

IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、GM-CMF、RANTES) をサイトカインアレイ法にて測定した。中でも TNF- $\alpha$  はアポトーシス誘導、感染防御、抗腫瘍作用など多くの生理活性を有しているが、最近では脂肪細胞から産生していることが知られており、細胞内へのグルコース取り込み阻害やインスリン感受性の低下にも関与することが報告されている。

TNF- $\alpha$  測定の結果、DBA/2 は高脂肪食負荷によって TNF- $\alpha$  が増加することが分かった (図 5)。一方、C57BL/6J、BALB/cA は高脂肪食負荷によって TNF- $\alpha$  産生は影響を受けなかった (図 5)。また雄性 DBA/2 は高脂肪食負荷により IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-3、MCP-1、GM-CMF も増加することが分かった。一方 C57BL/6J、BALB/cA は雌雄ともに高脂肪食負荷によって IL-12、RANTES が低下していることが分かった。以上のことからサイトカイン産生においても系統差が存在することが分かった。

現在、生活習慣病に関連する分子および炎症に関連する分子について各臓器 (肝・腎・膵・筋・白色脂肪・褐色脂肪) の遺伝子発現を解析中である。

#### D. 考察

本研究で用いた 3 系統において、雄性マウスが高脂肪食の影響を受けやすく、中でも DBA/2 マウスが最も感受性が高く、生活習慣病になりやすい傾向が示唆された。ま

た炎症に関与するサイトカインについても DBA/2 マウスが高脂肪食負荷により増加の傾向にあった。生活習慣病のパラメーター、免疫機能を制御するサイトカイン産生には系統差、雌雄差が存在することが明らかとなった。

今年度の研究結果からも遺伝子改変マウス作成の際に各疾患にあった系統を選択する重要性が分かる。一般的に C57BL/6 マウスが遺伝子改変マウス作成に広く用いられているが、糖尿病などの生活習慣病研究を目的とする場合は、DBA/2 などの他系統を利用することで表現型が増強される可能性が高い。引き続き FVB, C3H, A/J 等のマウス系統についても同様の検討を進める。

#### E. 結論

食餌などの環境要因が表現型に与える影響を精査することによって、マウス系統差ならびに雌雄差を明らかにすることができた。本研究で明らかとなった各系統、性別の特性を有効に利用することでより、より優れた疾患モデルマウス作出が可能となる。遺伝子改変マウス作出する場合、最適な系統を選択し、効率化を図ることが創薬疾患研究進展の一助となる。本研究によるマウス系統の遺伝的・生理学的情報データベース構築によって、疾患モデルマウス作成に貢献したい。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Uchio K., Sawada K, Manabe N. The expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in podocytes of hereditary nephrotic mice (ICGN strain). *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009 (in press)

2. Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, Uchio-Yamada K., Matsuda J, Suzuki O, Sato K. Type 2 diabetes mellitus in a non-obese mouse model induced by *meg1/grb10* overexpression. *Exp. Anim.* 2008 57(4): 385-395

### 2. 学会発表

1. 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典・眞鍋昇：母胎環境が遺伝性ネフローゼマウス（ICGN 系統）腎病変に与える影響、第 146 回獣医学会、2008 年 9 月 25 日、宮崎

2. 山田-内尾こずえ・澤田京子・國枝孝典・眞鍋昇：胚移植由来ネフローゼマウス（ICGN マウス）産仔の病態解析、第 100 回関西実験動物研究会、2008 年 12 月 5 日、京都

図 1

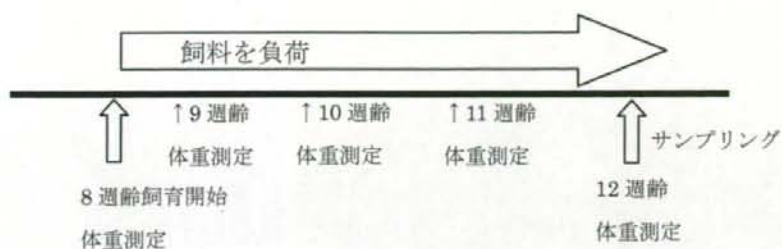


表 1

実験群	系統名	雌雄	飼料	実験群	系統名	雌雄	飼料
1	C57BL/6J	オス	CE2	10	C57BL/6J	メス	CE2
2	C57BL/6J	オス	CE7	11	C57BL/6J	メス	CE7
3	C57BL/6J	オス	QF	12	C57BL/6J	メス	QF
4	DBA/2J	オス	CE2	13	DBA/2J	メス	CE2
5	DBA/2J	オス	CE7	14	DBA/2J	メス	CE7
6	DBA/2J	オス	QF	15	DBA/2J	メス	QF
7	BALB/cA	オス	CE2	16	BALB/cA	メス	CE2
8	BALB/cA	オス	CE7	17	BALB/cA	メス	CE7
9	BALB/cA	オス	QF	18	BALB/cA	メス	QF

図 2

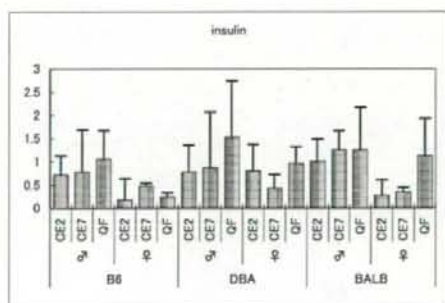
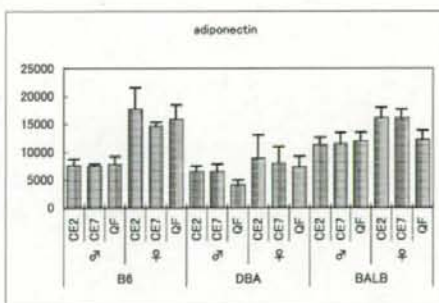
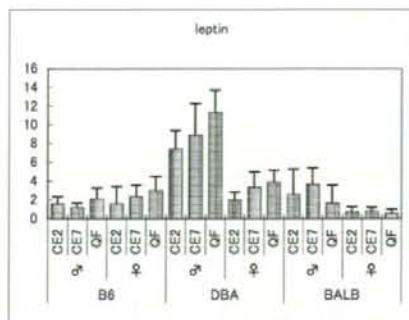


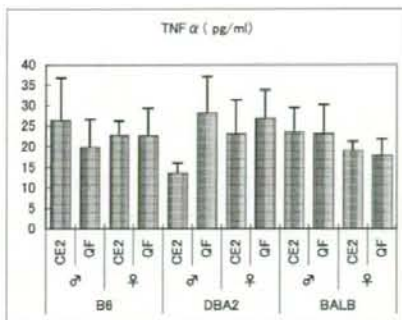
図 3



☒ 4



☒ 5



## カニクイザル cDNA クローンの収集解析と ゲノムデータベースの開発整備

研究分担者 長田直樹 (医薬基盤研究所・生物資源研究部・遺伝子資源室)

研究分担者 亀岡洋祐 (医薬基盤研究所・生物資源研究部・遺伝子資源室)

研究分担者 高橋一朗 (医薬基盤研究所・生物資源研究部・遺伝子資源室)

### 研究要旨

カニクイザルの膵臓、胸腺の各組織からオリゴキャッピング法によりcDNAライブラリーを作成し、各臓器から約10,000クローンずつについてcDNA配列の5'末端配列シークエンス解析を行った。また、カニクイザルとアカゲザルのゲノム情報を比較し、アカゲザルゲノム情報をベースにしたカニクイザルゲノムブラウザを作成した。このデータベースはカニクイザルのcDNA位置情報だけでなく、ゲノム資源であるBACクローンの位置情報やカニクイザルの疾患原因遺伝子にも有用なマイクロサテライト座位の多型情報も統合されており、今後のカニクイザルを用いた遺伝研究の重要な基盤になると考えられる。

カニクイザルは医薬品の効果や安全性また疾患感受性解析などの医学実験に最も頻繁に用いられている霊長類研究資源であり、その遺伝的背景を明確にすることは医学研究推進にとって重要である。我々はこれまでにヒトホモログとしてのカニクイザルcDNAを10,754クローンを収集してきた。RefSeqに登録されているヒトの標準遺伝子は約24,000個であり、カニクイザルではさらなるヒトホモログcDNAの収集が必要である。

### A. 研究目的

カニクイザルはその近縁種のアカゲザルとともに最も頻繁に医学実験に用いられている霊長類のひとつである。アメリカではその医学的重要性を理由にアカゲザルの全ゲノム配列解読が行われ、2007年にその概要版が発表された。それに対してカニクイザルのゲノム情報は圧倒的に少ない。また、アカゲザルのゲノム配列のどの部分が実際に転写されているかについてのトランスクリプトーム情報も非常に少ないのが現状である。本研究ではカニクイザルの遺伝子情報であるcDNAを単離してその配列を解析することにより、カニクイザルの遺伝情報をより高密度にし、将来のサルを使った遺伝的解析の基盤的整備を行うことを目的とする。また、アカゲザルとカニクイザルの近縁性を利用して、アカゲザルゲノムを鋳

型としたカニクイザルゲノム情報データベースの構築が可能である。ゲノムデータベースとこれまで構築されてきたcDNAデータベース、また、新たに開発中であるカニクイザルマイクロサテライト情報を統合することにより、今後カニクイザル疾患家系を用いた原因遺伝子探索の効率が飛躍的に向上するであろうと考えられる。

### B. 研究方法

新規 cDNA については、膵臓、胸腺の各組織からオリゴキャッピング法により完全長 cDNA ライブラリーを作成した(東大菅野研究室との共同研究)。ライブラリー作成に用いられたサルサンプルの採取方法については医薬基盤研究所動物実験倫理指針に基づき、倫理審査委員会にて承認された。ゲノムデータベースはアカゲザルゲ

ノム(rheMac2)をもとに GBrowse ソフトウェアを用いて構築された。cDNA 情報について QFbase(カニクイザル cDNA データベース)と連携させ、新たに得られたマイクロサテライトマーカーの位置・多型情報(寺尾班作成)をデータベースに実装した。また、約 600 のカニクイザル BAC クローンの末端配列を BALST プログラムによりアカゲザルゲノム上にマッピングし、その位置情報もデータベースに統合した。

## C. 研究結果および考察

カニクイザル脾臓、胸腺からそれぞれ約 10,000 ずつの cDNA クローンを単離し、ABI3730 シークエンサーをもちいて cDNA の 5' 末端配列を決定した。解読された配列はヒト遺伝子との相同性により注釈づけられ、カニクイザル cDNA データベースに登録されている(\*URL1)。これらのデータは遺伝子機能などにより容易に検索が可能である。これまでの研究により、総計約 135,000 の cDNA クローンが単離された。これらは 11,218 種類のヒト標準遺伝子(RefSeq)に対応する。したがって現在までに約半数程度の遺伝子がカニクイザルで同定されたと推定される。遺伝子の発現パターンは組織だけでなく、発生時期や生体へのストレスなど様々な条件によって変化する。また、細胞内には細胞あたり 1 コピー以下の微量しか発現されないものがあるために、従来までの方法では得られる遺伝子情報の歩留まりがどうしても存在する。これらの問題はより大量の情報が得られる次世代シーケンサーなどの使用により部分的に克服できると考えられる。

また、これまでの研究より、カニクイザルとアカゲザルの種間のゲノムの違いは、カニクイザルの種内差を考慮に入れると、さほど大きな意味を持たないことが示唆されてきた。そこで、我々はアカゲザルゲノム情報を鋳型にしたカニクイザルゲノムデータベースを構築した(\*URL2)。ゲノム配列にはカニクイザルの cDNA 配列、ヒト遺伝子の相同配列、マイクロサテライトの多型情報、BAC

クローンの末端配列がマッピングされ、その位置情報を確認することができる。また、約 400 の多型性を示すマイクロサテライトマーカーに関する情報も含まれている。したがって、将来的に疾患をもつ家系のカニクイザルの多型解析を行うことにより、原因の座位および原因遺伝子が特定できるであろうと考えている。また遺伝検査によるカニクイザルの個体管理などにも非常に有益なツールとなるであろう。

現在までの努力の結果、全ヒト標準遺伝子のうちおよそ半数の遺伝子についてサル cDNA を得ることができた。このデータはカニクイザルを使った研究のみならず、アカゲザルを用いた研究にも利用することができる。特にアカゲザルではゲノム配列は決定されたが転写産物に関する情報が少ないために、遺伝子の詳細な注釈が不可能であった。我々のデータはこれを補完し、霊長類を用いた医学実験の向上に資することが期待できる。また、今回作成されたカニクイザルゲノムデータベースはカニクイザルを用いて遺伝的な研究を行う場合に非常に役立つツールとなるであろう。

### \*URL1

<http://genbank.nibio.go.jp/qfbase/>

### \*URL2

<http://genbank.nibio.go.jp/cgi-bin/gbrowse/rheMac2/>

## E. 結論

今年度の研究により、カニクイザルの cDNA 配列がますます充実し、世界最大規模の cDNA データベースの充実を図ることができた。近年、サル類を用いた研究のなかで遺伝情報はより重要な役割を担うことになり、ますます整備されていかなければならないと考えられる。そのために今後も様々な組織から遺伝子クローンを単離してコレクションを拡充していくことが必要である。また、ゲノムデータベースに含まれる情報を増やし、他の様々なデータベースと連携させることにより、より有益なものが作られるであろう。他にも次世代

シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析やゲノム配列決定などにより、多くのデータが得られ、霊長類研究が加速されることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表(論文発表)

Naoki Osada, Hideki Innan. Duplication and Gene Conversion in the *Drosophila melanogaster* Genome. PLoS Genet. 4: e1000305 (2008)

Naoki Osada, Shuhei Mano, Jun Gojobori. Quantifying dominance and deleterious effect on human disease genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 841-847 (2009)

Shintaro Iwashita, Kentaro Nakashima, Motoki Sasaki, Naoki Osada, Si-Young Song. Multiple duplication of the bucentaur gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: identification of a novel homolog and distinct cellular expression. Gene *in press* (2009).

#### 学会発表

長田直樹 ヒト疾患とほぼ中立説 中立進化論の

現在 国立遺伝学研究所、三島 2008年7月

長田直樹、亀岡洋祐、高橋一朗、寺尾恵治 実

験用マカク間における遺伝的分化と交雑につ

いてのゲノム解析 第24回日本霊長類学会

明治学院大学 東京 2008年7月

長田直樹 Deleterious Mutations and

Human Diseases: Genomic Perspective.

第10回日本進化学会 東京 2008年8月  
長田直樹 ヒトゲノム中の塩基置換多型と疾患関

連遺伝子について 第62回日本人類学会  
愛知学院大学 名古屋 2008年11月  
亀岡洋祐、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、  
鈴木和男 MPO リーダーペプチドは活性制

御に関与するかII MPO研究会 東京 2008  
年10月  
長田直樹、亀岡洋祐、平田誠、田沼玲子、  
鈴木稯、菅野純夫、高橋一朗 カニクイ

ザル骨髄、脾臓、膵臓由来 cDNA ライブラリ  
ーの解析 日本分子生物学会・日本生化学会  
年会、神戸、2008年12月  
亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田誠、田  
沼玲子、長田直樹、高橋一朗、鈴木和男 人

工ガンマグロブリンの多様性の検討、第31回  
日本分子生物学会年会・第81回日本生化学  
会大会 合同大会、2008年12月 神戸  
Naoki Osada, Yosuke Kameoka, Ichiro  
Takahashi, Keiji Terao. Pattern of

genetic admixture and differentiation  
between *Macaca fascicularis* and *M.  
mulatta* genome. SBE 2008, Barcelona,  
Spain, 2008年6月  
Naoki Osada Analysis of recent gene  
duplication and conversion in the  
*Drosophila melanogaster* genome. JSPS  
International Colloquium (Evolutionary  
Genomics), Bonn, Germany 2009年3月

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1 カニクイザルゲノムデータベースのスクリーンショット

配列の名前、遺伝子名、ゲノム上の位置、その他のランドマークなどを検索します。ワイルドカード文字として\*を使うことができます。ルーラー上でクリックした位置が中心になります。スクロールとズームボタンを使って拡大率と位置を変更します。

例: chr1 BAC, AB052993, chr3 microsatellite, chr1.

[バナーを追加] [この表示をブックマーク] [この画像へのリンク] [ヘルプ] [?] [戻る]

検索

ランドマークまたは領域:

AB052993

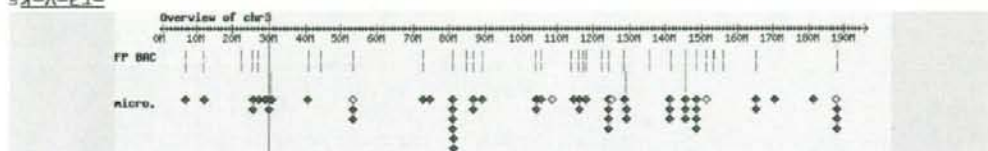
検索

データソース

QFbase-GBrowse

スクロール/ズーム: <<< 表示 100 kbp >>> 戻転

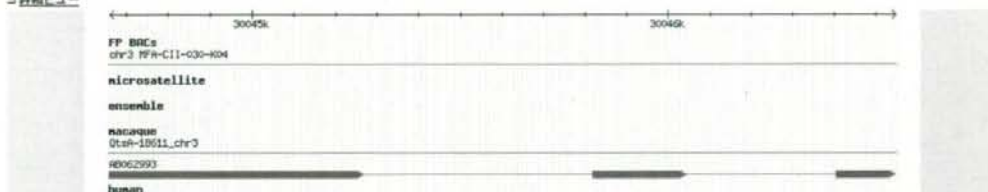
オーバービュー



領域



詳細ビュー



遺伝子名を録音

画像を更新

\* 指定されたカニクイザルゲノム領域上にあるBACクローン、マイクロサテライトマーカー、その近傍遺伝子の情報がわかる。



## 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
<b>Naoki Osada,</b> Sumio Sugano, Yutaka Suzuki.	Evolution of Gene Expression in Human and Chimpanzee Brains	David N. Cooper (Editor), Hildegard Kehrer-Sawatzki (Editor)	Handbook of Human Molecular Evolution.	John Wiley & Sons, Ltd	Chichester	2008	1236-1241
<b>Yasuhiro Yasutomi.</b>	Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration.	Holland, C.R., , an Mitamura, T. Eds.	Structure-based study of viral replication.	World Scientific	Singapore	2008	539-552.

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama H., <b>Yasutomi, Y.</b>	Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	<i>Vet. Path</i>	45	232-235	2008
Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and <b>Yasutomi, Y.</b>	Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	<i>J. Am. Assoc. Lab. Anim</i>	47(5)	1-6	2008

Mori,H., Yamanaka,K., Matsuo,K., <u>Yasutomi,Y.</u> and Mizutani,H.	Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells.	<i>Arch Dermatol.Rev.</i>	<i>July Epub ahead</i>		2008
Yasui,F., Kai,C., Kitabatake,M., Inoue, S., Yoneda M., Yokochi,S., Kase,R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatasu,K., <u>Yasutomi Y.</u> Shida,H	Kidokoro,M., Mizuno,K., Matsushima K. and Kohara,M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV.	<i>J.Immunol</i>	47	1-6	2008
Morioka ,T., Yamanaka,K., Mori,H., Omoto,Y., Tokime,K., Kakeda,M., Kurokawa,I., Gabazza,E., Tsubura A., <u>Yasutomi.Y.</u> and Mizutani, H	IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis.	<i>Br.J.Dermatol</i>		<i>in press</i>	
Okabayashi, S., Ohno,C. and <u>Yasutomi.Y.</u>	Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	<i>J.Comp.Pathol</i>		<i>in press</i>	
清水裕也、唐松 克夫、松原明 弘、保富康宏	ワクチンアジュバント の開発	日本臨床	66	1915-1921	2008

松原明弘、清水裕也、唐松克夫、 <u>保富康宏</u>	経口ワクチンの開発	日本臨床	66	1873-1878	2008
辻村祐佑、加藤翔太、 <u>保富康宏</u>	アレルギー性疾患に対するワクチン開発	PHARMASTAGE	8	14-21	2009
Blancher A, Bonhomme M, Crouau-Roy B, <u>Terao K</u> , Kitano T, Saitou N	Mitochondrial DNA sequence phylogeny of 4 populations of the widely distributed cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis fascicularis</i> ).	Journal of Heredity	99(3)	254-264	2008
<u>Terao K</u>	Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys –The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates.	Journal of Toxicological Science	in press		2009
Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, <u>Akari H</u> , Motoyoshi K, Okada S	Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor	Blood	111	243-250	2008

Sato H, Leo N, Katakai Y, Takano J, <b>Akari H.</b> Nakamura S, Une Y	Prevalence and molecular phylogenetic characterization of Trypanosoma (Megatrypanum) minasense in the peripheral blood of neotropical primates ( <i>Saimiri sciureus</i> and <i>Saguinus midas</i> ) after a quarantine period	Journal of Parasitology	94	1128-1138	2008
Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, <b>Akari H.</b>	Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based viral containment in a macaque AIDS model	Journal of Virology	82	10199- 10206	2008
Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, <b>Akari H.</b> Ishida T, Kimura A	Natural selection in the TLR- related genes in the course of primate evolution	Immuno- genetics	60	727-735	2008
Hohjoh H, <b>Akari H.</b> Fujiwara Y, Hirai H, Wada K	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene	Gene	432	60-66	2009
Izumi T, Takaori- Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <b>Akari H.</b> Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009

<u>Akari H.</u> , Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection	Microbiology and Immunology	53	53-57	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H.</u> , Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Science		印刷中	2009
N. Shimozawa, <u>T. Sankai.</u> , A. Ogura	Reproductive technologies and related studies in the cynomolgus monkey	J. Mamm. Ova Res.	25	133-142	2008
A. Honda, M. Hirose, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, N. Shimozawa, M. Hatori, N. Shimizu, T. Murata, M. Hirose, K. Katayama, N. Wakisaka, H. Miyoshi, K. Yokoyama, <u>T. Sankai.</u> , A. Ogura	Stable ES cell lines in rabbits : potential small animal models for human research	Reprod. Biomed. Online.	17(5)	706-715	2008
J. Tsuchida, T. Yoshida, <u>T. Sankai.</u> , Y. Yasutomi	Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques ( <i>Macaca fascicularis</i> )	J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.	47(5)	29-34	2008
S. Hayasaka, Y. Terada, K. Suzuki, H. Murakawa, I. Tachibana, <u>T. Sankai.</u> , T. Murakami, N. Yaegashi, K. Okamura	Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, MyRIP, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis	Asian. J. Androl.	10(4)	561-568	2008

S. Nakamura, S. Okabayashi, N. Ageyama, H. Koie, <b>T. Sankai</b> , F. Ono, K. Fujimoto, <b>K. Terao</b>	Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey	Vet. Pathol.	45	67-72	2008
Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, <b>Uchio-Yamada K. Matsuda J. Suzuki O.</b> Sato K.	Type 2 diabetes mellitus in a non-obese mouse model induced by megl/grb10 overexpression.	Exp. Anim.	57(4)	385-395	2008
<b>Uchio K.</b> Sawada K, Manabe N.	The expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in podocytes of hereditary nephrotic mice (ICGN strain).	<i>The Journal of Veterinary Medical Science</i>	in press	in press	2009
<b>Naoki Osada,</b> Shuhei Mano, Jun Gojobori	Quantifying dominance and deleterious effect on human disease genes	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	106(3)	841-846	2009
Shintaro Iwashita, Kentaro Nakashima, Motoki Sasaki, <b>Naoki Osada,</b> Si-Young Song	Multiple duplication of the bucentaur gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: identification of a novel homolog and distinct cellular expression	Gene	印刷中	印刷中	2009

## Chapter 20

# Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-like Particles Presenting Foreign Epitopes as a Novel Vector of Vaccine by Oral Administration

*Yasuhiro Yasutomi*\*,<sup>†</sup>

Virus-like particles (VLPs) are useful for studies on virion formation, host immune responses to viruses, and vaccines in no practical cell culture systems to allow the growth of virus. Among the various non-replicating molecules, VLP, an empty particle with a structure similar to that of an authentic virus particle, offers the possibility of a new approach for these studies. Hepatitis E virus (HEV) is an unclassified calicivirus-like, positive-strand RNA virus that causes human acute hepatitis by fecal-oral transmission. HEV first infects epithelial cells of the small intestine and then reaches the liver through the portal vein. It has been reported that intact open reading frame 2 (ORF2) of HEV is expressed as a membrane glycoprotein when artificially expressed in mammalian cells *in vitro*, probably because the N-terminal amino acid sequence serves as a signal peptide.<sup>1,2</sup> On the other hand, the intact ORF2 expression in insect cells resulted in various sizes of proteins with cleavages on both N- and C-termini, of which 53 kD polypeptides secreted in the culture supernatant.<sup>3-5</sup> It has also been reported that only after cleavage of C-terminal, which results in molecular weight reduction to

---

\*Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan.

<sup>†</sup>Department of Immunoregulation, Mie University Graduate School of Medicine, Mie 514-8507, Japan. E-mail: yasutomi@nibio.go.jp; yasutomi@doc.medic.mie-u.ac.jp.

54 kD, does ORF2 participate in the VLP formation.<sup>6,7</sup> In this chapter, investigation of HEV-VLP could be carried a molecule for foreign antigenic epitopes and to stimulate mucosal immunity without the need for adjuvant.

## Chimerization of VLP

Chimerization of VLP is a unique and useful method for studying morphology, assembly and host recognition of a virus. However, there are not many reports about chimeric VLP in the fields of virology and immunology. Moreover, the induction of immune responses through natural infectious route against not only VLPs but also carrying epitopes is limited.<sup>8-12</sup> Some chimeric plant virus particles carrying foreign epitopes have been reported.<sup>13</sup> These chimeric virus particles are replication-competent and elicit immune responses through mucosal immunization. These particles were derived by foreign epitope insertion in a cDNA of a virus. Chimeric VLPs obtained by the same method have also been reported.<sup>8-11</sup> Successful chimerization is dependent on selection of an appropriate insertion site in VLPs. Another system for chimerization of VLP is co-infection of a couple of baculoviruses in the same cells, which allows VLPs to be obtained as chimeric VLPs.<sup>12</sup> This method is an easy way to obtain the chimeric VLP, although the stability of molecular constructs and the characteristics of morphology to original virus are not promised. Chimeric VLPs obtained by foreign-molecule insertion are suitable for studying morphogenesis of viruses and host recognition to both VLPs and inserted molecules.

## HEV-VLP

Hepatitis E is an acute viral hepatitis caused by infection with HEV that was first recognized in India 1955. The HEV has been isolated from various animals, suggesting that hepatitis E is a zoonosis.<sup>14,15</sup> Although an *in vitro* culture system to amplify HEV has not been developed, over-expression of a part of ORF2 in a baculovirus expression system allows this protein to assemble into a VLP.<sup>6</sup> Formation of this VLP occurs only when N-terminal of ORF2 — where potential



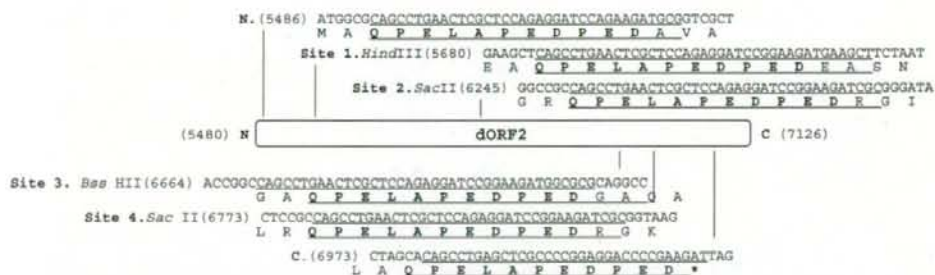
signal sequence is encoded — was deleted from the expression construct.<sup>6,16</sup> It has also been reported that additional endogenous cleavage of 52 amino acids at the C-terminal is necessary for the assembly of a VLP.<sup>6,7</sup> HEV-VLP appears as an empty particle of a slightly smaller size than that of a mature HEV particle.<sup>6,7</sup> An HEV-VLP has several advantages for studying virus formation or host recognition. In our experience, large amounts can be easily obtained from standard cultivation protocols compared with amounts of other VLPs obtained. The amount of purified HEV-VLPs collected from culture supernatant of 50 to 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  is more than 100 times greater than that of other VLPs. It has recently been found that the VLPs elicit strong immune responses when administered orally into mice as same to a natural infection route.<sup>17</sup> Moreover, it has been shown that oral inoculation of cynomolgus monkeys with HEV-VLP prevents the infection of native HEV by intravenous injection.<sup>18</sup> These findings indicated that HEV-VLPs conserved original HEV construction to enter the target cells. Conservation of the virus construct in VLPs is very attractive for vaccines inducing the same type of immune responses to virus infection.

### Chimeric HEV-VLP Carrying Foreign Epitope

pVL5480/7126, a baculovirus transfer vector that includes a portion of the ORF2 from HEV (dORF2), was described previously.<sup>6</sup> To insert the tag sequence within dORF2, oligonucleotides that encode the tag amino acid sequence were synthesized as shown in Table 1, and described previously.<sup>9</sup> The restriction sites used for insertion sites 1 to 4 were *Hind*III, *Sac*II, *Bss*HIII, and *Sac*II sites at nucleotide positions 5679, 6245, 6664, and 6773, respectively. For each site, oligonucleotide pairs of Htg5(0) and Htg3(GA), Htg5(+1) and Htg3(0), Htg5(0) and Htg3(GG), and Htg5(+1) and Htg3(0) were used, respectively. A C-terminal tag was added at a position 52 amino acids upstream from the translational terminal. This site was chosen because the last 52 amino acids at the C-terminal of ORF2 are cleaved off during the formation of VLPs. The nucleotide sequences around the inserted tag are schematically shown in Fig. 1. The plasmid containing the chimeric dORF2 was co-transfected

Table 1. Oligonucleotides Used in this Study

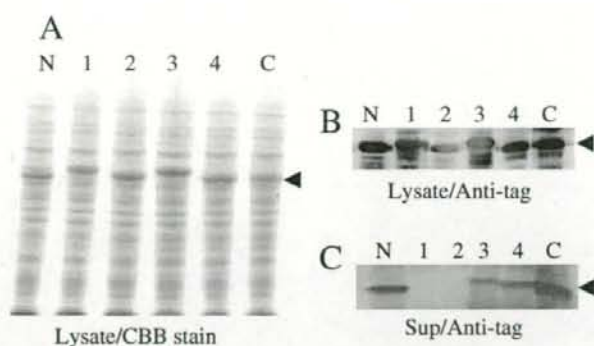
Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')
HEVBacBg	CGCAGATCTATGGCGGTGCTCCAGCCC
HEV52Pr	CTGCAGCTATGCTAGCGCAGAGTG
Htg5(0)	CAGCCTGAACTCGCTCCAGAGGA
Htg5(+1)	GCCAGCCTGAACTCGCTCCAGAGGA
Htg3(0)	ATCTTCCGGATCCTCTGGAGCGAG
Htg3(GA)	TCATCTTCCGGATCCTCTGGAGCGAG
Htg3(GG)	CCATCTTCCGGATCCTCTGGAGCGAG
Tag(-52)	CTGCAGCTAATCTTCGGGGTCCCGGGGCGAGCT CAGGCTGTGCTAGCGCAGAGTGG
BglTag	AGATCTATGGCGCAGCCTGAACTCGCTCCAGAGGA TCCAGAAGATGCGGTGCTCCAGCCCATGAC



**Fig. 1.** Schematic diagram and sequences around the tag epitope insertion sites in dORF2. Upper rows show nucleotide sequences and lower rows show the corresponding amino acid sequences. Amino acid numbers relative to the full-length ORF2 are indicated next to the amino acid before the inserted amino acids. Nucleotide numbers referring to HEV genome are in parenthesis. Inserted sequences are underlined. The tag epitope amino acid sequence is in bold face.

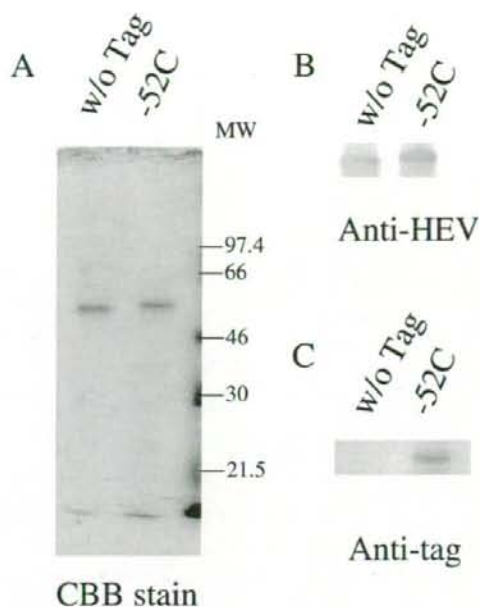
with baculovirus DNA, and the recombinant baculovirus was generated as described previously.<sup>6</sup> The production and purification of HEV-VLP was performed as described previously.<sup>6,7</sup>

Utilizing any of the insertion sites, the chimeric dORF2 was expressed at almost equal levels in the cell lysates (Fig. 2A). The antigenicity of the tag epitope was maintained in all cases, as shown by



**Fig. 2.** Expression of chimeric dORF2. A. Expression in the cell lysates was examined by Coomassie brilliant blue staining. B. Antigenicity of the tag epitope in the cell lysates was confirmed by Western blotting with the anti-tag antibody. C. Presence of each chimeric dORF2 in cell supernatant (8  $\mu$ l) was examined by Western blotting with the anti-tag antibody. The insertion site for each chimera is indicated at the top of the panel. N; N-terminal, 1 to 4; sites 1 to 4, respectively, C; C-terminal. The arrowhead on the right of each panel indicates the position of the chimeric dORF2.

Western blot analysis (Fig. 2B). Even at the C-terminal region, where the native HEV amino acid sequence is cleaved, the tag was not cleaved off from dORF2 (Fig. 2B, lane C). Among these chimeras, only the N- and C-terminal insertions resulted in release of a large amount of chimeric dORF2 into the culture supernatant (Figs. 2C and 2D), although small amounts were released when the insertions were made at either site 3 or 4. These results indicate that internal insertions somehow disturbed the release of dORF2 into the culture supernatant. The precise mechanisms involved in the HEV virion formation are not yet clear. The added tag at 52 amino acids upstream from the C-terminal region, where dORF2 is normally cleaved in insect cells, was not cleaved off in the infected cells during the generation of the chimeric VLPs. This is most likely due to alteration of the amino acid sequence recognized by the proteolytic enzyme involved in the C-terminal modification of HEV-VLP. The successful addition of extra amino acid sequences to the C-terminal of dORF2 suggests that the presence of extra amino acids at the C-terminal is not crucial



**Fig. 3.** Purification of the chimeric VLP. Purified VLP-52C was analyzed for its purity (A) and reactivity to anti-HEV (B) and anti-tag antibodies (C). A. Equal amounts (0.3  $\mu\text{g}$ ) of purified VLP-52C (-52C) and VLP without tag (w/o Tag) were separated on SDS-PAGE and stained by Coomassie brilliant blue staining. Positions of molecular weight markers are indicated on the right of the panel. B and C. Equal amounts (0.1  $\mu\text{g}$ ) of VLP-52C (-52C) and VLP without tag (w/o Tag) were analyzed by Western blotting using anti-HEV (B) and anti-tag (C) antibodies, respectively.

for preventing dORF2 from being incorporated into a VLP form. Rather, the amino acid sequences encoded by the HEV ORF2 genome prevented the formation of VLP.

We attempted to purify chimeric VLPs from the supernatant of Tn5 cells expressing chimeric dORF2 with a tag at either C-termini. The VLP-52C was slightly larger than the HEV-VLP without the tag (Fig. 3A). The purified VLP-52C retained the antigenicity of HEV as well as the intact tag epitope, as shown by the reactivity of specific antibodies (Figs. 3B and 3C).

Electron microscopic observation showed that VLP-52C was approximately 25 nm in diameter and indistinguishable from the