



Title	Development of an entirely plasmid-based reverse genetics system for 12-segmented double-stranded RNA viruses
Author(s)	納田, 遼太郎
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87917
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	納田 遼太郎
論文題名 Title	Development of an entirely plasmid-based reverse genetics system for 12-segmented double-stranded RNA viruses (12分節二本鎖RNAをゲノムとして持つウイルスのリバースジェネティクス系の確立)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
レオウイルス科は9～12本の分節型二本鎖RNA (dsRNA) をゲノムとして持つ非エンベロープウイルスのグループである。これまでにウイルス学的解析に必須の技術であるリバースジェネティクス系は10および11分節ゲノムを有するレオウイルス科のウイルスで確立されているものの、レオウイルス科の中でも12分節ゲノムを持つウイルスでは確立されていない。コルチウイルス属は12分節dsRNAゲノムを有しており、ヒトに発熱、悪寒、頭痛、腹痛などの症状をもたらすColorado tick fever virusが代表種として知られ、現在では北米、ヨーロッパ、アフリカ、アジア、オーストラリアなど世界中で様々なコルチウイルス属のウイルスが報告されている。日本国内においても野生のキチマダニからTarumizu tick virus (TarTV) が単離されている。しかしながらコルチウイルス属のウイルス生活環、病原性発現機序などはほとんど明らかになっていないのが現状である。本研究では、新たに国内のタヌキから分離されたTarTV Kochi株を用いて、コルチウイルス属ならびに12分節のdsRNAゲノムを持つウイルスとして初となるリバースジェネティクス系の確立を目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
これまでに確立されているレオウイルス科のリバースジェネティクス系と同様の手法を用いてTarTVのリバースジェネティクス系の確立を試みた。TarTVの12分節のゲノムのプラス鎖cDNAをプラスミドにクローニングした。ウイルスゲノムcDNAの上流にはT7プロモーター、下流にはD型肝炎ウイルス由来の自己切断型リボザイムが配置されている。12分節のウイルスRNAゲノムを発現するプラスミド(12種類)をT7 RNAポリメラーゼ発現細胞に導入することで組換えウイルスの作出に成功した。さらに組換えウイルス作製効率の向上を目的として、TarTVタンパク質およびワクシニアウイルスキャッピング酵素を加えた改良系の開発を行った。 TarTVのリバースジェネティクス系を用いて、Kochi株を遺伝的バックボーンとしSegment 12のみをマダニから分離されたT117株由来のものに置換したモノリアソータントウイルスを作製した。さらに様々なSegment 12の変異ウイルス作製し、Segment 12がコードするVP12はβ結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であることを明らかにした。VP8のC末端にルシフェラーゼの断片(HiBiTタグ)を挿入したレポーターウイルスについても作製した。レポーターウイルスは野生型ウイルスと同程度の増殖性を示し、有意に高いルシフェラーゼ活性が認められた。	
〔総 括(Conclusion)〕	
コルチウイルス属初となるTarTVのリバースジェネティクス系を確立した。VP12が糖修飾を受けることを示唆する結果を得た。作製したレポーターウイルスはウイルス複製阻害薬などのスクリーニングに有用と考えられる。本研究で開発に成功したTarTV のリバースジェネティクス系によりコルチウイルス属の解析が飛躍的に進展すると期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 納田遼太郎

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授	小林 剛
	副 査 大阪大学特任教授	松浦 善弘
	副 査 大阪大学教授	塩田 達也

論文審査の結果の要旨

コルチウイルス属には、マダニを介してヒトに感染し、発熱、筋肉痛などのインフルエンザ様症状や脳炎を引き起こすコロラドダニ熱ウイルスなどが含まれている。これまでにコルチウイルス属のウイルスは世界各地で分離されており、日本国内においても2017年にタルミズダニウイルスがマダニから分離されている。9～12分節に分かれた二本鎖RNAゲノムを持つレオウイルス科ではウイルス人工合成技術（リバーシジェネティクス系）の開発は他のRNAウイルス種と比較して遅れていたが、10分節ゲノムを持つ哺乳類レオウイルス、ネルソンペイレオウイルス、11分節ゲノムを持つロタウイルスなどにおいてはリバーシジェネティクス系が確立されている。しかし、最大数の12分節ゲノムを持つコルチウイルス属を含むレオウイルス科ウイルスのリバーシジェネティクス系は未だ確立されていない。

申請者は12分節二本鎖RNAゲノムを有するタルミズダニウイルス（コルチウイルス属）におけるリバーシジェネティクス系を確立した。本技術は12分節ゲノムを持つウイルスの人工合成技術として初の報告となる。さらに申請者は機能が不明であったタルミズダニウイルスのVP12タンパク質にタグ配列を付加したウイルスを用いて、VP12が糖タンパク質であることを明らかにし、その糖修飾部位も同定した。またルシフェラーゼ遺伝子の断片配列を組み込んだレポーターウイルスの作製にも成功しており、開発したタルミズダニウイルスのリバーシジェネティクス系の汎用性の高さを示した。

本研究成果はこれまで不明であったコルチウイルス属のウイルス複製機構や病原性発現機序などの解明に新たな知見をもたらすものであり、当該分野における貢献は極めて大きいと考えられる。以上の内容は学位論文に値する。