

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07150

研究課題名(和文) 新規な遺伝子操作系を用いたロタウイルス増殖および病原性発現の機構の解明

研究課題名(英文) Applications of entirely plasmid-based reverse genetics system on rotavirus research

研究代表者

河本 聡志 (Komoto, Satoshi)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60367711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：増殖能が極めて高い動物のロタウイルス(RV)について開発された当初のヘルパーウイルスを必要としない完全な遺伝子操作系の効率はかなり不十分であり、11分節のRV RNAゲノムを発現するT7プラスミドに加えて、細胞融合性蛋白質等を発現するヘルパープラスミドが必須であったが、NSP2とNSP5をコードするT7プラスミド量を調整することで、RVをコードするT7プラスミドのみから、しかも高効率に組換えRVを作製できる遺伝子操作系(11-プラスミドシステム)を確立した。11-プラスミドシステムに加えて、下痢便中のヒトRVを効率良く分離する技術を利用することで、世界に先駆けて、ヒトRVの人工合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

11-プラスミドシステムの確立により、今日では多くの研究者が容易にRVを人工合成できる状況に至った。現在、世界中で11-プラスミドシステムと11-プラスミドシステムをベースとした遺伝子操作系を駆使して、ロタウイルスの増殖、病原性発現の機構解明といった基礎研究、そして安全性に優れた次世代ワクチンや腸管指向性ウイルスベクター開発といった臨床応用を目指した研究が活発に行われている。また、11-プラスミドシステムは、まだ生体における安全性が確認されていない因子を一切用いないため、臨床応用を進めるうえで明確なアドバンテージがある。

研究成果の概要(英文)：Reverse genetics technology allows one to engineer infectious viruses from cloned cDNAs at will. We developed an efficient reverse genetics system that makes it possible to generate infectious rotaviruses (RVAs) from just 11 T7-driven plasmids encoding an RVA genome when the quantity ratio of the 2 rescue T7-driven plasmids for the NSP2 and NSP5 genes is increased by 3-fold in relation to that of the other 9 plasmids (11 plasmid-only system). Furthermore, it is now possible to rescue recombinant RVAs even with severely less efficient infectivity such as RVA vectors by using the 11 plasmid-only system, which has not been possible with the original RVA reverse genetics system. Finally, the successful generation of the first infectious human RVA was achieved when we made minor modification to the 11 plasmid-only system by increasing the trypsin concentration in the maintenance medium of the cell culture and applying the roller-culture technique to grow human RVAs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ロタウイルス リバースジェネティクス系 遺伝子操作系 11-プラスミドシステム ヒトロタウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最重要な下痢症ウイルスの一つであるロタウイルスは、11本の2本鎖RNA(dsRNA)分節をゲノムとして持ち、11ないし12個のウイルス蛋白質をコードする。各ウイルス蛋白質の機能を理解するため、これらウイルス蛋白質の強制発現、RNA分節の交換体であるリアソータント、温度感受性変異株などを主に用いて解析されてきた。しかしながら、ウイルス感染細胞内で起こる、ウイルス遺伝子およびその産物の機能的相互作用をこれら従来の手法で解析するには限界があり、実際のウイルス増殖や病原性発現のメカニズムを正確に理解することはできない。自己複製する存在としてのウイルスを真に理解するためには、感染性ウイルスそのものを用いた検証が必要不可欠である。ウイルス学分野におけるリバースジェネティクス系(遺伝子操作系、人工合成系)は、ウイルスゲノムを分子生物学的手法で自由自在に設計し、感染性ウイルスを作製することができ、ウイルス増殖や病原性発現のメカニズムを解析するうえで最も強力な手法となる。しかしながら、11本もの多分節dsRNAをゲノムとするロタウイルスでは、そのゲノム構造の複雑さ故に、この技術の開発、展開が大きく遅れてきた。申請者らは、ヘルパーウイルスを用いることで、11本の遺伝子分節のうち1本がcDNA由来となる組換えロタウイルスを作製することができる、世界初となる、ロタウイルスにおける遺伝子操作系の開発に成功した(Komoto et al., PNAS. 2006)。その後、ヘルパーウイルスを必要としない完全な遺伝子操作系の開発にも取り組み、大阪大学との共同研究で、全11本のゲノム分節が全てcDNA由来となる組換えロタウイルスを作製できる、新規な遺伝子操作系の開発にも成功した(Kanai, Komoto et al., PNAS. 2017)。

2. 研究の目的

ロタウイルスにおける新規な遺伝子操作系を駆使することで、未だその理解が不十分である、ロタウイルス増殖および病原性発現のメカニズムを実際の感染性ウイルスを用いて、分子レベルで解明することを目的とした。そのために必要となる、遺伝子操作系の改良についても試みた。

3. 研究の方法

(1) 高効率でしかも安全性に優れた遺伝子操作系の確立

現行の新規な遺伝子操作系における組換えロタウイルスの作製効率はかなり不十分であり、また、未だ生体における安全性が確認されていない、コウモリの病原体由来の細胞融合性蛋白質などを発現するヘルパープラスミドも必要とする。そこで、遺伝子操作系の各条件を詳細に検討することで、高効率でしかも安全性に優れた遺伝子操作系の確立を目指した。

(2) ロタウイルスベクタープラットフォームの開発

蛍光蛋白質といった大きなサイズの外来遺伝子を安定に発現できるような、腸管指向性のロタウイルスベクタープラットフォームの開発を目指した。

(3) ヒトロタウイルスにおける完全な遺伝子操作系の確立

最も重要なヒトロタウイルスは、動物ロタウイルスに比べて増殖能がきわめて低く、また、感染性を獲得するためのトリプシン依存性が高いことから、依然として遺伝子操作系の確立は困難をきわめている。そこで、当研究室における過去40年に渡るヒトロタウイルス研究の技術、知識を動員することで、ヒトロタウイルスにおける完全な遺伝子操作系の確立を目指した。

(4) サル/ヒトロタウイルス間のモノリアソータントパネルの作製

新たに確立した、私たち独自の高効率な11-プラスミドシステムを駆使することで、11種類のサル/ヒトロタウイルス間のモノリアソータントパネルが作製可能かどうかを検討した。

(5) 複数の外来遺伝子の同時発現を可能とするロタウイルスベクタープラットフォームの開発

これまでに報告のないような大きなサイズ、あるいは複数の外来遺伝子のロタウイルスゲノムへの挿入を可能とするような、ロタウイルスベクタープラットフォームの開発を目指した。

4. 研究成果

(1) 現行の遺伝子操作系の各条件を慎重に検討したところ、組換えロタウイルスの人工合成には、ウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドのみで十分であること。その際に、共に非構造蛋白質をコードするNSP2遺伝子とNSP5遺伝子の2本のプラスミド量を残る9本のプラスミド量の3倍量とすることで、組換えロタウイルスの作製効率が飛躍的に亢進($\sim 10^5$ 倍)することを見出した(11-プラスミドシステムの確立)。

(2) 当研究室で確立したばかりの11-プラスミドシステムを駆使することで、蛍光蛋白質のなかでも最も汎用されるEGFP遺伝子(720塩基)とmCherry遺伝子(708塩基)をロタウイルスゲ

ノムへ挿入することを試みた。私たちは、ロタウイルス複製に必須ではない NSP1 遺伝子上で 500 塩基を欠失するような遺伝子再編集(リアレンジメント)を起こしたウシロタウイルス A5-16 株を分離していた。この A5-16 株の NSP1 遺伝子構造を模したサルロタウイルス SA11-L2 株の NSP1 遺伝子をコードする T7 プラスミドを構築し、この 500 塩基の欠失領域に EGFP あるいは mCherry 遺伝子を挿入して、11-プラスミドシステムで組換えウイルスの作製を試みたところ、世界初となる、全長の蛍光蛋白質をしかも安定に発現する組換えロタウイルスの作製に成功した。

(3) 私たち独自の 11-プラスミドシステムと、当研究室で普段行っていた下痢便中のヒトロタウイルスを効率良く分離する技術(高濃度トリプシンと回転培養)を併せて利用したところ、世界初となる、感染性ヒトロタウイルス(KU 株: ヒトロタウイルスの中でも最重要な G1P[8]株)の人工合成に成功し、ロタウイルス研究者の宿願であった、ヒトロタウイルスの遺伝子操作系を確立することができた。

(4) サル SA11-L2 株をバックボーンとして、ヒト KU 株の遺伝子分節 1 本を保有するような、モノリアソータントパネルの作製を試みた。11-プラスミドシステムを駆使することで、11 種類のモノリアソータントを容易に作製できた。さらに、サル SA11-L2 株をバックボーンとして、ヒト KU 株の遺伝子分節 3 本(VP1-VP3)を保有する、トリプルリアソータントも作製することで、11-プラスミドシステムを用いることで、リアソータントについても自由自在に設計、作製できることを示した。次に、最も重要な感染防御抗原である VP7 について主要な血清型(G1-G4, G9, G12)をすべて網羅する VP7 リアソータントパネルを短期間で作製できることを示し、将来に新たな血清型を持つ新型ロタウイルスが出現した際にも、11-プラスミドシステムは、新たなワクチン開発に即応可能な基盤技術となり得ることを示した。

(5) 11-プラスミドシステムを駆使することで、複数の外来遺伝子を同時発現させることのできるロタウイルスベクタープラットフォームの開発を目指した。NSP1 遺伝子分節の大部分を欠失させ(両末端 222 塩基のみの構造)代わりに NanoLuc ルシフェラーゼ遺伝子(NLuc)遺伝子を挿入した組換えロタウイルスの作製を試みた。作製した組換えウイルスは感染細胞で安定に NLuc を発現し、この新たな NSP1 遺伝子プラットフォームは有用であることが示された。次に、NLuc-EGFP-mCherry という、3 つものレポーター遺伝子をブタテスコウイルスの 2A ペプチド配列で繋げた構造の遺伝子をゲノムへ挿入した組換えロタウイルスの作製にも成功した。この組換えロタウイルスは、感染細胞で 3 つものレポーター蛋白質を安定に発現しており、ロタウイルスゲノムから複数の外来遺伝子を同時発現させることができることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatazawa R, Fukuda S, Kumamoto K, Matsushita F, Nagao S, Murata T, Taniguchi K, Matsui T, Komoto S.	4. 巻 102(4)
2. 論文標題 Strategy for generation of replication-competent recombinant rotaviruses expressing multiple foreign genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gen Virol	6. 最初と最後の頁 1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komoto S, Fukuda S, Hatazawa R, Murata T, Taniguchi K.	4. 巻 286
2. 論文標題 Generation of recombinant rotaviruses from just 11 cDNAs encoding a viral genome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Res	6. 最初と最後の頁 198075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2020.198075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda S, Hatazawa R, Kawamura Y, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K, Komoto S.	4. 巻 101(8)
2. 論文標題 Rapid generation of rotavirus single-gene reassortants by means of eleven plasmid-only based reverse genetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gen Virol	6. 最初と最後の頁 806-815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komoto S, Fukuda S, Murata T, Taniguchi K.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Reverse genetics system for human rotaviruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 401-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komoto S, Fukuda S, Kugita M, Hatazawa R, Koyama C, Katayama K, Murata T, Taniguchi K.	4. 巻 93(8)
2. 論文標題 Generation of infectious recombinant human rotaviruses from just 11 cloned cDNAs encoding the rotavirus genome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e02207-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02207-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komoto S, Fukuda S, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K.	4. 巻 92(13)
2. 論文標題 Generation of recombinant rotaviruses expressing fluorescent proteins by using an optimized reverse genetics system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e00588-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00588-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Fukuda S, Hatazawa R, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K, Komoto S.
2. 発表標題 Eleven-plasmid-based reverse genetics platform for efficient generation of rotavirus reassortants
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本聡志
2. 発表標題 ロタウイルスの遺伝子操作系
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda S, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K, Komoto S.
2. 発表標題 Development of efficient and simple reverse genetics system based on only rotavirus cDNAs
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関