

1. ウイルスベクターの開発とウイルスの感染機構解析への応用

谷 英 樹

大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野
現所属:国立感染症研究所ウイルス第一部第一室

ウイルスは特定の生物の細胞内でのみ増殖可能な偏性細胞内寄生性微生物の一つとして定義付けられている。この性質を巧みに利用し開発されたウイルスベクターは、医学生物学の基礎研究から遺伝子治療への応用まで広範な分野で利用されている。私たちの研究グループではこれまでに、バキュロウイルスと水疱性口内炎ウイルス (VSV) の特徴を生かしたベクターの開発に取り組んできた。バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞用ベクターの開発により、従来のバキュロウイルスベクターより効率良く細胞や個体へ遺伝子導入することが可能となった。また、VSVを用いて、C型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、バキュロウイルス等のエンベロープ蛋白質を搭載したシュードタイプウイルスおよびこれらの遺伝子を VSV のゲノムに組み込んだ組換え VSV を作製し、エンベロープ蛋白質の性状および細胞内への侵入機構を解析した。

はじめに

ウイルスをベクターとして利用する技術は古くから、現在までに実に多くのウイルス種においてウイルスベクターの開発が行われている。一般的にウイルスベクターは、ウイルスが本来持つ病原性や増殖性に関わる遺伝子などを取り除き、目的とする外来遺伝子を組み込むことで、安全且つ効率良くターゲットとなる組織や細胞に目的蛋白質を発現させることに用いられている。近年、ウイルスベクターは遺伝子治療の道具として臨床的にも応用され、また最近話題の ES 細胞や iPS 細胞への遺伝子導入にも用いられている。また、ある種のウイルスの増殖性や利便性を利用してこれらに目的とする他のウイルスのエンベロープ蛋白質を被わせて、本来のウイルスに見立てたウイルスベクターの開発も行われている。これはシュードタイプウイルスと呼ばれており、水疱性口内炎ウイルス (VSV) やレトロウ

イルス、レンチウイルスなどに、様々なウイルスのエンベロープ蛋白質を被わせたシュードタイプウイルスが、細胞侵入機構の解析やワクチンベクターの開発に用いられている。本稿では、数あるウイルスベクターの中で、バキュロウイルスと VSV を用いたベクターの開発と応用について紹介したい。

I. バキュロウイルスベクター

バキュロウイルスベクターは外来蛋白質を昆虫細胞で効率よく産生できる発現系として広く用いられてきたが、哺乳動物細胞にも複製することなく、外来遺伝子を導入できることが明らかとなり、遺伝子導入ベクターとしても脚光を浴びてきた^{1,2)}。我々の研究グループでは、バキュロウイルスの哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を向上させるため、バキュロウイルスのエンベロープ蛋白質である GP64 を過剰に、あるいは、VSV や狂犬病ウイルスのエンベロープ蛋白質を被せたバキュロウイルスを作製した³⁾。これらの改変ウイルスは広範な動物細胞に高い遺伝子導入効率を示し、補体による不活化にも抵抗性を示した。また、マウスの脳や精巣にも効率良く目的遺伝子を発現できることが確認された⁴⁾。

a. 哺乳動物細胞への遺伝子導入

バキュロウイルスの哺乳動物細胞への導入は以前より報告されてはいたが、バキュロウイルスの各種プロモーターが哺乳動物細胞ではほとんど機能しないこともあり、遺伝

連絡先

〒 208-0011
東京都武蔵村山市学園 4-7-1
国立感染症研究所ウイルス第一部第一室
TEL: 042-848-7020
FAX: 042-561-2039
E-mail: htani@nih.go.jp

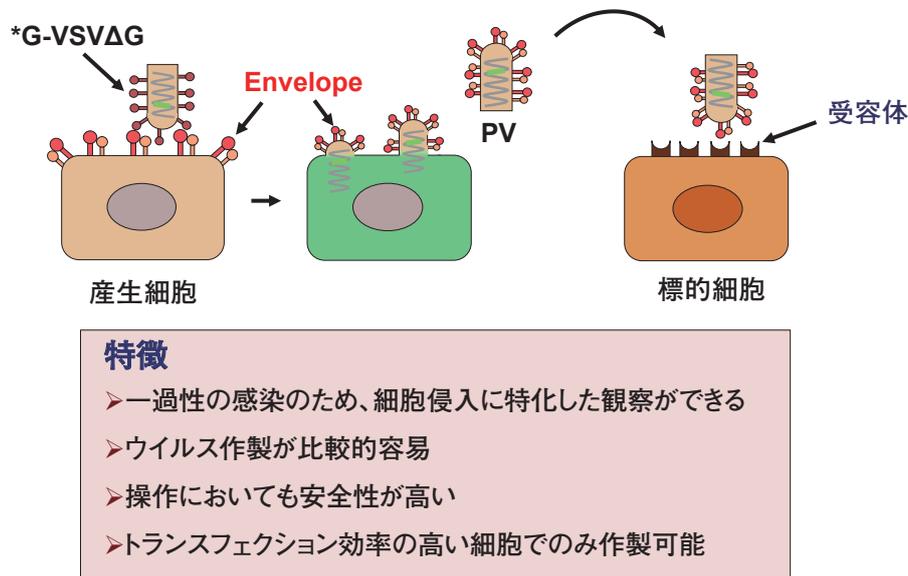


図1 VSV シュードタイプウイルス (pseudotype virus; PV)

産生細胞に一過性に目的とする他のウイルスエンベロップ蛋白質やリガンドを発現させる。そこにゲノム上ではエンベロップ遺伝子を欠損した VSVG 蛋白質を被った親ウイルスを感染させる。そこから出現してきたウイルスは発現した蛋白質を被っており、標的細胞にウイルス受容体もしくはリガンドに対する受容体が発現していれば感染が成立する。このウイルスは標的細胞でも複製し出芽できるが目的蛋白質を被っていないため裸のウイルスとなり次に新たに感染することはできない。

子発現は確認されていなかった⁵⁾。ところが、1995年に哺乳動物細胞で機能するプロモーターを組み込んだバキュロウイルスが肝細胞株に外来遺伝子を効率良く発現できることがわかり^{6,7)}、我々のグループでは広範に発現できるプロモーターを用いることで肝細胞株だけでなく様々な哺乳動物細胞での外来遺伝子の発現を確認できた⁸⁾。しかしながら、全ての哺乳動物細胞株に効率良く遺伝子導入できる訳ではなく、より効率良く遺伝子導入できるようにバキュロウイルスの粒子表面上に自身のエンベロップ蛋白質を過剰に、もしくは VSV や狂犬病ウイルスのエンベロップ蛋白質を被わせたシュードタイプウイルスを作製した³⁾。その結果、これらのシュードタイプウイルスは従来のバキュロウイルスに比べて様々な哺乳動物細胞株において高い外来遺伝子発現が認められた。

b. 動物個体への遺伝子導入

バキュロウイルスの *in vivo* における遺伝子導入は、血液中の補体成分による影響や自然免疫の誘導等により導入できる臓器も限定され、また導入できても非常に効率が悪かった。我々は、上記で作製した他のウイルスエンベロップ蛋白質を被ったシュードタイプバキュロウイルスを用いて様々な臓器への遺伝子導入を試みた結果、VSV のエンベロップ蛋白質 (VSVG) を被ったシュードタイプバキュロウイルスにおいて、マウスの脳組織および精巣のセルトリ細胞で効率良い遺伝子発現が認められた⁴⁾。

c. バキュロウイルスの哺乳動物細胞への侵入機構

バキュロウイルスが自然宿主である昆虫細胞ばかりでなく、哺乳動物細胞においても効率良く感染できることが明らかにされたものの、未だレセプターをはじめ詳細な細胞侵入機構についての解析は進んでいない。そのため我々は、上記の各種シュードタイプバキュロウイルスを用いて、バキュロウイルスの細胞侵入に関与する宿主因子の解析を行った。自身のエンベロップ蛋白質である gp64, VSVG もしくはマウス肝炎ウイルスのエンベロップ蛋白質 (MHV-S) を過剰に被ったシュードタイプウイルスを用いて、それぞれ蛋白質、糖質、脂質の関与を調べたところ、リン脂質分解酵素であるフォスホオリパーゼ C の処理によって濃度依存的に感染効率が減少したことから、バキュロウイルスは何らかのリン脂質を介して哺乳動物細胞に感染しているものと考えられた³⁾。この現象は昆虫細胞においても認められており、バキュロウイルスの感染には深く関与していると思われる。さらに、精製脂質を用いて詳細に解析した結果、フォスファチジン酸とフォスファチジルイノシトールが感染に関与していることが明らかとなった³⁾。最近、バキュロウイルスがマクロピノサイトーシスや脂質ラフトを介して細胞侵入していることが報告されており^{9,10)}、我々も現在、より詳細な脂質分子を介した細胞侵入機構についての解析を行っている。

II. VSV ベクター

VSV はラブドウイルス科ベシキュロウイルス属の RNA

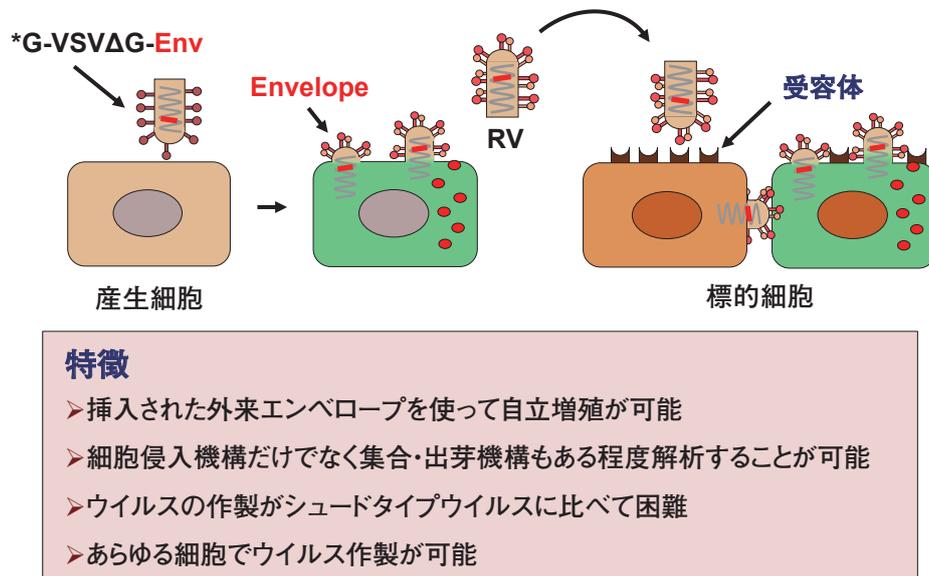


図2 VSV 組換えウイルス (recombinant virus; RV)

ゲノム上に他のウイルスエンベロープ蛋白質遺伝子などの目的遺伝子を挿入しておき、シュードタイプウイルスの親ウイルスと同様に一過性に VSVG 蛋白質を被ったウイルスを産生させたい細胞に感染させる。このウイルスは自身で目的蛋白質を発現させてそれを被って出現する。産生細胞に目的蛋白質に対する受容体などが発現していれば、この細胞がそのまま標的細胞となり、ウイルスは自立複製、増殖することができる。

ウイルスで、約 11kb からなるマイナス一本鎖 RNA ゲノムを保持している。実験室株であるインディアナ株はバイオセーフティレベル (BSL)-2 で取り扱うことが可能で、古くからマイナス鎖 RNA ウイルスの代表的なウイルスとして侵入や複製、出芽機構の研究に用いられてきた。また初期の研究より VSV と他のウイルスを共感染させると VSV が他のウイルスのエンベロープを非選択的に取り込みシュードタイプ化することが知られていた^{11, 12)}。その後、1995 年に VSV はマイナス鎖 RNA ウイルスの中では最初にリバースジェネティクスが確立され、エンベロープ遺伝子を欠損させても、通常の形態を保持したウイルス粒子を大量に産生可能であることが明らかとなった¹³⁾。この性質を利用して、一過的に他のウイルスエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスや、ゲノムに直接他のウイルスエンベロープ遺伝子を挿入して自立増殖することが可能となる組換えウイルス、さらに目的蛋白質を発現させるための発現ベクターやワクチンベクターなどの開発が行われている^{14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)}。

a. シュードタイプウイルスと組換えウイルス

シュードとは本来“偽の”という意味であり、自身のエンベロープ蛋白質の代わりに他のウイルスや目的の蛋白質を一過的に粒子表面に搭載したウイルスをシュードタイプウイルスと呼んでいる。リバースジェネティクス技術の進展により、RNA ウイルスをプラスミド DNA から作製できるようになり、特にレトロウイルスや VSV ではこれら

を基盤としたシュードタイプウイルスの作製に広く利用されている²³⁾。シュードタイプウイルスを利用する大きなメリットとしては、容易に取り扱いが難しい BSL-3 や BSL-4 に属するウイルスを BSL-2 レベルである程度解析できるようになることや、様々な要因から培養細胞で増殖できないウイルスの細胞侵入機構を解析することがあげられる (図 1)。また、VSV ゲノムにはリポーター遺伝子が搭載されているため、このリポーター遺伝子の発現や活性を指標にシュードタイプウイルスや組換えウイルスの感染効率を定量的かつ容易に評価することも可能である。

VSV ではゲノムに外来遺伝子を挿入できるシステムも構築されているために、レトロウイルスシステムでは不可能な外来蛋白質に依存した自立増殖による感染を再現できるようになった。この組換えウイルスは、複製効率の極めて高い VSV を利用するため、本来のウイルスが複製や出芽などの段階で増殖に影響を及ぼすと予想される細胞下でも問題なく、また発現プラスミドの導入効率に左右されるシュードタイプウイルスと異なり様々な細胞で組換えウイルスを作製することができる (図 2)。

b. C 型肝炎ウイルス (HCV) の細胞侵入機構解析への応用

HCV は肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、現在までにインターフェロンやリバビリンの他新規治療薬の開発が進められているものの、本邦において未だ 150 万人以上の感染者が存在し、社会的にも大きな問題となっている。C 型肝炎の征圧には、まず HCV の生活環をより正確に理

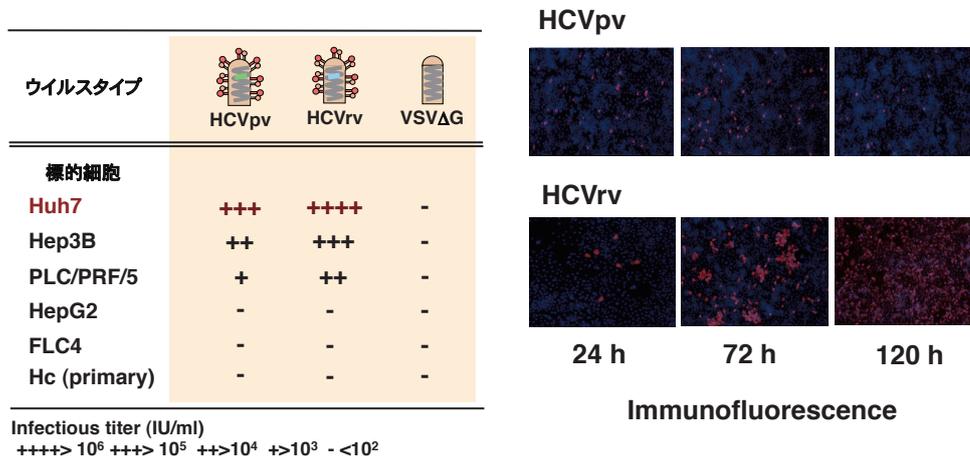


図3 HCVpv と HCVrv の感染性

(左) HCVpv および HCVrv は、様々なヒト肝細胞株において共に Huh7 細胞に最も高い感染性を示した。また HCVpv に比べて HCVrv はより高い感染性を示した。(右) ウイルスの N 蛋白質を特異的抗体を用いて蛍光抗体法で検出したもの(赤色で示す、青色は細胞の核染色)。HCVpv は 120 時間後でも感染が拡大しないのに対して、HCVrv は時間経過とともに感染が拡大していくことが認められた。

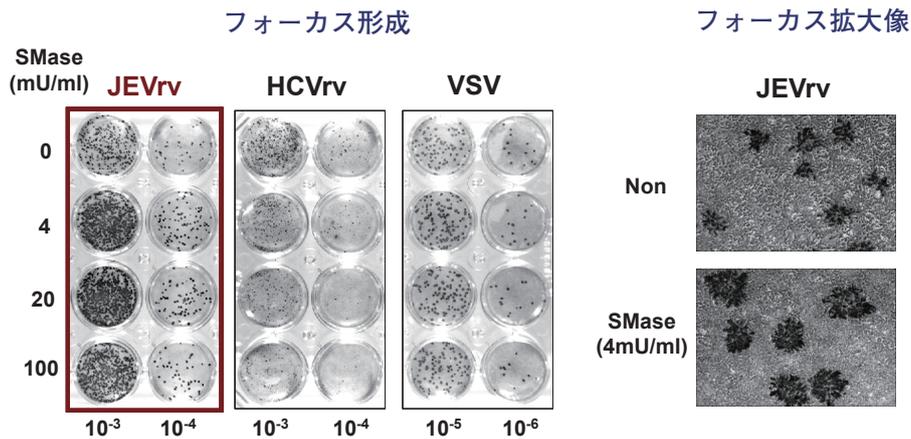
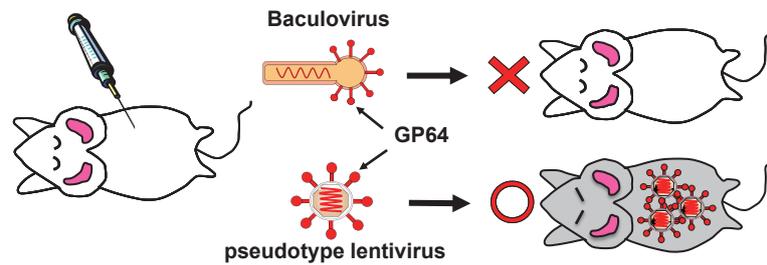


図4 JEVrv は細胞の SMase 処理によって感染性とフォーカスが增大する

JEVrv は SMase 処理細胞において感染性およびフォーカスが增大することが示された。一方、HCVrv や VSV では同様の処理においても影響は認められなかった。

解する必要があるが、現在まで患者血清から直接ウイルスを分離できる細胞培養系が存在しないため、各ステップを評価できる様々なアッセイ法を用いて解析が行われている²⁴⁾。その中で、細胞への侵入過程を解析する方法としてレトロウイルス、レンチウイルスおよび VSV を基盤としたシュードタイプウイルスが用いられてきた^{17, 25, 26, 27)}。HCV のシュードタイプウイルスの作製においては、本来細胞膜表面で出芽するレトロウイルスやレンチウイルス、VSV が、強力な ER 残留シグナルによって ER に存在している HCV のエンベロープ蛋白質をどのように取り込んできているのかは未だに解明できていないものの、感染性を示すシュードタイプウイルスが得られており、このシュードタイプウイルスはエンベロープ蛋白質や受容体候補分子に対する抗

体で感染中和されることから本来の HCV と同様の感染様式を示すものと考えられた²⁸⁾。さらに我々のグループでは HCV のエンベロープ遺伝子を挿入した感染性のある組換えウイルスの作製に成功し、HCV の感染感受性の高いヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞で高い感染性および自立増殖性が確認された(図3)²⁹⁾。また糖鎖修飾阻害剤を用いた解析より感染性粒子を産生するにはエンベロープ蛋白質がハイマンノース型の糖鎖修飾を受ける必要があることが明らかとなった²⁹⁾。VSV ベクターの利点である様々な細胞で組換えウイルスを作製すると、高い感染性を示す組換えウイルスが得られる細胞とほとんど感染性が得られない細胞が存在することも明らかとなった。HCV の出芽機構についてはまだ詳細が明らかになっていないため、こ



バキュロウイルスは容易に血清成分により不活化され、血液に暴露される臓器への遺伝子導入は困難(Sandig et al., 1996, Hofmann and Strauss, 1998)

しかし、GP64を被ったシュードタイプレンチウイルスは血清成分に抵抗性を持ち(Guibinga and Friedmann, 2005)、長期にわたり感染が成立する(Sinn et al., 2005, 2008)

昆虫細胞由来のバキュロウイルスと哺乳動物細胞由来のレンチウイルスの違いは?

→ 両方の細胞で増殖できるVSVを用いれば解析可能!

図5 GP64 を介した in vivo 遺伝子導入

昆虫細胞由来のバキュロウイルスはマウスへの遺伝子導入は困難であるが、GP64を被ったシュードタイプレンチウイルスおよびレンチウイルスは長期にわたりマウスへの遺伝子導入が可能である。この違いを両方の細胞で増殖できるVSVを用いて検討した。

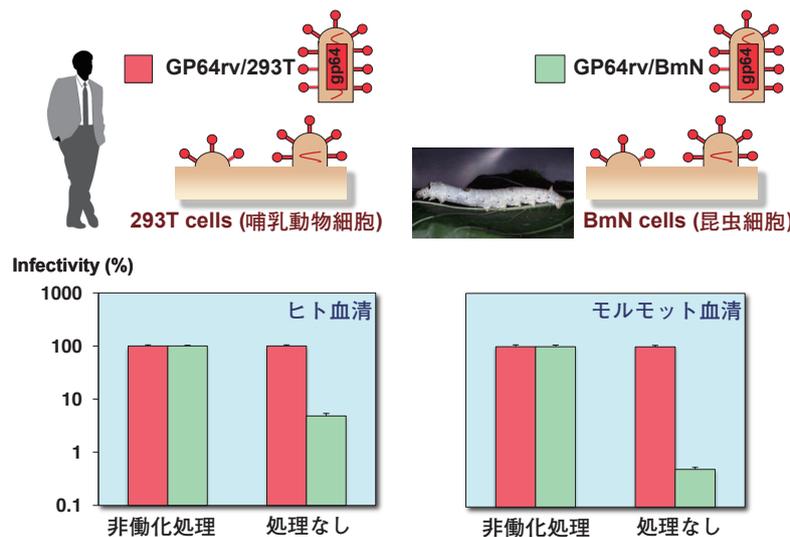


図6 哺乳動物細胞由来の GP64rv は血清に抵抗性を示す

哺乳動物細胞である293T細胞で作製したGP64rvはヒト血清とモルモット血清に対してほとんど感染性が低下しないのに対して、昆虫細胞であるBmN細胞で作製したGP64rvは両血清に対して容易に感染性が低下した。

の要因については不明であるが、感染性粒子の形成もしくは出芽時に細胞側の宿主因子が関与している可能性が示唆される。

c. 日本脳炎ウイルス (JEV) の細胞侵入機構解析への応用

JEVはフラビウイルス科フラビウイルス属のプラス1本鎖RNAウイルスで、遺伝子構造上はHCVにも近縁であると考えられてきた。低頻度ながらもヒトが脳炎を発症すると重症化するためにワクチンによる予防などが重要とさ

れている。JEVの感染機構に関しては不明な点も多く、特に細胞侵入に関しては受容体の同定も含めてまだ解明されていない部分が多い。そこで、VSVベクターを用いてJEVのエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスおよび組換えウイルスを作製し、細胞侵入機構の解析を行った³⁰⁾。ごく最近、JEVの感染にコレステロールが関与しており、過剰にコレステロールをウイルス粒子に添加することで感染が阻害できることが示された³¹⁾。シュー

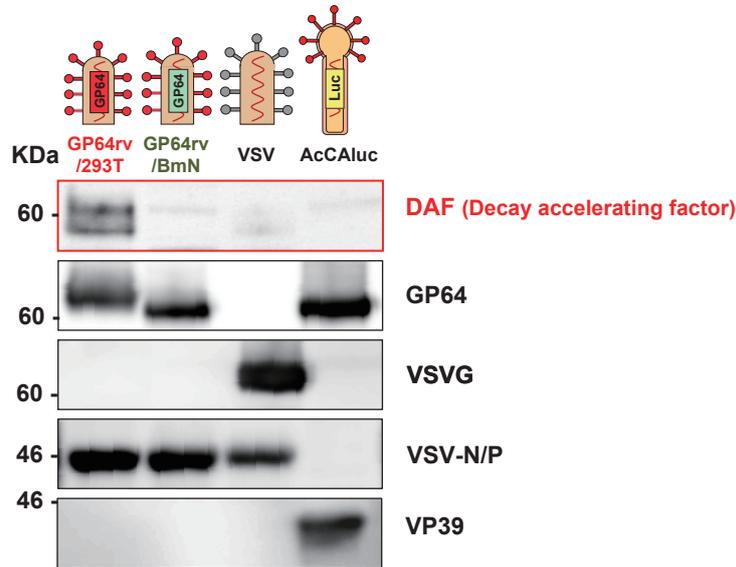


図7 哺乳動物細胞から産生された GP64rv は DAF を取り込む

BmN 細胞から出現した GP64rv や VSV、昆虫細胞由来のパキキュロウイルスの粒子中には DAF は取り込まれていないが、293T 細胞から出現したウイルス粒子中には DAF が取り込まれている。

ドタイプウイルスおよび組換えウイルスでも同様の実験を行った結果、両ウイルスとも報告通りコレステロールの過剰添加によって感染が阻害された。JEV では細胞侵入において脂質分子の関与が認められたため、次に様々な脂質分子による関与を検証したところ、スフィンゴミエリンを分解してセラミドを合成するスフィンゴミエリナーゼで細胞処理すると、JEV のシュードタイプウイルスおよび組換えウイルスで感染性が劇的に増強されることが明らかとなった (図4)³⁰⁾。JEV の細胞侵入においてセラミドの存在が感染増強に深く関与している可能性が示唆された。

d. パキキュロウイルス gp64 の補体抵抗性機構の解析

昆虫細胞で作出されるパキキュロウイルスベクターは、個体においては血液成分によって容易に不活化されるため、これまで血液に暴露される臓器への遺伝子導入は困難であった^{2, 32, 33)}。しかしながら、近年、パキキュロウイルスのエンベロープ蛋白質である GP64 を被ったシュードタイプレンチウイルスは VSV のエンベロープ蛋白質である VSVG よりも血清成分に抵抗性を示し、長期にわたりマウス個体への感染が成立することが報告された^{34, 35)}。そこで我々はシュードタイプレンチウイルスが哺乳動物細胞由来であることから、昆虫細胞由来であることと哺乳動物細胞由来であることに何らかの違いがあるために同じ GP64 を介した感染においても血清抵抗性の違いが見られるのではないかと考え、両方の細胞で増殖できる VSV ベクターを用いて GP64 を被ったシュードタイプウイルスおよび組換えウイルスの作製を試みた (図5)³⁶⁾。ヒトおよびモルモット血清を用いて血清抵抗性について検討したところ、

VSVG を被ったウイルスやパキキュロウイルスでは容易に感染性が阻害されるのに対し、GP64 を被ったシュードタイプウイルスでは高濃度の血清中でもほとんど感染性が阻害されないことが示された³³⁾。そこで次に細胞種による違いを検証するために、哺乳動物細胞と昆虫細胞を用いてそれぞれ GP64 組換えウイルスを作製し血清抵抗性を調べると、昆虫細胞で作製した GP64 組換えウイルスではヒトおよびモルモット血清で容易に感染性が阻害されるのに対し、哺乳動物細胞で作製したウイルスではシュードタイプウイルスと同様に血清ではほとんど感染性が阻害されなかった (図6)。この要因を検討した結果、糖鎖修飾などによるものではなく哺乳動物細胞由来の補体抵抗性因子 (DAF) が粒子中に取り込まれていることが明らかとなった (図7)。そこで、DAF を被らせたようなパキキュロウイルスを作製すれば昆虫細胞由来のパキキュロウイルスでも血清からある程度感染性ウイルスを保護できると考え、シュードタイプウイルスを作製するとこのウイルスは予想通りヒト血清に対して抵抗性を示すことができた³⁶⁾。

おわりに

現在までに多くのウイルスが遺伝子導入や遺伝子治療を目的としたベクターとして開発され応用されている。我々はこれまで、主にパキキュロウイルスや VSV を用いて「シュードタイプウイルス化」への応用を通じた開発、研究に取り組んできた。パキキュロウイルスにおいてはエンベロープ遺伝子を完全に除いてリガンド特異的なシュードタイプウイルスの開発も試みており³⁷⁾、今後更なるターゲッ

ティングベクターとしての応用を期待している。VSVにおいてもシュードタイプウイルスや組換えウイルスシステムがいち早く確立され、様々なウイルスの診断や感染機構を解析するための代替ウイルスとして特にBSL4のウイルス研究等には有用である。遺伝子組換えウイルスを用いた実験は法的な規制もあり取り扱いが難しくなりつつあるが、こうした技術を用いて今後、様々なウイルスの生活環における感染機構の解析やウイルス診断・征圧法の開発などに応用していきたい。

謝 辞

本研究は、大阪大学微生物病研究所松浦善治先生、国立感染症研究所宮村達男先生、東京大学大学院医学系研究科牛島廣治先生、テネシー大学メンフィス校 Michael A. Whitt 先生の御指導のもと、多くの共同研究者の先生、大学院生の方々と共に行われた研究であり、この場を借りて深く感謝申し上げます。また杉浦奨励賞にご推薦いただきました松浦善治先生、本研究を評価して戴きました日本ウイルス学会の先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Tani H, Abe T, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development. *Future Virol.* 3: 35-43, 2008.
- 2) Tani H, Abe T, Limn CK, Mochizuki R, Yamagishi J, Kitagawa Y, Watanabe R, Moriishi K, and Matsuura Y. Baculovirus vector—gene transfer into mammalian cells. *Uirusu* 53: 185-193, 2003.
- 3) Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, and Matsuura Y. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279: 343-353, 2001.
- 4) Tani H, Limn CK, Yap CC, Onishi M, Nozaki M, Nishimune Y, Okahashi N, Kitagawa Y, Watanabe R, Mochizuki R, Moriishi K, and Matsuura Y. In vitro and In vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* 77: 9799-9808, 2003.
- 5) Volkman LE, and Goldsmith PA. In vitro survey of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus interaction with nontarget vertebrate host cells. *Appl Environ Microbiol.* 45: 1085-1093, 1983.
- 6) Hofmann C, and Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10099-10103, 1995.
- 7) Boyce FM, and Bucher NLR. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 2348-2352, 1996.
- 8) Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, and Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells including non-hepatic cells by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* 78: 2657-2664, 1997.
- 9) Matilainen H, Rinne J, Gilbert L, Marjomaki V, Reunanen H, Oker-Blom C. Baculovirus entry into human hepatoma cells. *J. Virol.* 79: 15452-15459, 2005.
- 10) Laakkonen JP, Makela AR, Kakkonen E, Turkki P, Kukkonen S, Peranen J, Yla-Herttuala S, Airene KJ, Oker-Blom C, Vihinen-Ranta M, and Marjomaki V. Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of *E. coli* in non-phagocytic human cells. *PLoS One* 4: e5093, 2009.
- 11) Huang AS, Palma EL, Hewlett N, and Roizman B. Pseudotype formation between enveloped RNA and DNA viruses. *Nature* 252: 743-745, 1974.
- 12) Witte ON, and Baltimore D. Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus. *Cell* 11: 505-511, 1977.
- 13) Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, and Rose JK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4477-4481, 1995.
- 14) Takada A, Robison C, Goto H, Sanchez A, Murti KG, Whitt MA, and Kawaoka Y. A novel system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 14764-14769, 1997.
- 15) Ito H, Watanabe S, Sanchez A, Whitt MA, Kawaoka Y. Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* 73: 8907-8912, 1999.
- 16) Tatsuo H, Okuma K, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Takada A, Matsuura Y, and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.* 74: 4139-4145, 2000.
- 17) Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, and Miyamura T. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 286: 263-275, 2001.
- 18) Okuma K, Matsuura Y, Tatsuo H, Inagaki Y, Nakamura M, Yamamoto N, and Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 82: 821-830, 2001.
- 19) Perez M, Watanabe M, Whitt MA, and de la Torre JC. N-terminal domain of Bornavirus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J. Virol.* 75: 7078-7085, 2001.
- 20) Garbutt M, Liebscher R, Wahi-Jensen V, Jones S, Moller P, Wagner R, Volchkov V, Klenk HD, Feldmann H, and Stroher U. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J. Virol.* 78: 5458-5465, 2004.
- 21) Saha MN, Tanaka A, Jinno-Oue A, Shimizu N, Tamura K, Shinagawa M, Chiba J, and Hoshino H. Formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing surface proteins of hepatitis B virus. *J. Virol.* 79: 12566-12574, 2005.
- 22) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, and Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Gen. Virol.* 86: 2269-2274, 2005.

- 23) Whitt MA. Generation of VSV pseudotypes using recombinant Δ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Methods.* 169: 365-374, 2010.
- 24) Tani H, Komoda Y, Limn CK, Suzuki K, Moriishi K, Miyamura T, and Matsuura Y. Virus-cell interaction of HCV. *Structure-based Study of Viral Replication* (Edt. Cheng RH and Miyamura T), Chapter 6: 125-150, World Scientific, 2008.
- 25) Meyer K, Basu A, and Ray R. Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* 276: 214-226, 2000.
- 26) Bartosch B, Dubuisson J, and Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197: 633-642, 2003.
- 27) Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, and McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 7271-7276, 2003.
- 28) Sandrin V, Boulanger P, Penin F, Granier C, Cosset FL, and Bartosch B. Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 86: 3189-3199, 2005.
- 29) Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, Moriishi K, Fujiyama K, Kanto T, Hayashi N, Owsianka A, Patel AH, Whitt MA, and Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.* 81: 8601-8612, 2007.
- 30) Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 84: 2798-2807, 2010.
- 31) Lee CJ, Lin HR, Liao CL, and Lin YL. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J. Virol.* 82: 6470-6480, 2008.
- 32) Sandig V, Hofmann C, Steinert S, Jennings G, Schlag P, and Strauss M. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 7: 1937-1945, 1996.
- 33) Hofmann C, and Strauss M. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* 5: 531-536, 1998.
- 34) Schaubert CA, Tuerk MJ, Pacheco CD, Escarpe PA, and Veres G. Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro. *Gene Ther.* 11: 266-275, 2004.
- 35) Sinn PL, Burnight ER, Hickey MA, Blissard GW, and McCray PB Jr. Persistent gene expression in mouse nasal epithelia following feline immunodeficiency virus-based vector gene transfer. *J. Virol.* 79: 12818-12827, 2005.
- 36) Kaname Y, Tani H, Kataoka C, Shiokawa M, Taguwa S, Abe T, Moriishi K, Kinoshita T, and Matsuura Y. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/decay-accelerating factor into viral particles bearing baculovirus GP64. *J. Virol.* 84: 3210-3219, 2010.
- 37) Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, and Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79: 3639-3652, 2005.

Development of viral vectors and application for viral entry mechanisms

Hideki TANI

Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, 3-1, Yamadaoka, Suita-shi, 565-0871 Osaka, Japan
Present address: Special Pathogens Laboratory, Department of Virology I,
National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi,
208-0011 Tokyo, Japan. htani@nih.go.jp

Virus is identified as one of the obligate intracellular parasites, which only amplify in cells of specific living things. Viral vectors, which are developed by utilizing these properties, are available in the various fields such as basic research of medical biology or application of gene therapy. Our research group has studied development of viral vectors using properties of baculovirus or vesicular stomatitis virus (VSV). Due to the development of new baculoviral vectors for mammalian cells, it is possible to be more efficient transduction of foreign gene in mammalian cells and animals. Furthermore, pseudotype or recombinant VSV possessing the envelope proteins of hepatitis C virus, Japanese encephalitis virus or baculovirus were constructed, and characteristics of the envelope proteins or entry mechanisms of these viruses were analyzed.

