

5. ロタウイルスのリバースジェネティクスとその展望

谷口 孝喜, 河本 聡志, 佐々木 潤, 釘田 雅則

藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座

ロタウイルスは、ヒトを含めた多くの哺乳動物と鳥類の下痢便から検出される急性胃腸炎の病原ウイルスである。多くのウイルスでは、リバースジェネティクスが盛んに活用されているが、ロタウイルスにおいてはその開発が困難をきわめていた。最近、我々の研究室で、ヘルパーウイルスを利用する系ではあるが、その開発を行うことができた。それを利用して、VP4 抗原解析の一步として、サルロタウイルス SA11 株のスパイク蛋白質である VP4 の一つの中和エピトープを異なる抗原特異性を有するヒトロタウイルス DS-1 株由来の VP4 中和エピトープに置換し、抗原モザイクとなる VP4 を有する感染性のロタウイルスを調製した。レオウイルス科の他のウイルスも含めて、ロタウイルスのリバースジェネティクスとその展望をまとめた。

はじめに

ロタウイルスは、コモンな疾患である急性胃腸炎の病原体である。ヒトにおいては、ロタウイルス胃腸炎により、開発途上国を中心に年間約 60 万人の乳幼児が死亡している¹⁷⁾。先進国においても、入院を必要とする重症例が多く、医療経済的な観点からも、その予防に注目が集まっている。

ウイルスの増殖、病原性、免疫などを研究する上で、ゲノムを人工的に自由に改変した感染性ウイルスの性状を検討して、各ウイルス蛋白ないし遺伝子の機能を解析するリバースジェネティクスはきわめて有用である。これまでに、多くのウイルスにおいて、その開発と応用が盛んに行われてきた。しかし、10～12本の多分節の二本鎖 RNA をゲノムとするレオウイルス科に属するウイルスについては、世界中で多くの研究室が取り組んできたものの、分節 RNA が 10本のレオウイルスを除いて、その開発はきわめて困難であった。最近、我々の研究室において、ヘルパーウイルスを利用した系ではあるが、分節 RNA が 11本からなるロ

タウイルスでは初めて、リバースジェネティクスの系の開発に成功した^{13,14)}。ロタウイルスで開発されたのを機に、レオウイルスそしてブルータングウイルスでは、ヘルパーウイルスを利用しない理想的な系が開発された^{3,4,11,12)}。ここでは、これらの系の紹介も含めて、ロタウイルスのリバースジェネティクスの開発とそれを利用した一例、そして今後の展望についてまとめてみたい。

ロタウイルスのリバースジェネティクスまでの背景

ロタウイルスは、正二十面体をなす直径約 80nm (VP4 スパイクの突起を含めると 100nm) の球形ウイルスである。ゲノムが 11本の分節した二本鎖 RNA からなるのが大きな特徴である。ロタウイルス遺伝子の機能解析は、発現タンパク質の利用、遺伝子再集合体 (リアソータント) の利用、温度感受性変異株の利用、siRNA の利用、intrabody の利用などによって行われてきた。特に、リアソータントについては、性状の異なる二種のロタウイルスを同時に感染させることにより、分節 RNA のさまざまな組み合わせのリアソータントを調製することが可能である。特定の形質について、分節 RNA のさまざまな組み合わせのリアソータントの性状を比較することにより、どの分節 RNA が関与するかを同定できる¹⁸⁾。siRNA については、VP4, VP7, NSP4, NSP2, NSP5 などについて、各遺伝子発現を特異的に抑えることにより、各蛋白質の機能が解析されている¹⁶⁾。しかし、それら蛋白質のどの領域、あるいはどのアミノ酸が関与するか、そして非翻訳領域などの解析はできない。

連絡先

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98
藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座
TEL: 0562-93-2467
FAX: 0562-93-4008
E-mail: kokitani@fujita-hu.ac.jp

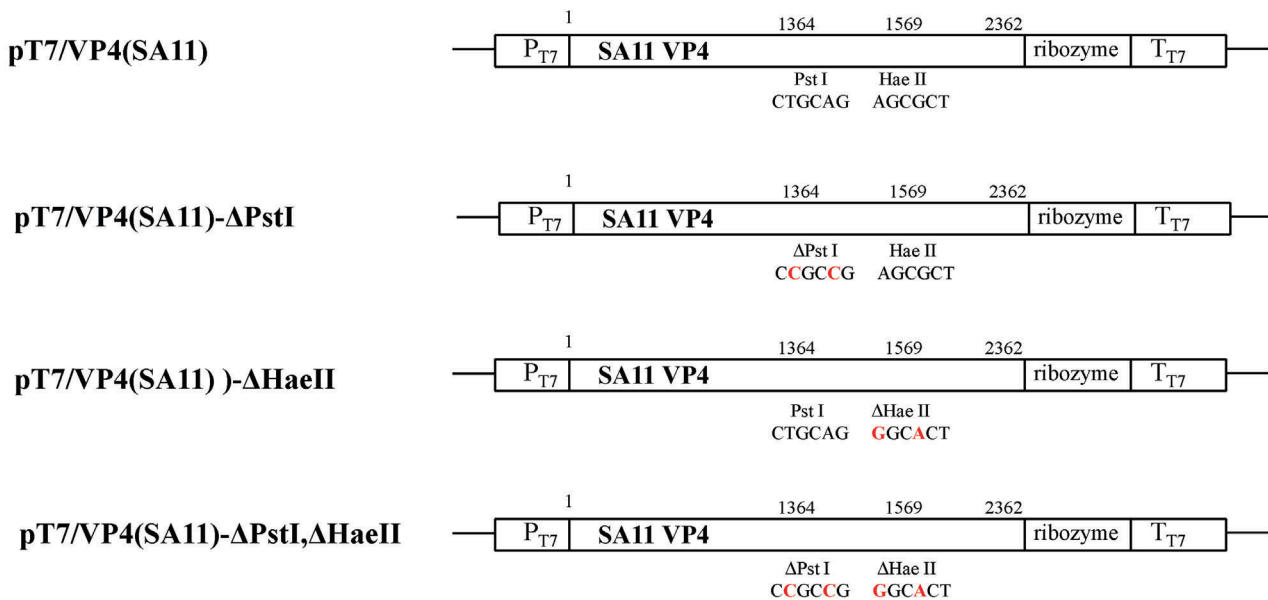


図1 SA11株VP4コード一本鎖RNAの転写プラスミドの構造

プラスミド pT7/VP4(SA11) は、上流から、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、SA11 ウイルス完全長 VP4 遺伝子、D 型肝炎ウイルス (HDV) リボザイム、そして、T7 ターミネーターを配置している。プラスミド pT7/VP4(SA11)Δ PstI、pT7/VP4(SA11)Δ HaeII、及び pT7/VP4(SA11)-Δ PstI,Δ HaeII は、プラスミド pT7/VP4(SA11)の VP4 遺伝子のコーディング領域に遺伝子マーカーとしてのサイレント変異を導入する (赤字で示した) ことで、それぞれ、PstI 切断部位あるいは HaeII 切断部位を破壊、あるいは両切断部位を破壊した。(文献 14 より)

また、変異を加えたウイルスを調製し、それを利用することもできない。さらに、外来遺伝子をウイルス RNA に挿入し、ウイルス感染細胞に発現あるいはウイルス粒子構造に表出させるためには、やはり、リバーシジェネティクスの手法が理想的である。

ロタウイルスでは、1994 年に *in vitro* での RNA 複製系が開発され、無細胞系で、精製オープンコア粒子を用いて cDNA 由来の mRNA を鋳型として dsRNA ゲノムが複製されることが報告された⁵⁾。それ以後、世界中で精力的なリバーシジェネティクス系の開発の試みが行われてきたが、これまで如何なる進歩も報告されなかった。

ロタウイルスのリバーシジェネティクスの開発

われわれは、インフルエンザウイルスの例にならない、cDNA 由来の人工的な 1 本の遺伝子セグメントとヘルパーウイルス由来の 10 本の遺伝子セグメントを有する感染性ウイルスの作成を試みた。ロタウイルスレセプターのリガンドである VP4 はロタウイルスの増殖能に強く関連している。そこで、高い増殖能をもつサルロタウイルス SA11 株の VP4 cDNA と増殖効率が SA11 の約 10% であるヒトロタウイルス KU 株をヘルパーウイルスとして利用した。この手法では、培養液中のウイルスの大多数はヘルパーウイルスなので、cDNA 由来の遺伝子を含むトランスフェクタ

ントウイルスを得るためには強い選択圧が必要となる。ここで、KU 株の属す P[8]タイプのヒトロタウイルスを特異的に中和し、SA11 株のような P[8]以外のタイプの VP4 を有するウイルスとは反応しない抗 VP4 中和モノクロン抗体を利用した。この中和抗体の存在下で培養することにより、SA11 の cDNA 由来の VP4 遺伝子分節を含むトランスフェクタントウイルスを選択的に増殖させた。

まず、上流から、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、SA11 ウイルス完全長 VP4 遺伝子、D 型肝炎ウイルス (HDV) リボザイム、そして、T7 ターミネーターを配置した転写プラスミド pT7/VP4 (SA11) を準備した¹⁴⁾ (図 1)。このベクターは、SA11 VP4 mRNA の末端に対応する正しい 5' 末端及び 3' 末端を有する 2,362 塩基のプラス鎖 RNA を産生することになる。

T7 RNA ポリメラーゼの細胞内での供給には、石井ら⁹⁾が作成した T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクシニアウイルス rDIs-T7pol を利用した。これは、鳥類の細胞には細胞変性効果 (CPE) を起こすが、哺乳類の細胞には CPE を起こさないことからきわめて有用である。まず、rDIs-T7pol を COS-7 細胞に感染させた後、pT7/VP4 (SA11) をトランスフェクトし、1 日後、ヘルパーウイルスとしての KU 株を重感染させ、さらに 1 日培養を続けた後、培養液を回収した。ヘルパーウイルス KU 株を特異的に中和する、

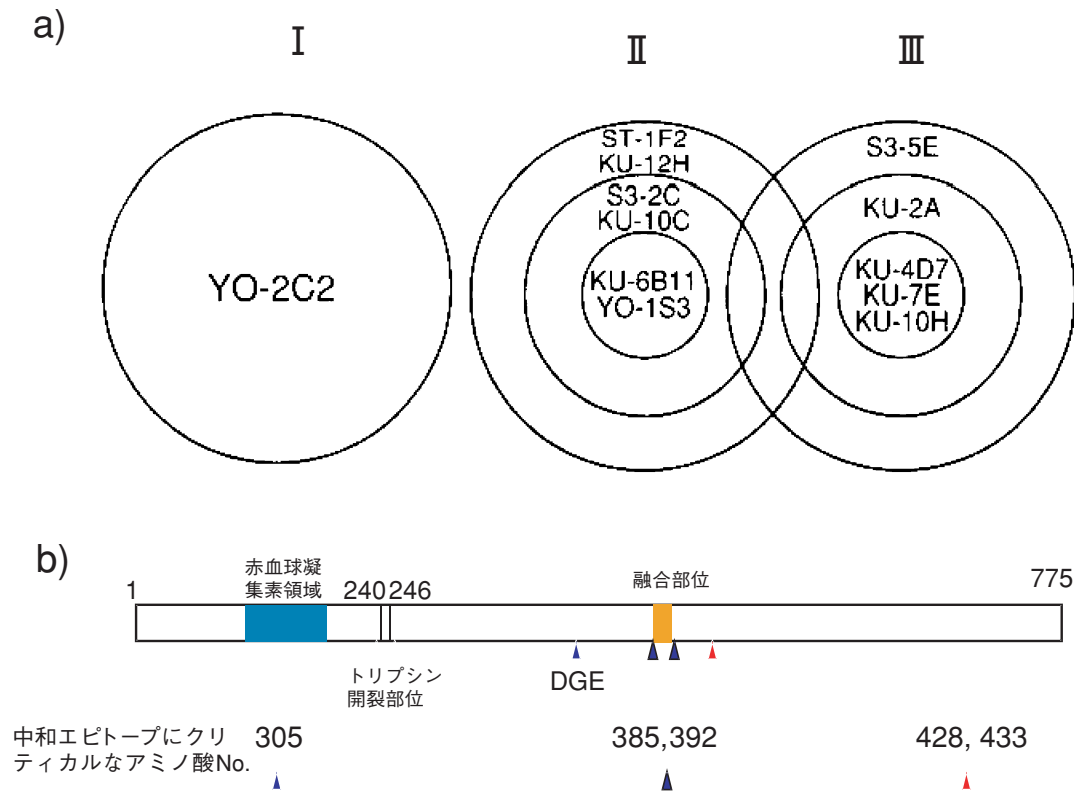


図2 ヒトロタウイルス (KU 株) VP5* 上の交叉性中和エピトープのマッピング (a) と VP4 の構造 (b)

ヒトロタウイルス KU 株の VP4 は 775 アミノ酸からなる。VP5* 上の交叉性中和エピトープは大きく 3 種に分かれ、I, II, III からなる。I は YO-2C2 抗体により認識され、アミノ酸 305 が、II は、KU-6B11 抗体、YO-1S3 抗体などにより認識され、アミノ酸 385, 392 が、III は、KU-4D7, KU-7E, KU-10H, KU-2A, S3-5E 抗体などにより認識され、アミノ酸 428, 433 がクリティカルなアミノ酸である。その他、インテグリンのリガンド DGE モチーフ、融合領域、赤血球凝集素領域、トリプシン開裂部位を示す。(文献 10 を改変)

異なる中和エピトープを認識する 2 種類の抗 VP4 中和抗体 ST-1F2 と YO-2C2 の存在下で、MA104 細胞を回転培養した。培養後、得られたウイルスをプラーク純化した後、MA104 細胞で増幅し、ビリオン dsRNA をポリアクリルアミド電気泳動で解析した。さらに、RT-PCR 産物断片の塩基配列決定により、回収したウイルスの VP4 遺伝子が SA11 由来であることを確認した。こうして、cDNA 由来の VP4 遺伝子分節を含む感染性ロタウイルストランスフェクタント (KU//rVP4 (SA11) ウイルス) が得られた。

次いで、PCR を利用した部位特異的変異法によって、プラスミド pT7/VP4 (SA11) における VP4 遺伝子のコーディング領域に遺伝子マーカーとしての 4 つのサイレント変異を導入した。PstI 切断部位あるいは HaeII 切断部位をそれぞれ破壊、あるいは両切断部位を破壊したプラスミド pT7/VP4 (SA11)- Δ PstI, pT7/VP4 (SA11)- Δ HaeII, 及び pT7/VP4 (SA11)- Δ PstI, Δ HaeII を調製し、上述と同様の条件下で培養することにより、KU//rVP4 (SA11)- Δ PstI, KU//rVP4 (SA11)- Δ HaeII, KU//rVP4 (SA11)- Δ PstI, Δ HaeII を得た。RT-PCR 制限酵素消化分析および塩基配

列決定により、サイレント変異の導入を確認した¹⁴⁾。こうして、ゲノム内に部位特異的変異を有する感染性ロタウイルスを回収することができた。こうしたロタウイルスにおけるリバースジェネティクス開発のポイントは、細胞傷害の少ないワクチニアウイルス rDIs-T7pol を利用したこと、特異的な中和モノクロン抗体を作成していたこと、増殖能の異なる 2 種のロタウイルスを基本としたことであろう。

ロタウイルスのリバースジェネティクスの応用

我々の系においては、現在のところ、標的となるのは VP4 だけである。VP4 は、ロタウイルスのスパイク蛋白質で、細胞レセプターのリガンドとして、増殖の最初のステップを規定する。VP4 が、トリプシンにより、VP8* と VP5* に開裂することで、ロタウイルスの感染性が獲得される。ロタウイルスには、外層蛋白質である VP7 と VP4 が規定する、独立した 2 種の血清型、G 血清型と P 血清型が存在する。G 血清型は少なくとも 15 種存在し、最近、遺伝子解析から、20 種の存在が示唆されている。一方、P 血清型については、少なくとも 14 種が報告されているが、P 血

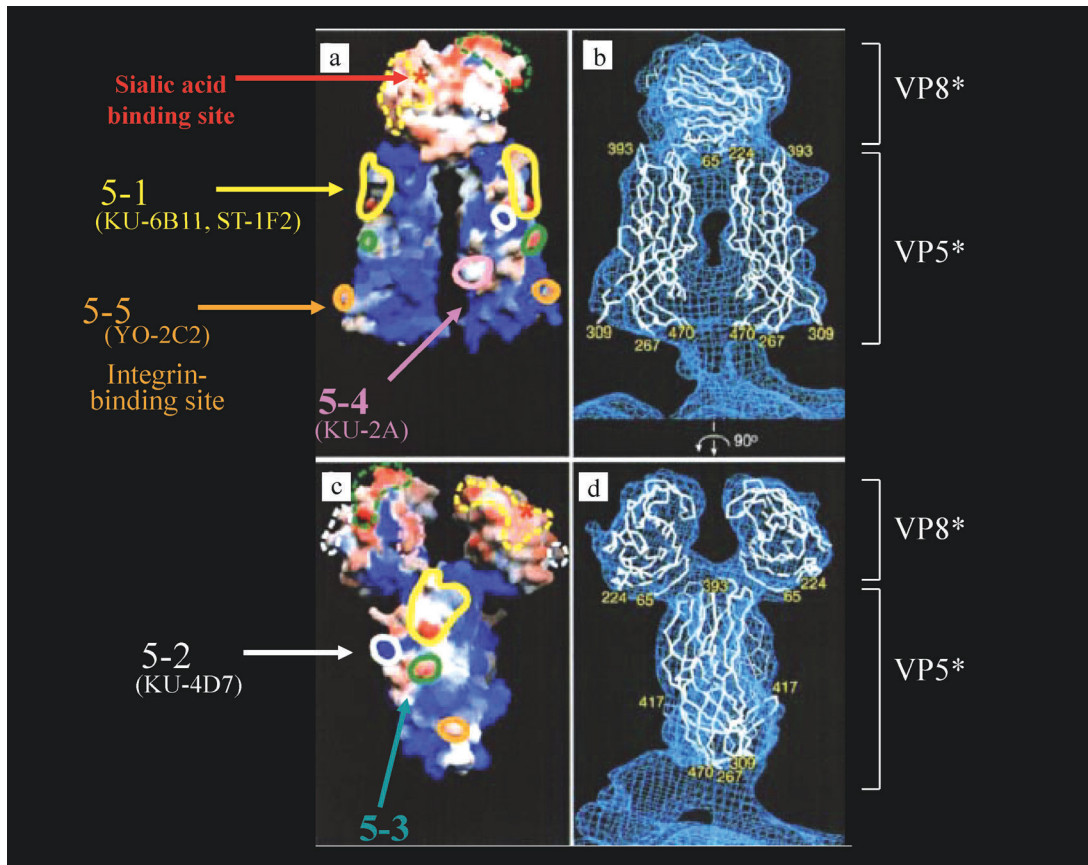


図3 VP4における中和エピトープの存在部位

パネル c,d における像は、パネル a,b に示された像を 90° 回転したものである。

数値は、ヒトロタウイルスで選択した、抗 VP5* 中和モノクロン抗体抵抗性変異株での変異アミノ酸残基の番号を示す。実線で囲む領域は、VP5* の異なる 5 つの抗原領域を示す。黄：5-1、白：5-2、緑：5-3、ピンク：5-4、オレンジ：5-5。() 内は、それぞれを認識するモノクロン抗体名を示す。破線で囲む領域は、VP8* の異なる 4 つの抗原領域を示す。黄：8-1、白：8-2、緑：8-3、ピンク：8-4。ロタウイルスのレセプターであるシアル酸の結合部位を * で示す。(文献 7 を改変)

清型を血清学的に分類することは、困難なため、塩基配列の違いから推定され、少なくとも 25 種の、いわゆる P タイプが報告されている。P タイプ特異性は主に VP8* に存在し、交叉反応性は VP5* に存在する。

われわれのマウスモノクロン抗体とそれに対する抵抗性変異株との中和パターン解析の成績から、VP5* 上には P タイプの枠を超えた 3 種の交叉反応性中和抗原部位 I, II, III が存在し、I は独立しておりシーケンシャルな抗原であり、II と III は互いに重なり合っておりコンフォメーションな抗原であることがわかっている^{10,24,26} (図 2)。さらに、他の研究室で分離されたモノクロン抗体の解析結果も含めると、VP5* 上には 5 種類の抗原領域 (5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5) が存在する⁷。一方、VP8* 上の抗原領域は、4 つに分類される (8-1, 8-2, 8-3, 8-4)¹⁵ (図 3)。ヒト型モノクロン抗体を作成し、VP8* にも交叉中和エピトープが存在すること、マウスとヒトでは認識される中和エピトープに違いがあるこ

とを示唆するデータが得られている⁸。

リバースジェネティクスを用いて、VP4 にモザイク抗原をもつロタウイルスの作成を試みた。KU//rVP4 (SA11) ウイルスは SA11 由来 VP4 遺伝子を有しているが、その中和エピトープ II をヒトロタウイルス P1B[4] の中和エピトープ II に置換したキメラ VP4 を有する人工感染性ロタウイルスの作出を試みた¹³。そのために、中和エピトープ領域の 6 ヶ所の塩基に変異を加え、5 個のアミノ酸の置換を行った (図 4)。得られた KU//rVP4 (SA11) IIDS-1 は、ELISA において、SA11 株の中和エピトープ II と反応するモノクロン抗体 YO-1E6 との反応性を失い、一方、DS1 と反応し SA11 とは反応しない S2-2F2 抗体が反応性を獲得した (図 5)。さらに、KU//rVP4 (SA11) IIDS-1 に対して、S2-2F2 は弱いながら中和活性を示した。エピトープ I および III に対する中和モノクロン抗体の反応性は SA11 に対する反応性と同一であった。こうしてリバースジェネティクスの手

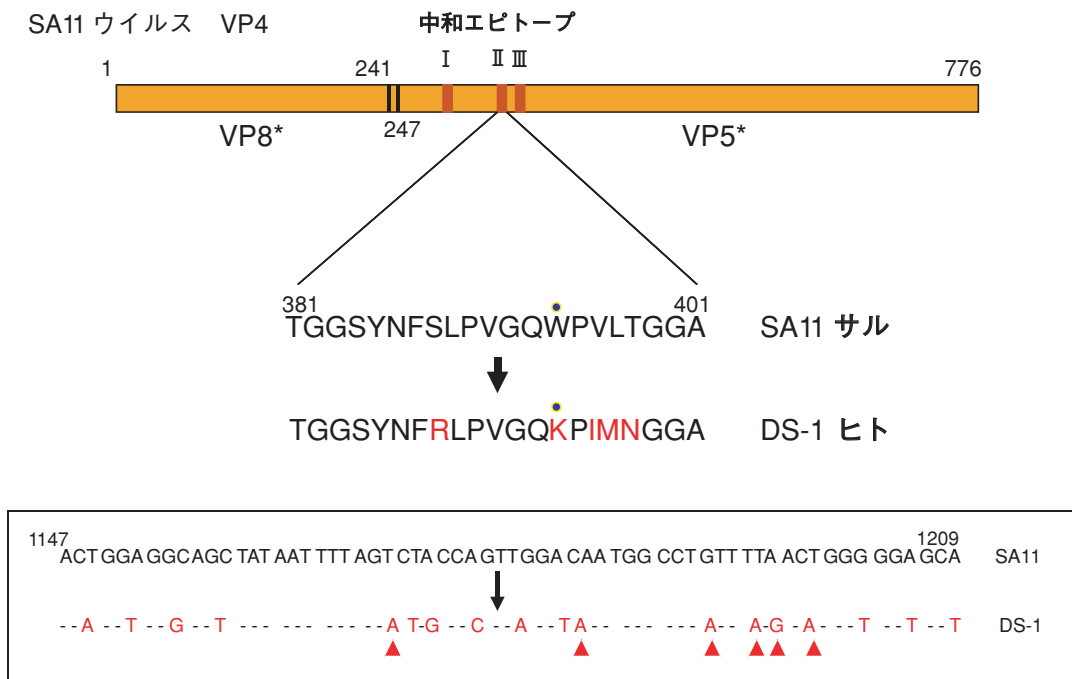


図4 SA11 株 VP4 の中和エピトープ II の DS-1 株の中和エピトープ II への置換

中和エピトープ II の周辺領域：アミノ酸 No.381 ～ 401 において，SA11 株と DS-1 株間では，5 個のアミノ酸の違いがある．そこで，アミノ酸置換を伴う，6 個の塩基（赤色の三角形）に置換を加え，SA11 株 VP4 のアミノ酸 No.381 ～ 401 を，DS-1 株と同一になるように置換した．緑色の○のアミノ酸（SA11 株で W，DS-1 株で K）がクリティカルなアミノ酸．

	中和反応				ELISA			
	KU	SA11	S2	KU//rVP4(SA11)-II(DS-1)	KU	SA11	S2	KU//rVP4(SA11)-II(DS-1)
S2-2F2	-	-	+++	+	-	-	+++	+++
KU-6B11	+++	+++	-	-	+++	+++	+	-
YO-1E6	+++	+	-	-	+++	+	-	-
YO-2C2	+++	-	-	-	+++	-	++	-

S2-2F2, KU-6B11, YO-1E6: 中和エピトープ II

YO-2C2: 中和エピトープ I

図5 VP4 の抗原モザイクを示す KU//rVP4(SA11)IDS-1 の反応性

S2 株は DS-1 株と同様の抗原を有する．中和反応，ELISA の反応において，SA11 の中和エピトープ II を DS-1 株の中和エピトープ II に置換したウイルス KU//rVP4(SA11)IDS-1 が，SA11 株と DS-1 株の抗原のモザイクであることを示す．

法で、VP4 抗原モザイクの感染性ウイルスの作成が可能となった。現時点でこのウイルスの作成の意義は大きく、まず、ロタウイルスでは初めて、アミノ酸の変異を伴う塩基変異を人工的に加えることが出来たこと、そして、自然界では存在しない VP4 の抗原モザイクを有する感染性ウイルスを作成したことである。将来的に、1 種のウイルスで多数の異なる特異性の中和エピトープを有するワクチンの開発への可能性もある。

他の 2 本鎖 RNA ウイルスのリバーシジェネティクス

ロタウイルスのような dsRNA をゲノムとして有する、いわゆる dsRNA ウイルスの中で、動物を宿主とするウイルスでは、分節 RNA が 2 本である伝染性ファブリキウス囊腫ウイルス (IBDV) および伝染性膵臓壊死症ウイルス (IPNV) において、2 本の RNA トランスクリプトをただトランスフェクションしただけで、感染性のウイルスが容易に回収できており、この手法で、人工変異ウイルスが作出されている。また、オルビウイルス科に属するブルータングウイルスについても、*in vitro* でウイルスコア粒子を用いて合成した 10 本の mRNA をトランスフェクションすることにより、感染性のウイルスを得た⁴⁾。その後、T7 プロモーターを有するトランスクリプションベクターに取り組んだブルータングウイルスのゲノムの *in vitro* で調製したプラス鎖 1 本鎖 RNA を用いて、感染性ウイルスを回収した³⁾。そして、レオウイルスでは、1990 年にヘルパーウイルスを利用した温度感受性変異株の調製、操作を加える遺伝子分節でコードされる特定のウイルス蛋白質を安定に発現するトランスフォーム細胞の調製といった極めて煩雑な準備を必要とするかなり複雑な系ではあるが、最初のリバーシジェネティクス系の報告²²⁾があり、その後改良が加えられ、最近になり多くの研究データが提出されるようになった¹⁹⁻²¹⁾。さらに 2007 年には Kobayashi ら¹¹⁾ が、プラスミド DNA のみのトランスフェクションにより感染性レオウイルスの回収に成功した。すでに、多くの人工変異を加え、有意義な研究データを提出している¹²⁾。

現在の試みと今後の展望

現在のところ、ロタウイルスのリバーシジェネティクスの標的遺伝子は VP4 遺伝子のみである。しかも、その効率は不十分である。今後、効率を高める条件を整え、標的をもう一方の外層蛋白質 VP7、そして非構造蛋白質にも広げていきたい。さらに、ヘルパーウイルスを利用せず、11 本すべての分節 RNA に対するプラスミド DNA のみ、ないし *in vitro* で調製した RNA トランスクリプトのみでの系の開発に進めたい。ウイルス増殖過程、病原性の解析といった基礎的研究から、新世代のワクチン開発、外来蛋白質の発現ベクターといった臨床応用への道が開けるものと期待される。現在、取り組み中の課題は以下の通りである。

1) NSP1

NSP1 は、ロタウイルスの増殖には必須でない非構造蛋白質として同定された。我々は、タイで分離した A5 株の性状を検討する過程で、NSP1 コード遺伝子で 500 塩基が欠失した、あるいは、ORF の途中でナンセンスコドン有することで、それぞれ 50 アミノ酸あるいは 40 アミノ酸しかコードしない NSP1 遺伝子を有する A5-16 および A5-10 クローンを得た²³⁾。その後、NSP1 は、IRF3 の破壊を誘導し、インターフェロンの産生を抑制する働きがあるが、増殖には必ずしも必須ではない遺伝子であることが判明した²⁾。そこで、この遺伝子が、外来遺伝子を組み込む候補遺伝子となる。特に、GFP 遺伝子を挿入し、蛍光を発する細胞を、FACS で選別する方法でのロタウイルスの分離に取り組んでいる。

ロタウイルス粒子は、トータルで、本来のゲノムの総塩基数よりも、少なくとも 2400 塩基余分の塩基を収容できることが、わかっている (Chen, Wu, Taniguchi, 未発表)。そこで、NSP1 遺伝子に限らず、他の遺伝子でも、IRES を挿入し、GFP ないしは、何らかの外来遺伝子の挿入が可能である。

2) VP7

ヘルパーウイルスを抑えるための中和モノクロン抗体での選択の過程で、中和モノクロン抗体に抵抗性の変異株が比較的容易に生成される。そのため、異なる 2 種の中和エピトープに対する中和モノクロン抗体の存在下での増殖を行う。SA11-L2 株においては、感染性のトリプシンに対する依存性がきわめて低い²²⁾ ので、リバーシジェネティクスで得られている、VP4 遺伝子のみ SA11-L2 由来で他のセグメントが KU 株由来であるウイルスをヘルパーウイルスとして用いて、SA11-L2 由来の VP7 cDNA を取り込む、新しいウイルスの選別を 2 種の異なる抗 KU 中和モノクロン抗体の存在下で、低ないし無トリプシン存在下での増殖条件で可能ならずである。また、トランスフェクトする cDNA に対応するヘルパーウイルスの KU 株の VP7 遺伝子を siRNA で抑制するなどの試みも行っている。

3) プラスミド DNA のみ

上述したように、レオウイルスでは、プラスミド DNA のみでのリバーシジェネティクスが開発された¹¹⁾。すでに、SA11-L2 株およびヒトロタウイルス KU 株について、すべてのセグメントについてプラスミド DNA の調製は終え、レオウイルスの系を参考に諸条件の設定に取り組んでいる。

4) RNA トランスクリプトのみ

ブルータングウイルスと同様に、ロタウイルスにおいても、EDTA 処理で外層蛋白質 VP4 および VP7 を取り除いた一重殻粒子を用いて、プラス極性一本鎖 RNA を大量に調製できる。また、*in vitro* で調製した、プラス極性一本鎖 RNA も含めて、トランスフェクション実験を行っている。さらに、この系で、ヘルパーウイルスを利用する系に

についても試みている。

こうして、さまざまな試みが行われているが、いずれも現在のところ成功にいたっていない。他の二本鎖 RNA ウイルスと異なり、なぜロタウイルスでは困難であるのかは不明であるが、分節 RNA がレオウイルス、ブルータングウイルスよりも 1 本多いこと、それ以外の何らかの理由があるものと思われる。

おわりに

ロタウイルスのリバースジェネティクス系は、まだ自由に操ることができる状態ではない。レオウイルス、ブルータングウイルスで、本来のリバースジェネティクスが可能となったが、我々の系も改善し、さらに発展させていきたい。時を同じくして、ヒトロタウイルスワクチンの開発が報告された。100ヶ国以上で、認可され、多くの国々ですでに定期接種化もされている。本研究が次世代のワクチン、外来遺伝子導入のためのベクターとしての役割、病態の解明にも役立てるよう、さらに努力したい。

文献

- 1) Arias, C.F., Dector, M.A., Segovia, L., López, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R., and López, S.: RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 102:43-51, 2004.
- 2) Barro, M., and Patton, J.P.: Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4114-4119, 2005
- 3) Boyce, M., Celma, C.C., and Roy, P.: Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 82:8339-8348, 2008.
- 4) Boyce, M., and Roy, P.: Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. *J Virol* 81:2179-2186, 2007.
- 5) Chen, D., Zeng, Q.Y., Wenz, M.J., Gorziglia, M., Estes, M.K., and Ramig, R.F.: Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol* 68, 7030-7039, 1994.
- 6) Cuadras, M.A., Bordier, B.B., Zambrano, J.L., Ludert, J.E., and Greenberg, H.B.: Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J Virol* 80:3935-3946, 2006.
- 7) Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., and Harrison, S.C.: Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430:1053-1058, 2004.
- 8) Higo-Moriguchi, K., Akahori, Y., Iba, Y., Kurosawa, Y., and Taniguchi, K.: Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J Virol* 78:3325-3332, 2004.
- 9) Ishii, K., Ueda, Y., Matsuura, Y., Kitamura, T., Kato, K., Izumi, Y., Someya, K., Ohsu, T., Honda, M., and Miyamura, T.: Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302:433-444, 2001.
- 10) Kobayashi, N., Taniguchi, K., and Urasawa, S.: Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J Gen Virol* 71:2615-2623, 1990.
- 11) Kobayashi, T., Antar, A.A.R., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., Skelton, W.B., Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Chappell, J.D., and Dermody, T.S.: A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1:147-157, 2007.
- 12) Kobayashi, T., Ooms, L., Chappell, J.D., and Dermody, T.: Identification of functional domains in reovirus replication proteins μ NS and μ 2. *J Virol* 83:2892-2906, 2009.
- 13) Komoto, S., Kugita, M., Sasaki, J., and Taniguchi, K.: Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J Virol* 82:6753-6757, 2008.
- 14) Komoto, S., Sasaki, J., and 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.
- 15) Monnier, N., Higo-Moriguchi, K., Sun, Z.Y., Prasad, B.V., Taniguchi, K., and Dormitzer, P.R.: High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol* 80:1513-1523, 2006.
- 16) Morita, Y., Taniguchi, K., Urasawa, T., and 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.
- 17) Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresse, J.S., and Glass, R.I.: Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006 12:304-306, 2006
- 18) Ramig, R.F., and Ward, R.L.: Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. *Adv Virus Res* 39:163-207, 1991.
- 19) Roner, M.R., and Joklik, W.K.: Reovirus reverse genetics: incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8036-8041, 2001.
- 20) Roner, M.R., and Roehr, J.: The 3' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* 358:89-97, 2007.
- 21) Roner, M.R., and Steele, B.G.: Localizing the reovirus packaging signals using an engineered m1 and s2 ssRNA. *Virology* 358:89-97, 2007.
- 22) Roner MR, Sutphin LA, and Joklik WK: Reovirus RNA is infectious. *Virology* 179: 845-852, 1990.
- 23) Taniguchi, K., Kojima, K., and 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.

- 24) Taniguchi, K., Maloy, W.L., Nishikawa, K., Green, K.Y., Hoshino, Y., Urasawa, S., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., and Gorziglia, M. :Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J Virol* 62:2421-2426,1988.
- 25) Taniguchi, K., Nishikawa, K., Kobayashi, N., Urasawa, T., Wu, H., Gorziglia, M., and Urasawa, S.: Differences in plaque size and VP4 sequence found in SA11 virus clones having simian authentic VP4. *Virology* 198: 325-330,1994.
- 26) Taniguchi, K., Urasawa, S., and Urasawa, T. : Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* 66:1045-1053,1985.

Present and future of reverse genetics of rotavirus

Koki TANIGUCHI, Satoshi KOMOTO, Jun SASAKI, and Masanori KUGITA

Department of Virology and Parasitology, School of Medicine, Fujita Health University,
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan
E-mail: kokitani@fujita-hu.ac.jp

Rotavirus is the leading pathogen for acute gastroenteritis in mammals and birds. Although the reverse genetics system has been utilized in many viruses, the system using a helper virus was developed for rotavirus in 2006. As a step for antigenic analysis of VP4 antigen of rotavirus, we prepared an infectious rotavirus with a spike protein VP4 having an antigenic mosaic by substituting one of the cross-reactive neutralization epitopes of a simian strain SA-11 with the corresponding one of a human strain DS-1. The future improvement and application of the rotavirus reverse genetics were discussed in this review.