

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790360

研究課題名 (和文) ロタウイルスの遺伝子操作系の確立と応用

研究課題名 (英文) Reverse genetics for rotavirus and its applications

研究代表者

河本 聡志 (KOMOTO SATOSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60367711

研究成果の概要 (和文)：リバーズジェネティクス技術を用いて、cDNA 由来の VP4 遺伝子 (外殻スパイク VP4 をコード) をゲノムとして有する感染性ロタウイルスを構築した。この技術の応用は、新原理に基づくワクチン開発、ロタウイルスをベースとした外来遺伝子発現ベクターの開発、さらにロタウイルスの病原性発現機構の分子レベルでの研究にも大いに役立つと期待される。

研究成果の概要 (英文)：Recombinant rotaviruses (RVs) containing a cDNA-derived VP4 genome could be generated by means of reverse genetics system. It is expected that this approach will be valuable for the development of novel RV vaccines and vaccine vectors, as well as for an understanding of the molecular basis of RV pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ロタウイルス、ウイルス工学、リバーズジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスは、11本の2本鎖RNA(dsRNA)分節をゲノムとして保有する。各遺伝子の機能を理解するため、これまで、温度感受性変異株、RNA分節の交換体であるリアソータント、発現蛋白質を用いた解析が主に行われてきた。ゲノム複製機序についても内殻粒子を用いた *in vitro* 複製系による解析が主に行われてきた。また、最近では、

RNAi や細胞内抗体結合法によるノックダウン解析も行われている。しかし、ロタ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方法で解析するには限界があり、実際のウイルス複製を理解することはできない。ウイルスを自己複製する生物として真に理解するためには、感染性ウイルスを用いた検証が必要不可欠である。リバーズジェネティクス

系はウイルスゲノムへ任意の変異を導入することで、ウイルスを自由に設計し作製することができ、ウイルス増殖や病原性発現機構を理解する上で最も強力な手法である。しかしながら、11本もの dsRNA ゲノム分節をゲノムとするロタウイルスは、そのゲノム構造の複雑さゆえか、この技術の応用が極めて困難であり、如何なる遺伝子操作系も存在していなかった。最近、ようやく私達は、ヘルパーウイルスを用いて 11本のゲノム分節のうち1本が cDNA に由来する組換えロタウイルスを作出することを可能にするリバーシジェネティクス系の開発に世界に先駆けて成功した (PNAS 103, 2006) (図 1)。

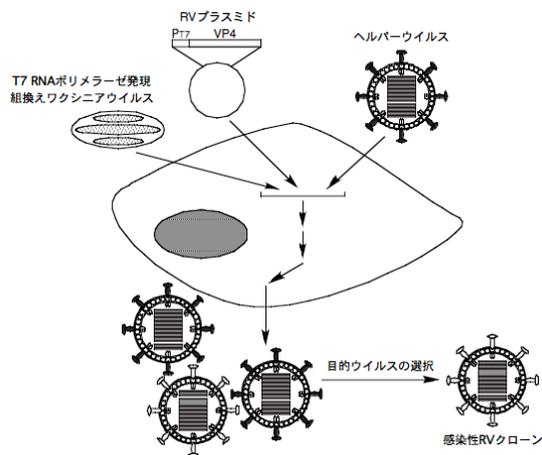


図 1 ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系 (T7 RNA ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞に、T7 RNA プロモーター下に VP4 遺伝子をコードするプラスミドを導入することで、細胞内に cDNA 由来の VP4 遺伝子プラス鎖 RNA が発現する。この細胞にヘルパーウイルスを重感染させ、回収したウイルスをヘルパーウイルス特異的な中和モノクローナル抗体存在下で培養することにより、cDNA 由来 VP4 遺伝子分節をゲノムとする感染性ロタウイルスクローンを選択する。)

2. 研究の目的

本研究では、上述のリバーシジェネティクス系を駆使し、外殻スパイク蛋白質をコードする VP4 遺伝子とその産物の機能的相互作用を実際のウイルスで追求することを目的とした。一方、この系はヘルパーウイルスを用いるので、回収ウイルスから組換えウイルスを単離するための強力な選択条件が必要であり、目的とするウイルス遺伝子によっては、その条件が存在していない。そこで、現在のリバーシジェネティクス系を発展させ、ヘルパーウイルスを必要とせずに任意にロタウイルスを設計しうる技術 (11本全ての分節ゲノムが cDNA に由来するロタウイルス

を作出する系) を開発することを目指した。

3. 研究の方法

外殻スパイク蛋白質 VP4 は感染初期の細胞吸着と侵入で機能するとともに、ロタウイルス粒子表面の主要な中和抗原でもある。そこで、リバーシジェネティクス系を用いて、VP4 上の 3つの交差反応性中和エピトープ (I, II および III) の 1つ、II の配列をサルロタウイルス SA11 株 (P[2]タイプ) からヒトロタウイルス DS-1 株 (P[4]タイプ) に置換した、異なる P タイプ由来の中和抗原をキメラに発現するような感染性ロタウイルスの作製を試みた。SA11 株 VP4 遺伝子上のエピトープ II 配列を DS-1 株に置換したプラス鎖 RNA 発現プラスミドを構築し、感染性ロタウイルスを作出した (図 2)。

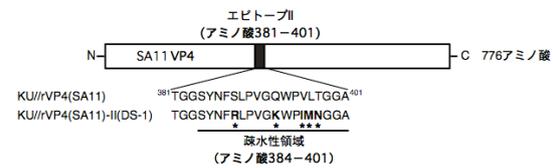


図 2 ロタウイルス VP4 遺伝子への部位特異的変異の導入 (サルロタウイルス SA11 株 VP4 遺伝子上のエピトープ II 配列をヒトロタウイルス DS-1 株に置換した感染性ロタウイルスを作出した。また、VP4 上に存在する疎水性領域 (アミノ酸 384-401) はエピトープ II 領域 (アミノ酸 381-401) と大きく重なっている。)

4. 研究成果

様々な P タイプ特異的中和モノクローナル抗体を用いて、回収した変異ウイルスの抗原性を検討したところ、エピトープ II については DS-1 株 (P[4]タイプ) の抗原性を示し、エピトープ I および III については、SA11 株 (P[2]タイプ) の抗原性を保持していた。さらに、この変異ウイルスは、P[4]タイプ特異的なエピトープ II 配列に対する中和モノクローナル抗体でその感染性が中和されたが、逆に P[2]タイプのエピトープ II 配列に結合する中和モノクローナル抗体との反応性は失っていた。これらのことから、作製した組換えロタウイルスは、設計通りに、ウイルス粒子表面に抗原モザイクを呈する VP4 を発現していることが確認された。

前述したように、VP4 は細胞吸着と侵入で機能するために、ロタウイルス感染性を決定する因子であり、病原性を考える上で重要な分子である。この VP4 上には疎水性領域が存在し、この配列はアルファウイルス属の E1 蛋白質 (細胞侵入に関与する) の融合ペプチド配列と相同性を示すことから、ロタウイル

スが細胞侵入する際に働く融合ペプチドである可能性が、発現蛋白質を用いた解析からも示唆されている。面白いことに、この疎水性領域（アミノ酸 384-401）は、前述のエピトープ II 配列（アミノ酸 381-401）と大きく重なっている（図 2）。もしこの領域が感染性ウイルスにおける融合ペプチドであれば、この領域のアミノ酸配列を置換した上述の VP4 抗原モザイクウイルスは、親株と比較して、生物学的性状、すなわち感染性が変化している可能性が考えられる。なぜなら、増殖の良いサルロタウイルス SA11 株の疎水性領域を増殖の悪いヒトロタウイルス DS-1 株のものと置換したからである。そこで、これらウイルスの培養細胞における感染性を検討したところ、置換変異を導入した変異ウイルスの感染性は、親株の 10 分の 1 程度にまで大きく低下していた。つまり、増殖の悪い DS-1 株の疎水性領域配列への置換は、増殖の良い SA11 株由来の VP4 を有するウイルスの感染性を大きく低下させた。実際、SA11 株 VP4 へ導入した 5 個のアミノ酸変異のうち 2 個は、中性アミノ酸から親水性アミノ酸への置換であり、結果としてこの領域の疎水性は低下している。今後、変異を狭めてアミノ酸変異を導入すれば、ロタウイルス増殖過程におけるこの疎水性領域の各アミノ酸の重要性が明らかになるであろう。

こうして、ロタウイルスにおいても、これまで出来なかった、人工的に変異を加えた生きたウイルスを分子生物学的研究の対象として扱うことが可能になりつつある。

このロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系開発の成功は、ロタウイルスが属するレオウイルス科を対象とする研究者を大いに刺激し、現在では世界の多くの研究室で活発な開発研究が行われている。その成果として、ごく最近、いずれも 10 本の分節 dsRNA をゲノムとするオルソレオウイルスとブルータングウイルスにおいて、全 10 本のプラス鎖 RNA を細胞内に供給するだけで、ウイルス複製サイクルを開始させることができる」と報告された。このことは、多分節 dsRNA ウイルスであるレオウイルス科においても、全分節のプラス鎖 RNA を細胞に導入するだけでウイルスの複製サイクルを開始することができること、即ち、レオウイルス科における最小複製単位もゲノム全分節のプラス鎖 RNA であることを強く示している。11 本の分節 dsRNA をゲノムとするロタウイルスにおいても、全 11 分節の cDNA 由来プラス鎖 RNA を細胞に導入することで、感染性ロタウイルスが作出できると考えられる。このヘルパーウイルスを必要としない、全ての分節 dsRNA が cDNA に由来するロタウイルスを作出するリバーシジェネティクス系は、理論上は、生きたロタウイルスに自

由自在の変異を入れることができ、ロタウイルスの増殖複製過程、病原性発現機構の研究を分子レベルで飛躍的に展開することを可能にすると期待される。現在のところ、私達のロタウイルスを cDNA のみから作出するという試みは成功に至っていない。これまでにリバーシジェネティクス系が開発されたもののウイルスのゲノム分節数よりも多いロタウイルスの 11 本という分節数と、ウシ胎児血清非存在下でトリブシン存在下という過酷なロタウイルス遺伝子を導入した細胞の培養条件が cDNA 由来のロタウイルス回収を困難にしている主な要因と考えられるが、これら技術的な問題に慎重に対応していくことで本研究の実現を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Komoto, S., Kugita, M., Sasaki, J., and Taniguchi, K.: Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J. Virol.* 82, 6753-6757, 2008. 査読有

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① Komoto, S., and Taniguchi, K.: Proteolytic cleavage at the conserved Arginine-241 of Rotavirus VP4 is not essential for virus replication in cell culture. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, September 9, 2009
- ② 河本聡志、釘田雅則、油井晶子、佐々木潤、守口匡子、前野芳正、石川球美子、谷口孝喜 VP4 上の交叉反応性中和エピトープの抗原モザイクを有する組換えロタウイルスの作製 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月 28 日
- ③ 河本聡志 ロタウイルスの新知見 第 20 回ウイルス性下痢症研究会、岡山、2008 年 10 月 25 日
- ④ Komoto, S., Kugita, M., Yui, A., Sasaki, J., and Taniguchi, K.: Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, September 9, 2008
- ⑤ Komoto, S., Kugita, M., Yui, A., Sasaki, J., Moriguchi, K., Maeno, Y., and Taniguchi, K.: Generation of

recombinant rotavirus having an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. XIV International Congress of Virology. Istanbul, Turkey, August 13, 2008

- ⑥ Komoto, S., Kugita, M., Yui, A., Sasaki, J., and Taniguchi, K.: Generation of recombinant rotavirus having an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. The 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program. Nagasaki, Japan, May 27, 2008

[図書] (計 2 件)

- ① 河本聡志、谷口孝喜 ロタウイルス感染性クローンの開発と病原性解析 共立出版蛋白質 核酸 酵素 54, 934-939, 2009.
- ② 谷口孝喜、河本聡志、佐々木潤、釘田雅則 ロタウイルスのリバースジェネティクスとその展望 日本ウイルス学会 日本ウイルス学会誌 59, 91-98, 2009.

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ :

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~virology/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 聡志 (KOMOTO SATOSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号 : 6 0 3 6 7 7 1 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし