

Title	Generation of recombinant rotaviruses encoding a split NanoLuc peptide tag
Author(s)	Pannacha, Pimfhun
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82105
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	PIMFHUN PANNACHA
論文題名 Title	Generation of recombinant rotaviruses encoding a split NanoLuc peptide tag (スプリットNanoLucペプチドタグを発現する遺伝子組換えロタウイルスの作製)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的 (Purpose)〕</p> <p>Our previous study reported the use of a rotavirus (RV) reverse genetics system to generate prototype NanoLuc luciferase (NLuc) reporter RV (rSA11-NLuc) expressing simian RV SA11 NSP1-NLuc chimeric reporter protein. However, viral replication of rSA11-NLuc was lower than a parental virus and the NLuc gene was unstably maintained in the viral genome. Thus, the prototype reporter RV might impede further RV biological study. Here, we established a quantitative reporter RV (rSA11-HiBiT) with a phenotype similar to wild-type virus. In addition, we generated recombinant human reporter RV (rOdeliaNSP1-Δ879-HiBiT) which lacked 879 bp corresponding to 293 aa at C-terminal end of RV Odelia NSP1 for a better understanding of the functional domain(s) of Human RV NSP1 to viral replication and intracellular innate signaling pathways.</p> <p>〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕</p> <p>HiBiT reporter virus was generated by inserting HiBiT peptide tag within C-terminal end of NSP1 gene. Using reverse genetics system, we could generate recombinant rSA11-HiBiT. The replication kinetics of rSA11-HiBiT were similar to those of wild-type virus in simian MA104 and human HT29 cells. rSA11-HiBiT was then serially passaged to test genetic stability. Viral replication, NLuc activity, and the electrophoretic of dsRNA genome of rSA11-HiBiT from passage 5 and 10 demonstrated that HiBiT peptide tag was stably maintained in rSA11-HiBiT. The rSA11-HiBiT precisely replicated as a parental virus <i>in vitro</i> when compared to wild-type virus in various human and simian cell lines. Western blotting results confirmed that the expression level of NSP1-HiBiT chimeric protein was similar to native NSP1 protein and NSP1-HiBiT protein could also induce the degradation of IRF3 in infected cells to support viral replication similarly as wild-type virus.</p> <p>To better understand human RV NSP1 functions, we generated rOdelia-HiBiT virus which lacked 879 bp corresponding to 293 aa at C-terminal end of Odelia NSP1 by using reverse genetics system. The replication of rOdeliaNSP1-Δ879-HiBiT was lower than the parental virus, suggesting that the deleted 293 aa sequence at C-terminal Odelia NSP1 contains the functional domain(s) for viral replication. Mouse embryonic fibroblast TBK1 deficient cells (IFN deficient cells) were infected with rOdeliaNSP1-Δ879-HiBiT and subsequently evaluated for viral replication and NLuc activity. Viral titers and NLuc activity of rOdeliaNSP1-Δ879-HiBiT were higher in IFN deficient cells than wild-type cells, indicating that IFN pathway contributes to human RV replication. Meanwhile the titers of wild-type virus in both cell lines are higher than rOdeliaNSP1-Δ879-HiBiT, indicating that deletion of 293 aa sequence at C-terminal Odelia NSP1 affects viral replication not only via IFN pathway but also another mechanisms.</p> <p>〔総括 (Conclusion)〕</p> <p>Recombinant simian and human reporter RVs expressing a split NanoLuc peptide tag were generated. The stable rSA11-HiBiT virus generated in this study is a powerful tool for novel antiviral drug or neutralizing antibody screening for RVs. In addition, this recombinant virus will provide a robust platform for the development of therapeutic measures against RV infection. Moreover, a split NanoLuc peptide tag can be used to identify the proper sites at where the transgenes could be inserted into viral proteins.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) PIMFHUN PANNACHA	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 小林 剛
	副 査 大阪大学教授 松浦 善治
	副 査 大阪大学教授 塩田 達也
論文審査の結果の要旨	
<p> ロタウイルスは乳幼児に重篤な下痢症を引き起こす。発展途上国を中心に年間約20万人の死亡例が報告されている。ロタウイルス感染症に対しては、有効なワクチンは実用化されているが、抗ウイルス薬の開発は遅れている。本研究では抗ウイルス薬のスクリーニングやウイルス感染動態に関する研究に有用なレポーター遺伝子発現ロタウイルスの開発を目的としている。過去の報告からサイズの大きな外来遺伝子を発現するロタウイルスを作製、解析した場合、その増殖性は低下することが知られていた。本研究では、このような問題を克服するため、大小2種類のNanoLucルシフェラーゼ断片 (LgBiTおよびHiBiT) の相補性を利用した発光系であるSplit NanoBiT Systemを外來遺伝子発現ロタウイルスの開発研究に応用することで、高増殖性を保持し、安定的にレポーター遺伝子 (HiBiT配列) を発現できる組換えサルロタウイルスおよびヒトロタウイルスの開発を行った。さらに、ロタウイルス特異抗体やロタウイルス増殖阻害薬を用いて解析を行った結果、抗ウイルス薬等のスクリーニング解析において、作製した組換えロタウイルスが有用であることを確認した。本研究で得られたロタウイルスベクターはロタウイルスの予防・治療法の開発を行う上で有用なツールと考えられる。以上の内容は学位論文に値する。 </p>	