

# 牛トロウイルスのリバースジェネティクスの確立

氏 家 誠

日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医感染症学研究室 准教授

日獣生大研報 71, 1-2, 2023.

## 要 旨

試験管内で合成したウイルス遺伝子を細胞に導入して、感染性ウイルスを人工合成する技術を「リバースジェネティクス (RG)」と呼びます。この技術を用いると、ウイルスがなぜ病気を起こすのか、ウイルスの増殖を止めるにはどのような薬を作れば良いのかなどを、ウイルスゲノムを直接操作して研究できるようになり、ワクチンや治療薬の開発を飛躍的に進展させることができます。このため RG は、現代のウイルス学において最も重視されている技術の一つです。本研究では、この技術を使って世界で初めて牛トロウイルス (BToV) の人工合成に成功しました。今回、確立した牛トロウイルスの RG によって、BToV ゲノムを自由に改変できるようになり、ウイルスの増殖機構の解明や新規ワクチン開発などが飛躍的に進展することが期待されます。

## はじめに

牛トロウイルス (BToV) は、ニドウイルス目トバニウイルス科トロウイルス (ToV) 亜科に属する、エンベロープを持つ 1 本鎖プラス鎖 RNA ウイルスです。BToV は仔牛の下痢の原因ウイルスであり、1979 年にアメリカで発見されて以来、日本を含む世界各国で検出されています。ToV は、以前はコロナウイルス (CoV) 科に属していたため、ToV と CoV は見た目も性質もよく似ています。しかしながら、その注目度は大きく異なり、CoV は新型コロナを初めとして医学や獣医学領域で重要なウイルスを多く含むため、広く研究されてきました。一方、ToV は通常無症状か軽症なためあまり注目されず、ほとんど研究されてきませんでした。実際、発表論文数を比較してみると、CoV 科に関する論文は、新型コロナが流行する以前でも約 16,500 報あるのに対して、ToV は現在までにわずか 242 報しかなく、超マイナーウイルスであることがわかります。本学着任前の著者は、インフルエンザや CoV の研究をしていましたが、本学着任後は激しい競争をさけるために、競争相手の少ないこの超マイナーウイルスを研究対象の一つに加えることにしました。

## 牛トロウイルスのリバースジェネティクス (RG) の確立

トロウイルスを研究対象にすれば、激しい競争から離脱し

てのんびり研究できると思ったのですが、誰も扱っていないウイルスであったため、確立されたアッセイ系や各種抗体がなく、興味深いデータは得られるもののそれ以降の研究が進まない状況が続きました。特に、ToV のリバースジェネティクス (RG) は極めて困難であるため、RG が確立されておらず、これも研究の大きな障壁となっていました。実は RG の難易度は、ウイルス科によって大きく異なり、例えば RNA ウイルスの中で最もシンプルなピココロナウイルス科の RG は 1981 年に成功したのに対し、最大の RNA ゲノムを持つ CoV 科の RG はその 19 年後の 2000 年に成功しました。CoV 科の RG は 2 つの主流な方法があり、全長ゲノムを BAC (大腸菌人工染色体) に組み込み細胞に導入する方法 (Enjuanes 法)<sup>1)</sup> と、数個の断片に分けた遺伝子を試験管内でつなぎ合わせ、そこからウイルス遺伝子を転写し細胞に導入する方法 (Baric 法)<sup>2)</sup> があります。理屈だけ聞くと簡単ですが、CoV 科の RG の難しさは有名で、例えば Baric 法ではラボ内で同じ材料と同じ試薬を使いながら、実際に操作できるのは職人技をもつ古参の研究者のみといった具合です。このため、CoV によく似た ToV も、RG が極めて困難であると言われていました。

転機が訪れたのは、大阪大学微生物病研究所の神谷亘先生 (現群馬大学大学院医学系研究科 生体防御学講座 教授) にお会いしたことで、神谷先生は国内で初めて Enjuanes 法を使って猫コロナの RG に成功しました<sup>3)</sup>。BToV の RG について相談すると、共同研究者として全面的にサポートして下さることになり、さらに、このころ、2 人の熱心で優秀な学生 (江藤由佳さんと漆山尚也さん) に会うことができました。そこで、機は熟したと感じ、45 年かかることを覚悟して着手したのです。幸いにも、神谷先生のサポートと学生らの甚大な努力のおかげで、わずか 2 年ほどで BToV の RG に成功しました。このように書くと順調に進んだように見えますが、BToV のゲノムは 30kb ほどあり、Enjuanes 法ではこれを 10 断片に分けて、大腸菌内の相同組み換えを利用して BAC に組み込んでいきます。1 断片組み込むのに約 2 週間かかるため、なんのトラブルもなく休まず働いても 5-6 か月かかる大仕事です。学生らは実習・講義・定期試験の合間を縫って、1 年半ほどの驚異的なスピードで全ゲノムの組み込みを終わらせました。

ところが、期待に胸を膨らませて行った最初の実験では、人工ウイルスを作ることができず、ひどく落胆します。あとで理由が判明するのですが、BToV のゲノムの一部は大腸菌に強い毒性を持つため、この毒性を中和するために大腸菌由来の遺伝子が意図しない形で BToV ゲノムに挿入されました。そこで、この大腸菌由来の余分な遺伝子を除去するために、様々な方法をトライするのですが、何をやっても上手く行かず関係者全員の心が折れ始めた半年後ようやく成功したのです。このようなわけで、2年かかった RG の最後の半年間は心身ともに疲弊することになりました。幸いにも、苦勞して確立した RG は、様々な仕事に応用でき (レポーター遺伝子発現 BToV やウイルスタンパク質の機能解析など)<sup>45)</sup>、現在は RG を使った次世代ワクチンの開発なども手掛けており、今後も研究の幅が大きく広がっていきそうです。

### さいごに

先日、とある学会の会場で、当研究室出身の学生 (東京大学大学院 岩田修二さん) にこんなことを言われました。「僕が、研究室見学に行った時に (おそらく 7-8 年前に)、氏家先生が『難しいけど、トロウイルスのリバースジェネティクスにチャレンジしてみたい』と言っていたのをよく覚えています。成功して本当に良かったですね。おめでとうございます。できることが広がって、今の学生が本当にうらやましいです。」と告げられ、とても嬉しく思いました。また、ウイルス学の分野では、Journal of Virology (J.Virol) がトップジャーナルの一つとして認識されていますが、責任著者として J.Virol に研究成果を載せることを目標にしていました。目標達成にずいぶん時間がかかりましたが、今回の RG 関連の仕事で、2報の J.Virol に掲載<sup>45)</sup> することができ、これも本当に嬉しかったです。

我々が2年間かかった BToV の RG ですが、技術は日進月歩であり、新型コロナウイルスの RG には新しい技術が開発され、わずか1か月で RG が確立されました<sup>6)</sup>。(この技術を使えば、ToV も理論上は1か月でできます!) その後も、簡便な RG 法が開発され続けています<sup>7)</sup>。とはいえ、ToV は依然として超マイナーウイルスであるため、BToV の RG にチャレンジするモノ好きな研究者はおらず、当分この技術は我々の研究室だけで独占できそうです。

最後に、著者は ToV 研究と並行して CoV 研究も続けており、最近では共著ながらも大変興味深い仕事に携わることができました<sup>8,9)</sup>。今後も、ToV や CoV 研究において、質の高い研究が行えるように努力していきたいです。

### 謝 辞

この度は名誉ある梅野信吉賞を頂きまして、大変光栄に存じます。受賞に際しましては清水学長をはじめ、選考委員会の先生方、本賞へのご推薦をいただきました田中良和教授、

さらには副賞を贈呈いただきました同窓会の皆様に謹んでお礼申し上げます。本研究にあたり、神谷亘教授 (群馬大学)、Enjuanes 教授 (CNB-CSIC) および田口文広前教授からは多くの助言と励ましを頂き心から感謝いたします。また、本研究は、卒業生の江藤由佳さんおよび漆山尚也さんの両学生が中心となって行い、その他多くの卒業生が関与してくださいました。彼らの知恵と尽力に、心より感謝いたします。最後に、日々の研究を見守ってくれる家族に心よりお礼いたします。

### 文 献

- 1) Almazán F, González JM, Pénczes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Durán J, and Enjuanes L. (2000) Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5516-21.
- 2) Yount B, Curtis KM, and Baric RS. (2000) Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol.* 74:10600-11.
- 3) Terada Y, Kuroda Y, Morikawa S, Matsuura Y, Maeda K, and Kamitani W. (2019) Establishment of a Virulent Full-Length cDNA Clone for Type I Feline Coronavirus Strain C3663. *J Virol.* 93:e01208-19.
- 4) Ujike M, Etoh Y, Urushiyama N, Taguchi F, Asanuma H, Enjuanes L, and Kamitani W. (2022) Reverse Genetics with a Full-Length Infectious cDNA Clone of Bovine Torovirus. *J Virol.* 96:e0156121.
- 5) Ujike M, Kawachi Y, Matsunaga Y, Etoh Y, Asanuma H, Kamitani W, and Taguchi F. (2021) Characterization of Localization and Export Signals of Bovine Torovirus Nucleocapsid Protein Responsible for Extensive Nuclear and Nucleolar Accumulation and Their Importance for Virus Growth. *J Virol.* 95:e02111-20.
- 6) Thi Nhu Thao T, Labrousseau F, Ebert N, V'kovski P, Stalder H, Portmann J, (他 21 名), and J. Thiel V. (2020) Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature.* 582:561-565.
- 7) Torii S, Ono C, Suzuki R, Morioka Y, Anzai I, Fauzyah Y, Maeda Y, Kamitani W, Fukuhara T, Matsuura Y. (2021) Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep.* 35:109014.
- 8) Matsuyama S, Kawase M, Nao N, Shirato K, Ujike M, Kamitani W, Shimojima M, and Fukushi S. (2020) The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells. *J Virol.* 95:e01648-20.
- 9) Li Y, Watanabe E, Kawashima Y, Plichta DR, Wang Z, Ujike M (他 25 名), and Honda K. (2022) Identification of trypsin-degrading commensals in the large intestine. *Nature.* 609:582-589.