

3. C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構

鈴木 哲朗, 政木 隆博, 相崎 英樹

国立感染症研究所ウイルス第二部

効率のよいウイルス産生細胞系が確立されていなかったため、C型肝炎ウイルス（HCV）の生活環研究の中で感染粒子の形成機構に関する解析は最も遅れていた。JFH-1株の出現により、感染から分泌までウイルス生活環全体に亘る解析が可能となり、粒子形成の分子機構研究が大きな展開を見せている。細胞内の脂肪滴及びその周辺の膜構造が粒子形成の場として働くことが示された。我々は、ゲノム複製調節に関与することが知られていたHCV非構造蛋白NS5Aが粒子形成にも関与することを示し、粒子形成の初期過程において、新たに作られたウイルスRNAがNS5A蛋白によって捕捉され、更にこのNS5A-HCV RNA複合体がCore蛋白と会合することがRNAパッケージングの引き金になるというモデルを提唱した。また、感染性粒子表面のコレステロール、スフィンゴ脂質が粒子構造の維持、感染性に重要であることを示す知見を得た。ウイルス非構造蛋白、脂質、脂質結合因子がHCV粒子のアセンブリー、輸送などにどのように関与しているかを明らかにすることが粒子形成機構研究の鍵になるものと思われる。

はじめに

「レプリコンシステム」「シュードタイプウイルス」[JFH-1株]これらはこの10年間のHCV研究の進展に大きく寄与した実験手法、研究材料である。HCVの生活環に関する基礎研究は、効率のよい培養細胞系が確立されていなかったため必ずしも順調には進んでいなかった。1999年にはじめてHCV RNA複製実験系としてレプリコンシステムが導入され、ゲノム複製機構に関する研究が大きな進展をみせた。また、レトロウイルスまたは水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ蛋白質を欠損させ、代わりにHCVのエンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプウイルスは感染モデルとして有用であることがわかった。そして2005年、HCV JFH-1株を用いた効率のよい感染増殖細胞系が確立されるに至り、長らく困難を極めた感染から分泌まで

の全ステップの分子機構の研究が可能となった。

HCV培養細胞系の試みと感染増殖細胞系の樹立

C型肝炎患者血清中のHCVを培養細胞に感染させウイルス増殖細胞系を作製する方法はHCVゲノム発見当初から試みられてきた。生体内での標的細胞である肝細胞を由来とする細胞株、またリンパ球系細胞で数多く感染、複製が調べられたが、観察できるウイルス量は低いレベルであり、詳細なウイルス研究への応用は難しい状況であった。我々は、三次元化細胞培養システムであるラジアルフロー型バイオリアクター（RFB）及び温度感受性ハイドルゲル（TGP）を利用してHCV培養細胞系の構築を行った。単層培養系に比べより本来の肝組織に近い立体的な培養環境化の方が肝炎ウイルスの感染増殖に適しているのではないかという発想であった。実際に、これらの三次元培養系では細胞あたりのアルブミン産生、分泌能や肝特異的薬物代謝酵素の発現が亢進していること、極性細胞の特徴である細胞間ジャンクション構造が形成されることが示されている^{12, 17, 20, 24}。RFB培養肝細胞株に患者血清感染、またHCVゲノムcDNAをトランスフェクションし高密度培養を行うことでウイルスの複製増殖を確認した¹。さらに、遺伝子型1bのダイシストロニックゲノム（全長レプリコン）を保持した細胞株をTGP培養することで単層培養系では認め

連絡先

〒 東京都新宿区戸山 1-23-1
国立感染症研究所ウイルス第二部
TEL: 03-5285-1111
FAX: 03-5285-1161
E-mail: tesuzuki@nih.go.jp

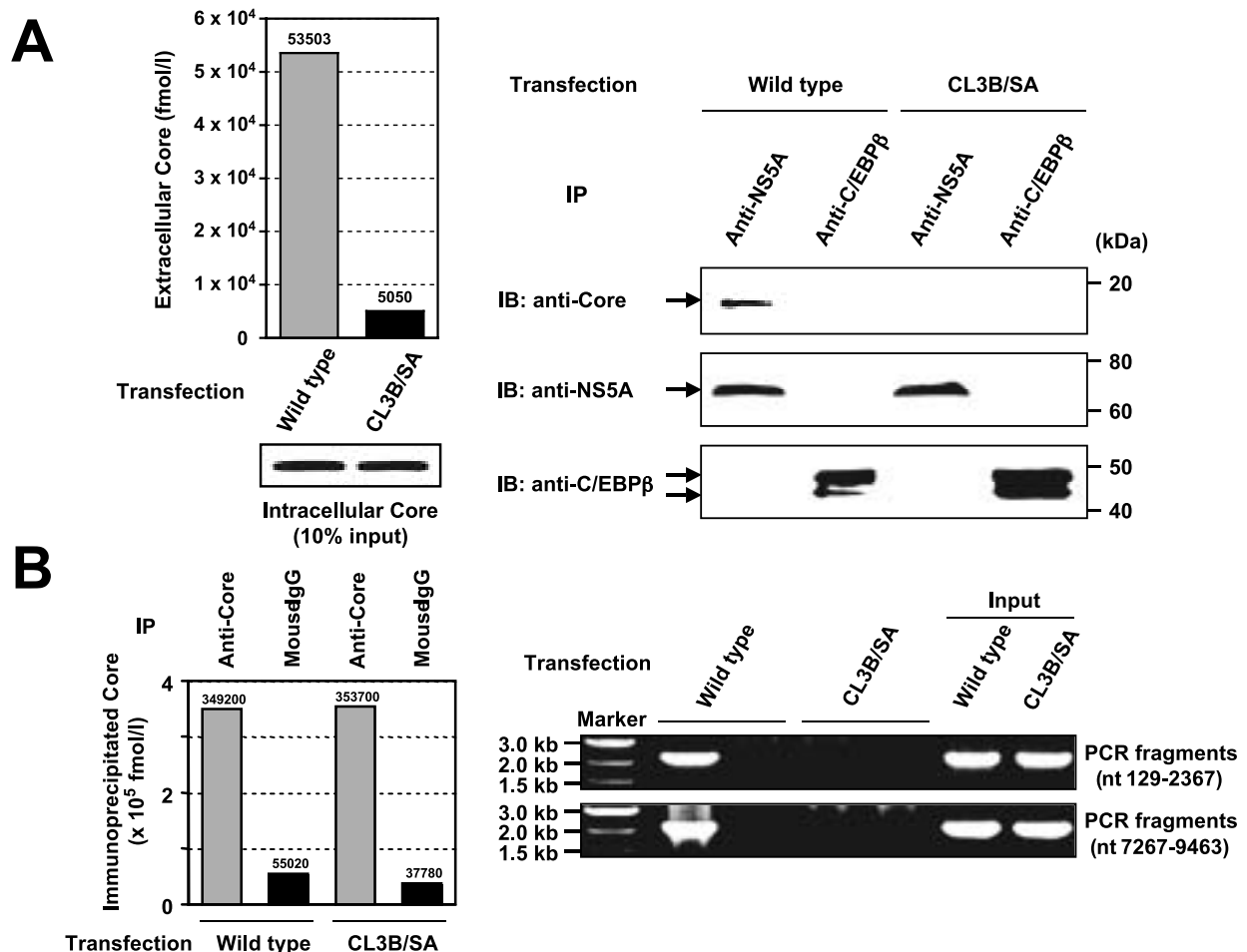


図1 NS5A domain III 変異が HCV 産生, Core-NS5A 相互作用, Core-associated viral RNA へ及ぼす影響

(A) NS5A domain III cluster 3-B のセリン/アラニン置換変異を持つ JFH-1 ゲノム (CL3B/SA) または野生型ゲノムを導入した Huh-7 細胞の細胞内ウイルス蛋白レベル (Intracellular Core) と細胞外分泌ウイルスレベル (Extracellular Core) を調べた (左図). これらの HCV 発現細胞ライセートを抗 NS5A 抗体で免疫沈降し抗 Core または抗 NS5A 抗体でウェスタンブロッティングを行った (右図). (B) 免疫沈降-RT-PCR 法による Core-associated HCV RNA の検出.

られなかったウイルス粒子の産生を観察した²⁴⁾. しかしながら, 依然としてその HCV 増殖レベルは必ずしも高いものではなく, よりウイルス産生効率にすぐれ, 汎用性の高い培養系の登場が待望されていた.

JFH-1 株は, 遺伝子型 2a の劇症患者の急性期血清から単離された HCV クローンで, レプリコンシステムによる解析から, 他の多くのクローンで見られるような適応変異を伴わずに高いゲノム複製効率を有することが示された^{15,16)}. 次に, JFH-1 株の全長 cDNA から合成された RNA をヒト肝癌細胞株 Huh-7 (通常の単層培養) へ導入することで, 感染性粒子の産生, 分泌が観察され, この HCV 粒子はチンパンジーにも感染性を有することも示された³²⁾. さらに, 感染実験に HCV 複製感受性の高い Huh-7 由来細胞株 (Huh7.5, Huh-7.5.1) を用いることで, 感染力価 10^4 - 10^5 の培養上清が得られること, 感染後 2-3 週間でほぼ 100% の

細胞が HCV 陽性となること, が明らかとなった^{18,33)}.

HCV 粒子形成における非構造蛋白 NS5A の役割

現在, このようにして確立された JFH-1 株による HCV 感染増殖細胞系を用いて, HCV 生活環の研究が活発に行われている. 粒子形成の分子機構に関するこれまでの研究成果の中で最もインパクトを与えたものは, HCV の粒子形成には細胞内脂肪滴が重要な役割を果たすという発見である²²⁾. かねてから, 構造蛋白 Core の一部が細胞の脂肪滴に存在することが知られていたが, 非構造蛋白の細胞内局在を詳細に調べた結果, NS5A 蛋白などが小胞体の他に脂肪滴近傍にも存在すること, 脂肪滴周辺で Core 蛋白を取り巻くようにして非構造蛋白が存在することが見出された. さらに, 脂肪滴と会合できないような変異ゲノムを発現させたところ, 感染性 HCV 粒子は産生されなくなることが示さ

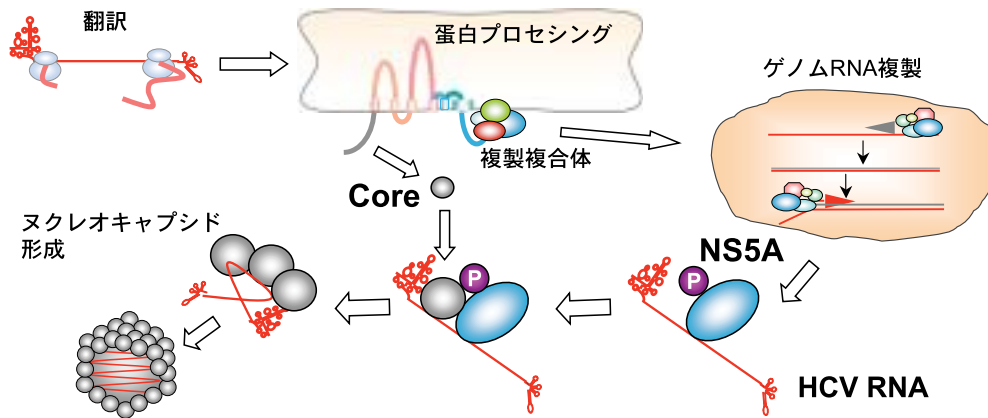


図2 HCV 粒子形成初期過程における NS5A 蛋白の役割のモデル

前駆体蛋白からプロセッシングされた HCV 蛋白のうち、非構造蛋白 (NS3, 4A, 4B, 5A, 5B) は宿主因子とともに複製複合体を形成しゲノム RNA 複製を行う。新生された HCV RNA と NS5A 蛋白との複合体が Core 蛋白と会合することがヌクレオキャプシド形成の引き金になる。

れた。

一方、HCV ゲノム複製を可視化する試みから、NS5A 蛋白の C 末端領域 (domain III ; 後述) に In-frame で GFP を挿入することにより、ゲノム複製細胞が簡単にモニターできることがレプリコンシステムで示された^{4,23)}。同様の解析は全長ゲノム発現系でも行われ、確かにこのような変異体からウイルスの産生は観察されるものの、その産生効率は野生型に比べ明らかに低下しているようであり²⁶⁾、我々もそれを確認した。そこでこれらの知見から、NS5A 蛋白、特にその C 末端領域は HCV 粒子形成になんらかの役割を担っているのではないかと考えた。

NS5A はリン酸化蛋白で、低リン酸化型 (56 kDa) と高リン酸化型 (58 kDa) が存在し、HCV ゲノム複製に必須であることが示されている。3 種類のドメイン構造を有し、N 末端側の domain I は立体構造が解かれ RNA 結合能を有する。Domain II にはインターフェロン感受性に関係する ISDR (Interferon sensitivity determining region) が含まれているが、domain II, III とも構造、機能について十分に解析されていない。NS5A domain III には、リン酸化に関与するセリン残基のクラスターが二ヶ所 (cluster 3-A, 3-B) 存在し、これらは HCV クローン間でよく保存されている。我々は domain III のリン酸化がウイルス産生に及ぼす影響を調べるため、種々の部分欠損または置換変異体を構築し、ゲノム複製、粒子産生能を解析した。その結果、cluster 3-B の 3 セリン残基のうち、任意の 2 残基または 3 残基をアラニンへ置換することにより、ゲノム複製は野生型と同等であるものの、産生されるウイルス量が顕著に低下することを見出した。また、このような変異に伴って NS5A 蛋白のリン酸化レベルが低下することも確認した¹⁹⁾。

NS5A domain III の変異が HCV 生活環のどのステップ

に影響を及ぼすのかを調べることによって、粒子形成機構における NS5A 蛋白の機能解明につながるものと思われる。前述のように、NS5A 蛋白と Core 蛋白は脂肪滴周辺領域での近接して存在することが観察されていることから、NS5A 蛋白は Core 蛋白と結合しうるのではないかと考えた。そして実際に NS5A は Core 蛋白と相互作用すること、ウイルス産生が低下する cluster 3-B 変異体では Core 蛋白と結合できなくなること (図 1A)、またこの変異によって NS5A 蛋白は脂肪滴周辺膜に局在できなくなることを見出した¹⁹⁾。

NS5A 蛋白はゲノム複製複合体を構成し、RNA 結合能を有している^{9,29)}。そこで、NS5A 蛋白が粒子形成に関与する分子機構として、複製複合体で新生されたウイルスゲノムが NS5A 蛋白に捕捉され、さらに NS5A-Core 蛋白相互作用によってゲノム RNA がヌクレオキャプシドの場合ヘリクルートされる、という作業仮説を考えた。これを検証するため、HCV ゲノム発現細胞のライセートを抗 Core 抗体で免疫沈降しさらにこの沈降物中の HCV RNA を long RT-PCR 法で検出した。その結果、野生型ゲノムの場合 Core 蛋白アソシエート HCV RNA が検出されたのに対し、cluster 3-B 変異ゲノムでは検出されなかった (図 1B)¹⁹⁾。この結果は、NS5A 蛋白の cluster 3-B の変異によって Core-HCV RNA の会合が影響を受けることを示しており、NS5A-HCV RNA 複合体が Core 蛋白と会合することが Core 蛋白によるゲノムパッケージングの引き金になることを示唆している (図 2)。

HCV NS5A 蛋白の domain III が粒子形成にとって重要であるという知見は、最近、米国とドイツのグループからも報告された^{5,30)}。粒子形成を左右するセリン残基 (の一つ) が casein kinase II でリン酸化される可能性が示されているが、今後、NS5A 蛋白のリン酸化制御とウイルス粒

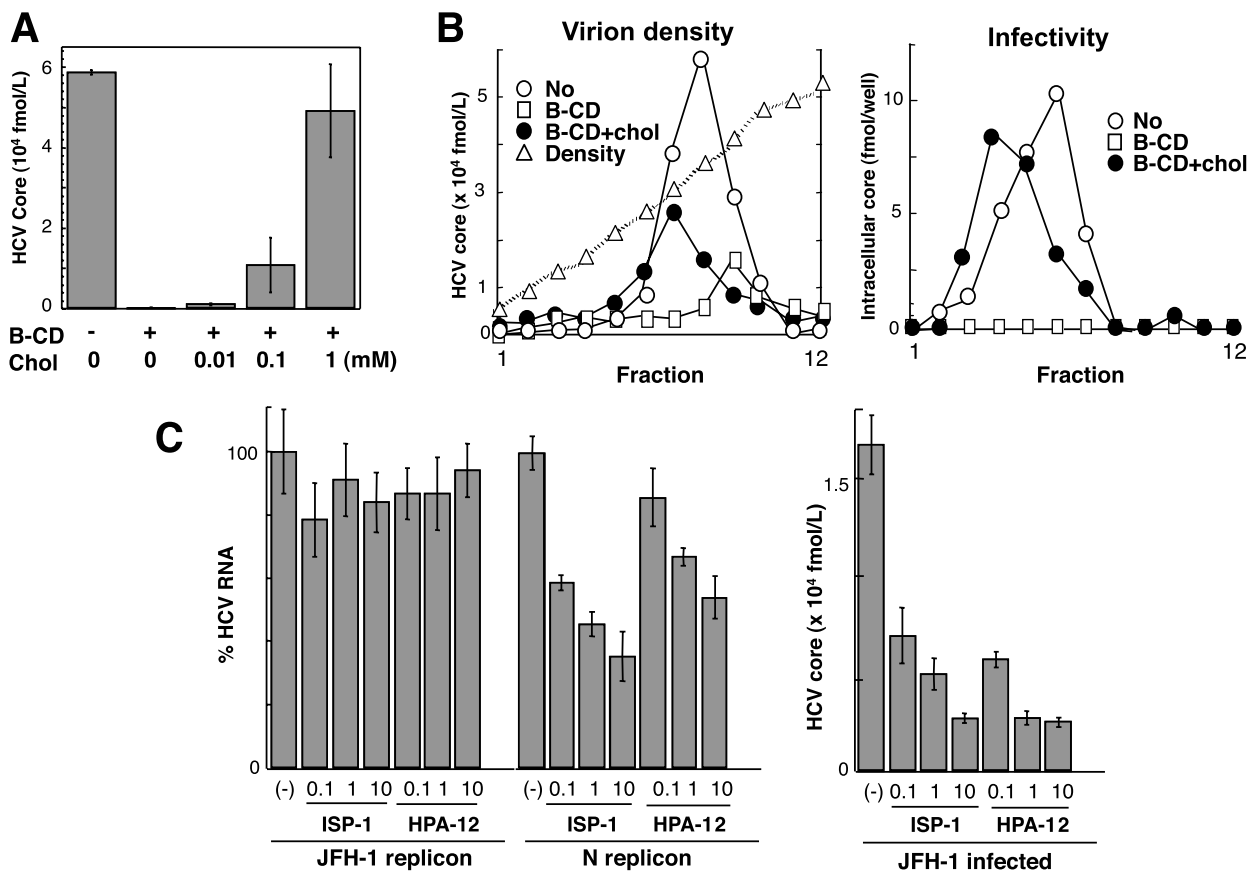


図 3 HCV 粒子表面コレステロールが粒子構造, 感染性へ及ぼす影響 (A, B) 及びスフィンゴ脂質合成阻害剤による HCV 産生阻害 (C)
 (A) 培養上清 HCV を 5 mg/ml B-CD 処理した後, コレステロール (Chol) を添加した. 超遠心操作により薬剤を除去し Huh-7 細胞に感染させ, 3 日後の細胞内 Core 量を測定した. (B) 培養上清 HCV を B-CD 未処理, 処理, または処理後 Chol を添加し, ショ糖密度勾配遠心分画した. 各分画中の Core 量を測定し (左図), また, 各分画サンプルを Huh7 細胞に感染させ 3 日後の細胞内 Core 量を測定した (右側). (C) HCV レプリコン細胞 (JFH-1 replicon, N replicon), JFH-1 感染細胞に myriocin /ISP-1 または (1R,3R)-N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl) dodecanamide (HPA-12) を加え 3 日間培養した. 細胞内の HCV RNA または Core 量を測定した.

子形成との関連を明らかにしていくことが重要になると思われる. また, NS5A-Core 相互作用様式の詳細を解明することによって, HCV 粒子形成を選択的に阻害する新たな治療薬の開発へ道が拓かれるものと期待される.

HCV 粒子構造, 感染性における粒子脂質成分の役割

エンベロープウイルスは小胞体, ゴルジ体, 形質膜などの細胞の生体膜を被って出芽するため, 細胞の膜脂質はウイルス粒子形成に重要な役割を果たしているものと考えられる. さらに, ウイルス粒子の膜脂質が宿主細胞への感染過程に参与する例も報告されている⁷⁾. しかし, HCV 粒子に含まれる脂質成分については解析が進んでおらず, その生理学的役割も不明であった. そこで我々は, 培養細胞で産生させた HCV JFH-1 粒子を, 培養上清から, 限外濾過, ショ糖密度勾配超遠心, ヘパリンアフィニティクロマトグ

ラフィを組み合わせて, 濃縮, 粗精製し, この HCV 粒子に含まれる脂質を生化学的に解析した. その結果, コレステロール/リン脂質モル比が細胞の膜分画に比べて有意に高値を示したことから, コレステロールに富んだ生体膜からの出芽, または粒子形成, 分泌過程でのコレステロールとの会合の可能性が考えられた³⁾.

次にこの HCV 粒子上の膜脂質がどのような役割を果たしているかを調べるため, HCV 粒子表面を methyl- β -cyclodextrin (B-CD) で処理してコレステロールを除去した後感染させたところ, B-CD の容量依存的に感染性が低下し, B-CD 処理した粒子にコレステロールを添加したところその感染性は回復した (図 3A)³⁾. また, コレステロールと親和性が高いスフィンゴ脂質の主要分子スフィンゴミエリンを加水分解する sphingomyelinase (SMase) で HCV 粒子を処理することにより感染性の低下を観察した³⁾. こ

これらのことは HCV genotype 1b のエンベロープを持つシュードタイプウイルスやキメラウイルスでも確認できた。以上から、ウイルス粒子表面のコレステロールとスフィンゴ脂質はウイルスの遺伝子型によらず感染に重要な役割を果たしていることが示された。

次に、HCV 粒子上のコレステロールが粒子の物性に与える影響を調べた (図 3B, C)。HCV 産生細胞の培養上清をシヨ糖密度勾配遠心分画すると Core 蛋白及び HCV RNA のピークは 1.17 g/ml 分画、感染性のピークは 1.13 g/ml 分画となる。このように、感染性のピークがウイルス遺伝子のそれに比べ低密度側に存在することは培養細胞系で作製した HCV の特徴の一つであるが、濃縮したこの培養上清を B-CD 処理しコレステロール除去後に同様に遠心分画を行うと、Core 蛋白のピークは 1.20 g/ml 分画に移行し、感染性はいずれの分画も検出限界以下であった。さらに、B-CD 処理後の培養上清にコレステロールを添加すると Core 蛋白のピークは低密度側へシフトし感染性も回復した³⁾。このようなコレステロールの除去&添加による loss- and gain-of-function は 5 mg/ml B-CD 処理で観察されるが、B-CD 濃度を 10 mg/ml へ上げた場合はコレステロール添加によって感染性の回復は見られない。これらのことから、HCV 粒子表面のコレステロールは粒子構造の維持に役立っており、コレステロールを完全に除去してしまうと粒子構造は致命的なダメージを受ける、これに対し、部分的に除去した場合の構造変化は感染性を低下させるものの、その変化は再生可能なレベルである、と考えられた。

次に、HCV 粒子上のコレステロールまたスフィンゴ脂質が感染過程のどのステップに関与するのかを解析した。あらかじめコレステロール除去または SMase 処理を行った HCV 粒子の宿主細胞への吸着性は未処理ウイルスと同等であったのに対し、吸着後の細胞内への取り込みは、これらの前処理を施した HCV で顕著な低下が認められた³⁾。レセプター蛋白分子とともに標的細胞内へウイルスが侵入する過程に粒子コレステロール、スフィンゴ脂質が関与する可能性が示された。

HCV ゲノムは、脂質ラフトの特徴である界面活性剤不溶性の膜分画で複製することが示され^{2, 27)}、HCV genotype 1 のゲノム複製細胞また HCV が増殖するヒト肝細胞キメラマウスに脂質ラフト構成成分であるスフィンゴミエリンの合成阻害剤 myriocin/ISP-1 を添加、投与することによって、HCV 複製効率は顕著に低下することが報告されている^{25, 31)}。この myriocin/ISP-1 またはセラミド輸送阻害剤 HPA-12 を HCV N 株 (genotype 1b) また JFH-1 株のサブゲノムレプリコン細胞に加えることによって、N 株では HCV ゲノム複製は阻害されるものの、JFH-1 株では予想に反して複製の低下はほとんど認められなかった。しかしながら、興味深いことに、JFH-1 のウイルス産生系では両薬剤の容量依存的に HCV 産生は抑制された (図 3C)³⁾。スフ

ィンゴ脂質合成阻害剤の抗 HCV 効果の作用機序として HCV ゲノム複製阻害だけでなく粒子形成あるいは感染過程へも介入しうることが示唆された。

おわりに

「ウイルス非構造蛋白」「脂質」は HCV の粒子形成制御に関する代表的なキーワードとなった。本稿では NS5A 蛋白が粒子形成過程にどのように働くかを紹介したが、最近、別の非構造蛋白で前駆体蛋白のプロセッシングを担っている NS2 がやはり粒子形成にも関与することが報告された^{11, 13, 14, 28)}。しかしながらその分子機構は現在まったくと言ってよいほど不明である。一方、脂質成分、脂質代謝と HCV 生活環の関連についての興味深い知見として、ウイルス産生におけるアポリポ蛋白、VLDL/LDL の重要性が示されている^{6, 8, 10, 21)}。脂肪滴周辺膜構造を起点とする HCV の粒子形成過程に介在する宿主蛋白の輸送・分泌経路—おそらく脂質関連分子が含まれる—を明らかにすることは、HCV のアセンブリー、出芽から細胞外への放出までの過程を制御する分子機構の解明に直結するものと思われる。

文献

- 1) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM.: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-461, 2004.
- 2) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T.: Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314: 16-25, 2003.
- 3) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol.* 82: 5715-5724, 2008.
- 4) Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R.: Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* 79: 3187-94, 2005.
- 5) Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, Engel U, Bartenschlager R.: Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4: e1000035, 2008.
- 6) Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* 81: 13783-13793, 2007.
- 7) Chazal N, Gerlier D.: Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 226-37, 2003.

- 8) Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 82: 2120-2129, 2007.
- 9) Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE.: Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 280: 36417-28, 2005.
- 10) Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 5848-53, 2007.
- 11) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 371: 446-450, 2008
- 12) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T.: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* 37: 665-673, 2003.
- 13) Jirasko V, Montserrent R, Appel N, Janvier A, Eustachi I, Brohm C, Steinmann E, Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R.: Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 283: 28546-28562, 2008.
- 14) Jones CT, Murray CL, Eastmann DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 81: 8374-8383, 2007.
- 15) Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T.: Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125: 1808-1817, 2003.
- 16) Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T.: Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol.* 64: 334-339, 2001.
- 17) Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Mizutani S, Ikenaga H.: Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34: 109-115, 1998.
- 18) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626, 2005.
- 19) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T.: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol.* 82:7964-76, 2008.
- 20) Matsuura T, Kawada M, Hasumura S, Nagamori S, Obata T, Yamaguchi M, Hataba Y, Tanaka H, Shimizu H, Unemura Y, Nonaka K, Iwaki T, Kojima S, Aizaki H, Mizutani S, Ikenaga H.: High density culture of immortalized liver endothelial cells in the radial-flow bioreactor in the development of an artificial liver. *Int J Artif Organs* 21: 229-234, 1998.
- 21) Meunier JC, Russell RS, Engle RE, Faulk KN, Purcell RH, Emerson SU.: Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol.* 82: 9647-9656, 2008.
- 22) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097, 2007.
- 23) Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, Lindenbach BD, Rice CM.: Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol.* 78: 7400-7409, 2004.
- 24) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T.: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351:381-392, 2006.
- 25) Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M.: Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol.* 1: 333-337, 2005.
- 26) Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R.: Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol.* 81: 4591-603, 2007.
- 27) Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang, and M. M. Lai. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol.* 77:4160-8, 2003.
28. Steinmann E, Brohm C, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T.: Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol.* 82: 7034-7046, 2008.
- 29) Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM.: Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435: 374-9, 2005.
- 30) Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J.: Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 4: e1000032, 2008.
- 31) Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M.: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse mod-

- el. *Biochem Biophys Res Commun.* 346: 67-73, 2006.
- 32) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11: 791-796, 2005.
- 33) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV.: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 9294-9299, 2005.

Involvement of nonstructural protein 5A and lipids on production of hepatitis C virus particles

Tetsuro SUZUKI, Takahiro MASAKI, Hideki AIZAKI

National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama,
Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640
tesuzuki@nih.go.jp

A robust system for production of recombinant infectious hepatitis C virus (HCV) has been established in 2005 and classical virological techniques are now able to be applied to the HCV research, especially regarding molecular mechanisms on virion assembly and maturation. We recently demonstrated that the C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A interaction with Core and the subcellular localization of NS5A. Mutation of this cluster blocks the NS5A-Core interaction, resulting in perturbation of association between Core and HCV RNA. It is thus tempting to consider that NS5A plays a key role in transporting the viral genome RNA synthesized by the replication complex to the surface of lipid droplets (LDs) or LD-associated membranes, where Core localizes, leading to facilitation of nucleocapsid formation. We also demonstrated an important role of cholesterol and sphingolipid in HCV infection and virion maturation. Specifically, mature HCV particles are rich in cholesterol. Depletion of cholesterol from HCV or hydrolysis of virion-associated sphingomyelin results in a loss of infectivity, and the addition of exogenous cholesterol restores infectivity. In addition, cholesterol and sphingolipid on the HCV membrane play a key role in virus internalization. Finally, inhibitors of the sphingolipid biosynthetic pathway efficiently block virion production.

