

令和元年6月2日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08505

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性および病原性の獲得機構の解明

研究課題名(英文) Establishment and applications of an entirely plasmid-based reverse genetics system

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルスは、地球規模で20万人以上の乳幼児死亡の原因となっている嘔吐下痢症の病原体である。任意の組換えロタウイルスを人工合成することは、新規ロタウイルスワクチンの開発のみならず、腸管指向性ウイルスベクターの開発にもつながる。ヘルパーウイルスを必要としない完全なリバースジェネティクス系の開発に取り組み、大阪大学のグループとの共同研究により、全11本のゲノム分節が全てcDNA由来の感染性ロタウイルスを人工合成する技術の開発に成功した。さらに、ロタウイルスゲノムをコードする11本のプラスミドのみから、しかも効率良くロタウイルスを人工合成する方法の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術は、生体における安全性がまだ確認されていない、動物ウイルス由来蛋白質等を用いることなく、ロタウイルスの人工合成を可能とするので、ロタウイルス増殖機序や病原性発現機構の解明といった基礎研究のみならず、安全性に優れた、次世代ワクチン、新規な腸管細胞への外来遺伝子の伝達技術の開発といった臨床応用の有用性につながる。この新規の手法では、ロタウイルスゲノムをコードする11本のプラスミドを用いるのみであり、簡便かつ安全であり、高効率である点など、実用性の高い手法である。

研究成果の概要(英文)：Reverse genetics is a powerful tool for studying virus replication and pathogenicity and also for vaccine development. We succeeded to develop an entirely plasmid-based reverse genetics system based on the transfection of 14 plasmids (11 rotavirus cDNAs in combination with three helper expression plasmids derived from other viruses). We recently developed an optimized reverse genetics system based on only rotavirus cDNAs (11-plasmid system), in which the concentration of cDNA plasmids containing NSP2 and NSP5 genes is 3- or 5-fold increased in relation to that of the other plasmids. In addition to infectious recombinant rotaviruses expressing fluorescent proteins (EGFP and mCherry), authentic human rotavirus (strain KU (G1P[8])) was also generated with the 11-plasmid system.

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 11-plasmid system NSP2, NSP5 ヒトロタウイルスの人工合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、遺伝子分節交換体(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。しかし、ウイルス感染細胞内で起こる、ウイルス遺伝子と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、実際のウイルス増殖や病原性発現の機構を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、感染性ウイルスを自由自在にcDNAから人工合成することができ、ウイルス増殖や病原性発現の機構を理解するうえ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に、この技術の応用は困難を極めた。2006年によく私たちは、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に由来する組換えロタウイルスを作製すること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(Komoto et al., PNAS, 2006)。

2. 研究の目的

上述のリバースジェネティクス系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目的の組換えロタウイルスを単離するための強力な選択条件(中和モノクローナル抗体、siRNA、温度感受性変異株など)が必要であり、目的とするゲノム分節によってはそもそも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本の遺伝子分節がすべてcDNAに由来する感染性ロタウイルスを人工合成できる技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物ロタウイルスの完全なリバースジェネティクス系の開発

増殖能がきわめて高い、サルロタウイルス SA11-L2 株の全11本の遺伝子分節各々をコードするT7プラスミド(T7 RNAプロモーターを使用)を構築し、T7 RNAポリメラーゼを恒常的に発現するBHK-T7細胞に遺伝子導入することで、感染性ロタウイルス SA11-L2 株の人工合成を試みた。

(2) NSP6発現を欠損した組換えロタウイルスの作製と解析

全11本のロタウイルス遺伝子分節は、基本的に1つのウイルス蛋白質をコードするが、セグメント11は例外で、NSP5とNSP6の2つをコードする。培養細胞で継代したロタウイルス株にNSP6発現を欠損したものがごく少数ながら報告されていることから、*in vitro*におけるロタウイルス増殖にNSP6は必須ではない可能性が示唆されている。一方で、自然界のロタウイルス間ではNSP6発現が完全に保存されていることから、*in vivo*におけるNSP6の重要性が推測されていた。そこで、新たに開発したリバースジェネティクス系を用いてNSP6欠損ウイルスの作製を試みた。

(3) 高効率なリバースジェネティクス系の確立と蛍光蛋白質を発現する感染性ロタウイルスの作製

上述の新規なリバースジェネティクス系の効率はいまだ不十分であった。そこで、各条件を詳細に検討することで、高効率なリバースジェネティクス系の確立を目指した。

(4) ヒトロタウイルスの完全なリバースジェネティクス系の開発

最も重要なヒトロタウイルスは増殖能がきわめて低く、依然としてリバースジェネティクス系の開発は困難であった。そこで、当研究室における過去40年にわたるロタウイルス研究の技術・知識を投入することで、ヒトロタウイルスにおける完全なリバースジェネティクス系の開発を目指した。

4. 研究成果

(1) 動物ロタウイルスの完全なリバースジェネティクス系の開発

SA11-L2株ゲノムをコードする11本のT7プラスミドおよび、動物ウイルス由来の細胞融合性蛋白質とキャッピング酵素を発現するヘルパープラスミド3本のプラスミドを合わせた14本のプラスミドを用いることで、大阪大学のグループとの共同研究により、全11本のゲノム分節全てがcDNA由来の感染性ロタウイルスを人工合成するリバースジェネティクス系の開発に成功した(Kanai et al., PNAS, 2006)。

(2) NSP6発現を欠損した組換えロタウイルスの作製と解析

サル SA11-L2 株およびヒト KU 株のセグメント11について、NSP6を発現欠損した組換えロタウイルスを作製することができた。これらNSP6欠損ウイルスの*in vitro*における増殖能を解析したところ、NSP6はロタウイルス増殖に必須ではないが、感染性を亢進することが明らかとなった(Komoto et al., 2017)。

(3) 高効率なリバースジェネティクス系の確立と蛍光蛋白質を発現する感染性ロタウイルス

の作製

現行リバースジェネティクス系のあらゆる条件を詳細に検討したところ、感染性ロタウイルスの人工合成にはロタウイルスゲノムをコードする 11 本のプラスミドで十分であること、さらに、NSP2 と NSP5 の 2 つの非構造蛋白質をコードする 2 本のプラスミド量を、残る 9 本のプラスミド量の 3 ~ 5 倍に増量することで、感染性ロタウイルスの人工合成効率が飛躍的に向上することを見出した (11-plasmid system) (Komoto et al., 2018)。この改良した、独自のリバースジェネティクス系を用いることで、世界初となる、全長の蛍光蛋白質 (EGFP, mCherry) を安定に発現する組み換えロタウイルスの作製も報告した。

(4) ヒトロタウイルスの完全なリバースジェネティクス系の開発

ロタウイルス胃腸炎患者下痢便中のロタウイルスを効率良く分離する技術 (高濃度のトリプシン添加と回転培養) を利用することで、世界に先駆けてヒトロタウイルス (KU 株: ヒトロタウイルスの中でも最も主要な G1P[8] 株) を人工合成することに成功した (Komoto et al., 2019)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Komoto S, Fukuda S, Kugita M, Hatazawa R, Koyama C, Katayama K, Murata T, Taniguchi K. Generation of infectious recombinant human rotaviruses from just 11 cloned cDNAs encoding the rotavirus genome. *J Virol.* 2019 93(8):e02207-18. 査読有.
DOI: 10.1128/JVI.02207-18

Komoto S, Fukuda S, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K. Generation of recombinant rotaviruses expressing fluorescent proteins using an optimized reverse genetics system. *J Virol.* 2018 92(13):e00588-18. 査読有.
DOI: 10.1128/JVI.00588-18

Komoto S, Kanai Y, Fukuda S, Kugita M, Kawagishi T, Ito N, Sugiyama M, Matsuura Y, Kobayashi T, Taniguchi K. Reverse genetics system demonstrates that rotavirus non-structural protein NSP6 is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol.* 2017 91(21):e00695-17. 査読有.
DOI: 10.1128/JVI.00695-17

Kanai Y, Komoto S, Kawagishi T, Nouda R, Nagasawa N, Onishi M, Matsuura Y, Taniguchi K, Kobayashi T. Entirely plasmid-based reverse genetics for rotaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017 114(9):2349-2354. 査読有.
DOI: 10.1073/pnas.1618424114

[学会発表] (計 5 件)

Fukuda S, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K, Komoto S, Development of efficient and simple reverse genetics system based on only rotavirus cDNAs, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018

河本聡志, ロタウイルスのリバースジェネティクス, ウイルス性下痢症研究会第 29 回学術集会, 2017

Fukuda S, Komoto S, Kanai Y, Kugita M, Kawagishi T, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Matsuura Y, Kobayashi T, Taniguchi K, Rotavirus non-structural protein NSP6 is not essential in cell culture, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017

Komoto S, Fukuda S, Ide T, Kanai Y, Kawagishi T, Matsuura Y, Kobayashi T, Taniguchi K, Generation of recombinant monoreassortant rotaviruses having human strain-derived gene segments, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017

Komoto S, Ide T, Taniguchi K, Rotavirus genomic rearrangement impairs packaging efficiency into progeny viruses despite does not confer growth disadvantage to viruses, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 高効率なロタウイルスの人工合成法

発明者: 河本聡志、谷口孝喜、福田佐織、

権利者: 学校法人藤田学園

種類: 特許

番号: 2018-075381

出願年: 2018

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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) 研究分担者

研究分担者氏名：河本 聡志
ローマ字氏名：KOMOTO, Satoshi
所属研究機関名：藤田医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60367711

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。