ロタウイルスの分子生物学

中込とよ子

秋田大学医学部微生物学講座

(受付: 昭和62年10月9日)

はじめに

ロタウイルスは、内外2層の capsid からなる virion 内に11分節の2本鎖 RNA をもつウイルスで、レオウイルス科の一員である(図1, 表1)。ロタウイルスは検索が試みられたほとんどすべての哺乳類および鳥類から分離されており、急性胃腸炎の小児から分離されたものは、ヒトロタウイルス、下痢症の仔ウシから分離されたものはウシロタウイルスと呼ばれるが、ヒトと動物の間で共通の serotype もあり³⁰⁾、また実験的には分離された種の barrier をこえて感染することも知られている^{41, 68, 72)}。また最近では本来動物由来のロタウイルスがヒトに感染したと考えられるような例も見出されている^{37, 42, 43)}。このようにロタウイルスは多数の動物種から分離されるために、インフルエンザウイルスと同様なウイルス株の命名法が提案されている⁵¹⁾が、あまり用いられていないようである。

ロタウイルスの臨床的な重要性が強く認識されるに従い、ロタウイルスによる下痢症の予防および治療法の研究に力が入れられてきている。このような医療上の要求は、ロタウイルスの基礎的研究をも著しく促進させている。この小論では、ロタウイルスの分子生物学的研究の現状をながめてみることにする。

1) ロタウイルスの超微細構造: 表面は780個の VP 7でおおわれ、60個のスパイク (VP 3) がつきだしている?

Cryo-electron microscopy と画像解析を併用して

ロタウイルス粒子の超微細構造を解析したところ、T (Triangulation number)=13であることをはじめ、ロタウイルス粒子の表面には132個の大きな aqueous channel が存在することがわかった⁵¹⁾。この channel は2重殻粒子の表面では幅5nmで深さが14nmであり、2重殻粒子表面では約12nm、1重殻粒子表面では10nmの間隔をおいて配置されている。フリーズフラクチャー法でもロタウイルス粒子表面には11nmの間隔をおいて直径3nmの穴があいていることが観察されている⁵³⁾。この aqueous channel を通して RNA 転写に必要なスクレオチドなどがとり込まれたり、mRNA を粒子外に放出しているものと想像される。

2重殻粒子の表面は平滑であり、この平滑な表面から遠位端にノブ状の構造物をもつスパイク(幅3.5nm、長さ4.5nm)が60個つき出している。直接的証拠はないが、このスパイクは量的に少ないVP3からなり、virion の表面全体は外層 capsid の主要成分であるVP7からできていると考えられる。このように仮定すると1個の virion には60個のVP3分子が存在することになる。また virion あたりのサブユニットの数は60Tであるという Casper および Klug の説⁷⁾に従えば、1個の virion には780分子のVP7があることになる。

一方、1重殻粒子表面での蛋白塊の分布は局所的であり、厳密に3回対称軸にそって分布していることから1重殻粒子を構成している蛋白が trimer 構造をとって集積していることを強く示唆している。さらにこの蛋白塊は下方にのび、その基部では局所的に2回対称軸に従い、鞍状の形をしている。このような表面構造のために、電顕でみる1重殻粒子は表面がとげだつてザラザラしてみえるのである。形態学的最小単位すなわち capsomer は、合計260個からなりすべての3回対称軸にそって配置されている。VP6は trimer 構造をとることが知られており^{22, 57)}、この capsomer は260個のVP6の trimer からなりたっていると考えられ、virion

〒010 秋田市本道1丁目1の1
Molecular Biology of Rotaviruses
Toyoko Nakagomi
Department of Microbiology
Akita University School of Medicine

表 1. ロタウィルス粒子の種類

	2 重殻粒子 (double-shelled particle)	1 重殻粒子 (single-shelled particle)	空 粒 子 (empty particle)	コア (core)
その他の名称	smooth particle complete particle	rough particle		
直 径	~70nm	~55nm	~70nm	~37nm
沈降係数	520S~530S	380S~400S		280S
塩化セシウム中での 浮上密度(g/cm ³)	1.36	1.38	1.29~1.30	1.44
RNAポリメラーゼ の活性	—	+	—	—
感 染 性	+	—	—	—

文献16, 18および36に基づいて作成。

図 1. ロタウィルス粒子のネガティブステインによる電子顕微鏡像。 a ; 2 重殻構造をもつ完全粒子（ヒトロタウィルス KUN 株）， b ; 外層 capsid を欠く 1 重殻粒子（ウシロタウィルス NCDV 株）， c ; 染色液が内部に浸透していることから遺伝子 RNA を含有していないと考えられる空粒子（ヒトロタウィルス KUN 株）写真下端の bar は 100 nm を示す。

1 個あたりでは780分子の VP 6 が存在することになる。
厚さ約3.5nm の外殻は 2 重殻粒子と 1 重殻粒子にある aqueous channel が重なる位置で、 1 重殻粒子の capsomer の先端に接しながらのっている。

2) ロタウィルスの構成蛋白

電子顕微鏡下でロタウィルスを観察すると 2 重殻粒子、 1 重殻粒子、 空粒子および core がみられる（表 1）。ロタウィルス粒子（SA 11 株）を構成する構造蛋白および各々の RNA 遺伝子が code する遺伝子産物と翻訳後修飾の過程を表 2， 3 に示した。 11 分節からなる RNA 遺伝子の code する蛋白の解明は、 次の 2 つの方法により決められた^{13, 26, 33)}。 (a) 遺伝学的方法： 2 種類の遺伝子型の異なるロタウィルスを同時に感染させ、 その子孫ウィルスの中から遺伝的組換え体を取り出しこれらの遺伝子型と表現型を比較する方法。 (b) 生化学的方法： ウィルス粒子から 2 本鎖 RNA を抽出し変性させた後または virion 中にある RNA 転写酵素を使って 2 本鎖 RNA から mRNA を作成した後に、 *in vitro* の翻訳系を使って翻訳を行いその産物を解析する方法。 さらに組換え体の表現型や *in vitro* 翻訳産物の解析にはモノクローナル抗体が役立った²⁷⁾。

ロタウィルスの感染性には外層 capsid の構成蛋白である VP 3（88K）と VP 7（38K）が関与しており、 これらのいずれに向けられた抗体でもウィルスを中和することが出来る^{30, 44)}。 VP 3 は赤血球凝集（HA）活性をもつが、 ウィルスの細胞への吸着に関与する蛋白は VP 7 であると考えられている⁵⁶⁾。 また VP 3 を code する gene 4 については下痢をおこしている患者から分離された株と不顕性感染の患者から分離された株とで遺伝子上に違いがみられることからウィルスの virulence に関与していると考えられている^{19, 23)}。 ロタウィルスは VP 3 が蛋白分解酵素により VP 5（60K）と VP 8（28K）に開裂することにより感染性を獲得するが^{9, 24)} VP 3 の蛋白分解酵素による開裂のされやすさがウィルスの virulence の違いに関係しているのかも知れな

表 2. ロタウィルス粒子を構成する蛋白 (SA11株)

トリプシンなしで 増殖させた粒子	トリプシン存在下 で増殖させた粒子	ポリペプチド の分子量
VP 1 (内層)	VP 1 (内層)	125K
VP 2 (内層)	VP 2 (内層)	94K
VP 3 (外層)	VP 3 (外層)	88K
	VP 4*	84K
	VP 5*(外層)	60K
VP 6 (内層)	VP 6 (内層)	41K
VP 7 (外層)	VP 7 (外層)	38K
	VP 8*(外層)	28K
VP 9 (外層)	VP 9 (外層)	27K

文献16に基づいて作成。() 内にそれぞれの蛋白が内層, 外層いずれの capsid に存在するか示した。* 印を付した蛋白は蛋白分解酵素によるペプチドの開裂産物であることを示す。

表 3. ロタウィルス (SA11株) の遺伝子支配

RNA分節	一次翻訳産物の分子量	翻訳後修飾	修飾産物の分子量	ウィルス蛋白の局在と機能
1	125K(VP 1)	なし	なし	内層 capsid の約 1 %
2	94K(VP 2)	開裂	88K(VP3*) 84K(VP4*)	内層 capsid の約20% RNA結合蛋白
3	同定されていない			
4	88K(VP 3)	開裂	60K(VP5*) 28K(VP8*)	外層 capsid の1成分 (スパイク), 赤血球凝集素 ウィルス中和に関与
5	53K(NS53)	なし	なし	
6	41K(VP 6)	なし	なし	内層 capsid の約80% groupおよびsubgroup抗原
7	34K(NS34)	なし	なし	
8	35K(NS35)	なし	なし	
9	38K(VP 7)	糖付加および トリミング	38K(VP7)	外層 capsid の主成分で ウィルス中和に関与
10	20K(NS29)	糖付加および トリミング	29K(NS29)	
11	26K(VP 9)	あり,詳細不明	27K(VP9)	外層 capsid の1成分か?

文献16および36に基づいて作成。* 印は蛋白分解酵素による開裂産物であることを示す。

い²³⁾。

VP 2 (94K) と VP 6 (41K) は内層 capsid を構成する主要成分で,それぞれ内層 capsid 蛋白の20%と80%を占める。内層 capsid にはこの他に量的にはわずか(〜1%)であるが分子量がロタウィルス蛋白では最大の VP 1 (125K) も存在する。VP 6 は virion 内でもまた感染細胞中でも trimer 構造をとっており^{22, 57)} さらにこれがジスルフィド結合でつながれて電子顕微鏡下に観察される hexameric unit となると考えられる⁵⁷⁾。1 重殻粒子を CaCl₂で処理すると VP 6 がはずれて

RNA 転写活性をもたない core となる。この core に再び VP 6 を加えると RNA 転写活性は回復し, 形態的にもポリペプチド構成の上からも 1 重殻粒子が再構成される⁵⁸⁾。しかし VP 6 自体には RNA polymerase 活性は証明されていないので, VP 6 が直接 RNA 転写に関与しているのか,あるいは VP 6 を失うことによって RNA 転写に関与する蛋白の立体構造が変化し RNA 転写活性がなくなるのか不明である。

VP 2 は core を構成する主成分であり, RNA 結合活性をもっている⁶⁾。RNA 結合活性のあるロタウィルス

蛋白は、この他非構造蛋白の1つであるNS 31 (31K) がある。VP 2が1本鎖RNAにより親和性が強いのに 対し、NS 31は1本鎖と2本鎖RNAに同等の親和性があることから、VP 2はvirionのassemblyあるいはRNA複製のときに必要な蛋白であり、またNS 31はRNA polymeraseの1成分であるかあるいはRNA合成の際に必要なとされる accessory protein であると 考えられる⁶⁾。

VP 9 (26K) は外層 capsid の1成分であるとされるが、粒子中に見出されないことも多くまたその機能も 不明である¹⁶⁾。

3) ロタウイルス遺伝子の塩基配列には、各分節間に 共通の特徴がある。

11分節のロタウイルス遺伝子RNAのうち7遺伝子 のcDNAがクローニングされその塩基配列が決定され ている(表4)^{1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 17, 20, 21, 32, 35, 36, 69, 70)}。ロ タウイルス遺伝子に共通する特徴は、①5'と3'末端 に共通の塩基配列(+鎖の遺伝子RNAでは(5')GGC A(U)UUA(U)AAA(U)⋯A(U)UGUGACC(3')) が存在すること、②介在配列のない単一のopen read- ing frameが各遺伝子分節に存在すること、および③ polyadenylationに必要な共通の塩基配列が存在しない ことである。

4) ロタウイルスの細胞内増殖過程：成熟には enve- lopeが必要か？

ロタウイルスは吸着にひきつづき2-3時間の暗黒期 eclipseを経た後、2-4時間後に遺伝子RNAの合成 が、また3-5時間後にウイルス蛋白合成が始まり、1 回の増殖サイクルの終了する感染12時間後にむけて子孫 ウイルスの産生は最大になる。全増殖過程は細胞質内で おこるが、ここでのウイルスの形態形成について超薄切 片での電子顕微鏡観察を中心に記していく。

(a) 吸着と侵入：nucleoidがファージの場合と同じ ように細胞質内に注入される？

ロタウイルス粒子(表3)のうち細胞に吸着するのは 2重殻粒子のみである。この2重殻粒子の細胞質内への 侵入のしかたには①endocytosisによるとするものと ②直接侵入によるとする2つの異なる考え方がある。

SA 11を感染させた細胞を観察すると感染後30分でラ イソゾーム中に直径50-55nmのsubviral particleが あらわれてくる。これらの粒子は感染直後には認められ ないのでこれは吸着した2重殻粒子がendocytosisの 機序で細胞質内にとり込まれ、ライソゾームに隔離さ れ、ライソゾームの酵素によって脱殻しsubviral par- ticleが出現したものと解釈される⁴⁷⁾。

これに対し直接侵入の機序によるとする考え方は次の ようなものである^{65, 66)}。ヒトロタウイルスはトリプシ

表4. 塩基配列からみたロタウィルス遺伝子および翻訳産物の特徴

特 徴	88KVP3	41KVP6	35KNS	38KVP7	34KNS	20KNS	26KNS	
	RV-5	SA11	SA11	SA11	UK	SA-11	Wa	UK
	gene 4 (34)	gene 6 (21)	gene 8 (3)	gene 9 (4)	gene 9 (67)	gene10 (5)	gene11 (32)	gene11 (68)
5'および3'末端の共通配列								
(5')GGC _U ^A UU _U ^A AA _U ^A	+	+	+	+	+	+	+	+
_U ^A UGUGACC(3')	+	+	+	+	+	+	+	+
総ヌクレオチド数	2,359	1,357	1,059	1,062	1,076	751	663	667
5'末端の非コードヌクレオチド	9	23	46	48	34	41	38	21
3'末端の非コードヌクレオチド	25	140	62	36	112	185	34	52
最初のAUGはいわゆる "強い"開始コドンか？	yes	yes	yes	no ^{a)}	no ^{b)}	yes	no	yes
Open reading frameの長さ	2,325	1,194	951	978	930	525	591	594
アミノ酸残基の数	775	397	317	326	310	175	197	198
ポリA付加のシグナル配列	—	—	—	—	—	—	—	—

文献36をもとに一部改変して作成。a)最初のAUG(49-51)は共通配列に従う"強い"開始コドンではないが、第2のATGコドン(136-138)は"強い"開始コドンである。b)最初のAUG(26-28)は"強い"コドンではないが、第2のAUG(35-37)は"強い"開始コドンである。

図 2. ロタウイルス粒子 (KUN 株) は細胞表面上に吸着した後、電子密度の高い物質 (おそらくウイルスの RNA) を細胞質内に放出し (a, b), しだいに綿球様の形態をとっていく (c, d). 写真下端の bar は100nm を示す (文献64).

ンで活性化しないと全く感染性を示さないことを利用して細胞に吸着した2重殻粒子の運命をみると、トリプシンにより活性化された感染性のあるウイルス粒子からは感染後5分以内にウイルスの nucleoid が細胞内に侵入して行くのがみられ、細胞内に入った nucleoid には capsid がないように見える (図2). これはロタウイルスの capsid は細胞膜の部分で融解し nucleoid のみが細胞質内に入るという直接侵入の形式を示している. ウイルスと細胞膜が接触した部分に穴が形成され、この穴を通してウイルス核酸がちょうどバクテリオファージの場合と同様な形で注入され細胞質内で電子密度の高い綿球様構造物となってあらわれると考えられる.

一方トリプシン処理をされていない感染性のないウイルス粒子は吸着20分後から phagocytosis によって細胞質内にとり込まれライソゾームに隔離される像が観察される. さらに感染2-4時間後になると phagocytic vesicle に存在するウイルス粒子は増加し、6-24時間後には core の形態をとっており外層と内層の capsid は分解されている. 感染後48時間まで経過を追っても新しいウイルス粒子形成がおこった証拠はみられなかった. このことからライソゾームを経由する吸着、侵入の過程の endocytosis の機序ではロタウイルスの増殖はおこらないと結論された. トリプシン処理したウイルスの場合でもライソゾーム中にとり込まれたウイルス粒子

がみられるが、これらのウイルスも増殖サイクルに入らないと考えられる。

(b) ウイルス蛋白および RNA の合成は細胞質内の viroplasm でおこる。

ウイルス粒子全体に対する抗血清の他に、VP 2, VP 6 および VP 7 の各成分に特異的に反応する抗血清を用いて免疫電顕法を行うと、抗 VP 7 血清では粗面小胞体 (RER) 膜がよく染まるのに対し、抗 VP 2 血清と抗 VP 6 血清では細胞質全体に存在するリボソームが染まる。このことからロタウイルス蛋白は遊離および膜結合型のリボソームで形成され、viroplasm と称される大きな顆粒状の細胞質内封入体へ集積されてくるものと考えられる。新たに合成されたウイルス RNA も viroplasm へ集積されてくると推定される。暗黒期がすぎるとより電子密度の低い物質でとりかこまれた電子密度の高い nucleoid (25-35nm) が viroplasm 周辺に形成される⁴⁷⁾。

(c) アセンブリーと成熟: envelope をかぶった粒子は 2 重殻粒子とはならない?

viroplasm の周辺に形成された core は、RER で成熟し、RER の内腔に向って budding する際に VP 7 糖蛋白を獲得して 2 重殻粒子となる。ロタウイルスの成熟機構に関しては次の 2 つの互いに関連する問題が未解決である。第 1 は外層 capsid がどのようにして成熟したウイルス粒子 (2 重殻粒子) にとり込まれていくかという問題で、換言すると 1 重殻粒子は本当に 2 重殻粒子の precursor なのかということである。第 2 の問題は、RER への budding の過程でロタウイルス粒子が envelope を一時的に獲得するという極めて特異な現象がおこるがウイルスの成熟に本当に envelope が必要なのか、換言すると 2 重殻粒子は envelope をかぶったウイルス粒子が RER の内腔で envelope を失うことによりできるのかというものである。

1 重殻粒子の存在は、① 2 重殻粒子の直前の precursor である。② 2 重殻粒子の外層 capsid のこわれたものである、および③それ自体が成熟ウイルスにはならない最終産物である、という 3 つの考え方で説明できる。①と②の考え方は自然に受け入れられそうであるが、ロタウイルスを Ca^{2+} 欠乏状態で増殖させた実験からは③の可能性が最も高いと思われる。ロタウイルスの成熟には、感染後 6-12 時間にわたるウイルスの対数増殖期に CaCl_2 を必要とする。 Ca^{2+} 欠乏状態では成熟した 2 重殻粒子は全く産生されず全て 1 重殻粒子となる。もし 1 重殻粒子が 2 重殻粒子の直前の precursor であり成熟の最終過程が Ca^{2+} 欠乏状態によりブロックされた

とすれば、細胞質内には 1 重殻粒子が蓄積してくるはずである。しかし Ca^{2+} 欠乏状態の 1 重殻粒子数は Ca^{2+} 存在下でのそれと変わらず 1 重殻粒子が 2 重殻粒子の precursor ではないことを示唆している^{59, 60)}。

glycosylation の阻害剤である tunicamycin 存在下でロタウイルスを増殖させると、 Ca^{2+} 欠乏の場合と同様に 1 重殻粒子のみが産生される。Envelope をもつ粒子は tunicamycin がない状態でもみられるが、tunicamycin 存在下では RER の内腔のほとんど全てのウイルス粒子が envelope をかぶっている⁵⁴⁾。そして envelope をもったウイルス粒子は cytolysis の際に膨化し膜が破れ、中から 1 重殻粒子が出現してくることが観察されている^{54, 63)}。すなわち envelope をもつウイルスは 1 重殻粒子が RER の膜をかぶることによって形成され、2 重殻粒子の成熟過程には envelope をもつ時期はないと考えられる^{63, 64)}。この考えによれば、tunicamycin 処理により RER の内腔のウイルス粒子はほとんど全て 1 重殻粒子となることをよく説明できる。

すなわちロタウイルスの成熟機構は core が 2 重殻粒子の直前の precursor となり、RER 上でアセンブルした粒子は RER 膜を通過する際に VP 7 を獲得し、RER の内腔に完成された 2 重殻粒子として放出される。また 1 重殻粒子は RER の膜をかぶって envelope を一時的に獲得した後、この envelope を RER 内腔で失って形成される最終産物であると考えられる。

5) VP 7 は膜蛋白の細胞内輸送を研究するよいモデルである。

リボソームで合成された蛋白がどのようにして翻訳後修飾をうけながら選別され、目的とする場所に輸送されるのかという問題は細胞生物学上の興味あるテーマである。N-グリコシド結合をもつ糖蛋白の生合成は、グルコース、マンノース、N-アセチルガラクトサミンからなるコアがドリコールピロリン酸の carrier で運ばれ、合成途上にあるポリペプチド鎖のアスパラギン残基に付加されることによっておこる。糖鎖はゴルジ装置で最終的な複合型糖鎖として修飾される前にトリミングを受け、RER では高マンノース型の糖鎖として存在する。また ER 膜を透過する蛋白は、アミノ末端にシグナルペプチドをもち、膜透過後にシグナルペプチダーゼにより切断されると分泌蛋白となり (図 3 A)、切断されずにシグナルペプチドの部分で膜につなぎとめられると C 末端側が内腔につき出した形の膜蛋白となる (図 3 C)。一方多くの膜蛋白では、ER 膜透過後シグナルペプチドが切断され、カルボキシル末端の疎水性ドメインによって膜につなぎとめられる (図 3 B)。すでにみてきたようにロタウイルスの成熟は RER でおこなわれるが、RER

図3 膜結合型リボソームで合成された蛋白がER膜を透過して分泌蛋白(A), NH_2 末端を内腔につきだした形の膜蛋白(B), および COOH 末端を内腔につきだした形の膜蛋白(C) となる様子を模式的に表わした。

図4. SA 11 株 VP 7 の NH_2 末端部分の構造および種々の deletion および point mutation により作成した変異蛋白の模式図。▼印を付したM (メチオニン) から翻訳が開始されることが考えられる。WT (野生型) および Δ51-61 では真の翻訳開始部位は不明である。■印は▼印を付したMから翻訳が開始されるように最初のMの直後 (Tyr) に TAC → TA (A/G) の point mutation により翻訳終結コドンを入れたことを示す。---- 線は deletion の部位に相当するアミノ酸列を示し、↑印はシグナルペプチダーゼにより切断をうける可能性が高い場所を示す。

に局在する膜糖蛋白の例は多くないため、ロタウイルス VP 7 は ER 膜糖蛋白の選別局在化を研究するユニークなプローブでもある。

VP 7 遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定されると、5' 末端に87ヌクレオチドの間隔をおいて2つの翻訳開始コドンにひき続きそれぞれ18残基 (H1) と17残基 (H 2) の疎水性アミノ酸をコードする塩基配列があることがわかった。H 1 や H 2 は VP 7 が ER 膜を透過する際のシグナルペプチドとしての役割を果たしていると考えられる。ところが VP 7 のカルボキシ末端には ER 膜へのアンカードメインを思わせる疎水性のアミノ酸配列は存在しない。それではどのようにして VP 7 が ER 膜蛋白となるのか (アンカードメインの同定)、シグナルペプチドは切断されるのかということを明らかにするために、VP 7 遺伝子の5' 末端側に種々の deletion や point mutation を作成し、これらの変異遺伝子の産物を解析した。解析には *in vitro* の再構成系であるウサギ網状赤血球の *in vitro* 蛋白合成系とイヌ脾臓ミクロソームの組合せおよび SV 40 ベクターを使った COS 細胞での形質発現の系が使われたが、その実験の一部を紹介する^{34, 50, 71)} (図 4)。

野生株 (WT) の VP 7 から H 1 ドメインを除去し H 2 ドメインのみをもつ△1-14、H 2 ドメインを除去し H 1 ドメインのみをもち同時に最初の ATG コドンが Kozak の所謂 “強い” 開始コドンになるように変異させた23Z、および H 1 と H 2 の両疎水性ドメインを欠き63残基目のメチオニンから翻訳が開始するようにした27S の遺伝子産物を比較すると、H 1 か H 2 の一方の疎水性ドメインがあれば VP 7 は ER 膜を透過できるが、両方を欠くと細胞質内にとどまった。すなわち H 1 も H 2 もシグナル

ペプチドとして機能することがわかった。そして興味深いことに23Z では VP 7 が ER 膜を透過した後さらにゴルジ装置で糖鎖の修飾をうけ複合型糖鎖となり培地中に分泌された。これは H 2 ドメインの除去により、WT では使われなかったシグナルペプチダーゼによる認識部位が再配置され、この部位で ER 膜へのアンカードメインとなっている H 1 が切断され VP 7 が分泌されるようになった可能性が考えられた。そこで切断部位と思われる H 1 ドメインにつづく Ala-Tyr-Ala ↓ の配列のうち68番目の Ala を Val に変異させた23 ZC について調べてみると、予想通り VP 7 は ER 膜に局在し分泌されなかった。

H 2 ドメインを除いた23Zばかりでなく、H 2 ドメインの後半部とそれにつづく領域を除去 (42S)、あるいは H 2 ドメインを残して H 2 ドメインにつづく領域を除去 (47S) しても VP 7 は分泌蛋白となった。しかし47S より5残基だけうけいにもつ△51-61 の場合 VP 7 は分泌蛋白とはならない。そこで23Z の場合と同様に42S と47S についても68番目の Ala を Val に変異させてみたところ、今度は予想に反して VP 7 は培地中に分泌されてしまった。これらの変異した VP 7 が①疎水性ドメインの切断をうけずに分泌される (?) のか、②既存の知識では予測しえない部位で切断されて分泌蛋白となるのかは不明である。

本来 ER 膜に局在する VP 7 を遺伝子操作により分泌蛋白にすることが可能であることから、同様に遺伝子操作により VP 7 を細胞膜表面上に発現させることも可能なはずである。その場合、VP 7 の免疫原性は著しく増強すると考えられる。われわれは VP 7 遺伝子とその変異体をワクシニアウイルスベクターに組み込み、VP 7 を

表 5. ロタウイルスの serotype と代表的ウイルス株

serotype	ヒトロタウイルス	動物由来のロタウイルス
1	Wa, KU, K8, D	な し
2	DS-1, KUN, S2	な し
3	P, M, MO, YO, Ito, Nemoto	SA11(サル), RRV(サル), CU-1(イヌ) Taka(ネコ), H-2(ウマ)
4	ST3, ST4, Hochi, Hosokawa, VA70	SB-2(ブタ), Gottfried(ブタ) SB-1A(ブタ)
5	な し	OSU(ブタ), H-1(ウマ) SB-1A(ブタ)
6	な し	NCDV(ウシ), UK(ウシ)
7	な し	Ch.2(ニワトリ), Ty.1(シチメンチョウ)
8 *	69M	
9 *	F45, WI61	

*これらの新しいserotype(文献8a,31,40)のヒトロタウイルスをそれぞれserotype 8 および 9 とすべきだという意見が支配的である(池上信子, Estes, M.K., 私信)。

細胞膜表面に発現させることを試みている。

6) VP 7 のウイルス中和に関与する抗原部位は virion 上で形成される 3 次元的立体構造に依存している

ロタウイルスの感染性の中和には HA 蛋白である VP 3 と糖蛋白である VP 7 の 2 つの外層蛋白が関与している。研究の歴史的経過から、VP 7 が最もよく研究されており、少なくとも 17 株のロタウイルスの VP 7 遺伝子の塩基配列が決定されている^{1, 3, 8, 20, 21, 25}。ロタウイルスの serotype は少なくとも 9 つ存在するが (表 5)^{8a, 29, 31, 40}、この serotype 特異性は VP 7 の抗原性に依存している。VP 7 の serotype 特異的抗原部位 (antigenic site) はアミノ酸残基 87-101 からなる領域 B とアミノ酸残基 208-221 からなる領域 E が virion 上で 3 次元的に近接して形成されるいわゆる conformational な抗原部位であり、この抗原部位は中和活性のあるモノクローナル抗体によって決められる複数の抗原エピートープ (antigenic epitope) から成り立っている。

a) VP 7 遺伝子の解析からみた一次構造上の特徴

現在までに塩基配列が決定された 17 株のロタウイルスの一次構造を比較してみると VP 7 にはいくつかの特徴があることがわかる (図 5, 6)。まず立体構造を考える上で重要なシステイン残基についてみると、すべてのロタウイルスで 8 個のシステイン残基が保存されており (アミノ酸残基 82, 135, 165, 191, 196, 207, 244 および 249)、VP 7 が基本的に同じ構造をしていることをうかがわせる²⁵。ただし SA 11 ではこの他にアミノ酸残基 32 もシステインであり合計 9 個のシステイン残基が存在する。

さらにプロリンについてみると、やはり全ての株に共通な 9 個のプロリン残基が存在する。糖鎖がつく可能性のある共通配列 Asn-X-Ser (または Thr) についてみると、アミノ酸残基 69-71 の配列は NCDV 以外のすべての株で保存されている。多くの株には 2~3 ヶ所にこの共通配列があるが、SA 11 では 1 ヶ所だけである。種々のロタウイルス株の一次構造を比べてみると、アミノ酸配列が serotype 間で非常に異なっている A から F の 6 領域²⁰ 以外の部位では、一次構造は非常に良く保存されている。A から F の 6 領域 (A, 39-50; B, 87-101; C, 120-130; D 143-152; E, 208-221; F, 233-242) をみると、serotype が異なるロタウイルス間では連続する 10 アミノ酸残基の中で 3 残基以上のアミノ酸が置換されている²⁰。一方同一 serotype に属するロタウイルス間ではアミノ酸一次構造はよく保存されている。たとえば serotype 1 である Wa, D および Montgomery 株を比較すると、領域 C において Wa 株が他の 2 株と 1 残基異なっている以外は、A から F の全ての領域において配列が一致している²⁵。また同じく serotype 1 の M 37 株では他の serotype 1 のロタウイルスと比較した場合領域 B で 2 ヶ所、D で 1 ヶ所、E で 2 ヶ所アミノ酸配列が異なっているだけで、やはり同一 serotype 内ではこれらの領域の一次構造は非常に良く保存されていた²⁵。一方、ウイルスの中和に関与する抗原部位は virion の外側に露出していると考えられることから、一般に親水性のアミノ酸残基から成り立っていると推定される。従って、serotype 間で一次構造が非常に異なりかつ親水性である領域は serotype に特異的な抗原決定基を含む部位である可能性が高いと考えられる。NCDV 株の

図 5. ロタウイルス NCDV 株 VP 7 の一次構造に基づいて VP 7 蛋白の特徴を示した。A から F の で囲んだ領域は serotype 間でアミノ酸配列が非常に異なる divergent region である。--- 線は親水性アミノ酸からなる領域を示し、■印および▼印は、それぞれ種々のロタウイルス株間で保存されているシステインおよびプロリン残基を示す。g 1 から g 4 までの↓印は各種ロタウイルス株 VP 7 での糖鎖付加の可能性のある位置を示し、このうち g 1 は NCDV 以外のすべてのロタウイルス株に共通して存在するが、g 2 および g 4 はそれぞれ serotype 2 のヒトロタウイルスおよび NCDV に特有の部位である。文献 20 に基づき作成。

VP 7 について調べてみると、領域 B が該当することがわかった²⁰⁾.

b) 合成ペプチドによる抗原部位の検索

VP 7 の一次構造上で親水性のアミノ酸からなる領域のどこの部分がウイルスの中和に関与する抗原部位であるのかを調べる目的で、これらの部位 (図 5, アミノ酸残基 66-76, 90-103, 174-183, 208-225, 247-259, 275-295) に相当するペプチドが合成され、ウサギに免疫された²⁸⁾. 得られた抗血清は全てウェスタンブロット法で VP 7 と反応したが、どの抗血清も virion を認識しなかったし、またウイルス中和活性もなかった. このことから VP 7 のウイルス中和に関与する抗原部位は一次構造により直接決定される linear な抗原部位ではなく、むしろ 3 次元的立体構造が重要な conformational なものであると考えられた²⁸⁾.

c) 精製 VP 7 とその断片による解析

Virion から単離した VP 7 を解析したところ、VP 7 は中和活性のあるモノクローナル抗体により認識されるだけでなくウイルスの吸着に関与する蛋白でもあることがわかった⁵⁶⁾. また単離した VP 7 は環状状態になるとこれらのモノクローナル抗体との反応性を失うことから、ジスルフィド結合が VP 7 の機能のために重要である

ことが示された⁵⁶⁾. さらにこれらのモノクローナル抗体を使って、ウイルスの吸着と中和にかかわるドメインが VP 7 上のどこにあるかを調べた. VP 7 を酵素あるいはブロムシアンで分解し、ウェスタンブロット法で調べると、モノクローナル抗体と反応する最小ペプチド断片は分子量約 14,000 (14K) のものであった. この 14K の断片も抗体との反応性を保つためにはジスルフィド結合が必須であった. またこの 14K の断片でマウスを免疫すると、ウイルス中和活性のある抗血清が得られた⁵⁵⁾. 一方、glycosylation の阻害剤である tunicamycin 存在下で増殖させたロタウイルス粒子から精製した VP 7 も中和活性のあるモノクローナル抗体と反応したことから、糖鎖はウイルスの中和や吸着に関して決定的な役割を演じていないようである⁵⁶⁾. このことは糖鎖を全く欠いた SA 11 の変異株が感染力をもっていることを支持する¹⁵⁾. しかし糖鎖は *in vitro* でのウイルスの安定性に関与することが示唆されている^{49, 54)}.

d) 中和活性のあるモノクローナル抗体とモノクローナル抗体に抵抗する抗原変異株を用いての抗原部位の同定

中和活性のあるモノクローナル抗体のパネルを使った competitive binding assay とそれぞれのモノクローナル抗体抵抗性の抗原変異株を用いた解析により、VP

図 6. 異なる serotype のロタウイルスどうして一次構造の変化が大きい divergent region のうち、ウイルス中和に関する抗原部位を形成していると考えられる B と E の 2 領域のアミノ酸配列を 6 つの serotype に属するロタウイルス株に分けて示した. 文献25より引用.

7上で中和に関与する抗原部位をマップすることが試みられた^{38, 61)}。competitive binding assayによる解析では、VP 7上には数個の相互に関連する抗原エпитープから成り立つ大きな中和抗原部位(ドメイン)が存在するという結果が得られた。しかし、competitive binding assayでは多くのnonreciprocalな競合がみられ結果の解釈が難しいこともあった。このようなnonreciprocalな競合の原因として次の2つが考えられる。第1にVP 7を3次的にみると抗原部位に割れ目(cleft)があり、あるモノクローナル抗体がこの割れ目の入口付近に結合すると他の全ての割れ目の中のエピトープに結合するモノクローナル抗体の結合を阻害する可能性である。第2は、あるモノクローナル抗体がVP 7に結合すると蛋白の立体構造に変化をおこし、他のモノクローナル抗体が認識するエピトープの形をかえるいわゆるアロステリック効果である。

モノクローナル抗体に抵抗性の抗原変異株の解析ではこのような問題はなく、VP 7上に機能的にみて2つの相異なる抗原部位が存在することが示された。また別の研究によればVP 7上にウイルス中和に関して2つの抗

原部位があり、1つはウイルスをserotype特異的に強く中和する部位であり、他はやはりserotype特異的ではあるがウイルスを弱くしか中和しない部位である^{38, 61, 62)}。このうちウイルスを強く中和する抗原部位は2つの研究グループで共通しており、抗原変異株の塩基配列の結果とあわせると(5)の(a)に記した領域Bに相当した。

中和活性のあるモノクローナル抗体存在下で増殖する抗原変異株の塩基配列をみると、表6に示す様にいずれの変異株においても野生株と比較してただ1ヶ所にヌクレオチドの置換があり、これがただ1ヶ所のアミノ酸置換をひきおこしている。これらの変化はVP 7の一次構造上の3ヶ所に集積していることが明らかになった。特に興味深いことは、アミノ酸残基211の位置(領域E)にAsp→Asnの変化がおこると、この抗原変異株はポリクローナルな抗血清によっても中和されにくくなった。これは上記のアミノ酸変化のためAsn—Ala—Thrというアミノ酸配列になって新たな糖鎖が付加され、このエピトープが存在する抗原部位全体に抗体が近づきにくくなるためであると考えられた。

表6. SA11 VP 7の抗原変異株にみられるヌクレオチド置換と予想されるアミノ酸置換

抗原変異株	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換	領域
VA10/N3	GAT→AAT	Asp→Asn(211)	E
VRV-3:1	GAT→AAT	Asp→Asn(211)	E
VB8/ X1	AAT→GAT	Asn→Asp (96)	B
VA11/M9	AAG→GAG	Lys→Glu (223)	E
VRV-3:2	ACG→GCG	Thr→Ala (147)	D
VA11/RV-3:1/a	AAG→GAG	Lys→Glu (223)	E
	GAT→AAT	Asp→Asn(211)	E
VA11/RV-3:1/b	AAG→GAG	Lys→Glu (223)	E
	AAC→AGC	Asn→Ser (94)	B

文献15に基づき一部改変して作成。()内の数字は置換の予測されるアミノ酸残基の位置を示す。

表7. SA11 VP 7の抗原変異株作成のために使ったモノクローナル抗体の特徴

モノクローナル抗体	認識する領域 (アミノ酸残基)	competition binding		
		A10/N3	A11/M9	B8/X1
A10/N3	E(211)	+	—	—
A11/M9	E(223)	+	+	+
B8/ X1	B (96)	+	+	+
RV-3:1	E, B(211, 94)	ND	ND	ND
RV-3:2	D(147)	ND	ND	ND

文献11, 38に基づき一部改変して作成。70%以上の競合がみられた場合を+, 10%以下の場合を—で示した。NDは未検査。

表 8. SA11 VP 7 の抗原変異株の中和活性のあるモノクローナル抗体に対する低抗性

ウィルス	抗 体					
	抗SA11	A10/N3 (211)	RV-3:1 (211,94)	B8/X1 (96)	A11/M9 (233)	RV-3:2 (147)
SA11						
VA10/N3	r	R	R	R		
VRV-3:1	r	R	R	R		
VB8/X1			R	R		
VA11/M9					R	
VRV-3:2						R
VA11/RV-3:1/a	r	R	R	R	R	
VA11/RV-3:1/b			R		R	

文献11に基づいて作成。抗体希釈1:500未満でのみウィルスを中和する場合を抵抗性(R), 1:500~1:25,600の間で中和する場合を中等度抵抗性(r), 1:100,000以上の希釈でも中和する場合を感受性(空白のまま)と判定した。()内の数字はそれぞれのモノクローナル抗体が認識するVP7のアミノ酸残基の位置を示す。

表 9. RRV VP 7 の抗原変異株の中和性のあるモノクローナル抗体に対する低抗性

しらべた抗原変異株													
領域	モノクロー ナル抗体	M11	A1	A15	1A9	5D9	M14	5C4	7A12	M2	2G4	M7	GAAD
1	M11	R	R										
1	A1		R	R									
1	A15	R	R	R									
2	1A9			R	R								R
3	5D9					R							R
4	M14						R	R					
4	5C4				R			R					R
5	7A12								R				R
6	M 2									R			
6	2G4										R	R	R
6	M7							R			R	R	

文献39に基づき作成。それぞれのモノクローナル抗体に抵抗する抗原変異株に対する赤血球凝集抑制反応価が野生株(RRV株)に対するその8分の1以下である場合、そのモノクローナル抗体に対して抵抗性(R)であると判定した。M2抗体は赤血球凝集抑制活性が弱いので中和試験を行い抵抗性をしらべた。GAADは2G4, 1A9, 7A12および5D9の4つのモノクローナル抗体に抵抗する抗原変異株である。

一方 RRV 株 (serotype 3) を使った研究³⁹⁾ では領域Bを認識するモノクローナル抗体存在下で増殖させて得た抗原変異株を解析したところ、新たに糖鎖付加位置が形成され (99番目のアミノ酸が Asn に置換), 糖鎖加により VP 7 の分子量が約 4,000 増加している抗原変異株が得られた。しかしこの抗原変異株ではポリクローナルな抗血清に対する抵抗性は有意に増加しなかった。

今までの実験結果を総合すると①領域BあるいはEを認識していると考えられる中和活性のあるモノクローナ

ル抗体はいずれも通常のウェスタンブロット法では検出できない^{9a)} ことから、この領域がジスルフィド結合の破壊を含めて蛋白質の変性に対して非常に感受性が強いこと、②領域Bを認識するモノクローナル抗体 (B8/X1) と領域Eを認識するそれ (A10/N3, A11/M9) とが competitive binding assay で競合する (表 7) ことから、それぞれのモノクローナル抗体の VP 7 上での結合部位が近接していると考えられること、さらに③領域Eを認識するモノクローナル抗体で選択した抗原変

異株が領域Bを認識するモノクローナル抗体に対しても抵抗性である¹¹⁾ことがわかり、領域BとEが多くの中和エピトープからなる単一の抗原部位を形成していることが結論づけられる。

7) VP 3には serotype をこえるウイルスの中和に 関与する抗原部位がある

VP 3上のウイルス中和に関与する抗原部位を決定するために、モノクローナル抗体による中和に抵抗するRRV株の抗原変異株を多数作成し、そのVP 3遺伝子の塩基配列を比較してヌクレオチドの変化している部位を調べた³⁹⁾。この結果、抗原変異株における突然変異はVP 3上の6ヶ所にみられる(表9, 10)ことから、VP 3には少なくとも6ヶ所のウイルス中和に関与する抗原部位が存在すると考えられる。この6ヶ所のうち5ヶ所

は、VP 3の開裂産物のアミノ末端側を構成するVP 8に存在し、株特異的ないしはごく限定されたheterologousな中和のみ関与しているようである。

これに対し開裂産物のカルボキシ末端側のVP 5には、広範囲のserotypeのロタウイルスを中和するモノクローナル抗体が認識する領域が存在する。この部位(領域6)は図7に示した様に非常に疎水性に富んだアミノ酸配列をしている。この領域のアミノ酸配列を検討すると14, 20, 11の疎水性アミノ酸のストレッチがそれぞれ1個の酸性アミノ酸(アスパラギン酸)と塩基性アミノ酸(ヒスチジン)をはさんでつながっており、中でもアミノ酸残基381-401の配列すなわちTGGDYSFALVGO-WPV MTGGがSemliki Forest VirusあるいはVesicular Stomatitis Virusなどのfusion peptideと相同性が高いことがわかった。VP 3に一次構造上か

表10. RRV VP 3の抗原変異株にみられたヌクレオチド置換と予想されるアミノ酸置換

抗原変異株	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換	領域	モノクローナル抗体の中和特異性
M11	A→G (268)	Thr→Ala (87)	1	RRV
A1	C→A (272)	Thr→Lys (88)	1	RRV, NCDV
A15	G→C (274)	Ala→Pro (89)	1	RRV
1A9	G→A (307)	Asp→Asn(100)	2	RRV
5D9	C→T (350)	Ser→Phe(114)	3	RRV
M14	A→G (452)	Gly→Glu(148)	4	RRV, NCDV
5C4	G→A (458)	Gly→Glu(150)	4	RRV
7A12	A→T (572)	Tyr→Phe(188)	5	RRV
M2	C→A (1172)	Ala→Glu(381)	6	RRV, SA11, UK, Wa, Gottfried
2G4	A→C (1187)	Glu→Pro(393)	6	RRV, SA11, OSU, UK,
M7	A→C (1187)	Glu→Pro(393)	6	RRV, SA11, UK
GAAD	G→A (307)	Asp→Asn(100)		
	A→G (413)	Glu→Arg(135)		
	A→G (527)	Lys→Arg(173)		
	A→C (1187)	Glu→Pro(393)		

文献39に基づき作成。GAADは4つのモノクローナル抗体2G4, 1A9, 7A12および5D9で選択した抗原変異株である。()内の数字はヌクレオチドあるいはアミノ酸残基の位置を示す。モノクローナル抗体の中和特異性はRRV, SA11, NCDV, OSU, UK, DS-1, WaおよびGottfriedの各株を使ってしらべた。

図7. VP 3領域6近傍の一次構造。——線は疎水性の強いアミノ酸配列を示し、この部分がVesicular Stomatitis VirusやSemliki Forest Virusのfusion活性のあるpeptideと似ている。また下段の---線を冠した18アミノ酸残基はTaniguchiらが合成ポリペプチドを作成した部分(の1つ)である。

ら推測されるような fusion 活性があるかどうかは、ロタウイルスの感染細胞への侵入や脱殻の機構を研究していく上で大変興味深い。しかし、なぜこのように非常に疎水性の強い領域が中和抗体により認識される部位なのであろうか。たとえば、この領域がトリプシン等の酵素による VP 3 の開裂のあとで virion の外側に露出し fusion peptide として機能するということが考えられる。

一方、KU 株について同様の解析を行ったところ、VP 3 には 3 ヶ所の serotype をこえたウイルス中和に関与する抗原部位があり、その 1 つは RRV 株の領域 6 とオーバーラップすることがわかった⁶⁷⁾。

これらの領域の抗原部位がアミノ酸配列をそのまま反映する linear なものか、立体的な配置を必要とする conformational なものか調べられている。領域 6 に対するモノクローナル抗体は VP 3 を免疫沈降しにくい (Greenberg, H. B. 私信) ことや、KU 株のほぼ領域 6 に相当する (383-400) 合成ペプチドがモノクローナル抗体と反応しなかった⁶⁷⁾ ことより、領域 6 は単純な linear な抗原部位ではなさそうである。一方、KU 株のアミノ酸残基 296-313 に相当する合成ペプチドは、serotype 1 から 4 にいたるヒトロタウイルスを広く中和するモノクローナル抗体 (YO-2C2) と反応することから、linear な抗原部位のようである。

このようなロタウイルスの heterotypic immunity における VP 3 の役割の解明は、今後のワクチン開発のための新しい標的である。このような観点からわれわれも serotype の枠をこえて多くのロタウイルスを中和する抗原部位のペプチドを大腸菌で発現させようと試みている。

おわりに

ロタウイルス研究の最大の興味の一つは、ウイルス中和に関与する蛋白を分子レベルで理解することであり、この小論でもそこに焦点をあてて解説した。

一方、小論では、紙数の関係で言及できなかったが、ロタウイルスの腸管における局所免疫および細胞免疫についての研究も重要な課題である。ロタウイルスの heterotypic immunity には細胞障害性 T 細胞 (CTL) も関与しているという最近の報告など⁴⁵⁾、この方面でも新たな展開がなされている。この点が解明できれば、広範囲の serotype に有効なワクチンを開発することが可能になるはずである。

急性胃腸炎は小児科臨床最多疾患の一つであり、しかもロタウイルスは原因の 30-40% を占める病原体である。ロタウイルスの分子生物学的研究にもとづいたワクチンが開発され、乳児嘔吐下痢症の克服される日が近い

ことを期待して終りにする。

追記

本稿脱稿後入手した情報 (Stirzaker, S. C., Whitfield, P. L., Christie, D. L., Bellamy, A. R., and Both, G. W. Processing of rotavirus glycoprotein VP 7: implication for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. 投稿中) によれば、VP 7 の開裂はアミノ末端から 50 番目のアラニン残基のカルボキシ末端でおこり、成熟した VP 7 のアミノ末端はピログルタミン酸の形をとりブロックされているということである。従って VP 7 がプロセッシングを受ける過程で 2 つの疎水性ドメイン H 1 と H 2 の両方がとり除かれることになり、VP 7 を ER に局在させる何か別のメカニズムが予想される。

謝辞

この総説のためにロタウイルス粒子の電子顕微鏡写真を作成して下さった佐々木仁倫技官 (秋田大学医学部実験実習機器センター) に感謝します。

論文のプレプリントをお送り下さりその引用を許可して下さった Mary K. Estes 博士 (Baylor College of Medicine), Paul A. Offit 博士 (Childrens Hospital University of Pennsylvania), Kim Green 博士, Jorge Flores 博士 (National Institutes of Health) および Gerald W. Both 博士 (CSIRO Division of Molecular Biology) に深謝します。

最後に本稿執筆の機会を与えて下さった須藤恒久教授 (秋田大学医学部微生物学講座) に感謝します。

文 献

- 1) Arias, C. F., Lopez, S., Bell, J. R., and Strauss, J. H. (1984) Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50, 657-661.
- 2) Both, G. W., Bellamy, A. R., Street, J. E., and Siegman, L. J. (1982) A general strategy for cloning double stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8. *Nucleic Acids Res.* 10, 7075-7088.
- 3) Both, G. W., Mattick, J. S., and Bellamy, A. R. (1983) The serotype-specific glycoprotein of simian-11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3091-3095.
- 4) Both, G. W., Siegman, L. J., Bellamy, A. R., and Atkinson, P. H. (1983) Coding assignment and nucleotide sequence of simian rotavirus

- SA 11 gene segment 10 : location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J. Virol.*, 48, 335-339.
- 5) Both, G. W., Bellamy, A. R., and Siegman, L. J. (1984) Nucleotide sequence of the ds RNA genomic segment of simian 11 rotavirus. *Nucleic Acids Res.*, 12, 1621-1626.
- 6) Boyle, J. F., and Holmes, K. V. (1986) RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J. Virol.* 58, 561-568.
- 7) Casper, D. L. D., and Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 1-24.
- 8) Charpilienne, A. F., Borrás, F., D'Auriol, L., Galibert, F., and Cohen, J. (1986) Sequence of the gene encoding the outer glycoprotein of the bovine rotavirus (RF strain) and comparison with homologous genes from four bovine, simian and human rotaviruses. *Ann. Inst. Pasteur Virol.*, 137, 71-77.
- 8a) Clark, H. F., Hoshino, Y., and Offit, P. A. (1986) Presumptive new serotype of human rotavirus. Abstracts, 86th Annual Meeting of the American Society for microbiology.
- 9) Clark, S. M., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B. B., and Spendlove, R. S. (1981) Trypsin enhancement of rotavirus infectivity : mechanism of enhancement. *J. Virol.*, 39, 816-822.
- 9a) Coulson, B. S., Fowler, K. J., Bishop, R. F., and Cotton, R. (1985) Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates. *J. Virol.*, 54, 14-20.
- 10) Dyall-Smith, M. L., and Holmes, I. H. (1984) Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. *Nucl. Acids Res.*, 12, 3973-3982.
- 11) Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregear, G. W., and Holmes, I. H. (1986) Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 3465-3468.
- 12) Elleman, T. C., Hoyne, P. A., Dyall-Smith, M. L., Holmes, I. H., and Azad, A. A. (1983) Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. *Nucl. Acid. Res.*, 11, 4689-4701.
- 13) Erickson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., and Estes, M. K. (1982) Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA 11 polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 42, 825-839.
- 14) Erickson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., Hanssen, H. H., and Estes, M. K. (1983) Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA 11. *Virology*, 127, 320-322.
- 15) Estes, M. K., Graham, D. Y., Raming, R. F., and Erickson, B. L. (1982) Heterogeneity of the structural glycoprotein (VP7) of simian rotavirus SA 11. *Virology*, 122, 8-14.
- 16) Estes, M. K., Palmer, E. L., and Objeski, J. F. (1983) Rotaviruses : a review. *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 105-123-184.
- 17) Estes, M. K., Mason, B. B., Crawford, S., and Cohen, J. (1984) Cloning and nucleotide sequence of the simian rotavirus gene 6 that codes for the major inner capsid protein. *Nucleic Acids Res.* 12, 1875-1877.
- 18) Estes, M. K., and Tanaka, T. (1987) Nucleic acid probes for rotavirus detection and characterization. in press
- 19) Flores, J., Midthun, K., Hoshino, Y., Green, K., Gorziglia, M., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1986) Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *J. Virol.* 60, 972-979.
- 20) Glass, R. I., Keith, J., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Askaa, J., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M., and Flores, J. (1985) Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP 7 gene of Nebraska Calf Diarrhea Virus rotavirus : comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotavirus. *Virology*, 141, 292-298.
- 21) Gorziglia, M., Aguirre, Y., Hoshino, Y., Esparza, J., Blumentals, I., Askaa, J., Thompson, M., Glass, R. I., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1986) VP 7 serotype-specific glycoprotein of OSU porcine rotavirus : coding assignment and gene sequence. *J. Gen. Virol.*, 67, 2445-2454.
- 22) Gorziglia, M., Larrea, C., Liprandi, F., and Esparza, J. (1985) Biochemical evidence of oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. *J. Gen. Virol.*, 66, 1889-1900.
- 23) Gorziglia, M., Hoshino, Y., Buckler-White, A., Glass, R., Flores, J., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1986) Conservation of amino acid sequence of VP 8 and cleavage region of 84-KDa outer capsid protein among rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7039-7043.
- 24) Graham, D. Y., and Estes, M. K. (1980) Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity : biologic mechanisms. *Virology*, 101, 432-439.
- 25) Green, K. Y., Midthun, K., Gorziglia, M.,

- Hoshino, Y., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M., and Flores, J. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. *Virology*, in press.
- 26) Greenberg, H. B., Flores, J., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., and Jones, R. (1983) Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.*, 64, 313-320.
 - 27) Greenberg, H. B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Flores, J., and Hoshino, Y. (1983) Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.*, 47, 267-275.
 - 28) Gunn, P. R., Sato, F., Powell, K. F. H., Bellamy, A. R., Napier, J. R., Harding, D. R. K., Hancock, W. S., Siegman, L. J., and Both, G. W. (1985) Rotavirus neutralizing protein VP 7 : antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* 54, 791-797.
 - 29) Hoshino, Y., Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Flores, J., and Kapikian, A. Z. (1984) Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.*, 149, 694-702.
 - 30) Hoshino, Y., Sereno, M., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1985) Independent segregation of two antigenic specificities (VP 3 and VP 7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8701-8704.
 - 31) Ikegami, N., Akatani, K., Hosaka, T., and Ushijima, H. (1987) Prevalence of a new serotype of group A human rotavirus in Japan. Abstracts. VII International Congress of Virology p 113.
 - 32) Imai, M., Richardson, M. A., Ikegami, N., Shatkin, A. J., and Furuichi, Y. (1983) Molecular cloning of double-stranded RNA virus genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 373-377.
 - 33) Kalica, A. R., Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Flores, J., Sereno, M. M., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1981) Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotavirus that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*, 112, 385-390.
 - 34) Kabcenell, A. K., and Atkinson, P. A. (1985) Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA 11. *J. Cell Biol.* 101, 1270-1280.
 - 35) Kantharidis, P., Dyall-Smith, M. L., and Holmes, I. H. (1987) Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV-5 and simian SA 11 rotaviruses. *Arch. Virol.* 93, 111-121.
 - 36) Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1985) Rotaviruses. In: B. N. Fields et al. *Virology*, Raven Press, New York.
 - 37) Kitaoka, S., Nakagomi, T., Fukuhara, N., Hoshino, Y., Suzuki, H., Nakagomi, O., Kapikian, A. Z. K., Ebina, T., Konno, T., and Ishida, N. (1987) Serological characteristics of a human rotavirus isolate, AU-1, which has a "long" RNA pattern and subgroup I specificity. *J. Med. Virol.* in press.
 - 38) Lazdins, I., Sonza, S., Dyall-Smith, M. L., Coulson, B., and Holmes, I. H. (1985) Demonstration of immunodominant neutralization site by analysis of antigenic variants of SA 11 rotavirus. *J. Virol.* 56, 317-319.
 - 39) Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M., Vo, P. T., and Greenberg, H. B. (1987) Primary characterization of VP 3 neutralization escape mutants. Abstracts, VIII International Congress of Virology, p. 115.
 - 40) Matsuno, S., Hasegawa, A., Mukoyama, A., and Inouye, S. (1985) A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.*, 54, 623-624.
 - 41) Mebus, C. A., Wyatt, R. G., Sharpee, R. L., Sereno, M. M., Kalica, A. R., Kapikian, A. Z., and Twienhaus, M. J. (1976) Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Infect. Immun.*, 14, 471-474.
 - 42) Nakagomi, O., Nakagomi, T., Oyamada, H., and Suto, T. (1985) Relative frequency of human rotavirus subgroups 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, 17, 29-34.
 - 43) Nakagomi, O., Nakagomi, T., Hoshino, Y., Flores, J., and Kapikian, A. Z. (1987) Genetic analysis of a human rotavirus that belongs to subgroup I but has an RNA pattern typical of subgroup II human rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1159-1164.
 - 44) Offit, P. A., and Blavat, G. (1986) Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virol.* 57, 376-378.
 - 45) Offit, P. A. and Dudzik, K. I. (1987) Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes cross-react with target cells infected with different rotavirus serotypes. *J. Virol.* in press.

- 46) Okada, Y., Richardson, M. A., Ikegami, N., Nomoto, A., and Furuichi, Y. (1984) Nucleotide sequence of human rotavirus genome segment 10. RNA encoding a glycosylated virus protein. *J. Virol.*, 51, 856-859.
- 47) Petrie, B. L., Graham, D. Y., and Estes, M. K. (1981) Identification of rotavirus particle types. *Intervirology*, 16, 20-28.
- 48) Petrie, B. L., Graham, D. Y., Hanssen, H., and Estes, M. K. (1982) Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunochemistry. *J. Gen. Virol.* 63, 457-467.
- 49) Petrie, B. L., Estes, M. K., and Graham, D. Y. (1983) Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J. Virol.*, 46, 270-274.
- 50) Poruchynsky, M. S., Tyndall, C., Both, G. W., Sato, F., Bellamy, A. R., and Atkinson, P. A. (1985) Deletions into an NH-terminal hydrophobic domain result in secretion of rotavirus VP 7, a resident endoplasmic reticulum membrane glycoprotein. *J. Cell Biol.*, 101, 2199-2209.
- 51) Prasad, B. V. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. M., and Chiu, W. (1987) Three dimensional structure of rotavirus. Abstracts, VII International Congress of Virology, p. 113
- 52) Rodger, S. M., and Holmes, I. H. (1979) Comparison of the geneomes of simian, bovine, and human rotavirus by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.*, 30, 839-846.
- 53) Roseto, A., Escaig, J., Delain, E., Cohen, J., Scherrer, R. (1979) Structure of rotaviruses as studied by the freeze-drying technique. *Virology*, 98, 471-475.
- 54) Sabara, M., Babiuk, L. A., Gilchrist, J., and Misra, V. (1982) Effect of tunicamycin on rotavirus assembly and infectivity. *J. Virol.* 43, 1082-1090.
- 55) Sabara, M., Barrington, A., Babiuk, L. (1985) Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. *J. Virol.* 56, 1037-1040.
- 56) Sabara, M., Gilchrist, J. E., Hudson, G. R., and Babiuk, L. A. (1985) Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J. Virol.* 53, 58-66.
- 57) Sabara, M., Ready, K. F. M., Frenchik, P. J., and Babiuk, L. A. (1987) Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotavirus nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. *J. Gen. Virol.* 68, 123-133.
- 58) Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G., and Spencer, E. (1986) Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J. Virol.* 60, 797-802.
- 59) Shahrabadi, M. S., and Lee, P. (1986) Bovine rotavirus mutation is a calcium-dependent process. *Virology*, 152, 298-307.
- 60) Shahrabadi, M. S., Babiuk, L. A., and Lee, P. (1987) Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology*, 158, 103-111.
- 61) Shaw, R. D., Vo, P. T., Offit, P. A., Coulson, B. S., and Greenberg, H. B. (1986) Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology*, 155, 434-451.
- 62) Sonza, S., Breschkin, A. M., and Holmes, I. H. (1984) The major surface glycoprotein of simian rotavirus (SA 11) contains distinct epitopes. *Virology*, 134, 318-327.
- 63) Suzuki, H., Sato, T., Konno, T., Kitaoka, S., Ebina, T., Ishida, N. (1984) Effect of tunicamycin on human rotavirus morphogenesis and infectivity. *Arch. Virol.* 81, 363-369.
- 64) Suzuki, H., Konno, T., Kitaoka, S., Sato, T., Ebina, T., and Ishida, N. (1984) Further observations on the morphogenesis of human rotavirus in MA 104 cells. *Arch. Virol.* 79, 147-159.
- 65) Suzuki, H., Kitaoka, S., Konno, T., Sato, T., and Ishida, N. (1985) Two modes of human rotavirus entry into MA 104 cells. *Arch. Virol.*, 85, 25-34.
- 66) Suzuki, H., Kitaoka, S., Sato, T., Konno, T., Iwasaki, Y., Numazaki, Y., and Ishida, N. (1986) Further investigation on the mode of entry of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* 91, 135-144.
- 67) Taniguchi, K., Gorziglia, M., Morita, Y., Urasawa, T., Urasawa, S., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1987) Localization of cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on human rotavirus VP 3 and VP 7. Abstracts, VII International Congress of Virology, p. 117.
- 68) Vesikari, T., Isolauri, E., d'Hondt, E., Delem, A., Andre, E., and Zissis, G. (1984) Protection of infants against human rotavirus diarrhea by RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine. *Lancet*, i, 977-981.
- 69) Ward, C. W., Elleman, T. C., Azad, A. A., and Dyall-Smith, M. L. (1984) Nucleotide sequence of gene segment 9 encoding a non-structural protein of UK bovine rotavirus. *Virology*, 134, 249-253.
- 70) Ward, C. W., Azad, A. A., and Dyall-Smith, M. L. (1985) Structural homologies between

- RNA gene segments 10 and 11 from UK bovine, simian, SA 11 and human Wa rotaviruses. *Virology*, 144, 328-336.
- 71) Whitfeld, P. L., Tyndall, C., Stirzaker, C., Bellamy, A. R., and Both, G. W. (1987) Location of sequences within rotavirus SA 11 glycoprotein VP 7 which direct it to the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2491-2497.
- 72) Wyatt, R. G., Sly, D. L., London, W. T., Palmer, A. E., Kalica, A. R., vanKirk, D. H., Chanock, R. M., and Kapikian, A. Z. (1976) Induction of diarrhea in colostrum-deprived newborn rhesus monkeys with the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Arch. Virol.*, 50, 17-27.