

ーサイトメトリーを用いて、HBs の Huh7、HepG2、HEK293T への吸着を定量化する方法を構築した。

(3) 受容体候補の選出：総数 8902 種類のタンパク質 (gi) を同定した。レクチン様タンパク質のジーンシンボルを比較した結果、gi 数で 181 種、symbol 数で 91 種のレクチン様分子を検出した。更に、糖への結合活性が認められている内在性レクチンを 4 種類に絞り込んだ。

(4) 受容体候補発現及び抑制細胞調製：受容体候補の 1 種である ASGR1 を CHO 細胞に発現させた ASGR1-CHO を調製した。

#### D. 考察

肝細胞株に発現している内在性レクチンの絞り込みがほぼ完了した。今後、これら内在性レクチンが HBV と相互作用するかどうかや、HBV 感染との相関について調べ、これら内在性レクチンが HBV の受容体として機能しているかどうかについて確認する。

#### E. 結論

フローサイトメトリーを用いて、HBs の細胞株への吸着を定量化する方法を構築した。HBV 糖鎖を認識する受容体候補の絞り込みに成功した。受容体候補の 1 種を CHO 細胞に発現させた細胞株を調製した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat.* 2013 Apr;20(4):e27-36

(2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.* 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### 4. 糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 4-1. 糖鎖合成阻害剤のHBVの増殖・感染能への影響

研究分担者：米田 政志 愛知医科大学 消化器内科  
研究分担者：伊藤 清顕 愛知医科大学 消化器内科

##### 研究要旨：

本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を解明し、他研究課題と連携しB型肝炎の新規治療薬の開発を目指す。B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが治療効果が不十分で根治することが出来ない。一方、創薬のターゲットとしてHBVの感染や複製の過程が研究され、糖鎖の関与が示唆されている。しかし、糖鎖の機能解析をより生体内に近い条件で研究する事は難しく、新しい糖鎖解析技術を用いて網羅的に解析する事が必須である。本研究では、肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家とグライコプロテオミクス技術など最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た糖鎖生物学者との協力体制(補完的医工連携体制)により、HBV感染における糖鎖の機能を理解し、HBVに対する創薬実用化を図る。1) HBV(HBs抗原)の糖鎖解析：多数の検体から種々のGenotypeのHBV(HBs抗原)を調製し、自ら開発したレクチンアレイ技術を応用し、糖鎖解析を行う。2) HBV感染可能細胞の糖鎖解析：産総研独自のグライコプロテオミクス技術を用いHBV感染可能細胞と非感染可能細胞の糖鎖プロファイリングを行う。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBVの感染機構を明らかにするために、新たにHBs抗原アレイを作製し、肝細胞結合に関わる分子を探索する。4) 糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響：HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を阻害し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにし、創薬開発のためのターゲットとする糖鎖を明らかにする。5) 糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製：ヒト型糖鎖を発現する酵母を用い、HBs抗原の大量精製を行う。現在ワクチン用に使われている通常の酵母由来のHBs抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。1~3年次は、糖鎖構造解析とグライコプロテオミクス技術により、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、医用応用のための基盤研究を行う。4~5年次は解析した肝細胞側の糖鎖および糖鎖合成系の役割をもとに、他研究グループと連携し、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発やワクチンの実用化へ繋げる。

##### A. 研究目的

HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬のターゲットとする。

我々はこれまでにHBVのエンベロープ蛋白

上の146番目のアスパラギンへのN結合型糖鎖がHBVの細胞外への放出に必須であることを報告してきた(Ito K et al. J Virol. 2010)。

この146番目のアスパラギンを異なるアミノ酸に変異させるとHBV粒子が細胞外に全く分泌されなくなるため、蛋白自体のfolding不良による粒子形成不全もしくは小胞体からゴルジ

装置への細胞内輸送不全により HBV の分泌が阻害されるものと考えている。これに対して、本研究の第一段階のステップとして、各種糖鎖プロセッシング阻害剤を用いることにより、どの過程の糖転移酵素が分泌に重要か、また分泌がどの程度ブロックされるかに関して実験を行った。次のステップとしては各種 siRNA を用いて、細胞内の多数の糖転移酵素の機能を阻害することにより、HBV の複製から分泌にかけて重要なファクターを模索し、新たな阻害剤開発に向けた情報を得る。

## B. 研究方法

In vitro 実験系で HBV の分泌過程を観察した。Huh7 cell および HepG2 cell の cell line を用い、genotype A を base とし 1.5mer HBV expression construct を transfection し、翌日に各種糖プロセッシング阻害剤を添加し 5 日目に harvest した。Harvest した培養上清は IP-southern blotting、real-time PCR、Western blotting により評価を行い、細胞内の HBV の replication に関しては Southern blotting および Western blotting により評価を行った。

## C. 研究結果

糖プロセッシング阻害剤として、まずは Mannosidase II を阻害する Swainsonine、Mannosidase I を阻害する Kifunensine、Glucosidase I を阻害する Castanospermine を用いて細胞障害性に関して解析を行った。その結果、高濃度の Castanospermine では細胞障害を惹起した。また、高濃度の Kifunensine では軽度の細胞障害を惹起、高濃度の Swainsonine では細胞障害をほとんど認めなかった。Swainsonine を用いて培養上清中の HBV DNA を real-time PCR で定量し HBV 分泌阻害作用を解析した結果、高濃度の Swainsonine で軽度の HBV 分泌阻害作用を認めた。

## D. 考察および結論

糖プロセッシング阻害剤の細胞に対する影響を観察すると、Swainsonine のようなゴルジ装置内でもより末梢に近い部位に作用する阻害剤では細胞障害性は低かった。一方で、Castanospermine のような小胞体内で作用するような阻害剤では、細胞障害性は高度であった。Swainsonine による HBV 分泌阻害作用を認めたが、今後は繰り返し実験を行うことで分泌阻害の程度を確認する必要がある。また、他の糖プロセッシング阻害剤による影響も今後観察していく予定である。さらには、糖転移酵素に関連する siRNA を用いて HBV の複製、分泌を観察することにより、新たな創薬ターゲットの候補となる分子を探索する。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013;3:1065
- (2) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 2012 Oct;56(4):1448-56

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### 4. 糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響 4-2. 糖鎖改変肝細胞におけるHBVの形成・分泌への影響

研究分担者：安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター  
研究分担者：梶谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター  
研究協力者：澤木 弘道 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター

##### 研究要旨：

B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが、根治することが難しく新規創薬が望まれている。本研究の目的は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染や複製における糖鎖の役割を明らかにし、B型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事である。そこで本研究では、肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家と糖鎖遺伝子ライブラリーを保持し糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た糖鎖生物学者との協力体制により、糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探求する。まず、HBV作製細胞と肝細胞の糖鎖遺伝子発現を解析し、糖鎖改変細胞を作製するためのcDNAプレートやsiRNAプレートを作製する。そして、HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を改変し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにする。1年次にはHBV創薬開発のターゲットとする糖鎖を明らかにするために、糖鎖遺伝子解析とcDNAおよびsiRNAライブラリーの調製を行った。

##### A. 研究目的

日本には約150万人のB型肝炎ウイルス(HBV)保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。HBVキャリアの1割程度が慢性肝炎や肝硬変さらにその内の数%の方が肝細胞癌を発症するとされ、長期にわたる治療と経過観測が必要となっている。しかしながら、持続感染を防ぐための核酸アナログ薬の継続投与は薬剤耐性ウイルスの出現が問題になっている。また、B型肝炎においてはインターフェロンによる治療成績が悪い場合が多く、特にgenotype間での治療効果に差があるなど、C型肝炎に比べ、有効な治療法が限られているという問題点がある。従って、逆転写酵素に代わる創薬ターゲットの発見が必要で、そのためにはHBVの感染/複製機構のより詳細な理解が必須である。

本研究では、糖鎖がHBVの粒子形成や分泌に重要であるという報告を基に、抗HBV薬剤のシーズを探索する。HBV作製細胞の糖鎖合成系を阻害する事により、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬の標的とする。

##### B. 研究方法

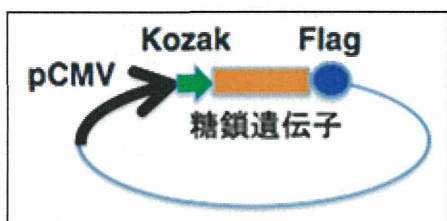
本研究では、HBV感染における糖鎖の機能を解析し、HBVに対する創薬ターゲット分子を探索するために、糖鎖改変細胞の作製を進めた。

(1) HBVを作製するHuH7細胞やHepG2細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、qRT-PCR(糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム)を行った。

(2) この解析より糖鎖遺伝子とその発現パタ

ーンで 2 群（抑制目的と過剰発現目的）に分け、それぞれ cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーの作成を進めた。

cDNA ライブラリーは産総研で集積された糖鎖遺伝子ライブラリーを基に PCR で増幅し、新規に作成した発現ベクターにクローニングし構築した。各クローンは塩基配列を決定し選別した後に、プラスミド DNA をエンドトキシンフリーで調製した。



cDNA ライブラリー用発現ベクター：発現レベルを高くするための Kozak 配列を開始コドン前に、発現量を確認するために C'末にタグを配した。

(3) タグを付加する事によって、形質転換後に共通のタグを用いて各糖鎖遺伝子の発現量を比較出来る様にした。HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い糖転移酵素の発現を確認した。

(4) 遺伝子発現の定量は遺伝子特異的なプライマーを作製し、qRT-PCR によって測定した。HuH7 細胞を siRNA で形質転換後に RNA を調製し、qRT-PCR によって確認した。

(5) より高い形質転換効率を得るために、GFPcDNA を用いて、HuH7 細胞の形質転換効率を試験した。

### C. 研究結果

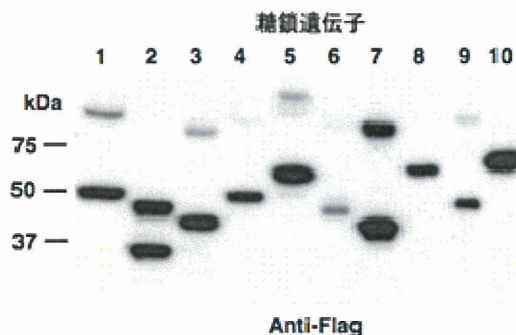
(1) qRT-PCR（糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム）による糖鎖遺伝子発現解析の結果、約 190 種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。肝細胞の糖鎖遺伝子発現とも比較し、糖鎖遺伝子群を高発現と低発現（発現無し）の 2 群に分けた。

表 肝細胞の糖鎖遺伝子発現

発現量 (HuH7 細胞:肝)	遺伝子数
HuH7 細胞-低:肝-低	58
HuH7 細胞-低:肝-高	44
HuH7 細胞-高:肝-低	36
HuH7 細胞-高:肝-高	48

(2) 上述の糖鎖遺伝子 qRT-PCR アレイの結果を基に、糖鎖遺伝子とその発現レベルで 2 群（過剰発現目的（表の上 2 段）と抑制目的（表の下 2 段））に分け、それぞれ cDNA ライブラリー（約 100 遺伝子）と siRNA ライブラリー（約 80 遺伝子 x3 本）の作成を進め、糖鎖改変細胞群の準備を行った。

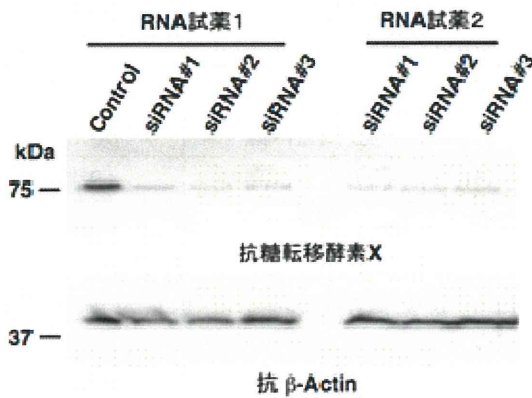
(3) cDNA ライブラリーは形質転換後に細胞を回収し、SDS-PAGE で分離後にウエスタンブロッティングを行い、クローニングされた糖鎖遺伝子が HuH7 細胞で発現することを確認した。



cDNA ライブラリーによる糖転移酵素の発現量の確認例

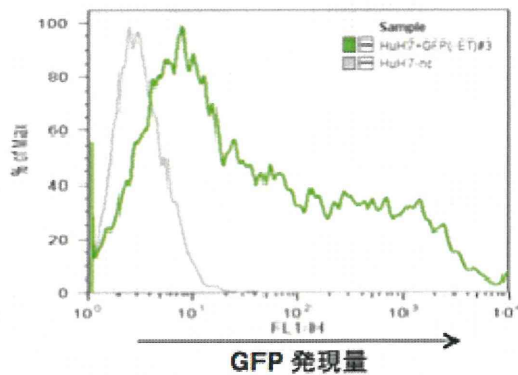
HuH7 細胞を 12 ウエルプレートに播種し、10 個の糖鎖遺伝子 cDNA で形質転換した。各ウエルの細胞抽出液を抗 Flag 抗体で検出した。

(4) siRNA ライブラリーによる糖鎖遺伝子のノックダウンは一部の糖鎖遺伝子については qRT-PCR によって確認した。1 遺伝子につき 3 種類の siRNA を用意しており、調べた限り 70-90% 発現量を低下させることに成功している。



siRNAによるノックダウン実験例  
糖転移酵素を発現している細胞にコントロール siRNA と遺伝子特異的な 3 種の siRNA を 2 種の試薬で形質転換し、発現量の変化を比較した。下段は対照のアクチンの発現量。

(5) cDNA の形質転換の際になるべく多くの細胞に cDNA を発現させる必要がある。HuH7 細胞と GFPcDNA を用いて、幾つかの形質転換法を試した結果リバーストランスフェクションによる HuH7 細胞の形質転換効率が最も高かった。



GFPcDNA による HuH7 細胞の形質転換の例  
GFPcDNA を HuH7 細胞にリバーストランスフェクションによって導入し、48 時間後に回収し、GFP の発現している細胞を FACS 解析した。70-80%の細胞が形質転換しており、30-40%の細胞で強発現していることが確認された。

#### D. 考察

本研究は HBV の感染における糖鎖の役割を

明らかにすることを目的の一つとしている。二つの可能性が考えられ、第一に肝細胞表面の糖鎖及び糖鎖関連分子、第二に HBV 上の糖鎖が HBV の感染に関与している可能性が考えられる。宿主肝細胞側の糖鎖合成系はそのまま HBV の糖鎖修飾を担うので、どちらの場合においても宿主肝細胞の糖鎖合成を阻害すると両方のシステムが影響を受けることになる。

HBV には持続感染系が確立されていないので、HBV 粒子の形成や分泌の研究には、HuH7 細胞や HepG2 細胞の形質転換が用いられる。このシステムを用い、感染能の有る HBV の分泌には HBs 抗原上の N 型糖鎖の付加が必要である事が明らかになっている。すなわち、ツニカマイシンやノジリマイシンなどの N 型糖鎖の合成阻害では、HBV ゲノムがパックされていないウイルス様粒子が放出されるものの、感染能を有する HBV 粒子は分泌されないことが報告されている。しかし、これらの阻害剤は全ての肝細胞に影響を及ぼすと考えられ、濃度の決定や感染細胞だけを選択的に処置するなどの難しい課題が残る。

従って、HBV の創薬ターゲットを選定するためには、どの糖鎖遺伝子や糖鎖合成に関わるタンパク質が関与しているのかを解明する必要がある。本研究と並行して愛知医科大(米田と伊藤ら)において、HBV 分泌のアッセイ系を確立した。10 種以上の糖鎖合成阻害剤存在下で HBV を作製し HBV 分泌を評価しており、抗 HBV 創薬の標的分子を選定するための基礎情報を取得した。今回調製した糖鎖遺伝子の cDNA ライブラリーや siRNA ライブラリーは 200 種以上有る糖鎖遺伝子の 90%以上をカバーしており、今後、糖鎖改変細胞を用い、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼすかを網羅的に検討する予定である。特に HBs 抗原上の糖鎖合成が重要なのか、宿主肝細胞内での糖鎖合成系の維持が重要なのかを明らかにする必要がある。

以上の様に、糖鎖改変細胞による糖鎖合成阻害の HBV 粒子形成・分泌への影響は、糖鎖の機能解析と共に、創薬ターゲットの選定に重要

である。

#### E. 結論

HBV 感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されておらず、HBV あるいは宿主肝細胞の糖鎖及び糖鎖関連分子をターゲットとした創薬の可能性を研究している。

その研究方法として、糖鎖改変細胞群を作製することとし、過剰発現用に約 100 種の cDNA、抑制用に約 80x3 種の siRNA ライブラリーを用意し、糖鎖改変細胞作製の準備を進めた。cDNA の発現、siRNA によるノックダウンも調べた限りでは、期待通りの結果が得られている。形質転換の改良も成功しており、早期の HBV 粒子形成・分泌アッセイを行う予定である。

以上のように、HBV の感染過程（粒子形成・分泌）における糖鎖合成の重要性と糖鎖機能解析を中心に医用応用のための基盤研究を行い、さらに B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発へ展開していきたい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 5. 糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製 B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ

研究分担者：千葉靖典 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

### 研究要旨：

現在我が国で使用されている主な HBV ワクチンは、酵母由来であり、糖鎖が考慮されていない。ほとんどの国や地域で HBV に対するユニバーサルワクチネーションが行われているにも拘らず、我が国ではユニバーサルワクチネーションが行われていないことや、ワクチンに対する抗体を保有する接種者でも B型肝炎に罹患する例などが報告されるなど、新規 HBV ワクチンの必要性が考えられる。そこで、ヒト型糖鎖を有する HBV ワクチンの開発を目指す。まず4種類の HBs 抗原をコードする遺伝子を全合成し、出芽酵母で発現させたところ、4種のうち2種類の HBs 抗原の発現が確認された。発現された HBs 抗原タンパク質は pre-S1 領域を含んでおり、また N-型糖鎖が複数本結合していることが示唆された。

### A. 研究目的

B型肝炎はC型肝炎と比較して治療成績が低く、画期的な新規治療薬の開発が望まれている。国民のニーズの高いB型肝炎の画期的な新規治療薬の開発等を目指し、基盤技術の開発を含む創薬研究や、治療薬としての実用化に向けた臨床研究等を総合的に推進するためには、治療用も含め新たなワクチン開発が重要である。

我が国で使用されている主な HBV ワクチン (HBs 抗原) は酵母由来である。その製品としてはヘプタバックス (Merck 社、GenotypeA を認識)、ピームゲン (化血研、GenotypeC を認識) があげられる。これらは HBs 抗原の S 領域を酵母で発現させており、糖鎖は付加されていない。近年、これらのワクチンを接種したにも関わらず、B型肝炎に罹患する例が増えてきている。その原因としては HBV エスケープ ミュータントの発生の可能性もあるが、免疫源とした HBs 抗原の S 領域に対してできた抗体が、感染した B型肝炎ウイルスを十分に認識していない可能性が指摘されている。実際に免疫してできた抗体のエピトープ解析の結果では、

糖鎖が付加される S 領域のループ構造に対して抗体ができています。このことは、糖鎖を持った B型肝炎ウイルスでは立体障害により抗体が結合できない可能性がある事を示唆している。従って、より天然に近い HBs 抗原をワクチンとして利用する事により有効性が高くなる可能性がある。

研究分担者の千葉は、これまでに酵母によるタンパク質発現に関する研究を行ってきた。さらにヒトと同じ形の糖鎖を付加できる「ヒト型糖鎖含有タンパク質生産酵母」(天野、千葉、成松ら PNAS 2008) を保有しており、これらの技術とツールを活用し、より効果の高い HBV ワクチンの開発を検討する事を目的とする。

### B. 研究方法

(1) HBs 抗原の酵母発現ベクター、および発現酵母の構築

共同研究者である名古屋市立大の田中先生より、GenotypeA 1種類、GenotypeC 3種類の HBs 抗原をコードする遺伝子情報、アミノ酸配列情報を頂いた。このアミノ酸配列情報



を基に、出芽酵母で使用頻度の高いコドンを使用するように遺伝子配列を設計し、遺伝子配列の全合成を行なった。シグナル配列は出芽酵母の $\alpha$ ファクターのプレプロ配列を用い、その直後にHBs抗原のL領域(preS1+preS2+S領域)をつないだ遺伝子配列とした。なお遺伝子合成は外注で行なった。

合成された遺伝子4種類(GenotypeA 1種類、GenotypeC 3種類)を、大腸菌と出芽酵母のシャトルベクターである YEp352GAPII のプロモーターとターミネーターをコードする遺伝子の間に挿入した。なおプロモーターとターミネーターは、恒常発現するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH; TDH3)を有するプラスミド型ベクターである。このベクターを大腸菌で増幅後、出芽酵母 W303-1A(MATa ura3-52 trp1 $\Delta$ 2 leu2-3\_112 his3-11 ade2-1 can1-100)の形質転換を行なった。選択培地でクローンを選抜後、継代培養を行ない、遺伝子が安定に保持されている事を認した。

### (2) HBs 抗原発現の確認

得られたクローンを 5ml の 2xSD-Ura 培地(1.34% 酵母ニトロゲンベース w/o アミノ酸、2%カザミノ酸、4%グルコース、80  $\mu$ g/ml トリプトファン、40  $\mu$ g/ml アデニン 1/2 硫酸塩)に植菌し、30 $^{\circ}$ C、72 時間培養を行なった。遠心により菌体を分離後、その上清の一部を SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写後、ウエスタンブロット解析により発現の確認を行なった。一次抗体としては市販の抗HBs抗体(抗PreS1モノクローナル抗体(マウス);特殊免疫研究所、または Hepatitis B surface Antigen A, Goat Antibody; PROSPEC)を用い、二次抗体は抗マウス IgG 抗体-ペルオキシダーゼ、または抗ヤギ Ig 抗体-ペルオキシダーゼを使用した。検出は ECL Western Blotting Detection Reagents (GE)を用いイメージアナライザー (GE LAS-1000)で行なった。N-型糖鎖付加の確認には endo-Hf (NEB)を用いた。

### (3) 倫理面への配慮

本課題は産総研の組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。本分担課題では、患者さんの遺伝子情報、細胞等は取り扱わない。また本年度実験動物は取り扱わないことから、倫理面の問題はないと判断した。

## C. 研究結果

4種類のHBs抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母のプラスミドベクターに挿入し、野生型酵母の形質転換を行った。現在上市されているB型肝炎ワクチンは、HBs抗原のS領域を酵母細胞内で発現している。また過去の例ではM領域を発現しているが、PreS2領域がプロテアーゼで切断されてしまうことから、変異を導入するなどの工夫が必要であった。そこでまず野生型酵母で発現を行い、次に切断の影響を見るためにプロテアーゼ破壊株で発現することを計画した。またこれまでワクチンとしてL領域を発現させた例があまりないことから、全長を発現させた。さらに糖鎖構造がより天然に近いワクチンの方がエスケープミュータントの抑制に効果があると考えられたため、糖鎖付加が起こるようにシグナルを付加して、分泌経路を通過させて培地中に分泌させるようにした(図1)。

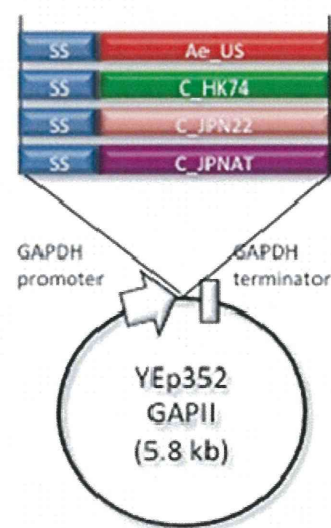


図1 発現ベクターのコンストラクト

形質転換した酵母を培養し、その培養上清および菌体抽出液についてウェスタンブロット解析を行った(図2a)。4種類のHBs抗原のうち、強く発現が確認されたのはGenotype A (Ae\_US) およびGenotype Cの1種類 (C\_JPNAT)、弱いながらも発現が確認されたのはGenotype Cの1種類 (C\_JPN22) 発現が確認できなかったのはGenotype Cの1種類 (C\_HK74) であった。培養上清中に発現が確認された2種類の分子量は

約60 kDaであり、予想される分子量の約45 kDa よりもかなり大きかったため、Endo-Hfによる糖鎖切断を行い、糖鎖付加の有無を確認した(図2b)。その結果、Endo-Hf処理後のHBs抗原の分子量は約50 kDaとなり、N-型糖鎖が少なくとも1本以上付加されていることが示唆された。またこの培養上清に発現したHBs抗原は抗pre-S1抗体でも検出されたことから、L領域のN末端を含む形で発現していることが確認された。

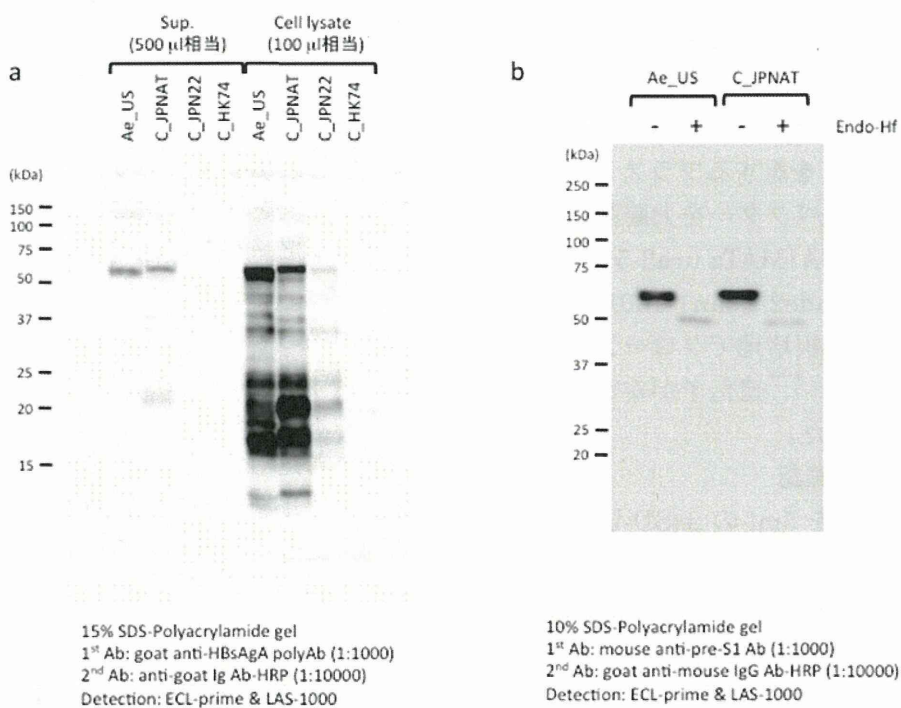


図 2

#### D. 考察

今回発現を試みた4種類のHBs抗原のうち、良好な発現が確認されたのはGenotype A (Ae\_US) とGenotype C 1種 (C\_JPNAT) の2種類であった。シグナル配列を除いたそれぞれの遺伝子配列は4種類とも400アミノ酸をコードしており、その相同性は非常に高い。したがって、なぜ発現に差が見られるかははっきりしない。今後、アミノ酸置換を行っていくことでその原因が確認できると考えられるが、当面は発現した2種類を用いて抗原の調製を行っていく。

発現した2種類のHBs抗原はSDS-PAGEでの分子量が約60 kDaであり、endo-Hfで処理することで約10 kDa減少したことから、N-型糖鎖が3~4本付加していることが示唆された。N-型糖鎖付加可能な部位は5カ所あることから、このうち数カ所に糖鎖が付加していると考えられる。また出芽酵母では50~100残基のマンノースからなる糖鎖が付加し、SDS-PAGE上でスミアなシグナルとなることが多い。しかし今回のシグナルが非常にシャープであることから、発現したHBs抗原に付加している糖鎖は比較的鎖長が短い、いわゆる高マンノース型のN-

型糖鎖であると推察される。高マンノース型糖鎖を持つ抗原は樹状細胞や単球に取り込まれやすく、効率よく抗原提示されることが期待されるため、今回発現した HBs 抗原はよいワクチンとなる可能性がある。

また今回 pre-S1 領域を含めた形で抗原を調製できていると考えられる。pre-S1 領域を含む HBs タンパク質は Dane 粒子を形成するのに必須であり、pre-S1 領域を含めた抗原で免疫できれば、従来の S 領域のみのワクチンと比較し、より汎用性の高いワクチンとなる可能性が高い。今後は発現した HBs 抗原を精製し、抗原タンパク質の生化学的特性を解明するとともに、マウス等へ免疫して各領域に対する抗体価の上昇が見られるかを確認する。また発現量が低いこ

とから、ベクターをプラスミドタイプからゲノム上に挿入するインテグレーションタイプに変更し、より栄養の高い培地を用いることで生産性を向上させる予定である。

#### E. 結論

4 種類の HBs 抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母で発現させたところ、2 種類の HBs 抗原の発現が確認された。発現された HBs 抗原は pre-S1 領域を含んでおり、また N-型糖鎖が複数本結合していることが示唆された。

#### F. 研究発表

なし。

### Ⅲ.研究成果の刊行に 関する一覧表

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
Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, <u>Iijima S</u> , Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, <u>Mizokami M</u>	Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication	J Viral Hepat.	20(4)	e27-36	2013 Apr
Hirabayashi J, Yamada M, <u>Kuno A</u> , Tateno H	Lectin microarrays: concept, principle and applications	Chem Soc Rev.	42(10)	4443-58	2013 Apr
<u>Kuno A</u> , Ikehara Y, Tanaka Y, <u>Ito K</u> , Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, <u>Mizokami M</u> , <u>Narimatsu H</u>	A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis	Sci Rep.	3	1065	2013 Jan
Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, <u>Iijima S</u> , Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, <u>Mizokami M</u>	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$ in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the <i>IL28B</i> gene	Gut.			2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
Du D, Zhu X, <u>Kuno A</u> , Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, Tanaka Y, Zhang X, <u>Narimatsu H</u>	Comparison of Lect-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels	Clin Chim Acta.	413(21-22)	1796-99	2012 Nov

<p><u>Ito K</u>, <u>Kuno A</u>, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, <u>Korenaga M</u>, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, <u>Narimatsu H</u>, <u>Mizokami M</u></p>	<p>LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients</p>	<p>Hepatol- ogy.</p>	<p>56(4)</p>	<p>1448-56</p>	<p>2012 Oct</p>
--	--	--------------------------	--------------	----------------	-----------------

## IV.研究成果の刊行物・別刷

# Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication

T. Sakamoto,<sup>1,2</sup> Y. Tanaka,<sup>1</sup> T. Watanabe,<sup>1</sup> S. Iijima,<sup>1</sup> S. Kani,<sup>1</sup> M. Sugiyama,<sup>1</sup> S. Murakami,<sup>1</sup> K. Matsuura,<sup>1,2</sup> A. Kusakabe,<sup>1,2</sup> N. Shinkai,<sup>1,2</sup> S. Fuminaka,<sup>1,2</sup> and M. Mizokami<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>Department of Virology & Liver unit; <sup>2</sup>Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; and <sup>3</sup>Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Japan

Received April 2012; accepted for publication September 2012

**SUMMARY.** Hepatitis B virus (HBV) is classified into several genotypes. Genotype G (HBV/G) is characterised by worldwide dispersion, low intragenotypic diversity and a peculiar sequence of the precore and core region (stop codon and 36-nucleotide insertion). As a rule, HBV/G is detected in co-infection with another genotype, most frequently HBV/A2. In a previous *in vivo* study, viral replication of HBV/G was significantly enhanced by co-infection with HBV/A2. However, the mechanism by which co-infection with HBV/A2 enhances HBV/G replication is not fully understood. In this study, we employed 1.24-fold HBV/A2 clones that selectively expressed each viral protein and revealed that the core protein expressing construct significantly enhanced the replication of HBV/G in Huh7 cells. The introduction of the HBV/A2 core promoter or core protein or both genomic regions into the HBV/G genome showed

that both the core promoter and core protein are required for efficient HBV/G replication. The effect of genotype on the interaction between foreign core protein and HBV/G showed that HBV/A2 was the strongest enhancer of HBV/G replication. Furthermore, Western blot analysis of Dane particles isolated from cultures of Huh7 cells co-transfected by HBV/G and a cytomegalovirus (CMV) promoter-driven HBV/A2 core protein expression construct indicated that HBV/G employed HBV/A2 core protein during particle assembly. In conclusion, HBV/G could take advantage of core proteins from other genotypes during co-infection to replicate efficiently and to effectively package HBV DNA into virions.

**Keywords:** co-transfection, core protein, genotype A, genotype G, hepatitis B virus, replication.

## INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection affects more than 350 million people and is one of the major causes of acute and chronic liver disease. Acute HBV infection in adults is usually self-limiting, while chronic HBV infection can cause chronic hepatitis, liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma [1]. As the clinical course in infected individuals depends on a complex interplay among various factors including viral, host and environmental factors, molecular characteristics of HBV including the genotype could become increasingly important in our understanding of HBV clinical implications [2].

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; CP, core promoter; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; SEAP, secreted alkaline phosphatase.

Correspondence: Masashi Mizokami, MD, PhD, The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine 1-7-1, Kohnodai, Ichikawa, 272-8516, Japan. E-mail: mmizokami@hospk.ncgm.go.jp

Eight major HBV genotypes (A–H) have been identified by a sequence divergence >8% in the entire HBV genome [3,4] and have a relatively distinct geographical distribution, which may be associated with anthropological history [5]. Hepatitis B virus genotype G (HBV/G) was first described in 2000 by studies carried out in France [6]. It is usually detected during co-infection with other genotypes, most frequently with HBV/A2 [7,8]. Co-infection with HBV/C and H has also been reported [9–11]. One of the features distinguishing HBV/G from other genotypes is the 36-nucleotide (nt) insertion in its core gene [6,12]. Recent studies indicated that the 36-nt insertion increased core protein translation without enhancing mRNA abundance [13], and insertion of the 36-nt in the core region of genotypes A and D impaired genome replication, despite upregulation of core protein expression, indicating that the 36-nt insertion could alter core protein expression without altering the mRNA expression [14]. The other feature of the HBV/G genome that is unique is the possession of two stop codons in the precore region that prevents the expression of hepatitis B e antigen (HBeAg) [6,12]. Nevertheless, some HBV/G carriers are



HBeAg positive, which is explained by co-infection with an HBeAg-expressing HBV/A strain [7].

As previously reported, HBV/G monoinfection in uPA/SCID mice that had been transplanted with human hepatocytes (hereafter referred to as chimeric mice) resulted in very low level viral replication, but HBV replication increased markedly when the animals were co-infected with HBV/A2, C or H [11,15]. Furthermore, the co-infection induced more pronounced fibrosis, which concurs with findings from studies of immunosuppressed patients [16]. However, as it is still unclear how the interaction between HBV/G and other genotypes enhances the replication of HBV/G and affects the virological and clinical manifestation within an individual, we conducted *in vitro* studies using 1.24-fold HBV clones to elucidate the mechanism of HBV/G replication during co-infection.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plasmid constructs of HBV DNA and sequencing*

Hepatitis B virus DNA was extracted from 100  $\mu$ L of serum using the QIAamp DNA blood kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Four primer sets were designed to amplify two fragments (A and B) covering the entire HBV/G genome. PCR with nested primers was performed using TaKaRa LA Taq polymerase (Takara Biochemicals, Kyoto, Japan) for 35 cycles (30 s at 95° C, 30 s at 60° C and 2 min at 72° C). The primer pairs and protocols for plasmid construction are outlined in the Supporting Information. As reported previously [17], these fragments were added to the pUC19 vector, which had been deprived of promoters (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), by digestion with *Hind*III and *Eco*RI, resulting in the 1.24-fold HBV genome – required to transcribe the oversized pregenome and pre-core messenger RNA. Cloned HBV DNA sequences were confirmed with Prism BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the ABI 3100 automated sequencer.

### *HBV DNA mutagenesis and construct design*

HBV/A2 and HBV/G clones containing the 1.24-fold HBV genome were constructed using isolates obtained from a co-infected Caucasian patient from the San Francisco cohort described in our previous study (patient #1) [7]. The study design conformed to the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by our institutional ethics committee. Written informed consent was obtained from the patient. The HBV/A2 clones isolated from the patient's blood specimen did not possess any precore or core promoter mutations that are known to affect HBeAg expression. To study the interaction between the different genotype isolates, the following viral protein expression constructs were prepared (outlined in Fig. 1) in HBV/A2 recombinant plasmids: HBV/A2-S, HBV/A2-core, HBV/A2-pol and HBV/A2-X and were each able to

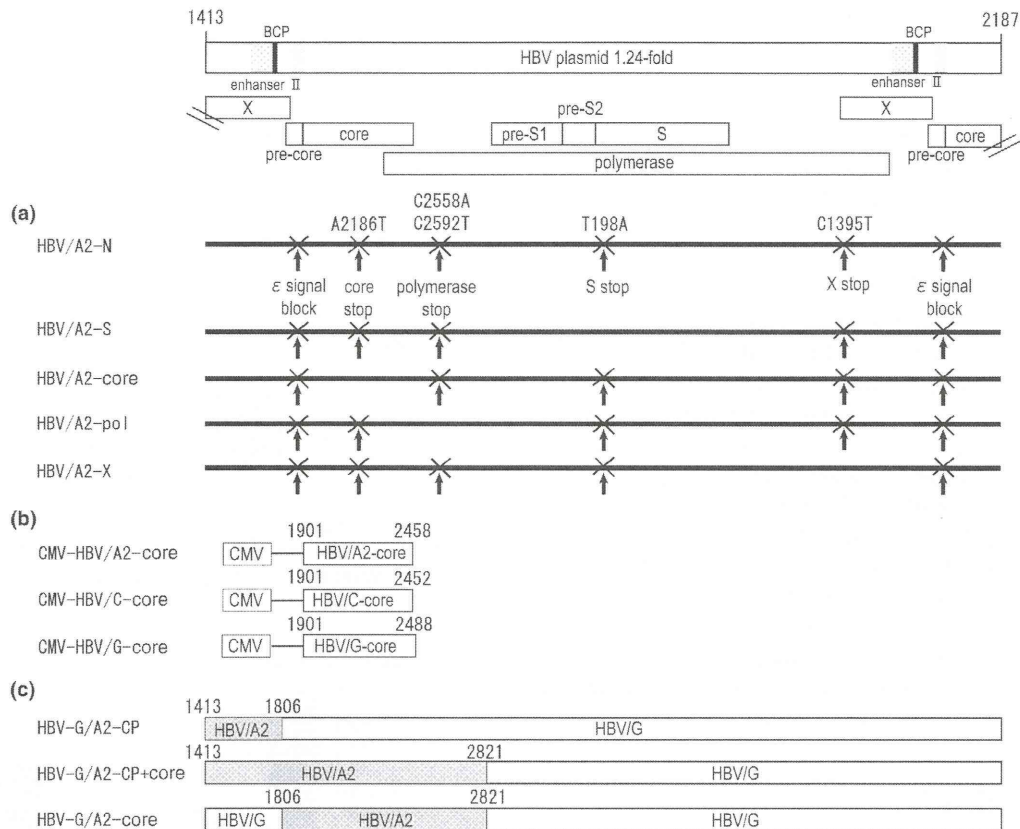
selectively translate one of the four viral proteins (the large surface, precore/core, polymerase and X proteins, respectively), whereas translation of the other three was prevented by the introduction of point mutations that produced corresponding stop codons (Fig. 1a). The following stop codons were used: (i) for surface protein: change from TTA to TAG in the 15th codon of the S gene (T198A) [18], (ii) for core protein: change from AAG to TAG in the 96th codon of the core gene (A2186T), (iii) for polymerase: change from CA-ACAA to TAATAA in the 283rd and 284th codons of the pol gene (C2558T/C2592T) and (iv) for X protein: change from CAA to TAA in the 7th codon of the HBx gene (C1395T) [19]. All of the above HBV/A2 recombinant plasmids possessed a TCTG motif after nucleotide position 1876, which abolished genome replication by altering the  $\epsilon$  loop (CTGT to TCTG, nt 1877–1880) [20]. The 'HBV/A2-N' clone contained all six mutations and was used as an experimental negative control. All of the mutations in this study (substitutions, insertions and deletions) were created by overlapping PCR extension followed by the exchange of endonuclease enzyme-restricted fragments, as described previously [13,21].

Three cytomegalovirus (CMV) promoter-driven expression clones were constructed containing the whole core genes (not including the precore section) of HBV/G (nt 1901–2488), HBV/A2 (nt 1901–2458) and HBV/C (nt 1901–2452); CMV-HBV/G/core, CMV-HBV/A2/core and CMV-HBV/C/core, respectively (Fig. 1b).

Three replicating recombinant constructs were created by recombination of different genomic sections of HBV/G and HBV/A2 (Fig. 1c). The 'HBV-G/A2-CP' clone was a HBV/G-based construct in which the leading fragment containing the core promoter (CP) region (nt 1413–1806) was replaced with that of HBV/A2. The 'HBV-G/A2-CP+core' clone was also an HBV/G-based construct, in which the leading fragment containing the core promoter (CP), precore and core region (nt 1413–2821) of HBV/G was replaced with those of HBV/A2. The 'HBV-G/A2-core' clone was an HBV/G-based construct in which the fragment of the precore and core region (nt 1806–2821) was replaced with those of HBV/A2.

### *Cell culture and transfection*

After 16 h of culture, Huh7 cells were transfected with 5  $\mu$ g of DNA construct per 10-cm diameter dish using the Fugene 6 transfection reagent (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol and harvested 3 days later. Transfection efficiency was measured by co-transfection with 0.5  $\mu$ g of a reporter plasmid expressing secreted alkaline phosphatase (SEAP) and normalised with subsequent SEAP measurement from culture supernatant using a SEAP reporter assay kit (Toyobo, Osaka, Japan) [17]. Three experiments were conducted for each clone.



**Fig. 1** HBV constructs (1.24-fold) and CMV-driven HBV core protein expression constructs used for the present study. CP, core promoter; BCP, basal core promoter; CMV, cytomegalovirus promoter. Stop codons for the corresponding HBV protein are indicated by crosses and arrows. All HBV/A2 recombinant plasmids consisted of the packaging-negative mutation ( $\epsilon$  signal block). In three recombinant constructs between HBV/A2 and HBV/G, the corresponding recombinant genomic parts are shown by the grey bar. CMV-core constructs produce core protein without generating HBeAg in the absence of the preceding  $\epsilon$  signal.

#### Determination of HBV markers

The expression levels of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBeAg were determined by chemiluminescent enzyme immunoassay using commercial assay kits (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan). The detection limit of the HBsAg assay is 0.05 IU/mL. HBV core-related antigen (HBcrAg) was measured in serum using a previously described chemiluminescent enzyme immunoassay [22]. The detection limit of the HBcrAg assay is 1.0 kU/mL.

#### Southern blot hybridisation

Southern blot hybridisation was performed with full-length probes for each genotype/subgenotype according to previously described methods [23]. In brief, cells were harvested and lysed in 1.5 mL of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA and 1% NP-40. Half of the cell lysate was treated with 100  $\mu$ g/mL of RNase A and 200  $\mu$ g/mL of DNase I for 2 h at 37°C, in

the presence of 6 mM Mg acetate. Then, HBV DNA was released by proteinase K digestion, extracted with phenol and precipitated with ethanol after the addition of 20  $\mu$ g of glycogen. DNA was separated on a 1.2% agarose gel, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and hybridised with an alkaline phosphatase-labelled full-length HBV/G or HBV/A2 fragment generated with a Gene Images AlkPhos direct labelling module (GE Healthcare, Hertfordshire, UK). The detection was performed with CDP-Star, ready-to use (Roche Diagnostics GmbH). The signals were analysed by using a LAS-3000 image analyzer (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan).

#### Western blot analysis

Serum or culture medium samples were subjected to SDS-PAGE under 15–25% polyacrylamide gel electrophoresis conditions. The proteins in the gel were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA) at 15 V for 45 min. The

membrane was then blocked and probed using alkaline phosphatase-conjugated HB50 (for HBcAg) or HB91 (for HBcrAg) monoclonal antibody [22] at room temperature for 1 h, before being washed and incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium substrate solution (KPL, Gaithersburg, MD, USA) for 15 min (for HBcrAg) or 90 min (for HBcAg).

#### Sucrose density gradient ultracentrifugation

Aliquots (1.7 mL) of 10%, 20%, 30%, 40%, 50% or 60% (w/w) sucrose in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA (pH 7.5) were carefully layered in a 12-mL ultracentrifuge tube and left at room temperature for 6 h. The culture supernatant of Huh7 cells that had been co-transfected with the 1.24-fold HBV genome construct (HBV/G or HBV/A) and/or the CMV-HBV/A2-core plasmid was layered onto this sucrose gradient, and ultracentrifugation was performed at  $200\,000 \times g$  for 15 h at 4°C in a Beckman Sw40Ti rotor (Beckman Coulter, Chaska, MN, USA). Fractions were collected from the top to the bottom of the gradient. The density of each fraction was calculated from its weight and volume. Each fraction was diluted 10-fold and tested for HBcrAg, HBsAg, HBeAg and HBV DNA.

#### Immunoprecipitation

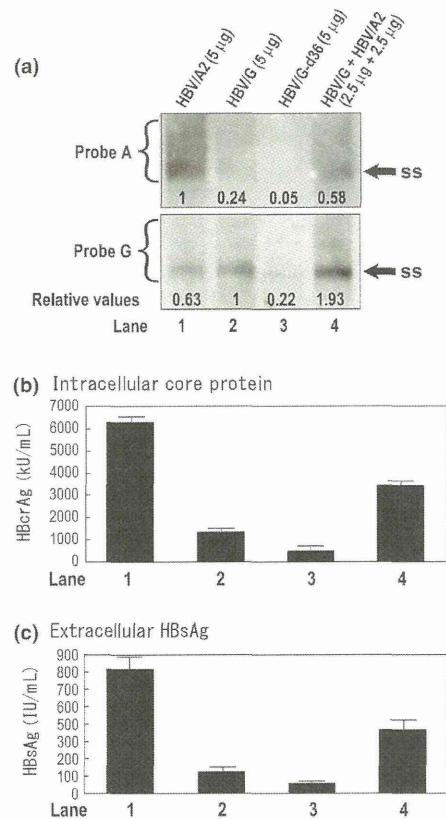
Immunoprecipitation was carried out using magnetic beads coated with monoclonal anti-HBs from the 'MagneSphere™ MS300/Caboxyl' kit (JSR Corp., Tokyo, Japan) [24]. A 100- $\mu$ L aliquot of sample was mixed with 100  $\mu$ L of a magnetic bead suspension. The mixture was then incubated for 1 h at room temperature under gentle agitation and then magnetically separated. The core protein in the precipitate was analysed by Western blotting.

## RESULTS

#### The replication of HBV/G is enhanced by HBV/A2 in co-transfection experiments

In this study, HBV/G and HBV/A2 genome clones (1.24-fold) were constructed from the serum of a HBV carrier that had been co-infected with HBV/G and HBV/A2. The HBV/G-d36 clone is a HBV/G genome-based construct in which the genotype-specific 36-nt insertion was deleted. We performed co-transfection with HBV/A2 and HBV/G clones and assessed virological features. Because of an over 12% sequence divergence between genotype A and G at the nucleotide level [12], the blot was hybridised successively with genotype-specific probes to DNA of each genotype. However, due to the unbiased binding of each probe at lower efficiency in Southern blot analysis [although the replication of HBV/A2 was higher than that of HBV/G, relative value of HBV/A2 with probe G became lower

(0.63), as well as the detection of HBV/G with probe A was very weak (0.24)], each probe of genotype G or A was used for hybridisation with the HBV/A2 and HBV/G clones (Fig. 2a). The density of single-strand HBV DNA detected by the genotype-specific probes in Southern blot analysis revealed that co-transfection with HBV/A2 resulted in increased replication of the wild-type HBV/G



**Fig. 2** (a) Southern blot analysis for replicative activity among HBV/G monotransfection, HBV/G-d36 monotransfection, HBV/A2 monotransfection and co-transfection with HBV/A2 and HBV/G (3 days after transfection). HBV/G-d36 clone was a deletion mutant lacking the 36-nt unique insertion in the core gene of the wild-type HBV/G clone. Hybridisation of the blot with genotype-specific probes of genotype A2 (upper) and G (lower). The density values shown at the bottom were measured to the probe-specific DNA sample. Single-stranded (SS) DNA is indicated by arrows. (b) Intracellular expression of core protein was estimated by detecting HBV-core-related antigen (HBcrAg) [22] as measured by a commercial chemiluminescent enzyme immunoassay (mean and standard deviation,  $n = 3$ ). (c) HBsAg levels in the supernatant as detected by a commercial chemiluminescent enzyme immunoassay (mean and standard deviation,  $n = 3$ ). All experiments were tested at least three times.

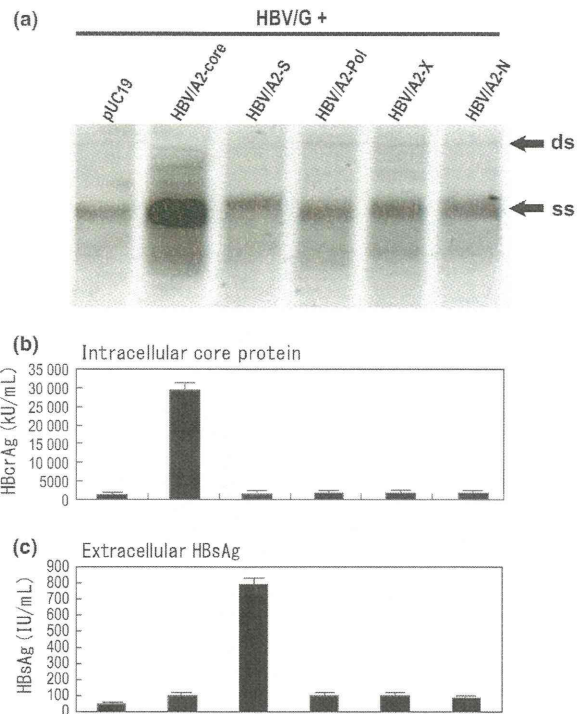
clone, compared with monotransfection of the wild-type HBV/G (Fig. 2a). The intracellular expression of core protein in the cell lysates and the expression of HBsAg in the culture supernatant were also enhanced by the co-transfection with both HBV/A2 and HBV/G clones (Fig. 2b and 2c). Removing the 36-nt insertion from the wild-type HBV/G genome resulted in a significant reduction in viral replication and core protein expression compared with the wild-type HBV/G clone. These results are in agreement with the observations of a previous study [13].

#### *The core protein of HBV/A2 is essential for efficient replication of HBV/G*

To determine how HBV/A2 rescues HBV/G replication during co-transfection, we constructed four HBV/A2 recombinant plasmids that selectively expressed one of the four viral proteins, whereas translation of the other three was prevented by the introduction of stop codons (Fig. 1a). All of these plasmids were prevented from coding for the viral pregenomic RNA containing the 'packaging-negative' mutation in the  $\epsilon$  signal loop to abrogate encapsidation (see Materials and methods). Huh7 cells were co-transfected with the wild-type HBV/G clone and one of the four plasmids expressing a single viral protein. According to Southern blot analysis, the expression of intracellular HBV DNA was greatly increased when HBV/G was co-transfected with HBV/A2-core compared with the other three expression plasmids or the experimental control (pUC19 or HBV/A2-N) (Fig. 3a). The intracellular expression of core protein in the cell lysates was also the highest when HBV/G was co-transfected with HBV/A2-core (Fig. 3b). The expression of HBsAg in the culture supernatant was only increased when HBV/G was co-transfected with the HBV/A2-S plasmid (Fig. 3c). These results indicated that the core protein translated from the HBV/A2 recombinant plasmid can enhance HBV/G replication.

#### *The core protein of HBV/A2 is more effective than those of HBV/C and HBV/G at promoting HBV/G replication*

To compare the effects of genotype on the ability of the core protein to increase HBV/G replication in co-transfection experiments, we generated three genotype-specific core protein expression constructs (HBV/G, HBV/A2 and HBV/C) driven by the CMV promoter, which produced core protein in the absence of a preceding  $\epsilon$  signal (Fig. 1c). Huh7 cells were co-transfected with HBV/G and one of the three core protein expression vectors. Southern blot analysis showed that the level of intracellular HBV DNA was highest during co-transfection with CMV-HBV/A2/core, followed by CMV-HBV/G/core, and was lowest for CMV-HBV/C/core (Fig. 4a), although the expression of core protein in the cell lysates was the highest during co-transfection with CMV-HBV/C/core, followed by CMV-HBV/G/core, and CMV-HBV/A2/core (Fig. 4b). As



**Fig. 3** (a) Southern blot analysis for replication competence of HBV/G clones co-transfected with each of the four HBV/A2 recombinant plasmids: HBV/A2-S, HBV/A2-core, HBV/A2-pol and HBV/A2-X selectively expressing only one of the four viral proteins (large surface, precore/core, polymerase or X protein, respectively). The 'HBV/A2-N' contained all the six mutations to be used as an experimental control. All of the above HBV/A2 recombinant plasmids had the 'packaging-negative' mutation in the  $\epsilon$  signal to abrogate encapsidation. (b) Intracellular expression of core protein was measured as described in Fig. 2b. (c) The expression of HBsAg in the culture supernatant was detected as described in Fig. 2c.

anticipated, there was no difference in the expression levels of HBsAg in any co-transfection experiment (Fig. 4c).

#### *A comparison of viral replication among HBV/G and recombinant HBV/G clones*

To examine the effects of genetic recombination and the roles of the core promoter, precore and core genomic regions in the interaction of HBV/G and HBV/A2 during co-transfection, we employed three HBV/G and HBV/A2 chimaeric replicating constructs (see Materials and methods), which are shown in Fig. 1c. After the transfection experiment. Southern blot analysis of cell lysates indicated an abundant level of DNA expression in HBV/G/A2-CP/core-transfected cells compared with those in the cells transfected with HBV/G-wild type, HBV/G/A2-CP and HBV/G/A2-core (Fig. 5a). As shown in Fig. 5b, the highest