

- (22) Konishi E, Shoda M, Yamamoto S, Arai S, Tanaka-Taya K, Okabe N. Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: a nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3054-6.
- (23) Arai S, Suzuki S, Tanaka-Taya K, Ohyama T, Osaka K, Taniguchi K, Okabe N. [Compile and evaluation of national surveillance on human echinococcosis in Japan, 1999 to 2002]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2005 Mar;79(3):181-90. Japanese.
- (24) Tanaka-Taya K. [Human cytomegalovirus infection]. *Nippon Rinsho*. 2005 Apr;63 Suppl 4:528-33. Review. Japanese.
- (25) Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol*. 2004 Jul;73(3):465-73.
- (26) Suzuki S, Sunagawa T, Ohyama T, Tanaka-Taya K, Taniguchi K, Okabe N. [Evaluation of public knowledge about influenza based on influenza hotline consultations]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2004 Feb;78(2):99-107. Japanese.
- (27) Arai S, Suzuki S, Tanaka-Taya K, Ohyama T, Osaka K, Taniguchi K, Okabe N. [Evaluation of national surveillance for echinococcosis in Japan, 1999 to 2002]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2003 Nov;77(11):957-64. Japanese.
- (28) Takahashi H, Suzumura S, Shirakizawa F, Wada N, Tanaka-Taya K, Arai S, Okabe N, Ichikawa H, Sato T. An epidemiological study on Japanese autism concerning routine childhood immunization history. *Jpn J Infect Dis*. 2003 Jun;56(3):114-7.
- (29) Amo K, Tanaka-Taya K, Inagi R, Miyagawa H, Miyoshi H, Okusu I, Sashihara J, Hara J, Nakayama M, Yamanishi K, Okada S. Human herpesvirus 6B infection of the large intestine of patients with diarrhea. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 1;36(1):120-3. Epub 2002 Dec 12.
- (30) Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2005-11.
- (31) Takahashi H, Tanaka-Taya K, Arai S, Hasegawa A, Okabe N. [A risk analysis by a measles exportation model concerning the FIFA World Cup 2002]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2002 Apr;76(4):269-74. Japanese.
- (32) Sugimoto T, Tanaka-Taya K, Ono J, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus-6 infection in neonates: Not protected by only humoral immunity. *Pediatr Int*. 2002 Jun;44(3):281-5.
- (33) Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amou K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Apr;29(7):595-8.

- (34) Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol*. 2002 Apr;76(8):4145-51.
- (35) Ono J, Imai K, Tanaka-Taya K, Kurahashi H, Okada S. Decreased frequency of seizures in infantile spasms associated with lissencephaly by human herpes virus 7 infection. *Pediatr Int*. 2002 Apr;44(2):168-70.
- (36) Thawaranantha D, Chimabutra K, Balachandra K, Warachit P, Pantuwatana S, Tanaka-Taya K, Inagi R, Kurata T, Yamanishi K. Genetic variations of human herpesvirus 7 by analysis of glycoproteins B and H, and R2-repeat regions. *J Med Virol*. 2002 Mar;66(3):370-7.
- (37) Tanaka H, Nishimura T, Hakui M, Sugimoto H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6-associated hemophagocytic syndrome in a healthy adult. *Emerg Infect Dis*. 2002 Jan;8(1):87-8.
- (38) Tajiri H, Kozaiwa K, Tanaka-Taya K, Tada K, Takeshima T, Yamanishi K, Okada S. Cytomegalovirus hepatitis confirmed by in situ hybridization in 3 immunocompetent infants. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(10):790-3.
- (39) Ohta H, Matsuda Y, Tokimasa S, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amo K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamamoto S, Tano Y, Aono T, Yamanishi K, Okada S, Hara J. Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis after stem cell transplantation: effective monitoring of CMV infection by quantitative analysis of CMV mRNA. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jun;27(11):1141-5.
- (40) Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Hara J, Fujisaki H, Matsuda Y, Ohta H, Osugi Y, Okada S, Yamanishi K. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 May;27(10):1065-70.
- (41) Takahashi H, Arai S, Tanaka-Taya K, Okabe N. Autism and infection/immunization episodes in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2001 Apr;54(2):78-9.
- (42) Hasegawa T, Kimura T, Sasaki T, Okada A, Tanaka-Taya K, Miyagawa H, Amou K, Mushiake S, Yamanishi K, Ishikawa S. Sequential measurement of human herpesvirus 6 DNA with polymerase chain reaction method in pediatric living-related liver transplantation. *Clin Transplant*. 2001 Jun;15(3):208-13.
- (43) Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, Okada S. Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2173-7.
- (44) Kosuge H, Tanaka-Taya K, Miyoshi H, Amo K, Harada R, Ebihara T, Kawahara Y, Yamanishi K, Nishikawa T. Epidemiological study of human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 in pityriasis rosea. *Br J Dermatol*. 2000 Oct;143(4):795-8.
- (45) Tanaka-Taya K, Kondo T, Nakagawa N, Inagi R, Miyoshi H, Sunagawa T, Okada S, Yamanishi K. Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. *J Med Virol*. 2000 Mar;60(3):284-9.
- (46) Matsuda Y, Hara J, Miyoshi H, Osugi Y, Fujisaki H, Takai K, Ohta H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Thrombotic microangiopathy associated with reactivation of human herpesvirus-6

- following high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in young children. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Oct;24(8):919-23.
- (47) Inui K, Miyagawa H, Sashihara J, Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Nishigaki T, Teraoka S, Mano T, Ono J, Okada S. Remission of progressive multifocal leukoencephalopathy following highly active antiretroviral therapy in a patient with HIV infection. *Brain Dev.* 1999 Sep;21(6):416-9.
- (48) Ota A, Tanaka-Taya K, Ueda S. Cross-reactivity of anti-HIV-1-p17-derivative peptide (P30-52) antibody to Env V3 peptide. *Hybridoma.* 1999 Apr;18(2):149-57.
- (49) Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol.* 1998 Nov;56(3):275-9.
- (50) Aono T, Kondo K, Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Kondo M, Osugi Y, Hara J, Okada S, Yamanishi K. Monitoring of human cytomegalovirus infections in pediatric bone marrow transplant recipients by nucleic acid sequence-based amplification. *J Infect Dis.* 1998 Nov;178(5):1244-9.
- (51) Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Nagae Y, Aono T, Fujisaki H, Matsuda Y, Osugi Y, Hara J, Mori Y, Sunagawa T, Tano Y, Okada S, Yamanishi K. Cytomegalovirus retinitis after transplantation of positively selected CD34+ cells from HLA-mismatched donors. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 Apr;17(4):345-8.
- (52) Matsuda Y, Hara J, Osugi Y, Fujisaki H, Takai K, Ohta H, Nakanishi K, Tokimasa S, Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Allogeneic peripheral stem cell transplantation using positively selected CD34+ cells from HLA-mismatched donors. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Feb;21(4):355-60. Tanaka-Taya K, Okada S. [Human herpesvirus-6 and -7 infection and bone marrow transplantation (BMT)]. *Nippon Rinsho.* 1998 Jan;56(1):208-12. Review. Japanese.
- (53) Tajiri H, Tanaka-Taya K, Ozaki Y, Okada S, Mushiake S, Yamanishi K. Chronic hepatitis in an infant, in association with human herpesvirus-6 infection. *J Pediatr.* 1997 Sep;131(3):473-5.
- (54) Torigoe S, Koide W, Yamada M, Miyashiro E, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestations. *J Pediatr.* 1996 Aug;129(2):301-5.
- (55) Tanaka-Taya K, Kondo T, Mukai T, Miyoshi H, Yamamoto Y, Okada S, Yamanishi K. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1996 Jan;48(1):88-94.
- (56) Yanagihara K, Tanaka-Taya K, Itagaki Y, Toribe Y, Arita K, Yamanishi K, Okada S. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis with sequelae. *Pediatr Infect Dis J.* 1995 Mar;14(3):240-2.
- (57) Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1968-70.
- (58) Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, Taya K, Yamanishi K. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child.* 1995 Jun;72(6):518-9.

- (59) Kitamura K, Ohta H, Ihara T, Kamiya H, Ochiai H, Yamanishi K, Tanaka K. Idiopathic thrombocytopenic purpura after human herpesvirus 6 infection. *Lancet*. 1994 Sep 17;344(8925):830.
- (60) Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr*. 1994 Jul;125(1):1-5.
- (61) Kawa-Ha K, Tanaka K, Inoue M, Sakata N, Okada S, Kurata T, Mukai T, Yamanishi K. Isolation of human herpesvirus 7 from a child with symptoms mimicking chronic Epstein-Barr virus infection. *Br J Haematol*. 1993 Jul;84(3):545-8.
- (62) Maeda A, Sata T, Enzan H, Tanaka K, Wakiguchi H, Kurashige T, Yamanishi K, Kurata T. The evidence of human herpesvirus 6 infection in the lymph nodes of Hodgkin's disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423(1):71-5
- (63) 多屋馨子：【大きく変わってきた!ワクチンを用いた日本の感染症対策】 わが国のワクチンへの取り組み ここが足りてて、ここが足りない. *チャイルドヘルス* 14巻10号 Page1604-1611(2011.10)
- (64) 多屋馨子：海外渡航者への麻疹ワクチン接種の必要性. *バムサジャーナル*. 23巻3号 Page141-148(2011.08)
- (65) 多屋馨子：今日のワクチン事情 MR ワクチン 2012年麻疹排除へ向けた現状は? *薬局*. 62巻8号 Page3018-3026(2011.07)
- (66) 加來浩器, 大山卓昭, 多屋馨子, 岡部信彦：茨城県北茨城市のある中学校を発端とした麻疹アウトブレイク事例での実地疫学調査について. *感染症学雑誌*. 85巻3号 Page256-262(2011.05)
- (67) 多屋馨子：ウイルス感染症にどう対処するか 麻疹. *小児科学レクチャー*. 1巻2号 Page285-294(2011.07)
- (68) 徳田浩一, 五十嵐正巳, 山本久美, 多屋馨子, 中島一敏, 中西好子, 島史子, 寺西新, 谷口清州, 岡部信彦：関東地方のある高校における麻疹集団発生事例 感染拡大防止策とワクチン効果に関する疫学的検討. *感染症学雑誌*. 84巻6号 Page714-720(2010.11)
- (69) 多屋馨子：ワクチンと行政. *INFECTION CONTROL*. 20巻6号 Page609-613(2011.06)
- (70) 山本久美, 多屋馨子：MR ワクチン. *医薬ジャーナル*. 47巻2号 Page769-774(2011.02)
- (71) 多屋馨子：予防接種健康被害救済制度・予防接種後副反応・健康状況調査. *小児科診療*. 12(21) : 2241-2250, 2009
- (72) 多屋馨子：予防接種後副反応・健康状況調査. *母子保健情報*. 59 : 42-48, 2009.
- (73) 多屋馨子：ワクチン行政とサーベイランス. *臨床検査* 54巻11号 Page1263-1271(2010.10)
- (74) 多屋馨子：日本における予防接種の現状と課題 効果と副反応を正しく理解して、自分と周りの人を感染症から守りたい. *日本小児科医会会報*. 37号 Page73-76(2009.04)
- (75) 加藤達夫, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 住友眞佐美, 多屋馨子, 馬場宏一, 三田村敬子. *感染症・予防接種レター* 予防接種と副反応. *小児保健研究*. 65巻5号 Page698-699(2006.09)
- (76) 多屋馨子：定期接種 副反応. *小児看護*. 27巻12号 Page1609-1615(2004.11)

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：インフルエンザウイルス複製に関与する宿主因子とウイルス因子のインターフェースを標的とした新規抗ウイルス薬探索の基盤研究

課題番号：H23-新興-一般-013

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：永田 恭介

所属研究機関：筑波大学

所属部局：医学医療系

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 25,875,000 円

I. 研究の意義

既存の抗インフルエンザウイルス薬は、変異率の高いウイルス遺伝子を標的としたものが主体であり、薬剤耐性株が出現しやすい。この問題を克服する一案として、高度に保存されたウイルス因子、もしくはウイルス因子に作用する宿主因子とウイルス因子の相互作用を標的とした新規抗ウイルス薬を開発することが挙げられる。それには、ウイルス因子と宿主因子の機能および構造を明らかにすることが必須である。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写に関与する宿主因子の同定

ウイルスゲノムの複製と転写を担うウイルスポリメラーゼは、他のウイルス遺伝子と比較して、高度に保存されている。また、ウイルスゲノムの複製・転写反応には、多くの宿主因子が必須である。従って、ウイルスポリメラーゼとその機能を制御する宿主因子（基本的に変異フリー）の相互作用面は、新規抗ウイルス薬の標的として最適である。本項目では、インフルエンザウイルスゲノムの複製および転写に関わる宿主因子を同定し、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性制御機構と、それに関わる機能構造を明らかにし、新規抗ウイルス薬探索の基盤研究に資する。

(2) ウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析

本項目では、ウイルスポリメラーゼ複合体の完全長の構造を決定し、低分子化合物が結合できる新規標的部位を探索する。

(3) インフルエンザウイルスゲノム複製・転写を阻害する化合物の探索

本項目では、まず、抗ウイルス薬候補のスクリーニング系を確立する目的で、PB1-PA 相互作用部位を標的として、*in silico* スクリーニング→低分子化合物ライブラリー→ウイルスポリメラーゼを阻害する候補化合物探索のシステムを構築する。これにより、既存の抗インフルエンザウイルス薬とは異なるメカニズムで、インフルエンザウイルス感染を阻害する新規抗ウイルス薬を創薬する方法論の構築に資する。ついで、ウイルスポリメラーゼと宿主因子の相互作用面を標的として、抗ウイルス薬候補のスクリーニングを行う。

Ⅲ. 1 年間の研究成果

(1) インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写に関与する宿主因子の同定 (永田・信澤)

新規に複製されたウイルスゲノムは、ウイルスタンパク質 NP と結合して ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成する。しかし、試験管内ゲノム複製反応に必要な宿主因子である MCM 複合体と NP を添加したのみでは、子孫 RNP 複合体は形成されない。本年度では、この課程を促進する宿主因子として、宿主のスプライシング因子である UAP56 に着目し、ウイルスゲノム複製と協調して UAP56 によって NP がウイルスゲノム上に配置されることを明らかにした。また、ウイルスポリメラーゼの転写反応には、ウイルスポリメラーゼが宿主キャップ構造と結合することが必須である。その相互作用機構を明らかにした。

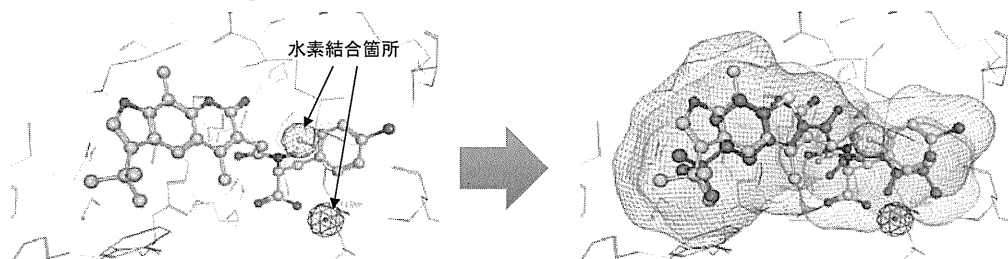
(2) ウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析 (永田・朴)

ウイルスポリメラーゼ複合体の完全長構造を決定するため、まず、組換えバキュロウイルス発現系を構築した。PB1、PB2、PA 発現用バキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、感染細胞抽出液よりアフィニティーカラムを用いてウイルスポリメラーゼ複合体を精製した。しかし、昆虫細胞から抽出した組換えウイルスポリメラーゼ複合体は、RNA 合成活性が著しく低下していた。このことから、組換えバキュロウイルス発現系では、正確な構造を持つウイルスポリメラーゼ複合体を調製することが困難であると考えられた。そこで次に、鶏卵を用いて大量のウイルス粒子を調製後、RNP 複合体を精製し、RNase 処理および種々のカラムを用いてウイルスゲノムおよび NP を除去し、活性を保持したウイルスポリメラーゼ複合体を精製することに成功した。

(3) インフルエンザウイルスゲノム複製・転写を阻害する化合物の探索 (夏目)

インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは PB1 を中心として、PB1 の N 末端に PA、および C 末端に PB2 がそれぞれ結合した複合体を形成する。これまでに、PB1 と PA の相互作用部位の部分結晶構造を決定することに成功している。本年度は、抗ウイルス薬候補のスクリーニング系を確立する目的で、PB1-PA 相互作用部位を標的として、*in silico* スクリーニング→低分子化合物ライブラリー→ウイルスポリメラーゼを阻害する候補化合物探索のシステムの構築を行った。これまでの *in silico* 解析と蛍光偏光法を用いた解析結果より、PB1 と PA の結合を阻害する低分子化合物として、化合物 No.38 が得られている。しかし、バイオアッセイの結果より、高い細胞毒性をもつことが指摘されていた。そのため、物性改善を目的として、*in silico* による化合物 No.38 と PA との相互作用モデルを模倣しながら化合物 No.38 とは新しい骨格をもつ化合物の探索 (Scaffold hopping) を実施した。化合物 No.38 をクエリーとした Scaffold hopping では、①PA と化合物 No.38 の相互作用モデルより、相互作用に重要とされる水素結合 2 カ所を拘束条件に、約 300 万件の化合物ライブラリー (化合物ライブラリーをもとに Drug-like 化合物をあらかじめ選定したライブラリー群) よりドッキング計算によって化合物を絞り込み、②前述で定義した水素結合を満たす化合物群を対象に、化合物 No.38 と表面形状が類似している化合物で、なおかつ、構造式が化合物 No.38 と異なる化合物を選定、の順序で行った (右図)。

①の探索では、約 300 万件



PAと化合物38の相互作用モデルより重要な水素結合2カ所を定義し、同じような水素結合を形成する化合物をドッキングによりスクリーニング

前のステップでヒットした化合物群から、化合物38と表面形状が類似しており、なおかつ、構造式がなるべく異なる化合物を選定

から、1,686 化合物がヒットし、②の過程では、1,686 化合物の中から、表面形状比較 (ROCS 法) により、形状類似性の閾値が、0.5 以上 (最小値 0、最大値 1) 以上で、かつ、MACSS key による Fingerprint 計算を利用した構造式の類似性計算で、構造類似性の閾値が、0.5 以下 (最小値 0、最大値 1) の条件を満たす 40 品目をアッセイ評価対象の化合物に選定した。

IV. 平成 24~25 年度の課題

(1) インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写に関与する宿主因子の同定 (永田・信澤)

これまで実験室株を用いて、ウイルスゲノムの複製・転写機構を明らかにしてきた。次年度からは、さらにこれまでと同様な方法で宿主因子を同定するとともに、病原性や種特異性が異なる複数の野外株を用いることにより、解析を拡充する。また、ウイルス因子と宿主因子の相互作用面を最小化し、その複合体形成ドメインの構造を決定する。

(2) ウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析 (永田・朴)

平成 23 年度に調製したウイルス粒子由来のウイルスポリメラーゼ複合体を用いて結晶構造解析を行う。また、機能ドメインを詳細に解析するためには変異体が必要となるため、ウイルスポリメラーゼ複合体全長および部分構造を組換えタンパク質として調製することが必須となる。平成 23 年度では組換えバキュロウイルス発現系を用いても十分な RNA 合成活性をもつウイルスポリメラーゼ複合体の調製が困難であったことから、哺乳動物細胞に特有のタンパク質修飾機構等が活性型への構造変換に必要であると考えられる。そのため、哺乳動物細胞を用いた組換えタンパク質発現系およびウイルスポリメラーゼの調製方法を検討し、構造活性相関を明らかにする。

(3) インフルエンザウイルスゲノム複製・転写を阻害する化合物の探索 (夏目)

Scaffold hopping の結果で選定された化合物のアッセイ評価結果に基づき、物性改善がみられた化合物について、構造的に類似した周辺化合物を再検索し、評価を行う。これらの方法論を基盤に、研究項目 (1)、(2) で得られたウイルスポリメラーゼおよび宿主因子の構造情報から、化合物結合性の高い相互作用面を検討し、ドッキングによるスクリーニングを用いて新規化合物を同定する。

V. 行政施策への貢献の可能性

薬剤耐性株の出現頻度が低い新規抗ウイルス薬を開発することで、新型インフルエンザ出現に対する事前準備として、1つのオプションになりうる。また、構造生物学的な解析手法を導入することで、感染症基盤研究の技術水準が向上することが期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

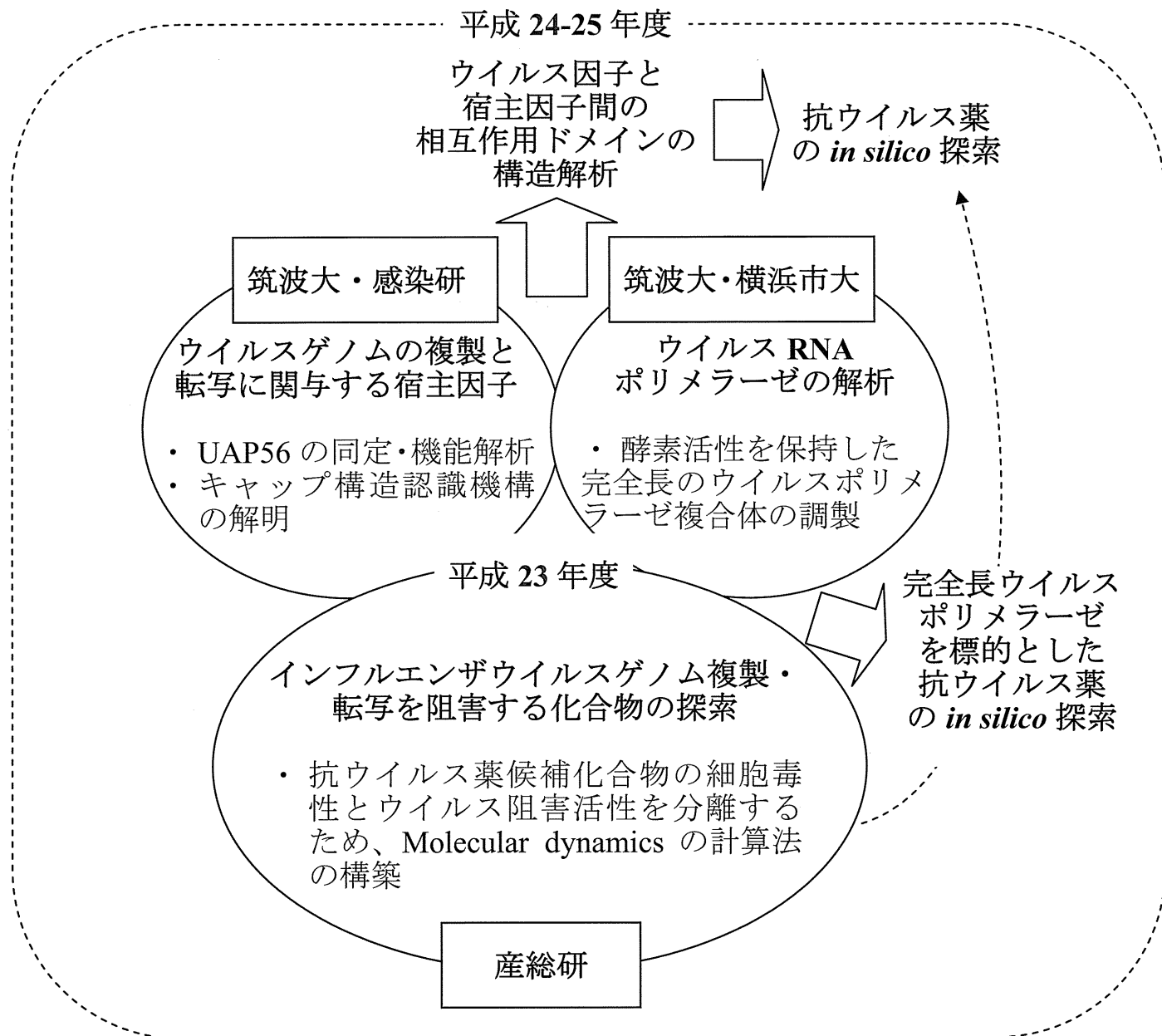
研究代表者：永田 恭介

Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari YO, Kuwata K. Structure-based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011; in press.

Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase. *J Virol.*, 2011; 85(15): 7504-12.

Kawaguchi A, Momose F, Nagata K. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol.*, 2011; 85(13): 6197-204.

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1981年9月 アルバート・アインシュタイン医科大学発生生物・癌研究部門・博士研究員
 1984年7月 スローンケタリング記念癌研究所分子生物・ウイルス研究系・研究員
 1985年2月 国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門・助手
 1991年4月 東京工業大学生命理工学部・助教授
 1999年4月 東京工業大学大学院生命理工学研究科・助教授（改組により）
 2001年2月 筑波大学基礎医学系・教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科・教授併任）
 2001年4月 筑波大学基礎医学系・教授
 2004年4月 筑波大学・大学院人間総合科学研究科社会環境医学専攻／・基礎医学系・教授（改組により）
 2006年4月 筑波大学・大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻・教授（改組により）
 2011年10月 筑波大学・医学医療系・教授（改組により）

・主な指導を受けた研究者

- 山田正篤（東京大学薬学部）
 Jerard Hurwitz（アルバート・アインシュタイン医科大学発生生物・癌研究部門）
 石浜 明（国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門）

・主な研究課題

- 1981年9月 Dr. Hurwitz に師事し、アデノウイルスゲノムの複製機構を明らかにした。
 1984年7月 Dr. Hurwitz の研究員として、アデノウイルスゲノムの複製に関わる宿主因子の同定と機能解析
 1985年2月 石浜明教授が主宰する研究室において、インフルエンザウイルスゲノム転写の分子機構解析
 1991年4月以降
 研究室を主宰し、インフルエンザウイルスゲノム複製の分子機構解析、インフルエンザウイルスゲノム複製に関わる宿主因子の同定と機能解析をすすめるとともに、インフルエンザウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼの機能構造の解析をすすめている（本研究課題の分担研究者である朴博士との共同研究）。

・これまでの研究実績（抜粋）

1. Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari YO, Kuwata K. Structure-based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011; in press
2. Numajiri-Haruki A, Naito T, Nishie T, Saito S, Nagata K. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011; 31: 847-856.

3. Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of Template Activating Factor-1 as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 3254-3265.
4. Numata M, Nagata K. Synergistic requirement of orphan nonamer-like elements and DNA bending enhanced by HMGB1 for RAG-mediated nicking at cryptic 12-RSS but not authentic 12-RSS. *Genes Cells*, 2011; 16:879-895.
5. *Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase. J. Virol.*, 2011; 85: 7504-7512.
6. *Kawaguchi A, Momose F, Nagata K. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. J. Virol.*, 2011; 85: 6197-6204.
7. Kadota S, Nagata K. pp32, an INHAT component, is a transcription machinery recruiter for maximal induction of IFN-stimulated genes. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 892-899.
8. Numata M, Saito S, Nagata K. RAG-dependent recombination at cryptic RSSs within TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22) chromosomal translocation region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 402: 718-724.
9. Jo S, Kawaguchi A, Takizawa N, Morikawa Y, Momose F, Nagata K. Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes Infect.*, 2010; 12: 1079-1084.
10. Takagi M, Motohashi K, Nagai A, Izumikawa M, Tanaka M, Fuse S, Doi T, Iwase K, Kawaguchi A, Nagata K, Takahashi T, Shin-Ya K. Anti-influenza virus compound from *Streptomyces* sp. RI18. *Org. Lett.*, 2010; 12: 4664-4666.
11. Takizawa N, Kumakura M, Takeuchi K, Kobayashi N, Nagata K. Sorting of influenza A virus RNA genome segments after nuclear export. *Virology*, 2010; 401: 248-256.
12. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Tame JR, Nagata K, Park SY. Structural insight into a novel subunit contact within influenza virus RNA polymerase. *EMBO J.*, 2009; 28: 1803-1811.
13. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR, Park SY. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, 2008; 454: 1127-1131.
14. Murayama A, Omori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, 2008; 133: 627-639.
15. Nagata K, Kawaguchi A, Naito T. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev. Med. Virol.*, 2008; 18: 247-260.
16. Kawaguchi A, Nagata K. *De novo* replication of the influenza virus RNA genome is regulated by a DNA replicative helicase, MCM. *EMBO J.*, 2007; 26: 4566-4575.
17. Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K. A novel influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 18235-18240.

18. Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of the influenza virus RNA polymerase subunits. *J. Virol.*, 2007; 81: 1339-1349.
19. Takizawa N, Watanabe K, Nouno K, Kobayashi N, Nagata K. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect.*, 2006; 8: 823-833.
20. Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama K. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat. Struc. Mol. Biol.*, 2006; 13: 331-338.
21. Numajiri A, Mibayashi M, Nagata K. Stimulus- and domain-dependent cell death acceleration by an IFN-inducible protein, human MxA. *J. Interf. Cytok. Res.*, 2006; 26: 214-219.
22. Haruki H, Okuwaki M, Miyagishi M, Taira K, Nagata K. Involvement of TAF-I/SET in transcription of adenovirus early genes as a positively acting factor. *J. Virol.*, 2006; 80: 794-801.
23. Nagata K, Takeyasu K. Nuclear Dynamics –Molecular Biology and Visualozation of the Nucleus-. Tokyo: Springer, 2006.
24. Kawaguchi A, Naito T, Nagata K. Involvement of Influenza Virus PA Subunit in Assembly of Functional RNA Polymerase Complexes. *J. Virol.*, 2005; 79: 732-744.
25. Iki S, Yokota S-I, Okabayashi T, Yokosawa N, Nagata K, Fujii N. Serum-dependent expression of promyelocytic leukemia protein suppresses propagation of influenza virus. *Virology*, 2005; 343: 106-115.
26. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Shahnewaz J, Kadota S, Nagata K. Stringent requirement of the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaque. *J. Virol.*, 2005; 79: 7838-7844.
27. Kadota S, Kanayama T, Miyajima N, Takeuchi K, Nagata K. Enhancing of measles virus infection by Magnetofection. *J. Virol. Meth.*, 2005; 128: 61-66.
28. Kadir T, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 643-652.
29. Takeuchi K, Kadota S, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)- α/β but not IFN- γ signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.*, 2003; 545: 177-182.
30. Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 45306-45314.
31. Momose F, Basler C F, O'Neill R E, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K. The cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 2001; 75: 1899-1908.
32. Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, Hoshida K, Kobayashi N, Nagata K. Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res.*, 2001; 77, 31-42.
33. Nakade K, Handa H, Nagata K. Promoter structure of the MxA gene that confers the resistance to

- influenza virus. *FEBS Lett.*, 1997; 418: 315-318.
34. Momose F, Handa H, Nagata K. Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie*, 1996; 7: 1103-1108.
35. Watanabe K, Handa H, Mizumoto K, Nagata K. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J. Virol.*, 1996; 70: 241-247.
36. Nagata K, Kawase H, Handa H, Yano K, Yamasaki M, Ishimi Y, Okuda A, Kikuchi A, Matsumoto K. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 4279-4283.
37. Shimizu K, Handa H, Nakada S, Nagata K. Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral and factors. *Nucleic Acids Res.*, 1994; 22: 5047-5053.
38. Nakayama M, Yazaki K, Kusano A, Nagata K, Hanai N, Ishihama A. Structure of mouse Mx1 protein: Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 15033-15038.
39. Yamanaka K, Ogasawara N, Yoshikawa H, Ishihama A, Nagata K. *In vivo* analysis of the promoter structure of the influenza virus RNA genome using a transfection system with an engineered RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 5369-5373.
40. Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 11151-11155.

平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究課題番号：H23—新興—一般—014予定機関：H23年度からH25年度研究代表者：野崎 智義所属研究機関：国立感染症研究所所属部局：寄生動物部職名：部長年次別研究費(交付決定額)：1年目 43,434,000円I. 研究の意義、必要性

- (1) 国内の顧みられない寄生虫症の監視機構が不備、効果的サーベイランス系の構築が必要
- (2) 原虫・蠕虫の遺伝子鑑別法、寄生虫症の簡易血清診断キットの整備が不十分
- (3) 寄生虫症の感染機構・病原機構等の解明が診断法・治療法の構築に不可欠
- (4) 新興寄生虫症の海外からの侵入・国内発生に備えた研究グループ・診断ネットワークの育成が不可欠

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) アカントアメーバ角膜炎・ジアルジア腸炎・アメーバ赤痢等の原因原虫の分子型別法の確立、監視施設網の構築により、監視体制を強化
- (2) イヌ回虫等幼虫移行症・肺吸虫症・アニサキス・住血吸虫症・ジアルジア症等の簡易血清診断法・診断キットを確立し、顧みられない寄生虫症の安価・簡便な診断を達成する
- (3) 赤痢アメーバ原虫の病原機構・細胞分化機構・薬剤耐性機構の解明により、感染の分子基盤を理解
- (4) マラリア原虫の薬剤耐性機構の解明と遺伝学的手法の開発、トキソプラズマの感染機構の解明により、病原機構と薬剤耐性機構の分子的理解と薬剤耐性克服の技術基盤を構築
- (5) イヌ回虫等の体内移行の機構の解明、エキノコックスの特異的呼吸鎖の解明と阻害剤のスクリーニング・同定により、新規薬剤標的を獲得

III. 1年間の研究成果

- ・研究代表者(野崎智義)
赤痢アメーバの病原因子輸送担体(システインプロテアーゼ受容体 CPBF1)を同定・機能を解明
- ・研究分担者(濱野真二郎)(注: pathogen-associated molecular pattern)
赤痢アメーバの PAMPs の性状解明、定着・非定着と腸管内ムチンの糖鎖構造の相関解明
- ・研究分担者(渡辺恒二)
HIV 感染随伴ジアルジア・クリプトスポリジウム症の臨床・疫学的特徴解明、顕微鏡診断問題点発見
- ・研究分担者(八木田健司)
ジアルジア診断に応用可能な単クローン抗体蛍光標識試薬の確立
- ・研究分担者(井上幸次)
アカントアメーバ角膜炎の量的相関の評価、サーベイランス継続、分子疫学の中間報告
- ・研究分担者(永宗喜三郎)
トキソプラズマ感染抵抗性 CHO 株のスクリーニング・分離、感染哺乳動物細胞の網羅的発現解析
- ・研究分担者(平井誠)
DNA 複製時エラー修復欠損したマラリア原虫(ミューテーター)の作出成功、全ゲノム解析により証明
- ・研究分担者(中野由美子)
マラリア原虫ピリメサミン耐性の拡散と遺伝子型混合のアフリカ・アジア間での相違を証明
- ・研究分担者(津久井久美子)
赤痢アメーバ薬剤耐性株の耐性候補遺伝子の機能と作用機序解明を開始
- ・研究分担者(丸山治彦)
トキソカラ(イヌ回虫またはネコ回虫)とブタ回虫感染を区別できる組換え抗原を同定
- ・研究分担者(北 潔):
エキノコックス幼虫の複合体 II の全サブユニットの塩基配列・アミノ酸配列を決定
- ・研究分担者(河津信一郎):
住血吸虫症検査法の基盤となる組換え体抗原の作製に成功、ELISA 法に応用
- ・研究分担者(山崎浩)
マンソン孤虫症の迅速診断 ICT キットが完成、有棘顎口虫診断法開発のための準備完了
- ・研究分担者(杉山広)
肺吸虫・アニサキスの血清診断・分子鑑別法を検討

IV. 平成24~25年度の課題

- (1) アカントアメーバ・腸管原虫症・HIV 随伴日和見原虫症の発生動向調査、分離株遺伝子型別
- (2) ジアルジア症・顎口症・肺吸虫症・アニサキス症のキットの地研、医療機関での検証
- (3) 住血吸虫症・マンソン孤虫症・イヌ回虫症等の新規診断法の開発と感染モデル等での検証
- (4) 赤痢アメーバ・アカントアメーバ・マラリア原虫等の薬剤耐性機構・感受性相関の解明
- (5) 赤痢アメーバの病原因子・分化因子・糖鎖認識レクチン・PAMPs の生化学的・生理学的解明
- (6) トキソプラズマ感染感受性・抵抗性宿主遺伝子の証明、マラリア原虫ミューテーターを用いた薬剤抵抗性株の選択、より高頻度なミューテーターの作出
- (7) 寄生虫症の網羅的遺伝子診断法の確立

(8) エキノコックス呼吸鎖複合体 II 阻害剤獲得を目的に大腸菌・無細胞蛋白質合成系による発現系確立

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 顧みられない原虫症・寄生虫症の検査診断キットの開発・普及・供給体制の構築
- (2) 検査・診断基準のガイドラインの作成
- (3) 腸管寄生虫症、アカントアメーバ角膜炎、蠕虫症などの寄生虫症の発生動向の把握
- (4) 寄生虫症の感染・寄生機構、免疫に関する幅広い知的基盤の整備
- (5) 国内の寄生虫研究グループ・研究者の育成
- (6) 国内外の研究グループとの連携の確立

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等) 2011 のみ

(野崎 智義)

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **BMC Genomics** 12, 275, 2011.

Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. **J. Antimicrob. Chemother.** 66, 2045-2052, 2011.

Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5, e1263, 2011.

Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-Infected Japanese Men: Clinical Features and Response to Therapy. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5:e1318, 2011.

Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. **J. Antimicrob. Chemother.** In press.

(濱野 真二郎)

原田倫世、濱野真二郎 アメーバ赤痢やクリプトスポロジウム症の現状と最新の知見 化学療法の領域 (2011 年 4 月号 72-79 頁)

(渡辺 恒二)

Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-Infected Japanese Men: Clinical Features and Response to Therapy. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5:e1318, 2011.

(井上 幸次)

宇野敏彦、福田昌彦、大橋裕一、下村嘉一、石橋康久、稲葉昌丸、井上幸次、植田喜一、江口洋、白石敦、外園千恵、田川義継、近間泰一郎：重症コンタクトレンズ関連角膜炎感染症全国調査。 **日眼会誌** 115:107-115, 2011

井上幸次：アカントアメーバ角膜炎。「**眼科学 第 2 版 (I)**」丸尾敏夫・本田孔士・臼井正彦編 p107-108, 文光堂, 東京, 2011.

井上幸次：感染性角膜炎全国サーベイランス「**専門医のための眼科診療クオリファイ 6 コンタクトレンズ自由自在**」大橋裕一編 p210-213, 中山書店, 東京, 2011.

井上幸次、大橋裕一、江口洋、杉原紀子、近間泰一郎、外園千恵、下村嘉一、八木田健司、野崎智義 わが国のアカントアメーバ角膜炎関連分離株の分子疫学多施設調査 (中間報告) **あたらしい眼科** in press.

(平井 誠)

Suga Y, Nagita A, Takesako R, Tanaka I, Kobayashi K, Hirai M., Matsuoka H. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency variant, G6PD Mizushima, showing increases in serum ferritin and cytosol leucine aminopeptidase levels. **J Pediatr Hematol Oncol.** 33,15-7, 2011

Matsuzaki-Moriya C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. A critical role for phagocytosis in resistance to malaria in iron-deficient mice. **Eur J Immunol.** 41, 1365-75. 2011

(津久井久美子)

Penuliar GM, Furukawa A, Nakada-Tsukui K, Husain A, Sato D, Nozaki T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother.** 2011, in press

(北 潔)

Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K. and Ōmura, S. Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. **Tetrahedron** 2011, in press.

(丸山 治彦)

Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, Maruyama H. A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. **Parasitol Res.**, 2011. In press

(河津 信一郎)

Asada, M., Tanaka, M., Goto, Y., Yokoyama, N., Inoue, N., and Kawazu, S. Stable expression of green fluorescent protein and targeted disruption of thioredoxin peroxidase-1 gene in *Babesia bovis* with the WR99210/dhfr selection system. **Mol. Biochem. Parasitol.** (in Press)

Goto, Y., Duthie MS., Nguyen, TT., Asada, M., Kawazu, S., Carter, D., and Inoue, N. Serological characterizations of tandem repeat proteins for detection of African trypanosome infection in cattle. **Parasitol. Int.** (in Press)

Nguyen, TT., Goto, Y., Lun, ZR., Kawazu, S., and Inoue, N. Tandem Repeat Proteins as potential

- diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. **Parasitol. Res.** (in Press)
- Angeles, JM., Goto, Y., Kirinoki, M., Leonardo, L., Rivera, PT., Villacorte, E., Inoue, N., Chigusa, Y., and Kawazu, S. Human antibody response to thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins as immunodiagnostic antigen candidates for *Schistosoma japonicum* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85: 674-679 (2011)
- Laohasinnarong, D., Thekisoe, OM., Malele, I., Namangala, B., Ishii, A., Goto, Y., Kawazu, S., Sugimoto, C., and Inoue, N. Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Parasitol. Res.** 109: 1735-1739 (2011)
- Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., and Kawazu, S. Improvement of the observational method for *Plasmodium berghei* oocysts in the midgut of mosquitoes. **Parasit. Vectors** 4: 118 (2011)
- Khukhuu, A., Lan, DT., Long, PT., Ueno, A., Li, Y., Luo, Y., Macedo, AC., Matsumoto, K., Inokuma, H., Kawazu, S., Igarashi, I., Xuan, X., and Yokoyama, N. Molecular epidemiological survey of *Theileria orientalis* in Thua Thien Hue Province, Vietnam. **J. Vet. Med. Sci.** 73: 701-705 (2011)
- Goto, Y., Duthie, MS., Kawazu, S., Inoue, N., and Carter, D. Biased cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 405:434-438 (2011)
- Kawazu, S., Takemae, H., Komaki-Yasuda, K., and Kano, S. Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Int.** 59: 298-302 (2010)
- Tanaka, M., Sakurai, T., Yokoyama, N., Inoue, N., and Kawazu, S. Cloning and characterization of peroxiredoxin in *Babesia bovis*. **Parasitol. Res.** 105: 1473-1477 (2009)
- 発明者：御子柴克彦、榎本匡宏、河津信一郎 米国仮出願番号：61/407,679 出願日 2010 年 10 月 28 日
(山崎 浩)
- 青笹尚彦, 常深祐一郎, 大藤由佳, 甲斐浩道, 森村壮志, 柿沼 誉, 玉置邦彦, 佐藤伸一, 前田卓哉, 山崎 浩. 有棘顎口虫による幼虫移行症の 1 例. **皮膚科の臨床**53:887-890, 2011.
- 太田和義, 山崎 哲, 高井哲成, 本城裕美子, 吉井重人, 影山富士人, 山田正美, 記野秀人, 山崎 浩, 武藤麻紀. マス生食によると思われた日本海裂頭条虫症の 1 例. **日本内科学誌** 2012 (印刷中)
- 山崎 浩, 森嶋康之, 杉山 広, 武藤麻紀. 2010 年 6 月以降に続けて関東地方で発生が確認された新興寄生虫感染症としてのアジア条虫症. **病原微生物検出情報**32:106-107, 2011.
(杉山 広)
- Sugiyama, H., Singh, T.S. and Rangsiruji, A. *Paragonimus*. in **Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens**, Liu, D.-Y., ed., CRC press, Boca Raton, 2011, chap. 39, in press.
- Furuya, K., Sugiyama, H., Ohta, M., Nakamura, S., Une, Y. and Sasaki, S. Cerebral microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* infection in a young squirrel monkey. **J Neuroparasitol** 2, in press, 2011.
- Koonmee, S., Intapan, P.M., Yamasaki, H., Sugiyama, H., Muto, M., Kuramochi, T., Kularbkeaw, J., Kanpittaya, J., Maleewong, W., Nawa, Y. Molecular identification of a causative parasite species using formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues of a complicated human pulmonary sparganosis case without decisive clinical diagnosis. **Parasitol Int** 60, in press, 2011.
- Chen, F., Li, J., Sugiyama, H., Weng, Y.-B., Zou, F.-C., Lin, R.-Q., Yuan, Z.-G., Song, H.-Q., Zhu, X.-Q. and Zhao, G.-H. Comparative analysis of 18S and 28S rDNA sequences of *Schistosoma japonicum* from mainland China, the Philippines and Japan. **J Animal Vet Adv** 10, 2010-2015, 2011.
- Zhao, G.-H., Li, J., Chen, F., Zou, F.-C., Yang, J.-F., Sugiyama, H., Xu, M.-J., Lin, Q., Lin, R.-Q., Zhu, X.-Q. Variability in intron sequences of housekeeping and antigen-coding genes among *Schistosoma japonicum* isolates in mainland China. **Parasitol Int** 60, 170-174, 2011.
- Zhao, G.-H., Blair, D., Li, X.-Y., Li, J., Lin, R.-Q., Zou, F.-C., Sugiyama, H., Mo, X.-H., Yuan, Z.-G., Song, H.-Q., Zhu, X.-Q. The ribosomal intergenic spacer (IGS) region in *Schistosoma japonicum*: structure and comparisons with related species. **Inf Genet Evol** 11, 610-617, 2011.
- Singh, T.S., Sugiyama, H., Devi, Kh.R., Singh, L.D., Binchai, S. and Rangsiruji, A. Experimental infection with *Paragonimus heterotremus* metacercariae in laboratory animals in Manipur, India. **Southeast Asian J Trop Med Pub Health** 42, 34-38, 2011.

VII. III (1 年間の研究成果) の概要図等

具体的成果

病原・防御機構の分子基盤の構築

寄生虫側病原機構の解明

- 赤痢アメーバ病原・分化・薬剤耐性機構
- 赤痢アメーバ病原規定因子候補遺伝子の機能解析 (野崎)
- 炎症性サイトカインを誘導するPAMPsの性状の解明・感染感受性と糖鎖構造の相関の解明 (濱野)
- メトロニダゾール耐性株のトランスクリプトーム解析 (津久井)
- マラリア原虫・トキソプラズマの代謝・感染・薬剤耐性機構の解明
- マラリア原虫の高頻度変異誘導株 (ミューテータ) の確立 (平井)
- マラリア原虫ピリメサミン耐性の核酸と多様性のアジアとアフリカの相違を解明
- トキソプラズマの感染感受性を規定する宿主遺伝子のスクリーニング (永宗)

- エキノкокスの特殊呼吸の解明
- 呼吸鎖複合体IIの全サブユニットの核酸・アミノ酸配列の決定 (北)
- 線虫の病原機構
- ブタ回虫のEST解析により、幼虫移行に重要な遺伝子を抽出、診断候補遺伝子を同定 (丸山)

寄生虫症発生動向の調査、検査法・診断法の確立

感染動向調査・サーベイランス

- HIVに伴う原虫腸管感染症の実態調査
- ジアルジア・クリプトスポリジウム症等腸管原虫症の感染実態解明、分離株確保 (渡辺)
- アカントアメーバ角膜炎
- アカントアメーバ角膜炎の実態把握、分離株の遺伝子型別解析 (井上)

血清診断法・キットの確立

- ジアルジア症
 - 糞便中虫体検出用のキット作成に必要な蛍光標識せた単クローン抗体作成 (八木田)
- 幼虫移行症
 - イヌ・ネコ・ブタ回虫症の鑑別血清反応を可能とする診断抗原の確立 (丸山)
 - マンソン狐虫の血清反応の確立 (山崎)
 - 顎口虫の血清反応に必要なcDNAの作成
- アニサキス症・肺吸虫
 - 新規診断法の検討 (杉山)
- 住血吸虫症
 - 人獣両方で住血吸虫を検出できる診断系に有用な抗原の選定 (河津)

厚生行政への貢献

・血清診断・遺伝子診断・型別の標準化
・ガイドラインの策定

・寄生虫感染症サーベイランスの構築

・寄生虫感染症研者・グループの育成・ネットワークの構築

○研究代表者の研究概要等

・過去に所属した研究機関の履歴

S62-H11 慶応大学助手、H11-H16 国立感染症研究所寄生動物部室長、H17-H20.6、群馬大学国際寄生虫病生態学教授、H20.7 より現職。留学歴：H1-7NIAID, NIH 並びに Rockefeller U。H11-現在、大阪バイオサイエンス研究所特別研究員；H11-現在、慶応大学非常勤講師；H21.9-現在筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 併人、H13-現在、薬事・食品衛生審議会専門委員、H13-17、科学技術振興事業団さきがけ 21(PRESTO)「生体と制御」領域研究員；H18-現在、日本寄生虫学会学術担当理事；H19-現在、日米医学協力研究会・寄生虫疾患専門部会パネルメンバー。

・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

曾我朋義・佐藤暖（慶応大学）、原田繁春（京都工繊大）、柴田哲男（名古屋工大）、James A. Dvorak (NIH), George A. M. Cross (Rockefeller U), William A. Petri Jr. (U Virginia)、Sandipan Ganguly (NICED, Kolkata)。

・主な研究課題

赤痢アメーバの病原機構の解明、原虫特異的含硫アミノ酸代謝解明と創薬、原虫症の"omics"研究。

・これまでの研究実績

査読のある英文論文数(101、うち総説 9、責任著者 51；著書 2；受賞数 3；特許数 3；寄与した指針ガイドライン等 2；以下過去 3 年分から関連論文のみ抜粋

- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **BMC Genomics** 12, 275, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. **J. Antimicrob. Chemother.** 66, 2045-2052, 2011.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5, e1263, 2011.
- Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-Infected Japanese Men: Clinical Features and Response to Therapy. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5:e1318, 2011.
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. **J. Antimicrob. Chemother.** In press.
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsue, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cysteine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. **J. Biol. Chem.**, 285, 26889-26899.
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **J. Biol. Chem.** published October 5, 2010 as doi:10.1074/jbc.M110.167304. (in press)
- Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot. Cell** 9, 926-933.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. **Exp. Parasitol.** 126, 337-347. (Review)
- Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Int. J. Antimicrobial Agents** 35, 56-61.
- Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria **Cell. Microbiol.** 12, 331-342.
- Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. (2010) Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. **Parasitol. Int.** 59, 75-81.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 106, 21731-21736.
- Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. **IUBMB Life**, 61, 1019-1028.
- Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009) Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. **Cell. Microbiol.** 2009 11, 1471-1491.

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

課題番号 : H23-新興-一般-015
 予定期間 : H23 年度から H25 年度まで
 研究代表者 : 長谷川秀樹
 所属研究機関 : 国立感染症研究所
 所属部局 : 感染病理部
 職名 : 部長
 年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 26,400,000 円

I. 研究の意義

- (1) 新型インフルエンザにも対応可能なより予防効果の高い経鼻粘膜投与型ワクチンを実用化するための、ワクチンの有効性を高める基盤的研究とヒトでの有効性を評価する方法の確立を目的とする。
- (2) ワクチン製造の元となるシードウイルス株の性質は、ワクチンの製造効率や効果に大きな影響を与える。そのためワクチン候補株の増殖効率、遺伝的安定性、抗原的安定性等を解析することは、株を選択する上で非常に重要である。
- (3) 粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立する。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新型インフルエンザ、季節性インフルエンザ両方に対して効果的な防御方法としての経鼻粘膜投与型ワクチンの臨床応用の為の有効性の確立が期待される。
- (2) ワクチンシードとして優れたウイルス株を検討・選択することにより増殖効率が高く遺伝的・抗原的安定性にも優れたウイルス株を粘膜ワクチンに使用することで、より短期間に効果の高いワクチンを製造することが可能となる。
- (3) リン脂質分解酵素 PAFAH2 の自然免疫応答における機能を、培養細胞およびノックアウトマウスを用いて明らかにする。また PAFAH2 の特異的阻害剤の探索を行う。本研究により、脂質代謝系を介した自然免疫賦活化の分子基盤が明らかとなるとともに、粘膜ワクチンの有効性を高める全く新しいアジュバンドの創製が期待される。

III. 1 年間の研究成果

- ・ 研究代表者 (長谷川秀樹)
- (1) 経鼻インフルエンザワクチンの有効性を調べるため成人ボランティアに季節性インフルエンザ

ウイルスの三倍濃縮スプリットワクチンを経鼻接種し誘導する免疫について、血清中和抗体、鼻腔洗浄液を採取し中和抗体及び HI 抗体価の測定方法の標準化を行った。

- (2) 従来、鼻腔洗浄液での中和抗体、HI 抗体価の測定は困難であったが、濾過法と濃縮方法を工夫する事により血清と対比させて鼻腔洗浄液の中和抗体、HI 抗体を測定する事が可能になった。本方法は今後粘膜ワクチンの評価の為に必須の手法となる事が期待される。
- (3) 本測定法を用いる事により 3 倍濃縮スプリットワクチンの成人への経鼻接種により、ウイルス株特異的な中和抗体を鼻腔洗浄液及び血清で誘導される事が判った。また中和反応を担う抗体のサブタイプは鼻腔洗浄液及び血清の分画により鼻腔洗浄液では IgA 抗体血中では IgG 抗体である事が明らかとなった。更に個体のこれまでのウイルス抗原への感作履歴を反映し、異なるウイルス株に対しても中和活性を示すことが明らかになった。ワクチン経鼻接種後の中和抗体価は鼻腔洗浄液では血清に先行して有意に上昇する事が明らかとなった。

・研究分担者（奥野良信）

- (1) 有効性評価に用いるための試作ワクチンを作製した。
- (2) 非 GLP 下での動物モデルにより経鼻インフルエンザワクチンの安全性を検討した。
- (3) 経鼻インフルエンザワクチンの効果について動物を用いて検討した。

・研究分担者（田代真人）

- (1) 種々の A/H5N1 ワクチン株について発育鶏卵における増殖性を確認したところ、特に問題は認められなかった。また A/H1N1pdm09 について鶏卵を用いてウイルス分離・継代を行ったところ、増殖性が高まった株（HA 価 512 以上）が得られた。

・研究分担者（新井洋由）

- (1) PAFAH2 ノックアウトマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、インフルエンザの HA タンパク質に対する抗体応答を調べたところ、PAFAH2 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて血中の HA タンパク質に対する IgG 抗体価が有意に上昇していることが明らかとなった。

IV. 平成 24～25 年度の課題

- (1) 人数を増やした臨床研究により経鼻インフルエンザワクチン有効性の統計的解析を行う。
- (2) 抗原量を減らした時の有効性についての検討が必要であり実用的なレベルでの有効性を得られる剤型・用量の試作ワクチンを作製する
- (3) 試作経鼻インフルエンザワクチンの GLP 試験、効果の検討
- (4) これまでに得られている鶏卵で継代することにより増殖性が高まったウイルス株について、遺伝子解析、抗原性解析、増殖性規定因子の探索等を行う。また、2011～12 シーズン、2012～2013 シーズンにおいても臨床検体を収集し、ウイルス分離と性状解析を進める。
- (5) 自然免疫腑活化における PAFAH2 の作用の分子メカニズムを解明するために、培養細胞を用いた解析を行う。また PAFAH2 ノックアウトマウスを Balb/c と戻し交配し、インフルエンザウイルス感染時の IgA 抗体応答に対する PAFAH2 の関与を調べる。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新規ワクチンである経鼻インフルエンザワクチンの実用化時に必要になる有効性の指標の為の科学的根拠を示す事ができる。
- (2) 粘膜ワクチンに応用可能な優れたワクチンシードを選択することにより、実用化された際には速やかに効果の高いワクチンを供給することが可能になる。これによって、国が進める新型インフルエンザ対策に大きく貢献できると考えられる。
- (3) 有効性の高いワクチン開発の基盤的研究となる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- 1) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of Neutralizing Antibodies in Adults After Intranasal Vaccination With an Inactivated Influenza Vaccine. *J Med Virol*, in press
- 2) Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26.
- 3) M.Ujike, M.Ejima, A.Anraku, K.Shimabukuro, M.Obuchi, N.Kishida, X.Hong, E.Takashita, S.Fujisaki, K.Yamashita, H.Horikawa, Y.Kato, A.Oguchi, N.Fujita, M.Tashiro, T.Odagiri and Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010. *Emerging infectious diseases*. 17: 470-479, 2011
- 4) Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains *Vaccine*. :29: 4156-4161, 2011
- 5) Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*. 2011 Oct 26;29(46):8330-8337