

3. オルビウイルスの初期複製と VP6 タンパク質の機能解析

松尾 栄子

神戸大学大学院農学研究科 感染症制御学教室

レオウイルス科 (family *Reoviridae*) に属するオルビウイルス (genus *Orbivirus*) は、節足動物を介して主に反芻動物やウマに感染し、重篤な感染症を引き起こす。また、ヒトへの感染も数例報告されている。近年、2本鎖 RNA (dsRNA) ウイルスで、相次いで遺伝子操作法 (reverse genetics, RG システム) が開発され、ウイルスタンパク質やゲノムに挿入した特定の変異が、実際のウイルス複製サイクルにどのような影響を及ぼすかを直接精査できるようになった。オルビウイルスでは特に、ブルータングウイルス (BTV) において、分子レベルからの複製機構の解析が進んでいる。本稿では、BTV での研究を中心に、RG システムを用いて明らかになったオルビウイルスの複製機構と、オルビウイルスに特有の構造タンパク質 VP6 の機能について概説する。

1. はじめに

オルビウイルス (genus *Orbivirus*) は 10 分節の 2 本鎖 RNA をゲノムとして有し、15 属あるレオウイルス科 (family *Reoviridae*) のうちの 1 属である。国際ウイルス分類委員会 (International committee on taxonomy of virus, ICTV) によって、1974 年に、ブルータングウイルス (Bluetongue virus, BTV), アフリカ馬疫ウイルス (African horse sickness virus, AHSV), 流行性出血病ウイルス (Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV) など 9 種類のウイルスがオルビウイルス属として初めて分類された。オルビの名前は、ドーナツのようなウイルスカプシドの形状³¹⁾から、「Ring= 輪っか」を意味するラテン語である「Orbi」に由来している。現在、2013 年度版の ICTV によるウイルス分類において、オルビウイルス属には、22 種類のウイルスが分類されており、また、種として未分類のオルビウイルスも存在している^{4, 17, 49, 74)}。

オルビウイルス感染症には、アフリカ馬疫 (AHS) や

ブルータング病 (BT) など、畜産業に甚大な影響を与える感染症だけでなく、少数ではあるが、人獣共通感染症も含まれている。現在、オルビウイルス感染症に対する有効な対処法はワクチンのみである。また、オルビウイルスの感染・複製機序の詳細や病原性発揮のメカニズムも不明である。近年、オルソレオウイルス³³⁾、ロタウイルス³⁴⁾に続いて、オルビウイルスでも特定の変異を導入した感染性ウイルス粒子を効率よく作出できる遺伝子操作系 (リバーシジェネティクス, RG システム) が開発され^{5, 7, 28, 44)}、ウイルス複製の詳細な解析が始まっている。

本稿では、オルビウイルスの基礎的性状について紹介すると共に、オルビウイルスの中でも研究が最も進んでいる、BTV での報告を中心に、その分子機構や複製機構、特にオルビウイルスが持つユニークな構造タンパク質 VP6 の機能について概説する。

2. オルビウイルスの疫学と対策

オルビウイルスは同じ科のオルソレオウイルスやロタウイルスとは異なり、ダニや蚊などの吸血性節足動物を介して感染するアルボウイルス (arbovirus) である。そのため、オルビウイルス感染症の発生病域・発生時期は、その媒介節足動物の生息域・発生時期と一致する⁵⁵⁾。近年の輸送手段の発達や、気候変動などにより、これまで生息していなかった地域での媒介節足動物の拡散に伴って、BTV などのアルボウイルスの感染が拡大する可能性が報告されている^{1, 22, 41)}。

オルビウイルスの多くは、主にヒツジやウシ、ウマなど

連絡先

〒 657-8501

兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1

神戸大学大学院農学研究科 資源生命科学専攻

応用動物学講座 感染症制御学教室

TEL & FAX: 078-803-5818

E-mail: eiko_matsuo@amethyst.kobe-u.ac.jp

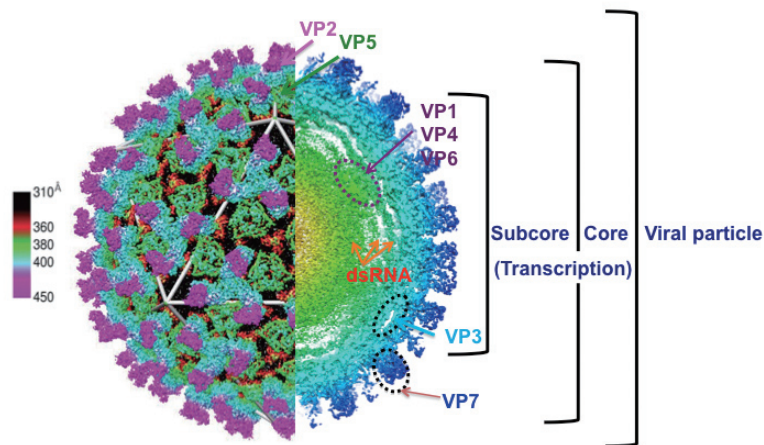


図1 BTV粒子の構造(参考文献^{51,73)}より改変)

外殻: VP2 (レセプター結合タンパク質), VP5 (膜融合タンパク質); コア粒子: VP7, VP3, VP1 (RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ), VP4 (Cap 構造付加酵素), VP6 (ATP 依存的 RNA ヘリケース), 10 分節の dsRNA (S1~S10)

動物に感染し、ヒトへの感染は報告されていないが、いくつかのオルビウイルスは、ヒトにも感染する人獣共通感染症の原因ウイルスである。オルビウイルスの感染から発症までの潜伏期間はおよそ数日~20日である(国際獣疫事務局 OIE 2014 technical-disease-cards, <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/technical-disease-cards/>)。また、宿主によっては感染しても病原性を発揮せず、不顕性感染に終わることもある。このような不顕性感染をしている宿主がオルビウイルスのリザーバー(reservoir)になる可能性がある。例えば、AHSV では、不顕性感染したシマウマやロバに加えてワクチン接種のため不顕性感染しているウマが新たな感染源となる可能性が報告されている^{54,72)}。

ヒトにも感染するオルビウイルスは、発熱や頭痛など、軽い疾患をヒトに引き起こし、時として髄膜炎などを引き起こすことが報告されているが、死亡することはまれである^{10, 15, 23, 36, 40, 52, 66, 67)}。一方、動物にのみ感染が報告されているオルビウイルスの感染力や致死率は様々である。例えば、ウマ脳症ウイルス(Equine encephalosis virus, EEV)では滅多に感染個体は死亡しないが^{26,27)}、BTV では、感染個体の致死率は70%以上^{7,59)}、AHSV では、95%にも及ぶ場合がある¹⁶⁾。また、その症状も粘膜の充血、発熱、嚥下障害、泡沫性流涎、蹄冠炎による歩行障害、死産、浮腫、肺水腫、大脳欠損など様々である。

AHSV や BTV のように高い致死率のオルビウイルスによる家畜の疾病は、感染個体の死亡などにより、経済的損失を招く。また、イバラキウイルス(Ibaraki virus, IBAV)を含む EHDV のように、致死率は20%程度だが、その感染により、乳牛の産乳量の激減など生産力の低下により畜産経済に大きな影響を及ぼすものもある^{32,60)}。さらに、

これらのウイルスが流行している地域からの感受性個体の移動制限や、精液、受精卵の移動も禁じられるため、輸出入における損失も甚大である²⁾。

日本では、BTV と IBAV の家畜への感染が報告されており、BT と イバラキ病は家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。BT は2006年を最後にその発生は報告されていないが、その後も、媒介昆虫であるヌカカや感染モニタリング用の「おとり牛」から BTV が検出されており⁶³⁾、再びアウトブレイクが起こる可能性がある。一方、イバラキ病は、2000年を最後にその発生はしばらく途絶えていたが、2013年には鹿児島で2頭の発症が確認されている(農林水産省平成25年次監視伝染病発生年報, http://www.maff.go.jp/j/syuan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)。また、ほぼ毎年、「おとり牛」において、IBAV 抗体の陽転が確認されており、今後もアウトブレイクが起こる可能性は否定できない。

AHSV や BTV, IBAV の家畜への感染予防には、生ワクチンや不活化ワクチンが用いられている。しかし、1997年に死産を起こした IBAV⁵³⁾ や、2006年から2008年にかけて、英国を含むヨーロッパでアウトブレイクした BTV 血清型8 (BTV-8)⁶¹⁾ のように、ワクチン株と血清型の異なるウイルスが新たに侵入した場合や、これまでウイルスが存在しなかった地域に侵入した場合、また病原性が確認されなかったためワクチン接種が行われなかった家畜が新たに感染・発症した場合には、その感染・流行拡大を止めることはできない。さらに、ワクチンの製造までには時間がかかるため、迅速な対応は期待できない。また、発症個体に対する治療法は補液などの対症療法しかないため、感染症流行の収束までには時間がかかる。

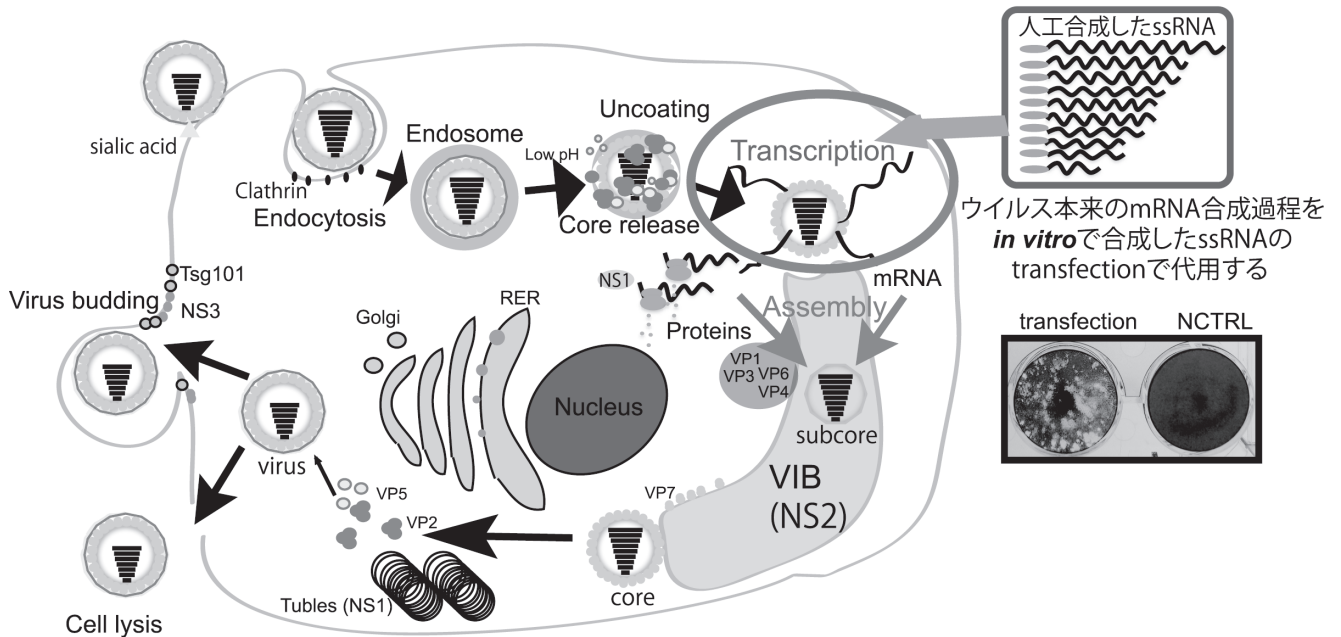


図2 BTVの複製サイクルの概観^{51,59)}とRGシステムの原理

3. オルビウイルスの構造とウイルス複製サイクル

オルビウイルスは、エンベロープを持たない直径80~90nmの球状の粒子で、2層のカプシド構造をとる(図1)。外殻はレセプター結合タンパク質であるVP2^{25, 73)}と膜融合タンパク質であるVP5^{20, 24)}からなる。外殻の内側にあるコア粒子はVP3とVP7からなる内殻とその内側の3つの酵素タンパク質: VP1(ポリメラーゼ), VP4(Cap構造付加酵素), VP6(ATP依存性RNAヘリカーゼ)と10分節のゲノムdsRNAからなる転写複合体で構成されている。コア粒子からVP7粒子を除いたものをサブコア粒子と呼ぶ。また、感染細胞内では上記の7種類の構造タンパク質以外に、4種類の非構造タンパク質(NS1~NS4)が発現される^{57, 68, 70)}。

10分節のdsRNA(S1~S10)にはそれぞれ非翻訳領域(UTR)に挟まれるように翻訳領域(CDR)が存在する⁵⁸⁾。各dsRNAの+鎖RNAの5'末にはCap構造を有し、Cap依存性mRNA合成が行われる。UTRは、ウイルスゲノムの粒子への取り込みに重要な働きをしていると考えられている^{9, 37)}。CDRにはS9とS10を除き、それぞれ1個のタンパク質がコードされている^{68, 70)}。S9のCDRには、酵素タンパク質であるVP6と非構造タンパク質であるNS4が異なるオープンリーディングフレーム(ORF)上にそれぞれコードされている⁵⁷⁾。S10には非構造タンパク質であるNS3がコードされているが、同じORF上の2個目の開始コドンから翻訳が開始され、NS3のN末13アミノ酸

が欠損したNS3Aが発現する場合がある^{21, 35)}。

オルビウイルスの複製サイクルは、基本的にはオルソレオウイルスやロタウイルスと類似点が多い(図2)。まず、VP2が宿主細胞表面のシアル酸に結合した後、クラスリン依存性エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる^{18, 73)}。エンドソーム内に取り込まれたウイルス粒子の外殻はpH依存性にエンドソーム膜と融合して脱殻し、細胞質内にコア粒子を放出する^{19, 69)}。放出されたコア粒子は、転写活性を持ち、mRNAの合成を始める。コア粒子から合成・放出されたmRNAは、リボソームに運ばれウイルスタンパク質を合成する。この時、非構造タンパク質であり、翻訳促進機能を持つNS1がまず合成され、他のタンパク質の合成を促進すると考えられている⁶⁾。合成されたタンパク質のうち、サブコア粒子を形成するタンパク質(VP1, VP3, VP4, VP6)と10本のmRNAは、非構造タンパク質のNS2が形成するウイルス封入体(VIB)に運ばれ、サブコア粒子を形成した後^{37, 48)}、VP7を獲得し、コア粒子となってVIBから運び出される^{29, 38, 39, 50)}。コア粒子はVP5, VP2を獲得して成熟ウイルス粒子となり、非構造タンパク質NS3と宿主タンパク質Tsg101などの働きで、宿主細胞から出芽(budding)もしくは細胞溶解(cell lysis)によって放出される^{3, 13, 14)}。

4. オルビウイルスにおけるRGシステムの構築と初期複製機構

筆者らは、オルビウイルスを含むレオウイルス科のウイ

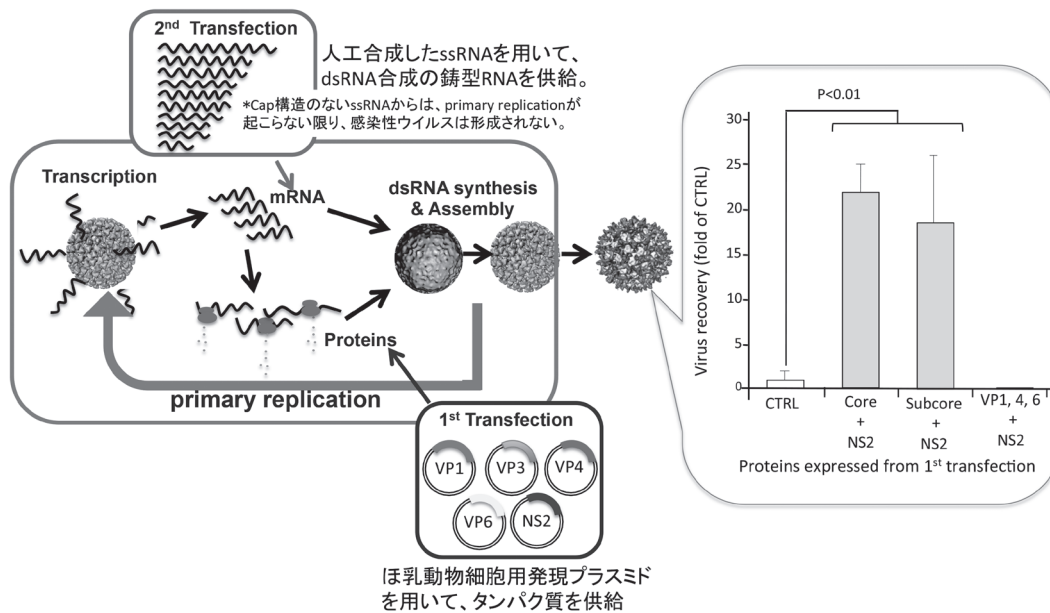


図3 RGシステムを用いたBTVの初期複製の証明(参考文献⁴⁸⁾より改変)

Cap構造のないBTV ssRNAからはBTVタンパク質が合成されない。しかし、1回目のtransfectionで供給されたBTVタンパク質と2回目のtransfectionで供給されたssRNAがPRCを形成すると、PRC内で合成されたssRNAにはCap構造がVP4によって付加されるため、VP2、VP5を含む全てのBTVタンパク質が合成された結果、感染性ウイルスが産生される。CTRL: Cap構造をもつssRNAを1回transfectionした細胞から産生されたBTV量

ルスに特徴的な複製ステップ「脱殻コア粒子内でのmRNA合成および細胞質への放出」を利用して、RGシステムを構築した。すなわち、*in vitro*で合成されたmRNAを細胞内へtransfectionすることで、コア粒子からのmRNAの放出をmimicした(図2)。mRNAの合成には、まず、感染細胞から精製したコア粒子を用いた(core RNA)^{7, 44}。現在では、より効率よく変異体を作製するために、ウイルスdsRNAから各分節のcDNAを合成し、T7プロモーター下流にそれぞれ挿入したプラスミドから、T7 RNAポリメラーゼを用いて10本の一本鎖+RNA(ssRNA)を合成している(T7 RNA)^{5, 28, 47, 48}。さらに、初期複製機構(primary replication)と呼ばれる、ウイルス増幅機構を利用したdouble-transfection法を用いて効率よく変異ウイルスを作製している^{28, 47, 48}(図3)。

レオウイルス科のウイルスの複製サイクルには、ウイルスを効率よく増殖させる機構が存在すると長く信じられてきた。例えば、オルソレオウイルスではsecondary transcriptionと呼ばれる、新たに形成されたサブウイルス粒子から再びssRNA合成が始まるステップの存在が報告されている⁶²。しかし、直接的にその機構の存在を証明した研究は少ない。オルビウイルスでは、RGシステムを用いて、ウイルス増幅機構を証明し、初期複製機構(primary replication)と名付けた⁴⁷(図3)。

BTVでは、10本のT7 RNAを1回transfectionするよりも1日間隔で2回transfection(double-transfection)する方が、ウイルス産生率が高いことが分かっていた。そこで、double-transfectionの1回目のtransfectionの条件によって、ウイルス産生率がどのように変化するか調べた(図3)。すると、1回目のtransfectionで、サブコア粒子を構成するタンパク質(VP1, VP3, VP4, VP6)とNS2を十分量発現した場合、たとえ、2回目のtransfectionにCap構造のないT7 RNAを用いても、1回transfectionするよりもはるかに多くのBTVが産生された^{47, 48}。しかし、1回目のtransfectionで、VP3を発現しない場合、ウイルス産生は激減したことから、VIB内で形成されたサブコア粒子は転写活性を持ち、新たにmRNAを合成することが明らかになった⁴⁸。したがって、BTVの複製サイクルには初期複製機構があり、初期複製複合体(primary replication complex, PRC)の最小単位はサブコア粒子であることが証明された。

さらに、詳細に初期複製機構を調べるために、2回目のtransfectionでVP7がコードされているS7 T7 RNAのみにCap構造を付加せず、新たに形成されたサブコア粒子からmRNAが合成されない限りVP7の発現がほとんどない場合、1回のみtransfectionするよりもはるかに効率は良いものの、2回目のtransfectionからのVP7発現がある場

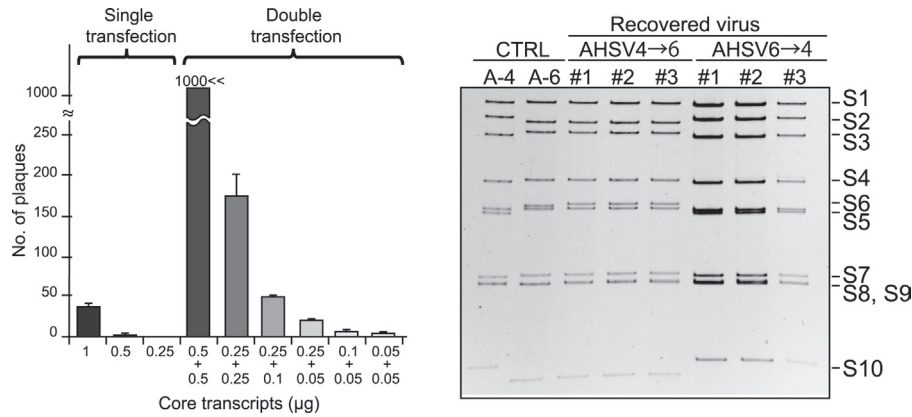


図4 RGシステムを用いたAHSVの初期複製の証明(参考文献⁴⁴⁾より引用)

BSR細胞にcore RNA (Core transcripts)の量もしくは回数を変えてtransfectionした場合のAHSV産生量(左図)と、1回目と2回目に異なる血清型のAHSV由来のcore RNAを用いてtransfectionして得られたAHSVのdsRNA泳動パターン(右図)。CTRL:血清型4型(A-4)と6型(A-6)のAHSVから得たdsRNA

合に比べてウイルスの産生効率が悪くなった⁴⁸⁾。近年開発された、BTVのCell-free assembly system (CFA)でも、VP7がない場合、形成されたサブコア粒子中のゲノムにRNase耐性がないことが分かっており³⁷⁾、サブコア粒子は非常に不安定で、VP7によって、PRCの安定性を高めていると考えられた⁴⁸⁾。また、VP7によりVIBからタンパク質合成の場である細胞質内にPRCを移動させている可能性がある^{29,48)}。

ウイルスタンパク質合成の初期に翻訳されると考えられている、NS1とNS2の初期複製への関与を調べたところ、VIBの構成要素であるNS2を予め発現させないと、ウイルス産生量が激減するため、VIB(NS2)は、初期複製には重要な因子であることが分かった⁴⁸⁾。一方、NS1は、RGシステムの場合にはほ乳動物細胞用発現プラスミドで初期複製に関与するタンパク質を発現させるので不要だが、実際のウイルス複製サイクルでの初期複製においては、ウイルスタンパク質の翻訳促進に寄与していると考えられる^{6,48)}。いずれの非構造タンパク質も、人工タンパク質合成システムを利用したCFAシステムでは、サブコア粒子の形成に関与しないことが分かっている³⁷⁾。

残りのウイルスタンパク質(VP2, VP5, NS3/NS3A, NS4)の複製機構への関与は明らかではない。しかし、ウイルス放出に関与しているNS3を予め過剰発現させた場合、ウイルス産生の低下が観察されることがある。このことは、新たに形成されたサブコア・コア粒子が、初期複製の開始、あるいはウイルス成熟の開始のどちらのステップに進むのかを決定する因子を研究する上で重要な知見であるかもしれない。

AHSVでは、BTVにやや遅れてRGシステムが開発された^{28,44)}。まず、AHSVのcore RNAをdouble-transfection

したところ、急激なウイルス産生の増加がみられた⁴⁴⁾(図4)。また、血清型の異なるAHSVのdsRNAはポリアクリルアミドゲルでの移動度が異なることを利用して、1回目、2回目のtransfectionにそれぞれ異なる血清型のAHSVのcore RNAを用いたところ、産生されたAHSVのゲノムは2回目のtransfectionに由来していた⁴⁴⁾(図4)。このことから、1回目のtransfectionで発現されたAHSVタンパク質と、2回目のtransfectionで供給されたssRNAがPRCを作り、ウイルス産生効率を高めていることが明らかになった⁴⁴⁾。さらに、BTVと同様のは乳動物細胞用発現ベクターとT7 RNAを用いたRGシステムも開発されている²⁸⁾。

5. オルビウイルス構造タンパク質VP6の機能解析

オルビウイルスの構造タンパク質VP6は、レオウイルス科の他のウイルスには同等のタンパク質が存在せず、オルビウイルスに特有である。遺伝子組換えバキュロウイルス発現システムにより発現・精製されたBTV VP6タンパク質を用いた*in vitro*の実験系において、VP6はRNAに結合し、ATPase活性とヘリケース活性を持つことが明らかになった^{30,64)}。このことから、VP6はポリメラーゼ活性を持つVP1^{8,46,71)}とCap構造付加酵素であるVP4^{42,56,65)}、dsRNAとともに転写複合体を形成し、脱殻したコア粒子内でのmRNA合成時、dsRNAを解くRNAヘリケースとして働くと考えられている⁷⁾。しかし、多くのウイルスRNAヘリケースタンパク質は、二量体であるのに対し、VP6は六量体を形成する³⁰⁾。また、VP6は精製コア粒子中に存在することは確認されているが、VP1, VP4のどちらとも結合が確認されておらず、ウイルス粒子内のどこに存在するのかも不明であるため、実際のウイルス複製サイクルでの機能は不明であった。

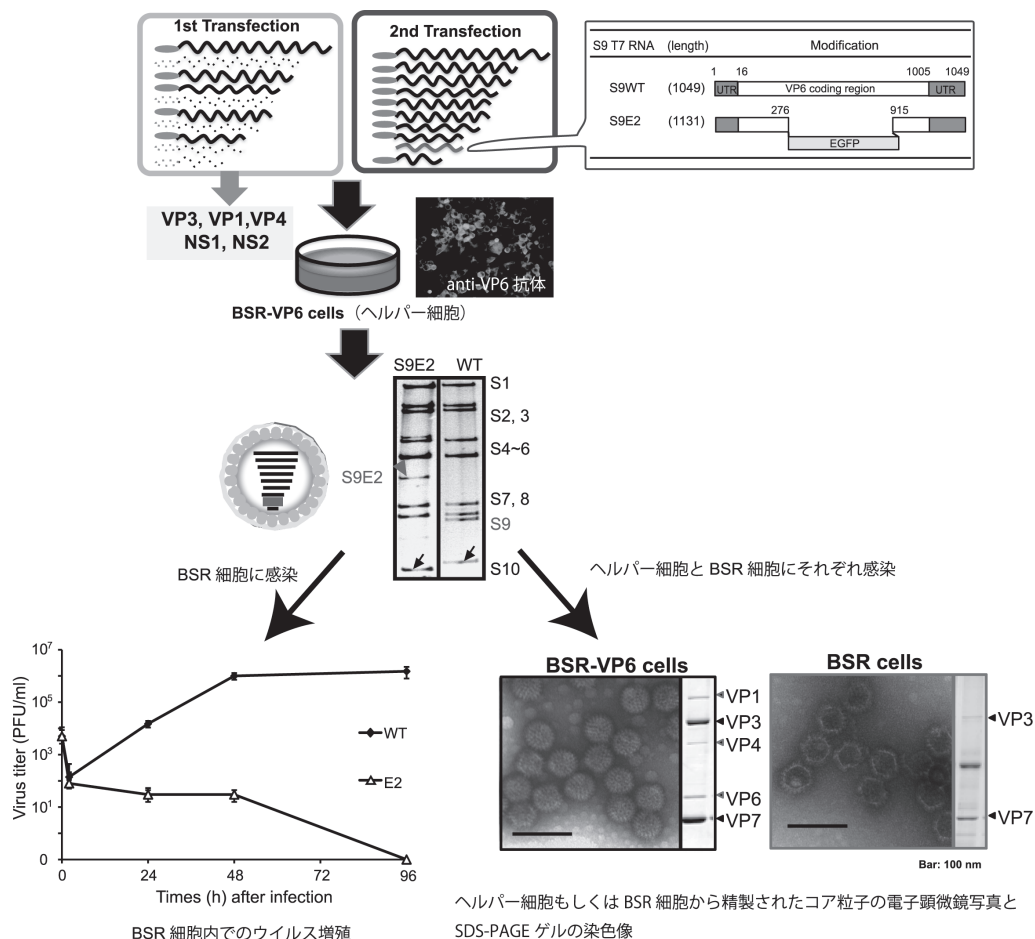


図5 複製能欠損 BTV (S9E2 BTV) の作製と性状検査 (参考文献^{43,44}) より改変)

BTV の RG システムを用いて、ウイルス複製における VP6 の重要性を検討するため、一回目の transfection で VP6 を発現させずに 2 回目の transfection をしたところ、ウイルス産生が激減した⁴⁷⁾。このことから、初期複製に VP6 は必須であることが明らかになった。さらに、VP6 をコードする S9 の CDR の約 3 分の 1 を欠損させ、欠損領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (EGFP) を挿入した EGFP/S9 T7 RNA を用いて、変異 BTV を作製した。この BTV の作製には、正常な VP6 を供給するため、VP6 を恒常的に発現するヘルパー細胞 (BSR-VP6) を用いた。作製された変異 BTV は、BSR-VP6 細胞では野生型 BTV と同様に増殖したが、VP6 が発現していない普通の BSR 細胞では各ウイルスタンパク質は発現しているが、感染性粒子の増加はみられなかった⁴³⁾ (図 5)。さらに、変異 BTV 感染 BSR 細胞内での dsRNA 合成を調べたところ dsRNA 合成が起こっていないことから、PRC の形成が起こっていない可能性が考えられた⁴⁸⁾。そこで、変異 BTV 感染 BSR 細胞からコア粒子を精製し、電子顕微鏡で観察したところ、ほとんどの粒子はゲノムを含まない中

空粒子であることが分かった⁴⁸⁾ (図 5)。さらに、この中空粒子には VP1, VP4 も含まれていないことから、VP6 は、dsRNA を VP1, VP4 とともに PRC へ取り込む packaging promoter である可能性が明らかとなった⁴⁸⁾。現在、どのようなメカニズムで VP6 がゲノムの取り込みに関与しているかを検討中である。

一部が欠損した VP6 をコードする S9 をゲノムとして持つ BTV は複製機能を欠損していることから、VP6 は BTV の複製に重要であることが分かった。しかし、VP6 には、BTV の複製に関与しない「不要領域」も存在することが、初めて明らかになった⁴⁵⁾。VP6 は可溶性が高く、結晶化しないため、その構造は不明である。しかし、核磁気共鳴法 (NMR) を用いた構造解析の結果、VP6 には 2 つの大きなループがあり、N 末側のループ (34~130 番目のアミノ酸) を欠損させてもその構造には変化がないことが明らかとなった。この N 末側のループを半分もしくは全て欠損した VP6 をコードする S9 を持つ BTV を作製したところ、全て欠損した BTV は複製能を欠損していたが、半分だけ欠損した (34~92 番目のアミノ酸) BTV は普通

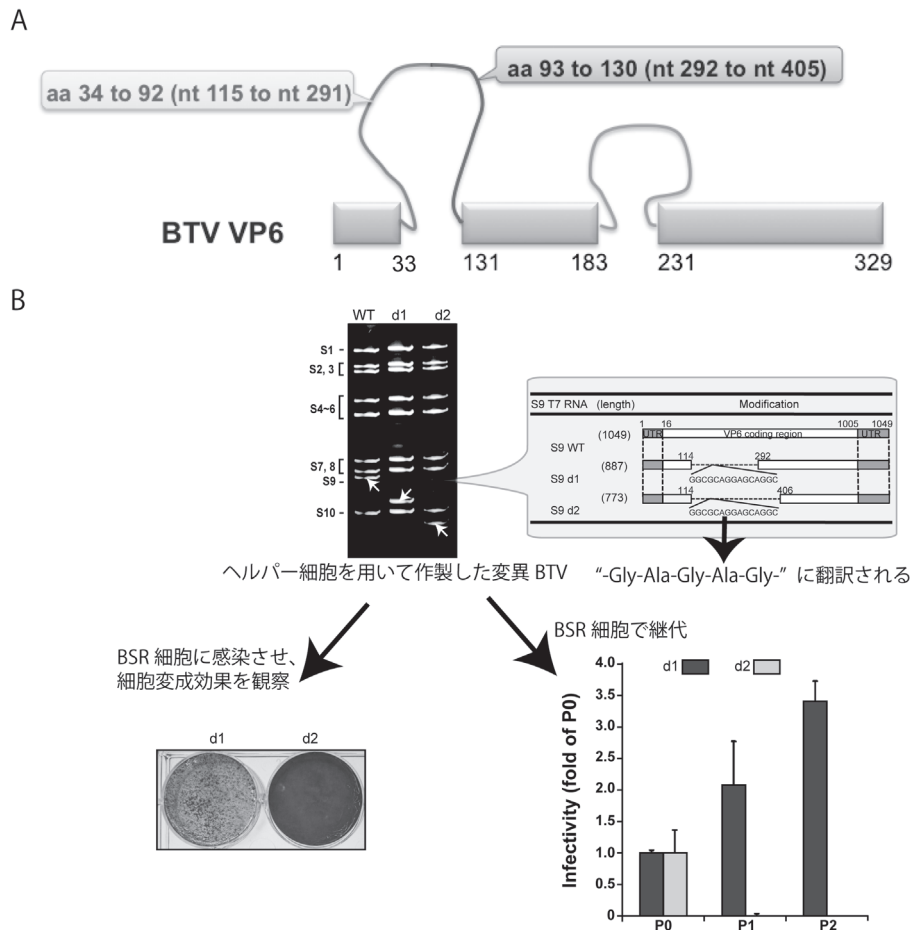


図 6 複製可能な VP6 欠損 BTV の作製と性状検査 (参考文献⁴⁵⁾ より改変)

A. VP6 のループ構造の位置を示した模式図. B. ヘルパー細胞を用いて作製された VP6 欠損変異 BTV の BSR 細胞での複製能. VP6 の構造を保持するため、ループ欠損領域にはグリシンとアラニン配列 (GAGAG) をリンカーとして挿入した.

の BSR 細胞でも増殖可能であった (図 6). VP6 の構造はほとんど同じであるにもかかわらず、複製能に差が出た 2 種類の欠損変異 BTV については更なる解析が必要ではあるものの、このような複製に不要な領域を利用して、今後さらに VP6 の機能や BTV の複製について明らかにしていきたい.

6. おわりに

RG システムの開発によって、ピンポイントで変異を入れた変異オルビウイルスの作製が可能になり、これまで不明であったウイルスタンパク質の機能や、ゲノムの *cis*-acting element についての解析が進み始めた。また、RG システムにより、迅速に作製できる複製機能を欠損させた DISC (disabled infectious single cycle) ワクチンなど、オルビウイルス感染症の流行に迅速に対応できる新しいワクチンの開発も始まっている^{11, 12, 43)}。オルビウイルスの基礎研究が進むことにより、新たな治療法や予防法の開発が期待される。

7. 参考文献

- 1) Acevedo P, Ruiz-Fons F, Estrada R, Marquez AL, Miranda MA, Gortazar C, and Lucientes J.: A broad assessment of factors determining *Culicoides imicola* abundance: modelling the present and forecasting its future in climate change scenarios. *PLoS One* 5:e14236, 2010.
- 2) Attoui H, Maan S, Anthony SJ, and Mertens PPC.: The economically important orbiviruses, Bluetongue virus, other orbivirus and other reoviruses: Their relationships and taxonomy, 2009. p. 32-4. *In* Mellor, PS, Baylis, M, and Mertens, PPC (ed.), *Bluetongue*, 1st ed. Elsevier/Academic Press, London.
- 3) Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, and Roy P.: The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13154-9, 2002.
- 4) Belaganahalli MN, Maan S, Maan NS, Nomikou K, Pritchard I, Lunt R, Kirkland PD, Attoui H, Brownlie

- J, and Mertens PP.: Full genome sequencing and genetic characterization of Eubenberg viruses identify Pata virus as a distinct species within the genus Orbivirus. *PLoS One* 7:e31911, 2012.
- 5) Boyce M, Celma CC, and Roy P.: Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 82:8339-48, 2008.
 - 6) Boyce M, Celma CCP, and Roy P.: Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virol J* 9, 2012.
 - 7) Boyce M, and Roy P.: Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. *J Virol* 81:2179-86, 2007.
 - 8) Boyce M, Wehrfritz J, Noad R, and Roy P.: Purified Recombinant Bluetongue Virus VP1 Exhibits RNA Replicase Activity. *J Virol* 78:3994-4002, 2004.
 - 9) Burkhardt C, Sung PY, Celma CC, and Roy P.: Structural constraints in the packaging of bluetongue virus genomic segments. *J Gen Virol* 5:2240-50, 2014.
 - 10) CDC. 2010. International Catalogue of Arboviruses Including Other Viruses of Vertebrates. Centers for disease control and prevention. .
 - 11) Celma CC, Bhattacharya B, Eschbaumer M, Wernike K, Beer M, and Roy P.: Pathogenicity study in sheep using reverse-genetics-based reassortant bluetongue viruses. *Vet Microbiol* 2014.
 - 12) Celma CC, Boyce M, van Rijn PA, Eschbaumer M, Wernike K, Hoffmann B, Beer M, Haegeman A, De Clercq K, and Roy P.: Rapid generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep. *J Virol* 87:9856-64, 2013.
 - 13) Celma CC, and Roy P.: Interaction of calpactin light chain (S100A10/p11) and a viral NS protein is essential for intracellular trafficking of nonenveloped bluetongue virus. *J Virol* 85:4783-91, 2011.
 - 14) Celma CC, and Roy P.: A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J Virol* 83:6806-16, 2009.
 - 15) Chumakov MP.: Report on the isolation from Ixodes persulcatus ticks and from patients in western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virol* 7:82-3, 1963.
 - 16) Coetzer JAW, and Guthrie AJ.: African horse sickness., 2004. p. 1231-46. In Coetzer, JAW and Tustin, RC (ed.), *Infectious Diseases of Livestock*, 2 ed. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town.
 - 17) Cooper E, Anbalagan S, Klumper P, Scherba G, Simonson RR, and Hause BM.: Mobuck virus genome sequence and phylogenetic analysis: identification of a novel Orbivirus isolated from a white-tailed deer in Missouri, USA. *J Gen Virol* 95:110-6, 2014.
 - 18) Du J, Bhattacharya B, Ward TH, and Roy P.: Trafficking of bluetongue virus visualized by recovery of tetracycline-tagged virion particles. *J Virol* 88:12656-68, 2014.
 - 19) Forzan M, Marsh M, and Roy P.: Bluetongue virus entry into cells. *J Virol* 81:4819-27, 2007.
 - 20) Forzan M, Wirblich C, and Roy P.: A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2100-5, 2004.
 - 21) French TJ, Inumaru S, and Roy P.: Expression of two related nonstructural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: Production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV-infected BHK cells. *J Virol* 63:3270-8, 1989.
 - 22) Gould EA, and Higgs S.: Impact of climate change and other factors on emerging arboviral diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:109-21, 2009.
 - 23) Gresikova M, Rajcani J, and Hruzik J.: Pathogenicity of Tribec virus for Macaca rhesus monkeys and white mice. *Acta Virol* 10:420-4, 1966.
 - 24) Hassan SH, Wirblich C, Forzan M, and Roy P.: Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. *J Virol* 75:8356-67, 2001.
 - 25) Hassan SS, and Roy P.: Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J Virol* 73:9832-42, 1999.
 - 26) Howell PG, Groenewald D, Visage CW, Bosman AM, Coetzer JA, and Guthrie AJ.: The classification of seven serotypes of equine encephalosis virus and the prevalence of homologous antibody in horses in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 69:79-93, 2002.
 - 27) Howell PG, Nurton JP, Nel D, Lourens CW, and Guthrie AJ.: Prevalence of serotype specific antibody to equine encephalosis virus in Thoroughbred yearlings in South Africa (1999-2004). *Onderstepoort J Vet Res* 75:153-61, 2008.
 - 28) Kaname Y, Celma CC, Kanai Y, and Roy P.: Recovery of African horse sickness virus from synthetic RNA. *J Gen Virol* 94:2259-65, 2013.
 - 29) Kar AK, Bhattacharya B, and Roy P.: Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol Biol* 8:4, 2007.
 - 30) Kar AK, and Roy P.: Defining the Structure-Function Relationships of Bluetongue Virus Helicase Protein VP6. *J Virol* 77:11347-56, 2003.
 - 31) Kavenoff R, Talcove D, and Mudd JA.: Genome-sized RNA from reovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:4317-21, 1975.
 - 32) Kedmi M, Van Straten M, Ezra E, Galon N, and Klement E.: Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *J Dairy Sci* 93:2486-95, 2010.
 - 33) Kobayashi T, Antar AA, Boehme KW, Danthi P, Eby EA, Guglielmi KM, Holm GH, Johnson EM, Maginnis MS, Naik S, Skelton WB, Wetzel JD, Wilson GJ, Chappell JD, and Dermody TS.: A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1:147-57, 2007.
 - 34) 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* 103:4646-51, 2006.
 - 35) Lee JW, and Roy P.: Nucleotide sequence of a cDNA

- clone of RNA segment 10 of bluetongue virus (serotype 10). *J Gen Virol* 67:2833-7, 1986.
- 36) Libikova H, Heinz F, Ujhazyova D, and Stunzner D.: Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Med Microbiol Immunol* 166:255-63, 1978.
 - 37) Lourenco S, and Roy P.: In vitro reconstitution of Bluetongue virus infectious cores. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:13746-51, 2011.
 - 38) Lymperopoulos K, Noad R, Tosi S, Nethisinghe S, Brierley I, and Roy P.: Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs. *Virology* 353:17-26, 2006.
 - 39) Lymperopoulos K, Wirblich C, Brierley I, and Roy P.: Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA. *J Biol Chem* 278:31722-30, 2003.
 - 40) Malkova D, Holubova J, Kolman JM, Marhoul Z, Hanzal F, Kulkova H, Markvart K, and Simkova L.: Antibodies against Some Arboviruses in Persons with Various Neuropathies. *Acta Virol* 24:298-, 1980.
 - 41) Mardulyn P, Goffredo M, Conte A, Hendrickx G, Meiswinkel R, Balenghien T, Sghaier S, Lohr Y, and Gilbert M.: Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. *Mol Ecol* 22:2456-66, 2013.
 - 42) Martinez-Costas J, Sutton G, Ramadevi N, and Roy P.: Guanylyltransferase and RNA 5'-triphosphatase activities of the purified expressed VP4 protein of bluetongue virus. *J Mol Biol* 280:859-66, 1998.
 - 43) Matsuo E, Celma CC, Boyce M, Viarouge C, Sailleau C, Dubois E, Breard E, Thiery R, Zientara S, and Roy P.: Generation of replication-defective virus-based vaccines that confer full protection in sheep against virulent bluetongue virus challenge. *J Virol* 85:10213-21, 2011.
 - 44) Matsuo E, Celma CC, and Roy P.: A reverse genetics system of African horse sickness virus reveals existence of primary replication. *FEBS Lett* 584:3386-91, 2010.
 - 45) Matsuo E, Leon E, Matthews SJ, and Roy P.: Structure based modification of Bluetongue virus helicase protein VP6 to produce a viable VP6-truncated BTV. *Biochem Biophys Res Commun* 451:603-8, 2014.
 - 46) Matsuo E, and Roy P.: Bluetongue virus VP1 polymerase activity in vitro: template dependency, dinucleotide priming and cap dependency. *PLoS One* 6:e27702, 2011.
 - 47) Matsuo E, and Roy P.: Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *J. Virol.* 83:8842-8, 2009.
 - 48) Matsuo E, and Roy P.: Minimum requirements for bluetongue virus primary replication in vivo. *J Virol* 87:882-9, 2013.
 - 49) Mertens PPC, Maan S, and Samuel A.: *Orbivirus, Reoviridae*, 2005. 1st ed. Elsevier/Academic Press, London.
 - 50) Modrof J, Lymperopoulos K, and Roy P.: Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J Virol* 79:10023-31, 2005.
 - 51) Mohl BP, and Roy P.: Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses* 6:3250-70, 2014.
 - 52) Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, David-West TS, and Kemp GE.: Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol* 69:49-64, 1975.
 - 53) Ohashi S, Yoshida K, Watanabe Y, and Tsuda T.: Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J Clin Microbiol* 37:3800-3, 1999.
 - 54) OIE.: 2012. African Horse sickness. Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health.
 - 55) Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, and Baylis M.: Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3:171-81, 2005.
 - 56) Ramadevi N, and Roy P.: Bluetongue virus core protein VP4 has nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity. *J Gen Virol* 79:2475-80, 1998.
 - 57) Ratniner M, Caporale M, Golder M, Franzoni G, Allan K, Nunes SF, Armezzani A, Bayoumy A, Rixon F, Shaw A, and Palmarini M.: Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog* 7:e1002477, 2011.
 - 58) Roy P.: Orbiviruses, 2001. p. 1835-69. *In* Knipe, DM, Roizman, B, Howley, PM, Straus, SE, Fields, BN, Griffin, DE, Martin, M, and Lamb, RA (ed.), *Fields' Virology*, Fourth Edition ed. Lippincott Williams & Wilkins.
 - 59) Santman-Berends IM, van Schaik G, Bartels CJ, Stegeman JA, and Vellema P.: Mortality attributable to bluetongue virus serotype 8 infection in Dutch dairy cows. *Vet Microbiol* 148:183-8, 2011.
 - 60) Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, Wilson W, Monaco F, and Domingo M.: Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 91:1-17, 2011.
 - 61) Savini G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, and Zientara S.: Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:101-20, 2008.
 - 62) Schiff LA, Nibert ML, and Tyler KL.: Orthoreoviruses and Their Replication, 2007. p. 1853-915. *In* Knipe, DM and Howley, PM (ed.), *Fields' Virology*, Fifth Edition ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, New York, USA.
 - 63) Shirafuji H, Yanase T, Kato T, and Yamakawa M.: Genetic and phylogenetic characterization of genome segments 2 and 6 of bluetongue virus isolates in Japan from 1985 to 2008. *J Gen Virol* 93:1465-73, 2012.
 - 64) Stauber N, Martinez-Costas J, Sutton G, Monastyrskaya K, and Roy P.: Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J Virol* 71:7220-6, 1997.
 - 65) Sutton G, Grimes JM, Stuart DI, and Roy P. Bluetongue

- virus VP4 is an RNA-capping assembly line. *Nature Struct Mol Biol* 14:449-51, 2007.
- 66) Tomori O.: Orungo virus: organ distribution with histopathology and development of experimentally infected Swiss albino mice. *Microbios* 19:157-66, 1977.
- 67) Tomori O, and Fabiyi A.: Neutralizing antibodies to Orungo virus in man and animals in Nigeria. *Trop Geogr Med* 28:233-8, 1976.
- 68) Verwoerd DW.: Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology* 38:203-12, 1969.
- 69) Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, and Huismans H.: Structure of the bluetongue virus capsid. *J Virol* 10:783-94, 1972.
- 70) Verwoerd DW, and Huismans H.: Studies on the in vitro and the in vivo transcription of the bluetongue virus genome. *Onderstepoort J Vet Res* 39:185-91, 1972.
- 71) Wehrfritz JM, Boyce M, Mirza S, and Roy P.: Reconstitution of Bluetongue virus polymerase activity from isolated domains based on a three-dimensional structural model. *Biopolymers* 86:83-94, 2007.
- 72) Weyer CT, Quan M, Joone C, Lourens CW, MacLachlan NJ, and Guthrie AJ.: African horse sickness in naturally infected, immunised horses. *Equine Vet J* 45:117-9, 2013.
- 73) Zhang X, Boyce M, Bhattacharya B, Zhang X, Schein S, Roy P, and Zhou ZH.: Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6292-7, 2010.
- 74) Zhao G, Krishnamurthy S, Cai Z, Popov VL, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Cao S, Virgin HW, Tesh RB, and Wang D.: Identification of novel viruses using VirusHunter--an automated data analysis pipeline. *PLoS One* 8:e78470, 2013.

Reverse genetics systems for orbiviruses reveal the essential mechanisms in their replication

Eiko MATSUO

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University
1-1, Rokkodai, Nada-ku, Kobe-city, 657-8501, Japan
eiko_matsuo@amethyst.kobe-u.ac.jp

The members of *Orbivirus* genus within the family *Reoviridae* cause severe arthropod-borne diseases mainly in ruminants and equids. In addition, the orbiviruses, which can infect humans, have been reported. In the last decade, the molecular and structural studies for orbiviruses, including Bluetongue virus (BTV), has made a great progress. Especially, a reverse genetics system (RG) for BTV, developed soon after Orhoreovirus and Rotavirus, is a major breakthrough. Here, I introduced the recent findings in orbivirus replication, especially the function of an enzymatic protein, VP6.