

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成18(2006)年4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発	1
松浦 善治	
II. 分担研究報告書	
遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発	5
松浦 善治・森石 恆司	
ネイティブ E 型肝炎ウイルス粒子と同じ大きさを有する組換え粒子の作製	8
武田 直和	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別冊	別添

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

主任研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：本研究事業により以下の点を明らかにした。1) バキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンド分子を自在に提示できるシュードタイプウイルスの作製系を構築し、広範な動物細胞に、あるいは狙った細胞だけに外来遺伝子を導入できるベクター系を構築した。重症急性呼吸器症候群ウイルス(SARS-CoV)のレセプターである2型アンギオテンシン転換酵素を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスは、SARS-CoVのスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ、特異的に感染して遺伝子を導入できることが示された。2) バキュロウイルスベクターを用いてヒト肝臓細胞で作製したC型肝炎ウイルス様粒子(HCV-LP)の結合は、これまでに報告されている昆虫細胞で作製したHCV-LPとは異なる細胞親和性を示し、HCVの受容体候補であるヒトCD81への結合には哺乳動物細胞における何らかの翻訳後修飾が必須であることが示唆された。3) バキュロウイルスが病原微生物認識受容体である既存のToll-like receptor非依存的に自然免疫を誘導できることが示唆された。4) 組換えバキュロウイルスで遺伝子型3の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つVLPを作製することができた。

分担研究者

森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授  
武田直和 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そしてRNAウイルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖DNAを遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュ

ロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入できる。2) ウイルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な免疫応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4) 他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウイルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発：ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発を試みる。バキュロウイルス粒子表面へのリガンド分子の取り込み機構を解析し、広範なリガンド分子を複数搭載可能なベクターの可能性を検討する。モデルとして、重症急性呼吸器症候群ウイルス(SARS-CoV)のレセプターである2型アンギオテンシン転換酵素(ACE2)を粒子表面に発現させたACE2シュードタイプウイルスの作製を試みる。

2) ヒト肝臓細胞でのC型肝炎ウイルス(HCV)様粒子(HCV-LP)の作製：HCVを効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCVの感染・複製機構は依然として謎に包まれたままである。HCVの粒子形成の解析は、*in vitro*合成系や酵母などを用いて解析されてきたが、HCVの主要な標的細胞であるヒト肝臓細胞を用いた解析はこれま

で報告されていない。そこで、バキュロウイルスベクターを用いて、ヒト肝臓由来細胞で HCV 様粒子 (HCV-LP) を作製し、その性状を解析した。

3)バキュロウイルスによる宿主応答：これまでに我々が報告してきた、ウイルスゲノムによる Toll-like receptor 9(TLR9)を介した抗ウイルス活性の誘導とは異なり、バキュロウイルスに特異的な TLR 非依存的な IFN の誘導機構が存在することが示唆された。バキュロウイルスによる抗ウイルス因子の誘導機構を IRFやSTAT等の転写因子欠損マウスを用いて解析し、アジュバント活性を兼ね備えた新規ワクチンベクターとしての可能性を検討する。

4)3型 HEV ORF2 の全長、および N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、ORF2 全長を発現する場合は感染細胞から、N 末端を欠失させた ORF2 を発現する場合は培養上清からウイルス様中空粒子 (VLP) を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA 法等で抗原性を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」

(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

### C. 研究結果

1)ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発：バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、SARS-CoV の受容体である ACE2 を粒子表面に発現させた ACE2 シュードタイプウイルスを作製した。このウイルスは、SARS-CoV のスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ感染性を示し、さらに、抗 ACE2 抗体によって特異的に中和された。

2)HCV の構造蛋白質をコードする遺伝子を CAG プロモーター下に組み込んだ組換えバキュロウイルスをヒト肝臓由来の FLC4 細胞に感染させて、密度勾配超遠心法にて HCV-LP を精製した。HCV-LP は CsCl の密度平衡遠心で 1.17 g/ml の密度を示し、抗 E1 および抗 E2 抗体と特異的に反応する 40-50 nm の粒子が免疫電子顕微鏡観察で確認され、粒子中には HCV RNA が検出された。

HCV の受容体候補として報告されているヒト CD81 の HCV-LP の結合への関与を調べるため、HCV-LP を可溶性ヒト CD81 蛋白質と反応後、ヒト CD81 陰性の HepG2 細胞とヒト CD81 陽性の Huh7 細胞に接種したところ、両細胞への結合活性がともに低下した。一方、抗ヒト CD81 抗体は Huh7 細胞への HCV-LP の結合を低下させたが、HepG2 細胞への結合には影響しなかったことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の因子の関与が示唆された。また、抗 E2 抗体で HCV-LP を前処理すると、両細胞への HCV-LP の結合が低下した。

3)バキュロウイルスによる宿主応答：TLR 及びそのシグナルアダプター分子である MyD88 の欠損マウスから種々の免疫細胞を調製し、バキュロウイルスの応答性を検討した。その結果、TLR9 ノックアウトマウス及び MyD88 ノックアウトマウスの脾臓細胞より調製した CD11c 陽性樹状細胞、及びチオグリコレート誘導性の腹腔細胞において、IL-12 の産生量の低下が認められた。しかしながら、抗ウイルス活性において中心的な役割を演じるインターフェロン  $\alpha$  の誘導は完全には消失せず、MyD88-TLR9 非依存的なシグナル経路の存在が示唆された。また、バキュロウイルスによる免疫細胞からの炎症性誘導シグナルはクロロキンや塩化アンモニウムなどで阻害されることから、ウイルス感染後のエンドソーム内での成熟プロセス、すなわち、ウイルスエンベロープとの膜融合とその後のウイルス DNA の細胞内放出過程が細胞内での TLR9 誘導シグナルに必須であることが示唆された。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。

4)N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の発現：これまで発現した遺伝子型 1 や遺伝子型 4 と同様、感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 58k、および 54k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 58k 以外に 57k、56k、および 54k のバンドが出現した。上清中には感染後 4 日目から 57k、56k、および 54k のバンドが出現し、これらの発現は 7 日目にプラトーに達した。感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径約 27nm の中空粒子が多数観察された。遺伝子型 3 の VLP が作製できた。感染上清を健常人血清と遺伝子型 4 HEV 感染患者血清と反応後、電子顕微鏡で観察したところ、患者血清でのみ凝集塊が観察された。したがって VLP はネイティブな HEV と同じ抗原性を有する粒子であった。

5)ORF2 の全長の発現：感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感

染細胞では検出されない分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54K のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。

6) 中空粒子内に取り込まれた核酸の解析：直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子は、その電顕像から粒子内部に核酸分子を取り込んでいることが予想された。そこで、精製粒子を用い、HEV 構造タンパク領域を増幅するプライマーを用いて増幅し、その塩基配列を解析した。その結果、増幅産物は HEV 特異的な配列を持つ核酸であった。

#### D. 考察

バキュロウイルス粒子表面に目的分子を自在に搭載する方法論を確立できた。ウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけに自殺遺伝子を導入することによって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。また、組換えバキュロウイルスを用いてヒト肝細胞で作製した HCV-LP の結合は、可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体により部分的に阻害された。これまで報告されている昆虫細胞で作製した HCV-LP はヒト CD81 非依存性に結合することから、HCV-LP のヒト CD81 への結合には哺乳動物細胞における何らかの翻訳後修飾の関与が示唆された。また、可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体では HCV-LP の Huh7 細胞への結合を完全に阻害できないことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の分子の関与が示唆された。ヒト肝臓由来細胞での HCV-LP の作製系は、HCV の感染初期過程や粒子形成の解析に有用なツールになると思われる。バキュロウイルスが免疫担当細胞に自然免疫を誘導できることが明らかとなった。バキュロウイルスの特性を活用した新しいウイルスベクターの開発は、先天性・後天性疾患の遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、新規 DNA ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高いものと思われる。

遺伝子型 3 の VLP を作成することができ、遺伝子型 1 および遺伝子型 4 と合わせて 3 種類の VLP を作製することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、いずれの VLP を用いても診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの

組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では遺伝子型 1 VLP と遺伝子型 4 VLP で抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。35-40nm の粒子の三次構造の解析により、ネイティブな HEV 構造の情報が得られることも期待できる。この粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、HEV の除去・不活化法の研究に有用である。今後、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。また、再構成粒子を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における in vivo での遺伝子導入効率を検討する。

#### E. 結論

- 1) gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドだけを被った組換えウイルスの作製系を構築し、ターゲット可能なバキュロウイルスベクター系を開発した。
- 2) ヒト肝細胞で HCV-LP を作製した。HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の分子の関与が示唆された。
- 3) バキュロウイルスによる自然免疫を誘導には MyD88-TLR9 非依存的なシグナル経路の存在が示唆された。
- 4) 組換えバキュロウイルスで遺伝子型 3 の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。この組換え粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子が取り込まれていた。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
- Li T.C., Takeda N., Miyamura T., Matsuura Y., Wang J.C., Engvall H., Hammar L., Xing L., and Cheng R.H. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **79**, 12999-13006 (2005).
- Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005:in press.
- Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1958-1960.
- Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H.,

- Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M.M., Miyamura T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* **79**:13473-13482 (2005).
- Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* **79**, 2847-2858 (2005).
- Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* **79**, 3639-3652 (2005).
- Mori Y., Okabayashi T., Yamashita T., Zhao Z., Wakita T., Yasui K., Hasebe F., Tadano M., Konishi E., Moriishi K., and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* **79**, 3448-3458 (2005).
- Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Tanaka K., Shimoike T., Moriishi K., Iwasaki T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **79**, 1271-1281 (2005).
2. 学会発表
- Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M.C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.
- Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上
- Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上
- Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上
- Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上
- 浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森 嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。
- 谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治：HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の感染機構、同上。
- 岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。
- 森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上
- 宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28  $\gamma$  の役割、同上。
- 李 天成、斉藤 美加、小倉 剛、宮村 達男、武田 直和。沖縄に生息するマングースの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況、同上。
- 李 天成、宮村 達男、武田 直和。E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須な領域の同定、同上。
- 岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシングとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発

分担研究者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授  
森石恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授

研究要旨：バキュロウイルスの粒子表面に目的のリガンド分子を自在に提示できるシュードタイプウイルスの作製系を構築し、広範な動物細胞に、あるいは狙った細胞だけに外来遺伝子を導入できるベクター系を構築した。重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV) のレセプターである 2 型アンギオテンシン転換酵素を表面に被ったシュードタイプバキュロウイルスは、SARS-CoV のスパイク蛋白質を発現する細胞にのみ、特異的に感染して遺伝子を導入できることが示された。また、バキュロウイルスベクターを用いてヒト肝臓細胞で作製した C 型肝炎ウイルス様粒子 (HCV-LP) の結合は、これまでに報告されている昆虫細胞で作製した HCV-LP とは異なる細胞親和性を示し、HCV の受容体候補であるヒト CD81 への結合には哺乳動物細胞における何らかの翻訳後修飾が必須であることが示唆された。さらに、バキュロウイルスが病原微生物認識受容体である既存の Toll-like receptor 非依存的に自然免疫を誘導できることが示唆された。

#### A. 研究目的

遺伝子治療の臨床研究がスタートして十数年が経過し、決して満足できる成績は得られていないものの、本治療法が今世紀の先端医療の要となることには疑いの余地はない。遺伝子治療の成否を握るのは、安全に効率よく標的細胞へ遺伝子を導入でき、しかも大きな組み込み容量を持った遺伝子導入ベクターの開発である。これまでの遺伝子治療用ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、そして RNA ウィルスなどが主に利用されてきた。しかしながら、自立増殖ウイルスの出現や、ランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化等の安全性の問題、遺伝子導入効率や特異的な遺伝子導入法の改善の余地、ならびに、細胞毒性や免疫反応の誘導、中和抗体による不活化等の多くの難問が山積みしている。これらの問題を解決するには、既存のウイルスベクターにはない特徴を保持した、新しいウイルスベクター系の開発が必要である。その候補の一つとして、我々は昆虫ウイルスであるバキュロウイルスベクターの開発を進めている。

バキュロウイルスは、環状二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ昆虫ウイルスで、感染した昆虫細胞内に多角体と呼ばれるウイルス粒子を包埋した封入体を大量に作るのが特徴である。本ウイルスはこれまで昆虫にしか感染しないと考えられていたが、広範な哺乳動物細胞へ感染し、複製することなく、外来遺伝子を効率よく発現できることが明らかにされ、遺伝子治療ベクターとしての可能性が注目を集めている。バキュロウイルスベクターの長所としては以下のような点が考えられる。1) 大きな外来遺伝子を挿入できる。2) ウィルス遺伝子が哺乳動物細胞で発現されないため有害な

免疫応答の誘導がない。3) ヒトにはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない。4) 他のウイルス蛋白質を組換えウイルスとして昆虫細胞で発現するとウイルス様粒子を大量に産生できる。

本研究はバキュロウイルスの特性を高度に利用して、持続感染症やがんに対する遺伝子治療用のベクター、アジュバント活性を保持したワクチンベクター、さらに、ウイルス様粒子を用いた経粘膜遺伝子導入ベクターの開発することを目的とする。

#### B. 研究方法

1) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発：ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって、狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発を試みる。バキュロウイルス粒子表面へのリガンド分子の取り込み機構を解析し、広範なりガンド分子を複数搭載可能なベクターの可能性を検討する。モデルとして、重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV) のレセプターである 2 型アンギオテンシン転換酵素 (ACE2) を粒子表面に発現させた ACE2 シュードタイプウイルスの作製を試みる。

2) ヒト肝臓細胞での C 型肝炎ウイルス (HCV) 様粒子 (HCV-LP) の作製：HCV を効率よく複製できる細胞培養系を欠くため、HCV の感染・複製機構は依然として謎に包まれたままである。HCV の粒子形成の解析は、*in vitro* 合成系や酵母などを用いて解析されてきたが、HCV の主要な標的細胞であるヒト肝臓細胞を用いた解析はこれまでに報告されていない。そこで、バキュロウイルスベクターを用いて、ヒト肝臓由来細胞で HCV 様粒子 (HCV-LP) を作製し、その性状を解析した。

3) バキュロウイルスによる宿主応答: これまでに我々が報告してきた、ウイルスゲノムによる Toll-like receptor 9 (TLR9) を介した抗ウイルス活性の誘導とは異なり、バキュロウイルスに特異的な TLR 非依存的な IFN の誘導機構が存在することが示唆された。バキュロウイルスによる抗ウイルス因子の誘導機構を IRF や STAT 等の転写因子欠損マウスを用いて解析し、アジュバント活性を兼ね備えた新規ワクチンベクターとしての可能性を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。

### C. 研究結果

1) ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発: バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質 gp64 の代わりに、SARS-CoV の受容体である ACE2 を粒子表面に発現させた ACE2 シュードタイプウイルスを作製した。このウイルスは、SARS-CoV のスパイク蛋白質を発現する細胞にのみに感染性を示し、さらに、抗 ACE2 抗体によって特異的に中和された。

2) HCV の構造蛋白質をコードする遺伝子を CAG プロモーター下に組み込んだ組換えバキュロウイルスをヒト肝臓由来の FLC4 細胞に感染させて、密度勾配超遠心法にて HCV-LP を精製した。HCV-LP は CsCl の密度平衡遠心で 1.17 g/ml の密度を示し、抗 E1 および抗 E2 抗体と特異的に反応する 40-50 nm の粒子が免疫電子顕微鏡観察で確認され、粒子中には HCV RNA が検出された。HCV の受容体候補として報告されているヒト CD81 の HCV-LP の結合への関与を調べるため、HCV-LP を可溶性ヒト CD81 蛋白質と反応後、ヒト CD81 陰性の HepG2 細胞とヒト CD81 陽性の Huh7 細胞に接種したところ、両細胞への結合活性がともに低下した。一方、抗ヒト CD81 抗体は Huh7 細胞への HCV-LP の結合を低下させたが、HepG2 細胞への結合には影響しなかったことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の因子の関与が示唆された。また、抗 E2 抗体で HCV-LP を前処理すると、両細胞への HCV-LP の結合が低下した。

3) バキュロウイルスによる宿主応答: TLR 及びそのシグナルアダプター分子である MyD88 の欠損マウスから種々の免疫細胞を調製し、バキュロウイルスの応答性を検討した。その結果、TLR9 ノックアウトマウス及び MyD88 ノックアウトマウスの脾臓細胞より調製した CD11c 陽

性樹状細胞、及びチオグリコレート誘導性の腹腔細胞において、IL-12 の産生量の低下が認められた。しかしながら、抗ウイルス活性において中心的な役割を演じるインターフェロン  $\alpha$  の誘導は完全には消失せず、MyD88-TLR9 非依存的なシグナル経路の存在が示唆された。また、バキュロウイルスによる免疫細胞からの炎症性誘導シグナルはクロロキンや塩化アンモニウムなどで阻害されることから、ウイルス感染後のエンドソーム内での成熟プロセス、すなわち、ウイルスエンベロープとの膜融合とその後のウイルス DNA の細胞内放出過程が細胞内での TLR9 誘導シグナルに必須であることが示唆された。この成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである。

### D. 考察

バキュロウイルス粒子表面に目的分子を自在に搭載する方法論を確立できた。ウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけに自殺遺伝子を導入することによって目的の細胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。また、組換えバキュロウイルスを用いてヒト肝細胞で作製した HCV-LP の結合は、可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体により部分的に阻害された。これまで報告されている昆虫細胞で作製した HCV-LP はヒト CD81 非依存性に結合することから、HCV-LP のヒト CD81 への結合には哺乳動物細胞における何らかの翻訳後修飾の関与が示唆された。また、可溶性ヒト CD81 や抗ヒト CD81 抗体では HCV-LP の Huh7 細胞への結合を完全に阻害できないことから、HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の分子の関与が示唆された。ヒト肝臓由来細胞での HCV-LP の作製系は、HCV の感染初期過程や粒子形成の解析に有用なツールになると思われる。バキュロウイルスが免疫担当細胞に自然免疫を誘導できることが明らかとなった。バキュロウイルスの特性を活用した新しいウイルスベクターの開発は、先天性・後天性疾患の遺伝子治療用ベクターとしてばかりでなく、新規 DNA ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高いものと思われる。

### E. 結論

1) gp64 を完全に欠損させ、目的のリガンドだけを被った組換えウイルスの作製系を構築し、ターゲティング可能なバキュロウイルスベクター系を開発した。2) ヒト肝細胞で HCV-LP



を作製した。HCV-LP の結合にはヒト CD81 以外の分子の関与が示唆された。3) バキュロウイルスによる自然免疫を誘導には MyD88-TLR9 非依存的なシグナル経路の存在が示唆された。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Li T.C., Takeda N., Miyamura T., Matsuura Y., Wang J.C., Engvall H., Hammar L., Xing L., and Cheng R.H. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **79**, 12999-13006 (2005).

Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H., Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M.M., Miyamura T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* **79**:13473-13482 (2005).

Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* **79**, 2847-2858 (2005).

Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* **79**, 3639-3652 (2005).

Mori Y., Okabayashi T., Yamashita T., Zhao Z., Wakita T., Yasui K., Hasebe F., Tadano M., Konishi E., Moriishi K., and Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J. Virol.* **79**, 3448-3458 (2005).

Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Tanaka K., Shimoike T., Moriishi K., Iwasaki T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **79**, 1271-1281 (2005).

2. 学会発表

Itsuki Hamamoto, Yorihiro Nishimura, Toru Okamoto, Hideki Aizaki, Minyi Liu, Yoshio Mori, Takayuki Abe, Tetsuro Suzuki, Micheal M.C. Lai, Tatsuo Miyamura, Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. 121th International Meeting on HCV and Related Viruses, Montreal, Canada, October 2-7, 2005.

Hironobu Miyamoto, Kohji Moriishi, Kyoji Moriya, Tetsuro Suzuki, Kazuhiko Koike, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura.

Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. 同上

Kosuke Nakai, Kohji Moriishi, Chang Kwang Limn, Toru Okamoto, Tetsuro Suzuki, Jack H. Nunberg, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. 同上

Hideki Tani, Yasumasa Komoda, Tetsuo Yamashita, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Itsuki Hamamoto, Yoshimi Tsuda, Chang Kweng Lim, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. 同上

Yasumasa Komoda, Hideki Tani, Chang Kweng Lim, Kensuke Suzuki, Eiko Matsuo, Yoshimi Tsuda, Kohji Moriishi, Arvind H. Patel, Tatsuo Miyamura, and Yoshiharu Matsuura. Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. 同上

浜本いつき、岡本 徹、相崎英樹、西村順裕、森 嘉生、阿部隆之、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 21-23 日。

谷 英樹、菰田泰正、山下哲生、鈴木健介、松尾栄子、浜本いつき、津田祥美、林 昌宏、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、宮村達男、松浦善治：HCV エンベロープ蛋白質を被ったシールドタイプ VSV の感染機構、同上。

岡本 徹、西村順裕、市村 徹、鈴木哲朗、宮村達男、森石恆司、松浦善治：C型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定、同上。

森 嘉生、山下哲生、森石恆司、松浦善治：日本脳炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシング機構、同上

宮本大伸、森石恆司、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治：C型肝炎ウイルスコア蛋白質によるインスリン抵抗性誘発における PA28γ の役割、同上。

岡本貴世子、森石恆司、大河内正康、武田雅俊、松浦善治：シグナルペプチドペプチダーゼによる HCV コア蛋白質のプロセッシングとその生物学的意義、第 28 回日本分子生物学学会年会、福岡、平成 17 年 12 月 8-11 日。

H. 知的所有権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
「遺伝子治療を目指した新規バキュロウイルスベクターの開発」  
分担研究報告書

ネイティブ E 型肝炎ウイルス粒子と同じ大きさを有する組換え粒子の作製  
分担研究者 武田直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

**研究要旨** 遺伝子型 3 の HEV VLP を作製した。N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 を発現した場合は、これまでの遺伝子型 1 や遺伝子型 4 の場合と同様、直径 27nm の VLP であった。一方、ORF2 の全長の発現では、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する VLP が作製できた。この組換え粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子を取り込まれていた。

協力研究者

李 天成、永田典代、宮村達男（国立感染研）  
恒光 裕（動衛研）

### A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子（VLP）がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。我々はこれまでに 1 型と 4 型の HEV について N 末端を欠失した構造蛋白を発現して VLP を作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブな HEV と似ていることを明らかにした。しかしながら、これら VLP はネイティブな HEV に比べ明らかに小さなサイズの粒子であった。本研究では 3 型の構造蛋白を発現し、ネイティブな HEV に近いサイズを持つ VLP の作製を試みた。

### B. 研究方法

3 型 HEV ORF2 の全長、および N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、ORF2 全長を発現する場合は感染細胞から、N 末端を欠失させた ORF2 を発現する場合は培養上清からウイルス様中空粒子（VLP）を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA 法等で抗原性を比較した。

### C. 研究結果

#### 1. N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の発現

これまで発現した遺伝子型 1 や遺伝子型 4 と同様、感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 58k、および 54k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 58k 以外に 57k、56k、および 54k のバンドが出現した。上清中には感染後 4 日目から 57k、56k、および 54k のバンドが出現し、これらの発現は 7 日目にプラトーに達した。感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径約 27nm の中空粒子が多数観察された。遺伝子型 3 の VLP が作製できた。感染上清を健常人血清と遺伝子型 4 HEV 感染患者血清と反応後、電子顕微鏡で観察したところ、患者血清でのみ凝集塊が観察された。したがって VLP はネイティブな HEV と同じ抗原性を有する粒子であった。

#### 2. ORF2 の全長の発現

感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54k のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。

#### 3. 中空粒子内に取り込まれた核酸の解析

直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子は、その電顕像から粒子内部に核酸分子を取り込んでいることが予想された。そこで、精製粒子を用い、HEV 構造タンパク領域を増幅するプライマーを用いて増幅

し、その塩基配列を解析した。その結果、増幅産物は HEV 特異的な配列を持つ核酸であった。

#### D. 考察

遺伝子型 3 の VLP を作成することができ、遺伝子型 1 および遺伝子型 4 と合わせて 3 種類の VLP を作製することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、いずれの VLP を用いても診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では遺伝子型 1 VLP と遺伝子型 4 VLP で抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。35-40nm の粒子の三次構造の解析により、ネイティブな HEV 構造の情報が得られることも期待できる。この粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、HEV の除去・不活化法の研究に有用である。今後、解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討する。また、再構成粒子を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における *in vivo* での遺伝子導入効率を検討する。

#### E. 結論

組換えバキュロウイルスで遺伝子型 3 の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな

粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。この組換え粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子が取り込まれていた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005;in press.
- Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH: Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 2005;79:1299-3006.
- Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1958-1960.

##### 2. 学会発表

- 李 天成、齊藤 美加、小倉 剛、宮村 達男、武田 直和。沖縄に生息するマンガースの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況。日本ウイルス学会、第 53 回学術集会 2005 年 11 月 横浜
- 李 天成、宮村 達男、武田 直和。E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須な領域の同定。日本ウイルス学会、第 53 回学術集会 2005 年 11 月 横浜

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li T.C., <u>Takeda N.</u> , Miyamura T., <u>Matsuura Y.</u> , Wang J.C., Engvall H., Hammar L., Xing L., and Cheng R.H.	Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus.	J. Virol.	79	12999-13006	2005
Hamamoto I., Nishimura Y., Okamoto T., Aizaki H., Liu M., Mori Y., Abe T., Suzuki T., Lai M.M., Miyamura T., Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B.	J. Virol.	79	13473-13482	2005
Mori Y., Okabayashi T., Yamashita T., Zhao Z., Wakita T., Yasui K., Hasebe F., Tadano M., Konishi E., Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication.	J. Virol.	79	3448-3458	2005
Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Tanaka K., Shimoike T., Moriishi K., Iwasaki T., Mizumoto K., <u>Matsuura Y.</u> , Miyamura T., and Suzuki T.	Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein.	J. Virol.	79	1271-1281	2005
Kitagawa Y., Tani H., Limn C.K., Matsunaga T.M., Moriishi K., and <u>Matsuura Y.</u>	Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses.	J. Virol.	79	3639-3652	2005
Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and <u>Matsuura Y.</u>	Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus.	J. Virol.	79	2847-2858	2005
Li T-C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y, Ishida M., Sakamoto S., <u>Takeda N.</u> , Miyamura T.	Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat.	Emerg. Infect. Dis.	11	1958-1960	2005

## Essential Elements of the Capsid Protein for Self-Assembly into Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus

Tian-Cheng Li,<sup>1\*</sup> Naokazu Takeda,<sup>1</sup> Tatsuo Miyamura,<sup>1</sup> Yoshiharu Matsuura,<sup>2</sup> Joseph C. Y. Wang,<sup>3</sup> Helena Engvall,<sup>3</sup> Lena Hammar,<sup>3</sup> Li Xing,<sup>3</sup> and R. Holland Cheng<sup>3,4</sup>

*Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011,<sup>1</sup> and Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita-shi, Osaka 565-0871,<sup>2</sup> Japan; Karolinska Institute, Department of Biosciences, 141 57 Huddinge, Sweden<sup>3</sup>; and Department of Molecular and Cellular Biology, University of California, Davis, California 95616<sup>4</sup>*

Received 21 April 2005/Accepted 20 July 2005

Hepatitis E virus (HEV) is a noncultivable virus that causes acute liver failure in humans. The virus's major capsid protein is encoded by an open reading frame 2 (ORF2) gene. When the recombinant protein consisting of amino acid (aa) residues 112 to 660 of ORF2 is expressed with a recombinant baculovirus, the protein self-assembles into virus-like particles (VLPs) (T.-C. Li, Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura, *J. Virol.* 71:7207–7213, 1997). VLPs can be found in the culture medium of infected Tn5 cells but not in that of Sf9 cells, and the major VLPs have lost the C-terminal 52 aa. To investigate the protein requirement for HEV VLP formation, we prepared 14 baculovirus recombinants to express the capsid proteins truncated at the N terminus, the C terminus, or both. The capsid protein consisting of aa residues 112 to 608 formed VLPs in Sf9 cells, suggesting that particle formation is dependent on the modification process of the ORF2 protein. In the present study, electron cryomicroscopy and image processing of VLPs produced in Sf9 and Tn5 cells indicated that they possess the same configurations and structures. Empty VLPs were found in both Tn5 and Sf9 cells infected with the recombinant containing an N-terminal truncation up to aa residue 125 and C-terminal to aa residue 601, demonstrating that the aa residues 126 to 601 are the essential elements required for the initiation of VLP assembly. The recombinant HEV VLPs are potential mucosal vaccine carrier vehicles for the presentation of foreign antigenic epitopes and may also serve as vectors for the delivery of genes to mucosal tissue for DNA vaccination and gene therapy. The results of the present study provide useful information for constructing recombinant HEV VLPs having novel functions.

*Hepatitis E virus* (HEV), which causes severe acute liver failure, belongs to the genus *Hepevirus* in the family *Hepeviridae* (22). HEV contains an approximately 7.2-kb single-stranded positive-sense RNA molecule (21). The RNA is 3' polyadenylated and includes three open reading frames (ORF). ORF1, mapped in the 5' half of the genome, encodes viral nonstructural proteins (7, 12). ORF2, located at the 3' terminus of the genome, encodes a protein-forming viral capsid (11, 25). ORF3, mapped between ORF1 and ORF2, encodes a 13.5-kDa protein that is associated with the membrane as well as with the cytoskeleton fraction (27). This protein is shown to be phosphorylated by the cellular mitogen-activated protein kinase (6, 8). The ORF3 protein may have a regulatory function (6, 8). Ever since HEV was first discovered in 1980 and visualized by immune electron microscopy in 1983 (2), many efforts have been made, using different expression systems, to express the structural protein (5, 11, 17, 26). It is particularly important to characterize the viral protein because so far no practical cell culture system for growing HEV is available. Only one neutralization epitope has been identified; it maps between amino acids 578 and 607 of the ORF2 protein (pORF2) (18).

The expression of foreign proteins in baculovirus systems opens the prospect of studying HEV capsid assembly, since virus-like particles (VLPs) of pronounced spikes on the surface can be formed with the recombinant protein expressed with this system (11, 25). This VLP is capable of inducing systemic and mucosal immune responses in experimental animals (9). With an oral inoculation of 10 mg of recombinant HEV VLPs, cynomolgus monkeys can develop anti-HEV immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA responses and protect against HEV infection (10). All these data suggest that VLPs are a candidate HEV vaccine.

The VLPs produced from Tn5 cells appear as T=1 icosahedral particles, which are composed of 60 copies of truncated pORF2 (25). The protein contains two distinctive domains: the shell (S) domain forms the semiclosed icosahedral shell, while the protrusion (P) domain interacts with the neighboring proteins to form the protrusion. The projection of T=1 recombinant HEV VLPs appears as spikes decorated with spherical rings (25), which fits with the morphology obtained from negatively stained HEV native virions. The diameter of these VLPs, 27 nm, is less than that reported for partially purified native virions (16). However, VLPs retain the antigenicity of the native HEV virion by designated antigenic sites at the P domain and by the capsid connection at the S domain. The particles appear empty, with no significant RNA-like density inside. The N-terminal region of pORF2 is rich in positively charged amino acid residues and may interact with RNA mol-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: (81)-42-561-0771. Fax: (81)-42-561-4729. E-mail: litc@nih.go.jp.

TABLE 1. Oligonucleotides used in the construction of baculovirus recombinants

Recombinant baculovirus	Forward primer <sup>a</sup>	Reverse primer <sup>b</sup>
Ac[n111]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n111c52]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTATGCTAGCGCAGAGTGGGGGCTAAAA</u>
Ac[n111c58]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTAGGCTAAAAACAGCAACCCGAGAGATGG</u>
Ac[n111c59]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTATAAAAACAGCAACCCGAGAGATGGAGA</u>
Ac[n111c60]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTAAACAGCAACCCGAGAGATGGAGACGG</u>
Ac[n111c64]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTAAGAGATGGAGACGGGACCCAGCACCCA</u>
Ac[n111c72]	<u>AAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTAACCCAGGCTAGTGGTGAAGTGGAAA</u>
Ac[c52]	<u>CAGGATCCATGGCGGTCGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT</u>	<u>AATCTAGACTATGCTAGCGCAGAGTGGGGGCTAAAA</u>
Ac[n123]	<u>AAGGATCCATGGATGCTCGACTCTCGCGGCGCCATCTT</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n124]	<u>AAGGATCCATGGTTCGACTCTCGCGGCGCCATCTT</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n125]	<u>AAGGATCCATGGACTCTCGCGGCGCCATCTTGGC</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n126]	<u>AAGGATCCATGTCTCGCGGCGCCATCTTGGCGCG</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n130]	<u>CAGGATCCATGATCTTGGCGGCGAGTATAATCTATC</u>	<u>GGTCTAGACTATAACTCCCGAGTTTACCACCTTCTACTT</u>
Ac[n125c59]	<u>AAGGATCCATGGACTCTCGCGGCGCCATCTTGGC</u>	<u>AATCTAGACTATAAAAACAGCAACCCGAGAGATGGAGA</u>

<sup>a</sup> BamHI (underlined) and an initiation codon (bold) are indicated.

<sup>b</sup> XbaI (underlined) and a stop codon (bold) are indicated.

ecules (21). Thus, the deletion of the N-terminal 111 amino acid (aa) residues and the insufficient volume of the central cavity may lead to the failure of RNA encapsidation (25).

Cell type dependence in the VLP formation of the recombinant capsid protein was observed when aa residues 112 to 660 of ORF2 were expressed with a recombinant baculovirus in two insect cell lines, Tn5 and Sf9. In Tn5 cells, two major bands, having molecular masses of 58 kDa (58K) and 53 kDa (53K), were found in the cell lysate, while a peptide in the VLPs comprising a 53K protein was found in the culture medium. The 53K protein has been designated as either the 50K or 54K protein in previous studies (9, 11). In Sf9 cells, an additional peptide with a size between that of 58K and that of 53K was found in the cell lysate. However, no VLP was recovered from the culture medium. In Tn5 cells, terminal sequencing revealed that 58K and 53K proteins have the same first 15 aa in the N terminus and that a posttranslation cleavage by cellular protease(s) occurred at the pORF2 C termini and converted 58K into 53K. An independent but similar observation was obtained when pORF2 of the Pakistani strain was expressed in Sf9 cells (17) where several immunoreactive proteins were detected in the cell lysate, and a 53K protein was secreted into the culture medium, but no VLP was found. Further investigation of pORF2 expression in Sf9 and Tn5 cells may allow us to understand the mechanism underlying the subunit assembly and particle formation of the recombinant HEV capsid.

We analyzed particle formation with pORF2 containing a series of truncated deletions at the N- and/or C-terminal region. In both Sf9 and Tn5 cells, amino acid residues 126 to 601 appeared to form the pORF2 core structure and were capable of self-assembling into VLPs. These results indicated that the cell dependence on particle formation is due to the difference between Sf9 and Tn5 cells in the modification process of pORF2.

#### MATERIALS AND METHODS

**Generation of recombinant baculoviruses and expression of capsid proteins.** DNA fragments encoding the N- and/or C-terminal aa-truncated pORF2 were amplified by PCR using plasmid pHEV5134/7161 as a template. Plasmid pHEV5134/7161 containing a full-length genotype I (G1) HEV pORF2 was

described previously (11). The primers used in the construction of baculovirus recombinants are shown in Table 1. Amplified DNA fragments were purified by using a QIAGEN PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA), digested with restriction enzymes, and ligated with baculovirus transfer vector pVL1393 (Pharmingen, San Diego, CA). An insect cell line derived from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (19) (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) was cotransfected with a linearized wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA (Pharmingen), and the transfer vectors were cotransfected by the Lipofectin-mediated method as specified by the manufacturer (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). The cells were incubated at 26.5°C in TC-100 medium (Gibco BRL) supplemented with 8% fetal bovine serum and 0.26% Bacto tryptose phosphate broth (Difco Laboratories, Detroit, MI). The proteins in the culture medium and cell lysate were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed by Western blot assay using serum from a patient with acute hepatitis E (11). Each recombinant virus was plaque purified three times. The baculovirus recombinants thus obtained were designated as Ac[n111], Ac[n111c52], Ac[n111c58], Ac[n111c59], Ac[n111c60], Ac[n111c64], Ac[n111c72], Ac[c52], Ac[n123], Ac[n124], Ac[n125], Ac[n126], Ac[n130], and Ac[n125c59]; a schematic diagram is shown in Fig. 1. Both insect Sf9 and Tn5 cells, the latter from a *Trichoplusia ni* insect cell line, BTI-Tn-5B1-4 (Invitrogen, San Diego, CA), were infected with recombinant baculoviruses at a multiplicity of infection of 10 and incubated for 5 days at 26.5°C as previously described (11, 23).

**Purification of VLPs.** The culture medium was harvested on day 5 after infection. The intact cells, cell debris, and progeny baculoviruses were removed by centrifugation at 10,000 × g for 90 min. The supernatant was then spun at 25,000 rpm for 2 h in a Beckman SW28 rotor. The resulting pellet was resuspended in 4.5 ml EX-CELL 405 at 4°C overnight. After mixing with 1.96 g of CsCl, the sample was centrifuged at 35,000 rpm for 24 h at 4°C in a Beckman SW50.1 rotor. The visible white band (at a density of 1.285 g/ml) was harvested by puncturing the tubes with a 21-gauge needle, diluted with EX-CELL 405 medium, and then centrifuged again in a Beckman TLA45 rotor at 45,000 rpm (125,000 × g) for 2 h to remove CsCl. The VLPs were placed on a carbon-coated grid, and the proteins were allowed to be absorbed into the grid for 5 min. After being rinsed with distilled water, the sample was stained with a 1% aqueous uranyl acetate solution and examined with a Hitachi H-7000 electron microscope operating at 75 kV.

**Terminal amino acid sequence analysis.** The VLPs were further purified by 5 to ~30% sucrose gradient centrifugation at 35,000 rpm for 2 h in a Beckman SW50.1 rotor. The visible white band was harvested as described above, diluted with EX-CELL 405, and again centrifuged at 45,000 rpm for 2 h in a Beckman TLA55 rotor to precipitate the VLPs. N-terminal aa microsequencing was carried out using 100 pmol of the protein by Edman automated degradation on an Applied Biosystems model 477 protein sequencer, and C-terminal aa sequencing was performed by Applied Biosystems.

**SDS-PAGE and Western blot analysis.** Dispersed insect cells were incubated for 20 min at room temperature to allow the cells to attach to culture flasks in TC-100 (Sf9 cells) or EX-CELL 405 (Tn5 cells) medium. The culture medium was removed, and the cells were infected with the recombinant baculoviruses at

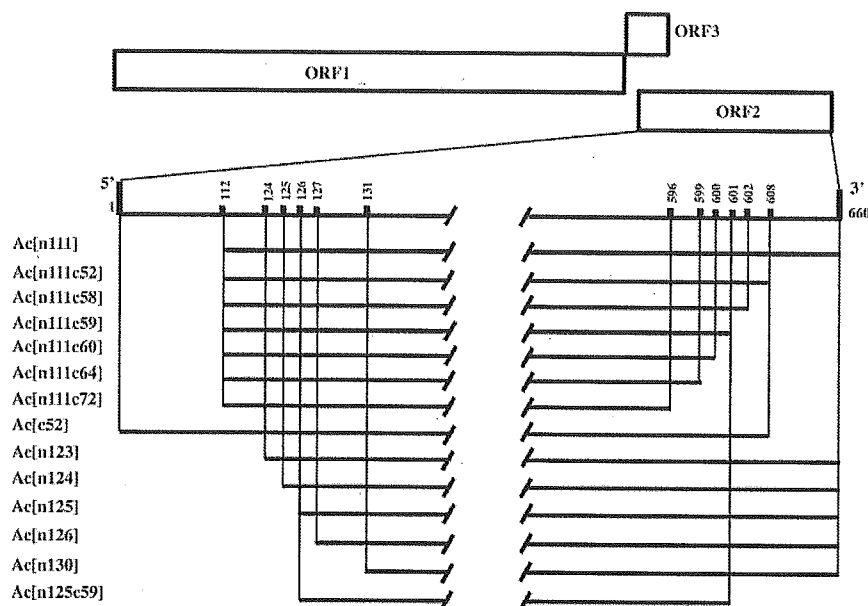


FIG. 1. Genome organization of HEV and schematic diagram of recombinant baculovirus vectors. DNA fragments encoding N- and C-terminal aa-truncated ORF2 were prepared by PCR with the primers listed in Table 1 and were used to construct 14 recombinant baculoviruses. Full-length pORF2 consisted of 660 aa. The N- and C-terminal aa numbers of the truncated protein are indicated.

a multiplicity of infection of 10. Virus adsorption was carried out for 1 h at room temperature, and then the cells were incubated at 26.5°C. The proteins in the cell lysate and in the culture medium were separated by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. For Western blotting, the proteins in the SDS-PAGE gel were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked with 5% skim milk in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)–150 mM NaCl and reacted with a patient's serum from an acute phase. Human IgG antibody was detected by using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human immunoglobulin (1:1,000 dilution) (DAKO A/S, Copenhagen, Denmark). Nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluidine were used as coloring agents (Bio-Rad Laboratories).

**Cryo-electron microscopy (cryo-EM) and image reconstruction.** A 3- $\mu$ l drop of purified HEV VLP (~1 mg/ml) was applied onto holey carbon film. After extra solution was wiped away with filter paper, the grid was rapidly plunged into liquid ethane surrounded by liquid nitrogen. Thus embedded in a thin layer of vitrified ice, the specimen was then transferred via a Gatan 626 cryo-transfer system to a Philips CM120 microscope. The specimen was observed at liquid nitrogen temperature and photographed at a magnification of 45,000. Each area was photographed twice, with defocus levels of 1  $\mu$ m and 3  $\mu$ m, respectively. The electron dose of each exposure was less than 10 electrons/Å<sup>2</sup>. The selected electron micrographs were digitized with a Zeiss scanner at a step size of 14  $\mu$ m, corresponding to 3.1 Å at the specimen. The images were reconstructed according to icosahedral symmetry with Fourier-Basel procedures (4, 28). Briefly, the particle orientation and center of each image were estimated with the EMPFT program, where the structure of Tn5-produced HEV VLP was used as the initial model (1). The first reconstruction was generated from selected images and used as a model to refine the orientation and center parameters. After itinerant runs of EMPFT, the parameters were stable and appeared unchanged from one EMPFT run to another. The final reconstruction was computed by combining 353 images at a resolution of 23 Å. The surface-rendering map was generated with the NAG Explorer program combined with custom-created modules.

**Mass spectrometry.** The mass spectrometry experiment was done with a Reflex III mass spectrometer from Bruker, equipped with gridless delayed extraction. The samples were mixed with an equal volume of a saturated solution of sinapinic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 33% (vol/vol) acetonitrile and 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid. On the target plate, a thin layer was prepared with a saturated solution of sinapinic acid in ethanol. A sample volume of 0.5  $\mu$ l was applied to a thin layer of sinapinic acid and allowed to crystallize. Data were acquired in the linear instrument mode. Data were processed and evaluated by XMASS software from Bruker.

## RESULTS

**C-terminal 52-amino-acid deletion is necessary for formation of VLPs in Sf9 cells.** To understand the mechanism underlying VLP formation in Sf9 and Tn5 cells, we prepared a series of baculovirus recombinants expressing pORF2 with different deletions at the N- and/or C-terminal region (Table 1 and Fig. 1). The cell lysate and culture medium of infected insect cells were analyzed by Western blotting. In a previous study, the N-terminal 111 aa-truncated HEV pORF2 was expressed by a recombinant baculovirus, Ac[n111], in both insect cells (11). Two major proteins, ~58K and ~53K, were detected in both cell lysates. The 53K protein was released into cell culture medium and assembled into VLPs in Tn5 cells but not in Sf9 cells (11).

Analysis of the N- and C-terminal aa sequences of the VLPs revealed that the N terminus was at aa residue 112 and the C terminus ended at aa residue 608, indicating that the C-terminal 52 aa of ORF2 were deleted. The protein that forms VLPs contains 497 amino acids (112 to ~608), and its molecular mass was about 53K. An N-terminal 111 aa- and C-terminal 52 aa-truncated construct, Ac[n111c52], was generated, and the protein was expressed in both Sf9 and Tn5 cells. As expected, a single 53K protein was found in both Sf9 and Tn5 cell lysates (Fig. 2, Ac[n111c52] lanes in Sf9 and Tn5). Interestingly, these 53K proteins were released into both culture media as VLPs, as observed by electron microscopy (Fig. 3). The particle appeared empty and homogenous in size. Therefore, C-terminal truncation to aa residue 608 is crucial for particle formation and release into Sf9 cells.

Ac[n111c58] and Ac[n111c59] encode truncated pORF2s with an N-terminal 111-aa deletion and respective C-terminal deletions of 58 and 59 aa. The expressed proteins migrated to

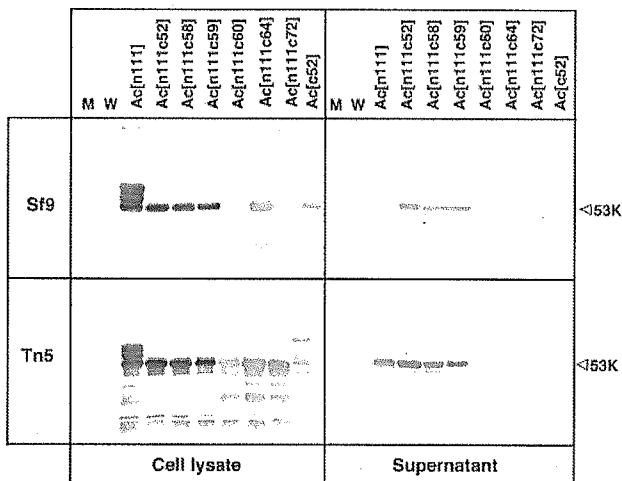


FIG. 2. Western blot assay of truncated pORF2 expressed in Sf9 and Tn5 cells. Eight recombinant baculoviruses, Ac[n111], Ac[n111c52], Ac[n111c58], Ac[n111c59], Ac[n111c60], Ac[n111c64], Ac[n111c72], and Ac[c52], were used to infect the insect cells. Ten microliters of the culture medium (right column) and 5  $\mu$ l of the cell lysate (left column) were separated by 10% SDS-PAGE, and HEV-specific proteins were detected by Western blot analysis using the serum of a patient with acute hepatitis E. M, molecular weight markers; W, wild-type baculovirus-infected cells.

a position similar to that of 53K and appeared in both cell lysates as well as in the culture medium (Fig. 2); both were also assembled into VLPs (data not shown). In contrast, truncated pORF2 from Ac[n111c60], Ac[n111c64], and Ac[n111c72] was not released into the culture medium to detectable levels, and VLP was not formed even though protein expression remained similar to those of the other constructs (Fig. 2). Instead, a

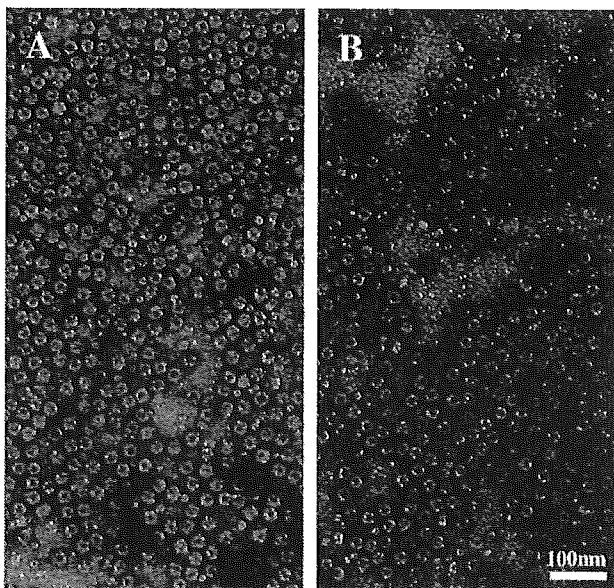


FIG. 3. EM of the HEV VLPs generated in Tn5 (A) and Sf9 (B) cells with recombinant baculovirus Ac[n111c52]. The VLPs were stained with 2% uranyl acetate. Bar, 100 nm.

protein with a molecular mass of 42 kDa was detected in both of the cell lysates as well as in the culture medium by Western blot analysis. When pORF2 with a C-terminal 52-aa deletion was expressed with a recombinant baculovirus, Ac[c52], two major proteins, 65K and  $\sim$ 53K, were observed in infected Tn5 and Sf9 cell lysates 5 days postinfection (p.i.). However, these two proteins were not detected in their culture media (Fig. 2, Ac[c52] lanes in Sf9 and Tn5). These results indicated that aa residues before 601 were essential to the formation of VLPs.

**VLPs produced in Sf9 and Tn5 cells possess the same configurations and structures.** The morphology of the VLPs generated in Sf9 cells appeared to be similar to that generated in Tn5 cells, as observed in the negatively stained particles (Fig. 3). To investigate the structural properties of these two released VLPs, we performed cryo-electron microscopy and image processing using VLPs produced in Tn5 cells. The electron cryomicrographs showed that the particle projected as a spiky hollow sphere, indicating that no RNA-like density was packed inside the capsid (Fig. 4A). The image processing was done according to the icosahedral procedure. The rotational symmetry of 522 was applied to reconstruct the final three-dimensional structure. The reconstructed VLP displayed a T=1 surface lattice with protruding density located at each of 30 twofold axes (Fig. 4B). The VLP was composed of 60 copies of pORF2, and the protruding density consisted of dimeric, projecting domains from twofold-related peptides. The particle diameter was 270  $\text{\AA}$ , measured from the three-dimensional reconstruction. The protein shell was 85  $\text{\AA}$  thick at the twofold axes. A channel can be observed under each protruding density. The protruding density was about 43  $\text{\AA}$  high, and the twofold platform was 56  $\text{\AA}$  in the long axes (data not shown). The threefold-related dimers formed a regular triangle, and the dimer-dimer distance was 76  $\text{\AA}$  measured from center to center (Fig. 4B). Molecular interactions at the icosahedral threefold region appeared much stronger than those at the fivefold region. There was no significant difference in radial density distribution between Tn5- and Sf9-produced VLPs (Fig. 4C).

We further determined the composition of the particles obtained from Sf9 and Tn5 cells using mass spectrometry (Fig. 5). HEV VLPs produced from Tn5 and Sf9 cells with recombinant baculovirus Ac[n111c52] were analyzed. In both cases, the major density peak was monitored at the position corresponding to a mass of 53 kDa. The peak was symmetrically distributed, and a shoulder tip can be found in both cases. The shoulder tip was about 1 kDa larger than the main density peak. The signals further confirmed that the molecular mass of truncated pORF2 was 53 kDa, disregarding the production cell lines.

**Essential N-terminal amino acids for VLP formation.** Deletion of the N-terminal 111 residues is necessary for particle formation, which is consistent with our previous observation (11). The subsequent question is how many amino acids can be removed from pORF2 N termini without changing its capability to form VLPs. We made five constructs to express proteins with 123-, 124-, 125-, 126-, and 130-aa deletions at the N terminus by using five recombinant baculoviruses: Ac[n123], Ac[n124], Ac[n125], Ac[n126], and Ac[n130], respectively. As shown in Fig. 6, three proteins, having molecular masses of 58 to 51 kDa, were detected by Western blotting in both cell lysates at 5 days p.i., and the largest bands (58 to  $\sim$ 57K) were



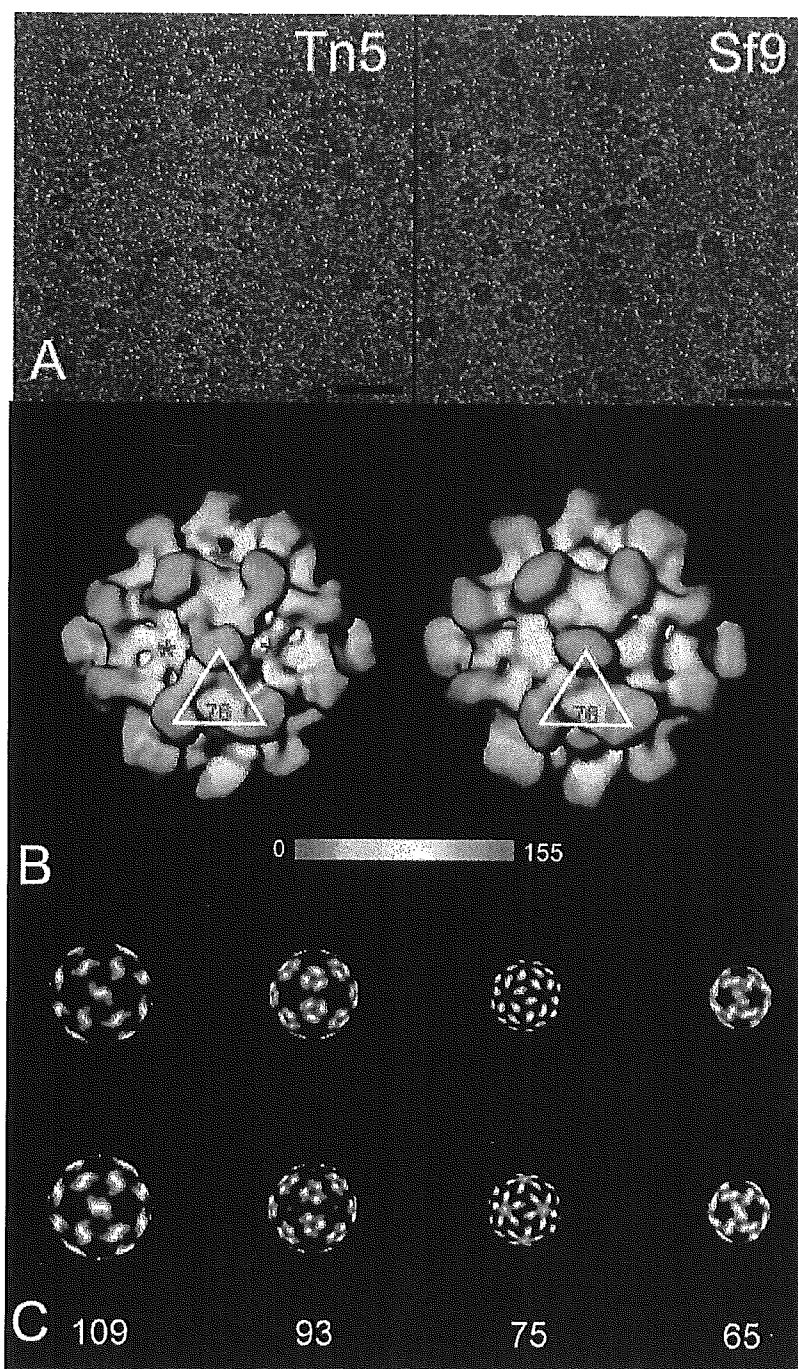


FIG. 4. HEV VLP structures determined by cryo-electron microscopy and image reconstruction. (A) Cryo-electron micrograph of ice-embedded HEV VLPs produced from Tn5 and Sf9 cells. The bar corresponds to 100 nm. (B) Surface-shaded representation of HEV VLP structures viewed along icosahedral twofold axes. VLPs from both Tn5 (left panel) and Sf9 (right panel) cells were color coded according to the radius, as indicated in the scale bar. The adjacent protruding spikes remain at equal distances of 76 Å (white lines). The asterisks mark the positions of three adjacent icosahedral fivefold axes. (C) Sequential radial density projections generated from the twofold-oriented density map at corresponding radii. The protein density appears as the light color, while the background density is black.

thought to be the primary translation products encoded by N-terminal 123, 124, 125, 126, and 130 aa-truncated ORF2. In Tn5 cells, a C-terminal 52-aa-deleted product, about 51K protein, was the major protein to be efficiently released into the

culture medium, where VLP formation occurred in Ac[n123]-, Ac[n124]-, and Ac[n125]-infected Tn5 cells (data not shown). Although the 51K protein was released into the culture medium, no VLP formation occurred in Ac[n126]- or Ac[n130]-

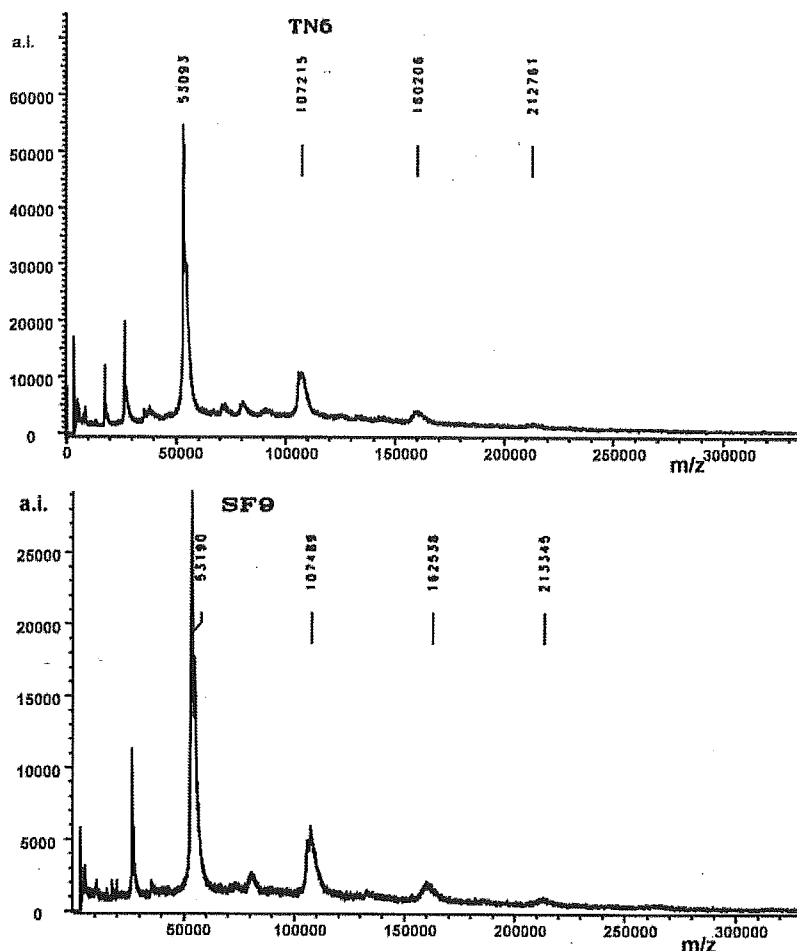


FIG. 5. Mass spectra from purified HEV VLPs displayed as the counts of isotope abundance (a.i.) versus mass/charge values ( $m/z$ ). HEV VLPs produced from Tn5 (top panel) and Sf9 (bottom panel) cells with recombinant baculovirus Ac[n111c52] gave consistent mass spectra in which the abundant elements show similar  $m/z$  values at 53,000, 107,000, and 160,000.

infected Tn5 cells. In contrast, the 51K protein was not released into the culture medium in infected Sf9 cells (Fig. 6). These results demonstrated that aa residues after 125 were essential to the formation of VLPs.

When Ac[n125c59], an N-terminal 125 aa- and C-terminal 59 aa-truncated recombinant baculovirus, was expressed in Sf9 and Tn5 cells, the 51K protein was detected in both cell lysates and the culture media, where VLP formation occurred in both insect cell types (Fig. 6). This confirmed our observation that a C-terminal deletion of 52 to 59 amino acids was required for particle formation when Sf9 cells were used.

## DISCUSSION

HEV is enigmatic due to the virus's inability to grow in conventional cell culture. Large quantities of the HEV capsid protein carrying antigenicity and immunogenicity comparable to those of the native virion have been generated for a long time, because the capsid protein is a key molecule for the diagnosis of hepatitis E as well as for vaccine development.

We previously found that when an N-terminal 111 aa-trun-

cated ORF2 protein was expressed in Tn5 and Sf9 cells, two major peptides, having molecular masses of 58 and 53 kDa, were generated in both cells, and only the 53-kDa protein generated in Tn5 cells was released into culture medium and self-assembled into VLPs (11). The 58K protein presented the primary translation product, and the 53K protein is a processing product from the 58K protein. In this study, we examined the difference between Tn5 and Sf9 cells in HEV ORF2 gene expression and found that when a recombinant baculovirus (Ac[n111c52]) harboring a construct of the C-terminal 52-aa deletion was used, no difference between Sf9 and Tn5 cells in protein translation and particle formation was found. The observation that Ac[n111] failed to produce VLPs in Sf9 cells raised a question about the posttranslation modification in insect cells. In Tn5 cells, the levels of protein expression by Ac[n111] and Ac[n111c52] appeared to be similar. Therefore, it is likely that the 58K protein was incorrectly processed in Sf9 cells, thus affecting VLP assembly.

In addition, when Sf9 insect cells were infected with Ac[n111], the expressed proteins were localized in the cyto-

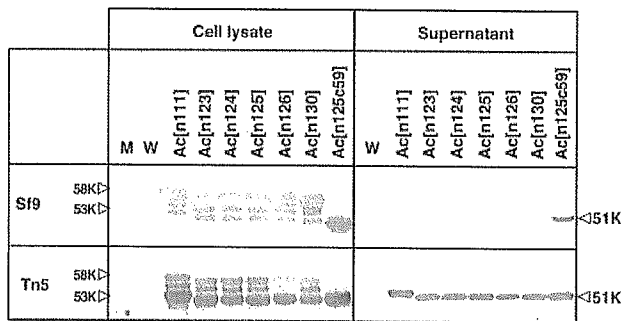


FIG. 6. Expression of N-terminally truncated pORF2 in Sf9 and Tn5 cells infected with Ac[n123], Ac[n124], Ac[n125], Ac[n126], Ac[n130], and Ac[n125c59]. A Western blot assay was carried out as described in the legend to Fig. 2. Ac[n111] was included for the expression of the 58K and 53K proteins. M, molecular weight markers; W, wild-type baculovirus-infected cells.

plasm and observed as inclusion-like bodies (one to four structures per cell) by EM (25). In contrast, when Sf9 cells were infected with Ac[n111c52], there were no inclusion-like bodies (data not shown), and the expressed proteins were localized evenly in the cytoplasm. Concomitantly, expressed protein was poorly detected in the culture medium from Ac[n111]-infected Sf9 cells at 3 days p.i., whereas a large amount of the 53K protein was detected in the culture medium from Ac[n111c52]-infected Sf9 cells. These findings suggest that the C-terminal aa of ORF2 might affect the localization, and subsequently the release, of the capsid protein from the insect cells. However, we do not yet know whether the VLPs form before release in infected cells or after release in culture medium.

The presence of Leu601 in pORF2 is important for the formation of HEV VLPs. A protein with a longer (580 to 610) deletion of aa residues was aberrant in protein folding; this may reduce the ORF2 homo-oligomerization (24). The prediction of the secondary structure based on protein sequence suggests two  $\beta$ -strand motifs in the region between aa 580 and 601 (580 to ~589 and 593 to ~601). The failure in the particle assembly with Ac[n111c60] is due to incomplete formation of this  $\beta$ -strand motif. Although aa 111 to 601 and aa 111 to 602 formed VLPs, the yield of each of these was about 10 to 20% of the yields of aa 111 to 660 (data not shown). This is in contrast to the fact that the levels of protein expression inside the cells were similar in these constructs. This observation further confirmed that stability of the C-terminal  $\beta$ -strand motif is essential for VLP assembly.

The N-terminal 111-aa-deletion was found to be essential for cellular membrane dissociation of pORF2 expressed in insect cells (17, 24). We extended the N-terminal deletion up to Val125 without altering the ability to form HEV VLPs (Fig. 6). The ORF2 protein exhibits two-domain folding (25), with a domain organization similar to those of the norovirus (NV) capsid protein (15) and the tomato bushy stunt virus capsid protein (14). The N-terminal aa residues 112 to 125 may be the arm region extending from the S domain into the particle interior. In NV, the N-terminal region appeared to serve as a switch controlling the S domain configuration in the assembly process (3). Removal of the first 20 amino acids did not affect NV-like particle self-assembly, but a longer deletion at the

N-terminal region did (3). Thus, residues 112 to 125 are putatively located in the HEV virion interior and may regulate VLP assembly.

Tn5 and Sf9 are insect cell lines that are commonly used in recombinant protein expression. The Tn5 cell is becoming more and more popular because it yields higher quantities of tissue factor than Sf9. Under optimum conditions, Tn5 cells produce 28-fold more secreted soluble tissue factor than Sf9 cells on a per-cell basis (23). In this paper, we report the difference between Tn5 and Sf9 cells in a protein synthesis system. The ORF2 protein underwent posttranslation cleavage, which is crucial for HEV VLP assembly. Although the HEV virion assembly mechanism remains unclear, our data indicate that the region consisting of ORF2 residues 126 to 601 is the kernel element for the monomer-monomer interaction and thus initiates VLP assembly.

Recombinant HEV VLPs themselves can be candidates for parenteral as well as oral hepatitis E vaccines (9, 10), and these VLPs have potential as mucosal vaccine carrier vehicles for the presentation of foreign antigenic epitopes through oral administration (13). Furthermore, HEV VLPs can be a vector for gene delivery to mucosal tissue for the purposes of DNA vaccination and gene therapy (20). The results of the present study provide the basic tool to construct VLPs having novel functions.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tomoko Mizoguchi for secretarial work, Thomas Kieselbach for help with the mass spectrometry, and Leif Bergman for building EXPLORER modules.

The study was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants, including Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Research on Hepatitis, Research on Human Genome, Tissue Engineering, and Research on Food Safety, from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. This work was sponsored by grants from the Swedish Research Council to R.H.C. and L.X. A grant from the National Science Council, Taiwan, supported the work of J.C.Y.W.

#### REFERENCES

- Baker, T. S., and R. H. Cheng. 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116:120-130.
- Balayan, M. S., A. G. Andjaparidze, S. S. Savinskaya, E. S. Ketiladze, D. M. Braginsky, A. P. Savinov, and V. F. Poleschuk. 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20:23-31.
- Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. Prasad, and M. K. Estes. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* 76:4044-4055.
- Cheng, R. H. 2000. Visualization on the grid of virus-host interactions, p. 141-153. *In* L. Johnsson (ed.), *Simulation and visualization on the grid*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- He, J., A. W. Tam, P. O. Yarbough, G. R. Reyes, M. Carl, P. O. Yarbough, A. W. Tam, K. E. Fry, K. Krawczynski, K. A. McCaustland, D. W. Bradley, and G. R. Reyes. 1993. Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* 31:2167-2173.
- Kar-Roy, A., H. Korkaya, R. Oberoi, S. K. Lal, and S. Jameel. 2004. The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase. *J. Biol. Chem.* 279:28345-28357.
- Koonin, E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes, and D. W. Bradley. 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8259-8263.
- Korkaya, H., S. Jameel, D. Gupta, S. Tyagi, R. Kumar, M. Zafrullah, M. Mazumdar, S. K. Lal, L. Xiaofang, D. Sehgal, S. R. Das, and D. Sahal. 2001.

- The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J. Biol. Chem.* **276**:42389–42400.
9. Li, T. C., N. Takeda, and T. Miyamura. 2001. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* **19**:3476–3484.
  10. Li, T. C., Y. Suzuki, Y. Ami, T. N. Dhole, T. Miyamura, and N. Takeda. 2004. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* **22**:370–377.
  11. Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **71**:7207–7213.
  12. Magden, J., N. Takeda, T. C. Li, P. Auvinen, T. Ahola, T. Miyamura, A. Merits, and L. Kaariainen. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J. Virol.* **75**:6249–6255.
  13. Niikura, M., S. Takamura, G. Kim, S. Kawai, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, T. C. Li, N. Takeda, and Y. Yasutomi. 2002. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* **293**:273–280.
  14. Olson, A. J., G. Bricogne, and S. C. Harrison. 1983. Structure of tomato bush stunt virus. IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **171**:61–93.
  15. Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**:287–290.
  16. Purcell, R. H., and S. U. Emerson. 2001. Hepatitis E virus, p. 3051–3061. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
  17. Robinson, R. A., W. H. Burgess, S. U. Emerson, R. S. Leibowitz, S. A. Sosnovtseva, S. Tsarev, and R. H. Purcell. 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **12**:75–84.
  18. Schofield, D. J., J. Glamann, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2000. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J. Virol.* **74**:5548–5555.
  19. Stewart, L. M. D., and R. D. Possee. 1993. Baculovirus expression vectors, p. 227–256. *In* A. J. Davidson and R. M. Elliotts (ed.), *Molecular virology: a practical approach*. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
  20. Takamura, S., M. Niikura, T. C. Li, N. Takeda, S. Kusagawa, Y. Takebe, T. Miyamura, and Y. Yasutomi. 2004. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* **11**:628–635.
  21. Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**:120–131.
  22. *Virus Taxonomy*. 2002. <http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/Ictv/fr-fst-g.htm>.
  23. Wickham, T. J., and G. R. Nemerow. 1993. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* **9**:25–30.
  24. Xiaofang, L., M. Zafrullah, F. Ahmad, and S. Jameel. 2001. A C-terminal hydrophobic region is required for homo-oligomerization of the hepatitis E virus capsid (ORF2) protein. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**:122–128.
  25. Xing, L., K. Kato, T. Li, N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R. H. Cheng. 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* **265**:35–45.
  26. Yarbough, P. O., A. W. Tam, K. E. Fry, K. Krawczynski, K. A. McCaustland, D. W. Bradley, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* **65**:5790–5797.
  27. Zafrullah, M., M. H. Ozdener, S. K. Panda, and S. Jameel. 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* **71**:9045–9053.
  28. Zhong, Y., J. Cheng, Y. Liu, J. Dong, J. Yang, and L. Zhang. 2000. Expression of human single-chain variable fragment antibody against non-structural protein 3 of hepatitis C virus antigen in *e. coli*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **8**:171–173. (In Chinese.)