

1. ウイルス ノロウイルス総説 2020

片山 和彦

北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学・感染制御科学府ワクチン学研究室

ノロウイルスは、一般に感染性胃腸炎、大規模な食中毒を引き起こすウイルスとして知られており、感染メカニズムの解明やワクチンや治療薬の開発が急務となっている。ノロウイルスには、ヒトの疾患に関係するヒトノロウイルスの他にも、動物の疾患に関係するノロウイルスも存在する。中でも、ネズミの疾患に関係するネズミノロウイルスは、株化培養細胞での増殖培養が可能であるため、長年培養細胞で増殖させることのできなかったヒトノロウイルスの代替えウイルスとして使用され、基礎ウイルス学的研究に寄与してきた。構造生物学的研究の進展により、ノロウイルスは、細胞への感染の際、ダイナミックな形状変化によって感染性を向上させるなど、柔軟性に富む粒子構造を有することが明らかにされた。ヒト腸管オルガノイドの技術発展により、ヒトノロウイルスの腸管での病原性発現機構、感染増殖機構の研究、レセプター分子の探索が進められている。ヒト腸管オルガノイドの利用により、ワクチンや抗ウイルス薬の開発も加速し、実用化を目指した治験が進められている。本稿では、ノロウイルス発見の歴史から最新の研究成果、ワクチン開発についてまとめた。

【ノロウイルス発見の歴史】

1972年にNIHのアルバート・カピキアン博士らは、1968年10月にオハイオ州ノーウォークの小学校で発生した胃腸炎の集団発生の罹患者から採取した直腸スワブ由来の便材料を、細菌を含まない濾液として成人のボランティアに投与し、他のボランティアに連続継代したところ、ボランティアの何人かに急性胃腸炎の発症が認められた。これらのボランティアから得られた便検体を、既感染者の回復期血清を用いた免疫電子顕微鏡観察 (IEM: immune electron microscopy) により観察し、ウイルス様粒子を可視化し、ノーウォークエージェントと名付けた¹⁾。これが、ノーウォークウイルスの名前の由来である。その後、ハワイウイルス (HV; 1971年にホノルルで発生した胃腸炎の家族内集団発

生由来)およびスノーマウンテンウイルス (SMV; 1976年のコロラドリゾートキャンプでの集団発生由来)がそれぞれ1977年および1982年に発見され、IEMによりノーウォークウイルス (NV: Norwalk virus) と抗原的に異なることが示された^{2,3)}。

1980年代後半、オハイオ州ノーウォークに由来する便濾液をボランティア研究で成人に飲ませることで、十分な量のウイルス粒子を得て、JiangらによるNVゲノム分子クローニングと全塩基配列決定が行われた⁴⁾。その後、NVと抗原性の異なる一群のウイルス (HVやSMV)を代表して、Lordsdale virus (LV)の全塩基配列が決定された⁵⁾。NVおよびLVは、互いに抗原性が異なるが、そのゲノムは、ポリアデニル化された3'末端を有する3つのオープンリーディングフレーム (ORF: open reading frame) を有するプラス一本鎖RNAであった^{6,7,5)}。ORF1は、そこにコードされているプロテアーゼ依存的に翻訳切断を受け、成熟した6種類の非構造蛋白となる大きなポリペプチド鎖をコードしていた^{8,9)}。ORF2は主要カプシド蛋白質であるVP1をコードし、ORF3は副構造タンパク質であるVP2をコードしていた。その後、我々の研究グループの18株に及ぶウイルスのゲノム全長演繹配列解析の結果、構造の類似性と、塩基配列の類似性から、遺伝子グループI (GI: genogroup I, 遺伝子グループII (GII: genogroup II) の2つの主要な系統に分離され、NVはGIに属し、HV, SMV,

連絡先

〒108-8641

東京都港区白金5-9-1

北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学・感染制御科学府ワクチン学研究室

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

TEL: 03-3444-6161 (代表) 内線 6468 (教授室)

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

LVはGIIに属していることが明らかになった¹⁰⁾。さらに、GI, GIIには、それぞれ遺伝子型が複数存在していることも示された(遺伝子型分類に関しては後述する)。2002年にフランスで行われた国際ウイルス分類委員会(ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses)の会議において、*Norwalk viruses*を種名に、その音を残した*Norovirus*を属名と決定した^{11,12,13)}。本来、*Norwalk virus*と呼称されるべきだが、今のところ、*Norovirus*には*Norwalk viruses*のみが唯一の種として存在するため“*Norwalk virus*”と呼称しても、“*Norovirus*”と呼称しても同義である。そのため、なじみ深い“*Norovirus*”と呼称されることが多い(本稿では、ウイルス名を*Norovirus*(NoV)と記載する。イタリックで記載する場合、属名、種名を表す。)

【*Norovirus* の分類】

*Caliciviridae*に属するウイルス属は、現在11属 *Bavovirus*, *Lagovirus*, *Minovirus*, *Nacovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Recovirus*, *Salovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus*, *Vesivirus*-であり、ヒトの疾患に関与するウイルスは、*Norovirus*と*Sapovirus*に含まれる。NoVは、ICTVのウイルスデータベース(ICTVdB)の、*Calicivirus*の項目に、*Caliciviridae*>*Norovirus*>*Norwalk viruses*のウイルスとして定義されている¹⁴⁾。*Norovirus*と*Sapovirus*の種レベル以下の分類として、研究者らによる暫定的な遺伝子タイピングシステム(遺伝子クラスターまたは遺伝子型に細分された遺伝子群からなる)を用いた疫学研究が行われている。ICTVは種名までの管理を行うが、ウイルス種以下のクラス分類、例えば、血清型や遺伝子型は、研究者の判断に任せている。*Caliciviridae*に属するウイルスは、現在も様々な動物種から発見され続けており、新しい属名の決まっていないウイルスもすでに多数報告されている¹⁴⁾。

以下、NoVの遺伝子グループと遺伝子型について概説する。

NoV研究者らは、*Norovirus*(属)、*Norwalk viruses*(種)に属するNoVは、ウイルスキャプシド蛋白質であるVP1のアミノ酸配列を用いた分子系統解析に基づいて、少なくとも10のノロウイルス遺伝子グループ(Gに続いてローマ数字、例えばGI, GIIなど)に分類した¹⁵⁾。GIは、そのクラスター内部を更に9つの遺伝子型に細分できる。同様に、GIIは27の遺伝子型に^{15,16)}、GIIIは3つの遺伝子型に、GIVは2つの遺伝子型に、GVIは2つに細分できる。GV, GVI, GVII, GVIII, GIX, GXはそれぞれ1つの遺伝子型を有するのみであるが、今後研究の進展によって新しい遺伝子型が発見される可能性が高い。ヒトの疾患に関与するNoV(HuNoV)は、GI, GII, GIV, GVIII及びGIXに属する¹⁵⁾。

NoVのORF1とORF2の接合部の間で最も頻繁に起こる遺伝子リコンビネーションは、NoVゲノム内の点突然

変異とともに、宿主からの免疫応答からのエスケープ現象とNoVの進化をもたらす力として知られている^{10,17-20)}。ノロウイルスの遺伝子型は、前述のようにVP1のアミノ酸配列によってグループが決定され、更に遺伝子型に細分化されていた。しかし、遺伝子リコンビネーションの頻度を考慮し、ORF1の最下流にコードされるRdRp(RNA dependent RNA polymerase)の配列によってポリメラーゼ遺伝子型を決定してGII.P1_GII.1または、GII.1[P1]の様に表記することが提唱されている¹⁵⁾。現在までに報告されている遺伝子グループと遺伝子型を模式的にまとめた(図1)。

以上の様に、NoVの遺伝子グループ、遺伝子型分類はまだ流動的な部分が残っていることに加え、*Norwalk viruses*の遺伝子グループをウイルス種に格上げすること、ウイルス種の名前も変更することが検討されており、2021年からスタートするICTVの新しい*Calicivirus* study group(筆者がグループ長を務める)で検討が継続される。

ウイルス粒子構造

NoVの感染性粒子に関する構造解析は、株化培養細胞で効率良く増殖させることのできるネズミノロウイルス(MNV: Murine Norovirus)を用いて調べることができる。一方、HuNoVは、効率良く増殖させることのできる株化培養細胞が存在せず、感染性粒子を構造解析に用いるレベルで得ることは難しい。しかし、HuNoVの場合、ORF2をバキュロウイルスに組み込み、昆虫細胞発現系で大量にVP1を発現することにより、ウイルス様中空粒子(VLPs: Virus like particles)を作出することが可能である。したがってVLPsを用いた粒子の構造解析が進んでいる。

一般に、NoVの感染性粒子はT=3の正二十面体である。ORF2にコードされるVP1タンパク質のダイマーが90個集合して、ウイルス粒子の外殻が形成される²¹⁻²⁵⁾。VP1のダイマーはA/BダイマーおよびC/Cダイマーを形成し、60個のA/Bダイマーが二十面体の5回回転軸に位置し、30個のC/Cダイマーが2回回転軸に位置する。VP1は、シェル領域(S: Shell domain)と突出(P: Protruding domain)領域と呼ばれる2つの主要ドメインから成り、フレキシビリティが高いヒンジ領域でつながっている²²⁾(図2B, C)。VP1のN末端アミノ酸は、キャプシドの内部に存在し、VP1ダイマー同士をつなぐN末端アーム(NTA: N-terminal arm)を形成している(図2C)。SドメインはVP1の最も高度に保存された領域であり、滑らかな球状の内殻を形成している。A/BおよびC/CダイマーのSドメインは、正二十面体のT=3の形に適合するために、それぞれ特有の対合状態をとる²⁵⁾。Pドメインはアーチ状の突起を形成する。このドメインはさらにP1とP2サブドメインに細分される。P2ドメインは、主要な抗原部位として宿主免疫系に暴露されるため、高速にアミノ酸が変化する

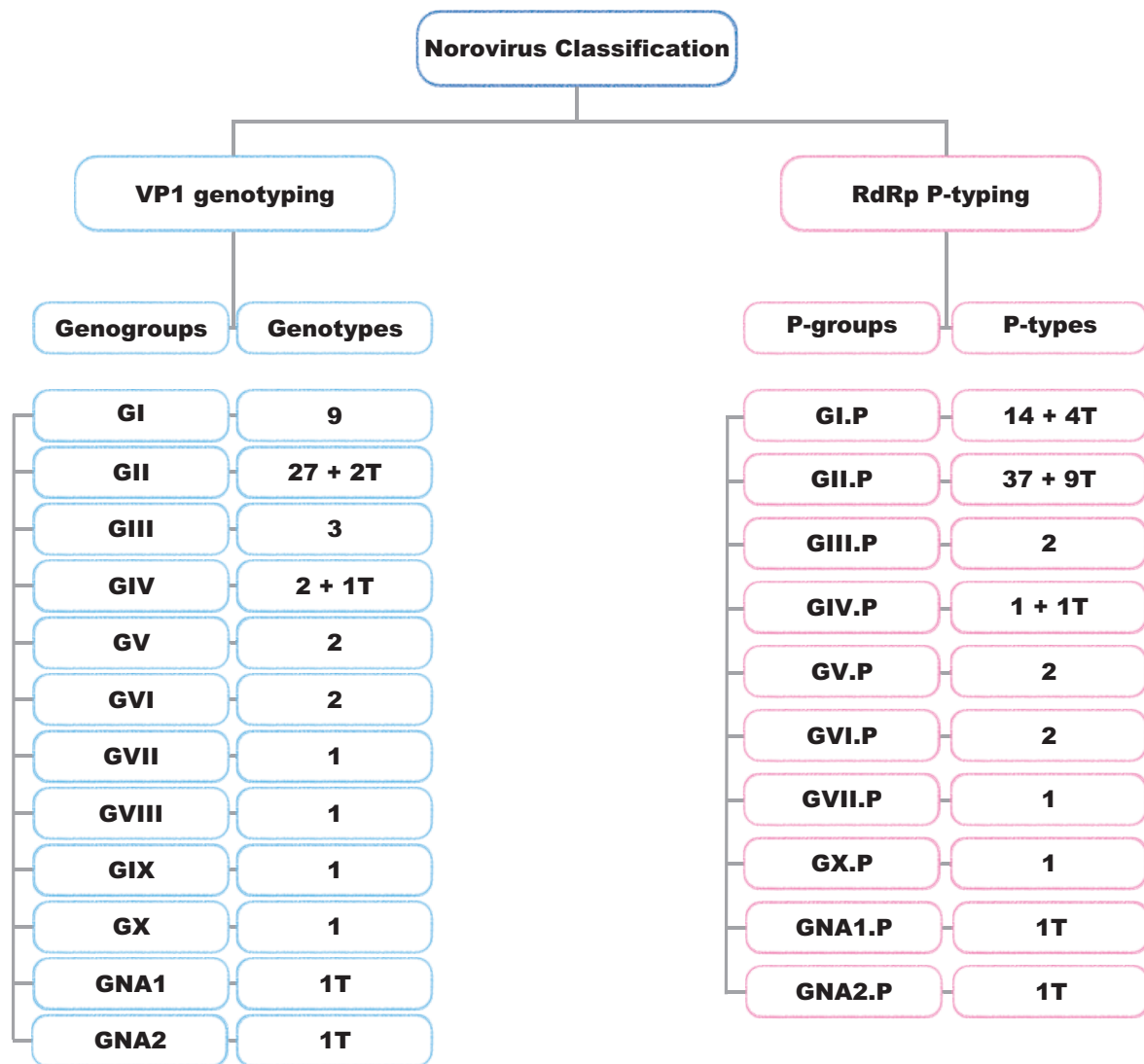


図1 ノロウイルスの遺伝子グループ、遺伝子型の分類模式図

可変領域でもある²⁶⁾。しかし、組織血液型抗原 (HBGA: Histo-blood group antigen) の結合ポケットを有しており^{27, 28)}、このポケット構造は比較的安定している^{22, 26, 29-33)}。MNVでは、SドメインとPドメインをつなぐヒンジ部分の屈伸とひねり効果により、立ち上がった構造と座った構造を取ることによって、その感染性をコントロールしていることが報告されている (図 2D, E)³⁴⁾。

NoVの感染性粒子の内部構造解析は、余り進んでいない。HuNoVのVLPを用いた内部構造の解析において、粒子内部表面のSドメインと結合するORF3にコードされるマイナーなカプシド蛋白質VP2が1~2分子程度存在することが示唆されている³⁵⁾。近年、ウイルスが細胞に侵入する際、および粒子のアセンブルの際のVP2の役割の解析が進められている^{36, 35)}。VP1とVP2はNTAとSドメインの接合部に位置するVP1残基の高度に保存されたパッチ (IDPWIモチーフ) を介して相互作用する。特に、

このモチーフの最初のイソロイシン残基 (NVのIle-52) は、VP1ダイマーの2つのIle-52残基がSダイマーの内面にまたがる負電荷を帯びたベルトの中心に位置するように存在する。この残基に変異を導入すると、粒子へのVP2の取り込みが行われなくなる。これらの結果をまとめ、VP2とVP1の相互作用するドメインはVP2のアミノ酸108から152に存在することが示された³⁷⁾。驚くべきことに、コンピュータ解析により、VP2のこの領域はGII.4ヒトノロウイルス株において超可変性であることが明らかになった。VP1およびVP2はウイルスが進化する際に互いに連動してアミノ酸変異を誘発することが示唆された。つまり、VP1に免疫学的プレッシャーによってアミノ酸変異が生じると、VP2にも粒子の高次構造維持のために必要なアダプティブミューテーションが入ると考えられている³⁸⁾。VP1蛋白質は自己集合して効率良くVLPを形成する能力を有し、RNAまたはVP2を必要としない^{39, 40)}。しかし、VP2

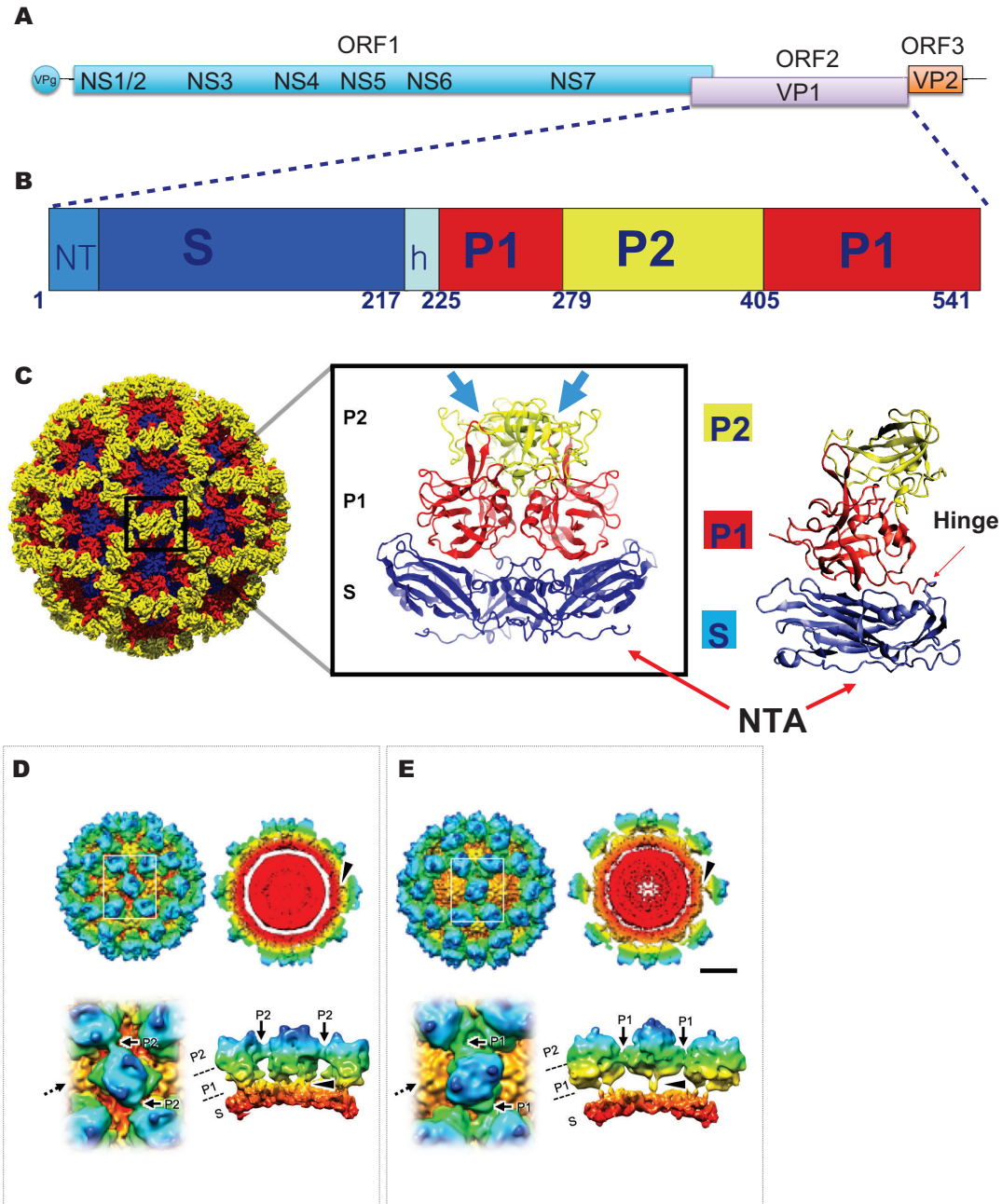


図2 A: ノロウイルスの遺伝子構造. B: VP1 ポリプロテインの拡大図. 下部にアミノ酸残基位置を示した. NT(NTA)は, VP1 ポリプロテインのN末端部分を示した. Sはシェルドメイン, Pはプロトウレディングドメイン, hはヒンジドメインを示した. 色分けはパネルCに対応させた. C: 左から, VP1 ダイマー 90分子からなるVLP, 四角内は, VP1 ダイマー, 右端はVP1 モノマー. 水色の矢印は, HBGA 結合ポケットを示した. D: ヒンジ部分のひねり効果により座った構造. Pドメインは, P2 部分で連結して座った構造を安定化している. E: 立ち上がった構造. P1 部分で連結して立ち上がりを維持している.

の共発現はVLPの安定性とプロテアーゼに対する耐性を増加させることも知られておりVP2が粒子内面からVP1の構造維持に何らかの影響を与え, ウイルス粒子の構造安定性に関与している可能性がある^{41,42}.

ゲノムの構造と構成

NoVは, 約7500~7700塩基(nt)のプラス一本鎖RNAをゲノムとして持つ(図2A). ゲノムは, 低分子タ

ンパク質VPgと共有結合した5'エンドpGpU配列から始まると考えられている. 5'末端の短い(約18nt)保存領域は, サブゲノムRNAの5'末端部分にも存在し, ゲノム, サブゲノムのトランスクリプションへの関与が示唆されている⁴³. ゲノムRNAには, 3つのORFが存在し, ORF1には, 非構造蛋白が5'末端付近からコードされている. ORF2は, 構造タンパク質(VP1)を, ORF3はVP2をコードしている. MNVは, このほかにORF4を有しており, 宿主免疫応答

ヒトの腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルス培養系

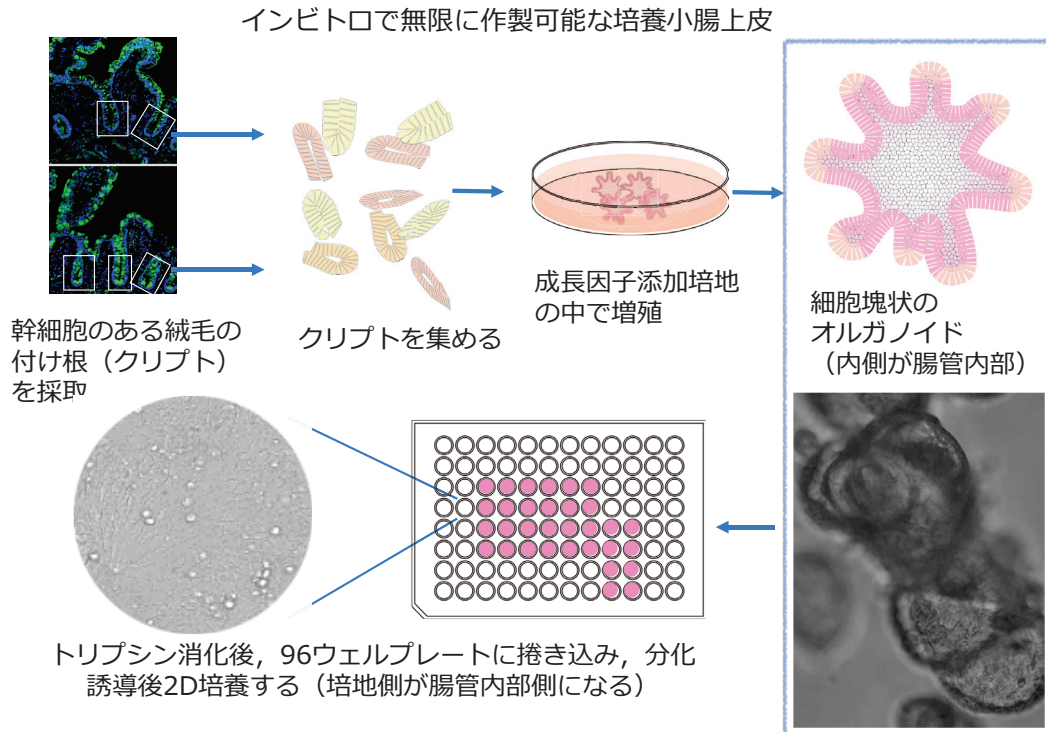


図3 ヒト腸管オルガノイド培養の模式ヒト十二指腸、空腸から絨毛の付け根部分（クリプト）を採取、成長因子を添加した培地中でオルガノイドを細胞塊状に増殖させる。細胞塊は程よい大きさになったら、マイクロピペットで碎き、継代培養する。継代培養で無限に増殖が可能。細胞塊状のオルガノイドをトリプシンで消化し、96ウェルプレートで2Dオルガノイドとして分化誘導しつつ培養、十分に分化後にHuNoVの感染増殖に用いる。

の調節に関与している23.8キロダルトン（kDa: kilodalton）のVF1タンパク質をコードしている⁴⁴⁾。HuNoV、MNVのRNAベース、もしくはプラスミドベースのリバースジェネティクスシステム⁴⁵⁻⁵¹⁾、RNAのレプリコンシステムが確立されており⁵²⁾、分子生物学的なウイルスの性状解析に活用されている。NoVは、宿主細胞に感染し細胞内で複製増殖する際に、ゲノムRNAからサブゲノムRNA（ORF2、ORF3を有する）が大量に転写され、構造タンパク質は主にサブゲノムRNAから翻訳、供給される。ORF2とORF3の間には、ORF2を翻訳したリボゾームを再び呼び込み、ORF3を翻訳させるためのユニークなRNAの高次構造と配列（リボゾームのリエンリーステム）の存在が報告されている^{53,54-56)}。

NoVの構造タンパク質

NoVの感染性粒子にはVP1、VP2、VPgの3種類の蛋白質が認められる⁵⁷⁾。VP1（約60kDa）は、一粒子あたり180コピー（90量体）存在することがVLPの構造解析の結果から明らかにされている（図2C）²²⁾。VP2、VPgの一感染性粒子あたり分子数は、未だ明らかにされていない。ネコカリシウイルス（FCV: Feline Calicivirus）感染性粒子の最近の構

造研究から、VP2の新しい機能が明らかにされた^{36, 58, 59)}。VP2は、FCVがレセプターに結合してエンドソームに取り込まれた際、エンドソーム膜を突き破って粒子内部からゲノムRNAを細胞質に放出するために、感染性粒子の変形を導くことが示されたのである。VP2は、粒子外に弾けるように飛び出し、ポータル状の構造物を形成し、それを通じてRNAの放出を行うことが報告された³⁶⁾。一方、VPgは、感染細胞中のゲノムRNAおよびサブゲノムRNAと共有結合しており、粒子当たり1~2コピーと推定されるウイルス粒子中の微量成分である^{60, 61)}。VPgは、感染性粒子に存在するのだが、構造タンパク質としての機能は不明である。

NoVの非構造蛋白

NoVは、ORF1にコードされている約189kDaの大きなポリプロテインがコードされている。このポリプロテインには、N末端側からN-terminal protein (NS1/2)、NTPase (NS3)、p22 (3A-like protein) (NS4)、VPg (NS5)、protease (NS6)、RNA dependent RNA polymerase (RdRp) (NS7) がコードされており（図2A）、ポリプロテイン翻訳後にproteaseによるシスでの切断、トランスでの切断を受け、

6種類の成熟した非構造タンパク質となる^{8, 45, 62, 63}。複製に関わるNS3 (NTPase), NS6 (プロテイナーゼ)^{64-66, 67-72}, NS7 (ポリメラーゼ)^{73, 74, 75}の活性については研究が進んでおり, *in vitro* 活性測定システムが確立されている。また, アトミックレベルで解明された三次元構造から, これらのタンパク質を標的とする阻害剤の研究が進んでいる。ゲノムRNAの感染能に必要なNS5(VPg)は多機能であり, 翻訳とRNA複製の両方に役割を果たしている⁷⁶⁻⁷⁹。残りのタンパク質(NS1, NS2, NS4)は, 細胞内膜と相互作用することが示唆されており^{57, 64}, 細胞内でのウイルス複製複合体形成, タンパク質の輸送システムのコントロールに関与する可能性が高く⁸⁰, 抗ウイルス薬開発の重要なターゲットになり得る。

NoVの複製増殖機構

NoVは, 宿主細胞表面糖鎖と相互作用し, 感染を促進する付着因子として利用している。細胞表面糖鎖は, 宿主域や組織親和性の決定に重要な役割を果たしており, その糖鎖結合プロファイルには多様性がある。HuNoVやウシノロウイルスは, 様々なHBGA糖鎖部分, ヘパラン硫酸プロテオグリカン, およびシアリル化グリカンに結合する⁸¹⁻⁸⁵。MNVは糖脂質上のシアル酸とNまたはO結合型糖タンパク質を認識する^{86, 87}。NoVは, 宿主細胞表面糖鎖との相互作用に続いて, タンパク質性受容体と相互作用する。MNVのタンパク質性受容体CD300lfとCD300ldは, BV2(マウスミクログリア細胞)またはRAW 264.7細胞(マウスマクロファージ)を用いたCRISPR/Cas9スクリーニングを通して, 二つの研究グループ(我々と北米のグループ)によって独立して同定された^{88, 89}。HuNoVを効率良く増殖培養させることができる株化培養細胞は樹立されていない。しかし, 近年, 2つのHuNoV培養増殖システムが報告された。1つは, HuNoV GIIの幾つかの遺伝子型が, 培養下で樹立されたヒトB細胞株に感染するというシステムである⁹⁰。感染は, 化学合成されたHBGA, または共生細菌によって発現されるHBGA様糖鎖⁹¹に依存して起きる。このシステムは, 不思議なことに樹立者とその関係者のラボでは稼働するが, 技術移転された複数のラボでの再現性はとれていない。もう1つは, ヒト腸管の幹細胞から樹立されたヒト腸オルガノイドでの複製である(図3)⁹²。幹細胞から繊毛の先端に移動する際に分化誘導によって生じる成熟腸細胞は, HuNoV感染感受性を示し, 効率良く増殖培養可能であることが示された。さらに, ウイルス遺伝子型依存的に胆汁, もしくは胆汁酸がウイルスの感染増強またはウイルス複製に必要なことが明らかにされた。例えば, HuNoV GII.4は胆汁がなくとも感染増殖が可能だが, 胆汁共存下では10倍ほど増殖効率が上昇する。GII.3の場合, 胆汁がないと全く増殖が認められないが, 胆汁を加えるとGII.4に匹敵する増殖効率を見せる。GII.3増殖に関

与する胆汁成分を特定するため, まずは胆汁主要成分である胆汁酸の評価が行われた⁹³。13種類の胆汁酸(一次非抱合胆汁酸: 2種類, 抱合胆汁酸: 8種類, 二次非抱合胆汁酸: 3種類)をGII.3感染中に培地へ添加したところ, 主に抱合胆汁酸がGII.3増殖を促進すること, さらに胆汁酸疎水度とGII.3複製量が相関することが明らかになった。胆汁酸がエンドサイトーシスを促進し, エンドソームの酸性化を誘導する。さらに, 腸内腔側細胞膜のセラミドレベルを増加させるなど, HuNoVは, 細胞活動の変化を侵入の際に巧みに利用していることが示された。ヒト腸管オルガノイドシステムは, ノロウイルス研究に広く利用されており, 抗ウイルス薬の評価や消毒薬の評価, 後述するワクチン効果の評価への活用が始まっている⁹⁴⁻⁹⁸。

ワクチン

NoVによる胃腸炎を防ぐためのワクチンはまだ上市されていない。現在, 多種類のワクチン候補が開発途上にある⁹⁵。最も代表的なワクチン剤型は, VLPを抗原とするワクチンである。NoVの代表的な遺伝子グループであるGIからGI.1を, GIIからGII.4を選択し, これらをブレンドしたワクチンが開発されている⁹⁹⁻¹⁰²。このワクチンは, 組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させてVLPを発現させ, それを抗原として用いる。一方, VLPを植物で発現させて^{103, 104}抗原として用いるタイプのワクチンも開発されている¹⁰⁵。これらのタイプのワクチンの内, 幾つかは, 第I/II相試験が進行している。NoV-VLPを抗原とするワクチンは安全であり, 試験した用量, 経路, アジュバントの条件で, 疾患に対してある程度の防御効果が得られることが示されている^{101, 102}。最初の試験では, NV (GI.1) rVLPを鼻腔内経路で投与した後, 感染性NVの経口負荷を行った⁹⁹。2番目の試験では, NV (GI.1)とGII.4コンセンサス rVLPを筋肉内注射した後, 感染性GII.4ノロウイルスで攻撃し, 2価製剤を評価した^{101, 102}。いずれの試験でも感染防御免疫のエビデンスが示されたが, これらのワクチンの有効性を確立するには, より大規模なプラセボ対照第III相試験が必要である。全く発想が異なる別のタイプのワクチンとして, NoVのVP1のcDNAをアデノウイルスに組み込み, 組換えアデノウイルスとし, それを錠剤で経口投与するタイプのワクチン開発も進んでいる¹⁰⁶⁻¹⁰⁸。すでに米国内では, 安全性試験を終え, 第I相試験のスタートが始まっている。さらに, NoVのVP1とロタウイルスのVP6をバキュロウイルスで発現させ, 抗原とするNoV-ロタウイルス混合ワクチンの開発も始まっている¹⁰⁹⁻¹¹⁴。今後, 新しい世代のワクチン開発が進められ, 発症阻止に有効なワクチンの誕生が望まれる。

引用文献

- 1) Kapikian A. Z., Wyatt R. G., Dolin R., Thornhill T. S., Kalica A. R. and Chanock R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075-81.
- 2) Dolin R., Reichman R. C., Roessner K. D., Tralka T. S., Schooley R. T., Gary W. and Morens D. 1982. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 146:184-9.
- 3) Thornhill T. S., Wyatt R. G., Kalica A. R., Dolin R., Chanock R. M. and Kapikian A. Z. 1977. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 135:20-7.
- 4) Jiang X., Graham D. Y., Wang K. N. and Estes M. K. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250:1580-3.
- 5) Lambden P. R., Caul E. O., Ashley C. R. and Clarke I. N. 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259:516-9.
- 6) Hardy M. E. and Estes M. K. 1996. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* 12:287-90.
- 7) Jiang X., Wang M., Graham D. Y. and Estes M. K. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66:6527-32.
- 8) Liu B., Clarke I. N. and Lambden P. R. 1996. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70:2605-10.
- 9) Liu B. L., Lambden P. R., Gunther H., Otto P., Elschner M. and Clarke I. N. 1999. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73:819-25.
- 10) Katayama K., Shirato-Horikoshi H., Kojima S., Kageyama T., Oka T., Hoshino F., Fukushi S., Shinohara M., Uchida K., Suzuki Y., Gojbori T. and Takeda N. 2002. Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. *Virology* 299:225.
- 11) Lambden P. R., Caul E. O., Ashley C. R. and Clarke I. N. 1994. Human enteric caliciviruses are genetically distinct from small round structured viruses [letter]. *Lancet* 343:666-7.
- 12) Liu B. L., Clarke I. N., Caul E. O. and Lambden P. R. 1995. Human Enteric Caliciviruses Have a Unique Genome Structure and Are Distinct from the Norwalk-Like Viruses. *Archives of Virology* 140:1345-1356.
- 13) Matson D. O., Zhong W. M., Nakata S., Numata K., Jiang X., Pickering L. K., Chiba S. and Estes M. K. 1995. Molecular Characterization of a Human Calicivirus with Sequence Relationships Closer to Animal Caliciviruses Than Other Known Human Caliciviruses. *Journal of Medical Virology* 45:215-222.
- 14) Vinje J., Estes M. K., Esteves P., Green K. Y., Katayama K., Knowles N. J., L'Homme Y., Martella V., Vennema H., White P. A. and ICTV Report C. 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J Gen Virol* 100:1469-1470.
- 15) Chhabra P., de Graaf M., Parra G. I., Chan M. C., Green K., Martella V., Wang Q., White P. A., Katayama K., Vennema H., Koopmans M. P. G. and Vinje J. 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* 100:1393-1406.
- 16) Kroneman A., Vega E., Vennema H., Vinje J., White P. A., Hansman G., Green K., Martella V., Katayama K. and Koopmans M. 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158:2059-68.
- 17) Bull R. A., Hansman G. S., Clancy L. E., Tanaka M. M., Rawlinson W. D. and White P. A. 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 11:1079-85.
- 18) Motomura K., Yokoyama M., Ode H., Nakamura H., Mori H., Kanda T., Oka T., Katayama K., Noda M., Tanaka T., Takeda N. and Sato H. 2010. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol* 84:8085-97.
- 19) Phumpholsup T., Chieochansin T., Vongpunsawad S., Vuthitanachot V., Payungporn S. and Poovorawan Y. 2015. Human norovirus genogroup II recombinants in Thailand, 2009-2014. *Arch Virol* 160:2603-9.
- 20) Simmonds P. 2006. Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other Mammalian positive-stranded RNA viruses. *J Virol* 80:11124-40.
- 21) Prasad B. V., Matson D. O. and Smith A. W. 1994. Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* 240:256-64.
- 22) Prasad B. V., Hardy M. E., Dokland T., Bella J., Rossmann M. G. and Estes M. K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:287-90.
- 23) Chen R., Neill J. D., Noel J. S., Hutson A. M., Glass R. I., Estes M. K. and Prasad B. V. 2004. Inter- and intra-genus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 78:6469-79.
- 24) Katpally U., Voss N. R., Cavazza T., Taube S., Rubin J. R., Young V. L., Stuckey J., Ward V. K., Virgin H. W. t., Wobus C. E. and Smith T. J. 2010. High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *J Virol* 84:5836-41.
- 25) Yu G., Zhang D., Guo F., Tan M., Jiang X. and Jiang W. 2013. Cryo-EM structure of a novel calicivirus, Tulane virus. *PLoS One* 8:e59817.
- 26) Tan M., Huang P., Meller J., Zhong W., Farkas T. and Jiang X. 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 77:12562-71.
- 27) Huang P., Farkas T., Marionneau S., Zhong W., Ruvoen-Clouet N., Morrow A. L., Altaye M., Pickering

- L. K., Newburg D. S., LePendu J. and Jiang X. 2003. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* 188:19-31.
- 28) Tan M., Hegde R. S. and Jiang X. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 78:6233-42.
- 29) Cao S., Lou Z., Tan M., Chen Y., Liu Y., Zhang Z., Zhang X. C., Jiang X., Li X. and Rao Z. 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81:5949-57.
- 30) Kilic T., Koromyslova A., Malak V. and Hansman G. S. 2018. Atomic Structure of the Murine Norovirus Protruding Domain and Soluble CD300lf Receptor Complex. *J Virol* 92.
- 31) Choi J. M., Hutson A. M., Estes M. K. and Prasad B. V. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9175-80.
- 32) Hansman G. S., Shahzad-Ul-Hussan S., McLellan J. S., Chuang G. Y., Georgiev I., Shimoike T., Katayama K., Bewley C. A. and Kwong P. D. 2012. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J Virol* 86:284-92.
- 33) Shanker S., Czako R., Sapparapu G., Alvarado G., Viskovska M., Sankaran B., Atmar R. L., Crowe J. E., Jr., Estes M. K. and Prasad B. V. 2016. Structural basis for norovirus neutralization by an HBGA blocking human IgA antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E5830-E5837.
- 34) Song C., Takai-Todaka R., Miki M., Haga K., Fujimoto A., Ishiyama R., Oikawa K., Yokoyama M., Miyazaki N., Iwasaki K., Murakami K., Katayama K. and Murata K. 2020. Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS Pathog* 16:e1008619.
- 35) Vongpunsawad S., Venkataram Prasad B. V. and Estes M. K. 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol* 87:4818-25.
- 36) Conley M. J., McElwee M., Azmi L., Gabrielsen M., Byron O., Goodfellow I. G. and Bhella D. 2019. Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature* 565:377-381.
- 37) Glass P. J., Zeng C. Q. and Estes M. K. 2003. Two Non-overlapping 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* 77:3569-77.
- 38) Chan M. C., Lee N., Ho W. S., Law C. O., Lau T. C., Tsui S. K. and Sung J. J. 2012. Covariation of major and minor viral capsid proteins in norovirus genotype II genotype 4 strains. *J Virol* 86:1227-32.
- 39) Hjelm B. E., Kilbourne J. and Herbst-Kralovetz M. M. 2014. TLR7 and 9 agonists are highly effective mucosal adjuvants for norovirus virus-like particle vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 10:410-6.
- 40) Leite J. P., Ando T., Noel J. S., Jiang B., Humphrey C. D., Lew J. F., Green K. Y., Glass R. I. and Monroe S. S. 1996. Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* 141:865-75.
- 41) Lin Y., Fengling L., Lianzhu W., Yuxiu Z. and Yanhua J. 2014. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genotype II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J Microbiol* 52:970-5.
- 42) Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S. E., Hutson A. M. and Estes M. K. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603-15.
- 43) Lambden P. R., Liu B. L. and Clarke I. N. 1995. A Conserved Sequence Motif at the 5'-Terminus of the Southampton Virus Genome Is Characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* 10:149-152.
- 44) McFadden N., Bailey D., Carrara G., Benson A., Chaudhry Y., Shortland A., Heeney J., Yarovinsky F., Simmonds P., Macdonald A. and Goodfellow I. 2011. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog* 7:e1002413.
- 45) Katayama K., Murakami K., Sharp T. M., Guix S., Oka T., Takai-Todaka R., Nakanishi A., Crawford S. E., Atmar R. L. and Estes M. K. 2014. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4043-52.
- 46) Arias A., Urena L., Thorne L., Yunus M. A. and Goodfellow I. 2012. Reverse genetics mediated recovery of infectious murine norovirus. *J Vis Exp*, 10.3791/4145.
- 47) Chaudhry Y., Skinner M. A. and Goodfellow I. G. 2007. Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* 88:2091-100.
- 48) Sandoval-Jaime C., Green K. Y. and Sosnovtsev S. V. 2015. Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J Virol Methods* 217:1-7.
- 49) Ward V. K., McCormick C. J., Clarke I. N., Salim O., Wobus C. E., Thackray L. B., Virgin H. W. t. and Lambden P. R. 2007. Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11050-5.
- 50) Yunus M. A., Chung L. M., Chaudhry Y., Bailey D. and Goodfellow I. 2010. Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J Virol Methods* 169:112-8.
- 51) Oliveira L. M., Blawid R., Orilio A. F., Andrade B. Y. G., Souza A. C. A. and Nagata T. 2018. Development of an infectious clone and replicon system of norovirus GII.4. *J Virol Methods* 258:49-53.
- 52) Chang K. O., Sosnovtsev S. V., Belliot G., King A. D. and Green K. Y. 2006. Stable expression of a Norwalk

- virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 353:463-73.
- 53) Herbert T. P., Brierley I. and Brown T. D. 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 77 (Pt 1):123-7.
 - 54) Luttermann C. and Meyers G. 2009. The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev* 23:331-44.
 - 55) Simmonds P., Karakasiliotis I., Bailey D., Chaudhry Y., Evans D. J. and Goodfellow I. G. 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res*, gkn096 [pii] 10.1093/nar/gkn096.
 - 56) Bailey D., Karakasiliotis I., Vashist S., Chung L. M., Reese J., McFadden N., Benson A., Yarovinsky F., Simmonds P. and Goodfellow I. 2010. 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* 84:2859-70.
 - 57) Daughenbaugh K. F., Wobus C. E. and Hardy M. E. 2006. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol J* 3:33.
 - 58) Di Martino B. and Marsilio F. 2010. Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Res Vet Sci* 89:279-81.
 - 59) Kaiser W. J., Chaudhry Y., Sosnovtsev S. V. and Goodfellow I. G. 2006. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol* 87:363-8.
 - 60) Herbert T. P., Brierley I. and Brown T. D. 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 78 (Pt 5):1033-40.
 - 61) Dunham D. M., Jiang X., Berke T., Smith A. W. and Matson D. O. 1998. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* 143:2421-30.
 - 62) Liu B. L., Viljoen G. J., Clarke I. N. and Lambden P. R. 1999. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in E-coli. *Journal of General Virology* 80:291-296.
 - 63) Sosnovtsev S. V., Belliot G., Chang K. O., Prikhodko V. G., Thackray L. B., Wobus C. E., Karst S. M., Virgin H. W. and Green K. Y. 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 80:7816-31.
 - 64) Ettayebi K. and Hardy M. E. 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* 77:11790-7.
 - 65) Han K. R., Lee J. H., Kotiguda G. G., Jung K. H., Chung M. S., Kang S., Hwang S. and Kim K. H. 2018. Nucleotide triphosphatase and RNA chaperone activities of murine norovirus NS3. *J Gen Virol* 99:1482-1493.
 - 66) Yen J. B., Wei L. H., Chen L. W., Chen L. Y., Hung C. H., Wang S. S. and Chang P. J. 2018. Subcellular Localization and Functional Characterization of GII.4 Norovirus-Encoded NTPase. *J Virol* 92.
 - 67) Hussey R. J., Coates L., Gill R. S., Wright J. N., Sarwar M., Coker S., Erskine P. T., Cooper J. B., Wood S., Clarke I. N., Lambden P. R., Broadbridge R. and Shoolingin-Jordan P. M. 2010. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the protease from Southampton norovirus complexed with a Michael acceptor inhibitor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66:1544-8.
 - 68) Muzzarelli K. M., Kuiper B., Spellmon N., Brunzelle J., Hackett J., Amblard F., Zhou S., Liu P., Kovari I. A., Yang Z., Schinazi R. F. and Kovari L. C. 2019. Structural and Antiviral Studies of the Human Norovirus GII.4 Protease. *Biochemistry* 58:900-907.
 - 69) Nakamura K., Someya Y., Kumasaka T., Ueno G., Yamamoto M., Sato T., Takeda N., Miyamura T. and Tanaka N. 2005. A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* 79:13685-93.
 - 70) Someya Y. 2012. From head to toe of the norovirus 3C-like protease. *Biomol Concepts* 3:41-56.
 - 71) Viskovska M. A., Zhao B., Shanker S., Choi J. M., Deng L., Song Y., Palzkill T., Hu L., Estes M. K. and Venkataram Prasad B. V. 2019. GII.4 Norovirus Protease Shows pH-Sensitive Proteolysis with a Unique Arg-His Pairing in the Catalytic Site. *J Virol* 93.
 - 72) Zeitler C. E., Estes M. K. and Venkataram Prasad B. V. 2006. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* 80:5050-8.
 - 73) Fukushi S., Kojima S., Takai R., Hoshino F. B., Oka T., Takeda N., Katayama K. and Kageyama T. 2004. Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* 78:3889-96.
 - 74) Zamyatkin D. F., Parra F., Alonso J. M., Harki D. A., Peterson B. R., Grochulski P. and Ng K. K. 2008. Structural insights into mechanisms of catalysis and inhibition in Norwalk virus polymerase. *J Biol Chem* 283:7705-12.
 - 75) Ng K. K., Pendas-Franco N., Rojo J., Boga J. A., Machin A., Alonso J. M. and Parra F. 2004. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* 279:16638-45.
 - 76) Belliot G., Sosnovtsev S. V., Mitra T., Hammer C., Garfield M. and Green K. Y. 2003. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells. *J Virol* 77:10957-74.
 - 77) Chung L., Bailey D., Leen E. N., Emmott E. P., Chaudhry Y., Roberts L. O., Curry S., Locker N. and Goodfellow I. G. 2014. Norovirus translation requires an interaction between the C Terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *J Biol Chem* 289:21738-50.
 - 78) Royall E., Doyle N., Abdul-Wahab A., Emmott E., Mor-

- ley S. J., Goodfellow I., Roberts L. O. and Locker N. 2015. Murine norovirus 1 (MNV1) replication induces translational control of the host by regulating eIF4E activity during infection. *J Biol Chem* 290:4748-58.
- 79) Lee J. H., Park B. S., Han K. R., Biering S. B., Kim S. J., Choi J., Seok J. H., Alam I., Chung M. S., Kim H. M., Hwang S. and Kim K. H. 2018. Insight Into the Interaction Between RNA Polymerase and VPg for Murine Norovirus Replication. *Front Microbiol* 9:1466.
- 80) Sharp T. M., Guix S., Katayama K., Crawford S. E. and Estes M. K. 2010. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5:e13130.
- 81) Almand E. A., Moore M. D. and Jaykus L. A. 2017. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. *Front Microbiol* 8:2549.
- 82) Marionneau S., Ruvoen N., Le Mouillac-Vaidye B., Clement M., Cailleau-Thomas A., Ruiz-Palacois G., Huang P., Jiang X. and Le Pendu J. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastro-duodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122:1967-77.
- 83) Tamura M., Natori K., Kobayashi M., Miyamura T. and Takeda N. 2004. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J Virol* 78:3817-26.
- 84) Taube S., Mallagaray A. and Peters T. 2018. Norovirus, glycans and attachment. *Curr Opin Virol* 31:33-42.
- 85) Wegener H., Mallagaray A., Schone T., Peters T., Lockhauserbaumer J., Yan H., Uetrecht C., Hansman G. S. and Taube S. 2017. Human norovirus GII.4(MI001) P dimer binds fucosylated and sialylated carbohydrates. *Glycobiology* 27:1027-1037.
- 86) Taube S., Perry J. W., McGreevy E., Yetming K., Perkins C., Henderson K. and Wobus C. E. 2012. Murine noroviruses bind glycolipid and glycoprotein attachment receptors in a strain-dependent manner. *J Virol* 86:5584-93.
- 87) Taube S., Perry J. W., Yetming K., Patel S. P., Auble H., Shu L., Nawar H. F., Lee C. H., Connell T. D., Shayman J. A. and Wobus C. E. 2009. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for Murine Noroviruses (MNV). *J Virol*, JVI.02245-08 [pii] 10.1128/JVI.02245-08.
- 88) Haga K., Fujimoto A., Takai-Todaka R., Miki M., Doan Y. H., Murakami K., Yokoyama M., Murata K., Nakaniishi A. and Katayama K. 2016. 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.
- 89) Orchard R. C., Wilen C. B., Doench J. G., Baldrige M. T., McCune B. T., Lee Y. C., Lee S., Pruett-Miller S. M., Nelson C. A., Fremont D. H. and Virgin H. W. 2016. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science* 353:933-6.
- 90) Jones M. K., Watanabe M., Zhu S., Graves C. L., Keyes L. R., Grau K. R., Gonzalez-Hernandez M. B., Iovine N. M., Wobus C. E., Vinje J., Tibbetts S. A., Wallet S. M. and Karst S. M. 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346:755-9.
- 91) Sano D., Wada K., Imai T., Masago Y. and Omura T. 2010. Norovirus-binding proteins recovered from activated sludge micro-organisms with an affinity to a noroviral capsid peptide. *J Appl Microbiol*, JAM4821 [pii] 10.1111/j.1365-2672.2010.04821.x.
- 92) Ettayebi K., Crawford S. E., Murakami K., Broughman J. R., Karandikar U., Tenge V. R., Neill F. H., Blutt S. E., Zeng X. L., Qu L., Kou B., Opekun A. R., Burrin D., Graham D. Y., Ramani S., Atmar R. L. and Estes M. K. 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353:1387-1393.
- 93) Murakami K., Tenge V. R., Karandikar U. C., Lin S. C., Ramani S., Ettayebi K., Crawford S. E., Zeng X. L., Neill F. H., Ayyar B. V., Katayama K., Graham D. Y., Bieberich E., Atmar R. L. and Estes M. K. 2020. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:1700-1710.
- 94) Ball J. M., Hardy M. E., Atmar R. L., Conner M. E. and Estes M. K. 1998. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol* 72:1345-53.
- 95) Treanor J. J., Atmar R. L., Frey S. E., Gormley R., Chen W. H., Ferreira J., Goodwin R., Borkowski A., Clemens R. and Mendelman P. M. 2014. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate—reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *J Infect Dis* 210:1763-71.
- 96) Alvarado G., Ettayebi K., Atmar R. L., Bombardi R. G., Kose N., Estes M. K. and Crowe J. E., Jr. 2018. Human Monoclonal Antibodies That Neutralize Pandemic GII.4 Noroviruses. *Gastroenterology* 155:1898-1907.
- 97) Costantini V., Morantz E. K., Browne H., Ettayebi K., Zeng X. L., Atmar R. L., Estes M. K. and Vinje J. 2018. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis* 24:1453-1464.
- 98) Prasad B. V., Shanker S., Muhaxhiri Z., Deng L., Choi J. M., Estes M. K., Song Y., Palzkill T. and Atmar R. L. 2016. Antiviral targets of human noroviruses. *Curr Opin Virol* 18:117-125.
- 99) Hesse S., Neill F. H., Estes M. K., Shanker S., Prasad B. V., Ferreira J. and Atmar R. L. 2015. Serological Responses to a Norovirus Nonstructural Fusion Protein after Vaccination and Infection. *Clin Vaccine Immunol*, 10.1128/CVI.00595-15.
- 100) Bernstein D. I., Atmar R. L., Lyon G. M., Treanor J. J., Chen W. H., Jiang X., Vinje J., Gregoricus N., Frenck R. W., Jr., Moe C. L., Al-Ibrahim M. S., Barrett J., Ferreira J., Estes M. K., Graham D. Y., Goodwin R., Borkowski A., Clemens R. and Mendelman P. M. 2015. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis* 211:870-8.

- 101) Atmar R. L., Baehner F., Cramer J. P., Song E., Borkowski A., Mendelman P. M. and Group N. O. R. S. 2016. Rapid Responses to Two Virus-Like Particle Norovirus Vaccine Candidate Formulations in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Infect Dis*, 10.1093/infdis/jiw259.
- 102) Atmar R. L., Baehner F., Cramer J. P., Song E., Borkowski A., Mendelman P. M. and Group N. O. R. S. 2016. Rapid Responses to 2 Virus-Like Particle Norovirus Vaccine Candidate Formulations in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Infect Dis* 214:845-53.
- 103) Santi L., Huang Z. and Mason H. 2006. Virus-like particles production in green plants. *Methods* 40:66-76.
- 104) Damos A. G. and Mason H. S. 2018. High-level expression and enrichment of norovirus virus-like particles in plants using modified geminiviral vectors. *Protein Expr Purif* 151:86-92.
- 105) Rybicki E. P. 2019. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 10.1002/wnan.1587:e1587.
- 106) Guo L., Wang J., Zhou H., Si H., Wang M., Song J., Han B., Shu Y., Ren L., Qu J. and Hung T. 2008. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine* 26:460-8.
- 107) Guo L., Zhou H., Wang M., Song J., Han B., Shu Y., Ren L., Si H., Qu J., Zhao Z., Wang J. and Hung T. 2009. A recombinant adenovirus prime-virus-like particle boost regimen elicits effective and specific immunities against norovirus in mice. *Vaccine* 27:5233-8.
- 108) Mattison C. P., Cardemil C. V. and Hall A. J. 2018. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. *Expert Rev Vaccines* 17:773-784.
- 109) Blazevic V., Malm M., Arinobu D., Lappalainen S. and Vesikari T. 2015. Rotavirus capsid VP6 protein acts as an adjuvant in vivo for norovirus virus-like particles in a combination vaccine. *Hum Vaccin Immunother*, 10.1080/21645515.2015.1099772:0.
- 110) Blazevic V., Malm M., Arinobu D., Lappalainen S. and Vesikari T. 2016. Rotavirus capsid VP6 protein acts as an adjuvant in vivo for norovirus virus-like particles in a combination vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 12:740-8.
- 111) Malm M., Tamminen K., Lappalainen S., Vesikari T. and Blazevic V. 2016. Rotavirus Recombinant VP6 Nanotubes Act as an Immunomodulator and Delivery Vehicle for Norovirus Virus-Like Particles. *J Immunol Res* 2016:9171632.
- 112) Malm M., Heinimaki S., Vesikari T. and Blazevic V. 2017. Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs. *Clin Exp Immunol* 189:331-341.
- 113) Malm M., Diessner A., Tamminen K., Liebscher M., Vesikari T. and Blazevic V. 2019. Rotavirus VP6 as an Adjuvant for Bivalent Norovirus Vaccine Produced in *Nicotiana benthamiana*. *Pharmaceutics* 11.
- 114) Malm M., Vesikari T. and Blazevic V. 2019. Simultaneous Immunization with Multivalent Norovirus VLPs Induces Better Protective Immune Responses to Norovirus Than Sequential Immunization. *Viruses* 11.

Review

Norovirus

Kazuhiko KATAYAMA, PhD.

Professor

Laboratory of Viral Infection I, Department of Infection Control and Immunology,
Ōmura Satoshi Memorial Institute & Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University.

Noroviruses commonly cause infectious gastroenteritis and massive food poisoning. There is an urgent need to elucidate the infection mechanism of noroviruses and to develop vaccines and therapeutic drugs. In addition to human disease, noroviruses have been implicated in animal disease. Noroviruses that cause murine diseases can be propagated in strained cultured cells, and for many years, murine norovirus has been used as a model for human noroviruses that could not be propagated in cultured cells. That model and advances in technology have been instrumental in basic studies of noroviruses. From structural biology, noroviruses undergo dynamic shape changes to improve their infectivity when they infect cells. New culture techniques have made human intestinal organoids available for studying the mechanisms of pathogenic expression of human noroviruses in the intestinal tract, mechanisms of infection growth, and the search for receptor molecules. Vaccines and antivirals using human intestinal organoids are under active development, and some are already in clinical trials. In this paper, I review the latest research results, vaccine development, and other advances from the history of norovirus discovery.