

(4)大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の発現と精製

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 USP15 の活性部位に結合する特殊ペプチド (環状 N-メチルペプチド) を作製するために (東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)、Avi-His₆-USP15 UCH (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) の大腸菌発現プラスミドを作製した。pQE80L-N_{Avi}-4 に USP15 の aa 257-952 をコードする cDNA を PCR で増幅し、In-Fusion cloning 法でサブクローニングした。Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5 α で発現させ、HisTrap HP (GE Healthcare) を用い、アフィニティ精製した。

(5)HPV 16E6 のポリユビキチン化

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。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

C. 研究結果

(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
Hi5 細胞に組換えウイルスを感染させ、72

時間後に細胞を回収した。約 110kDa の FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S の発現を anti-FLAG 抗体で確認した。

(2)FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S の精製
FLAG beads に組換え FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S 蛋白質を結合させ、FLAG peptide で溶出し、アフィニティ精製した。それぞれの蛋白質を含む分画を集めて透析した。

(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。10, 20, 50, 100 nM の FLAG-USP15 または FLAG-USP15 C269S を用いて Z-RLRGG-NH の切断を解析したところ、FLAG-USP15 では定量的に切断活性が示されたが、FLAG-USP15 C269S では全く切断活性を示さず、*in vitro* で簡便かつ定量的に USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を測定する系が構築できた。

(4)大腸菌における Avi-His₆-USP15 UCH の発現と精製

Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5 α で発現させ、HisTrap HP (GE Healthcare) を用い、アフィニティ精製した。CBB 染色にて約 90kDa の Avi-His₆-USP15 UCH 蛋白質が得られ、anti-His₆ 抗体で確認した。

(5)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。これより 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

HPV16E6 を速やかに排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤作製を目指した。USP15 の *in vitro* assay 系を構築するために FLAG-USP15、および FLAG-USP15 C269S を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。そして、FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S を FLAG-beads で精製し、DUB-GLO protease

assay で USP15 の in vitro 活性定量系の構築に成功した。この系は簡便で定量性がある。次に USP15 の活性ドメイン UCH を Avi-His₆-USP15 UCH として大腸菌で発現した。さらに GST-16E6 のユビキチン化を検出する系を構築した。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。今後、USP15 UCH に結合する特殊ペプチドを作製し、USP15 を阻害して 16E6 の脱ユビキチン化を阻害する系を作製する。HPV16E7 の脱ユビキチン化酵素 USP11 に対しても同様な活性測定系、抗 USP11 特殊ペプチドを作製する予定である。

E. 結論

子宮頸癌の特異的治療薬の開発を目指し、HPV16E6 の安定化因子である USP15 の阻害剤作製を試みた。今年度は in vitro USP15 assay 系の構築に成功した。また、USP15 の活性部位を大量に精製し、USP15 活性を阻害する特殊ペプチド作製のためのプローブを作製した。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) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5381.
- 2) 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*, 2013, 126 (Pt9): 2014-26.

- 3) Ratnoglik SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., Shoji I, Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Antiviral activity of extracts from Morinda citrifolia leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology, in press*.
- 4) Adianti M., Aoki C., Komoto M., Deng L., Shoji I, Wahyuni T., Lusida M., Soetjipto S., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species. *Microbiology and Immunology, in press*.
- 5) 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, and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.
- 6) Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., Shoji I, Deng L., Aoki C., and Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*, 2013, 10 (1): 259, 1-9.
- 7) El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji I, Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.

2. 学会発表

- 1) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 2) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 3) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 4) Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 5) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 6) Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
- 7) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV 感染による糖代謝障害の分子機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013 年 11 月.
- 8) DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 9) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 瀧野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導體 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) は C 型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 10) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 11) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 12) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C 型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.

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

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 JFH-1 株によりC型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、多量のウイルスを精製するのは技術的な困難が伴う。そこで、同じ肝炎ウイルスであるE型肝炎ウイルス（HEV）をベクターとして用いることができるかどうかの検討を行った。HEV 感染性クローンに外来遺伝子を組み込んで発現させることに成功し、HEV の VLP に RNA を包埋させることができることも示唆された。

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。

本年度は、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

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、遺伝子解析研究に関する倫理指針」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、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

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。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なクローンがあった。こ

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、本フラクションの 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

構造蛋白 (ORF2) を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つ replicon 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な clone があった。これらの clone 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、本フラクションの 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、replicon が包埋された粒子 (trans-packaging particles) である可能性が示唆された。

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

- Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii

K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, in press.

- Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., Ishii K., Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both *in vitro* and *in vivo*. Gastroenterology, 145: 447-455 (2013)
- Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization. Journal of Virology, 87: 6031-6036 (2013)
- 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
- 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン BIO Clinica 28: 25-29 (2013)

2. 学会発表

- Yokokawa H., Moriyama M., Nakamura N., Higashino A., Akari H., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Induction of neutralizing antibodies by vaccination with cell culture derived hepatitis C virus particles in primate model. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, Australia, October 10-14, 2013.
- Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A virus infection in Japan. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore. March 10-14, 2013
- 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクシニアウイルス DIs 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症予防効果、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
- 清原知子、石井孝司、多田有希、脇田隆字：A 型肝炎のリスクアセスメント、第 17 回日本ワクチン学会、平成 25 年 11 月、津
- 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究、第 61 回日本ウイルス学会、平成 25 年 11 月、神戸
- 石井孝司、李 天成、吉崎佐矢香、塩田智之、脇田隆字：E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作成の検

- 討、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸
7. 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松 久、久保田智己：結晶構造解析とQM/MM計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸
 8. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：小児におけるHBs抗原保有率調査、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸
 9. 横川 寛、森山正樹、中村紀子、東濃篤徳、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの有効性の検討、第61回日本ウイルス学会、平成25年11月、神戸

G. 知的所有権の取得状況
なし

フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用

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：網康至、須崎百合子 動物管理室

岸田典子、白倉雅之、浅沼秀樹 インフルエンザ研究センター

武田 直和、大阪大学微生物研究所

研究要旨 E型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus、HEV) はE型肝炎の原因ウイルスである。これまでヒトから4つの遺伝子型の異なるHEVが同定されているが、近年、ヒト以外の動物からも新しいHEVが続々発見され人畜共通感染症として注目されている。フェレットE型肝炎ウイルス (Ferret HEV) は最近オランダのフェレットから検出された新型HEVであるが、遺伝子配列以外のFerret HEVに関する情報がほとんどない。本年度の研究では、Ferret HEVの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子 (VLPs) を作製した。さらにVLPsを用いて抗体検出ELISA法を樹立し、Ferret HEVの疫学調査、病原性と抗原性の解析をした。

A. 研究目的

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、現在、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は小型球形ウイルスであり、その直径は約30 nmである。HEVはE型肝炎の原因ウイルスであり、発展途上国では多発であるが、先進各国でも散発例がしばしば報告される。これまでヒトから4つの遺伝子型の異なるHEVが同定されているが、その中、G3とG4 HEVがイノシシ、ブタ、シカからも分離され、人畜共通感染症として注目されている。その他、ニワトリ、ラット、フェレット、ミンク、ヘラジカ、サル、モングース、コウモリなどの動物からも新し

いHEVが続々発見され、これらのウイルスの病原性などまだ明らかにされていない。フェレットE型肝炎ウイルス (Ferret HEV) は2012年にオランダのフェレットから検出された新型HEVであるが、現在二株のウイルス全長遺伝子配列が登録されている。遺伝子構造は既知のHEVと類似する。遺伝子配列以外のFerret HEVに関する情報がほとんどない。本研究では、Ferret HEVの疫学調査、病原性と抗原性の解析を目的とし、Ferret HEVの構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作製を試みた。

B. 研究方法

全長およびNあるいはC末端、さらに両端を欠失した ferret HEV ORF2 を RT-PCR

法で増幅した。定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 細胞に感染させ、構造蛋白を発現してウイルス様粒子 (ferret HEV-LPs) を作製した。ferret HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立した。Ferret HEV-LPs をウサギに免疫し、抗 ferret HEV-LPs 抗体を得た。抗 ferret HEV-LPs 抗体と他の遺伝子型の異なる HEV との反応性を ELISA 法で測定し、ferret HEV の抗原性を既知の G1, G3, G4 および rat HEV の抗原性と比較した。さらに、抗 ferret HEV-LPs 抗体の G3HEV に対する中和活性を測定し、ferret HEV と既知 HEV の血清型の違いを検討した。また、ferret HEV に関する疫学調査を行った。

C. 研究結果

Ferret HEV ORF2 全長を組換えバキュロウイルスで発現し、ORF2 全長と思われる蛋白が検出されたが、ferret HEV-LPs の形成が認められなかった。N 末端から 112aa, C 末端から 47aa を欠失した ferret HEV ORF2 を持つ組換えバキュロウイルスを感染した Tn5 細胞培養上清から直径約 24nm の ferret HEV-LPs を大量に得た。Ferret HEV-LPs 比重は $1.29\text{g}/\text{cm}^3$ である。また、Ferret HEV-LPs の N 末端アミノ酸を解析した結果、その配列は Ferret HEV ORF2 の 113-117 番目の配列と一致した。また、抗 ferret HEV-LPs 抗体は G1, G3, G4, rat HEV との交叉反応を示したが、G3 HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を中和しなかった。また、アメリカから輸入してきた実験用フェレットから ferret HEV-LPs を抗原とした抗体検出 ELISA 法によって抗 ferret HEV IgG および IgM 抗体が検出された。

D. 考察

Ferret HEV-LPs の作製に成功した。ferret HEV は G1, G3, G4 および rat HEV との交叉反応があるにも関わらず、G3 HEV に対する中和活性を示さなかったことから、G1-4 HEV

と血清型が異なる可能性が示唆された。また、アメリカからの輸入実験用フェレットでは ferret HEV 感染が稀ではないことから、実験動物の検疫また実験動物の管理に当たっては ferret HEV の感染を十分考慮する必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) Tingting Yang, 李天成。スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析。第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、岡山。

2) 李天成、Tingting Yang, Wei Li, Daiwei Guan, Ling Fang, Juan Su, Changwen Ke, 武田直和、脇田隆字中国における Rat HEV の感染調査。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月、岐阜。

3) 李天成、楊ていてい、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、今井正樹、浅沼秀樹、武田直和、脇田隆字。フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。

4) 石井孝司、李天成、塩田智之、吉崎佐矢香、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築とレプリコン包埋 VLP 作製の検討。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。

5) 塩田智之、李天成、石井孝司、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、脇田隆字。E 型肝炎ウイルス感染性規定宿主因子の探索に関する研究。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。

6) 清水健太、濱口杉大、李天成、吉松組子、有吉紅也、有川二郎。ラット E 型肝炎ウイルス

は人獣共通感染症の病原体か？第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月神戸。

7) Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. An unrecognized hepatitis E outbreak in a monkey facility The 23st Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 6-10 June 2013, Singapore

2. 論文発表

1) Tomoyuki Shiota, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Takanobu Kato, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle. J Virol. 2013, May 87:(10): 6031-6036.

2) Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Takaji W. No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19 (8):1343-1345.

3) Dawei Guan, Wei Li, Juan Su, Ling Fang, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tian-Cheng Li, and Changwen Ke. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. Emerg Infect Dis. 2013 Aug;19(8):1341-1343.

4) Wei Li, Dawei Guan, Juan Su, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, ChangWen Ke, Tian-Cheng Li. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. Vet Microbiol. 2013 Aug 30; 165 (3-4): 275-80.

5) Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida

N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li TC. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. J Gen Virol. 2013. 12:2647-56.

6). Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Hideki Asanuma, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis. 2014. *In press*.

7) Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Tomoyuki Shiota, Sayaka Yoshizaki, Hiromu Yoshida, Mariko Saito, Toshifumi Imagawa, Fidelino F. Malbas, Socorro P. Lupisan, Hitoshi Oshitani, Takaji Wakita, and Koji Ishii. Molecular detection of Hepatitis E virus in rivers in the Philippines. Am J Trop Med and Hyg. 2014. *In press*.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, <u>Katayama K</u> , Oka T.	Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients.	Jpn J Infect Dis.	66	454-7	2013
Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, <u>Katayama K</u> , Mizutani T.	Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing.	J Vet Med Sci.	75	1651-5	2013
Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, <u>Katayama K</u> .	Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens.	PLoS One	8	e66534	2013
Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, <u>Katayama K</u> , Koopmans M.	Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping.	Arch Virol.	158	2059-68	2013
Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, <u>Katayama K</u> , Oka T.	Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams.	Food Environ Virol.	5	119-25	2013
<u>片山和彦</u>	ノロウイルスについて	健康教室	710	74-79	2013
<u>片山和彦</u>	ノーウォークウイルスの特徴と予防対策	食品機械装置	50	52-59	2013
<u>片山和彦</u>	ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム	感染症	253	12-13 19-21	2013
<u>片山和彦</u>	ノロウイルス感染のメカニズム	食と健康		9-17	2013
<u>片山和彦</u>	増加傾向にあるサポウイルス食中毒	食と健康		16-19	2013
<u>片山和彦</u>	ノロウイルスの感染予防	小学保険ニュース		1	2014

Higo-Moriguchi K, Shirato H, <u>Someya Y</u> , Kurosawa Y, Takeda N, Taniguchi K.	Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigens.	J. Med. Virol.	86	558-567	2013
Watanabe M, Phamduong E, Huang CH, Itoh N, Bernal J, <u>Nakanishi A</u> , Rundell K, Gjoerup O, Kasamatsu H.	Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells.	J. Virol.	87	5053-64	2013
Tange S, Zhou Y, Nagakui-Noguchi Y, Imai T, and <u>Nakanishi A</u>	Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase.	Virol. J.	10	153-164	2013
Diotti RA, <u>Nakanishi A</u> , Clementi N, Mancini N, Criscuolo E, Solforosi L, and Clementi M	JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes?	Clin. Develop. Immunol.	2013	Article ID 967581	2013
Takimoto K, Taharaguchi M, Sakai K, Takagi Y, <u>Tohya Y</u> , Yamada Y.	Effect of hypochlorite-based disinfectants on inactivation of murine norovirus and attempt to eliminate or prevent infection in mice by addition to drinking water.	Exp. Anim.	62	237-45	2013
Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, <u>Tohya Y</u> , Hayakawa S, Ushijima H.	The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers.	J Infect Chemother.	19	779-81	2013
Huch M, Bonfanti P, Boj SF, <u>Sato T</u> , 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
Hayashi A, <u>Sato T</u> , 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	711-22	2013
Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, <u>Sato T</u> , 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.	15	81-8	2014
Miyoshi J, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Ichikawa R, Yajima T, Okamoto S, Naganuma	Mucosal healing with oral tacrolimus is associated with favorable medium- and long-term prognosis in	J Crohns Colitis.	7	e609-14	2013

M, <u>Sato T</u> , Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T.	steroid-refractory/dependent ulcerative colitis patients.				
Miyake M, Toguchi H, Nishibayashi T, Higaki K, Sugita A, Koganei K, Kamada N, Kitazume MT, Hisamatsu T, <u>Sato T</u> , 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
Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, <u>Sato T</u> , 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
Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Saito H, <u>Sato T</u> , 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
Handa T, Kanai T, <u>Sato T</u> , 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
Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VSW, van de Wetering M, <u>Sato T</u> , Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries R, Grompe M, Clevers H.	<i>In vitro</i> expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration.	Nature	494	247-50	2013
Mawatari, T., Hirano, K., Tsunemitsu, H., <u>Suzuki T</u> .	Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010.	J. Gen. Virol.		in press	2014
Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, <u>Suzuki T</u> , Kanegae Y.	Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication.	Sci Rep		in press	
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., and Tsubouchi H.	Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4.	PLoS One	8	e82094, 1-7	2013
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Fukazawa H.	Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling.	Microbes Infect		in press	
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, <u>Suzuki T</u> .	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
Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K,	Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro.	PLOS ONE	8	e68992	2013

Suzuki R, Ichinose S, Wake K, <u>Suzuki T</u> , Miyamura T, Wakita T, Aizaki H.					
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, <u>Suzuki T</u> , 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
Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, <u>Suzuki T</u> , 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
Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, <u>Suzuki T</u> , Kato T, Maurel P, Wakita T.	Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells.	Gastroenterology	144	56-58	2013
Mori S., <u>Kusumoto-Matsuo R.</u> , 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
<u>Kusumoto-Matsuo R.</u> , 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	2014
Ishii Y., Nakahara T., Kataoka M., <u>Kusumoto-Matsuo R.</u> , 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
Kukimoto I., Maehama T., Sekizuka T., Ogasawara Y., Kondo K., <u>Kusumoto-Matsuo R.</u> , 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
Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, <u>Shoji I</u> , Wilcox CS, Lai EY, Han F.	Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo.	Antioxid & Redox Sign.	in press	doi: 10.1089/ars.2013.5381	2013
Ichimura T, Taoka M, <u>Shoji I</u> , 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	J. Cell. Sci.	126	2014-2026	2013
Ratnoglik SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., <u>Shoji I</u> , Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H.	Antiviral activity of extracts from Morinda citrifolia leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.	Microbiol. Immunol.		doi: 10.1111/1348-0421.12133	2014
Adianti M., Aoki C., Komoto M., Deng L.,	Anti-hepatitis C virus compounds obtained from	Microbiol. Immunol.		doi: 10.1111/134	2014

<u>Shoji I.</u> , Wahyuni T., Lusida M., Soetjipto S., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H.	Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species.			8-0421.12127	
Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., <u>Shoji I.</u> , Deng L., Aoki C., and Hotta H.	Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus.	Virolog. J.	10	259, 1-9	2013
El-Shamy A, Shindo M, <u>Shoji I.</u> , Deng L, Okuno T, and Hotta H.	Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	58	555-563	2013
<u>Li T.C.</u> , Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene			In press
Akazawa D., Moriyama M., Yokokawa H., Omi N., Watanabe N., Date T., Morikawa K., Aizaki H., <u>Ishii K.</u> , Kato T., Mochizuki H., Nakamura N. and Wakita T.	Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus was effective both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Gastroenterology	145	447-455	2013
Shiota T., <u>Li T.C.</u> , Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life-cycle: Implication in viral genome encapsidation and particle stabilization.	Journal of Virology	87	6031-3036	2013
石井孝司	A型肝炎、E型肝炎	臨床と微生物	41	72-78	2014
石井孝司、清原知子	A型肝炎ワクチン	BIO Clinica	28	25-29	2013
<u>Li TC</u> , Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Wakita T.	No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats.	Emerg Infect Dis.	19	1343-1345	2013
Guan D, Li W, Su J, Fang L, Takeda N, Wakita T, <u>Li TC</u> , and Ke CW.	Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China.	Emerg Infect Dis.	19	1341-1343	2013
Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, Ke CW, <u>Li TC</u> .	High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China.	Vet Microbiol.	165	275-280	2013
Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, <u>Li TC</u> .	Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses.	J Gen Virol	12	2647-2656	2013

