

総説
----

# 1. ロタウイルスのリバースジェネティクス系 ～感染性ヒトロタウイルスの人工合成～

河本 聡志, 福田 佐織

藤田医科大学医学部ウイルス・寄生虫学講座

ロタウイルスは、乳幼児嘔吐下痢症の病因ウイルスである。1990年にロタウイルスの全ゲノム塩基配列が初めて決定されて以来、ヒトロタウイルスの人工合成を最終目標とする遺伝子操作系(リバースジェネティクス系)の開発は、ロタウイルス研究者の長年の念願であった。2006年によく、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製できるリバースジェネティクス系が初めて開発された。その後10年かかって2017年、ロタウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドに加えて、細胞融合性蛋白質等を発現するヘルパープラスミド3本を合わせた計14本を細胞に導入することで、動物(サル)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が実現した。次いで、11本のウイルス遺伝子のうち、2種類の遺伝子(非構造蛋白質NSP2とNSP5)を他の9本の遺伝子の3倍量として細胞に導入することで、最少因子(ロタウイルスゲノムをコードするT7プラスミド)のみから、しかも高効率にロタウイルスを人工合成することを可能とするリバースジェネティクス系(11-plasmid system)が確立された。一方で、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が、今年(2019年)、当研究室において、11-plasmid systemとロタウイルス患者下痢便中の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)とを利用することで、世界初となる、感染性ヒトロタウイルスの人工合成を報告した。本稿では、ロタウイルス研究者の宿願であった、ヒトロタウイルスの人工合成に至るまでの背景、そして今後の展望を紹介したい。

## 1. はじめに

ロタウイルスは、1973年に急性胃腸炎で入院した幼児の十二指腸生検標本中に発見された、乳幼児嘔吐下痢症の病因ウイルスである<sup>1,2)</sup>。これまでに、ロタウイルスは、ヒトを含めたきわめて多数の哺乳動物および鳥類に急性胃腸炎を起こすウイルスであることが明らかとなった<sup>3)</sup>。ロタウイルスの感染性はきわめて高く、1～100個のビリオン

により感染が成立することから、衛生状態をいかに改善してもロタウイルス感染の制御は困難であり、先進国を含めた世界中のほぼすべての乳幼児が5歳までに感染し、しかも発症する。2006年に2種の弱毒生ワクチンが開発されたものの、開発途上国を中心に、いまだ年間21.5万人の乳幼児が死亡する、最も主要な下痢症ウイルスの1つである<sup>4)</sup>。ロタウイルスはレオウイルス科に属し、11本の2本鎖RNA(double-stranded RNA: dsRNA)をゲノムとして、6個の構造蛋白質(VP1～VP4, VP6, VP7)と6個の非構造蛋白質(NSP1～NSP6)をコードする。ビリオンは直径80～100 nmで、コア、内殻、外殻のカプシド3層で構成される二重殻粒子であり、非エンベロープウイルスである<sup>3)</sup>。

ウイルスゲノムをクローニングしたcDNAから感染性ウイルスを人工合成する技術、すなわち遺伝子操作系(リバースジェネティクス系)は、理論上は(ウイルスにとって致死的な変異を導入しない限りは)任意にゲノムを改変、

### 連絡先

〒470-1192  
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98  
藤田医科大学医学部ウイルス・寄生虫学講座  
TEL: 0562-93-2486  
FAX:  
E-mail: satoshik@fujita-hu.ac.jp

設計したウイルスを人工合成することができ、ウイルス増殖過程や病原性発現機構の解明といった基礎研究のみならず、ワクチンやウイルスベクター開発といった臨床研究においても、きわめて有用な技術である。これまでに、DNA および RNA ウイルスにかかわらず、殆どの主要な病原ウイルスにおいて、リバーシジェネティクス系の開発と応用が活発に行われ、多くの重要な知見と成果が得られてきた。しかしながら、11本もの多分節 dsRNA 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、リバーシジェネティクス系の開発は困難をきわめた<sup>5,6)</sup>。そのため、長らく温度感受性変異株、ゲノム分節の交換体である遺伝子再集合体（リアソータント）、ウイルス蛋白質の単独発現による解析が主に行われてきた。しかし、それぞれの遺伝子ごとに得られた知見を単純に総和しても、それらが複雑に相互作用する存在である、生きた存在としてのウイルスを真に理解することはできない。やはり、ロタウイルスの増殖過程や病原性発現の機構を真に理解するためには、リバーシジェネティクスの研究手法が必要である。

他の主要な病原ウイルスと同様に、1990年にはロタウイルスについても全ゲノム塩基配列（約18.6 k）が初めて決定され<sup>7)</sup>、1994年には *in vitro* ゲノム複製系（ロタピリオンから精製したオープンコア粒子を用いて、cDNA 由来の mRNA から dsRNA 複製を可能とする *in vitro* 複製系）も開発された<sup>8)</sup> ことから、ロタウイルスにおいてもリバーシジェネティクス系が開発される日は近いと期待された。しかしながら、その後10余年もの間、欧米を中心としたロタウイルス主要研究室で精力的な開発競争が行われたにもかかわらず、如何なる成功も報告されなかった。ようやく2006年に、私たちの研究室において、ヘルパーウイルスを用いる初期的な系ではあるが、ロタウイルスでは世界初となるリバーシジェネティクス系の開発を報告した<sup>9)</sup>。この系では、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の作製を可能とした。その後10年かかって2017年、大阪大学のグループと私たちは、増殖能がきわめて高い動物ロタウイルスを用いて、ロタウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドに加えて、細胞融合性蛋白質等を発現するヘルパープラスミド3本を合わせた計14本を細胞に導入することで、動物ロタウイルスにおける完全なリバーシジェネティクス系の開発を報告した<sup>10)</sup>。次いで、ロタウイルスの11本の遺伝子のうち、2種類の遺伝子（非構造蛋白質NSP2とNSP5）を他の9本の遺伝子の3倍量として細胞に導入することで、最少因子（ロタウイルスゲノムをコードするT7プラスミド）のみから、しかも高効率にロタウイルスを人工合成するリバーシジェネティクス系（11-plasmid system）を確立した<sup>11)</sup>。一方で、最も重要なヒトロタウイルスは増殖能がきわめて低く、依然としてリバーシジェネティクス系の確立は困難であったが、本年（2019年）、11-plasmid

system とロタウイルス患者下痢便中の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）とを利用することで、世界初となる、感染性ヒトロタウイルスの人工合成にも成功した<sup>12)</sup>。1973年に遡るヒトロタウイルス発見から約45年を経て、私たちはようやくにして、ヒトロタウイルスを任意に改変、設計できる技術を実現できた。

## 2. ヘルパーウイルスを用いた リバーシジェネティクス系の開発

ロタウイルスが細胞に感染すると、細胞質内で dsRNA ゲノムからプラス鎖 RNA が転写される。このプラス鎖 RNA は、ウイルス蛋白質の mRNA として機能するとともに、新生のコア粒子内に取り込まれて dsRNA 複製の鋳型ともなる。そこで私たちは、ロタウイルス感染細胞内に cDNA 由来のウイルス mRNA を供給すれば、新生コア粒子内に取り込まれて dsRNA ゲノム複製の鋳型となり、cDNA 由来の dsRNA をゲノムとして有する組換えロタウイルスが作製できるのではないかと考えた。そこで、細胞内に cDNA 由来のウイルス mRNA を発現するためのプラスミド（T7 プラスミド）を構築した。ロタウイルス cDNA の上流に T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列、下流に D 型肝炎ウイルス（HDV）リボザイム配列と T7 RNA ポリメラーゼターミネーター配列を配置することで、両末端の塩基配列が真正のロタウイルス mRNA と完全に一致した cDNA 由来ウイルス mRNA を細胞質内に発現させることができる。私たちが以前にサブクローン化していた、きわめて高い増殖能を有するサルロタウイルス SA11-L2 株（G3P[2]）<sup>13)</sup> の VP4 遺伝子（外殻スパイク蛋白質をコード）をコードする T7 プラスミドを構築した。T7 RNA ポリメラーゼを発現させた培養細胞（COS-7）にこの VP4 プラスミドを導入し、そこにヘルパーウイルスとなるヒトロタウイルス KU 株（G1P[8]）<sup>14)</sup> を感染させた。ヘルパーウイルス KU 株に特異的な抗 VP4 中和モノクローナル抗体存在下で、感染 COS-7 細胞ライセートを継代培養したところ、KU 株をバックボーンとして、cDNA 由来の SA11-L2 株 VP4 遺伝子分節をゲノムとして有する、世界初となる組換えロタウイルス（KU//rVP4SA11）が作製された<sup>9)</sup>。当初、このリバーシジェネティクス系の標的遺伝子は構造蛋白質 VP4 のみであったが、組換えロタウイルスを単離するための選択条件を工夫することで、非構造蛋白質 NSP2 と NSP3 にもこの系が適用可能であることが報告された<sup>15,16)</sup>。一方で、このヘルパーウイルスを用いるリバーシジェネティクス系では、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の有無が実験成功の要となり、その条件が確立できたのは、11本のゲノム分節のうちわずか3本に過ぎない。また、ウイルスゲノムへの変異導入で増殖能が低下した組換えロタウイルスの

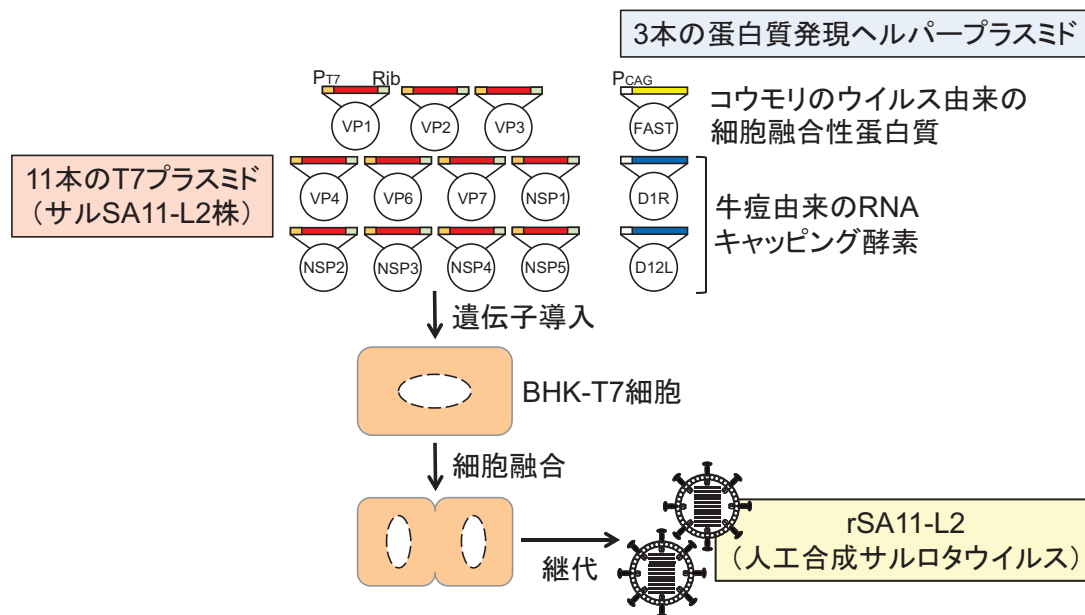


図1 ヘルパープラスミドを利用したロタウイルスのリバースジェネティクス系

ロタウイルスゲノムをコードする 11 本の T7 プラスミドに加えて、コウモリのウイルス由来の細胞融合性蛋白質等を発現するヘルパープラスミド 3 本を合わせた計 14 本を T7 RNA ポリメラーゼを恒常的に発現する BHK-T7 細胞に導入することで、11 本のゲノム分節がすべて cDNA 由来となる組換えロタウイルスが作製される。P<sub>T7</sub>、Rib はそれぞれ T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、HDV リボザイムを示す。(参考文献 10 から改変)

単離はさらに困難であることから、本系では、ロタウイルスゲノムを自由自在には改変、設計することはできず、ヘルパーウイルスを用いない、11 本のゲノム分節のすべてを cDNA から人工合成する、完全なリバースジェネティクス系の開発が切望された<sup>5,6)</sup>。

### 3. ヘルパーウイルスを必要としない リバースジェネティクス系の開発

私たちは、2006 年からヘルパーウイルスを必要としないリバースジェネティクス系の開発にも取り組み、上記のサル SA11-L2 株について、VP4 遺伝子以外の 10 本の遺伝子分節についてもクローニングして各々の T7 プラスミドを構築し、全 11 本の T7 プラスミドを細胞導入することで、ロタウイルス複製を開始させることを試みた。遺伝子導入に用いる培養細胞株の検討を始めとして、さまざまな条件を精力的に試したものの、なかなか成功に至ることはできなかった。2013 年からは共同研究を開始し、大阪大学・小林先生の研究グループと私たちは、最終的に、T7 プラスミド配列の一部を修正するとともに、11 本の T7 プラスミドが 1 つの細胞に同時に導入される確率は相当に低いことから、コウモリのウイルス由来の細胞融合性蛋白質等を発現するヘルパープラスミド 3 本をあわせて計 14 本を培養細胞 (BHK-T7) に遺伝子導入することで、11 本のゲノム分節がすべて cDNA 由来となる組換え動物ロタウイルスの作製がようやく実現した<sup>10)</sup> (図 1)。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開発の突破口を開いた、小林先生らの細胞融合性蛋白質等の使用の意義は大きい。

### 4. 新規なリバースジェネティクス系による NSP6 の解析

全 11 本のロタウイルスゲノム分節は、基本的に 1 つの蛋白質のみをコードするが、セグメント 11 は例外で、非構造蛋白質 NSP5 と NSP6 の 2 つをコードする<sup>3)</sup>。in vitro で継代培養したロタウイルス株のなかには NSP6 発現を欠損したものがごく少数ながらあることから、in vitro におけるロタウイルス増殖に NSP6 は必要でない可能性が示唆されていた<sup>17-19)</sup>。一方で、自然界に存在するロタウイルス株間では、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 の重要性もまた推測されていた。そこで、セグメント 11 へのサイレント変異導入で NSP6 発現を欠損させた組換えロタウイルスの作製が可能かどうかを、新規なリバースジェネティクス系を用いて試みた(図 2)。その結果、NSP6 欠損ウイルス (rSA11-delNSP6) は、親株 (rSA11-L2) に比べて増殖速度が遅くなるものの作製可能であること、すなわち、in vitro におけるロタウイルス増殖に NSP6 は必須ではないことが示された<sup>20)</sup>(図 2, 3)。さらに、rSA11-delNSP6 はマウスを用いた in vivo 実験系で、ウイルス増殖に伴う下痢を誘導することもわかっている (福田ら、論文準備中)。こうして、新規なリバースジェネティクス系を用いることで、従来の手法では全く手の出

表1 最適な遺伝子導入 T7 プラスミド量のスクリーニング (参考文献 11 を改変)

プラスミド量 ( $\mu\text{g}$ ) <sup>a</sup> :												ウイルスレスキュー 効率 <sup>b</sup> (成功 / 実験回数)	ウイルス価 (PFU/ml)
VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	FAST		
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.2	2/3	実験 1: <10 実験 2: <10 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	1/3	実験 1: <10 実験 2: 0 実験 3: 0
<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0	1/3	実験 1: <10 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0.75	0	3/3	実験 1: $6.8 \times 10^5$ 実験 2: $4.3 \times 10^4$ 実験 3: $5.0 \times 10^4$
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0	0/3	実験 1: 0 実験 2: 0 実験 3: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0	3/3	実験 1: $5.8 \times 10^2$ 実験 2: $1.5 \times 10^5$ 実験 3: $1.0 \times 10^2$

<sup>a</sup> 太字は3倍量にした T7 プラスミド

<sup>b</sup> 3回のリバーシジェネティクス実験での組換えロタウイルスレスキュー効率

なかったセグメント 11 に変異を導入することが可能となり、実際のロタウイルス増殖における NSP6 の意義に関して重要な知見が得られた。

### 5. 最少因子を用いた高効率な リバーシジェネティクス系の確立

上述の新規なリバーシジェネティクス系における組換えロタウイルスの作製効率は不十分であり、また、必要とするコウモリのウイルス由来の細胞融合性蛋白質は、生体における安全性がまだ確認されていないため、臨床応用における用いることが難しいと考えられた。そこで私たちは、11

本のロタウイルスゲノムをコードする T7 プラスミドのみからロタウイルスを人工合成できるリバーシジェネティクス系の確立を目指し、各 T7 プラスミドの遺伝子導入する適量を検討するスクリーニング実験を開始した(表 1)。その結果、効率は低いながら、ロタウイルスゲノムをコードする 11 本の T7 プラスミドのみで組換えロタウイルスが作製できること、さらに、2 種類の遺伝子(非構造蛋白質 NSP2 あるいは NSP5)を 3 倍量として細胞に導入することで、組換えロタウイルスが高効率に作製可能であることを見出した(表 1)。ロタウイルス感染細胞内において、NSP2 と NSP5 はペアで viroplasm (ウイルス工場) と呼

表2 リバースジェネティクス系における NSP2 遺伝子と NSP5 遺伝子をコードする T7 プラスミド間の相乗効果 (参考文献 11 を改変)

T7 プラスミド量 ( $\mu\text{g}$ ) <sup>a</sup> :											ウイルスレスキュー 効率 <sup>b</sup> (成功/実験回数)	ウイルス価 (PFU/ml)
VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5		
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	2/6	実験 1: <10 実験 2: 25 実験 3: 0 実験 4: 0 実験 5: 0 実験 6: 0
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>2.25</b>	0.75	0.75	<b>2.25</b>	6/6	実験 1: $3.3 \times 10^6$ 実験 2: $6.5 \times 10^5$ 実験 3: $2.5 \times 10^4$ 実験 4: $3.3 \times 10^5$ 実験 5: $1.0 \times 10^6$ 実験 6: $7.5 \times 10^5$
0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	<b>3.75</b>	0.75	0.75	<b>3.75</b>	6/6	実験 1: $7.5 \times 10^5$ 実験 2: $8.0 \times 10^4$ 実験 3: $1.2 \times 10^6$ 実験 4: $5.3 \times 10^5$ 実験 5: $6.5 \times 10^4$ 実験 6: $2.8 \times 10^5$

<sup>a</sup> 太字は 3 倍量あるいは 5 倍量にした T7 プラスミド

<sup>b</sup> 6 回のリバースジェネティクス実験での組換えロタウイルスレスキュー効率

ばれる, 新生のウイルス遺伝子および蛋白質が集積してウイルス複製の場となる構造体を形成する. そこで, NSP2 遺伝子と NSP5 遺伝子を同時に 3 倍量あるいは 5 倍量とする実験を次に行ってみた. その結果, 3 倍量 < 5 倍量で, 組換えロタウイルスの作製効率はさらに有意に上昇することが明らかとなった (表 2). こうして, 2 種類の遺伝子 (NSP2 と NSP5) を他の 9 本の遺伝子の 3 ~ 5 倍量として細胞に導入することで, 最少因子 (ロタウイルスゲノムをコードする T7 プラスミド) のみから, しかもきわめて高効率に組換えロタウイルスを人工合成することを可能とするリバースジェネティクス系 (11-plasmid system) が確立された<sup>11)</sup> (図 4). 全 11 本の T7 プラスミドを導入した BHK/T7-9<sup>21)</sup> 細胞内では, 2 種類の遺伝子 (NSP2 と NSP5) を他の 9 本の遺伝子の 3 倍量とすることで, ロタウイルス様粒子数の顕著な増加が認められる (図 5).

#### 6. 蛍光蛋白質を発現する組換えロタウイルスの作製

ウイルス研究において, ウイルスが生体内でどの組織でどの細胞に感染しているかを判別することは, 最も重要で基本となる情報であり, 特に, 蛍光蛋白質といったレポーターを発現する組換えウイルスの作製は, ウイルス増殖に関する基礎研究のみならず, 抗ウイルス剤の開発などにおいて大きく貢献している<sup>22, 23)</sup>. ロタウイルス分野においても, レポーターを発現する組換えロタウイルスの作出を目標として, ウイルスゲノムへの外来遺伝子の挿入について多大な努力がなされてきた. まず, 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用いて, FLAG タグ塩基配列 (24 塩基) あるいはコオロギ麻痺ウイルス由来の IRES 塩基配列 (190 塩基) を NSP2 遺伝子分節の 3' 側非翻訳領域 (UTR) にアウトフレームで挿入した組換えロタウイルスの作製が報告された<sup>24)</sup>. 次いで, 新規なリバースジェネティクス系を用いて, split-GFP 塩基配列 (48 塩基) あるいは NanoLuc Luciferase 遺伝子 (516 塩基) を NSP1 蛋白質の C 末側に融合させる形でインフレームでの挿入が報告された<sup>10)</sup>. 一方で, 全長の蛍光蛋白質といった, さらに大きなサイズの外来遺伝子をロタウイルスゲノムに挿入することは, リバースジェネティクス系の効率が不十分なこともあり, 成功に至っていなかった. そこで私たちは, 上述の 11-plasmid system を活用することで, 蛍光蛋白質のなかでも最も汎用される EGFP 遺伝子 (720 塩基) と mCherry 遺伝子 (708 塩基) のロタウイルスゲノムへの挿入を試みた. 蛍光蛋白質遺伝子を挿入する遺伝子分節の候補として, NSP1 遺伝子が考えられた. それは, 私たちが以前にウイルス分離していた, 遺伝子再編集 (リアレンジメント) を起こしたウシロタウイルス A5-16 株が, NSP1 遺伝子上の 500 塩基を欠損しているからである<sup>25)</sup>. そこで, リアレンジメントを起こした A5-16 株の NSP1 遺伝子構造を模した SA11-L2 株の NSP1 遺伝子をコードした T7 プラスミドを構築し, この 500 塩基の欠損領域に EGFP 遺伝子または mCherry 遺伝子を挿入した 2 種の T7 プラスミド (pT7/NSP1-EGFP, pT7/NSP1-mCherry) を構築した (図 6A). これら蛍光蛋白質をコードする NSP1

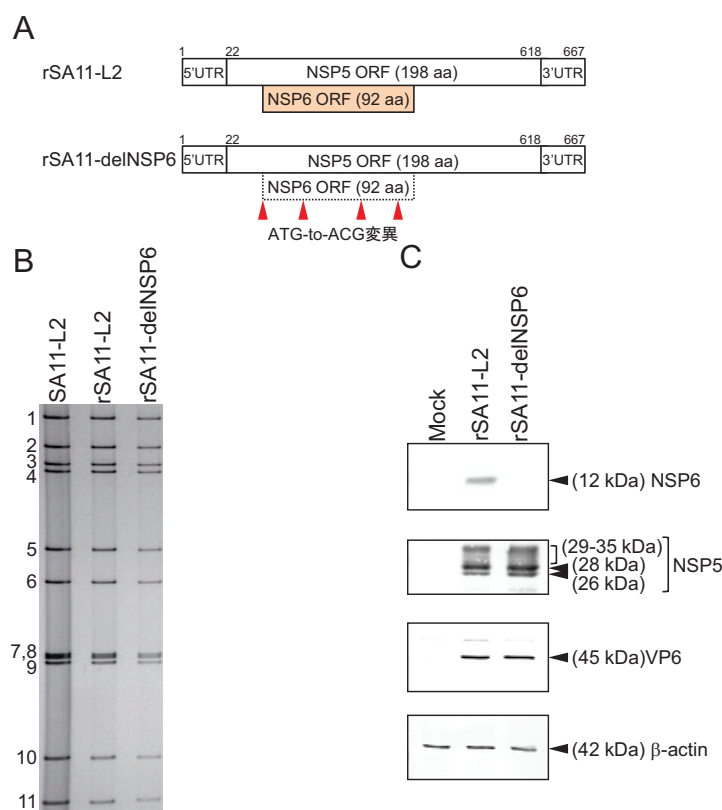


図2 NSP6欠損口タウウイルスの作製

(A) セグメント11へのサイレント変異導入でNSP6発現を欠損させた組換え口タウウイルス(rSA11-delNSP6)の作製。(B) rSA11-delNSP6のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)像。(C) rSA11-delNSP6のウイルス蛋白質発現。rSA11-delNSP6はNSP6発現を欠損している。(参考文献20から改変)

遺伝子のT7プラスミドと他の10本のT7プラスミドを用いて、11-plasmid systemで組換え口タウウイルスの作製を試みたところ、緑色のEGFPあるいは赤色のmCherryを発現する、世界初となる、全長の蛍光蛋白質を発現する組換え口タウウイルス(rSA11-EGFP, rSA11-mCherry)が作製できた<sup>11)</sup>(図6B, C)。rSA11-EGFPやrSA11-mCherryの使用は、生体組織を固定することなく、口タウウイルス増殖部位を蛍光で発色させることができるので、*in vitro*や*in vivo*におけるライブイメージングが容易に可能となった。一方で、レポーターを発現する組換えRNAウイルスの多くでは、ウイルス継代に伴ってレポーター遺伝子が徐々に脱落することが知られているが、rSA11-EGFPとrSA11-mCherryは継代を10代繰り返してもウイルスゲノム構造には何ら変化が起こらず、挿入したレポーター遺伝子は依然として安定してウイルスゲノム内に保持される<sup>11)</sup>。このことは、自然界で発生したリアレンジメント株であるA5-16のNSP1遺伝子構造を模したためであると考えられる。同様に、レポーター遺伝子以外にも様々な外来遺伝子をNSP1遺伝子上のこの領域に挿入することが可能である。これまでに、腸管粘膜を標的器官とするノロウイルス、性器粘膜を侵入門戸とするヒト免疫不全ウイルス(HIV)、

呼吸器粘膜を標的器官とするインフルエンザウイルスの感染防御抗原をそれぞれ発現する組換え口タウウイルスが、11-plasmid systemを活用することですでに作製できており、これら外来抗原を発現する組換え口タウウイルスの経口投与による、腸管粘膜刺激を介した、異種病原体に対する粘膜免疫誘導口タウウイルスベクターの開発が期待される。

## 7. ヒト口タウウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の確立

最も重要なヒト口タウウイルスには、ウイルス学的形質において、動物口タウウイルスとは大きく異なる、少なくとも以下の特徴が存在する。(1) 感染防御抗原であるVP7とVP4上の中和エпитープ抗原構造は、ヒト口タウウイルスと動物口タウウイルスとは大きく異なる<sup>26-29)</sup>。(2) ヒト口タウウイルスに特異的なレセプター認識パターンがあり、ヒト口タウウイルスは、GM1ガングリオシドや組織血液型抗原(HBGA)などの分子内に埋もれた形や修飾された形のシアル酸に結合するが、動物口タウウイルスは、分子表面に露出したシアル酸と結合する<sup>30-37)</sup>。(3) 口タウウイルス増殖において、ビリオン上のスパイク蛋白質VP4が腸管内腔のトリプシンで切断活性化されることで口タウウイルスが

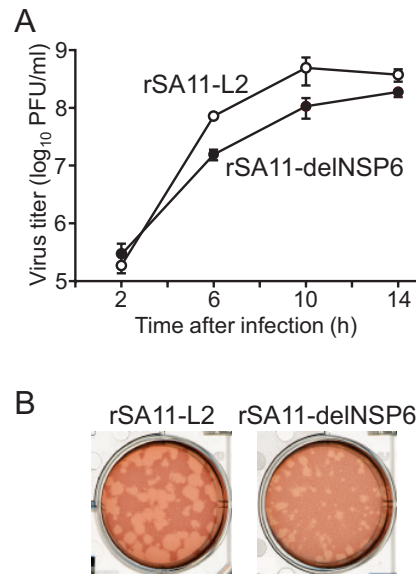


図3 NSP6欠損ロタウイルスの増殖能

(A) rSA11-delNSP6の一段階増殖曲線. rSA11-delNSP6は親株rSA11-L2に比べて増殖速度が遅い. (B) rSA11-delNSP6のプラーク形成能. 増殖曲線の結果と一致して, rSA11-delNSP6は親株SA11-L2に比べて減弱したプラーク形成能を示す. (参考文献20から改変)

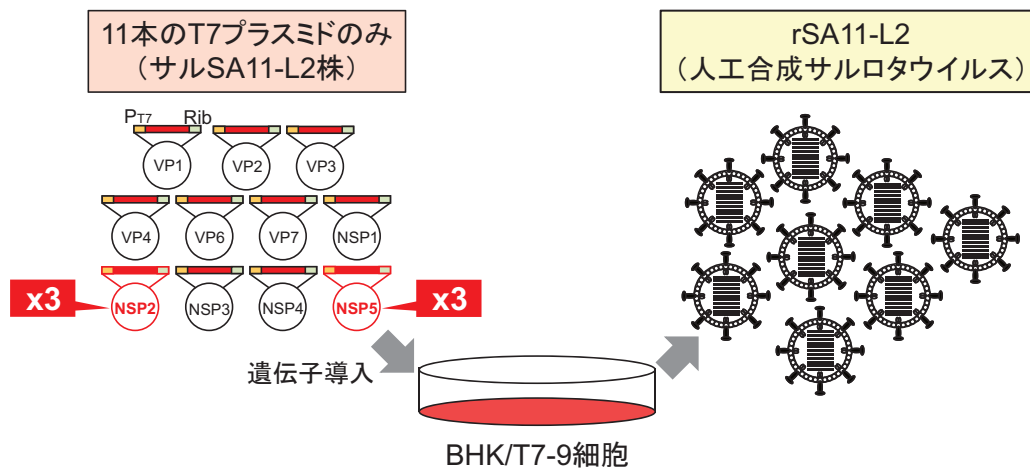


図4 最少因子を用いた高効率なロタウイルスのリバースジェネティクス系

ロタウイルスゲノムをコードする11本の遺伝子のうち, 2種類の遺伝子(非構造蛋白質NSP2とNSP5)を他の9本の遺伝子の3倍量としてBHK/T7-9細胞に導入することで, 最少因子(ロタウイルスゲノムをコードするT7プラスミド)のみから, しかも高効率にロタウイルスが作製できる. (参考文献11から改変)

感染性を獲得する過程があるが, この切断活性化に必要なトリプシン濃度は, ヒトロタウイルス>動物ロタウイルスである<sup>38,39</sup>. (4) ヒトロタウイルスの増殖能は, *in vitro*と*in vivo*ともに, 動物ロタウイルスよりもきわめて低い<sup>40</sup>. 特に, ヒトロタウイルスの増殖能が低いという点は, ヒトロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系の開発においてはきわめて不利に働く. こうして, 依然としてヒトロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系の開発は困難であった. しかしながら, 自然なヒトロタウイルスの

感染, 増殖や病原性発現の機構を理解するためには, やはりヒトロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系の確立は必須であると考えられた. そこで私たちは, やはり当研究室で分離していた上記のヒトロタウイルスKU株(ヒトロタウイルスのなかでも最もコモンであり, 最も重要なG1P[8]株)について, ウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドを構築し, 11-plasmid systemを適用することで, 感染性ヒトロタウイルスの人工合成を試みた. サルロタウイルスのリバースジェネティクス系開発におい

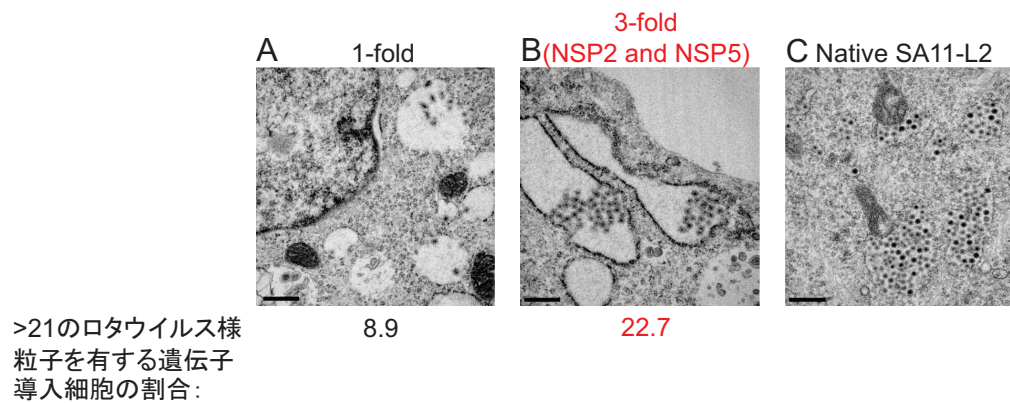


図5 ロタウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドを導入したBHK/T7-9細胞内の電気顕微鏡像

ロタウイルスゲノムをコードする11本のT7プラスミドを導入したBHK/T7-9細胞の小胞体内には、ロタウイルス様粒子が認められる。2種類の遺伝子（NSP2とNSP5）を他の9本の遺伝子の3倍量にすると、ロタウイルス様粒子の数は顕著に増加する。スケールは500 nm。（参考文献11から改変）

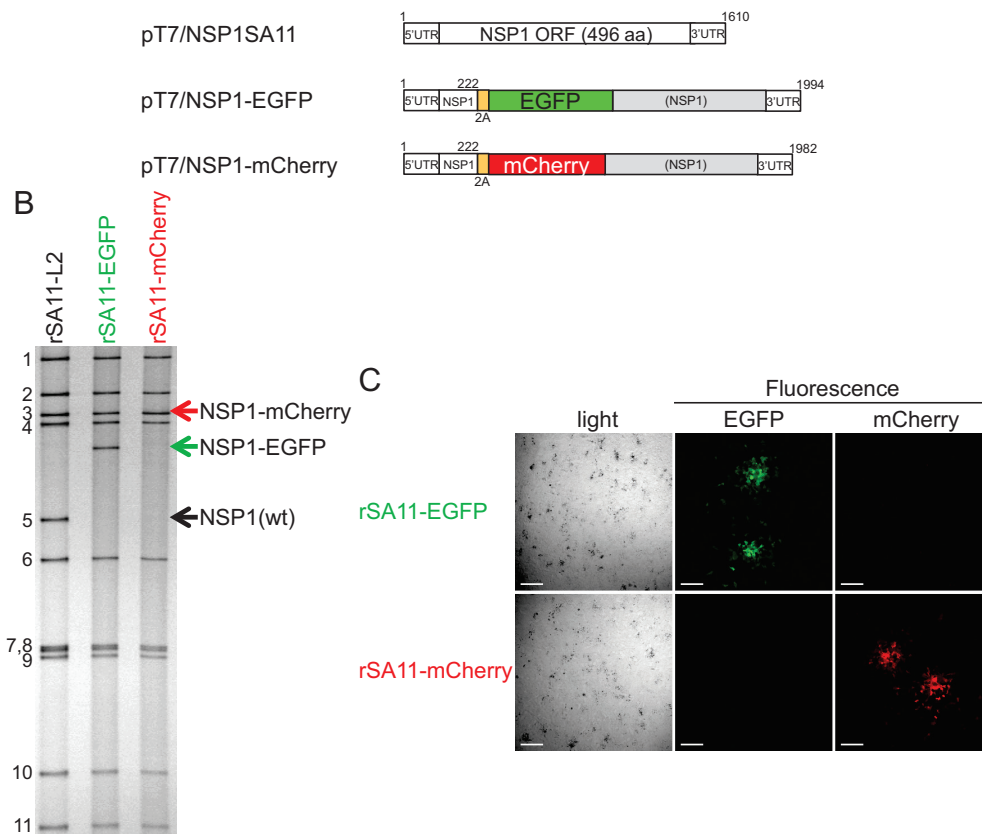


図6 蛍光蛋白質を発現するロタウイルスの作製

(A) リアレンジメント株であるウシA5-16株のNSP1遺伝子構造を模したSA11-L2株NSP1遺伝子への蛍光蛋白質（EGFP, mCherry）遺伝子の挿入。2Aは2Aプロテアーゼ配列を示す。(B) 11-plasmid systemを用いて作製したrSA11-EGFP, rSA11-mCherryのPAGE像。(C) rSA11-EGFP, rSA11-mCherryを感染させたCV-1細胞におけるEGFP, mCherryの蛍光像。スケールは200 nm。（参考文献11から改変）

では、T7プラスミドの塩基配列がきわめて重要であった経験から、北里大学・片山先生の研究グループとの共同研究で、次世代シーケンシング技術を駆使することで、KU

株ゲノムをコードするT7プラスミドの塩基配列を高い信頼性を持つものとした。11-plasmid systemは高効率なシステムではあるが、ヒトロタウイルスの人工合成は一筋縄



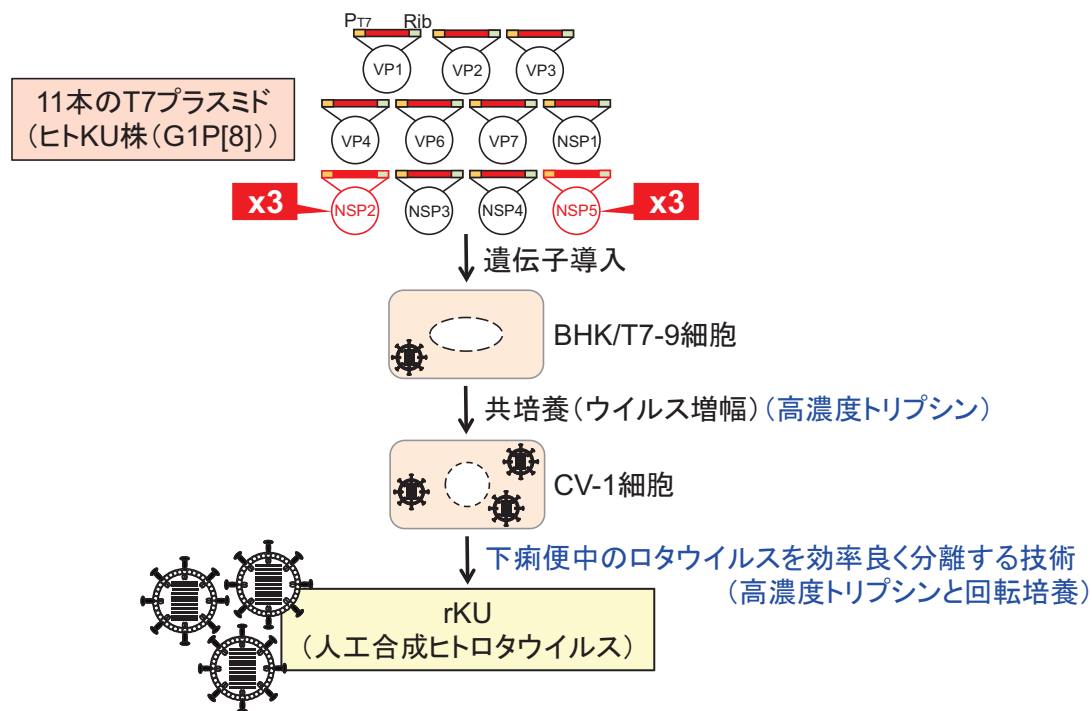


図7 ヒトロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の確立

ヒトロタウイルスゲノムをコードする11本の遺伝子のうち、NSP2とNSP5遺伝子を他の9本の遺伝子の3倍量にして(11-plasmid system)、さらに、ロタウイルス患者下痢便中の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、感染性ヒトロタウイルスが作製される。(参考文献12から改変)

にはいかなかった。そこで、私たちが普段行っていた、ロタウイルス患者下痢便中の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)をあわせて利用したところ、世界初となる、感染性ヒトロタウイルスの人工合成に成功した<sup>12)</sup>(図7)。こうして、11-plasmid systemを工夫することで、ロタウイルス研究者の宿願であった、ヒトロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系をついに確立することができた。

### 8. おわりに

ロタウイルス研究では、1973年のヒトロタウイルス発見からの約45年間で、多くの重要なウイルス学的知見が蓄積されてきた。それら研究の成果として、2006年に認可された2種の弱毒生ロタウイルスワクチン(Rotarix, RotaTeq)の優れた有効性が報告されている<sup>41-43)</sup>。しかしながら、これらワクチン株の弱毒の分子基盤は明らかではない。その他にも、ロタウイルスには数多くの不明な点が存在する。例えば、11本の分節dsRNAが1本ずつウイルス粒子にパッケージングされるメカニズムはどうなっているのか、viroplasm内でウイルス遺伝子とその産物の相互作用はどのようになっているのか、その際に宿主因子はどのように関与しているのか、そして一部のウイルス蛋白質

はリン酸化や糖鎖付加といった修飾を受けるが、その意義は何かなど、ロタウイルスには明らかにしなければならない謎が数多く残されている。また、2種類の遺伝子(非構造蛋白質NSP2とNSP5)を他の9本の遺伝子の3~5倍量として細胞に導入することで、リバーシジェネティクス系の効率が亢進する分子機構についても詳細は不明のままである。私たちは、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試みを開始してから約20年かかって、ようやく、ロタウイルス研究者の宿願であった、ヒトロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系まで確立できた。今後、この技術を駆使することで、ヒトロタウイルスの感染、増殖や病原性発現の機構の詳細を明らかにしていくことは、安全性に優れた次世代ワクチンの開発に繋がると期待される。また、本技術は生体における安全性がまだ確認されていない、コウモリのウイルス由来の蛋白質等を用いることなく、最少因子(ロタウイルスゲノムをコードするT7プラスミド)のみからロタウイルスの人工合成を可能とするので、次世代ワクチン開発のみならず、安全性に優れた、腸管細胞を特異的に標的とする、新規な遺伝子治療や外来遺伝子の伝達技術の開発(ロタウイルスベクター開発)といった臨床応用が大いに期待できる。

## 謝 辞

本研究は、藤田医科大学の谷口孝喜名誉教授のご指導のもと、多くの先生方のご指導、ご支援、ご協力の上で推進して参りました。ここに深く感謝申し上げます。執筆の機会を与えてくださいました村田貴之先生、長谷川秀樹先生に厚く御礼申し上げます。

## 利益相反に関する開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

## 参考文献

- 1) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283, 1973.
- 2) Flewett TH, Bryden AS, Davies H.: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497, 1973.
- 3) Estes MK, Greenberg HB.: Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 6th ED. Knipe DM, Howley PM (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1347-1401, 2013.
- 4) Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network.: Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clin Infect Dis* 62:S96-S105, 2016.
- 5) Komoto S, Taniguchi K.: Genetic engineering of rotaviruses by reverse genetics. *Microbiol Immunol* 57:479-486, 2013.
- 6) Taniguchi K, Komoto S.: Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2:399-407, 2012.
- 7) Mitchell DB, Both GW.: Comparison of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* 177:324-331, 1990.
- 8) Chen D, Zeng CQ, Wentz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF.: Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol* 68:7030-7039, 1994.
- 9) Komoto S, Sasaki J, Taniguchi K.: Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4646-4651, 2006.
- 10) 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* 114:2349-2354, 2017.
- 11) 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* 92:e00588-18, 2018.
- 12) 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* 93:e02207-18, 2019. \*Co-first authors.
- 13) Taniguchi K, Nishikawa K, Kobayashi N, Urasawa T, Wu H, Gorziglia M, Urasawa S.: Differences in plaque size and VP4 sequence found in SA11 virus clones having simian authentic VP4. *Virology* 198:325-330, 1994.
- 14) Urasawa S, Urasawa T, Taniguchi K, Chiba S.: Serotype determination of human rotavirus isolates and antibody prevalence in pediatric population in Hokkaido, Japan. *Arch Virol* 81:1-12, 1984.
- 15) Trask SD, Taraporewala ZF, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT.: Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18652-18657, 2010.
- 16) Troupin C, Dehee A, Schnuriger A, Vende P, Poncet D, Garbarg-Chenon A.: Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol* 84:6711-6719, 2010.
- 17) López T, Rojas M, Ayala-Bretón C, López S, Arias CF.: Reduced expression of the NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* 86:1609-1617, 2005.
- 18) Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK.: Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* 181:295-304, 1991.
- 19) Torres-Vega MA, González RA, Duarte M, Poncet D, López S, Arias CF.: The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* 81:821-830, 2000.
- 20) 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* 91:e00695-17, 2017.
- 21) Ito N, Takayama-Ito M, Yamada K, Hosokawa J, Sugiyama M, Minamoto N.: Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol Immunol* 47:613-617, 2003.
- 22) Breen M, Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L.: Replication-competent influenza A viruses expressing reporter genes. *Viruses* 8:E179, 2016.
- 23) Rostad CA, Currier MC, Moore ML.: Fluorescent and bioluminescent reporter myxoviruses. *Viruses* 8:E214, 2016.
- 24) Navarro A, Trask SD, Patton JT.: Generation of genetically stable recombinant rotaviruses containing novel genome rearrangements and heterologous sequences by reverse genetics. *J Virol* 87:6211-6220, 2013.
- 25) Taniguchi K, Kojima K, Urasawa S.: Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides

- 153 to 155. *J Virol* 70:4125-4130, 1996.
- 26) Hoshino Y, Kapikian AZ.: Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl* 12:99-111, 1996.
  - 27) Morita Y, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S.: Analysis of serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus by the use of neutralizing monoclonal antibodies and antigenic variants. *J Gen Virol* 69:451-458, 1988.
  - 28) Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T.: Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* 66:1045-1053, 1985.
  - 29) Taniguchi K, Morita Y, Urasawa T, Urasawa S.: Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J Virol* 61:1726-1730, 1987.
  - 30) Barbé L, Le Moullac-Vaidye B, Echasserieau K, Bernardeau K, Carton T, Bovin N, Nordgren J, Svensson L, Ruvoën-Clouet N, Le Pendu J.: Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Sci Rep* 8:12961, 2018.
  - 31) Böhm R, Fleming FE, Maggioni A, Dang VT, Holloway G, Coulson BS, von Itzstein M, Haselhorst T.: Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nat Commun* 6:5907, 2015.
  - 32) Delorme C, Brüssow H, Sidoti J, Roche N, Karlsson KA, Neeser JR, Teneberg S.: Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *J Virol* 75:2276-2287, 2001.
  - 33) Guo CT, Nakagomi O, Mochizuki M, Ishida H, Kiso M, Ohta Y, Suzuki T, Miyamoto D, Hidari KI, Suzuki Y.: Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J Biochem* 126:683-688, 1999.
  - 34) Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV.: Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type hist-blood group antigen. *Nature* 485:256-259, 2012.
  - 35) Hu L, Ramani S, Czako R, Sankaran B, Yu Y, Smith DF, Cummings RD, Estes MK, Venkataram Prasad BV.: Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nat Commun* 6:8346, 2015.
  - 36) Le Pendu J, Nyström K, Ruvoën-Clouet N.: Host-pathogen coevolution and glycan interactions. *Curr Opin Virol* 7:88-94, 2014.
  - 37) Yu X, Coulson BS, Fleming FE, Dyason JC, von Itzstein M, Blanchard H.: Novel structural insights into rotavirus recognition of ganglioside glycan receptors. *J Mol Biol* 413:929-939, 2011.
  - 38) Kitaoka S, Suzuki H, Numazaki Y, Konno T, Ishida N.: The effect of trypsin on the growth and infectivity of human rotavirus. *Tohoku J Exp Med* 149:437-447, 1986.
  - 39) Offit PA, Clark HF, Stroop WG, Twist EM, Plotkin SA.: The cultivation of human rotavirus, strain 'Wa', to high titer in cell culture and characterization of the viral structural polypeptides. *J Virol Methods* 7:29-40, 1983.
  - 40) Ramig RF.: The effects of host age, virus dose, and virus strain on heterologous rotavirus infection of suckling mice. *Microb Pathog* 4:189-202, 1988.
  - 41) Burnett E, Jonesteller CL, Tate JE, Yen C, Parashar UD.: Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J Infect Dis* 215:1666-1672, 2017.
  - 42) Jonesteller CL, Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD.: Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006-2016. *Clin Infect Dis* 65:840-850, 2017.
  - 43) Leshem E, Lopman B, Glass R, Gentsch J, Bányai K, Parashar U, Patel M.: Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systemic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:847-856, 2014.

# Reverse genetics of rotaviruses: Generation of recombinant human rotaviruses from just 11 cDNAs encoding the rotavirus genome

**Satoshi KOMOTO and Saori FUKUDA**

Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine  
E-mail: satoshik@fujita-hu.ac.jp

An entirely plasmid-based reverse genetics system for animal rotavirus was established very recently. We improved the reverse genetics system to generate recombinant rotavirus by transfecting only 11 T7 plasmids for its 11 genes under the condition of increasing the ratio (3- or 5-fold) of the cDNA plasmids for NSP2 and NSP5 genes (11-plasmid system). Utilizing this highly efficient system, we engineered the first infectious recombinant rotaviruses harboring fluorescent (EGFP and mCherry) protein genes. In addition to these recombinant animal viruses, the first infectious recombinant human rotavirus (strain KU (G1P[8])) was also generated with the 11-plasmid system with some modifications. The availability of recombinant human rotaviruses will provide a genetic platform for a better understanding of the replication, pathogenicity, and other biological characteristics of this medically important virus and enable the rational development of next-generation human rotavirus vaccines.