

トピックス

2. レオウイルス科のリバースジェネティクス系

金井 祐太, 納田 遼太郎, 小林 剛

大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野

レオウイルス科のウイルスは9～12分節に分かれた二本鎖RNAをゲノムとして有しており、乳幼児のウイルス性下痢症の原因ウイルスとして重要なロタウイルスをはじめ、哺乳類、鳥類、両生類、魚類、爬虫類、昆虫、植物、菌類等、広範な宿主に感染する多様なウイルス種が含まれる。レオウイルス科において組換えウイルスの人工合成技術であるリバースジェネティクス系の確立は、そのゲノム構造の複雑性から他のウイルス科に比べ遅れていた。しかし、哺乳類オルソレオウイルスの完全なリバースジェネティクス系が2007年に確立されると、それに次いでブルータングウイルス、ロタウイルス等、公衆衛生上重要なウイルスのリバースジェネティクス系が確立された。最近ではレオウイルス科で最多の12分節ゲノムを持つコルチウイルス属のリバースジェネティクス系についても確立されたことでレオウイルス科の研究において新たな展開が期待される。本稿ではレオウイルス科のリバースジェネティクス系の原理とその応用について概説する。

1. レオウイルス科の概要

レオウイルス科ウイルスはエンベロープを持たない正二十面体構造の粒子内部に9～12分節の二本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) ゲノムを含有している。オルソレオウイルス属に含まれる哺乳類オルソレオウイルス (哺乳類レオウイルス) は1950年代に分離され、呼吸器や消化器に感染するものの病気との関連性が不明のウイルス「Respiratory Enteric Orphan virus」の頭文字をとりレオウイルス (Reovirus) と命名された。レオウイルス科にはヒトに疾患をもたらすウイルスとして、乳幼児に重篤な下痢症状をもたらすロタウイルス、マダニによって媒介されるコロラドダニ熱ウイルスなどが知られている。獣医学や農学領域で重要なウイルスとして、反芻動物に感染するブルータングウイルスや致死性感染を引き起こすアフリカ馬疫ウイルス、家禽に関節炎等をもたらすトリレオウ

イルス、魚類に致死的な症状を引き起こすアクアレオウイルス、イネ科の植物の生育に悪影響を与えるイネ萎縮ウイルスやイネ黒条萎縮ウイルスなどが知られており、レオウイルス科は幅広い宿主域を示し、産業上脅威となるウイルスが多く含まれている。近年、レオウイルス科の研究は遺伝子操作技術であるリバースジェネティクス系が哺乳類レオウイルスやロタウイルス等で確立されたことで、急速に分子生物学的な理解が進んでいる。

2. 哺乳類レオウイルスの粒子構造および複製サイクル

哺乳類レオウイルスは、レオウイルス科のモデルウイルスとして古くから研究されており、ウイルス粒子やゲノム構造ならびにウイルス複製サイクルに関する研究が精力的に進められている。哺乳類レオウイルスがコードする構造タンパク質 ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$) は外殻と内殻の2層構造からなる非エンベロープ性の正二十面体のウイルス粒子を形成する (図1)。ウイルス粒子の12個の頂点の基部にはRNAキャッピング酵素である $\lambda 2$ が位置し、そこからファイバー状の $\sigma 1$ がウイルス粒子外に突出している。ウイルス粒子の内にはRNA依存性RNAポリメラーゼ $\lambda 3$ と、そのコファクター $\mu 2$ が内殻内に位置する $\lambda 2$ の基部に局在し、粒子内には10分節のdsRNAゲノム (L1, L2, L3, M1, M2, M3, S1, S2, S3, S4) が含まれる。感染の際にはウイルス粒子表面の $\sigma 1$ が細胞表面の感染受容体であるjunctional adhesion molecule A (JAM-

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

ウイルス免疫分野

TEL: 06-6879-8309

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

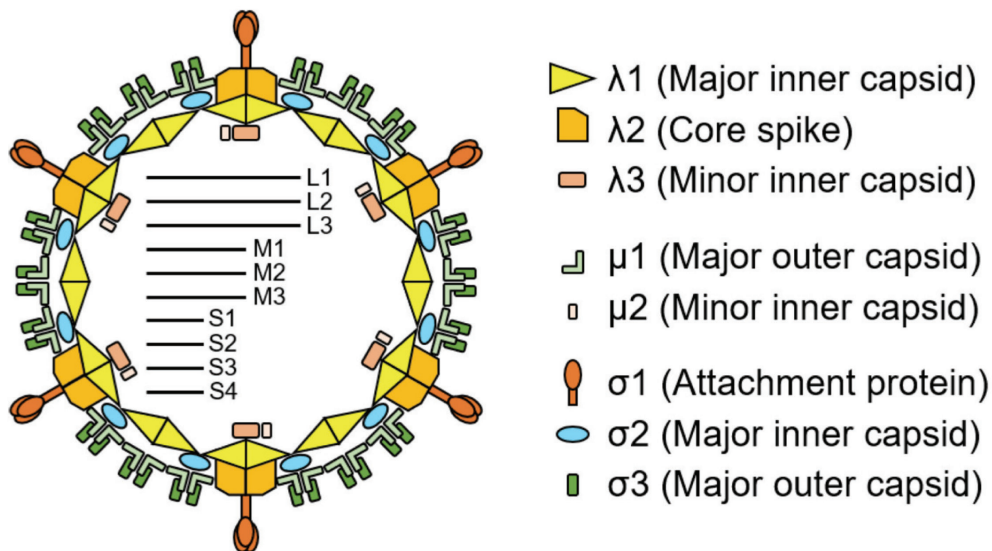


図1. 哺乳類レオウイルスの粒子構造

A), シアル酸等と結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入する¹⁾。エンドソーム内で低 pH や cathepsin の作用により外殻を形成するウイルスタンパク質が除去され、内殻からなるコア粒子が細胞質中に放出される²⁾。コア粒子では外殻の除去により活性化した RNA ポリメラーゼ複合体の作用により、dsRNA のマイナス鎖を鋳型としてキャップが付加されたプラス鎖の一本鎖 RNA の合成が開始され、細胞質中に放出される。これらの RNA は mRNA として機能し、ウイルスタンパク質の翻訳が開始される。この時に非構造タンパク質である μ NS および σ NS はウイルス複製の場である viral factory (viroplasm と呼ばれる) を形成し、構造タンパク質およびウイルス由来の一本鎖プラス鎖 RNA が集合し、新規ウイルス粒子が形成される (図2)。

哺乳類レオウイルスと並んで研究が進んでいるロタウイルスも同様に非エンベロープ性正二十面体のウイルス粒子を形成する。ロタウイルスは6種類の構造タンパク質が3層構造の粒子を形成し、5種類の主な非構造タンパク質がウイルス複製をサポートする。またウイルス粒子外層は VP4 がスパイク状突起を形成し、細胞表面の糖鎖を受容体とするなど、哺乳類レオウイルスと異なる点も多い。しかしながら、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、細胞質に放出された内殻粒子においてプラス鎖の一本鎖 RNA が合成され、ウイルスタンパク質の翻訳が開始されるなど、基本的な複製サイクルは共通している。

哺乳類レオウイルスの10分節 dsRNA ゲノムは、それぞれ 5' および 3' 末端に非翻訳領域を持ち、その間に翻訳領域が含まれる。基本的に各分節がそれぞれ一つの遺伝子をコードするが、S1 遺伝子分節のみ読み枠の異なる2種類のタンパク質 ($\sigma 1$, $\sigma 1s$) がコードされる。また全ての

分節遺伝子において 5' 末端の4塩基 (5'-GCUA) および 3' 末端の5塩基 (UCAUC-3') は完全に保存されており、ウイルスゲノムの複製に寄与していると考えられている。また、各遺伝子分節の 5' および 3' 末端から、非翻訳領域および翻訳領域の一部を含む100~200塩基前後の配列には、遺伝子分節固有のパッケージングシグナルが含まれていることが、遺伝子組換えウイルスの作製結果から予想されている³⁾。以上のような基本的な遺伝子構造 (ウイルス種固有の両末端塩基の保存配列、非翻訳領域に挟まれた翻訳領域等) はレオウイルス科において共通であると考えられる。末端配列やパッケージングシグナルはウイルス複製過程に必須であることから、正確な末端配列を保持したウイルスゲノム由来相補的 DNA (cDNA) のプラスミドへのクローニングと、それを鋳型としたウイルスゲノム RNA の正確な転写はリバーシジェネティクス系の構築に重要である。

3. レオウイルス科におけるリバーシジェネティクス系の確立

ウイルスのリバーシジェネティクス系は、ウイルスゲノム由来 DNA もしくは RNA を培養細胞に導入し、人工的に組換えウイルスを合成する技術である。単離したウイルスゲノム由来 cDNA は PCR mutagenesis 等の一般的な分子生物学の手法により変異を導入することが出来るため、任意の遺伝子変異を持つ組換えウイルスを作製できる。リバーシジェネティクス系は様々な RNA ウイルス種において確立されているが、人工合成の方法は各ウイルス種の複製サイクルやゲノム構造に依存する。動物 RNA ウイルスの中では、一本鎖プラス鎖 RNA ゲノムを持つポリオウイルスのリバーシジェネティクス系が1981年に開発された

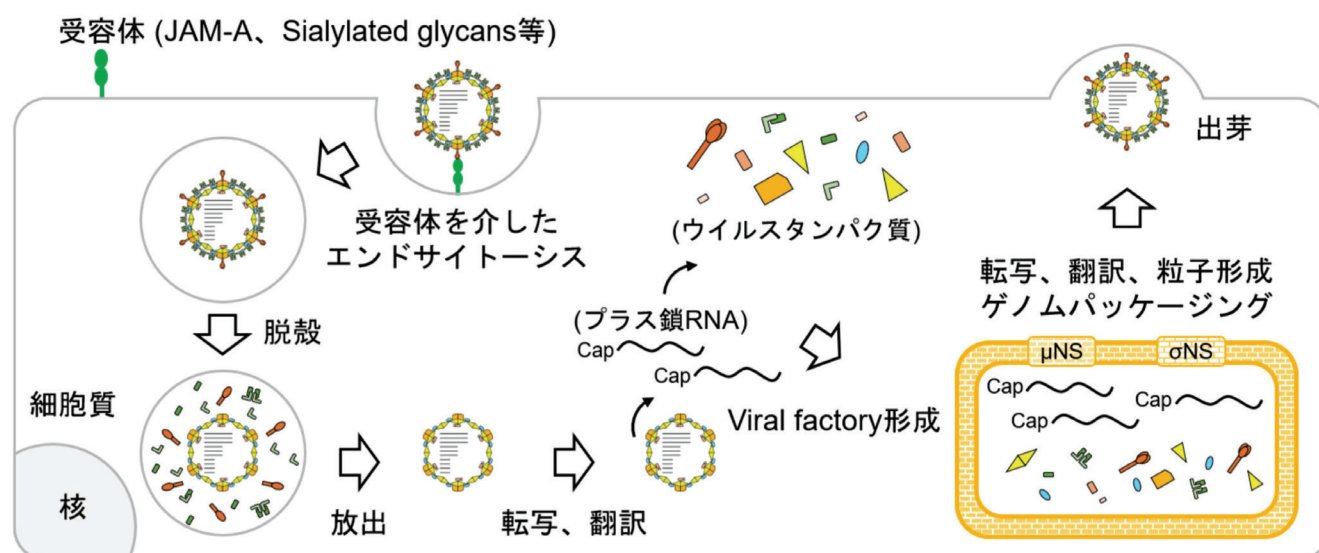


図2. 哺乳類レオウイルスの複製サイクル

が⁴⁾、9～12分節のdsRNAゲノムを持つレオウイルス科においては他のRNAウイルス種に比べ遅れており、レオウイルス科初となる完全なリバースジェネティクス系が哺乳類レオウイルスを用いて確立されたのは2007年である⁵⁾。先述したように哺乳類レオウイルスは細胞内に侵入後、ウイルス粒子に含まれるRNA依存性RNAポリメラーゼの機能によりキャップ構造を持つプラス鎖の一本鎖RNAを合成し、このウイルスRNAがウイルスタンパク質の翻訳や新規ウイルスのゲノムとして利用される。レオウイルス科のリバースジェネティクス系では、この感染ステップを模倣し、全分節ゲノム由来の一本鎖プラス鎖RNAを細胞内に産生させることで、組換えウイルスを作製する。

レオウイルス科のリバースジェネティクス系の開発の黎明期には、ヘルパーウイルスの感染に加え、変異を導入した特定の遺伝子分節由来のRNAを感染細胞内に発現させることで、ウイルスゲノムに外来遺伝子を取り込ませる部分的な遺伝子組換え技術が哺乳類レオウイルスおよびロタウイルスで報告されている^{6,7)}。その後、哺乳類レオウイルスの各分節遺伝子由来のcDNAをコードするプラスミドを全て同時に培養細胞にトランスフェクションすることで組換えウイルスを得る完全なリバースジェネティクス系が確立され⁵⁾、レオウイルス科のリバースジェネティクス系の主流な方法として様々なレオウイルス科ウイルスに適用されている。

リバースジェネティクス系に使用するレスキュープラスミドがコードしているウイルスゲノム由来cDNA配列の上流にはT7プロモーター配列を配置し、下流にはD型肝炎ウイルス(hepatitis delta virus: HDV)由来の自己切断型リボザイム配列が配置されている。T7プロモーターからの転写は3'末端のTATAの直後のG(グアニン)か

ら効率よく開始される。哺乳類レオウイルスやロタウイルスの5'末端は共通してGから始まるため、余計な配列を付加することなく発現ベクターの構築が可能である。ウイルスゲノムの正確な両末端配列の合成はウイルス複製に極めて重要であることから、転写開始点を厳密に制御できるT7プロモーターはレオウイルス科のみならず、様々なウイルスのリバースジェネティクス系に利用されている。哺乳類レオウイルスゲノムcDNAをコードしたレスキュープラスミドをT7RNAポリメラーゼを発現するワクシニアウイルス感染細胞あるいはT7RNAポリメラーゼ安定発現細胞に導入することで、T7プロモーター下流のウイルスゲノムの5'末端から転写が起これ、3'末端に位置するHDVリボザイム配列により転写されたウイルスRNAの末端が正確な位置で切断され、ウイルス感染時にウイルス粒子より生成されるプラス鎖の一本鎖RNAと同等のRNAが産生される(図3)。また哺乳類レオウイルスの感染時には構造タンパク質であるλ2タンパク質が5'キャップ構造を付加し、効率的なウイルスタンパク質の翻訳をサポートしていることが知られている。T7プロモーターを利用したリバースジェネティクス系では、T7RNAポリメラーゼ安定発現細胞内でウイルスRNAの合成は成立するが、転写されたRNAはキャップ構造をほとんど持っていないと予想される。そこで人工的にキャップ構造を付加する目的で、レオウイルス科のリバースジェネティクス系ではワクシニアウイルスやアフリカ豚コレラウイルス由来のRNAキャッピング酵素を同時に発現させることで、ウイルスの作製効率が向上することが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

レオウイルス科でこれまでにリバースジェネティクス系が確立されているブルータンクウイルス(10分節)、ネルソンベイルソレオウイルス(10分節)、ロタウイルス(11

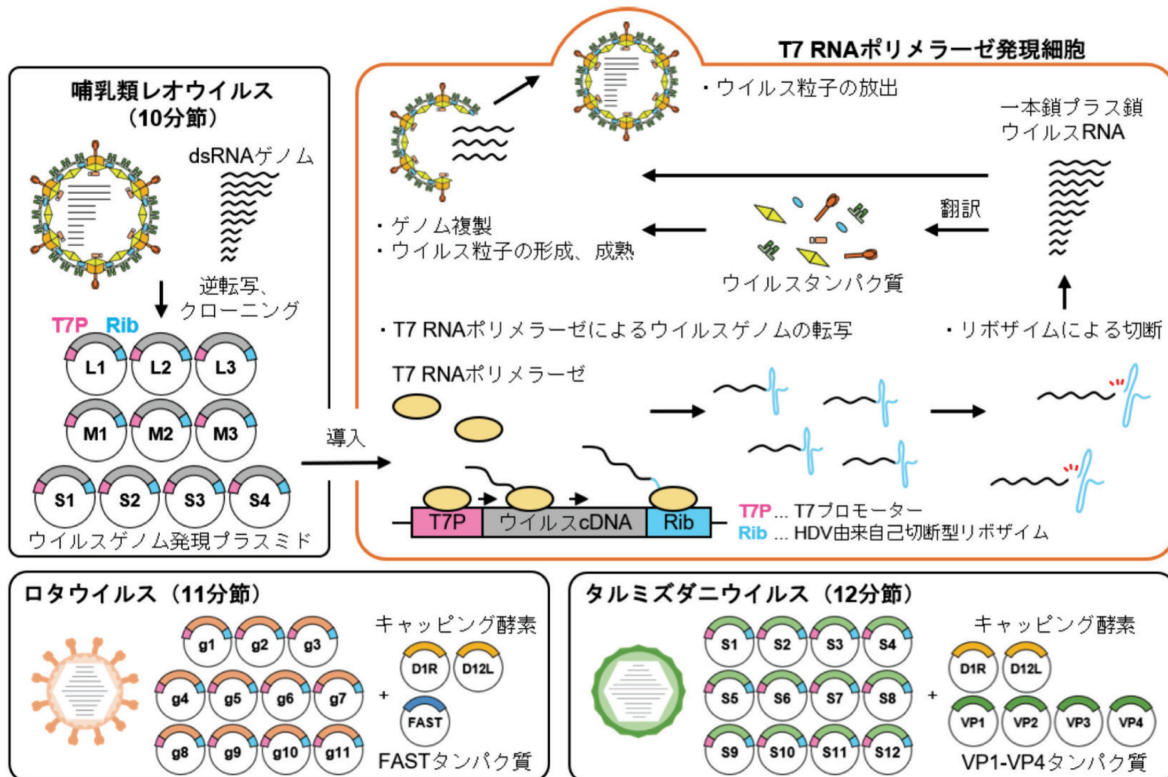


図3. 哺乳類レオウイルス (10 分節), ロタウイルス (11 分節), タルミズダニウイルス (12 分節) のリバーシジェネティクス系

分節), タルミズダニウイルス (12 分節) 等は遺伝子分節数が異なるものの, 分節間で保存された末端配列等, 哺乳類レオウイルスと同様のゲノム構造を持ち類似した複製サイクルを経ることから, 哺乳類レオウイルスに準じたりバーシジェネティクス系が開発されている^{9, 11-16)}. 特筆すべきはレオウイルス科で最多の12分節 dsRNA ゲノムを持つコルチウイルス属 (タルミズダニウイルス) のリバーシジェネティクス系が2021年に報告されたことである. リバーシジェネティクス系の確立は遺伝子分節数が多くなるにつれ困難になることが知られていたが, 12分節のゲノムを有するウイルスの人工合成が可能になったことで, 今後はゲノム分節数を問わないレオウイルス科ウイルスのリバーシジェネティクス系の確立が期待される.

4. 遺伝子組換え哺乳類レオウイルスによる腫瘍溶解性ウイルスベクターの開発

哺乳類レオウイルスは1970年代にRNA研究などの基礎的研究に用いられてきたものの, ヒトにはほとんど病原性を示さないため, 医学的な重要性は低いとみなされていた. しかし, 1998年に腫瘍細胞に対して選択的に複製し細胞溶解を誘導することが報告され, 現在までレオウイルスを用いたがん治療法への応用研究が進められている¹⁷⁾. 腫瘍溶解活性が発見された当初はRas遺伝子の変異に由

来するがん細胞において, 抗ウイルス分子として古くから知られる dsRNA 依存性プロテインキナーゼ (protein kinase R: PKR) の活性が低下していることがレオウイルスの抗腫瘍活性の主な分子機構であると考えられていた¹⁸⁾. しかし, その後の研究により Ras 遺伝子変異を伴わないがん細胞に対しても腫瘍溶解活性を示す例が報告されており, がん細胞種ごとに異なる分子機構を介した複合的な要因により腫瘍溶解活性を発揮していると考えられている¹⁹⁾. レオウイルス以外にも多くのウイルスが腫瘍溶解活性を示すことが知られており, 抗腫瘍ウイルス製剤として開発が進んでいるが, レオウイルスは低病原性であるため, 比較的高力価のウイルスを一度に投与できることが利点とされる. 一方で, ヘルペスウイルスやワクシニアウイルス等の先行する腫瘍溶解性ウイルスでは, 様々な遺伝子改変により, 病原性の低下や抗腫瘍活性の改良が行われているのに対し²⁰⁾, レオウイルスにおいては野生型ウイルスのみを用いたがん治療の臨床試験が行われてきた²¹⁾. 近年, 哺乳類レオウイルスの遺伝子改変技術の改良が進み, 外來遺伝子を発現する遺伝子組換えレオウイルスの作製や, 腫瘍溶解活性が高いレオウイルス株の遺伝子操作系の開発が行われることで, より有用な腫瘍溶解性レオウイルスの作出が期待されている.

野生型の哺乳類レオウイルス感染では, ウイルス粒子表

面の $\sigma 1$ タンパク質(図1)と、細胞表面に発現するJAM-Aが結合することで感染が成立するが¹⁾、JAM-Aの発現が低下しているがん細胞では野生型レオウイルス感染に抵抗性となることが知られている。我々はJAM-Aの発現が低下したがん細胞を標的とするため、細胞表面に発現するインテグリンに親和性を示すRGDペプチド配列を $\sigma 1$ タンパク質に挿入した組換えレオウイルスの作製に成功している²²⁾。腫瘍溶解性ウイルスとして開発が先行しているヘルペスウイルスやワクシニアウイルスでは、がん免疫を促進するIL-12や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)等のサイトカイン遺伝子を発現する遺伝子組換えウイルスが開発され、がん治療に対する効果が認められている。我々は外来遺伝子を発現するレオウイルスベクターを開発し、NanoLuc Luciferase (NLuc)を発現する組換えレオウイルス(rMRV-NLuc)を作製した。ヒトがん細胞を皮下に移植したマウスにrMRV-NLucを尾静脈より投与し、生体イメージング観察を行ったところ、がん細胞に局限したNLucのシグナルが観察され、レオウイルスががん細胞に選択的に感染していることを確認した²³⁾。オランダの研究グループはGM-CSFを発現する遺伝子組換えレオウイルスを開発し、培養細胞において機能的なGM-CSFの発現が確認されている²⁴⁾。これらの報告は外来遺伝子を発現する腫瘍溶解性レオウイルスの開発研究を進めるうえで有用な知見である。

5. ロタウイルスのリバースジェネティクス系とワクチン開発

ロタウイルスは乳幼児の急性胃腸炎の主な原因ウイルスであり、途上国ではロタウイルス感染により多くの乳幼児が命を落としている。また獣医学領域においてもウシやブタなど幅広い宿主に対して、時に重篤な下痢症を引き起こすことから、公衆衛生上極めて重要性が高いウイルスである。哺乳類レオウイルスの完全なリバースジェネティクス系が2007年に確立されたことから、ロタウイルスのリバースジェネティクス系も速やかに確立されるかと思われた。しかし実際に実用的な系が報告されたのは10年後の2017年であった。我々はロタウイルスの11分節のウイルスゲノムを発現する11種類のプラスミドに加えて、ネルソンベイオルソレオウイルスのFASTタンパク質を増殖促進因子として、さらにワクシニアウイルス由来のRNAキャッピング酵素を同時に細胞内に導入することで、遺伝子組換えロタウイルスの人工合成に成功した(図3)⁹⁾。開発当初は組換えロタウイルスの作製効率は低かったものの、その後非構造タンパク質であるNSP2およびNSP5タンパク質の過剰発現^{25, 26)}や、アフリカ豚コレラウイルス由来のRNAキャッピング酵素の使用⁸⁾、インターフェロン経路を抑制した細胞株の使用¹⁰⁾などの改良法が国内外の研究グループによって報告され、組換えウイルスの作製

効率は格段に向上している。

ロタウイルスのリバースジェネティクス系は基礎研究だけでなく、ワクチン開発への応用も期待されている。現在主に2種類のロタウイルス弱毒生ワクチンが日本を含む世界で広く使用されている。Rotarix (GlaxoSmithKline)はG1P[8]型のヒトロタウイルスを培養細胞で感染継代することで得られた弱毒生ワクチンである。もう一方のRotaTeq (Merck)はウシロタウイルスとヒトロタウイルスの混合感染によって得られたリアソータントウイルスであり、ヒトロタウイルス由来のVP7 (G1, G2, G3, G4)もしくはVP4 (P1A[8])を持つ5種のリアソータントウイルスのカクテルである。RotarixとRotaTeqは2006年にヨーロッパと米国でそれぞれ認可され、その後世界各国で使用が開始され、2022年現在、世界110か国以上で使用されている。ワクチン使用以前は、ロタウイルスによる乳幼児の死亡者数は年間50万人程度報告されていたが、ワクチンの効果によりロタウイルスによる死亡者数は128,000人程度にまで減少している。一方で、低所得国でのワクチン効果の低下やロタウイルス遺伝子型間での効果に差があることなどから、さらなるワクチンの改良も求められている。実際に、後発のワクチンとして2018年にインドで開発された2種類の弱毒生ワクチンはWHOのprequalificationを取得している。

これまでのワクチン開発では、培養細胞での継代などによりウイルスの弱毒化が行われていたが、時間と手間がかかり、遺伝子変異と弱毒化の関連が不明であるなど問題も多かった。リバースジェネティクス系では任意の遺伝子変異を導入することが出来るため、抗原性や病原性を制御したワクチン株を迅速に作製できると期待されている。我々や米国のグループは培養細胞で増殖能の高いサルロタウイルスSA11株を基に様々な遺伝子型のヒトロタウイルス由来VP4もしくはVP7をもつリアソータントウイルスを作製し、任意の抗原性を示す組換えロタウイルスの作製に成功している^{27, 28)}。しかしながら、VP4やVP7のリアソータントウイルスでは増殖能が顕著に低下することが報告されている。ワクチン株の増殖能はワクチンの生産コストに直結することから、さらなる遺伝子改変により抗原性を維持しながら高い増殖能を示す組換えロタウイルスの作製方法が求められている。

6. 12分節dsRNAゲノムを有する節足動物媒介性コルチウイルス属のリバースジェネティクス系

コルチウイルス属は12分節のdsRNAゲノムを有する。コルチウイルス属に含まれるコロラドダニ熱ウイルスは、北米大陸のマダニやげっ歯類が保有しており、マダニの吸血によりヒトに感染する。感染患者は二相性の発熱、頭痛、筋肉痛、食欲不振を呈し、重篤な場合は白血球減少、髄膜炎、脳炎を発症することもある。病原性が強いことから、

レオウイルス科では唯一のBSL3に指定されている。他のコルチウイルス属のウイルスとして、国外ではEyachウイルス（ヨーロッパ）やKundalウイルス（インド）、Tai forestウイルス（コートジボワール）などが報告されており、国内ではタルミズダニウイルスがキチマダニから分離されている²⁹⁾。

前述のように10分節、11分節のゲノムを有するレオウイルス科ウイルスのリバースジェネティクス系は確立されているが、この科で最多となる12分節dsRNAゲノムを持つウイルスにおいては、この技術の開発は遅れていた。我々は国内のタヌキから分離されたコルチウイルス属タルミズダニウイルスを用いてリバースジェネティクス系の開発を試みた。哺乳類レオウイルスの系を基にタルミズダニウイルスの12分節ゲノム由来cDNAをそれぞれコードする12種類のレスキュープラスミドを作製し、T7 RNAポリメラーゼ発現細胞に導入することで世界初となる12分節dsRNAゲノムを持つウイルスの人工合成に成功した¹²⁾。当初、この系は他のレオウイルス科ウイルスの系と比較して、組換えウイルスの作出効率の低さが問題であったが、複製に関与すると考えられる4種類のタルミズダニウイルスタンパク質（VP1, VP2, VP3, VP4）およびRNAキャッピング酵素を過剰発現させることで組換えウイルスの作製効率を向上させることに成功した（図3）。

タルミズダニウイルスを含むコルチウイルス属の増殖機構の多くは不明であり、各ウイルスタンパク質の機能も理解が進んでいない。我々はタルミズダニウイルスのsegment 12にコードされるVP12にFLAGタグを付加した組換えウイルスを作製し、解析を行った。その結果、VP12は糖タンパク質であり、39番目のアスパラギンにN-結合型糖鎖修飾を受けていることが明らかになった。さらに糖鎖修飾を受けない変異体ウイルスを作製したところ、*in vitro*での複製効率には影響しないことが判明した。VP12の糖鎖修飾は特定の組織や宿主での増殖において特別な機能があるのではないかと予想されるが、その意義は不明である。タルミズダニウイルスのヒトに対する病原性については明らかになっていないが、リバースジェネティクス系が確立されたことで、今後、タルミズダニウイルスを含むコルチウイルス属の増殖機構や病原性解析が進展すると期待される。

7. おわりに

2007年に哺乳類レオウイルスのリバースジェネティクス系が確立されて以降、ブルータンゲウイルス、ネルソンベリオソレオウイルス、ロタウイルス等、医学や獣医学領域で重要なレオウイルス科ウイルスのリバースジェネティクス系が相次いで確立され、分子生物学的研究が急速に進んでいる。レオウイルス科は他のウイルスには見られないユニークなゲノム構造（9～12分節のdsRNAゲノム）

をもつことから、研究が進むことでウイルス学分野のみならず、RNA構造生物学を含む様々な分野の発展にも寄与すると期待される。

謝辞

ロタウイルスおよびタルミズダニウイルスのリバースジェネティクス系の開発研究は国立感染症研究所、藤田医科大学および山口大学との共同研究により遂行されました。最後に、執筆の機会を与えてくださいました野田 岳志先生に厚く御礼申し上げます。

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) Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104(3):441-451, 2001.
- 2) Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* 277(27):24609-24617, 2002.
- 3) Roner MR, Steele BG. Localizing the reovirus packaging signals using an engineered m1 and s2 ssRNA. *Virology* 358(1):89-97, 2007.
- 4) Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214(4523):916-919, 1981.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Eaton HE, Kobayashi T, Dermody TS, Johnston RN, Jais PH, Shmulevitz M. African swine fever virus NP868R capping enzyme promotes reovirus rescue during reverse genetics by promoting reovirus protein expression, virion assembly, and RNA incorporation into infectious virions. *J Virol* 91(11):e02416-16, 2017.
- 9) 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.

- 10) Sanchez-Tacuba L, Feng N, Meade NJ, Mellits KH, Jais PH, Yasukawa LL, Resch TK, Jiang B, Lopez S, Ding S, Greenberg HB. An optimized reverse genetics system suitable for efficient recovery of simian, human and murine-like rotaviruses. *J Virol* 94(18):e01294-20, 2020.
- 11) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima 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.
- 12) Nouda R, Minami S, Kanai Y, Kawagishi T, Nurdin JA, Yamasaki M, Kuwata R, Shimoda H, Maeda K, Kobayashi T. Development of an entirely plasmid-based reverse genetics system for 12-segmented double-stranded RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(42):e210533411, 2021.
- 13) 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.
- 14) Pretorius JM, Huismans H, Theron J. Establishment of an entirely plasmid-based reverse genetics system for Bluetongue virus. *Virology* 486:71-77, 2015.
- 15) Guo Y, Pretorius JM, Xu Q, Wu D, Bu Z, Theron J, Sun E. Development and optimization of a DNA-based reverse genetics systems for epizootic hemorrhagic disease virus. *Arch Virol* 165(5):1079-1087, 2020.
- 16) Wu Q, Ding M, Li C, Liu G, Chen Z. Construction and characterization of an infectious molecular clone of novel duck reovirus. *J Gen Virol* 99(4):449-456, 2018.
- 17) Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282(5392):1332-1334, 1998.
- 18) Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17(12):3351-3362, 1998.
- 19) Song L, Ohnuma T, Gelman IH, Holland JF. Reovirus infection of cancer cells is not due to activated Ras pathway. *Cancer Gene Therapy* 16(4):382-382, 2009.
- 20) Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30(7):658-670, 2012.
- 21) Noonan AM, Farren MR, Geyer SM, Huang Y, Tahiri S, Ahn D, Mikhail S, Ciombor KK, Pant S, Aparo S, Sexton J, Marshall JL, Mace TA, Wu CS, El-Rayes B, Timmers CD, Zwiebel J, Lesinski GB, Villalona-Cale-ro MA, Bekaii-Saab TS. Randomized phase 2 trial of the oncolytic virus pelareorep (Reolysin) in upfront treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Mol Ther* 24(6):1150-1158, 2016.
- 22) Kawagishi T, Kanai Y, Nouda R, Fukui I, Nurdin JA, Matsuura Y, Kobayashi T. Generation of Genetically RGD signal-Modified Oncolytic Reovirus That Enhances JAM-A-Independent Infection of Tumor Cells. *J Virol* 94(23):e01703-20, 2020.
- 23) Kanai Y, Kawagishi T, Matsuura Y, Kobayashi T. In vivo live imaging of oncolytic mammalian orthoreovirus expressing nanoLuc luciferase in tumor xenograft mice. *J Virol* 93(14):e00401-19, 2019.
- 24) Kemp V, van den Wollenberg DJM, Camps MGM, van Hall T, Kinderman P, Pronk-van Montfort N, Hoebe RC. Arming oncolytic reovirus with GM-CSF gene to enhance immunity. *Cancer Gene Ther* 26:268-281, 2019.
- 25) Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Onishi M, Pannacha P, Nurdin JA, Nomura K, Matsuura Y, Kobayashi T. Development of stable rotavirus reporter expression systems. *J Virol* 93(4):e01774-18, 2019.
- 26) Komoto S, Fukuda S, Ide T, Ito N, Sugiyama M, Yoshikawa T, Murata T, Taniguchi K. Generation of recombinant rotaviruses expressing fluorescent proteins by using an optimized reverse genetics system. *J Virol* 92(13): e00588-18, 2018.
- 27) Kanai Y, Onishi M, Kawagishi T, Pannacha P, Nurdin JA, Nouda R, Yamasaki M, Lusiany T, Khamrin P, Okitsu S, Hayakawa S, Ebina H, Ushijima H, Kobayashi T. Reverse Genetics Approach for Developing Rotavirus Vaccine Candidates Carrying VP4 and VP7 Genes Cloned from Clinical Isolates of Human Rotavirus. *J Virol* 95(2):e01374-20, 2020.
- 28) Diller JR, Carter MH, Kanai Y, Sanchez SV, Kobayashi T, Ogden KM. Monoreassortant rotaviruses of multiple G types are differentially neutralized by sera from infants vaccinated with ROTARIX® and otaTeq®. *J Infect Dis* 224(10):1720-1729, 2021.
- 29) Fujita R, Ejiri H, Lim CK, Noda S, Yamauchi T, Watanabe M, Kobayashi D, Takayama-Ito M, Murota K, Posadas-Herrera G, Minami S, Kuwata R, Yamaguchi Y, Horiya M, Katayama Y, Shimoda H, Saijo M, Maeda K, Mizutani T, Isawa H, Sawabe K. Isolation and characterization of Tarumizu tick virus: A new coltivirus from Haemaphysalis flava ticks in Japan. *Virus Res* 242:131-140, 2017.

