

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790440

研究課題名（和文） 遺伝子操作系を用いたロタウイルス増殖過程の解析

研究課題名（英文） Reverse genetics approach to study the molecular biology of rotavirus

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）：リバーシジェネティクス系を用いて、cDNA由来のVP4遺伝子（外殻スパイク蛋白質VP4をコード）をゲノムとして有する組換えロタウイルスを作製した。VP4上のトリプシン切断領域にフェーリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換えロタウイルスは、トリプシン非存在下では多段階増殖し得ないのみならず、新生ビリオンの大部分が感染細胞内に蓄積しており、増殖能は野生型VP4を有する親株に比べて大きく低下した。細胞内でのVP4活性化はロタウイルス増殖には負に作用する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We generated and characterized a recombinant rotavirus expressing cDNA-derived VP4 with a modified cleavage site recognized by furin as well as trypsin. Unexpectedly, the VP4 cleavage site mutant virus could not undergo multicycle replication without an exogenous protease. Furthermore, the mutant virus showed lower infectivity even in the presence of trypsin compared with the parental virus carrying authentic VP4. These results suggest that intracellular cleavage of VP4 by furin may be disadvantageous for rotavirus infectivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、リバーシジェネティクス、スパイク蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス（RV）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コア粒子を用いた *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法によるノックダウン解析も行われている。しかし、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

ルスをを用いた検証が必要不可欠である。リバーシジェネティクス系（遺伝子操作系）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、ウイルス増殖過程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 分節をゲノムとする RV 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。2006年によく私達は、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 RV 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)。

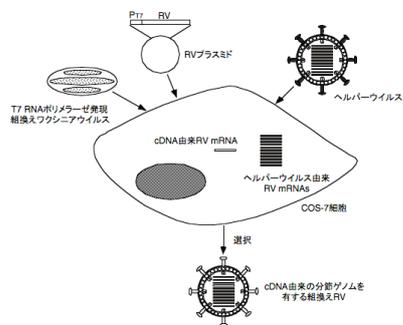


図 1 RV におけるリバーシジェネティクス系 (T7 RNA ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた COS-7 細胞に、T7 RNA プロモーター下に RV 遺伝子を配置したプラスミドを導入することで、細胞内に cDNA 由来の RV mRNA が発現する。この細胞にヘルパーウイルスを重感染させ、回収したウイルスの中から cDNA 由来の分節ゲノムを有する組換え RV を選択する。)

## 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 VP4 遺伝子 (外殻スパイク蛋白質 VP4 をコード) に応用し、VP4 が関わる増殖過程を実際のウイルスで解析することを目的とした。一方で、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、その条件が存在しない。そこで、ヘルパーウイルスを必要とせずに任意に RV を設計し得る技術 (全 11 本のゲノム分節が cDNA に由来する RV を作出する系) を開発することも目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ヘルパーウイルスを用いるリバーシジ

## エネティクス系の応用

エンベロープウイルスの多くは、表面スパイク蛋白質が宿主プロテアーゼによって切断活性化されて感染性を獲得する。このため、宿主プロテアーゼによる表面スパイク蛋白質の切断活性化は、多くのエンベロープウイルスの病原性発現に深く関わっている。非エンベロープウイルスである RV も外殻スパイク蛋白質 VP4 がトリプシンで VP8\* と VP5\* に切断活性化されることで感染性を獲得する。トリプシン非存在下での RV 多段階増殖の可能性を試みる目的で、VP4 上のトリプシン切断領域にフェューリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換え RV の作製した (図 2)。

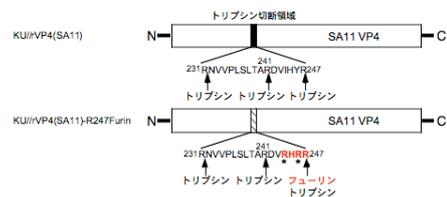


図 2 RV VP4 遺伝子への部位特異的変異の導入 (サル RV SA11 株 VP4 遺伝子上のトリプシン切断領域 (247 番目のアルギニン残基) にフェューリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換え RV を作製した。この組換えウイルスの VP4 はトリプシンおよびフェューリンによって切断される。)

## (2) ヘルパーウイルスを必要とせず、完全に cDNA のみから RV を作出する系の開発

サルおよびヒト RV の全 11 本の分節ゲノム各々をコードするプラスミド 11 個を構築した。培養細胞にこれら 11 個のプラスミドを導入した場合、全 11 本の RV mRNA と全 11 種の RV 蛋白質が供給されることから、理論上は RV 複製サイクルを開始させることができると考えられた。

## 4. 研究成果

### (1) ヘルパーウイルスを用いるリバーシジェネティクス系の応用

作製した組換えウイルスの VP4 は設計通りに、細胞内フェューリンによって高効率に切断された。しかし、この組換えウイルスはトリプシン非存在下では多段階増殖し得ないのみならず、新生ビリオンの大部分が感染細胞内に蓄積しており、MA104 および CV-1 細胞における増殖能は野生型 VP4 を有する親株に比べて大きく低下した。フェューリン発現を欠損した LoVo 細胞においては、この組換えウイルスは親株と同程度の増殖能を示し

たことから、細胞内における VP4 活性化は RV 増殖には負に作用する可能性が示された。

(2) ヘルパーウイルスを必要とせず、完全に cDNA のみから RV を作出する系の開発

様々な RV 感受性 (COS-7, 293T, MA104, CV-1, HT-29, MDCK, Vero) および非感受性 (BHK, CHO, L929) の細胞株に全 11 個の RV プラスミドを導入した。この際に T7 RNA ポリメラーゼの供給方法として、従来の組換えワクシニアウイルスを用いる方法とともに、安定発現細胞株を用いる方法を試みた。しかしながら、いずれにおいても未だ感染性 RV の作出に成功していない。当研究室においてもレオウイルス (10 本の dsRNA 分節をゲノムとする) の全 10 個のプラスミドを培養細胞に導入することで、感染性レオウイルスを効率良く作出できており、RV のプラスミド 11 個を高効率で培養細胞に導入する問題はクリアしていると考えている。これらのことから、汎用している培養細胞内に全 11 本の RV mRNAs を供給するだけでは、感染性 RV を回収できないことが示唆された。

今後、ヘルパーウイルスを用いるリバーシジェネティクス系を VP4 遺伝子に応用し、VP4 が関わる RV 感染過程の各段階を実際のウイルスで解析する。特に、未だその理解が不十分である VP4 の限定切断による RV 感染性獲得の機構を解明したい。一方で、現在のシステムを駆使することで得られる知見をもとに、ヘルパーウイルスを必要とせず全 11 本のゲノム分節が cDNA に由来する組換え RV を作出する技術の開発を目指したい。

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., Wakuda, M., Ide, T., Niimi, G., Maeno, Y., Higo-Moriguchi, K., and Taniguchi, K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J. Gen. Virol.* 92:2914-2921, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Komoto, S., and Taniguchi, K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. 第 34 回日本分子生物学会年会、神奈川、2011 年 12 月 14 日
- ② Komoto, S., Wakuda, M., Maeno, Y.,

Yui, A., Higo-Moriguchi, K., Sasaki, J., Ishikawa, K., and Taniguchi, K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. XV International Congress of Virology, Hokkaido, Japan, September 13, 2011

- ③ Komoto, S., and Taniguchi, K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to be recognized by furin does not result in enhanced replication. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会、神奈川、2010 年 12 月 7 日
- ④ 河本聡志、和久田光毅、前野芳正、油井晶子、佐々木潤、守口匡子、石川球美子、谷口孝喜 VP4 上のトリプシン切断領域にフューリン認識配列を導入した組換えロタウイルスの作製 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7 日
- ⑤ Komoto, S., and Taniguchi, K. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to be recognized by furin does not result in enhanced replication. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, September 9, 2010

[図書] (計 1 件)

- ① 河本聡志、谷口孝喜 医薬ジャーナル社、ロタウイルス胃腸炎の予防と治療の新しい展開、2012、136 (26-38)

[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