医療・ヘルスケア、ワクチン

ヒトロタウイルスのリバースジェネティクス系

微生物病研究所　ウイルス免疫分野
教授 **小林 剛**
Researchmap https://researchmap.jp/virology

研究の概要

ロタウイルスは乳幼児に重篤な下痢症を引き起こすウイルスで、医療の発展が遅れている開発途上国を中心にロタウイルス感染によって年間約20万人が死亡しているとされている。ロタウイルスについては、ウイルス遺伝子を人工的に改変できるリバースジェネティクス系の開発が遅れていたことから、ロタウイルスの研究を進める上で大きな障壁となっていた。本研究では、ヒトロタウイルスの増殖機構を理解するため、ヒトロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発を行った。

研究の背景と結果

リバースジェネティクス系は、RNA ウイルスゲノム由来の核酸を培養細胞に導入し、人工的に任意の組換えウイルスを作製する技術である。11分節の複雑な RNA ゲノムを有するロタウイルスにおいては、実用的なリバースジェネティクス系の開発は遅れていた。しかし、2017年、我々のグループは、サルロタウイルス SA11株の11分節の RNA ゲノムを発現するプラスミドと人工合成を促進する因子として、細胞融合性タンパク質 FAST とワクシニアウイルス由来の RNA キャッピング酵素を培養細胞に同時に導入することで、組換えサルロタウイルスの人工合成に成功した。一方で、ロタウイルスは種特異性が高いことから、サルロタウイルスのリバースジェネティクス系に加えて、ヒトロタウイルス研究の解析に有用なヒトロタウイルスのリバースジェネティクス系の確立が望まれていた。そのため、本研究では世界規模で流行している遺伝子型の一つである G4P[8] 型のヒトロタウイルス（Odelia 株）のリバースジェネティクス系の開発を行った。方法として、Odelia 株由来ウイルスゲノムを抽出し、得られたウイルスゲノム由来 cDNA を T7プロモーターおよび D 型肝炎ウイルスリボザイム配列の間に配置したプラスミド（レスキュープラスミド）を作製した。全11分節の Odelia 株のレスキュープラスミド、細胞融合性タンパク質 FAST、ワクシニアウイルス RNA キャッピング酵素、ロタウイルス NSP2、NSP5発現プラスミドを T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に導入し、培養後、ウイルスのレスキューに成功した（Figure 1）。Odelia株のリバースジェネティクス系を用いて、サルロタウイルス SA11株と Odelia 株とのモノリアソータントウイルスの作製を行った。さらに、宿主免疫の制御活性を有する NSP1タンパク質における様々な変異ウイルスを作製し、ヒトロタウイルス NSP1の C 末端側166アミノ酸残基の領域がウイルス複製において重要な役割を担っていることを明らかにした（Figure 2）。本技術の開発により、ヒトロタウイルスの研究の進展が期待される。

研究の意義と将来展望

ロタウイルス研究では培養細胞で増殖性の高いサルロタウイルスが一般的に解析モデルとして使用されている。しかし、サルロタウイルスとヒトロタウイルスの間ではウイルス学的性状が異なる点も知られており、ヒトロタウイルスの研究を進める上でヒトロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発は重要な研究課題である。本研究で開発に成功したヒトロタウイルスのリバースジェネティクス系により、ヒトロタウイルス遺伝子内に任意の変異を導入することが可能となり、ヒトロタウイルスの増殖機構の解明や、ヒトロタウイルスをベースにした新規ロタウイルスワクチンの開発研究などが飛躍的に進展すると期待される。

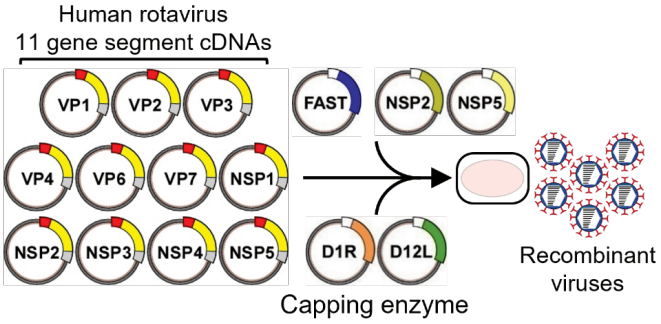

Figure 1. Human rotavirus reverse genetics system

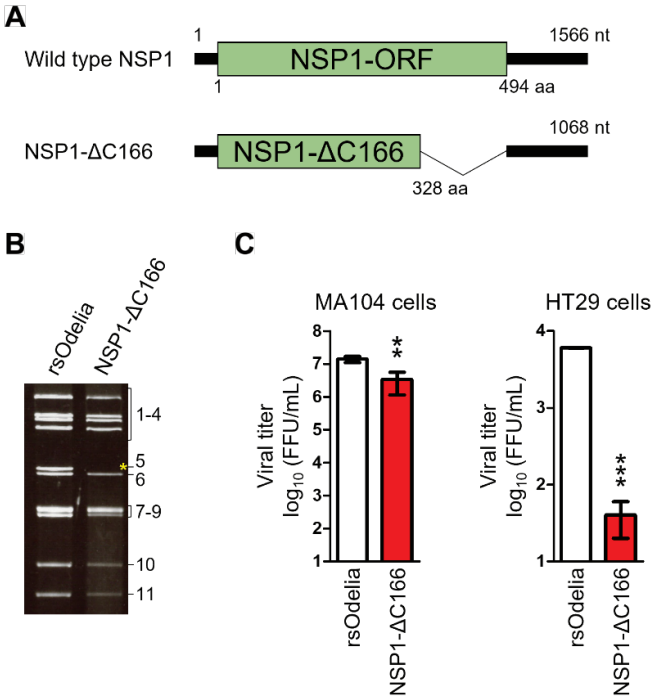

Figure 2. Generation of recombinant viruses lacking C-terminal region of NSP1. (A) Schematic presentation of the plasmid encoding the NSP1 gene used for recovery of recombinant virus. (B) Electropherotype of rsOdelia-NSP1-Δ166. (C) Viral replication of NSP1 mutant in MA104 cells and HT29 cells.

特　許	特許第6762070号、第6944213号
論　文	Kawagishi, Takahiro et al. Reverse genetics system for a human group A rotavirus. J Virol. 2020 Jan 6; 94(2): e00963-19. doi: 10.1128/JVI.00963-19. Kanai, Yuta et al. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Feb 28; 114(9): 2349-2354. doi: 10.1073/pnas.1618424114.
参考 URL	
キーワード	ロタウイルス、ワクチン、人工合成