

2. ノロウイルスレセプター研究の歴史と ネズミノロウイルス受容体の発見

片山 和彦

北里大学北里生命科学研究所・感染制御科学府ウイルス感染制御学 I

ノロウイルスは、世界中に広く分布し、年間数十万人から数百万人に及ぶ非細菌性急性胃腸炎患者を発生させ続けている。ノロウイルスの研究は、1972年に免疫電子顕微鏡観察によってウイルス粒子が発見されて以来、感染感受性株化培養細胞の欠如、感染モデル動物の欠如によって長期にわたり進展が阻害された状態が続いていた。ATCC等から入手可能な株化培養細胞を用いてノロウイルスの増殖培養を試みたが、いずれも成功には至らなかった。2003年にネズミに感染するノロウイルスが、STAT1とRAG2をノックアウトした(RAG)/STAT1^{-/-}マウスにおける致死感染因子としてマウスの脳内から発見された。このウイルスは、マウスのマクロファージ細胞株、RAW264.7細胞で効率よく増殖培養させることが可能であった。ネズミノロウイルスの発見は、ノロウイルス研究の障壁を取り去り、ノロウイルスの研究の突破口となると期待された。

本稿では、このような背景から、ヒトノロウイルスの機能性レセプター分子の発見を狙い、日本と北米でほぼ同時に進行したヒトノロウイルスのサロゲートウイルスとして有用性の高いネズミノロウイルスの機能性レセプター検索から発見に至までの研究を、ノロウイルス研究の背景とともに概説する。

【ノロウイルスの分類】

ノロウイルスとは、カリシウイルス科(Caliciviridae)ノロウイルス属(Norovirus)ノーウォークウイルス種(Norwalk viruses)のウイルスの一般的な呼称名である。Caliciviridaeには、Norovirusの他に、Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus, Nebovirusの合計5つのウイルス属が存在する(<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>)。正式には、カリシウイルス科(Caliciviridae)、ノロウイルス属(Norovirus)、ノーウォークウイルス種(Norwalk virus)であるから、

“ノーウォークウイルス”と呼ぶのが正しい。今のところNorovirusのウイルス種は、Norwalk virusのみであるため、マスメディアなどで多用され、定着したノロウイルス(NoV)がウイルス名として使用されている。本稿では、以下慣例に従ってNorwalk virusをノロウイルス(NoV)とする。

NoVのゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、遺伝学的に5つのgenogroupに分別される(<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) (図1)。Genogroup I, II, IV (GI, II, IV)がヒトに感染するNoV (Human Norovirus; HuNoV) (GIIにはブタに感染する株 (Swine Norovirus; SwNoV)^{1,2)}, GIVにはイヌに感染する (Canine Norovirus; CaNoV)³⁾, ネコに感染する Feline Norovirus; FeNoV^{4,5)}が含まれる), GIIIがウシに感染するノロウイルス⁶⁾, そしてGVがネズミに感染するNoV⁷⁾ (Murine Norovirus, MNV)である。MNVは後述するようにSTAT1ノックアウト系のマウス脳内から分離されたため、マウスノロウイルスと呼称されることもある。

連絡先

〒108-8641

東京都港区白金5-9-1

北里大学北里生命科学研究所・感染制御科学府ウイルス感染制御学 I

TEL & FAX: 03-5791-6468 (direct)

TEL: 03-3444-6161 (代表) 内線 6468 (教授室)

Email: katayama@lisci.kitasato-u.ac.jp

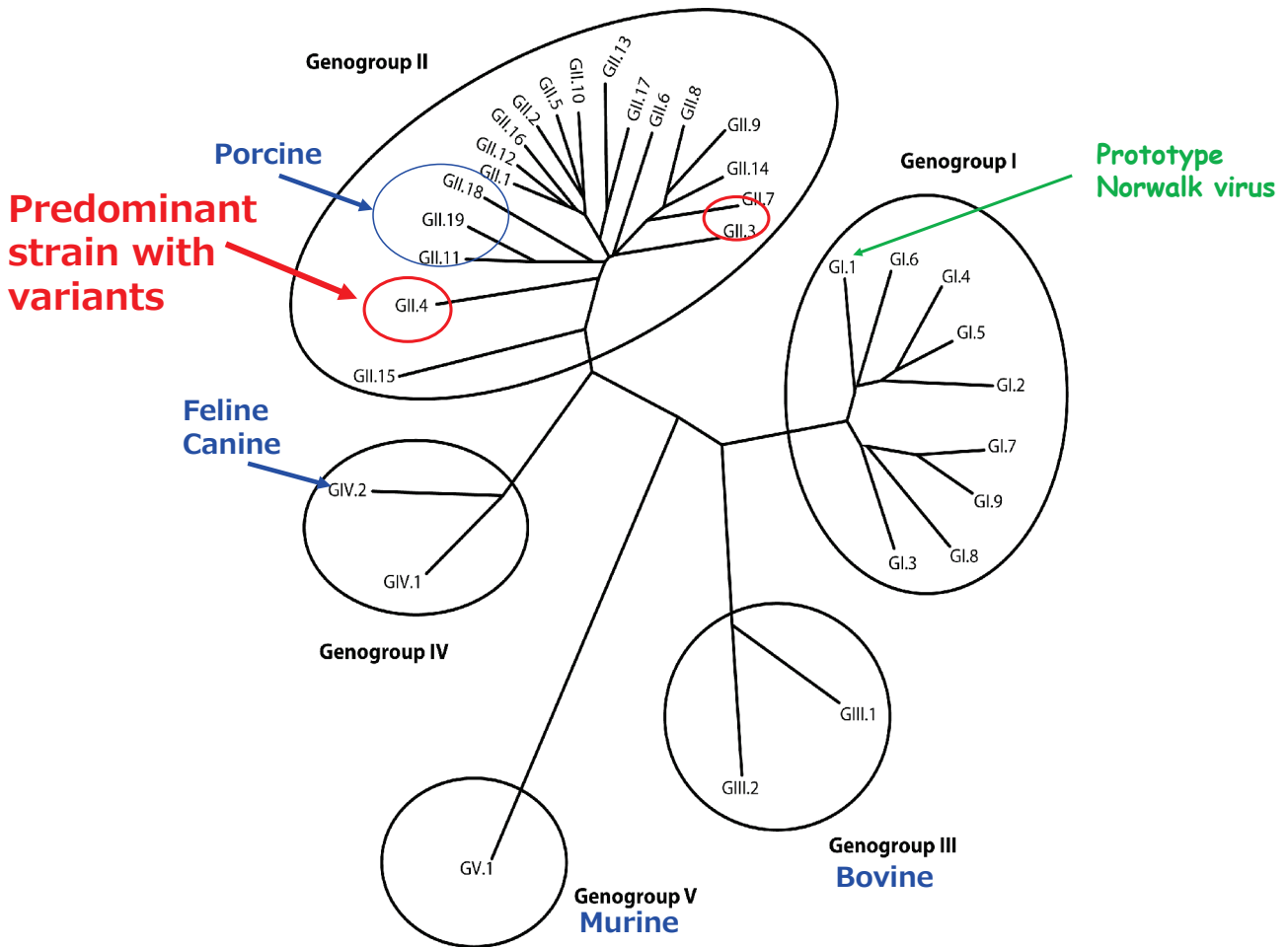


図1 ノロウイルス属ノーウォークウイルス種の分子系統樹
 1972年に発見された prototype Norwalk virus, 2000年代に入り主要流行株となった GII.4 を predominant strain として示した。各遺伝子グループには、宿主名を示した。

【MNV の特徴】

MNV は、その形状とゲノムの性状から5番目の genogroup, GV として発見され、2003年に科学雑誌 Science に報告された⁷⁾。プロトタイプウイルスは、Science の報告に基づいて MNV-1 と表記する。以来、北米、ヨーロッパなどから次々と新たな MNV 株が分離され、塩基配列データがデータベースに登録された⁸⁾。MNV -S7 株⁹⁾は、我が国で飼育している健常な実験用マウスの糞便サンプルから分離培養された株の一つである。MNV の内、マウスから分離された株の遺伝子配列の相同性は高く、ほぼ同じ遺伝子型であり、MNV-1 で誘導された中和血清で他の MNV 株を中和できることから、血清型も同じと考えて良い^{10, 11)}。米国の実験用マウスでの血清学的調査において MNV 抗体が22%に達する高い陽性率を示すことが報告された¹²⁾。また、MNV が通常のマウスで持続感染を起こすことも示された¹³⁾。さらに、感染8週間後のマウス腸間

膜リンパ節、空腸、脾臓などからウイルス RNA が検出されたことが報告され、糞口感染による MNV の伝播が示された¹³⁾。しかし、MNV に感染したマウスは、おう吐、下痢などの消化管症状を示すことは少ない。通常は、ほとんど症状を示さないことが知られている。

MNV は、マウス・マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞で、増殖培養が可能で、さらには、RNA ベースのリバーシジェネティックスやプラスミドベースのリバーシジェネティックスにより核酸から感染性ウイルスを産生することが証明されている唯一の NoV である¹⁴⁻¹⁶⁾。

【ノロウイルスのレセプター研究史】

HuNoV に近縁なラゴウイルス属のウサギ出血熱ウイルス (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus; RHDV) が、組織血液型抗原 (HBGA) をレセプターとして細胞に感染していることが明らかにされていたため¹⁷⁾、2002年にフランスの研究グループがヒトの組織血液型抗原 (HBGA) と

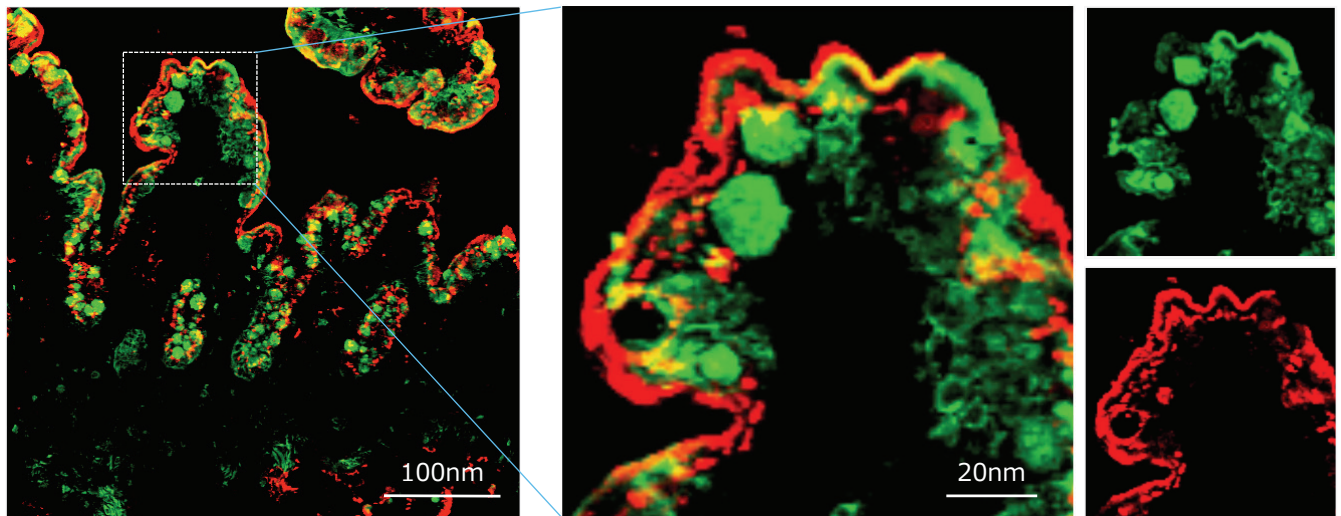


図2 ヒト小腸バイオプシに取り込まれたVLPと腸管表面に存在するHBGAの免疫染色像

ノロウイルスVLPを緑色に、HBGA赤色で蛍光免疫染色した。左端の四角部分の拡大増を右に示した。右端の2枚は、VLP染色(緑単独)、HBGA染色(赤単独)の画像。この2枚を重ね合わせ、VLPとHBGAの共局在を調べた。共局在すると重ね合わせた画像上でオレンジ色になる。

HuNoVのウイルス様中空粒子(Virus like particle; VLP)との結合について解析した¹⁸⁾。彼らは、HuNoV-VLPがヒトのHBGAに結合することを発見し、ヒトの組織血液型抗原(HBGA)をレセプターとしている可能性を示唆した。以来、HBGAとHuNoV-VLPを用いた結晶構造解析など最新の構造生物学的アプローチにより、分子レベルでの結合メカニズムの研究が進められた¹⁹⁾。VLPの突起部分であるVP1のP-domainにHBGAの結合ポケットが存在し、そこにHBGAが特異的に結合することが報告された。さらに、HBGAを分泌できる個体と分泌できない個体では、分泌できない個体の感染感受性が統計学的有意に低いことが明らかになった²⁰⁾。しかし、細胞表面にHBGAを発現させても、HuNoVは感染しないことが明らかになった^{21, 22)}。実際にVLPが細胞に結合する際にHBGAを使うのか否かを確かめるため、その現象の可視化が試みられた²³⁾。結腸由来の培養細胞Caco-2を用いた実験では、VLPは細胞の分化誘導に伴って結合効率が上昇することが分かったが、結合したVLPとHBGAはほとんど共局在しなかった。さらに不思議なことに、VLPはHBGAを発現していない細胞にも効率よく結合した。次に、実際にヒトの体内ではどのようにHuNoVが小腸に結合するのかを可視化するため、小腸の生検サンプルを用いてVLPの結合実験が行われた(図2)。すると、VLPは腸管上皮細胞だけではなく、ゴブレット細胞にも非常に効率よく結合した。HBGAとの共局在が認められる部分も存在したが、共局在しない部分がより多く認められることが明らかになった。驚くべきことにCaco-2を用いた結合実験と異なり、細胞に結合したVLPは非常に速やかにかつ高効率で細胞内に侵入する

ことが示されたのである。HBGAに結合しない性質を持つVLPを用いて、同様にヒト小腸への結合実験を行ったところ、そのVLPも腸管上皮細胞やゴブレット細胞に結合し、非常に効率よく細胞内に取り込まれることが明らかにされた。これらの結果から、HuNoVはHBGAと異なる未知のレセプター分子を利用して細胞に結合・侵入している可能性があることが示唆された²³⁾。

後述のように、現在もHuNoVの細胞への侵入、感染に直接関わるレセプター分子の探索が進められているが、未だにHuNoVレセプター分子は見つかっていない。

【ノロウイルスの宿主特性はレセプター依存的である】

HuNoV患者の便に含まれるHuNoV粒子は、二次感染を引き起こすことから感染性を有することは明らかである。このHuNoVからRNAを取り出して培養細胞に導入したところ、ORF1にコードされる非構造タンパク質が正常に作られ、ゲノム複製以降のステップが回って新生感染性粒子が放出された²¹⁾。この研究により、HuNoVは細胞に侵入して、ゲノムを細胞内に放出することができれば複製増殖が可能であることが示唆された。この仮説を元にヒト細胞内で稼働するEF-1 α プロモーターの下流にHuNoVのcDNAを挿入したプラスミドクローンを作成し、核酸からHuNoVを作製するリバースジェネティクス(RGS)の構築が試みられた¹⁶⁾(図3)。ヒト株化培養細胞である293T, Caco2, Huh7, サルの株化培養細胞であるCOS7に導入し、HuNoVのゲノムRNAを細胞内で合成させたところ、非構造タンパク質合成、構造タンパク質合成、ゲノム複製が行われ、最終的に電子顕微鏡で観察可能な新生ウ

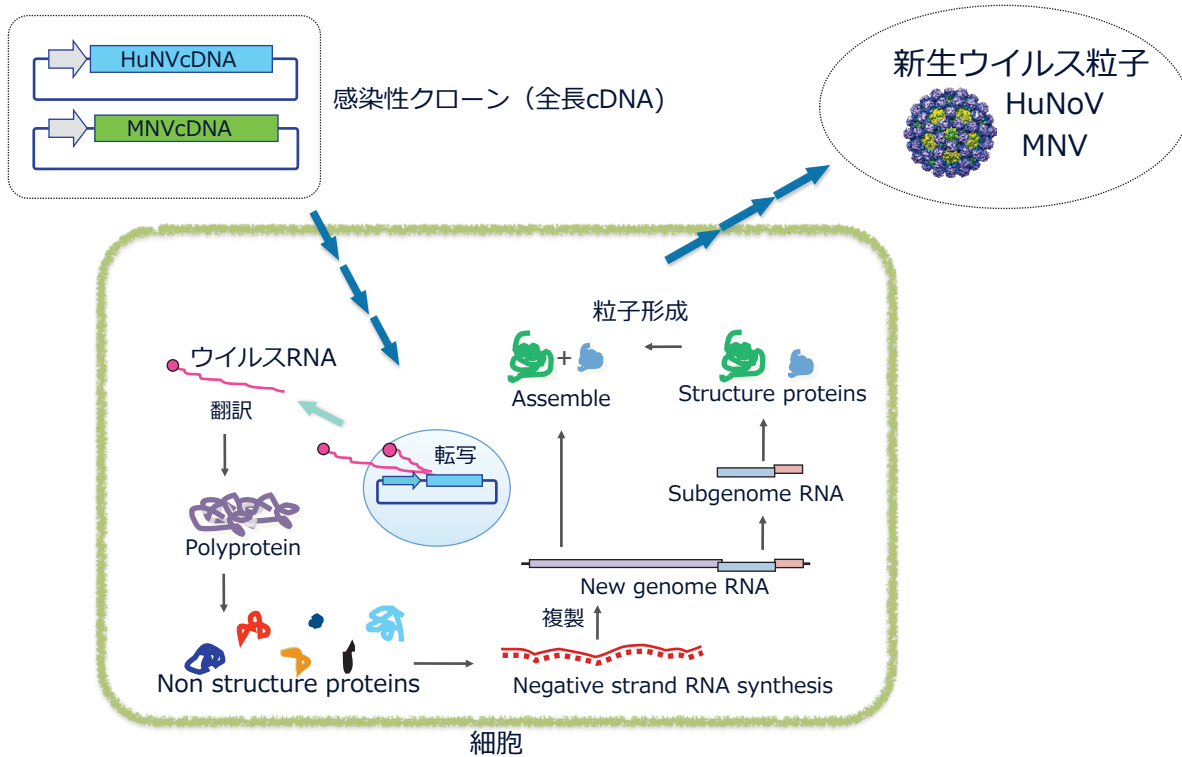


図3 ノロウイルスのリバースジェネティックシステム

ヒトノロウイルスやネズミノロウイルスの全長 cDNA を EF1 α プロモーター下流にクローニングしたプラスミドを、非感受性細胞である HEK293T (ヒト腎上皮細胞由来培養細胞) や、COS7 (アフリカミドリザル腎上皮細胞由来) に導入すると、核内に移動したプラスミド DNA からウイルス RNA が転写され、以降のサイクルが進行して新生ウイルスが産生される。Katayama et al, PNAS 111(38), E4043-52, 2014

ウイルス様粒子が産生されることが明らかになった。しかし、HuNoV には感受性細胞が無いため、新生ウイルス様粒子の感染性は確認できず、この RGS が遺伝子から感染性のある新生ウイルス粒子を作出できるか否かの確認は、MNV を用いて行われた。MNV の cDNA を HuNoV の cDNA に入れ替えた前述のプラスミドクローンは、ヒト由来細胞とサル由来細胞、さらにはイヌ、ネコ、ハムスターなどの動物由来細胞から新生ウイルス粒子を作出し、その新生ウイルス粒子は、MNV 感受性細胞である RAW264.7 細胞で感染増殖が可能だった。この結果により、MNV の宿主特異性は細胞内の複製工程では無く、細胞への侵入工程、つまりレセプター依存的事であることが示唆された。

【MNV のレセプター検索】

NoV の研究において、宿主特異性に関わるレセプターを含む宿主因子を同定できれば、抗ウイルス薬、消毒薬などの薬剤開発、複製増殖機構の解明、ワクチン開発、組織特異性、病原性等の機序の研究を大きく前進させることは明白である。しかし、HuNoV は感受性を示す株化培養細胞が無く、試験管内増殖培養ができない^{24,25)}。それに対

して、MNV は、RAW264.7 細胞で増殖培養が可能な NoV であり、RAW264.7 細胞の細胞表面には MNV 特異的なレセプター分子が発現しているはずである。RAW264.7 細胞表面に存在する MNV レセプターは、HuNoV で HBGA がレセプターとされていたように、細胞表面にある糖鎖ではないかと予想されていた。程なくして、MNV はシアル酸を認識して細胞に結合すると報告がなされ²⁶⁾、シアル酸が MNV レセプターの第一候補と考えられるようになった。しかし、同時に、HBGA もシアル酸もウイルスを細胞内に取り込む機能を持たないかもしれないとする疑問も生じ始めていた²¹⁾。我々と米国の研究グループは、互いに全く独立した研究を実施し、The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR/Cas9 enzyme と guideRNA; gRNA を用いたゲノムワイドランダムノックアウトシステムを利用して MNV 感染に必須な因子の探索を開始した^{27,28)} (図4)。

MNV は RAW264.7 細胞に対して細胞障害性 (Cytopathic effect; CPE) を示す。つまり、MNV が感染した RAW264.7 細胞は細胞死に至る。我々は、CRISPR/Cas9 ゲノムワイドノックアウトシステム遺伝子をランダムにノックアウト

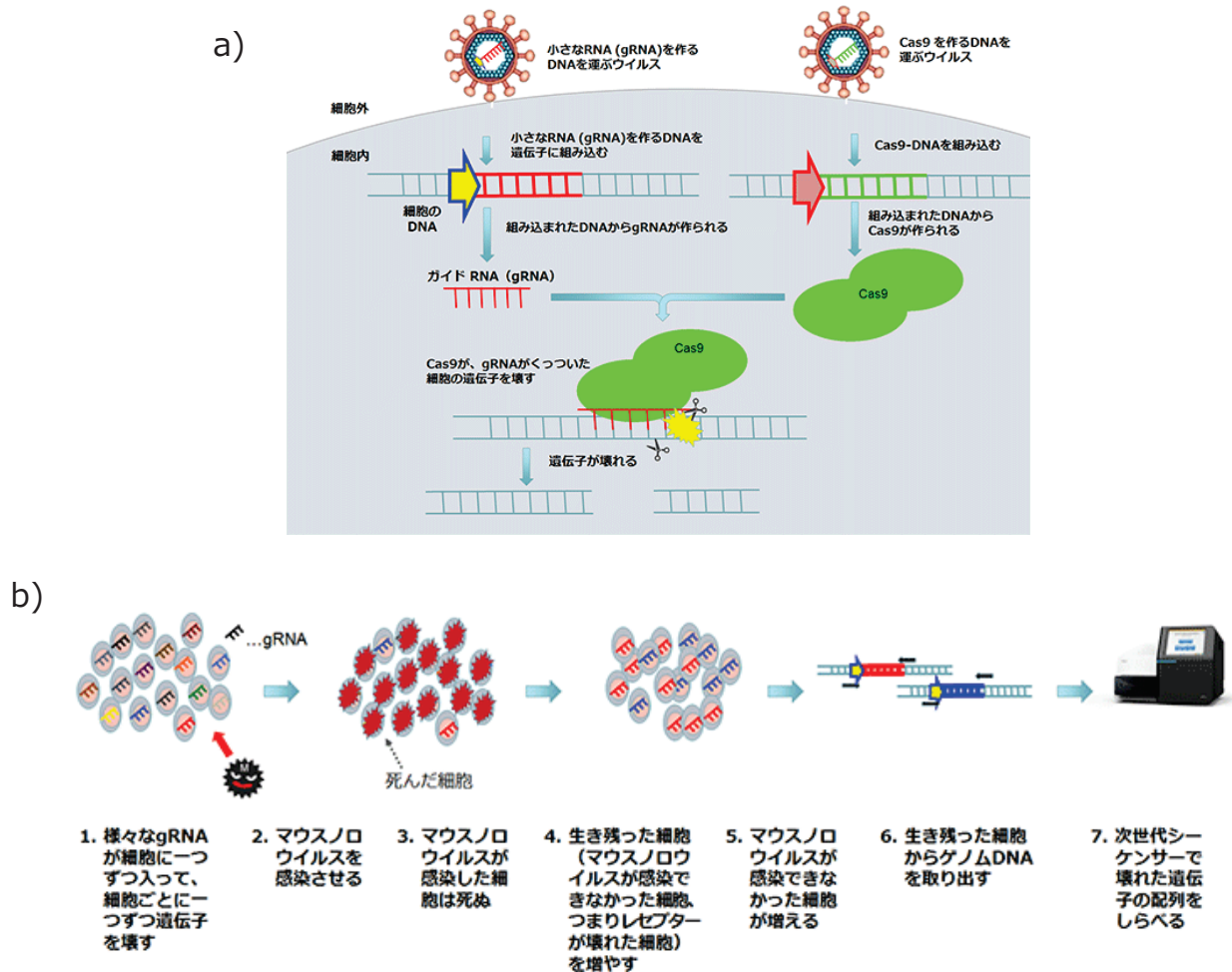


図4 CRISPR/Cas9によるゲノムワイド遺伝子ノックアウトシステム概略

a) Cas9 酵素をコードする遺伝子をレンチウイルスによって細胞の遺伝子に組み込み、Cas9 を恒常的に発現する細胞を作製する。そこに宿主細胞の遺伝子に相同性を持つ gRNA 配列のライブラリーをレンチウイルスによって導入する。

b) MOI=1 で gRNA ライブラリーレンチウイルスを感染させ、一細胞につき一遺伝子をノックアウトする。その後、MNV を感染させ、感染感受性を示す細胞に細胞死を誘導する。生き残った細胞に導入された gRNA の配列を次世代シーケンサーを用いて解析する。

した RAW264.7 細胞を作出し、そこに MNV を感染させて感受性細胞を細胞死に導いた後、生き残った細胞があるなら、それは MNV 増殖に必須な宿主細胞の遺伝子、つまり、レセプターなどを失った細胞であるはずだと仮説を立て、研究を開始した。あらかじめ、Cas9 遺伝子を組換えレンチウイルスを用いて、RAW264.7 細胞に導入して Cas9 を定常的に発現する RAW264.7 細胞を作出した。次に、マウスの全ての遺伝子をターゲットにした gRNA ライブラリーを、組換えレンチウイルスによって Cas9 を定常的に発現している RAW264.7 細胞に導入することで、細胞の遺伝子をランダムにノックアウトした。そこに、MNV-S7 株、もしくは MNV-1 株を 1 以上の Multiplicity of Infection; MOI で感染させ、MNV 感受性を有する RAW264.7 細胞を死滅

させた。生き残った RAW264.7 細胞を増殖培養し、それらに含まれている gRNA の配列を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) で網羅的にシーケンスしたところ、最もリード数の多い遺伝子として Cluster of Differentiation 300lf; CD300lf⁽²⁹⁾ が検出されたのである (図5)。この結果は、この遺伝子産物である CD300lf 蛋白質が、RAW264.7 細胞における MNV 感受性を支配的にコントロールするレセプター分子である可能性が極めて高いことを示唆していた。そこで、次に CD300lf 遺伝子のみを CRISPR/Cas9 でノックアウトした RAW264.7 細胞を作出し、MNV 感染感受性を調べると、CD300lf ノックアウト RAW264.7 細胞は MNV に対する感受性を失っていた。更に、通常の RAW264.7 細胞表面の CD300lf を抗マウス CD300lf 抗体で

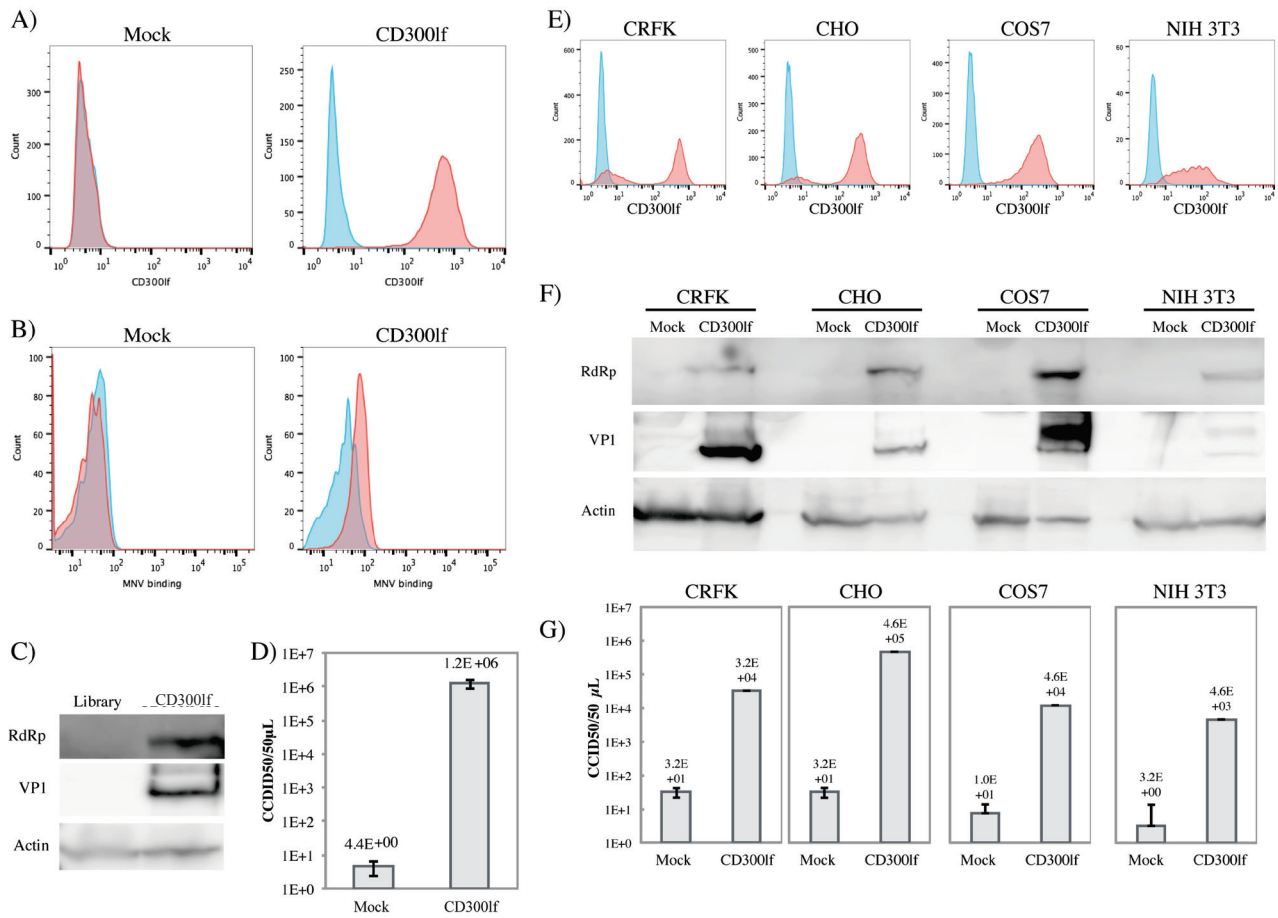


図6 MNVのレセプター検索

- A) レセプター分子 CD300lf-DNA を導入したヒト細胞 (293T) の CD300lf 分子の発現が確認された。
 B) CD300lf に MNV が結合することが確認された。
 C) CD300lf 発現 293T 細胞内に MNV が感染し、MNV タンパク質が合成されていることが確認された。
 D) CD300lf 発現 293T 細胞内に MNV が感染し、培養上清中に感染性のある新生 MNV を放出していることが確認された。
 E) ネコの細胞 (CRFK)、ハムスターの細胞 (CHO) サルの細胞 (COS7) MNV 感受性のないマウスの細胞 (NIH3T3) に CD300lf を導入して発現させた。
 F) それぞれの CD300lf 発現細胞内に MNV が感染し、MNV タンパク質が合成されていることが確認された。
 G) それぞれの CD300lf 発現細胞に MNV が感染し、培養上清中に感染性のある新生 MNV を放出していることが確認された。
 Haga K., et al, PNAS, 113(41) E6248-E6255, 2016.

きことに細胞質ドメインを持たない CD300ld もレセプターとして機能したのである。また、*in vitro* の実験系において、MNV は細胞への感染に際し、シアル酸を必要としないことも示唆された。HuNoV の場合も、MNV と同様に、*in vitro* の系ではレセプター分子があれば、HBGA は必要ないのかもしれない。

米国のグループもほぼ同時に、同様の方法で CD300lf 分子がレセプターであるとの結論にたどり着いていた²⁸⁾。彼らは、シアル酸、又は糖脂質が、MNV が細胞に接着する際に重要な役割を果たすレセプターであると報告していたため、これらの役割について再検討を試みた。HBGA

を分泌できない Fut2 遺伝子欠損マウスに対して、MNV の感染感受性試験を行い、野生型マウスと比較検討を実施したが、両者の感染感受性は同等であった。細胞レベルでは、マンノシダーゼ処理細胞と未処理細胞を比較検討したが、細胞表面に結合する MNV のレベルには有意差がなかった。彼らの予想に反し、MNV の細胞への接着と感染には CD300lf 分子の発現が必要十分条件であり、それ以外の細胞側の糖鎖は関与していないとの結論に達したのである。しかし、一方で彼らは血清中の分子量 50 kDa 以下の非タンパク質性耐熱性分子がコファクターとして機能し、MNV の感染感受性を向上させる働きがあることを示唆し

た。しかし、それ以上このコファクターに関する情報の提供は無い。彼らは、更に CD300lf 遺伝子をノックアウトしたトランスジェニックマウスを用いて MNV 感染に対する感染抵抗性を調べ、CD300lf 分子が MNV 感染に必須である事を明らかにした。また、HeLa 細胞に CD300lf 分子を導入し、非感受性細胞である HeLa 細胞が CD300lf 分子を導入すると感染感受性細胞になることも明らかにした。

<終わりに>

CD300lf, CD300ld 分子のアミノ酸配列は、動物種によって多様性があり、この多様性が NoV の宿主特異性に関係していると考えられた。我々よりも一月早く同様の結果を Science に報告した米国のグループも、同様の考察を示していた。しかし、自然はそう単純では無く、我々の予想を裏切っている可能性が高い。CD300lf, CD300ld のヒトの Homolog を発現させた細胞を作出するのは簡単なことであり、HuNoV の感染感受性を試すことも困難では無い。MNV レセプター発見から早くも一年が経過しようとしているが、HuNoV のレセプターに関する報告は無い。我々は再びスタートラインに立ち、ゼロから HuNoV のレセプター探しをする必要があるのかもしれない。

引用文献

- 1) Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S: Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* **143**:1215-1221, 1998.
- 2) Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ: Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J Virol* **73**:9625-9631, 1999.
- 3) Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, Desario C, Cavalli A, Corrente M, Camero M, Germinario CA, Banyai K, Di Martino B, Marsilio F, Carmichael LE, Buonavoglia C: Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* **14**:1306-1308, 2008.
- 4) Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, Caffero MA, Robetto S, Aste G, Lanave G, Marsilio F, Martella V: A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infect Genet Evol* doi:10.1016/j.meegid.2015.12.019, 2015.
- 5) Takano T, Kusuhara H, Kuroishi A, Takashina M, Doki T, Nishinaka T, Hohdatsu T: Molecular characterization and pathogenicity of a genogroup GVI feline norovirus. *Vet Microbiol* **178**:201-207, 2015.
- 6) Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN: Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* **73**:819-825, 1999.
- 7) Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWT: STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**:1575-1578, 2003.
- 8) Kitajima M, Oka T, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K: Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. *Microbiol Immunol* **53**:531-534, 2009.
- 9) Kitagawa Y, Tohya Y, Ike F, Kajita A, Park SJ, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y: Indirect ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay for detecting the antibody against murine norovirus S7 in mice. *Exp Anim* **59**:47-55, 2010.
- 10) Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, Kelley ST, Virgin HWT: Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J Virol*, 2007.
- 11) Chachu KA, Strong DW, LoBue AD, Wobus CE, Baric RS, Virgin HWT: Antibody is critical for the clearance of murine norovirus infection. *J Virol* **82**:6610-6617, 2008.
- 12) Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, Riley LK, Livingston RS: Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:1145-1151, 2005.
- 13) Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS: Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp Med* **56**:247-251, 2006.
- 14) Ward VK, McCormick CJ, Clarke IN, Salim O, Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWT, Lambden PR: Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:11050-11055, 2007.
- 15) Yunus MA, Chung LM, Chaudhry Y, Bailey D, Goodfellow I: Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J Virol Methods* **169**:112-118, 2010.
- 16) Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK: Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:E4043-4052, 2014.
- 17) Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J: Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* **74**:11950-11954, 2000.
- 18) Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J: Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122**:1967-1977, 2002.
- 19) Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X: Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* **77**:12562-12571, 2003.

- 20) **Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, Svensson L:** A homozygous non-sense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol* **79**:15351-15355, 2005.
- 21) **Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, Estes MK:** Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* **81**:12238-12248, 2007.
- 22) **Herbst-Kralovetz MM, Radtke AL, Lay MK, Hjelm BE, Bolick AN, Sarker SS, Atmar RL, Kingsley DH, Arntzen CJ, Estes MK, Nickerson CA:** Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. *Emerg Infect Dis* **19**:431-438, 2013.
- 23) **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* **8**:e66534, 2013.
- 24) **Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK:** Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* **85**:79-87.
- 25) **Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadwaj U, He H, Neill FH, Sastry KJ, Yao Q, Estes MK.** 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* **406**:1-11, 2004.
- 26) **Taube S, Perry JW, Yetming K, Patel SP, Auble H, Shu L, Nawar HF, Lee CH, Connell TD, Shayman JA, Wobus CE:** Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J Virol* **83**:4092-4101, 2009.
- 27) **Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Doan YH, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, Katayama K:** Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E6248-E6255, 2016.
- 28) **Orchard RC, Wilen CB, Doench JG, Baldrige MT, McCune BT, Lee YC, Lee S, Pruett-Miller SM, Nelson CA, Fremont DH, Virgin HWt:** Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science* **353**:933-936, 2016.
- 29) **Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J:** The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* **37**:827-839, 2012.
- 30) **Borrego F:** The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* **121**:1951-1960, 2013.
- 31) **Comas-Casellas E, Martinez-Barriocanal A, Miro F, Ejarque-Ortiz A, Schwartz S, Jr., Martin M, Sayos J:** Cloning and characterization of CD300d, a novel member of the human CD300 family of immune receptors. *J Biol Chem* **287**:9682-9693, 2012.

Discovery of murine norovirus receptor

Kazuhiko KATAYAMA

Professor

Laboratory of Viral Infection I, Department of Infection Control and Immunology,
Kitasato Institute for Life Sciences & Graduate School of Infection Control Sciences,
Kitasato University.

e-mail : katayama@lisci.kitasato-u.ac.jp

Norovirus is the leading cause of acute gastroenteritis worldwide. Since the discovery of human norovirus (HuNoV), an efficient and reproducible norovirus replication system has not been established in cultured cells. Although limited amounts of virus particles can be produced when the HuNoV genome is directly transfected into cells, the HuNoV cycle of infection has not been successfully reproduced in any currently available cell-culture system. Those results imply that the identification of a functional cell-surface receptor for norovirus might be the key to establishing a norovirus culture system. Using a genome-wide CRISPR/Cas9 guide RNA library, we identified murine CD300lf and CD300ld as functional receptors for murine norovirus (MNV). The treatment of susceptible cells with polyclonal antibody against CD300lf significantly reduced the production of viral progeny. Additionally, ectopic CD300lf expression in nonsusceptible cell lines derived from other animal species enabled MNV infection and progeny production, suggesting that CD300lf has potential for dictating MNV host tropism. Furthermore, CD300ld, which has an amino acid sequence in the N-terminal region of its extracellular domain that is highly homologous to that of CD300lf, also functions as a receptor for MNV. Our results indicate that direct interaction of MNV with two cell-surface molecules, CD300lf and CD300ld, dictates permissive noroviral infection.