

1. ロタウイルスにおけるリバーシジェネティクス系

金井 祐太, 小林 剛

大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野

ロタウイルス (RV) は乳幼児に重篤な下痢症を引き起こすウイルスであり, ワクチンが利用できるようになった今日でも世界中で年間約 20 万人が RV 感染により亡くなっている. ウイルスゲノムの改変技術であるリバーシジェネティクス系は, ウイルス学研究を行う上で必須の基盤技術であるが, 11 分節の二本鎖 RNA ゲノムを有する RV においては, その開発が遅れていた. 最近, 筆者らは RV の人工合成促進因子として, コウモリレオウイルス由来の細胞融合性タンパク質 FAST ならびにワクシニアウイルス由来の RNA キャッピング酵素を用いることで RV の人工合成に世界で初めて成功し, 任意の変異を加えた組換え RV を自在に作製できる系を確立した. 本稿では RV を含むレオウイルス科のリバーシジェネティクス系の概要について解説する.

はじめに

レオウイルス科に属するロタウイルス (RV) は, 3 層構造からなる非エンベロープウイルスであり, 11 分節の二本鎖 RNA (dsRNA) ゲノムを有する. 5 歳以下の乳幼児の多くが感染し, 重症化する例も多く, 世界中で毎年約 20 万人が RV 感染により亡くなっている¹⁾. 世界の乳幼児の死亡原因の中で 10% 前後を急性感染性胃腸炎が占めるが, その中でも 25~30% が RV 感染によるものと報告されている²⁾. RV はヒトの他, 様々な哺乳動物や鳥類に感染し, 種間伝播や分節ゲノムの遺伝子再集合は, RV の遺伝子多様性の獲得に寄与している. 現在, 2 種類の弱毒生ワクチンが世界中で使用され, 重症化の予防に大きく貢献しているが, 幾つかの問題点も指摘されていることから, 次世代ワクチンの開発も求められている³⁻⁵⁾.

リバーシジェネティクス系とは, プラスミド等にクロー

ニングしたウイルス由来 cDNA や合成したウイルス由来核酸から, 感染性ウイルスを人工的に作製する技術である. 標的とするウイルスゲノムに任意の改変を自由自在に加えることができるリバーシジェネティクス系は, ウイルス学研究に必須の手法である. 動物の RNA ウイルスでは, 1981 年にポリオウイルスでリバーシジェネティクス系が報告されて以降⁶⁾, 現在まで狂犬病ウイルス⁷⁾, インフルエンザウイルス⁸⁾ 等, 多くの RNA ウイルスでその技術が開発され, ウイルス増殖機構の解明やワクチンベクター開発研究に多大な貢献をしてきた⁹⁾. 9-12 本の分節型 dsRNA ゲノムを有するレオウイルス科では, その複雑なゲノム構造からリバーシジェネティクス系の開発は遅れていたものの, 近年, 幾つかのウイルスでこの技術が確立されている¹⁰⁾. しかし, この科で最も重要な病原ウイルスである RV においては, 実用性の高いリバーシジェネティクス系の開発は進んでおらず, RV の基礎・応用研究を進める上で大きな障害となっていた.

オルソレオウイルス属のリバーシジェネティクス系

レオウイルス科オルソレオウイルス属は細胞融合活性の有無により Fusogenic グループと Nonfusogenic グループに分類される. Fusogenic グループには, コウモリレオウイルス (Pteropine reovirus: PRV), トリレオウイルス, ヒヒレオウイルス等が, Nonfusogenic グループには哺乳類オルソレオウイルス (Mammalian orthoreovirus: MRV) が含まれる¹¹⁻¹⁴⁾. Fusogenic グループの細胞融合活性は, このグループがコードする Fusion-associated small transmembrane

連絡先

〒 565-0871

大阪府吹田市山田丘 3-1

大阪大学微生物病研究所

難治感染症対策研究センター

ウイルス免疫分野

TEL: 06-6879-8335

FAX: 06-6879-8278

E-mail: tkobayashi@biken.osaka-u.ac.jp

(FAST) タンパク質の作用によることが知られている^{13,15)}。

MRVは、正20面体2層構造を持ち、10分節のdsRNAをゲノムとして保有している。MRVは古くからレオウイルス科のモデルウイルスとして研究が進んでおり、ウイルス学研究以外にもキャップ構造の発見やタンパク質の翻訳機構など、黎明期のRNA研究に広く貢献してきた^{16,17)}。また、MRVは近年、病原性が極めて低いこと、選択的腫瘍溶解活性を持つことから、腫瘍溶解性ウイルスとして癌治療研究に応用されており、実用化に向けた基礎・臨床研究が精力的に行われている¹⁸⁻²⁰⁾。レオウイルス科におけるリバーシジェネティクス系は、MRVで最初の成功例が報告された。

1990年、RonerらはMRVのリバーシジェネティクス系の基礎となる成果を報告した。彼らは、MRV-3型由来コア粒子から*in vitro* transcription 反応により合成した10分節のプラス鎖の一本鎖ウイルスRNA (ssRNA) をウサギ網状赤血球ライセートを用いた系で翻訳し、得られた翻訳産物、MRV-3型由来dsRNAならびにssRNAゲノムをヘルパーウイルス (MRV-2型) 感染細胞に導入することで、目的とするウイルス (MRV-3型) の作製に成功した²¹⁾。この系では、産生されたMRV-3型はヘルパーウイルスとして用いられたMRV-2型との増殖速度の差を利用することで、プラーク法により単離された。その後、Ronerらはこの系をさらに応用し、レオウイルス科初となるリバーシジェネティクス系の開発に成功した。彼らは、コア粒子から合成した9分節のssRNAと、*in vitro* transcription 反応により合成したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子をS2遺伝子に組み込んだS2-CAT ssRNAを同時にヘルパーウイルス感染細胞に導入することで、遺伝子改変を加えた組換えMRVの作製に成功した²²⁾。しかし、ヘルパーウイルスを用いたMRVのリバーシジェネティクス系は、操作が複雑かつ高度な手技が必要とされることから、より簡便で効率の高い系の開発が望まれていた。

2007年、筆者らは汎用性の高いMRVのリバーシジェネティクス系の確立を目的にヘルパーウイルスを必要としないPlasmid-based リバーシジェネティクス系の開発に成功した²³⁾。この系の開発のため、筆者らは、MRV-3型の全10分節dsRNAゲノム由来cDNAを作製し、得られたcDNAをT7プロモーターおよびD型肝炎ウイルス (HDV) リボザイム配列の間に挿入したプラスミドを構築した。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 (VV) DIIs-T7pol株²⁴⁾を感染させたマウス由来L929細胞に構築した10分節ゲノム発現プラスミドを導入することで、組換えMRVの作製に成功した²³⁾。MRVの複製サイクルでは、コア粒子内でウイルス自身が持つRNA依存性RNAポリメラーゼにより合成された10分節のssRNAは、mRNAとしてウイルスタンパク質の合成あるいは

dsRNAゲノム合成の鋳型として機能する。Plasmid-basedの系においても、T7 RNAポリメラーゼにより転写され、HDVリボザイムによって自己切断されたRNAがウイルスssRNAとして機能することで、その後の感染サイクルが反映されると考えられる。

筆者らは、MRVのPlasmid-based リバーシジェネティクス系を基に、複数のMRVゲノム発現カセットを一つのプラスミドにクローニングし、最終的に4個の発現プラスミドに集約することでウイルス作製効率を向上させた系やT7 RNAポリメラーゼを持続的に発現するハムスター由来BHK (BHK-T7) 細胞を使用することで、VV DIIs-T7pol株を必要としないより簡便なシステムの開発も行った^{23,25)}。現在、MRVのPlasmid-based リバーシジェネティクス系は、多くの研究室で導入され、レオウイルス科研究の発展に広く貢献している。

細胞融合活性を持つFusogenicグループではリバーシジェネティクス系の開発が遅れていた。最近、筆者らは、PRVのリバーシジェネティクス系の開発に成功した²⁶⁾。PRVは、1968年にオーストラリアでオオコウモリ (*Pteropus poliocephalus*) から分離され、長らくコウモリを自然宿主とする非病原性のレオウイルスと考えられていた。しかし、2007年にマレーシアで重篤な呼吸器症状を呈した患者からPRVが分離され、ヒトに病原性を示すことが報告された²⁷⁾。その後もアジア諸国で同様の呼吸器症状を呈した患者からのPRV感染例が報告されており、国内においても、インドネシア・バリ島より帰国後、急性の呼吸器症状を呈した患者から、PRV Miyazaki-Bali/2007 (MB) 株が分離されている²⁸⁾。筆者らは、PRVの複製機構ならびに病態発現機序を理解するため、MRVのリバーシジェネティクス系を基に高病原性MB株のPlasmid-based リバーシジェネティクス系の開発を行った。さらに、この系を用いて、セルアタッチメントタンパク質sigmaC欠損ウイルスを作製し、解析を行った結果、PRVの細胞吸着・侵入過程にはsigmaCを含む複数のウイルスリガンドによる感染経路が存在することを明らかにした²⁶⁾。PRVのリバーシジェネティクス系は他のレオウイルス科の系と比較して、組換えウイルスの作製効率が非常に高いことから、Fusogenicグループ特有の感染機構 (細胞融合性FASTタンパク質の機能解析等) の解明のみならず、ゲノムアセンブリやゲノムパッケージングなど、レオウイルス科共通の複製機構の解明にも有用と考えられる。

オルビウイルス属のリバーシジェネティクス系

オルビウイルス属は、10分節dsRNAゲノムを有し、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 haemorrhagic disease virus: EHDV) 等の獣医学領域で重要な節足動物によって

媒介されるウイルスが含まれる²⁹⁻³¹⁾。その中でも、反芻動物に感染するBTVは、古くからオルビウイルス属のモデルウイルスとして研究が進んでいる³²⁻³⁴⁾。リバーシジェネティクス系の開発においても、MRVのPlasmid-basedリバーシジェネティクス系の開発と同時期に、BTVでRNA-basedリバーシジェネティクス系が英国のロンドン衛生熱帯医学大学院大学のグループにより報告された。英国のグループは、BTV粒子から酵素処理によりカプシドタンパク質を除去したコア粒子を用いてssRNAを合成し、得られた10分節全てのssRNAをBTV感受性細胞にトランスフェクションすることで、感染性ウイルスが作製できることを証明した³⁵⁾。この報告は、ヘルパーウイルスを必要とせず、ssRNAのみを培養細胞に導入することで、感染性ウイルスの作製が可能であることを示した重要な成果である。

英国のグループは、この方法を発展させることで、RNA-basedリバーシジェネティクス系の開発を行った。ウイルスゲノムcDNAをコードするプラスミドから、T7プロモーターを利用した*in vitro* transcription反応により、10分節ssRNAを合成し、得られた10分節のssRNAを細胞へトランスフェクションすることで、組換えBTVの作製に成功した³⁶⁾。当初、このRNA-basedリバーシジェネティクス系のウイルス作製効率は低かったが、*in vitro*で合成された10分節ssRNAの培養細胞への導入回数を1回から2回に増やすこと、BTV複製複合体を形成するVP1、VP3、VP4、VP6タンパク質ならびにViral inclusion bodyを形成するNS2タンパク質を過剰発現させることで、ウイルス作製効率は大幅に改善されている³⁷⁾。BTVのRNA-basedリバーシジェネティクス系を基に、その後、AHSVやEHDVにおいてもリバーシジェネティクス系が開発されており、筆者らもAHSVの系の開発に貢献した^{38, 39)}。RNAを直接トランスフェクションするRNA-basedリバーシジェネティクス系は、初期複製過程の研究に利点はあるが、*in vitro*で10分節全てのssRNA合成が必要なこと、合成したssRNAを培養細胞に効率的にトランスフェクションする必要があることから、高いコストと高度な技術が要求される。そのため、最近では、BTVやAHSVにおいても、より簡便なPlasmid-basedのリバーシジェネティクス系が開発されている^{40, 41)}。

RVにおけるヘルパーウイルスを用いた リバーシジェネティクス系

RVはレオウイルス科で最も公衆衛生上重要な感染症であり、世界中の多くのRV研究者がこれまでRVのリバーシジェネティクス系の開発を試みていた。様々な試行錯誤の中、2006年、最初のブレイクスルーとして、ヘルパーウイルスを用いた系が藤田保健衛生大学のグループにより報告された。この系は、サルRV SA11株由来の外殻ス

イクタンパク質VP4をコードするVP4遺伝子由来cDNAをT7プロモーターおよびHDVリボザイム配列の間に配置したプラスミドを構築し、構築したVP4分節ゲノム発現プラスミドをVV DIs-T7pol株およびヘルパーウイルス(ヒト由来RV KU株)を感染させた細胞に導入することで、SA11株由来のVP4遺伝子を持つKU株を作製する方法である。ヘルパーウイルスから目的とする組換えウイルスの選別は、KU株のVP4に対する中和抗体を用いて野生型KU株の増殖を抑制することで、SA11株由来VP4遺伝子を持つ組換えウイルスの単離を行っている。この系では、中和抗体による組換えウイルスの選別が必須であるため、標的とする遺伝子は現在までのところVP4遺伝子に限られているが、セルアタッチメントVP4タンパク質は、RVの抗原性(遺伝子型)を決定する重要なタンパク質の一つであり、新規の異なる遺伝子型を持つワクチン候補株の作出などに応用可能である^{42, 43)}。

2010年には、Viroplasm形成に関わる非構造タンパク質NSP2⁴⁴⁾に変異を導入できるヘルパーウイルスを用いたリバーシジェネティクス系がアメリカ国立衛生研究所のグループより報告された。このグループは、NSP2遺伝子に機能的変異を持つRV温度感受性変異株(tsE株)をヘルパーウイルスとして用いることで、外来性のNSP2遺伝子を取り込ませることに成功した⁴⁵⁾。tsE株はNSP2遺伝子の変異により30℃の培養条件では効率よく増殖するが、39℃での増殖効率は低い。この性質を利用して、39℃で培養することで、目的とするNSP2遺伝子を取り込んだ組換えウイルスの選別を行った。さらに、選別方法をより強力にするため、tsE株由来のNSP2遺伝子に対するsmall interfering RNAを用いることで、外来性のNSP2遺伝子を持つ組換えウイルスのみが選択的に増殖するよう操作している。これらの系の報告以降、幾つかのヘルパーウイルスを用いたリバーシジェネティクス系が報告されている^{46, 47)}。しかし、これらの系では、改変できる分節遺伝子が限定されることから、ヘルパーウイルスを必要としない、全ての11分節遺伝子を自由自在に改変できる完全なリバーシジェネティクス系の開発が切望されてきた。

RVにおけるPlasmid-basedのリバーシジェネティクス系

筆者らは、オルソレオウイルス属の研究と並行して、RVにおけるヘルパーウイルスを必要としない完全なリバーシジェネティクス系の開発に取り組んできた。MRVの系を基に、RV SA11株の11分節ゲノム由来cDNAをT7プロモーターおよびHDVリボザイムの間に挿入したプラスミドを作製し、得られたプラスミドをT7 RNAポリメラーゼ発現細胞に導入することで、組換えウイルスの作出を試みたが、成功には至らなかった。しかし、オルソレオウイルス属およびオルビウイルス属では、Plasmid-basedのリバーシジェネティクス系が確立されているこ

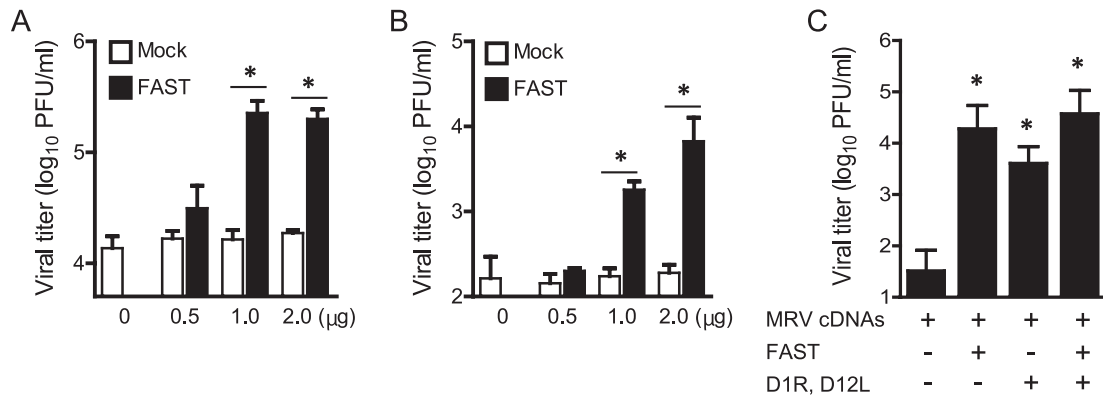


図1 FAST および RNA キャッピング酵素による組換えウイルス作製効率の促進 (参考文献 51 より改変)

FAST タンパク質の発現により, (A) 哺乳類レオウイルス (MRV) および (B) ロタウイルスの複製能は増強された. (C) FAST および RNA キャッピング酵素存在下で, 組換え MRV の作製効率が顕著に増加した.

と, RV のヘルパーウイルスを用いた系でも, T7 プロモーターを有するゲノム発現プラスミドから合成された外来性のウイルス様 ssRNA は, ヘルパーウイルス粒子に取り込まれ, RV ゲノムとして機能していることを考慮すると, 筆者らの開発研究の方向性は間違っていないと推察された. そこで, 筆者らは, RV のウイルス作製効率を向上させるために様々な試みを行った. 試行錯誤の中, 筆者らは, RV の人工合成を促進できる二つの因子を見出した.

一つ目の因子は, PRV の研究を行っている過程で発見された. Fusogenic グループに属する PRV は前述のように FAST タンパク質をコードしている. 過去の報告から, FAST はウイルス複製の増強に関与することが示唆されていたことから⁴⁸⁾, FAST をコードしないレオウイルス科のウイルスである MRV や RV の複製能に及ぼす FAST の効果について検討した. その結果, 興味深いことに, FAST 存在下で MRV および RV の複製能が顕著に増加されることが明らかとなった (図 1A, B). そこで, 筆者らは, FAST を RV リバースジェネティクス系の人工合成促進因子として用いることを着想した.

二つ目の人工合成促進因子として, VV 由来の RNA キャッピング酵素を見出した. 感染細胞の細胞質内で複製する VV は, そのゲノム内に D1R と D12L のサブユニットからなる RNA キャッピング酵素をコードしている^{49, 50)}. レオウイルス科の ssRNA の 5' 末端にはキャップ構造が付加されている. そのため, MRV や PRV で開発された VV DIs-T7pol 株を使用する Plasmid-based リバースジェネティクス系では, 導入したゲノム発現プラスミドから合成される ssRNA の 5' 末端には VV 由来の RNA キャッピング酵素により, キャップ構造が付加されることから, ssRNA の安定性と翻訳効率は高いことが予想される. 一

方, T7 RNA ポリメラーゼを持続発現する細胞株を用いるリバースジェネティクス系では, 細胞質内で合成される ssRNA の 5' 末端にキャップ構造が付加される割合は極めて低く, 翻訳効率も低いと考えられる. 実際, PRV における VV DIs-T7pol 株を用いる系と T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞を使用する系では, VV DIs-T7pol 株を用いる系の方がウイルス作製効率は, より高い²⁶⁾. そのため, キャップ構造を効率よく付加することは, レオウイルス科の組換えウイルス作製効率の向上に重要と考えられたことから, 筆者らは T7 RNA ポリメラーゼ発現細胞に VV 由来の RNA キャッピング酵素を導入する発想に至った.

筆者らが見出した人工合成促進因子, FAST ならびに VV 由来 RNA キャッピング酵素がどのように RV のリバースジェネティクス系の効率に影響を与えるかは不明であった. そこで, 安定的な MRV のリバースジェネティクス系を用いて, これら二つの因子の効果を検証した. その結果, 10 分節の MRV ゲノム発現プラスミドセットのみを BHK-T7 細胞に導入した場合と比較して, FAST タンパク質あるいは VV 由来 RNA キャッピング酵素の存在下で, 組換え MRV の作製効率は顕著に増強された. FAST ならびに VV 由来 RNA キャッピング酵素の両方を加えた場合では, 約 1150 倍の作製効率の向上が認められた (図 1C). これらの成果から, 二つの促進因子は, レオウイルス科のリバースジェネティクス系の効率の向上に極めて有用であると考えられた. 最終的に, 筆者らは MRV のリバースジェネティクス系で得られた FAST ならびに VV 由来 RNA キャッピング酵素の成果を基に, RV のリバースジェネティクス系の開発に成功した. RV ゲノム発現プラスミド 11 種, FAST タンパク質発現ベクター, VV 由来 RNA キャッピング酵素 (D1R および D12L サブユニット) 発現ベクター, 計 14 種のプラスミドを BHK-T7 細胞にトランスフェクションした後に, RV の高感受性細胞であるサル腎臓由来 MA104 細胞を加え, 37° C で数日間トリプシン存在下の

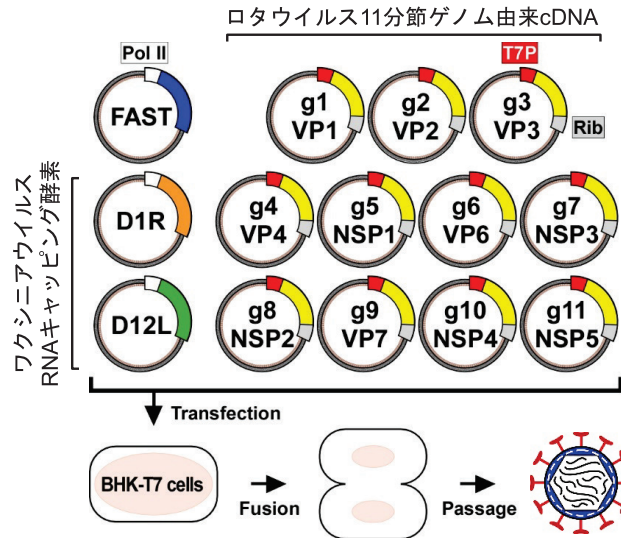


図2 FAST および RNA キャッピング酵素を利用したロタウイルスのリバースジェネティクス系 (参考文献 51 より改変)

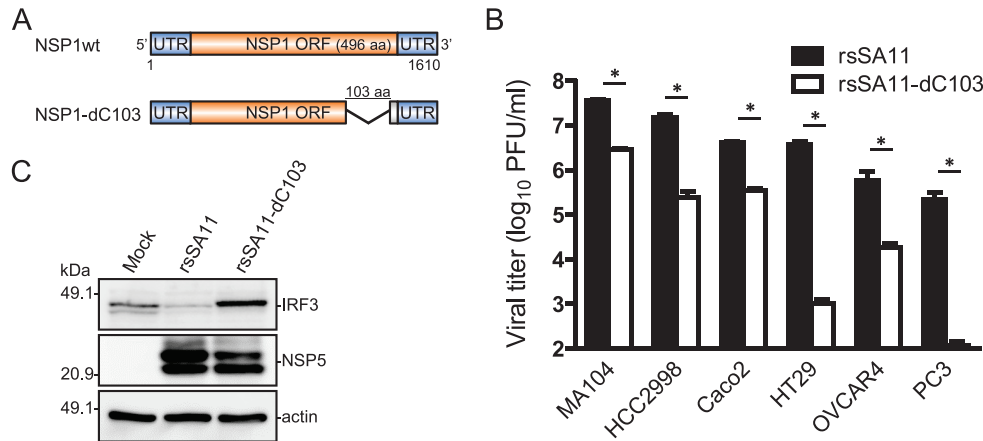


図3 ロタウイルス NSP1 C 末端領域の機能解析 (参考文献 51 より改変)

- (A) NSP1 の C 末端領域 103 アミノ酸を欠損した組換えウイルス (rsSA11-dC103) の作製。
 (B) 様々な培養細胞において、rsSA11-dC103 の複製能は低下した。
 (C) rsSA11-dC103 感染細胞における IRF3 分解能の消失。

培地で共培養することで目的とする組換え RV の作製に成功した (図 2)⁵¹⁾。

リバースジェネティクス系による NSP1 タンパク質の機能解析

RV はそのゲノム内に 6 種の非構造タンパク質 (NSP1-NSP6) をコードしている。その中でも、NSP1 は最も機能解析が進んでいるタンパク質の一つであり、C 末端領域に含まれる pLxIS モチーフを介して IRF-3 の分解を誘導し、インターフェロン (IFN) 応答を抑制することが報告されている^{52, 53)}。そこで、NSP1 の C 末端領域のウイルス複製サイクルにおける重要性を明らかにするため、新規 RV リバースジェネティクス系を用いて、pLxIS モチーフ

を含む NSP1 の C 末端側 103 アミノ酸を欠損した組換えウイルス (rsSA11-dC103) の作製を行った (図 3A)。rsSA11-dC103 の増殖能は野生型 rsSA11 株と比較し、様々な培養細胞株において、顕著に低下しており (図 3B)、IRF3 の分解能も欠如していた (図 3C)。これらの成果から、NSP1 の C 末端領域は IRF3 の分解により IFN 経路を抑制し、ウイルス増殖の促進に関与していることが確認された。NSP1 は、E3 cullin-RING リガーゼ複合体中の β -TrCP と直接相互作用することで、I κ B の分解経路を抑制し、結果として NF κ B の活性化を抑制することが報告されている^{54, 55)}。また、NSP1 の N 末端領域には RNA 結合ドメイン⁵⁶⁾ や RING ドメインが存在し⁵⁷⁾、E3 cullin-RING リガーゼ複合体との相互作用に必要と考えられている⁵⁸⁾。今後、

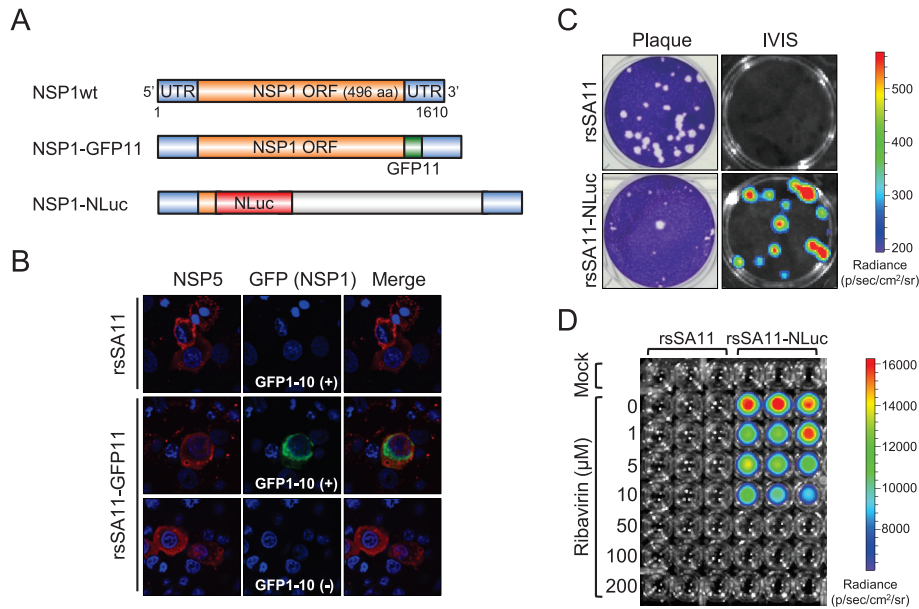


図4 レポーター遺伝子発現口タウイルス (RV) の作製 (参考文献 51 より改変)

- (A) NSP1 遺伝子改変によるレポーター遺伝子発現 RV の作製。
 (B) NSP1-GFP11 ペプチド融合タンパクを発現する RV (rsSA11-GFP11) を作製し, GFP1-10 発現細胞に感染させたところ, GFP 蛍光が認められた。
 (C) NLuc 遺伝子発現 RV (rsSA11-NLuc) により形成されたプラークにおいて発光シグナルが観察された。
 (D) リバビリンの濃度依存的に rsSA11-NLuc 感染細胞における NLuc 活性の低下が認められた。

リバースジェネティクス系により, NSP1 の機能領域 (RING ドメイン, RNA 結合ドメインおよび pLxIS モチーフ等) やランダムに変異を加えた組換えウイルスを作製し, 解析することで NSP1 のより詳細な機能が明らかにされていくことが期待される。

レポーター遺伝子発現 RV の作製

蛍光タンパク質や発光タンパク質を発現する組換えレポーター遺伝子発現ウイルスは, 薬剤のスクリーニングを簡便にし, 細胞や生体における感染のライブイメージングを可能にすることから, ウイルス学研究に多大な貢献をしている。レオウイルス科においても, レポーター遺伝子発現ウイルスの作製例がいくつか報告されている^{26, 59-61)}。筆者らは最初に短いペプチドタグを用いたレポーター遺伝子発現 RV の作製を行った。方法として, Split-GFP システムを用いた⁶²⁾。Split-GFP システムは, 全長 230 アミノ酸残基からなる GFP タンパク質を GFP1-10 (214 アミノ酸残基) と GFP11 (16 アミノ酸残基) に分割し, 細胞内で再構築することで緑色蛍光を発する実験系である。Split-GFP の GFP11 ペプチドを NSP1 タンパク質の C 末端に挿入した組換えウイルスを作製し (図 4A), GFP1-10 を発現する細胞に感染させたところ, ウイルス抗原陽性の細胞に GFP 蛍光が観察された (図 4B)。この Split-GFP 蛍光は NSP1 の感染細胞内局在を反映していることから, 感染

細胞内における NSP1 タンパク質の細胞内動態のイメージング研究に有用である。

次いで, 筆者らは, よりサイズの大きいレポーター遺伝子発現する組換え RV の作製を試みた。過去の報告から, NSP1 遺伝子はウイルス複製に必須ではないことが示唆されている^{63, 64)}。そこで, NSP1 遺伝子の N 末端領域内に NanoLuc Luciferase (NLuc) 遺伝子を挿入した組換え RV (rsSA11-NLuc) の作製を行った (図 4A)。rsSA11-NLuc 感染により形成されたプラークは, NLuc の基質を添加することで, 明瞭な発光シグナルが認められた (図 4C)。さらに, rsSA11-NLuc を抗 RV 剤として知られるリバビリン存在下で培養したところ, リバビリン濃度依存的に発光シグナルが低下することが示され, 簡便な抗 RV 薬のスクリーニングに応用可能であることが示された (図 4D)。RV は経口投与により効率的に粘膜免疫を誘導できることから^{56, 65)}, NSP1 遺伝子に様々な粘膜感染症に対する抗原遺伝子を搭載した組換え RV は, 経口投与型粘膜ワクチンベクターとして有用と考えられ, 今後の開発研究の進展が期待される。

RV リバースジェネティクス系を応用した 次世代ワクチン開発の展望

2006 年以降, 2 種類の弱毒生ワクチン, Rotarix (GSK) と RotaTeq (Merck) が市場に導入され, 重症化を予防す

るワクチンとして、高い防御効果を発揮している⁶⁶⁻⁷¹⁾。しかし、RV 感染症が特に問題視されている発展途上国における不十分な防御効果、高額な費用、副反応（腸重積症）、また、既存のワクチンでは多様な RV の全ての血清型を制御することが困難等の問題から、次世代ワクチンの開発研究の重要性が増している。

これまでの RV ワクチン開発は、主に培養細胞での連続継代による弱毒化や異なる株間の遺伝子再集合体によりワクチン候補株を得ていたが^{72, 73)}、これらの方法は偶発的に得られたウイルス株に依存しており、新規ワクチンの開発には膨大な時間を要するのみならず、得られた RV 株の弱毒化のメカニズムについても不明なままである。しかし、新規リバースジェネティクス系によりウイルスゲノムに任意の変異を加えることで、病原性を制御し、地域、時期の流行に合わせた抗原性を持つ RV ワクチンの開発は、RV 感染制御に極めて有用と考えられる。従来のワクチン開発法に比べ、コストと開発期間を大幅に削減できる可能性があることから、今後の次世代 RV ワクチン開発において、リバースジェネティクス系の応用は主流になると期待される。

おわりに

レオウイルス科の研究において、長らく待ち望まれていた RV の完全な Plasmid-based リバースジェネティクス系が遂に開発された。筆者らはこれまでレオウイルス科におけるリバースジェネティクス系を駆使することで、多くの知見を蓄積してきた。これらの経験や技術の応用が、RV のリバースジェネティクス系の確立に貢献できたことは、とても幸運な巡り合わせと思われる。筆者らが開発した RV のリバースジェネティクス系のウイルス複製効率は、他のレオウイルス科のシステムと比較すると十分ではない。また、RV 人工合成促進因子の一つである FAST によるウイルス複製・合成増強メカニズムについても詳細は不明のままである。さらに、継続して改良を重ねることで、より効率の高い RV の遺伝子改変技術の開発が望まれる。同時に、この系を活用し、如何にして RV 研究を進展させていくかが今後重要と考えられる。これまでに 10 分節ならびに 11 分節 dsRNA ゲノムを有するレオウイルス科ではリバースジェネティクス系が確立されている。しかし、最多 12 分節 dsRNA ゲノムを持つコルチウイルス属などでは、リバースジェネティクス系は確立されていない。これらのウイルスについてもリバースジェネティクス系を確立し、レオウイルス科について総合的に研究を進めることで、さらに多くの重要な知見が得られると期待される。筆者らも微力ながら RV を含むレオウイルス科の研究の発展に少しでも貢献できるよう努めていきたい。

謝 辞

本総説で紹介した PRV ならびに RV に関する研究は、国立感染症研究所の西條政幸先生、下島昌幸先生、富山大学の谷英樹先生、藤田保健衛生大学の谷口孝喜先生、河本聡志先生、大阪大学微生物病研究所の松浦善治先生ら、その他多くの方々のご協力により遂行されたものであり、深謝いたします。最後に、執筆の機会を与えていただきました渡邊雄一郎先生ならびにウイルス編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

利益相反開示について

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clin Infect Dis* 62 Suppl 2:S96-S105, 2016.
- 2) Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC,

- Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380(9859):2095-2128, 2012.
- 3) Bhandari N, Sharma P, Taneja S, Kumar T, Rongsen-Chandola T, Appaiahgari MB, Mishra A, Singh S, Vrati S A dose-escalation safety and immunogenicity study of live attenuated oral rotavirus vaccine 116E in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 200(3):421-429, 2009.
 - 4) Bines JE, Danchin M, Jackson P, Handley A, Watts E, Lee KJ, West A, Cowley D, Chen MY, Barnes GL, Justice F, BATTERY JP, Carlin JB, Bishop RF, Taylor B, Kirkwood CD Safety and immunogenicity of RV3-BB human neonatal rotavirus vaccine administered at birth or in infancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* 15(12):1389-1397, 2015.
 - 5) Groome MJ, Koen A, Fix A, Page N, Jose L, Madhi SA, McNeal M, Dally L, Cho I, Power M, Flores J, Cryz S Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* 17(8):843-853, 2017.
 - 6) Racaniello VR, Baltimore D Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214(4523):916-919, 1981.
 - 7) Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13(18):4195-4203, 1994.
 - 8) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9345-9350, 1999.
 - 9) Bridgen A Introduction. *Reverse Genetics of RNA Viruses*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp 1-23, 2012
 - 10) Trask SD, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT Comparative analysis of Reoviridae reverse genetics methods. *Methods* 59(2):199-206, 2013.
 - 11) Corcoran JA, Salsman J, de Antueno R, Touhami A, Jericho MH, Clancy EK, Duncan R The p14 fusion-associated small transmembrane (FAST) protein effects membrane fusion from a subset of membrane microdomains. *J Biol Chem* 281(42):31778-31789, 2006.
 - 12) Clancy EK, Duncan R Helix-destabilizing, beta-branched, and polar residues in the baboon reovirus p15 transmembrane domain influence the modularity of FAST proteins. *J Virol* 85(10):4707-4719, 2011.
 - 13) Shmulevitz M, Duncan R A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J* 19(5):902-912, 2000.
 - 14) Duncan R, Chen Z, Walsh S, Wu S Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress. *Virology* 224(2):453-464, 1996.
 - 15) Ciechonska M, Duncan R Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends Microbiol* 22(12):715-724, 2014.
 - 16) Kozak M, Shatkin AJ Identification of features in 5' terminal fragments from reovirus mRNA which are important for ribosome binding. *Cell* 13(1):201-212, 1978.
 - 17) Furuichi Y, Morgan M, Muthukrishnan S, Shatkin AJ Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal structure: m-7G(5')ppp(5')G-MpCp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1):362-366, 1975.
 - 18) Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282(5392):1332-1334, 1998.
 - 19) Etoh T, Himeno Y, Matsumoto T, Aramaki M, Kawano K, Nishizono A, Kitano S Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin Cancer Res* 9(3):1218-1223, 2003.
 - 20) Clements D, Helson E, Gujar SA, Lee PW Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virother* 3:69-82, 2014.
 - 21) Roner MR, Sutphin LA, Joklik WK Reovirus RNA is infectious. *Virology* 179(2):845-852, 1990.
 - 22) Roner MR, Joklik WK Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):8036-8041, 2001.
 - 23) 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, Dermody TS A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1(2):147-157, 2007.
 - 24) 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 DI5 strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302(2):433-444, 2002.
 - 25) Kobayashi T, Ooms LS, Ikizler M, Chappell JD, Dermody TS An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398(2):194-200, 2010.
 - 26) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimajima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T Reverse genetics for fusogenic bat-borne orthoreovirus associated with acute respiratory tract infections in humans: role of outer capsid protein sigmaC in viral replication and pathogenesis. *PLoS Pathog* 12(2):e1005455, 2016.
 - 27) Chua KB, Crameri G, Hyatt A, Yu M, Tompang MR, Rosli J, McEachern J, Crameri S, Kumarasamy V, Eaton BT, Wang LF A previously unknown reovirus of

- bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27): 11424-11429, 2007.
- 28) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One* 9(3):e92777, 2014.
 - 29) Maclachlan NJ, Zientara S, Savini G, Daniels PW Epizootic haemorrhagic disease. *Rev Sci Tech* 34(2):341-351, 2015.
 - 30) Santman-Berends IM, van Schaik G, Bartels CJ, Stegeman JA, Vellema P Mortality attributable to bluetongue virus serotype 8 infection in Dutch dairy cows. *Vet Microbiol* 148(2-4):183-188, 2011.
 - 31) Mellor PS, Hamblin C African horse sickness. *Vet Res* 35(4):445-466, 2004.
 - 32) Grimes JM, Burroughs JN, Gouet P, Diprose JM, Malby R, Zientara S, Mertens PP, Stuart DI The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* 395(6701):470-478, 1998.
 - 33) Zhang X, Boyce M, Bhattacharya B, Schein S, Roy P, Zhou ZH Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14):6292-6297, 2010.
 - 34) Patel A, Roy P The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res* 182:5-20, 2014.
 - 35) Boyce M, Roy P Recovery of infectious bluetongue virus from RNA. *J Virol* 81(5):2179-2186, 2007.
 - 36) 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(17):8339-8348, 2008.
 - 37) Matsuo E, Roy P Minimum requirements for bluetongue virus primary replication in vivo. *J Virol* 87(2):882-889, 2013.
 - 38) Kaname Y, Celma CC, Kanai Y, Roy P Recovery of African horse sickness virus from synthetic RNA. *J Gen Virol* 94(Pt 10):2259-2265, 2013.
 - 39) Matsuo E, Saeki K, Roy P, Kawano J Development of reverse genetics for Ibaraki virus to produce viable VP6-tagged IBV. *FEBS Open Bio* 5:445-453, 2015.
 - 40) Pretorius JM, Huismans H, Theron J Establishment of an entirely plasmid-based reverse genetics system for Bluetongue virus. *Virology* 486:71-77, 2015.
 - 41) Conradie AM, Stassen L, Huismans H, Potgieter CA, Theron J Establishment of different plasmid only-based reverse genetics systems for the recovery of African horse sickness virus. *Virology* 499:144-155, 2016.
 - 42) 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(13):6753-6757, 2008.
 - 43) 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 U S A* 103(12):4646-4651, 2006.
 - 44) Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):333-339, 1999.
 - 45) 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 U S A* 107(43):18652-18657, 2010.
 - 46) 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(13):6711-6719, 2010.
 - 47) Johne R, Reetz J, Kaufer BB, Trojnar E Generation of an avian-mammalian rotavirus reassortant by using a helper virus-dependent reverse genetics system. *J Virol* 90(3):1439-1443, 2016.
 - 48) Brown CW, Stephenson KB, Hanson S, Kucharczyk M, Duncan R, Bell JC, Lichty BD The p14 FAST protein of reptilian reovirus increases vesicular stomatitis virus neuropathogenesis. *J Virol* 83(2):552-561, 2009.
 - 49) Ensinger MJ, Martin SA, Paoletti E, Moss B Modification of the 5'-terminus of mRNA by soluble guanylyl and methyl transferases from vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7):2525-2529, 1975.
 - 50) Niles EG, Lee-Chen GJ, Shuman S, Moss B, Broyles SS Vaccinia virus gene D12L encodes the small subunit of the viral mRNA capping enzyme. *Virology* 172(2):513-522, 1989.
 - 51) Kanai Y, Komoto S, Kawagishi T, Nouda R, Nagasawa N, Onishi M, Matsuura Y, Taniguchi K, Kobayashi T Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(9):2349-2354, 2017.
 - 52) Zhao B, Shu C, Gao X, Sankaran B, Du F, Shelton CL, Herr AB, Ji JY, Li P Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(24):E3403-3412, 2016.
 - 53) Arnold MM, Patton JT Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virol* 85(5):1970-1979, 2011.
 - 54) Lutz LM, Pace CR, Arnold MM Rotavirus NSP1 associates with components of the cullin RING ligase family of E3 ubiquitin ligases. *J Virol* 90(13):6036-6048, 2016.
 - 55) Ding S, Mooney N, Li B, Kelly MR, Feng N, Loktev AV, Sen A, Patton JT, Jackson PK, Greenberg HB Comparative Proteomics Reveals Strain-Specific beta-TrCP Degradation via Rotavirus NSP1 Hijacking a Host Cullin-3-Rbx1 Complex. *PLoS Pathog* 12(10):e1005929, 2016.
 - 56) Hua J, Chen X, Patton JT Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific

- RNA binding. *J Virol* 68(6):3990-4000, 1994.
- 57) Mitchell DB, Both GW Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53. *Virology* 174(2):618-621, 1990.
 - 58) Davis KA, Morelli M, Patton JT Rotavirus NSP1 requires casein kinase II-mediated phosphorylation for hijacking of cullin-RING ligases. *MBio* 8(4) 2017.
 - 59) van Gennip RG, van de Water SG, Potgieter CA, van Rijn PA Structural protein VP2 of African horse sickness virus is not essential for virus replication in vitro. *J Virol* 91(4) 2017.
 - 60) Demidenko AA, Blattman JN, Blattman NN, Greenberg PD, Nibert ML Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetravirus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(20):E1867-1876, 2013.
 - 61) Sun C, Gardner CL, Watson AM, Ryman KD, Klimstra WB Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. *J Virol* 88(4):2035-2046, 2014.
 - 62) Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 23(1):102-107, 2005.
 - 63) Taniguchi K, Kojima K, 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 153-155. *J Virol* 70(6):4125-4130, 1996.
 - 64) Patton JT, Taraporewala Z, Chen D, Chizhikov V, Jones M, Elhelu A, Collins M, Kearney K, Wagner M, Hoshino Y, Gouvea V Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *J Virol* 75(5):2076-2086, 2001.
 - 65) Conner ME, Gilger MA, Estes MK, Graham DY Serologic and mucosal immune response to rotavirus infection in the rabbit model. *J Virol* 65(5):2562-2571, 1991.
 - 66) Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Paviaruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354(1):11-22, 2006.
 - 67) Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Gouveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 354(1):23-33, 2006.
 - 68) Curns AT, Steiner CA, Barrett M, Hunter K, Wilson E, Parashar UD Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states. *J Infect Dis* 201(11):1617-1624, 2010.
 - 69) Mujuru HA, Yen C, Nathoo KJ, Gonah NA, Ticklay I, Mukaratirwa A, Berejena C, Tapfumane O, Chindedza K, Rupfutse M, Weldegebriel G, Mwenda JM, Burnett E, Tate JE, Parashar UD, Manangazira P Reduction in Diarrhea- and Rotavirus-related Healthcare Visits Among Children <5 Years of Age After National Rotavirus Vaccine Introduction in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J* 36(10):995-999, 2017.
 - 70) Hemming M, Rasanen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr* 172(6):739-746, 2013.
 - 71) Sanchez-Uribe E, Esparza-Aguilar M, Parashar UD, Richardson V Sustained reduction of childhood diarrhea-related mortality and hospitalizations in Mexico after rotavirus vaccine universalization. *Clin Infect Dis* 62 Suppl 2:S133-139, 2016.
 - 72) Ward RL, Bernstein DI Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis* 48(2):222-228, 2009.
 - 73) Matthijssens J, Joelsson DB, Warakomski DJ, Zhou T, Mathis PK, van Maanen MH, Ranheim TS, Ciarlet M Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Virology* 403(2):111-127, 2010.

A plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses

Yuta KANAI and Takeshi KOBAYASHI

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan.

E-mail address: tkobayashi@biken.osaka-u.ac.jp (Takeshi Kobayashi)

Rotavirus (RV), a non-enveloped icosahedral virus containing eleven gene segments of double-stranded RNA, is the leading cause of severe, acute diarrhea among infants and young children worldwide. Safe and effective rotavirus vaccines have been available since 2006, and have markedly reduced the number of deaths by severe gastroenteritis. However, rotaviruses are still responsible for approximately 200,000 deaths annually worldwide. Reverse genetics systems for the manipulation of viral genomes are a powerful approach for studying viral replication and pathogenesis, and for developing vaccines and viral vectors. The understanding of the molecular mechanisms underlying RV pathogenesis, or development of next generation vaccines, has been hampered by the lack of a complete reverse genetics system. Recently, we developed a novel reverse genetics system which enabled recovery of recombinant RVs entirely from cloned cDNAs. This new strategy requires co-expression of a small transmembrane protein that accelerates cell-to-cell fusion and vaccinia virus capping enzyme. In this review, the strategies and history of the development of reverse genetics systems for the family *Reoviridae* are described.

