

## 培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の 開発と予防診断法に関する研究

**研究要旨** 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、その感染症対策が十分でないウイルスについて、診断技術・実験モデルの開発、予防・治療法開発のための基盤研究等を包括的に行う。食中毒、下痢症の原因であるヒトノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、ロタウイルス、最近同定された新規ヒトポリオーマウイルス(MCV、KIV、WUV など)、子宮頸癌の原因ウイルスであるヒトパピローマウイルス(HPV)、ウイルス性肝炎の原因ウイルスである E 型肝炎ウイルス(HEV)を対象とした。

NoV：マウス NoV はリバースジェネティックシステムで感染性粒子が産生可能であることが明らかになり、宿主特異性を規定するのはウイルスのエントリーから脱核までのステップにあることが示唆された。NoV 非構造蛋白を発現する RNA レプリコン候補遺伝子を作成した。マウス NoV の増殖に必要なシグナル伝達系の解析を行い、RAW264.7 細胞への感染に関与すると思われるプロテインキナーゼの同定に成功した。次世代シーケンサーを用いて、感染者体内に存在する NoV 配列を包括的に解析した結果、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判明した。韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物から、実験用マウス由来 NoV とは独立した新規 NoV を発見した。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すが、EGFP 発現レンチウイルスベクターを用いることにより、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。

ロタウイルス：ブタロタウイルス C 複数株の全ゲノム配列を初めて解読、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り、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。

ポリオーマウイルス：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。メルケル細胞がんの原因因子と考えられる 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い、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。

HPV：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、日本人の健常者 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。HPV16 型の E6 蛋白質の脱ユビキチン化を制御する脱ユビキチン化酵素 USP15 および不活化型 USP15 C269S を発現するバキュロウイルスを作製した。組換え蛋白質 FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S を昆虫細胞で発現させ、アフィニティ精製し、DUB-Glo protease assay を用いた試験管内アッセイ系を樹立した。

HEV：HEV のレプリコンを構築に成功し、HEV 構造蛋白をレプリコン保持細胞に供給することでトランスパッケージが行えることを確認し、1 回感染性の擬似粒子作成に成功した。Ferret HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、抗体検出系を構築した。実験用フェレットから抗 ferret HEV IgG および IgM 抗体が検出され、実験用フェレットでは ferret HEV 感染が稀ではないことが判明した。

研究代表者  
石井孝司 国立感染症研究所・室長

分担研究者  
鈴木哲朗 浜松医科大学・教授  
片山和彦 国立感染症研究所・室長  
李 天成 国立感染症研究所・主任研究官  
染谷雄一 国立感染症研究所・主任研究官  
松尾理加 国立感染症研究所・主任研究官  
勝二郁夫 神戸大学医学部・准教授  
鈴木 亨 動物衛生研究所・主任研究員  
中西 章 国立長寿医療研究センター・室長  
本村和詞 大阪大学微生物病研究所・特任准教授  
遠矢幸伸 日本大学生物資源科学部・教授  
佐藤俊朗 慶応義塾大学医学部・特任講師

研究協力者  
田中智之 堺市衛生研究所・所長  
柊元 巖 国立感染症研究所・室長  
石井克幸 国立感染症研究所・主任研究官

#### A. 研究目的

本研究班では、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、その感染症対策が十分でないウイルスについて、診断技術・実験モデルの開発、予防・治療法開発のための基盤研究等を包括的に行うことを目的とする。本研究で開発、確立されるウイルス増殖（モデル）系を利用することにより、これらのウイルスの感染増殖、病態発現の解析を進めることが可能になると考えられる。このような基盤的研究を発展させることにより、ウイルス性下痢症、子宮癌、慢性肝疾患等の制圧に貢献し、医療、福祉の向上に繋がり医療費の低減に寄与することが期待される。

#### B. 研究方法

##### 1. ノロウイルス（NoV）

##### 1-1 マウスノロウイルス（MuNoV）感染性粒子の構成成分の性状

感染性粒子の構成成分を確認するため、MuNoVのVPgコード領域にメチオニン(Met)を導入するための変異を挿入した。また、VP2の機能ドメインスキャンのためにTetra cysteine tagを導入した。塩化セシウム浮上密

度勾配遠心法によって、ウイルスを精製し、分取したフラクションを $\alpha$ VP1抗体と $\alpha$ ウサギIgGマグネティックビーズを用いて免疫沈降し、SDS-PAGEにより解析した。

##### 1-2 NoV レプリコンの構築

全塩基配列が解明されている NoV チバ株（GI.4）RNA レプリコン候補遺伝子作成のため、C型肝炎ウイルス（HCV）JFH-1 株由来のIRES 支配下に置かれたネオマイシン耐性遺伝子（Neo）断片、GFP 融合 Neo 断片、分泌型 NanoLuc（secNLuc）遺伝子断片を導入した。

##### 1-3 増殖に必要なシグナル伝達系の解析

MuNoV S7 株を RAW264.7 細胞に感染させ、MuNoV 感染時からキナーゼ阻害剤 120 種類を加え、各阻害剤による細胞生存性そのものに対する影響、cytopathetic effect への効果を調べた。また、いくつかのサンプルでは 48 時間後の培養上清よりウイルス RNA 量を定量 RT-PCR により評価した。

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pT7 MuNoVS7 に対して、トランスポゾン Tn5 を用いてランダムに挿入変異を引き起こしたライブラリーを作成した。これらライブラリーより各所に Tn5 挿入変異をもつ MuNoVRNA を作成し、293T 細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作成した。その培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させ、増殖する組換えウイルスのうち、Tn5 配列をもつウイルスを RT-PCR で同定し、その挿入位置を配列決定した。

##### 1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実態

2006 年 05 月 15 日から 2013 年 03 月 10 日の間に、20 の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にて 2006 年 05 月～2011 年 03 月の間に全 20 カ所の衛生研究所で収集され、全ゲノム情報が判明した 395 検体のうち、ヒト-ヒト感染が疑われる症例：4 例、集団食中毒事例：5 例、散発食中毒事例：15 例、計 24 例を無作為に抽出し、カプシド遺伝子シェル領域配列を調べた。cDNA を template にして、カプシド遺伝子シェル領域を PCR で増幅した。Roche GS 454 FLX Titanium を用い

て、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-house の配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。

#### 1-5 野ネズミ由来 NoV の検出と培養細胞での分離の試み

各地で捕獲されたアカネズミ、ハタネズミ、クマネズミ、ドブネズミなどを含む計 222 検体の野ネズミ由来糞便または腸管内容物から total RNA を抽出し、ORF3 内の保存領域をもとにデザインしたプライマーペアを用い RT-PCR 及び遺伝子解析を行った。NoV ゲノムが検出された検体については、乳剤の遠心上清を RAW264.7 細胞に接種しウイルス RNA の検出を行うことにより、ウイルス増殖の有無を検討した。

#### 1-6 培養腸管上皮細胞感染系の確立

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) により培養を行った。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。

### 2. ロタウイルス

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。

### 3. ポリオーマウイルス

#### 3-1 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

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を昆虫細胞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)。

#### 3-2 MCPyV による lncRNA の発現変動

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 を 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。

### 4. パピローマウイルス (HPV)

#### 4-1 日本人での高リスク型 HPV 抗体の保有状況の調査

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。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。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。

#### 4-2 Wee1 による HPV DNA 維持複製の調節機構

PV16 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 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。エピゾーム DNA を抽出し、HPV16 ゲノムをリアルタイム 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、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ト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 およびその欠失変異体と FLAG-16E1 を強制発現させ、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。また逆に、16E1 の Wee1 との結合に必要な領域も同様に同定した。

293 細胞において、Wee1 と 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測定した。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。

#### 4-3 in vitro USP15 assay 系の作製

Hi5 細胞に FLAG-USP15, FLAG-USP15 C269S を発現する組換えバキュロウイルスを感染させ、FLAG beads で組換え蛋白質をアフィニティ精製した。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。

#### 4-4 大腸菌における Avi-His<sub>6</sub>-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、Avi-His<sub>6</sub>-USP15 UCH(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)を大腸菌 DH5 $\alpha$  で発現させ、HisTrap HP(GE Healthcare)を用い、アフィニティ精製した。

#### 4-5 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、His<sub>6</sub>-E1, MEF-E6AP, His<sub>6</sub>-UbcH7, GST-11E6, GST-16E6 を組換え蛋白として発現、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。

### 5. E 型肝炎ウイルス (HEV)

#### 5-1 HEV レプリコンの構築

感染性の HEV クローンの構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換したレプリコン RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞に導入し、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。

#### 5-2 フェレット HEV 様粒子の作製およびその応用

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 を発現させウイルス様粒子 (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。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

#### 1. ノロウイルス (NoV)

##### 1-1 MuNoV 感染性粒子の構成成分

塩化セシウム浮上密度勾配遠心後、密度 1.36 g/cm<sup>3</sup> を中心に VP1 のバンドが検出された。VP1 を 1 感染性粒子当たり 180 分子とすると、VP2 は、12 分子、VPg は 24 分子内包されていることが示唆された。

内包されている VPg のどのアミノ酸残基に RNA との結合に関与しているかを調べるため、RNA との結合が予測されているチロシン (Y) 残基をフェニルアラニン (F) に

置き換えたクローンを作製し、感染性粒子産出に与える影響を調べた。Y26, Y45 は感染性粒子産生能が消失した。つまり、Y26, Y45 に RNA との結合部位があることが示唆された。Y40, Y117 は、感染性粒子放出が認められ、3 継代してもリバートは認められなかった。

VP2 の機能ドメイン検索を行った。VP2 のアミノ酸配列から 2 次構造を予測し、Tetracycline tag(TCtag)を挿入したミュータントクローンを 7 種類作製した。感染性粒子の産生が認められたのは、C 末端に予想されたベータシートに tag を挿入したクローンのみであり、VP2 の C 末端に予想されたベータシート以外は、VP2 の機能に参与している可能性がある。

### 1-2 NoV レプリコンの構築

培養細胞での NoV 粒子形成機構を解明するため、RNA レプリコンの作成を試みた。チバ株 (GI.4) の ORF1 遺伝子下流に C 型肝炎ウイルス由来の IRES とネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ cDNA を作成した。また、MuNoV は培養細胞で増殖が可能であるので、その遺伝子を利用して複製可能な RNA レプリコンを作り出すことが可能であると期待される。また、ヒトノロウイルスの RNA レプリコン作成において良い対照となると思われる。同様にレポーター遺伝子を組み込んだレプリコンを作製した。

### 1-3 増殖に必要なシグナル伝達系の解析

プロテインキナーゼ阻害剤から MuNoV 増殖阻害効果のあるものをスクリーニングしたところ、PI3K, mTOR,そして ATM の各キナーゼに対する複数の阻害剤でウイルス感染による細胞障害性に対する阻害が見られた。そのほかにも、EGF 受容体、polo-like kinase, p38MAPK などの阻害剤でも細胞障害性の抑制が観察された。一方、FLT3 kinase, c-MET, VEGF 受容体の阻害剤では、ウイルス感染による細胞死を促進する効果が観察された。同様な結果は、Aurora キナーゼ、Burton tyrosine キナーゼ阻害剤でも見られた。これらのウイルス感染による細胞障害性に対して阻害/抑制、促進効果が見られた際の細胞上清中ウイルス RNA 量は、抑制され

ている際には減少、促進されている際には増加していた。しかし細胞死が促進されている場合には、阻害剤抜きで通常感染の際の上清中ウイルス量には及ばなかった。

MuNoV S7 株全長を組み込んだ pT7 MuNoVS7 に対して、Tn5 トランスポゾンによりカナマイシン耐性遺伝子をランダムに挿入し、カナマイシン耐性株を選択することでトランスポゾン挿入クローンを選別した。得られた組換え MuNoV から感染増殖に影響の無い Tn5 配列の挿入位置、MuNoV nt# 2513 を同定した。この位置は、ORF1 の NS3 コード領域内で、NS3 の 131 番目アミノ酸残基 Lys と 132 番目の Thr の間に挿入されていた。このクローンは、野生型と同程度の増殖が認められた。しかしながらこの部位に Venus 蛍光タンパク質配列 (714bp) あるいはプラストサイジン耐性遺伝子配列 (393bp) を挿入した場合は、増殖クローンを得ることはできなかったため、長い配列の挿入は難しいと考えられた。

### 1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実態

混合感染は、24 検体中 9 検体 (ヒト-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) で検出された。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。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。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。

### 1-5 野ネズミ由来 NoV の検出と培養細胞での分離の試み

韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物 4 検体から NoV のゲノム由来と考えられる 392bp の増幅産物が検出された。その塩基配列を決定し、系統樹を作製したところ、実験用マウス由来 NoV

とは独立した野ネズミ由来の NoV の枝をヨーロッパモリネズミ由来 NoV とともに形成し、新規 NoV であることが示された。実験用マウス由来の NoV が増殖可能である株化細胞 (RAW264.7) を用いて、RT-PCR 陽性であった 4 検体からのウイルス分離を試みたが、CPE の発現並びにウイルス RNA 量の増加も認められなかった。

#### 1-6 培養腸管上皮細胞感染系の確立

ヒト小腸・大腸上皮から樹立され、長期培養が可能になったヒト培養オルガノイドを用いて GFP 発現ウイルス感染系の確立を試みた。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、培養培地の最適化を行い、感染細胞の長期培養に成功した。

## 2. ロタウイルス

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、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、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り、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。

## 3. ポリオーマウイルス

3-1 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 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。

#### 3-2 MCPyV による lncRNA の発現変動

large T 抗原(LT)とそのスプライシングバリエーション(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 ILOC643650 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。

## 4. パピローマウイルス (HPV)

4-1 日本人での高リスク型 HPV 抗体の保有状況の調査

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。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。

4-2 Wee1 による HPV DNA 維持複製の調節機構

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。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。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により、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。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ところ、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。

#### 4-3 in vitro USP15 assay 系の作製

DUB-Glo protease assay 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。

#### 4-4 大腸菌における Avi-His<sub>6</sub>-USP15 UCH の発現と精製

Avi-His<sub>6</sub>-USP15 UCH 蛋白質を大腸菌 DH5 $\alpha$  で発現させアフィニティ精製した。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。

### 5. E 型肝炎ウイルス (HEV)

#### 5-1 HEV レプリコンの構築

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、培養上清を濃縮しシヨ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。

#### 5-2 フェレット HEV 様粒子の作製およびその応用

Ferret HEV ORF2 全長の 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。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、アメリカから輸入され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

#### ノロウイルス

これまで、感染性ウイルス粒子に内包されているウイルス蛋白質は、ウイルス様中空粒子の研究結果から、VP1 が 180 分子、VP2 が 1-2 分子、VPg が 1 分子内包されるのではないかと予想されていた。しかし、本研究により、VP2, VPg とともに複数分子が内包されており、粒子の骨格を構築している可能性が示された。VP2 の C 末端に予想されたベータシート以外は、VP2 の機能に関与している可能性がある。

プロテインキナーゼ阻害剤パネルを用いてウイルス増殖阻害効果のあるものを、スクリーニングした結果、PI3K, mTOR,そして ATM の各キナーゼに対する複数の阻害剤でウイルス感染による細胞障害性に対する阻

害が見られた。これらの阻害剤の作用点を詳細に解析することにより、新規の抗ノロウイルス薬剤開発が期待される。また、ウイルス感染による細胞死を見かけ上促進したように見えるキナーゼ阻害剤については、培養細胞を HuNoV 増殖に誘導できるような薬剤スクリーニング系の開発を視野に入れつつ、その作用点について引き続き解析を行う予定である。

Tn5 トランスポゾンを用いたランダム挿入により作成したライブラリーより単離した増殖クローンは、MuNoV ゲノム 2513 番目塩基(ORF1, NS3 コード領域)へ Tn5 配列が挿入されていた。Tn5 配列挿入によるウイルス増殖への影響は見られなかったため、この領域は遺伝子改変に比較的寛容であると考えられる。大きな遺伝子挿入は難しいが、NS3 と VP2 のコード領域がある程度遺伝子改変に耐性があることが明らかになったため、これらの領域の改変を中心に、MuNoV の HuNoV 化のアプローチを模索している。

計 222 検体の野ネズミ由来の糞便または腸管内容物を用いて、RT-PCR により NoV を検索したところ、韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミ 4 検体から新しい NoV が検出された。実験用マウス由来 NoV が増殖することが知られている、マウスマクロファージ由来の株化細胞である RAW264.7 細胞での分離はできなかったが、今後、全ゲノム塩基配列の決定に加えて、チェジュセスジネズミまたは近縁のネズミ由来の器官や組織を用いた組織培養法を開発し、新しい NoV 培養系並びに動物モデルの開発が期待される。

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。

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。

#### ロタウイルス

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が、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変異に富んでいることが明らかとなった。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設定した世界スタンダードの遺伝学的分類基準(カットオフ値)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。

#### ポリオーマウイルス

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を示されたため、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。ポリオーマウイルスが糖鎖クラスターにより凝集沈殿することを初めて示した。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 BKPpyV, JCPyV より高いことが関連しているかもしれない。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。

#### パピローマウイルス

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。

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、この仮説を実証するためさらに検討を進める。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。

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複数の系の構築に成功した。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る。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 型肝炎ウイルス

HEV replicon が包埋された粒子 (trans-packaging particles) の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高く、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。

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。

## E. 結論

### ノロウイルス

MuNoV をモデルとして、感染性粒子を構

成するウイルス蛋白質が VP1, VPg, VP2 であることを示した。VPg と VP2 は、従来の報告とは異なり、1 ウイルス粒子に複数パッケージングされていることが示唆された。VPg, VP2 の機能解析の結果、VPg にはチロシン残基に RNA が結合している可能性があること、VP2 の c 末端側のベータシートを除き、他の構造は感染性ウイルス粒子産生に必須である事を明らかにした。

NoV チバ株の RNA レプリコン候補遺伝子を作成した。その対照としてマウスノロウイルスの RNA レプリコン候補遺伝子も作成した。

MuNoV の感染増殖に関わるシグナル伝達系を解析する目的で、キナーゼ阻害剤パネルを用い、RAW264.7 細胞への MuNoV 感染に関与すると思われるプロテインキナーゼを同定した。また、Tn5 トランスポゾンを用いたランダム挿入を用いて、MuNoV ゲノム内で短い外来配列を挿入できる部位を同定した。

新規動物 NoV をチェジュセスジネズミから検出した。

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。

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。

### ロタウイルス

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。

### ポリオーマウイルス

糖鎖クラスター効果を利用して、ヒトポリオー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。

### パピローマウイルス

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。

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 コピキチンリガーゼ E6AP による HPV 11E6, 16E6 の *in vitro* コピキチン化アッセイ系を樹立した。

## HEV

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。

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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)
3. 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)
4. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微

- 生物 41: 72-78 (2014)
5. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
6. Harada S., Tokuoka E., Kiyota N., Katayama K., Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Journal of Infectious Diseases*, 66: 454-457 (2013)
7. 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., Katayama K., Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75: 1651-1655 (2013)
8. Murakami K., Kurihara C., Oka T., Shimoike T., Fujii Y., Takai-Todaka R., Park Y., Wakita T., Matsuda T., Hokari R., Miura S., Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLOS ONE*, 8: e66534 (2013)
9. Kroneman A., Vega E., Vennema H., Vinjé J., White PA., Hansman G., Green K., Martella V., Katayama K., Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, 158: 2059-2068 (2013)
10. Iizuka S., Takai-Todaka R., Ohshiro H., Kitajima M., Wang Q., Saif LJ., Wakita T., Noda M., Katayama K., Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food and Environmental Virology*, 5: 119-125 (2013)
11. 片山和彦 ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン *BIO Clinica* 28: 30-35 (2013)
12. 片山和彦 ノロウイルス(ノーウォークウイルス)のGII.4 2012変異株 *日本医事新報* 4637: 6061 (2013)
13. 片山和彦 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)
14. 片山和彦 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)
15. 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム *食と健康* 10月号 9-17 (2013)
16. 片山和彦 増加傾向にあるサポウイルス食中毒 *食と健康* 11月号 16-19 (2013)
17. Watanabe M., Phamduong E., Huang CH., Itoh N., Bernal J., Nakanishi A., Rundell K., Gjoerup O., Kasamatsu H. Formation of covalently modified folding intermediates of

- simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells. *Journal of Virology*, 87: 5053-5064 (2013)
18. Tange S., Zhou Y., Nagakui-Noguchi Y., Imai T, and Nakanishi A. Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase. *Virology Journal*, 10: 153 (2013)
  19. Diotti RA., Nakanishi A., Clementi N., Mancini N., Criscuolo E., Solfrosi L, and Clementi M. JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes? *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: Article ID 967581, (2013)
  20. Higo-Moriguchi K., Shirato H., Someya Y., Kurosawa Y., Takeda N., Taniguchi K. Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigens. *Journal of Medical Virology*, 86: 558-567 (2013)
  21. Takimoto K., Taharaguchi M., Sakai K., Takagi Y., Tohya Y., 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. *Experimental Animals*, 62: 237-245 (2013)
  22. Shimizu-Onda Y., Akasaka T., Yagyu F., Komine-Aizawa S., Tohya Y., Hayakawa S., Ushijima H. The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19: 779-781 (2013)
  23. Huch M<sup>#</sup>, Bonfanti P<sup>#</sup>, Boj SF<sup>#</sup>, Sato T<sup>#</sup>, 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. *The EMBO Journal*, 32: 2708-2721 (2013) <sup>#</sup>Equal authorship
  24. 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*, 13: 711-722 (2013)
  25. 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 Biology Therapy*, 15: 81-88 (2013)
  26. 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. *Journal of Crohn's & Colitis*, 7: 609-614 (2013)
  27. 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. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102: 2564-2571 (2013)
  28. 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)
  29. Matsumoto A., Kanai T., Mikami Y., Chu PS., Nakamoto N., Ebinuma H., Saito H., Sato T., Yagita H., Hibi T. IL-22-producing ROR $\gamma$ t-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. *PLOS ONE*, 8: e62853 (2013)
  30. Handa T., Kanai T., Sato T., Mikami Y., Sujino T., Hayashi A., Mizuno S., Matsumoto A., Hisamatsu T., Hibi T. *Immunology letters*, 150: 123-129 (2013)
  31. 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: 247-250 (2013)
  32. Mawatari T., Hirano K., Tsunemitsu H., Suzuki T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010. *Journal of General Virology*, in press.
  33. 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. *Scientific Reports*, in press.
34. 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.
  35. 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 and Infection*, in press.
  36. 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 Pathogens*, 9: e1003589 (2013)
  37. 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)
  38. 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- $\beta$  type I receptor. *Scientific Reports*, 3: 3243 (2013)
  39. 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 and Infection*, 15: 45-55 (2013)
  40. 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)
  41. 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 Journal*, 11: 11 (2014)
  42. 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.
  43. 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)
  44. 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)
  45. 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*, [Epub ahead of print] (2014)
  46. 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*, 126: 2014-2026 (2013)
  47. 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.
  48. 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.
  49. 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 (2013)
50. 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*, 10: 259, 1-9 (2013)
  51. 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*, 58: 555-563 (2013)
  52. Li T.C., Ami Y., Suzaki Y., Takeda N., Takaji W. No Evidence for Hepatitis E Virus Genotype 3 Susceptibility in Rats. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 1343-1345 (2013)
  53. Dawei Guan., Wei Li., Juan Su., Ling Fang., Naokazu Takeda., Takaji Wakita., Li T.C. and Changwen Ke. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 1341-1343 (2013)
  54. Wei Li., Dawei Guan., Juan Su., Naokazu Takeda., Takaji Wakita., ChangWen Ke., Li T.C. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Veterinary Microbiology*, 165: 275-280 (2013)
  55. Yang T., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Kishida N., Shirakura M., Imai M., Asanuma H., Takeda N., Wakita T., Li T.C. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. *The Journal of General Virology*, 12: 2647-2656 (2013)
  56. Li T.C., Tingting Y., Yasushi A., Yuriko S., Masayuki S., Noriko K., Hideki A., Naokazu T. and Wakita T. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. *Emerging Infectious Diseases*, in press.
2. 学会発表
1. 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.
  2. 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
  3. 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
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  10. 1. Nakanishi A., Takagi H, Murakami K, Oka T, Todaka R, Tohya Y, and Katayama K Adaptive mutation of murine norovirus S7 strain important for growth in RAW264.7 cells. *American Society for Virology* (2013)

- July 22, State College, Pennsylvania, United States
11. Katayama K, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka T, Guix S, Sharp TM, Atmar RL, Crawford SE, and Estes MK A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA 5th International Calicivirus Conference Oct. 12, (2013) Beijing, China
  12. 中西 章, 丹下正一朗, 野口裕子, 周妍 アストロウイルス感染とオートファジー 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月12日 神戸
  13. Nakanishi A, Tange S, Noguchi Y, Zhou Y Association of autophagic process during human astroviral infection 第36回日本分子生物学会 2013年12月5日 神戸
  14. 染谷雄一, 守口匡子, 白土東子, 武田直和, 奥野良信, 黒澤良和, 谷口孝喜「ヒト型抗ノロウイルス抗体によるノロウイルス粒子-血液型抗原相互作用の阻害」第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013年9月11-13日
  15. 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, 久保田智巳「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学術総会, 神戸, 2013年11月10-12日
  16. 染谷雄一「ノロウイルスプロテアーゼの基質特異性について」日本薬学会第134年会, 熊本, 2014年3月27-30日
  17. Suzuki, T., Tsunemitsu, H. Molecular characterization of animal rotavirus C. Pennsylvania, USA, Jul 20-24,2013.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
  22. 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.
  23. Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
  24. 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.
  25. 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.
  26. Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 淵野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 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.
  27. 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 $\alpha$  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.
  28. 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.
  29. 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.
30. 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：ノトバイオート豚を用いた実験的豚 B 群口タウ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
  31. 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：ノトバイオート豚を用いた実験的豚 B 群口タウ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
  32. 鈴木 亨、長谷部文子、宮崎綾子、恒光裕：国内で検出した豚 C 群口タウ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
  33. 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
  34. Suzuki, T. Genetic analysis on nonstructural protein 1 of porcine rotavirus C. 5th European rotavirus biology meeting, Valencia, Spain, Oct 6-9, 2013.
  35. 鈴木 亨、長谷部文子、宮崎綾子、恒光裕：動物由来 C 群口タウ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
  36. 森 清一郎、松尾 理加、柊元 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
  37. 石井 克幸、中原 知美、森 清一郎、竹内 隆正、柊元 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
  38. 松尾 理加、森 清一郎、前濱 朝彦、柊元 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
  39. 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
  40. 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.
  41. 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.
  42. 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.
  43. Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
  44. 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.
  45. Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
  46. 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.
  47. 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.
  48. 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 及び半合成誘導体 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.
49. 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 $\alpha$  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.
  50. 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.
  51. 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.
  52. 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.
  53. 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.
  54. 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.
  55. 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.

G. 知的所有権の取得状況

なし