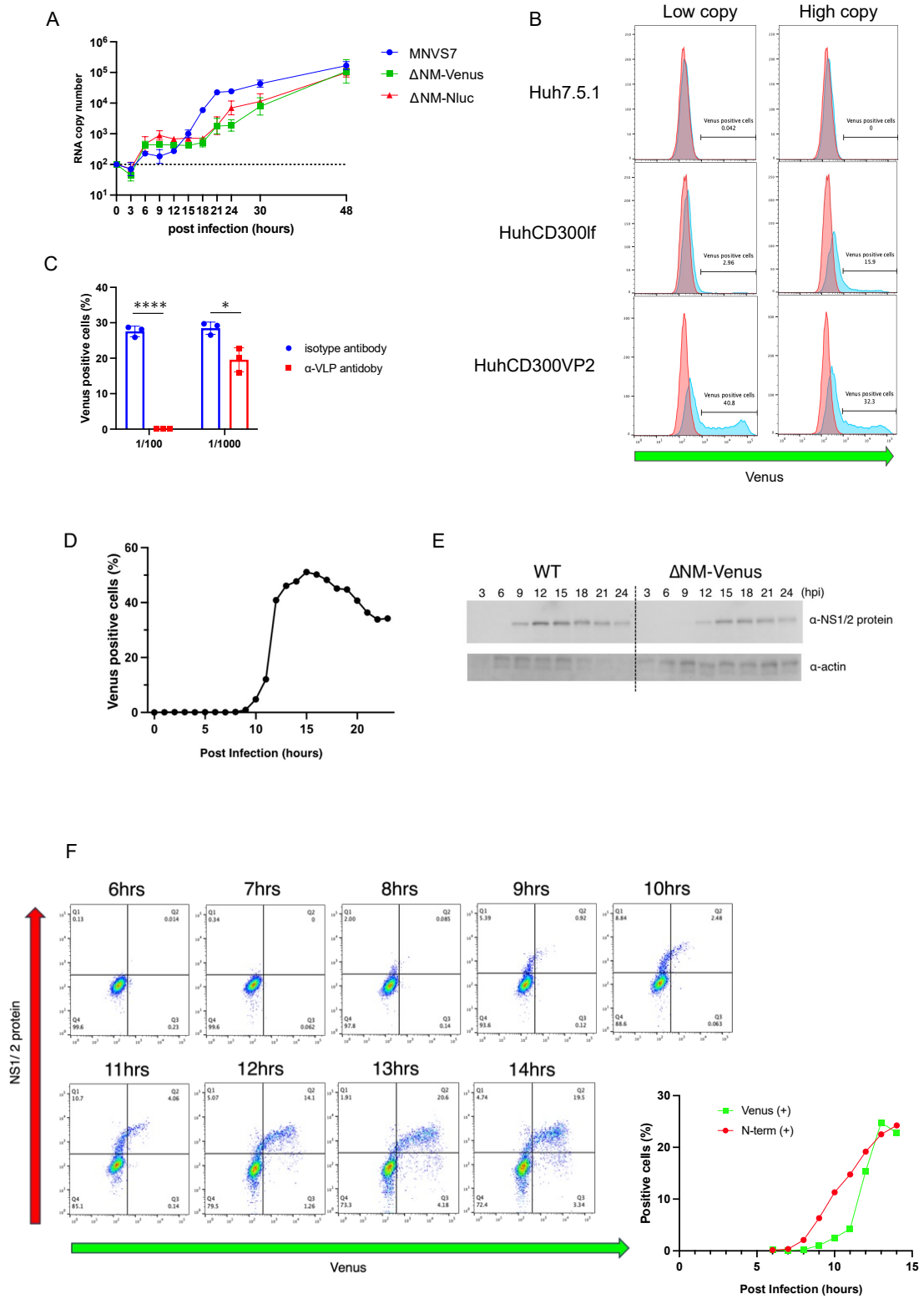


Fig. 10 異なる継代数 (P+6, P+7, P+8) の Δ NM-Venus ウイルスにおける Venus 発現

細胞数の比較

異なる継代数 (P+6, P+7, P+8) の Δ NM-Venus ウイルス (1×10^9 RNA コピー数) を Huh CD300VP2 細胞 (1×10^6 個) に感染させ、24 時間及び 48 時間後における Venus 発現細胞数の割合を示した。各ドットは Venus 発現細胞数の割合を示し、棒グラフは Venus 発現細胞数の平均値を示した。また、エラーバーは標準偏差を示した。

Fig. 11



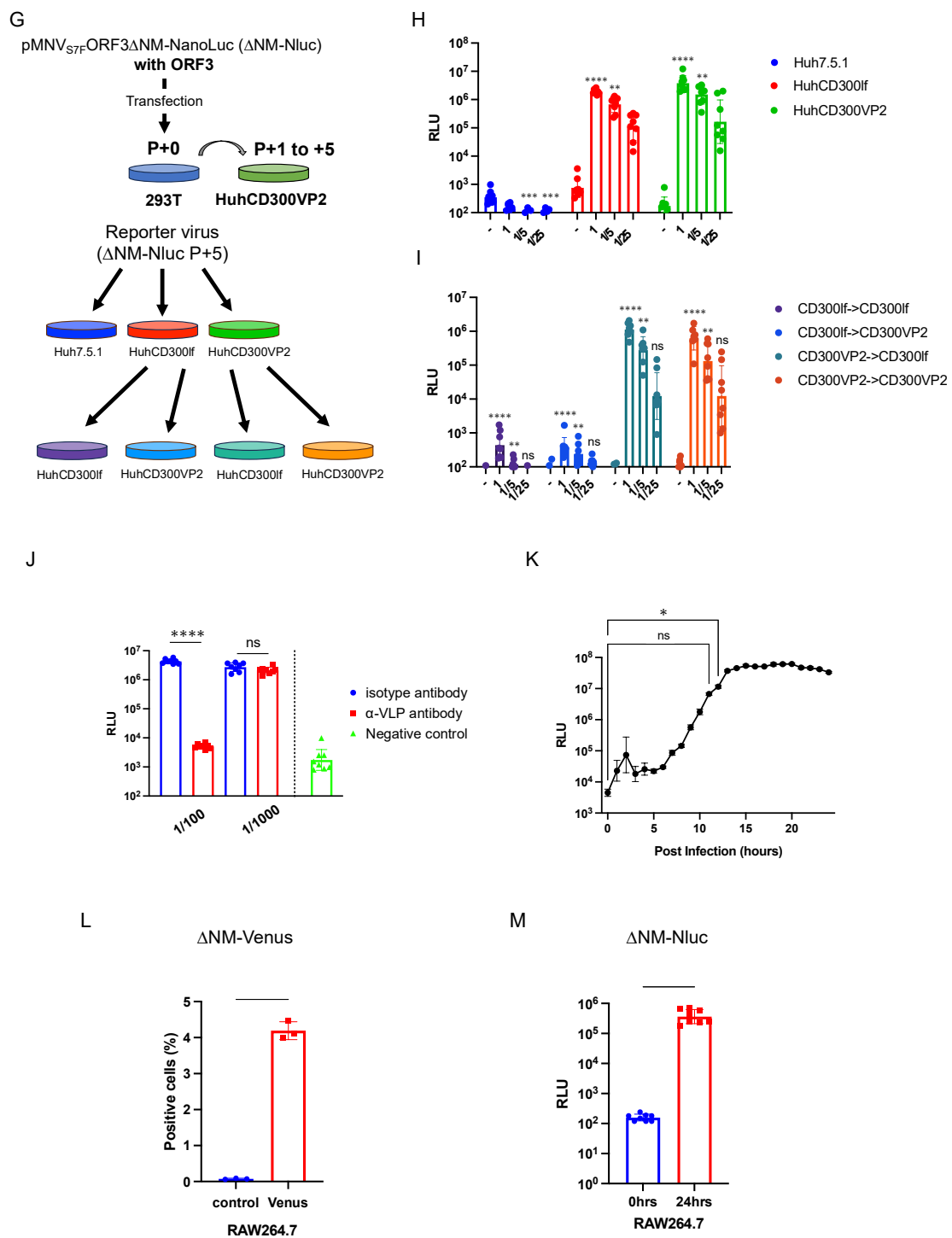


Fig. 11 レポーターウイルスの性状解析

(A)レポーターウイルスと MNVS7 (2×10^7 RNA コピー数) を HuhCD300VP2 細胞 (2×10^4 個) に感染させ、感染 3 時間ごとに培養上清を回収し、培養上清中に存在するウイ

ルス RNA を定量した。各ドットは RNA コピーの幾何平均値であり、エラーバーは幾何標準偏差を示した。(B) Δ NM-Venus ウイルス (1×10^9 または 1×10^8 RNA コピー数) を Huh7.5.1、HuhCD300lf または HuhCD300VP2 細胞 (1×10^6 個) に感染させ、24 時間後、Venus 発現細胞数をフローサイトメトリーで測定した。この実験は 2 度繰り返し行った。(C) Δ NM-Venus ウイルス (2×10^8 RNA コピー数) を MNV VLP で免疫したウサギの希釈抗血清 (1/100 または 1/1,000) に反応させ、その後、HuhCD300lf 細胞に接種した。24 時間後に Venus 発現細胞をフローサイトメーターで検出した。有意差検定は Welch の t 検定で決定した (*, $P < 0.05$, ****, $P < 0.0001$)。各棒グラフは検出した 3 つのウェルの平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示した。(D) Δ NM-Venus ウイルス (1×10^9 RNA コピー数) を HuhCD300lf 細胞 (2×10^5 個) に感染させ、感染 1 時間ごとに感染細胞を回収し、Venus 発現細胞をフローサイトメトリーで測定した。(E) 同じ RNA コピー数の MNV または Δ NM-Venus ウイルス (2×10^8 RNA コピー数) を HuhCD300lf 細胞 (2×10^5 個) に感染させ、感染 3 時間ごとに細胞溶解液を回収した。ローディングコントロールとしてアクチンを用いた。(F) Δ NM-Venus ウイルス (1×10^8 RNA コピー数) を HuhCD300lf 細胞 (1×10^5 個) に感染させ、感染 6 時間から 14 時間の 1 時間ごとに細胞を回収した。細胞は 6~14 時間毎に回収した。回収した細胞は固定し、メタノールで透過処理した。ブロッキング後、細胞を抗 NS1/2 抗体及び Alexa 647 抗ウサギ IgG を順に反応させ、フローサイトメトリーで解析した。(G) NanoLuc ルシフェラーゼ (Nluc) を発現する MNV レポーターウイルスの継代を模式図で示した。NM-Nluc ウイルスは pMNVS7F-ORF3 Δ NM-NanoLuc と pORF3 を 293T 細胞にトランスフェクションし、トランスフェクトした 293T 細胞 (P+0) の上清上清を、HuhCD300VP2 細胞 (P+1~+5) に接種し、継代した。(H) Δ NM-Nluc ウイルスを 5 回増殖継代後、各希釈ウイルス液 (1×10^7 (1)、 2×10^6 (1/5) または 4×10^5 (1/25) RNA コピー数) を各細胞株 (1×10^4 個) に感染させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。(I) さらに、ルシフェラーゼ活性を示した細胞 (HuhCD300lf 細胞および HuhCD300VP2 細胞) の培養上清を希釈 (1、1/5、または 1/25) し、HuhCD300lf 細胞および HuhCD300VP2 細胞に接種した。各細胞のルシフェラーゼ活性は、感染 24 時間後に Nano-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega 社製) を用いて測定し、ルミノメーターで発光シグナルを検出した。グラフの縦軸は相対発光単位 (RLU) を示し、各棒グラフは、測定した 8 ウェルの幾何平均値を示した。また、エラーバーは幾何学的標準偏差を示し、有意差検定は Kruskal-Wallis 検定により決定した (**, $P < 0.005$, ***, $P < 0.0005$, ****, $P < 0.0001$, ns, not significant)。(J) Δ NM-Nluc ウイルス (2×10^7 RNA コピー数) を MNV VLP で免疫したウサギの希釈抗血清 (1/100 または 1/1,000) に反応させ、HuhCD300lf 細胞に接種した。24 時間後に感染細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。有意差検定は Welch の t 検定によって決定した (***, $P < 0.0001$, ns, 有意差なし)。各棒グラフは測定した 8 ウェルの幾何平均値を示し、エラーバーは幾何学的標準偏差を示した。(K) Δ NM-Nluc ウイルス

(1×10^8 RNA コピー数) を HuhCD300lf 細胞 (2×10^4 個) に感染させ、感染細胞を感染後 1 時間ごとに回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。有意差検定は Kruskal-Wallis 検定により決定した (*, $P < 0.05$, ns, not significant)。各ドットは RLU の幾何平均値を示し、エラーバーは幾何標準偏差を示した。(L) Δ NM-Venus ウイルス (1×10^9 RNA コピー数) を RAW264.7 細胞 (1×10^6 個) に感染させ、24 時間後に Venus 発現細胞数を測定した。有意差検定は Welch の t 検定で決定した (***, $P < 0.0001$)。各棒グラフは測定した 3 つのウェルの平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示した。(M) Δ NM-NLuc ウイルス (2×10^7 RNA コピー数) を RAW264.7 細胞 (2×10^4 個) に感染させ、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。有意差検定は Welch の t 検定で決定した (***, $P < 0.0001$)。各棒グラフは測定した 8 ウェルの幾何平均値を示し、エラーバーは幾何学的標準偏差を示した。

Fig. 12

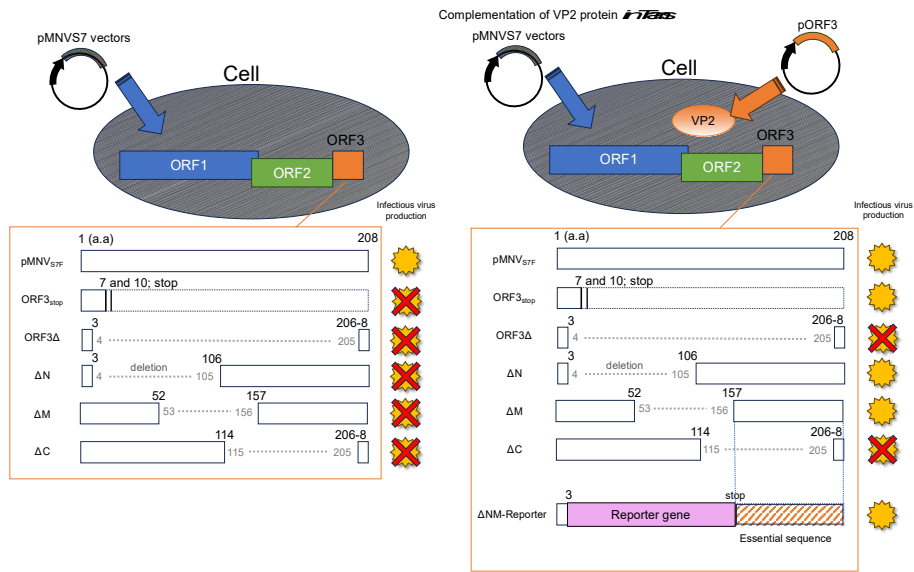


Fig. 12 本研究の概要図

MNV 産生における VP2 タンパク質と ORF3 配列の必要性を別々に評価した。

(左) VP2 タンパク質は MNV 産生に必須であった。また今回作成した部分欠損した VP2 を持ったコンストラクトからは感染性粒子は産生されなかった。

(右) VP2 をトランスに供給することで、ORF3_{stop} からは感染性ウイルスを産生することにできた。一方で、ORF3 Δ からは VP2 供給条件下では増殖できなかった。そこで、この ORF3 中の必須な配列領域を調べるために、VP2 供給下で部分欠損した変異体を評価した結果、ORF3 の VP2 タンパク質の 157-208 番目をコードしている領域にウイルス産生に必須な領域が含まれており、ORF3 の 4-156 番目の領域は VP2 タンパク質をトランスで供給した場合にはウイルス産生には不要であった。この不要な領域は外来遺伝子に置換することができ、置換されたウイルス (レポーターウイルス) は VP2 供給条件下で増殖することができ、感染した細胞でレポーター遺伝子の発現も認められた。