

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590561

研究課題名(和文) 遺伝子操作系を用いたロタウイルス感染過程の解明

研究課題名(英文) Development and application of rotavirus reverse genetics system

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちが世界に先駆けて開発に成功したヘルパーウイルスを用いるロタウイルスのリバースジェネティクス系を駆使して、未だその理解が不十分である、ロタウイルスの感染性獲得における外殻スパイク蛋白質VP4の役割を実際のウイルスで解析した。また、このシステムの適用が未だ報告されていない遺伝子分節についても組換えウイルスを単離するための選択条件の開発を試みた。さらに現在の系を発展させ、全11本の遺伝子分節がcDNA由来の組換えロタウイルスを作製しうる技術の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Rotavirus VP4 possesses three conserved mono-basic residues at its trypsin cleavage site (R231, R241, and R247). Although only R247 is assumed to be required for the activation of infectivity with conventional techniques, the strict conservation of the three residues suggests that the presence of these residues may play an important role during infection. This possibility was evaluated by generating recombinant rotaviruses with trypsin cleavage site mutations using reverse genetics. We isolated and characterized a rotavirus variant possessing a rearranged segment 11 with small sequence (3-bp) deletion within the open reading frame. Our results indicate that a rotavirus genomic rearrangement impairs packaging efficiency into the progeny viruses despite does not confer growth disadvantage to viruses. We developed a plasmid-based reverse genetics system for reovirus driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase, which could increase the flexibility of such reverse genetics systems.

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 ヘルパーウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

レオウイルス科に属するロタウイルスは、11本の2本鎖RNA(dsRNA)分節をゲノムとして保有する。各遺伝子の機能を明らかにするため、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。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や病原性発現機構を正確に理解することはできない。ウイルスを自己複製する存在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。遺伝子操作系(リバースジェネティクス系)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、ウイルス感染性や病原性の獲得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ロタウイルスでは、そのゲノム構造の複雑さゆえか、この技術の応用がきわめて困難であり、如何なるリバースジェネティクス系も存在していなかった。2006年ようやく私たちは、ヘルパーウイルスを用いて11本の遺伝子分節のうち1本がcDNAに由来するような組換えロタウイルスを可能にするリバース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)。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述のヘルパーウイルスを用いるリバース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が関与するロタウイルスの感染性の獲得機構を実際のウイルスで解析することを目的とした。また、VP4以外の遺伝子分節についても組換えウイルスを単離するための条件を開発し、ロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系を発展にも展開させていくことを目指した。一方で、このシステムはヘルパーウイルスを用いるので、回収ウイルスの中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、目的とする遺伝子分節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、全11本の遺伝子分節がcDNAに由来する組換えロタウイルスを作出する技術の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ヘルパーウイルスを用いるリバースジェ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ロタウイルスも、トリプシンでVP4がVP8\*とVP5\*に切断されることで感染性を獲得する。VP4の切断領域には高度に保存された非連続の3個のアルギニン残基(R231、R241、R247)が存在し、異なる感受性でトリプシンにより切断される。発現蛋白質を用いた解析から、感染性の獲得にはR247の切断だけで十分であり、残る2個のアルギニン残基の切断はロタウイルス感染には必要でないと推測されている。しかし、全てのアルギニン残基はロタウイルス間できわめて高度に保存されていることから、ウイルス感染において何らかの生物学的意義があるとも推測されてきた。このVP4上の切断領域にさまざまな変異を導入し、組換えロタウイルスの性状を検討した。

### (2) ロタウイルスリアレンジメント変異株 KU-24 の解析

ヒト KU 株の限界希釈から、セグメント11に3塩基欠失(Δ423-425)を起こしたリアレンジメント変異株 KU-24 を分離し、変異型セグメント11のウイルス粒子へのパッケージング効率を解析することで、KU-24 株がNSP5/6 遺伝子を標的とするリバースジェネティクス系を開発する際にヘルパーウイルスとして活用できる可能性を検討した。

### (3) ヘルパーウイルスフリーのリバースジェネティクス系の開発の試み

ロタウイルスのリバースジェネティクス系は、ヘルパーウイルスの利用を必要とし、cDNAのみによる系はまだ開発されていない。哺乳類オルソレオウイルス(レオウイルス)は、10本のdsRNAをゲノムとして保有し、多分節dsRNAウイルスの複製機構および病原性を理解する上で優れたモデルである。近年、cDNAのみから感染性レオウイルスの作製を可能にするリバースジェネティクス系が開発され、従来の系では困難であった任意のウイルスゲノム改変を可能にした。ロタウイルスにおけるヘルパーウイルスフリーのリバースジェネティクス系の開発にあたり、レオウイルスの系はそのモデルとなり得る。このレオウイルスのシステムでは、T7 RNAポリメラーゼを発現している培養細胞にレオウイルスをコードするT7プラスミドを導入することで、感染性レオウイルスを作製できる。これまで、T7 RNAポリメラーゼの供給は、組換えワクシニアウイルス rDIs-T7pol あるいは BHK-T7 細胞の使用に限られてきた。本研究では、さらに幅広く応用できる T7 RNAポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスのリバースジェネティクス系の確立を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) ヘルパーウイルスを用いるリバースジ

## エネティクス系の応用

VP4 上の切断領域のアルギニン残基を単独あるいは同時にヒスチジン残基あるいはリシン残基に置換した組換えロタウイルスをリバースジェネティクス系で作製した。アルギニン残基とリシン残基を各々特異的に切断するアルギニルエンドペプチダーゼとリシルエンドペプチダーゼを用いて、各残基における切断の重要性を検討したところ、発現蛋白質を用いた解析では見出すことのできなかった、R231 における切断もロタウイルス感染性の獲得には必要である可能性が示された。

## (2) ロタウイルスリアレンジメント変異株 KU-24 の解析

リアレンジメント変異株 KU-24 は野生型 KU 株と同程度の増殖能を示したが、ウイルス粒子へのパッケージング効率は、変異型セグメント 11 < 野生型セグメント 11 であることが競合感染実験により示された。KU-24 株の 2 つのリバーストウイルスはともに 423-425 位置にオリジナル配列と類似の遺伝子配列の挿入を有することから、この領域のシーケンスがセグメント 11 のパッケージングに重要なシグナルを含んでいる可能性が示された。したがって、KU-24 株をヘルパーウイルスとして用いることで、パッケージング効率の違いを選択条件とした NSP5/6 遺伝子を標的としたリバースジェネティクス系の開発につながるものと期待される。

## (3) ヘルパーウイルスフリーのリバースジェネティクス系の開発の試み

レオウイルスをコードする 10 個の T7 プラスミドと T7 RNA ポリメラーゼの発現プラスミド (pC-T7pol) を共導入した L929 細胞では、ウイルス量は少ないものの、組換えレオウイルスが回収された (~10 PFU/ml)。次に、インターフェロン産生能が欠損している BHK-21 細胞に、これら 11 個のプラスミドを共導入したところ、組換えレオウイルスの回収効率は著しく上昇した (~10<sup>3</sup> PFU/ml)。こうして、これまで報告されていない、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスのリバースジェネティクス系が確立された。

## 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 8 件)

Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8]

rotavirus strains that have emerged in Myanmar. PLoS One. 2015;10:e0124965.

DOI: 10.1371/journal.pone.0124965. 査読有

Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguchi K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. Vet Microbiol. 2014;174:577-583.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.09.033. 査読有

Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirato H, Tsuji T, Ichinose Y, Taniguchi K: Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. Infect Genet Evol. 2014;27:277-293.

DOI: 10.1016/j.meegid.2014.08.002. 査読有

Komoto S, Kawagishi T, Kobayashi T, Ikizler M, Iskarpatyoti J, Dermody TS, Taniguchi K. A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. J Virol Methods. 2014;196:36-39.

DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.023. 査読有

Matsuoka T, Yodoshi T, Sugai M, Hiyane M, Matsuoka T, Akeda H, Ohfu M, Komoto S, Taniguchi K. A case of mild encephalopathy with a reversible splenic lesion associated with G5P[6] rotavirus infection. Case Rep Pediatr. 2013;2013:197163.

DOI: 10.1155/2013/197163. 査読有

Komoto S, Taniguchi K. Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. Microbiol Immunol. 2013;57:479-486.

DOI: 10.1111/1348-0421.12071. 査読有

Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhoea and encephalopathy in Japan. J Gen Virol. 2013;94:1568-1575.

DOI: 10.1099/vir.0.051011-0. 査読有

Taniguchi K, Komoto S. Genetics and reverse genetics of rotavirus. Curr Opin Virol. 2012;2:399-407.

DOI: 10.1016/j.coviro.2012.06.001. 査読有

### [学会発表](計 9 件)

河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山

和彦、谷口孝喜、タイで検出された G10P[5]ブタロウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014 年 11 月 10 日~2014 年 11 月 12 日

井手富彦、河本聡志、守口匡子、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、Shofiqur Rahman、梅田浩二、Sa Van Nguyen、辻孝雄、谷口孝喜、ミャンマーにおける G12P[6]および G12P[8]ヒトロウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2014 年 11 月 10 日~2014 年 11 月 12 日

河本聡志、川岸崇裕、富田万祐子、小林剛、谷口孝喜、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを用いたレオウイルスの遺伝子操作系、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日

富田万祐子、守口匡子、河本聡志、辻孝雄、ヌグエン・バン・サー、梅田浩二、谷口孝喜、ミャンマーにおける胃腸炎小児患者由来ヒトロウイルスの G タイプおよび P タイプの分布状況、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日

前野芳正、河本聡志、Ernest Wandera、富田万祐子、一瀬休生、谷口孝喜、ケニアで検出された G12 ヒトロウイルス株ゲノムの全塩基配列の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日

河本聡志、ロタウイルス遺伝子操作系の開発とそれを用いた外殻スパイク蛋白質 VP4 の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2012 年 11 月 13 日~2012 年 11 月 15 日

河本聡志、富田万祐子、谷口孝喜、ロタウイルスの VP4 トリプシン開裂部位の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2012 年 11 月 13 日~2012 年 11 月 15 日  
富田万祐子、河本聡志、前野芳正、谷口孝喜、我が国で検出された G5P[6]ヒトロウイルス Ryukyu-1120 株ゲノムの全塩基配列の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2012 年 11 月 13 日~2012 年 11 月 15 日

前野芳正、荻野倫子、河本聡志、和久田光毅、富田万祐子、石川球美子、佐々木潤、守口匡子、谷口孝喜、一瀬休生、ケニアにおけるロタウイルス感染症の分

子疫学、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2012 年 11 月 13 日~2012 年 11 月 15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<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：60367711

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし