

E 型肝炎ウイルス粒子の感染性を規定する因子の解析

E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築およびレプリコン包埋 VLP 作成の検討

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 主任研究官 李 天成
国立感染症研究所ウイルス第 2 部 研究員 塩田 智之

研究要旨 E 型肝炎ウイルス (HEV) は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことが研究を困難にしていたが、最近になって PLC/PRF/5 細胞を用いることによりウイルスを増殖させることができることが報告された。本研究では、PLC/PRF/5 細胞で増殖することができる HEV 株を取得し、本株からの感染性の全長 cDNA のクローニングと、感染能のよい細胞の分離を試みた。取得した感染性の全長 HEV cDNA からの各種レポーターを持つレプリコン構築と、本レプリコンを構造蛋白 VLP 中に包埋させる方法について検討した。

A. 研究目的

E 型肝炎は、通常 HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよい HEV の増殖系を確立することが望まれている。

ヒト肝癌由来細胞株である PLC/PRF/5 で

増殖できる HEV 株の取得と、この株からの感染性の cDNA のクローニングを行い、感染性クローンの取得に成功した。より効率のよい HEV の細胞培養での増殖系を確立するため、PLC/PRF/5 の single cell cloning を行ったところ、本細胞株は HEV が増殖できる細胞、増殖できない細胞が混在したヘテロな細胞の集合であることが判明した。

さらに、感染性の HEV cDNA クローンからのレプリコンの構築を試みた。また構築されたレプリコンを HEV VLP に包埋させた、一過性の感染性粒子を取得することができるかどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

HEV 83-2 株を接種し、各細胞株での HEV の感染増殖を Real time PCR 法および ELISA 法を用いて比較した。また、合成した感染性の HEV RNA を各細胞にトランスフェクションし、細胞内でのウイルス増殖について検討した。

感染性の HEV クローン 83-2 の構造蛋白領

域をレポーター遺伝子で置換した cDNA を作成し、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA を作成した。本 RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコン RNA を導入することで、構造蛋白中にレプリコン RNA が包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

クローニングした HEV cDNA から合成した全長 RNA は細胞内で増殖することが確認された。また、この培養上清を naïve な PLC/PRF/5 細胞に添加したところ、2 週間目から培養上清中に HEV 抗原蛋白の分泌が確認されたことから、本クローンは感染性を有

することが確認できた。

PLC/PRF/5 細胞については、single cell cloning により約 100 株を取得した。それぞれの株に 83-2 を接種し、約 2 ヶ月程度の長期培養を行い、培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ、一部の細胞株は 2 ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず、HEV が感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。

感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入しなかった場合にはレプリコンは機能しなかった。また、Luciferase をレポーターとして用いた場合には HCV IRES を持つ場合にも機能しなかったが、サイズが小さい SecNanoLuc (分泌型の Luciferase) をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した。

構造蛋白 (ORF2) を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作成した。その中には構造蛋白の分泌が比較的良好的なクローンがあった。これらのクローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。上記のフラクションを RNase A 処理後に RNA を抽出し、構造、非構造それぞれの領域の RT-PCR を行ったところ、本フラ

クシヨンの RNA は RNase A 抵抗性であり、構造領域のみが PCR で増幅されたことから、レプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された。

D. 考察

HEV の感染性クローンを取得することができたため、今後は本クローンを用いた reverse genetics の実験を行い、特に HEV の感染性を規定する領域の解析、感染細胞内でのウイルス複製機構の解析を行うことを予定している。

また、PLC/PRF/5 細胞のクローニングにより得られた多数の細胞株の HEV 感受性を調べ、感受性株、非感受性株を複数クローニングすることができた。また、これらの株に HEV が感染できない原因は、細胞内での HEV 複製ができないためではなく HEV の細胞への吸着、侵入過程に問題があるためであることが解析結果から示唆された。感染性を規定する宿主側の因子について現在探索を行っている。

本研究で構築した HEV レプリコンでは、ORF2 をコードし発現する subgenomic RNA が作られていない可能性がある。しかしながら IRES を導入した場合は、genomic RNA が dicistronic に機能することによりレポーター遺伝子の翻訳が可能となったのではないかと推察される。Luciferase の場合は IRES を導入しても機能しなかったが、Neomycin との fusion protein である LucNeo が約 2.5kbp とサイズが大きいことが原因であるかもしれない。Luciferase 遺伝子とし

て SecNanoLuc を使用した場合にはレポーター遺伝子が機能しているが、これは約 600bp 程度と小さいためである可能性がある。

今後、上記のレプリコンが包埋された可能性のある画分について、電子顕微鏡での観察と感染性の有無の確認を行う予定である。感染性が確認できれば、本粒子はトランスパッケージ型の 1 回のみ感染性の粒子として、HEV の感染過程の解析に有用であると考えられる。また、特に NanoLuc をレポーターとして持つ HEV レプリコンを用いたアッセイ系は簡便かつ感度がよく、複製機構の解析や増殖阻害物質の探索に有用と考えられる。

E. 結論

HEV の感染性クローンを取得した。また、PLC/PRF/5 細胞をサブクローニングし、約 100 株を得た。これらの中には HEV 感染に対し感受性の株、非感受性の株があり、HEV の細胞内での増殖を規定する宿主因子が存在することが示唆された。

HEV のレプリコンの構築に成功した。また、PLC/PRF/5 細胞に構造遺伝子発現プラスミドとレプリコン RNA を導入することにより、レプリコンを包埋した粒子を取得できる可能性が示唆された。本レプリコンやレプリコンを包埋した粒子は、HEV の感染、増殖過程の解析や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda T., Wu S., Kiyohara T.,

- Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)
2. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86: 11138-11150 (2012)
 3. Suzuki R., Saito K., Shirakura M., Akazawa D., Ishii K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T. and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for the study of the virus assembly and infection. *Virology*, 432: 29-38 (2012)
 4. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
 5. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, 42: 248-253 (2012)
 6. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
 7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, 53, 219-224 (2012)
 8. 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
 9. 石井孝司、脇田隆字 海外における A型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- *化学療法の領域* 28: 984-992 (2012)
 10. 石井孝司 2010年春季の A型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析 *消化器内科* 54: 233-238 (2012).
 11. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N.,

- Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, in press.
12. Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J., Saito A., Funai H., Kimura N., Ageyama N., Yoshizaki S., Suzuki T., Yasutomi Y., Miyamura T., Kannnagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers in Microbiology*, in press
 13. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, in press
 14. Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. *Vaccine*, 29: 4821-4828 (2011)
 15. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 260-261 (2011)
 16. Li T.C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
 17. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
 18. 石井孝司 B型肝炎の現状とワクチン 愛知県小児科医会会報 94: 38-46 (2011)
 19. 石井孝司、清原知子 A型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825 (2011)
 20. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明 2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討

- 1999年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502 (2011)
21. 石井孝司 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565 (2011)
22. 石井孝司、李 天成 E型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
23. Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha.1. Virology Journal, 7: 212 (2010)
24. Masaki T., Suzuki R., Saeed M., Mori K., Matsuda M., Aizaki H., Ishii K., Maki N., Miyamura T., Matsuura M., Wakita T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. Journal of Virology, 84: 5824-5835 (2010)
25. Zhang Y.-Y., Zhang B.-H., Ishii K. and Liang T. J. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. Journal of Virology, 84: 3396-3407 (2010)
26. Hmwe S., Aizaki H., Date T., Murakami K., Ishii K., Miyamura T., Koike K., Wakita T. and Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Research, 85: 520-524 (2010)
27. 石井孝司、李 天成 E型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
28. 清原知子、石井孝司 ファクトシート (案) 1. A型肝炎. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書: 社団法人 畜産技術協会: 255-259, 2010. 3.
29. 清原知子、石井孝司 新時代のワクチン戦略について考える A型肝炎 臨床検査 54: 1383-1391 (2010)
- G. 知的所有権の取得状況
なし

新規ヒトポリオーマウイルス、ボカウイルスの構造タンパク質発現およびその応用
ラット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必須な領域の同定

分担研究者 李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
協力研究者 片岡 紀代 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 最近、新しい病原ウイルスが続々と発見されている。しかしながら、多くのウイルスが培養細胞では増殖できないため、効率よく組換え抗原を作製することはウイルス診断およびワクチン開発に重要である。新規ヒトポリオーマウイルスKIVとWUVは呼吸器疾患の原因の一つだと推測されている。ヒトボカウイルス（HBoV）はパルボウイルス科の一種で、小児下気道感染症から検出され、さまざまな小児呼吸器疾患や腸管感染症などに関連すると推測されている。しかしながら、それらの詳細は未だ十分に解析されていない。また、増殖細胞系は確立されておらず、ウイルスの感染、複製の機序は不明である。抗体や抗原検出法が確立されず、疫学情報も不十分である。今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてウイルス様粒子（VLP）の作製を試みた。さらに得られたVLPを用いて、抗体検出方法を確立し、新規ヒトポリオーマウイルス、ヒトボカウイルスの血清疫学解析を行った。

E型肝炎ウイルス（HEV）はE型肝炎の原因ウイルスである。E型肝炎は発展途上国で常時散発的に発生し、時として飲料水などを介し大流行を引き起こす。先進国においても、E型肝炎はすでに土着していて、人畜共通感染症として注目されている。最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型のHEVは続々と発見されていたが、これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序および抗原性、病原性は未だに明らかではない。これまでわれわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてrat HEVの構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子(Rat HEV-LPs)の作製に成功し、これを用いた抗体検出ELISA法を樹立し、ベトナム野生ラットにおけるRat HEV感染実態を調査した。本研究ではrat HEV構造蛋白のN末端、あるいはC末端、さらに両端を欠失した構造蛋白を発現し、ネイティブなウイルス粒子と類似するウイルス様粒子の作製および粒子形成に必須な領域の同定を試みた。

A. 研究目的

1) ボカウイルス、ポリオーマウイルス

ヒトボカウイルスはパルボウイルス科

(*Parvoviridae*)、ボカウイルス属(*Bocavirus*)

に属する直鎖一本鎖DNAウイルスである。この

属名も最初この属にいるウイルスのホスト名

から由来したものである。ウイルス遺伝子の全長は約5300bpであり。主にNS1, NP1, VP1 VP2 という四つの蛋白をコードする。VP2がメジャーな構造蛋白、VP1マイナーな構造蛋白をコードする。現在、四種類のヒューマンボカウイルスが発見されていた。HBoVは2005年、呼吸器疾患小児患者から分離されたものでHBoV2, 3, 4. それぞれ下痢などの患者糞便から分離された。いずれにして、ヒトボカウイルスは小児下気道感染症や腸管感染症などの病気の発症とは関連すると考えられているが、これらの疾患との明確な関連は未だ確認されていない。

WUV と KIV は ポリオーマウイルス属 (*Polyomavirus*) に分類され、最近、呼吸器疾患の患者から発見された新規ヒトポリオーマウイルスである。既知のポリオーマウイルスと同じくポジティブ二本鎖DNAウイルスである。ウイルス遺伝子の全長は約5300bpであり、主にLager T, small T、VP1、VP2、VP3など5つの蛋白をコードする。VP1はメジャーな構造蛋白、VP2, VP3がマイナーな構造蛋白をコードする。これまで発見されたヒトポリオーマウイルス JC, BK, MCVとは異なって、主に呼吸器疾患感染症などの病気の発症とは関連すると考えられている。しかし、これらの疾患との明確な関連は未だ確認されていない。

これらのボカウイルス、ポリオーマウイルスは増殖細胞系は確立されていない。今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトボカウイルスのウイルス様粒子 (VLP) の作製を試みた。さらに得られたVLPを用いて、抗体検出方法を確立し、各ウイルスの血清疫学解析を行った。

2) ラット E 型肝炎ウイルス

E型肝炎ウイルス (hepatitis E virus, HEV) はエンベロープを持たない一本鎖のポジティブストランドRNAウイルスであり、ヘペウイルス科 (*Hepeviridae*)、ヘペウイルス属 (*Hepevirus*) に分類されている。HEVは急性E型肝炎の原因ウイルスである。E型肝炎は発展途上国で常時散发的に発生し、時として飲料水などを介し大流行

を引き起こす。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。また、HEVはヒトだけではなく、家畜や野生動物などにも感染する。これまでに、ヒトから四つの遺伝子型が分離されたが、最近、ウサギ、イノシシ、ラットから新しい遺伝子型のHEVは続々発見されていた。これらのウイルスが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかではない。その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。これまでわれわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてrat HEVの構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析をした。ラットE型肝炎ウイルス (rat HEV) は直径約35-40nmの小型球形ウイルスである。N末端から100アミノ酸を欠失させた構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約23nmのウイルス様粒子 (VLP) が産生される。アミノ酸配列解析によって、N末端の100個のアミノ酸のほかにC末端から数十個のアミノ酸が欠失していることが明らかになっている。本研究ではrat HEV構造蛋白のN末端、あるいはC末端、さらに両端を欠失した構造蛋白を発現し、ネイティブなウイルス粒子と類似するウイルス様粒子の作製および粒子形成に必要な領域の同定を試みた。

B. 研究方法

1) ボカウイルス、ポリオーマウイルス

三種類のヒトボカウイルス (HBoV, HBoV2, HBoV3) ゲノムの構造蛋白領域 VP2 遺伝子をもつ組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製、同様に、MU と KI の構造蛋白領域 VP1 遺伝子をもつ組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製し、昆虫細胞 Sf9 及び Tn5 で発現させた。ウイルス蛋白の発現、ウェスタンブロット法、粒子形成を透過型電子顕微鏡観察等で解析した。形成

された粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。精製したウイルス様粒子を抗原とした抗体 ELISA を確立し、健常人における感染状況を調査した。

2) ラット E 型肝炎ウイルス

Rat HEV (GU345042) 構造蛋白をコードする ORF2 の配列を合成し、定法どおり、N あるいは C 末端、さらに両端を欠失した rat HEV 構造蛋白を RT-PCR で増幅して組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞 Tn5 および Sf9 で発現した。発現蛋白は SDS-PAGE、ウェスタンブロット法等で、粒子形成の有無およびその形状を電子顕微鏡で確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1) ボカウイルス、ポリオーマウイルス

昆虫細胞 Sf9 及び Tn5 における HBoV VP2 の発現の違いを比較した。Tn5 では感染後二日に予想される分子量 (60.5 kDa) の VP2 蛋白が産生され、3 日にピークとなり、6 日からだんだん減っていく。これに対して、Sf9 細胞ではこれに相当するバンドはほとんど見られなかった。同じ昆虫細胞でも抗原発現量は相当違うことが明らかになった。組換えバキュロウイルス感染された Tn5 細胞では 60.5 kDa の VP2 蛋白が効率よく培養上清に放出された。培養上清を張遠心法で濃縮し、塩化セシウム密度勾配遠心法で精製した。電子顕微鏡観察したところ、比重 1.30 g/cm³ 分画に直径約 22nm の球形中空粒子構造が認められた。精製 VLP をウサギに接種し抗 HBoV-VP2, HBoV2-VP2, HBoV3-VP2 抗血清を作製し、三種類のボカウイルスの抗原性を比較した結果、異なる抗原性を示すものの、交叉反応も示された。これらの VLP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人におけるヒトボカウイルス抗体保有率を解析した。その結果、若年層から高い抗体保有率を示し、健常成人の約 90% がヒトボ

カウイルス抗体陽性であることが明らかとなり、多くの場合、乳幼児期に感染する可能性が考えられた。

昆虫細胞 Sf9 と Tn5 に MU KI VP1 を持つ組換えバキュロウイルスをそれぞれ感染し、構造蛋白の発現の確認および発現量を比較した。昆虫細胞 Tn5 と Sf9 では感染後 3 日に予想通り分子量が約 41 kDa の VP1 蛋白は産生された。ただし、JC, BK, MCV とは異なって、MU VP1 と KI VP1 の発現量はともに極めて少なかった。培養上清を超遠心によって濃縮したあと塩化セシウム密度勾配遠心で精製した結果、Sf9 細胞培養上清から 41 と 39 kDa の二種類の蛋白が得られた。41 kDa の蛋白は比重 1.30 g/cm³ 分画に分布し、電子顕微鏡で直径約 50nm の球形粒子が観察された。39 kDa の蛋白は比重 1.29 g/cm³ 分画に分布し、電子顕微鏡観察したところ、直径約 22nm から 50nm まで数種類の直径の異なる粒子が存在する。KI-VLP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人における KI に対する抗体保有率を調査した。その結果、若年層から高い抗体保有率を示し、平均の健常成人の 52.8% が KI に対する抗体を有することが明らかとなり、約 20% のヒトは、乳幼児期に感染する可能性が考えられた。また、構造蛋白発現量を向上させるため、KI VP1 の N 末端から 9 個アミノ酸を欠損した組換えバキュロウイルスを作製し、同じ方法で構造蛋白を発現してみた。その結果、抗原発現量と粒子産生量は共に増加した。

2) ラット E 型肝炎ウイルス

N 末端から 12 個のアミノ酸を欠失した rat HEV ORF2 を Tn5 細胞で発現させることによって感染細胞内から直径約 23nm の中空粒子と 35nm の非中空粒子を得た。35nm の粒子は形態上ネイティブなウイルスと類似し、粒子内には rat HEV RNA が取り込まれていた。また、N 末端から 100 個のアミノ酸を欠失させた上に、C 末端から 593 番目まで 52 個のアミノ酸を欠損させても粒子の形成には影響を与えなかったが、これ以上欠失させると粒子は形成されなく

なった。したがって、粒子形成にはC末端は593番目のアミノ酸までが必須であった。

D. 考察

組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトポリオーマウイルス WU と KI の構造蛋白を発現し中空粒子の作製が成功した。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立し、新規ヒトポリオーマウイルスの疫学調査に有効な検査方法を提供した。この方法を利用して、呼吸器疾患患者における IgM 抗体の推移などの血清疫学解析を詳細に行い、ヒトポリオーマウイルス感染に起因する疾患を明らかにすることが期待される。今後、KI-VLP, WU-VLP をウサギに免疫し抗体を作製し、KI、WU、JC、BK、MCV などのヒトポリオーマウイルスの抗原性の比較によって、ウイルス抗原性を解明する予定である。

D. 結論

組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトボカウイルス、ヒトポリオーマウイルス (KIV, WUV) の構造タンパク質を発現し VLP を取得した。VLP を用いて抗体検出方法を確立し、血清疫学解析を行った。

ネイティブな HEV と類似する直径を持つラット HEV 粒子の作製に成功した。VLP 形成には ORF2 C 末端 593 番目アミノ酸まで必須であることが明らかになった。これらの結果はラット HEV 粒子の三次構造解析に有用である。また、大きな粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、パッケージングに関する情報が得られることが期待される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzuki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.

2). Tian-Cheng Li, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Shumpei P. Yasuda, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full-Genome Characterization of a Rat Hepatitis E Virus Strain Isolated in Vietnam. *EID.* 2013 Jan;19(1):115-8.

3). Pitchanee Jariyapong, Li Xing, Nienke E. van Houten, Tian-Cheng Li, Wattana Weerachatanukul, Benjamin Hsieh, Carlos G. Moscoso, Chun-Chieh Chen, Masahiro Niikura, R. Holland Cheng, Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine.* 2013, 31:417-424

4). Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Adachi Isao, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID* 2012, 18 (12) 2032-2034.

5). Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiology and Infection.* *Epidemiol Infect.* 2012 Nov 1:1-9.

6). Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 2012 Nov;56 (11):760-770.

7). Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning

of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)

8). Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis*. 2012;10(2):80-5.

9) Tian-cheng Li, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *Journal of General Virology* (2011), 92, 2830-2837.

10) Xing L, Wang JC, Tian-Cheng Li, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng

RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol*. 2011 Jan;85(2):1117-24.

11) Tian-Cheng Li, Xing L, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway *J Biol Chem*. 2010 Oct 22;285(43):33175-83.

12) Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 2011. March 5(3):202.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B 型肝炎ウイルス S 抗原の分泌機構の研究

子宮頸癌の治療薬を目指した特殊ペプチドによる E6AP 阻害剤の開発

分担研究者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨 HBV の各遺伝子型の HBs 抗原を効率良く産生する方法を開発するために、HBs 抗原の分泌効率を規定する遺伝子領域を解析した。PreS2 の翻訳開始点における Kozak 配列周辺に塩基配列の違いが認められた。この領域の S 抗原の発現および分泌効率への影響を明らかにするために 13 種類の変異体プラスミドを作製した。S 抗原の分泌量を解析したところ、PreS2 の +6 位の変異により S 抗原の分泌効率が 4.2 倍に上昇した。+7~+11 位の変異でも S 抗原の分泌が約 4.4 倍に上昇する変異を同定した。

また、子宮頸癌の特異的治療薬の分子基盤の構築を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発および E6 のユビキチン化機構の解析を行った。フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラリー合成とその網羅的探索技術 (RaPID system) により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを 8 種類得た。その中から、環状 N-メチルペプチド CM₁₁-1 および CM₁₁-1S が E6AP のユビキチンリガーゼ活性を強く抑制することを明らかにした。また、E6 のユビキチン化機構の解析から、in vitro において E6AP が HPV11 および HPV16 の E6 のユビキチン化させることを示した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は遺伝子解析により 8 種類の遺伝子型に分類できるようになった。我が国の HBV 感染は、従来 genotype C が中心であったが、近年、ヨーロッパ型の genotype A が性交感染症として日本国内、特に大都市部に侵入、拡大していることが疫学的に示され、本邦の厚生労働行政上、重大な課題となってきた。HBV の S 抗原は HBV ワクチンおよび B 型肝炎の診断系に用いられているが、HBV の S 抗原分泌機構は必ずしも十分に解明されていない。また、現行の各遺伝子型の HBs 抗原の効率のよい産生系が確立されれば、簡便な ELISA 系を構築し、各遺伝子型の臨床病態、流行状態を的確

に判断できるようになる。また、全ての遺伝子型に有効なワクチンが今後必要になると想定されるため、S 抗原産生を規定する遺伝子領域の解明を目的として、HBs 抗原分泌機構の解明を試みた。

一方、90%以上の子宮頸癌にハイリスク型のヒトパピローマウイルス (HPV) 感染と E6, E7 蛋白質の組込みがあり、癌抑制遺伝子 p53, pRb のユビキチン-プロテアソーム系による分解誘導が発癌において重要であることが知られている。HPV ワクチンが近年、実用化され、若年女子の HPV 感染を予防し、将来的に子宮頸癌の発症が抑制されることが期待されているが、すでに HPV に感染している患者に対する特異

的な抗パピローマウイルス薬は未だ存在しない。子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6/E6APによる癌抑制遺伝子 p53 の不活化を抑制する小分子の開発、および、HPV E6 のユビキチン化機構の解析を行った。

B. 研究方法

(1)HBV 発現プラスミドの作製

HBV-Aeus, HBV-Cat 株 (国立国際医療センター、溝上センター長から供与) を、pSV プラスミドにサブクローニングしたものを、Huh7 細胞にトランスフェクトし、細胞内および培養上清中への HBs 抗原の発現、および分泌を ELISA 法で解析した。

(2)HBV-Aeus 株の PreS2-S 領域開始部分の配列は (CTGTGACGAACATGG) であるが、HBV-Cat 株の配列 (CTGCACCGAACATGG) へ以下の変異を導入し変異体プラスミドを作製した。

MT1 (CTGCAACGAACATGG)

MT2 (CTGTGCCGAACATGG)

MT3 (CTGTGACGAACATGG)。(下線が変異部位)

HBV-Cat 株の PreS1-PreS2 の配列 (ATCCTCAGGCCATGCAGTGAAT) へ以下の変異を導入した変異体プラスミドを作製した。

MT4 (ATCCTCAGGCCATGCAATGAAC)

MT5 (ATCCTCAGGCCATGCCATGGAAC)

MT6 (ATCCTCAGGCCAGGCAATGGAAC)

MT7 (ATCCTCAGGCCAGGCCATGAACT)

MT8 (ATCCTATCCTCATGCAATGGAAC)

MT9 (ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)

MT10 (ATCCTCAGGCCATGCAACGGAAC)

MT11 (ATCCTCAGGCCATGCAATGGAAC)

MT12 (ATCCTCAGGCCATGCAATGGCAC)

MT13 (ATCCTCAGGCCATGCAGTGAAC)

これらの変異体プラスミドは QuickChange site-directed mutagenesis kit にて作製した。

(3)Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBs 抗原の発現を ELISA 法で解析し、どの領域が HBs 抗原分泌に重要であるかを解析した。

(4)フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、天然物様特殊ペプチドライブラ

リーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で E6AP の HECT ドメインに結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した (東京大学理学部、菅教授との共同研究)。

(5)得られた特殊ペプチドの E6AP 阻害活性を Prx1 および p53 を基質にして in vitro ユビキチン化アッセイで検討した。

(6)HPV E6 のユビキチン化を解析した。ユビキチン経路の構成蛋白質を得るために、His₆-E1, MEF-E6AP を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Hi5 細胞に感染させ、各組換え蛋白質を発現した。その後、細胞から Ni-NTA または FLAG-beads で各蛋白質をアフィニティ精製した。His₆-UbcH7 を大腸菌 BL21 (DE3) で、GST-11E6, GST-16E6 を大腸菌 DH5 α で発現し、Ni-NTA または精製した。これらの組換え蛋白質を用い、HPV E6 蛋白質の in vitro ユビキチン化を解析した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。

C. 研究結果

(1)HBV 変異プラスミドの作製

HBV-Aeus 株 pSV-AAA, HBV-Cat 株 pSV-CCC および PreS1, PreS2, S 領域を上記のように組換えた変異体プラスミド pSV CCC-MT1 から pSV CCC-MT13 まで作製した。

(2)HBsAg の上清中への分泌量は pSV-AAA と比較して pSV CCC-MT9, pSV CCC-MT13 が最も高値となり、day 4 で約 80ng/mL と pSV-AAA の 2 倍、genotype C の pSV-CCC の約 4 倍まで分泌効率が向上していた。

(3)Ae PreS2 では ATGCAGTGAAT (MQWN), CAT PreS2 では ATGCAATGGAAC (MQWN), CAT PreS2-MT9 では ATGCAACTCCAC (MQLH), CAT PreS2-MT13 では ATGCAGTGAAC (MQWN) という配列になっており、同義置換でも分泌効率に差が

あることから、開始コドン周囲の塩基配列が分泌効率に關与する可能性が示された。

(4) RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する 11-13 アミノ酸の環状 N-メチルペプチドを計 8 種類得た。

(5) 環状 N-メチルペプチド CM₁₁-1 は HECT domain への Ub conjugation を抑制したが、同じ配列でリニア状ペプチドの LM₁₁-1 や N-メチル化されていない CP₁₁-1 は抑制作用に乏しかった。特殊ペプチドと E6AP HECT ドメインの結合解析の結果、Kd は CM₁₁-1 で 0.602 nM, LM₁₁-1 で 180nM, CP₁₁-1 で >1000 nM となり、環状で Nメチル化された CM₁₁-1 が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状 LM₁₁-1 や Nメチル化されていない CP₁₁-1 では結合力が弱かった。

CM₁₁-1 は E6AP の基質 Prx1 のユビキチン化を効率良く阻害した。また、HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化も抑制することが示された。

また、CM₁₁-1S1 も E6AP 依存性のポリユビキチン化を阻害した。

(6) 精製した MEF-E6AP は GST-11E6, GST-16E6 をポリユビキチン化したが、陰性コントロールの GST はポリユビキチン化されなかったことから、E6AP が 11E6, 16E6 のポリユビキチン化を促進するユビキチンリガーゼとして機能することが示唆された。

D. 考察

HBV genotype A の HBV-Aeus 株は genotype C の HBV-Cat 株に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高い。分泌効率が異なるクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較したところ、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示された。そこで、更に詳細に解析するために 13 種類の変異プラスミドを作製し、HBs 抗原分泌効率を比較検討した。

その結果、preS2 の遺伝子配列の違いで S 抗原の上清への分泌量が著しく変化することが判った。MT9(ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)では preS2 の開始コドンより下流の+7-+10 位に変異が導入されており、この変異により pSV-CCC と比較し

て約 4.4 倍まで分泌量が向上した。また、MT13(ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAC)では+6 位へのひとつの塩基置換のみで分泌効率が約 4.2 倍に向上した。この二種類の変異を組み合わせると更に向上するかどうか更に検討すれば、高効率の分泌系を樹立できる可能性が示された。

また、RaPID system により、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチドを得た。ペプチドと E6AP HECT ドメインの結合解析の結果、環状で Nメチル化された CM₁₁-1 が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状 LM₁₁-1 や Nメチル化されていない CP₁₁-1 では結合力が弱かった。CM₁₁-1 は E6AP の基質 Prx1 のユビキチン化を効率良く阻害した。さらに、HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化も抑制することが示された。これらの結果から RaPID system で環状 N-メチルペプチドを作製する技術は E3 リガーゼ阻害剤を作製するのに強力な技術となることが示された。

HPV 11E6, 16E6 のユビキチン化反応が E6AP により促進されることが示された。近年、16E6 の脱ユビキチン化酵素として USP15 が同定されたが、今回樹立した in vitro ユビキチン化系と精製 USP15 を用いることで、USP15 の活性測定、阻害剤探索に応用可能であると考えられた。

E. 結論

HBV の preS1-preS2-S 領域の遺伝子配列を比較したところ、Middle S の翻訳開始点における Kozak 配列に差違が認められた。この preS2 の遺伝子配列の S 抗原発現および分泌効率への影響を明らかにするために 13 種類の変異体プラスミドを作製した。変異体プラスミドにより S 抗原の分泌量を解析したところ、PreS2 の +6 の塩基の 1 つの変異により S 抗原の分泌効率が 4.2 倍に上昇した。また、+7~+10 の変異でも S 抗原の分泌が約 4.4 倍に上昇する変異が見つかった。

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6/E6AP による癌抑制遺伝子 p53 の不活性化を抑制する小分子の開発を行った。RaPID

systemにより、E6AP HECT domain と結合する環状 N-メチルペプチド 8 種類を得た。抗 E6AP 環状 N-メチルペプチド CM₁₁-1, CM₁₁-1S1 が HPV16E6/E6AP による p53 のユビキチン化を抑制することを示した。また、E3 ユビキチンリガーゼ E6AP による HPV 11E6, 16E6 の in vitro ユビキチン化アッセイ系を樹立した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N. 14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, in press.
- 2) Matsui, C., Shoji, I., Kaneda, S., Sianipar, IR., Deng, L., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Virology*, 2012, 86 (23): 12903-11.
- 3) Shoji, I. Roles of the two distinct proteasome pathways in hepatitis C virus infection. *World Journal of Virology*, 2012, 1, 44-50.
- 4) El-Shamy, A., Shoji, I., El-Akel, W., Bilasy SE, Deng, L., El-Raziky, M., Jiang, D., Esmat, G., and Hotta, H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clinical Microbiology*, 2012, 50 (12): 3886-92.
- 5) Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Sada, K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinases Fyn in B cells. *PLoS One*, 2012, 7 (10):e46634.
- 6) Kim, S-R., El-Shamy, A., Imoto, S., Kim, KI., Ide, Y-H., Deng, L., Shoji, I., Tanaka, Y., Hasegawa, Y., Ota, Mitsuhiro., and Hotta, H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *Journal of Gastroenterology*, 2012, 47 (10): 1143-51.
- 7) El-Shamy, A., Shoji, I., Kim S-R., Ide, Y-H., Imoto, S., Deng, L., Yoon, S., Fujisawa, T., Tani, S., Yano, Y., Seo, Y., Azuma, T., and Hotta, H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-Interferon /Ribavirin therapy. *PLoS One*, 2012, 7, e30513, 1-10.
- 8) Shoji I., Deng L., and Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Frontiers in Microbiology*, 2012; 2: A278, 1-5.
- 9) Kamada K., Shoji I., Deng L, Wakita T., and Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. *Microbes and Infection*, 2012; 14: 69-78.
- 10) El-Shamy, A., Ide, Y-H., Kim, SR., Sasase, N., Imoto, S., Deng, L., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin therapy. *Intervirology*, 2012, 55, 1-11.

- 11) Sasayama M., Shoji I., Ide Y-H., Deng L., and Hotta H. A point mutation at Asn-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *Journal of Medical Virology*, 2012; 84: 229-234.
- 12) El-Shamy, A., Shoji, I., Saito, T., Watanabe, H., Ide, Y-H., Deng, L., Kawata, S., and Hotta, H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiology and Immunology*, 2011, 410, 38-47.
- 13) Yamagishi, Y., Shoji, I., Miyagawa, S., Kawakami, T., Katoh, T., Goto, Y., and Suga, H. Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. *Chemistry & Biology*, 2011, 18, 1562-1570.
- 14) El-Shamy A., Shoji I., Saito T., Watanabe H., Ide Y-H., Deng L., Kawata S., and Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to Pegylated-Interferon/Ribavirin combination therapy. *Microbiology and Immunology*, 2011; 55: 418-26.
- 15) Deng L., Shoji I., Oawa W., Kaneda S., Soga T., Jiang D. P., Ide Y-H., and Hotta H., Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *Journal of Virology*, 2011; 85: 8556-68.
- 16) Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Lai, MMC, Wakita, T., and Suzuki, T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2011, 410, 38-47.
- 17) Hayashida K, Shoji, I., Deng, L., Ide, Y-H., and Hotta, H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54, 684-90.
- 18) Nasu, J., Murakami, K., Miyagawa, S., Yamashita, R., Ichimura, T., Wakita, T., Hotta, H., Miyamura, T., Suzuki, T., Satoh, T., and Shoji, I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 111, 676-85.
- 19) Kim SR., Imoto S., Kudo M., Nakajima T., Ando K., Mita K., Fukuda K., Hong HS., Lee YH., Nakashima K., Shoji I., Nagano-Fujii M., Hotta H., and Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated Interferon α treatment for chronic hepatitis C. *Internal Medicine*, 2010, 49, 1119-1122.
- 20) Moriishi K., Shoji, I., Mori, Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Kataoka, C., and Matsuura, Y. Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010, 52 411-420.
- 21) Sanjo M., Saito, T., Ishii, R., Nishise, Y., Haga, H., Okumoto, K., Ito, J., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H., Fukuda, K., Imai, Y., El-Shamy, A., Deng, L., Shoji, I., Hotta, H., and Kawata, S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for

chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 82, 1364-70, 2010.

- 22) Kim, SR., Imoto, S., Kudo, M., Mita, K., Taniguchi, M., Kim, KI., Sasase, N., Shoji, I., Nagano, M., El-Shamy, A., Hotta, H., Nagai, T., Nagata, Y., and Hayashi, Y. Double filtration plasmapheresis plus interferon treatment for non-sustained virological response to previous combination therapy: Early viral dynamics. *Intervirology*, 53, 44-48, 2010.
- 23) Sasase, N., Kim, SR., Kudo, M., Kim, KI., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hayashi, Y., Shoji, I., El-Shamy, A., and Hotta, H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in

PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53, 49-54, 2010.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名 出版地	出版年	ページ
李天成	我が国におけるE型肝炎の疫学と最近の動向	小柳義夫	日本臨床	日本臨床社、東京	2011	573-578
田中智之	消化器症候群 ノロウイルス	田代真人 牛島廣治	ウイルス感染症の検査・診断スタンダード	羊土社、東京	2011	129-133
相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字	C型肝炎ウイルスの分子生物学 HCVの生活環における脂質の役割		新時代のウイルス性肝炎学—基礎・臨床研究の進歩	日本臨床、東京	2011	129-133
田中智之	ノロウイルス食中毒	日本食品微生物学会	食品微生物学辞典	中央法規出版株式会社、東京	2010	188-89
後藤耕司、鈴木哲朗	感染症のゲノム解析と核酸検査 (Nucleic Acid-Based Testing) B型肝炎ウイルス・C型肝炎ウイルス感染症.		遺伝子診療学 (第2版)	日本臨床、東京	2010	511-517
鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博	C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成	日本ウイルス学会	ウイルス	日本ウイルス学会、東京	2010	87-92
Kasamatsu H, Nakanishi A, Liddington RC, Sawa H	Structural and functional studies of polyomavirus late gene products	Yoshida K	Molecular Biology of Tumor Virus Gene Products	Research Signpost, India	2010	109-168
勝二 郁夫	ウイルスによる発癌	東 匡伸、 小熊恵二、 堀田博	シンプル微生物学 [改訂第5版]	南江堂、東京	2011	247-253
勝二 郁夫	ウイルスの臓器親和性と侵入機構	本田武司	はじめの一步のイラスト感染症・微生物学	羊土社、東京	2011	88-89
勝二 郁夫	主なウイルス性疾患、インフルエンザ、ウイルス性肝炎、HIV.	本田武司	はじめの一步のイラスト感染症・微生物学	羊土社、東京	2011	163-167

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. T.	Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells.	Gastroenterology	144	56-58	2013
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H.	Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle.	Microbes Infect	15	45-55	2013
Suzuki T.	Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles	Front Microbiol	3	38	2012
Ando T., Imamura H., Suzuki R., Aizaki H., Watanabe T., Wakita T, and Suzuki T.	Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA.	PLoS Pathog	8	e1002561	2012
Suzuki R., Saito K., Kato T., Shirakura M., Akazawa D., Ishii K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T., and Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology	432	29-38	2012
Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y.	A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus.	Biol Pharm Bull	35	1320-1327	2012
Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T.,	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	J Virol	86	284-292	2012