

次に、無作為に抽出した豚血清 121 例を用いて、間接蛍光抗体法 (IFA) と ELISA 法による HEV 抗体の検出比較を行った。IFA は、HEV G3 カプシド蛋白を発現する組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を抗原とし、被検血清を 10 倍希釈より 4 倍階段希釈して実施した。ELISA 法は OD 値 0.2 以上を陽性とした。

C. 研究結果

HEV の経口投与において、3 日齢と 30 日齢の豚間で糞便ならびに血清中での HEV

RNA の検出期間ならびに検出量に違いがみられた。すなわち、糞便中の HEV RNA は、3 日齢の豚ではウイルス投与後 7 日 (7 PID) から観察期間中検出された。一方、30 日齢では HEV RNA は 3-7 PID より検出されたが、検出期間は 3 日齢のそれに比べて短く、検出される RNA 量のピークも 1/100 から 1/1000 と低値であった。血清中の HEV RNA は、3 日齢では 14 PID から検出されたが、30 日齢の豚では全く検出されなかった (図 1)。

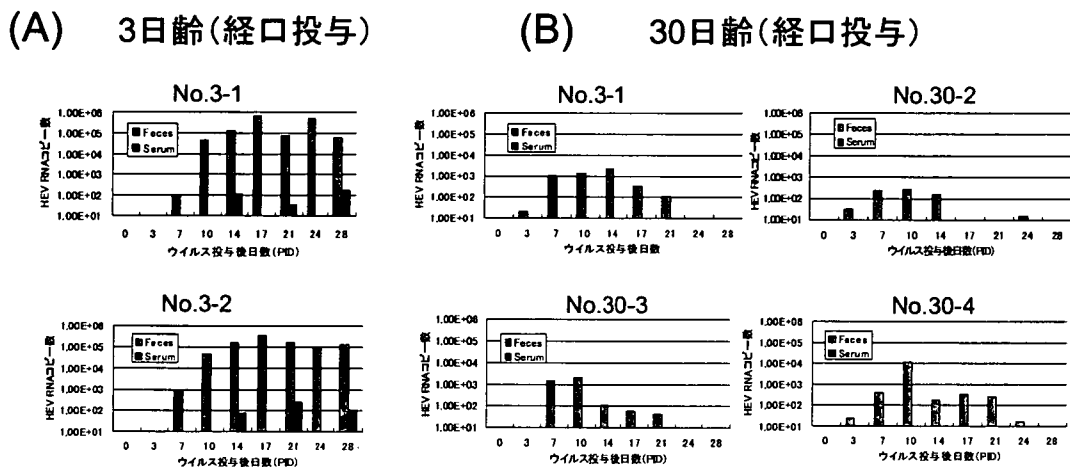


図1. HEV経口投与豚(A, 3日齢; B, 30日齢)での糞便ならびに血清中のHEV RNA量

HEV の静脈内投与では、3 日齢と 30 日齢の豚間では糞便ならびに血清中の HEV RNA 検出時期や検出量に大きな違いは認められなかった (図 2)。

血清中の IgG 抗 HEV 抗体の推移において、

30 日齢で HEV を投与した豚は 3 日齢の豚 (経口投与ならびに静脈内投与) に比べて IgG 抗体の検出される時期が早い傾向にあった (図 3)。

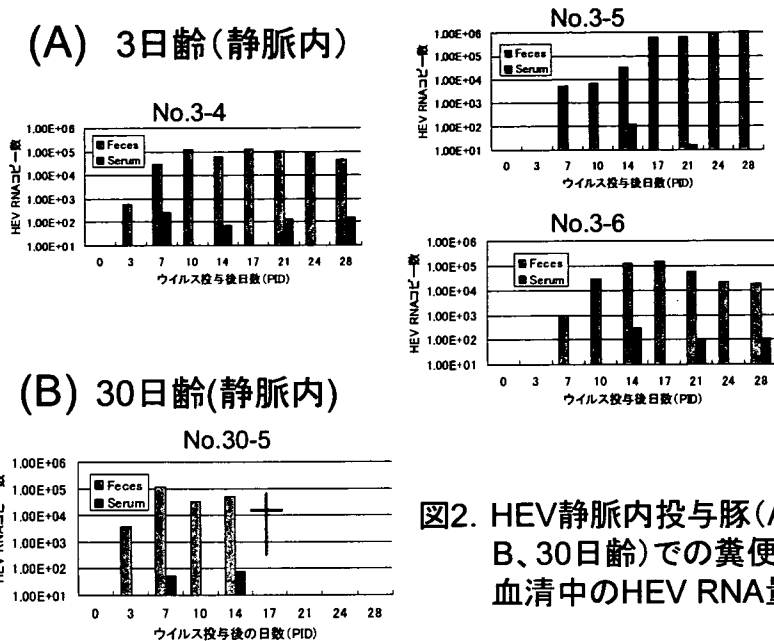


図2. HEV静脈内投与豚(A、3日齢; B、30日齢)での糞便ならびに血清中のHEV RNA量

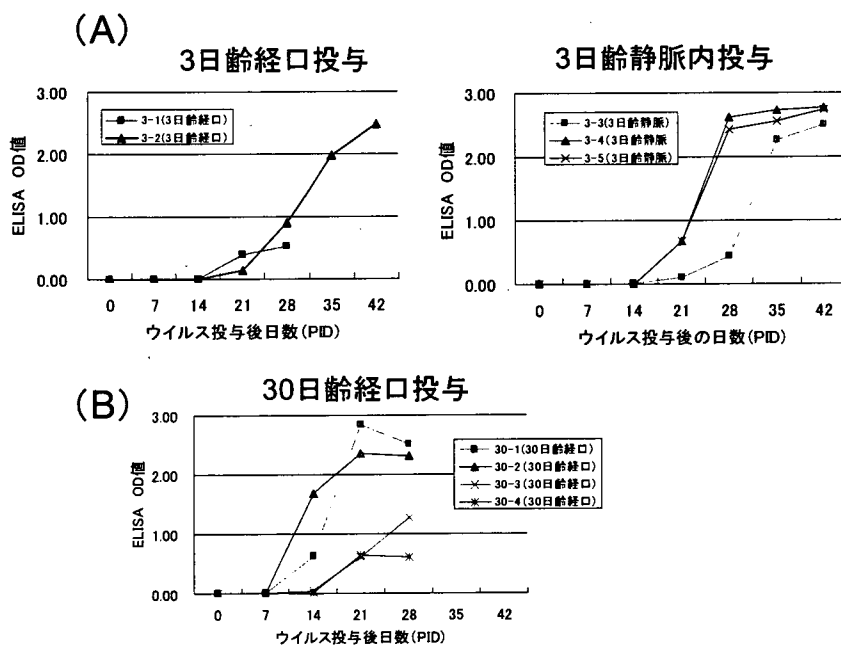


図3. HEV投与豚(A、3日齢; B、30日齢)の血清中IgG抗HEV抗体の推移

IFA 抗体価と ELISA OD 値の相関係数は 0.94、判定の一致率は 89%と、相関係数、

一致率とも良好であった（図4）。

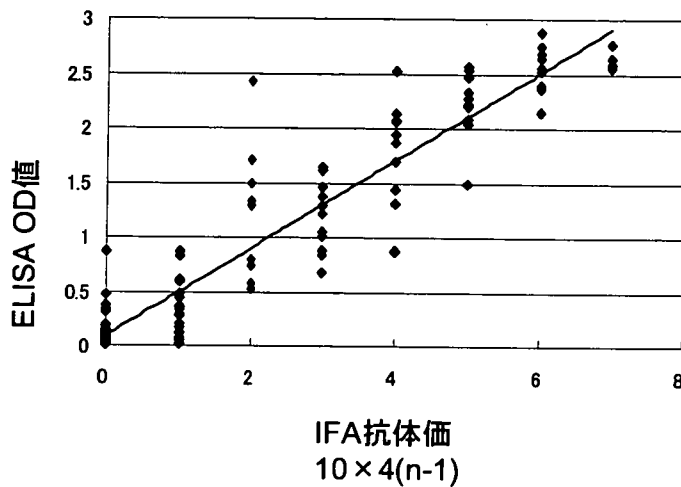


図4. 豚血清121例でのHEVに対するELISA値とIFA抗体価

D. 考察

HEVの経口投与において、日齢の違いによりHEVの感染性が異なることが示唆された。これまで豚におけるHEVの実験感染は経口投与では感染は困難であった。その原因として、供試された豚の日齢が高いことが今回の成績から推測された。次に、3日齢豚で認められた血清中の抗体応答の遅延は液性免疫機能の未熟に起因したと考えられた。

HEVに対するIFA抗体価とELISA OD値は、相関係数ならびに一致率とも良好であった。このことから、VLPを用いたELISA法はHEVの抗体検査において有効な方法であると考えられた。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. HEVの経口感染において豚の日齢が進むにつれて感受性が低下する可能性がある。
2. VLPを用いたHEV抗体検出用ELISA

法は有効な方法である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
和文解説

恒光 裕. E型肝炎. 人獣共通感染症, 養賢堂 39-45, 2007.

誌上発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究報告書

HBV, HCV中空粒子を利用した新規診断系の開発

分担研究者 勝二郁夫 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 HBVは遺伝子型分類が可能になり、外来性の遺伝子型HBVが日本に侵入し、感染が拡大していることが指摘されている。そこで、様々な遺伝子型のHBVを診断できる簡便な検査系を確立することが必要である。効率よくHBs抗原粒子を分泌させるために種々の遺伝子型のHBVクローンを用いHBs抗原分泌機構を解析した。ヨーロッパ型のgenotype A (HBV-Ae)は本邦に多いgenotype C (HBV-CA)より複製効率は低いものの、上清中への分泌効率が高かった。HCVはエンベロープ抗体検出系が存在せず、より効率のよいウイルス産生系の樹立が必要である。今回、HCV J6/JFH1株の継代培養により従来より感染価の高いウイルス産生細胞を樹立することを試み、従来より10-100倍感染価の高いウイルス産生系の樹立に成功した。ウイルス遺伝子の適合変異について解析を進めている。

A. 研究目的

近年、B型肝炎ウイルス(HBV)は従来の血清分類だけでなく、遺伝子解析により8つの遺伝子型に分類できるようになった。本邦では多くの一過性HBV感染は急性肝炎の発症のみで完治すると考えられてきたが、遺伝子型分類による臨床疫学研究が進むにつれて、遺伝子型により慢性化しやすいもの、また慢性肝炎から肝癌に移行しやすい遺伝子型が存在することが指摘されるようになってきた。ヨーロッパ型のgenotype Aが性交感染症として日本国内、特に大都市部に侵入、拡大していることが疫学的に示されている。そこで、遺伝子型分類を簡便に検査できる方法の開発、また、臨床病態との関連を明らかにし、HBVの適切な診断法、予防法、治療法の開発が急務である。

また、C型肝炎ウイルスの診断法は飛躍的に進歩しているが、ウイルスの中和

やワクチン効果の判定に重要な抗エンベロープ抗体検出系は未だ確立できていない。

いずれのウイルスにおいても効率よくウイルスを増殖させる手段が未だ確立されておらず、大量のウイルス抗原を調製できないことが主たる原因であると考えられる。また、ネイティブなウイルスと同様な形態と抗原性を有するウイルス抗原の産生は極めて困難であり、診断における特異性と感度を低下させる一因になっている。この意味で、ウイルス様中空粒子(virus-like particles, VLP)が大量に産生できれば、ワクチン開発と診断試薬の性能向上の両面において格段の進展が期待できる。

そこで、今回はB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の中空粒子を効率よく発現し、ワクチン開発と検査・診断法の向上を目指すための基礎

的検討を行った。

B. 研究方法

(1) pUC19 にクローニングした様々な遺伝子型の HBV クローン (名古屋市立大学の溝上雅史教授、田中靖人准教授から供与) を Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBV 複製を ELISA 系および real time PCR 法で測定した。そして、上清への HBs 抗原分泌効率を比較した。

(2) 細胞上清中への HBs 抗原分泌効率が高いクローンを選択し、Huh-7 細胞で恒常的に発現する細胞株を樹立した。

(3) 上清中に分泌される HBs 抗原の精製方法を検討した。

(4) HCV J6/JFH 株を用いて in vitro でウイルス RNA を合成し、Huh-7.5 細胞株へエレクトロポレーション法で RNA を細胞内へ導入した。この HCV 感染細胞を 3-4 日ごとに継代し、上清中のウイルス感染価を測定した。

(5) 継代により上清中の感染価が増大したものについてダイレクトシーケンシング法で遺伝子解析を行い、どの領域に変異が入っているか検討した。ウイルス感染価に影響をおよぼす適合変異を解析した。

C. 研究結果

(1) HBV genotype A, B, C の各クローンを Huh-7 細胞にトランスフェクトして、上清中への HBs 抗原を測定した。genotype A (HBVAe) は genotype C (HBVCA) と比較して遺伝子複製の効率は高く

ないにもかかわらず、上清中に分泌する効率が高いことが再現良く示された。

(2) pUCHBV-Ae と pZeoSV2 を Huh-7 細胞に co-transfect し、Zeocin で選択することにより HBV-Ae を恒常的に発現する Huh-7 細胞株の樹立に成功した。この中から HBs 抗原の分泌効率の高いクローンを選別した。

(3) ショ糖密度勾配遠心法で HBs 抗原の分離調整法を解析した。1.10-1.15g/ml 付近に効率よく HBs 抗原粒子が回収された。

(4) HCV の増殖系において継代することにより上清中に放出されるウイルスの感染力価が HCV P-1 株に比べて 10-100 倍増大した。

(5) HCV P-47 株感染細胞は持続感染状態を維持し、高い感染力価のウイルスを産生し続けた。

(6) ダイレクトシーケンシング法で HCV ゲノムのどこに適合変異があるか解析を進めている。

D. 考察

HBV genotype A 株 (HBV-Ae) は genotype C 株 (HBV-CA) に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高いことが明らかとなった。HBs 抗原粒子分泌を制御する分子機序は必ずしも明らかになっていない。今回、分泌効率が異なるクローンを同定することができた。これらのクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較することで、どの遺伝子領域が HBs 抗原粒子分泌を制御しているか明らかにできる可能性が示された。次年度以降に詳細に検討し、明らかにしていきたい。

次に、HBV-Aeを持続的に発現するHuh-7細胞株を樹立し、HBs抗原の分泌効率が高いクローンを選択することができた。この細胞株を用いて効率良くHBs抗原粒子を採取する条件検討を行っている。しょ糖密度勾配遠心法でHBs抗原粒子が回収される条件が明らかとなったので、今後、調整法の最適化を検討していきたい。

HCVの粒子産生系の検討において、HCV J6/JFH1株感染Huh-7.5細胞を継代培養したところ、継代に応じて感染力価はP-1株に比べて10-100倍上昇した。P-47株感染細胞は持続感染状態を維持し高い感染力価のウイルスを産生し続けることが示された。感染力価の上昇にはHCVゲノムへの適合変異が関与していると考えられ、現在、適合変異遺伝子配列を解析している。HCVゲノム上のどの遺伝子変異がウイルス粒子産生、アセンブリ、放出に関与しているか明らかにすることにより、HCV粒子の粒子形成、分泌機構に重要なゲノム配列が分かり、より効率のよい粒子産生系が構築できるものと期待される。

E. 結論

genotype A (HBV-Ae)は複製効率は高くないにも関わらずgenotype C (HBV-CA)より上清中への分泌効率が高いことが分かった。HBV-AeのHBs抗原粒子を持続発現するHuh-7細胞株を樹立した。また、HCV J6/JFH1株の継代培養により従来より感染力価の高いウイルス産生細胞を樹立することを試み、従来より10-100倍感染力価の高いウイルス産生系の樹立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.*, 2007, 42: 411-423.

2) Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system., 2008, *J Virol Methods.*, 148, 174-181.

2. 学会発表

1) Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes. Murakami K, Shoji I, Hamamoto I, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Glasgow, UK, September 9-13, 2007

2) Shoji I, Murakami K, Fukuda K, Osaki M, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. AASLD, Boston, November 2-6, 2007.

3) 血球系細胞におけるHCV JFH-1株の感染および複製の検討. 村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. 第55回日本ウイルス学会、2007年11月21-23日、札幌。

4) HCVコア蛋白と結合する新規宿主因子hnRNP1/H2の同定と相互作用解析. 阿部克俊、村上恭子、市村徹、高宮智史、大崎

一直、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫。第55回日本ウイルス学会、2007年11月21-23日、札幌。

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

培養細胞における E 型肝炎ウイルスの増殖

分担研究者 李天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨 E 型肝炎ウイルス (HEV) は増殖のための確実な細胞培養系が未だに樹立されていないウイルスである。細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。我々はブタから分離した遺伝子型 3 (G3) に属する HEV 株を PLC/PRF/5, A549, GL37 などの細胞に接種し、経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて測定し、HEV の増殖できる細胞、あるいはこれらの細胞で増殖できるウイルス株を検索した。現在、PLC/PRF/5 に感染したウイルス株の性状を解析している。

協力研究者

劉 蘭軍 (国立感染症研究所)

恒光 裕 (動物衛生研究所)

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus; 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。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20% に達するという報告もある。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、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかにされず、ワクチン開発のための基盤的情報が不足している。今回我々はブタから分離した遺伝子型 3 (G3) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5、ヒト肺ガン細胞 A549 およびアフリカミドリザル腎細胞 GL37 などに接種し、ウイルスの複製、増殖等の有無を観察し、HEV 培養細胞増殖系の樹立を試みた。

B. 研究方法

HEV 感染ブタ由来の肝臓組織をすりつぶし、PBS (-) で 10% 乳剤を作製した。ELISA 法および RT-PCR 法によってウイルス抗原と遺伝子を確認した。1 ml の肝細胞乳剤をそれぞれ PLC/PRF/5、A549 および GL37 に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、培養細胞で増殖するかどうかを評価した。

C. 研究結果および考察

G3 HEV を感染した PLC/PRF/5 細胞の上清に 5 日目から HEV-RNA が検出され、32 日目から HEV 構造蛋白が検出された。その後、HEV 構造蛋白および HEV-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、接種後 10 ヶ月が経った時点でも依然高いレベルを維持している。また、培養上清から分離したウイルスのアミノ酸配列は感染出発材料から分離したウイルスのアミノ酸配列と一致し、培養細胞での複製、増殖による変異が見られなかった。

蛍光抗体を用いた免疫染色法では HEV 構造蛋白が細胞質に分布していることが示された。さら

に構造蛋白をウェスタンブロット法で解析した結果、糖鎖修飾されることも示唆された。糖鎖修飾の意義、およびそのメカニズムをさらに解析する必要がある。

D. 結論

HEV が増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、ウイルス増殖、複製のメカニズムの解明に新たな道が開かれる。又、これによって HEV の不活化条件、消毒薬の評価、ワクチン効果、さらに治療薬のスクリーニング等を *in vitro* で容易に検討することが可能になり、食品等からのウイルス除去に有力な科学根拠を提供できる。さらに、培養細胞の樹立によって生 E 型肝炎ワクチンあるいは不活化 E 型肝炎ワクチンの開発も可能となる。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. シジミからの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
2. 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
3. 加藤花名子, 佐藤幸代, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 土屋公幸, 仲谷淳, 鈴木和男, 樹金森弘, 李天成, 武田直和, 恒光裕, 池田秀利, 2007. 9. 野生動物における抗 E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査. 第 144 回日本獣医学会学術集会. 江別市

2. 論文発表

- (1) Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui

D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.

- (2) Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve *yamato-shijimi* (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2

- (3) Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.

- (4) Hiroshi Yamamoto, Li TC, Chihiro Koshimoto, Kaoru Itoh, Nobumoto Miyashita, Jiro Arikawa, Kenichi Yagami, Masahide Asano, Hideo Tezuka, Noboru Suzuki, Tsutomu Kurosawa, Tosiya Shihahara, Masato Furuya, Shiro Mori, Hiroshi Satoh, Kazuki Ohsawa, Kentaru Ibuki, Sung-IL Lee, Masakazu Kita, Naokazu Takeda. Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Japan. 2008. *Exp. Animals*. *In press*

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

HCVのsubgenomic repliconを持つウイルス様粒子の形成と性状解析

分担研究者 石井 孝司 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV) は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことが研究を困難にしていたが、劇症肝炎患者からクローニングされた 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

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症である。現在のウイルス保有者数は世界中で 1.7 億人 (HIV 感染者の 4 倍) にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの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たが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、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 (HCV-LPs) を大量に回収、精製する方法を開発することを目標とする。この技術が可能となれば、HCV-LPs を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討し、最終的には C型肝炎ワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

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

pEF4 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。

2. 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ヨ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

ヨ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、シヨ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 前後の画分に回収された。HCV のエンベロップ蛋白の 1 つである E2 はヘパリンと結合する性質があることが知られているが、上記の構造蛋白と RNA が共存するフラクションをヘパリンアフィニティカラムにかけたところ、構造蛋白と RNA の大部分はヘパリンカラムに結合した。このことから、分泌された構造蛋白は RNA と共に何らかの構造体を形成していることが示唆された。

D. 考察

本年度の研究により、HCV の構造蛋白を恒常的に発現する細胞株から構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認され、この構造蛋白はシヨ糖密度勾配遠心で 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、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給した場合、構造蛋白はシヨ糖密度勾配遠心上記と同様の画分に集積し、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、細胞株が subgenomic replicon を保持している場合、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。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感染細胞で増殖しないため、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. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* in press
2. Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 411-423 (2007).
3. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and

Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).

4. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007)
5. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).
6. 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*, 9, 515-521 (2007).
7. 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).
8. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中 (2007)
9. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 感染・炎症・免疫 37: 58-59 (2007)

2. 学会発表

1. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Ishii K., Wakita T. The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.
2. Akari H., Ishii K., Iwasaki Y., Iijima S., Maki N., Mori K., Katakai Y., Kimura N., Yoshizaki S., Ageyama N., Yokota T., Suzuki T., Miyamura T. Development of chronic GBV-B infection in marmosets with

- smoldering plasma viremia. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.
3. Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 8th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Washington DC, USA, May 27-31, 2007.
 4. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 11 回日本ワクチン学会、平成 19 年 12 月、横浜。
 5. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生された HCV ウイルスの免疫原性に関する検討、第 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 6. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 7. 岩崎優紀、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、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C 型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する、第 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 8. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、第 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
 9. 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析、第 55 回日本ウイルス学会、平成 19 年 10 月、札幌。
- G. 知的所有権の取得状況
- 1) 2007-167916・石井孝司他 3 名・UV による C 型肝炎ウイルスの不活化方法・2007 年 6 月 26 日出願
 - 2) 2005-287825・石井孝司他 6 名・新規ヒト C 型肝炎ウイルス粒子とその生産方法・2005 年 9 月 30 日出願、同海外出願
 - 3) 2005-287646・石井孝司他 6 名・感染性 C 型肝炎ウイルス粒子産生系・2005 年 9 月 30 日出願、同海外出願
 - 4) 2005-300350・石井孝司他 4 名・新規 RNA 結合ペプチド・2005 年 9 月 6 日出願

研究成果の刊行に関する一覧表

- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.*, 2007, 42: 411-423.
- Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system., 2008, *J Virol Methods.*, 148, 174-181.
- Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.
- Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve *yamato-shijimi* (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2
- Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.
- Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Itoh K, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mori S, Satoh H, Ohsawa K, Ibuki K, Lee S, Kita M, Takeda N. Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Japan. 2008. *Exp. Animals. In press*
- Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 411-423 (2007).
- Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).
- Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007)
- Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).
- 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*, 9, 515-521 (2007).
- 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).

Ishiguro N, Inoshima Y, Suzuki K, Tanaka T, Miyoshi T. Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into wild boar populations (投稿中)

田中智之、武田直和 ノロウイルスの現状と院内感染対策。 *感染症* 37 (3) : 94-104, 2007

田中智之、奥田真珠美 ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。 *小児科診療* 70 (6) : 985-990, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 院内発生時における感染拡大防止対策 - ノロウイルス
月刊薬事 49 (11) : 37-42, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒 *食と健康* 10: 6-14, 2007

田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和 ノロウイルス迅速抗原検査 *検査と技術* 36 (3) : 235-239, 2007

恒光 裕. E型肝炎. *人獣共通感染症*、養賢堂 39-45, 2007.

石井孝司、李 天成、武田直和 E型肝炎 *食品由来感染症と食品微生物* 中央法規出版 印刷中 (2007)

石井孝司、李 天成、武田直和 E型肝炎 *感染・炎症・免疫* 37 : 58-59 (2007)

Review

Molecular biology of hepatitis C virus

TETSURO SUZUKI, HIDEKI AIZAKI, KYOKO MURAKAMI, IKUO SHOJI, and TAKAJI WAKITA

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Infection with hepatitis C virus (HCV), which is distributed worldwide, often becomes persistent, causing chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. For many years, the characterization of the HCV genome and its products has been done by heterologous expression systems because of the lack of a productive cell culture system. The development of the HCV replicon system is a highlight of HCV research and has allowed examination of the viral RNA replication in cell culture. Recently, a robust system for production of recombinant infectious HCV has been established, and classical virological techniques are now able to be applied to HCV. This development of reverse genetics-based experimental tools in HCV research can bring a greater understanding of the viral life cycle and pathogenesis of HCV-induced diseases. This review summarizes the current knowledge of cell culture systems for HCV research and recent advances in the investigation of the molecular virology of HCV.

Key words: hepatitis C virus, translation, polyprotein processing, RNA replication, viral assembly, ubiquitin

Introduction

Hepatitis C virus (HCV), discovered in 1989, is a major etiologic agent of posttransfusion- and sporadic non-A, non-B hepatitis¹ and at present infects approximately 200 million people worldwide.^{2,3} Persistent infection with HCV is associated with the development of chronic hepatitis, hepatic steatosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.^{3,4-8} HCV is a small, enveloped RNA virus that belongs to the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family.^{9,10} Its genome consists of a single-strand of

positive-sense RNA of approximately 9.6kb, which contains an open reading frame (ORF) coding for a polyprotein precursor of approximately 3000 residues.¹¹ The precursor is cleaved into at least ten different proteins: the structural proteins core, E1, E2, and p7, and the nonstructural proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B (Fig. 1).

To date, six major genotypes of HCV have been identified that differ by 31%–34% in their nucleotide sequence and by about 30% in their amino acid sequence. It has been shown that HCV, like many other RNA viruses, circulates in infected individuals as a population of diverse but closely related variants referred to as quasispecies.¹² This quasispecies model of mixed virus populations may confer a significant survival advantage, because the simultaneous presence of multiple variant genomes and the high rate of generation of new variants allows rapid selection of mutants better suited to new environmental conditions.¹³

Specific anti-HCV drugs that efficiently block virus production are not yet available. The current standard care is combination therapy with interferon (IFN)- α and the nucleoside analog ribavirin, which cures about 40% of hepatitis C patients infected by HCV genotype 1, the most prevalent genotype in industrialized countries, and about 80% of those infected by genotype 2 or 3.^{14,15} Since many patients still do not benefit from the treatment and IFN therapy is associated with undesirable side effects such as headache, fever, severe depression, myalgia, arthralgia, and hemolytic anemia, development of innovative treatment alternatives for hepatitis C patients is immediately needed. Studies of HCV life cycle in cell cultures have been greatly facilitated by the development of genetically engineered viral genomes that are capable of self-amplifying to high levels (replicon system), and by recent establishment of a production system for recombinant infectious HCV. Such progress will aid in the development of significantly improved HCV antiviral agents.

Received: February 8, 2007 / Accepted: February 10, 2007
Reprint requests to: T. Suzuki

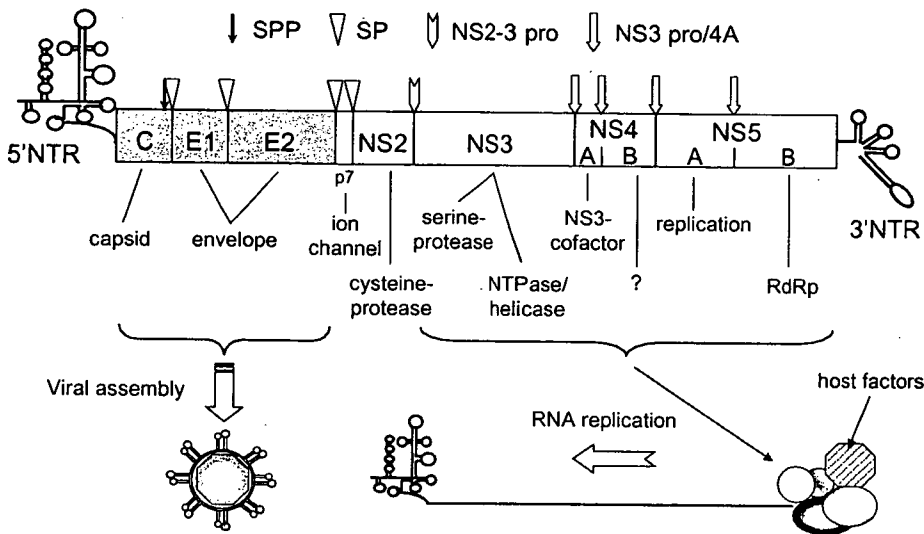


Fig. 1. Hepatitis C virus (HCV) genome organization and polyprotein processing. Posttranslational cleavages by signal peptide peptidase (*SPP*), signal peptidase (*SP*), NS2-NS3 protease (*NS2-3 pro*), and NS3 protease and NS4A complex (*NS3 pro/4A*) lead to the production of functional HCV proteins. *NTR*, non-translated region

Cell culture systems for HCV research

Although substantial information on HCV protein structure and function has been obtained from the use of a variety of cell culture and in vitro expression systems, for many years, HCV research has been hampered by the restricted host range and the inefficiency of cell culture models for viral infection and propagation. The development of the HCV replicon system, therefore, is a milestone in HCV research and has allowed examination of viral RNA replication in cell culture.¹⁶ Expression systems of heterologous virus genes based on RNA replicons have been established in a variety of positive-strand RNA viruses such as polio virus,¹⁷⁻²⁰ the alphavirus Semliki Forest virus,²¹ Sindbis virus,²²⁻²⁵ Kunjin virus,²⁶ human rhinovirus 14,²⁷ and bovine viral diarrhea virus.²⁸ In general, advantages of replicon systems are (1) a high level of gene expression and RNA replication, (2) easy construction of recombinants, and (3) a wide permissible host range.

The HCV replicons are typically composed of selectable, bicistronic RNA, with the first cistron containing the HCV 5' nontranslated region (NTR), which directs translation of the gene encoding the neomycin phosphotransferase, and the second cistron containing the internal ribosome entry site (IRES) of the encephalomyocarditis virus, which directs translation of HCV NS3 through NS5B region, and the 3' NTR. The prototype subgenomic replicon utilized a particular HCV genotype 1b clone termed Con1. Following transfection of RNA generated by in vitro transcription of the cloned replicon sequences into a human hepatoma cell line Huh-7, antibiotic G418-resistant cells could be obtained in which the subgenomic RNA replicated autonomously. RNA replication was first detected at relatively low frequency, followed by the identification of replicons harboring cell culture-adaptive mutations, which in-

creased the efficiency of replication initiation by several orders of magnitude.²⁹⁻³¹

Adaptive mutations were found primarily at the N-terminus of the NS3 helicase, in NS4B, and in the center of NS5A, which is upstream of the region putatively involved in IFN sensitivity. Most of the mutations in NS5A are located at highly conserved serine residues and lead to change in the phosphorylation state of NS5A.^{32,33} A combination of adaptive mutation in NS3 and NS5A resulted in the highest level of replication of a particular HCV genotype 1b isolate.³¹ Later work, however, has indicated that adaptive mutations can arise in most of the viral nonstructural proteins.^{34,35} The mechanisms by which adaptive mutations increase RNA replication efficiency are not well understood.

In the last 7 years, a variety of different replicons have been generated, including replicons with reporters or markers such as luciferase and green fluorescent protein, replicons from genotype 1a and 2a, and genome-length dicistronic HCV RNAs (genomic HCV replicons). HCV replicons with reporter genes allow us to execute fast and reproducible screening of large series of compounds for antivirals.³⁶⁻³⁸ Huh-7 cells are the most permissive for HCV replicons. However, variability in the permissiveness for replicons has been observed for a given Huh-7 cell pool, and the cells that are able to support efficient replication of the viral genome are enriched during selection such as G418 treatment. A so-called "cured" cell clone, which can be prepared by removing the replicons by treatment with IFN, supports viral replication to a much higher level in many cases and is useful for introducing genome-length HCV RNAs.^{39,40}

An HCV genotype 2a replicon with the JFH-1 strain, which was first isolated from the serum of a Japanese patient with fulminant hepatitis C by our group,⁴¹ replicates efficiently in not only Huh-7 cells but also other

hepatocyte-derived cell lines, HepG2 and IMY-N9, and nonhepatocyte-derived cell lines, HeLa and 293.⁴²⁻⁴⁴ Interestingly, the JFH-1 replicon does not require adaptive mutations for replicating in these cell lines, and enormously efficient RNA replication is detected by transient replication assay as well as by colony formation assay with G418 selection,⁴² suggesting that the JFH-1 genome can replicate autonomously without the help of drug selection or the requirement of adaptive mutations. This observation laid the basis for a breakthrough in HCV research.

Transfection of the full-length JFH-1 genome into Huh-7 cells leads to the production of HCV particles that are infectious both for naïve cells and for animal models.⁴⁵ As a first attempt, an in vitro transcribed full-length JFH-1 RNA was introduced into naïve Huh-7 cells, which is the original cell line used for subgenomic replicon studies. Efficient RNA replication in the transfected cells was detectable by Northern blot analysis, and the viral-enveloped particles, which are spherical structures with an outer diameter of approximately 55 nm, were secreted to the culture medium.⁴⁵ Secreted virus was found to be infectious, although at low efficiency, for naïve Huh-7 cells, and its infectivity can be neutralized by anti-CD81 antibody and hepatitis C patients' sera.⁴⁵ Subsequently, to increase the infection efficiency, "cured" Huh-7 cell lines such as Huh7.5, Huh7.5.1, and Huh7-Lunet were used. Infectivity of these cured cell lines with JFH-1 became more intense

compared with standard Huh-7 cells, and the virus titers released from cells freshly transfected with the JFH-1 genome were markedly increased by continuous passage of the cells carrying persistent replicating viral RNA.⁴⁶ Further, chimeric constructs with the core to NS2 region of another genotype 2a clone, J6, improved the infectivity.⁴⁷ Thus, this recombinant infectious HCV cell culture system opens avenues of biochemical and genetic studies of the HCV life cycle.

Besides isolating functional molecular clones of HCV that replicate to high levels, to generate a cell culture model that mimics natural host cell environments may be advantageous for improving HCV production systems suitable for studying the virus-host interaction. It is likely that HCV morphogenesis occurs in a complex cellular environment in which host factors may either enhance or reduce the assembly and budding process. Generally, the interaction of viruses with polarized epithelia in the host is one of the key steps in the viral life cycle. A variety of enveloped viruses mature and bud from distinct membrane domains of the host cells.⁴⁸⁻⁵¹ We found that a dicistronic HCV genome of genotype 1b supports the production and secretion of infectious HCV particles in two independent three-dimensional (3D) culture systems, the radial-flow bioreactor (RFB) and the thermoreversible gelation polymer (TGP), but not in monolayer cultures, although its productivity is much lower than that observed in the JFH-1 system⁵² (Fig. 2). The RFB system was initially aimed at the

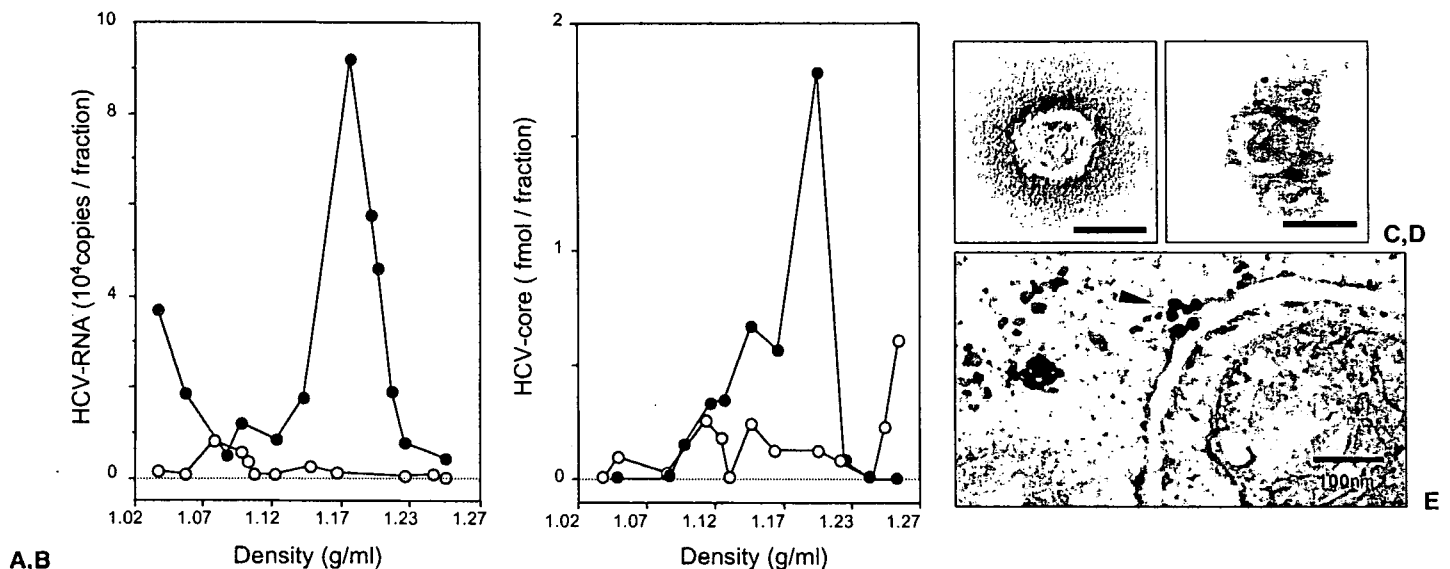


Fig. 2A–E. Production of HCV particles in the three-dimensional, thermoreversible gelatin polymer (TGP) culture of the Huh-7 cell line (RCYM1) carrying genome-length dicistronic HCV RNA of genotype 1b. **A, B** Sucrose density gradient analysis of culture supernatants of RCYM1 cells. The culture supernatants were fractionated and then HCV RNA (**A**) and core protein (**B**) in each fraction were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and real-time reverse transcription polymerase chain reaction, respectively. *Closed circles*, TGP culture; *open circles*, monolayer culture. **C, D** Electron microscopy of HCV particles in the supernatants of TGP-cultured RCYM1 cells. **C** Negative staining. **D** Immunogold labeling with an anti-E2 antibody. Gold particles, 5 nm; bars, 50 nm. **E** Silver-intensified immunogold staining with anti-E1 antibody. The *arrowhead* indicates virus-like particles reacting with anti-E1 antibody

development of artificial liver tissue, and the bioreactor column consists of a vertically extended cylindrical matrix through which liquid medium flows continuously from the periphery toward the center of the reactor.⁵³ In RFB culture, human hepatocyte-derived cells can grow spherically or cubically, and they retain liver functions such as albumin synthesis⁵³⁻⁵⁵ and drug-metabolizing activity mediated by cytochrome P450 3A4.⁵⁶ TGP is a chemically synthesized biocompatible polymer which has a sol-gel transition temperature, thus enabling us to culture cells three-dimensionally in the gel phase at 37°C and to harvest them in the sol phase at 4°C, without enzyme digestion.⁵⁷ In contrast to other matrix gels made from conventional natural polymers, TGP has several advantages that allow us to investigate the functional characteristics of epithelial cells, their tissue-like morphology, and their potential clinical applications. For example, the use of 3D culture materials other than TGP requires treatment with appropriate digestive enzymes or heating to collect cells grown as spheroids from the culture media, and the matrices may damage the cultured cells to some extent. A 3D culture system based on RFB and TGP, in which human hepatoma cells can assemble into spheroids with potentially polarized morphology, is a valuable tool in studies of HCV morphogenesis.

Translation

The approximately 341-nucleotide (nt)-long 5' NTR is one of the most conserved regions of the HCV genome, and the secondary structural model, which is also largely conserved, reveals four distinct RNA domains in the region, reflecting its importance in both viral translation and replication.⁵⁸⁻⁶¹ The 5' NTR forms four highly structured domains (domains I-IV), which may be conserved among HCV and related flaviviruses and pestiviruses,^{59,60} and it is functionally characterized as an IRES to direct cap-independent translation of the genome.^{62,63} To determine the minimal sequence required for HCV IRES-dependent translation, as in the earlier studies of picornaviruses, the bicistronic RNAs in which two reporter protein-coding sequences are separated by an IRES sequence were analyzed. Translation of the upstream reading frame occurs in a 5' end-dependent fashion, while translation of the downstream reading frame is driven by the IRES element. The IRES comprises nearly the entire 5' UTR of the genome. There is evidence to suggest that the first 12 to 30 nt of the coding sequence are also important for IRES activity.⁶⁴⁻⁶⁶ The first 40 nt of the 5' NTR, which includes a single stem-loop (domain I), is not essential for the translation; the 5' border of the IRES was mapped between nt 38 and 46.^{61,67,68} Domains II and III are relatively more complex

and contain multiple stems and loops.^{60,69} Domain IV consists of a small stem-loop containing the polyprotein start codon at nt 342 and forms a pseudoknot via base-pairing with a loop in domain III.

Recruitment of the 43S ribosomal complex, containing a small 40S ribosomal subunit, eukaryotic initiation factor (eIF) 3, and a tRNA-eIF2-GTP ternary complex, to mRNA molecules is critical for initiation of eukaryotic protein synthesis. The 40S subunit and eIF3 can bind independently to the HCV IRES.^{64,70-72} However, it appears that interaction between IRES RNA and the 40S subunit drives formation of an IRES-40S subunit-eIF3 complex, since HCV IRES RNA demonstrates similar affinity to both the 40S subunit and the 40S-eIF complex.⁷¹ Other cellular factors such as La autoantigen,⁷³⁻⁷⁵ heterogeneous ribonucleoprotein L,⁷⁶ poly-C binding protein,^{77,78} and pyrimidine tract-binding protein,^{79,80} also bind to the IRES element and modulate translation.

Regulation of IRES-dependent translation of HCV is also likely to involve viral factors. We found that the core protein specifically inhibits HCV translation, possibly by binding to a stem-loop IIIId domain, particularly a GGG triplet within the hairpin loop structure of the domain, within the IRES (Fig. 3).⁷⁹⁻⁸¹ Although a conflicting report has suggested that inhibition of HCV translation is due to an RNA-RNA interaction, rather than to an interaction between RNA and the core protein,⁸² later studies support the role of a core protein sequence spanning amino acids (aa) 34-44 in inhibition of viral translation through its interaction with the IRES.⁸³ Furthermore, the N-terminal 20 residues of the core protein have been shown to selectively inhibit translation mediated by HCV IRES in a cell type-specific manner.⁸⁴ We propose a model in which competitive binding of the core protein to the IRES and 40S ribosomal subunit regulates HCV translation.

By analogy with other RNA viruses with IRES-mediated expression, the HCV 5' NTR has been expected to contain not only determinants for translation but also *cis*-acting elements for RNA replication. Recent studies demonstrated that (1) the sequence upstream of the IRES is essential for viral RNA replication, (2) sequences within the IRES are required for high-level HCV replication, and (3) the stem-loop domain II of the IRES is crucial for the replication.⁸⁵

Polyprotein processing

IRES-mediated translation of the HCV ORF yields a polyprotein precursor that is subsequently processed by cellular and viral proteases into mature structural and nonstructural proteins (Fig. 1). As deduced from the hydrophobicity profile and the dependence on micro-

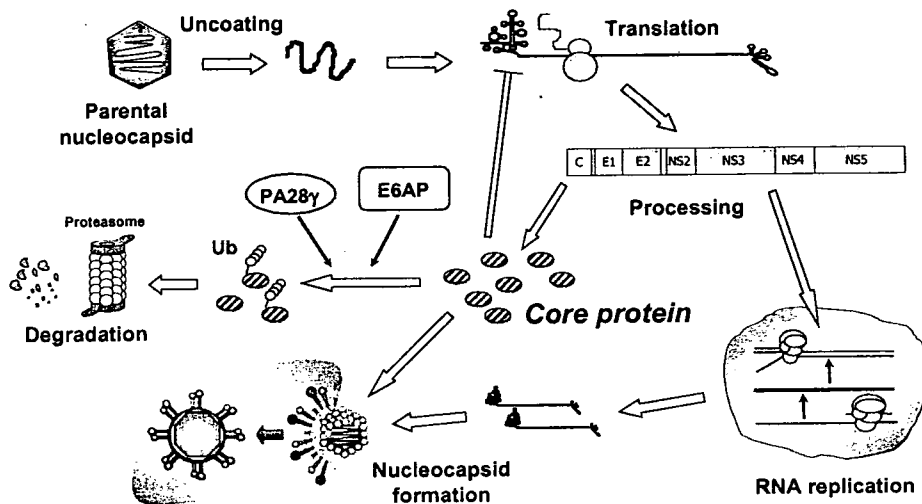


Fig. 3. The role and fate of HCV core protein in the postulated HCV life cycle. See text for further explanation and details

somal membranes, junctions at core/E1, E1/E2, E2/p7, and p7/NS2 are processed by host signal peptidases. For instance, secondary structure analysis of the core protein reveals that all major alpha helices are located in the C-terminal half of the protein. A predicted alpha helix encoded by aa 174–191 is extremely hydrophobic and resembles typical signal peptide sequences. Further posttranslational cleavage close to the C terminus of the core protein takes place, removing the E1 signal sequence by the signal peptide peptidase.^{86–89} This peptidase has recently been identified⁹⁰ and exhibits protease activity within cellular membranes, resulting in cleavage of peptide bonds in the plane of lipid bilayers.

The viral nonstructural proteins are processed by two viral proteases: processing between NS2 and NS3 is a rapid intramolecular reaction that is accomplished by the NS2–3 protease, which spans NS2 and the N-terminal domain of NS3, whereas the remaining four junctions are cleaved by the serine protease located at the N-terminal 180 residues of NS3 protein. Efficient cleavage at the NS2/3 site requires the 130 C-terminal residues and the first 180 aa of NS3. Recombinant proteins lacking the N-terminal membrane domain of NS2 were found to be enzymatically active, allowing further characterization of this activity.^{91,92} Deletion of NS2 from the nonstructural polyprotein did not abolish the replication of HCV RNA in cell cultures, indicating that NS2 is not essential for viral RNA replication.^{16,29}

The NS3–NS5B region is processed presumably with the following preferred order of cleavage: NS3/4A → NS5A/5B → NS4A/4B → NS4B/5A.^{93–96} Processing at the NS3/4A site is an intramolecular reaction, whereas cleavage at the other sites can be mediated intermolecularly. NS3 is a multifunctional molecule. Besides its N-terminal protease activity, the helicase and nucleotide triphosphatase (NTPase) activities reside in the C-terminal 500 residues of the NS3 protein.^{97–101} NS4A

functions as a cofactor of the NS3 serine protease and is required for efficient polyprotein processing. There are significant differences in the stability and activity of the NS3 protease in the presence or absence of NS4A. NS3 protein is relatively unstable when expressed in cells in the absence of NS4A.¹⁰² Structural studies by nuclear magnetic resonance and X-ray methods show that the NS3–4A complex has a more highly ordered N-terminal domain and NS4A binding leads the NS3 protease to a rearrangement of the active site triad to a canonical conformation.¹⁰³ It has been predicted that the N-terminus of NS4A forms a transmembrane helix, which presumably anchors the NS3–4A complex to the cellular membrane.¹⁰⁴

RNA replication

HCV is assumed to replicate its genome through the synthesis of a full-length negative-strand RNA. Positive-strand RNA is then produced from the negative-strand template; it is several-fold more abundant than the negative-stranded RNA and is utilized for translation, replication, and packaging into progeny viruses. RNA replication of most RNA viruses involves certain intracellular membrane structures, including the endoplasmic reticulum (ER),^{105–107} Golgi,¹⁰⁸ endosomes, and lysosomes.¹⁰⁹ HCV RNA replication is also believed to occur in the cytoplasm of the virus-infected cells.

Although NS5B protein has RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity in vitro, its recombinant product alone is presumably short of strict template specificity and fidelity, which are essential for viral RNA synthesis. It is highly likely that other viral or host factors are important for conferring proper RNA replication and that the replication complexes (RCs), which are composed of NS5B and additional components re-