

## 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、遺伝子治療に用いられる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) の研究を進めた。遺伝子治療が先天性遺伝病に対する実用的な治療技術となるには、治療に用いる遺伝子を発現調節機能領域と共に効率良く導入できるベクターが必要であり、新型ウイルスベクターが内外で開発されている。一方、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、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。

HPV には 100 以上の遺伝子型が存在するが、15 の型が子宮頸癌の原因となる。これらの HPV は性行為等で生じた粘膜の微小なキズから侵入し、表皮基底細胞 (幹細胞) の核内にエピソードとして潜伏・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ゲノムの複製、キャプシド蛋白質の合成が順次起こり子孫ウイルスが形成される。このような HPV 生活環の中で、偶然 HPV ゲノムが細胞染色体に組み込まれ、細胞の DNA 合成系の再活性化とアポトーシスの抑制機能を持つ HPV 初期遺伝子群の発現が継続的に起こると細胞は不死化し、やがて発癌に至る。抗 HPV 薬の開発基盤とするため HPV 生活環を詳細に解析した。全ての発癌性 HPV 群に共通な中和エピートープの解析とそれをワクチン抗原に応用する研究を進めた。製薬会社から HPV ワクチンの承認申請がなされ、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し、今後の HPV 対策の基盤となる情報を共有する目的で、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、活動を

開始した。

第二室では、ウイルスのゲノム情報と蛋白質の結晶構造を基に、情報科学と計算科学を応用して、ウイルスの変異による構造変化と機能修飾を予測する研究戦略をたてている。この新しい研究手法は、抗原性、免疫感受性、薬剤感受性、感染宿主域、増殖能等の変化を予測可能にし、ウイルス感染の迅速診断、予防・治療、ウイルス進化等の研究に役立つと期待できる。RNA ウイルスを対象に、ウイルスゲノム情報を集めたデータベースの構築と変異の実態を解析するために必要な解析ツールの作製を進めた。自然界で許容される変異の種類、ゲノムに生じる連鎖変異、ウイルス病原性変化と連動する変異等の情報の蓄積に努めた。臨床材料や情報の取得が重要であり、感染研内外との共同研究を積極的に進めた。

第三室では、細菌のゲノム情報をもとに病原性を解析する研究をめざしている。病原性大腸菌のように、常在菌が外来性の毒素産生能や薬剤耐性を獲得して、病原性を持つこともあるので、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。培養環境とヒト体内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。このような背景から、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。黄色ブドウ球菌をモデルに、生体内感染期における遺伝子発現の制御と病原性の関連を解析した。パイオテロ対策に役立てるため、炭疽菌プラスミドのゲノム情報を得た。

#### 業 績

##### 調査・研究

##### 1. 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. AAV ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

### (1) 高発現 AAV ベクターの開発

AAVS1-insulator を搭載し、ヒト EF1 プロモーターからルシフェラーゼを発現する AAV ベクターをマウス骨格筋に接種する実験を継続した。接種後 4 から 24 週間まで、insulator 搭載ベクターからは、insulator の向きや位置に依存せずに、対照の 1000 倍程度の高発現が認められた。発現量は、極めて転写活性が高い HCMV IE プロモーター/エンハンサーを用いた場合に匹敵した。insulator は筋肉での残存ベクターゲノム量、環状 DNA の割合に影響を与えないので、高発現は転写の昂進によると推定した。AAVS1-insulator は、HCMV IE プロモーター/エンハンサーからの転写をさらに昂進する機能は示さなかったが、転写活性が必ずしも高くない様々なプロモーターからの高発現に寄与する可能性がある。200 塩基長の AAVS1-insulator は、最大 4,500 塩基長のベクターゲノムしかパッケージできない AAV ベクターにおいて特に有意義なものである。(竹内隆正、内野蘭代、神田忠仁)

### (2) 抗 AAV 抗体による AAV 感染促進

ヒト単球系細胞株への AAV 感染における抗 AAV 抗体の影響を調べた。中和濃度以下に希釈したマウス抗 AAV 血清と AAV をインキュベートした後、単球系細胞株へ接種すると、2~10 倍の感染促進が見られた。予め単球系細胞株と抗 Fc 受容体抗体を反応させると、抗 AAV 血清による感染促進は認められなかった。AAV 粒子へ結合した抗 AAV 抗体の Fc 部位が細胞表面の Fc 受容体に結合し、AAV の細胞への結合、侵入を促進するらしい。AAV が感染したサルでは、AAV ゲノムは主にリンパ系組織に検出される。AAV は宿主に強い免疫反応を引き起こさないで、生体内でも、少量の抗 AAV 抗体が Fc 受容体を持つ免疫系細胞への AAV 感染を助けていると考えられる。(森清一郎、神田忠仁)

## II. HPV に関する研究

### 1. HPV の増殖制御機構の研究

#### (1) HPV 後期プロモーターに結合する細胞蛋白質の同定

HPV 後期プロモーターの転写活性は感染角化細胞の分化に同調して制御され、未分化細胞では強く抑制されている。マイクロ磁気ビーズに結合させた HPV16 後期プロモーターの DNA 断片 (250bp) と HeLa 細胞核抽出液を混合し、DNA と複合体を作った蛋白質を分離した。得られた蛋白質は MALDI/TOF-PMF 法による解析で nucleolin であることがわかった。nucleolin は核小体に豊富に存在する蛋白質で、HCV の複製に関与する。後期プロモーター内に nucleolin 結合配列に類似した配列が存在するので、nucleolin が HPV 後期プロモーターに結合し、転写活性を抑制する可能性が示された。(佐藤英貴、柗元 巖、石井克幸、神田忠仁)

#### (2) HPV DNA 複製における MCM 結合蛋白質の役割

これまでにヒト MCM7 蛋白質に結合する機能未知のヒト細胞蛋白質として MCM-BP 蛋白質を同定した。HPV の複製蛋白質 E1 は MCM7 蛋白質とアミノ酸配列の相同性があることから、HPV DNA 複製における MCM-BP 蛋白質の役割を検討した。293 細胞における HPV16 オリジンプラスミドの一過性複製を検出する実験系で、siRNA によって MCM-BP 蛋白質をロックダウンすると、オリジンプラスミドの複製量が増加した。MCM-BP 蛋白質が HPV 複製を負に制御している可能性がある。(柗元 巖、神田忠仁)

#### (3) HPV 生活環と角化細胞の分化における miRNA の役割

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞の培養条件を詳細に検討し、未分化状態とインボルクリンを発現する分化状態を樹立した。この二つの状態の miRNA を網羅的に比較し、miR-210 の発現量が分化に伴って大幅に上昇することを見出した。miR-210 は細胞の YY1 の発現量を変動させ、HPV 初期プロモーター P97 の転写活性を抑制した。また、キャプシド蛋白質 L1 をコードする mRNA の安定性も未同定の miRNA によって調節されていることがわかった。HPV 遺伝子の発現調節に細胞の miRNA が重要な役割を果たしているらしい。

(Marita Overhoff、神田忠仁)

#### (4) HPV16 型 L1 蛋白質のシステイン残基が持つチオールの機能-2

昨年までに、HPV キャプシド蛋白質 L1 のチオールが感染の初期過程において重要な役割を果たすことを示した。このチオールが感染初期に起こる L1 分子間ジスルフィド結合の異性化に必要であることがわかった。異性化は HPV と細胞膜との結合に重要であり、異性化できない HPV は細胞表面に留まるか侵入しても排出されると考えられ

る。(石井克幸、神田忠仁)

## 2. 交差性中和エピトープをもつワクチン抗原の作製

### (1) 型共通 HPV ワクチン開発に関する研究

昨年度までに、HPV16型 L1 蛋白質に型共通の L2-エピトープを挿入して作製したキメラ VLP 抗原をアジュバントとともにウサギに免疫して得た抗血清が、複数の型の HPV を中和することを示した。臨床試験を念頭に、ヒトに使用実績がある水酸化アルミニウムを用いてキメラ VLP 抗原を沈降させ、ヒト接種相当量をマウスに筋注して免疫応答を調べた。得られた血清も HPV16、18、31、35、52、58 型を中和した。(近藤一成、島袋志保、森 清一郎、神田忠仁)

### (2) ワクチン抗原候補キメラ VLP の精製

キメラ VLP を組み換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞で作った。凍結融解、超音波破碎、Benzonase による核酸の分解、フィルター濾過の後、カチオンイオン交換クロマトグラフィー (POROS 50HS) とゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-300 HS) で精製した。この方法で 120 ml の培養系から約 97% の蛋白質純度のキメラ VLP を 1.27mg 得た。電子顕微鏡で粒子構造を確認した。残された課題は混入する細胞由来 DNA の除去で、還元剤によって解離させた状態で Benzonase を加えても 1mg のキメラ VLP 当たり 43.6ng の DNA が残った。DNA 結合能を持つ L1 のカルボキシ末端を欠失させたキメラ VLP の作製を試みたが、粒子を形成しなかった。(石井克幸、神田忠仁)

### (3) HPV 中和抗体価測定系の作製

HPV の増殖する実用的な培養細胞系は無いため、HPV キャプシドにレポーターを組み込んだ感染性偽ウイルス (PsV) を使って抗体の中和活性を測定している。今年度は新たに、HPV35、51 型 PsV を作製した。HPV キャプシド蛋白質をコードする mRNA は未分化な通常の培養細胞では分解されてしまうので、アミノ酸配列は変えずに塩基配列を置換したコドン変異体が必要である。オーバーラップする 90 塩基の 1 本鎖 DNA を PCR で繋いでいく方法でコドン変異体遺伝子を合成した。HPV35、51 型 PsV は感染性を示し、中和抗体の測定系に使えることがわかった。(森 清一郎、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. RNA ウイルスゲノムの解析

#### (1) ノロウイルス (NoV) のゲノム解析

昨年度に引き続き、ウイルス二部と共同で NoV のゲノム解析を行った。2006 年 11 月から 2008 年 2 月までに 19 の都道府県で発生したノロウイルス感染症例から 92 の糞便試料を回収した。80 の試料から NoV GII/4 ゲノム全長の塩基配列を得た。キャプシド蛋白質 VP1・VP2 をコードする領域について系統樹解析を行なった。75 (94%) の配列は、昨年冬期に日本とヨーロッパ諸国に流行した新型株 (GII/4 2006b 株) に近縁であったが、4 例の試料に、固有の遺伝子系統を示す GII/4 株が検出された。これらは、キャプシド蛋白質の最外郭ループ領域に複数のアミノ酸置換をもつ。抗原変異による流行拡大の可能性がある。引き続き、次年度も冬期の流行株を解析する。(本村和嗣、中村浩美、守宏美、岡智一郎[ウイルス二部]、武田直和 [ウイルス二部]、神田忠仁、佐藤裕徳)

糞便試料の収集は以下の方々の協力による(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)、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(宮城県衛生環境研究所)

#### (2) C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム解析

HCV 持続感染維持とウイルスゲノム変異の関連を知るために、HCV 持続感染者のウイルスゲノムの網羅的解析を開始した。昭和大学医学部と共同で、持続感染症例(インターフェロン治療例を含む)の血液試料を収集し、現在までに、28 症例についてゲノム全長(約 9.6 kb)の塩基配列を得た。インターフェロン耐性を担う HCV 遺伝子について新たな知見が得られると期待している。(本村和嗣、中村浩美、守宏美、伊藤敬義[昭和大学医学部]、井廻道夫[昭和大学医学部]、佐藤裕徳、神田忠仁)

#### (3) ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のゲノム解析

HIV-1 の薬剤耐性とウイルスゲノム変異の関連を知るために、治療前後の HIV-1 持続感染者のウイルスゲノム

の網羅的解析を開始した。国立国際医療センターと共同で、治療前後の HIV-1 の持続感染症例（薬剤治療例を含む）の血液試料を収集し、現在までに、18 症例についてゲノム全長（約 9.6 kb）の塩基配列を得た。薬剤耐性変異と連動する変異を同定することで、HIV-1 遺伝子の共進化について新たな知見が得られる。（本村和嗣、中村浩美、守宏美、瀧永博之（本村和嗣、中村浩美、守宏美、瀧永[国立国際医療センター]、佐藤裕徳）

#### (4) ブタ内在性レトロウイルス（PERV）のゲノム解析

移植用臓器として利用が計画されている遺伝子改変ブタには PERV のプロウイルスが存在し、常時、多様な感染性粒子を産生している。PERV の変異と感染宿主域の拡大に関する基盤情報として、ブタ細胞中の PERV の全ゲノム解析を行なった。遺伝子改変ブタの卵巣細胞および末梢血リンパ球中の PERV プロウイルス DNA（ほぼ全長約 8.9 kb）をクローニングし、合計 19 のゲノム塩基配列を得た。また、卵巣細胞との共培養により樹立した PERV 感染 HeLa 細胞から、15 のゲノム塩基配列を得た。（本村和嗣、神田忠仁、佐藤裕徳）

#### 2. 病原性ウイルスゲノムデータベースの構築

病原体ゲノムデータベースに、キーワード検索・BLAST 検索を行うための Web インターフェイスを付加した。ゲノム情報を基にウイルスの起源、多様性、変化等の解析を行なうためのツール（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）を作製し、Web インターフェイスの検索結果をもとに解析を実行する環境をつくった。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、HIV-1 の最新のゲノム情報を定期的に自動取得するための自動更新システムをデータベースに付加した。（横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳）

#### 3. 病原性ウイルス蛋白質の立体構造解析

##### (1) HIV-1 主要中和エピートープの立体構造解析

HIV-1 外被蛋白質 Gp120 の高度可変領域 V3 は、感染者の中和抗体の主要な標的である。V3 の電荷が +2 ~ +4 であるとき、ウイルスは抗 V3 抗体中和抵抗性となることを見出した。電荷量の変化による V3 構造の変化を分子動力学計算に基づく構造解析により調べた。その結果、V3 の電荷が gp120 単量体における V3 の立体配置を制御することを見出した。中和抵抗性 V3（荷電量 +2 ~ +4）は stem 付近から折れ曲がった構造をとる。このため、中和エピー

トープが Gp120 三量体では遮蔽されることが予測された。（横山勝、長縄聡[横浜市立大学]、佐藤裕徳）

##### (2) サボウイルスプロテアーゼ複合体の構造解析

サボウイルス (SaV) プロテアーゼの基質認識に重要と考えられるアミノ酸を予測し、実験で検証した。計算機を用いて、SaV プロテアーゼドメインと基質の一部 (ORF1 ポリプロテイン開裂部位近傍 8 アミノ酸) の複合体構造を構築した。結合様式を原子レベルで解析し、基質結合に関わる可能性のあるプロテアーゼのアミノ酸を特定した。結合には静電相互作用、 $\pi$ - $\pi$  相互作用、疎水相互作用が関与すると考えられた。現在、これらの相互作用の意義について、変異導入解析を用いて調べている。（横山勝、岡智一郎[ウイルス 2 部]、片山一彦[ウイルス 2 部]、武田直和[ウイルス 2 部]、佐藤裕徳）

#### IV 病原性細菌のゲノム解析

##### 1. 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分離された Fv113 株の全ゲノム塩基配列を調べている。平均 1.6 kb の DNA 断片を含んだ全ゲノムショットガンライブラリーより、12,454 個の約 700 bp の塩基配列を取得した。Illumina 社 Genome Analyzer では 16,351,103 本の 33 bp の塩基配列を取得した。得られた全ての塩基配列をアセンブルし、3,811 本の連結配列（コンティグ）を得た。コンティグの総塩基長は約 2.5Mb で、Pulsed-Filed 電気泳動から推定されるゲノム長と一致した。2,225 個の ORFs を抽出し、Blastp によって、蛋白質相同性を検索した。740 個（33%）が *Fusobacterium* 属と、142 個（6%）が大腸菌などの Proteobacteria と、664 個（30%）が *Clostridium* 属などの Firmicutes と最も高い相同性を示した。（関塚剛史、黒田 誠、大草敏史「順天堂大学・消化器内科」）

##### (2) 細菌フローラの網羅的解析

網羅的に細菌フローラを同定する Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を用いて、健常人と細菌性膣炎患者の膣内フローラの比較解析を行っている。健常人では、デーデルライン桿菌である乳酸菌群の存在比率が高いが、膣炎患者では乳酸菌群の存在比率が低く、*Gardnerella* 属細菌および難培養性細菌が優位に存在することが示唆された。解析精度向上のため、T-RFLP 法の改良および新しい 16S リボソーム配列データベースの作成を検討している。（黒田 誠、関塚剛史）

## 2. 細菌感染における病原性因子の転写調節と定着因子の解析

### (1) 黄色ブドウ球菌の病原因子レギュレーター・Sar ファミリーの転写調節解析

黄色ブドウ球菌の病原性は、Sar ファミリーの複合的な転写調節系により制御されている。SarS 過剰発現は菌凝集を抑制するのに対し、SarT および SarU 過剰発現は強度の菌凝集を起こした。これら過剰発現体の転写プロファイルマイクロアレイで解析したところ、*sarT* および *sarU* 遺伝子近傍にコードしている *sasG* 遺伝子の転写増強が明らかになった。(黒田 誠、関塚剛史)

### (2) 細胞壁架橋蛋白質 SasG による黄色ブドウ球菌の自己凝集の解析

SasG は、細胞壁架橋型蛋白質であり、菌凝集に直接起こす可能性が示唆された。*sasG* 遺伝子に変異を導入すると菌凝集が消失し、プラスミドにより *sasG* 遺伝子を相補すると菌凝集が回復した。SasG は A ドメインと 8 回の繰り返し B ドメインを持つが、A ドメインの相補でバイオフィルム・菌凝集の回復が見られた。組換え SasG-A 発現体を Native 電気泳動法およびフォルマリン架橋実験で分析したところ、4 もしくは 8 量体のホモ複合体を形成していることが分かった。これらの結果は、SasG が菌凝集・バイオフィルム形成を亢進し、臨床で見られる黄色ブドウ球菌の微小膿瘍の形成に関わっている可能性を示唆している。(黒田 誠、関塚剛史)

## 3. 細菌のゲノム配列を用いた分子疫学調査

### (1) *B. anthracis* の持つプラスミドの SNPs 及び変異領域の同定

国内の異なる地域、年代および家畜より分離された *B. anthracis* BA103 及び BA104 の 2 つのプラスミド [pX01 (181 kb) 及び pX02 (95 kb)] の全塩基配列を調べた。約 700 本のプライマー・ウォーキング法により塩基配列を明らかにした。Ames Ancestor 株および BA103 株間の一塩基多型は、pX01 で 7 カ所、pX02 で 2 カ所存在し、塩基の欠失および挿入箇所は pX01 で 6 カ所、pX02 で 3 カ所存在した。Ames Ancestor 株および BA104 株間の一塩基多型は、pX01 で 18 カ所、pX02 で 11 カ所存在し、塩基の欠失および挿入箇所は、pX01 で 5 カ所、pX02 で 8 カ所存在した。国内分離株間におけるプラスミドの塩基配列の多様性が示唆された。(関塚剛史、黒田 誠、野口 章 [獣医科学部]、井上 智 [獣医科学部])

### (2) 日本における *B. anthracis* の遺伝型と地理的分布

日本分離株を含む所内保有炭疽菌 48 株を解析対象とした。ゲノムおよびプラスミド DNA 上の 8 カ所の VNTR (variable number of tandem repeats) 領域に対し、Multiple-locus VNTR analysis (MLVA) を行った。日本分離炭疽菌株は主に同一のアレルにタイピングされ、特有の遺伝型を示した。今後、17 カ所の VNTR 領域を加え、計 25 カ所の MLVA 解析を行い、日本株の詳細な遺伝型および地理的分布・由来について検討する。

(関塚剛史、黒田 誠、奥谷晶子 [獣医科学部]、井上 智 [獣医科学部])

### (3) 狂犬病ウイルスのゲノム配列を用いた分子疫学調査

2006 年にフィリピンで野犬に噛まれ、京都で狂犬病を発症し、死亡した患者の狂犬病ウイルス株 (R061117) のゲノム配列を調べた。一本鎖 RNA ウイルスゲノムから cDNA を調整し、固定毒 CVS 株の保存配列を参考にして計 6 箇所の領域 (平均 4 kb) を PCR 増幅し、全ゲノム配列をカバーする DNA を調整した。プライマー・ウォーキング法により、5' 末端側の 90 塩基および 3' 末端側の約 340 塩基を除く 11,490 塩基長の配列を明らかにした。

R061117 株のゲノム配列は、固定毒 CVS 株に 84% の相同性を示し、フィリピンの野犬間で流行している狂犬病ウイルスとワクチン株間におけるゲノムの多様性が示唆された。(関塚剛史、黒田 誠、野口 章 [獣医科学部]、井上 智 [獣医科学部])

## 品質管理に関する業務

### HPV ワクチンの承認前検査

欧米の製薬会社が開発した HPV ワクチンの承認前検査を担当した。安全性研究部、細菌 2 部と共同で、申請書類の精査を行い、記載不備の修正や検査項目の選定を進めた。(柘元 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への参加

WHO は 2006 年の検討会において、HPV 感染の実態とワクチン導入のインパクトを世界規模で調査することを決め、情報収集を行う HPV ラボラトリーネットワーク (HPV ラボネット) を組織した。2007 年 9 月に病原体ゲノム解析研究センターは、西太平洋地域の Regional Reference Laboratory に指定された。これまでに HPV ラボネットにて標準化された HPV ジェノタイプピング法の導入を進めている。(柘元 巖、神田忠仁)

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Kondo, K., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J. Med. Virol.*, 80:841-846, 2008.
- 2) Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Antibody-Dependent Enhancement of Adeno-Associated Virus Infection of Human Monocytic Cell Lines. *Virology*, 357:141-147, 2008.
- 3) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T.: Tissue Distribution of Cynomolgus Adeno-associated Viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in Naturally Infected Monkeys. *Arch. Viro.*, 153:375-380, 2008.
- 4) Takeuchi, T., Wang, L., Mori, S., Nakagawa, K., Yoshikura, H., and Kanda, T.: Characterization for Quality Control of Mouse 3T3-Swiss Albino Cells Available in Japan. *Jap. J. Inf. Dis.*, 61:9-12, 2008.
- 5) Ishii, Y., Kondo, K., Matsumoto, T., Tanaka, K., Shinkai-Ouchi, F., Hagiwara, K., Kanda, T.: Thiol-reactive Reagents Inhibits Intracellular Trafficking of Human Papillomavirus Type 16 Pseudovirions by Binding to Cysteine Residues of Major Capsid Protein L1. *Virology Journal*, 4:110, 2007.
- 6) Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Takatani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. *Virus Genes*, 35:473-481, 2007.
- 7) Fukushi S, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Taguchi F, Yokoyama M, Kurane I, Morikawa S: Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells. *J. Virol.* 81: 10831-10834, 2007.
- 8) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N: Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection and its abrogation in CD4-dependent infection. *J. Gen. Virol.* 88: 3139-3144, 2007.

9) Kameoka M, Kitagawa Y, Utachee P, Jinnopat P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Dhepakson P, Tokunaga K, Sato H, Komano K, Yamamoto N, Oguchi S, Natori Y, Nishimune Y, Sawanpanyalert P, and Ikuta K.

Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359: 729-734, 2007.

10) Motomura, K., Chen, J., and Hu, W.-H. Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *J. Virol.* 82: 1923-1933, 2008.

11) Tanaka, Y., Sakamoto, S., Kuroda, M., Goda, S., Gao, Y. G., Tsumoto, K., Hiragi, Y., Yao, M., Watanabe, N., Ohta, T., and Tanaka, I. A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ehb from *Staphylococcus aureus*. *Structure*, 16:488-496, 2008.

12) Higashide, M., Kuroda, M., Omura, C. T., Kumano, M., Ohkawa, S., Ichimura, S., and Ohta, T.

Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Have Emerged in Urogenital Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008 Mar 24. [Epub ahead of print]

13) Tanaka, Y., Kuroda, M., Yasutake, Y., Yao, M., Tsumoto, K., Watanabe, N., Ohta, T., and Tanaka, I. Crystal structure analysis reveals a novel forkhead-associated domain of ESAT-6 secretion system C protein in *Staphylococcus aureus*. *Proteins*, 69:659-664, 2007.

#### 2. 和文発表

1) 神田忠仁、森清一郎：ヒトパピローマウイルスの遺伝子発現制御、ウイルス研究の現在と展望、蛋白質核酸酵素、52、1106-1112、2007

2) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルス、感染制御、3(6) 539-544、2007

3) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルスの生活環と感染予防ワクチン戦略、日本性感染症学会誌、18(1)、20-27、2007

4) 神田忠仁：ヒトパピローマウイルス感染症と子宮頸がん、MEDICO、38(9)、297-300、2007

5) 村上 努、Heinrich G. G\_ttlinger、森川裕子、駒

野 淳、梁 明秀、佐藤裕徳： Gag 蛋白質の輸送と機能の制御、日本エイズ学会誌、9、102-107、2007

6) 本村和嗣, 岡智一郎、佐藤裕徳： 2006年に我が国に流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析、食品衛生研究、57、19-26、2007

7) 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 秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析、病原体微生物情報 (IASR)、10 月号 3-4

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

1) Kukimoto, I., Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T.: The hSkn-1a POU transcription factor enhances DNA replication of human papillomavirus 16 through direct binding to two sites near the replication origin. 24th International Papillomavirus Conference (November 3-9, 2007, Beijing, China.)

2) Wadchara Pumpradit P, Tomita Y, Yokoyama M, Naganawa S, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K and Sato H. Characterization of neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1CRF01\_AE molecular clones with different coreceptor usages. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 25-28, 2007, Los Angeles, USA.

3) Motomura K, Oka T, Grant H, Yokoyama M, Kanda T, Takeda N, Sato H. Genome analysis of norovirus GII4 variants spread in Japan during 2006-2007-winter season. The 41th Annual Meeting of the US- Japan Cooperative Medical Science Program, Virology Panel Meeting, July 23-25, 2007, Baltimore, MD, USA.

4) Oka T, Yokoyama M, Yamamoto M, Miyashita K, Hansman GS, Katayama K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. Structural and functional analysis of the calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Third International Calicivirus Conference, November 3-6, 2007, Cancun, Mexico, Caribbean.

5) Tanaka T, Motomura K, Yamamoto M, Kanda T, Sato H, Oka T, Hansman GS, Takeda N and Norovirus Surveillance Group of Japan. Molecular epidemiology of Noroviruses during 2006-2007-winter season in Japan. The Third International Calicivirus Conference, November 3-6, 2007, Cancun, Mexico,

Caribbean.

6) Naganawa S, Yokoyama M, Kitamura K, and Sato H. Self-masking of HIV-1 envelope V3 variants for neutralization escape. The third Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. November 26-27, 2007, Hiroshima, Japan.

7) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, and Shioda T. A single amino acid of HIV-2 capsid determines its sensitivity to restriction by cynomolgus monkey and human TRIM5(s). The 3rd Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. November 26-27, 2007, Hiroshima, Japan.

8) Makoto Kuroda. In vivo expression of cell surface proteins in Staphylococcus aureus. Gordon Research Conference, staphylococcal diseases. Les Diablerets, Switzerland. Sep. 2-7/2007.

### 2. 国内学会

1) Kukimoto, I., Mori, S., Takeuchi, T., and Kanda, T.: The hSkn-1a POU transcription factor enhances DNA replication of human papillomavirus type 16. 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007 年 10 月、横浜)

2) Kondo, K., Ochi, H., Yoshikawa, H., and Kanda, T. Prophylactic vaccine against multiple high-risk human papillomaviruses. 第 66 回日本癌学会学術総会 (2007 年 10 月、横浜)

3) Ishii, Y., Kondo, K., Matsumoto, T., Tanaka, K., Shinkai-Ouchi, F., Hagiwara, K., Kanda, T.: HPV 感染初期過程におけるキャプシド内遊離チオール役割、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月、横浜)

4) 内野繭代、竹内隆正、森清一郎、神田忠仁：インスレーターあるいは MAR を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) の開発、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月、横浜)

5) 岡智一郎、山本真民、横山勝、小川智子、Hansman S. Grant、片山和彦、宮下佳奈、高木弘隆、遠矢幸伸、佐藤裕徳、武田直和：カリシウイルスプロテアーゼの構造機能解析。日本薬学会 (2007 年 3 月、富山)

6) 本村和嗣, 岡智一郎, Hansman Grant, 横山勝, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳：2006-2007 シーズンに流行したノロウイルスのゲノム解析。衛生微生物技術協議会第 28 回研究会 シンポジウム (2007 年 7 月、岡山)

7) 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 シーズンの冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 のゲノム解析。第 5 回感染症態研究会 (2007 年 9 月、熊本)

8) 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 19 回 ウイルス性下痢症研究会 (2007 年 10 月、札幌)

9) 横山 勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman S. Grant, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: サポウイルスプロテアーゼ/ORF1 ポリプロテイン複合体の構造解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ (2007 年 10 月、札幌)

10) 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 55 回 日本ウイルス学会総会、ワークショップ (2007 年 10 月、札幌)

11) 岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman S. Grant, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 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機構の共通性。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ (2007 年 10 月、札幌)

12) 宋海, 中山英美, 横山勝, 佐藤裕徳, 塩田達男: A single amino acid of HIV-2 capsid determines its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5<sub>s</sub>. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌)

13) 久保嘉直, 吉居廣朗, 神山陽香, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 細胞内侵入における ERM ファミリー蛋白質の関与。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌)

14) 吉居廣朗, 神山陽香, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: エンドサイトーシス阻害剤の CD4 非依存性 HIV-1 感染に対する影響。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌)

15) 神山陽香, 吉居廣朗, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直: HIV-1 感染における膜裏打ちタンパク質の関与に対する RNAi による網羅的解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌)

16) 福士秀悦, 前田健, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 横山勝, 吉川泰弘, 水谷哲也, 酒井宏治, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂: コウモリ由来 ACE2 を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (2007 年 10 月、札幌)

17) 福士秀悦, 平井明香, 新倉綾, 山田靖子, 前田健, 吉川泰弘, 横山勝, 水谷哲也, 酒井宏治, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂: コウモリ由来 ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルスの感染性の解析。第 7 回人と動物の共通感染症研究会学術集会 北里大学薬学部コンベンションホール (2007 年 11 月)

18) 佐藤裕徳, 横山勝, 神田忠仁, 早川 智, 北村勝彦, 長縄聡: HIV-1 CRF01\_AE V3 の変異解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会、(2007 年 11 月、広島)

19) 長縄聡, 早川 智, 北村勝彦, 佐藤裕徳: HIV-1 CRF01\_AE V3 の機能解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月、広島)

20) 横山勝, 長縄聡, 神田忠仁, 佐藤裕徳: HIV-1 CRF01\_AE V3 の構造解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月、広島)

21) 鈴木康弘, 横山 勝, 佐藤裕徳, Promjunyakul Warunya, 今村淳治, 服部俊夫: CD4 非依存性 HIV-1 臨床分離株 SDA-1 の CD4 非依存性責任領域のコンピューター及び分子生物学的な解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月、広島)

22) 椎野禎一郎, 佐藤裕徳, 保科佳美, 武部 豊: HIV-1 の RT 領域における遺伝子組換え価と突然変異率の多様性への寄与。第 21 回日本エイズ学会学術集会 (2007 年 11 月、広島)

23) 黒田誠, 東出正人, Carlos Takashi Omura, 市村禎宏, 太田敏子: ラクタム剤耐性 Staphylococcus saprophyticus の新規 SCCmec 構造。第 81 回日本細菌学会総会 (2008 年 3 月、京都市)