

4. 分節2本鎖RNAウイルスにおけるリバーシジェネティクス系 —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—

河本 聡志, 谷口 孝喜

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、11本の2本鎖RNA (dsRNA) 分節をゲノムとして保有するウイルスであり、最も主要な下痢症ウイルスである。リバーシジェネティクス系はウイルスゲノムへ任意の変異を導入することで、ウイルスを自由に設計し作製することができ、遺伝子の機能や病原性を理解する上で最も強力な手法である。しかしながら、ロタウイルスを含む10～12本のdsRNA分節をゲノムとするレオウイルス科では、そのゲノム構造の複雑さから開発は長い間、困難を極めていた。しかし、ごく最近、我々は効率がまだ不十分ではあるが、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に成功した。ここでは、前半部分で、開発の基礎となったロタウイルスの増殖様式に関する最近の知見をまとめ、後半部分では、分節dsRNAウイルスにおけるリバーシジェネティクス系開発の背景と経緯について、ロタウイルスの系も含めてまとめてみたい。

はじめに

ロタウイルスは、世界中の様々な哺乳動物および鳥類に急性胃腸炎を起こすウイルスで、レオウイルス科に属す²⁶⁾。ヒトでは、冬季乳幼児嘔吐下痢症の病原体として知られ、下痢、嘔吐による脱水のため、開発途上国では、年間50万人の乳幼児死亡が算出されている。開発国においては、その重篤度から入院に占める割合が高く医療経済的に重視されている⁴⁶⁾。ロタウイルスには、血清学的な交叉反応を示さない7種の群(A～G)が存在するが、ここでは、病原性、検出頻度ともにもっとも高いA群についてのみ触れる。

ロタウイルス粒子は、三層構造からなる。ゲノムは、11本の分節した2本鎖RNA (dsRNA) からなり、6種の構造蛋白質 (VP1～VP4, VP6, VP7)、および6種の非構造蛋白質 (NSP1～NSP6) をコードしている。外層蛋白質であるVP4とVP7は、独立した中和抗原を有し、それぞれPセロタイプ、Gセロタイプを規定する¹⁵⁾。ただ、VP4につ

いては、血清学的な分類が困難なためPセロタイプが未決定な場合があり、アミノ酸配列の違いにより、P遺伝子型として分類されるのが一般的である。Gセロタイプは、15種 (G1～G15)、Pセロタイプは14種、P遺伝子型で26種 (P[1]～P[26]) が報告されている。こうして、ロタウイルスには多数の血清型が存在するため、ワクチンによる感染防御は困難が予想される。

2006年に、ヒトに対する2種のロタウイルスワクチンが開発されたが、新たな世代のロタウイルスワクチンの開発に向け、また、ロタウイルスの生活環の解析、免疫応答の解析など広い分野で、リバーシジェネティクス系の開発が期待されていた。RNAウイルスのリバーシジェネティクスについては、1978年のバクテリオファージQBでの最初の開発以来、多くのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAウイルスについて広く開発、応用されてきた。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ウイルスは、細菌、植物、昆虫、寄生虫、鳥類、哺乳動物と、幅広い生物種を宿主とする。ゲノムであるdsRNAは、一部のdsRNAウイルスを除いて、2本～12本に分節している特徴を有する。分節RNAが2本、3本のdsRNAウイルスの場合では、リバーシジェネティクス系が開発されている^{10-15, 42-44)}が、10～12本のレオウイルス科のウイルスでは、複雑な系を用いたレオウイルス以外では、リバーシジェネティクス系の開発が困難を極めていた⁶⁶⁻⁷⁰⁾。我々は、ごく最近、明確な病気を引き起こすコモンなウイ

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

ルスであるロタウイルスにおいて、念願のリバーシジェネティクス系の開発に成功した^{27,28)}。これを機会に、本総説では、ロタウイルスのゲノムの性状、生活環を簡単に述べ、ロタウイルスを含めた dsRNA ウイルスのリバーシジェネティクスについて解説したい。

1. ロタウイルスのゲノム

ロタウイルスのゲノムは、前述した通り、11本の dsRNA (RNA セグメント 1~11) からなっており、各セグメントは、out-of-frame の2つの ORF を有するセグメント 11を除いて、それぞれ1つの ORF を有している。数種のウイルス株で、全塩基配列が決定されている。サルロタウイルス SA11 株では、セグメント 1 の 3,302 塩基からセグメント 11 の 663 塩基まで、総数 18,555 塩基である³⁷⁾。ロタウイルスのプラス鎖 RNA は 5'末端がキャップ構造を有するが、3'末端はポリ A を持たない。A 群特異的およびセグメント特異的な塩基配列が、RNA の複製、翻訳そしてエンカプシレーションに必須である。5'末端、3'末端は保存されており、5'-GGC (A/U) (A/U)U (A/U)A (A/U) (A/U)——— (A/U)U (G/U) (G/U) (G/U) (A/G)CC-3' となっている。これらの配列は、トランスクリプターゼ、レプリカーゼの認識シグナルとなっている。また、5'と3'末端の塩基配列は相補的で、ステムループの二次構造をなす。

ロタウイルスのゲノムは多様性を示し、各分節 dsRNA のポリアクリルアミド電気泳動における移動度の違いにより容易に検出される。この多様性は、点変異の蓄積、リアソートメント、リアレンジメントにより生じる⁷⁵⁾。リアソートメントは、1つの細胞が2つ以上の異なるウイルス株に感染することにより起こる。その効率は高く、in vitro で 50%、in vivo で 70~80% である^{19,65)}。リアレンジメントは、1つの遺伝子内での塩基配列群の変化をいい、多くは、部分的な重複、ときに欠失が起こる¹¹⁾。

2. ロタウイルスの生活環

ウイルスの増殖サイクルは、増殖効率の良い SA11 株で 10~12 時間、効率の悪いヒトロタウイルスでは 18~22 時間である。すべての増殖過程は細胞質内で起こる。細胞質内に局在する電子密度の高い封入体 (viroplasm) の重要性が多くの研究で明らかにされている。viroplasm は、感染初期には多数の小型の構造体であるが、感染後期には小型の集合体が集まり大型の構造体となる。NSP2 と NSP5 がこの viroplasm の生成に必須の要素であり、ウイルスの増殖に重要であると認識されている。ロタウイルスの転写と複製に関する詳細な総説はすでにある^{30,47,49,50,51,53)} ので、ここでは、ロタウイルスの生活環の概要を記述する。

1) 吸着と侵入

感受性細胞をノイラミニダーゼで処理すると、多くの動物ロタウイルスの感染性が大幅に減少するので、シアル酸

はロタウイルスの細胞への吸着に必要であることがわかっている。しかし、動物ロタウイルスの一部とほとんどのヒトロタウイルスの感染性は、このノイラミニダーゼの処理で影響を受けない。その後の研究により、ノイラミニダーゼに感受性のウイルスはガングリオシドの外側に位置するシアル酸を、抵抗性のウイルスはガングリオシドの内側に位置するシアル酸に結合することが判明した³²⁾。しかし、ロタウイルスのレセプターは単純ではない。コレステロールおよびグリコスフィンゴリピドに富む細胞質膜のマイクロドメインに埋まっている分子の複合体であるらしい。さらに、インテグリンがより特異的なレセプターであり、細胞内への侵入も促進する⁷⁾。結局、吸着から侵入まで一連の流れが提唱されている^{25,31)}。VP8 がまずシアル酸を含むレセプターと接触し、VP5 がインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と結合し、次いで VP7 が $\alpha v \beta 3$ および $\alpha x \beta 2$ と相互作用し、ウイルスが侵入する際、VP5 がヒートショック蛋白質と相互作用する。侵入すると、外層蛋白質である VP7 と VP4 が除去され、三層構造の二重殻粒子が二層構造の単重殻粒子となり、転写活性を示す。

2) 転写

一重殻粒子は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase:RdRp) である VP1、グアニリルトランスフェラーゼである VP3、足場となる VP2、そして内部蛋白質 VP6 から構成される。転写の過程は、この一重殻粒子内で行われる¹⁵⁾。一重殻粒子内のゲノムである dsRNA のマイナス鎖を鋳型として、5'末端にキャップ構造を有し、3'末端にはポリ A を持たない完全長のプラス鎖 RNA が合成される。合成されたプラス鎖 RNA は、正 20 面体粒子の頂点に存在するチャンネルから突出してくると思われる⁶⁰⁾。このプラス鎖 RNA は、蛋白質合成に使用されるとともに、dsRNA 合成の鋳型ともなる。トランスフェクトしたプラス鎖 RNA が viroplasm に輸送されないとの報告がなされたことから、以下のような仮説が提唱されている⁷²⁾。ロタウイルス感染細胞にはプラス鎖 RNA の二つのプールが存在しており、1つは、dsRNA の鋳型となる viroplasm に存在するプラス鎖 RNA プールであり、もう1つは、翻訳の鋳型となり viroplasm の外に存在するプラス鎖 RNA プールであるとするものである。転写においては、dsRNA は環状構造をとり、転写が次から次へと回転するように進行すると考えられている⁷⁷⁾。

3) 翻訳

ロタウイルスの mRNA は 3'末端にポリ A をもたない。そこで、NSP3 の N 末端側ドメイン (アミノ酸 No.4~164) が、mRNA の 3'末端の共通配列 (5'-GUGACC) に特異的に結合し、NSP3 の C 末端側ドメインがキャップ関連翻訳開始因子 eIF4G と結合し、mRNA は環状となる^{10,56)}。eIF4E が 5'末端のキャップ構造に結合し 5'末端の 4 塩基 (5'-GACC-3') は翻訳のエンハンサーとして働く⁵⁷⁾。つまり、

ポリ A 結合蛋白質 (polyA binding protein; PABP) の代わりに、NSP3 が mRNA の環状化に関わっているらしい。NSP3 と PABP の eIF4G との結合部位はオーバーラップしており、また、NSP3 と eIF4G の親和性は PABP と eIF4G の親和性よりも強いので、宿主の mRNA の翻訳よりもロタウイルスの翻訳がより効率的に進むと思われる^{23,45,55,80}。こうして、ウイルスは宿主の翻訳装置をハイジャックすることとなる⁷⁸。これに対して、Montero ら³⁸ は、RNA 干渉で NSP3 をノックダウンしても、翻訳にはまったく影響がないとするまったく相反した実験結果を提出した。NSP3 の役割に対するこの顕著な相違は、無細胞系と培養細胞系での実験の違いによるものと思われる。

11 本の個々の遺伝子の発現は、転写のレベルで制御されている。最も多量に発現される NSP4 と最も少量の発現である VP1 とでは、約 250 倍の量的違いがある。また、NSP3 と結合する RoXaN という 110kDa の新たに見出された細胞由来蛋白質もまた、翻訳の制御に関わっているようである⁸³。

4) 複製

すでに述べたように、RNA の複製は、NSP2 と NSP5 が集積している viroplasm で行われている。粒子内に取り込まれた mRNA は、1 回だけマイナス鎖 RNA の鋳型となり、dsRNA の合成がなされる。dsRNA の合成は、VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP5 (これらはすべて 1 本鎖 RNA に結合能を有する) からなるコア粒子への mRNA のパッケージングと同時に起きる。3'末端には、マイナス鎖 RNA の合成開始に関与するエレメント、RdRp を誘うエレメントなど、dsRNA の合成を促進するエレメントを有する。5'末端もまた、マイナス鎖 RNA の合成に関わる安定な複合体 (RdRp と他の因子) を含んでいる。ORF にも cis 作働性エレメントが存在する⁵²。さらに、mRNA の長さ、AU 含量も複製の効率に影響を与える。最終的に 1 ウイルス粒子には、11 本の分節 dsRNA が 1 本ずつパッケージされているので、パッケージのための mRNA の選択はきわめて特異性が高いと言える。そのメカニズムは、古くから不思議に思われているが、現在でも、よくわかっていない。

3. dsRNA ウイルスにおけるリバースジェネティクス系

ロタウイルスの分節 dsRNA ゲノムがコードする各遺伝子の機能を理解するため、これまでに、温度感受性変異株^{18,22,61-63}、RNA 分節の交換体であるリアソータント⁶¹⁻⁶³、発現蛋白質^{6,8,16,29,35,36,85} を用いた解析が主に行われてきた。ゲノム複製機序についてもオープンコアを用いた in vitro 複製系による解析^{5,45,76} が行われてきた。また、最近では RNA 干渉^{1,4,9,33,72} や細胞内抗体結合法^{79,81,82} によるノックダウン解析も用いられている。しかし、ロタウイルス感染細胞内で起こるウイルス遺伝子およびその産物の機能的相互作用をこれら従来の方法で解析するには限界があり、実際のウイルス複製を理解することはできない。ウイルスを自己

複製する生物として真に理解するためには、感染性ウイルスを用いた検証が必要不可欠である。

リバースジェネティクス系は任意のウイルス設計を可能とするので、ウイルスを真に理解するには最も強力な実験手法となる。これまでに、dsRNA ウイルスでは、Φ 6^{42,43} および Φ 8 ファージ⁴⁴、伝染性ファブリキュウス囊症ウイルス (IBDV)^{3,40}、伝染性膀胱壊死症ウイルス (IPNV)⁸⁴ およびレオウイルス⁷⁰ においてリバースジェネティクス系が開発されている。ごく最近、我々もロタウイルスにおけるリバースジェネティクス系を開発した²⁷。この新たに可能となった強力な遺伝子操作技術は、ロタウイルスの複製機構、病原性を分子論的に解析することを可能とし、基礎研究のみならず、ワクチンやベクター開発に広く貢献することが期待される。

1) バクテリオファージ Φ 6

バクテリオファージ Φ 6 はシストウイルス科に属するウイルスである。ウイルス粒子は 3 分節 dsRNA ゲノムを収納するプロカプシドをエンベロープが包む。各分節 (L, M, S) は 4 または 5 個の ORF を含み、5'および 3'末端には数百塩基からなる非翻訳領域 (untranslated region; UTR) が存在する⁷¹。

L 分節がコードする P1, P2, P4 および P7 蛋白質を宿主細菌内で強制発現させると、レプリカーゼおよびトランスクリプターゼ活性を有するプロカプシド (発現プロカプシド) が自律構成される。発現プロカプシドは、試験管内でウイルス mRNA を内部に取込んで dsRNA 複製の鋳型とする。さらに、生成した dsRNA からの mRNA 転写もおこなう (in vitro パッケージング-複製系)^{20,21}。

1990 年、Olkkonen ら⁴² は、ゲノム 3 分節のうち 1 分節が cDNA に由来する Φ 6 を作製するリバースジェネティクス系の開発に成功した。5'および 3'末端配列がウイルス mRNA と一致した M 分節の 1 本鎖 RNA (ssRNA) を T7 RNA ポリメラーゼを用いて in vitro で転写合成し、ウイルス由来の L および S 分節 ssRNA と混合して、in vitro パッケージング-複製系に用いる ssRNA とした。これら ssRNA を内部に取込んだ発現プロカプシドを外殻蛋白 P8 でコーティングし (ヌクレオカプシドの生成)、スフェロプラストへ導入すると、cDNA 由来の M 分節をゲノムとして持つ組換え Φ 6 が産生された。その後、Onodera ら⁴³ はこの最初の系を改良し、cDNA 由来の L 分節 ssRNA を発現している宿主細菌に、L 分節が欠損した非感染性の組換え Φ 6 (in vitro パッケージング-複製系で構築) を感染させ、in vivo で cDNA 由来 ssRNA をパッケージングさせることで、感染性復帰体となる組換え Φ 6 を回収する系も開発している。さらに最近、T7 あるいは SP6 RNA ポリメラーゼで ssRNA を発現する全 3 分節の各プラスミドを同時にスフェロプラストに導入するだけで、完全に cDNA 由来の Φ 6 を作出する系も開発されている⁷⁴。また、この系

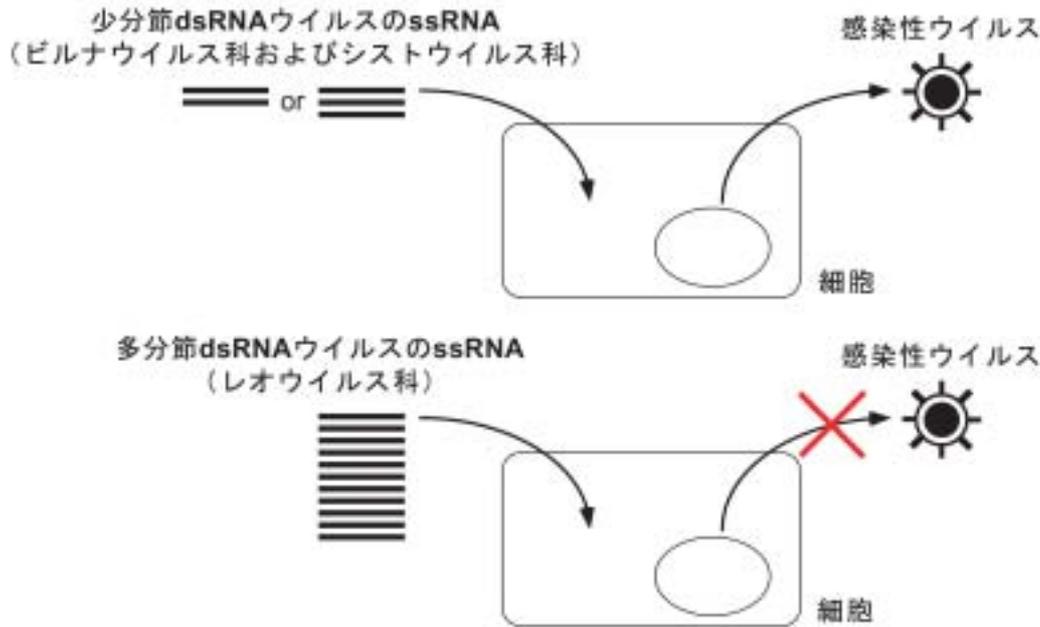


図1 分節 dsRNA ウイルスの ssRNA 導入によるウイルス複製サイクルの開始

2本あるいは3本の分節 dsRNA をゲノムとするビルナウイルス科およびシストウイルス科のウイルスでは、ssRNA を細胞に導入するだけでウイルス複製サイクルを開始することができる。一方、10-12本もの分節 dsRNA をゲノムとするレオウイルス科のウイルスでは、ssRNA 導入による感染性ウイルスの回収は報告されていない。

は、同じシストウイルス科のバクテリオファージΦ8への応用にも成功している⁴⁴⁾。一方で、Bamfordのグループは、精製したウイルス蛋白質と ssRNA を試験管内で混合し、感染性Φ6を再構成する系を開発している^{58, 59)}。彼らはウイルスゲノムに変異導入していないが、この系もシストウイルス科のリバースジェネティクス系となり得ることは明らかである。しかし、これらシストウイルス科におけるリバースジェネティクス系の応用による組換えロタウイルスの作出は報告されていない。

2) ビルナウイルス

ビルナウイルス科に属するIBDVは鳥類を宿主とする高度免疫不全症の病因ウイルスである²⁾。ビルナウイルス粒子は2分節 dsRNA ゲノムを単殻カプシド内に収納する¹²⁾。分節Aはカプシドを構成するVP3とVP2、分節BはRdRpであるVP1をコードする²⁴⁾。VP1はさらに dsRNA ゲノム5'末端に結合するVPgとしても機能する¹³⁾。両分節ゲノムの5'および3'末端には約百塩基のUTRが存在する³⁹⁾。ウイルス mRNA の3'末端はポリAを欠いているが、一方、5'末端にはキャップ構造⁷³⁾あるいはVPg^{13, 34)}が結合するとの2通りの説がある。

1996年、Mundtら⁴⁰⁾は両分節が完全にcDNA由来のIBDVを作製するリバースジェネティクス系の開発に成功した。5'および3'末端がウイルス mRNA のものと一致するAおよびB分節のssRNAをT7 RNAポリメラーゼを用いてin vitroで転写合成し、Vero細胞に導入したところ、

36時間後にcDNA由来の両分節をゲノムとするIBDVの産生が確認された。この系はその後すぐに、同じビルナウイルス科に属するIPNVにも応用された⁸⁴⁾。次に、Bootら³⁾は、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換え鶏痘ウイルスを感染させたQM5細胞に、T7 RNAポリメラーゼでウイルスssRNAを発現する両分節の転写プラスミドをトランスフェクトすることで、完全にcDNA由来のIBDVを作出することに成功した。この系では、プラスミドのウイルスcDNAをT7 RNAプロモーターとD型肝炎ウイルス(HDV)由来リボザイム配列の間に配置することで、5'および3'末端がウイルス mRNA と一致したssRNAが発現するようにしている。さらに最近、Petersら⁵⁴⁾は、カプシド蛋白質(VP2およびVP3)発現プラスミドをssRNA転写プラスミドと同時に細胞に導入することで、組換えウイルスの回収効率が向上すると報告している。このように、ビルナウイルス科では、バクテリオファージΦ6の場合と同様に、ウイルスssRNAを細胞に導入するだけで、ウイルス複製サイクルを開始することができる。しかしながら、これら2本あるいは3本の分節をゲノムとするウイルスに対し、10-12本もの多くの分節をゲノムとするレオウイルス科のウイルスでは、上述のストラテジーによる組換えウイルスの作出は報告されていない(図1)。

3) レオウイルス

オルソレオウイルス(レオウイルス)は、レオウイルス科に属するウイルスである。ヒトの呼吸器、腸管から分離

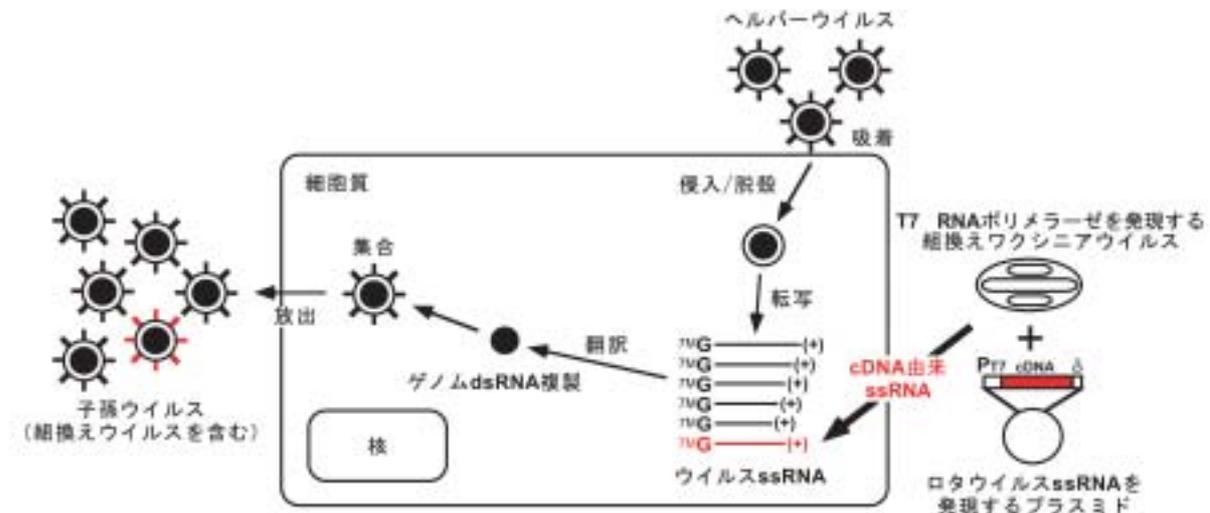


図2 ヘルパーウイルスを用いたロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系のデザイン

細胞に導入した cDNA 由来のプラス鎖 ssRNA は、ヘルパーウイルスの ssRNA とともにウイルスゲノム dsRNA 複製の鋳型となり、さらにパッケージングされて cDNA 由来の dsRNA をゲノムとして持つ組換えロタウイルスが生成する。

されたが、病原性は明確でないウイルスとして名付けられた。レオウイルスは3つの血清型 (ST1, ST2, ST3) に分類される。ウイルス粒子は10本の分節 dsRNA ゲノムを二重殻カプシドが収納する。10本の分節 (L1, L2, L3, M1, M2, M3, S1, S2, S3, S4) には12の ORF が存在し、8個 ($\lambda 1, \lambda 2, \lambda 3, \mu 1, \mu 2, \sigma 1, \sigma 2, \sigma 3$) の構造蛋白質、4個 (μ NS, μ NSC, σ NS, σ 1S) の非構造蛋白質がコードされている。各分節 RNA の5'および3'末端には短い配列の UTR が存在する。また、ロタウイルスと同様に、ウイルス mRNA は5'末端にキャップ構造を有しているが、3'末端にはポリ A を欠いている⁴¹⁾。

1990年、Ronerらは10本のウイルス RNA からレオウイルスを作製するリバーシジェネティクス系を開発した⁷⁰⁾。この系はユニークで複雑なものだが、過去10余年間、レオウイルス科における唯一のリバーシジェネティクス系であった。この系の実験手順は次の通りである。レオウイルス ST3 のウイルス由来 ssRNA および dsRNA と同時に、これらウイルス RNA をウサギ網状赤血球ライセートで翻訳した産物を L929 細胞にトランスフェクトし、さらに、ヘルパーウイルスとなるレオウイルス ST2 を感染させて、23時間培養後に細胞を回収した。回収ウイルスを用いてウイルスプラークを形成させたところ、5日後には ST3 ウイルスが回収された。ここでは、ST3 ウイルスのプラーク形成に要する日数が5日以上なのに対し、ST2 ウイルスは12日以上であることが、この実験系で目的ウイルスを単離するための選択条件となっている。彼らはまた、回収される ST3 ウイルスのゲノムは、導入 ssRNA に由来しており、dsRNA は ssRNA の感染性を増強すると報告している。^{66,67,69)}。しかしながら、この実験系では、導入 ssRNA の感染性を dsRNA

が増強する機序、また、ウサギ網状赤血球ライセートのウイルス RNA 翻訳産物と ST2 ヘルパーウイルスの果たす役割が不明であり、今日でもこれらは明らかにされていない。一方で、彼らはこの系で、2つの温度感受性変異を同時に保有する二重温度感受性株の作出にも成功している⁶⁸⁾。

次に、彼らは最初のリバーシジェネティクス系を改良し、cDNA 由来の S2 分節をゲノムとして持つレオウイルスを作出した⁶⁸⁾。ST3 ウイルスの S2 遺伝子 3'側領域を欠損させ、代わりに CAT 遺伝子を in-frame で連結した配列を T7 RNA プロモーターと HDV リボザイムの間に配置したプラスミドを構築した。このプラスミドの発現する蛋白質 (σ 2-CAT) は σ 2 蛋白質としての機能をもはや有しないので、全長の σ 2 蛋白質をトランスに発現するような L929 細胞 (L-ST3.S2 細胞株) を新たに準備した。10本で構成される ST3 ウイルスの精製 ssRNA に、S2 遺伝子とアニールするオリゴヌクレオチドを反応させ、RNA-DNA 複合体を RNaseH で消化することで、S2 遺伝子を欠いた9本からなるウイルス ssRNA を準備した。構築したプラスミドから T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写合成した σ 2-CAT ssRNA をこのウイルス ssRNA に加え、新たに10本 (9本プラス1本) で構成される S2 遺伝子置換 ST3 ssRNA とした。この S2 遺伝子置換 ST3 ssRNA とウサギ網状赤血球ライセートの S2 遺伝子置換 ST3 ssRNA 翻訳産物を同時に L-ST3.S2 細胞へトランスフェクトし、さらに、ヘルパーウイルス ST2 を感染させることで、CAT を発現する組換え ST3 ウイルスを回収している。上述の実験手順でもわかるように、レオウイルスにおけるリバーシジェネティクス系は相当に複雑であり、要求される技術水準も高い。しかしながら、彼らはさらにこのリバーシジェネティクス系を用いて、S2

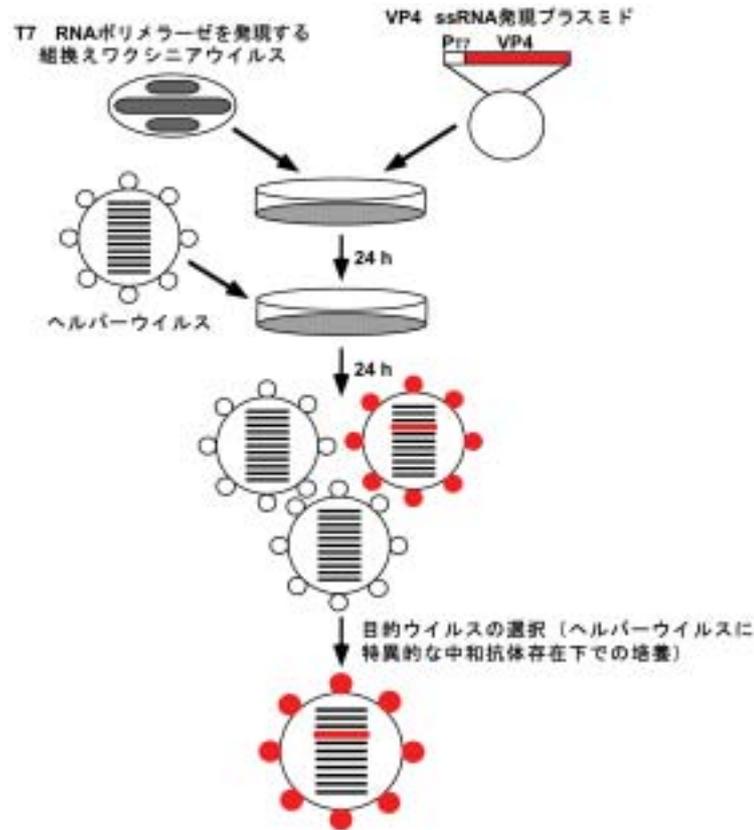


図3 開発したロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系

T7 RNA ポリメラーゼを発現する細胞に、T7 RNA プロモーター供給下でVP4 遺伝子 ssRNA を発現するプラスミドを導入する。導入24時間後にヘルパーウイルスを感染させ、さらに24時間培養を続ける。回収したウイルスをヘルパーウイルスに特異的な中和抗体存在下で培養することで、cDNA 由来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（文献28から改変して引用）。

ssRNA 上のパッケージングシグナル配列を明らかにすることにも成功している^{66,69}。一方で、他の研究室でのこのリバーシジェネティクス系の再現、および他のレオウイルス科のウイルスでの応用はいまだに成功していない。

4) ロタウイルス

ロタウイルスでは、1994年に *in vitro* でのRNA複製系の開発に成功している⁵。この論文でChenらは、無細胞系で、精製オープンコア粒子がcDNA由来のmRNAを鋳型としてdsRNAゲノムを複製することを報告した。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の開発される日が近いと予想された。しかしながら、それ以後、世界中で10余年の間、精力的な開発の試みが行われてきたにもかかわらず、これまで如何なる成功も報告されていなかった。このため、多くのロタウイルス研究者は、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に対してかなり悲観的でもあった。

前半部でも述べたように、ロタウイルスの複製では、RdRpが転写するmRNAはゲノムdsRNA複製の鋳型とし

ても機能する。そこで理論上では、細胞に導入したcDNA由来のプラス鎖ssRNAは、ヘルパーウイルスのRdRpに認識されてゲノムdsRNA合成の鋳型となり、さらにパッケージングされることで、cDNA由来のdsRNAをゲノムとして持つ組換えロタウイルスが生成するのではないかと考えられる（図2）。そこで我々は、ヘルパーウイルスを用いて、11本のゲノム分節のうち1本がcDNAに由来するようなロタウイルスの作出を試みた（図3）。まず、細胞内にcDNA由来のウイルスssRNAを供給するため、増殖能の良いサルロタウイルスSA11株のVP4遺伝子をT7 RNAプロモーターとHDVリボザイムの間に配置したプラスミドを構築した。T7 RNAポリメラーゼを発現している細胞にこのプラスミドを導入すると、5'および3'末端がウイルスmRNAと一致したプラス鎖ssRNAが発現する。そこで、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスrDIs-T7polを感染させたCOS-7細胞にこのプラスミドをトランスフェクトし、さらに、ヘルパーウイルスとなるヒトロタウイルスKU株を重感染させた。24時間培養の後

にこの COS-7 細胞を回収した。回収ウイルスの中から cDNA 由来 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 に特異的な中和単クローン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の出現とともに、KU 株をベースとして cDNA 由来の SA11 株 VP4 遺伝子分節をゲノムとして安定に保有する組換えロタウイルスが得られた²⁷⁾。さらに、トランスフェクトするプラスミドの VP4 遺伝子の ORF 内に 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、いずれのプラスミドを用いた場合にも cDNA 由来 VP4 遺伝子分節をゲノムとする組換えロタウイルスが回収され、この新しく開発されたロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の有用性が確認された。一方で、現在の我々の系は、組換えウイルスの回収効率がまだかなり不十分である。これは、ロタウイルスを含むレオウイルス科のゲノムパッケージングが厳格にコントロールされているというこれまでの知見を反映しているように思われる。そして、この厳しいウイルスゲノムのパッケージングコントロール、さらに、viroplasm という細胞内の隔離した環境でゲノム複製を行うというこのウイルス科特有の複雑さが、組換えロタウイルスの回収を難しくしている主な原因かもしれない。このように、回収効率が改善の余地があるものの、この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は、今後のロタウイルス研究の著しい展開を導くものと期待される。

おわりに

2 本あるいは 3 本の分節 dsRNA をゲノムとするビルナウイルスやシストウイルスではリバーシジェネティクス系がこれまでに開発されている。これらのウイルスでは、全分節の mRNA を細胞に導入するだけでウイルス複製サイクルを開始することができる。一方で、10-12 本もの分節 dsRNA をゲノムとするレオウイルス科のウイルスでは、レオウイルスを除いて、いずれでもリバーシジェネティクス系は開発されていなかった。また、これらウイルスの全分節 mRNA だけを細胞に導入してウイルスを回収しようとする試みは、多くの研究室で精力的に試されてきたにもかかわらず、世界のどこでも未だ成功しておらず、完全に cDNA 由来の感染性ウイルスを作出するには、mRNA に加えて、ウイルス側または宿主側の因子をトランスに供給する必要があるのかもしれない。一方で、ごく最近、我々はヘルパーウイルスを用いる系で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に成功した。この系はヘルパーウイルスを用いるので、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、目的とする遺伝子によっては、その条件が存在していない。また、現時点では組換えウイルスの回収効率はまだかなり

不十分であり、人工変異の導入で増殖性の低下した組換えウイルスの回収を困難にするかもしれない。しかしながら、これら問題はあるものの、リバーシジェネティクス系の開発は、ロタウイルスの複製サイクルにおいて、今までウイルスから切り離した状態でしか調べることができなかったウイルス遺伝子とその産物の機能的相互作用を実際のウイルスで解析することを可能とし、さらには、近い将来、ヘルパーウイルスを必要としない、すべての分節 dsRNA が cDNA に由来するロタウイルスを作出するリバーシジェネティクス系確立への道につながるものと期待している。

謝 辞

ロタウイルスのリバーシジェネティクス系の開発にあたり、国立感染症研究所の石井孝司先生、大阪大学微生物病研究所の松浦善治先生には、rDIs-T7pol および pX8dT の分与をいただきました。ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Arias CF, Dector MA, Segovia L, Camacho M, Isa P, Espinosa R, Lopez S.: RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 102, 43-51, 2004.
- 2) Becht H.: Infectious bursal disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90, 107-121, 1980.
- 3) Boot HJ, ter Huurne AA, Peeters BP, Gielkens AL.: Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. *Virology* 265, 330-341, 1999.
- 4) Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Buronne OR.: RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* 86, 1481-1487, 2005.
- 5) Chen D, Zeng QY, Wenz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF.: Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* 68, 7030-7039, 1994.
- 6) Cohen J, Charpilienne A, Chilmoneczyk S, Estes MK.: Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* 171, 131-140, 1989.
- 7) Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ.: Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5389-5394, 1997.
- 8) Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK.: Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68, 5945-5922, 1994.
- 9) Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF.: Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 3, 1175-1180, 2002.
- 10) Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK.: Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108, 71-81, 2002.
- 11) Desselberger U.: Genome rearrangements of

- rotaviruses. *Adv. Virus. Res.* 46, 69-95, 1996.
- 12) Dobos P.: In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* 193, 403-413, 1993.
 - 13) Dobos P.: Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208, 19-25, 1995.
 - 14) Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR.: Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 85, 625-634, 2004.
 - 15) Estes MK.: Rotaviruses and their replications. In: *Fields Virology*. 4th ED. Knipe DM, Howley, PM (Ed.), Lippincott, Philadelphia, USA, 1747-1785, 2001.
 - 16) Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD.: Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 61, 1488-1494, 1987.
 - 17) Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR.: Two bob-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP4, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* 80, 333-339, 1999.
 - 18) Faulker-Valle GP, Clayton AV, McCrae MA.: Molecular biology of rotaviruses. III. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of bovine rotavirus. *J. Virol.* 42, 669-677, 1982.
 - 19) Gombold JL, Ramig RF.: Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J. Virol.* 57, 110-116, 1986.
 - 20) Gottlieb P, Strassman J, Frucht A, Qiao X, Mindich L.: In vitro packaging of the bacteriophage Φ 6 ssRNA genomic precursors. *Virology* 181, 589-594, 1991.
 - 21) Gottlieb P, Strassman J, Qiao X, Frucht A, Mindich L.: In vitro replication, packaging, and transcription of the segmented double-stranded RNA genome of bacteriophage Φ 6: studies with procapsids assembled from plasmid-encoded proteins. *J. Bacteriol.* 172, 5774-5782, 1990.
 - 22) Greenberg HB, Kalica AR, Wyatt RW, Jones RW, Kapikian AZ, Chanock RM.: Rescue of noncultivable human rotavirus by gene reassortment during mixed infection with ts mutants of a cultivable bovine rotavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 420-424, 1981.
 - 23) Groft CM, Burley SK.: Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell* 9, 1273-1283, 2002.
 - 24) Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA.: Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14, 5001-5012, 1986.
 - 25) Isa P, Arias CF, Lopez S.: Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj. J.* 23, 27-37, 2006.
 - 26) Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM.: Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 4th ED. Knipe DM, Howley, PM (Ed.), Lippincott, Philadelphia, USA, 1787-1833, 2001.
 - 27) 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.
 - 28) Komoto S, Taniguchi K.: Reverse genetics systems of segmented double-stranded RNA viruses including rotavirus. *Future Virol.* 1, 833-846, 2006.
 - 29) Labbe M, Charpilienne A, Crawford SE, Estes MK, Cohen J.: Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 65, 2946-2952, 1991.
 - 30) Lawton JA, Estes MK, Prasad BVV.: Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv. Virus. Res.* 55, 185-222, 2000.
 - 31) Lopez S, Arias CF.: Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271-278, 2004.
 - 32) Lopez S, Arias CF.: Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39-66, 2006.
 - 33) Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S.: Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79, 184-192, 2005.
 - 34) Magyar G, Chung HK, Dobos P.: Conversion of VP1 to VPg in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 245, 142-150, 1998.
 - 35) Mattion NM, Cohen J, Aponte C, Estes MK.: Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* 190, 68-83, 1992.
 - 36) Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK.: Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* 181, 295-304, 1991.
 - 37) Mitchell DB, Both GW.: Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* 177, 324-331, 1990.
 - 38) Montero H, Arias CF, Lopez S.: Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.* 80:9031-9038, 2006.
 - 39) Mundt E, Müller H.: Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* 209, 10-18, 1995.
 - 40) Mundt E, Vakharia VN.: Synthetic transcripts of double-stranded birnavirus genome are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11131-11136, 1996.
 - 41) Nibert ML, Schiff LA.: Reoviruses and their replication. In: *Fields Virology*. 4th ED. Knipe DM, Howley, PM (Ed.), Lippincott, Philadelphia, USA, 1679-1728, 2001.
 - 42) Olkkonen VM, Gottlieb P, Strassman J, Qiao X, Bamford DH, Mindich L.: In vitro assembly of infectious nucleocapsids of bacteriophage Φ 6: formation of a recombinant double-stranded RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9173-9177, 1990.
 - 43) Onodera S, Qiao X, Qiao J, Mindich L.: Acquisition of a fourth genomic segment in bacteriophage Φ 6, a bacteriophage with a genome of three segments of dsRNA. *Virology* 212, 204-212, 1995.
 - 44) Onodera S, Sun Y, Mindich L.: Reverse genetics and

- recombination in Φ 8, a dsRNA bacteriophage. *Virology* 286, 113-118, 2001.
- 45) Padilla-Noriega L, Paniagua O, Guzman-Leon S.: Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology* 298, 1-7, 2002.
 - 46) Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI.: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infect. Dis.* 9, 565-572, 2003.
 - 47) Patton JT.: Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp.* 238, 64-77, 2001.
 - 48) Patton JT, Jones MT, Kalbach AN, He Y, Xiaobo J.: Rotavirus RNA promoter requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71, 9618-9626, 1997.
 - 49) Patton JT, Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del CR, Taraporewala ZF.: Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 169-187, 2006.
 - 50) Patton JT, Spencer E.: Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217-225, 2000.
 - 51) Patton JT, Vasquez-Del CR, Spencer E.: Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3769-3777, 2004.
 - 52) Patton JT, Wenz M, Xiabo J, Ramig R.: cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J. Virol.* 70, 3961-3971, 1996.
 - 53) Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BVV.: Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 189-219, 2006.
 - 54) Peters MA, Lin TL, Wu CC.: Infectious bursal disease virus recovery from Vero cells transfected with RNA transcripts is enhanced by expression of the structural proteins in trans. *Arch. Virol.* 150, 2183-2194, 2005.
 - 55) Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D.: Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17, 5811-5821, 1998.
 - 56) Poncet D, Aponte C, Cohen J.: Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J. Virol.* 67, 3159-3165, 1993.
 - 57) Poncet D, Laurent S, Cohen J.: Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *EMBO J.* 13, 4165-4173, 1994.
 - 58) Poranen MM, Paatero AO, Tuma R, Bamford DH.: Self-assembly of a viral molecular machine from purified protein and RNA constituents. *Mol. Cell* 7, 845-854, 2001.
 - 59) Poranen MM, Tuma R.: Self-assembly of double-stranded RNA bacteriophages. *Virus Res.* 101, 93-100, 2004.
 - 60) Prasad, BVV, Rothnagel R, Zeng CQ-Y, Jakane J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK.: Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* 382, 471-473, 1996.
 - 61) Ramig RF.: Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 120, 93-105, 1982.
 - 62) Ramig RF.: Factors that affect genetic interaction during mixed infections with temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology* 127, 91-99, 1983.
 - 63) Ramig RF.: Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants that define five additional recombination groups in simian rotavirus SA11. *Virology* 130, 464-473, 1983.
 - 64) Ramig RF.: Genetics of the rotaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 225-255, 1997.
 - 65) Ramig RF, Ward RL.: Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. *Adv. Virus Res.* 39, 163-207, 1991.
 - 66) Roner MR, Bassett K, Roehr J.: Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* 329, 348-360, 2004.
 - 67) Roner MR, Joklik WK.: Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8036-8041, 2001.
 - 68) Roner MR, Nepliouev I, Sherry B, Joklik WK.: Construction and characterization of a reovirus double temperature-sensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6826-6830, 1997.
 - 69) Roner MR, Roehr J.: The 3' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the reovirus genome. *Virol. J.* 1-11, 2005.
 - 70) Roner MR, Sutphin LA, Joklik WK.: Reovirus RNA is infectious. *Virology* 179, 845-852, 1990.
 - 71) Semancik JS, Vidaver AK, Van Etten JL.: Characterization of a segmented double-helical RNA from bacteriophage Φ 6. *J. Mol. Biol.* 78, 617-625, 1973.
 - 72) Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT.: Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* 78, 7763-7774, 2004.
 - 73) Spies U, Müller H.: Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J. Gen. Virol.* 71, 977-981, 1990.
 - 74) Sun Y, Qiao X, Mindich L.: Construction of carrier state viruses with partial genomes of the segmented dsRNA bacteriophages. *Virology* 319, 274-279, 2004.
 - 75) Taniguchi K, Urasawa S.: Diversity in rotavirus genomes. *Sem. Virol.* 6, 123-131, 1995.
 - 76) Tortorici MA, Broering TJ, Nibert ML, Patton JT.: Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *J. Biol. Chem.* 278, 32673-32682, 2003.
 - 77) Tortorici MA, Shapiro BA, Patton JT.: A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA* 12, 133-146, 2006.
 - 78) Varani G, Allain FHT.: How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nature Struct.*

- Biol.* 9, 158-159, 2002.
- 79) Vascotto F, Campagna M, Visintin M, Cattaneo A, Burrone OR.: Effects of intrabodies specific for NSP5 during the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* 85, 3285-3290, 2004.
- 80) Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D.: Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3'end. *J. Virol.* 74, 7064-7071, 2000.
- 81) Visintin M, Settanni G, Maritan A, Graziosi S, Marks JD, Cattaneo A.: The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. *J. Mol. Biol.* 317, 73-83, 2002.
- 82) Visintin M, Tse E, Axelson H, Rabbitts TH, Cattaneo A.: Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid *in vivo* system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11723-11728, 1999.
- 83) Vitour D, Lindenbaum P, Vende P, Becker MM, Poncet D.: RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J. Virol.* 78, 3851-3862, 2004.
- 84) Yao K, Vakharia VN.: Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 72, 8913-8920, 1998.
- 85) Zeng CQ, Labbe M, Cohen J, Prasad BVV, Chen D, Ramig RF, Estes MK.: Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 201, 55-65, 1994.

Establishment of a reverse genetics system for rotavirus

Satoshi KOMOTO, and Koki TANIGUCHI

Department of Virology and Parasitology, School of Medicine,
Fujita Health University, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

The rotavirus genome is composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA). Rotavirus is the leading etiological agent of severe gastroenteritis in infants and young children worldwide. Reverse genetics is the powerful and ideal methodology for the molecular study of virus replication, which enables the virus genome to be artificially manipulated. Very recently, we developed the first reverse genetics system for rotavirus, which enables one to generate an infectious rotavirus containing a novel gene segment derived from cDNA. In this review, we describe each steps of rotavirus replication to understand the background to the establishment of a reverse genetics system for rotavirus, and summarize the reverse genetics systems for segmented dsRNA viruses including rotavirus.