

これらの株についても HBs 抗原発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターは HepG2 細胞に導入し、3 日後の培養上清を用いて HBs 抗原の検出を行った。HBs 抗原の検出は、世界標準で海外でも使用されているアーキテクト・HBsAg QT (アボット ジャパン株式会社)、一般的に使用されている定性試薬であるルミパルス II HBsAg (富士レビオ株式会社)、最近発売され高感度で変異の影響を受けにくいルミパルス HBsAg-HQ (富士レビオ株式会社) の各キットを用いて行い、その測定値を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した B 型急性肝炎症例の HBV ゲノム配列はインフォームドコンセントを得て採取された検体を用いて行った解析から得た。これらの検体の使用については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において審議され承認を得ている (受付番号 398、平成 24 年 12 月 28 日付)。

C. 研究結果

1. 遺伝子型 A-H 株のコンセンサス HBs 抗原発現ベクターによる検討

遺伝子型 A-H 株のコンセンサス配列を持つ HBs 抗原発現ベクターを作製し、導入細胞の培養上清をアーキテクト・HBsAg QT とルミパルス HBsAg-HQ の HBs 抗原検出用試薬で測定した。その結果、アーキテクト・HBsAg QT とルミパルス HBsAg-HQ の測定値には良い相関が得られ、どちらの試薬においても各遺伝子型のコンセンサス株については十分な検出能を有していると考えられた (図 1)。

2. 遺伝子型 A, B, C 株のワクチンエスケープ変異の検討

遺伝子型 A, B, C 株の HBs 領域のコンセンサス配列に、ワクチンエスケープ変異として知られている T/I126S と G145R の変異を導入したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトの導入細胞の培養上清をアーキテクト・HBsAg QT、ルミパルス HBsAg-HQ、ルミパルス II HBsAg の各 HBs 抗原検出用試薬で測定し

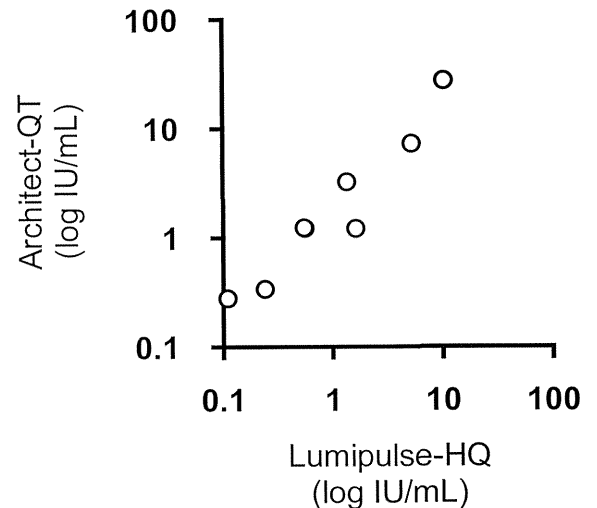


図 1. 遺伝子型 A-H 株のコンセンサス配列による HBs 抗原測定値の評価

た。その結果、ルミパルス HBsAg-HQ とルミパルス II HBsAg の測定値では良い相関が得られたが、遺伝子型 C の G145R 変異株では回帰直線からの乖離を認め、ルミパルス II HBsAg での測定値が低くなっていると考えられた (図 2)。また、アーキテクト・HBsAg QT とルミパルス HBsAg-HQ の測定値の比較では、ルミパルス間の比較に比べその相関が低く、測定値にキット間の差が有ると考えられた (図 2)。

3. 国内の B 型肝炎症例から得られた HBV 株を用いた検討

国内の B 型肝炎症例から得られた HBV 株のうち HBs 領域に変異が検出された 22 株についても HBs 抗原発現ベクターを構築し、導入細胞の培養上清を用いて HBs 抗原量の測定を行った。その結果、ルミパルス HBsAg-HQ とルミパルス II HBsAg の測定値では比較的良い相関が得られたが、アーキテクト・HBsAg QT とルミパルス HBsAg-HQ の間ではその相関が低く、測定値が乖離している検体がいくつか認められた (図 3)。これらの検体には遺伝子型 A が 5 株、遺伝子型 B が 7 株、遺伝子型 C が 10 株含まれていたが、遺伝子型特異的な測定値の乖離は認められなかった。

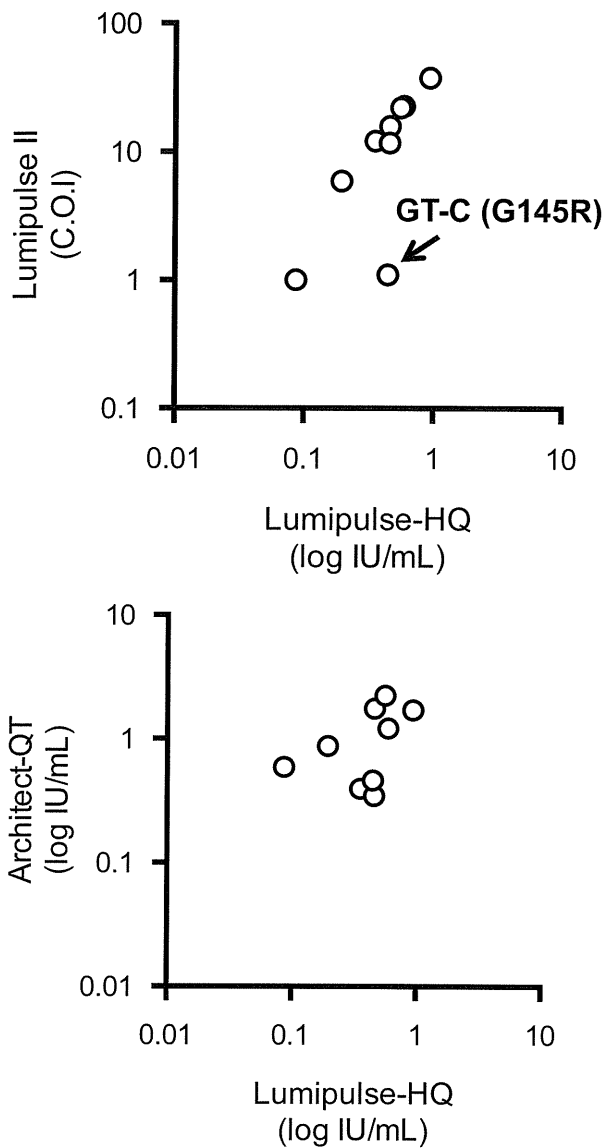


図2. 遺伝子型A-C株のワクチンエスケープ変異導入株を用いたHBs抗原測定値の評価

D. 考察

今回は発売元が同じHBs抗原検出用試薬であるルミパルス HBsAg-HQ とルミパルス II HBsAg、上記2つとは発売元が異なるアーキテクト・HBsAg QT を用いてHBs抗原測定値の比較を行った。その結果、遺伝子型に依存した測定値の差は明らかではなかったが、ワクチンエスケープ変異を含むHBs領域の変異により、試薬間の測定値の乖離が認められ、これらの検体では各種試薬によるHBs抗原検出能に差が有る可能性が示唆された。その測定値の乖離は、発売元が異なる試薬間において顕著であり、今後

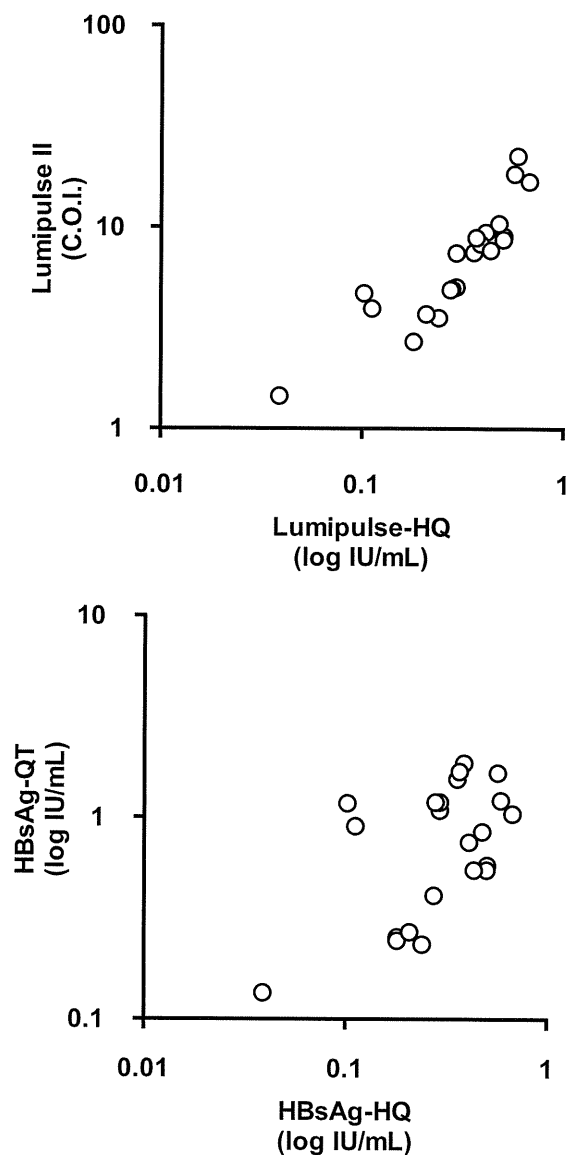


図3. 国内のB型肝炎例から得られたHBV株を用いたHBs抗原測定値の評価

多くのHBs抗原検出用試薬を対象とした性能評価が必要であると考えられた。

E. 結論

培養細胞でのHBs抗原発現ベクターを作製し、これらコンストラクト導入細胞の培養上清を用いてHBs抗原の測定を行った。この系を用いることでHBs抗原検出系の性能評価が可能であると考えられるが、培養上清での測定により得られた検出感度の差が、臨床検体の測定において同様に観察されるか注意が必要である。今後はこの培養細胞発現系による評価と臨床検体を用

いた評価を合わせて行うことで、各種 HBs 抗原
検出用試薬の性能調査を行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture-adapted HCV by end-point dilution and infection. PLoS One, 9(5), e98168, 2014.

2) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. World J Gastroenterol, 20(11), 3044-9, 2014.

3) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. PloS One, 9(6), e98521, 2014.

4) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. J Virol, 88(16), 9233-9244, 2014.

5) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. J Virol, 88(13), 7541-7555, 2014.

2. 学会発表

1) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Hepatitis C virus replication in a monkey kidney-derived cell line. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

2) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, T Matsumura, M Shiina, S Asabe, Wakita T, M

Imawari. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

3) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

4) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Infection and Replication of Hepatitis C Virus in Vero cells Derived from Green Monkey Kidney. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 7-11, 2014. Boston, USA.

5) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、2014 年 5 月.

6) 村山麻子、藤原圭、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29-30 日、東京.

7) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、新田沙由梨、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異による HCV 増殖および IFN 感受性への影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10-12 日、横浜.

8) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスが感染複製可能なベロ細胞株の樹立. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25-27 日、横浜.

H. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
(医薬品等規制調和・評価研究事業))
平成26年度分担研究報告書

Real-time PCR を使ったウイルス定量技術の標準化と第四世代検出試薬の体外診断薬審査への応用

分担研究者： 草川 茂 (国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官)

研究要旨

抗原抗体同時検出が可能な第四世代試薬の、体外診断薬審査における HIV-1 p24 抗原の検出感度を試験する検体の作製とそれを用いた性能試験を行った。in-house real-time RT-PCR 法による HIV-1 RNA 定量結果に基づき、11 種類の HIV-1 サブタイプ/CRF/グループを含む 26 株の分離ウイルスから試験用検体を作製した。p24 抗原検出試薬や第四世代スクリーニング試薬の測定結果から、RNA 定量結果に基づいて作製された試験用検体の p24 量は、すべての株でほぼ一定であることがわかった。これらの試験検体を用いた性能検査の結果から、検査の現場において指摘されている問題点を裏付けるデータが得られ、今回樹立した抗原検出感度試験用検体の作製法とこれらを用いた試験が、製造販売承認前の第四世代検出試薬の体外診断薬審査に有用であることが示された。

A. 研究目的

現在の HIV の検査室レベルでのスクリーニング検査試薬は、抗体検出試薬である第三世代試薬と抗原抗体同時検出試薬である第四世代試薬に分けられる。第四世代試薬は、抗原を検出できることによって、セロコンバージョン前の感染初期の検体をも検出することができ、ウィンドウ期の短縮に役立っている。第四世代試薬の性能試験は、市販のセロコンバージョンパネルを用いた第三世代試薬との初回検出採血日数の比較によって行われるが、これらのパネルの詳細な性質については不明な点が多い。初回検出採血日数の差が抗原の検出によるのか抗体の検出感度の差によるのかわからない、実際に検査の現場で使用されている第四世代試薬の感染初期の検出感度が、セロコンバージョンパネルで示された結果と必ずしも一致しない場合がある、シーケンス情報がないためサブタイプ/CRF 毎の抗原検出感度のばらつきが検討できない等の問題点がある。本研究では、第四世代試薬の体外診断薬審査試験において、感染初期の検出に重要な抗原の検出感度を試験するための試験検体の作製方法と、作製した試験検体の有用性について検討した。

B. 研究方法

6 種類のサブタイプ、4 種類の組換え型流行株 (CRF)、グループ O の HIV-1 分離株 (表 3) を、PHA 刺激ヒト末梢血単核細胞で培養し、昨年度の本研究事業の報告に示した SYBR Green 法による in-house real-time RT-PCR 法で HIV-1 の定量を行った。 1×10^5 copies/mL が 10pg/mL p24 量に相当するとみなし、各 HIV-1 株を 1×10^5 copies/mL、 5×10^5 copies/mL、 1×10^6 copies/mL、 2.5×10^6 copies/mL になるよう Basematrix 53 (SeraCare Life Science) にスパイクした試験用検体を作製し、使用時まで -80°C にて保存した。 1×10^5 copies/mL の検体を、コバス Taqman HIV-1 オート Ver.2.0 (ロシュ・ダイアグノスティクス) による RNA 定量結果から、in-house 法による RNA 定量結果を確認するとともに、 1×10^6 copies/mL の検体を Innotest HIV Antigen mAb (Innogenetics) を用いて測定し、HIV-1 p24 抗原国際標準品 (NIBSC code 90/636) の希釈列を用いて作成した検量線から p24 量を算出した。国内既承認品を用いた測定は、ELISA を原理とするジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (バイオラッド) とエンザイグノスト HIV インテグラル II (シ

ーメンスヘルスケアダイアグノスティクス)、イムノクロマト(IC)試薬であるエスプライン HIV Ag/Ab (富士レビオ) を用いて行った。

(倫理面への配慮)
なし。

C. 研究結果

HIV-1 分離株を用いて作製した抗原検出感度試験用検体のうち、 1×10^5 copies/mL に調整した検体を、コバス Taqman HIV-1 オート ver.2.0 で測定した (図4)。CRF08_BC の1検体(SPL81)を除くすべての検体が 1×10^5 copies/mL から 0.5log の範囲になり、in-house real-time RT-PCR の結果に基づいて調整された検体の RNA コピー数が適切であることが示された。

さらに 1×10^6 copies/mL に調整した検体の p24 量を Innostest HIV Antigen mAb (Innogenetics) で測定したところ、100pg/mL の前後に分布していることが確認できた (図5)。

3種類の濃度 (1×10^5 copies/mL、 5×10^5 copies/mL、 2.5×10^6 copies/mL) に調整したこれらの試験用検体を、3種類の HIV スクリーニング試薬を用いて測定した。

ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT では、いずれの検体も 1×10^5 copies/mL (≈ 10 pg p24/ml) まで検出可能であった (図6)。コバス Taqman HIV-1 オート ver.2.0 でやや高値を示した SPL81 でカットオフインデクス(C.O.I.)がやや高い傾向が見られた (図6)。一方エンザイグノスト HIV インテグラル II では、ほとんどの株で 1×10^5 copies/mL

(≈ 10 pg p24/ml) まで検出可能であったが、CRF07_BC の一株(SPL86)はすべて陰性判定となり、ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT で高値を示した SPL81 も C.O.I.が低く、 1×10^5 copies/mL では陰性判定となった。

エスプライン HIV Ag/Ab では、1000pg/mL で1株が陰性判定となり、250pg/mL ではコバス Taqman HIV-1 オート Ver.2.0 で高値となった SPL81、SPL76 (図4) を除いてすべて陰性判定となった (図7)。

D. 考察

様々なサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスを安価に定量する方法として SYBR Green 法による in-house real-time RT-PCR 法を確立した。この方法で作製した抗原検出感度試験用検体の RNA コピー数と p24 抗原濃度が適切であることは、HIV-1 RNA 増幅定量試薬「コバス Taqman HIV-1 オート ver.2.0」と HIV-1 p24 抗原検出試薬「Innotest HIV Antigen mAb」による測定の結果から確認された (図4、図5)。

この方法でウイルス量を揃えた HIV-1 抗原検出感度試験用検体を使って、HIV スクリーニング試薬の抗原検出能の検討を行った。

2種類の ELISA を原理とする HIV スクリーニング試薬で測定したところ、エンザイグノスト HIV インテグラル II で、2つの株(SPL86、SPL81)の検出感度にばらつきがみられた (図6)。いずれの CRF も隣国である中国における主要な HIV-1 流行株であり、今後さらに検体数を増やしての詳細な検討が必要と思われる。

エスプライン HIV Ag/Ab を使った測定では、サブタイプ/CRF/グループを問わず、本試薬の抗原検出感度が ELISA を原理とする2つの試薬の 1/100 程度であることが明らかになった。本試薬は、ELISA や化学発光免疫測定法等を原理とする第四世代スクリーニング試薬と同様に抗原抗体同時検出を謳っているものの、その感染初期の検出能に疑問を投げかける報告があり、今回の結果はそれを裏付けるデータとなった。

E. 結論

本研究において樹立した HIV-1 抗原検出感度試験用検体作製法は、より安価で効果的な試験用検体を作製できる方法であり、それらを用いた第四世代検出試薬の性能検査の結果から、検査の現場において指摘されている問題点を予見しうることが示された。本法は、製造販売承認前の第四世代検出試薬の体外診断薬審査に有用な方法であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takebe Y, Naito Y, Raghwani J, Fearnhill E, Sano T, Kusagawa S, Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Brown AJ, Pybus OG, Dunn D, Kondo M: Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan. J Virol. 88(17), 9864-9876, 2014.

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

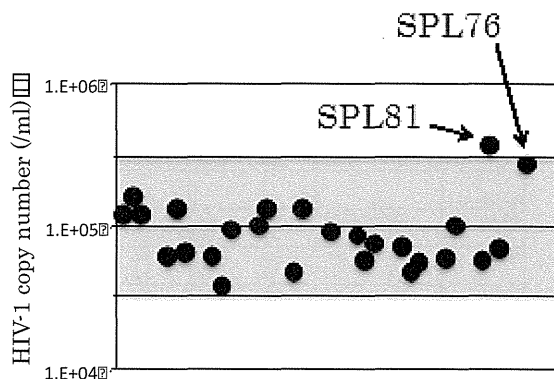


図4： 1×10^5 copies/mL 検体のコパス Taqman オート Ver.2.0(ロシュ・ダイアグノスティクス)による測定

表3：用いた HIV-1 分離株の分類

Subtype A	Subtype D	CRF01_AE	CRF07_BC
SPL2	SPL32	SPL41	SPL64
SPL7	SPL40	SPL44	SPL86
SPL8		SPL48	
Subtype B	Subtype F	CRF02_AG	CRF08_BC
SPL11	SPL72	SPL53	SPL69
SPL17	SPL73	SPL59	SPL81
SPL18		SPL60	SPL85
Subtype C	Subtype G	Group O	
SPL27	SPL74	SPL76	
SPL61			
SPL62			

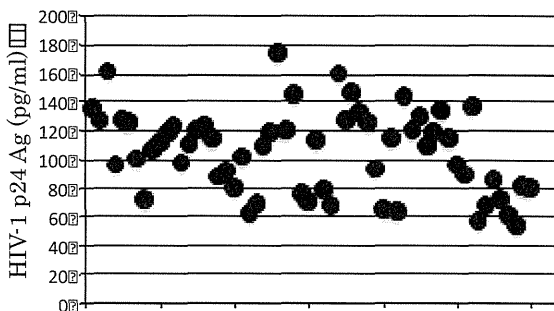


図5： 1×10^6 copies/mL 検体の Innostest HIV Antigen mAb (Innogenetics)による測定

	2.5x10 ⁶		5x10 ⁵		1x10 ⁵	
Subtype A						
SPL2	16.5	18.2	7.9	10.9	2.8	2.9
	8.4	8.5	6.7	6.7	2.6	2.6
SPL7	15.1	16.1	6.8	7.1	2.7	2.1
	8.1	8.4	6.0	6.1	2.2	2.2
SPL8	16.4	17.8	8.5	10.0	3.3	2.5
	8.0	8.3	5.7	6.0	2.1	2.2
Subtype B						
SPL11	17.9	18.8	9.8	11.8	5.0	4.4
	7.8	8.1	5.3	5.3	2.1	2.2
SPL17	17.7	18.9	9.9	11.7	4.0	3.7
	8.1	8.3	6.4	6.4	2.5	2.4
SPL18	17.7	18.5	8.9	11.3	4.0	3.4
	8.1	8.5	6.5	6.4	2.6	2.5
Subtype C						
SPL27	16.4	17.9	7.8	8.6	3.0	2.7
	8.3	8.3	6.5	6.6	2.5	2.6
SPL61	17.9	19.3	9.8	11.3	4.2	3.8
	7.9	8.4	7.4	7.4	3.4	3.5
SPL62	17.0	18.5	10.9	10.9	4.2	3.7
	8.2	8.2	5.7	5.8	2.1	2.0
Subtype D						
SPL32	18.1	18.0	10.9	10.6	3.8	3.3
	8.4	8.3	6.3	6.4	2.4	2.4
SPL40	15.3	15.3	7.3	7.5	2.5	2.1
	8.1	8.2	5.8	5.8	2.1	2.2
Subtype F						
SPL72	18.3	18.3	11.3	11.2	4.1	3.2
	8.0	8.2	4.9	5.0	1.7	1.7
SPL73	17.5	17.4	9.7	9.6	3.2	2.5
	7.6	7.6	3.6	3.6	1.2	1.2
Subtype G						
SPL74	18.3	18.3	11.4	11.1	3.8	3.9
	8.0	8.0	4.6	4.7	1.7	1.7
CRF01_AE						
SPL41	19.4	17.8	12.9	11.8	4.7	3.7
	8.4	8.4	6.7	6.6	2.5	2.4
SPL44	16.7	16.8	8.5	8.0	2.8	2.4
	8.0	8.1	5.4	5.3	2.0	1.8
SPL48	20.8	20.8	13.3	14.9	4.7	4.9
	11.1	11.2	6.8	6.6	2.0	2.1
CRF02_AG						
SPL53	18.3	18.3	8.9	10.2	2.7	2.6
	10.7	10.8	6.0	5.8	1.9	1.9
SPL59	19.0	19.5	10.3	10.4	3.3	3.2
	11.1	10.8	6.9	6.7	2.1	2.2
SPL60	19.2	19.6	10.4	10.8	3.5	2.9
	10.5	10.7	5.9	6.0	1.9	1.9
CRF07_BC						
SPL64	17.6	17.2	8.5	8.4	2.4	2.4
	11.1	11.3	8.8	8.5	2.9	3.1
SPL86	0.8	0.9	0.5	0.5	0.4	0.4
	11.5	11.5	9.0	8.8	3.4	3.2
CRF08_BC						
SPL69	16.4	17.3	7.0	7.3	2.0	1.9
	11.3	11.4	7.7	7.6	2.7	2.5
SPL81	5.7	5.4	1.5	1.6	0.6	0.6
	11.6	11.6	11.3	11.6	9.1	9.3
SPL85	14.8	14.9	5.7	5.2	1.6	1.5
	11.3	11.4	7.6	7.9	2.7	2.6
Group O						
SPL76	20.4	19.1	15.4	14.6	5.7	5.9
	11.5	11.5	7.7	7.5	2.5	2.4

上段:エンザイグノスト HIV インテグラル II (ロット番号: 43742)
下段:ジェンスクリーン HIV Ag-Ab ULT (ロット番号: 4E0091)
・いずれもC.O.I.値が1以上を陽性と判定する
・陰性判定となったものをグレーで示した。

図6: ELISA を原理とするスクリーニング試薬を用いて試験検体の測定

	1000	250	50
Subtype A			
SPL2	+	-	-
SPL7	-	-	-
SPL8	+	-	-
Subtype B			
SPL11	+	-	-
SPL17	+	-	-
SPL18	+	-	-
Subtype C			
SPL27	+	-	-
SPL61	+	-	-
SPL62	+	-	-
Subtype D			
SPL32	+	-	-
SPL40	+	-	-
Subtype F			
SPL72	+	-	-
SPL73	+	-	-
Subtype G			
SPL74	+	-	-
CRF01_AE			
SPL41	+	-	-
SPL44	+	-	-
SPL48	+	-	-
CRF02_AG			
SPL53	+	-	-
SPL59	+	-	-
SPL60	+	-	-
CRF07_BC			
SPL64	+	-	-
SPL86	+	-	-
CRF08_BC			
SPL69	+	-	-
SPL81	+	+	-
SPL85	+	-	-
Group O			
SPL76	+	+	-
SPL77	+	-	-

図7: 抗原抗体同時検出 IC 試薬「エスプライン HIV Ag/Ab」を用いた試験検体の測定

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
(医薬品等規制調和・評価研究事業))
分担研究報告書

血液を介して感染するウイルスの標準品整備に関する動向についての研究

研究分担者 百瀬暖佳 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官
研究協力者 水澤左衛子 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員
研究協力者 大隈 和 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長
研究代表者 浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

研究要旨

ウイルス検出を目的とした体外診断用医薬品の再評価には、国際的な共同研究によって力価が定められた国際標準品/参照品や国際参照パネルの存在が不可欠であり、その整備、および更新の動向を把握することは重要である。本研究では世界保健機関(WHO)、および WHO Collaborating Center の専門家が集まる会議に提出された資料を精査し、国際標準品等に関する最新の動向を調査した。また、欧州における体外診断用医薬品の品質管理体制について情報収集を行った。

A. 研究目的

ウイルス検出を目的とした体外診断用医薬品の技術の進歩はめざましく、国内外のメーカーが製造する体外診断用医薬品は世界各国で使用されている。これら体外診断用医薬品の再評価には国際標準品、国際参照パネルが必要不可欠である。ウイルスの国際標準品は世界保健機関(WHO)の生物製剤標準化に関する専門家委員会 (Expert Committee on Biological Standardization : ECBS) において最終的に制定されるが、作製、および更新作業は主に National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC、イギリス)、Paul-Ehrlich-Institut (PEI、ドイツ)、Food and Drug Administration (FDA、アメリカ)が行っている。ECBS に先立ち、上記 3 機関が参集する WHO Collaboration Centers meeting では実務者間の協議が行われ、Scientific Working Group on the Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT)では標準品等に関する科学的な議論がなされる。本研究では、WHO 国際標準品の整備に関する最新の情報を収集し、その動向を把握することを目的とした。また、欧州における体外診断用医薬品の品質管理体制について情報収集を行った。

B. 研究方法

SoGAT - 2nd Joint Blood Virology and Clinical Diagnostics Meeting への出席、WHO ECBS に提出された議案書の精査から、WHO 国際標準品・参照品、国際参照パネルの整備、更新の進捗状況について動向調査を行った。欧州体外診断薬指令 (Directive 98/79/EC)、および 2012 年に出された同指令の改訂案を基に、欧州における体外診断用医薬品の品質管理体制に関する情報収集を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. 国際標準品の動向

2014 年の WHO ECBS において、ウイルスに関する標準品として第 3 次 HBs 抗原国際標準品、第 1 次 HCV コア抗原国際標準品が制定された。その他の標準品として、第 1 次トキソプラズマ核酸国際標準品、第 1 次抗マラリア人血清国際標準品が制定された。第 3 次 HBs 抗原国際標準品、第 1 次 HCV コア抗原国際標準品については国立感染症研究所が国際共同研究に参加している。新

規事業として、Herpes Simplex virus 1/2-DNA 国際標準品の新規作製が承認された(表 4)。

第 5 次 HCV-RNA 国際標準品については、2015 年の ECBS での制定を目標に更新作業が進められている。その他のウイルス核酸に関して JCV、BKV、HHV6A、HHV6B、およびアデノウイルスの国際標準品、HIV-1 測定用サブタイプパネル、HEV ジェノタイプパネルの準備が進行中である。JCV 国際標準品の候補品、HCV 国際標準品の更新、HEV ジェノタイプパネルの候補品については力価等を評価するための国際共同研究が開始された。抗 HTLV 抗体パネル(感度・特異性検査用)も評価のための国際共同研究が開始された。

2. HCV-RNA 国際標準品の安定性

室温発送における安定性が問題となっている HCV-RNA 国際標準品について、含湿度、残留酸素、抗 HCV 抗体、pH 緩衝剤(HEPES)、凍結乾燥保護剤(トレハロース)の影響が NIBSC において検討された。いずれの項目においても力価の有意な低下は認められず、HCV-RNA 国際標準品の安定性を低下させている要因は判明しなかった(2014 年の SoGAT において NIBSC 担当者より報告)。しかしながら、在庫数が少なくなってきたことから標準品の更新作業に入ること、次期ロットでは密閉性が増すことを期待して、充填容器をガラスバイアル・スクリュューキャップ型に変更することが報告された。

3. 欧州における体外診断用医薬品の品質管理

EU 加盟国で流通する体外診断用医薬品には欧州指令 98/79/EC が適応される。欧州指令 98/79/EC には体外診断用医薬品が満たすべき基本的安全性要件、各診断薬が遵守すべき技術要件、品質保証システムへの整合規格等が定められている。欧州指令 98/79/EC に定められた全ての要件を満たす場合に CE マーキングが表示され、EU 内で流通できる。

欧州指令 98/79/EC では各診断項目に応じ、ユーザー、患者、輸送、環境に与える影響についてリスク分析が行われ、危険性に応じて Annex II List A(高)、Annex II List B(中高度)、Self-Test(中程度)、

General(低)の 4 群にクラス分けされている。List A に分類される診断項目には、HIV-1、HIV-2、HTLV-I/II、HBV、HCV、HDV、および血液型(ABO 式、Rh 式、抗 Kell)が、List B に分類される診断項目には、風疹ウイルス、CMV、クラミジア、および血液型(抗 Duffy、抗 Kidd、不規則抗体)が含まれる。欧州指令 98/79/EC ではクラスに応じて要求事項が定められており、List A、B に該当する品目では製造販売承認の前に notified body と呼ばれる第三者認証機関で製剤設計、品質管理システムなどの適合性評価を受ける必要がある。さらに、List A 該当品目では PEI 等の reference laboratory でロット毎の検定(バッチリリース)を受ける。

2012 年 9 月 26 日、欧州委員会より欧州指令 98/79/EC の改訂案が出された。1998 年以降の科学技術の向上に伴い、現行の欧州指令 98/79/EC を実情に則したものにするための改訂で、位置づけは法令となる見込みである。また、体外診断用医薬品のクラス分けは Annex II List A、List B、Self-Test、General からクラス A、B、C、D に変更される。Annex II List B は概ねクラス C に、List A は概ねクラス D に分類されるが、予めリスト化されたクラス分けからフローチャートに沿ったクラス分けに変更され、より柔軟な対応が可能となる予定である。

D. 考察

1. 国際標準品の動向

国際標準品等の整備に関する最新の動向を把握するため、SoGAT、ECBS へ提出された議案書等を活用して情報の収集を行った。国際標準品作製のための国際共同研究の多くに国立感染症研究所が参加している。

2. HCV-RNA 国際標準品の安定性

国際標準品等が凍結乾燥品として準備される理由は主に、交付に際しての室温輸送を目的としていると考えられる。しかし、室温での安定性の問題からドライアイス発送となるならば、凍結乾燥の必要はないとも言える。不必要な処理を施さない凍結品の方が臨床検体の性状に近く標準品に適しているという考えもある。今後、標準品等

の性状についてはユーザーからの要望等も加味した上で議論がなされることが期待される。

3. 欧州における体外診断用医薬品の品質管理

欧州における体外診断用医薬品の品質管理システムでは、欧州指令 98/79/EC に中程度/高リスクと分類されている項目について、第三者認証機関が適合性を評価し、規制当局が製造販売承認を行っている。日本においても同様のシステムが採られていると考えられる。また、欧州では List A 該当品目の市販に当たり、バッチリリースが行われている。バッチリリースは、日本における国家検定に類似のものと考えられる。一部の体外診断用医薬品について承認前試験のみを実施している日本とは異なる点である。

現在進行中の改訂案が発効された場合、クラス分類が変更される診断薬も出てくるかもしれないが、欧州における体外診断用医薬品の品質管理システムの体制に大きな変更はないものと考えられる。

E. 結論

2014 年度の WHO ECBS において、ウイルス等に関する標準品・パネルとして第 3 次 HBs 抗原国際標準品、第 1 次 HCV コア抗原国際標準品、第 1 次トキソプラズマ核酸国際標準品、第 1 次抗マラリア人血清国際標準品が制定された。標準品制定のための国際共同研究では、国立感染症研究所が参加協力を行った。新規事業として、Herpes

Simplex virus 1/2-DNA 国際標準品の新規作製が承認された。

HCV、JCV、BKV、HHV6A、HHV6B、およびアデノウイルスの国際標準品、HIV-1 測定用サブタイプパネル、HEV ジェノタイプパネル、抗 HTLV 抗体パネルについては更新/新規作製の作業が進行中である。

欧州における体外診断用医薬品の品質管理システムは概ね日本と類似しているが、高リスクに分類される体外診断用医薬品についてバッチリリースを実施している点が日本と異なる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I: Identification of TL-Om1, an ATL cell line, as a reference material for human T-lymphotropic virus 1 quantitative polymerase chain reaction: J Clin Microbiol. 2015 Feb;53(2):587-96

2. 学会発表

Madoka Kuramitsu and Isao Hamaguchi: Development of a HTLV-1 DNA standard, Scientific Working Group on the Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT) – 2nd Joint Blood Virology and Clinical Diagnostics Meeting, Graz, Austria – 28-29 May 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 4. 2014 年の WHO ECBS において承認されたウイルス等の国際標準品

制定

	更新	標準品/参照品 名称	種類	感染研が国際共同研究に参加
抗原	3rd	Hepatitis B surface antigen	国際標準品	○
抗原	1st	Hepatitis C Virus core antigen	国際標準品	○
核酸	1st	Toxoplasma gondii for NAT	国際標準品	
抗体	1st	Human serum anti-malaria Plasmodium falsiparum	国際標準品	

新規事業

		標準品/参照品 名称	種類
核酸	新規	Herpes Simplex Virus DNA type 1 and 2	国際標準品

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakata M, Otsuki N, <u>Okamoto K</u> , Anraku M, Nagai M, Takeda M, Mori Y.	Short Self-interacting N-terminal Region of Rubella Virus Capsid Protein Is Essential for Cooperative Actions of Capsid and Nonstructural p150 Proteins.	J. Virol.	88	11187-11198	2014
Abo H, <u>Okamoto K</u> , Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y.	Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses.	J. Virol. Methods	24	207C:73-77	2014
Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, <u>Takahashi Y</u> , Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, <u>Ato M</u> , Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E.	Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants.	J. Virol.	88	12364-12373	2014
Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, <u>Kato T</u> .	Single strain isolation method for cell culture- adapted HCV by end-point dilution and infection.	PLoS One	9	e98168	2014
Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, <u>Kato T</u> .	Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection.	World J. Gastroenterol.	20	3044-3049	2014
Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, <u>Kato T</u> , Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T.	HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases.	PLoS One	9	e98521	2014
Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, <u>Kato T</u> , Shin EC.	Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells.	J. Virol.	88	9233-9244	2014

Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, <u>Kato T</u> , Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T.	Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production.	J. Virol.	88	7541-7555	2014
Takebe Y, Naito Y, Raghvani J, Fearnhill E, Sano T, <u>Kusagawa S</u> , Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Brown AJ, Pybus OG, Dunn D, Kondo M.	Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan.	J. Virol.	88	9864-9876	2014
Kuramitsu M, <u>Okuma K</u> , Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, <u>Momose H</u> , Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, <u>Hamaguchi I</u> .	Identification of TL-Om1, an ATL cell line, as a reference material for human T-lymphotropic virus 1 quantitative polymerase chain reaction.	J. Clin. Microbiol.	53	587-596	2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Short Self-Interacting N-Terminal Region of Rubella Virus Capsid Protein Is Essential for Cooperative Actions of Capsid and Nonstructural p150 Proteins

Masafumi Sakata, Noriyuki Otsuki, Kiyoko Okamoto, Masaki Anraku, Misato Nagai, Makoto Takeda, Yoshio Mori

Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

ABSTRACT

Nucleocapsid formation is a primary function of the rubella virus capsid protein, which also promotes viral RNA synthesis via an unknown mechanism. The present study demonstrates that in infected cells, the capsid protein is associated with the nonstructural p150 protein via the short self-interacting N-terminal region of the capsid protein. Mutational analyses indicated that hydrophobic amino acids in this N-terminal region are essential for its N-terminal self-interaction, which is critical for the capsid-p150 association. An analysis based on a subgenomic replicon system demonstrated that the self-interacting N-terminal region of the capsid protein plays a key role in promoting viral gene expression. Analyses using a virus-like particle (VLP) system also showed that the self-interacting N-terminal region of the capsid protein is not essential for VLP production but is critical for VLP infectivity. These results demonstrate that the close cooperative actions of the capsid protein and p150 require the short self-interacting N-terminal region of the capsid protein during the life cycle of the rubella virus.

IMPORTANCE

The capsid protein of rubella virus promotes viral RNA replication via an unknown mechanism. This protein interacts with the nonstructural protein p150, but the importance of this interaction is unclear. In this study, we demonstrate that the short N-terminal region of the capsid protein forms a homo-oligomer that is critical for the capsid-p150 interaction. These interactions are required for the viral-gene-expression-promoting activity of the capsid protein, allowing efficient viral growth. These findings provide information about the mechanisms underlying the regulation of rubella virus RNA replication via the cooperative actions of the capsid protein and p150.

Rubella virus (RV) is the sole member of the genus *Rubivirus* in the family *Togaviridae*. RV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus with a genome of approximately 10 kb. The genome acts as an mRNA and contains three untranslated regions and two open reading frames (ORFs). The ORF at the 5' end encodes two nonstructural proteins (NSPs), p150 and p90, which function in viral RNA replication. The other ORF, at the 3' end, encodes three structural proteins (SPs), capsid, E2, and E1, which are integral components of the virion (1). NSP p150 contains several domains that are conserved among other RNA viruses (2, 3). A putative methyltransferase domain and a protease domain are located at the amino (N) and carboxyl (C) termini, respectively (2, 4, 5). There are also two domains of unknown function, Y and X, between the methyltransferase and protease domains. The putative methyltransferase domain is considered to play a role in capping viral RNA (4). The protease domain cleaves the precursor polyprotein p200 into p150 and p90, and this step is critical in the regulation of viral RNA replication (6–8). NSP p90 has two functional domains, helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domains, in the N- and C-terminal regions, respectively (6, 7). p150 and p90 are believed to form the replication complex with the viral genome and play crucial roles in viral RNA replication (8–10). The SPs are synthesized as a precursor polyprotein, which is cleaved into the capsid, E2, and E1 proteins by a host-cell signal peptidase in the lumen of the endoplasmic reticulum. Previous studies have suggested that the capsid protein interacts initially with the viral genomic RNA and is then assembled into the virion with an envelope derived from the host cell membrane containing the E2 and E1 glycoproteins, mainly in the

Golgi complex (11–14). Nucleocapsid formation is a primary function of the capsid protein, but the protein also promotes viral RNA synthesis via an unknown mechanism(s) (15–18). It has also been reported that the capsid protein promotes virus production via its interaction with several host factors (19–21). Previous studies (17, 22, 44, 45) have shown that the capsid and p150 proteins interact with each other and colocalize in cells (17, 22) and that the expression of the capsid protein compensates for the functional disability of p150 (17, 44, 45). These observations suggest a cooperative action between the capsid and p150 proteins. In this study, our data indicate that the capsid protein associates with p150 via the short self-interacting N-terminal region of the capsid protein and that this region is essential for the close cooperative actions of the capsid and p150 proteins.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. Vero and 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin). BHK cells were maintained in DMEM supplemented with 5% FBS and

Received 17 June 2014 Accepted 18 July 2014

Published ahead of print 23 July 2014

Editor: S. López

Address correspondence to Yoshio Mori, yoshiom@nih.go.jp.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01758-14

antibiotics. RK13 cells were maintained in DMEM supplemented with 8% bovine serum (BS) and antibiotics. BHK cells carrying an RV subgenomic replicon (HS Rep), BHK-HS-Rep cells, were maintained in DMEM containing 10% FBS, 2.5 μ g/ml puromycin (Life Technologies, Carlsbad, CA), and antibiotics. The Vero, 293T, BHK, and RK13 cells were maintained at 37°C, whereas the BHK-HS-Rep cells were maintained at 35°C. The RV strain RVi/Hiroshima.JPN/01.03[1J] was isolated in Japan in 2003 from a clinical specimen, through three passages in RK13 cells. Recombinant viruses derived from this strain were propagated after one or two passages in BHK cells.

Antibodies. The following mouse monoclonal antibodies were used: anti-RV capsid protein (Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-RV E2 (Viral Antigens, Memphis, TN), anti-RV E1 (U.S. Biologicals, Salem, MA), anti-FLAG M2 (Sigma, St. Louis, MO), and anti-GAPDH (MBL, Aichi, Japan). A rabbit anti-RV p150 polyclonal antibody (22) was a kind gift from T. Ahola (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland). Goat anti-RV virion, rabbit anti-AG1, and rabbit anti-Myc polyclonal antibodies were purchased from Acris Antibodies GmbH (San Diego, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and MBL, respectively. A rabbit anti-RV p90 polyclonal antibody was produced by immunizing a rabbit with the p90 helicase domain (amino acids 1334 to 1586) expressed in *Escherichia coli*.

Plasmid constructs. An infectious genomic cDNA of the RVi/Hiroshima.JPN/01.03[1J] strain was constructed by connecting overlapping reverse transcription (RT)-PCR-amplified products, as described previously (55, 56), with some modifications. The cDNA was inserted into the SpeI and EcoRI sites of a modified pUC18 vector, in which the HindIII site in the multicloning site was replaced with a SpeI site. To insert an SP6 promoter immediately upstream from the 5' end of the genomic cDNA, the 5'-terminal fragment of the RV genome (nucleotides [nt] 1 to 1919) was amplified by RT-PCR using the following primer pair: forward primer SpeI-HS(+)1-26 (5'-gcttactagtATTTAGGTGACACTATAGCAA TGGGAGCTAACGGACCTCGCTTA-3') and reverse primer RV(-)1899-919 (5'-atccgaattcGCACGACACGGACAAAAGCC-3') (the SpeI and EcoRI sequences are shown in lowercase italicized letters, the SP6 promoter sequence is underlined, and nucleotides that are added for efficient enzymatic digestions are indicated in lowercase roman letters). They were swapped using the SpeI and SnaBI restriction enzymes. To insert a poly(A) sequence immediately downstream from the 3' end of the genomic cDNA, the 3'-terminal fragment of the RV genome (nt 8258 to 9762) was amplified by RT-PCR using the following primer pair: forward primer HS(+)8258-80 (5'-agtcaagcttatgGAGGAGGCTTTCACCTACCT CTG-3') and reverse primer HS(-)9738-dt20 (5'-ctaggaattcT₂₀CTATG CAGCAACAGGTGCGGGAATC-3') (HindIII and EcoRI sequences are shown in lowercase italicized letters). They were swapped using the SbfI and HindIII restriction enzymes. The resulting plasmid was designated "pHS."

To generate a plasmid encoding the cDNA from an infectious clone with an in-frame insertion encoding the green fluorescent protein humanized monomer Azami Green 1 (AG1) between amino acid positions 717 and 718 within a hypervariable region of p150, a HindIII restriction enzyme site was introduced by PCR-mediated site-specific mutagenesis between nt positions 2192 and 2193 of the genomic cDNA. The AG1 gene flanked by HindIII sites was then amplified by PCR and cloned into the HindIII site introduced into the p150 gene. The resulting plasmid, encoding an infectious cDNA with the p150 gene fused to the AG1 gene (p150/AG1), was designated "pHS-p150/AG1." A series of infectious clones, each with a single mutation in the capsid protein, was generated based on pHS-p150/AG1 using PCR-mediated site-specific mutagenesis.

A plasmid encoding the cDNA for a subgenomic replicon of the RVi/Hiroshima.JPN/01.03[1J] strain, pHS-Rep-P2R, was constructed by replacing the structural polyprotein gene with a reporter gene encoding a fusion protein of puromycin *N*-acetyl-transferase, foot-and-mouth disease virus 2A self-cleavage domain, and *Renilla* luciferase, in that order (designated the "P2R reporter"). pHS-Rep-GND-P2R, encoding the

cDNA for a replication-defective form of the subgenomic replicon, was constructed by introducing a D1967N point mutation into the RdRp catalytic GDD motif. A plasmid encoding the cDNA for another subgenomic replicon, pHS Rep, was constructed by replacing the structural polyprotein gene with a puromycin *N*-acetyl-transferase gene.

Expression plasmids encoding either p150, the capsid protein, the E2-E1 polyprotein, or the precursor SPs (capsid, E2, and E1) were generated based on the pcDNA3.1+ vector (Life Technologies). The AG1 gene was inserted into the p150 gene in the region corresponding to amino acid positions 717 and 718 (p150/AG1) or at the N terminus (^{AG1}p150). The expression construct for the full-length capsid protein was designated "C₁₋₃₀₀." Constructs containing N- or C-terminal deletions are indicated with subscript numbers. A three-tandem-FLAG epitope (3FLAG) or a three-tandem-Myc epitope (3Myc) sequence was inserted into the capsid protein gene at the 5' terminus (^{FLAG/myc}C), and the 3' terminus was tagged with the mCherry gene (C^{mC}). Plasmids encoding a series of mutant capsid proteins with deletions or amino acid substitutions were prepared with PCR-based mutagenesis. These mutations were also introduced into the capsid protein gene within the plasmids encoding the precursor SP. All the nucleotide sequences of the inserts were confirmed with DNA sequencing before use.

Recovery of cloned viruses from infectious cDNA clones. The full-length viral genomic or subgenomic replicon RNAs were synthesized from the plasmids encoding the cDNAs by *in vitro* RNA transcription with the mMESSAGE mMACHINE SP6 transcription kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. The quality of the synthesized viral RNAs was confirmed by electrophoresis, and the amounts of RNAs were calculated spectrophotometrically. BHK cells were transfected with the synthesized RNAs using DMRIE-C transfection reagent (Life Technologies), and the culture media were replaced with fresh media at 4, 5, and 6 days posttransfection (dpt). To prepare master stocks of the clones of RVi/Hiroshima.JPN/01.03[1J] (rHS) and its recombinant (rHS-p150/AG1), derived from pHS and pHS-p150/AG1, respectively, the culture supernatants were harvested at 7 dpt. To analyze the growth kinetics of the RVs after RNA transfection, aliquots of the culture media were harvested every 24 h until 120 h posttransfection (hpt).

Growth kinetics of rHS and rHS-p150/AG1. Monolayers of RK13 cells in six-well plates were inoculated with rHS or rHS-p150/AG1 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. After incubation for 1 h at room temperature, the cells were washed twice with 1 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Life Technologies) and cultured with 2 ml of minimal essential medium (MEM) containing 8% BS and antibiotics. The cells were incubated at 35°C in a humidified incubator containing 5% CO₂, and aliquots of the culture media were collected every 24 h until 120 h postinoculation (hpi). The infectious titers in the media were determined by plaque assay, as described previously (55, 56), and are expressed in PFU.

Fluorescent focus-forming assay (FFA). Monolayers of Vero cells in 24-well plates were inoculated with 0.1 ml of samples serially diluted 10-fold and incubated for 1 h at room temperature. The cells were then cultured with 0.5 ml of MEM containing 2% FBS, 0.07% sodium bicarbonate, 0.5% agarose, and antibiotics. After incubation for 7 days at 35°C, the cells were fixed with PBS containing 4% formalin. The foci of cells expressing AG1 were counted under a fluorescence microscope, and the infectious titers are expressed in fluorescent focus-forming units (FFU).

Indirect immunofluorescence assay (IIFA). Vero cells were inoculated with rHS or rHS-p150/AG1 at an MOI of 1.0 or transfected with plasmids expressing p150 and the capsid proteins using TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI). After incubation, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS. They were then stained with the appropriate primary antibody and then with the appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 or 594 (Life Technologies). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Lonza Cologne GmbH, Walkersville, MD). The stained cells were observed with an FV1000D spectral type confocal laser-scanning microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Coimmunoprecipitation assay (co-IPA). 293T cells were cotransfected using Lipofectamine LTX (Life Technologies) with several combinations of expression plasmids: a series of FLAG^C constructs and AG1^{p150} and a series of FLAG^{mC}/myc^C₁₋₃₀ constructs. After incubation for 48 h, the cells were treated with immunoprecipitation lysis buffer (125 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5% glycerol), and the cell debris was removed by centrifugation at 15,000 × g for 5 min at 4°C. Aliquots (5.0% or 10.0% of the total volume) of the cell lysates were used as the “input” samples, and the remaining samples were pretreated with mouse IgG-agarose (Sigma) for 60 min at 4°C. The pretreated samples were immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) for 2 h at 4°C. After five washes with Tris-HCl-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween 20 (TBS-T), the protein complexes bound to the agarose gel were dissolved by boiling the gel with sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer for 5 min. The samples were then analyzed with immunoblotting.

Immunoblotting. The polypeptides in the samples were separated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. After the membranes were blocked with SuperBlock blocking buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), they were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T or the immune-enhancer solution Can Get Signal (Toyobo, Osaka, Japan). The membranes were then washed three times with TBS-T and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted with TBS-T or Can Get Signal for 2 h at room temperature. After being washed, the membranes were treated with SuperSignal West Dura extended-duration substrate (Thermo Fisher Scientific) or SuperSignal West Femto maximum-sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific), and the chemiluminescent signals on the membranes were detected with an LAS-3000 Luminescent image analyzer (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom).

Reporter assay of the viral-gene-expression-promoting activity of the capsid protein. Full-length capsid protein mRNA or a series of mutant mRNAs were synthesized from plasmids encoding the corresponding cDNAs with *in vitro* RNA transcription, using the mMACHINE T7 kit (Life Technologies). The quality of the synthesized RNAs was confirmed with electrophoresis, and the amounts of the RNAs were measured spectrophotometrically. BHK cells were transfected with the subgenomic replicon RNA (HS-Rep-P2R or HS-Rep-GND-P2R), together with each capsid protein mRNA. The transfected BHK cells were collected at 72 hpt, and their *Renilla* luciferase activities were measured with the *Renilla* luciferase assay system (Promega, Madison, WI). The expression levels of the capsid protein in the *Renilla* luciferase assay samples were detected by immunoblotting with anti-RV virion and anti-GAPDH antibodies.

Analysis of VLPs generated by transfection of RV subgenomic replicon cells with SP constructs. BHK cells were transfected with *in vitro*-synthesized RNA encoding the subgenomic replicon HS Rep. A stable cell line carrying the subgenomic replicon, BHK-HS-Rep cells, was established by selection with 2.5 μg/ml puromycin. The cells were transfected with a series of plasmids expressing the SP constructs using Lipofectamine LTX (Life Technologies). The culture media were replaced with fresh media at 24 hpt and harvested after incubation for another 24 h. The titers of the infectious viruslike particles (VLPs) in the media were analyzed with FFA. To analyze the physical properties of the VLPs, the media were harvested and centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C. The supernatants were layered onto 15% (wt/vol) sucrose cushions and centrifuged in an SW28 rotor (Beckman) at 113,000 × g for 2 h at 4°C to produce VLP pellets (23, 24). The VLP pellets were suspended in PBS overnight to quantify VLP production. For further analysis, the resolved wild-type (wt) and L12A VLPs were fractionated by ultracentrifugation through a 10% to 40% sucrose density gradient in an SW41 rotor (Beckman) at 145,000 × g for 2 h (25, 26). The fractions (1 ml each) were collected from the top of the gradient. The proteins were concentrated from 700 μl of each fraction with trichloroacetic acid precipitation and analyzed by immunoblotting with an anti-RV virion antibody. Viral RNA was purified from 200 μl of

each fraction using a High Pure viral RNA kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), and the copy number of the genomic RNA was measured with reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR). In the qRT-PCR, part of the p90 gene was amplified using RealTime Ready RNA virus master (Roche Applied Science), the primer set HS qPCR(+)6107 (5'-ATGCACCAGCGCATCAAG-3') and HS qPCR(-)6158 (5'-GGCCACCTGCTGTCTTC-3'), and Universal ProbeLibrary (UPL) probe 160 (Roche Applied Science) in a LightCycler 480 system (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions. The copy number of each genomic RNA was calculated by standardization to an *in vitro*-synthesized full-length genomic RNA.

Nucleotide sequence accession number. The whole genomic sequence of the RVi/Hiroshima.JPN/01.03[1] strain was determined and submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database under accession number AB860305.

RESULTS

Capsid protein colocalizes with p150 in RV-infected cells. Recombinant RVs, rHS, and rHS-p150/AG1, expressing p150 fused to the green fluorescent protein AG1, were generated (Fig. 1A). AG1 was inserted between amino acid positions 717 and 718 within a hypervariable region of p150, which permits the insertion of extra peptides or deletions (44, 45, 57). As expected, the cellular distribution pattern of p150/AG1 was similar to that of the original p150 (Fig. 1B), and the growth kinetics of rHS-p150/AG1 were similar to those of the parental rHS (Fig. 1C). Vero cells were infected with rHS-p150/AG1 and analyzed with indirect immunofluorescence and confocal microscopy (IICM). At 36 hpi, p150/AG1 was distributed in the cytoplasm and at the cell border (Fig. 1D). The signals for p150/AG1 at the cell border were merged with those of the lipid membrane stained with the lipophilic dye DiI (data not shown). These data suggest that p150/AG1 localized at the plasma membrane. At 72 hpi, the majority of p150/AG1 was distributed in filamentous structures in the cytoplasm (Fig. 1D), as described previously for the original p150 (9, 22, 47). Almost all the p150/AG1 in these distributions clearly overlapped the distribution of the capsid protein (Fig. 1D). At 36 hpi, ~50% of cells showed clear p150/AG1 signals at the plasma membrane, whereas at 72 hpi, ~60% of cells showed signals in the filamentous structures (Fig. 1E). The viral glycoproteins E2 and E1 rarely colocalized with p150/AG1 at either 36 or 72 hpi (data not shown).

The N-terminal 30-amino-acid region of the capsid protein (C₁₋₃₀) is responsible for its association with p150. The capacity of the capsid protein to interact with p150 was analyzed with co-IPA. Expression plasmids encoding the full-length capsid protein (C₁₋₃₀₀) or a series of truncated forms of the capsid protein (C₅₁₋₃₀₀, C₁₀₁₋₃₀₀, C₁₅₁₋₃₀₀, C₁₋₁₅₀, C₁₋₁₀₀, C₁₋₅₀, and C₁₋₃₀) were prepared (Fig. 2A and B). C₅₁₋₃₀₀, C₁₀₁₋₃₀₀, and C₁₅₁₋₃₀₀ have truncations at the N terminus, and C₁₋₁₅₀, C₁₋₁₀₀, C₁₋₅₀, and C₁₋₃₀ have truncations at the C terminus. A 3FLAG tag was added to the N terminus of all the capsid proteins (Fig. 2A and B). 3FLAG-tagged C₁₋₃₀₀, C₅₁₋₃₀₀, C₁₀₁₋₃₀₀, and C₁₅₁₋₃₀₀ were designated FLAG^C₁₋₃₀₀, FLAG^C₅₁₋₃₀₀, FLAG^C₁₀₁₋₃₀₀, and FLAG^C₁₅₁₋₃₀₀, respectively. A red fluorescent protein, mCherry, was added to the C terminus of 3FLAG-tagged C₁₋₃₀₀, C₁₋₁₅₀, C₁₋₁₀₀, C₁₋₅₀, and C₁₋₃₀, and designated FLAG^{mC}₁₋₃₀₀, FLAG^{mC}₁₋₁₅₀, FLAG^{mC}₁₋₁₀₀, FLAG^{mC}₁₋₅₀, and FLAG^{mC}₁₋₃₀, respectively (Fig. 2B). Coimmunoprecipitation assay of the proteins expressed from these plasmids showed that FLAG^C₁₋₃₀₀ interacted with N-terminally AG1-tagged p150 (AG1^{p150}), whereas neither FLAG^C₅₁₋₃₀₀, FLAG^C₁₀₁₋₃₀₀, nor FLAG^C₁₅₁₋₃₀₀ interacted with AG1^{p150} (Fig. 2C and D).

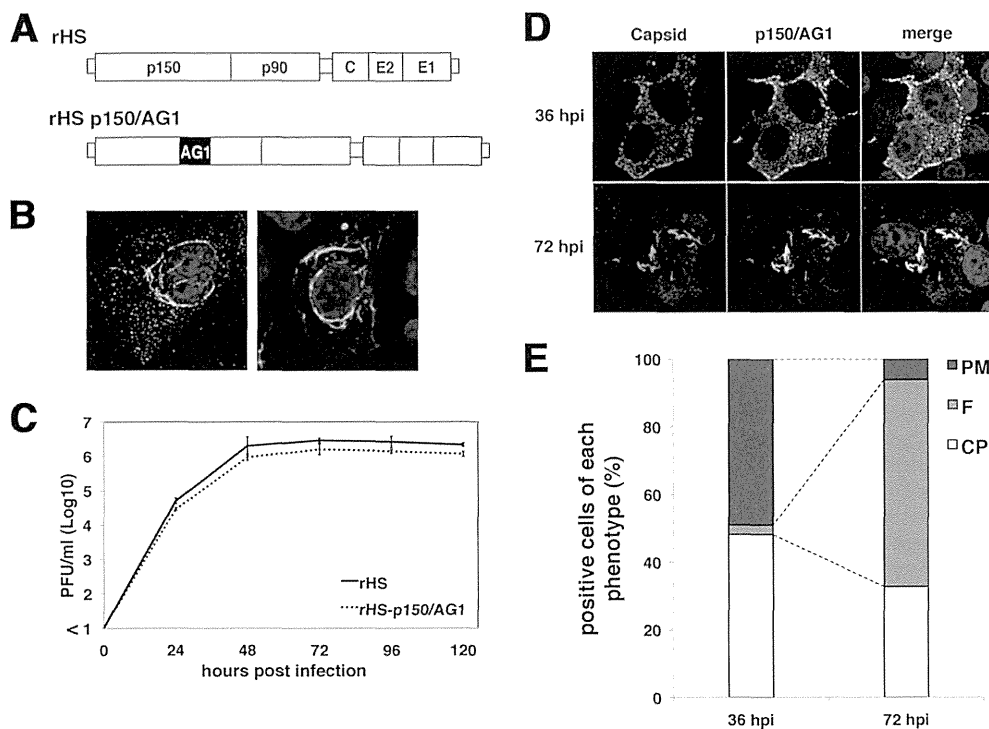


FIG 1 Preparation of an infectious clone of RV expressing p150 fused to the green fluorescent protein AG1. (A) Schematic diagrams of the genomes of the original virus (rHS) and the genetically modified RV encoding p150 fused to the green fluorescent protein AG1 (rHS-p150/AG1). AG1 was inserted in frame into the hypervariable region of the p150 gene. (B) Distributions of p150 in Vero cells infected with rHS (left) or rHS-p150/AG1 (right) at 96 hpi. Native p150 was detected with IIFA using an anti-p150 antibody, and p150/AG1 was detected by its AG1 fluorescence. (C) Growth kinetics of the two infectious clones in RK13 cells. The cells were inoculated with each virus at an MOI of 0.1, and the viral titers in the media, harvested at the indicated times, were determined with plaque assays. The averages from three independent experiments are presented. Error bars indicate standard deviations. (D) Distributions of the capsid protein (red) and p150/AG1 (green) in Vero cells infected with rHS-p150/AG1. Vero cells infected with rHS-p150/AG1 at an MOI of 1.0 were fixed at the indicated times and analyzed with IFAs using anti-AG1 and anti-capsid antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). (E) Proportions of each distribution pattern of p150/AG1 in panel D. The distributions of p150/AG1 were categorized into three patterns in the cells positive for both p150/AG1 and the capsid protein: at the plasma membrane (PM), at filamentous structures (F), and diffusely in the cytoplasm (CP) (total number of counted cells [n] = 106 at 36 hpi; n = 98 at 72 hpi).

FLAG_{C₁₋₃₀₀}^{mC}, FLAG_{C₁₋₁₅₀}^{mC}, FLAG_{C₁₋₁₀₀}^{mC}, FLAG_{C₁₋₅₀}^{mC}, and FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} all coimmunoprecipitated with AG1p150. These results indicate that C₁₋₃₀ is responsible for the interaction of the capsid protein with p150.

Self-interacting capacity of C₁₋₃₀ is essential for the capsid-p150 interaction. Perera et al. (26) reported that the N-terminal region of the capsid protein of Sindbis virus, which belongs to the same family (*Togaviridae*) as RV, contains a coiled-coil motif. C₁₋₃₀ of RV is also predicted by the COILS program (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) to contain a coiled-coil motif at amino acid positions 8 to 29. A series of point mutations (M9A, E10A, L12A, L16A, and L23A) were introduced into FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} and 3Myc-tagged C₁₋₃₀^{mC} (myc_{C₁₋₃₀}^{mC}) (Fig. 3A). In these mutant peptides, the amino acid residue at position 9, 10, 12, 16, or 23 was replaced with an alanine. Mutation 20P21 is a single amino acid insertion, not a substitution, in which a proline residue was inserted between amino acid positions 20 and 21. Coimmunoprecipitation assay showed the self-interacting capacity of C₁₋₃₀, because myc_{C₁₋₃₀}^{mC} coimmunoprecipitated with FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} (Fig. 3B). The amount of coimmunoprecipitated myc_{C₁₋₃₀}^{mC} was greatly reduced by mutations L12A, L16A, and 20P21 (Fig. 3B). M9A and L23A moderately reduced the amounts of coimmunoprecipitated myc_{C₁₋₃₀}^{mC} (Fig. 3B). In contrast, E10A

had little effect on the amount of myc_{C₁₋₃₀}^{mC} coimmunoprecipitated (Fig. 3B). These data demonstrate that hydrophobic residues at amino acid positions 9, 12, 16, and 23 of C₁₋₃₀ are important for the self-interaction of C₁₋₃₀. These residues form a hydrophobic interface in the predicted coiled-coil structure. Our data also suggest that the formation of the secondary structure of C₁₋₃₀ is critical for its self-interaction, because a single amino acid insertion (20P21) severely affected its self-interaction.

The p150-interacting capacity of FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} and its mutant constructs (FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC}-20P21, -M9A, -E10A, -L12A, -L16A, and -L23A) was analyzed with co-IPA. The mutations that severely or moderately affected the self-interacting capacity of C₁₋₃₀ (M9A, L12A, L16A, L23A, and 20P21) greatly reduced the amounts of AG1p150 that precipitated with FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} (Fig. 3C). In contrast, the amount of AG1p150 that precipitated with FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} was not affected by E10A, which had no effect on the self-interaction of C₁₋₃₀ (Fig. 3C). These data show that the self-interacting capacity of C₁₋₃₀ is closely associated with its capacity to interact with p150. The p150-interacting capacity of FLAG_{C₁₋₃₀₀} and its mutant constructs (FLAG_{C₅₁₋₃₀₀} and FLAG_{C₁₋₃₀₀}-20P21, -M9A, -E10A, -L12A, -L16A, and -L23A) was also analyzed with co-IPA. Consistent with the data for FLAG_{C₁₋₃₀}^{mC} and its mutant constructs, AG1p150 coimmuno-

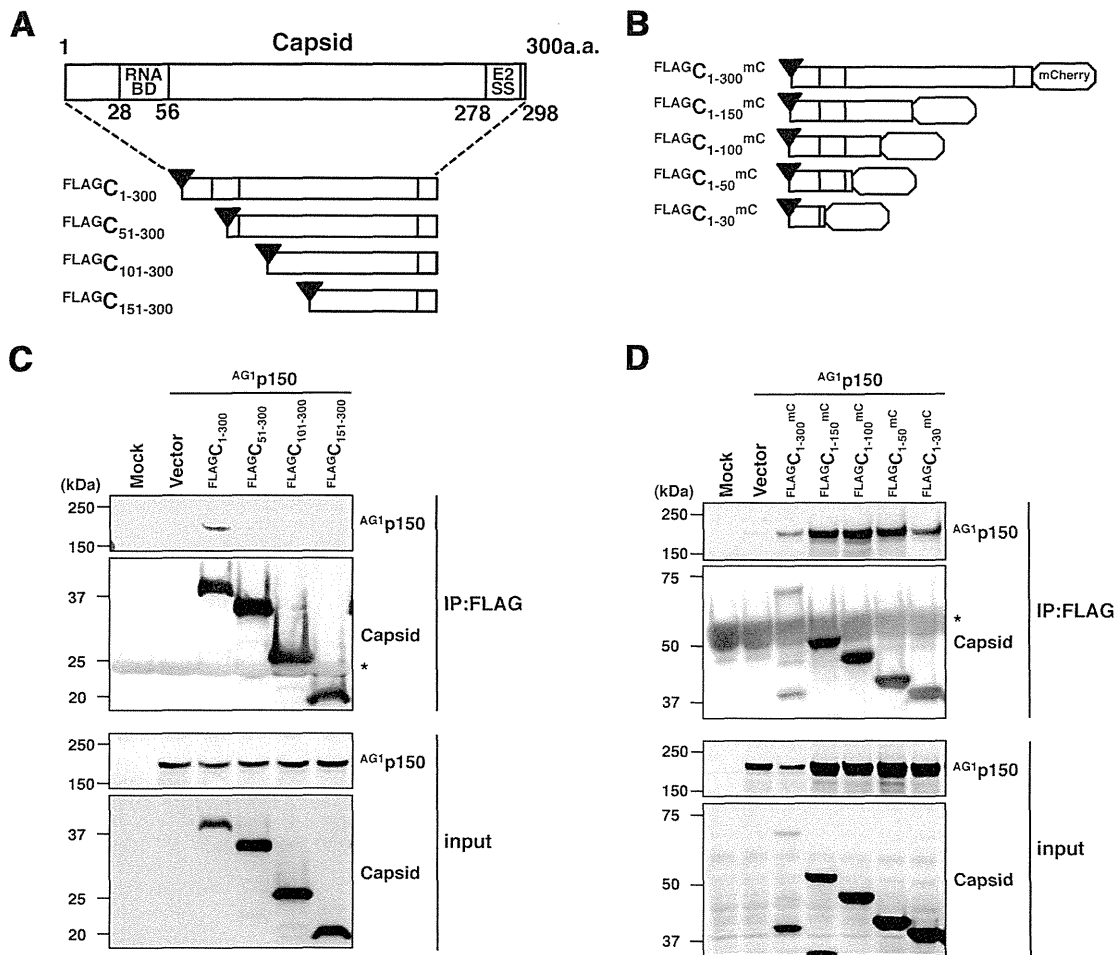


FIG 2 The short N-terminal region of the capsid protein is important for its interaction with p150. (A) A schematic diagram of the whole capsid protein and its N-terminal truncated mutants used in coimmunoprecipitation assays. The first and last amino acid positions of the truncated capsid proteins are indicated as subscript numbers. In the capsid protein, the genomic RNA-binding domain (RNA BD) and the signal peptide sequence for the E2 protein (E2 SS) are mapped at amino acids 28 to 56 and 278 to 298, respectively (13, 48). A 3FLAG tag (filled triangle) was fused at the N terminus. (B) A schematic diagram of the whole capsid protein and its C-terminally truncated mutants used in coimmunoprecipitation assays. mCherry protein was fused at the C terminus. (C) Coimmunoprecipitation assays of the whole capsid protein or the series of N-terminally truncated mutants with ^{AG1}p150. 293T cells were cotransfected with plasmids expressing the series of the capsid proteins and ^{AG1}p150. The proteins were precipitated on agarose beads conjugated with an anti-FLAG antibody, and the input samples were analyzed by immunoblotting with an anti-AG1 antibody (for ^{AG1}p150) or an anti-FLAG antibody (for the capsid proteins). The asterisk indicates the mass of the IgG light chain. The panel shows data representative of results from three independent experiments. (D) Coimmunoprecipitation assay of the whole capsid protein or a series of C-terminal mutants with ^{AG1}p150. Coimmunoprecipitation assay and immunoblotting were performed as described in the legend to panel C. The asterisk indicates the mass of the IgG heavy chain. The panel shows data representative of results from three independent experiments.

precipitated poorly with ^{FLAG}C₅₁₋₃₀₀ and ^{FLAG}C₁₋₃₀₀ containing mutations M9A, L12A, L16A, L23A, or 20P21 (^{FLAG}C₁₋₃₀₀-M9A, -L12A, -L16A, -L23A, or -20P21, respectively), whereas ^{AG1}p150 precipitated efficiently with ^{FLAG}C₁₋₃₀₀ containing the mutation E10A (^{FLAG}C₁₋₃₀₀-E10A) (Fig. 3D). The COILS program also predicted two potential coiled-coil domains in p150, in amino acid regions 438 to 453 and 946 to 959. The p150 protein may use these regions to interact with the capsid protein. However, a truncated form of p150 (p150₁₋₄₃₈), lacking both potential coiled-coil domains, retained the ability to interact with the capsid protein (data not shown).

To obtain further evidence of the capsid-p150 interaction, the intracellular distribution patterns of the capsid protein and p150 were analyzed with IICM. Vero cells were transfected with plas-

mids expressing the individual capsid proteins (C₁₋₃₀₀, ^{FLAG}C₁₋₃₀₀, ^{FLAG}C₅₁₋₃₀₀, and ^{FLAG}C₁₋₃₀₀-20P21, -M9A, -E10A, -L12A, -L16A, and -L23A) singly or together with a plasmid expressing p150/AG1. As reported previously (9), filamentous structures were observed even when p150/AG1 was expressed alone (Fig. 3E, top right). C₁₋₃₀₀ was diffusely distributed in the cytoplasm when expressed alone (Fig. 3E, top left) but was redistributed to the filamentous structures together with p150/AG1 when they were coexpressed (Fig. 3E, lower panels). The distribution pattern of ^{FLAG}C₁₋₃₀₀ was similar to that of C₁₋₃₀₀ (Fig. 3E, lower panels). However, the mutant capsid proteins with no or reduced p150-interacting capacity (^{FLAG}C₅₁₋₃₀₀ and ^{FLAG}C₁₋₃₀₀-20P21, -M9A, -E10A, -L12A, -L16A, and -L23A) were diffusely distributed in the cytoplasm, independently of the filamentous structures of p150/

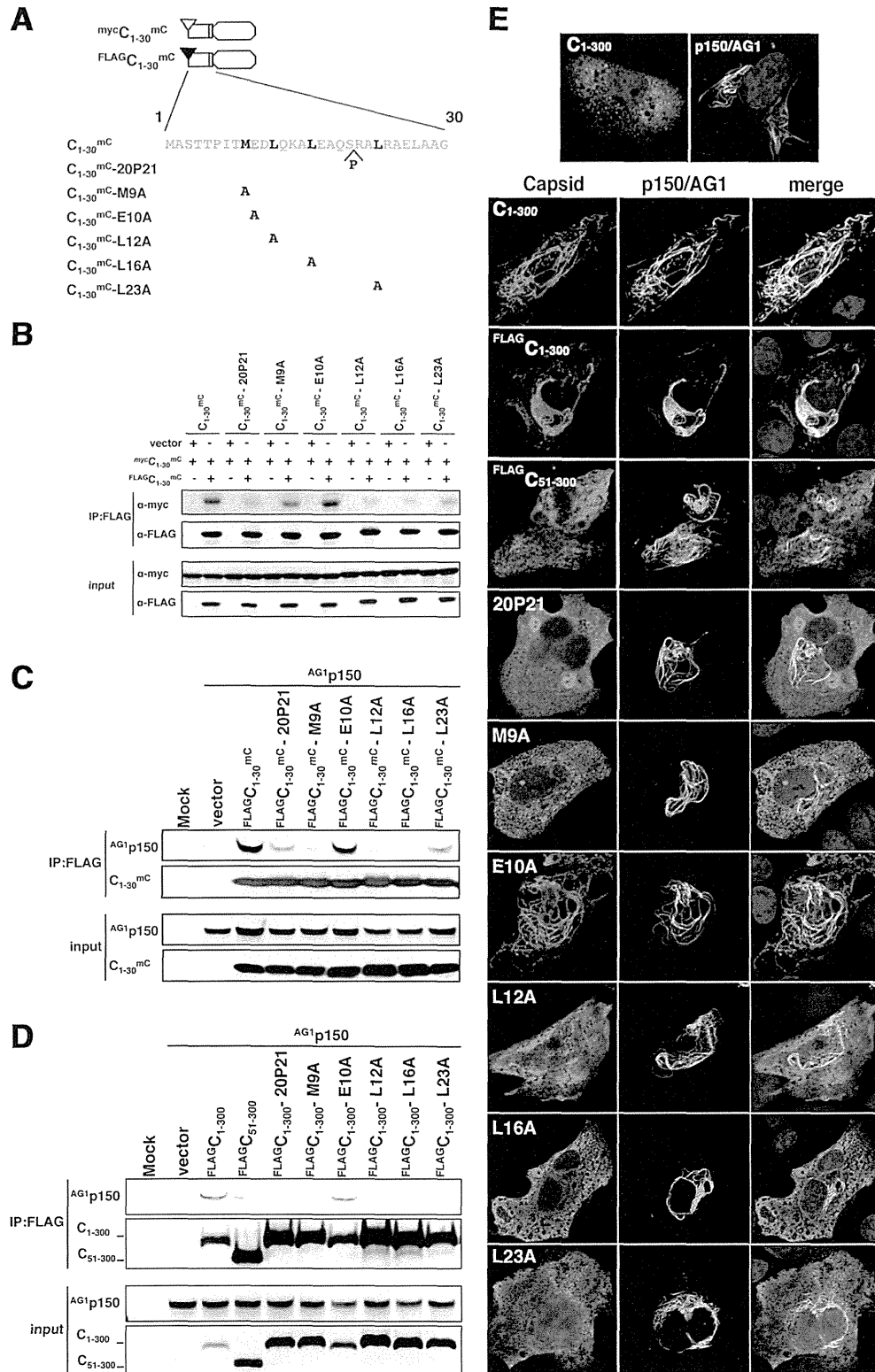


FIG 3 The 30 N-terminal amino acids in the capsid protein have a self-interacting capacity that correlates with the capsid-p150 interaction. (A) Schematic diagram of proline insertion and alanine substitution mutants in the N-terminal region of the capsid protein. A single insertion or substitution was introduced into C₁₋₃₀^{mC} tagged with either 3Myc or 3FLAG at the N terminus. (B) Coimmunoprecipitation assay of a series of FLAG/mycC₁₋₃₀^{mC} mutants. 293T cells were cotransfected with plasmids expressing a series of FLAG/mycC₁₋₃₀^{mC} constructs (FLAGC₁₋₃₀^{mC} or FLAGC₁₋₃₀^{mC}-20P21, -M9A, -E10A, -L12A, -L16A, or L23A) or plasmids expressing mycC₁₋₃₀^{mC} containing the same mutations as FLAGC₁₋₃₀^{mC}. The precipitates bound to agarose beads conjugated with an anti-FLAG antibody