

## 2 1 . 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 神田 忠仁

### 概 要

病原体ゲノム解析研究センターは、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、遺伝子治療に使うウイルスベクターに関する研究と子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の研究を行った。

遺伝子治療は先天性遺伝病の治療や末期癌患者のQOLの改善に成果を上げている。しかし、実用的な治療技術となるには、遺伝子導入効率の向上と導入遺伝子の発現調節技術の開発が求められている。ウイルスの持つ高い感染性や標的臓器の特異性を利用するウイルスベクターが使われるが、アデノウイルスベクターによる患者の死亡やレトロウイルスベクターによる白血病の発症が報告されており、ウイルスベクターの安全性の確保が厚生行政の課題となっている。我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立てるため、内外のウイルスベクターの安全性、有効性に関する情報収集に努めた。今後、臨床応用が増えると考えられるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの性質を調べる研究を継続した。

子宮頸癌発症の最大リスクファクターは発癌性HPVの感染である。HPVは粘膜の微少なキズから侵入し、表皮基底細胞(幹細胞)の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程でウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗HPV薬の開発基盤とするためHPV生活環の詳細な解析を続けた。

HPVは100以上の遺伝子型に分類されており、15の型が発癌性を持つ。2つの発癌性HPVの感染を防ぐ第一世代HPVワクチンが欧米で開発されたが、発癌性HPV群に共通の中和エピトープを見出したので、次世代ワクチン抗原へ応用する研究を進めた。

医薬品医療機器総合機構の依頼を受け、HPVワクチンの承認前検査を担当した。また、WHOはHPVの感染実態とワクチン導入による影響を把握するために、HPVラボネットワークを構築した。西太平洋地域の拠点ラボに

指定されているので、HPV遺伝子型判定と抗HPV抗体測定方法の標準化作業に参加した。

第二室では、ウイルスのゲノム情報を基に、情報科学と計算科学を応用して、ウイルスの性質を予測する研究戦略を開発している。近年の分子構造と機能に関する情報の蓄積、計算機能力の向上、情報処理理論の進展などに伴い、計算機を用いて蛋白質・核酸の高次構造、酵素反応、分子間相互作用などを高精度で近似する技術が急速に進展している。この技術は、培養が困難な病原体や易変異性病原体の解析に役立つ。ホモロジーモデリング法、分子動力学法、結合シミュレーション等の精度を検証し、抗ウイルス因子の機能、ウイルス蛋白質の構造特性、ウイルス酵素の反応機構、ウイルスの複製や免疫逃避、薬剤耐性機構などを予測する研究を進めた。

データベースに易変異性ウイルスのゲノム情報を効率的に収集し、管理する体制の整備を進めた。公開されるウイルスゲノム配列情報を、毎日、自動的に専用サーバーに格納するシステムを構築した。次世代シーケンサーによる配列情報の大量収集、情報処理理論に基づく配列解析、in silico構造解析、および実験を組み合わせる感染者体内のウイルス準種の組成と生物学的意義を解析するシステムの構築を進めた。

第三室は、細菌のゲノム情報をもとに病原性を解析する研究を行っている。病原性大腸菌のように、常在菌であっても外来性の毒素産生能や薬剤耐性を獲得するものがあり、非病原性常在菌のゲノム情報の蓄積は、病原性因子の同定・解析の基盤となる。また、培養環境とヒト体内環境で増殖している細菌では遺伝子群の発現が異なることから、臨床試料中の細菌で発現している遺伝子群の直接解析が重要となる。このような背景の下に、偏性嫌気性グラム陰性桿菌 *Fusobacterium varium* のゲノム解析を進めた。*F. varium* は、健常者の細菌叢からも分離されるが、難病指定されている潰瘍性大腸炎の増悪因子である可能性が強く示唆されている。食中毒病原菌の特定やバイオテロ対策への応用を念頭に、包括的なゲノム情報の取得と迅速診断への応用をめざす研究を進めた。

## 業績

### 調査・研究

#### I. 遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

##### 1. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及び Nature Medicine 等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続した。(竹内隆正、森 清一郎、柗元 巖、石井克之、神田忠仁)

##### 2. インスレーターを用いた高発現 AAV ベクターの開発

###### (1) インスレーターによる発現増強機構の検討

AAVS1 インスレーターを搭載した AAV ベクターからの遺伝子発現は著しく増強される。AAVS1 インスレーターは PPP1R12C 遺伝子の転写開始点のすぐ上流に位置している。種々の哺乳動物ゲノムの相同領域を比較して、高度に保存された配列を見出した。この配列に結合する蛋白質をデータベース検索し、Zfp143 を抽出した。合成した Zfp143 と標的配列を持つ DNA 断片との *in vitro* での結合を確認した。Zfp143 が結合しないように置換変異を導入すると AAV ベクターからの発現増強がなくなり、AAVS1 インスレーター に Zfp143 が結合して発現増強が起こることが強く示唆された。(竹内隆正、内野蘭代、神田忠仁)

###### (2) 骨格筋を標的とする AAV ベクターの開発

遺伝子治療で骨格筋を標的臓器とする場合を念頭に、骨格筋特異的プロモーターであるマウス MCK プロモーターを持つ AAV ベクターを作成した。AAV ベクターに AAVS1 インスレーター搭載すると、転写が上昇した。臓器特異性は維持されており、マウス筋芽細胞およびマウス骨格筋で強い発現が認められた。安全で高性能の遺伝子治療用ベクター作製につながる。(竹内隆正、村上 功、神田忠仁)

#### II. HPV に関する研究

##### 1. HPV 増殖機構の研究

###### (1) microRNA による HPV 初期プロモーター活性の調節

表皮角化細胞株 HaCaT の分化に伴い発現が上昇する microRNA-210(miR-210)を HPV 陽性子宮頸癌細胞株、HeLa、CaSki、SiHa に過剰発現させると、HPV 初期遺伝

子 E6 の転写が抑制され、細胞の増殖能も低下した。HPV 陰性子宮頸癌細胞株 C33a では、miR-210 の過剰発現による増殖能の低下は見られなかった。HPV 陽性子宮頸癌細胞株では、miR-210 によって HPV 初期プロモーターが抑制され、E6、E7 癌蛋白質の発現が減少して増殖能が低下したと考えられる。

(森 清一郎、Marita Overhoff、神田忠仁)

###### (2) パピローマウイルスゲノム複製における細胞 DNA 損傷修復系の役割

ウシパピローマウイルスゲノムをエピソームとして維持しているマウス細胞で、宿主の DNA 損傷応答系のひとつである ATM 系が活性化していることを見つけた。ATM のノックダウンや阻害薬を用いた解析から、ATM の活性化はウイルスのゲノム複製を抑制することを明らかにした。ウイルス粒子を用いた感染実験でも同様の結果を得ことから、宿主の DNA 損傷修復系は、ウイルス感染直後から活性化し、ウイルスのゲノム複製を抑制することが示唆された。

(中原知美、Paul F. Lambert)

###### (3) HPV ゲノム複製とライセンスング

ヒト子宮頸部前癌病変由来 W12 細胞は、HPV16 ゲノムをエピソームとして安定に維持する。最近 W12 細胞における HPV16 のゲノム複製はライセンスングされている可能性が報告された。クロマチン免疫沈降法を用い、W12 細胞のライセンスング因子と HPV 複製開始点を含む DNA 断片の結合を解析している。

(中原知美、神田忠仁)

###### (4) 無細胞系での HPV DNA ローリングサークル型複製

W12 細胞の抽出液を用いた無細胞 DNA 複製系で、HPV 複製起点を含むプラスミドを鋳型にした DNA 複製反応を行ったところ、アガロースゲル電気泳動での移動度がプラスミド型の複製産物とは異なる高分子量の複製 DNA が検出された。鋳型プラスミドを一カ所切断する制限酵素処理により、高分子量の複製 DNA は、切断した鋳型プラスミドと同じ長さの DNA に変換された。分化した W12 細胞では、複製フォークが一方向に進行するローリングサークル型の HPV DNA 複製が起こることが報告されており、無細胞系でこの現象が再現されたと考えられる。(松尾理加、柗元 巖、神田忠仁)

###### (5) ヒト核小体蛋白質 nucleolin の HPV16DNA への結合 HPV16 ゲノム DNA (E6 遺伝子の 3' 端と E7 遺伝子の 5'

端領域)と細胞抽出物を混合すると nucleolin が結合した。HeLa 細胞に強制発現した nucleolin 及び内在性 nucleolin は、いずれも HPV16DNA を含むプラスミドに細胞内でも結合した。また W12 細胞で、内在性 nucleolin と HPV16 ゲノムとの結合が確認された。nucleolin は細胞分裂期の染色体に局在するので、nucleolin が HPV ゲノムの維持に関わる可能性が示唆された。(佐藤英貴、松尾理加、石井克幸、中原知美、森清一郎、終元 巖、神田忠仁)

#### (6) 新しい HPV タイピングの導入

HPV 型間で比較的保存されている L1 DNA を標的にした multiplex PCR を行い、型特異的な DNA プロブとのハイブリダイゼーションにより増幅 DNA の型を判定する新たな HPV タイピング法を導入した。このタイピング法により、子宮頸部上皮内腫瘍の DNA 検体を解析し、101 検体の内 89 検体 (88%) の HPV 型を判定した。(終元 巖、佐藤英貴、川名 敬[東京大学医学部産婦人科教室])

### 2. 交差性中和エпитープをもつワクチンの開発

#### (1) HPV 31 ウイルス粒子の作製と高リスク型共通抗 L2 抗体による中和

HPV31 ゲノムを持つ前癌病変由来細胞を三次元培養し、分化した細胞で増殖した少量のウイルス粒子を回収した。HPV16 の副キャプシド蛋白質 (L2 蛋白質) のアミノ酸 56-75 領域に対する抗体 (抗 P56/75 抗体) は、この HPV31 の感染を阻害した。HPV の増殖する実用的な培養細胞系が無いことから、これまで、HPV 主キャプシド蛋白質 (L1 蛋白質) と L2 蛋白質発現プラスミド及び SV40ori を持つレポータープラスミドを SV40T 抗原陽性細胞に同時に導入し、複製したレポーターが HPV キャプシドにパッケージされた粒子 (偽ウイルス) を中和反応に使ってきた。得られた成績は、偽ウイルスを使った中和反応系が、少なくとも抗 P56/75 抗体では、実際の HPV 中和を反映していることが強く示唆された。(石井克幸、中原知美、森清一郎、神田忠仁)

#### (2) 高リスク型共通中和抗体による HPV 感染抑制機構

HPV16L2 蛋白質のアミノ酸 56-75 領域で誘導した抗体は、HPV16 だけでなく 18、31、35、51、52、58 型偽ウイルスの感染を防ぐので、全ての高リスク型 HPV を中和すると期待できる。この中和抗体が結合した HPV16 偽ウイルスの細胞内動態を追跡し、抗体はキャプシドからゲノムが放出される脱殻を阻害することがわかった。L2 蛋白質のアミノ酸 56-75 領域は、脱殻に必要な機能を担っ

ており、この機能は全ての高リスク HPV に共通だと思われる。(石井克幸、田中恵子 [感染病理部]、近藤一成、竹内隆正、神田忠仁)

#### (3) HPV 副キャプシド蛋白質 (L2) の機能

HPV51 プロトタイプ (Nu 株) と日本で分離された HPV51 (Ma 株) の L2 蛋白質は 2 つの領域 (領域 I: aa95-99、領域 II: aa179-186) でアミノ酸配列が大きく異なることがわかった。Ma 株の主キャプシド蛋白質 (L1) と Ma-L2 または Nu-L2 を細胞で発現させると、どちらも同様にキャプシド様粒子を形成し、レポータープラスミドをパッケージングした偽ウイルスが形成された。Ma-L2 を持つ偽ウイルスを細胞に接種するとレポーターが発現したが、Nu-L2 を持つ偽ウイルス接種では発現しなかった。Ma-L2 は核に、Nu-L2 は細胞質に局在した。Ma-L2 と Nu-L2 のキメラを作成し同様の実験を行ったところ、領域 II がレポーターの発現、L2 の核への局在に重要であることがわかった。偽ウイルス接種によるレポーターの発現には、L2 蛋白質の核移行が必要である。(森 清一郎、石井克之、近藤一成、島袋志保、神田忠仁)

### III. 病原性ウイルスのゲノム解析

#### 1. 病原性ウイルスゲノム情報の解析

##### (1) 公開データベースからのウイルスゲノム情報の自動収集

主に新興再興感染症と慢性感染症が問題となる易変異性ウイルスを対象とし、Web 上に公開されるウイルスゲノム配列情報を、日々、自動取得・更新するシステムをつくり、村山庁舎のデータベースサーバ Altix350 に設置した。対象は、インフルエンザ、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス、C 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ブタ内在性レトロウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルスとした。データベースに、配列アノテーションのマニュアル修正機能、ゲノム配列解析ツール (系統樹解析、エントロピー解析、同義置換・非同義置換解析、相互情報量解析) などの機能を付加した。(横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳)

##### (2) 我が国で流行しているノロウイルスゲノムの解析

ノロウイルス GII4 は、世界各地で集団食中毒を引き起こしている。2006 年 5 月～2009 年 2 月の間に全国 19 カ所の衛生研究所で感染者糞便を収集した。計 201 の GII4 感染症例について、ウイルスゲノム全長の配列情報 (約  $1.5 \times 10^6$  塩基) を取得し、ゲノム配列の進化系統、ゲノム構造、およびキャプシドの立体構造を調べた。国内で

は、常時、キャプシド表面に複数の特徴的な変異セットをもつウイルスが発生していること、キャプシド表面の変異数が多いと流行規模が大きいこと、キャプシド表面の変異セットはゲノム組換えで獲得した可能性が高いこと、この変異によりキャプシド表面の物理化学的性質が変化することが示唆された。(本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、神田忠仁、岡智一郎[ウイルス二部]、武田直和 [ウイルス二部]、佐藤裕徳)

糞便試料の収集協力者(敬称略)。田中智之(堺市衛生研究所)、野田衛(国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨(北海道立衛生研究所)、三上稔之(青森県環境保健センター)、斉藤博之(秋田県健康環境センター)、植木洋(宮城県保健環境センター)、高橋朱実(岩手県環境保健研究センター)、篠崎邦子(千葉県衛生研究所)、吉田徹也(長野県環境保全研究所)、田村務(新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則(富山県衛生研究所)、東方美保(福井県衛生環境研究センター)、小林慎一(愛知県衛生研究所)、内野清子(堺市衛生研究所)、入谷展弘(大阪市立環境科学研究所)、飯塚節子(島根県保健環境科学研究所)、福田伸治(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、近藤玲子(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸(佐賀県衛生薬業センター)、松岡由美子(熊本市環境総合研究所)、岩切章(宮崎県衛生環境研究所)

### (3) C型肝炎患者に維持される HCV 準種の解析

次世代シーケンサー-FLX を用いた大容量ショットガンシーケンシングで得られた情報から、HCV 感染者の準種の組成を知る実験系を立ち上げた。HCV 感染者血液 2 検体について、NS5A 領域の配列情報を網羅的に収集し、情報処理理論に基づき遺伝子を再構築することで、検体中のウイルス準種の種類と存在頻度を推定した。同じ検体の NS5A 領域の PCR 増幅産物(約 1.3kb)をプラスミドにクローニングした後、約 800 クローンの塩基配列情報を収集した。両者の比較により、FLX 解析系は、約 10%の頻度で存在する準種ゲノムを再現性よく検出できることがわかった。シーケンシング条件の改良により、遺伝子再構築に用いるリード配列の量と質の向上が見込まれ、マイナーな準種の特定、あるいは多検体の準種解析が可能と考えている。今後、準種の病態への関わりを解析する基盤となる。(本村和嗣、大出裕高、横山勝、中村浩美、守宏美、神田忠仁、佐藤裕徳(本村和嗣、中村浩美、守宏美、大出裕高、横山勝、伊藤敬義[昭和大学医学部]、井廻道夫[昭和大学医学部]、神田忠仁、佐藤裕徳)

## 2.in silico 構造機能解析技術の応用研究

### (1) APOBEC3G(A3G)の機能調節機構

抗 HIV 蛋白質 A3G は、HIV Vif 蛋白質依存的に分解され、抗ウイルス活性を失う。京大の高折らは、A3G がリン酸化修飾を受けると Vif 依存的分解に耐性となることを見つけた。ホモロジーモデリング法を用いてこの現象の分子機序を調べた。A3G の 32 番目のアミノ酸 (T32) のリン酸化、または酸性アミノ酸への置換で、T32 と R24 の側鎖間相互作用が強くなることを見出した。これにより、R24 を含む A3G 表面ループの可動性が低下し、Vif 結合能が低下すると予測された。この予測の正当性は、A3G R24 の変異導入解析で確認された。Vif 依存的分解の感受性を制御する構造要因を明らかにしたことで、Vif 耐性 A3G の設計と治療への応用の道が開かれた(横山勝、白川康太郎[京大]、高折晃史[京大]、佐藤裕徳)

### (2) サポウイルスプロテアーゼ (SaV PR) の基質認識機構

SaV PR は、ウイルス前駆体蛋白質の特定箇所を切断する。ホモロジーモデリング法を用いて、SaV PR の基質認識機構を調べた。SaV PR と切断領域ペプチドの複合体構造をつくり、基質認識に関わる PR アミノ酸を予測した。ウイルス二部と共同で、PR の変異導入解析を実施し、予測の妥当性を確認した。PR の活性中心溝に位置する T30, Y101, K112, R113 が基質認識に重要であることを見出した。抗 SaV 薬開発の基盤情報が得られた。(横山勝、岡智一郎[ウイルス二部]、片山和彦[ウイルス二部]、武田直和[ウイルス二部]、佐藤裕徳)

### (3) ヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ (HIV-1 PR) の基質特異性発現機構

HIV-1 PR は、ウイルス前駆体蛋白質の特定箇所を順序だてて切断する。ホモロジーモデリング法とレプリカ交換分子動力学法を用いて、基質切断部位の構造特性と切断効率の関係を調べた。PR 非結合時に基質切断点を挟む P1 と P1'部位アミノ酸の側鎖が伸長状態をとりやすいほど基質の PR 親和性が高まること、PR 結合時に基質切断点上流の P1 と P2 部位アミノ酸の主鎖のねじれが大きいほど切断反応効率が高まることを見出した。ウイルス粒子成熟の理解と HIV-1 PR 活性阻害薬改良の基盤情報が得られた。(大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳)

### (4) ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素 (HIV-1 RT) の薬剤耐性機構

国立国際医療センターの瀧永らは、未治療 HIV-1 の RT 配列を解析し、V106I と V179D 変異が頻出すること、両変異が同時に生じると第 1 世代非核酸系 RT 阻害薬 (NNRTI; EFZ、NVP) の耐性が発現すること、第 2 世代 NNRTI の ETV には耐性を付与しないことを見つけた。ホモロジーモデリング法を用いて、これらの現象の分子機序を調べた。V106I/V179D 変異により、EFZ と NVP への静電的および物理的反発力が昂進して RT 親和性が低下すること、ETV は、変異に応じて自身の構造を変化させることで RT 親和性を維持することを見出した。薬剤構造の柔軟性はウイルス変異に対処するための有力な物性であることが判明した。HIV-1 RT 活性阻害薬改良の基盤情報が得られた。(大出裕高、横山勝、神田忠仁、瀧永博之[国立国際医療センター]、佐藤裕徳)

#### IV 病原性細菌のゲノム解析

##### 1. *Fusobacterium varium* Fv113 株のゲノム解析

潰瘍性大腸炎患者から臨床分離された *F. varium* Fv113 株の全ゲノム塩基配列解析を継続した。ホールゲノムショットガンライブラリー (平均 1.6 kbp を 12,454 本解析済み) に 5 kb 長のゲノム断片を含むショットガンライブラリーを 10,976 クローン追加し、次世代シーケンサー (Illumina 社 Genome Analyzer II) によって得られた塩基配列全てを用いて *de novo* assembly を行った。計 558 本のアセンブル配列 (contig) を得た。プロトタイプ株である *F. varium* ATCC 8501 株のゲノム解析も行い、患者分離 Fv113 株ゲノムと比較した。Fv113 株は特徴的な分泌装置 Type IV secretion system (T4SS) を 2 loci 持つことがわかった。現在、T4SS が分泌する effector 因子の探索を行っている。(関塚剛史、坂野聡美、芹澤昌邦、黒田 誠、大草敏史「東京慈恵会医科大・柏病院・消化器肝臓内科」)

##### 2. *Bacillus anthracis* (炭疽菌) の系統解析と病原性解析

###### (1) セレウスグループの迅速鑑別

セレウスグループの炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、セレウス菌 (*B. cereus*) 及びチューリンジエンシス菌 (*B. thuringiensis*) は、感染症およびテロ対策の観点から正確・迅速に鑑別する必要がある。これらの細菌ゲノムの塩基配列は同源性が高く、ゲノム解析から種を鑑別するには工夫が求められる。これまでに解析した炭疽菌日本分離株ゲノムの塩基配列と公開配列情報 (炭疽菌 17 株、セレウス菌 14 株、チューリンジエンシス菌 3 株) を使い、菌種内で保存性の高い領域を 1 塩基レベルで調べて 1 塩基多型 (SNP) を網羅的に探索した。炭疽菌に 2,965 箇所 tag-SNPs を検出した。さらに、SNPs の連関を調べ、セレウ

スグループの分類に使うことができる tag-SNPs 80 箇所を選別した。この 80 箇所を調べれば、炭疽菌、セレウス菌、及びチューリンジエンシス菌を鑑別できる。(芹澤昌邦、関塚剛史、黒田 誠、奥谷晶子[獣医科学部]、井上智[獣医科学部])

###### (2) 炭疽菌の分泌蛋白質による細胞形態変化

炭疽菌プラスミド pXO1 および pXO2 の塩基配列から、多数の機能未知分泌蛋白質の存在が示唆された。炭疽菌野生株 (pXO1 および pXO2 保有)、pXO1 保有株、pXO2 保有株、そして両プラスミド脱落株の培養上清をヒト細胞 (HeLa 細胞、Vero 細胞) に添加し、細胞形態を観察した。野生株および pXO1 保有株の培養上清を添加して 2 時間後、特に Vero 細胞において、顕著な細胞形態変化が見られた。pXO2 保有株および両プラスミド脱落株では変化が見られなかったため、pXO1 に起因すると推定された。この形態変化はアポトーシスによるものではないことを確認した。また、Caco-2 細胞、A549 細胞、293 細胞には形態変化が見られなかったことから、HeLa/Vero 細胞に親和性のある因子が関与していることが示唆された。

(坂野聡美、黒田 誠、奥谷晶子[獣医科学部]、井上 智[獣医科学部])

##### 3. メタゲノム解析による網羅的病原体検出

###### (1) 川崎病患者検体に存在する微生物ゲノムの検討

川崎病患者のリンパ節、血清、咽頭拭い液から核酸を抽出し、イルミナ社 GAII DNA シーケンサーにより 75 塩基長の配列 300-900 万個を取得した。short reads assembler velvet を用いて冗長な配列を減らした後、相同性検索で微生物ゲノム由来配列を抽出した。血清サンプルから得た配列の平均 95% はヒトゲノムに由来し、ヒト以外に由来する配列は 1% 未満であった。咽頭ぬぐい液から得た配列の半数は細菌由来であったが、常在菌と考えられた。リンパ節検体から得た DNA 塩基配列の 0.22% が細菌由来であったが、RNA 塩基配列では 19.9% 細菌由来であった。そこでリンパ節検体中の RNA 塩基配列から、検体に存在する細菌群を推定した。実験操作で混入する可能性が高い環境細菌群は除外した。腸内細菌群 (バクテロイデス属、クロストリディウム属等) が多数存在し、便の細菌種と類似した構成であった。咽頭に存在するインフルエンザ菌、肺炎球菌は検出されたが、A 群レンサ球菌は検出されなかった。(黒田 誠、関塚剛史、水谷哲也[ウイルス第 1 部]、片野晴隆[感染病理部])

(2) 動物腸管内の細菌叢および原生動物叢の検出・同定  
動物の腸管内の一部の細菌は自由生活型の原生動物に内在し、原生動物の移動と共に別の宿主へ感染することがある。生産管理された食鶏の盲腸便 22 検体および 3 カ所の異なる牧場の放牧牛の糞便 7 検体を入し、16S-rDNA 配列にもとづく T-RFLP 法によって細菌叢を解析した。また、18S-rDNA 配列による原生動物叢の検出・同定を行った。食鶏盲腸便 22 検体の腸内細菌叢の大部分が、Bacteroidetes 及び Clostridia であった。食鶏盲腸便全てに於いて *Campylobacter jejuni* が存在し、Campylobacteraceae の割合は細菌叢全体の約 1.8% を占めていた。牛糞便中には、*C. jejuni* は存在しなかった。食鶏盲腸便中には原生動物は検出されなかったが、牛糞便中に *Blastocystis* 属および *Balantidium* 属が高頻度に検出された。原虫に内在する細菌を T-RFLP 法により解析したところ、原虫内に *Eubacterium* 属が多く存在することが示唆された。

(関塚剛史、黒田 誠)

## 品質管理に関する業務

### HPV ワクチンの承認前検査

HPV ワクチン試験品の提供を受け、承認申請書に記載された規格及び試験法の妥当性について、実際に試験を行い検討した。製剤担当室として、その結果をまとめ、厚生労働省医薬食品局に報告した。(松尾理加、終元 巖、神田忠仁)

## 国際協力関係業務

### WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

2006 年に WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク (HPV ラボネット) の、西太平洋地域 Regional Reference Laboratory としての活動を行った。抗 HPV 抗体価を測定する VLP ELISA 標準化のための国際共同研究に参加し、解析結果を WHO に報告した。HPV ラボネットが主催する HPV DNA proficiency panel に参加し、十分な解析能力をもつ HPV ラボとして認定を受けた。また WHO 本部で開催された HPV ラボネット会議に出席し、HPV アッセイの標準化について討議した。(終元 巖、松尾理加、神田忠仁)

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1) Kukimoto, I., Mori, S., Sato, H., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Transcription factor human Skn-1a enhances replication

of human papillomavirus DNA through the direct binding to two sites near the viral replication origin. *FEBS Journal*, 275, 3123-3135, 2008.

- 2) Kusumoto, R., Dawut, L., Marchetti, C., Lee, JW., Vindigni, A., Ramsden, D., and Bohr, VA.: Werner Protein Cooperates with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex in End-Processing. *Biochemistry*, 47, 7548-7556, 2008.
- 3) Mori-Uchino, M., Takeuchi, T., Murakami, I., Yano, T., Yasugi, T., Taketani, Y., Nakagawa, K., and Kanda, T.: Enhanced transgene expression in the mouse skeletal muscle infected with the adeno-associated viral vector with the human elongation factor 1a promoter and a human chromatin insulator. *J. Gene. Med.*, in press, 2009
- 4) Ochi, H., Kondo, K., Yasugi, T., Hirai, Y., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Neutralizing Antibodies against Human Papillomavirus Types of 16, 18, 31, 52, and 58 in the Serum Samples from Women in Japan with Low Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:1536-1540, 2008.
- 5) Kanda, T. and Kondo, K.: Development of an HPV vaccine for a broad spectrum of high-risk mtypes. *Human Vaccine*, 5:1-3, 2008.
- 6) Kubo Y, Yoshii H, Kamiyama H, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) Proteins Function as Pleiotropic Regulators of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Virology*. 375:130-140, 2008.
- 7) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. : Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. *PLoS ONE* 3: e3206, 2008. (The first two authors contributed equally)
- 8) Shirakawa K, Takaori-kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T.: Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates the interaction between APOBEC3G and HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1184-91, 2008.
- 9) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan.: Identification of Monomorphic and Divergent Haplotypes in 2006/2007 Norovirus GII/4 Epidemic

Population by Genome-wide Tracing of Evolutionary History. *J. Virol.* 82:11247-62, 2008.

- 10) Yamao, T., Eshita, Y., Kihara, Y., Satho, T., Kuroda, M., Sekizuka, T., Nishimura, M., Sakai, K., Watanabe, S., Akashi, H., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Srisawat, R., Miyata, T., Sakata, A., Hosokawa, M., Nakashima, M., Kashige, N., Miake, F., Fukushi, S., Nakauchi, M., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., Mizutani, T.: Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 154(1):153-8, 2009.
- 11) Kuroda, M., Ito, R., Tanaka, Y., Yao, M., Matoba, K., Saito, S., Tanaka, I., Ohta, T.: Staphylococcus aureus Surface Protein SasG Contributes to Intercellular Autoaggregation of Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(4):1102-6, 2008.
- 12) Sakamoto, S., Tanaka, Y., Tanaka, I., Takei, T., Yu, J., Kuroda, M., Yao, M., Ohta, T., Tsumoto, K.: Electron microscopy and computational studies of Ehb, a giant cell-wall-associated protein from Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(2):261-6, 2008.
- 13) Watanabe, M., Tanaka, Y., Suenaga, A., Kuroda, M., Yao, M., Watanabe, N., Arisaka, F., Ohta, T., Tanaka, I., Tsumoto, K.: Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third neat domain of IsdH from Staphylococcus aureus. *J Biol Chem.* 283(42):28649-59, 2008.
- 14) Kuroda, M., Tanaka, Y., Aoki, R., Shu, D., Tsumoto, K., Ohta, T.: Staphylococcus aureus giant protein Ehb is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. *Biochem Biophys Res Commun.* 374(2):237-41, 2008.

## 2. 和文発表

- 1) 神田忠仁: ヒトパピローマウイルスの生活環、小児科診療、71(8),1319-1323, 2008.
- 2) 本村和嗣, 終元巖, 佐藤裕徳 "PCR法(ウイルス)"; KEY WORD 感染症. 先端医学社. 第二版, 242-243, 2008.
- 3) 本村和嗣, 佐藤裕徳. ノロウイルス感染症. 特集: 変化する感染症. 総合臨床. 57, 2697-2702, 2008.
- 4) 大出裕高: 原子レベルで薬剤耐性を理解する-YAKU学・最前線 研究現場からあなたへ-薬事日報 第10560号 12面, 2008.
- 5) 佐藤裕徳, 大出裕高, 本村和嗣, 横山勝: HIVの構造と感染・増殖の分子機構. 日本臨床 67, 37-42, 2009.

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Fukushi S, Hirai A, Niikura A, Maeda K, Yoshikawa Y, Yamada YK, Yokoyama M, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Identification of bat ACE2 proteins and their receptor function for SARS-coronavirus. 第42回日米医学ウイルス性疾患専門部会、(2008年6月、長崎)
- 2) Fukushi S, Hirai A, Niikura A, Maeda K, Yoshikawa Y, Yamada KY, Yokoyama M, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S. Identification of bat ACE2 proteins and their receptor function for SARS-coronavirus. 第7回日中ウイルス学会 (2008年6月、東京)
- 3) Makoto Kuroda, Masato Higashide, Carlos Takashi Neves Omura, Saburo Ohkawa, Sadahiro Ichimura, Toshiko Ohta. Methicillin-Resistant Staphylococcus saprophyticus Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Have Emerged in Urogenital Tract Infections. 108th ASM general meeting. (2008年6月, 米国)
- 4) Nakahara, T.: A cellular DNA damage response pathway and BPV-1 DNA replication, Molecular Biology of DNA Tumor Viruses Conference (2008年7月、米国)
- 5) Kusumoto, RM. : Role for the Werner syndrome protein in DNA double strand break repair and telomere maintenance. Cheongju University Memorial Symposium (2008年9月、韓国)
- 6) Onyango C, Leligidowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama E, Shioda T, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S and Cotton M. MHIV-2 Capsids Distinguishing High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. 11th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology (2008年9月、米国)
- 7) Naganawa S, Yokoyama M, Kitamura K, Sato H. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity. Joint Meeting of the AIDS Panels US-Japan Cooperative Medical Science Program and NIID AIDS Research Center 20th Anniversary Symposium (2008年9月、日本)
- 8) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, and Takeda N. Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference Hall, National Institute of Hygiene and

Epidemiology (NIHE) (2008年10月、ベトナム)

9) Kukimoto, I. : WHO HPV laboratory network for surveillance after worldwide introduction of HPV vaccines. 4th International Infection Control Conference of Theodor Bilharz Research Institute (2008年11月、エズプト)

10) Onyango C, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama E, Shioda T, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S and Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguishing High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort, The 15th International Conference on AIDS and STIs in Africa. (2008年12月、セネガル)

10) Kusumoto, RM. : Role for the Werner syndrome protein in DNA double strand break repair and telomere maintenance. International Minisymposium in University of Ulsan (2009年1月、韓国)

11) Yokoyama M, Naganawa S, Kitamura K, Sato H. Net Positive Charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 Sequence Regulates Viral Sensitivity to Humoral Immunity 4TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM (2009年3月、ドイツ)

## 2. 国内学会

1) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: 2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析, 第81回日本感染症学会総会 (2008年4月、島根)

2) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, 片山和彦, 神田忠仁, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳: 2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析, 第29回衛生微生物技術協議会 (2008年6月、東京)

3) 黒田誠, 伊藤隆太, 田中良和, 太田敏子: 細胞壁架橋型タンパク質 Staphylococcus aureus surface protein G (SasG) による自己複合体形成と菌凝集能。第53回ブドウ球菌研究会 (2008年9月、東京都文京区)

4) Ode H, Yokoyama M, Sato H.: Secondary Structure Tendency of Substrate Cleavage Site Influences Substrate Binding of HIV-1 Protease. CBI Annual 4) Meeting 2008 International Symposium. (2008年10月、東京)

5) 森清一郎, 神田忠仁: microRNAによるヒトパピローマウイルスプロモーター活性の調節, 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2008年10月、岡山)

6) 石井克幸, 神田忠仁: ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染初期過程におけるキャプシド蛋白質チオール基の役割, 第56回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2008

年10月、岡山)

7) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 星野和彦, 蒔本恭, 秋山美穂, 木村博一, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan : ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序, 第56回日本ウイルス学会学術集会, ワークショップ (2008年10月、岡山)

8) 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 山本真民, 宮下佳奈, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

9) 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 守宏美, 中村浩美, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和: カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

10) 小澤一弘, 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 中村浩美, 守宏美, 佐藤裕徳, 武田直和 : 調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

11) 久保嘉直, 神山陽香, 吉居廣朗, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 ウイルス粒子に取り込まれたエズリン・ドミナント・ネガティブ変異体による感染抑制, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

12) 吉居廣朗, 神山陽香, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: CD4非依存性 HIV-1 細胞内侵入におけるカテプシン群蛋白質分解酵素の関与, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

13) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: X4-tropic HIV-1 感染における CXCR4 のラフト局在の重要性, 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年10月、岡山)

14) 横山勝, 佐藤裕徳: 相互情報量解析による HIV-1 CRF01\_AE V3 領域アミノ酸残基の共変異部位の同定, 第22回日本エイズ学会学術集会 (2008年11月、大阪)

15) 横山勝, 白川康太郎, 高折晃史, 佐藤裕徳: 分子モデリングによるリン酸化 APOBEC3G の構造解析, 第22回日本エイズ学会学術集会 (2008年11月、大阪)

16) 大出裕高, 横山勝, 佐藤裕徳, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 間宮均人, 濱口元洋, 杉浦互, 横幕能行. HIV-1 プロテアーゼにおける耐性変異 L89V の立体的影響, 第22回日本エイズ学会学術集会 (2008年11月、大阪)

17) 横幕能行, 大出裕高, 間宮均人, 濱口元洋, 伊部史朗, 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 金田次弘, 杉浦互. Enfuvirtide



(T-20)+raltegravir (RAL) + darnavir (DRV) + etravirine (TMC125) + lamivudine (3TC)の多剤高度耐性 HIV-1 感染症に対する治療効果、第 22 回日本エイズ学会学術集会 (2008 年 11 月、大阪)

18) 吉居廣朗、神山陽香、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直：CD4 非依存性 HIV-1 の細胞内侵入におけるカテプシン群蛋白質分解酵素の関与、第 22 回日本エイズ学会学術集会 (2008 年 11 月、大阪)

19) Ivo Sah Bandar、高橋清実、長縄 聡、本村和嗣、佐藤裕徳、北村勝彦、佐藤成大：Clinical profile and molecular epidemiology of HIV/AIDS Patients in Jakarta, Indonesia、第 22 回日本エイズ学会学術集会 (2008 年 11 月、大阪)

17) 岡智一郎、横山勝、片山和彦、恒光裕、山本真民、宮下佳奈、本村和嗣、脇田隆宇、佐藤裕徳、武田直和：カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) (2008 年 12 月、神戸)

18) 横山勝、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳：カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008) (2008 年 12 月、神戸)

19) Kusumoto, RM., Karmakar, P., May, A., and Bohr, VA. : Impact of phosphorylation of Werner syndrome protein by DNA-PK on the repair of DNA double strand breaks. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008 年 12 月、神戸)

20) 黒田誠：感染症の関与が疑われる難病の解明 一次世代型シーケンサーで病原体を突き詰められるのか？ ～ 山口大学スーパー研究推進体(微生物の機能解析および機能開発) (2008 年 12 月 21 日、山口県宇部市) (特別講演として口頭発表)

21) 芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、井上智、黒田誠：セレウスグループに属する各菌種における SNP の網羅的探索と種間比較におけるその利用、第 8 2 回日本細菌学会総会 (2009 年 3 月、名古屋市)

22) 黒田誠、関塚剛史：黄色ブドウ球菌の SarA パラログによる細胞壁架橋型タンパク質 SasG の転写制御の解析、第 8 2 回日本細菌学会総会 (2009 年 3 月、名古屋市)

23) 奥谷晶子、関塚剛史、黒田誠、井上智、山田章雄：日本で分離された炭疽菌の分子遺伝学的解析、第 8 2 回日本細菌学会総会 (2009 年 3 月、名古屋市)

24) 関塚剛史、井上智、黒田誠：動物腸管内の細菌叢お

よび原生動物叢の検出・同定、第 8 2 回日本細菌学会総会 (2009 年 3 月、名古屋市)