

2. ロタウイルス遺伝子操作系の開発とそれを用いた 外殻スパイク蛋白質 VP4 の解析

河本 聡志

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、冬季乳幼児嘔吐下痢症の病因ウイルスである。ロタウイルス胃腸炎により、開発途上国を中心に毎年約45万人の乳幼児が死亡している。先進国においても、ほぼすべての乳幼児が感染し、発症する。これまでに、多くのRNAウイルスにおいて遺伝子操作系（リバーシジェネティクス系）が開発され、ウイルスゲノムを任意に改変することでウイルス増殖過程や病原性に関する多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら、11本もの多分節2本鎖RNAをゲノムとするロタウイルスでは、過去10余年の間、精力的な開発の試みが行われたにもかかわらず、如何なる成功も報告されていなかった。我々は、ロタウイルス増殖過程および病原性発現機構の研究を分子レベルで展開させることを目的として、ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の開発を行ってきた。2006年にヘルパーウイルスを用いた系ではあるが、cDNAに由来するゲノム分節を有する組換えロタウイルスを作製することを可能にするリバーシジェネティクス系の開発に世界に先駆けて成功した。このシステムを外殻スパイク蛋白質VP4に応用することで、異なる血清型由来の交差反応性中和エピトープをキメラに発現する組換えロタウイルスおよび、ロタウイルス感染性の獲得に重要な役割を果たすVP4上のトリプシン切断領域にフェーリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換えロタウイルスの作製にも成功している。本稿では、これらロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の開発とその応用例、そして今後の展望を紹介したい。

はじめに

ロタウイルスは、ヒトを含めた哺乳動物および鳥類に急性胃腸炎を起こすウイルスである。感染性は極めて高く、1～100個の感染性ウイルス粒子により感染が成立することから、世界中のほぼすべての乳幼児が感染し、発症する。ロタウイルス胃腸炎により、開発途上国を中心に年間45.3万人の乳幼児が死亡している²³⁾。ロタウイルスはレオウイルス科に属し、11本の2本鎖RNA（double-stranded RNA: dsRNA）をゲノムとして、6種のウイルス構造蛋白

質（VP1～4, VP6, VP7）と6種の非構造蛋白質（NSP1～6）をコードしている。ウイルスゲノム（総塩基数：約18.6 k）はコア内部に格納されている。ロタウイルス粒子は直径80～100 nmの正20面体構造をとり、コア、内殻、外殻の3層で構成される二重殻粒子である。エンベロープは持たない⁵⁾（図1）。ウイルス粒子内にRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）やキャップ合成関連酵素を有する。コアはVP1, VP2, VP3からなり、内殻蛋白質VP6が覆って一重殻粒子を形成し、さらに外殻蛋白質VP7とVP4で覆われて二重殻粒子つまり感染性ウイルス粒子となる。VP7は平滑な粒子表面を、VP4はスパイクを形成する。正20面体粒子の各頂点には穴が存在し、粒子内部につながるチャンネルとして機能する。外殻蛋白質VP7とVP4は独立した中和抗原を有し、それぞれ血清型（遺伝子型）GタイプとPタイプを規定する。これまでに、G1～G27とP[1]～P[37]が報告されており、多数の遺伝子型が存在する^{17,25)}。

cDNAから感染性ウイルスを作製することを可能にする技術、すなわち遺伝子操作系（リバーシジェネティクス系）

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: 0562-93-2486

FAX: 0562-93-4008

E-mail: satoshik@fujita-hu.ac.jp

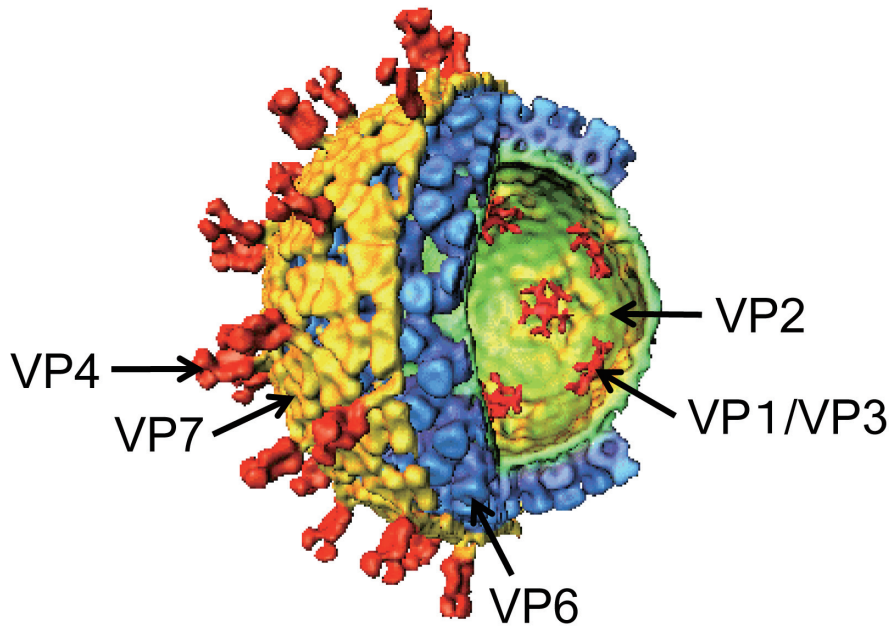


図1. クライオ電子顕微鏡法による電子密度データをコンピュータ解析して得られた感染性ロタウイルス粒子（二重殻粒子）のモデル
感染性ロタウイルス粒子は3層構造を有する。VP1, VP2, VP3 からなるコアは内殻蛋白質 VP6 に覆われて一重殻粒子を形成し、さらに外殻はVP7の平滑な表面とVP4のスパイクが取り囲み、二重殻粒子となる。（Baylor College of Medicine, Prasad 博士提供）

は、分子生物学的手法による改変が自由自在に行えるcDNAからウイルスゲノムを任意に改変した感染性ウイルスを作製することができ、ウイルス増殖過程や病原性発現機構を理解する上で最も強力な手法となる。これまでに、多くのDNAおよびRNA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。一方で、11本もの多分節dsRNAをゲノムとするロタウイルスは、そのゲノム構造の複雑さゆえか、このリバーシジェネティクス系の開発は困難を極めていた^{13, 21)}。そのため、ロタウイルス研究では、個々のウイルス遺伝子をクローニングしそれぞれを細胞に導入して発現させることや、遺伝子再集合体（リアソータント）の利用などといった従来の手法が用いられ、多くの知見が得られてきた。しかし、それぞれの遺伝子ごとに得られた情報を単純に総和しても、それらが複雑に相互作用する存在である生物としてのウイルスを真に理解することはできない。また、実際のウイルス増殖において、それら遺伝子のどの領域または塩基が関与するのかといった詳細な解析もできない。やはり、ロタウイルス増殖過程および病原性発現機構の研究を分子レベルで展開させるためには、リバーシジェネティクスの研究手法が理想的である。

1990年にロタウイルスゲノムの全塩基配列が初めて決定され¹⁸⁾、1994年にはin vitro複製系（精製したオープンコア粒子を用いてcDNA由来プラス鎖RNAを鋳型としてdsRNAゲノムを複製するin vitroシステム）が開発された³⁾。そこで、ロタウイルスにおいてもリバーシジェネ

ティクス系が開発される日は近いと予想された。しかしながら、それ以後、世界中で10余年もの間、精力的な開発の試みが行われたにもかかわらず、如何なる進歩も報告されなかった。ようやく2006年に、我々の研究室において、ロタウイルスでは初めてのリバーシジェネティクス系の開発に成功した¹²⁾。この系は、ヘルパーウイルスを必要とする初期的なリバーシジェネティクス系ではあるものの、これまで不可能であったcDNA由来の分節dsRNAゲノムを有する感染性ロタウイルスの作製を可能にした。本総説では、ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の開発とその応用例、そして今後の展望についてまとめてみたい。

1. ロタウイルスのリバーシジェネティクス系の確立

まず、ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の開発原理の理解のため、ロタウイルスの生活環におけるゲノム転写と複製を概説する。ロタウイルスの生活環は細胞質内で完結する。ロタウイルスが細胞質内に侵入すると、外殻蛋白質VP7とVP4が外れる。細胞質内に放出された一重殻粒子の内殻蛋白質VP6は再配置され、RdRpが活性化されてゲノム転写が開始する¹⁶⁾。11本のdsRNA分節それぞれのマイナス鎖を鋳型として11本の完全長のプラス鎖RNAが転写され（転写過程）、チャネルから細胞質内に放出される²⁾。このプラス鎖RNAは、5'末端にキャップ構造を有するが、3'末端にはポリAを持たない構造を

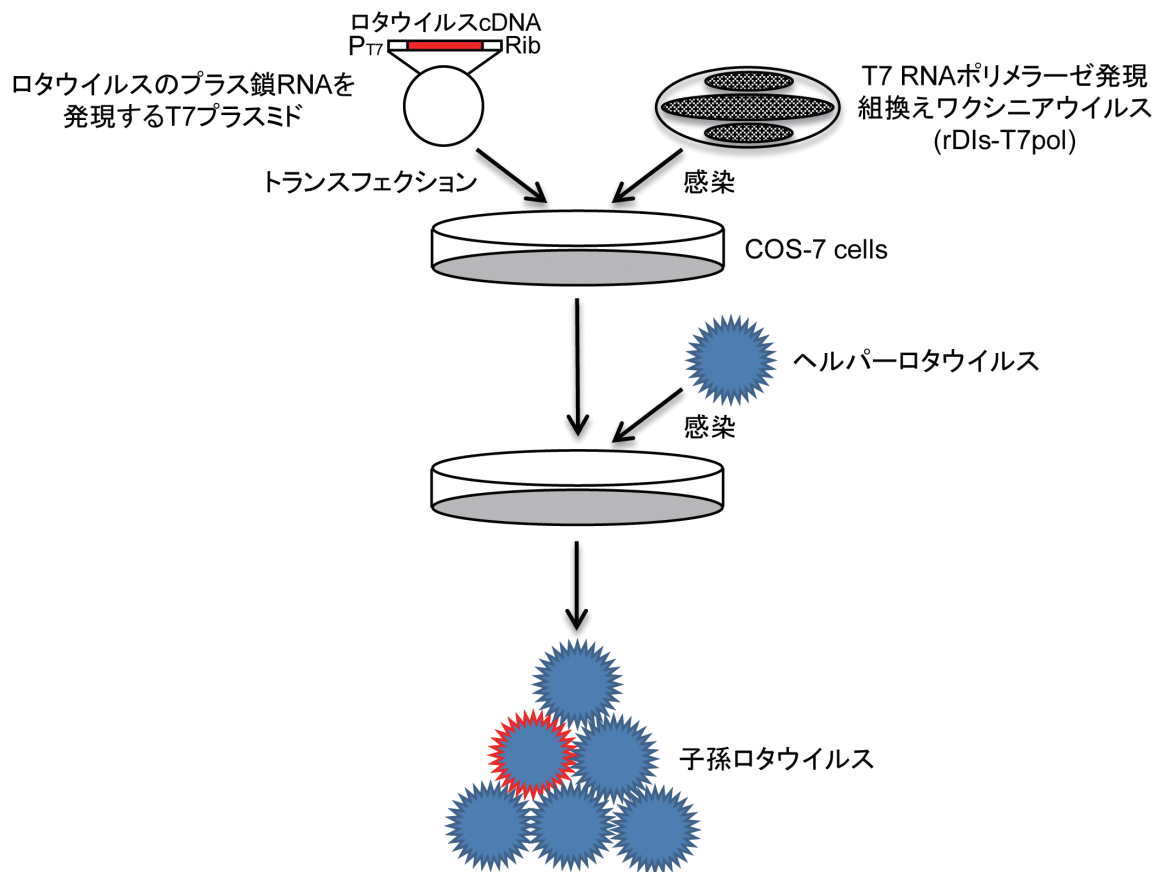


図2. ロタウイルスのリバースジェネティクス系

あらかじめ T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクシニアウイルス (rDIs-T7pol) を感染させた COS-7 細胞に、ロタウイルス遺伝子をコードする T7 プラスミドを導入し、さらにこの細胞にヘルパーウイルスを重感染させる。子孫ウイルスの中から cDNA 由来の遺伝子分節をゲノムとして有する組換えロタウイルスを選択する。P_{T7}、Rib はそれぞれ T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、HDV リボザイムを示す。

示し⁷⁾、ウイルス蛋白質合成の mRNA となるとともに、新生されるコア粒子内にパッケージングされ、ここでゲノム dsRNA 複製の鋳型ともなる (複製過程)³⁾。このゲノム複製の全過程でゲノム dsRNA はコア粒子内に格納されていることから、ゲノム dsRNA へ直接に特異的変異を導入することは不可能とされる。しかしながら、理論上は、ロタウイルス感染細胞に cDNA 由来のプラス鎖 RNA を導入すれば、新生のコア粒子内に取込まれて RdRp による dsRNA 複製の鋳型となり、cDNA 由来の dsRNA をゲノムとして有する組換えロタウイルスが作製できるのではないかと考えられた。そこで我々は、ヘルパーウイルスを用いて、11 本の分節ゲノムのうち 1 本が cDNA に由来するような組換えロタウイルスの作製を試みた (図 2)。まず、細胞内に cDNA 由来のプラス鎖 RNA を供給するため、上流から T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、サルロタウイルス SA11 株 (G3P[2]) の全長 VP4 遺伝子 (外殻スパイク蛋白質をコード) cDNA、デルタ肝炎ウイルス (HDV) リボザイム、T7 RNA ポリメラーゼターミネーター配列を

配置したプラスミド pT7/VP4(SA11) を構築した (図 3)。この T7 プラスミドを、T7 RNA ポリメラーゼ発現組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞に導入することで、ワクシニアウイルス自身がコードする 5' 末端へのキャップ構造付加活性と HDV リボザイムの自己切断活性とで、5' および 3' 末端の配列と構造がロタウイルスの真正のプラス鎖 RNA と一致した cDNA 由来のプラス鎖 RNA を細胞質内に供給できる。組換えワクシニアウイルス感染により誘導される細胞傷害性は、弱毒 rDIs-T7pol 株⁸⁾ を用いることで、その程度を最小限に抑えることが可能である。そこで、rDIs-T7pol をあらかじめ感染させた COS-7 細胞にこの T7 プラスミドを導入し、さらにヘルパーウイルスとなるヒトロタウイルス KU 株 (G1P[8]) を重感染させた。回収ウイルスの中から cDNA 由来の VP4 遺伝子分節をゲノムとする組換えウイルスを単離するため、回収ウイルスを KU 株の VP4 (P[8] タイプ) に対する特異的な中和モノクローナル抗体存在下で継代培養したところ、ロタウイルスによる細胞変性効果の出現とともに、KU 株をベースと

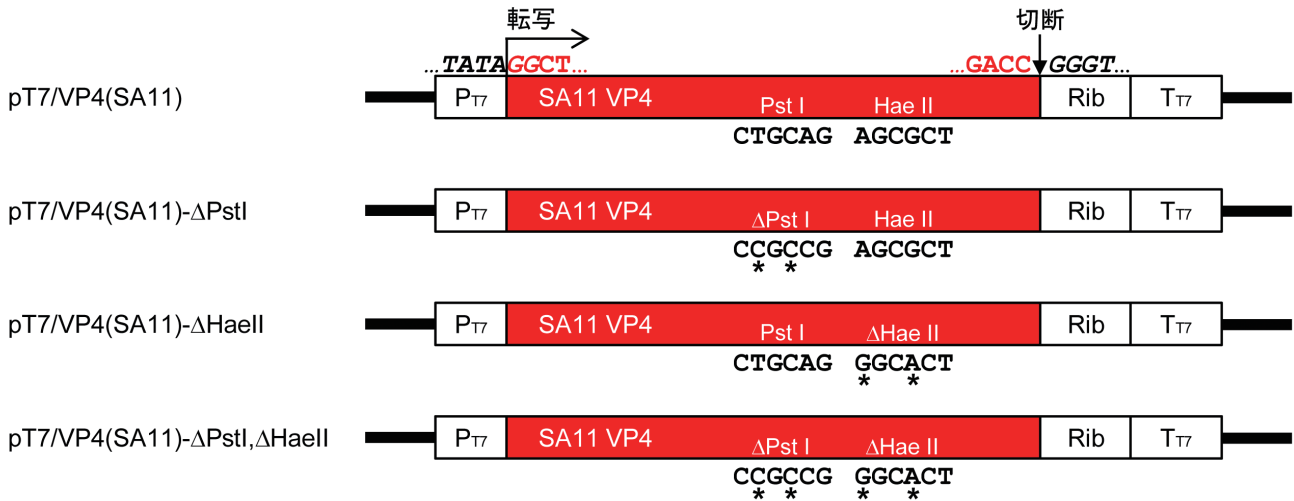


図 3. SA11 株 VP4 遺伝子のプラス鎖 RNA を発現する T7 プラスミドの構造

T7 RNA ポリメラーゼプロモーター下流に SA11 株 VP4 遺伝子 cDNA を配置したプラス鎖 RNA 転写プラスミド pT7/VP4(SA11) を構築した。また、変異を導入した 3 つの T7 プラスミドは、制限酵素 Pst I および Hae II サイトを破壊する 2 種類のサイレント変異を単独あるいは同時に有する。P_{T7}、Rib、T_{T7} はそれぞれ T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、HDV リボザイム、T7 ターミネーターを示す。(文献 13 を改変)

表 1 作製した KU//rVP4 (SA11) - II (DS-1) の抗原性

| ロタウイルス株 | VP4 エピトープ | | | VP7 エピトープ |
|---------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | エピトープ I | エピトープ II | エピトープ III | |
| SA11 | SA11 型 | SA11 型 | SA11 型 | SA11 型 |
| KU//rVP4(SA11) | SA11 型 | SA11 型 | SA11 型 | KU 型 |
| KU//rVP4(SA11)- II (DS-1) | SA11 型 | DS-1 型 | SA11 型 | KU 型 |
| KU | KU 型 | KU 型 | KU 型 | KU 型 |
| DS-1 | DS-1 型 | DS-1 型 | DS-1 型 | DS-1 型 |

して cDNA 由来の SA11 株 VP4 遺伝子 (P[2] タイプ) を dsRNA ゲノムとして有する、世界初となる組換えエロタウイルス (KU//rVP4(SA11)) が回収された¹²⁾。さらに、VP4 遺伝子上に 2 種類のサイレント変異を単独あるいは同時に導入した T7 プラスミドを構築して同様の実験を行ったところ、いずれの T7 プラスミドを用いた場合にも、同様に VP4 組換えウイルス 3 株が回収され、この開発したロタウイルスのリバースジェネティクス系の有用性が確認された (図 3)。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系開発のポイントは、P タイプ特異的な中和モノクローナル抗体を作製していたこと、組換えワクシニアウイルスに弱毒 rDIs-T7pol 株を用いたこと、プラスミド導入が容易な COS-7 細胞を利用したことだと考えられる。

2. ロタウイルスのリバースジェネティクス系の応用

外殻スパイク蛋白質 VP4 は感染初期の細胞侵入で機能するとともに、ロタウイルス粒子表面の主要な中和抗原でもある。そこで、リバースジェネティクス系を用いて、

VP4 上の 3 つの交差反応性中和エピトープ (I, II, III)²⁰⁾ の 1 つ、エピトープ II の配列をサルロタウイルス SA11 株 (P[2] タイプ) からヒトロタウイルス DS-1 株 (P[4] タイプ) に置換した、異なる P タイプ由来の中和抗原をキメラに発現するような組換えエロタウイルスの作製を試みた。SA11 株の VP4 エピトープ II 内に 5 アミノ酸変異を導入して DS-1 株由来の配列に置換した T7 プラスミドを構築し、リバースジェネティクス系で組換えエロタウイルス (KU//rVP4(SA11)-II(DS-1)) を作製した (図 4)¹⁴⁾。さまざまな P および G タイプ特異的モノクローナル抗体を用いて KU//rVP4(SA11)-II(DS-1) の抗原性を検討したところ、エピトープ II については DS-1 株 (P[4] タイプ) の抗原性を示し、エピトープ I および III については、SA11 株 (P[2] タイプ) の抗原性を保持していた (表 1)。さらに、この KU//rVP4(SA11)-II(DS-1) は、P[4] タイプ特異的なエピトープ II 配列に対する中和モノクローナル抗体でその感染性が中和されたが、逆に、P[2] タイプのエピトープ II 配列を認識する中和モノクローナル抗体との反応性は失っていた。こうして、リバースジェネティクス技術の手法で、



図 4. VP4 が抗原モザイクを示す組換えロタウイルスの作製

SA11 株 VP4 エピトープ II 内に 5 アミノ酸変異 (*で示す) を導入して, DS-1 株由来の配列に置換した組換えロタウイルス KU//rVP4(SA11)-II(DS-1) を作製した. (文献 15 を改変)

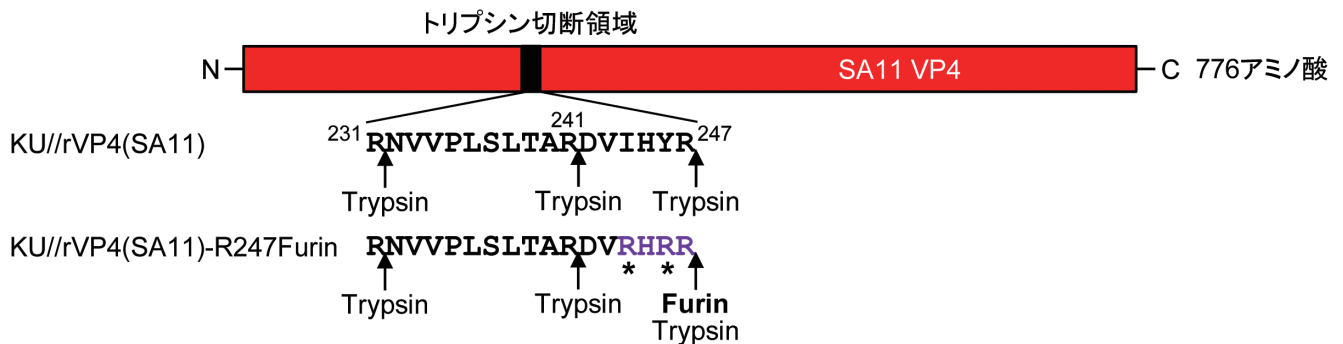


図 5. VP4 上のトリプシン切断領域にフェューリン配列を導入した組換えロタウイルスの作製

SA11 株 VP4 上のトリプシン切断領域に 2 アミノ酸変異 (*で示す) を導入することで, フェューリン認識配列 (紫色) を導入した組換えロタウイルス KU//rVP4(SA11)-R247Furin を作製した. (文献 16 を改変)

設計通りに VP4 が抗原モザイクを示す感染性ロタウイルスの作製が可能となった. 将来的には, 1 種類のロタウイルスで複数の異なる血清型の中和エピトープを発現するロタウイルスワクチンの開発への可能性が期待できる.

エンベロープウイルスの多くは, 表面スパイク蛋白質が宿主プロテアーゼによって切断活性化されることで感染性を獲得する. このため, 宿主プロテアーゼによるスパイク蛋白質の切断活性化は, 多くのエンベロープウイルスの病原性発現に深く関わっている⁹⁾. 単独あるいは連続した塩基性残基からなる切断部位は, それぞれが細胞外トリプシン様プロテアーゼと細胞内フェューリン様プロテアーゼによって切断を受ける. 非エンベロープウイルスであるロタウイルスも, トリプシンで VP4 が VP8* と VP5* に切断されることで感染性を獲得する⁴⁾. そこで, トリプシン非存在下でのロタウイルス多段階増殖の可能性を試みる目的で, VP4 上のトリプシン切断領域にフェューリン様プロテアーゼ認識配列を導入した組換えロタウイルスの作製を試みた. SA11 株の VP4 遺伝子上のトリプシン切断領域 (244IHYR247) にフェューリン認識配列 (244RHRR247) を置換導入した組換えロタウイルス (KU//rVP4(SA11)-R247Furin) をリバースジェネティクス系で作製した (図 5)¹⁵⁾. KU//rVP4-R247Furin は予想外にトリプシン非存在下では

多段階増殖し得ないのみならず, 新生ビリオンの大部分が感染細胞内に蓄積しており, 増殖能は野生型 VP4 を有する親株 (KU//rVP4(SA11)) に比べて大きく低下した (図 6). 細胞内での VP4 切断活性化は, ロタウイルス増殖には負に作用する可能性が示唆された. こうして, リバースジェネティクスの手法は, 実際のウイルス増殖における各遺伝子の機能を明らかにする上で非常に有用である. また, このようなロタウイルス感染性の弱毒化に関与する遺伝子変異の情報は, 次世代のワクチンを開発する際に役立つものと期待される.

一方で, 我々のロタウイルスのリバースジェネティクス系の標的は VP4 遺伝子のみであったが, NSP2²⁴⁾ および NSP3 遺伝子²⁶⁾ についてもこのシステムを改変することで適用可能であることが報告されている. 今後さらに, 残る 8 遺伝子分節についても組換えウイルスを単離するための選択条件を開発し, ロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系を発展させていく必要がある.

3. ロタウイルスのリバースジェネティクス系の改良

我々は, ロタウイルスのリバースジェネティクス系を応用した研究を進めながら, より効率良く研究を進めるために, 現在のシステムを改良する試みも行ってきた. リバー

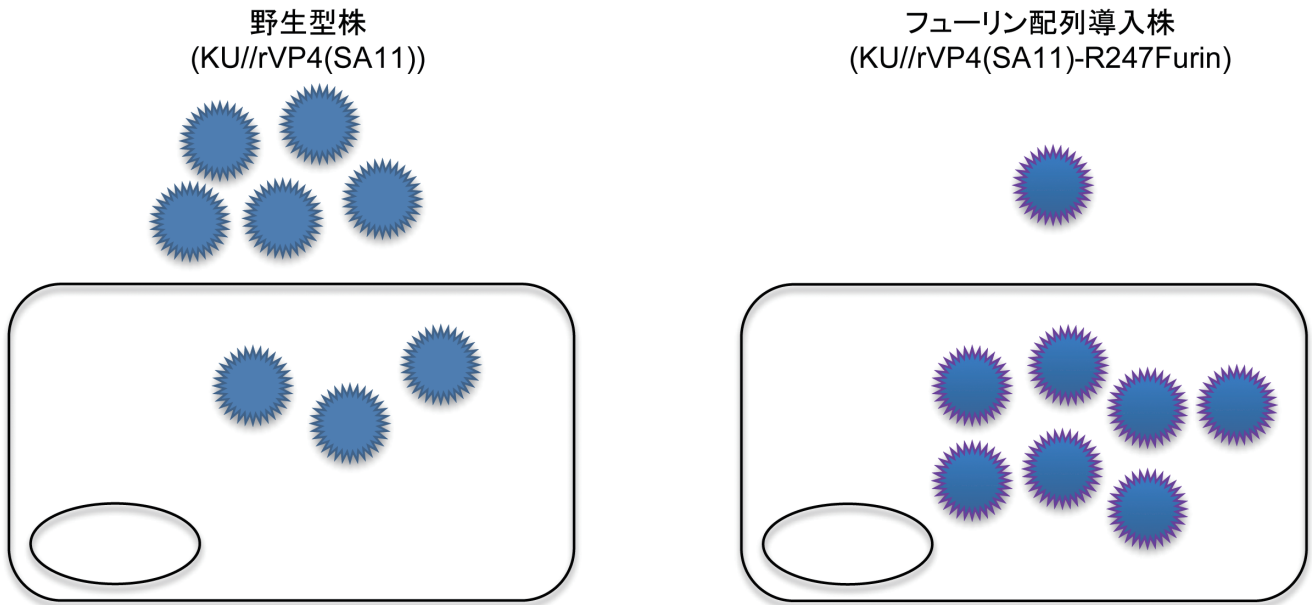


図 6. フューリン配列導入株の細胞内蓄積

フューリン配列導入株 (KU//rVP4(SA11)-R247Furin) では、新生ウイルス粒子の大部分が感染細胞内に蓄積しており、増殖能は野生型株 (KU//rVP4(SA11)) に比べて大きく低下した。

スジェネティクス系による組換えウイルスの回収効率は、大多数のヘルパーウイルスの中から組換えウイルスを単離するための選択条件に依存するので、この選択条件を改良することで組換えウイルス回収効率を改善できると考えられた。我々は、VP4 遺伝子をコードする T7 プラスミドとともに、ヘルパーウイルス由来の VP4 プラス鎖 RNA を特異的に分解する siRNA の発現プラスミド (U6 プラスミド) を細胞に共導入することにより、VP4 組換えウイルスの回収効率を大きく向上させることができた (図 7) (Komoto and Taniguchi, 未発表)。この改良したリバースジェネティクス系を用いることで、より容易に組換えロタウイルスが作製できるようになり、現在は、VP4 上のトリプシン切断領域にさまざまな変異を導入した組換えロタウイルスを多数作製し、この領域の各残基における切断の重要性について詳細な解析を進めている。一方で、中和モノクローナル抗体と RNAi メカニズムを組み合わせたこの強力な選択条件は、これまで系の開発に至っていない、もう一方の外殻蛋白質 VP7 を標的としたリバースジェネティクス系の開発につながるものと期待される。

4. ヘルパーウイルスを用いないロタウイルスのリバースジェネティクス系開発の試み

上述したように、ロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系はヘルパーウイルスを必要とするため、回収ウイルスの中から組換えウイルスを単離するための強力な選択条件が必要であり、その選択条件が開発されているのは

11本の遺伝子分節のうち3本に過ぎない。また、これらシステムでは、変異導入によって増殖能が大きく低下した組換えウイルスの単離は困難である。この問題は、ロタウイルスを任意に設計する上で大きな問題であり、ヘルパーウイルスを必要としないリバースジェネティクス技術の開発が望ましい。近年、レオウイルス科に属し、いずれも10本の dsRNA 分節をゲノムとする、哺乳類オルソレオウイルス (レオウイルス)^{10, 11)} とブルータングウイルス¹⁾ において、cDNA 由来の全10本のプラス鎖 RNA を細胞内に供給するだけで、ウイルス複製を開始させることができると報告された。このことは、レオウイルス科における最小複製単位はゲノム全分節のプラス鎖 RNA であることを強く示している。11本の dsRNA 分節をゲノムとするロタウイルスにおいても、全11本の cDNA 由来プラス鎖 RNA を細胞内に供給することで、感染性ロタウイルスが合成できると考えられる。しかしながら、世界中の多くの研究室がこれらのシステムをロタウイルスに適用するべく全力を挙げているものの、いまだに成功には至っていない。一方で、我々の研究室においても、T7 RNA ポリメラーゼを発現している細胞にレオウイルスゲノムをコードする10個の T7 プラスミド (Vanderbilt University, Dermody 博士から分与) を導入するだけで、効率良く感染性レオウイルスを合成できている (Komoto et al., 投稿中)。何故ロタウイルスではヘルパーウイルスを必要としないリバースジェネティクス系の開発が困難であるかは不明であるが、考えられる要因として以下を挙げるができる: (1)

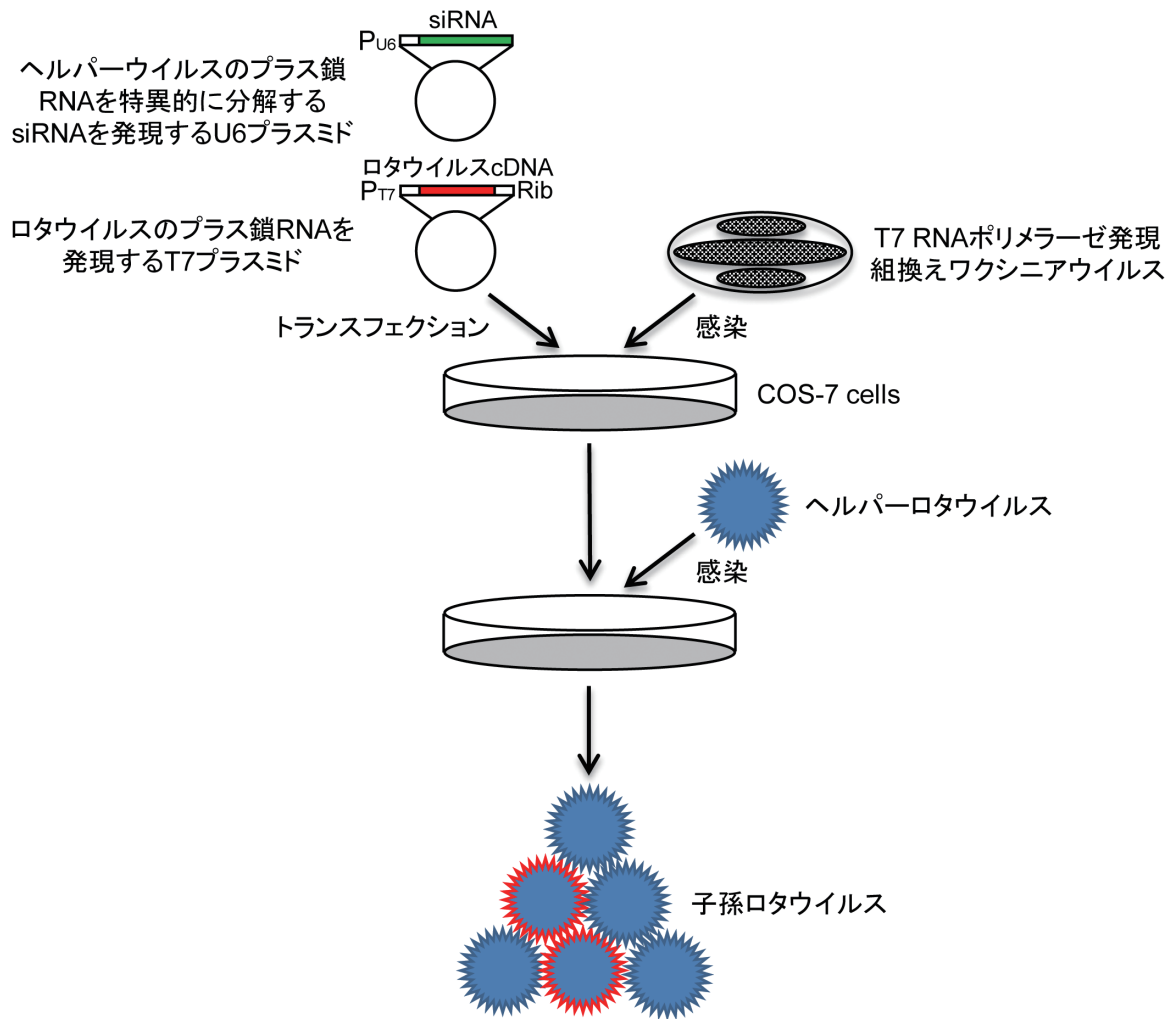


図7. ロタウイルスのリバースジェネティクス系の改良

VP4 遺伝子をコードする T7 プラスミドとともに、ヘルパーウイルス由来の VP4 プラス鎖 RNA を特異的に分解する siRNA の発現プラスミド (U6 プラスミド) を共導入することで、VP4 組換えウイルスの回収効率は大きく改善した。Pu6, Pt7, Rib はそれぞれ U6 プロモーター、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター、HDV リボザイムを示す。

ロタウイルスは、遺伝子分節がレオウイルスよりも 1 本多い、(2) 培養細胞におけるロタウイルス増殖能 (10^8 PFU/ml) は、レオウイルス増殖能 (10^9 PFU/ml) よりも一桁低い、(3) ロタウイルス増殖のためには、培地から FCS を除いた上でトリプシンを添加する必要がある、この操作が、大量のプラスミドを導入した細胞にダメージを与える、(4) 産生されるロタウイルス粒子全体中の感染性ウイルス粒子の割合は、レオウイルスの場合と比較し、きわめて少ない⁶⁾。我々は、サルロタウイルス SA11 株およびヒトロタウイルス KU 株のゲノムをコードする T7 プラスミドの構築を終え、これらの考えられる要因のいくつかを回避する工夫を含めてさまざまな試みを行っているが、現在のところいずれも成功に至っていない²¹⁾。このことは、ヘルパーウイルスを用いないロタウイルスのリバースジェネ

ティクス系を開発するためには、従来の実験手法と現在のヘルパーウイルスを用いるリバースジェネティクス系を動員することで、ロタウイルス複製に関する知見をより一層深めることが必要であるように思われる。

おわりに

RNA ウィルスでは、1978 年のバクテリオファージ Q β ²²⁾ から始まって 1981 年のポリオウイルス¹⁹⁾ と続き、現在ではそのほとんどでリバースジェネティクス系が開発され、ウイルス遺伝子の機能解析研究に役立っている。しかしながら、11 本もの多分節 dsRNA をゲノムとするロタウイルスは、長らくこの技術の適用を頑なに拒否してきた。しかしながら、本稿で述べたように、ロタウイルスにおいても、ようやくこの分野の突破口が開かれた。その結果、従来の

手法では手の出なかった、実際のロタウイルス増殖における各遺伝子の詳細な機能解析が可能になりつつある。さらに現在の系を発展させ、ヘルパーウイルスを必要とせずに任意にロタウイルスを設計しうる技術を開発し、ロタウイルス増殖過程や病原性発現機構の研究を飛躍的に展開することが期待される。我々がロタウイルスのリバースジェネティクス系の開発を報告した2006年、時を同じくして2種のロタウイルスワクチンの開発が報告された。これらのワクチンは100ヶ国以上で認可され、約30ヶ国で定期接種されている。我々の研究が、新世代のワクチンやウイルスベクターの開発といった臨床応用にも役立てるよう努力していきたい。

謝辞

本研究は、2003年から藤田保健衛生大学医学部で谷口孝喜先生の御指導のもと、多くの方々の御指導、御支援、御協力の上で推進して参りました。ここに深く感謝申し上げます。名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞にご推薦下さいました谷口孝喜先生、生田和良先生、鈴木信弘先生、本研究を評価して頂きました日本ウイルス学会の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Boyce M, Celma CC, Roy P.: Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 82:8339-8348, 2008.
- 2) Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J.: Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* 76:7822-7831, 2002.
- 3) Chen D, Zeng CQ, Wentz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF.: Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol* 68:7030-7039, 1994.
- 4) Estes MK, Graham DY, Mason BB.: Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* 39:879-888, 1981.
- 5) Estes MK, Kapikian AZ.: Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 5th ED. Knipe DM, Howley PM (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1917-1974, 2007.
- 6) Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desselberger U.: Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passages at high multiplicity of infection. *Virology* 143:88-103, 1985.
- 7) Imai M, Akatani K, Ikegami N, Furuichi Y.: Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol* 47:125-136, 1983.
- 8) Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, Miyamura T.: Structural analysis of vaccinia virus D1s strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302:433-444, 2002.
- 9) Klenk HD, Garten W.: Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2:39-43, 1994.
- 10) Kobayashi T, Antar AAR, Boehme KW, Danthi P, Eby EA, Guglielmi KM, Holm GH, Johnson EM, Maginnis MS, Naik S, Skelton WB, Wetzel JD, Wilson GJ, Chappell JD, Dermody TS.: A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1:147-157, 2007.
- 11) Kobayashi T, Ooms LS, Ikizler M, Chappell JD, Dermody TS.: An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398:194-200, 2010.
- 12) Komoto S, Sasaki J, 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.
- 13) Komoto S, Taniguchi K.: Reverse genetics systems of segmented double-stranded RNA viruses including rotavirus. *Future Virology* 1:833-846, 2006.
- 14) Komoto S, Kugita M, Sasaki J, Taniguchi K.: Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J Virol* 82:6753-6757, 2008.
- 15) Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moriguchi K, Taniguchi K.: Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *J Gen Virol* 92:2914-2921, 2011.
- 16) Libersou S, Siebert X, Ouldali M, Estrozi LF, Navaza J, Charpilienne A, Garnier P, Poncet D, Lepault J.: Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *J Virol* 82:2844-2852, 2008.
- 17) Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156:1397-1413, 2011.
- 18) Mitchell DB, Both GW.: Comparison of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* 177:324-331, 1990.
- 19) Racaniello VR, Baltimore D.: Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214:916-919, 1981.
- 20) Taniguchi K, Maloy WL, Nishikawa K, Green KY, Hoshino Y, Urasawa S, Kapikian AZ, Chanock RM, Gorziglia M.: Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J Virol* 62:2421-2426, 1988.
- 21) Taniguchi K, Komoto S.: Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2:399-407, 2012.
- 22) Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C.: QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 274:223-228, 1978.

- 23) Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Dugue J, Parashar UD, WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network.: 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12:136-141, 2012.
- 24) Trask SD, Taraporewala ZF, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT.: Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18652-18657, 2010.
- 25) Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R.: Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol* 94:136-142, 2013.
- 26) Troupin C, Dehee A, Schnuriger A, Vende P, Poncet D, Garbarg-Chenon A.: Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol* 84:6711-6719, 2010.

Reverse genetics system of rotaviruses: development and application for analysis of VP4 spike protein

Satoshi KOMOTO

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

The rotavirus genome is composed of 11 gene segments of double-stranded (ds)RNA. Reverse genetics is the powerful and ideal methodology for the molecular analysis of virus biology, which enables the virus genome to be artificially manipulated. Although reverse genetics systems exist for nearly all major groups of RNA viruses, development of such a system for rotaviruses is more challenging owing in part to the technical complexity of manipulation of their multi-segmented genome. A breakthrough in the field of rotavirus reverse genetics came in 2006, when we established the first reverse genetics system for rotaviruses, which is a partially plasmid-based system that permits replacement of a viral gene segment with the aid of a helper virus. Although this helper virus-driven system is technically limited and gives low levels of recombinant viruses, it allows alteration of the rotavirus genome, thus contributing to our understanding of these medically important viruses. In this review, I describe the development and application of our rotavirus reverse genetics system, and its future perspectives.