

列解析プログラムで亜株、遺伝子型の頻度を調べ比較した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) カプシド遺伝子シエル領域の配列情報(434762 配列:約 1.2×10^8 塩基 / 24 検体)を取得した。(ii) 混合感染は、24 検体中 9 検体で検出された。(iii) 次世代シーケンサーの解析により、一個体内において、異なる遺伝子型および亜株の準種(1.7-47.7%)、および微小準種(0.2-0.4%)が検出された。通常のサンガー法によるシーケンスでは、これらの準種の検出はできなかった。(iv) 混合感染の組み合わせは、GII.3, GII.6, GII.9, GII.13、亜株では、GII.4_2004/05, 2006b, 2008a, 2009a などの混合感染が同定された(図 1)。(v) 混合感染はヒトーヒト感染事例で 2 検体、集団食中毒事例で 5 検体、散発食中毒事例で 2 検体、認められた。混合感染は、感染経路に依存せず、頻繁に観察される事象であることがわかった。(iv) 2007/08 シーズンの検体では、混合感染例は認められなかった。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いることで、混合感染を検出できた。様々な感染経路で、混合感染が頻繁に生じている可能性が示唆された。本研究成果は、組換えウイルスの発生機構、病態、持続感染などを解析して行く上で基盤となる知見と考えられる。更に、ヒト集団下におけるノロウイルス感染伝播の理解の基盤情報となることが期待される。

E. 結論

今年度は、次世代シーケンサーを用いて、個体内における遺伝子型や亜株の種類、

分布、動態を明らかにした。次年度は、ノロウイルスのヒト社会への流行の拡大の機序を解明するために、小規模集団発生事例を対象にして、遺伝子型や亜株の種類を明らかにしたい。分布に差が認められるようであれば、VLP を抗原とした ELISA 測定系を用いて、糞便中の抗体価を調べ、その意義について考察したい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中智之先生(堺市衛生研究所)、野田衛先生(国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨先生(北海道立衛生研究所)、三上稔之先生(青森県環境保健センター)、斉藤博之先生(秋田県健康環境センター)、蛇口哲夫先生、高橋朱実先生、高橋知子先生、佐藤直人先生(岩手県環境保健研究センター)、植木洋先生(宮城県保健環境センター)、田村務先生(新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則先生、名古屋真弓先生(富山県衛生研究所)、篠原美千代先生(埼玉県衛生研究所)、篠崎邦子先生(千葉県衛生研究所)、吉田徹也先生(長野県環境保全研究所)、小林慎一先生(愛知県衛生研究所)、東方美保先生、小和田和誠先生(福井県衛生環境研究センター)、内野清子先生、三好龍也先生(堺市衛生研究所)、入谷展弘先生(大阪市立環境科学研究所)、福田伸治先生、重本直樹先生(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、伊藤文明先生、阿部勝彦先生、山本美知子先生(広島市衛生研究所生物科学部)、飯塚節子先生(島根県保健環境科学研究所)、近藤玲子先生、山下育孝先生(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸先生、増本久人先生(佐賀県衛生薬業センター)、原田誠也先生(熊本県保健環境科学研究所)、松岡由美子先生(熊本市環境総合研究所)、岩切章先生(宮崎県衛生環境研究所)

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. **本村和嗣**、大石和徳; ノロウイルス感染症. からだの科学. 東京. 日本評論社 ;2013; 276:p.47-51

2. **本村和嗣**; ノロウイルス感染症. 化学療法の領域. 東京. 医薬ジャーナル ;2013;29: p.1038-1045.

2. 学会発表

1. **Motomura K.**, Ode H., Yokoyama M., Nakamura H., Sato A., Katayama K., Noda M., Takeda N., Tanaka T., Sato H., and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. Fifth International calicivirus Conference. ;2013; Beijing, CHINA.

2. Sato H., Yokoyama M., **Motomura K.**, Nakamura H., Oka T., Katayama K., Noda M., Takeda N., Tanaka T., and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Constrain of pandemic Norovirus GII.4. Fifth International calicivirus Conference. ;2013; Beijing, CHINA.

3. Endo Y., **Motomura K.**, Hayashi Y. K., Noguchi S., Nonaka I., Mori-Yoshimura M., Oya Y., Nishino I. Exome analysis on tubular aggregate myopathy. American Society of Human Genetics 2013. ;2013; Boston, U.S.A.

4. **Motomura K.**, Dynamic Aspect of Norovirus GII.4 Genome in Nature. Seminar. Faculty of Medicine, Chiang Mai University. ;2013; Chiang Mai, Thailand.

5. **本村和嗣**. 次世代型シーケンサーを用いた遺伝子解析の実例紹介. 国立精神・神経医療研究センター. 教育セミナー. ;2013; 東京

6. 遠藤ゆかり、**本村和嗣**、林由起子、小牧宏文、埜中征哉、西野一三. Whole Exome Sequencing Analysis on hereditary muscle disease with tubular aggregates. 第55回日本小児神経学会学術集会. ;2013; 大分

7. **本村和嗣**、大出裕高、横山勝、中村浩美、佐藤彩、岡智一郎、片山和彦、野田衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan、ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態. 第61回日本ウイルス学会学術集会. ;2013; 神戸.

8. 佐藤裕徳、横山勝、**本村和嗣**、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan. パンデミックノロウイルスの変化の制約. 第61回日本ウイルス学会学術集会. ;2013; 神戸.

9. **本村和嗣**、横山勝、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、佐藤裕徳、田中智之、武田直和、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス遺伝子変異の変遷. 第25回ウイルス性下痢症研究会. ;2013; 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

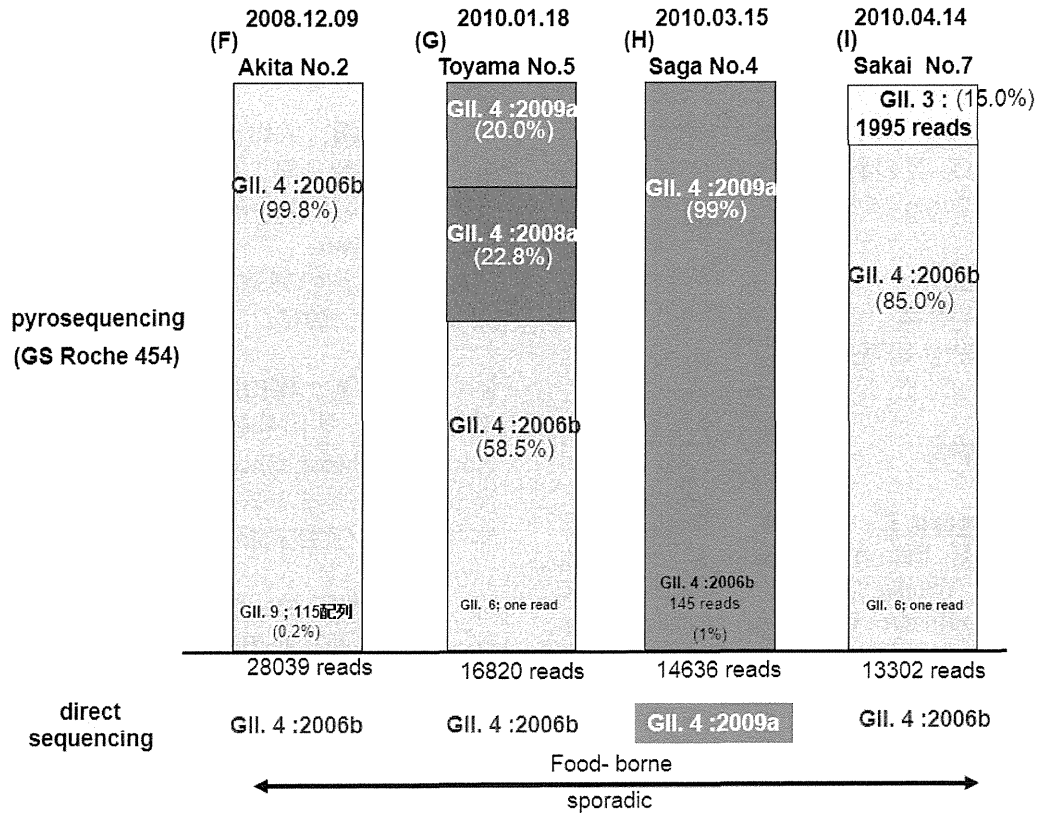
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

☒ 1

Classification of genotypes and subtypes in samples



ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立

分担研究者 佐藤 俊朗 慶應義塾大学医学部 消化器内科 特任准教授

研究要旨 ノロウイルスは培養細胞感染系が未だ確立されておらず、感染系を基にした感染メカニズムの解明が待たれる。我々はノロウイルスの感染宿主細胞と考えられるヒト腸管上皮細胞の培養技術を世界に先駆けて開発してきた。本研究課題ではノロウイルス培養細胞感染系の確立を目指す。

培養ヒト腸管上皮細胞は培養細胞株と異なり、細胞ストレス感受性が極めて高いため、ウイルス感染等の処置に対する抵抗性を示した。我々は、EGFP 発現レンチウイルスベクターを用い、ヒト腸管上皮細胞に対するウイルス感染条件の最適化に成功した。また、ノロウイルス研究者の培養上皮細胞感染系開発のための基盤的な整備を行った。本年度は、ヒト腸管上皮細胞の供与に関する倫理申請書類の作成、腸管上皮細胞技術の指導、ウイルス感染プロトコールの供与などを行った。

A. 研究目的

本研究課題である、培養細胞感染系が確立されていない病原体の1つであるノロウイルスはしばしば流行を認めるため、社会的問題となっている。ノロウイルスは主に腸管粘膜に感染すると考えられているが、腸管上皮細胞の培養が困難であったため、感染系は現在確立されていない。我々は、2009年に世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養系の確立を報告し、2011年にはヒト腸管上皮幹細胞の培養系を確立した。

本研究では新しく開発されたヒト腸管上皮幹細胞培養を用い、ノロウイルスの培養細胞感染系の確立を目的としている。感染系の確立により、ノロウイルスの感染メカニズムや病態の理解を深め、新しい治療に結びつくことが期待できる。

B. 研究方法

ヒト小腸および大腸粘膜より腸管上皮陰窩を採取し、マトリジェルに包埋し、ヒト腸管上皮幹細胞培養に最適化した培地(Advanced DMEM/F12, EGF, Noggin, R-spondin, A83-01, Wnt-3A)により培養を行う。培養により腸管上皮細胞は3次元組織様構造体オルガノイドを形成し、永続的な培養を行う。

ヒト腸管上皮幹細胞のウイルス感染システムの確立のため、GFP 発現カセットを有する自己不活型第三世代レンチウイルスベクターより高力価ウイルス上清を作成した。当研究室では病原性ウイルスの取り扱いが困難であるため、ノロウイルス研究者への培養腸管上皮細胞の供与、培養指導を行い、感染プロトコールの構築に関して宿主側の培養条件のアドバイスを行っていく。

C. 研究結果

ヒト小腸・大腸上皮幹細胞はオルガノイドを形成し、長期培養が可能であった。樹立されたヒト培養オルガノイドを用い、

培養に用いるマトリジェルはウイルス粒子の核酸を阻害するため、マトリジェルを酵素処理により除去する必要があった。また、トリプシン処理により、上皮細胞を単細胞化することにより、ウイルス感染効率の改善が確認された。培養ヒト腸管上皮細胞はこのような処置に対して細胞死が誘導されるため、培養培地を最適化を行い、感染細胞の長期培養に成功した。

同様な方法により、GFP 発現アデノウイルス・レトロウイルスの感染も確認でき、ウイルス感染プロトコールとして利用できることが期待できる。

今後、ノロウイルス感染研究を確立するため、患者由来ヒト上皮オルガノイドの他施設での使用に関する倫理研究計画を準備している。また、培養技術指導、最適化されたウイルス感染プロトコール提供により、本研究事業の分担研究者と効率的なノロウイルスの感染系確立に向けた基盤整備を行っている。

D. 考察

ヒト腸管上皮オルガノイドは細胞株と異なり、一般的なウイルス感染処置に対して培養技術の最適化が必要であった。今回最適化された方法は実験用ウイルスに対するものであるが、異なる3種類のウイルスにおいて効率のよい感染効率が確認できたため、ノロウイルスへの感染系確立が期待できる。

E. 結論

ヒト腸管上皮オルガノイドのウイルス感染系の基盤技術が開発された。

F. 研究発表

論文発表

(1) Huch M[#], Bonfanti P[#], Boj SF[#], Sato T[#], Loomans CJ, van de Wetering M,

Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. **EMBO J.** 32:2708-21,2013. [#]Equal authorship

(2) Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. **Cell Host Microbe.** 12;13:711-22,2013.

(3) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. **Cancer Biol Ther.**22;15, 2013.[Epub ahead of print]

(4) Miyoshi J, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Ichikawa R, Yajima T, Okamoto S, Naganuma M, Sato T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Mucosal healing with oral tacrolimus is associated with favorable medium- and long-term prognosis in steroid-refractory/dependent ulcerative colitis patients. **J Crohns Colitis.** doi:pii: S1873-9946(13)00172-4,2013.

(5) Miyake M, Toguchi H, Nishibayashi T, Higaki K, Sugita A, Koganei K, Kamada N, Kitazume MT, Hisamatsu T, Sato T, Okamoto S, Kanai T, Hibi T. Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in

- humans using human intestinal tissues. **J Pharm Sci.** 102:2564-71,2013.
- (6) Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, **Sato T**, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. **Immunology.** 139:19-29,2013.
- (7) Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Saito H, **Sato T**, Yagita H, Hibi T. IL-22-producing ROR γ t-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. **PLoS One.** 8:e62853,2013
- (8) Handa T, Kanai T, **Sato T**, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Mizuno S, Matsumoto A, Hisamatsu T, Hibi T. Dendritic cells administered intrarectally penetrate the intestinal barrier to break intestinal tolerance via Th2-mediated colitis in mice. **Immunol Lett.** 150:123-9,2013
- (9) * Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VSW, van de Wetering M, **Sato T**, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries R, Grompe M, Clevers H. *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. **Nature** 494:247-50,2013

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

動物ロタウイルスCの全ゲノム解析

分担研究者 鈴木 亨 動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域 主任研究員

研究要旨 培養細胞における実験感染系が確立されていないため、性状が未解明なロタウイルスCについて、遺伝学的な手法を用いて、特に動物由来ロタウイルスCの遺伝子性状を明らかにした。

A. 研究目的

ロタウイルスは幼若動物や乳幼児における重症性下痢の主要原因の一つであり、新興感染症病原体である。また、ロタウイルスは人獣共通感染症病原体でもあり、現在までに8つの異なる種(A-H)が存在することが知られているが、中でもロタウイルスA-Cはヒト以外にウシ、ブタなどの動物からもウイルスが検出されることから、公衆衛生上高い関心を集めている。

ロタウイルスCは1980年代に重症性下痢を示した子ブタから検出され、その後も世界各国のヒトやウシ、イヌなどからウイルスが見つまっている。また、本ウイルスが原因となって引き起こす下痢症例はヒトや動物で後を絶たないが、本ウイルスは培養細胞感染系で増殖することが困難であるため、性状解析や診断予防法の開発等まだ多くの課題が残されている。

今年度はロタウイルスCの診断法開発に向けたVLP作出のための準備段階として、本ウイルスの遺伝学的性状を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

2002年から2010年にかけて、国内の複数農場から集められたブタロタウイルスC 22株について、独自に設計したプライマーを用いてRT-PCR法でもって11本すべての分節RNAを増幅し、TAクローニング法でもって塩基配列を決定した。

今回解読したブタロタウイルスC 22株の各遺

伝子の塩基配列について、これらウイルスの遺伝学的性状を理解するため、既報のヒトやウシロタウイルスCにおけるそれら塩基配列と比較・解析を行うと共に、系統樹解析を実施した。

C. 研究結果

ブタロタウイルスC 22株の各遺伝子の塩基配列について、ヒトやウシロタウイルスCにおけるそれら塩基配列と比較・解析した結果、また、ヒトおよびウシロタウイルスC株間ではそれぞれ配列に極めて高い相同性が認められたが、ブタロタウイルスC株間では配列に大きな相違が認められた。すなわち、ブタロタウイルスCは、遺伝的多様性に富んでいることが明らかとなった。

また、今回解読したブタロタウイルスCの各遺伝子配列情報に、既報のヒトおよびウシロタウイルスCの当該遺伝子情報を加えた上で、系統樹解析を実施したところ、ヒトおよびウシロタウイルスCはそれぞれ単一の遺伝子型に分類されるのに対して、ブタロタウイルスCは複数の遺伝子型に分類されることが明らかとなった（表1）。従って、国内には11本の各遺伝子について異なる遺伝子型を有する複数のブタロタウイルスC株が存在し、広く分布していることが明らかとなった。

D. 考察

これまでのヒトおよびウシロタウイルスCに加えて、今回初めてブタロタウイルスC複

数株の全ゲノム配列を解読することに成功した。各遺伝子における配列をこれら株間で比較したところ、ブタロタウイルス C は、他動物由来ロタウイルス C と配列が大きく異なり（挿入や欠失等が存在）、変異に富んでいることが明らかとなった。ロタウイルス C は元々子ブタの重症性下痢において検出された経緯もあることから、ブタロタウイルス C は他動物種由来ロタウイルス C と比べて古くから存在していることが示唆された。

また一方で、今回得られたブタロタウイルス C 複数株の全遺伝子情報を活用して、それぞれの遺伝子における世界スタンダードの遺伝学的分類基準（カットオフ値）を設定した。これらの基準は今後検出される新たなウイルスの起源を探る上で有用であると共に、種間伝播や遺伝子再集合によって生じる変異ウイルスの監視態勢強化につながるものと思われる。

ロタウイルス C の遺伝子性状はまだ不明な点を含んでいるため、今後も引き続き本ウイルスの動向を見守りつつ、動物由来およびヒト由来ロタウイルス C の遺伝子情報を蓄積していき、これらウイルスの起源や特性について明らかにしていく必要がある。

E. 結論

ブタロタウイルス C の複数株について、全遺伝子の塩基配列を明らかにした。これら遺伝子情報をもとに遺伝学的分類基準を策定し、ブタロタウイルス C は複数の異なる遺伝子型に分類されることを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. Mawatari, T., Hirano, K., Tsunemitsu, H., Suzuki, T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003–2010. *J. Gen. Virol.* (in press).

学会発表

1. Suzuki, T., Tsunemitsu, H. Molecular characterization of animal rotavirus C.

Pennsylvania, USA, Jul 20–24, 2013.

2. 下久保奈都美、山田 学、鈴木 亨、宮崎綾子、藤本彩子、山本佑、中村菊保、恒光裕：ノトバイオト豚を用いた実験的豚 B 群ロタウイルス感染症の電子顕微鏡学的解析 1-ウイルスの性状と局在について-、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月
3. 藤本彩子、山田 学、下久保奈都美、鈴木 亨、宮崎綾子、山本 佑、中村菊保、恒光裕：ノトバイオト豚を用いた実験的豚 B 群ロタウイルス感染症の電子顕微鏡学的解析 2-小腸粘膜傷害と修復について-、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月
4. 鈴木 亨、長谷部文子、宮崎綾子、恒光裕：国内で検出した豚 C 群ロタウイルスの遺伝学的解析、第 156 回日本獣医学会学術集会、岐阜、2013 年 9 月
5. Suzuki, T., Miyazaki, A., Tsunemitsu, H. Genetic dissection for VP7 gene of porcine rotavirus C collected around Japan. The 6th Asian Pig Veterinary Society Congress. Ho Chi Minh, Vietnam, Sep 23–25, 2013
6. Suzuki, T. Genetic analysis on nonstructural protein 1 of porcine rotavirus C. 5th European rotavirus biology meeting, Valencia, Spain, Oct 6–9, 2013.
7. 鈴木 亨、長谷部文子、宮崎綾子、恒光裕：動物由来 C 群ロタウイルスの遺伝学的分類、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

表 1. ロタウイルス C の各遺伝子に関する遺伝学的分類基準と遺伝子型数のまとめ

遺伝子	遺伝子名	カットオフ値 [%]	総遺伝子型数	ブタロタウイルス C の遺伝子型数
VP1	<u>G</u> lycoprotein	86	5	3
VP2	<u>P</u> rotease-sensitive	87	5	3
VP3	<u>I</u> nnner capsid	86	4	2
VP4	<u>R</u> NA-dependent RNA polymerase	80	6	4
VP6	<u>C</u> ore protein	87	7	4
VP7	<u>M</u> ethyltransferase	85	9	4
NSP1	Interferon <u>A</u> ntagonist	78	5	3
NSP2	<u>N</u> TPase	89	5	3
NSP3	<u>T</u> ranslation enhancer	80	5	3
NSP4	<u>E</u> nterotoxin	71	4	2
NSP5	<u>p</u> Hosphoprotein	79	4	2

多価化糖鎖クラスターを利用したウイルス凝集技術の開発

メルケル細胞ポリオーマウイルスによる long non-coding RNA の発現変動

分担研究者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 1) 培養細胞での感染増殖系が確立されていないためウイルス学的研究に制約があり、ウイルス粒子の形態、性状解析が不十分であったり、ウイルス診断系が十分整備されていない場合がある。ウイルス-糖鎖結合性を利用しさらにシアル酸含糖鎖を多価化することによって、ヒトポリオーマウイルスの BK ウイルス、JC ウイルス、メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) を効率よく凝集沈殿させることが可能であることを初めて示した。

2) MCPyV はメルケル細胞がんの原因因子と考えられているが、ウイルス発がんの分子機構はほとんど解明されていない。MCPyV 感染に起因する発がんの機構解明を目指して MCPyV T 抗原発現による細胞内 long non-coding (lnc) RNA の発現変動の解析を行った。T 抗原によって顕著に発現亢進する lncRNA、有意に低下する lncRNA を各一種類明らかにした。

A. 研究目的

培養細胞での感染増殖系が確立されていないためにウイルス学的研究に制約があり、ウイルス粒子の形態、性状解析が不十分であったり、ウイルス診断系が十分整備されていない場合がある。ウイルス粒子を効率よく簡便に凝集濃縮させることができれば、粒子の性状解析に有用だけでなく、診断技術の開発にも繋がる。本研究では、ヒトポリオーマウイルスと糖鎖との結合性を利用してウイルス粒子の新たな凝集濃縮技術の開発を行った。

メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) は約 5 年前に発見された新規ポリオーマウイルスで、皮膚がんの一種メルケル細胞がんの原因因子と考えられているが、発がんの分子機構はほとんど解明されていない。MCPyV 感染に起因する発がんの機構解明を目指して MCPyV T 抗原発現による細胞内 long non-coding (lnc) RNA の発

現変動の解析を行った。

B. 研究方法

ヒトポリオーマウイルス ; BK ウイルス (BKPyV)、JC ウイルス (JCPyV)、MCPyV の各 VP1 遺伝子を発現する組換えバキュロウイルスは李天成博士 (国立感染研) によって作製され供与された。組換えウイルスを昆虫細胞 Tn5 および Sf9 へ感染させ培養上清を濃縮、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて各ポリオーマウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を精製した。各種多価化糖鎖クラスターは尾形 慎博士 (福島高専) によって合成され供与された。

MCPyV の T 抗原を CMV プロモーター支配下で発現するプラスミド pcDNA4HisMax-LT は片野晴隆博士 (国立感染研) より供与された。Hek293 細胞へトランスフェクションし、2 日後に細胞トータル RNA を回収し、定量 RT-PCR によって

各種 lncRNA を定量測定した。

(倫理面への配慮) 株化細胞のみを用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

1. 多価化糖鎖クラスターを利用したウイルス凝集技術の開発

BKPyV, JCPyV, MCPyV の VLP それぞれに各糖鎖クラスターを加えよく混和した後、PEG6000/NaCl 溶液を加え 4°C 静置後 2000rpm, 30 分間の遠心操作を行った。沈殿した VLP を SS-PAGE、銀染色またはウエスタンブロット法で解析した。直鎖状高分子糖鎖ポリマーとして、グルタミン酸にラクトース (Lac) または LacNAc を導入しポリマー化した PGA-Lac, PGA-LacNAc、さらに、Lac/LacNAc にシアル酸を alpha2, 3 結合または alpha2, 6 結合させた PGA-2, 3SALac, PGA-2, 6SALac, PGA-2, 3SALacNAc, PGA-2, 6SALacNAc を用いた。さらに、分子量は PGA タイプの 1000 分の 1 程度で四価十字型糖鎖クラスターを同様に用意した (Tet-LacNAc, Tet-2, 3SALacNAc, Tet-2, 6SALacNAc)。BKPyV 及び JCPyV は糖鎖クラスターのうち高分子でシアル酸を含む PGA-2, 3SALac, PGA-2, 6SALac, PGA-2, 3LacNAc, PGA-2, 6LacNAc の場合、効率よく共沈殿した。他の糖鎖の場合沈殿分画に VLP はほとんど検出されなかった。一方、MCPyV の場合は、BKPyV, JCPyV と同様に PGA-2, 3SALac, PGA-2, 6SALac, PGA-2, 3LacNAc, PGA-2, 6LacNAc の沈殿効率が非常に高いが、PGA-Lac, PGA-LacNAc, Tet-2, 3SALacNAc, Tet-SA2, 6LacNAc でも効率は低いものの沈殿を認めた。

2. MCPyV による lncRNA の発現変動

まず、MCPyV T 抗原発現ベクター導入によって large T 抗原 (LT) とそのスプライシングバリエント (57kT) が発現することをウエスタンブロットで確認した。この細胞及び空ベクター導入細胞から RNA を調製し、25 種類の lncRNA の発現レベルを測定した。三度独立した実験を行った結果、LT/57kT 発現に伴う NEURL3 の顕著な発現亢進と 1LOC643650 の発現低下が再現性よく

認められた。時に、NEURL3 の発現レベルは LT/57kT 発現によって約 6 倍まで亢進した。

D. 考察

1. 多価化糖鎖クラスターを利用したウイルス凝集技術の開発

BKPyV, JCPyV は多くのシアル酸含糖脂質と結合することが知られ、我々が以前行った VLP を用いた SPR 解析においても、BKPyV は、GM3, GD1b, GD2, GD3, GD1a, GT1a, GQ1b との結合が認められ、JCPyV はこれらに加えて GM2, GM1 とも効率よく結合することが示された。これに対し、MCPyV はやや結合選択性が高く、調べたシアル糖のうち GM2, GM3, GD2, GD3 とのみ結合が認められた。SPR 解析から、GM3 である 2, 3SA-Lac はいずれのポリオーマウイルスとも結合しうることが示されたため、今回、シアル化 Lac とその関連糖を含む糖鎖クラスターについて解析を行った。シアル酸付加によってウイルス結合性が上がった (生じた) こと、高分子型の方が糖鎖のクラスター効果が高かったことは予想された通りであるが、ポリオーマウイルスで糖鎖クラスターによる凝集沈殿を示した初めての成績である、また、MCPyV では、四価糖鎖でも沈殿効果を示したが、GM3 との結合性が BKPyV, JCPyV より高いことが関連しているかもしれない。

2. MCPyV による lncRNA の発現変動

lncRNA (長鎖非翻訳 RNA) は、200 nt 以上の長さを有する RNA で、ゲノム中の様々な領域から発現しており、アルツハイマー病、癌など幅広い疾患において、lncRNA の異常発現が観察されている。miRNA に比べ解析が遅れているものの近年急速に研究が進み、細胞内の情報伝達やクロマチン修飾に機能するなどの例が示されている。ウイルス発がん、また皮膚がん発症における lncRNA の役割は未解明であり、今回見出した知見を基に MCPyV 関連発がんにおいて lncRNA がそのように働いているか明らかにしていきたい。

E. 結論

糖鎖クラスター効果を利用して、ヒトポリオマウイルスを効率よく凝集沈殿させられることを初めて示した。

MCPyV T抗原の発現による lncRNA 発現変動を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. **Sci Rep** (in press).
2. Mawatari S, Uto H, Ido A, Nakashima K, Suzuki T, Kanmura S, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Shimada Y, Sudoh M, Shoji I, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. **PLOS ONE** (in press).
3. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. **Microbes Infect** (in press).
4. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. **PLOS Pathog** 9; e1003589, 2013.
5. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H,

- Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. **PLOS ONE** 8; e68992, 2013.
6. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi SI, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. **Sci Rep** 3; 3243, 2013.
 7. 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.
 8. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. **Gastroenterology** 144; 56-58, 2013.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

日本人での高リスク型ヒトパピローマウイルス抗体の保有状況の調査

Wee1 によるヒトパピローマウイルス DNA 維持複製の調節機構

分担研究者 松尾 理加 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官
研究協力者 石井 克幸 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター主任研究官
研究協力者 終元 巖 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター第一室室長

研究要旨 日本人でのヒトパピローマウイルス（HPV）抗体の保有状況の調査、及び HPV 感染予防ワクチンによる免疫賦与効果の解析と評価を目指し、ハイスループット HPV 抗体測定系の確立を行う。今年度は、高リスク型 HPV のうち 8 種類の VLP を作製した。また、既に確立されている ELISA 系を用いて、日本人の健康者 200 人の血清における HPV16 抗体価を測定し、新たな系の確立において必要となる参照データを得た。抗体陽性率は女性では 6.8%、男性では 6.2%であった。

一方で、HPV16 ゲノムを維持する子宮頸部由来細胞において、細胞周期を制御する Wee1 をノックダウンすると HPV ゲノムのコピー数が減少することを見いだした。Wee1 は HPV の DNA ヘリカーゼである E1 の安定化に関与することが示唆された。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（HPV）の感染は子宮頸癌の原因であり、2つの高リスク型 HPV（HPV16/18）に対する感染予防ワクチンが世界で導入されている。近年、ワクチンによる免疫効果を評価するために、大規模な HPV 血清疫学調査の実施が求められている。これまでに我々は、ヒト培養細胞で作製した HPV16/18 の VLP を抗原に用いた ELISA 系を確立している。本研究では、さらに HPV31/33/35/51/52/58 の VLP を作製し、蛍光ビーズに VLP を結合させ、ビーズソーターにて 8 種類の高リスク型 HPV 抗体価を同時に測定するハイスループット測定系の確立を目的とする。そして、この測定系を用いて、健康な日本人のワクチン接種群と非接種群で抗体価を測定し、ワクチンの集団免疫賦与効果を評価することを目指している。また、HIV 感染者や小児の自己免疫疾患患者で、HPV ワクチンが十分な HPV

抗体価を誘導できるかを、検討することも計画している。今年度の目的は、ハイスループット測定系の確立に向けて、8 種類の VLP を作製すること、及びその VLP を抗原に用いた ELISA 系で HPV ワクチン導入前の日本の健康な男女が保有する HPV16 抗体価を調査することである。

高リスク型 HPV の感染後、HPV ゲノムはエピゾームとして長期間にわたり潜伏した後、細胞ゲノムに組込まれ、子宮頸癌へと発展する。HPV 感染者の子宮頸癌発症を抑えるためには、HPV ゲノムの維持機構の解明は重要である。これまでに、様々な DNA 損傷応答 (DDR) タンパク質が HPV ゲノムの維持に関与することが siRNA を用いた実験により報告されている。細胞の Wee1 チロシンキナーゼは細胞周期を制御する G2/M チェックポイントタンパク質である。Wee1 チロシンキナーゼのノックダウンは、DDR を活性することから、Wee1 の HPV ゲノムの維持機構

への関与が予想される。本年度は HPV ゲノム維持における Wee1 の役割を検討し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

① 高リスク型 HPV 15 種類のうち、16/18/31/33/35/51/52/58 型の 8 種類の VLP を作製した。293FT 細胞にコドンの最適化を行った HPV キャプシドタンパク質 L1 および L2 の発現ベクターをトランスフェクションし、発現した L1 および L2 で形成された VLP をオプティプレップ密度勾配遠心法により精製した。このうち、16 型 VLP を抗原に用いて、健康な日本人男女 200 人の血清中の HPV16 の抗体価を ELISA 系にて測定した。国立感染症研究所・医学研究倫理審査委員会の承認を経て、国立感染症研究所が保有する血清バンクの検体を使用した。日本の女性において、検出される HPV DNA 型の地域による違いは認められていないことから、大都市圏を含む 4 地域（関東、中部、近畿、九州：各約 50 検体）を選択し、10-19 歳、20-29 歳、30-39 歳、40-49 歳、50-59 歳の 5 年代区分で、各区分につき 40 検体（男性約 20 検体、女性約 20 検体）（合計 200 検体）を測定した。なお検体は日本で HPV ワクチンが導入される以前の、2008 年に収集されたものを用い、HPV16 国際標準血清（WHO International Standard 05-134 HPV16 antibodies）を基準として、測定される HPV16 抗体価の単位付けを行った。

② HPV16 型ゲノムを安定に維持する子宮頸部由来 W12 細胞において、RNAi 法により Wee1 をノックダウンし、2 日後に HPV ゲノムのコピー数を測定した。Hirt 法によりエピゾーム DNA を抽出し、HPV16 ゲノムの塩基番号 500-670 領域を増幅するプライマーセットを用いて、リアルタイム PCR 法にて定量した。

また、ヒト胎児腎 293 細胞において、Wee1 をノックダウンし、翌日、HPV の複製 DNA ヘリカーゼである E1 (HPV16 型) を FLAG タグを付加して（以下 FLAG-16E1 と略す）、強制発現させた。FLAG-16E1 発現ベクターをトランスフェクションした 2 日後に、FLAG-16E1 の mRNA 発現量を

RT-PCR 法にて測定し、タンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより測定した。

また、293 細胞や HPV DNA 陰性の子宮頸癌由来 C33A 細胞において、HA タグ融合 Wee1 (Wee1-HA) と FLAG-16E1 を強制発現させて、FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により結合を検出した。さらに、全長 646 アミノ酸から成る Wee1 の欠失変異体を作製し、16E1 との結合に必要な領域を GST プルダウンアッセイにより同定した。アッセイには大腸菌で発現させ、精製した GST-Wee1 の欠失変異体と、Sf9 細胞で発現・精製した FLAG-16E1 を用いた。また逆に、全長 649 アミノ酸から成る 16E1 の Wee1 との結合に必要な領域を同定した。FLAG-16E1 の C 末端欠失変異体を 293 細胞で発現させ、FLAG 抗体吸着アガロースに結合させて、この状態で精製 GST-Wee1 (215-646 aa) と混合し、結合を検出した。

293 細胞において、Wee1 と APC ユビキチンリガーゼ複合体のコアサブユニットの 1 つである Cdc27 を RNAi 法によりノックダウンし、FLAG-16E1 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより検出した。また、同様に Wee1 ノックダウン 293 細胞での APC 複合体の標的配列に変異を導入した FLAG-16E1 や、E1 のユビキチン化を介した分解に重要であると考えられている 483 番目のアミノ酸リジンをアラニンに置換した変異体 (K483A) のタンパク質発現量も解析した。

C. 研究結果

① 健康な日本人 200 人の血清（女性 103 検体、男性 97 検体）の HPV16 抗体価を ELISA 系にて測定したところ、抗体陽性率は女性では 6.8%、男性では 6.2%であった（図 1）。陽性の検体は女性では 40 代から、男性は 30 代からみられた（図 2）。また、地域による違いは認められなかった。なお WHO HPV ラボラトリーネットワークでは、HPV 非感染者での HPV 抗体価の平均値に 3 倍の標準偏差を加えた値を、抗体陽性のカットオフ値とすることが推奨されており、今回はスウェーデンのバーゲン女子（12 歳以下）

の血清 HPV16 抗体価の解析結果から、カットオフ値として 4.0 IU/mL (IU: 国際標準単位) を用いた。

② W12 細胞にて Wee1 をノックダウンしたところ、HPV ゲノム量が 30% へと減少した (図 3)。そこで、HPV 複製に必須の因子である DNA ヘリカーゼ E1 (16 型) の mRNA とタンパク質レベルに対する Wee1 ノックダウンの影響を検討した。E1 には有用な抗体がないため、Wee1 をノックダウンした 293 細胞で FLAG-16E1 を強制発現して、FLAG 抗体によりその発現を調べた。Wee1 ノックダウンにより、FLAG-16E1 の mRNA レベルにはほとんど影響がなかったが、タンパク質レベルが著しく減少した。18 型 E1 タンパク質レベルも同様に著しく減少した。骨肉腫由来 U-2 OS 細胞や、HeLa 細胞においても、同様の結果が得られた。次に、16E1 と Wee1 の結合について検討した。293 細胞において Wee1-HA と FLAG-16E1 を共発現させると、FLAG-16E1 のタンパク質レベルが増加した。このことから、Wee1 は翻訳後の 16E1 の安定化に関わることが示唆された。

FLAG-16E1 と Wee1-HA を共発現させた 293 細胞や C33A 細胞において、両者の結合が免疫沈降法により検出された。GST プルダウンアッセイでは、Wee1 の 1-124 aa と 1-214 aa は FLAG-16E1 との結合が検出されず、1-290 aa や 215-646 aa は結合が検出された。一方、16E1 の 1-184 aa、1-359 aa、及び 1-439 aa は GST-Wee1 (215-646 aa) との結合が検出されず、全長の 16E1 は結合が検出された。これらの結果から、16E1 と Wee1 は、440-649 aa と 215-646 aa の領域でそれぞれ、直接結合することが示唆された。

次に、Wee1 による 16E1 の安定化機構について検討した。293 細胞において、Wee1 をノックダウンし、FLAG-16E1 (K483) を強制発現させたところ、コントロールノックダウンに比べてタンパク質レベルで 76% の発現がみられた。野生型の FLAG-16E1 は 17% の発現しかみられないことから、Wee1 は 16E1 の K483 のユビキチン化を介した分解を阻害することが示唆された (図 4)。

ウシパピローマウイルス 1 型の E1 は APC ユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン化を受

け、分解されることが報告されている。16E1 も APC 経路により分解されるのか、また、Wee1 はその経路の分解を阻害するのかを検討した。293 細胞において、Wee1 または Cdc27 をノックダウンし、FLAG-16E1 を強制発現させたところ、Cdc27 ノックダウンではコントロールノックダウンに比べて FLAG-16E1 のタンパク質レベルが上昇した。この結果から、16E1 も APC 経路により分解されることが示唆された。ダブルノックダウンでは Wee1 ノックダウンに比べて FLAG-16E1 のタンパク質レベルは少し上昇したものの、Cdc27 ノックダウンに比べる著しく低かった (図 5)。さらに、APC 複合体の標的配列に変異を導入した FLAG-16E1 (R537A/L540A、R619A/L622A、K628A/E629A) のタンパク質レベルは、Wee1 ノックダウンにより野生型と同程度に低下した (図 6)。これらの結果から、Wee1 は 16E1 の APC 経路による分解をほとんど阻害しないことが示唆された。

D. 考察

① 今回の調査では、健康な日本人女性での HPV16 抗体陽性率は 6.8% であった。スロベニアにおける子宮頸癌の検診で得られた検体を解析した結果、子宮頸部に HPV16 DNA が検出された場合、血清が HPV16 抗体陽性となる確率 (抗体陽転率) は 56.7% と報告されている。この陽転率から逆算すると、調査した日本人女性での積算の HPV16 感染率は約 12% と推測された。これまでに健康な日本人女性での HPV 抗体価の調査は行われておらず、この結果は HPV ワクチン導入前の日本の HPV 血清疫学のベースラインデータとなる。

我々はこれまでに、HPV DNA のタイピングにより、日本では HPV52/58 などの非ワクチン型 HPV による子宮病変が多いことを報告している。ワクチン導入により、今後、非ワクチン型 HPV が蔓延する可能性もあり、HPV16/18 も含め、他の高リスク型 HPV の抗体価を測定することは重要である。そのためにも、ハイスループット測定系の確立が急がれる。ワクチン導入後のワクチン型、及び非ワクチン型 HPV の蔓延状態

の血清疫学的変化は、HPV ワクチンの効果評価および接種方針の策定の基盤情報となることが期待できる。

HPV16 抗体陽性率は女性 6.8%、男性 6.2%であり、性別による優位な差はみられなかった。HPV は性行為を介して感染することから、この結果は、HPV ワクチンの接種対象者を男性までに広げる議論を行う際の、行政上の重要な科学的判断材料となり得る。

② Wee1 は HPV16 型 E1 の 440-649 aa (ヘリカーゼドメイン) 内の領域と直接結合して、E1 の K483 のユビキチン化を介した分解を抑制すると考えられる。APC 複合体のコアサブユニットの siRNA や APC 複合体の標的配列の E1 変異体を用いた実験から、Wee1 は APC ユビキチンプロテアソーム以外の E1 分解経路を抑制すると推察される。E1 の分解は APC 経路以外報告されておらず、Wee1 による E1 の安定化機構の解明には、新規の E1 分解機構を明らかにする必要がある。

E1 は HPV E2 によりウイルス複製起点ヘリクルートされ、その後、E2 は細胞の DNA ポリメラーゼ α へ置き換わるまで E1 と結合すると考えられている。E2 は Wee1 と同様に E1 の DNA ヘリカーゼドメインと結合することが示されており、E2 と Wee1 は E1 との結合に競合する可能性がある。また、E2 は APC 複合体のアダプターサブユニット (ユビキチン化される基質と結合するサブユニット) である Cdc20 や Cdh1 の機能阻害を介して、E1 の分解を阻害することが報告されている。さらに、分化細胞での HPV18 E7 タンパク質の発現に伴い、Wee1 の発現が上昇するという報告がある。これらのことから、E1 はタンパク質レベルで様々な方法で、また、維持複製時だけでなく、増殖複製期においても安定化されることが推察される。

本研究から、未分化の W12 細胞において Wee1 をノックダウンすると、E1 が Wee1 と結合できないために K483 のユビキチン化を介した E1 分解が起こり、HPV 維持複製効率が低下することで、HPV ゲノムのコピー数が減少すると考えられる。この仮説を実証するためには、E1 における Wee1 との結合に必要なアミノ酸を同定し、そ

の変異体をコードする HPV ゲノムを作製し、細胞に導入して、Wee1 をノックダウンした時に HPV ゲノムのコピー数が低下しないことを示す必要がある。また、Wee1 と E1 の結合を阻害するような薬剤が同定できれば、将来的には HPV ゲノムを感染細胞から排除することが可能になるかもしれない。

E. 結論

健康な日本人女性での HPV16 抗体価を初めて測定し、年齢層が上がるのに伴って、抗体陽性率が上昇することを明らかにした。また、日本人男性での HPV16 抗体価を初めて測定した。

Wee1 が E1 の APC 経路以外のタンパク質分解経路を阻害することで、感染細胞での HPV ゲノムの維持機構に関与することが示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Mori S., Kusumoto-Matsuo R., Ishii Y., Takeuchi T. and Kukimoto I. Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1 helicases. *Virology J.*, 11, 11 (2014)
2. Kusumoto-Matsuo R., Ghosh D., Karmakar P., May A., Ramsden D. and Bohr VA. Serines 440 and 467 in the Werner syndrome protein are phosphorylated by DNA-PK and affects its dynamics in response to DNA double strand breaks. *Aging (Albany NY)*, in press.
3. Ishii Y., Nakahara T., Kataoka M., Kusumoto-Matsuo R., Mori S., Takeuchi T. and Kukimoto I. Identification of TRAPPC8 as a Host Factor Required for Human Papillomavirus Cell Entry. *PLOS One*, 8, e80297 (2013)
4. Kukimoto I., Maehama T., Sekizuka T., Ogasawara Y., Kondo K., Kusumoto-Matsuo R., Mori S., Ishii Y., Takeuchi T.,

Yamaji T., Takeuchi F., Hanada K. and Kuroda M.
Genetic Variation of Human Papillomavirus Type 16 in Individual Clinical Specimens Revealed by Deep Sequencing
PLOS One, 8, e80583 (2013)

学会発表

1. 森 清一郎、松尾 理加、柗元 巖
ヒトパピローマウイルス16型と18型間での複製干渉機構
第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月、神戸
2. 石井 克幸、中原 知美、森 清一郎、竹内 隆正、柗元 巖、松尾 理加
HPVキャプシド副構成蛋白質L2はTRAPPC8の機能を阻害する
第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月、神戸
3. 松尾 理加、森 清一郎、前濱 朝彦、柗元 巖

ヒトパピローマウイルス16型 E1タンパク質に結合する細胞チロシンキナーゼの同定
第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月、神戸

4. Mori S., Kusumoto-Matsuo R. and Kukimoto I.
Molecular mechanism of replication interference between HPV16 and HPV18
DNA Tumour Virus Meeting
2013年7月、イギリス バーミンガム

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

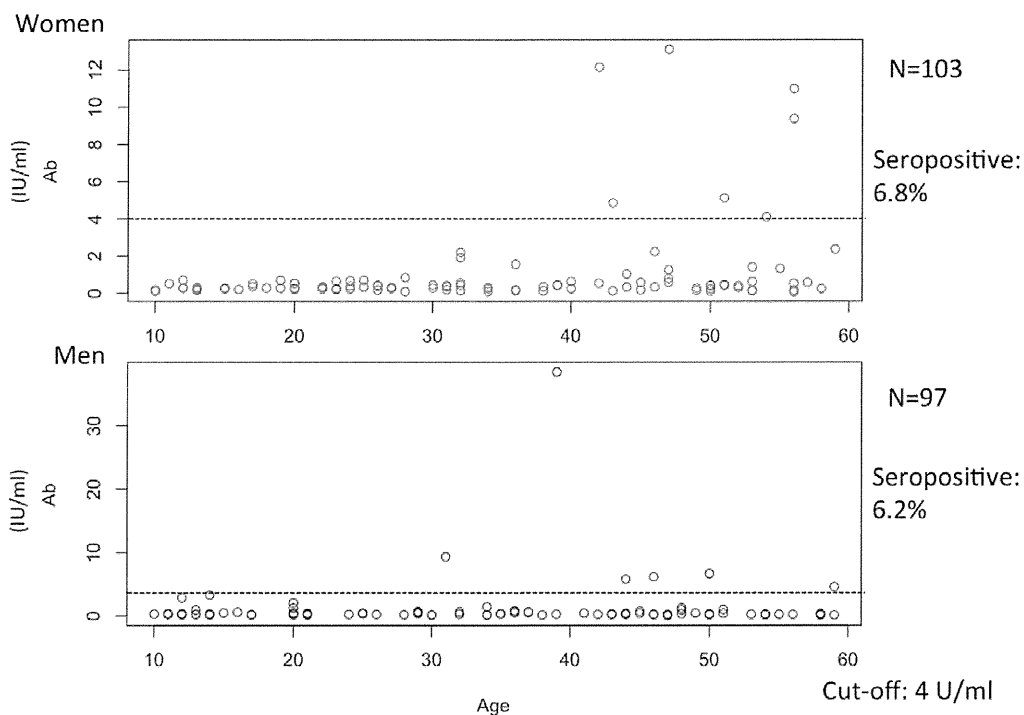


図1 健常日本人での血清中のHPV16抗体価

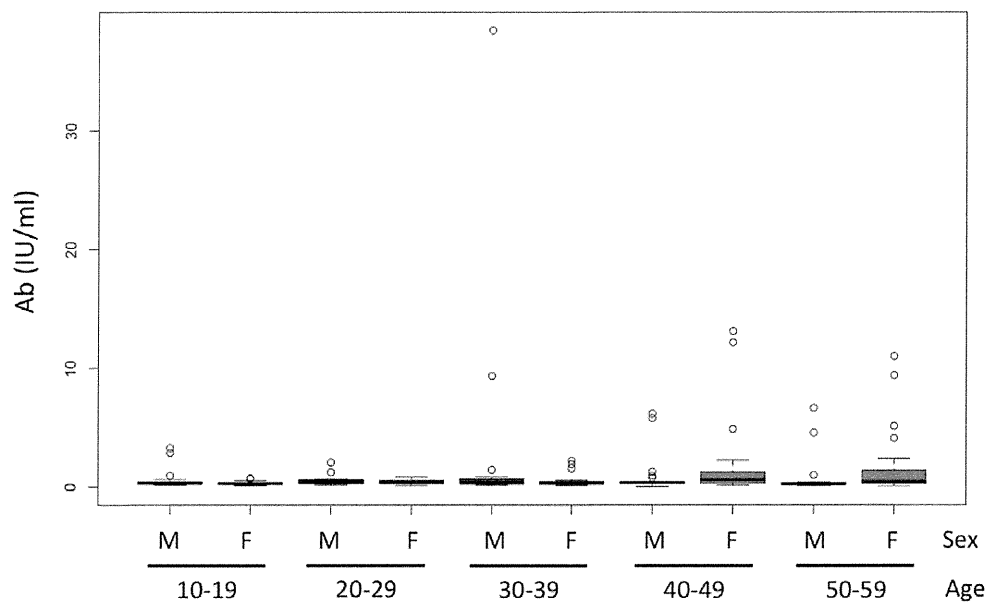


図2 年齢層ごとのHPV16抗体価分布

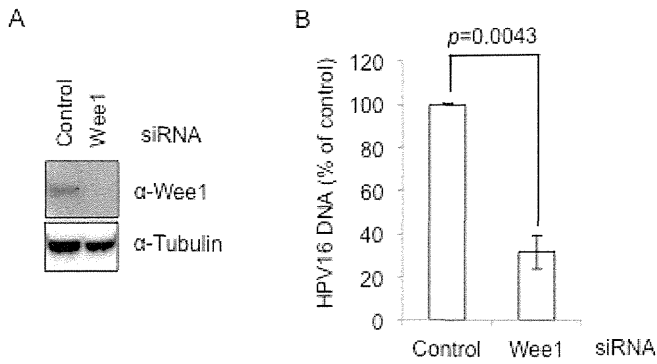


図3 Wee1ノックダウンによるHPV16ゲノムのコピー数の減少 (A) ウェスタンブロット (B) リアルタイムPCR法によるHPV16 DNAの定量

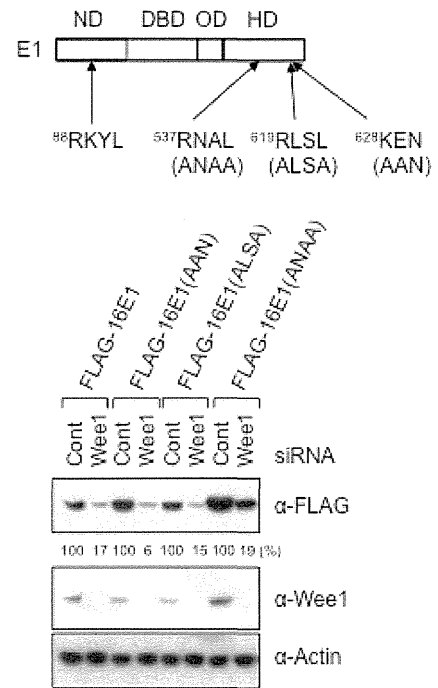


図6 Wee1ノックダウンによるFLAG-E1のAPC標的配列変異体のタンパク質レベルへの影響

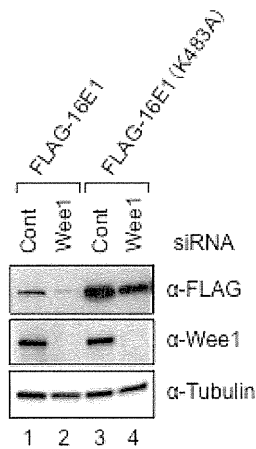


図4 Wee1ノックダウンによるFLAG-16E1の野生型とK483A変異体のタンパク質レベルへの影響

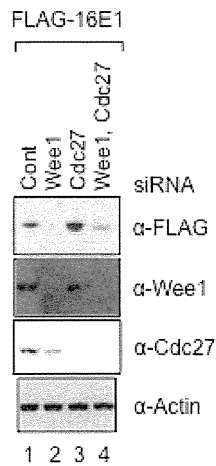


図5 Wee1/Cdc27ノックダウンによるFLAG-16E1のタンパク質レベルへの影響

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究

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 子宮頸癌の 90%以上はハイリスクグループのヒトパピローマウイルス (HPV) 感染により発症する。HPV による発癌では、HPV 由来の E6, E7 蛋白質による癌抑制遺伝子 p53, pRb の分解誘導が必須であり、発癌の抑制にはこれらの経路を遮断することが重要である。近年、HPV16 型の E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御していることが明らかとなった。そこで、E6 遺伝子が組込まれた細胞から E6 蛋白質を特異的に排除する方法の開発を目指し、USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する特殊ペプチドの開発を試みた。まず、組換えバキュロウイルス系で FLAG-USP15、および FLAG-USP15 C269S を発現、精製した。DUB-Glo protease assay により USP15 活性を簡便かつ定量的に測定する *in vitro* assay 系を構築した。また、USP15 の活性ドメインを発現する Avi-His₆-USP15 UCH を大腸菌で発現、精製した。現在、USP15 UCH に結合する特殊ペプチドの作製を進めており、USP15 の阻害効果を解析する。

A. 研究目的

子宮頸癌の 90%以上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 蛋白質の組み込みがあり、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プロセスに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。近年、E6, E7 蛋白質の安定性を脱ユビキチン化酵素 USP15, USP11 が制御していることが明らかとなった。そこで、子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目的に、USP15, USP11 の特異的阻害剤の作製を目指す。

B. 研究方法

(1) FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S を発現する組換えバキュロウイルスの作製
pVL1393 に FLAG-USP15, または FLAG-USP15 C269S (不活化型) をサブクローニングし、BaculoGold で組換えバキュロウイルスを作製した。

(2) FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S の精製
Hi5 細胞に組換えバキュロウイルスを感染させ、FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S をそれぞれ発現させ、FLAG beads で組換え蛋白質をアフィニティ精製した。

(3) *in vitro* USP15 assay 系の作製
DUB-Glo protease assay (Promega) を用い、*in vitro* USP15 assay 系を作製した。Z-RLRGG-NH が切断されるとルシフェラーゼ活性が出現するため、ルミノメーターで切断活性を測定した。