

E型肝炎ウイルス粒子の感染性を規定する因子の解析

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第2部 室長 石井 孝司

研究要旨 E型肝炎ウイルス（HEV）は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことが研究を困難にしていたが、最近になって PLC/PRF/5 細胞を用いることによりウイルスを増殖させることができることが報告された。本研究では、PLC/PRF/5 細胞で増殖することができる HEV 株を取得し、本株からの感染性の全長 cDNA のクローニングと、感染能のよい細胞の分離を試みた。

A. 研究目的

E型肝炎は、通常 HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよい HEV の増殖系を確立することが望まれている。

本研究では、ヒト肝癌由来細胞株である PLC/PRF/5 を用い、本細胞株で増殖できる

HEV 株の取得と、この株からの感染性の cDNA のクローニングを行った。

B. 研究方法

E型肝炎ウイルス（HEV）に感染したブタ肝臓より組織乳剤を作成し、PLC/PRF/5 細胞に感染させ、本細胞で増殖可能な HEV 株 83-2 を取得した。本株は genotype 3 であった。全長を 5 つのフラグメントに分割して RT-PCR により cDNA を取得し、連結して全長 cDNA を構築した。5' 端に導入した T7 promoter を用いて全長 RNA を合成した。

一方、PLC/PRF/5 に HEV を感染させ、抗 HEV 抗体を用いて蛍光抗体染色を行うと、長期間培養後も HEV に感染していない細胞が見られ、この細胞株はヘテロな集団であることが推測された。そのため、single cell cloning を行い、クローニングされた多数の細胞株について HEV の感染性を調べた。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに

樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

合成した全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入したところ、導入後 1 週間から培養上清中に HEV 抗原蛋白 (ORF2、キャプシド蛋白) の分泌が観察され、この RNA は細胞内で増殖することが確認された。また、この培養上清を naïve な PLC/PRF/5 細胞に添加したところ、2 週間目から培養上清中に HEV 抗原蛋白の分泌が確認されたことから、本クローンは感染性を有することが確認できた。

PLC/PRF/5 細胞については、single cell cloning により約 100 株を取得した。現在、各株の HEV 感受性について検討している。

D. 考察

HEV の感染性クローンを取得することができたため、今後は本クローンをを用いた reverse genetics の実験を行い、特に HEV の感染性を規定する領域の解析、感染細胞内でのウイルス複製機構の解析を行うことを予定している。

また、PLC/PRF/5 細胞のクローニングにより得られた多数の細胞株の HEV 感受性を調べ、その中で効率よく HEV が感染できる細胞を選択し、培養細胞系の確立を目指す。また、感染できる細胞とできない細胞を比較解析することにより、宿主側で HEV 感染に重要な役割を果たすと考えられる因子の解析を行いたい。

E. 結論

HEV の感染性クローンを取得した。また、PLC/PRF/5 細胞をサブクローニングし、約 100 株を得た。HEV 感染に対する感受性について検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology Journal*, 7: 212 (2010)

2. Masaki T., Suzuki R., Saeed M., Mori K., Matsuda M., Aizaki H., Ishii K., Maki N., Miyamura T., Matsuura M., Wakita T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *Journal of Virology*, 84: 5824-5835 (2010)

3. Zhang Y.-Y., Zhang B.-H., Ishii K. and

Liang T. J. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *Journal of Virology*, 84: 3396-3407 (2010)

4. Hmwe S., Aizaki H., Date T., Murakami K., Ishii K., Miyamura T., Koike K., Wakita T. and Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Research*, 85: 520-524 (2010)

5. 石井孝司、李 天成 E 型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)

6. 清原知子、石井孝司 ファクトシート (案) 1. A型肝炎. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書: 社団法人畜産技術協会: 255-259, 2010. 3.

7. 清原知子、石井孝司 新時代のワクチン戦略について考える A型肝炎 臨床検査 54: 1383-1391 (2010)

2. 学会発表

1. 清原知子、石井孝司、脇田隆字: B型肝炎ワクチンの in vitro 試験: Inhibition Assay、第14回日本ワクチン学会、平成22年12月、東京

2. 森山正樹、赤澤大輔、横川 寛、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討、第14回日本ワクチン学会、平成22年12月、東京

3. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、脇田隆字、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛: 2010年に日本で多発した A型肝炎

の分子疫学的解析、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島

4. 石井孝司、吉崎佐矢香、杉山奈央、加藤孝宣、李 天成、武田直和、脇田隆字: E型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島

5. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、成松 久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、久保田智巳: X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島

6. 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスの trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、第58回日本ウイルス学会、平成22年11月、徳島

7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.

8. Ishii K. Surveillance of hepatitis A virus in Japan. Research Forum for the Tohoku-RITM Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. Manila, Philippines, December 10, 2010.

9. Yokokawa H., Akazawa D., Moriyama M., Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T., Kato

T., Ishii K. and Wakita T. Development of a purification method of highly purified HCV virion for industrial production. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.

10. Moriyama M., Akazawa D., Yokokawa H., Nishimura K., Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T., Kato T., Ishii K. and Wakita T. The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.

11. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Efficient production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.

12. Li T.C., Liu R., Yoshizaki S., Ishii K., Miyamura T., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.

13. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Use of trans-complemented hepatitis C virus

particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

なし

新規ポリオーマウイルスの感染増殖系探索にむけたレポーターシステムの開発とウイルスの細胞指向性を決定するカプシドの機能解析

研究分担者 中西 章（独）国立長寿医療研究センター老化制御研究部 室長

研究要旨 WUV, KIV をはじめとして次々と発見される新規のヒトポリオーマウイルスについてウイルス学的診断法を開発するために、当研究者が開発した surrogate capsid system を利用して、初めて WUV, KIV カプシドを持つレポーター粒子を作成しその感染性（遺伝子導入性）を確かめた。また、ポリオーマウイルスの細胞指向性を規定するカプシドの機能解析を行うため、細胞指向性が異なるウイルス間でのハイブリッドカプシドウイルスを作成して、その細胞指向性を解析したところ、細胞指向性の決定は、ウイルス粒子表面を構成する VP1 のみではなく、粒子内部に存在する VP2/3 も関与することを明らかにした。

A. 研究目的

2007 年から今年 2011 年に至るまで、計 7 種の新たなヒトポリオーマウイルスが発見されている。ヒト皮膚がん（メルケル細胞がん）からは MCV、ヒト棘状毛胞異形成症から Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) が見つかったが、これらウイルスの感染とがん化・発症等との関連は明かではない。また、WUV, KIV, HPyV6, 7, 9 などのウイルスに至っては直接関連する病態は不明である。近年の報告ではこれら新規ポリオーマウイルスに対する抗血清をもつヒトの割合は MCV では 60-90%、WUV, KIV では 80-90% と報告されており、これらウイルスが無視できないほど高い割合で存在していることが明らかになっている。これらウイルスの診断法・感染増殖系の確立に向けた基盤研究を行うために、(1) 新規ヒトポリオーマウイルスのカプシドを利用したレポーターシステムを開発し、感染できる細胞種の探索を簡便化すると同時に、(2) 新興ポリオーマウイルスが増殖する培養細胞の探索を支援することを目的として、細胞特異的な感染の

決定要因となるカプシドについてその細胞侵入機能の解析を行った。

B. 研究方法

本研究者が開発した surrogate capsid system により、WUV あるいは KIV のカプシドをもつレポーター粒子を作成した。WUV, KIV の VP1 遺伝子は感染研ウイルス第 2 部李先生より分与された。WUV, KIV の VP2/3 遺伝子は NCBI の配列情報 (WUV: NC009539, KIV: NC009238) をもとに人工合成し、それぞれの VP1 遺伝子と組み合わせて、WUV, KIV の後期遺伝子コード領域を再構成した。CAG プロモーター下流に各後期遺伝子コード領域を組み込み、pCAG WUV, pCAG KIV を作成した。これらの (1) DNA いずれかと (2) SV40 T 抗原を発現するコンストラクト (pCI Ts)、(3) SV40 複製開始点をもつレポーター遺伝子発現カセットをもつ 3 種のレポーター DNA のいずれか、a) 分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を発現する pSEAP2、b) 分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、あるいは c) ZsGreen 蛍光蛋白質を

発現する pSCMV ZG、と共に 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。各細胞抽出液を Nuclease 処理の後、27-39% Optiprep (Beckman SW50, 45, 000rpm, 3.5hours, 10°C) の連続密度勾配遠沈により分画し、それぞれのレポーターDNA をパッケージした粒子を回収した。SEAP 活性は SEAP アッセイキット (Toyobo)、Gluc 活性は Biolum assay kit (New England Biolab) で、それぞれ測定し、ZsGreen 発現は蛍光顕微鏡下で観察し各レポーター粒子の遺伝子導入性を検証した。

細胞特異性を規定するカプシドの機能解析を行うため、限定した細胞種にしか感染しない JCV, LPV と、感染する細胞種をあまり選ばない SV40 を例に取り、SV40 ゲノムを基にして VP1 または VP2/3 を JCV, LPV のものと交換した以下の組み合わせのキメラウイルスゲノムを作成した：SV40 VP1-JCV VP2/3 (S1-J3), SV40 VP1-LPV VP2/3 (S1-L3), JCV VP1-SV40 VP2/3 (J1-S3), LPV VP1-SV40 VP2/3 (L1-S3)。これらの組換えウイルスゲノムを TC7 細胞にトランスフェクションして、VP1 と VP2/3 の由来が異なるハイブリッドカプシドウイルスを回収した。これらのウイルスは SV40 の受容細胞である TC7 細胞、あるいは JCV/LPV 感染を支持する細胞、SVG/BJA-B 細胞へ感染させ、その感染効率をウイルス DNA 増幅量の検出により解析した。

C. 研究結果

WUV、KIV のカプシドを持つレポーター粒子を作成するため、pCAG WUV、pCAG KIV をそれぞれ pCI Ts と pCMV Gluc2 と共に 293T 細胞にトランスフェクションした。その細胞抽出液を Optiprep の密度勾配遠沈により 16 分画に分け、各分画についてレポーターDNA の存在を検出するため SV40 Ori をターゲットとして PCR を行った。同時に作成した SV40 レポーター粒子を対照にしたところ、SV40 粒子と同様な分画に PCR のバンドが観察され、WUV、KIV のレポーター粒子の生成が示唆された。これらの粒子を含むと思われる分画をプールし、real-time PCR でレポーターDNA を定量すると、総量約 106-107 コピ

一であり、SV40 レポーター粒子の収量約 108 と比べると劣っていた。293T, CV-1, BSC-1 細胞に対し、細胞あたり 1, 10, 100, 1,000 コピーDNA にあたるサンプルを遺伝子導入に用い、導入後 48-60 時間で細胞上清の SEAP あるいは Gluc の活性を測定した。SV40 レポーター粒子には及ばないものの、WUV、KIV 共にいずれの細胞にも与えたコピーDNA 量の増加に沿ってシグナルの増加が検出され、WUV、KIV のカプシドによるレポーターDNA の細胞への導入が示唆された。同様に、ZsGreen を発現するレポーターDNA を包含させたレポーター粒子による遺伝子導入でも、ZsGreen の発現が確認できた。

各種キメラウイルス DNA を TC7 細胞にトランスフェクションし、27-39% Optiprep 密度勾配遠沈で分画し、SV40 origin 配列をターゲットとした PCR でウイルス DNA を検出したところ、SV40 ウイルス粒子と同様な位置に各ハイブリッドカプシドウイルス DNA のピークが検出できた。これらのピークを集めウイルス DNA 濃度を合わせ Western blot でカプシド蛋白質を検出したところ、野生型ウイルス粒子と同様な量の各カプシド蛋白質が検出でき、野生型ウイルス粒子と同様な量比で各ハイブリッド粒子が形成されていることが示唆された。これらの粒子を種々の細胞に感染させたところ、SV40 の VP2/3 をもつハイブリッドカプシドウイルスは、VP1 が由来するウイルスの特異性を維持しつつより高い感染性を示す傾向をしめした。たとえば、J1-S3 は JCV の増殖細胞株である SVG に対して、SV40/JCV より高い感染性を示し、また L1-S3 は、LPV 増殖細胞株である BJA-B 細胞で増殖し (SV40 は不可)、また TC7 細胞でも増殖が可能になった。一方 SV40 の VP1 をもち JCV あるいは LPV の VP2/3 をもつハイブリッドカプシドウイルスはいずれの細胞でも低い感染性しか示さなかった。

D. 考察

新たに発見されたポリオーマウイルス、WUV、KIV、のカプシドを利用してレポーター粒子を作成し、293T, CV-1, BSC-1 細胞への遺伝子導

入を確かめた。これらレポーター粒子の作成に用いた遺伝子配列は、臨床検体からの増幅産物であり、感染性ゲノム配列のものであることは証明されていない。遺伝子導入性をもつレポーター粒子生成はこれらの配列が感染性ウイルスのものであることを示唆している。現時点ではレポーター粒子の生化学的な検証はまだ十分ではないため、コンポーネントの構成比・電顕下での形態解析などを行い、レポーター粒子としての確証を積み重ねる必要がある。また調査した細胞種は限定的であるが、WUV/KIV は呼吸器系疾患患者から見つかる場合が多いためヒト小気道上皮細胞も感染増殖細胞の候補一つとして、現在は細胞種を広げて各レポーター粒子の遺伝子導入性を確かめている。

ポリオーマウイルスの細胞レセプターはSV40 が GM1 及び MHC I, JCV は GT1b 及び Serotonin receptor、などとされているがこれらレセプター分子の分布から各ウイルスの細胞特異性を説明するのは難しい。しかしポリオーマウイルスの細胞特異性はほぼカプシド蛋白質が担っていることから、粒子表面を構成する VP1 と細胞レセプターとの結合とは異なる作用点が細胞特異性に影響を与えていると考えられている。ハイブリッドカプシドウイルスによる実験により、SV40 VP2/3 は JCV または LPV の VP1 と組み合わせにより、VP1 が由来するウイルスの細胞指向性を維持しつつより高い感染性を示すことが明らかになった。粒子内部にあるとされる VP2/3 がウイルスの細胞特異的な感染性に影響を与えうるということは、VP2/3 が機能すると考えられているウイルスの細胞内移行過程での細胞特異性の関与が示唆される。SV40 VP2/3 をもつハイブリッドウイルスが細胞指向性を維持しつつより高い感染性を示したことを利用して、分離培養が難しいウイルスの VP2/3 を SV40 のものと交換することにより、細胞培養を容易にするこ

ともアイデアとして考えることが可能であり、新規ウイルスの感染培養細胞の探索の方向性にも示唆を与える発見である。

E. 結論

新規ポリオーマウイルス、WUV 及び KIV のレポーター粒子を作成しその感染性（遺伝子導入性）を検証した。

ポリオーマウイルスの細胞特異性の決定には粒子内部カプシド蛋白質 VP2/3 が関与することが明らかになった。

F. 研究発表

論文発表

1. Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., and Ono, S.
Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*
2. Tange, S., Imai, T., Nakanishi, A.
An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect.
Virus Res. (in press)

G. 知的所有権の出願・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

B型肝炎ウイルス S 抗原の分泌機構の研究

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 HBV の S 抗原の効率良い発現系の確立はワクチンおよび診断系に重要であるが、HBV の S 抗原分泌機構は必ずしも十分に解明されていない。そこで、各遺伝子型の HBs 抗原を効率良く産生する方法を開発するために、HBs 抗原の分泌効率を規定する遺伝子領域を解析した。分泌効率の異なる株 HBV-Aeus と HBV-Cat のキメラプラスミドの解析から、HBV-Cat の preS1-preS2 領域を HBV-Aeus の配列に置換すると S 抗原が効率よく分泌できることが明らかとなった。両株間の遺伝子配列を詳細に比較したところ、Large S, Middle S, Small S 蛋白質の翻訳開始点における Kozak 配列周辺に違いが認められた。そこで、翻訳開始点周辺の遺伝子配列が S 抗原の発現および分泌効率に及ぼす影響を明らかにするために、9 種類の変異体プラスミドを作製し解析した。その結果、preS2 の開始コドン付近に 1 塩基または 4 塩基の変異を導入することにより、細胞上清中の S 抗原産生が著しく向上することが明らかになった。Middle S の効率良い発現が、small S の発現、分泌効率に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

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 種類の遺伝子型に分類できるようになった。遺伝子型分類による臨床疫学研究が進むにつれて、慢性化しやすい遺伝子型、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た。我が国の HBV 感染は、従来 genotype C が中心であったが、近年、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、本邦の厚生労働行政上、重大な課題となってきた。

HBV の S 抗原は HBV ワクチンおよび診断系に用いられており、効率良い発現系が重要であるが、HBV の S 抗原分泌機構は必ずしも十分に解明されていない。各遺伝子型の HBs 抗原の効率のよい産生系が確立されれば、簡便な ELISA 系

を構築し、各遺伝子型の臨床病態、流行状態を的確に判断できるようになる。また、全ての遺伝子型に有効なワクチンが今後必要になると予想されるため、S 抗原産生を規定する遺伝子領域の解明を目的として、HBs 抗原の発現解析を行った。

B. 研究方法

(1) HBV キメラプラスミドの作製

HBV-Aeus, HBV-Cat 株 (国立国際医療センター、溝上センター長から供与) の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を PCR 法で作製し、pSV プラスミドにサブクローニングしたものを、Huh7 細胞にトランスフェクトし、細胞内および培養上清中への HBs 抗原の発現、および分泌を ELISA 法で解析した。

(2) HBV-Aeus 株の PreS2-S 領域開始部分の配列は (CTGTGACGAACATGG) であるが、HBV-Cat 株の

配列 (CTGCACCGAACATGG) への変異体。

MT1 (CTGCAACGAACATGG)

MT2 (CTGTGCCGAACATGG)

MT3 (CTGTGACGAACATGG)。(下線が変異部位)

HBV-Cat 株の PreS1-PreS2 の配列 (ATCCTCAGGCCATGCAAGTGAAT) への変異体

MT4 (ATCCTCAGGCCATGCAATGCAAC)

MT5 (ATCCTCAGGCCATGCATGGAAC)

MT6 (ATCCTCAGGCCAGGCAATGGAAC)

MT7 (ATCCTCAGGCCAGGCCATGAACT)

MT8 (ATCCTATCCTCATGCAATGGAAC)

MT9 (ATCCTCAGGCCATGCAACTCCCAC)

これらの変異体プラスミドを QuickChange site-directed mutagenesis kit にて作製した。

(3) 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 HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で解析した。

(4) 細胞上清中への HBs 抗原分泌効率を ELISA 法で検討し、どの領域が HBs 抗原分泌に重要であるかを解析した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。

C. 研究結果

(1) HBV キメラプラスミドの作製

HBV-Aeus 株 pSV-AAA, HBV-Cat 株 pSV-CCC およびの PreS1, PreS2, S 領域を上記のように組換えた変異体プラスミド pSV CCC-MT1, pSV CCC-MT2, pSV CCC-MT3, pSV CCC-MT4, pSV CCC-MT5, pSV CCC-MT6, pSV CCC-MT7, pSV CCC-MT8, pSV CCC-MT9 を作製した。

(2) Huh-7 細胞へ上記 11 種類のプラスミドとコントロールプラスミド (pSV-zeo) をトランスフェクトした後、day 1, 2, 3, 4 で細胞および培養上清を回収した。HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で解析したところ、いずれにおいても、small S 蛋白質が予想されたサイズ (22kDa, 26kDa) で検出された。

(3) HBsAg の上清中への分泌量は genotype A の

wild type (pSV-AAA) 方が最も高く、day 3 でピークとなり、60ng/mL と効率良く分泌されていた。genotype C の wild type (pSV-CCC) では day 3 で 26ng/mL と pSV-AAA の約 43% と低値であった。

(4) pSV-CCC MT1, 2, 3, 5, 6, 7 は pSV-CCC とほぼ同様な分泌パターンを示した。

(5) pSV-CCC-MT4 と pSV-CCC-MT9 が著明に分泌が回復しており、いずれも day 3 でピークに達した。pSV-CCC-MT4 では 43ng/mL, pSV-CCC-MT9 では 53ng/mL と効率良く分泌していた。特に pSV-CCC-MT9 は pSV-AAA とほぼ同等な分泌パターンを示していた。

D. 考察

HBV genotype A の HBV-Aeus 株は genotype C の HBV-Cat 株に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高い。分泌効率が異なる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したところ、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示された。そこで、更に詳細に解析するために 9 種類の変異プラスミドを作製し、HBs 抗原分泌効率を比較検討した。

S 領域の翻訳開始点の Kozak 配列の変異では small S 抗原の発現および分泌にほとんど影響は見られなかった。ところが、middle S の発現に影響を及ぼす preS2 の遺伝子配列で S 抗原の上清への分泌量が著しく変化することが明らかとなった。

MT4 (ATCCTCAGGCCATGCAATGCAAC) 変異は preS2 の開始コドンより下流の+6 位の G→C 変異させたものであり、この一塩基の変異により pSV-CCC と比較して 60% ほど分泌量が向上した。また、MT9 (ATCCTCAGGCCATGCAACTCCCAC) 変異は分泌量が二倍以上に向上した。MT4 では二つ目の ATG の後に C を入れることで分泌が向上していた。また、MT9 では二つ目の ATG を消失させると分泌効率は飛躍的に向上した。一方、PreS2 の翻訳開始部位の ATG に変異を導入した MT6, MT7 では分泌効率の改善が見られなかった。これらの結果から、Kozak 配列そのもので

はないが、PreS2 の二つ目の ATG あるいは二つ目の ATG の Kozak 配列に相当する部位の配列が重要であると考えられた。これより、Middle S の効率良い産生が起こると、small S の産生効率と分泌効率が向上する可能性が示唆された。今後、さらに詳細に変異株を作製し検討すると共に、他の遺伝子型の HBsAg 発現系でも検討する必要があると考えられた。

E. 結論

preS2 の開始コドン付近に 1 塩基または 4 塩基の変異を導入することにより、細胞上清中の S 抗原産生が著しく向上することが明らかになった。Middle S の効率良い発現が、small S の発現、分泌効率に関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) El-Shamy, A., Shoji, I., Saito, T., Watanabe, H., Ide, Y-H., Deng, L., Kawata, S., and Hotta, H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ ribavirin combination therapy. *Microbiology and Immunology, in press.*
- 2) El-Shamy, A., Ide, Y-H., Kim, SR., Sasase, N., Imoto, S., Deng, L., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *Intervirology, in press.*
- 3) Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2011, 410, 38-47.
- 4) Hayashida K, Shoji, I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54, 684-90.
- 5) Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji, I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 111, 676-85.
- 6) Kim SR., Imoto S., Kudo M., Nakajima T., Ando K., Mita K., Fukuda K., Hong HS., Lee YH., Nakashima K., Shoji, I., Nagano-Fujii M., Hotta H., and Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated Interferon α treatment for chronic hepatitis C. *Internal Medicine*, 2010, 49, 1119-1122.
- 7) Moriishi K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010, 52 411-420.
- 8) Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji, I., Hak, H., and Kawata, S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82, 1364-70, 2010.
- 9) Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., Shoji, I., and Hotta, H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-Interferon plus ribavirin. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 56, E60-E66, 2010.
- 10) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I.,

- Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological response to previous combination therapy: Early viral dynamics. *Intervirology*, 53, 44-48, 2010.
- 11) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53, 49-54, 2010.
2. 学会発表
- 1) Shoji I., Kaneda S, Deng L, Ide Y-H, Hotta H. Molecular mechanism of HCV-induced suppression of glucose transporter (GLUT) 2 expression. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 2) El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I., Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, 2010. Yokohama.
- 3) Deng L, Ide Y-H, Shoji I., Hotta H. HCV-induced generation of reactive oxygen species leads to Bax-mediated apoptosis through activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase signaling pathway. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 4) Sasayama M, Shoji I., Adianti M, Ide Y-H, Deng L, Hotta H. Identification of an amino acid residue that determines sensitivity to virus neutralization by nonspecific inhibitors and specific neutralizing antibodies in human sera. 17th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses. Sep 10-14, 2010. Yokohama, Japan.
- 5) Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.
- 6) Shoji I., Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Ide Y-H, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. 第33回日本分子生物学会、Dec 7-10. 2010 神戸.
- 7) 岡田典子、勝二郁夫、甘翔、Lin Deng、姜大鵬、井出良浩、堀田博. C型肝炎ウイルス NS5A に結合するユビキチンリガーゼの同定. 第33回日本分子生物学会、Dec 7-10. 2010. 神戸.
- 8) Deng Lin, 兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博. C型肝炎ウイルス感染は転写因子 FoxO1 を介した糖新生を誘導する. 第63回日本細菌学会関西支部総会、Nov 20, 2010. 大阪.
- 9) 勝二郁夫、Lin Deng、堀田博. HCVによる糖代謝障害の分子機序 日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム Nov 7-9, 2010. 徳島
- 10) El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2a および 2b の NS5A 多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
- 11) Deng Lin, 兼田崇作、井出良浩、勝二郁夫、堀田博. 糖代謝に及ぼす C型肝炎ウイルスの影響及びその分子機序の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
- 12) 笹山美紀子、勝二郁夫、Adianti M、井出良浩、Da-Peng J、Deng L、堀田博. 慢性 C型肝炎患者血清および非感染者血清を用

いたC型肝炎ウイルス中和感受性決定部位の検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.

- 13) 堀田博, 井出良浩, 勝二郁夫. C型肝炎ウイルス感染は糖新生系を亢進し、糖尿病発症に関与する. 第46回日本肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.
- 14) 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a及びHCV-2bのNS5A多様性は治療効果と相関する. 第46回日本肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.
- 15) 金守良, 井本勉, 堀田博, 三田敬二, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良弘. 1b型高ウイルスC型慢性肝炎のPEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN-β4週間連続投与の試み. 第46回日本肝臓学会総会, May 27-28, 2010. 山形.
- 16) 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C型慢性肝炎に対するPEG-IFNα-2a/RBV併用療法の早期治療効

果に関与する因子の検討. 第14回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.

- 17) 井本勉, 金守良, 堀田博, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩, 前川陽子. C型慢性肝炎1b型高ウイルス量併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFNβ2~4週連続投与後PEG-IFNα-2a+RBV併用療法の早期ウイルスダイナミクスによるEVR予測. 第14回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.
- 18) 進藤道子, El-Shamy Ahmed, 森川輝久, 原野雄一, 中島知明, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. C型慢性肝炎から肝癌発生まで経時的観察が可能であった症例におけるウイルス遺伝子多様性の解析. 第14回日本肝臓学会大会, Oct 13-14, 2010. 横浜.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kasamatsu H, Nakanishi A, Liddington RC, Sawa H	Structural and functional studies of polyomavirus late gene products	Yoshida K	Molecular Biology of Tumor Virus Gene Products	Research Signpost	Kerala, India	2010	109-168

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
Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T.	Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein.	Virology	410	38-47	2011
Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, <u>Suzuki T</u>	Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin.	Antiviral Res	85	520-524	2010
Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, <u>Suzuki T</u>	Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription.	J Virol	84	5824-5835	2010
Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, <u>Suzuki T</u> , Croce CM, Patel T	Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes.	Clin Cancer Res	16	957-966	2010
Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, <u>Suzuki T</u> , Tatsumi M, Matsuura Y.	Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus.	Microbiol Immunol.	54	206-220	2010
Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, <u>Suzuki T</u> , Wakita T.	Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope.	Biochem Biophys Res Commun.	395	565-571	2010

Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T.	Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients.	Clin Immunol	135	459-465	2010
Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T.	RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells.	PLOS Pathog	6	E1000885	2010
Tyler M. Sharp, Susana Guix, Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford, Mary K. Estes.	Inhibition of Cellular Proteing Secreion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Exprot Signal.	PloS ONE	5	1-15	2010
Kosuke Murakami, Sayaka Suzuki, Naohito Aoki, Tetsuya Okajima, Daita Nadano, kenji Uchida, Kousaku Yamashita, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda, and Tsukasa Matsuda.	Binding of Norovirus Virus-Like Particles(VLPs) to Human Intestinal Caco-2 Cells and the Suppressive Effect of Pasteurized Bovine Colostum on This VLP Binding.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	74	541-547	2010
Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan.	Divergent Evolution of Norovirus GII/4 By Genome recombination over 2006-2009 in Japan”	Journal of Virology	84	8085-8097	2010
Li Xing, Tian-Cheng, Naoyuki Mayazaki, Martha N.Simon, Joseph S.Wall, Mary Moore, Che-Yen Wang, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura, and R. Holland Cheng.	Structure of Hepatitis E Virion-sized Particle Reveals an RNA-dependent Viral Assembly Pathway.	Journal of Biological Chemistry	285	33175-33183	2010
Li Xing, Joseph C. Wang, Tian-Cheng Li, Yasuhiro Yasuomi, James Lara, Yury Khudyakov, Darren Schofield, Suzanne U. Emerson, Robert H. Purcell, Naokazu Takeda, Tatsuo Miyamura, and R. Holland Cheng.	Spatial Configuration of Hepatitis E Virus Anigenic Domain	Journal of Virology	85	1117-1124	2011
Ling Yang, Tomoko Kiyohara, Tatsuo Kanda, Fumio Imazeki, Keiichi Fujiwara, Verena Gauss-Muller, Koji Ishii,	Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combinaion of amantadine and	Virology Journal	7		2010

Takaji Wakita, Osamu Yokosuka.	interferon-alpha.				
Yong-Yuan Zhang, Bai-Hua Zhang, Koji Ishii, and T Jake Liang.	Novel Function of CD81 in Controlling Hepatitis C Virus Replication.	Journal of Virology	84	3396-3407	2010
Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., and Ono, S.	Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, <i>Anguilla japonica</i>	Virology		in press	2011
Tange, S., Imai, T., Nakanishi, A.	An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect.	Virus Res.		in press	2011
El-Shamy, A., Shoji, I., Saito, T., Watanabe, H., Ide, Y-H., Deng, L., Kawata, S., and Hotta, H.	Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy.	Microbiology and Immunology			in press
El-Shamy, A., Ide, Y-H., Kim, SR., Sasase, N., Imoto, S., Deng, L., Shoji, I., and Hotta, H.	Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy.	Intervirolgy			in press
Hayashida K, Shoji, I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H.	17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus.	Microbiology and Immunology	54	684-90	2010
Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji, I.	E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin I.	Journal of Cellular Biochemistry	111	676-85	2010
Kim SR., Imoto S., Kudo M., Nakajima T., Ando K., Mita K., Fukuda K., Hong HS., Lee YH., Nakashima K., Shoji I., Nagano-Fujii M., Hotta H.	Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated Interferon α treatment for chronic hepatitis C.	Internal Medicine	49	1119-1122	2010

Moriishi K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y.	Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus.	Hepatology	52	411-420	2010
Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji, I., Hak, H., and Kawata, S.	Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Journal of Medical Virology	82	1364-70	2010
Sasayama, M., Deng, L., Kim, SR., Ide Y-H., Shoji, I., and Hotta, H.	Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with peglated-Interferon plus ribavirin.	Kobe Journal of Medical Sciences	56	E60-66	2010
Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y.	Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological response to previous combination therapy: Early viral dynamics.	Intervirolgy	53	44-48	2010
Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H.	Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b.	Intervirolgy	53	49-54	2010

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Production of Infectious Hepatitis C Virus by Using RNA Polymerase I-Mediated Transcription[∇]

Takahiro Masaki,^{1†} Ryosuke Suzuki,^{1†} Mohsan Saeed,^{1,4} Ken-ichi Mori,² Mami Matsuda,¹ Hideki Aizaki,¹ Koji Ishii,¹ Noboru Maki,² Tatsuo Miyamura,¹ Yoshiharu Matsuura,³ Takaji Wakita,¹ and Tetsuro Suzuki^{1*}

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan¹; Advanced Life Science Institute, Wako, Saitama 351-0112, Japan²; Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan³; and Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan⁴

Received 13 November 2009/Accepted 8 March 2010

In this study, we used an RNA polymerase I (Pol I) transcription system for development of a reverse genetics protocol to produce hepatitis C virus (HCV), which is an uncapped positive-strand RNA virus. Transfection with a plasmid harboring HCV JFH-1 full-length cDNA flanked by a Pol I promoter and Pol I terminator yielded an unspliced RNA with no additional sequences at either end, resulting in efficient RNA replication within the cytoplasm and subsequent production of infectious virions. Using this technology, we developed a simple replicon *trans*-packaging system, in which transient transfection of two plasmids enables examination of viral genome replication and virion assembly as two separate steps. In addition, we established a stable cell line that constitutively produces HCV with a low mutation frequency of the viral genome. The effects of inhibitors of N-linked glycosylation on HCV production were evaluated using this cell line, and the results suggest that certain step(s), such as virion assembly, intracellular trafficking, and secretion, are potentially up- and downregulated according to modifications of HCV envelope protein glycans. This Pol I-based HCV expression system will be beneficial for a high-throughput antiviral screening and vaccine discovery programs.

Over 170 million people worldwide have been infected with hepatitis C virus (HCV) (22, 33, 37), and persistence of HCV infection is one of the leading causes of liver diseases, such as chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (16, 25, 38). The HCV genome is an uncapped 9.6-kb positive-strand RNA sequence consisting of a 5' untranslated region (UTR), an open reading frame encoding at least 10 viral proteins (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B), and a 3' UTR (46). The structural proteins (Core, E1, and E2) reside in the N-terminal region.

The best available treatment for HCV infection, which is pegylated alpha interferon (IFN- α) combined with ribavirin, is effective in only about half of patients and is often difficult to tolerate (25). To date, a prophylactic or therapeutic vaccine is not available. There is an urgent need to develop more effective and better tolerated therapies for HCV infection. Recently, a robust system for HCV production and infection in cultured cells has been developed. The discovery that some HCV isolates can replicate in cell cultures and release infectious particles has allowed the complete viral life cycle to be studied (23, 49, 53). The most robust system for HCV production involves transfection of Huh-7 cells with genomic HCV RNA of the JFH-1 strain by electroporation. However, using this RNA transfection system, the amount of secreted infectious viruses often fluctuate and mutations emerge in HCV genome with multiple passages for an extended

period of time (54), which limits its usefulness for antiviral screening and vaccine development.

DNA-based expression systems for HCV replication and virion production have also been examined (5, 15, 21). With DNA-based expression systems, transcriptional expression of functional full-length HCV RNA is controlled by an RNA polymerase II (Pol II) promoter and a self-cleaving ribozyme(s). DNA expression systems using RNA polymerase I (Pol I) have been utilized in reverse genetics approaches to replicate negative-strand RNA viruses, including influenza virus (12, 29), Uukuniemi virus (11), Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (10), and Ebola virus (13). Pol I is a cellular enzyme that is abundantly expressed in growing cells and transcribes rRNA lacking both a 5' cap and a 3' poly(A) tail. Thus, viral RNA synthesized in cells transfected with Pol I-driven plasmids containing viral genomic cDNA has no additional sequences at the 5'- or 3' end even in the absence of a ribozyme sequence (28). The advantages of DNA-based expression systems are that DNA expression plasmids are easier to manipulate and generate stable cell lines that constitutively express the viral genome.

We developed here a new HCV expression system based on transfection of an expression plasmid containing a JFH-1 cDNA clone flanked by Pol I promoter and terminator sequences to generate infectious HCV particles from transfected cells. The technology presented here has strong potential to be the basis for *trans*-encapsidation system by transient transfection of two plasmids and for the establishment of an efficient and reliable screening system for potential antivirals.

MATERIALS AND METHODS

DNA construction. To generate HCV-expressing plasmids containing full-length JFH1 cDNA embedded between Pol I promoter and terminator se-

* Corresponding author. Present address: Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan. Phone: 81-53-435-2336. Fax: 81-53-435-2337. E-mail: tesuzuki@hama-med.ac.jp.

† T.M. and R.S. contributed equally to this study.

[∇] Published ahead of print on 17 March 2010.

quences, part of the 5'UTR region and part of the NS5B to the 3'UTR region of full-length JFH-1 cDNA were amplified by PCR using primers containing BsmBI sites. Each amplification product was then cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and verified by DNA sequencing. Both fragments were excised by digestion with NotI and BsmBI, after which they were cloned into the BsmBI site of the pHH21 vector (a gift from Yoshihiro Kawaoka, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison [29]), which contains a human Pol I promoter and a mouse Pol I terminator. The resultant plasmid was digested by AgeI and EcoRV and ligated to JFH-1 cDNA digested by AgeI and EcoRV to produce pHHJFH1. pHHJFH1/GND having a point mutation at the GDD motif in NS5B to abolish RNA-dependent RNA polymerase activity and pHHJFH1/R783A/R785A carrying double Arg-to-Ala substitutions in the cytoplasmic loop of p7 were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis. To generate pHHJFH1/ΔE carrying in-frame deletions of parts of the E1 and E2 regions (amino acids [aa] 256 to 567), pHHJFH1 was digested with NcoI and AscI, followed by Klenow enzyme treatment and self-ligation. To generate pHH/SGR-Luc carrying the bicistronic subgenomic HCV reporter replicon and its replication-defective mutant, pHH/SGR-Luc/GND, AgeI-SpeI fragments of pHHJFH1 and pHHJFH1/GND were replaced with an AgeI-SpeI fragment of pSGR-JFH1/Luc (20). In order to construct pCAG/C-NS2 and pCAG/C-p7, PCR-amplified cDNA for C-NS2 and C-p7 regions of the JFH-1 strain were inserted into the EcoRI sites of pCAGGS (30). In order to construct stable cell lines, a DNA fragment containing a Zeocin resistance gene excised from pSV2/Zeo2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) was inserted into pHH21 (pHHZeo). Full-length JFH-1 cDNA was then inserted into the BsmBI sites of pHHZeo. The resultant construct was designated pHHJFH1/Zeo.

Cells and compounds. The human hepatoma cell line, Huh-7, and its derivative cell line, Huh7.5.1 (a gift from Francis V. Chisari, The Scripps Research Institute), were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with nonessential amino acids, 100 U of penicillin/ml, 100 μg of streptomycin/ml, and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. *N*-Nonyl-deoxyojirimycin (NN-DNJ) and kifunensine (KIF) were purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada), castanospermine (CST) and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol hydrochloride (DIM) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 1-deoxymannojirimycin (DMJ) and swainsonine (SWN) were from Alexis Corp. (Lausen, Switzerland), and *N*-butyl-deoxyojirimycin (NB-DNJ) was purchased from Wako Chemicals (Osaka, Japan). BILN 2061 was a gift from Boehringer Ingelheim (Canada), Ltd. These compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide and used for the experiments. IFN-α was purchased from Dainippon-Sumitomo (Osaka, Japan).

DNA transfection and selection of stable cell lines. DNA transfection was performed by using FuGENE 6 transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. To establish stable cell lines constitutively producing HCV particles, pHHJFH1/Zeo was transfected into Huh7.5.1 cells within 35-mm dishes. At 24 h posttransfection (p.t.), the cells were then divided into 100-mm dishes at various cell densities and incubated with DMEM containing 0.4 mg of zeocin/ml for approximately 3 weeks. Selected cell colonies were picked up and amplified. The expression of HCV proteins was confirmed by measuring secreted core proteins. The stable cell line established was designated H751JFH1/Zeo.

In vitro synthesis of HCV RNA and RNA transfection. RNA synthesis and transfection were performed as previously described (26, 49).

RNA preparation, Northern blotting, and RNase protection assay (RPA). Total cellular RNA was extracted with a TRIzol reagent (Invitrogen), and HCV RNA was isolated from filtered culture supernatant by using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Valencia, CA). Extracted cellular RNA was treated with DNase (TURBO DNase; Ambion, Austin, TX) and cleaned up by using an RNeasy minikit, which includes another step of RNase-free DNase digestion (Qiagen). The cellular RNA (4 μg) was separated on 1% agarose gels containing formaldehyde and transferred to a positively charged nylon membrane (GE Healthcare, Piscataway, NJ). After drying and cross-linking by UV irradiation, hybridization was performed with [³²P]dCTP-labeled DNA using Rapid-Hyb buffer (GE Healthcare). The DNA probe was synthesized from full-length JFH-1 cDNA using the Megaprime DNA labeling system (GE Healthcare). Quantification of positive- and negative-strand HCV RNA was performed using the RPA with biotin-16-uridine-5'-triphosphate (UTP)-labeled HCV-specific RNA probes, which contain 265 nucleotides (nt) complementary to the positive-strand (+) 5'UTR and 248 nt complementary to the negative-strand (-) 3'UTR. Human β-actin RNA probes labeled with biotin-16-UTP were used as a control to normalize the amount of total RNA in each sample. The RPA was carried out using an RPA III kit (Ambion) according to the manufacturer's procedures. Briefly, 15 μg of total cellular RNA was used for hybridization with 0.3 ng of the β-actin probe and 0.6 ng of either the HCV (+) 5'UTR or (-) 3'UTR RNA

probe. After digestion with RNase A/T1, the RNA products were analyzed by electrophoresis in a 6% polyacrylamide-8 M urea gel and visualized by using a chemiluminescent nucleic acid detection module (Thermo Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR), sequencing, and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Aliquots (5 μl) of RNA solution extracted from filtered culture supernatant were subjected to reverse transcription with random hexamer and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Four fragments of HCV cDNA (nt 129 to 2367, nt 2285 to 4665, nt 4574 to 7002, and nt 6949 to 9634), which covers most of the HCV genome, were amplified by nested PCR. Portions (1 or 2 μl) of each cDNA sample were subjected to PCR with TaKaRa LA Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 3 min. The amplified products were separated by agarose gel electrophoresis and used for direct DNA sequencing. To establish the 5' ends of the HCV transcripts from pHHJFH1, a synthetic 45-nt RNA adapter (Table 1) was ligated to RNA extracted from the transfected cells 1 day p.t. using T4 RNA ligase (Takara). The viral RNA sequences were then reverse transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) with a primer, RT (Table 1). The resultant cDNA sequences were subsequently amplified by PCR with 5'RACEouter-S and 5'RACEouter-R primers, followed by a second cycle of PCR using 5'RACEinner-S and 5'RACEinner-R primers (Table 1). To establish the terminal 3'-end sequences, extracted RNA sequences were polyadenylated using a poly(A) polymerase (Takara), reverse transcribed with CAC-T35 primer (Table 1), and amplified with the primers 3X-10S (Table 1) and CAC-T35. The amplified 5' and 3' cDNA sequences were then separated by agarose gel electrophoresis, cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), and sequenced.

Western blotting. The proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon; Millipore, Bedford, MA) after separation by SDS-PAGE. After blocking, the membranes were probed with a mouse monoclonal anti-HCV core antibody (2H9) (49), a rabbit polyclonal anti-NS5B antibody, or a mouse monoclonal GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) antibody (Chemicon, Temecula, CA), followed by incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody and visualization with an ECL Plus Western blotting detection system (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom).

Quantification of HCV core protein. HCV core protein was quantified by using a highly sensitive enzyme immunoassay (Ortho HCV antigen ELISA kit; Ortho Clinical Diagnostics, Tokyo, Japan) in accordance with the manufacturer's instructions.

Sucrose density gradient analysis. Samples of cell culture supernatant were processed by low-speed centrifugation and passage through a 0.45-μm-pore-size filter. The filtrated supernatant was then concentrated ~30-fold by ultrafiltration by using an Amicon Ultra-15 filter device with a cutoff molecular mass of 100,000 kDa (Millipore), after which it was layered on top of a continuous 10 to 60% (wt/vol) sucrose gradient, followed by centrifugation at 35,000 rpm at 4°C for 14 h with an SW41 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Fractions of 1 ml were collected from the bottom of the gradient. The core level and infectivity of HCV in each fraction were determined.

Quantification of HCV infectivity. Infectious virus titration was performed by a 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assay, as previously described (23, 26). Briefly, naive Huh7.5.1 cells were seeded at a density of 10⁴ cells/well in a 96-well flat-bottom plate 24 h prior to infection. Five serial dilutions were performed, and the samples were used to infect the seeded cells (six wells per dilution). At 72 h after infection, the inoculated cells were fixed and immunostained with a rabbit polyclonal anti-NS5A antibody (14), followed by an Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen).

Labeling of de novo-synthesized viral RNA and immunofluorescence staining. Labeling of *de novo*-synthesized viral RNA was performed as previously described with some modifications (40). Briefly, cells were plated onto an eight-well chamber slide at a density of 5 × 10⁴ cells/well. One day later, the cells were incubated with actinomycin D at a final concentration of 10 μg/ml for 1 h and washed twice with HEPES-saline buffer. Bromouridine triphosphate (BrUTP) at 2 mM was subsequently transfected into the cells using FuGENE 6 transfection reagent, after which the cells were incubated for 15 min on ice. After the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), they were incubated in fresh DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C for 4 h. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 15 min at room temperature. Immunofluorescence staining of NS5A and *de novo*-synthesized HCV RNA was performed as previously described (26, 40). The nuclei were stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) solution (Sigma-Aldrich). Confocal microscopy was performed