

狂犬病の診断法確立に関する研究

研究分担者： 井上 智 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究協力者： 加来 義浩 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究協力者： 野口 章 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨：

狂犬病は、ラブドウイルス科、リッサウイルス属、狂犬病ウイルスを原因とするウイルス性の人獣共通感染症（動物由来感染症）である。毎年、世界中で 55,000 人が死亡しており、そのほとんどはアジア・アフリカ等の開発途上国である。狂犬病の診断として、狂犬病ウイルス抗原に特異的なモノクローナル抗体を直接蛍光標識して行う直接蛍光抗体法（DFA 法）が一般的に行われている。しかしながら、市販の検査キットは高価であり発展途上国であるアジアの国々で使用するには経済的負担が大きい。そこで、より安価に特異抗体を生産可能な方法として、免疫グロブリン V_H 鎖、 V_L 鎖の抗原結合領域だけから構成される小型の抗体様分子である「single chain variable fragment (scFv)」を利用した狂犬病の抗原診断法の確立を試みた。今回、狂犬病ウイルス P 蛋白質（RV-P）に特異的に反応する「scFv」の作出を行った。作出した「scFv」は蛍光標識を行い、狂犬病ウイルス実験株（CVS-11）に対する反応性を調べた。4 種類のヘテロなクローン「scFv」（No. 19、38、80、115）の作出に成功した。蛍光標識した 4 つのクローンはいずれも感染細胞中の狂犬病ウイルス（CVS-11）抗原に特異的に反応することが確かめられ、作出した scFv の反応性と特異性については検討の余地が残されているが、標識-抗 RV-P scFv が狂犬病ウイルスの抗原検出系に利用できることが示された。

A. 研究目的

狂犬病は、ラブドウイルス科、リッサウイルス属、狂犬病ウイルスを原因とするウイルス性の人獣共通感染症（動物由来感染症）である。毎年、世界中で 55,000 人が死亡しており、そ

のほとんどはアジア・アフリカ等の開発途上国である。狂犬病の診断として、狂犬病ウイルスの N 蛋白（RV-N）に特異的なモノクローナル抗体を直接蛍光標識した直接蛍光抗体法（DFA 法）が一般的に行われている。しかしながら、

市販の検査キットは高価であり発展途上国であるアジアの国々で使用するには経済的負担が大きい。そこで、より安価に特異抗体を生産可能な方法として、免疫グロブリン V_H 鎖、V_L 鎖の抗原結合領域だけから構成される小型の抗体様分子である「single chain variable fragment (scFv)」(図1)を利用した狂犬病特異的な抗体の作成とこれを利用した抗原診断法について検討を行った。

本研究では、狂犬病ウイルス (CVS-11 株) の P 蛋白質 (RV-P) に対する「scFv」を作出して蛍光標識を行い、RV-P に対する反応性については CVS-11 株を感染させた MNA 細胞で確認した。また、自家製の抗 RV-P 特異的なウサギ血清と市販の検査キット(直接蛍光標識抗狂犬病 N 蛋白 (RV-N) モノクローナル抗体)を陽性対照として比較を行った。

B. 研究方法

1) 抗 RV-P scFv の作出

バンニング: 抗 RV-P scFv 遺伝子のクローニングは、大腸菌発現の精製 RV-P を固相化した immunoplate に、ヒト scFv 発現ファージディスプレイライブラリー "Tomlinson I+J" (英国 MRC Centre for Protein Engineering より分与) を 3 回繰り返して反応させて、吸着ファージを溶出して行った。

特異性の高い scFv クローンの選択: RV-P を固相化した immunoplate で ELISA を行い、反応性の高いクローンを選択した。クローンは scFv 遺伝子の塩基配列を確認してヘテロのク

ローンのみを選択した。

scFv 発現プラスミドの回収: scFv 発現プラスミドは、大腸菌 HB2151 に導入して大量発現を行ない、scFv の C 末端 His タグを利用して Ni-NTA Agarose (Qiagen) で精製を行った。

2) 抗 RV-P scFv の蛍光標識

作出した scFv (200 µg) を HiLyte Fluor 555 Labeling kit-NH₂ (同仁化学研究所) で標識した。

方法は、添付プロトコールに従った。

3) 蛍光標識-抗 RV-P scFv の反応性確認

CVS-11 株を感染させたマウス神経芽腫 (MNA) 細胞を利用して抗 RV-P scFv の反応性調べた。

RV-P 陽性スライドの作成: MNA 細胞を 8 穴のチャンバースライドで培養。細胞が confluent になった状態で CVS11 株を接種。接種 48 時間後にアセトン固定。

RV-P 陰性スライドの作成: 非感染 MNA 細胞をアセトン固定。

抗体: (1) HiLyte 555 標識抗 RV-P scFv は 1:20、1:200、1:2,000、1:20,000 に希釈して用いた。(2) 抗 RV-P ウサギ血清は 1:2,000 に希釈して使用。2 次抗体にヤギ抗ウサギ IgG FITC 標識抗体 (1:500 希釈) を用いて間接蛍光抗体法を行った。(3) 市販の抗 RV-N FITC 標識抗体 (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fuji

Rebio))は1:25に希釈して直接蛍光抗体法を行った。

反応:1次および2次抗体は室温で1時間反応させ、PBSで3回洗浄して、グリセリン封入を行って蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1) 抗RV-P scFv:大腸菌発現RV-Pを用いた3パンニングを3回行って192クローンのファージを回収した。ここから、RV-Pに高い反応性を示す11個のクローンをELISA法で選択した。11クローンについては、scFv遺伝子の塩基配列を特定してヘテロな4種類のクローン(No.19、38、80、115)を作出した。

2) 蛍光標識抗RV-P scFvの反応性:作出した4つのHiLyte555標識-抗RV-P scFv(No.19、38、80、115標識scFv)は、いずれも1:20~1:2,000の希釈においてCVS-11株の感染したMNA細胞と強く反応した。No.19、38、80、115標識scFvによるCVS-11株感染細胞の染色像は、いずれも抗RV-Pウサギ血清を使用した間接蛍光抗体および市販の抗RV-N FITC標識抗体による染色像と同様に細胞室内に顆粒状の染色像を示した(図2)。

D. 考察

本研究は、より安価に特異抗体を生産可能な

方法として、免疫グロブリンV_H鎖、V_L鎖の抗原結合領域だけから構成される小型の抗体様分子である「single chain variable fragment(scFv)」を利用した狂犬病の抗原診断法の確立が目的である。

今回、狂犬病ウイルスのP蛋白に特異性の高い4種類のヘテロなクローン(No.19、38、80、115)の作出に成功した。

蛍光標識して回収した4つのNo.19、38、80、115標識scFvは、いずれも1:20~1:2,000の希釈においてCVS-11株の感染したMNA細胞と強く反応した。また、No.19、38、80、115標識scFvによるCVS-11株感染細胞の染色像はいずれも抗RV-Pウサギ血清を使用した間接蛍光抗体および市販の抗RV-N FITC標識抗体による染色像と同様で、細胞室内に顆粒状の染色像を示した。

作出したscFvの反応性と特異性については検討の余地が残されているが、標識-抗RV-P scFvが狂犬病ウイルスの抗原検出系に利用できることが示された。scFvは、専用の標識キットを利用して容易に標識することが可能であり、HiLyte 555以外にもHRP、FITCなどが市販されている。

scFvは、大量生産および種々のマーカー標識が容易な小型抗体様分子として、近年の抗体医薬の進展とともに注目されている。本法は、動物の免疫を必要とせず、scFv発現ファージディスプレイライブラリー"Tomlinson I+J"を利用して実験室内で短期間に標的抗原に対する標識抗体を作製できることが特徴である。

本研究では、scFv遺伝子のクローニングにモノクローナル抗体を産生するハイブリド

ーマを用いる方法に代えて、scFv 発現ファージディスプレイライブラリー” Tomlinson I+J” を利用した。

このライブラリーは、ナイーブなヒト由来 B 細胞から抽出した VH 鎖、VL 鎖遺伝子をランダムにくみ合わせた scFv をファージ表面に発現させたものである。ライブラリーには 10^8 以上の異なる種類の scFv 発現ファージが含まれており、精製されたウイルス蛋白質があれば、本ライブラリーを用いて約 2 週間で標的蛋白に特異的な scFv のクローニングが可能である。

さらに、RV 野外株は地域ごとに多様な抗原性を示すことが知られているが、将来、市販の抗 RV-N 標識抗体に反応性が低い野外株が出現した場合に、各検査機関で迅速に特異性の高い抗体を作出できることが期待される。

E. 結論

今回、狂犬病ウイルス P 蛋白質 (RV-P) に特異的に反応する「scFv」の作出を行い、4 種類の独立したクローン「scFv」(No. 19、38、80、115) の作出に成功した。

蛍光標識した 4 つのクローンはいずれも感染細胞中の狂犬病ウイルス (CVS-11) 抗原に特異的に反応することが確かめられ、標識-抗 RV-P scFv が狂犬病ウイルスの抗原検出系に利用できることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hotta K., Bazartseren B., Kaku Y., Noguchi A., Okutani A., Inoue S. and Yamada A. 2008. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. *Virus Res.* 139:85-90.

Nishizono A., Khawplod P., Ahmed K., Goto K., Shiota S., Mifune K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Mannen K., Tepsumethanon V., Mitmoonpitak C., Inoue S. and Morimoto K. 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol. Immunol.* 52:243-249.

2. 学会発表

Inoue, S. Rabies in Japan. Session 4: Country reports on rabies surveillance, prevention and control, legislation and policies developed. IEC, multi-sectoral collaborations and community-based model in human and animals. Workshop on strengthening cooperation and sharing information on rabies among ASEAN plus three countries. The ASEAN plus three Emerging Infectious Diseases Programme. 23-25 April 2008, Ha Long, Vietnam.

Kaku, Y., Noguchi, A., Okutani, A., Hotta,

K., Bazartseren, B., Yamada, A. and Inoue, S. Inhibition of rabies virus growth by intrabody against phosphoprotein in mouse neuroblastoma cells. 42nd joint working conferece on viral diseases and satellite meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 26-28 May, 2008. Nagasaki, Japan.

Medina, P.B., Acosta, L.P., Jarilla, B., Demetria, C.S., Malbas, F., Inoue, S. and Manalo, D.L. Development of local rabies fluorescent isothiocyanate conjugate (FITC) for direct antigen detection by fluorescent microscopy (FAT) (Preliminary results). Asian DFederation of Laboratory Animal Science. 27-29 September, 2008. China.

Inoue, S. and Bazartseren, B. Rabies in Japan. Meeting Salon of The State Central Veterinary Laboratory (SCVL). 22 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.

Inoue, S. Rabies in Japan. Diagnostic skill and advanced methods (2nd technical conference). 26 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.

Bazartseren Boldbaatar、加来義浩、野口 章、

奥谷晶子、堀田こずえ、井上 智、山田章雄。
Rapid detectin of rabies virus by RT-LAMP。
第56回日本ウイルス学会、2008、10月、岡山

Orbina, J.R.C., Bajaro, J.D.P., Kamigaki, T., Noguchi, A., Inoue, S., Manalo, D.L., Demetria, C.S., De Guzman, A.S., Quiambao, B.P., Segubre-Mercado, E.M., Saito, M., Suzuki, A., Lupisan, S.P., Olveda, R.M., and Oshitani, H. Molecular epidemiology of rabies in the Philippines. Establishment of methods and preliminary results. The launching of the Tohoku University-RITM collaborating research center for emerging and reemerging infectious diseases. RITM Auditorium. 20 October 2008, Manila, Philippines.

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

日本学術会議、生産農学委員会獣医学分科会
提言：狂犬病対策システムの構築に向けて
平成20年（2008年）8月28日

図1 scFv (single chain variable fragment)の構造

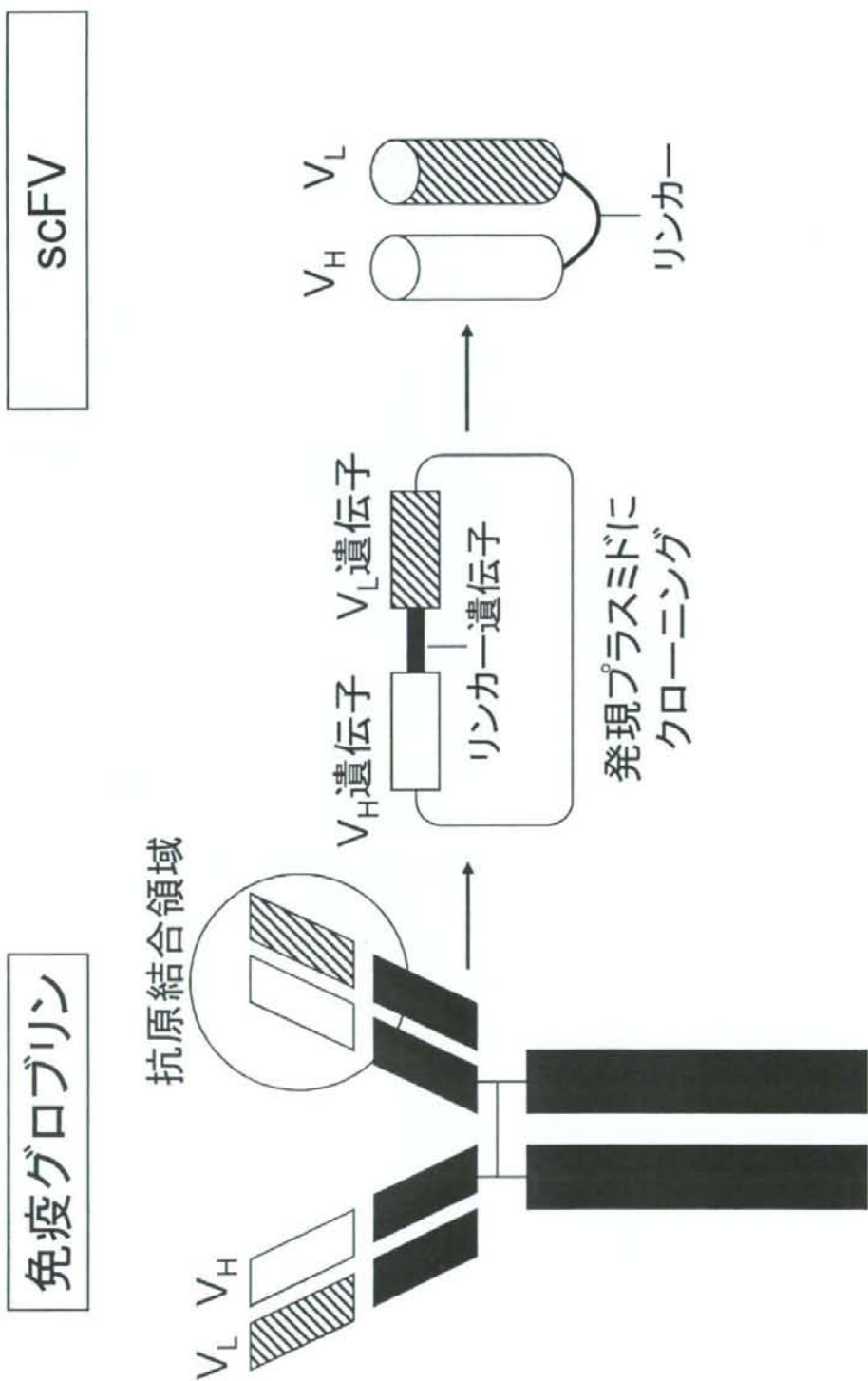


図2 蛍光標識抗RV-P scFvを用いた直接蛍光抗体法

蛍光標識 抗RV-P scFv No.38
(1:2,000希釈)

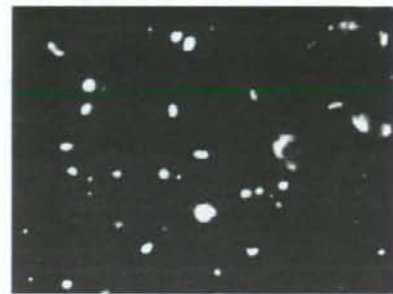
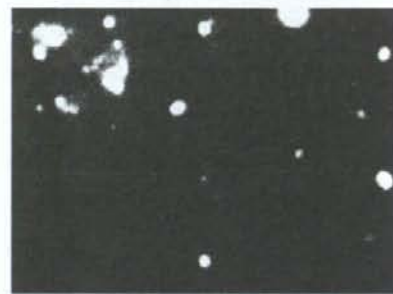
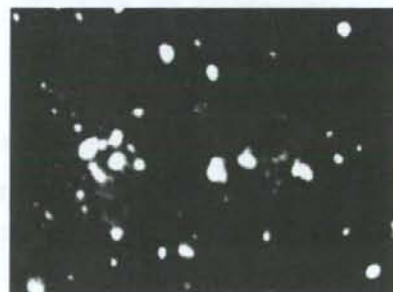
陽性対照

RV (CVS11株)感染細胞

非感染細胞

FITC標識 抗RV-N抗体(市販)

ウサギ抗RV-P血清



厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

分担者研究報告書

狂犬病の疫学と神経病原性に関する研究:

インドネシアにおける狂犬病の分子疫学

研究分担者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: インドネシアで流行する狂犬病ウイルスの遺伝的關係及び動態を明らかにするために、スマトラ、ジャワ、カリマンタン、スラウェシ及びフロレスの各島から採取された野外ウイルス 10 株について、これらの N 遺伝子部分的塩基配列(1307 塩基)を決定・解析した。系統学的解析の結果、これらのインドネシア株がひとつのクラスターを形成し、かつアジア各国で流行するウイルスと遺伝的に近縁であることが明らかとなった。これらのインドネシア株は、中国で流行するウイルスと特に近縁であった。インドネシアで流行するウイルスは、さらに 3 つの系統グループ(ID1、ID2 及び ID3)に分類された。ID1 及び ID2 グループに分類されたウイルスがそれぞれスマトラ島及びジャワ島に分布していたのに対し、ID3 のウイルスはカリマンタン、スラウェシ及びフロレスの各島に分布していた。以上の結果より、ウイルスの系統グループと地理的分布に関連性があることが示された。

A. 研究目的

近年の分子生物学の発展により、世界各国で流行する狂犬病ウイルスの遺伝的關係が明らかにされている。しかしながら、インドネシアにおける狂犬病ウイルスの情報は非常に少なく、これまで 2 株の遺伝子解析が報告されているにすぎない(Smith et al., Infect. Dis., 1992)。そこで本研究では、インドネシアで流行する狂犬病ウイルスのより詳細な遺伝的關係及び動態を解明することを目的として、インドネシアの各地域から採取された 10 株の N 遺伝子部分的塩基配列(1307 塩基)を決定・解析した。

B. 研究方法

スマトラ、ジャワ、カリマンタン、スラウェシ及びフロレスの各島において、1997-2001 年の間に採

取された野外ウイルス計 10 株(イヌ由来 6 株、ウシ由来 1 株、シカ由来 1 株、ネコ由来 1 株、ハクビシン由来 1 株)(表 1)の N 遺伝子 cDNA を RT-PCR 法を用いて増幅し、部分的配列(ゲノム番号 114-1420 番目、計 1307 塩基)をダイレクト・シーケンス法により決定した。その後、GenBank データ・ベースより得られた世界各国の流行ウイルスの塩基配列とともに、Clustal X プログラム(Larkin et al., Bioinformatics, 2007)を用いた近隣接合法により系統学的解析を行った。

C. 研究結果

1) 系統学的解析

インドネシア由来の 10 株は系統樹上で同一のクラスターに分類され、互いに遺伝的に近縁であることが明らかとなった(図 1)。インドネシア由来ウ

ウイルスは、他のアジア流行株、特に中国で流行する一部のウイルスと遺伝的に関連していた。インドネシア株からなるクラスターは、その樹形に基づきさらに 3 つの系統グループ (ID1, ID2 及び ID3) に区別された。

2) 系統グループと地理的分布の関係

次に、各ウイルスの所属する系統グループとその地理的分布の関係を調べた。ID1 及び ID2 グループに分類されたウイルスがそれぞれスマトラ島及びジャワ島に分布していたのに対し、ID3 のウイルスはカリマンタン、スラウェシ及びフロレスの各島に分布していた (図 2)。以上の結果より、ウイルスの系統グループと地理的分布に関連性があることが示された。

D. 考察

インドネシアの流行ウイルスが一部の中国株と遺伝的に近縁であったことから (図 1)、それぞれ共通の祖先から進化したと考えられた。歴史的に、多くの人々が中国からインドネシアに移民したことが知られている。今回の系統学的解析の結果ならびにこの歴史的事実より、以前、移民に伴って中国で流行するウイルスが人為的にインドネシアに持ち込まれた可能性が考えられた。

インドネシアの流行ウイルスにより構成されるクラスターがさらに ID1, ID2 及び ID3 の系統グループに区別されたことから (図 1)、同国のウイルスが少なくとも 3 つに分類されると考えられた。これらの系統グループとウイルスの地理的分布の間に関連性が認められたことから、インドネシアにおける狂犬病ウイルスの感染環に地理的要因が大きく影響を及ぼしていると考えられた。具体的

には、ID1 及び ID2 の系統グループに属するウイルスはそれぞれスマトラ島及びジャワ島だけに認められたことから、海洋という地理的障壁がウイルスの島から島への伝播を阻害していると考えられた。

一方、ID3 のウイルスは、カリマンタン、スラウェシ及びフロレスの各島に分布していた。これまで、ある漁師が狂犬病に感染したイヌをスラウェシ島からフロレス島に持ち込んだことが明らかとなっている (Windiyarningsih et al., J. Med. Assoc. Thai., 2004)。すなわち、両島の間ウイルス伝播は、人為的であったことが知られている。以上より、カリマンタン-スラウェシ島間でも人為的なウイルスの伝播が行われた可能性が考えられた。

以上より、インドネシアで流行する狂犬病ウイルスの感染環に、地理的要因が密接に関与するものの、人為的な要因も影響を及ぼしていると考えられた。このような情報は、インドネシアにおける狂犬病の防疫対策を実施する上で、非常に有用であると考えられた。

E. 結論

インドネシアで流行する狂犬病ウイルスは、互いに近縁で、中国に分布するウイルスと共通祖先を持つと考えられた。また、インドネシアのウイルスが系統学的に少なくとも 3 つの系統群に区別されることが明らかとなった。これらの系統群と地理的分布の間に関連性が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- | | |
|---|--|
| <p>1) Mita T, Shimizu K, <u>Ito N</u>, Yamada K, Ito Y, Sugiyama M, Minamoto N: Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. <i>Virus Res.</i> 2008, 137: 33-39.</p> <p>2) Susetya H, Sugiyama M, Inagaki A, <u>Ito N</u>, Mudiarto G, Minamoto N: Molecular epidemiology of rabies in Indonesia. <i>Virus Res.</i> 2008, 135: 144-149.</p> | <p>2.学会発表
なし</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他</p> |
|---|--|

表 1. 本研究で使用したウイルス

島	地域	株名	分離年	由来動物	アクセッション番号
スマトラ	Bukittinggi	SC01-66	2001	ハクビシン	AB154213
スマトラ	Bukittinggi	SC02-82	2002	ネコ	AB154211
スマトラ	Bukittinggi	SC01-65	2001	シカ	AB154214
スマトラ	Bukittinggi	SC01-73	2001	ウシ	AB154213
スマトラ	Rejanglebong	SC01-21	2001	イヌ	AB154238
スマトラ	Bengkulu	SC01-13	2001	イヌ	AB154237
ジャワ	Cirebon	JA97-05	1997	イヌ	AB154220
カリマンタン	不明	KL00-18	2000	イヌ	AB154221
スラウェシ	Monado	SW97-04	1997	イヌ	AB154241
フロレス	Flores	FL97-01	1997	イヌ	AB154218

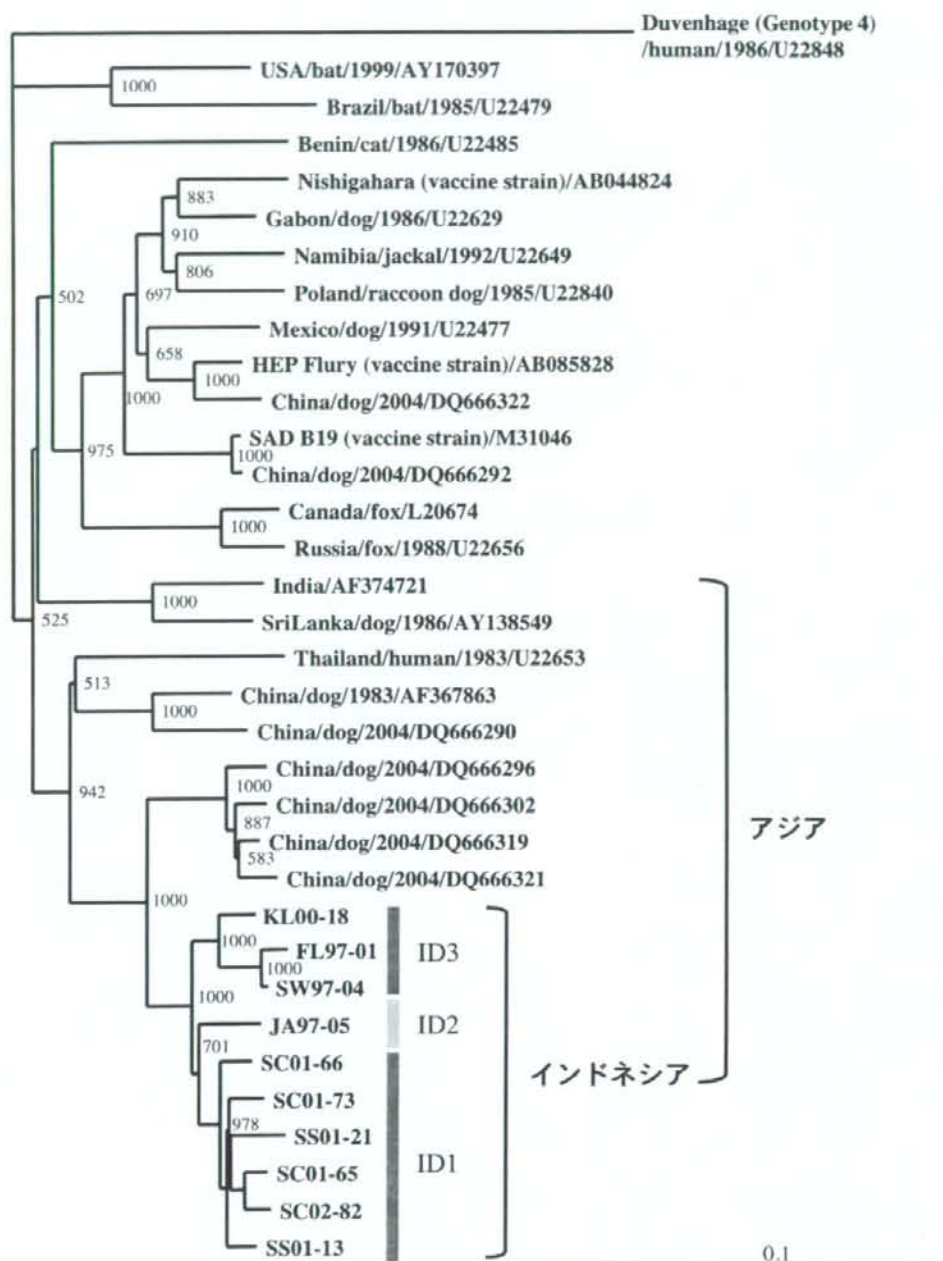


図 1. N 遺伝子部分的塩基配列 (1307 塩基) に基づく系統樹

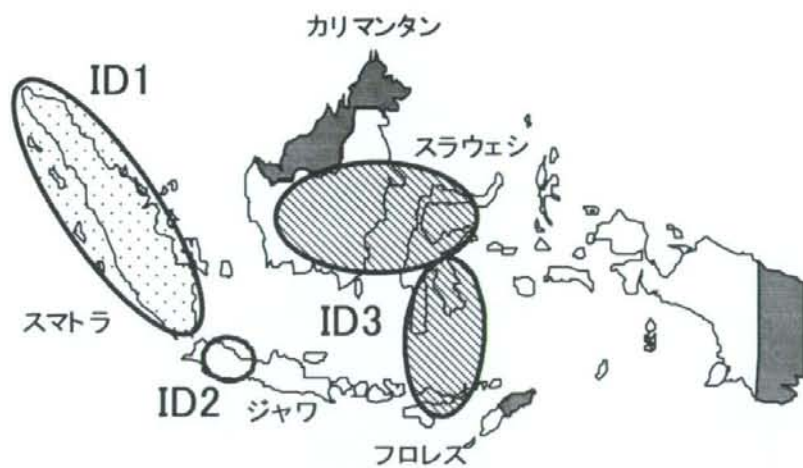


図 2. インドネシアにおける狂犬病ウイルスの系統グループと地理的分布

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshii K, Goto A, Kawakami K, Kariwa H, Takashima I	Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus	J Gen Virol	89	200-11	2008
Takashima I, Kariwa H, Shirato K	Epidemiology and diagnosis of West Nile virus infection.	Glo Env Res	12	21-25	2008
Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason	Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis	Vaccine	26	2772-2781	2008
Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi	Japanese encephalitis remains common in Japan	Pediatric Infectious Disease Journal	27	769-770	2008
Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi Yamanaka	Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions	Japanese Journal of Infectious Diseases	61	410-411	2008
Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas Guillermo, Maria del Carmen Parquet, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita	Isolation and Molecular Characterization of Banna Virus from Mosquitoes, Vietnam	Emerging Infectious Diseases	Vol. 14(8)	1276-1279	2008
Basu Dev Pandey, Kouichi Morita, Santa Raj Khanal, Tomohiko Takasaki, Isao Miyazaki, Tetsuro Ogawa, Shingo Inoue, Ichiro Kurane	Dengue Virus, Nepal	Emerging Infectious Diseases	Vol. 14(3)	514-515	2008
Manmohan Parida, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao and Kouichi Morita	Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique: perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases	Reviews in Medical Virology	Vol. 18	407-421	2008
Kazuya Hidari, Naonori Takahashi, Masataka Arihara, Masato Nagaoka, Kouichi Morita, Takashi Suzuki	Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga	Biochemical and Biophysical Research Communications	Vol. 376	91-95	2008
Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong, Do Quang Ha, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Ha Manh Tuan, Vo Van Tuong, Cao Thi Phi Nga, Tran van Dat, Toshifumi Oyama, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama	Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome	PLoS Neglected Tropical Diseases	Vol. 2	e304	2008
Liu J, Liu B, Cao Z, Inoue S, Morita K, Tian K, Zhu Q, Gao GF	Characterization and application of monoclonal antibodies specific to West Nile virus envelope protein	J Virol Methods	Vol.	154(1-2):20-26	2008
森田公一	西ナイル熱	Medical Practice	25(5)	799-801	2008
森田公一	日本脳炎ウイルス	Drug Delivery System	23(2)	159-161	2008
Chandy, S., Yoshimatsu, K., Ulrich, R. G., Mertes, M., Okumura, M., John, T., Balraj, V., Muliylil, J., Mammen, J., Abraham, P., Arikawa, J., Sridharan, G.	Seropidemiological study on hantavirus infections in India	ELESEVIER/Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene	102	70-74	2008
Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Hatause, R., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa, J.	Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice	Arch Virol	153(8)	1605-1609	2008
Arai, S., Ohdachi, D. S., Asakawa, M., Kang, H. J., Mocz, G., Arikawa, J., Okabe, N., Yanagihara, R	Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (<i>Urotrichus talpoides</i>)	PNAS	105, No. 42	16296-16301	2008

Kariwa, H., Noda, H., Nakauchi, M.	Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus	Jpn. J. Vet. Res.	55 (4)	115-127	2008
Dutta, N.K., Mazumdar, K., Lee, B.H., Baek, M.W., Kim, D.J., Na, Y.R., Park, S.H., Lee, H.K., Kariwa, H., Mai, Ie Q., Park, J.H.	Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine	Immunol. Lett.	118 (1)	65-71	2008
Nakamura, I., Yoshimatsu, K., Lee, B.H., Okumura, M., Taruishi, M., Araki, K., Kariwa, H., Takashima, I., Arikawa, J.	Development of a serotyping ELISA system for Thailand virus infection	Arch. Virol.	153 (8)	1537-1542	2008
Lee HK, Lee BH, Dutta NK, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Kariwa H, Nakauchi M, Mai Ie Q, Heo SJ, Park JH.	Detection of antibodies against SARS-Coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA	J. Microbiol. Biotechnol.	18 (10)	1717-1721	2008
Nakauchi, M., Kariwa, H., Kon, Y., Yoshii, K., Maeda, A., Takashima, I.	Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly.	Microbiol Immunol.	52 (12)	625-630	2008
Abu Daud, N.H., Kariwa, H., Tkachenko, E., Dzagurnova, T., Medvedkin, O., Tkachenko, P., Ishizuka, M., Seto, T., Miyashita, D., Sanada, T., Nakauchi, M., Yoshii, K., Maeda, A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I.	Genetic and antigenic analyses of a Puumala virus isolate as a potential vaccine strain	Jpn J Vet Res. 56	56 (3)	151-165	2008
Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Eirokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, Dove W, Montenegro FM, Correia JB, Nakagomi O, Cunliffe NA, Hart CA	Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine	Archives of Virology	153	591-593	2008
Kheyami AM, Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Hart CA, Cunliffe NA.	Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children in Saudi Arabia: First detection of G9 and G12 Strains	Journal of Clinical Microbiology	46(9)	1185-1191	2008
Gurgel RG, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE.	Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review	Journal of Clinical Virology	43	1-8	2008
Naghypour M, Nakagomi T, Nakagomi O.	Issues with reducing the rotavirus-associated mortality by vaccination in developing countries	Vaccine	26	3236-3241	2008
Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA.	Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis	Archives of Virology	153	957-960	2008
Bozdayi G, Dogan B, Daligic B, Bostanci I, Sari S, Battaloglu NO, Rota S, Dallar Y, Nishizono A, Nakagomi O, Ahmed K	Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey	Journal of Medical Virology	80	733-740	2008
Al-Mashhadani MN, Nakagomi O, Dove W, Ahmed H, Nakagomi T, Hart CA, Cunliffe NA	Norovirus gastroenteritis among children in Iraqi Kurdistan	Journal of Medical Virology	80	506-509	2008
Komoto S, Kugita M, Sasaki J, Taniguchi K	Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4	J Virol	82(13)	6753-6757	2008
K Sugata, K Taniguchi, A Yui, F Miyake, S Suga, Y Asano, M Ohashi, K Suzuki, N Nishimura, T Ozaki, T Yoshikawa	Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis	Pediatrics	122	392-397	2008
Yi-Pei Lin, Su-Yuan Chang, Chuan-Liang Kao, Koki Taniguchi, Li-Ming Huang, Fu-Tian Chiang, and Chun-Nan Le	Determination of Rotavirus VP6 Genogroup by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	J Clin Microbiol	46(10)	3330-3337	2008

Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK, Ganesh B, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN, Wang Y-H	Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus	Journal of Medical Virology	80	2023-2033	2008
Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Nagashima S, Paul SK, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN	Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of rotaviruses	Archives of Virology	153	555-559	2008
Paul SK, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Watanabe S, Alam MM, Ahmed MU, Hossain MA, Naik TN	Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults.	Archives of Virology	153	1999-2012	2008
Wang Y-H, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima S, Zhu Z-R, Peng J-S, Liu M-Q, Hu Q, Zhou D-J, Watanabe S, Ishino M	Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China	Journal of Medical Virology	81	382-389	2009
Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T	Characterization of sapovirus strains in outbreaks in Hokkaido, Japan	Jpn J Infect Dis	61	504-	2008
Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H	Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genome-wide tracing of evolutionary history	J Virol	82	11247-62	2008
Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF	Acute gastroenteritis caused by G1/2 sapovirus, Taiwan	Emerg Infect Dis	14	1165-71	2007
Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N	Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases	J Virol	81(13)	6798-806	2007
Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T	Sapovirus in water, Japan	Emerg Infect Dis	13(1)	133-5	2007
Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford S E, Neill F H, Atmar R L, Estes M K	Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells	Journal of Virology	81(22)	12238-12248	2007
Hansman G, Oka T, Katayama K, Takeda N	Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification	Reviews in medical virology	17	133-141	2007
Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A	A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization	Vaccine	26(50)	6441-6444	2008
Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Teptomethanon V, Mitoompitak C, Inoue S, Morimoto K	A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis	Microbiol. Immunol	52	243-249	2008
Shibuya T, Yamashiro T, Masaie Y, Ohuchi M, Uechi G, Nishizono A	Identification of a human monoclonal Fab with neutralizing activity against H3N2 influenza A strain from a newly constructed human Fab library	Microbiol. Immunol	52	162-170	2008
西園 晃	変数する感染症—人間の備えは十分か? 「狂犬病」	総合臨床	57(11)	2667-2672	2008
Mita T, Shimizu K, Ito N, Yamada K, Ito Y, Sugiyama M, Minamoto N	Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus	Virus Res.	137	33-39	2008
Susetya H, Sugiyama M, Inagaki A, Ito N, Mudiarto G, Minamoto N	Molecular epidemiology of rabies in Indonesia	Virus Res.	135	144-149	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus

Kentaro Yoshii, Akiko Goto, Kazue Kawakami, Hiroaki Kariwa and Ikuo Takashima

Correspondence

Kentaro Yoshii
kyoshii@vetmed.hokudai.ac.jp

Laboratory of Public Health, Department of Environmental Veterinary Sciences,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

We have previously reported a system for packaging tick-borne encephalitis (TBE) virus subgenomic replicon RNAs into single-round infectious virus-like particles (VLPs) by using *in trans* expression of viral C/prM/E structural proteins. In this study, the *trans*-packaging system was applied to the generation of chimeric VLPs with mosquito-borne Japanese encephalitis (JE) virus. Although *trans*-expression of TBE virus C and JE virus prM/E proteins resulted in the secretion of VLPs, the expression of JE virus C/prM/E proteins did not lead to the secretion of VLPs, suggesting that homologous interaction between C and non-structural proteins or the genomic RNA is important for efficient assembly of infectious particles. Neutralization testing showed that the antigenic characteristics of the VLPs were similar to those of the native virus. Furthermore, the infectivities of the TBE virus- and JE virus-enveloped VLPs for the ISE6 tick cell line and C6/36 mosquito cell line were investigated. The VLPs were able to enter only those cells that were derived from the natural vectors for the respective viruses. TBE virus replicon RNA packaged in VLPs produced TBE virus non-structural proteins in tick cells, but could neither replicate nor produce viral proteins in mosquito cells. These findings indicate the importance of specific cellular factors for virus entry and replication during flavivirus infection of arthropods. These results demonstrate that chimeric VLPs are useful tools for the study of viral genome packaging and cellular factors involved in vector specificity, with the additional safety aspect that these chimeric VLPs can be used instead of full-length chimeric viruses.

Received 28 December 2006

Accepted 28 August 2007

INTRODUCTION

The genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) contains important human pathogens, including tick-borne encephalitis (TBE) virus, Japanese encephalitis (JE) virus, yellow fever virus, dengue virus and West Nile (WN) virus. Flaviviruses can be divided into three phylogenetic and ecological groups: the tick-borne group, the mosquito-borne group and the no-known-vector group (Gaunt *et al.*, 2001; Gould *et al.*, 2003; Kuno *et al.*, 1998). The extent of transmission of arthropod-borne viruses depends on both ecological and physiological parameters, of which vector competence is the most important factor. Vector competence is determined by extrinsic and intrinsic factors, such as the physiological ability of vector tissue to become infected and to maintain a particular infectious agent (Hardy *et al.*, 1983; Kramer & Ebel, 2003; Nuttall & Labuda, 2003). The involvement of these factors in flavivirus infection is not well understood.

The flavivirus genome consists of a positive-polarity, single-stranded RNA of approximately 11 kb, which encodes three structural proteins, i.e. the core (C), pre-membrane (prM) and envelope (E) proteins, and seven non-structural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5), within a single long open reading frame (Chambers *et al.*, 1990). The 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) have predicted secondary structures that are implicated in viral replication, translation and packaging of the genomes (Gritsun *et al.*, 1997; Proutski *et al.*, 1997; Rauscher *et al.*, 1997). In the process of assembly of virus particles, viral structural proteins are inserted co-translationally into the endoplasmic reticulum (ER) and processed by the NS2B–NS3 protease complex and signal peptidase, and the C proteins and genomic RNA, which form the icosahedral nucleocapsid, are encapsidated by budding into the luminal side of the ER (Mackenzie & Westaway, 2001). However, little is known about the details of the molecular mechanism of packaging.

The development of stable, infectious cDNA clones of flaviviruses has enabled the construction of chimeras of

A supplementary table showing primers used in this study is available with the online version of this paper.

different flaviviruses (Caufour *et al.*, 2001; Guirakhoo *et al.*, 2001; Mathenge *et al.*, 2004; Pletnev & Men, 1998; Pletnev *et al.*, 1992, 2002). These chimeric viruses are useful tools for the study of viral replication cycles and for vaccine development. Moreover, they can be applied to the study of host factors that are involved in vector competence for flavivirus transmission in cases where chimeric viruses are generated from flaviviruses borne by different arthropods.

For several flaviviruses, such as TBE virus (Gehrke *et al.*, 2003; Hayasaka *et al.*, 2004), Kunjin (KUN) virus (Khromykh & Westaway, 1997), WN virus (Scholle *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2002), dengue virus (Pang *et al.*, 2001) and yellow fever virus (Molenkamp *et al.*, 2003), subgenomic replicons have recently been constructed by deleting genes for viral structural proteins. These replicons can replicate in cultured cells by virtue of functioning NS proteins, but they cannot produce progeny infectious viruses owing to the lack of viral structural proteins. In recent studies, the expression of viral structural proteins in cells harbouring replicon RNA has resulted in the secretion of particles, which have been designated virus-like particles (VLPs). VLPs are infectious and the replicon RNAs packaged in VLPs replicate in infected cells. However, as viral structural proteins are not encoded by the replicon, progeny viruses cannot be produced. Thus, this single-round infectivity feature of VLPs enables safe handling under biosafety level 2 (BSL-2) conditions. VLP systems were developed for TBE virus (Gehrke *et al.*, 2003; Yoshii *et al.*, 2005), KUN virus (Harvey *et al.*, 2004; Khromykh *et al.*, 1998) and WN virus (Scholle *et al.*, 2004). The VLPs of flaviviruses are similar to the native virus in terms of their physical features and functional characteristics for infection. Therefore, VLPs can be substituted for native virions in investigations into the biological properties of flaviviruses.

Previously, we constructed a subgenomic replicon of Far-Eastern subtype TBE virus and developed the *trans*-packaging system for VLPs further (Hayasaka *et al.*, 2004; Yoshii *et al.*, 2005). In this study, the *trans*-packaging system was applied to the generation of chimeric VLPs between TBE virus and JE virus (tick- and mosquito-borne flaviviruses, respectively), to investigate the molecular mechanism of flavivirus packaging and the specificity of the competence of the natural host vectors for flavivirus infection.

METHODS

Cells and viruses. The baby hamster kidney (BHK)-21 cell line was grown at 37 °C in Eagle's minimal essential medium (MEM) that was supplemented with 8% fetal calf serum (FCS) and L-glutamine. C6/36 cells, which are derived from the mosquito *Aedes albopictus*, were grown at 28 °C in MEM with 10% FCS (Igarashi, 1978). The ISE6 cell line from the tick *Ixodes scapularis* (kindly donated by Dr U. G. Munderloh, University of Minnesota, MN, USA) was grown at 34 °C in L-15B medium with 10% FCS, as described by Munderloh *et al.* (1994).

TBE virus strain Oshima 5-10 and JE virus strain Nakayama were used in this study (Mason *et al.*, 1991; Takashima *et al.*, 1997).

Antibodies. Rabbit polyclonal anti-prM, anti-E and anti-NS3 antibodies were generated by immunization with the recombinant prM, E and NS3 proteins, as described in our previous study (Yoshii *et al.*, 2004). For the neutralization tests, we used the mouse anti-E monoclonal antibodies (mAbs) 1H4 and 4H8, which were prepared in our laboratory (Komoro *et al.*, 2000). Mouse mAbs 10B4 (anti-JE virus E) and 13E7 (anti-JE virus prM), which were provided by Dr E. Konishi (Department of Health Sciences, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan), were used in Western blotting. The anti-TBE virus, anti-Langkat virus and anti-JE virus mouse polyclonal antibodies were prepared from the sera of mice infected with TBE virus strain Oshima 5-10, Langkat virus strain TP-21 and JE virus strain Nakayama, respectively.

Plasmid construction. Derivation of the recombinant plasmid pCTBECME, which expresses all of the viral structural proteins derived from the Oshima 5-10 strain of TBE virus, has been described previously (Yoshii *et al.*, 2005). pcJEME, which is a pcDNA3-based plasmid that encodes the JE virus (Nakayama strain) genes for the signal sequence of prM and the prM and E proteins, was provided by Dr E. Konishi and Dr P. W. Mason (Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA) (Konishi *et al.*, 1998). For the construction of pcJECME, which encodes all of the viral structural proteins of the JE virus, viral RNA was extracted from a JE virus-inoculated suckling mouse brain, and RT-PCR was performed by using the primers *Bam*HIIJE5'f (forward) and pcJEME1200r (reverse) (see Supplementary Table S1, available in JGV Online) as described previously (Takashima *et al.*, 1997). The PCR products were digested with *Bam*HII and *Bsi*WI and inserted into the pcJEME plasmid.

For the construction of pCTBEC-JEME, which encodes TBE virus C and the JE virus signal sequence of prM and the prM and E genes, these fragments were amplified by fusion PCR. First, the DNA fragment that encodes the region of the TBE virus gene from the 5'-UTR to the NS2B-NS3 cleavage site of protein C was amplified by using pCTBECME as template with the *Bam*HITBE5'f and CrGGN primers, and the JE virus signal sequence of prM and the prM and E genes were amplified by using pcJEME as the template with primers CrGGN and pcJEME1200r. The CrGGN and CrGGN primers contain a complementary sequence that encodes the 3' end of the TBE virus C gene and the signal sequence of the JE virus prM. These two PCR fragments were subsequently used as templates in a second round of PCR with the *Bam*HITBE5'f and pcJEME1200r primers. The PCR products were digested with *Bam*HII and *Bsi*WI and inserted into the pcJEME plasmid.

For the construction of pCTBENS2B/3, which expresses the TBE virus NS2B-NS3 polyprotein, PCR was carried out using the *Xho*INS2Bf and *Eco*RINS3r primers. The PCR products were digested with *Xho*I and *Eco*RI and inserted into the pCAGGS plasmid (Niwa *et al.*, 1991).

The TBE replicon RNA transcripts were prepared from the Oshima REPpt plasmid, as described previously (Hayasaka *et al.*, 2004).

Preparation of VLPs. TBE replicon RNA was transcribed from the Oshima REPpt plasmid and electroporated into BHK-21 cells, as described previously (Hayasaka *et al.*, 2004). After 24 h culture, the cells were transfected with the plasmid that expressed the flavivirus structural proteins, which was complexed with the *Trans*IT-LT1 reagent (PanVera Corporation), as described previously (Yoshii *et al.*, 2004). At 36 h post-transfection, the supernatant was harvested and cleared by centrifugation at 1000 g for 10 min. The particles in the supernatant were precipitated with 10% PEG ($M_w=8000$) and 1.9% NaCl for 2 h at 4 °C, and pelleted at 10 000 g for 20 min. The pellets were resuspended in PBS supplemented with RNase A (20 µg ml⁻¹).

Infectivity assays. Titration of the VLPs was carried out as described previously (Yoshii *et al.*, 2005). Briefly, BHK-21 cells grown on

chamber slides were infected with serially diluted VLP solutions and incubated for 24 h at 37 °C. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. After blocking with 2% BSA, the cells were incubated with anti-TBE virus NS3 rabbit IgG antibodies for 1 h and then treated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch). The images were viewed and recorded by using confocal microscopy.

In the particle neutralization test, 100 IU (infectious units) of VLPs were incubated with a serial dilution of the antibodies (described above) prior to infection of BHK-21 cells for 1.5 h. Particle-infected cells were visualized as described above.

In the case of experimental infections of ISE6 or C6/36 cells, cells grown on 16-well chamber slides were infected with VLPs at an m.o.i. of 1 and incubated for 48 h. Infected cells were visualized as described above.

SDS-PAGE and Western blotting. Transfected cells and supernatants were electrophoresed in SDS/polyacrylamide gels. The protein bands on the gels after SDS-PAGE were transferred onto PVDF membranes and incubated with 1% gelatin in 25 mM TBS that contained 0.01% Tween 20 (TBST). After washing with TBST, the membranes were reacted with the anti-E and/or anti-prM antibodies and then treated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Promega).

Infectivity to arthropod cells. ISE6 or C6/36 cells were infected with infectious VLPs at an m.o.i. of 1. Following VLP absorption for 1 h, the supernatants were harvested and remaining VLPs in the supernatant were titrated. The cells were treated with 0.1 mg Pronase ml⁻¹ (Roche) for 40 min to prevent non-specific binding of VLPs to the cell surface, as described previously (Mizutani *et al.*, 2003). The cell samples were harvested at 1, 2, 4 and 8 h post-infection. RNA was extracted from the cell and reverse transcription was carried out as described previously (Takashima *et al.*, 1997). PCR was carried out by using the following primers: for the region between the 5'-UTR and NS1 of TBE virus, TBES'f and TBENS1r; for the *I. scapularis* β -actin gene, I-actin-F and I-actin-R; and for the *A. albopictus* β -actin gene, A-actin-F and A-actin-R (see Supplementary Table S1, available in JGV Online). The actin gene expression levels were used in control RT-PCR experiments to normalize the amount of cDNA used in each reaction.

RESULTS

Packaging of TBE virus replicon RNA into single-round infectious particles that contain the JE virus envelope

For expression of the flavivirus structural proteins used to package the TBE virus replicon RNA, the following four plasmid vectors, in which TBE virus and/or JE virus structural protein genes were cloned, were prepared (Fig. 1): pcTBECME, which encodes the TBE virus C/prM/E; pcJEME, which encodes the JE virus signal sequence of prM and the prM and E regions; pcJECME, which encodes the JE virus C/prM/E; and pcTBEC-JEME, which encodes the TBE virus C gene and the JE virus signal sequence of the prM-prM-E region.

For the RNA-packaging experiment, TBE virus replicon RNA was prepared from the Oshima REPpt plasmid, which

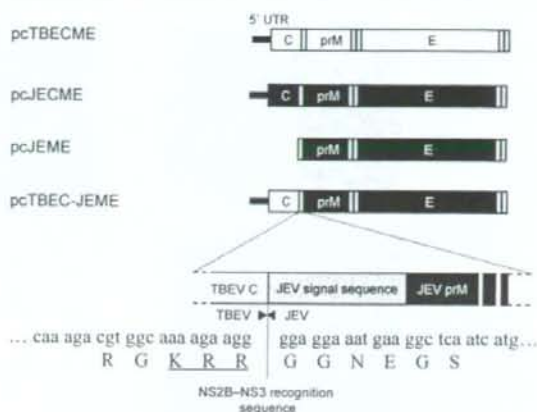


Fig. 1. Schematic representation of the plasmids used for expression of the flavivirus structural proteins. White regions are derived from TBE virus and black regions from JE virus. The signal sequence of prM of pcTBEC-JEME is derived from JE virus.

was constructed from the TBE virus infectious cDNA O-IC plasmid (Hayasaka *et al.*, 2004). In the BHK-21 cells that were infected with PEG-precipitated supernatant from pcTBEC-JEME- or pcTBECME- and replicon-transfected cells, the production of TBE virus NS3 proteins was detected by immunofluorescence assay (IFA) (Fig. 2a, d), which contrasted with the lack of viral protein production observed for cells that were infected with the supernatant of pcJEME- and replicon-transfected cells or that were transfected with replicon RNA alone (Fig. 2b, e). In the case of the supernatant from pcJECME- and replicon-transfected cells, IFA-positive cells were rarely seen (Fig. 2c; representative field). A second passage, in which the supernatants of the infected BHK-21 cell cultures were transferred to fresh BHK-21 cells, resulted in infection in the case of the RNA transfection from full-length infectious cDNA O-IC (authentic virus particles; Fig. 2i), but not in the case of transfection with replicon Oshima REPpt and pcTBEC-JEME or pcTBECME (Fig. 2g, h). These data demonstrate that the particles (VLPs) secreted by pcTBEC-JEME- or pcTBECME- and TBE virus replicon Oshima REPpt-transfected cells have only single-round infectivity potential.

C RNA homology requirement for the secretion of VLPs

To analyse the secretion of VLPs from cells transfected with plasmids that express flavivirus structural proteins and the replicon, transfected cells and supernatant were subjected to Western blot analysis (Fig. 3a). In cells that were transfected with pcTBECME and Oshima REPpt, TBE virus prM and E protein bands were detected by the TBE virus prM- and E-specific antibodies. Moreover, similar intensities were detected by the JE virus prM- and