

## 2.1. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 脇田 隆字 (～H22.8.31)

黒田 誠 (H22.9.1～)

### 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。

人事異動では、平成22年3月31日付で神田忠仁センター長の定年退職に伴い、平成22年4月1日付でウイルス第二部・脇田隆字部長が病原体ゲノム解析研究センター長を併任した。平成22年9月1日付で脇田隆字部長に代わり、第三室長の黒田誠センター長が着任した(引き続き第三室長を併任)。平成23年3月1日付で、第三室に竹内史比古室長が採用された(黒田室長の併任が解除された)。平成22年10月1日付で横山勝任期付研究員(第二室)が、主任研究官に採用された。

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生活環と感染における宿主応答・防御機構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、主キャプシド蛋白質L1をワクチン抗原にしており、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、副キャプシド蛋白質L2にみられる型共通アミノ酸領域が、幅広い型に有効な中和抗体を誘導することを見出した。この型交差性中和エピトープの解析を進めた。

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。さらに、独自に感度と特異性を向上させた新規HPVタイプング法の開発を行った。

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させるため、インスレーター導入による骨格筋特異的な安定・高発現の改良型AAVベクターを開発した。

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、WHO 指定バイオテロ病原体（炭疽菌、野兎病菌、ペスト菌）とサルモネラ等の薬剤耐性食中毒菌のゲノム解析を行った。また 2009 パンデミック・インフルエンザウイルス剖検検体から迅速で包括的なシーケンシングを行い、患者に感染しているインフルエンザウイルス・他病原体のゲノム情報を浮かび上がらせる研究手法を開発した。さらに、このダイレクト解析手法を応用して、難治性疾患（川崎病など）や不明疾患（生魚の喫食による不明食中毒）を対象に病原体の検出を試みた。細菌には動物の腸管内原動物に感染し、感染原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）

##### 2. インスレーターを用いた高発現 AAV ベクターの開発

###### (1) インスレーター搭載 AAV ベクターの改良

AAVS1 インスレーター搭載（改良型）AAV ベクターと従来型 AAV ベクターの比較を行った。改良型は骨格筋特異の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たものをを用い、従来型は CMV-IE プロモーターを持つ AAV ベクターを用いた。CMV-IE プロモーターは組織非特異的にもっとも強力な転写活性を示すプロモーターの一つである。両者ともにキャプシドは AAV2 と AAV1 のハイブリッドにチロシン残基置換を加えたものをを用いた。骨格筋への直接

投与では改良型と従来型は同等の導入遺伝子発現を認めたのに対し、注射部位からの漏出を想定した尾静脈からの投与では改良型の導入遺伝子発現は各臓器で低く、特に肝臓・心臓・肺において従来型よりも有意に減少していた。改良型 AAV ベクターは有効性と安全性が高いと考えられた。（村上 功、竹内隆正）

###### (2) AAV ベクター組込み部位同定法の検討

遺伝子治療による重大な有害事象として挿入変異による悪性腫瘍の発生がある。AAV ベクターを用いた動物実験でも肝腫瘍発生の報告があり、ベクター投与との因果関係を推定するためには AAV ベクターゲノムの宿主染色体への組込みの有無、さらに組込み部位に関する情報が必要である。簡便な組込み部位同定法として LM-PCR 法を検討した。AAV ベクターが組み込まれた HeLa 細胞クローンをモデル系として用いた実験で、LM-PCR 法により細胞染色体とベクターの接合部位を含む DNA 断片を増幅し塩基配列を解読しうることが分かった。（竹内隆正）

## II. HPV に関する研究

### 1. HPV の感染増殖機構の研究

#### (1) HPV 感染の初期過程に必要な宿主因子の解析

HPV51 型プロトタイプ（Nu 株）と日本で分離された HPV51 型（Ma 株）の副キャプシド蛋白質 L2 は 2 つの領域でアミノ酸配列が大きく異なり、Ma 株 L2 を含む偽ウイルスを細胞に接種するとレポーター遺伝子が発現するが、Nu 株 L2 を含む偽ウイルスでは発現しない。前年度に同定した Ma 株 L2 に特異的に結合する細胞蛋白質の発現を、HeLa S3 細胞でノックダウンすると、Ma 株 L2 を含む偽ウイルス接種によるレポーター遺伝子の発現が低下した。同様の低下は HPV16 型および 31 型の偽ウイルスの接種でも観察された。この細胞蛋白質は HPV 感染の初期過程に必須であることが示唆される。（石井克幸）

#### (2) HPV 感染の初期過程における宿主細胞応答の解析

HPV16 型偽ウイルスを HeLa S3 細胞へ接種するとオートファジーが誘導されることが分かった。オートファジー阻害剤で細胞を処理すると、HPV16 型偽ウイルスの感染によるレポーター遺伝子の発現が上昇したことから、HPV 感染の初期過程においてオートファジーは宿主防御応答として働くと考えられる。（石井克幸）

#### (3) E1 を基質にする細胞チロシンキナーゼの探索

HPV ゲノム複製に働くウイルス蛋白質 E1 の活性や細胞内局在は、E1 のセリン残基のリン酸化により制御される

ことが知られている。一方、293 細胞で FLAG タグ付き HPV16 型 E1 (FLAG-E1) を発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降して ATP と反応させると、FLAG-E1 がセリンではなくチロシンリン酸化されることが分かった。小麦胚抽出液での無細胞蛋白質合成系とアルファスクリーン検出系を用いて、FLAG-E1 に結合する細胞チロシンキナーゼの網羅的スクリーニングを行い、これまでに 13 種の結合キナーゼを見出した。さらに *in vitro* リン酸化アッセイにより、その内の 9 種のキナーゼが E1 のチロシンリン酸化を引き起こすことが示された。(松尾理加、澤崎達也[愛媛大学]、終元 巖)

#### (4) High-throughput HPV DNA 複製アッセイ系の構築

HPV16 複製起点を含む DNA 断片を組込んだリポータープラスミドを、E1 及び E2 発現プラスミドと同時に細胞に導入して、リポーター活性の上昇を指標に HPV DNA 複製を検出するアッセイ系を構築した。これまでのサザンブロット法やリアルタイム PCR 法と比べて、簡便かつ迅速に大量のアッセイを行うことが可能となり、HPV 複製に影響を与える因子のスクリーニングや機能解析に使える。(終元 巖)

#### (5) E1 チロシン変異体の複製活性の解析

HPV16 型 E1 に存在する 23 カ所のチロシン残基の内、15 カ所のチロシンをそれぞれフェニルアラニンに置換した変異 FLAG-E1 の複製活性を、新たに構築した複製アッセイ系で調べた。15 のチロシン変異体の内、379 番の変異体では複製活性が完全に消失したことから、このチロシン残基が E1 の機能上、重要な役割を有していることが示された。今後このチロシン残基が細胞内リン酸化の標的となるか検討する。(松尾理加、終元 巖)

## 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

前年度に開始した我が国の女性に感染している HPV 遺伝子型の調査を継続して行った。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 リバースプロット法を用いて HPV タイピングを行った。2010 年 4 月から 2011 年 3 月までに 1000 検体を解析し、HPV 陽性率は約 50%、その内の約 30% の検体から複数の HPV 型が同時に検出された。検出頻度が最も高いのは HPV52、ついで HPV16、HPV58 であった。(近藤一成[NTT 東日本病院]、神田忠仁[理化学研究所]、松尾理加、終元 巖)

### (2) 新しい HPV タイピング方法の開発

前年度に開発した蛍光ビーズソーターを用いた HPV タイピング方法の改良を行った。HPV DNA の L1 遺伝子領域増幅法を MGP PCR から PGMY PCR に変更して、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た。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て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した。従来の MGP PCR を用いた方法と比べて改良法では、タイピングの感度と特異性が全体的に上昇した。(村松祐理[理研ジェネシス]、斉藤 督[理研ジェネシス]、松尾理加、終元 巖)

## 3. 交差性中和エピトープをもつワクチンの開発

### (1) 抗 HPV16 L2 モノクローナル抗体の分離

現行の HPV 感染予防ワクチンは主キャプシド蛋白質 L1 を抗原としており、子宮頸癌の原因となる高リスク型のうち 16、18 型にしか効果が無い。副キャプシド蛋白質 L2 に型共通の抗原領域(交差性中和エピトープ)が複数見いだされ、次世代ワクチン抗原として開発が進められている。なかでも 16 型 L2 のアミノ酸 56 から 75 領域(56/75)は、最も幅広い型に有効な中和抗体を誘導する。この領域の交差性中和エピトープを詳細に解析するために、56/75 ペプチドを抗原として二種類のモノクローナル抗体(MAb)13B 及び 24B を分離した。(森 清一郎、中尾砂理、神田忠仁[理化学研究所])

### (2) 抗 HPV16 L2 モノクローナル抗体の性状解析

MAb 24B は調べた全ての高リスク型 HPV(16、31、33、35、51、52、58 型)粒子に結合した。MAb 13B は 35 及び 52 型以外の調べた全ての型の粒子に結合した。MAb 13B 及び 24B はそれぞれ、16 型及び 58 型の偽ウイルス感染を中和した。また 2 つの MAb を混合すると、より強い中和活性が認められた。変異を導入した 56/75 ペプチドを抗原とするエピトープ解析で、MAb 13B 及び 24B はそれぞれ 56/75 内の異なる領域を認識したことから、少なくとも 2 つの交差性中和エピトープが 56/75 内にあることが分かった。さらにこれらの MAb の HPV 粒子への結合を阻害する抗体の有無を ELISA で調べることにより、ヒト血清中の交差性中和抗体価を測定する方法を開発した。(森 清一郎、中尾砂理、神田忠仁[理化学研究所])

## 4. HPV ワクチンの品質管理の研究

HPV ワクチンの力価試験では、酵素免疫測定法(ELISA)を用いて参照ロットワクチンに対する相対力価を測定す

る。参照ロットワクチンは最終小分製品であり、有効期間は4℃で三年間であることから、近い将来その切り換えが想定される。2価ワクチンの現参照ロットと新参照ロットのVLP含量の比較試験を行い、切り換えの妥当性を評価したところ、新たな参照ロットには現在の参照ロットと同等量のVLPが含まれることが示された。(終元 巖)

### 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359のGroup IIのNoVゲノム全長の塩基配列(約 $2.7 \times 10^6$ 塩基)を得た。

2010/2011秋冬期は、少なくともGII/2, GII/3, GII/4の3種の遺伝子型が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。2006/07年秋冬期に大流行したGII/4 2006b亜株は、その後も主要な流行株ではあったが、流行の規模は年々縮小していた。特定の流行株が流行すると、これに伴ってヒト集団に、その流行株に対する免疫バリアー(集団免疫)が形成されると考えられる。2006b亜株に対する強固な集団免疫が形成された結果、免疫淘汰圧を逃避できた他の遺伝子型GII/2, GII/3が、昨シーズン国内において、流行したと考えている。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27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)、芥藤博之(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)、阿部勝彦、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)、増本久人、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

2010年9月から2011年3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 $2.3 \times 10^5$ 塩基)を取得した。得られた情報は、2011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、神田忠仁、藤崎誠一郎[インフルエンザ研究センター]、金南希[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) 新型シーケンサーFLX 454のエラー補正プログラムの構築

新型シーケンサー454によるシーケンシングでは、特にポリヌクレオチド配列で高頻度のエラーが生じる。既知の配列のシーケンスにより、エラーは主にポリヌクレオチドの3'末端側に生じることを見出した。相補鎖の配列情報を用いてエラーを修復するプログラムを構築し、シーケンシングの過程で生じる約1%のエラーを0.01%未満まで減少させる補正プログラムを作った(大出裕高、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳)。

##### (4) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のゲノム解析

HIV-1感染者の体内では、一日に $10^9-10^{10}$ 個もの多様な変異ウイルスが産生され選択と進化を続けて薬剤耐性ウイルスの発生、免疫逃避、病態進行などに関わると推測されている。しかし、変異集団の種類とダイナミズム等の実態はよくわかっていない。FLX 454を用いて未治療感染者血液中のHIV-1エンベロープ遺伝子全域の配列情報を網羅的に取得し、エラー補正後の配列を解析した結果、Maraviroc(CCR5受容体拮抗薬)やT20耐性関連変異を持つHIV-1が治療前に存在しうることがわかった。(本村和嗣、大出裕高、中村浩美、守宏美、神田忠仁、瀧永博之[国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター]、佐藤裕徳)

##### (5) C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノム解析

HIV-1感染者同様、HCVの持続感染者の体内でも膨大な量の変異集団が発生していると推察されている。それらの変異株とHCV感染者のインターフェロン治療耐性の関わりを調べた。宿主ゲノムの遺伝子型から治療感受性と予測されながら、PEG-IFN+RBV治療に不応答であった患

者を含む19名のHCV感染者の血液中に存在するHCVゲノムのcore領域の情報をFLX 454を用いて網羅的に取得した(約 $4.0 \times 10^8$ 塩基)。IFN耐性関連変異(R70Q or H)をもつHCV準種(>1%)は、10名の検体で検出された(SVR: 7/12症例, NR: 3/7症例)。しかし、今回の解析対象では、70番目のアミノ酸多型と治療抵抗性の関係は認められなかった。(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

新興再興感染症や慢性感染症対策の一環として、病原体ゲノム情報のデータベース化を進めている。現在、病原体ゲノムデータベースには、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、HIV-1の最新のゲノム情報が、自動更新システムにより蓄積されている。本年度は、アノテーションの修正機能を用いて、病原体ゲノムデータベースに蓄積されているノロウイルスのゲノム情報のアノテーションを修正した。(横山勝、佐藤裕徳)

## 3. 病原性ウイルスの宿主指向性に関する構造解析

(1) サル指向性 HIV-1 CA の一アミノ酸変異によるサル細胞での増殖の促進

MN4S と MN5S は、サル細胞・個体での増殖効率が改善されたウイルスクローンである。アカゲザル由来 HSR5.4 細胞を用いて MN4S と MN5S の馴化を試みると、キャプシド(CA)のヘリックス6(h6)の一アミノ酸変異(CA-Ad)が増殖促進に寄与した。CAの構造解析により、同様の増殖促進効果が期待される h6 の他の一アミノ酸変異(CA-St)を見出した。CA-St を MN4S および MN5S に導入し、HSR5.4 細胞での増殖特性を調べると、CA-St は CA-Ad よりもさらに増殖効率を増強した。CA-St を導入したウイルスクローン MN4Rh-3(MN4S 由来)および MN5Rh-3(MN5S 由来)は、HSC-F 細胞、HSR5.4 細胞およびカニクイザル末梢血単核球での増殖効率が、親株よりも格段に向上していた。これらの結果は、CA の一アミノ酸変異により、この領域に関わる何らかの因子を回避することで、サル細胞での増殖が促進されることを示唆している。(横山勝、野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[徳島大]、佐藤裕徳)

(2) アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 $\alpha$  を回

避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築

アカゲザル(Rh) TRIM5 $\alpha$ を回避する HIV-1 の構築を目的として、ターゲットとなるキャプシド(CA)の改変を試みた。Rh TRIM5 $\alpha$ による抑制を回避するため、Rh TRIM5 $\alpha$ 抵抗性の SIVmac239 CA とのアミノ酸配列比較に基づき、HIV-1 クローン MN4Rh-3 および MN5Rh-3 の CA を遺伝子工学的に改変した。作製した13個の CA 変異体ウイルスの増殖特性を Rh 由来細胞株(M1.3S)にて比較した結果、4個のウイルスクローンで増殖効率の向上が認められた。これら4つの CA 変異および SIVmac239 CA と MN4Rh-3/MN5Rh-3 CA との構造比較に基づく変異を適宜組み合わせ、多数のウイルスクローンを構築した。これらの中に、M1.3S 細胞での増殖効率が上記の13個の CA 変異体ウイルスよりも向上しているウイルスクローンが見出された。(横山勝、野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[徳島大]、佐藤裕徳)

## 4. 病原性ウイルスの中和逃避に関する構造解析

(1) HIV-1 gp120 outer domain の立体配置への V3 荷電量の影響

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り、電荷によりウイルスの抗 V3 抗体中和感受性が制御される。これまで、V3 配列の荷電量の低下により CD4 結合ループの露出度が低下し、CD4 結合部位を認識する中和抗体による感受性が低下する可能性が示唆してきた。今年度は、gp120 の多様性をエントロピー解析により調べ、V3 の荷電量の低下によって CD4 結合ループ周辺のアミノ酸の多様性が低下していることを明らかにした。これは CD4 結合部位近傍が抗体の選択圧を受けていることを示唆し、構造解析の結果を支持する。また、V3 組換えウイルスを用い中和試験を行うと、V3 配列の荷電量の低下により CD4 結合部位を認識する中和抗体の感受性が低下することが明らかになった。(横山勝、長縄聡[横浜市大、臨床研]、松下修三[熊本大]、佐藤裕徳)

## 5. 病原性ウイルスの薬剤設計に関する構造解析

(1) マウスとヒトのノロ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

ヒトノロウイルスは、培養細胞を用いた増殖系が無い。一方、マウスノロウイルスは培養細胞で増殖できる。本研究では、マウスノロウイルス増殖系をヒトノロウイルス増殖阻害剤のスクリーニングに使う際の基盤情報収集を目的として、ヒトノロウイルスおよびマウスノロウイルスプロテアーゼの基質結合ポケットの構造解析を行い、

共通に基質結合に関わるプロテアーゼのアミノ酸残基の同定を行った。基質認識に関わる可能性が示唆されている P4、P2、P1 はそれぞれ、疎水性ポケット、比較的弱い疎水性ポケット、親水性アミノ酸近傍に配置された。ノロウイルスプロテアーゼの基質認識には、P4、P2、P1 の疎水性度が重要であることが示唆された。(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) 抗 HIV 因子の構造解析

ヒト細胞タンパク質テザリンは、HIV 粒子の放出を阻害する抗 HIV 因子として知られる。HIV は、Vpu タンパク質の働きでテザリンの抗 HIV 活性を中和し、ヒト細胞で増殖できる。京大の小林らは、テザリンの Vpu 感受性を制御するアミノ酸として I34、L37、L41 の 3 種を同定した。この制御を司る構造基盤を解析した。分子動力学法などを用いてテザリン膜貫通部位の脂質二重層における構造モデルを構築した。I34、L37、L41 は、脂質中でヘリックス構造をとること、側鎖はヘリックスの同じ表面で脂質中に露出すること、さらに T45 の側鎖もこれらのアミノ酸と同一表面に配置すること、これら 4 種のアミノ酸が変異すると側鎖の配向が崩れることなどを見出した。これら 4 種のアミノ酸は Vpu との相互作用表面を形成する可能性が高い。この予測結果はさらなる変異導入解析で支持された。(大出裕高[現：国立病院機構名古屋医療センター]、小林朋子[京都大学ウイルス研究所]、小柳義夫[京都大学ウイルス研究所]、佐藤裕徳)

## IV. 病原性細菌のゲノム解析

### 1. バイオテロ・新興感染症対策としての超高速ゲノム解読システムの構築

バイオテロ・新興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムを構築した。前年度までは、*Bacillus anthracis* 炭疽菌を中心にゲノム解読を行い、株系統解析法開発とゲノムワイドなキノロン耐性領域の探索を行った。本年度は他 WHO 指定バイオテロ病原体である *Yersinia pestis* ペスト菌、*Francisella tularensis* 野兎病菌、*Burkholderia pseudomallei* 類鼻疽菌のゲノム情報解析を行った。

解読した *Y. pestis* Yreka 株の素性・由来が不確かであり、ゲノム情報によってその起源が推定できるかどうか検討した。公開ゲノム情報と併せて SNVs 比較を行い、アメリカ株である C092 と非常に近縁であることがわかった (28 SNVs / 4.7 Mb ゲノムサイズ)。公開ゲノム情

報から推定されている *Y. pestis* の世界的な伝播経由 (Nature Genetics 2010 42:1140-3) に合わせてみると、Yreka 株は 18 世紀後半の中国福建省からハワイ・米国本土への伝播経路に関連した菌株に類することが示唆された。*Y. pestis* は世界的に 3 回のアウトブレイク が史実から知られており、その史実・ゲノム情報に基づいて由来不明の Yreka 株の系統関係を明らかにすることができた。バイオテロに使用された株の由来・起源をトレースし発生源を特定することと同じであり、株固有の SNVs が有用な情報源であることを示唆していた。

*F. tularensis* ゲノム情報に基づいた SNVs 系統解析の報告論文 (J Bacteriol. 191(8):2474-84) を参考にして NVF 株のゲノム情報の SNVs 系統比較を行ったところ、NVF 株は弱毒性である *japonica* である FSC022 (Ebina) と類縁関係にあり、北米由来の強毒型 *tularensis* や北米・ユーラシア大陸由来の *holarctica* とは全く異なる系統関係を示すことが明らかになった。この結果は、日本分離株固有の遺伝型を示しており、*japonica* は島国日本で隔離された特有の subsp. であることが示唆された。

*B. pseudomallei* ゲノム情報の報告論文 (J Clin Microbiol. 2010 Dec 22) を参考にして、計 21 株のゲノム SNVs 系統比較を行い、計 52,837 箇所 SNVs サイトを取得した。その系統関係から、*B. pseudomallei* の分離株は分離された大陸に基づいた系統を示すことが明らかになった。アジア、オーストラリア、南米と大陸間で特有のゲノム SNVs 系統を示すことから、個々の大陸において固有の環境に根付いた結果と考えられる。これら大陸・国・地域に特徴的な遺伝情報を包括的に取得し、かつ系統分類解析法を整備し、有事において正確な判断を処する基盤を整備した。

(関塚剛史、黒田 誠、高橋英之[細菌第一部]、宇田晶彦[獣医科学部]、棚林清[獣医科学部])

### 2. 網羅配列解読による病原体検出

2009 年はパンデミック・インフルエンザウイルスによる脅威に全世界が不安におののいた年であった。日本においても少数であるが死亡例が散見し、今後のウイルス伝播と高病原性化の予測等、迅速に配列を確定する必要があった。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から抽出した全 RNA を網羅配列解読し、病原体候補を検索した。全解読リード (947 万本) のうち、インフルエンザ A ウイルス配列を約 8 万本 (0.85%) 同定することができた。ウイルス配列を平均 x200 以上のカバレッジで解読できたことにより、ハマグリチニン配列 (HA, セグメント 4) に 3 箇所

の塩基変異を同定した。それら変異箇所は混合塩基になっており、2種類のヘマグルチニン配列の存在を明らかにした。それら変異による抗原ドリフトおよび肺上皮細胞のシアル酸 ( $\alpha 2-6$  及び  $\alpha 2-3$ ) への親和性変化を示唆するデータを得た。この次世代シーケンサーによるダイレクト網羅解読法により、インフルエンザウイルスが1患者体内で抗原性と病原性を変化させた可能性を見出した。偏見のないダイレクト遺伝子検査法として機能し、未知病原体をも検出できるセーフティーネットとして貢献するシステムである。

(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])

### 3. 薬剤耐性食中毒菌に係るゲノム配列レベルでの検出系開発

薬剤耐性が懸念されるサルモネラ菌 (*Salmonella enterica* Typhimurium, phage type : DT12) の T000240 株のゲノム解読と比較ゲノム解析により、水平伝達により獲得した特有の薬剤耐性因子がアイランド構造になっていることを明らかにした。 $\beta$ -ラクタム剤、アミノグリコシド、スルフォアミド、キノロン耐性に関与する遺伝子群を内在する Class 1 integron や、テトラサイクリン耐性を伝達するトランスポゾンや、クロラムフェニコール耐性など、多剤耐性化に関与する因子群が集積しているだけでなく、重金属耐性や細菌感染に重要な鉄獲得系(Aerobactin 生合成系)をも近傍に位置していることが示唆された。これら集積には一旦伝達性プラスミドとして構築されたものと推定され、サルモネラ菌プラスミド pUO-StVR2 と浄化槽の活性汚泥から分離されたプラスミド pRSB107 と非常に近縁の塩基配列と構造を示していた。

さらに、全ゲノム情報を活用する有用な解析手法として、coregenome から選別した SNPs を用いた phylo-coregenome 法を行った。上述の T000240 株は2000年に日本で分離された ST19 に分類される菌株であるが、phylo-coregenome 法による詳細な分類により、1940年に分離された LT2 株により近縁であり、1990年代に伝播分布した DT104 株とは遠い系統であることを示していた。

(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])

### 4. 感染症の関与が疑われる難治性疾患の病原体検索・解析

難治性疾患として登録される所謂“難病”は未だその病因論 (etiology) が確立していない。その一つに川崎病が挙げられ、小児 (主に6ヶ月~5歳) の200人に1人が川崎病に罹患する。川崎病は小児の急性発熱性疾患のひとつで、その本態は急性全身性血管炎である。

感染症が病態増悪に関与しているかどうか検討するため、次世代シーケンサーによる網羅配列解読で病原体候補を検索した。はじめに、川崎病患者の血清・咽頭ぬぐい液から共通する病原体候補の探索を試みたが、患者ごとの病歴・治療歴等が影響しているためか、特定の共通因子を見出すことができなかった。患者ごとの固有因子も否定出来ないため、グロブリン治療前後の血清を網羅配列解読し、急性期と回復期における差異を指標にして病原体候補を探索した。免疫グロブリン治療により *Streptococcus* 属の減少傾向が顕著に見られた。*Streptococcus* 属にはスーパー抗原を産生する A 群溶血性レンサ球菌 *S. pyogenes* が知られており、その関与が疑われて久しいが、患者の血液培養等の培養検査では全て陰性であるため、他の *Streptococcus* species を念頭において総合的に解釈する必要があり、現在、川崎病に関連する *Streptococcus* species の分離培養を行っている。

(黒田 誠、関塚剛史、絹巻暁子「東京大」、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])

### 5. 細菌 16S-rDNA 配列を基礎とした細菌フローラの網羅分布解析法の開発

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個々の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかわかりません。本研究は、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする。これまでに、UC 患者の腸内細菌叢は、T-RFLP、定量 PCR、16S rDNA のシーケンス等の手法で解析されてきた。しかしながら、上記手法は網羅性もしくは定量性のどちらかに特化しており、密接に関連する菌種の特定に至らず、より網羅的且つ定量的解析が必要となる。細菌叢の新解析手法とし

て、パイロシークエンス法による次世代シークエンサーが用いられているが、コストが高いのが難点である。本研究課題により、Illumina社の次世代シークエンサーを用いて糞便中の minor group (1x10<sup>3</sup>~4cfu/1g)の細菌の検出も可能な、簡便で安価、網羅的且つ定量的解析手法を開発した。本手法を用いることで、本疾患に密接に関与する細菌が明らかになると期待される。

(関塚剛史、黒田 誠)

## 6. 生鮮食品による不明食中毒の解析

不明感染症疑いのかかる症例は数多く、その中でも生鮮食品による不明食中毒の症例が増加傾向にあった。この不明症例に特徴的な疫学調査結果として、推定される魚の刺身を喫食した平均6時間後に嘔吐・下痢を数回もよおし、その後特に目立った腹痛もない軽微な食中毒であることがわかっている。毒素性もしくは細菌性食中毒とは潜伏時間が異なり、様々な検査(毒素、細菌、ウイルス、マリントキシン)が陰性であることを考慮すると、従来の考え方が全く通用しない可能性を示唆していた。そこで、当該食中毒事例残品を網羅配列解読し、関連する病原体を検索した。

嘔吐・下痢に関連する対象魚の全ゲノム配列が公開されていないため、喫食して問題の無い切り身の網羅配列解読をコントロール配列とし、比較解析を行うことで嘔吐食材からのみ検出される解読リードを選別した。相同性検索の結果、魚病(ジェリーミート)の原因と知られている粘液胞子虫クドア属(*Kudoa*)の18S、28S-rRNAの配列が顕著に検出された(2.56%)。切り身のPBS懸濁液の鏡検により、大量の6極嚢を有する粘液胞子虫を確認した。複数の当該食中毒事例残品とコントロール・サンプルを用いて18S-rRNAに対する定量的RT-PCRを行ったところ、食中毒事例残品では1万倍以上もの*Kudoa*属の存在を確認した。

対象魚の食材を煮魚や冷凍保存すると嘔吐活性が消失することから、特徴的な原因物質だと推定される。数多くの疫学調査、網羅配列解読、動物実験により検討すべき原因物質の候補を絞り込むことができた。

(黒田 誠、関塚剛史、大西真[細菌第一部]、野崎智義[寄生動物部]、大西貴弘[国立食品衛生研究所]、小西良子[国立食品衛生研究所])

## 7. 呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの引き起こす重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。本研究

は、次世代シークエンサーの解析能力を駆使し、呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体(各種臓器・組織検体)から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログ作製を目的としている。山形県で小流行した呼吸器感染症の疑いのある不明病検体(咽頭・便検体)の網羅配列解読の結果、Human parechovirus (HPeV)の塩基配列を検出し、HPeV全長配列の決定により HPeV-3型のウイルス感染の疑いがあることを明らかにした。HPeV-3のVP1配列に対する特異プライマーを用いてRT-PCR検査したところ、他便検体から6検体の陽性バンドを確認し、他咽頭・髄液検体からは検出されなかった。不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することができた。多種多様に変異導入するRNAウイルス全てを検出するためには次世代シークエンサーによる検出・鑑別法は有用と考えられる。手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適用されると想定されるため、将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れて広範な感染症対策に貢献するシステムを構築していきたい。

(関塚剛史、黒田 誠、木村博一[感染症情報センター]、水田克己[山形衛研])

## 8. 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、トロイの木馬のように原生動物をベクターとして継ぎの宿主へ感染することが可能であると知られている。牛糞便中には、新規 *Balantidium* 属の原虫が高頻度に検出された。その原虫のう子中に存在する細菌の16S rRNA 遺伝子を次世代シークエンサーにて網羅配列解読し、牛糞便全体の細菌叢と比較を行った。糞便細菌叢で主要な割合を占めた偏性嫌気性細菌の全てがのう子内に存在することは無く、糞便細菌叢の解析で検出限界以下であった細菌が、のう子内から検出された。従って、原虫のう子内に特異的に存在する細菌が存在することが示唆された。また、のう子内に存在する細菌をCTCにて染色し、蛍光顕微鏡にて観察を行ったところ、のう子の食胞と思われる形態内に、生菌が観察された。本研究により、牛糞便内にはこれまでに報告ない新規 *Balantidium* 属が存在し、そのう子内の食胞には特異的な細菌が生存した状態で存在することが示唆され、腸内に存在する細菌が過酷な自然環境中においてものう子内で生存可能であり、腸内寄生性原虫をベクターとして利用してい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 ワクチンの国家検定

新規に承認申請された HPV ワクチン (4 価ワクチン) の承認前検査を製剤担当室として、血液安全性研究部・細菌第二部と共に実施した。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た。また前年度に承認された HPV ワクチン (2 価ワクチン) の検定を製剤担当室として担当した。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、石井克幸、森 清一郎、竹内隆正、終元 巖、黒田 誠)

## 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 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 laboratory manual の編集に参加し、出版に携わった。(終元 巖、松尾理加、森 清一郎、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])

## 発表業績一覧

### I. I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Ishii, Y., Tanaka, K., Kondo, K., Takeuchi, T., Mori, S., and Kanda, T. Inhibition of nuclear entry of HPV16 pseudovirus-packaged DNA by an anti-HPV16 L2 neutralizing antibody. *Virology*. 406: 181-188, 2010.
- 2) Kusumoto-Matsuo, R., Opresko, P. L., Ramsden, D., Tahara, H., and Bohr, V. A. Cooperation of DNA-PKcs and WRN helicase in the maintenance of telomeric D-loops. *Aging*. 2: 274-284, 2010.
- 3) Kusumoto-Matsuo, R., Kanda, T., and Kukimoto, I. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes to Cells*. 16: 23-33, 2011.
- 4) Mori, S., Nakao, S., Kukimoto, I., Kusumoto-Matsuo, R., Kondo, K., and Kanda, T. Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. *Cancer Science*. 102: 1223-1227, 2011.

- 5) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol*, 84:8085-97, 2010.
- 6) Kono K, Song H, Yokoyama M, Sato H, Shioda T, Nakayama EE. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 $\alpha$ -mediated restriction. *Retrovirology*, 7:72, 2010.
- 7) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology*, 7:90, 2010.
- 8) Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. *PLoS One*. 5:e8867, 2010.
- 9) 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.
- 10) 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:F15-22, 2010.
- 11) 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.
- 12) Matsuoka E, Tanaka Y, Kuroda M, Shouji Y, Ohta T, Tanaka I, Yao M. Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A (UafA) from *Staphylococcus saprophyticus* reveals participation of the B domain in ligand binding. *Protein Sci*. 2010 Dec 15. [Epub ahead of print]

- 13) Izumiya H, Sekizuka T, Nakaya H, Taguchi M, Oguchi A, Ichikawa N, Nishiko R, Yamazaki S, Fujita N, Watanabe H, Ohnishi M, Kuroda M. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):623-30. Epub 2010 Nov 22.
- 14) Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S. Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2821-9. Epub 2010 Jun 16.
- 15) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One.* 2010 Apr 23;5(4):e10256.
- 16) Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M. Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in *Bacillus anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):2787-92. Epub 2010 Apr 12.

## 2. 和文発表

- 1) 終元 巖 “子宮頸がんとヒトパピローマウイルス (HPV) 感染” アニムス、17-20、2010.
- 2) 佐藤裕徳：ヒトノロウイルスの生存戦略 (総説)、ウイルス、60:21-32、2010.
- 3) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、氏家誠、小渕正次、小田切孝人、本村和嗣、佐藤彩、横山勝、終元巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人 “2009/10 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析” 病原微生物検出情報月報 Vol. 31 p. 253-260: 2010年9月号
- 4) 田村務、田澤崇、渡邊香奈子、渡部香、昆美也子、三好龍也、内野清子、吉田永祥、松尾光子、西口智子、田中智之、北元憲利、本村和嗣、佐藤裕徳 “ノロウイルス GII/4 の 2008a 亜株の動向とイムノクロマト法の改良” 病原微生物検

- 出情報月報 Vol. 31 p. 316-317: 2010年11月号
- 5) 松下修三、横山 勝、宮内浩典、松田善衛、俣野哲朗、岩谷靖雅. HIV 細胞侵入とその防御機序. *日本エイズ学会誌*, 12:67-73, 2010.
  - 6) 黒田 誠 “変貌する感染症研究 -感染症対策に欠かせない網羅配列解読法- ” *医学のあゆみ*、236(6): 571-576、2011.

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Murakami, I., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Nakahara, T., Matsuo, R., Fujii, T., Aoki, D., and Kanda, T. Nucleosome positioning on episomal human papillomavirus DNA in cultured cells. 26<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference (2010年7月、モントリオール)
- 2) 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, Keio University, Tokyo, Japan, 2010.
- 3) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile, 2010.
- 4) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. Structural insight into substrate recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like protease. Fourth International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile, 2010.
- 5) Tanaka T, Motomura K, Sato H, Uchino K, Yoshida H, Miyoshi T, and Matsuo M. Genetic characteristics of double infection of Noroviruses not related to oyster consumption. The Forth International Calicivirus Conference, 2010, Santa Cruz, Chile.

### 2. 国内学会

- 1) 村上 功、竹内隆正、藤井琢磨、青木大輔、神田忠仁: An Adeno-Associated Virus Vector Efficiently And Specifically Transduce Mouse Skeletal Muscle、第16回日本遺伝子治療学会学術集会 (2010年7月、宇都宮)

- 2) 村松祐理、斎藤 督、柗元 巖、塚原祐輔：VeraCode-Allele Specific Primer Extension (ASPE) 法を用いた Human Papillomavirus (HPV) の型特異的な検出、第 17 回日本遺伝子診療学会 (2010 年 8 月、津)
- 3) 石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、森 清一郎、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 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 4) 柗元 巖、松尾理加、近藤一成、神田忠仁：PGMY リバースプロッティング法による我が国の HPV 遺伝子型分布の調査、第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 5) 本村和嗣、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス GII/4 の生き残り戦略、第 84 回 日本感染症学会総会、ワークショップ (2010 年 4 月、京都)
- 6) 本村和嗣. ノロウイルスのゲノム組換えと抗原性変異、第 20 回 第 20 回感染研シンポジウム“ゲノム情報と感染症研究” (2010 年 5 月、東京)
- 7) 佐藤裕徳. HIV の中和抗体逃避機構. 第 20 回感染研シンポジウム“ゲノム情報と感染症研究” (2010 年 5 月、東京)
- 8) 本村和嗣. ノロウイルスのゲノム解析、第 1 回新興・再興感染症拠点ゲノムセミナー (2010 年 5 月、仙台)
- 9) 田中智之、本村和嗣. ノロウイルス、第 51 回日本臨床ウイルス学会、シンポジウム (2010 年 6 月、香川)
- 10) 本村和嗣. ゲノミクスと計算科学の手法に基づくノロウイルス進化の研究、第 58 回 日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム、(2010 年 11 月 徳島)
- 11) 横山 勝. ゲノミクス、計算科学、実験科学の手法に基づく HIV の中和抗体逃避機構の研究. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム (2010 年 11 月、徳島)
- 12) 稲垣奈津子、武内寛明、横山 勝、佐藤裕徳、梁明秀、俣野哲朗. SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、(2010 年 11 月、徳島)
- 13) 河野 健、横山 勝、佐藤裕徳、塩田達男、中山英美. アカゲザル TRIM5 $\alpha$  は HIV-2/SIVmac キャプシドの複数領域を認識する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 14) 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子. サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 15) 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. アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 $\alpha$  と tetherin を回避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 16) Wisoot C, 横山 勝, Aksara T, Pattara K, 小林正明, 沖津祥子, 牛島廣治. Emergence of a new Norovirus GII.6 Variant among Infants and Children with Acute Gastroenteritis in Shizuoka, Japan during 2008-2009. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、(2010 年 11 月、徳島)
- 17) 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 は CD4 非依存性 HIV 感染感受性の重要な決定因子の一つである. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 18) 神山陽香、岩尾正倫、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直: Tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 19) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、氏家誠、小淵正次、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所: 2009/10 シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性 pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 20) 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、網康至、須崎百合子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小淵正次、氏家誠、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 “2009/10 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 22 年度のワクチン株” 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)
- 21) 田中智之、本村和嗣、内野清子、三好達也、松尾光子、西口智子、佐藤裕徳、吉田永祥: 食中毒事例におけるノロウイルス重感染のウイルス遺伝子

- 学的解析. 第 31 回日本食品微生物学会学術総会 (2010 年 11 月、滋賀)
- 22) 野間口雅子, 齊藤 暁, 明里宏文, 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. サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 の構築—アカゲザル TRIM5 $\alpha$  と tetherin による抑制の回避— 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 12 月、東京)
- 23) 泉 泰輔, 横山 勝, 篠原正信, 松井道志, 井尾克宏, 佐藤裕徳, 高折晃史. 抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G の N 末端ポケット構造の重要性. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 12 月、東京)
- 24) 小林朋子, 大出裕高, 佐藤佳, Gee Peter, 山元誠司, 蝦名博貴, 佐藤裕徳, 小柳義夫: Human tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2010 年 12 月、東京)
- 25) 岡 智一郎, 横山 勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆字, 片山和彦. カリシプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), (2010 年 12 月、神戸)
- 26) Izumi T, Yokoyama M, Shinohara M, Matsui M, Ito K, Sato H, Takaori-Kondo. A Model structure of APOBEC3G N-terminal region reveals a binding pocket modulating HIV-1 Vif interaction and RNA required for encapsidation. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) (2010 年 12 月、神戸)
- 27) 黒田誠. 次世代シーケンサー網羅配列解読法による川崎病の病原体候補カタログの作製. 第 26 回関東川崎病学会 (2010 年 6 月、東京都渋谷区)
- 28) 黒田誠. 次世代シーケンサーによる網羅的且つ定量的なヒト腸内細菌叢解析. 第 93 回日本細菌学会・関東支部会 (2010 年 10 月、横浜市)
- 29) 黒田誠, 関塚剛史, 絹巻暁子, 佐藤誠一, 大場邦弘, 浜田洋通, 寺井勝, 緒方昌平, 石井正浩, 森雅亮, 横田俊平, 水谷哲也. 次世代シーケンサーによる川崎病の原因究明. 第 113 回日本小児科学会学術集会 (2010 年 4 月、盛岡市)
- 30) 黒田誠. 次世代シーケンサーによる川崎病の病原体候補カタログの作製. 第 30 回日本川崎病研究会 (2010 年 10 月、京都市)
- 31) 黒田誠, 片野晴隆, 中島典子, 飛梅実, 関塚剛史, 相内 章, 長谷川秀樹, 佐々木裕子, 荒川宜親, 佐多徹太郎. 次世代シーケンサーによるパンデミック・インフルエンザウイルス A/H1N1/2009 の多様性解析. BMB2010 第 3 3 回分子生物学会年会 (2010 年 12 月、神戸市)
- 32) 宇田晶彦, 関塚剛史, 藤田修, 黒田誠, 堀田明豊, 山本美江, 棚林清, 山田章雄 *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU 株の強毒性に関わる遺伝子の同定. BMB2010 第 3 3 回分子生物学会年会 (2010 年 12 月、神戸市)
- 33) 関塚剛史, 黒田誠. 次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA 配列解読による網羅的且つ定量的な腸内細菌叢解析. BMB2010 第 3 3 回分子生物学会年会 (2010 年 12 月、神戸市)
- 34) 黒田誠. 次世代シーケンサーによるパンデミック・インフルエンザウイルス A/H1N1/2009 の多様性解析. 第 151 回日本獣医学会学術集会 (2011 年 3 月、府中市)
- III. 学会等 (財団等を含む) の学術賞受賞者  
大出裕高. *in silico*構造解析の HIV/AIDS 研究への応用.  
ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞者 (日本エイズ学会)
- IV. 研究助成金等 (財団等の競争的資金) 獲得者  
終元巖 三菱財団 平成 22 年度自然科学研究助成金