

2. 精製ウイルス粒子の性状解析を行った。
3. 精製ウイルス粒子のマウスへの免疫を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. D Akazawa, T Date, K Morikawa, A Murayama, M Miyamoto, M Kaga, H Barth, T F Baumert, J Dubuisson, T Wakita. CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. J Virol. 2007 in press.
2. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. J Virol. 2007 in press.
3. K Morikawa, Z Zhao, T Date, M Miyamoto, A Murayama, D Akazawa, J Tanabe, S Sone, and T Wakita. The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. J. Med. Virol 2007 in press.
4. E Larrea, JI Riezu-Boj, L Gil-Guerrero, N Casares, R Aldabe, P Sarobe, MP. Civeira, JL Heeney, T Wakita, F Borrás-Cuesta, JJ. Lasarte, J Prieto. Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus Infection. J Virol. 2007. 81(7):3662-6.
5. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. Hepatology Research, 2007 in press
6. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. J Virol. 2007 81(3):1174-85.
7. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. Nature Protocols, 2006 1(5): 2334-2339.
8. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. Virology Journal 2006, 3:89
9. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. Arch Virol. 2007 152(3):457-61.
10. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. J Virol. 2006 81(1):309-18
11. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouillé. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. J Virol. 2006. 80(14):6964-72.
12. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious

hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. J Virol. 2006. 80(9):4633-9.

13. N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. J Virol. 2006. 80(9):4510-20.

14. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. Future Virology, 2006, 1: 519-525.

15. Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.

16. 脇田隆宇 ウイルス性肝炎 増刊号・ICPのためのウイルス学・臨床と微生物 2006, 33(10) 611-615

17. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆宇 HCV増殖機構の解明 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 143-6

18. 脇田隆宇 HCV発現細胞系の確立 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 147-51

19. 脇田隆宇 JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩 医学のあゆみ 2006, 218(10) 883-888

20. 脇田隆宇 C型肝炎ウイルス 分子細胞治療 2006 Vol.5, p364-367

21. 脇田隆宇 HCVレプリコンシステム カレントセラピー、2006, 24(8), 67

2. 学会発表および講演など

1) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」、第8回仙台Liver Meeting、仙台エクセルホテル東急、(2006, 6.24)

2) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス培養系の構築とその応用」、第7回横浜青葉・緑消化器病研究会、青葉台フォーラム、(2006, 7.21)

3) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の構築とその応用」、第4回湯沢リバーシンポジウム、NASPA ニューオータニ、(2006, 9.9)

4) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス培養系の開発とその展望」、第14回 Schering-Plough Liver Forum (Tokyo)、赤坂プリンスホテル、(2006, 11.18)

5) 脇田隆宇, ランチョンセミナー「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)

6) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系開発とその応用」、第10回東海ウイルス感染症研究会、安保ホール(名古屋市)、(2007, 1.13)

7) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の開発とその応用」、第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、笹川記念会館、(2007, 1.19)

8) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆宇、「HCV感染に関与する宿主因子の探索」、第2回広島大学肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館(2006, 6.18)

9) 森川賢一、脇田隆宇 C型肝炎ウイルス粒子のHuh7細胞への感染におけるHSPGおよび

- CD81の関与 第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26) ワークショップ1「ウイルス性肝炎研究の最前線」
- 10) 脇田隆宇、相崎英樹、鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関与する宿主因子の解析 第10回日本肝臓学会大会、札幌(2006, 10.11-12) シンポジウム6「ウイルス肝炎進展因子の解明」
- 10) 関根裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆宇、渡辺守、C型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討、第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26)
- 11) 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、C型肝炎ウイルス(HCV)による自然免疫受容体TLR3の発現制御、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 12) 森田奈央子、野村知里、石橋真理子、楠美嘉晃、杉谷雅彦、脇田隆宇、高山忠利、江角真理子、類洞内皮C型レクチンL-SIGNとC型肝炎ウイルス、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 13) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、脇田隆宇、HCV感染に関与する宿主因子の探索、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 14) 相崎英樹、原弘道、井上寧、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、マイケルライ、鈴木哲朗、HCV RNA複製を調節する分子シャペロンの同定とその機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 15) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、RNA Polymerase I promoter/terminator系を用いた感染性HCV粒子の作成、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 16) 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝子OASLの機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 17) 村山麻子、伊達朋子、森川賢一、赤澤大輔、脇田隆宇、HCV JFH-1株のRNA複製に必要な領域の同定、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 18) 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、高橋由利絵、阿部克俊、奈須純一、鈴木哲朗、脇田隆宇、水本清久、宮村達男、E6AP依存性HCV core蛋白分解の分子認識機構の解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 19) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCVのsubgenomic repliconを持つウイルス様粒子の形成と放出、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 20) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis Particles in vitro. 2<sup>nd</sup> international workshop on clinical pharmacology of hepatitis therapy. Vienna, Austria (2006, 4. 25).
- 21) T Wakita. In vitro cultivation of hepatitis C virus. Current strategy of new drug development for HCV. Biomedical Engineering Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan (2006, 5. 3).

22) T Wakita. Development of an Infectious HCV system JFH-1, a Fulminant Hepatitis. 2006 ASV Medical Virology Club Satellite meeting. Madison WI, USA (2006, 7. 1)

23) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Cultured Cells. 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, on July 1-5, 2006.

24) T Wakita. HCV and cell culture-progress and problems. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

25) T Wakita. HCV replication Update. 17th Asian Pacific Association for the study of the Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan (2007, 3. 27)

26) K Morikawa, T Date, A Murayama, M Kaga, D Akazawa, T Wakita.

CHARACTERIZATIONS OF HIGHLY PURIFIED INFECTIOUS HCV PARTICLES PRODUCED IN CULTURED CELLS. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

27) K Fukuda, I Shoji, M Shirakura, K Murakami, T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, T Shimoji, K Abe, J Nasu, Y Takahashi, S Sato, M Fukasawa, Y Yamakawa, M Nishijima, T Wakita, K Mizumoto, T Miyamura. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

28) T Masaki, R Suzuki, M Matsuda, T Miyamura,

T Wakita, T Suzuki. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

29) H Aizaki, Y Inoue, M Matsuda, T Shimoji, M Lai, T Wakita, T Miyamura, T Suzuki. Identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

30) A Murayama, T Date, M Miyamoto, K Morikawa, D Akazawa T Wakita. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

31) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Barth H, Baumert TF, Blum HE. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

32) D Akazawa T Date, K Morikawa, A Murayama, K Kaga, T Wakita CD81 expression is important for the heterogenous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8.

27-31)

33) Machida M, Huang J, Wang CH, Kondo Y, Sung VMH, Wakita T, Lai MMC. Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

34) Miyanari Y, Usuda N, Atsuzawa K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

35) K Ishiii, B Zhang, J Li, M Shirakura, K Morikawa, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

36) Kato T, Heller T, Matsumura T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang JT. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture. The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

37) M Imamura, N Hiraga, M Tsuge, C Noguchi, S Takahashi, E Iwao, Y Fujimoto, C Tateno, M Honda, S Kaneko, T Wakita, K Yoshizato, K Chayama. Infection of human hepatocyte

chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- $\alpha$ . The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

38) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

39) K Morikawa, T Wakita. Infectious hepatitis C virus particle binding to the Huh7 cell surface is mediated by glycosaminoglycans and its internalization by CD81. The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

なし

分担研究報告書

# ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリアクターによる ウイルス粒子産生細胞の培養

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官 石井 孝司

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。脇田らが分離した JFH-1 株により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に JFH-1 株の構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしないHCV の virus-like particles の作成を最終的な目標としている。

## A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV 感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCV のワクチン開発が望まれている。

これまでに HCV のワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったためである。Lohmann らが Con1 株の HCV レプリコンを開発して以来、培養細胞で HCV 複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1 株の HCV 全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかった。一方、脇田らが劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株は、これまでの HCV 株と比較して培養細胞

における複製能力が非常に高く、この JFH-1 株の合成全長 RNA を培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

哺乳類細胞に HCV の構造蛋白と subgenomic replicon RNA を供給することにより、HCV 様粒子（HCV-LPs）を形成させることができれば、HCV のゲノムパッケージングや粒子形成などライフサイクルの研究だけでなく、ワクチン開発研究にも有用と考えられる。

本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域を哺乳類細胞で発現させると、培養液中に（HCV-LPs）を分泌する。HCV-LPs を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

## B. 研究方法

JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

pEF ベクターは、EF プロモーターと Zeocin 耐性遺伝子を持ち、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成することができる。本ベクターの EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してショ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

上記の HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを、HCV の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に同様に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してショ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白と replicon RNA の培養上清中での挙動を調べた。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振

第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存する。

## C. 研究結果

1. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

JFH-1 株の構造領域遺伝子を pEF4 の EF プロモーターの下流に挿入し、Huh7 細胞に導入した。目的蛋白を発現している細胞株を選択したところ、培養上清にも HCV 構造蛋白が分泌されていることが確認された。また、培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 付近にコア蛋白が存在していることが確認され、HCV の粒子様構造物が形成されている可能性が示唆された。

2. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

Genotype 1b の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に JFH-1 の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入した細胞株を樹立した。この株からは構造蛋白と replicon RNA が分泌され、蔗糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白と RNA は比重が 1.15 前後の分画に回収された。この画分の構造蛋白と RNA の大部分がヘパリンカラムに結合したことから、同様に何らかの構造体を形成していることが示唆された。現在、この構造体の電顕観察と感染性の有無を調べている。

#### D. 考察

本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV の virus-like particles の作成を最終的な目標としている。HCV の構造蛋白を供給する方法として、昨年度は組換えワクチニアウイルスを用いる方法と薬剤耐性プラスミドを用いる方法の2つを検討したが、組換えウイルスを用いた場合には精製した HCV-LPs にワクチニアウイルスが少量ではあるが混入するため、VLP の感染性を検討することが困難であった。従って本年度は薬剤耐性プラスミドを subgenomic replicon を保持する細胞に導入する方法のみを検討した。その結果、構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認され、この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心で native な HCV 粒子と類似の比重の画分に集積していることが見出された。また、同じ画分から subgenomic replicon RNA も検出された。このことから、いずれの方法で構造蛋白を供給した場合も発現蛋白は HCV 粒子様構造を取っていることが示唆され、また、ウイルス様粒子中には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。この推定構造が正しければ、感受性細胞に一過性に感染し、細胞内で増殖しないウイルス様粒子である可能性が高く、目的とする粒子が取得できたことになる。今後は、粒子様構造を正しく取っているかどうかのさらに詳細な解析を行い、証明できれば感染性を有するかどうかの検討を行う。本粒子は感染性は有するが増殖せず、HCV 蛋白をすべて感染細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチン

チンとして用いることができると考えられる。

また、構造蛋白や replicon RNA に変異を入れ、粒子形成に重要な部分の解析を行うことも検討している。

#### E. 結論

HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV 様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。本ウイルス様粒子は、推定通りの構造を取っていれば一過性に感染するのみで増殖能のない HCV-like particle であり、HCV の粒子形成や細胞への吸着、侵入過程の解析に好適であり、また優れたワクチン候補であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, in press.
2. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Archives of Virology*, in press.
3. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).
4. Nakai K., Kimura-Someya T., Okamoto T., Ishii K., Lim C.K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K. and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for



- interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of Virology* 80: 11265-11273 (2006)
5. Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 253-258 (2006)
  6. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596 (2006)
  7. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
  8. Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).
  9. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006).
  10. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380 (2006).
  11. 李天成、石井孝司、武田直和 E 型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒 遺伝 印刷中
  12. 石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218 : 839-844 (2006)
  13. 石井孝司、李天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用 感染・炎症・免疫 36 : 44-47 (2006)
2. 学会発表
- 1) Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on HCV and Related Viruses, Cairns, Australia, August 27-31, 2006.
  - 2) 吉崎佐矢香、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の機能的解析とプロテオーム解析、日本分子生物学会、平成 18 年 12 月、名古屋。
  - 3) 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本綾：SARS-coronavirus と *Mycoplasma fermentans* の共感染が細胞に及ぼす影響、第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 1 月、名古屋。
  - 4) 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男：C 型肝炎のサロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染マーマセットの解析、第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 1 月、名古屋。
  - 5) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 1 月、名古屋。
  - 6) 水谷哲也、遠藤大二、白戸憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一：新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法 (LAV 法)、第 142 回日本獣医学会、平成 18 年 9 月、山口。
  - 7) 横田隆徳、石井孝司、榎昇、矢野純一、榎本信幸、明里宏文：siRNA の静脈注射による C 型肝炎の遺伝子治療：サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルによる有効性の検討、第 42 回日本肝臓学会総会、平成 18 年 5 月、京都。
- G. 知的所有権の取得状況
1. 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DIs 株。・2004 年 8 月 23 日出願
  2. 2004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、およびその利用。・2004 年 8 月 2 日出願

## ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発

東レ株式会社医薬研究所 望月 英典

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことであるが、JFH-1 株の発見により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、JFH-1 株のレプリコン複製系を用いてウイルス産生能の高い細胞を見出し、ウイルス粒子の大量調整法と精製法の開発を目指す。

### A. 研究目的

肝炎ワクチン開発のためには、HCV 高産生細胞培養系の開発が必須要件である。HCV 産生細胞培養系は、①細胞の中で HCV ゲノムの複製能が起こり、②感染する粒子として組み立てられてウイルスとして産生される2つの要件から成っている。最近の研究からHCV感染には細胞表面のCD81分子発現が重要であることが明らかとなった。また、ウイルス複製は異なる宿主因子に制御されている。この二つの観点から感染および複製効率が良くウイルス培養に適した細胞株の樹立を試みた。さらに、遺伝子型1bの表面蛋白をもつキメラウイルス粒子の作製を試みたので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. HCV感染に係わる宿主因子の解析

JFH-1 株、HCVは従来の Huh7 細胞にのみ感染可能だがその感染効率は1%以下と低い。感染感受性の異なる細胞株の混在を考えて、Huh7 細胞を限界希釈法によりクローニングして亜細胞株を得た。亜細胞株をHCV 感染性、レプリコンの複製感受性、細胞表面

マーカーの解析を行った。

#### 2. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

細胞培養系でのHCV粒子大量生産を目指し、HCV感染細胞のマイクロキャリアによる培養を検討した。

#### 3. Genotype 1b の株由来構造蛋白をもつキメラウイルスの作製

我が国および欧米諸国においてHCVの主要な遺伝子型は1型である。現在感染性の確認されているウイルス株はJFH-1株のみで、その遺伝子型は2aである。そこで、JFH-1株の構造領域遺伝子を遺伝子型1bに組み換えたキメラウイルスの作製を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべてのDNAおよび病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべてのDNAに関して組み換えDNA実験計画を提出

し承認を得ている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

## C. 研究結果

### 1. HCV感染に係わる宿主因子の解析

従来の Huh7 細胞から限界希釈法により 70 クローンの亜細胞株を得た。HCV の感染性を比較すると親株よりも最大 10 倍程度まで感染性の良いクローンや感染性のより低い細胞株、さらに感染性の全くない細胞株が存在することが明らかとなった。次にルシフェラーゼ遺伝子を持つレプリコンによる HCV 遺伝子の複製感受性を検討すると、複製感受性も様々な程度の細胞株が存在したが、感染感受性と複製感受性の間に相関関係は無かった。そこで、HCV の感染性に関与することが報告されている細胞表面マーカーを解析した。CD81, SR-B1, LDLr について検討すると、CD81 の発現の有無が亜細胞株の感染感受性と相関していることが明らかとなった。つまり、CD81 の発現がある細胞株は感染感受性があり、CD81 の発現のない細胞株では感染性が見られなかった。さらにレプリコンによる解析により、CD81 を発現していない細胞は複製感受性が高かった。そこで、CD81 を発現せず、感染感受性の無い細胞株 (Huh7-25) に CD81 発現プラスミドのトランスフェクションにより、CD81 を強制発現すると感染感受性が回復した。さらに CD81 を持続して発現する細胞株を樹立した (Huh7-25-CD81)。この Huh7-25-CD81 はこれまでに報告された Huh7.5.1 などの細胞よりも高い感染感受性を示し、ウイルス培養に適した細胞株であることが明らかとなった。

### 2. マイクロキャリアによる HCV 感染細胞の培養

ウイルスを大量に取得するためには HCV 感染細胞を平面培養するよりもマイクロキャリア上で細胞を培養して、スピナー培養を行うことで、効率よく、高濃度のウイルス培養液を取得できると考えられる。そこで前項で樹立した Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上に培養する条件を検討した。しかし、至適条件下で Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上で培養し、HCV を感染させると、細胞増殖が停止して培養液中のウイルス産生量があまり増加しないことが明らかとなった。そこで、ウイルス感染細胞の培養条件の至適化を試みている。

### 3. Genotype 1b の株由来構造蛋白をもつキメラウイルスの作製

3 種類の遺伝子型 1b HCV 株の構造領域遺伝子を JFH-1 株の全長遺伝子に組み換えて、キメラウイルス遺伝子を作製した。全長 RNA を合成して、Huh7 細胞にトランスフェクションして、ウイルス産生を検討した。3 種類のキメラウイルスの中で 1 種類のキメラウイルスは持続的にウイルスが産生されて、その産生量は遺伝子型 2a のウイルスに匹敵した。このキメラウイルスは Huh7 細胞に感染性を示した。現在このキメラウイルスの大量取得を試みている。

## D. 考察

Huh7 細胞をクローニングすることにより、親細胞株中には感染感受性の異なる亜細胞株が混在していることが明らかとなった。感染感受性を決定する重要な宿主因子は細胞表面の CD8

1分子であった。また、ウイルス複製感受性は逆にCD81発現の無い亜細胞株で高いものが見られた。そこで、CD81を強制発現して得られた Huh7-25-CD81 細胞は感染感受性が高く、ウイルス培養に適していると考えられた。HCVの感染感受性にはさらに多くの宿主因子が関与していると考えられている。最近では肝細胞のタイトジャンクションに発現する Claudin-1 という分子がHCV感染に重要であることが報告された。従って、関与する宿主因子の発現を調整することにより感染感受性をコントロールできると考えられる。また、ウイルス粒子を大量に取得するために、より効率の良い感染細胞培養法を開発する必要がある。今回はマイクロキャリア上での感染細胞培養を試みた。感染前と感染後で培養の至適条件が異なることが示唆された。従って、今後は感染細胞の至適培養条件を探索することが必要であると考えられた。

異なる遺伝子型の感染性ウイルス粒子を取得することはHCVワクチン開発において重要である。今回の検討で、ウイルス粒子産生効率の良い遺伝子型1bのキメラウイルスを作製することができた。培養細胞に適したウイルスゲノム配列を明らかにすることが必要である。

#### E. 結論

1. HCV感染感受性の高い細胞株 (Huh7-25-CD81) を樹立した。
2. ウイルス粒子を大量に取得するための感染細胞培養法を検討した。
3. 遺伝子型1bの構造領域遺伝子を持つキメラウイルスを作製した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

特願 2006-510335 (対応する国際出願 W02005080575A1)

ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにC型肝炎ウイルス粒子の作製方法

特願 2006-532743 (対応する国際出願 W20006022422A1)

自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノム RNA

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
15) Kato T. (脇田)	Development of an Infectious HCV Cell Culture System	Tan, S-L	Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology	Horizon Bioscience	Norfolk, UK	2006	451-464
28) Ishii K (石井)	Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS	Mizutani T	SARS	Transworld Research Network	Kerala, India	2006	107-117

#### 雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) D Akazawa. (脇田)	CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones.	Journal of Virology	in press		2007
2) Kato T. (脇田)	Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture.	Journal of Virology	in press		2007
3) K Morikawa (脇田)	The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and	Journal of Medical Virology	in press		2007

	uptake of infectious HCV particles.				
4) E Larrea. (脇田)	Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus Infection.	Journal of Virology	81(7)	3662-6	2007
5) Date T. (脇田)	An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain.	Hepatology Research.	in press		2007
6) Shirakura M. (脇田)	The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein.	Journal of Virology	81(3)	1174-85	2007
7) Kato T. (脇田)	Cell culture and infection system for hepatitis C virus.	Nature Protocols.	1(5)	2334-2339	2006
8) SL Uprichard. (脇田)	Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells.	Virology Journal.	3:	89	2006
9) Shirato-Horikoshi H. (脇田)	Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens.	Arch Virol.	152(3)	457-61	2007
10) Wagoner J. (脇田)	Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection.	Journal of Virology	81(1)	309-18	2006

11) E Blanchard. (脇田)	Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis	Journal of Virology	80(14)	6964-72	2006
12) T Kanda (脇田)	Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes	Journal of Virology	80(9)	4633-9	2006
13) N Ishii (脇田)	Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus	Journal of Virology	80(9)	4510-20	2006
14) Kato T. (脇田)	A novel virus culture system for hepatitis C virus	Future Virology	1:	519-525	2006
16) 脇田隆字	ウイルス性肝炎	臨床と微生物	33(10)	611-615	2006
17) 相崎英樹 (脇田)	HCV増殖機構の解明	別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver. 3	II. 肝・胆・膵	143-6	2006
18) 脇田隆字	HCV発現細胞系の確立	別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver. 3	II. 肝・胆・膵	147-51	2006
19) 脇田隆字	JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩	医学のあゆみ	218(10)	883-888	2006
20) 脇田隆字	C型肝炎ウイルス	分子細胞治療	Vol. 5	364-367	2006
21) 脇田隆字	HCVレプリコンシステム	カレントテラピー	24(8)	67	2006
22) Ishii K	GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of	Microbes and Infection	in press		2007



(石井)	GBV-B in extrahepatic tissues <i>in vivo</i> .				
23) Mizutani T (石井)	Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells.	Archives of Virology	in press		2006
24) Mizutani T (石井)	System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases	Emerging Infectious Diseases	13	322-324	2007
25) Nakai K (石井)	Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein	Journal of Virology	80	11265-11273	2006
26) Matsuyama S (石井)	Enhancement of SARS-CoV infection by proteases	Adv. Exp. Med. Biol.	581	253-258	2006
27) Ishii K (石井)	Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine	Adv. Exp. Med. Biol.	581	593-596	2006
29) Mizutani T (石井)	Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells	BBRC	347	261-265	2006
30) Murakami K	Production of infectious hepatitis C virus particles	Virology	351	381-392	2006

(石井)	in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b				
31) Ishii K (石井)	Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs	Virology	351	368-380	2006
32) 李天成 (石井)	E 型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒	遺伝	in press		2007
32) 石井孝司	SARS コロナウイルス研究の最前線	医学のあゆみ	218	839-844	2006
33) 石井孝司	肝炎ウイルス VLP の作成と応用	感染・炎症・免疫	36	44-47	2006

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

## CD81 Expression Is Important for the Permissiveness of Huh7 Cell Clones for Heterogeneous Hepatitis C Virus Infection<sup>∇</sup>

Daisuke Akazawa,<sup>1,2</sup> Tomoko Date,<sup>2</sup> Kenichi Morikawa,<sup>2</sup> Asako Murayama,<sup>2</sup> Michiko Miyamoto,<sup>3</sup> Minako Kaga,<sup>2</sup> Heidi Barth,<sup>4</sup> Thomas F. Baumert,<sup>4†</sup> Jean Dubuisson,<sup>5</sup> and Takaji Wakita<sup>2\*</sup>

Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries, Inc., Kanagawa, Japan<sup>1</sup>; Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan<sup>2</sup>; Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo, Japan<sup>3</sup>; Department of Medicine II, University of Freiburg, Freiburg, Germany<sup>4</sup>; and CNRS-UPR2511, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France<sup>5</sup>

Received 22 July 2006/Accepted 14 February 2007

Huh7 cells constitute a permissive cell line for cell culture of hepatitis C virus (HCV) particles. However, our Huh7 line shows limited permissiveness for HCV. Thus, in this study we set out to determine which host factors are important for conferring permissiveness. To analyze the limited permissiveness of our Huh7 cells, 70 clones were obtained after single-cell cloning of parental Huh7 cells. The cloned Huh7 cells exhibited various levels of HCV pseudoparticles and JFH-1 virus infection efficiency, and some clones were not permissive. A subgenomic replicon was then transfected into the cloned Huh7 cells. While the replication efficiencies differed among the cloned Huh7 cells, these efficiencies did not correlate with infectious permissibility. Flow cytometry showed that CD81, scavenger receptor class B type I, and low-density-lipoprotein receptor expression on the cell surfaces of the Huh7 clones differed among the clones. Interestingly, we found that all of the permissive cell clones expressed CD81 while the nonpermissive cell clones did not. To confirm the importance of CD81 expression for HCV permissiveness, CD81 was then transiently and stably expressed on a nonpermissive Huh7 cell clone, which was consequently restored to HCV infection permissiveness. Furthermore, permissiveness was down-regulated upon transfection of CD81 silencing RNA into a CD81-positive cell clone. In conclusion, CD81 expression is an important determinant of HCV permissiveness of Huh7 cell clones harboring different characteristics.

Hepatitis C virus (HCV) is a worldwide human pathogen, and most infected patients progress to chronic liver disease. The primary therapy for HCV is treatment with pegylated interferon and ribavirin; however, these agents do not cause a marked decline in the virus titers of all treated patients. Thus, the elucidation of native virus-host interactions is necessary to develop new, more effective therapies. However, the lack of a robust cell culture system to produce infectious virions has hampered research. That said, in a great boon to HCV research, a cell culture system that allows the whole life cycle of HCV to be investigated was recently developed (22, 34, 41).

HCV is an enveloped virus that belongs to the *Hepacivirus* genus in the *Flaviviridae* family (23). Cell attachment of flaviviruses generally leads to endocytosis of bound virions. Several molecules have been proposed as cell entry receptors of HCV; most of these have been identified based on binding with soluble recombinant E2 protein or HCV-like particles (2, 3, 12, 25, 30, 31). Putative HCV receptors include CD81 (30), low-density-lipoprotein (LDL) receptor (1), scavenger receptor class B type I (SR-BI) (31), and several molecules that induce concentration of viral particles at the cell surface. Infectious HCV pseudoparticles (HCVpp) harboring E1E2 glycoproteins (5, 11) have substantiated the functional roles of the candidate

receptors CD81 and SR-BI in HCV entry (5, 6, 15). The importance of CD81 for HCV entry was recently confirmed using cell-cultured HCV particles (22, 34). Furthermore, CD81 is important for postattachment of HCV particles on Huh7 cells (19, 28).

Huh7 and its interferon-cured cells are considered permissive cell lines for HCV particles (22, 34, 41), but our Huh7 cell line shows limited permissiveness. In the present study, we performed single-cell cloning of Huh7 cells and then analyzed heterogeneity. To investigate the host factors important for HCV infection, the Huh7 cell clones were then transiently infected with JFH-1 virus and comparisons of efficiency of replication and expression of candidate receptors were performed.

### MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and single-cell cloning.** Parental Huh7 cells, Huh7.5.1 cells (41) (a generous gift from Francis V. Chisari), and Huh7 cell clones were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum, as described previously (18). Parental Huh7 cells were diluted with medium and seeded into 96-well plates at 0.3 cells per well. Seventy single-cell-derived clones were then selected, and after 3 weeks their cells were passaged. The resultant Huh7 cell clones were stored at -80°C until use.

**Plasmids.** pJFH-1 (34), pSGR-JFH1/Luc, pSGR-JFH1/Luc-GND (17), and pFGR-JFH1 (10) were generated as previously reported. pFGR-J6/N2X-JFH1 was generated by replacement of the JFH-1 structural region (a core coding region to the BclI site) with pJ6CF (35) (a generous gift from Jens Bukh). pFGR-JFH1/EGFP and pFGR-J6/N2X-JFH1/EGFP were generated by replacement of the neomycin-resistant gene of pFGR-JFH1 and that of pFGR-J6/N2X-JFH1 with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene from pEGFP-N3 (Clontech, Mountain View, CA). pcDNA3.1-CD81 and the vesicular stomatitis virus (VSV) G protein-expressing construct pCAG-VSVG (27) were

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Phone: 81-3-5285-1111. Fax: 81-3-5285-1161. E-mail: wakita@nih.go.jp.

† Present address: UMR INSERM-ULP 748, Université Louis Pasteur, 3 rue Koeberlé, 07000 Strasbourg, France.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 28 February 2007.