

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、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の増殖とそれを支える細胞因子の研究ならびに遺伝子治療に使うウイルスベクターに関する研究を行った。

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、そのうち 15 の型(ハイリスク型)が子宮頸癌の原因となる。欧米で開発された第一世代 HPV ワクチンは、ハイリスク型 HPV のうち 2 種の感染阻止に限定した予防効果を持つ。我々は、ハイリスク HPV 群に共通の中和エピトープを見出した。このエピトープを搭載したワクチン抗原を試作した。

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ている。第一室は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。

HPV ワクチンの承認前検査、生物学的製剤基準の策定、検定項目の選定を担当した。また、実施に検定を担当した。

遺伝子治療は、マスコミの過熱報道が収まった後も着実に進歩し、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。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、いわば人工のウイルスを多量に、直接患者に投与することになるので、安全の確保が重要となる。海外では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、遺伝子治療臨床試験における安全性の評価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)ベクターの性能向上を目指す研究を継続した。

第二室では、バイオインフォマティクス技術と実験データ、臨床データを活用して、ウイルスの性質を解析する新しい研究戦略の開発を続けた。計算科学を駆使して、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ことから、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。これらの研究戦略を HIV が中和抗体から逃避する分子機構や薬剤耐性獲得機構の解析、ノロウイルスの分子疫学に役立てるとともに、さらに、新規抗ウイルス剤の設計に役立てる研究へと進展させている。

次世代シーケンサーを使って、C 型肝炎ウイルス慢性感染患者体内に存在するウイルス準種の包括的解析をおこない、インターフェロン治療の感受性に関わるウイルス側因子の探索を進めた。インフルエンザウイルス研究センターに協力し、分離株のシーケンシングと解析を担当した。

第三室は、次世代シーケンサーを使って、バイオテロに使われる可能性のある炭疽菌、薬剤耐性食中毒菌、口腔常在菌等のゲノム解析を行った。また患者検体に含まれる核酸の迅速で包括的なシーケンシングを行い、そこからヒトの配列を除いて、患者に感染している微生物のゲノム情報を浮かび上がらせる研究手法を開発し、川崎病の病原因子探索への応用を試みた。細菌には動物の腸管内原生動物に感染し、感染原生動物とともに他の宿主に感染を拡大するものがある。このような細菌群の

研究は殆ど無いので、牛をモデルに腸管内原生動物と細菌の研究を始めた。

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会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て行った。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、終元 巖、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) AAVS1 インスレーター搭載 AAV ベクターの改良

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 ベクターに AAVS1 インスレーターを搭載し、さらにキャプシドの一部を AAV1 と相同なアミノ酸配列に置換し、それとは別の領域のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した。これらの改良の組み合わせによりマウス骨格筋で 200 倍の発現増強効果があった。MCK プロモーターの骨格筋特異性は改良型ベクターにおいても保持されていた。治療用遺伝子を発現させる土台として有用なベクターである。(竹内隆正、村上 功、神田忠仁)

(2) AAVS1 インスレーター機能の解析

マウス細胞での AAVS1 インスレーターの解析から、マウス蛋白質 Zfp143 が AAVS1 インスレーターに結合することが示唆されたので、ヒト細胞中での ZNF143 (Zfp143 のヒトホモログ) の結合を調べた。クロマチン免疫沈降により、HeLa S3 細胞及びヒト初代筋芽細胞において、ZNF143 が AAVS1 インスレーターに結合していることが分かった。HeLa S3 細胞で ZNF143 を過剰発現させると、AAVS1 インスレーターの下流にある *PPP1R12C* 遺伝子の mRNA が増加し、逆に siRNA を用いて ZNF143 をノックダウンすると *PPP1R12C* mRNA が減少した。ZNF143 は AAVS1 インスレーターに結合して *PPP1R12C* 遺伝子の転写を促進していることが示された。ZNF143 が AAVS1 領域への遺伝子挿入効率や、挿入遺伝子の転写に及ぼす影響について研究を進める。(竹内隆正、神田忠仁)

II. HPV に関する研究

1. HPV 増殖機構の研究

(1) HPV DNA のローリングサークル型複製

HPV DNA の無細胞複製系を構築し、W12 細胞 (HPV16 DNA を維持しているヒト子宮頸部上皮細胞) の抽出液中では、HPV DNA がローリングサークル型の DNA 複製機構により複製されることが分かった。W12 細胞抽出液にヒト胎児腎 293 細胞の抽出液を加えると、ローリングサークル型複製が抑制されたことから、293 細胞にはローリングサークル型複製の抑制因子があることが示唆された。(松尾理加、終元 巖、神田忠仁)

(2) HPV のヌクレオソーム構造の解析

HPV 持続感染細胞 (HPV16 感染 W12 細胞、及び HPV31 感染 CIN612 細胞) を用いて、HPV ゲノムのヌクレオソーム構造を調べた。増殖もしくは分化する条件で細胞を培養し、NP40 処理の後、MNase 処理を行うことで単ヌクレオソームに相当する DNA を得た。各 HPV ゲノムの LCR~E6 遺伝子領域にわたり 30 塩基ごとに PCR アンプリコンを設定し、リアルタイム PCR で定量した。どちらの細胞も培養条件により、HPV ゲノム内の MNase 耐性領域が変化した。HPV16 と HPV31 で同様の変化を示す領域があり、宿主細胞の分化と連動してヌクレオソーム構造が変化する共通機能領域の可能性がある。(村上 功、竹内隆正、終元 巖、神田忠仁)

(3) ヒト核小体蛋白質 nucleolin が HPV 複製に及ぼす効果

HPV16 ゲノムの特異的部位に結合する nucleolin が、HPV16 の複製 DNA ヘリカーゼである E1 蛋白質と結合することを、Far-Western 法を用いて明らかにした。293 細胞抽出液を用いた無細胞 HPV DNA 複製系に組換え nucleolin 蛋白質を加えることで、nucleolin の HPV DNA 複製における役割を検討したが、効果は認められなかった。今後は細胞内で nucleolin をノックダウンした時の HPV 複製への影響を検討する。(終元 巖、松尾理加、神田忠仁)

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 我が国の HPV 遺伝子型分布の調査

十分な感度と特異性を持つ HPV タイピング法を用いて、我が国の女性に感染している HPV 遺伝子型の調査を開始した。NTT 東日本病院婦人科を受診した女性から子宮頸管部細胞を収集し、DNA を抽出して、PGMY リバースプロテイング法を用いて HPV タイピングを行った。2010 年

2月までに393検体を解析し、HPV陽性率は50%、その内の31%の検体から複数のHPV型が同時に検出された。従来の成績以上に複合感染が多いHPV感染の実態が示されつつある。(終元 巖、松尾理加、近藤一成[NTT 東日本病院]、神田忠仁)

(2) HPV タイピング方法の再検討

HPV タイピングで汎用されているPCRシステム(MY09/11、PGMY、GP5+/6+、MGP、L1C1/C2)の間で、2種類の型のHPV DNAが混在するときの検出精度を比較した。HPV6、16、18、31、51、52、58の全長ゲノムをクローニングしたプラスミドを用いて、6000コピーのHPV16 DNAと6000、600、60、6コピーのその他の型のDNAを混合した試料を調整した。各PCRを行い、型特異的なDNAプローブを用いたリバースプロットハイブリダイゼーション法によりPCR産物の検出・型判別を行った。全てのPCRシステムで、片方の型の検出感度が低下する干渉現象が認められた。特に主に日本で使用されてきたL1C1/C2 PCRでは、6000コピーのHPV16 DNAと600コピーのHPV18またはHPV51 DNAが混在する条件では、HPV16 DNAが検出されなかった。L1C1/C2 PCRを用いた過去のデータは、複合感染するHPVが正確に検出されていない可能性がある。(中尾砂理、森 清一郎、終元 巖、神田忠仁)

(3) 新しいHPV タイピング方法の開発

蛍光ビーズソーターを用いてHPV遺伝子型を判別する新しい方法を開発した。HPV DNAのL1遺伝子領域をMGP PCRにて増幅し、HPV型特異的プライマー伸張反応によりビオチン付加ヌクレオチドを取り込ませる。このDNAをマイクロビーズに結合したHPV型特異的プローブとハイブリダイゼーションさせ、蛍光ストレプトアビジンで標識した後、蛍光ビーズソーターにて検出する。この方法により、HPV6、11、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68を十分な感度と特異性で判別することが可能であった。また本方法は、臨床検体のHPVタイピングにも適応可能であった。(終元 巖、松尾理加、齊藤 督[理研ジェネシス])

3. 交差性中和エピトープをもつワクチンの開発

(1) 高リスク型共通中和抗体によるHPV感染抑制機構

HPV16キャプシド副構成蛋白質(L2)のアミノ酸56-75領域には、高リスク型HPVに共通の中和エピトープが存在する。レポータープラスミドを含むHPV16擬似ウイルス粒子を用い、このエピトープに結合する中和抗体が、細胞内でキャプシドからDNAが遊離する脱殻過程を阻害

することが分かった。L2の56-75領域は脱殻過程に必要な機能を担うことが示され、この機能は全ての高リスク型HPVに共通だと考えられる。(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)

(2) 高リスク型共通中和抗体によるHPV31 authentic virion感染の中和

CIN612細胞を分化させる三次元培養法を用いて、HPV31のauthentic virionを調整した。HPV16 L2のアミノ酸56-75領域に対する高リスク型共通中和抗体が、このauthentic virionのヒトHaCaT細胞に対する感染を中和することが分かった。型共通中和抗体が実際のHPV感染を、幅広く防御できることが示唆された。(石井克幸、中原知美、森 清一郎、神田忠仁)

(3) HPV51 Ma株のL2に結合する細胞蛋白質の同定

HPV51プロトタイプ(Nu株)と日本で分離されたHPV51(Ma株)のL2は、二つの領域でアミノ酸配列が大きく異なり、Ma-L2を持つ擬似ウイルス粒子を細胞に接種するとレポーターが発現するが、Nu-L2を持つ擬似ウイルス粒子では発現しない。FLAG-Ma-L2を293FT細胞で発現させ精製し、質量分析法によりMa-L2に特異的に結合する細胞蛋白質を同定した。この蛋白質をノックダウンした293FT細胞及びHeLa S3細胞に、Ma-L2を持つHPV51擬似ウイルス粒子を接種すると、レポーターの発現が低下した。この細胞蛋白質がHPV感染の初期過程に働くことが示唆される。(石井克幸、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

2006年5月～2010年3月の間に全国20カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い、計276のNoV遺伝子型GII/4のゲノム全長の塩基配列を得た。少なくとも7種のGII/4の単系統亜株(2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bと命名)が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。4種は、進化起源の異なる配列が組み合わさって生じたモザイクゲノムをもっていた。4種に共通するゲノム組換え点として、ORF1/ORF2境界の高度保存領域を見いだした。この領域での組換えにより、別個に進化した近縁のノロウイルスの間で、複製関連遺伝子とキャプシド遺伝子の変異セットを効率よく交換できる。これにより、複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させたウイルスが迅速に発生し、ウイルスの適応変化能力を

高めている可能性がある。得られた情報は、ノロウイルスサーベランスに還元した。(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]、片山和彦[ウイルス二部]、武田直和 [ウイルス二部]、佐藤裕徳)

糞便試料の収集は以下の 25 名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、蛇口哲夫、高橋知子(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)、伊藤文明(広島市衛生研究所生物科学部)、近藤玲子、山下育孝(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)

(2) インフルエンザウイルス (IFV) のゲノム解析 1

2009 年に日本国内に流行した A/H1N1pdm に罹患し重症または死亡した群 (27 症例) を対象に、全 8 分節 (計 13500bps) の配列情報 (約 3.6×10^5 塩基) を取得した。重症化とリンクする変異は特定できなかった。2009 年 9 月から 2010 年 1 月までの期間に、日本、東アジアで流行したインフルエンザウイルス-150 株の NA 遺伝子の配列情報 (約 2.3×10^5 塩基) を取得した。得られた情報は、2010 年 2 月に WHO で開催された北半球ワクチン株選定会議、ならびに国内のワクチン株選定会議の流行株遺伝子資料として活用された。(本村和嗣、佐藤彩[インフルエンザ研究センター]、中村浩美、守宏美、神田忠仁、氏家誠[インフルエンザ研究センター]、小淵正次 [インフルエンザ研究センター]、安楽茜[インフルエンザ研究センター]、小田切孝人[インフルエンザ研究センター]、佐藤裕徳)

(3) インフルエンザウイルス (IFV) のゲノム解析 2

独自に取得したインフルエンザウイルスゲノム情報、および公共データベースの配列情報を解析し、2009 年 4 月～2010 年 1 月の間に流行した新型インフルエンザウイ

ルス A/H1N1pdm 準種の相互の遺伝距離、遺伝子再集合の有無、エンベロープタンパク質の可変部位、ヒトで流行が拡大する過程で定着したアミノ酸変異に関する情報を収集した。A/H1N1pdm がブタからヒトに伝搬した際にボトルネック効果が働き、ごく少数の近縁ウイルスが選択されて世界的流行の主因となったこと、これらは HA と NA の結合ポケットの周辺に位置する特徴的変異を 3 つもつこと、HA と NA の遺伝的多様性は低いレベルで漸増したが、12 月の時点でも高い均一性を保っていたこと (HA の遺伝距離: 4 月 = $1.7 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$ → 12 月 = $4.9 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$ 、NA の遺伝距離: 4 月 = $0.9 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$ → 12 月 = $3.4 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$)、HA、NA の可変部位は主に表面に分布していること、低頻度ではあるがタミフル耐性変異 H275Y が国内で維持されていること、等を示した。(横山勝、本村和嗣、小淵正次[インフルエンザウイルス研究センター]、氏家誠[インフルエンザウイルス研究センター]、小田切孝人[インフルエンザウイルス研究センター]、田代真人[インフルエンザウイルス研究センター]、神田忠仁、佐藤裕徳)

(4) インフルエンザウイルス (IFV) のゲノム解析 3

国内のパンデミック・インフルエンザ A ウイルスによる死亡例の肺剖検サンプル中の全 RNA の配列を包括的に解読した。全解読リード (947 万本) のうち、インフルエンザ A ウイルス配列が約 8 万本 (0.85%) 存在した。ウイルス配列を平均 $\times 200$ 以上のカバレッジで解読し、ヘマグルチニン遺伝子配列 (HA、セグメント 4) の 3 箇所塩基が混在していた。少なくとも、2 種類のヘマグルチニン配列の存在が示唆された。抗原性や肺上皮細胞のシアル酸 ($\alpha 2-6$ 及び $\alpha 2-3$) への親和性の異なるウイルスが混在していた可能性がある。(黒田誠、関塚剛史、片野晴隆[感染病理部]、中島典子[感染病理部]、佐多徹太郎[感染病理部]、佐々木裕子[細菌第二部]、荒川宜親[細菌第二部]、神田忠仁)

(5) C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム解析

HCV 感染者のインターフェロン治療耐性に関わるウイルス側の要因を探索する研究を進めた。FLX を用いて、HCV 感染者の血液試料中の HCV ゲノム情報を包括的に収集するシステムを作った。本来、宿主ゲノム情報を基に治療感受性と予測されながら (IL-28 に関する危険遺伝子多型をもたない患者)、PEG-IFN+RBV 治療に不応であった患者を含む 14 名の HCV 感染者の血液中に存在する HCV ゲノムの情報を次世代シーケンサー FLX を用いて網羅的に取得した (約 4.0×10^8 塩基)。現在、治療不応

答の患者のウイルスに特徴的な塩基やアミノ酸、並びに治療後のウイルスに特徴的な塩基やアミノ酸の有無を調べている。(本村和嗣、大出裕高、杉山真也[国立国際医療センター 肝炎免疫研究センター]、中村浩美、守宏美、横山勝、田中靖人[名古屋市立大学]、神田忠仁、溝上雅史[国立国際医療センター 肝炎免疫研究センター]、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サーバおよび解析サーバの更新を行った。データベースサーバは Altix350 から Altix450 (Itanium2 1.66GHz/18MB x 6, 24GB)に、解析サーバは Altix350 から Altix XE270 (Xeon X5560 2.8GHz/8MB x 2, 24GB)に変更し、サーバの演算能力が2倍以上に向上した。引き続き、自動更新システムを用いて、8種の病原性ウイルス(インフルエンザウイルス、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス、ブタ内在性レトロウイルス、ポリオウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、C型肝炎ウイルス)の最新のゲノム情報を蓄積した。(横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳)

3. 病原性ウイルスの中和に関わる領域の構造解析

(1) HIV-1 の中和感受性を制御する構造要因の特定

HIV-1 エンベロープ Gp120 のコアから突出する V3 ループは、感染補受容体との結合に関わり、抗体の中和エピトープが存在する。これまでに、V3 の正電荷量が変異により低下すると、V3 の立体配置が変化し、ウイルスの抗 V3 抗体中和感受性が低下することを見出した。本年は、組換え実験と *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、V3 の電荷が V3 自身だけでなく gp120 コアの構造と中和エピトープの露出度をも制御することを見いだした。分子動力学法を用いた立体構造解析により、V3 の正電荷が低下すると gp120 のコア内に位置する CD4 結合ループの露出度が低下することがわかった。V3 組換え HIV を用いた中和試験により、V3 の正電荷が低下すると CD4 結合ループを標的とする種々の単抗体へのウイルスの中和感受性が低下することがわかった。V3 の正電荷量は、Gp120 の構造とウイルスの中和感受性の制御因子であることを明らかにした。(横山 勝、長縄 聡[横浜市大、臨床研]、松下修三[熊本大、エイズ学研究センター]、神田忠仁、佐藤裕徳)

(2) HIV/SIV の TRIM5 α 感受性を制御する構造要因の特定

TRIM5 α は、HIV/SIV 感染の阻害活性をもつ細胞性抗ウイルス蛋白質で、ウイルスのカプシド蛋白質に作用する。

塩田らは、感染阻害効果はウイルス特異的で、HIV/SIV の宿主域の決定に関与することを示した。本研究では、変異導入解析と *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、HIV-2/SIVmac239 カプシドの TRIM5 α の結合に関わるアミノ酸の種類と配置を新たに特定した。これらは、すべてカプシドのコアの外面のループまたはヘリックスに位置していた。(横山 勝、中山英美[阪大微研]、塩田達男[阪大微研]、佐藤裕徳)

(3) サル免疫不全ウイルス (SIV) の CTL 逃避と増殖能の回復を支える構造要因の特定

俣野らは、サル感染モデル等により、SIV の CTL 逃避変異は、しばしばウイルス複製能の低下に結びつくことを示した。本研究では、CTL 逃避ウイルスの馴化実験、変異導入解析、および *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、SIVmac239 の CTL 逃避と増殖能の回復を支えるカプシドのアミノ酸の種類と配置を特定した。CTL 逃避と増殖能の回復に関わる3つの変異は、カプシドがその機能単位であるヘキサマー構造をとったときに互いに近接することがわかった。また隣接するカプシドモノマー間で推定結合ポケットを形成することがわかった。これらのアミノ酸は、ヘキサマーにおけるカプシド分子間の相互作用、あるいはヘキサマーと宿主因子の相互作用に重要な働きをしている可能性がある。(横山 勝、武内寛明[東大医科研]、梁明秀[横浜市大]、俣野哲朗[東大医科研]、佐藤裕徳)

4. 病原性ウイルスの薬剤設計に関する構造解析

(1) ノロウイルスの酵素の構造解析

ノロウイルスの酵素を標的とする増殖阻害薬の設計を目的とする。変異導入解析、*in silico* 立体構造解析、および分子進化を組み合わせることで、ヒト由来ノロウイルス (hNoV) とマウス由来ノロウイルス (mNoV) のプロテアーゼおよびポリメラーゼの活性部位、立体構造、および保存部位と可変部位の位置を解析した。プロテアーゼの切断活性に必須のアミノ酸 (H, D/E, C, H)、ポリメラーゼの RNA 合成活性に必須の YGDD モチーフと近傍の保存モチーフ A の立体配置は、hNoV U201 株と mNoV S7-PP3 株の分子モデルでほぼ一致していた。前駆体の切断反応、および RNA 合成反応に直接、間接に関わるアミノ酸の配置は、hNoV と mNoV の間でよく保存されていることがわかった。mNoV 増殖系を用いて hNoV 増殖阻害剤候補のスクリーニングを進める予定である。(横山 勝、岡智一郎[ウイルス2部]、遠矢幸伸[日大]、片山一彦[ウイルス2部]、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 逆転写酵素 (RT) の薬剤耐性獲得機構

湯永らは、HLA B*51 拘束性 CTL を持つ患者体内で HIV-1 RT に CTL エスケープ変異 I135X (X=L, V, T, R) が出現し、定着すること、I135X が E138K と同時に生じることで、ウイルスは非核酸系 RT 阻害薬 (NNRTI; EFZ, NVP, ETV) 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 RT と薬剤の複合体モデルを構築し、変薬剤耐性獲得の分子機序を調べた。I135X/E138K 変異により、EFZ, NVP, ETV が入り込むポケットの形が変化し、薬物-酵素間の親和性が低下することを見出した。原子レベルでの耐性発現機構の解明により、薬剤改変の基盤を得た。HLA 型に依存する新しい薬剤耐性変異の発見により、遺伝子検査の臨床応用性の向上に寄与した。(大出裕高、横山勝、湯永博之[国立国際医療センター]、佐藤裕徳)

(3) HIV-1 プロテアーゼ (PR) の基質特異性発現機構

HIV-1 PR は、ウイルスの Gag 蛋白質前駆体の特定箇所を順序だてて切断する。in silico 立体構造解析と実験データを組み合わせることで、基質の切断効率を制御する基質自身の構造特性を特定した。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切断部位周辺の構造特性を明らかにし、プロテアーゼ結合効率および Gag 前駆体の切断効率と相関する構造特性が存在することを明らかにした。HIV-1 PR 活性阻害薬開発・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)

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) 炭疽菌のゲノム解析

次世代シーケンサーを用いて、日本で分離された炭疽菌 2 株のゲノム解析を実施した。公開ゲノム配列を合わせた計 19 株の比較ゲノム解析で、2,965 箇所の 1 塩基多型 (SNP) を同定し tag-SNPs による遺伝子検査体制を整えた。この簡易検査法により、食中毒起因菌であるセレウス菌など炭疽菌近縁種との鑑別、菌株の系統関係の推定、などを実施する基盤をつくった。炭疽菌・キノロン中等度耐性株のゲノム解読により、炭疽菌感染の第一治療薬であるキノロン剤耐性に関与しうる薬剤排泄系遺伝子群を同定した。実験によりこの遺伝子群の変異で中等度耐性になることを明らかにした。従来の遺伝子検査対象 (gyrase AB, topoisomerase IV) に加え、包括的な検査体制に有用な新規遺伝子ターゲットを同定した。

(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]、神田忠仁)

(2) 薬剤耐性食中毒菌のゲノム解析

ヒトおよび食品由来の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Infantis, Typhimurium, およびその他血清型 (タイ分離) の薬剤耐性株を中心に計 20 株の全ゲノム配列を解読した。*S. enterica* のコアゲノムに存在する SNP を 65,844 箇所抽出した。ここ数年伝播が危惧されている Typhimurium 薬剤耐性の代表株 T000240 について、製品評価技術基盤機構との共同で全ゲノム配列を取得し、耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てとそのアイランド構造を明らかにした。(黒田誠、関塚剛史、泉谷秀昌[細菌第一部]、渡邊治雄[細菌第一部])

2. 川崎病患者の体内の微生物ゲノムの包括的解析

川崎病は、小児 (主に 6 ヶ月〜5 歳) の 200 人に 1 人が罹患する原因不明の難治性疾患である。次世代シーケンサーを用いて、川崎病患者の血清 (13 名)、咽頭ぬぐい液 (2 名)、およびリンパ節 (1 名) 中の核酸情報を網羅的に収集した。1 検体につき 300〜900 万本のリードを収集し、相同性検索で病原体候補配列を抽出した。血清由来リードの平均 95% はヒト配列に由来し、ウイルス・細菌を含む病原体候補は全体の 1% 弱であった。咽頭ぬぐい液では半数が細菌由来の配列であった。リンパ節検体では、細菌群の検出率が DNA で 0.22%、RNA で 19.9% となり、腸内細菌群が多数検出され、便の構成細菌種と類似した検出プロファイルであった。咽頭由来であるインフルエンザ菌、肺炎球菌は検出されたが、A 群レンサ球菌の配列は検出されなかった。広範な細菌群の検出は全身性炎症の進行を示唆する。*Mycobacterium* 属に類似した配列を見出し、新規の *Mycobacterium* sp. がリンパ節組織に存在していた可能性が示唆された。(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]、佐藤誠一[新潟市民病院]、大場邦弘[公立昭和病院]、森雅亮[横浜市立大]、横田俊平[横浜市立大])

3. 細菌叢の解析

(1) 動物腸管内の原生動物中の細菌叢の解析

動物の腸管内の一部の細菌は原生動物に内在し、原生動物をバクテリアとして別の宿主へ感染する可能性がある。牛糞便中には、*Blastocystis* 属および *Balantidium* 属の原虫が高頻度に検出された。検出された原虫は、これまで報告の無かった新種である事が示唆された。16S rRNA 遺伝子のシーケンズおよび T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法の解析結

果から、*Balantidium*属に内在する細菌叢は、糞便中で優勢なBacteroidetes等ではなく、偏性嫌気性細菌 *Mogibacterium*, *Lactococcus*および*Turicibacter*属細菌であることが判明した。(関塚剛史、黒田誠)

(2) 口腔常在菌 *Streptococcus salivarius* のゲノム解析
口腔常在菌叢のなかでも最優勢種である *S. salivarius* は、虫歯や口臭などの原因菌の口腔内バランスを調節するプロバイオティクスとして注目されている。*S. salivarius* HT9R 株の網羅配列解読を行ない、約300万のリード配列を得た。ABYSS-pe による *de novo* assembly の結果、約100本のContig配列を得た。また、別のEuler-SRによるアセンブル結果と併せて最終的に5本のSuper-contigにまで繋げることができた。今後、口腔内に常在する種々の *Streptococcus* 属の比較ゲノム解析を行い、*S. salivarius* のゲノム特性を解明し、実験も交えて口腔常在菌としての生理的役割を解析する予定である。(坂野聡美、関塚剛史、黒田誠、泉福英信[細菌第一部])

品質管理に関する業務

HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチンの国内承認に際して、その生物学的製剤基準案を所内で取りまとめ、検定基準を作成した。2009年10月に承認された HPV ワクチンの検定を、製剤担当室として開始した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。(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

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。HPV ラボネットが主催する HPV DNA proficiency panel 及び HPV serology proficiency panel に参加し、十分な能力を持つ HPV ラボとして認定を受けた。また HPV ラボネットが主催するトレーニングワークショップに参加し、感染研での標準的 HPV アッセイの導入について講演した。(終元 巖、松尾理加、近藤一成[NTT 東日本病院]、川名 敬[東京大学医学部産婦人科教室]、神田忠仁)

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Ode H, Yokoyama M, Kanda T, and Sato H. Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. J. Mol. Model. In press (2010)
- 2) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotten M. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. Vaccine. 28 Suppl 2:B60-7, 2010.
- 3) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. AIDS. 24(5):F15-22, 2010.
- 4) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not etravirine. Antimicrob Agents Chemother. 54:1596-602, 2010.
- 5) Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. PLoS One. 5:e8867, 2010.
- 6) Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn J Infect Dis. 63:67-71, 2010.
- 7) Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. J Vet Med Sci. 72: 93-97. 2010.
- 8) Sato, H., Kusumoto-Matsuo, R., Ishii, Y., Mori, S., Nakahara, T., Shinkai-Ouchi, F., Kawana, K., Fujii, T., Taketani, Y., Kanda, T. and Kukimoto, I. Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. Biochem Biophys

Res Commun, 387, 525-530, 2009.

9) Kondo, K, Ishii, Y, Mori, S, Shimabukuro, S, Yoshikawa, H, Kanda, T. Nuclear location of minor capsid protein L2 is required for expression of a reporter plasmid packaged in HPV51 pseudovirions. *Virology*, 394, 259-65, 2009.

10) McCord, RA., Michishita, E., Hong, T., Berber, E., Boxer, LD., Kusumoto, R., Guan, S., Shi, X., Gozani, O., Burlingame, AL., Bohr, VA. and Chua, KF. SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY)*, 1, 109-121, 2009.

11) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 394:119-29. 2009.

12) Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, Motomura K, Sato H, Kitamura K, Pohan HT, Sato S. Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25:637-46, 2009.

13) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 386:23-31, 2009.

2. 和文発表

1) 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.

2) 本村和嗣: Analysis of genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2、*日本感染症学会誌*、83:81-93, 2009.

3) 本村和嗣, 横山勝, 佐藤裕徳: ヒトノロウイルス 2006 年株、*臨床と微生物*、5 : 205-209, 2009.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Ishikawa J, Hoshino Y, Kuroda M, and Sekizuka T. Discovery of secondary metabolite biosynthetic genes in *Nocardia brasiliensis* by genome scanning with next generation sequencer. The 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA'

15) (2009 年 8 月、中国)

2) Kukimoto, I. Genotyping of Human Papillomavirus by PGMY-reverse blot hybridization. The 6th Japan-Taiwan Symposium on 2009 Influenza Pandemic, Enteric Virus Infection and New Development for Rapid Diagnosis (2009 年 9 月、東京)

3) Kukimoto, I. Experience of setting up the PGMY-RBH assay in a regional reference laboratory. The WHO HPV LabNet Training Workshop on HPV Genotyping and HPV Serology Laboratory Performance (2010 年 3 月、ローザンヌ)

4) Yokoyama M, Naganawa S, Kitamura K, Sato H. Influence of Net Positive Charge in V3 Sequence on Conformation of HIV-1 gp120 outer domain. 5TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPIOSIUM、(第 5 回日独 HIV シンポジウム)、(2010 年 3 月、東京)

2. 国内学会

1) 横山 勝, 長縄 聡, 北村勝彦, 佐藤裕徳: HIV-1 エンベロープ蛋白質の荷電変化によるウイルス中和感受性と細胞指向性の調節. 第 9 回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ (2009 年 5 月、熊本)

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、Norovirus Surveillance Group of Japan : 2006-2008 秋冬期までに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析、第 30 回衛生微生物技術協議会、ウイルス性下痢症 シンポジウム (2009 年 7 月、大阪)

3) 神田忠仁: 次世代 HPV ワクチンの開発、第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月)

4) 森 清一郎、石井克幸、近藤一成、神田忠仁: ヒトパピローマウイルス 51 型 (HPV51) キャプシドに組み込まれたレポーターの発現と副キャプシド蛋白質 (L2) の機能、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)

5) 石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、神田忠仁: 高リスク型共通中和抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染抑制機構、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)

6) 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: ヒト核小体蛋白質 nucleolin は HPV16 ゲノム DNA に結合する、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)

7) 村上 功、竹内隆正、藤井多久磨、青木大輔、神田忠仁: 骨格筋特異的・高発現アデノ随伴ウイルスベクター

- の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 8) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、Norovirus Surveillance Group、佐藤裕徳：ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ (2009 年 10 月、東京)
- 9) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、Norovirus Surveillance Group、佐藤裕徳：ノロウイルス GII/4 の変異、第 21 回 ウイルス性下痢症研究会 特別企画 (2009 年 10 月、東京)
- 10) 横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、遠矢 幸伸、神田 忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳：マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 11) 横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸、第 57 回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ (2009 年 10 月、東京)
- 12) 大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳：HIV-1 前駆体蛋白質の切断効率を制御する構造特性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 13) 大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、岡慎一、神田忠仁、渦永博之、佐藤裕徳：HIV-1 の EFV/NVP 耐性獲得と ETV の抗 HIV 活性維持の分子機序、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 14) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫：HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 15) 久保嘉直、吉居廣朗、神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：カテプシン B 抑制因子による CD4 非依存性 HIV-1 感染の促進、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 16) 神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直：HIV-1 感染における標的細胞中のエズリン・リン酸化の重要性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 17) 齊藤麻理子、井上智、神垣太郎、杉浦尚子、Bazartseren Boldbaatar、野口章、関塚剛史、黒田誠、鈴木陽、押谷仁：フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
- 18) 森雅亮、黒田誠、関塚剛史、大場邦弘、水谷哲也、横田俊平：川崎病の原因究明-III. プロテオーム解析法を用いた患者血清の網羅的解析、第 29 回日本川崎病研究会 (2009 年 10 月、名古屋)
- 19) 黒田誠、関塚剛史、佐藤誠一、大場邦弘、濱田洋通、寺井勝、緒方昌平、石井正浩、森雅亮、横田俊平、水谷哲也：川崎病の原因究明-II. 次世代シーケンサーによる網羅的解析、第 29 回日本川崎病研究会 (2009 年 10 月、名古屋)
- 20) 水谷哲也、黒田誠、関塚剛史、大場邦弘、緒方昌平、石井正浩、森雅亮、横田俊平：川崎病の原因究明-I. ウイルスの網羅的解析、第 29 回日本川崎病研究会 (2009 年 10 月、名古屋)
- 21) 大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳：HIV-1 前駆体蛋白質切断部位の構造特性と切断効率の関連、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009 年 11 月、名古屋)
- 22) 大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、岡慎一、神田忠仁、渦永博之、佐藤裕徳：HIV-1 逆転写酵素 V106I/V179D 変異による NNRTI 活性変化の分子機序、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009 年 11 月、名古屋)
- 23) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫：サル指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009 年 11 月、名古屋)
- 24) Ivo N Sah Bandar、高橋 清実、本村 和嗣、長縄 聡、北村 勝彦、佐藤 裕徳、佐藤 成大：Near full length sequence analysis of CRF33_01B among Indonesian patients、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009 年 11 月、名古屋)
- 25) 横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2009 年 11 月、名古屋)
- 26) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智：全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索、第 92 回日本細菌学会・関東支部会 (2009 年 11 月、東京)
- 27) 本村和嗣：ウイルス感染症の実態、平成 21 年度下期協同組合中央接骨師会 (2009 年 12 月、東京)
- 28) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智：全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索、第 83 回日本細菌学会・総会 (2010 年 3 月、横浜)
- 29) 関塚剛、黒田誠：illumina GAI1 による 16SrDNA 配

列を用いた網羅的且つ定量的な細菌叢解析、第 83 回日本細菌学会・総会（2010 年 3 月、横浜）

30) 坂野聡美、奥谷晶子、井上智、黒田誠：炭疽菌病原プラスミドにコードされる分泌タンパク質の培養細胞への影響、第 83 回日本細菌学会・総会（2010 年 3 月、横浜）

31) Kusumoto-Matsuo, R., Kukimoto, I. and Kanda, T. Human papillomavirus DNA replicates with rolling circle mode in a cell-free system. 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ（2009 年 11 月、彦根）

32) 松尾理加、柊元 巖、神田忠仁：無細胞系におけるヒトパピローマウイルス DNA のローリングサークル型複製、第 32 回日本分子生物学会（2009 年 12 月、横浜）