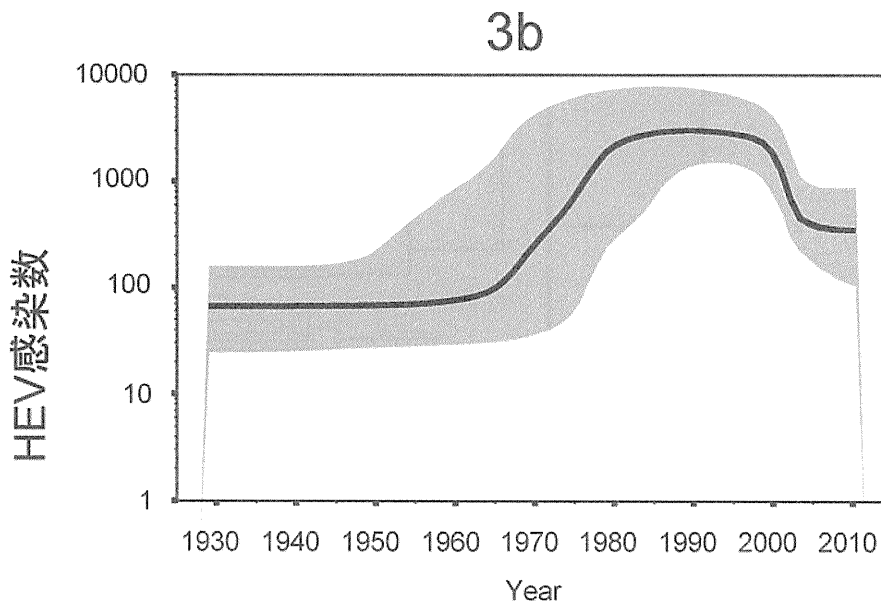
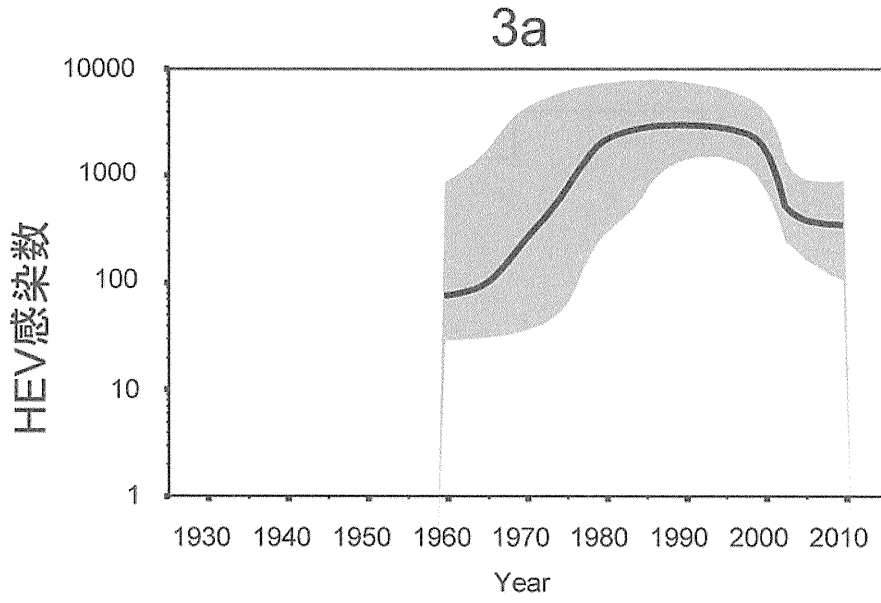


Bayesian Skyline plot (BSP) median & 95% CI



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、および
治療に関する研究
平成 23 年度分担研究報告書

組換えバキュロウイルスを用いた Rat HEV 構造蛋白の発現およびその応用

研究分担者 李天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：E 型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus、HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生し、時として飲料水などを介し大流行を引き起こす。先進国においても、E 型肝炎はすでに土着していて、人畜共通感染症として注目されている。最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型の HEV は続々発見されていたが、これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序および抗原性、病原性は未だに明らかではない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて rat HEV の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。さらに Rat HEV-LPs を用いた抗体検出 ELISA 法を樹立し、ベトナム野生ラットにおける Rat HEV 感染実態を調査した。

<研究協力者>

網康志、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室・主任研究官）

片岡 紀代（国立感染症研究所・病理部・主任研究官）

有川二郎（北海大学・動物実験施設・教授）

されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかではない。その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて rat HEV の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析をした上、rat HEV 疫学調査をした。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) はエンベロープを持たない一本鎖のポジティブストランド RNA ウイルスであり、ヘペウイルス科 (*Hepeviridae*)、ヘペウイルス属 (*Hepevirus*) に分類されている。HEV は急性 E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生し、時として飲料水などを介し大流行を引き起こす。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20% に達するという報告もある。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。また、HEV はヒトだけではなく、家畜や野生動物などにも感染する。これまでに、ヒトから四つの遺伝子型が分離されたが、最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型の HEV は続々発見されていた。これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立

B. 研究方法

Rat HEV (GU345042) 構造蛋白をコードする ORF2 の配列を合成し、定法どおり Rat HEV ORF2 全長、あるいは N 末端 12 と 100 個アミノ酸を欠損した組換えバキュロウイルスを作製し、Tn5 細胞で構造蛋白を発現させる。SDS-PAGE とウェスタン法を用いて細胞内および培養上清中の発現蛋白を確認したあと、塩化セシウム密度勾配遠心法によりウイルス様粒子 (VLPs) を精製する。精製した VLPs をウサギに免疫し、抗 rat HEV-LPs 抗体を作製する。Rat HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立し、rat HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較する。

中和活性の測定：免疫血清を HEV と 6 ウェールプレート上で十分混合して、37℃ 一時間反応させた後、4℃ 一晚置く。翌日、PLC/PRF/5 細胞を 5×10^5 /well 蒔き、36℃ で培養する。その後、3 日おきに培地を交換する。経時的に培養上清中の抗原を測定し、ウイルスの増殖の有無

によって免疫血清の中和活性を評価する。

倫理面への配慮：本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて rat HEV ORF2 全長を発現した場合、感染細胞内に 69kDa の蛋白が確認された。これは rat HEV 全長構造蛋白と思われる。ただし、この蛋白は培養上清に分泌されなく、粒子の形成も認められなかった。N 末端 100 個アミノ酸を欠損した rat HEV ORF2 を発現した場合、感染細胞培養上清から直径約 24nm と 30 nm 二種類の rat HEV-LPs を大量に得た。形態上では 24nm の VLPs は G1, G3, G4 HEV-LPs と類似する。Rat HEV-LPs をウサギに免疫し、高力価な抗体が誘導された。抗 rat HEV-LPs 抗体は G1, G3, G4 HEV-LPs との反応が ELISA 法で確認されたが、抗 G1, G3, G4 HEV-LPs 抗体に比べ反応が弱い。また、Rat HEV-LPs を用いて G1, G3, G4 HEV を感染した E 型肝炎患者血清から特異的 IgG および IgM 抗体の検出できるが、いずれも抗体価が低い。抗 rat HEV-LPs 抗体は PLC/PRF/5 細胞への G1, G3 および G4 HEV の感染を阻止することから中和活性を有することが推測される。以上の結果から rat HEV の抗原性は G1, G3, G4 HEV とは異なるが、G1, G3, G4 HEV と類似する抗原エピトープをいくつか持つことが示唆された。さらに rat HEV-LPs を用いた抗体検出 ELISA 法を樹立し、ベトナム野生ラットにおける疫学調査をした。調査結果から、ベトナム野生ラットにおける rat HEV 抗体保有率は 20.9% であることが分かった。また、ベトナム野生ラットから新しい遺伝子型の rat HEV 遺伝子を検出した。

ネイティブウイルス粒子ともっと類似する rat HEV-LPs を作製するため、N 末端 13 個アミノ酸を欠損した rat HEV ORF2 ゲノムを持つ組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞 Tn5 に感染した。感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 68k のバンドが出現した。発現は 4 日目にプラトーに達し、6 日目から 64k、および 53k のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35nm のネイティブなウイルス粒子と

ほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。この粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子が取り込まれていた。

D. 考察

これまでに G1 HEV 構造蛋白を用いて野生ラットから抗 HEV 抗体が検出された報告はいくつかあった。ただし、rat HEV に対する特異的な抗体の検査法でないので、これらの結果は rat HEV の本来の感染状況が反映されていない。本研究は rat HEV-LPs の作製の成功により、抗 rat HEV 特異抗体の検査は可能となった。この検査方法の樹立は rat HEV 感染実態の究明に非常に有用である。

E. 結論

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて rat HEV 構造蛋白を発現し、世界初 rat HEV-LPs の作製に成功した。rat HEV-LPs は既知の G1, G3 G4HEV-LPs と交叉反応することが明らかになった。Rat HEV-LPs を用いた抗体検出 ELISA 法を樹立し、ベトナム野生ラットにおける疫学調査をして、新しい遺伝子型の rat HEV が存在することがわかった。

F. 研究発表

1. 学会発表
 - 1) Genotype 5 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析、李 天成、高橋 和明、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎 百合子、石井 孝司、脇田 隆字、三代 俊治。第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月 堺市
 - 2) 田中聖一、山本博、万年和明、李天成。ニッポンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 152 回日本獣医学会学術集会 2011 年 9 月 堺市
 - 3) Tian-cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, and Takaji Wakita. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Rat Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses cell culture. IUMS2011, XV international congress of virology. 2011. September, Sapporo.
 - 4) Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki Tetsuro Suzhki, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Expression of rat HEV virus capsid protein and generation of the virus-like particles. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

- 5) Koji Ishii, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tomoyuki Shioda, Takanobu Kato, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

2. 論文発表

- 1) Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2012. *In press*.
- 2) Tian-cheng Li, 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* (2011), 92, 2830–2837.
- 3) Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li TC, Takeda N, Ogasawara K, Torii R. Epidemiology of Hepatitis E Virus in Indoor-Captive Cynomolgus Monkey Colony. *J Vet Med Sci*. 2012. *in press*.
- 4) 李天成 我が国における E 型肝炎の疫学と最近の動向. 日本臨床増刊号 573-578, 2011.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、および
治療に関する研究
平成 23 年度分担研究報告書

種の壁を越えた HEV の培養細胞での増殖

研究協力者 高橋雅春 自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
研究代表者 岡本宏明 自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨： E 型肝炎ウイルス（HEV）は人獣共通感染ウイルスであり、ブタおよびイノシシは動物由来 E 型肝炎の感染源になっていると考えられている。HEV の培養細胞感染系を用いて、HEV の種の壁を越えた感染について *in vitro* での検討を行ったところ、ブタおよびイノシシの肝臓、糞便および血液由来の HEV はヒト由来の A549 細胞および PLC/PRF/5 細胞に感染し、培養上清中に progeny ウイルスが放出された。感染・増殖の成否は接種するウイルス量に依存的であった。また、ウサギ由来の HEV も A549 細胞での増殖が認められた。一方、zoonotic type の感染性を有する遺伝子型 3 型のヒト HEV は種の壁を越えてブタ腎臓由来の PK15 細胞および IBRS-2 細胞に感染し、効率良く増殖するが、nonzoonotic type の 1 型のヒト HEV は接種後 10 日目以降で増殖が抑制された。これは 1 型 HEV の宿主特異性と関連していると思われた。

<共同研究者>

田中利典（自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門、講師）

吉林台（自治医科大学 感染・免疫学講座ウイルス学部門、客員研究員）

高橋秀行（自治医科大学大学院医学研究科修士課程学生、現 株式会社リンフォテック 新規事業本部）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は人獣共通感染ウイルスであり、ヒトのみならず、ブタ、イノシシ、シカ等の動物でも感染が認められる。ヒトから分離される HEV には少なくとも 4 種類の遺伝子型（1～4 型）があるが、このうち 1 型および 2 型はヒトのみから分離される nonzoonotic type である。一方、3 型および 4 型は zoonotic type であり、ブタおよびイノシシは動物由来 E 型肝炎の感染源になっていると考えられている。そこで、我々が開発したヒト由来 A549 細胞および PLC/PRF/5 細胞による HEV の効率的な培養細胞感染系を用いて、実際に動物由来の HEV が種の壁を越えてヒト由来細胞に感染し、増殖できるのか否かを *in vitro* で検討した。また、反対にヒト由来 HEV の動物由来細胞への感染性についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物由来 HEV のヒト由来細胞への接種

HEV 陽性の市販ブタ肝臓のホモジネート、ブタ糞便上清、ブタ血清、野生イノシシの肝臓のホモジネートおよびウサギ血清を動物由来 HEV の感染源として、6 ウェルプレートで培養したヒト肺癌由来の株化細胞である A549 細胞およびヒト肺癌由来の PLC/PRF/5 細胞に接種し、2 日毎に培養上清を採取し、real-time PCR 法により培養上清中に出現する HEV progeny を経時的に測定した。また、HEV ORF2 領域の 457 塩基長を nested RT-PCR 法により増幅し、感染源と培養上清中の progeny ウイルスの塩基配列を比較した。

2. ヒト由来 HEV のブタ由来細胞への接種

E 型肝炎患者の糞便に由来し、PLC/PRF/5 細胞で継代培養された遺伝子型 1 型、3 型および 4 型のヒト HEV をブタの腎臓由来の株化細胞である PK15 細胞および IBRS-2 細胞に接種し、2 日毎に培養上清を採取し、HEV progeny を経時的に測定した。

倫理面への配慮：本研究で使用したヒト HEV が由来する糞便検体の採取に際してインフォームドコンセントが得られている。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果および考察

1. ブタおよびイノシシ由来 HEV のヒト由来細胞への接種

HEV陽性の市販ブタ肝臓 7 検体のホモジネートをA549 細胞に接種したところ、high titerの3 検体（接種量 $4.0 \times 10^4 \sim 6.6 \times 10^5$ copies/well）で培養上清中へのprogeny ウイルスの放出が認められた。progeny ウイルスは接種後 2～6 日目に培養上清中に出現し、30 日目には $1.1 \sim 7.3 \times 10^7$ copies/mL に達した(図 1A)。また、PLC/PRF/5 細胞でも同様の増殖が認められた。一方、HEV titer が低い 4 検体（接種量 $\leq 6.0 \times 10^2$ copies/well）では 30 日目までにprogeny ウイルスの出現は認められなかった。この実験により、ブタ由来のHEVは種の壁を越えて、ヒト由来細胞で増殖することが明らかになり、市販ブタ肝臓に含まれるHEVは感染性を有し、HEV 陽性のブタ肝臓を加熱不十分な状態で摂取した場合には感染が成立し、E型肝炎を発症する可能性があることが強く支持された。

HEV陽性のブタ糞便上清 3 検体をA549 細胞に接種 ($2.0 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ copies/well) したところ、培養上清中へのprogeny ウイルスの放出が認められ、接種後 60 日目には $1.0 \sim 7.2 \times 10^5$ copies/mL に達した。また、HEV陽性のブタ血清 9 検体をA549 細胞に接種したところ、high titerの2 検体（接種

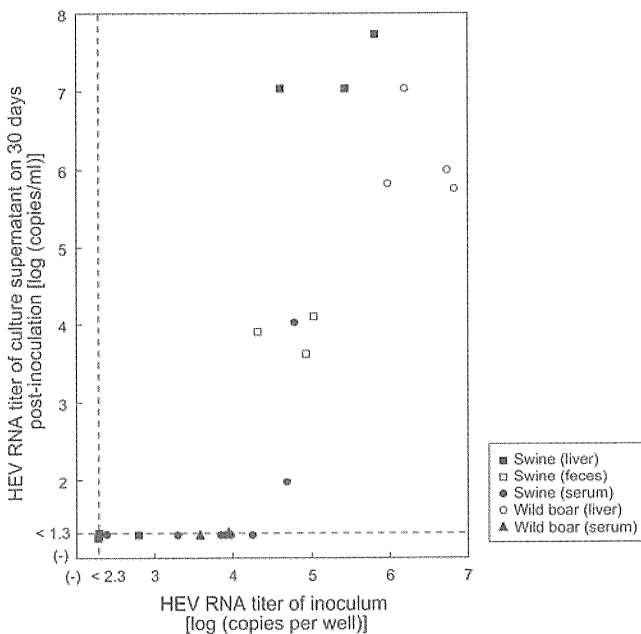


図 2 接種材料の HEV RNA titer と接種後 30 日目の培養上清中の progeny HEV の HEV RNA titer の比較

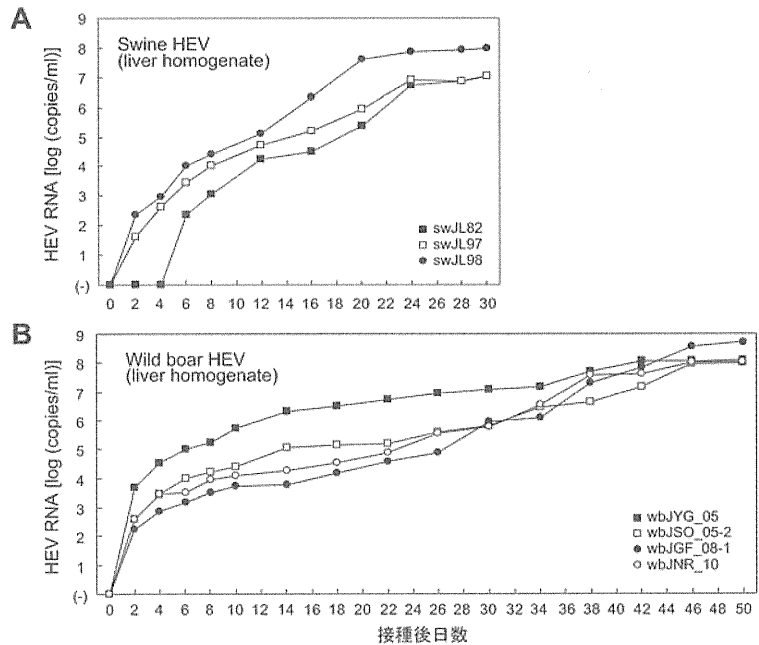


図 1 ブタ (A) および野生イノシシ (B) の肝臓ホモジネート由来 HEV の A549 細胞での増殖

培養上清中で検出された HEV RNA のタイターの推移を示す。

量 $5.0 \sim 6.0 \times 10^4$ copies/well) で培養上清中へのprogeny ウイルスの放出が認められた。

HEV陽性の野生イノシシの肝臓 4 検体のホモジネートをA549 細胞に接種したところ ($9.8 \times 10^5 \sim 6.6 \times 10^6$ copies/well)、活発な増殖が認められ、接種後 2 日目に培養上清中にprogeny ウイルスが出現し、50 日目には $9.8 \times 10^7 \sim 3.5 \times 10^8$ copies/mL に達した。PLC/PRF/5 細胞でも同様の増殖が認められた(図 1B)。

ブタおよびイノシシのHEVは感染材料の種類（糞便・血清・肝臓）にかかわらず、接種ウイルス量が 2.0×10^4 copies/well 以上の場合に感染が成立し、 1.8×10^4 copies/well 以下では成立しなかった(図 2)。従って、ブタおよびイノシシのHEVの培養の成否はヒトHEVの場合と同様に接種するウイルス量、即ち感染材料中のHEV titerに依存していると考えられた。

感染材料中の HEV および培養上清中に出現した progeny ウイルスの ORF2 領域の 412 塩基長の配列を比較したところ、相互に 99.5～100%の一致率を示したことから、ブタおよびイノシシ糞便・血清・肝臓材料中の HEV が培養細胞中で増殖していることが確認された。

2. ウサギ由来 HEV のヒト由来細胞への接種

中国内モンゴル自治区の飼育ウサギ (Rex rabbit) 211 羽についてHEV感染状況の調査を行ったところ、151 羽 (71.6%) の血清でHEV RNAが

陽性であった。このうちtiterが 10^5 copies/mL以上であった4検体をヒト由来のA549細胞に接種($1.3 \sim 4.8 \times 10^5$ copies/mL)したところ、最もtiterが高かったrbIM043株で培養上清中にprogenyウイルスの出現が認められた。ウサギHEVは系統発生的分類において遺伝子型3型の中で、ヒト、ブタおよびイノシシ由来株とは異なる独立したclusterを形成しているが、in vitroの培養系では種の壁を越えてヒト由来細胞に感染して増殖することが示された。但し、感染が成立したのはこの1株のみで、培養上清中のHEV titerは接種後30日目でも 10^4 copies/mLに満たなかった。これは感染源としたウサギ血清のHEV titerが低値であったためであると推察され、より効率の良い培養を行うためにHEV高力価の材料を確保すべく、ウサギ検体の採取を継続中である。

3. ヒト由来HEVのブタ由来細胞への接種

最近、我々はブタ、ヒト、サル、ウシおよびイヌの腎臓由来の株化細胞を用いた感染実験を行い、遺伝子型3型および4型のヒトHEVが種の壁を越えてブタ腎臓由来のPK15細胞およびIBRS-2細胞で増殖することを明らかにした。3型のヒトHEVは3型のブタHEVと同様にブタ由来のPK15細胞で効率良く増殖しているが、1型HEVは接種後10日目以降増殖が抑制された。ブタ腎臓由来のIBRS-2細胞でも同様に3型のヒトおよびブタのHEVが効率的に増殖するのに対して、ヒトの1型HEVの増殖は抑制された。この1型ヒトHEV株は、A549細胞では3型のヒトHEVおよびブタHEVと同様に持続的に増殖していることから、ヒト1型HEVはヒト由来細胞では効率的に増殖するもののブタ由来細胞では増殖しにくいと考えられた。これは3型HEVがzoonotic typeの感染性を有するのに対して、1型HEVはヒトにのみ感染するという宿主特異性を有していることに関連していると思われた。

D. 結論

HEV陽性の市販ブタ肝臓、ブタ糞便上清、ブタ血清およびイノシシ肝臓中のHEVは、種の壁を越えてヒト由来のA549細胞およびPLC/PRF/5細胞に感染し、培養上清中へのprogenyウイルスの放出が認められた。感染・増殖の成否は感染材料の種類（糞便・血清・肝臓）にかかわらず、接種するウイルス量に依存していると考えられた。同様にウサギ由来のHEVも種の壁を越えてヒト由来のA549細胞に感染することが明らかになった。一方でzoonotic typeの感染性を有する遺伝子型3型のヒトHEVは種の壁を越えてブタ腎臓由来の

PK15細胞およびIBRS-2細胞に感染し、効率良く増殖するが、nonzoonotic typeの1型のヒトHEVは接種後10日目以降で増殖が抑制され、これは1型HEVの宿主特異性と関連していると思われた。今後の検討で、我々が作製した3型HEVの感染性cDNAクローン(pJE03-1760F/wt)をbackboneにして1型HEVとの各種のキメラを作製し、ブタ由来のPK15細胞およびIBRS-2細胞に接種することにより、宿主特異性を規定している遺伝子領域を特定したいと考えている。

E. 研究発表

1. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. Arch Virol 157: 235-246, 2012.
2. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. Arch Virol 156: 1345-1358, 2011.
3. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H: Tumor susceptibility gene 101 and vascular protein sorting pathway are required for release of hepatitis E virus virion. J Gen Virol 92: 2838-2848, 2011.
4. 田辺利男、水尾仁志、矢崎康幸、高橋雅春、岡本宏明: 北海道東部の釧路市および根室市におけるE型肝炎ウイルス感染の疫学調査：感染の地域差と食文化の相違について. 肝臓 52: 567-574, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
 経口感染する肝炎ウイルス(A 型、E 型)の感染防止、遺伝的多様性、および
 治療に関する研究
 平成 23 年度分担研究報告書

HEV の感染細胞からの放出に関わる宿主因子

研究協力者 長嶋茂雄 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門 講師
 研究代表者 岡本宏明 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨： E 型肝炎ウイルス (HEV) の ORF3 蛋白質に存在する PSAP モチーフは、膜に覆われたウイルス粒子の形成ならびに感染細胞からのウイルス粒子の放出に重要である。本研究では、ORF3 蛋白質と宿主因子である tumor susceptibility gene 101 (Tsg101)の相互作用の解析、ならびに multivesicular body (MVB) sorting 機構を阻害することによる HEV 放出効率への影響を解析した。野生型 ORF3 蛋白質は Tsg101 との結合が認められたが、PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質では結合が認められず、ORF3 蛋白質は PSAP モチーフを介して Tsg101 と細胞内で結合することが明らかとなった。また、Tsg101 に対する siRNA ならびに Vps4 のドミナントネガティブ変異体を用いて、これらの宿主因子を抑制したところ、HEV の放出が阻害された。以上の結果から、Tsg101 および Vps4 はウイルスの放出に重要であり、HEV の放出に MVB sorting 機構が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

HEV はノンエンベロープウイルスでありながら、培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在している。これまでの解析により、ORF3 蛋白質に存在する PSAP モチーフが、膜に覆われたウイルス粒子の形成ならびに感染細胞からのウイルス粒子の放出に重要であることが明らかとなった。以上の結果から、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に MVB sorting が関与している可能性が示唆された。そこで、HEV が感染細胞から子孫ウイルスを放出するために宿主の MVB sorting 機構を利用しているか否かを明らかにすることを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

実験に用いたHEVは、JE03-1760F株 (遺伝子型 3 型) 由来の感染性cDNAクローン(pJE03-1760F/wt) から合成したRNAをPLC/PRF/5 細胞にトランスフェクトして得られたウイルスである。Tsg101 と野生型ORF3 蛋白質または2つのPSAPモチーフのアミノ酸配列を置換した変異型ORF3 蛋白質 (mutPLAP/LSAL) (図 1) との相互作用の解析は、発現プラスミドを用いてこれらの蛋白質を細胞内に共発現させ、共免疫沈降法ならびに蛍光抗体法により行った。HEV放出におけるTsg101 ならびに Vps4 の必要性については、Tsg101 に対するsiRNA ならびにVps4 ドミナントネガティブ変異プラスミドをトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清中および細胞内のHEV RNA titer をリアルタイムRT-PCR法により測定し、検討した。感染細胞を用いたORF3 蛋白質とCD63の細胞内局在の解析は、蛍光抗体法により行った。

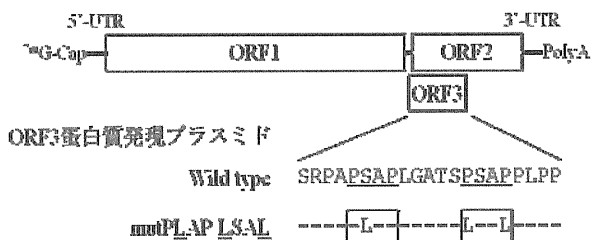


図 1 HEV のゲノム構造と ORF3 蛋白質発現プラスミドの PSAP モチーフに導入したアミノ酸変異

倫理面への配慮

感染性 cDNA クローンが由来する糞便検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。また、検体提供者は匿名化されているため、個人のプライバシーを侵害することはない、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. ORF3 蛋白質と Tsg101 の相互作用の解析

L-ドメインである PSAP モチーフは、宿主因子である Tsg101 と結合することが報告されている。この点について Tsg101 と野生型 ORF3 蛋白質または PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質 (図 1) を細胞内に共発現させ、2つの方法で相互作用の解析を行った。

① 共免疫沈降法による解析

野生型の ORF3 蛋白質は Tsg101 との結合が認められたが、PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質では Tsg101 との結合が認められなかった。

② 蛍光抗体法による解析

野生型の ORF3 蛋白質と Tsg101 は、細胞質内において高頻度 ($92.5 \pm 2.5\%$) に共局在を示した。一方、PSAP モチーフを持たない ORF3 蛋白質では、Tsg101 との共局在が認められなかった。

以上の結果から、ORF3 蛋白質は PSAP モチーフを介して Tsg101 と細胞内で結合することが明らかとなった。さらに、PSAP モチーフを置換すると、ウイルスの放出が阻害されたことに加え、Tsg101 との相互作用が認められないことから、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に MVB sorting が関与している可能性が示唆された。

2. Tsg101 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

HEV 放出における MVB sorting 機構の関与を調べるために、Tsg101 に対する siRNA を用いて、細胞内の Tsg101 をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。Tsg101 は MVB sorting の初期過程で働く ESCRT-I 複合体の構成因子の 1 つである。

Tsg101 に対する siRNA (siTsg101) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。そして、感染 10 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、NC siRNA を 100% として、siTsg101 では 6.4% と放出効率の著しい低下が認められた。この時の細胞内の Tsg101 の発現については、ウェスタンブロッティングによる確認を行ったが、siTsg101 を導入した細胞では Tsg101 は検出されなかった。

また、siTsg101 をトランスフェクトした細胞内の HEV RNA を定量した結果、siRNA をトランスフェクトしていない細胞内および NC siRNA をトランスフェクトした細胞内と同程度であった。このことから、siRNA トランスフェクションによる

HEV RNA 複製への影響はないものと考えられた。

以上の結果から、Tsg101 はウイルス粒子の放出に重要であり、HEV が MVB sorting 機構を利用している可能性が示唆された。

3. Vps4 ドミナントネガティブ変異体をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Vps4 は、MVB sorting の最終段階に作用する ATPase である。そこで、この活性部位にアミノ酸置換を導入したドミナントネガティブ変異体を細胞内に発現させ、ウイルスの放出効率を解析した。Vps4 は 2 つのアイソタイプ Vps4A, Vps4B が存在するため、それぞれの活性部位にアミノ酸変異 [Vps4AEQ (E228Q), Vps4BEQ (E235Q)] を導入し実験に用いた。

siRNA を用いた解析と同様に、Vps4AEQ, Vps4BEQ または何もコードされていない空のベクター (empty vector) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。感染 8 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した結果、empty vector を 100% として、Vps4AEQ では 19.2%、Vps4BEQ では 15.6% と放出効率の低下が認められた。また、細胞内でのドミナントネガティブ変異体の発現については、ウェスタンブロッティングにより確認を行ったが、効率のよい発現が認められた。

以上の結果から、ウイルス粒子の放出には Vps4A および Vps4B の酵素活性が必要であり、HEV が vacuolar protein sorting (Vps) pathway を利用している可能性が示唆された。

4. 野生型 Vps4 をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Vps4 のドミナントネガティブ変異体を用いた解析の結果、ウイルスの放出が阻害されたことから、更なる Vps4 の機能を調査するため、野生型の Vps4A または Vps4B を過剰発現した細胞を用いてウイルスの放出効率を解析した。

ドミナントネガティブ変異体を用いた解析と同様に、野生型 Vps4A, Vps4B または empty vector を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。感染 8 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した結果、empty vector を 100% として、Vps4A では 104.3%、Vps4B では 103.7% と放出効率に影響は認められなかった。

以上の結果から、ウイルス粒子の産生には内在性の Vps4 で十分であることが示唆された。

5. HEV 感染細胞における ORF3 蛋白質と CD63 の

細胞内局在

ORF3 蛋白質と MVB の細胞内局在を確認するため、HEV 感染細胞を用いて蛍光抗体法により ORF3 蛋白質および MVB のマーカー蛋白質である CD63 をそれぞれ標識した。その結果、ORF3 蛋白質と CD63 は、細胞質内において高頻度 (82.5 ± 2.5%) に共局在を示した。

以上の結果から、HEV は MVB sorting の機構を細胞膜ではなく、エンドソーム膜上で利用している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究により、HEV の放出には多くのエンベロープウイルスで報告されている MVB pathway が関与していることが明らかとなった。さらに、ORF3 蛋白質が MVB のマーカーである CD63 と共局在を示すこと、感染細胞内には培養上清中の粒子と同様の抗原性を示す膜に覆われたウイルス粒子が存在していること (未発表データ) を見出した。これらの知見は、HEV が細胞質内のエンドソーム膜に出芽し、エンベロープを獲得した成熟ウイルス粒子が MVB 内に存在することを示唆している。以上の考察から、HEV の成熟粒子は、MVB 内に共存しているエクソソームとともに細胞外に分泌される可能性が強く示唆される。また、感染培養系において細胞変性が認められず、長期間の培養が可能であることから、細胞内膜輸送系を巧みに利用した極めてオリジナリティの高い放出機構を有していると考えられる。

今後は、MVB pathway を利用して膜成分を獲得したウイルス粒子がどのようにして細胞外に放出されるかを明らかにすることが重要となる。E 型肝炎に対する特異的な治療法が確立されていない現状にあって、HEV の放出機構が明らかとなれば、抗ウイルス剤の開発など特異的な治療法の確立による疾患制圧の大きな一歩となることが期待される。

E. 結論

本研究により、HEV の感染細胞からの放出には、ウイルス側の因子として ORF3 蛋白質に存在する PSAP モチーフが重要であり、宿主側の因子として Tsg101 ならびに Vps4 が重要であることが明らかとなった。また、ORF3 蛋白質にコードされた PSAP モチーフが L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に MVB sorting が関与していることが示された。さらに、HEV はこの MVB sorting の機構を細胞膜上ではなく、エンドソーム膜上で利用している可能性が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for virion release of hepatitis E virus. 15th International Congress of Virology (第59回日本ウイルス学会学術集会), Sapporo, 2011.

論文発表

1. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. Arch Virol. 157:235-246, 2012.
2. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for release of hepatitis E virions. J Gen Virol. 92:2838-2848, 2011.
3. Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. Arch Virol. 156:1345-1358, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
「経口感染する肝炎ウイルス（A 型、E 型）の感染防止、遺伝的多様性、
および治療に関する研究」

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 原著論文（研究代表者、研究分担者を二重下線および研究協力者を一重下線で示す）
 - 1) Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J Gen Virol* 92(Pt 4):902-908, 2011
 - 2) Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. *J Gen Virol* 92(Pt 12):2838-2848, 2011
 - 3) Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol* 156(8): 1345-1358, 2011
 - 4) Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol* 157(2): 235-246, 2012
 - 5) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Maile TQ, 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. *J Gen Virol* 92(Pt 12):2830-2837, 2011
 - 6) Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li T, Takeda N, Ogasawara K, Torii R. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J Vet Med Sci*. 2011 Oct 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21997233.
 - 7) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Wakita T, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *J Clin Virol* 53(3):219-224, 2012
 - 8) Miyamura T, Ishii K, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatol Res* 42(3):248-253, 2012
 - 9) Yoshida T, Miyasaka T, Azegami Y, Uchiyama Y, Kasahara H, Ueda H, Nagase H, Fujita S, Ishii K, Noda M. Epidemiological investigation and analysis of hepatitis A virus genomes in

the three cases of hepatitis A infections that occurred in April-May 2010. *Jpn J Infect Dis* 64(3):260-261, 2011

- 10) Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, Okano H, Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, Arai M, Okamoto H, Mishiro S. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver Int* 32(4): 675-688, 2012
- 11) Nakayama N, Oketani M, Kawamura Y, Inao M, Nagoshi S, Fujiwara K, Tsubouchi H, Mochida S. Novel classification of acute liver failure through clustering using a self-organizing map: usefulness for prediction of the outcome. *J Gastroenterol* 46(9):1127-1135, 2011
- 12) 田辺利男, 水尾仁志, 矢崎康幸, 高橋雅春, 岡本宏明. 北海道東部の釧路市および根室市におけるE型肝炎ウイルス感染の疫学調査 感染の地域差と食文化の相違について. *肝臓* 52(9): 567-574, 2011
- 13) 岡野宏, 中野達徳, 松崎晋平, 佐瀬友博, 齋藤知規, 向克巳, 西村晃, 伊藤圭一, 白木克哉, 竹井謙之, 岡本宏明. 三重県内で発生した稀な 3 型(ヨーロッパ型)E型肝炎ウイルスによる散発性急性肝炎の 4 症例. *肝臓* 52(5): 295-302, 2011
- 14) 高橋和明, 須藤恒久, 新井雅裕, 三代俊治. 1957 年“尾去沢肝炎”凍結保存 53 年目の血清から発掘したA型肝炎ウイルス准完全長ゲノム塩基配列. *肝臓* 52(6): 376-379, 2011
- 15) 北嶋直人, 瀬尾靖, 矢野嘉彦, 林祥剛, 安倍夏生, 新井雅裕, 高橋和明, 三代俊治. 平成 22 年度 地域医療における疾病並びに医療等に関する研究調査 兵庫県におけるHEV感染実態調査(最終報告). *神緑会学術誌* 27: 18-21, 2011
- 16) 加藤秀章, 高橋和明, 中村誠, 池内寛和, 平野敦之, 安倍夏生, 新井雅裕, 三代俊治. 野生イノシシ喫食会への参加後に発症した愛知静岡株によるE型急性肝炎の 2 例. *肝臓* 52(8): 524-527, 2011
- 17) 道免和文, 小野原伸也, 田中博文, 春野政虎, 下田慎治, 姜貞憲, 石井孝司, 高橋和明. 2010 年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討 1999 年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性. *肝臓* 52(8): 497-502, 2011
- 18) 小関 至, 姜貞憲, 水尾仁志, 赤池 淳, 大村卓味, 狩野吉康, 松居剛志, 佐賀啓良, 渡辺正夫, 三浦洋輔, 倉 敏郎, 常松 泉, 松林圭二, 坂田秀勝, 岡本宏明, 高橋和明, 新井雅裕. 2009 年秋に札幌圏で発生した E 型肝炎小流行の臨床的・ウイルス学的・分子疫学的解析. *肝臓* 53(2): 78-89, 2012

2. 総説 (研究代表者、分担研究者および研究協力者を下線で示す)

- 1) Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* 161(1):65-77, 2011
- 2) Meng XJ, Anderson DA, Arankalle VA, Emerson SU, Harrison TJ, Jameel S, Okamoto H. *Hepeviridae*. In: Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, editors, *Virus Taxonomy*. Oxford: Elsevier, 2011, pp. 1021-1028.
- 3) 岡本宏明. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 E 型肝炎 E 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴. *日本臨床* 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学. p579-587, 2011

- 4) 八橋弘, 玉田陽子. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 A型肝炎 我が国におけるA型肝炎の疫学と最近の動向. 日本臨床 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学 p553-558, 2011
- 5) 新井雅裕. 【ウイルス肝炎 最新の動向と最新の実地診療】 セミナー/最新の疫学・検査、および研究・知見の実地診療への生かしかた ウイルス肝炎の動向 経口ウイルス肝炎感染症の最新動向と最新の診療. Medical Practice 28(8): 1355-1358, 2011
- 6) 石井孝司, 清原知子. A型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況. 小児科 52(12) : 1819-1825, 2011
- 7) 石井孝司. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 A型肝炎 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴. 日本臨床 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学. p559-565, 2011
- 8) 石井孝司, 李天成. E型肝炎. 公衆衛生. 75: 43-46, 2011
- 9) 姜貞憲. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 E型肝炎 E型肝炎の診断と治療. 日本臨床 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学 p588-592, 2011
- 10) 李天成. 【新時代のウイルス性肝炎学 基礎・臨床研究の進歩】 E型肝炎 我が国における E型肝炎の疫学と最近の動向. 日本臨床 69(増刊 4) 新時代のウイルス性肝炎学 p573-578, 2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Short
Communication

Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype

Masaharu Takahashi,^{1†} Tsutomu Nishizawa,^{1†} Hiroyuki Sato,^{2‡}
Yukihiro Sato,³ Jirintai,¹ Shigeo Nagashima¹ and Hiroaki Okamoto¹Correspondence
Hiroaki Okamoto
hokamoto@jichi.ac.jp¹Division of Virology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University School of Medicine, Shimotsuke-Shi, Tochigi-Ken 329-0498, Japan²Department of Internal Medicine, Maniwa Kokuho Yubara Onsen Hospital, Maniwa-Shi, Okayama-Ken 717-0403, Japan³Department of Internal Medicine, Kamiichi General Hospital, Nakaniikawa-Gun, Toyama-Ken 930-0391, Japan

While performing a nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection among 450 wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) that had been captured in Japan between November 2005 and March 2010, we found 16 boars (3.6%) with ongoing HEV infection: 11 had genotype 3 HEV, four had genotype 4 HEV and the remaining boar was infected with HEV of an unrecognized genotype (designated wbJOY_06). The entire wbJOY_06 genome was sequenced and was found to comprise 7246 nt excluding the poly(A) tail. The wbJOY_06 isolate was highly divergent from known genotype 1–4 HEV isolates derived from humans, swine, wild boars, deer, mongoose and rabbits ($n=145$) by 22.6–27.7%, rat HEV isolates ($n=2$) by 46.0–46.2%, and avian HEV isolates ($n=5$) by 52.5–53.1% over the entire genome. A Simplot analysis revealed no significant recombination between the existing HEV strains of genotypes 1–4. Therefore, we propose that the wbJOY_06 isolate is the first member of a previously unidentified genotype.

Received 5 December 2010
Accepted 7 January 2011

The hepatitis E virus (HEV) was first identified as a leading cause of acute and fulminant hepatitis linked to faecal–oral transmission in tropical and subtropical countries. However, hepatitis E has been found to be endemic in industrialized countries, including Japan, the USA and European countries, where autochthonous HEV infections are an emerging concern (Dalton *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2003; Purcell & Emerson, 2008). It has recently been reported that zoonotic food-borne transmission of HEV from domestic pigs, wild boars and wild deer to humans plays an important role in the occurrence of cryptic hepatitis E in industrialized countries, including Japan and France, where people have distinctive habits of eating uncooked or undercooked meat (including the liver and colon/intestine of animals) (Colson *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2004; Tei *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2003).

HEV is a non-enveloped virus and its genome is a positive-sense ssRNA, which is capped and polyadenylated (Kabrane-Lazizi *et al.*, 1999; Tam *et al.*, 1991). It is classified as the sole member of the genus *Hepevirus* in the family *Hepeviridae* (Emerson *et al.*, 2005). The genome is approximately 7.2 kb in size and contains three ORFs that encode non-structural proteins involved in replication (ORF1), a capsid protein consisting of 660 aa (ORF2), and a small protein of only 113–114 aa (ORF3) that is essential for viral infectivity in animals (Graff *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007) and virion egress (Emerson *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2009a). Four genotypes of HEV that infect humans have been identified (Emerson *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Okamoto, 2007). HEV genotypes 1 and 2 are restricted to humans and associated with outbreaks of hepatitis E as water-borne epidemics in developing countries, whereas HEV genotypes 3 and 4 are zoonotic and responsible for sporadic cases of hepatitis E worldwide.

Recently, significant progress has been made in understanding the animal reservoirs of HEV (Meng, 2010; Pavio *et al.*, 2010). The discoveries of animal strains of HEV from domestic pigs (Meng *et al.*, 1997), wild boars (Sonoda *et al.*, 2004), deer (Tei *et al.*, 2003), mongoose (Nakamura *et al.*, 2006), chickens (Haqshenas *et al.*, 2001; Payne *et al.*, 1999), rabbits (Zhao *et al.*, 2009) and rats (Johne *et al.*, 2010) have

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University School of Medicine, Shimotsuke-Shi, Tochigi-Ken 329-0498, Japan.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the wbJOY_06 isolate reported in this paper is AB602441.

Supplementary material is available with the online version of this paper.

significantly broadened the host range and genomic diversity of HEV. Regarding HEV from wild boars, HEV RNA and antibodies have been detected in several countries, including Australia, Germany, Hungary, Italy, Japan, the Netherlands and Spain, with a seroprevalence rate of 9–43 % and the HEV RNA detection rate of 2–25 % (Chandler *et al.*, 1999; de Deus *et al.*, 2008; Kaci *et al.*, 2008; Martelli *et al.*, 2008; Michitaka *et al.*, 2007; Nishizawa *et al.*, 2005; Rutjes *et al.*, 2010; Sonoda *et al.*, 2004). However, the genomic characteristics of boar HEV isolates are not fully understood. While performing a nationwide survey of HEV infection among 450 wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) that had been captured in Japan between November 2005 and March 2010, we found 16 boars (3.6 %) with ongoing HEV infection: 11 had genotype 3 HEV, four had genotype 4 HEV and the remaining boar was infected with HEV (designated wbJOY_06) that differed from reported HEV isolates by 18.0–24.3 % within a 412 nt sequence of the ORF2 region, suggesting that wbJOY_06 is classifiable into an unrecognized genotype. Therefore, the present study was conducted to determine the full-length genomic sequence of the wbJOY_06 isolate and to clarify the genomic characteristics of the novel boar HEV isolate.

The wbJOY_06 isolate was recovered from liver tissues of a 20 kg male wild boar that had been caught in the forest of Maniwa city, Okayama Prefecture located in the western part of Honshu Island on 12 January 2006. To determine the full-length sequence of the wbJOY_06 genome, total RNA was extracted from boar liver specimens (500 mg) using the Trizol reagent (Invitrogen), and the RNA preparation thus obtained was reverse transcribed and subjected to nested PCR. The central 7 kb sequence of the wbJOY_06 genome was divided into 12 overlapping sections and amplified: they were nt 37–448 (412 nt) (primer sequences excluded), nt 386–1096 (711 nt), nt 1078–1270 (193 nt), nt 1247–2002 (756 nt), nt 1925–3232 (1308 nt), nt 3208–3912 (705 nt), nt 3895–4520 (626 nt), nt 4468–4624 (157 nt), nt 4613–5364 (752 nt), nt 5349–6013 (665 nt), nt 5991–6402 (412 nt) and nt 6388–7155 (768 nt). The extreme 5'-end sequence (nt 1–60) was determined by a modified rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique called RNA ligase-mediated RACE (RLM-RACE) with the First Choice RLM-RACE kit (Ambion), as described previously (Okamoto *et al.*, 2001). Amplification of the extreme 3'-end sequence [nt 7123–7246 excluding the poly(A) tail] was accomplished using the RACE method, according to a method described previously (Okamoto *et al.*, 2001). The amplification products were sequenced on both strands either directly or after cloning into pT7BlueT-Vector (Novagen), and sequence analysis was performed as described previously (Okamoto *et al.*, 2001).

The wbJOY_06 isolate had a genomic length of 7246 nt, excluding the poly(A) tract at the 3' terminus, and possessed three major ORFs, similar to reported mammalian and avian HEV isolates (Emerson *et al.*, 2005): ORF1, ORF2 and ORF3 code for 1709 aa (nt 26–5152), 660 aa (nt 5194–7173) and 112 aa (nt 5186–5521), respectively. The 5' and 3' untranslated regions of wbJOY_06

comprised 25 and 73 nt [excluding the poly(A) tail], respectively. Upon comparison with the 145 reported HEV genomes of genotypes 1–4 whose entire or nearly entire nucleotide sequences are already known, the wbJOY_06 genome shared nucleotide sequence identities of only 73.2–74.3 % with human genotype 1 HEV ($n=20$), 72.9 % with human genotype 2 HEV ($n=1$), 72.3–74.8 % with genotype 3 HEV of human, swine, wild boar, deer, mongoose and rabbit origin ($n=66$), and 76.3–77.4 % with genotype 4 HEV of human, swine and wild boar origin ($n=58$). Although rabbit HEV sequences were reported to belong to a novel genotype (Zhao *et al.*, 2009), they segregated into genotype 3 in the present phylogenetic analyses (see Figs 1 and 2), corroborating a recent review article by Pavio *et al.* (2010). In addition, wbJOY_06 was only 53.8–54.0 % identical to rat HEV ($n=2$) and 46.9–47.5 % similar to avian HEV ($n=5$) over the entire genome (Supplementary Table S1, available in JGV Online). These results indicate that the wbJOY_06 isolate is distantly related to the known HEV isolates of genotypes 1–4, including eight boar isolates of genotypes 3 and 4, and is clearly distinct from the previously reported rat and avian HEV isolates. The phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987), with the Kimura two-parameter correction model using online tools in the DDBJ database (National Institute of Genetics, Mishima, Japan), based on the overlapping (nearly) entire genomic sequence of the 146 HEV isolates [reported isolates (nos. 001–145: see Supplementary Table S2, available in JGV Online) and wbJOY_06], and bootstrap values were determined on 1000 resamplings of the datasets (Felsenstein, 1985). The tree confirmed that wbJOY_06 does not belong to the four known genotypes, most probably being classifiable into an unrecognized genotype (Fig. 1).

In an attempt to improve the phylogenetic analysis, a maximum-likelihood phylogenetic tree including the 146 full or near-full HEV genomes [reported 145 isolates (Supplementary Table S2) and wbJOY_06] was constructed with the PHYML method version 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) implemented via the web server PALM (<http://palm.iis.sinica.edu.tw>) (Chen *et al.*, 2009) using the GTR+I+G substitution model selected by MODELTEST version 3.7 (Posada & Crandall, 1998) under the Akaike information criterion (AIC). The phylogenetic tree was visualized by FigTree program version 1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The tree further confirmed that wbJOY_06 is distantly related to all known HEV isolates of genotypes 1–4 (Fig. 2).

To investigate possible recombination in the wbJOY_06 genome, a window scanning analysis of aligned HEV genomes was performed using the Simplot software program (version 3.5.1) (Lole *et al.*, 1999). The wbJOY_06 isolate was slightly closer to genotype 4 than the remaining three genotypes, but no significant evidence of recombination between genotype 4 and the other three genotypes was revealed by this method (Supplementary Fig. S1).

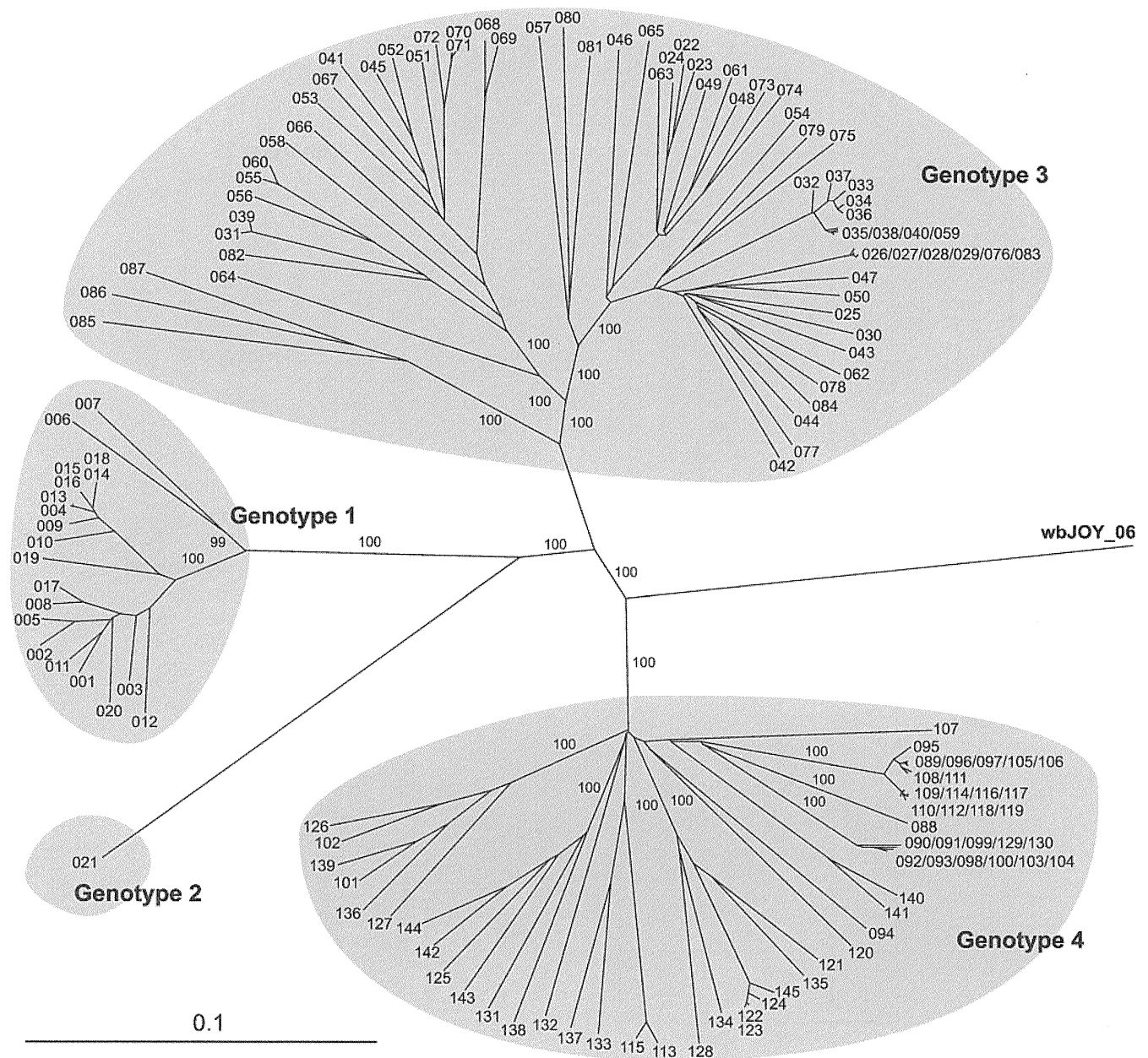


Fig. 1. An unrooted phylogenetic tree constructed by the neighbour-joining method based on the entire or near-entire nucleotide sequence of 145 HEV isolates of genotypes 1–4 retrievable from the DDBJ/GenBank/EMBL database as of November 2010 (see Supplementary Table S2) as well as the wbJOY_06 isolate obtained in the present study. Since the length of the sequence that has been identified for different isolates varies, the overlapping 71 27 nt sequence of 145 reported human, swine, boar, deer, mongoose and rabbit HEV isolates and the wbJOY_06 isolate, which is indicated in boldface type for visual clarity, are compared. Bootstrap values are indicated for the major nodes as a percentage of the data obtained from 1000 resamplings.

Similar to the genomes of genotype 4 (Takahashi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000), the wbJOY_06 genome possessed a nucleotide insertion of U between the second and third AUG codons in ORF2, which may change the downstream reading frames in both ORF2 and ORF3 (Fig. 3). ORF2 and ORF3 proteins of genotype 1 HEV have been shown to be

encoded by a single bicistronic subgenomic RNA of 2.2 kb in size (Graff *et al.*, 2006), and that initiation of translation at the third in-frame AUG codon of ORF3 in the genotype 1 genome is essential for viral infectivity *in vivo* (Graff *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). The exact initiation site of the subgenomic RNA has also been determined for genotype 3

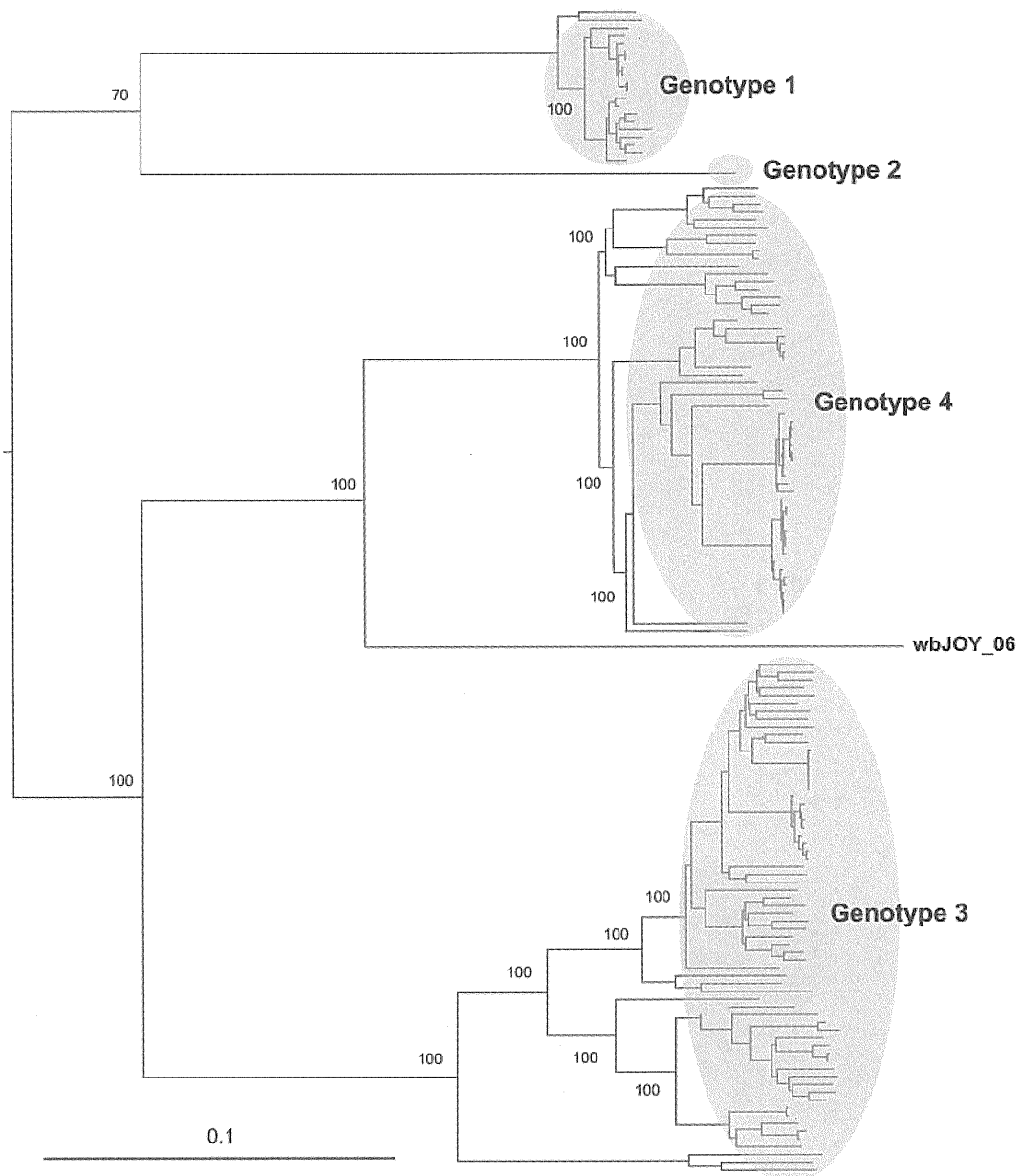


Fig. 2. Maximum-likelihood phylogenetic relationships of the overlapping 7127 nt sequence of 145 reported human, swine, boar, deer, mongoose and rabbit HEV isolates (see Supplementary Table S2) and the wbJOY_06 isolate. The tree was constructed using PHYL (model GTR+I+G), with optimized tree topology and branch lengths, and the numbers associated with tree branches are indicative of the percentage of 10 full maximum-likelihood bootstrap replicates that support the existence of the branches. The wbJOY_06 isolate is indicated in boldface type for visual clarity.

HEV (JE03-1760F) and genotype 4 HEV (HE-JF5/15F) in cultured cells, and found to be located exclusively at nt 5122, with a common 5'-GC sequence, which is identical to that of the prototype genotype 1 HEV (Sar-55) (Ichiyama *et al.*, 2009). These results suggest that, despite the presence of an insertion in the genomes of genotype 4, all four genotypes of HEV possess a subgenomic RNA encoding ORF2 and ORF3 proteins with the same N-terminal position. To confirm this notion, the 5'-terminal sequence

of the subgenomic RNA of the wbJOY_06 isolate was determined by 5' RLM-RACE utilizing a procedure specific for capped RNA in accordance with a method described previously (Ichiyama *et al.*, 2009). A sequence analysis of a single product of the expected size (nt 5171–5206: primer sequences at both ends excluded) corresponding to the 2.2 kb subgenomic RNA, revealed that the wbJOY_06 isolate harboured subgenomic RNA with the 5'-terminal GC sequence starting at nt 5171 (corresponding to nt

5122 in the Sar-55 genome) (Fig. 3). Therefore, it is beyond doubt that all mammalian HEV strains, including the wbJOY_06 strain identified in the present study possess a subgenomic RNA starting at the same nucleotide position with the common sequence of 5'-GC. This is further supported by the evidence that a *cis*-reactive element with the sequence UGAAUAACAUGU (nt 5153–5164), which is located just upstream of nt 5171, is highly conserved among the all known genotype 1–4 genomes as well as in the wbJOY_06 genome, and has been reported to be critical for synthesis of the 2.2 kb subgenomic RNA (Graff *et al.*, 2005, 2006). Of interest, the wbJOY_06 genome had a A-to-G mutation at nt 5180, with conversion from the methionine codon (AUG) to GUG, and was presumed to encode a shortened ORF3 protein of 112 aa (Fig. 3).

Recently, Takahashi *et al.* (2010) reported a partial 326 nt ORF1 sequence of an HEV isolate designated JBOAR135-Shiz09 (GenBank accession no. AB573435) that had been recovered from a wild boar captured in 2009 in Shizuoka Prefecture located in the central part of Honshu Island, Japan. The JBOAR135-Shiz09 isolate shared only 71.2–78.2% nucleotide sequence identities with reported HEV

sequences of genotypes 1–4, and was proposed to segregate to genotype 5. Of note, the JBOAR135-Shiz09 isolate was only 79.4% identical to our wbJOY_06 isolate within the reported 326 nt ORF1 sequence. The phylogenetic tree constructed based on the 326 nt sequence indicated that wbJOY_06 and JBOAR135-Shiz09 were distantly related to each other, similar to the relationship between genotypes 1 and 2, thus suggesting that they may be classifiable into two distinct, unidentified genotypes, although the final decision on genotype classification should be made by the International Committee on Virus Taxonomy based on the comparative analysis of the entire genomic sequences.

In conclusion, we identified an HEV isolate (wbJOY_06) that was recovered from a wild boar in Japan which was found to be highly divergent from the known genotype 1–4 HEV isolates by 22.6–27.7% over the entire genome. A Simplot analysis revealed no significant recombination between the existing HEV strains of genotypes 1–4. We therefore propose the wbJOY_06 isolate as the first member of a previously unidentified genotype. It remains to be determined if the wbJOY_06-like HEV can cross the species barrier and infect humans or other animal species. Additional studies are warranted to elucidate the host

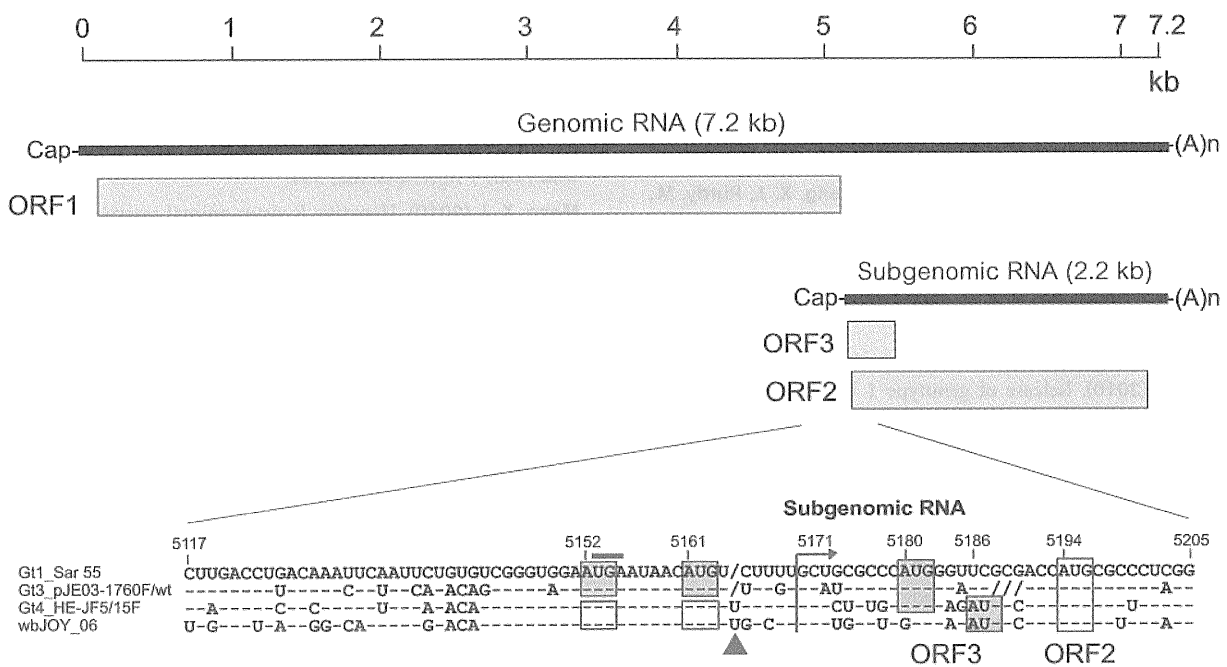


Fig. 3. Comparison of the HEV sequences containing potential initiation codons for ORF2 and ORF3. A prototype genotype 1 HEV isolate (Sar-55) and two HEV isolates of genotype 3 [wild-type infectious cDNA clone (pJE03-1760F/wt)] (Yamada *et al.*, 2009b) and genotype 4 (HE-JF5/15F) (Tanaka *et al.*, 2009) which were transfected or inoculated into PLC/PRF/5 cells were compared. The reported initiation site of the subgenomic RNA of Sar-55, pJE03-1760F/wt and HE-JF5/15F (Graff *et al.*, 2006; Ichiyama *et al.*, 2009) and that of wbJOY_06 determined in the present study are illustrated by a vertical bar with an arrow. Potential initiation codons of ORF3 are indicated by shaded boxes, and those of ORF2 are shown by open boxes. The inserted U residue that is found in the genotype 4 isolate (HE-JF5/15F) and the wbJOY_06 isolate is marked with a closed triangle. The termination codon (UGA) of ORF1 is overlined. Dashes indicate nucleotides that are identical to the top sequence and forward slashes denote deletion of nucleotides. Nucleotide positions are in accordance with the wbJOY_06 genome.