

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

ウイルスの作出

感染制御科学専攻 感染制御・免疫学履修コース ワクチン学

DI-21001 石山涼翔

【緒言】

ヒトに感染するノロウイルス(human norovirus: HuNoV)は、カリシウイルス科ノロウイルス属ノロウイルス・ノーウォークケンス種のウイルスであり、急性胃腸炎や非細菌性食中毒の原因ウイルスとして知られている。グローバルな HuNoV 胃腸炎患者数は、年間約 7 億人、死亡者数は年間約 21 万人と人類に極めて深刻なダメージを与え続けており[1]、ワクチン開発や治療薬開発が切望されている。ワクチンを含む抗ウイルス創薬のためには、*in vitro*, *in vivo* におけるウイルスの複製増殖システムと、感染モデル動物を用いた薬理薬効の研究が必須である。HuNoV は、1972 年の発見以来それらが構築されておらず、研究が遅れていた。2016 年に腸管オルガノイドによる複製増殖に成功が報告され[2]、研究の障壁の一部が突破されたが、オルガノイドより維持管理が容易く、高効率な株化培養細胞による増殖培養システムの確立、マウス、ラットなどの小型感染モデル動物の開発が求められている。

このような状況下、ノロウイルス・ノーウォークケンス種のウイルスとして 2002 年に発見されたネズミノロウイルス (murine norovirus: MNV) は、マウスのマクロファ

ージ由来株化培養細胞である RAW264.7 で、増殖培養することが可能であり、通常の実験用マウスに経口感染させることが可能である。一方、MNV 感染マウスは胃腸炎を発症せず、病原性も不明であるため、HuNoV の代替ウイルスとして用いる場合には、HuNoV の類似性と独自性を認識して利用する必要がある。

2016 年、当研究室の芳賀らは、HuNoV のレセプター分子の検索を行う過程で、MNV のタンパク質性レセプター分子 CD300lf, CD300ld を同定に成功した[3]。

CD300lf, ld のヒトホモログ分子は、HuNoV のレセプター分子として機能しなかったが、効率のよいリバーシジェネティクス (RGS) による MNV 遺伝子の操作を可能とし、MNV の複製増殖機構研究の進展に貢献した。

本研究は、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な自然免疫系ノックアウト細胞に CD300lf を導入した細胞を樹立し、RGS を利用した新生ウイルス産生システムを構築することを目指した。さらに、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 (6~7 種類の非構造タンパク質をコードする ORF1、キャプシドタンパク質 VP1 をコードする ORF2、マイナー構造タンパク質 VP2 をコードする ORF3) と 3

‘untranslated region (3’UTR)のうち、ORF3(VP2)と 3’UTR のノロウイルスの細胞内複製に関する機能を明らかにすることを目的として行った。

ノロウイルスにおいて、VP1 は単独で発現させることで自己集合してウイルス様中空粒子 (VLP) を形成することから、粒子形成には VP2 が必須では無いことが知られ

ている。しかしながら、ORF3 の 3'側の領域を欠損させると感染性粒子が形成されないこと[4]や ORF3 の 3'側から 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[5]。これらの報告から、VP2 タンパク質と ORF3 の 3'領域の RNA 配列は、共にウイルスのライフサイクル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、本研究の目的の一つである感染性粒子形成における VP2 の機能を解析するには、VP2 自体が必要なのか、ORF3 の RNA 配列が必要なのか明確に区別する必要がある。

先行研究では、それらを区別するために、VP2 タンパク質と ORF3 配列を別個に評価できる系を構築した (Fig. 1)。

MNV の RGS により ORF3 の開始コドン直後にストップコドンを導入し VP2 タンパク質が発現しないようにすると感染性粒子が産出されない事を示した。その際に VP2 タンパクをトランスで供給することで、感染性粒子を産出できるようになることも示した。しかしながら、ORF3 の配列の大部分を欠損させると VP2 供給下でもウイルス産生は起こらなかったことから、ORF3 の配列部分にもウイルス産生に必要な領域が存在することが示唆された。

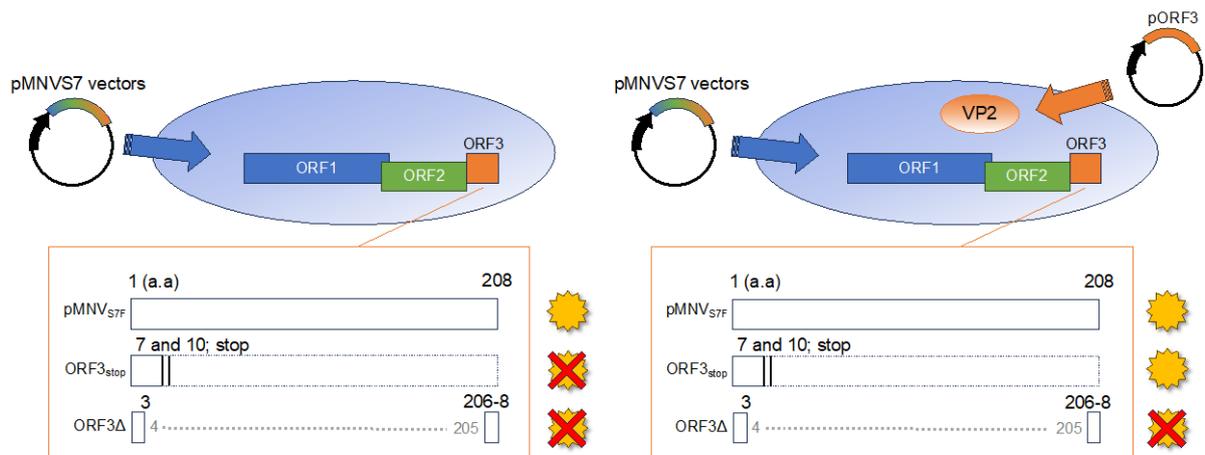


Fig. 1 先行研究のSummary Figure

本研究では、より効率的な MNV 培養系を作出する事で、ORF3 欠損変異体ウイルスを効率的に作出・増殖させ、各変異体の感染性を定量的に示すことで ORF3 の必須配列部分を同定し、さらに必須領域以外の領域に外来遺伝子が導入できるか検討した。

【方法と結果】

● MNV 感受性細胞株の樹立

本研究では、RIG-I 遺伝子にミスセンス変異を持ったヒト肝癌細胞株 (Huh7.5.1) に MNV 受容体タンパク質である CD300lf の遺伝子を導入し、恒常的に CD300lf を発現する細胞株 (Huh7.5.1/CD300lf) を作製した。この細胞は、先行研究で用いた RAW264.7 細胞に比べ、より多くの MNV を産生することが確認された。さらに、MNV S7 株の VP2 タンパク質を恒常的に発現させた細胞株 (Huh7.5.1/CD300lf/VP2) を作製し、評価に用いた。

● Huh7.5.1/CD300lf/VP2 を用いた MNV

ORF3 欠損変異体ウイルスの再評価

Huh7.5.1/CD300lf/VP2 を用いて、感染性粒子の形成に必要な ORF3 の配列領域を再評価した (Fig. 2, 3)。その結果、先行研究と同様に ORF3 の N 末端側を欠損させたプラスミドからは感染性粒子が産生されたが、C 末端側を欠損させたプラスミドからは感染性粒子が産生されなかった。よって、この領域内に感染性ウイルス産生に必要な領域が含まれていることが示唆された。

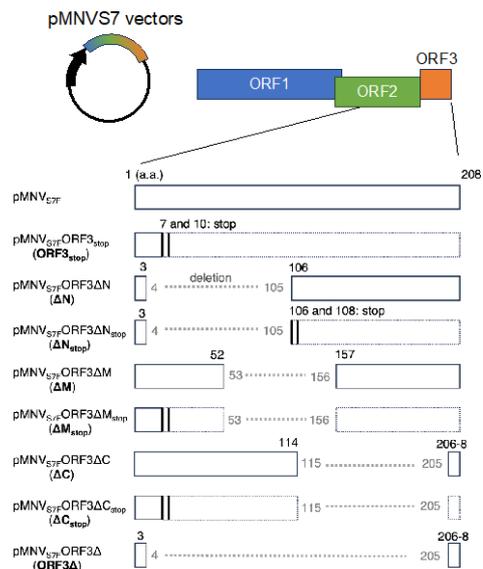


Fig. 2 MNV ORF3欠損変異体プラスミド

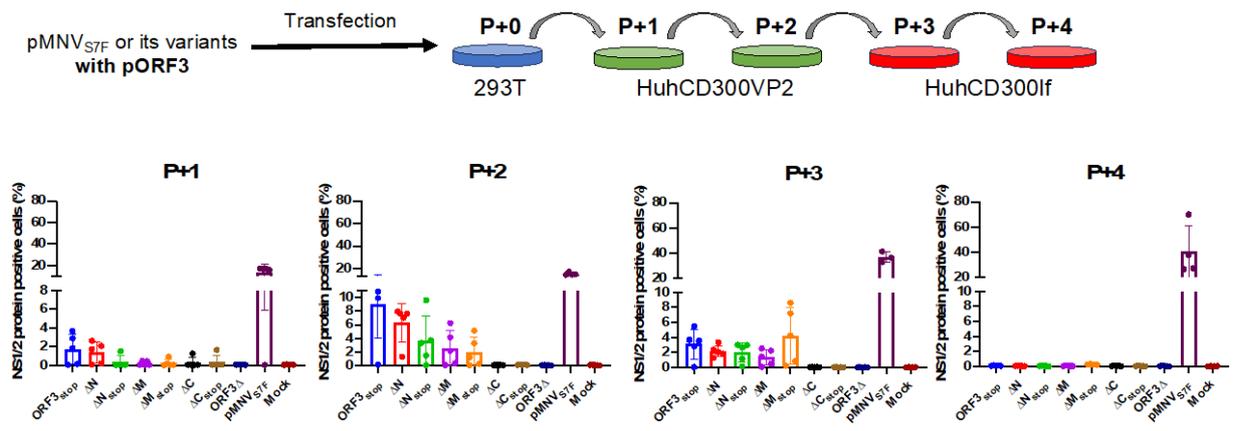


Fig. 3 Huh7.5.1/CD300If/VP2を用いたMNV ORF3欠損変異体ウイルスの再評価

- 外来遺伝子を導入したウイルスの作出と挿入遺伝子の安定性の確認

ORF3 上の非必須領域に外来遺伝子

の導入を試みた (Fig. 4)。外来遺伝

子として、低分子の蛍光タンパク質

をコードする UnaG 遺伝子、GFP

の蛍光特性を改良したタンパク質を

コードする Venus 遺伝子、高輝度になるように改良された低分子の発光酵素をコード

した NanoLuc (Nluc) 遺伝子を用い、外来遺伝子を導入したウイルスがレポーターウ

イルスとして機能するか検証した。

レポーターウイルス (Δ NM-Venus, Δ NM-UnaG, Δ NM-Nluc) は MNV ORF3 欠損変

異体ウイルスと同様に作出し、十分なウイルス量を確保するために 5 回継代した後、

各レポーターウイルスのゲノム配列を次世代シーケンサーにより調べた。

Δ NM-Venus ウイルスでは、Venus 遺伝子を含む ORF3 領域に変異は認められなかつ

たが、ORF2 領域に T5691C (サイレント変異) 及び T6598C (ミスセンス変異 :

F515L) の変異を有するウイルスがそれぞれ 66% 及び 72% の割合で認められた。

Δ NM-Nluc ウイルスでは、Nluc 遺伝子に 1 から 5 個のアデニンが少なくとも 50% 以

上の割合で挿入が確認された。さらに、ORF2 領域には G5119A (ミスセンス変

異 : V22I)、C5821A (ミスセンス変異 : P256T) がそれぞれ 76% 及び 96% の割合

で認められた。 Δ NM-UnaG ウイルスでは、挿入した UnaG 遺伝子の大部分が欠失し

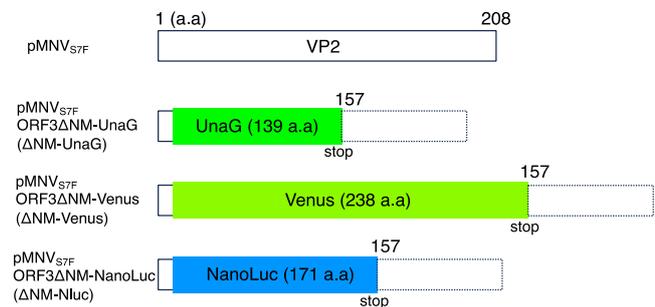


Fig. 4 MNV ORF3 外来遺伝子挿入プラスミド

たウイルスが、約 80%の割合で確認された。

そこで、挿入したレポーター遺伝子が安定的に保持されていた Δ NM-Venus ウイルスと Δ NM-Nluc ウイルスを用いてそれらウイルスの性状を確認した。

- レポーターの発現及びレポーターウイルスの性状確認

レポーターウイルスが MNV としての性状を維持しているか確認するために、レポーターウイルスを Huh7.5.1, Huh7.5.1/CD300lf, Huh7.5.1/CD300lf /VP2 に接種して、Venus 発現細胞数及びルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 5A, B)。

Huh7.5.1/CD300lf 及び Huh7.5.1/CD300lf /VP2 では、Venus 発現細胞数及びルシフェラーゼ活性が増加した。一方、Huh7.5.1 では、Venus 発現細胞数及びルシフェラーゼ活性は観察されなかった。さらに、 Δ NM-Nluc ではルシフェラーゼ活性を示した細胞の培養上清を Huh7.5.1/CD300lf, Huh7.5.1/CD300lf /VP2 に接種し、ルシフェラーゼ活性を評価した (Fig. 5C)。Huh7.5.1/CD300lf /VP2 の培養上清を接種した細胞株では、ルシフェラーゼ活性を示した。一方、Huh7.5.1/CD300lf の培養上清を接種した細胞株では、ルシフェラーゼ活性を示さなかった。

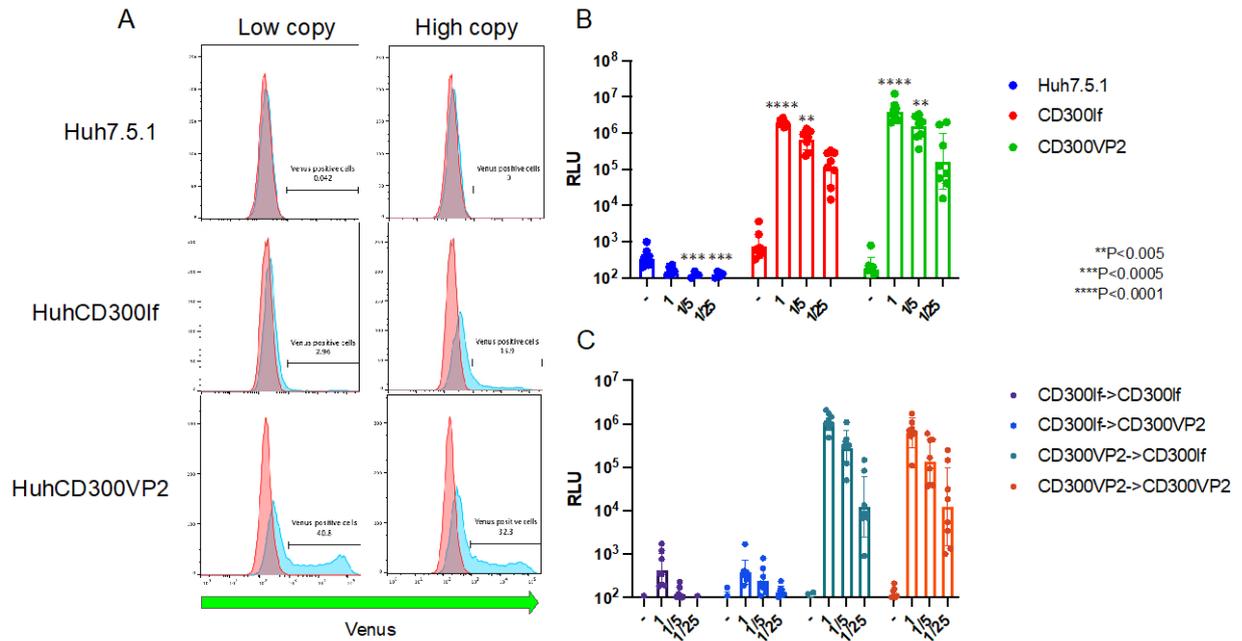
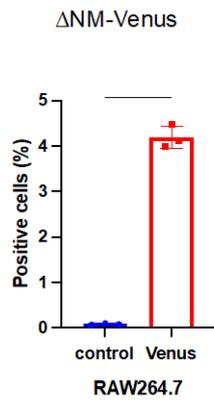


Fig. 5 レポーターの発現及びレポーターウイルスの性状確認

以上の結果より、レポーターウイルスは MNV と同様に CD300lf をレセプターとして用いて感染すること、そしてウイルスの継代には VP2 タンパク質をトランスで供給することが必要なことが示唆された。

さらに、レポーターウイルスが自然宿主由来の RAW264.7 においても、感染しレポーター遺伝子の発現を検出できるかどうか確認した。ΔNM-Venus ウイルス感染させることで、Venus 発現細胞を確認されたが、Huh7.5.1/CD300lf と比べると Venus 発現細胞数は少なかった (Fig. 5D)。また、ΔNM-Nluc ウイルス感染においても、ルシフェラーゼ活性は検出されたが、Huh7.5.1/CD300lf と比べて約 10 倍低かった (Fig. 5E)。

D



E

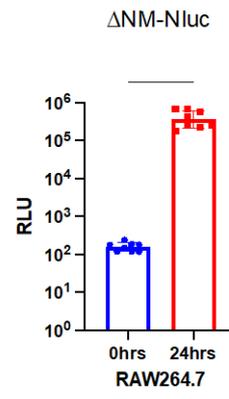


Fig. 5 レポーターの発現及びレポーターウイルスの性状確認

【考察】

同定した ORF3 の非必須領域に外来遺伝子を導入したウイルスの作出に成功した。

作出した各レポーターウイルスのゲノムの安定性を次世代シーケンサーによって確認した結果、導入した遺伝子によってその安定性が異なる可能性を示した。その安定性は、挿入遺伝子の長さに依存している可能性が考えられる。したがって、この系でレポーターウイルスを作製する場合には、増殖後にウイルスゲノム中の挿入遺伝子の安定性を確認する必要がある。

レポーターウイルスの ORF2 領域にはいくつかの変異が観察されたが、MNV と同様にレセプター分子である CD300lf を用いた感染機構を有しており、VP2 タンパク質が発現していない細胞においても、レポーター遺伝子の発現を検出できたことから、一回の感染でレポータータンパク質を検出することが可能であることが示された。また、レポーターウイルスは自然宿主由来の RAW264.7 にも感染し、レポーター遺伝子の発現を検出することができたことから、*in vivo* においても感染し、レポーター遺伝子を発現させる事ができる可能性を示した。

これらの結果は、MNV と同様の性状を有していることを示しており、MNV のマウス個体内でのウイルス感染動向の研究や 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。さらに、このシステムは HNV レポーターベクターの作製にも役立つ可能性があり、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 回しか感染しない弱毒生

ウイルスワクチンの開発につながる可能性がある。

1. Howley, P.M., D.M. Knipe, and S.P.J. Whelan, *Fields virology Volume 1 Emerging viruses*. Seventh edition. ed. 2021, Philadelphia: Wolters Kluwer. volumes.
2. Ettayebi, K., et al., *Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids*. Science, 2016. **353**(6306): p. 1387-1393.
3. Haga, 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. **113**(41): p. E6248-E6255.
4. Sosnovtsev, S.V., et al., *Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4012-24.
5. Bailey, D., 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. **84**(6): p. 2859-70.