

変わることで、マウス個体感染時の病原性が消失することが報告されている (Bailey et al. 2008)。そしてこの MNoV 1 型も、細胞での継代によって 14 の塩基が変化していることが報告されており、個々の変化の理由は明らかではない。今後は、Vp1 のみではなく ORF1 にみられるアミノ酸残基の遺伝子配列変化についても、細胞培養増殖性の優劣で規定されているのか検討する必要がある。

## E. 結論

MNoV 7 型の RAW264.7 細胞への増殖馴化の過程で、ゲノム遺伝子配列の変化がみられ、そしてその変化は元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列への収束を伴うものであると考えられた。またこの変化はまた細胞内増殖に適したゲノム配列が選択されていることが一因であることが示唆された。

## II. 新規ヒト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

### 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 MCPyV、ヒト棘状毛胞異形成症からは、Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV)、呼吸器疾患の患者から WUPyV、KIPyV、健康ヒト皮膚から HPyV6、HPyV7、免疫抑制患者からは HPyV9 など、新たに見つかったこれらのウイルスの病原性については、その解析が端緒についたばかりである。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 MCPyV で 60-90%、TSPyV で 70% (成人)、WUPyV、KIPyV で 80-90%、HPyV9 で 47% などと報告されており、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。しかし、これらの新規ポリオーマウイルスの研究に必須であ

る感染増殖が可能な細胞は知られていない。我々は、先に開発した surrogate capsid (psudovirion) system を利用しこれらのウイルスがよく感染増殖できる細胞の検索を行っている。本年度は、WUPyV、KIPyV の psudovirion を利用して、これらの粒子が効率に導入できる細胞株を同定し、また TSPyV の psudovirion の作成を試みた。

### B. 研究方法

本研究者が開発した psudovirion system により、WUPyV、KIPyV のカプシドをもつ psudovirion を以下の方法で作成した。3つのプラスミド、(1)pCAG WUV 又は pCAG KIV と (2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、を 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。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep (Beckman SW50, 45, 000rpm, 3.5hours, 10°C) の連続密度勾配遠沈後、フラクションに分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。Gluc 活性は Bioluminescence assay kit (New England Biolab) で測定し、各 psudovirion の遺伝子導入性を検証した。サンプル中の DNA コピー数は、SV40 origin をターゲットとした定量 PCR により算定した。また、TSPyV の Vp1、Vp2、Vp3 をコードする後期遺伝子領域を人工合成し (Vp1 領域は、国立感染症研究所李天成先生より分与)、pCAG プラスミドに組み込み、TSPyV の Vp1、Vp2/3 をコードする pCGA-TSV を作成した。

### C. 研究結果

WUPyV、KIPyV psudovirion の粒子特性のより詳細な解析を行うため、各粒子を大量に作成・精製した。pCMV-Gluc2 をパッケージする WUPyV、KIPyV psudovirion を、それぞれ 15cm ディッシュ 20 枚分の 293T 細胞から作成し、2回の 27-39% Optiprep 密度勾配遠沈によって

分画精製し、そして pseudovirion を含むフラクションを Amicon Ultra 15 (MWC0 100kDa, Millipore) で濃縮した。このサンプルを 5-20% の SDS-PAGE で展開して銀染色を行い、Vp1 (~40kD), Vp3 (~30kDa), ヒストンコアタンパク質 (~20kDa) の各位置にバンドが認められた。質量分析等によって確認する必要があるが、各バンドの濃さとおよその予想される DNA コピー数とは矛盾しない比率であった。また、pseudovirion がよく導入できる細胞を検索するため、293T, TC7, Vero 細胞に対し、細胞あたり 1, 10, 100, 1,000 コピー-DNA にあたる SV40, WUPyV, KIPyV pseudovirion を導入し、48-60 時間後に細胞上清の Gluc の活性を測定した。293T, TC7 への導入では SV40 pseudovirion には及ばないものの、WUPyV, KIPyV 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た。一方、Vero 細胞への導入では、WUPyV, KIPyV pseudovirion による pCMV-Gluc2 の導入は SV40 pseudovirion によるものとほぼ同程度の Gluc 発現誘導がみられ、WUPyV, KIPyV は Vero 細胞で比較的良好に感染できる可能性が示唆された。

pCAG-TSV を利用して TSPyV の pseudovirion 作成を試みたが、おそらく pCAG-TSV からの TSPyV カプシドタンパク質発現による 293T 細胞への毒性が高く、pseudovirion の作成は困難であった。

#### D. 考察

今回の研究では、WUPyV, KIPyV pseudovirion を精製し Vp1, Vp3, ヒストンコアタンパク質とも考えられるバンドを銀染色で確認し、これまで他のポリオーマウイルスカプシドから作成した pseudovirion の解析結果と類似した SDS-PAGE 展開像を観察した。特異抗体あるいは質量分析などで確認は必須であるが、バンドの濃さから推定できる pseudovirion としての構成比は Optiprep 密度勾配遠沈でも示された物理化学的特性とも矛盾しない。過去の研究では、virion の構成比に異常が生じた場合、例えば通常より少量の Vp2, Vp3 で構成された粒子ではその感染

性は著しく低下していた。もし pseudovirion の構成成分比が通常と異なっていた場合には、その導入効率は著しく低いことが予想できる。しかしながら今回の研究では、WUPyV, KIPyV pseudovirion によって Vero 細胞へ効率に導入できたため、各 pseudovirion の構成成分比が virion と大きく異なることはないとも考えることもできる。一方、この結果は WUPyV, KIPyV の感染増殖に Vero 細胞が使用できる可能性を示している。今後は Vero 細胞で WUPyV, KIPyV の分子クローンをトランスフェクションしてその増殖が確認できるかという点、そして WUPyV, KIPyV の Vero 細胞への導入に関わる細胞側レセプター、利用されるエンドサイトーシス経路の同定といった点が次の課題である。

#### E. 結論

新規ポリオーマウイルス、WUPyV, KIPyV の pseudovirion を作成し、これらは Vero 細胞へ効率に導入できることが明らかになった。このことは、WUPyV, KIPyV の感染増殖できる細胞として Vero 細胞が利用できる可能性を示している。

#### F. 研究発表

##### 1. 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*  
*Virology* 157:116-20. (2011)

- 2) Tange, S., Imai, T., Nakanishi, A.  
An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect.

2. 学会発表

1) Tange, S., Chapellier, B., Nakanishi, A.  
Infectious human astroviral RNA expressed by  
Pol II promoter  
American Society for Virology (2011) July 17,  
Minneapolis, USA

2) Nakanishi, A., Tange, S.  
Examination of minor viral capsid proteins  
that influence cell tropism of polyomavirus  
ICGEB DNA tumour virus meeting (2011) July  
21, Trieste, Italy

3) Watanabe, M., Phamduong, E., Huang, C-H.,  
Itoh, N., Nakanishi, A., Rundell, K.,  
Gjoerup, O., Kasamatsu, K.  
A new role of a helicase-domain of SV40 Large  
T antigen in the formation of covalently  
modified Vp1 folding intermediates.  
ICGEB DNA tumour virus meeting (2011) July  
21, Trieste, Italy

4) Nakanishi, A., Tange, S., Oka, T.,  
Katayama, K.

Interplay of RNA, Vpg, and capsid proteins  
upon self-assembly of noroviral VLP in vitro  
International Union of Microbiological  
Societies 2011 Congress (2011) Sep. 13,  
Sapporo, Japan

5) Nakanishi, A., Tange, S.  
Role of minor capsid proteins of  
polyomavirus on determining the cell  
tropism of the virus  
第34回日本分子生物学会 2011年12月14  
日 横浜

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

子宮頸癌の治療薬を目指した特殊ペプチドによる E6AP 阻害剤の開発

分担研究者 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おいて重要である。本研究では、HBV の各遺伝子型の 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。PreS2 の翻訳開始点における Kozak 配列周辺に塩基配列の違いが認められた。この領域の S 抗原の発現および分泌効率への影響を明らかにするために 13 種類の変異体プラスミドを作製した。S 抗原の分泌量を解析したところ、PreS2 の+6 位の変異により S 抗原の分泌効率が 4.2 倍に上昇した。+7 ~+11 位の変異でも S 抗原の分泌が約 4.4 倍に上昇する変異が見つかった。

子宮頸癌はハイリスクグループのヒトパピローマウイルス (HPV) の感染で引き起こされる。子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発を行った。フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、mRNA 鋳型依存的に天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 (RaPID system) により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを得た。抗 E6AP 環状 N-メチルペプチド CM<sub>11</sub>-1 が HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化を抑制することを示した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は遺伝子解析により 8 種類の遺伝子型に分類できるようになった。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いるが、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。また、現行の各遺伝子型の 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 抗原分泌機構の解明を試みた。

一方、子宮頸癌の 90% にハイリスク型のヒトパピローマウイルス (HPV) 感染と組込みがあるが、特異的な抗がん剤がない。子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発を目指した。

B. 研究方法

(1) HBV 発現プラスミドの作製

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) を、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)へ以下の変異を導入し変異体プラスミドを作製した。

MT1(CTGCAACGAACATGG)

MT2(CTGIGCCGAACATGG)

MT3(CTGTGACGAACATGG)。(下線が変異部位)

HBV-Cat 株の PreS1-PreS2 の配列(ATCCTCAGGCCATGCAGTGAAT)へ以下の変異を導入した変異体プラスミドを作製した。

MT4(ATCCTCAGGCCATGCAATGCAAC)

MT5(ATCCTCAGGCCATGCCATGGAAC)

MT6(ATCCTCAGGCCAGGCAATGGAAC)

MT7(ATCCTCAGGCCAGGCCATGAACT)

MT8(ATCCTATCCTCATGCAATGGAAC)

MT9(ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)

MT10(ATCCTCAGGCCATGCAACGGGAAC)

MT11(ATCCTCAGGCCATGCAATTGGAAC)

MT12(ATCCTCAGGCCATGCAATGGCAC)

MT13(ATCCTCAGGCCATGCAGTGAAC)

これらの変異体プラスミドは 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 ELISA 法で解析し、どの領域が HBs 抗原分泌に重要であるかを解析した。

(4)フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、mRNA 鋳型依存的に天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で E6AP の HECT ドメインに結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した(東京大学理学部、菅教授との共同研究)。

(5)得られた特殊ペプチドと E6AP HECT ドメインとの結合を表面プラスモン共鳴測定装置

(Biacore)にて解析した。

(6)得られた特殊ペプチドの E6AP 阻害活性を Prx1 および p53 を基質にして in vitro ユビキチン化アッセイで検討した。

(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 変異プラスミドの作製

HBV-Aeus 株 pSV-AAA, HBV-Cat 株 pSV-CCC および 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 から pSV CCC-MT13 まで作製した。

(2)HBsAg の上清中への分泌量は pSV-AAA と比較して pSV CCC-MT9, pSV CCC-MT13 が最も高値となり、day 4 で約 80ng/mL と pSV-AAA の 2 倍、genotype C の pSV-CCC の約 4 倍まで分泌効率が向上していた。

(3)Ae PreS2 では ATGCAGTGAAT (MQWN), CAT PreS2 では ATGCAATGGAAC (MQWN), CAT PreS2-MT9 では ATGCAACTCCAC (MQLH), CAT PreS2-MT13 では ATGCAGTGAAC (MQWN) という配列になっており、同義置換でも分泌効率に差があることから、開始コドン周囲の塩基配列が分泌効率に関与する可能性が示された。

(4) RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを数種得た。

(5)特殊ペプチドと E6AP HECT ドメインの結合解析の結果、Kd は CM<sub>11</sub>-1 で 0.602 nM, LM<sub>11</sub>-1 で 180nM, CP<sub>11</sub>-1 で >1000 nM となり、環状で N-メチル化された CM<sub>11</sub>-1 が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状 LM<sub>11</sub>-1 や N-メチル化されていない CP<sub>11</sub>-1 では結合力が弱かった。

(6) CM<sub>11</sub>-1 は E6AP の基質 Prx1 のユビキチン化を効率良く阻害した。また、HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化も抑制することが示された。

#### D. 考察

HBV genotype A の HBV-Aeius 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 13 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。

その結果、preS2 の遺伝子配列の違いで S 抗原の上清への分泌量が著しく変化することが判った。MT9(ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)ではpreS2の開始コドンより下流の+7-+10位に変異が導入されており、この変異により pSV-CCC と比較して約 4.4 倍まで分泌量が向上した。また、MT13(ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAC)では+6 位へのひとつの塩基置換のみで分泌効率が約 4.2 倍に向上した。この二種類の変異を組み合わせると更に向上するかどうか更に検討すれば、高効率の分泌系を樹立できる可能性が示された。

RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを得た。ペプチドと E6AP HECT ドメインの結合解析の結果、環状で N-メチル化された CM<sub>11</sub>-1 が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状 LM<sub>11</sub>-1 や N-メチル化されていない CP<sub>11</sub>-1 では結合力が弱かった。CM<sub>11</sub>-1 は E6AP の基質 Prx1 のユビキチン化を効率良く阻害した。また、HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化も抑制することが示された。これらの結果から RaPID system で環状 N-メチルペプチドを作製する技術は E3 リガーゼ阻害剤を作製するのに強力な技術となることが示された。

#### E. 結論

HBV の preS1-preS2-S 領域の遺伝子配列を比較したところ、Middle S の翻訳開始点における Kozak 配列に差違が認められた。この preS2 の遺伝子配列の S 抗原発現および分泌効率への影響を明らかにするために 13 種類の変異体プラスミドを作製した。変異体プラスミドにより S

抗原の分泌量を解析したところ、PreS2 の+6 の塩基の1つの変異により S 抗原の分泌効率が 4.2 倍に上昇した。また、+7~+10 の変異でも S 抗原の分泌が約 4.4 倍に上昇する変異が見つかった。

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発を行った。RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチド CM<sub>11</sub>-1 を得た。抗 E6AP 環状 N-メチルペプチド CM<sub>11</sub>-1 が HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化を抑制することを示した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamagishi, Y., Shoji, I., Miyagawa, S., Kawakami, T., Katoh, T., Goto, Y., and Suga, H. Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. *Chemistry & Biology*, 2011, 18, 1562-1570.
- 2) Shoji I., Deng L., and Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Frontiers in Microbiology*, 2012; 2: A278, 1-5.
- 3) Kamada K., Shoji I., Deng L., Wakita T., and Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes and Infection*, 2012; 14: 69-78.
- 4) 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*, 2012; 55: 1-11.
- 5) El-Shamy A., Shoji I., Kim SR., Imoto S., Deng

- L., Yoon S., Fujisawa T., Tani S., Yano Y., Seo Y., Azuma T., and Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotype 2a and 2b and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *PLoS One*, 2012; 7: e30513, 1-10.
- 6) Sasayama M., Shoji I., Ide Y-H., Deng L., and Hotta H. A point mutation at Asn-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *Journal of Medical Virology*, 2012; 84: 229-234.
- 7) 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*, 2011; 55: 418-26.
- 8) Deng L., Shoji I., Oawa W., Kaneda S., Soga T., Jiang D. P., Ide Y-H., and Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *Journal of Virology*, 2011; 85: 8556-68.
- 2.学会発表
- 1) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., El-Shamy A., Deng L., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that targets hepatitis C virus NS5A protein for ubiquitylation. 18<sup>th</sup> International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September 2011.
- 2) Deng L., Shoji I., Ogawa W., Kaneda S., Soga T., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. 18<sup>th</sup> International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September, 2011.
- 3) Matsui C., Shoji I., Kaneda S., Deng L., Jiang DP., Ide Y-H., and Hotta H. HCV-induced suppression of glucose transporter 2 gene expression via downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ . 18<sup>th</sup> International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September, 2011.
- 4) Ide Y-H., Maebo T., An C., Jiang DP., Deng L., Shoji I., and Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in NS3 transgenic mice. 18<sup>th</sup> International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, September, 2011.
- 5) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., El-Shamy A., Deng L., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 6) Deng L., Shoji I., Ogawa W., Kaneda S., Soga T., Jang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Molecular mechanisms involved in HCV infection-induced hepatic gluconeogenesis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 7) Matsui C., Shoji I., Kaneda S., Deng L., Jiang DP., Ide Y-H., and Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses glucose transporter 2 gene expression by downregulation of hepatocyte nuclear factor 1A. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011.
- 8) Ide Y-H., Maebo T., An C., Jiang DP., Deng L., Shoji I., and Hotta H. Development of hepatocellular carcinoma in NS3 transgenic mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September, 2011.
- 9) El-Shamy AM., Shoji I., Saito T., Ide Y-H., Deng L., Kawata S., and Hotta H. Polymorphisms of serine protease-domain of NS3 and core protein of hepatitis C virus genotype 1b associated with hepatocellular carcinoma development. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress,

- Sapporo, September, 2011.
- 10) Shoji I., Okada N., Gan X., Miyagawa S., Makimoto M., Chieko M., Jang DP., Deng L., Ide Y-H., and Hotta H. Identification of an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation of hepatitis C virus NS5A protein. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.
- 11) Ichimura T., Shoji I., and Hachiya N. A regulatory mechanism for tripartite-motif protein 32 revealed by quantitative 14-3-3 interactome analysis in PKA signaling pathway. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.
- 12) Lin Deng, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスは酸化ストレスを介して糖新生を亢進し糖尿病発症に関与する. (プレナリーセッション). 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 13) 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. HCV NS3 トランスジェニックマウスを用いた肝発癌機構の研究. ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤(シンポジウム). 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 14) 進藤道子, El-Shamy A, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. 肝癌発生前後におけるC型肝炎ウイルス遺伝子(IRRDR, ISDR とコア蛋白)多様性の経時的変化の検討. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 15) 金守良, 井本勉, 堀田博, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩. 併用療法無効患者に対する二重濾過血液交換療法(DFPP)のEVRに関係するウイルスダイナミクス. 宿主因子(IL28B)とウイルス因子の検討. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.
- 16) 金守良, 井本勉, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, El Shamy A., 勝二郁夫, 林祥剛, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN $\alpha$ -2b+Ribavirin(併用療法)におけるインスリン抵抗性と治療効果、肝組織所見、BMIとの関連. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 17) El-Shamy A., 勝二郁夫, 斎藤貴史, 西瀬雄子, 井出良浩, Deng L., 河田純男, 堀田博. C型肝炎ウイルスのNS3変異Y56/Q86及びコア蛋白変異Q70は高発癌性ウイルス株の指標となる. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 18) 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 斎藤雅也, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN $\alpha$ -2a/RBV併用療法のEVR・SVRに関する因子の検討(神戸肝炎治療研究会). 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
- 19) 松井千絵子, 勝二郁夫, 兼田崇作, Deng L, 井出良浩, 堀田博, C型肝炎ウイルスによるグルコーストランスポーターGLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第64回日本細菌学会関西支部総会, 大阪, 2011.
- 20) 甘翔, Lin Deng, 陳明, 井出良浩, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5Aの新規結合タンパク質であるヒストンメチル基転移酵素SMYD3の同定. 第64回日本細菌学会関西支部総会 2011, 大阪
- 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

## 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
李天成	我が国における E 型肝炎の疫学と最近の動向	小柳義夫	日本臨床	日本臨床社	大阪	2011	573-578
田中智之	ノロウイルス食中毒	日本食品微生物学会	食品微生物学辞典	中央法規出版株式会社	東京	2010	188-189
田中智之	消化器症候群 ノロウイルス	田代真人 牛島廣治	ウイルス感染症の検査・診断スタンダード	羊土社	東京	2011	129-133

## 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
Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, <u>Suzuki T.</u>	Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles.	J Biol Chem	286	37264-37273	2011
Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, <u>Suzuki T.</u>	Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus.	J Gen Virol	92	2082-2087	2011
Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, <u>Suzuki T.</u> , Wakita T	Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes.	Vaccine	29	4821-4828	2011
Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D,	In Vivo adaptation of hepatitis C virus for	Hepatology	54	425-433	2011

Watanabe N, Murayama A, <u>Suzuki T</u> , Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T.	efficient virus production and evasion of apoptosis.				
Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Kaneko S. T.	Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C.	Gastroenterology	141	128-140	2011
Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, <u>Suzuki T</u> , Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K.	Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein.	J Hepatol.	54	432-438	2011
Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, <u>Suzuki T</u> , Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y.	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One.	6	E15967	2011
Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, <u>Suzuki T</u> .	Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules.	Biochem Biophys Res Commun.	407	135-140	2011
Inoue Y, Aizaki H,	Chaperonin TRiC/CCT	Virology	410	38-47	2011

Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, <u>Suzuki T.</u>	participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein.				
Suzuki T, Kuga K, Miyazaki A, <u>Tsunemitsu H.</u>	Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B.	J Gen Virol	92	2922-2929	2011
Suzuki T, Soma J, Kuga K, Miyazaki A, <u>Tsunemitsu H.</u>	Sequence and phylogenetic analyses of nonstructural protein 2 genes of species B porcine rotaviruses detected in Japan during 2001-2009.	Virus Res			In press
<u>Tian-Cheng Li,</u> Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda.	A retrospective study on imported hepatitis E in Japan.	J. Travel Medicine and Infectious Disease		in press	2012
<u>Tian-cheng Li,</u> Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T.	. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses.	Journal of General Virology	92	2830-2837	2011
Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, <u>Li TC,</u> Takeda N, Ogasawara K, Torii R.	Epidemiology of Hepatitis E Virus in Indoor-Captive Cynomolgus Monkey Colony.	J Vet Med Sci.		in press	2012
<u>Motomura K,</u> Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N,	Divergent Evolution of Norovirus GII/4 By Genome recombination over 2006-2009 in Japan	J. Virol.		8085-97	2010

Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan					
Ivo N. SahBandar, Kiyomi Takahashi, <u>Kazushi Motomura</u> , Zubairi Djoerban, Iman Firmansyah, Katsuhiko Kitamura, Hironori Sato, Herdiman T. Pohan, Shigehiro Sato	nThe Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis	AIDS Res Hum Retroviruses		97-102	2011
岸田典子、高下恵美、 藤崎誠一郎、徐紅、 伊東玲子、土井輝子、 江島美穂、金南希、 菅原裕美、氏家誠、 小淵正次、小田切孝 人、 <u>本村和嗣</u> 、佐 藤彩、横山勝、終元 巖、佐藤裕徳、小口 晃央、山崎秀司、藤 田信之、田代真人	2009/10 シーズンの季節性お よび新型インフルエンザ分離 株の解析	病原微生物検 出情報月報	31	253-260	2010
田村務、田澤崇、渡 邊香奈子、渡部香、 昆美也子、三好龍也、 内野清子、吉田永祥、 松尾光子、西口智 子、田中智之、北元 憲利、 <u>本村和嗣</u> 、佐 藤裕徳	ノロウイルス GII/4 の 2008a 亜株の動向とイムノクロマト 法の改良	病原微生物検 出情報月報	31	316-317	2010
<u>本村和嗣</u>	ノロウイルスの生き残り戦略	Medico	42	32-35	2011
<u>本村和嗣</u>	ノロウイルス感染症	臨床とウイル ス	39	115-122	2011
岸田典子、高下恵美、 藤崎誠一郎、徐 紅、 伊東玲子、土井輝子、 江島美穂、金 南希	2010/11 シーズンのインフ ルエンザ分離株の解析	病原微生物検 出情報月報	32	317-323	2011

菅原裕美、佐藤彩、今井正樹、小田切孝人、田代真人、本村和嗣、横山 勝柊元 巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之					
Mizutani, T., Sayama, Y., <u>Nakanishi, A.</u> , 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	157	116-20	2011
Tange, S., Imai, T., <u>Nakanishi, A.</u>	An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect.	Virus Res.	412	179-87	2011
K. Ishii <i>et al.</i>	Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010.	Journal of Clinical Virology	In press		2012
Y. Iwasaki <i>et al.</i>	Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets.	Frontiers in Microbiology	In press		2012
T. Miyamura <i>et al.</i>	Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure.	Hepatology Research	In press		2012
D. Akazawa <i>et al.</i>	Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture.	Vaccine	29	4821-4828	2011
T. Yoshida <i>et al.</i>	Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano.	Japanese Journal of Infectious Diseases	64	260-261	2011

T. Li <i>et al.</i>	A cell culture system for hepatitis E virus.	Hepatology International	5	202	2011
K. Ishii <i>et al.</i>	Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010.	Hepatology International	5	204-205	2011
Yamagishi, Y., Shoji, I., Miyagawa, S., Kawakami, T., Kato, T., Goto, Y., and Suga, H.	Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library.	Chemistry & Biology	18	1562-1570	2011
Shoji I., Deng L., and Hotta H.	Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders.	Frontiers in Microbiology	2	A278, 1-5	2012
Kamada K., Shoji I., Deng L, Wakita T., and Hotta H.	Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production.	Microbes and Infection	14	69-78	2012
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	55	1-11	2012
El-Shamy A., Shoji I., Kim SR., Imoto S., Deng L., Yoon S., Fujisawa T., Tani S., Yano Y., Seo Y., Azuma T., and Hotta H.	Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotype 2a and 2b and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy.	PLoS One	7	1-10	2012
Sasayama M., Shoji I., Ide Y-H., Deng L., and Hotta H.	A point mutation at Asn-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization.	Journal of Medical Virology	84	229-234	2012

El-Shamy A., <u>Shoji I.</u> , 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	55	418-26	2011
Deng L., <u>Shoji I.</u> , Oawa W., Kaneda S., Soga T., Jiang D. P., Ide Y-H., and Hotta H.	Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway.	Journal of Virology	85	8556-68	2011
Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., <u>Katayama, K.</u>	Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells.	Antiviral Res.	90	9-16	2011
Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., <u>Katayama, K.</u>	Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases.	Microbiol Immunol.	55	108-14	2011
Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., <u>Katayama, K.</u> , Katayama, H.	Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan.	Letters in applied microbiology	52	181-4	2011
Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., <u>Katayama, K.</u> , Kwong, P. D.	Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability.	J of Virol.	85	6687-70 1	2011
Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	J of Virol.	86	284-92	2012



Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., <u>Katayama K.</u> , Murata K., Kwong P. D.	Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle.	J of Virol.		In press	2012
Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. <u>Katayama, K.</u>	Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus.	Exp Anim	61	35-40	2012
<u>田中智之</u> 、	院内感染予防におけるノロウ イルス迅速診断法の活用	感染対策ICT ジャーナル	5(4),	427-4	2010
Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo M, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, <u>Tanaka T</u> , Wakita T, Katayama K, Takeda N and Oka T	Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall	J. Med. Virol	82:	720-726	2010

## IV. 研究成果の刊行物・別冊

# Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles<sup>\*[S]</sup>

Received for publication, May 7, 2011, and in revised form, August 18, 2011. Published, JBC Papers in Press, August 30, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.259085

Mohsan Saeed<sup>§</sup>, Ryosuke Suzuki<sup>‡</sup>, Noriyuki Watanabe<sup>‡</sup>, Takahiro Masaki<sup>‡</sup>, Mitsunori Tomonaga<sup>‡</sup>, Amir Muhammad<sup>¶</sup>, Takanobu Kato<sup>‡</sup>, Yoshiharu Matsuura<sup>||</sup>, Haruo Watanabe<sup>S\*\*</sup>, Takaji Wakita<sup>‡</sup>, and Tetsuro Suzuki<sup>‡\*\*\*1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan, the <sup>S</sup>Department of Infection and Pathology, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan, the <sup>¶</sup>Department of Pathology, Khyber Girls Medical College, Peshawar 25000, Pakistan, the <sup>||</sup>Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan, the <sup>\*\*</sup>National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan, and the <sup>\*\*\*</sup>Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan

**Background:** HCV causes ER stress in the infected cells.

**Results:** HCV-induced ER stress leads to increased expression of certain proteins that in turn enhance the degradation of HCV glycoproteins and decrease production of virus particles.

**Conclusion:** HCV infection activates the ERAD pathway, leading to modulation of virus production.

**Significance:** ERAD plays a crucial role in the viral life cycle.

Viral infections frequently cause endoplasmic reticulum (ER) stress in host cells leading to stimulation of the ER-associated degradation (ERAD) pathway, which subsequently targets unassembled glycoproteins for ubiquitylation and proteasomal degradation. However, the role of the ERAD pathway in the viral life cycle is poorly defined. In this paper, we demonstrate that hepatitis C virus (HCV) infection activates the ERAD pathway, which in turn controls the fate of viral glycoproteins and modulates virus production. ERAD proteins, such as EDEM1 and EDEM3, were found to increase ubiquitylation of HCV envelope proteins via direct physical interaction. Knocking down of EDEM1 and EDEM3 increased the half-life of HCV E2, as well as virus production, whereas exogenous expression of these proteins reduced the production of infectious virus particles. Further investigation revealed that only EDEM1 and EDEM3 bind with SEL1L, an ER membrane adaptor protein involved in translocation of ERAD substrates from the ER to the cytoplasm. When HCV-infected cells were treated with kifunensine, a potent inhibitor of the ERAD pathway, the half-life of HCV E2 increased and so did virus production. Kifunensine inhibited the binding of EDEM1 and EDEM3 with SEL1L, thus blocking the ubiquitylation of HCV E2 protein. Chemical inhibition of the ERAD pathway neither affected production of the Japanese encephalitis virus (JEV) nor stability of the JEV envelope protein. A co-immunoprecipitation assay showed that EDEM orthologs do not bind with JEV envelope protein. These findings

highlight the crucial role of the ERAD pathway in the life cycle of specific viruses.

Quality control of proteins, such as the elimination of misfolded proteins, is largely connected with the endoplasmic reticulum (ER),<sup>2</sup> which is an organelle responsible for the folding and distribution of secretory proteins to their sites of action. This pathway is termed ER-associated degradation (ERAD) and is triggered by ER stress. It results in retrotranslocation of misfolded proteins into the cytosol, followed by polyubiquitylation and proteasomal degradation (1). Several viral infections have been reported to trigger the ERAD pathway (2–4); however, the role of this pathway in the life cycle of viruses remains poorly defined.

Initiation of the ERAD pathway occurs from the oligomerization and autophosphorylation of IRE1, an ER stress sensor. The activated IRE1 removes an intron from X-box-binding protein 1 (XBP1) mRNA, which then encodes a potent transcription factor for activation of genes, for example, ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein (EDEM). EDEM1 (5), along with its two homologs EDEM2 (6) and EDEM3 (7), as well as ER mannosidase I (ER ManI), belong to the glycoside hydrolase 47 family. EDEMs are thought to function as lectins that deliver misfolded glycoproteins to the ERAD pathway. However, the precise mechanism by which they assist in glycoprotein quality control remains unclear.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease. The RNA genome of HCV, a member of the Fla-

\* This work was supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S7.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan. Tel.: 81-53-435-2336; Fax: 81-53-435-2338; E-mail: tesuzuki@hama-med.ac.jp.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: ER, endoplasmic reticulum; CHX, cycloheximide; EDEM, ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein; ERAD, ER-associated degradation; HCV, hepatitis C virus; JEV, Japanese encephalitis virus; KIF, kifunensine; ManI, mannosidase I; m.o.i., multiplicity of infection; TM, tunicamycin; XBP1, X-box-binding protein 1; IRE, inositol-requiring enzyme.

viviridae family, encodes the viral structural proteins Core, E1, E2, and p7, as well as six nonstructural proteins (8, 9). Two N-glycosylated envelope proteins E1 and E2 are exposed on the surface of the virus and are necessary for viral entry.

The aim of this study was to investigate whether the ERAD pathway is activated upon HCV infection and whether this affects the quality control of virus glycoproteins and virion production. We show that HCV infection triggers the ERAD pathway, possibly through IRE1-mediated splicing of XBP1. Moreover, EDEM1 and EDEM3, but not EDEM2, interact with HCV glycoproteins, resulting in increased ubiquitylation. EDEM1 knockdown and chemical inhibition of the ERAD pathway increases glycoprotein stability, as well as production of infectious virus particles, whereas overexpression of EDEM1 decreases virion production. These results provide insight into the mechanism by which HCV triggers the ERAD pathway and subsequently affects the quality control of virus glycoproteins and virus particle production.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Chemicals**—Human hepatoma cells HuH-7 and HuH-7.5.1 (a gift from Dr. F. V. Chisari (The Scripps Research Institute) (10) and human embryonic kidney cells 293T were cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM containing 10% FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, nonessential minimum amino acids, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Tunicamycin (TM) was purchased from Sigma-Aldrich, and kifunensine (KIF) was purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada).

**Preparation of Virus Stock**—HCV JFH-1 was generated by introducing *in vitro* transcribed RNA into HuH-7.5.1 cells by electroporation, and virus stocks were prepared by infecting at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.01, as described previously (10). Infected cells were grown in culture medium containing 2% FBS, and supernatants were collected after multiple passages to get high titer virus. The supernatants were concentrated using a 500-kDa hollow fiber module (GE Healthcare) resulting in ~90% recovery of the virus. Focus-forming units were measured with an anti-HCV core antibody to determine virus titration (2H9, described below). Virus stocks containing  $1 \times 10^7$  focus-forming units/ml were divided into small aliquots and stored at -80 °C until use. rAT strain of Japanese encephalitis virus (JEV) (11) was used to generate virus stock.

**Plasmids**—cDNAs of mouse EDEM1-HA, EDEM2, and EDEM3-HA, having 92, 93, and 91% amino acid homology with their human orthologs, respectively, were a kind gift from Drs. N. Hosokawa (Kyoto University) and K. Nagata (Kyoto Sangyo University). A HA tag was attached to the C terminus of EDEM2 by PCR, and sequencing analysis was performed to confirm the sequence. To generate pJFH/E1dTM-myc and pJFH/E2dTM-myc, HCV E1 encoding amino acids 170–352 and HCV E2 encoding amino acids 340–714 of JFH-1 polyprotein were amplified by PCR with forward primer and reverse primer containing NotI and XbaI restriction sites, respectively, and cloned into a NotI/XbaI site of the pEF1/Myc-His plasmid (Invitrogen). The pCAGC105E plasmid carrying PrM and E proteins of the rAT strain of JEV has been described (12). Plasmids carrying the firefly luciferase reporter gene under control

of the intact promoter of GRP78 and GRP94 or the defective promoter lacking ERSE elements have been described (13) and were a kind gift from Dr. K. Mori (Kyoto University).

**Antibodies**—Rabbit polyclonal antibodies included anti-HA (Sigma-Aldrich), anti-HCV NS5A (14), anti-SEL1L (Sigma-Aldrich), anti-ubiquitin (MBL, Nagoya, Japan), and anti-JEV E antibodies. The mouse monoclonal antibodies were anti-HA (clone 16B12; Covance, Emeryville, CA), anti-HCV E2 (clone 8D10-3),<sup>3</sup> anti-β-actin (clone AC15; Sigma-Aldrich), anti-HCV core (clone 2H9) (15), and anti-Myc (clone 9E10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antibodies. Anti-JEV antibodies have been described (16) and were a kind gift from Drs. C. K. Lim and T. Takasaki (National Institute of Infectious Diseases).

**Analysis of XBP1 Splicing**—Total RNA was extracted from cells using Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan) following the manufacturer's protocol, and 2 µg of RNA was subjected to cDNA synthesis using oligo(dT) and Superscript III (Invitrogen). PCR was carried out using specific primers 5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3' and 5'-GTATCTCTAAGACTAGGGGCTTGGTA-3' for XBP1 and 5'-TCCTGTGGCA-TCCACGAAACT-3' and 5'-GAAGCATTTGCGGTGGAC-GAT-3' for β-actin to generate PCR fragments of 598 bp for unspliced XBP1, 572 bp for spliced XBP1, and 315 bp for β-actin. The following cycling conditions were used to amplify the genes: 1 cycle of 98 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 98 °C for 20 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension of 72 °C for 10 min. The PCR product of XBP1 was further digested with PstI enzyme (New England Biolabs) and resolved on a 2% agarose gel prepared in TAE buffer. Unspliced XBP1 yielded two smaller fragments of 291 and 307 bp whereas spliced XBP1 stayed intact due to loss of the restriction site after splicing.

**Gene Microarray Analysis**—For microarray analysis, RNA was extracted from HuH-7.5.1 cells at 48 and 72 h after JFH-1 infection. Cells treated for 12 h with 5 µg/ml TM served as a positive control. Hybridization was performed on a 3D-Gene (see 3D-Gene web site) Human Oligonucleotide chip 25k (Toray Industries Inc., Tokyo, Japan). For efficient hybridization, this microarray chip has three dimensions and is constructed with a well between the probes and cylinder stems with 70-mer oligonucleotide probes on the top. Total RNA was labeled with Cy3 or Cy5 using the Amino Allyl MessageAMP II aRNA Amplification kit (Applied Biosystems). The Cy3- or Cy5-labeled aRNA pools were subjected to hybridization for 16 h using the supplier's protocol. Hybridization signals were scanned using a ScanArray Express Scanner (PerkinElmer Life Sciences) and processed by GenePixPro version 5.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Detected signals for each gene were normalized using a global normalization method (Cy3/Cy5 ratio median = 1). Genes with Cy3/Cy5 normalized ratios  $>\log_2 1.0$  or  $<\log_2 -1.0$  were defined, respectively, as significantly up- or down-regulated genes.

**Quantification of Cellular Gene Expression**—Gene expression levels were measured using predesigned assay-on-demand (Applied Biosystems). RT-PCR amplification was performed

<sup>3</sup> D. Akazawa, N. Nakamura, and T. Wakita, unpublished data.