

新型コロナウイルスにおけるリバーズ・ジェネティクス法

田村友和, 福原崇介*

Reverse genetics systems for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

Tomokazu TAMURA, Takasuke FUKUHARA

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, reverse genetics, COVID-19, recombinant virus

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, 2019 年末の発生報告以降, ウイルスの感染性と伝播力の強さから世界に瞬く間に広がった. 世界中の科学者とその征圧のために研究を推し進め, 行政機関の後押しもあり, ワクチンや治療薬がこれまでにない速さで開発・承認された. その結果, 多くの人命を救うことができた. 一方で, 罹患後症状 (いわゆる後遺症) や絶えず出現する変異株を考慮すると, ワクチンや治療薬が開発された現在でも COVID-19 が公衆衛生上重要な疾病であることに変わりはない.

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を含め, インフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV) 等の RNA ウイルスは, 一般的に変異頻度が DNA ウイルスよりも 100 倍程度高いと考えられている. そのため, ウイルスがヒトの間で感染と伝播を繰り返すうちに, 種々の変異 (置換変異, 欠損変異, 挿入変異) がその遺伝子に蓄積する. その結果として, ウイルスの病原性や指向性が変化してしまうことが知られている. COVID-19 のオミクロン株対応ワクチンを新たに作製する必要があったことや国立感染症研究所が, 毎年インフルエンザのワクチンに使用するウイルス株を選定するのはこのためである. ウイルスの増殖におけるこれら変異の意義を明らかにすることはウイルス感染症を制御する上で必須であることから, 任意の変異を持ったウイルスを実験室内で人工的に作製する技術はそれに有効である.

変異を持った組換えウイルスを作出する手法であるリバーズ・ジェネティクス法とは, プラスミド等にクローニングしたウイルス cDNA あるいはウイルスの核酸をウイルスの感受性培養細胞に導入し, 感染性のウイルスを得る実験のことである. この手法を用いることで, ウイルス遺伝子を自在に改変した組換えウイルスを作製することが可能となることから, 様々なウイルスで本手法が開発されている. しかし, コロナウイルスの遺伝子は, RNA ウイルスの中で最も大きく約 30 kb であることから, 1つのプラスミドにそれを挿入することは不可能である. 従って, これまでのコロナウイルス研究では, 大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome: BAC) や酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome: YAC) に遺伝子をクローニングする方法あるいは, 全長の遺伝子を 6~8 本の断片にして, 試験管内でライゲーションによって結合させる方法が用いられてきた¹⁻³⁾ (図 1). しかし, これらの方法は手順が複雑で時間を要し, かつある程度の熟練性が必要である. そのため, 絶えず出現する SARS-CoV-2 の変異株の迅速な解析には不向きであると考えられていた. そこで我々は, プラスミドへの遺伝子クローニングに用いられていた circular polymerase extension reaction (CPER)^{4,5)} を同じ RNA ウイルスで 10 kb 程度の遺伝子を持つフラビウイルスに適用して成功した実績⁶⁾ を基に, さらに遺伝子が大きい SARS-CoV-2 に適用する研究を推進した. CPER 法による組換えウイルスの作製には, 培養細胞で RNA を転写させるプロモーターとウイルス遺伝子の 3'末端を切断することができリボザイムをコードする「リンカー」が必要である. このリンカーと全長のウイルス遺伝子を

*責任者連絡先:
北海道大学大学院医学研究院微生物学免疫学分野病原微生物学教室
〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目
Tel: 011-706-6905, Fax: 011-706-6905
E-mail: fukut@pop.med.hokudai.ac.jp

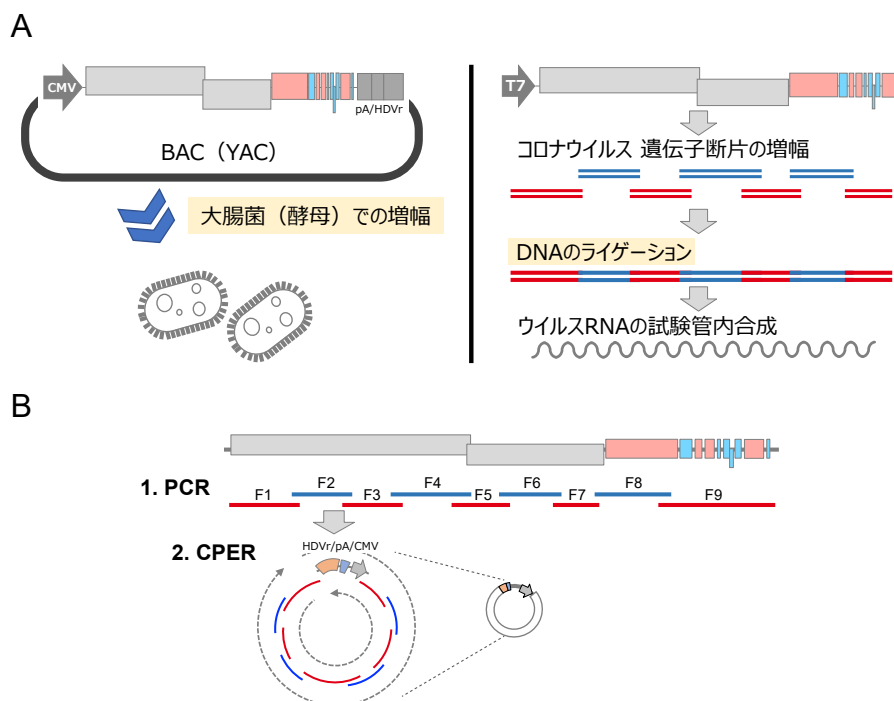


図1 コロナウイルスのリバース・ジェネティクス法

- A. 従来のリバース・ジェネティクス法を示す。左図は、大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome: BAC) あるいは酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome: YAC) にコロナウイルスの完全長の遺伝子をクローニングする手法。ウイルス遺伝子の上下に配したプロモーターとリボザイムにてウイルス RNA を培養細胞で転写させる。右図は、ウイルス遺伝子を数断片に分け、それぞれを試験管内でライゲーションさせ、ウイルス遺伝子上流に配した RNA の転写プロモーターを用いて試験管内でウイルス RNA を合成させる手法。
- B. 高速リバース・ジェネティクス法を示す。完全長の SARS-CoV-2 遺伝子を、それぞれが PCR 反応によって効率的に結合して伸長できるように9つの領域に分けた。Poly(A)シグナルおよびD型肝炎ウイルス由来のリボザイム配列、サイトメガロウイルスのプロモーターをコードするリンカーとウイルス遺伝子由来の PCR 産物を用いて circular polymerase extension reaction (CPER) を行うことで、設計された相同配列を介して断片を正しい順に結合させ、「プロモーター、完全長のウイルス遺伝子、リボザイム」の順番で環状になった DNA を得る。この CPER 反応物をウイルス感受性細胞にトランスフェクションすることにより、細胞でウイルス RNA を転写させる。

数断片にして PCR にて十分量まで増幅させる。その際、リンカーとウイルス遺伝子断片の両末端が重なり合うようにすることで、得られた PCR 産物を続く実験に用いることができる。これらの PCR 産物を同じモル数になるように試験管内で配合し、DNA ポリメラーゼを用いて CPER を行う。設計された相同配列を介して断片を正しい順に結合させ、「プロモーター、完全長のウイルス遺伝子、リボザイム」の順番で環状になった DNA を得る。得られた DNA を直接、ウイルスの感受性細胞にトランスフェクションすることで、感染性の組換えウイルスを得ようとする実験である。この手法は大腸菌等を介したクロー

ニングの工程がないため、クローニングの過程で目的のクローンを得るための「トライ・アンド・エラー」の時間がないことが大きなメリットである。そして我々は、SARS-CoV-2 での CPER 法の樹立に成功した。開発したその手法を以下に簡単に記載する。Poly(A)シグナルおよびD型肝炎ウイルス由来のリボザイム配列、CMV プロモーターをコードするリンカーのプラスミドを新たに作製した。完全長の SARS-CoV-2 遺伝子を9つの領域に分け、それぞれの遺伝子断片が PCR 反応によって効率的に結合して伸長できるように試行し、最適なプライマーを設計した。その後、それぞれの PCR 産物を用いて CPER

の条件を最適化した。感受性細胞は、SARS-CoV-2の感染を許容し、増殖することができる細胞で、且つトランスフェクション効率が良いそれを選定した。すなわち、ウイルスの細胞への侵入に必要なACE2およびTMPRSS2を発現させたHEK293細胞をCPER産物のトランスフェクションに用いることとした。ウイルスが細胞で増殖した指標となる細胞変性効果を認めた細胞から培養上清を回収し、それをSARS-CoV-2の増殖性が非常に高いVeroE6/TMPRSS2細胞⁷⁾に接種することで、様々な実験に使用することができる高い感染価を持つウイルスを得た。最後に、作出した組換えウイルスは全長の配列をシーケンスにて決定し、目的のそれであることを確認した。以上、我々はウイルス遺伝子の増幅から感染性の組換えウイルスを得るまで、最短で2週間で行える実験プラットフォームを樹立することに成功した⁸⁾。このプラットフォームをこれまでに活用し、SARS-CoV-2変異株が本邦に侵淫・流行する前にその性状を解析し、誌上報告してきた⁹⁻¹¹⁾。また、各種レポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスを作製し、ワクチン接種により賦与された中和活性の効率的な評価方法や生体におけるライブイメージング技術等の応用研究を展開している。

今後も、地球の気候変化やヒトの活動域の拡大に伴い、COVID-19のような新興・再興ウイルス感染症が流行する可能性は十分にある。そのためにもSARS-CoV-2の研究で培った技術を基盤に、感染症の先回り対策として組換えウイルス作製技術の更なる「簡便化」と「汎用化」に向けた研究を推進したいと考えている。

著者全員の利益相反（COI）の開示：

田村友和：研究費（受託研究，共同研究，寄付金等）
（上原記念生命科学財団，武田科学振興財団）

福原崇介：本論文発表内容に関して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Almazán F, Dediego ML, Galán C, et al.: Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol* **80**: 10900–10906, 2006. doi: 10.1128/JVI.00385-06
- 2) Scobey T, Yount BL, Sims AC, et al.: Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 16157–16162, 2013. doi: 10.1073/pnas.1311542110
- 3) Yount B, Curtis KM, Fritz EA, et al.: Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12995–13000, 2003. doi: 10.1073/pnas.1735582100
- 4) Quan J, Tian J: Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc* **6**: 242–251, 2011. doi: 10.1038/nprot.2010.181
- 5) Thi Nhu Thao T, Labrousse F, Ebert N, et al.: Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* **582**: 561–565, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2294-9
- 6) Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, et al.: Characterization of recombinant flaviviridae viruses possessing a small reporter tag. *J Virol* **92**: e01582-17, 2018. doi: 10.1128/jvi.01582-17
- 7) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, et al.: Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**: 7001–7003, 2020. doi: 10.1073/pnas.2002589117
- 8) Torii S, Ono C, Suzuki R, et al.: Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep* **35**: 109014, 2021. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109014
- 9) Saito A, Irie T, Suzuki R, et al.: Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature* **602**: 300–306, 2022. doi: 10.1038/s41586-021-04266-9
- 10) Yamasoba D, Kimura I, Nasser H, et al.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. *Cell* **185**: 2103–2115.e19, 2022. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.035
- 11) Kimura I, Yamasoba D, Tamura T, et al.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariants, including BA.4 and BA.5. *Cell* **185**: 3992–4007.e16, 2022. doi: 10.1016/j.cell.2022.09.018