

201420036A

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成27(2015)年 3月

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成27(2015)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 1
石井 孝司

II. 分担研究報告

1. ノロウイルス感染、複製機構の研究
カリシウイルスのリバースジェネティクス 17
片山 和彦
2. ノロウイルス複製機構について 23
染谷 雄一
3. マウスノロウイルスのベクター化に関する研究 27
中西 章
4. ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団の包括的
遺伝系統解析 31
本村 和詞
5. 野生ネズミ由来ノロウイルスの遺伝子解析 35
遠矢 幸伸
6. ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立 37
佐藤 俊朗
7. ウシロタウイルスの発生動向と遺伝学的特性 41
鈴木 亨

8. 高感度ウイルス検出技術の開発 メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染侵入機構・・・・・・・・・・	45
鈴木 哲朗	
9. ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌 ・・・・・・・・	49
佟元 巖	
10. 新規抗 HPV 薬開発のための基盤研究 ・・・・・・・・・・	53
勝二 郁夫	
11. E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築および増殖メカニズムの解明・・・	57
石井 孝司	
12. Rat HEV の細胞培養およびリバーシジェネティクス法による Rat HEV の 作成 ・・・・・・・・・・	61
李 天成	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ・・・・・・・・・・	65

I. 総括研究報告

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 : ヒトおよびマウス NoV の感染性クローンにレポーター遺伝子を組み込むことに成功した。感受性細胞の探索や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。また、小腸のオルガノイドを使ってヒト NoV を培養できるか検討を開始した。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 VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によってウイルス遺伝子発現が誘導されたことから、NoV において初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になった。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、優位に検出された GII.4 2006b 亜株は、どの集団でもウイルスコピー数が高く、複製能・増殖能に優れたウイルスである可能性が示唆された。韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミ由来 NoV は、実験用マウス由来 NoV とは異なる新規 NoV のグループに属することを明らかにした。

ロタウイルス : ウシならびにブタロタウイルス B 複数株を用いた遺伝子解析の結果、動物由来ロタウイルス B は国内外問わず、異なる遺伝的背景を有する複数の株が世界中に存在・まん延していることが明らかとなった。

ポリオーマウイルス : Pseudovirion を利用した感染モデル系から、ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

HPV : 一部の子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) の擦過細胞検体において、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に C to T の置換変異が蓄積している現象 (hypermutation) を見出した。また HPV16 ゲノムを維持する CIN 由来のヒト培養細胞において APOBEC タンパク質を強制的に発現させると、同様の hypermutation が HPV16 ゲノムの E2 遺伝子に導入された。APOBEC タンパク質が HPV ゲノムに hypermutation を導入し、HPV ゲノムの細胞 DNA への組込みを容易にすることで、子宮頸部発癌に関わる可能性が示唆された。脱ユビキチン化酵素 USP15 の脱ユビキチン化酵素活性を阻害する小分子のスクリーニングおよび特殊ペプチドの開発を試み、インヒビターライブラリー320 コンパウンドから最終的に 5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

HEV : HEV の構造蛋白領域をレポーター遺伝子に置き換えたレプリコンを作成し、化合物ライブラリから現在までに複数の HEV レプリコン増殖阻害を有する化合物を同定した。Rat HEV が増殖できる細胞培養系を樹立した。また、in vitro で合成した完全長の rat HEV RNA をヌードラット肝臓に直接接種したことにより、感染性をもつ Rat HEV を獲得した。

高感度ウイルス検出技術の開発 : 局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、免疫クロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出しうることを明らかにした。

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
柊元 巖 国立感染症研究所・室長
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・特任准教授

研究協力者

田中智之 堺市衛生研究所・所長
石井克幸 国立感染症研究所・主任研究官
朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所・教授
佐藤 豪 日本大学生物資源科学部 助手
朴 英斌 国立感染症研究所・研究員
戸高玲子 国立感染症研究所・非常勤職員
吉田和央 国立長寿医療研究センター・流動研究員

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 MuNoV、HuNoV のリバースジェネテ

ックシステム (RGS)

pHuNoV_{U201F} を骨格として、U201 株 cDNA 部分を MNV genome cDNA に置き換え、pMNV_{S7F} を構築した。株化細胞 (HEK293T) に HuNoV pKS-U201F または pKS-FCV-F をトランスフェクションした後上清を回収し、感受性細胞がある MNV は RAW264.7 細胞株に感染させ TCID₅₀ を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス titer を定量した。

GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子を作るべく、ORF1 に GFP 遺伝子を導入した。また、細胞内で RdRp の活性を可視化してモニターするために、ORF2 に GFP を導入した。また、活性を数値化するために、ウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) やナノルシフェラーゼ (Nluc) をレポーターとして導入した。

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。また、細胞培養が可能ながげっ歯動物ノロウイルス MuNoV1 株についても同様の操作を行った。

1-3 MuNoV のベクター化

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS MuNoV S7 DNA を元に、MuNoV ORF3 の一部欠損変異体を作製した。また、MuNoV の ORF2 および 3、ORF3 単独を発現するベクター (pKS MNV ORF23 あるいは pKS MNV ORF3) も作成した。これらの pKS MNV S7 DNA そしてその変異体を単独に、あるいは ORF2、3 を発現するプラスミドと共に 293T 細胞にトランスフェクションによって導入し、その培養上清を RAW264.7 細胞に感染させた。MuNoV 遺伝子発現の有無を VP1/VPg の免疫染色により確認し、293T 細胞上清の感染性粒子の存在を検証した。

1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実態

2012 年 3 月に島根県で発生した集団食中毒

事例を対象に解析した。原因施設調理従事者 (n=7) から、汚染食材を介して、原因施設弁当喫食者 (n=9)、関連他施設 A 料理喫食者(n=3)、関連他施設 B 料理喫食者(n=6)と感染拡大した集団食中毒事例を対象とした。糞便試料を出発材料とし、カプシド遺伝子シエル領域の配列情報を取得し、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

昨年度の研究で NoV 遺伝子が検出された 4 検体のチェジュセスジネズミ由来腸管内容物の Total RNA から RT-PCR を行い、増幅産物が得られた場合は塩基配列を常法に従い決定した。

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 2011 年にかけて山形県内で検出されたウシロタウイルス B 12 株を材料に使用した。それら複数株の VP1, VP2, VP6, VP7, NSP1, NSP2 および NSP5 の 8 つの遺伝子について、RT-PCR 法で ORF 全長を増幅し、シーケンス解析を実施した。今回決定したウシロタウイルス B 12 株の各種遺伝子情報から系統樹解析を実施し、本ウイルスの起源並びに生態を明らかにすることを試みた。

3. ポリオーマウイルス

ポリオーマウイルスのカプシドをもつ psudovirion を以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち分

型 Gaussia ルシフェラーゼ(Gluc)を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、連続密度勾配遠心により分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 psudovirion を回収した。

4. パピローマウイルス (HPV)

4-1 ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

HPV16 陽性の子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の擦過細胞から DNA を抽出して、Differential DNA Denaturation PCR(3D-PCR)法により、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内の A/T-rich hypermutation について検討した。臨床検体は、NTT 東日本関東病院・産婦人科の近藤一成先生より供与を受けた。また、CIN 由来の W12 細胞を用いて、APOBEC3 タンパク質による HPV16 ゲノムへの変異導入の可能性についても、3D-PCR 法にて検討した。

4-2 in vitro USP15 assay 系の作製

昨年、樹立した DUB-Glo protease assay による in vitro USP15 assay 系を用いて inhibitor library から阻害活性物質をスクリーニングを行った。阻害活性の陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にした USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析した。

4-3 大腸菌を用いた Avi-His₆-USP15 UCH の精製と結合ペプチドのスクリーニング

Avi-His₆-USP15 UCH(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)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。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 Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した (東京大学理学部、菅裕明教授との共同研究)。

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 83-2 の構造蛋白領域をレポーター遺伝子 (SecNanoLuc) で置換した cDNA を作成し、合成した RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞に導入するとレプリコンが複製しレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) が分泌されることを確認した。レポーターの分泌を指標にレプリコン複製を阻害する物質のスクリーニングを行った。

5-2 ラット HEV の解析

Rat HEV を感染したヌードラット (Long Evans *rmu/rmu*) の便材料をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清中の rat HEV の増殖を、電子顕微鏡や免疫染色で確認した。また、感染細胞培養上清をヌードラットに接種することにより産生されたウイルスの感染性を確認した。

リバースジェネティクス法による rat HEV 作製をするため、rat HEV ドイツ株 (GU345042) から ratHEV RNA を合成し、ヌードラット肝臓に直接接種した。経時的に採血、採便し、血中および便中の Rat HEV RNA を RT-PCR 法により測定し、ウイルス増殖の有無により、全長 rat HEV RNA の感染性を評価した。また、感染ヌードラット糞便中の Rat HEV の感染性を確認した。

6 高感度ウイルス検出技術の開発

表面を凹凸加工した金ナノプラスフィルム (NPGL) をシステアミン処理しアミノ基または量子ドット (QD) 表面にアミノ基修飾を施した。抗インフルエンザウイルス HA 抗体を *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) / *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 処理した後、上記 NPGL、QD にそれぞれコンジュゲートした。蛍光測定用 96 ウェルプレート各ウェルに抗 HA 抗体-NPGL を入れ、種々の濃度のインフルエンザウイルス液を添加。さらに抗 HA 抗体-QD を添加し反応させ、励起 380 nm、発光 518 nm 波長で蛍光強度を測定した。

C. 研究結果

1. ノロウイルス (NoV)

1-1 MuNoV、HuNoV の RGS

蛍光タンパク質遺伝子を内包した感染性粒子作製の試み

GFP 遺伝子を NTPase コード領域と 3A-like protein コード領域の間に挿入したコンストラクトを、細胞のトランスフェクションすると、細胞内部にブロードに GFP の発光が認められた。上清からウイルスを精製し、電子顕微鏡で観察すると、産生効率は低いが生ウイルス粒子が観察された。生ウイルス粒子から RNA を抽出し、抽出した RNA を細胞内にトランスフェクションすると、細胞に GFP のシグナルが認められた。この結果は、生ウイルス粒子は GFP が挿入されたゲノムを内包しており、そのゲノムは細胞内で自己複製が可能であることを示唆していた。

生ウイルス粒子の感染性を確かめるため、MNV を用いて、GFP 遺伝子の挿入を試みた。N-terminal protein と NTPase の間のみ GFP 遺伝子の受け入れが許され、それ以外の場所は RGS が稼働しなかった。GFP を挿入したクローンを 293T 細胞にトランスフェクションし、回収した上清を MNV 感受性細胞である RAW264.7 細胞に感染させ、GFP の蛍光を観察した。本実験で産生される感染性粒子への GFP 遺伝子内包には成功したが、GHFP 遺伝子は複製過程で排除されるか、リバータントの出現によって、淘汰されていると考えられた。

細胞内 RdRp 活性測定法構築の試み

RdRp の活性測定のため、GFP を ORF2 に組み込んだ pHuNoV_{U201F-2GFP} とネガティブコントロールを、それぞれ COS7 細胞にトランスフェクションして、GFP の発現を観察したところ、トランスフェクション 12 時間後から GFP の発色が認められ、GFP が発現している細胞の数、発色強度は、30、36 時間に最大になった。それに対し、ネガティブコントロールをトランスフェクションした細胞では、48 時間後に至っても GFP の発色は認められなかった。

次に、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201FΔ4607G-2RS} を用いてルシフェラーゼによる RdRp 活性の定量化を検討したところ、トランスフェクション後 6 時間から上昇を始め、24 時間でピークに達した後、42 時間後にはバックグラ

ウンドと同レベルにまで低下した。他方、ネガティブコントロールをトランスフェクションした細胞のルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション後 6 時間から徐々に上昇を始めたが、42 時間でピークに達した後、48 時間後に向けて低下した。ピーク時の 24 時間では、pHuNoV_{U201F-2RS}、pHuNoV_{U201FA4607G-2RS} トランスフェクション細胞のルシフェラーゼ活性の差は 8 倍程度の開きがあり、24 時間後には RdRp 活性の定量、活性差測定が可能であると思われた。

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。HuNoV チバ株 (GI.4) と MuNoV のレプリコン数種を構築し、Vero 細胞に導入したが現在のところ薬剤耐性を示す細胞は得られていない。構造蛋白を恒常的に発現する細胞株は、現在薬剤耐性細胞を取得しており、目的蛋白の発現について確認を行っている。

1-3 MuNoV のベクター化

MuNoV 感染性ゲノム配列をコードする pKS MNV S7 の VP2 コード領域 (ORF3) の欠損変異、あるいは stop codon 導入による点変異の各変異体を 293T 細胞にトランスフェクションし、その細胞上清を RAW264.7 細胞に共培養させることにより感染性粒子の形成を調べた。全ての変異体について 293T 細胞に導入した際の細胞上清には、RAW264.7 細胞を VP1/VPg 陽性にできるものではなく、感染性粒子の形成は見られなかった。以上の変異体についてさらに、293T 細胞へ pKS MNV ORF23 あるいは pKS MNV ORF3 との共導入を行い、293T 細胞内での VP2 の補完を試みたが、その細胞上清の中には RAW264.7 細胞を VP1/VPg 陽性にできるものはなかった。しかし同じ上清を RAW VP2 と共培養したところ、293T 細胞への欠損および点変異体と pKS MNV ORF3 の共導入、 ΔM と pKSMNV ORF23 の共導入で得られたその細胞上清には RAW VP2 細胞でウイルス遺伝子発現を示す VP1/VPg 陽性細胞の出現が認められた。

1-4 NoV 感染者体内における混合感染の実

態

25 検体からカプシド遺伝子シェル領域の配列情報を取得したところ、シェル領域の遺伝系統が異なるウイルス亜集団の重感染は、25 検体中 23 検体で検出された。食中毒事例では原因施設調理従事者群 (n=7) は 7 種、原因施設弁当喫食者群 (n=9) は 7 種、関連他施設 A 料理喫食者群 (n=3) は 4 種、関連他施設 B 料理喫食者群 (n=6) は 5 種の、異なる遺伝子型と亜株が検出された。2012 年秋冬期に大流行した GII.4 2012 Sydney は、個体内に微小集団 (0.1 - 22.0 %) として、13 例で検出された。2006b は、調理従業員発症者群で 7 名中 6 名、弁当喫食者で 9 名中 9 名、関連他施設 A 料理喫食者では、3 名中 3 名、関連他施設 B 料理喫食者群では、6 名中 6 名検出された。

1-5 野ネズミ由来 NoV の検出と培養細胞での分離の試み

チェジュセスジネズミ由来腸管内容物 4 検体のうち、1 検体において、ORF2 及び ORF3 を含む NoV ゲノムの 3'側領域 2,867 塩基の配列を決定できた。系統樹解析の結果、実験用マウス由来 NoV とは異なり、ヨーロッパの野生ネズミから検出された NoV とクラスターを形成した。

実験用マウス由来 NoV、野生げっ歯類由来 NoV との相同性を調べたところ、ORF2 は塩基、アミノ酸ともに実験用マウス由来より野生げっ歯類由来 NoV との方がやや相同性が高かった。また、アミノ酸配列における変異を調べると、P2 領域において変異が多く認められた。推定 ORF4 領域でも同様の傾向が見られた。

2. ロタウイルス

ウシロタウイルス B 12 株の各遺伝子の配列の解析結果から、ヒトやブタロタウイルス B 株と遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。また、インドで検出されたウシロタウイルス B 株との比較では、今回解読した全ての遺伝子において、ORF の長さは同じであったが、配列が異なることが明らかとなった。

ロタウイルス B の各遺伝子に関する系統樹解析の結果、山形県内で検出されたウシロ

タウイルス B 株は過去に北海道、さらに米国で検出されたウシロタウイルス B 株と同じ遺伝子型に分類されたが、インドで検出されたウシロタウイルス B 株とは異なる遺伝子型に分類された。また、ウシロタウイルス B 株は系統発生的にヒトやブタロタウイルス B 株とは明確に区別された。

3. ポリオーマウイルス

これまでに高い親和性を示すことが見いだされている GD3 と GM3、MCPyV 感染に関与すると文献的に知られている GT1b について psudovirion 感染系で MCPyV の感染感受性に寄与するかを調べた。GM95 (マウス由来ガングリオシド合成酵素欠損) へ GM1, GM3, GD3, GT1b を添加し、SV40 および MCPyV の psudovirion を接種した結果、GD3 が MVPyV の細胞への感染侵入に最も重要な役割を果たしうることが示された。

4. パピローマウイルス (HPV)

4-1 ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌

軽度病変 (CIN1) 11 例および高度病変 (CIN3) 27 例を解析した結果、E2 領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%)、CIN3 で 6 例 (22%) 検出された。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコーディング鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C to T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていた。

W12 細胞をインターフェロン β で処理すると、幾つかの APOBEC3 タンパク質 (APOBEC3A, 3F, 3G) の mRNA 発現が誘導され、HPV16 ゲノムの E2 遺伝子内に C to T hypermutation が検出された。この現象は、APOBEC3G に対する siRNA の導入によりブロックされた。また W12 細胞に APOBEC3A, 3G を強制発現すると、同様の hypermutation が検出された。

4-2 in vitro USP15 assay 系の作製

DUB-Glo protease assay による in vitro

USP15 assay 系を用いてインヒビターライブラリー(320 コンパウンド)から阻害活性物質をスクリーニングしたところ、DUB activity を阻害するコンパウンドが 33 個見つかった。陽性コンパウンドに関し、Di-Ub(K48)を基質にして USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析したところ、5 種類のコンパウンドで著明な USP15 阻害活性を確認した。

4-3 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 で発現させアフィニティ精製した。Avi-His₆-USP15 UCH に結合する特殊ペプチドをスクリーニングし、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

5. E 型肝炎ウイルス (HEV)

5-1 HEV レプリコンの構築

LOPAC 化合物ライブラリーから、HEV レプリコン複製阻害活性を持つ化合物 17 をピックアップした。ピックアップされた化合物の中には、すでに HEV 増殖阻害活性が報告されていたリバビリンが含まれており、本スクリーニング系の妥当性が示されたのではないと思われる。これらの阻害剤のウイルス複製における作用機序について解析を進める。

5-2 ラット HEV の解析

Ferret HEV-LPs をバキュロウイルス発現系を用いて作成した。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抗 ferret HEV IgG および IgM 抗体が検出された。

6 高感度ウイルス検出技術の開発

NPGL 含各ウェルへ 1~1000 PFU/mL の種々の濃度のインフルエンザウイルス H3N2 を添加し、さらに QD を反応させたところ 5~1000 PFU/mL でウイルス濃度-蛍光強度の相関 (直線性) が認められた。このウイルス濃度レンジで定量測定可能と考えられる。また、本開発技術は一般医院で診断に用いられ

ているイムノクロマト法に比べ 100 倍程度高感度であると結論された。

D. 考察

ノロウイルス

NoV のリバーシジェネティックシステムを構築し、ORF1、ORF2 それぞれにレポーター遺伝子を挿入し機能させることに成功した。HuNoV の場合、感受性を示す細胞がまだ見出されていないため感染性粒子であるかを実証するのが困難であるが、感染性粒子である可能性は極めて高いものと推察される。ORF1 にレポーター遺伝子を挿入した場合は複製過程で排除されるか、リバータントの出現によって、淘汰されていると考えられ、今後継代可能な GFP 遺伝子内包ウイルスの作製を試みる。また、ORF2 にルシフェラーゼを挿入した NoV は、RdRp 活性の定量、活性差測定に有用と考えられ、阻害剤のスクリーニングへの応用が考えられる。また、レプリコンを用いた系も確立できれば同様に有効と思われる。一方、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も確立され、HuNoV 感染実験の体制が整った。

293T 細胞内での組換え MuNoV 粒子の形成過程、そして permissive な細胞 (RAW264.7 細胞) 内でウイルス遺伝子発現での過程、の両方に VP2 を補完した場合、ゲノム自身に VP2 を欠損していても、タンパクをトランスに供給することによりウイルス遺伝子発現を開始できることが示された。このことは、VP2 は構造タンパク質としての役割だけではなく、ウイルス遺伝子発現に対しても機能的な役割を果たしていることが示唆される。

次世代シーケンサーを用いた NoV による集団食中毒事例での包括的な配列解析により、集団内で、ウイルス粒子の安定性、複製能、集団免疫からの逃避能に優れたものが選択され、感染伝播の際に、遺伝的に多様な集団から一部のウイルス亜集団が抽出されるボトルネックが生じている可能性が示唆された。ウイルス遺伝情報の包括的収集および情報科学的手法による解析は、ノロウイルスの流行予測の基盤情報となることが期待される。

韓国の済州島において固有種であるチェジュセスジネズミから新たな NoV 遺伝子が検出された。系統解析の結果、この NoV 遺伝子が既知のどの系統とも異なることが示唆された。NoV は広範な地域において、多様な種類のげっ歯類に保持されている可能性が示された。

ロタウイルス

遺伝子解析の結果、わが国で流行しているウシロタウイルス B 株は Nemuro 株と遺伝学的に近縁な株が全国に存在・伝播していることが示唆された。また、系統樹解析の結果、わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は米国で検出されたウシロタウイルス B 株と共通の起源に由来することが示唆されたが、インドで検出された株とは早い段階で分岐し、それぞれがこれまでに交わることなく独自に進化を遂げてきた可能性が示唆された。今後、東南アジア諸国や世界中に拡散しているウシロタウイルス B、あるいは他動物種由来のロタウイルス B 株を収集し、それらの遺伝子解析を実施することで、ウシロタウイルス B を含めたロタウイルス B の生態ならびに起源が明らかになってくることと思われる。

ポリオーマウイルス

MCPyV の細胞への感染侵入に、ガングリオシド GD3 が重要な役割を担っている可能性が示された。MCPyV と糖鎖との結合にはラクトースにシアル酸が一個結合した構造で十分であるが、細胞への侵入にはさらにシアル酸が結合した構造が有効であることが示された。GD3 は、脳細胞分化に関与しており、神経外胚葉性細胞や上皮性癌細胞では高発現を示すのに対し、分化度の高い成熟神経細胞では低発現であることが知られている。GD3 の生理的役割と MCPyV の感染様式が連関するか今後明らかにしたい。

パピローマウイルス

臨床検体で検出された C to T hypermutation の標的配列から、APOBEC3 タンパク質の関与が強く示唆された。APOBEC3B が HPV ゲノムにも作用して

hypermutation を導入する可能性が考えられた。一方、臨床検体での HPV ゲノムの hypermutation は著しく低い割合でしか検出されなかったことから、ウイルス増殖や維持に及ぼす影響は小さいことが予想された。

HPV16E6 を排除する抗 HPV 薬開発のため、脱ユビキチン化酵素 USP15 に対する阻害剤開発を目指した。インヒビターライブラリーから、5 種類の小分子化合物で著明な USP15 阻害活性を確認した。USP15 阻害活性を確認できた小分子については今後、細胞内での USP15 阻害活性と E6 への安定性への影響を解析していく予定である。また、USP15 の catalytic domain である UCH domain に結合する 5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。現在、スケールアップして精製中であり、USP15 阻害活性を解析する予定である。

E 型肝炎ウイルス

HEV レプリコンを構築し、化合物ライブラリーからレプリコン複製阻害物質のスクリーニングを開始した。特に東京大学の化合物ライブラリーから、比較的強い複製阻害活性を有すると考えられる化合物を得ることができた。今後 E 型肝炎治療薬としての検討、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う。

Rat HEV のヌードラット体内での増幅を確認できたことから、PLC/PRF/5 細胞で増殖された rat HEV が感染性を有することが示された。また、リバーシジェネティクス法によって感染性を持つ rat HEV を取得できることが証明された。

高感度ウイルス検出技術の開発

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム／量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、マルチウェルプレートで必要試薬と検体を混和し、洗浄操作なく 10 分程度で測定が可能であることを示した。さらに、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルスを検出しうることを明らかにした。種々の臨床検体を用いた解析により本開発

技術の有用性を評価する予定である。

E. 結論

ノロウイルス

HuNoV、MuNoV の感染性クローンに GFP 遺伝子を導入し、感染すると細胞が GFP のシグナルを発する GFP-Tagged progeny virus を産生することに成功した。この新生ウイルスは、感受性細胞の探索、スクリーニングに有用である。また、機能タンパク質 (RdRp) の活性測定システムを構築した。本システムによって、RdRp の活性差を測定することで、HuNoV の病原性を調べることができるともかもしれない。NoV チバ株の RNA レプリコン候補遺伝子および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。また、ヒト腸管上皮オルガノイド培養系を確立し、HuNoV 感染が成立するか検討を開始した。

VP2 コード領域を欠いた複製欠損型 MuNoV 変異体は、VP2 の共発現によりウイルス遺伝子発現を誘導することが出来た。この結果は、ノロウイルスにおいて初めて複製欠損型ゲノムの機能的な補完が可能になったことを示しており、HuNoV カプシドタンパク質機能を解析できる実験系としての MuNoV ベクター系の構築へ前進した。

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。

チェジュセスジネズミから検出された NoV ゲノムの塩基配列 (2,876 塩基) を決定し、マウス由来の NoV とは異なる特性を有する NoV であることが示唆された。今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして非常に期待される。

ロタウイルス

わが国で検出されたウシロタウイルス B 株は、インドで検出されたウシロタウイルス B 株と遺伝的に異なる起源に由来することが明らかとなった。

ポリオーマウイルス

ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たす可能性が示された。

パピローマウイルス

子宮頸部の HPV 感染病変において、APOBEC3 タンパク質が HPV ゲノムに変異を導入することで、子宮頸部発癌に関与する可能性が示唆された。

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。インヒビターライブラリーから USP15 の脱ユビキチン化酵素活性に対する阻害効果を解析し、5 種類のヒット化合物を同定した。さらに UCH ドメインに結合する特殊ペプチドの作製を行い、5 種類の環状 N メチルペプチドと 3 種類の環状ペプチドを得た。

HEV

HEV レプリコンを構築し、化合物ライブラリーからレプリコン複製阻害物質のスクリーニングを開始し、複数の候補化合物を得た。今後 E 型肝炎治療薬としての検討、HEV の感染、増殖機構や病原性発現メカニズムの解析を行う。

Rat HEV 培養系が樹立できたことから、今後 rat HEV 複製のメカニズムの解明が可能となる。また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 感染性クローンの作製は、cDNA への特定の突然変異の導入やウイルス感染のトロピズムなどの研究に非常に有用である。

高感度ウイルス検出技術の開発

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム／量子ドットを用いたインフルエンザウイルス高感度検出系を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E

2. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma PLC/PRF/5 Subclones. Microbiology and Immunology in press.
3. Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., Ishii K., Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. PLOS One, 9, e101993 (2014)
4. 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, 90: 764-766 (2014)
5. 石井孝司 A型肝炎、E型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)
6. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 23 ; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
7. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. J. Vet. Med. Sci. 76(7), 1045-50, 2014.
8. Fang-TzyWu, Hsieh-Cheng Chen, Catherine Yen Ching-Yi Wu, Kazuhiko Katayama, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu. Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013. Arch Virol, in press, 2015.
9. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR ロタウイルス特集号 vol.35 No.3 Mar. 2014.
10. 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型2014年版 IASR

- ノロウイルス特集号 vol.35 No.7 July 2014.
11. 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol.17 No.1 12-15, 2014.
 12. 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No.4723, 59-60, 2014.
 13. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol.20 No.12, 10-12, 2014
 14. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol.20 No.12, 14-19, 2014
 15. 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策ICTジャーナル vol.9 No.4 2014.
 16. 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.
 17. 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec.18, 2014.
 18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus. *J. Virol. Methods*. 207: 178-81 (2014)
 22. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K, Tohya Y. Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *J Vet Med Sci*. 76: 1045-50 (2014)
 23. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. in press: doi: 10.1038/nm.3802 (2015)
 24. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGF β Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer. *Cancer Res* 75: 766-76 (2015)
 25. Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. *Integr Biol (Camb)* 7: 213-28 (2015)
 26. Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5: 5728 (2014)
 27. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res* 74: 2882-91 (2014)
 28. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1820-7 (2014)
 29. Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T,

- Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR γ t⁺ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1426-34 (2014)
30. Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* 9: e84619 (2014)
31. 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* 15: 81-8 (2014).
32. Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet* 5:169 (2014)
33. Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)* 1: 14 (2014)
34. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus Res.* 197: 26-34 (2014).
35. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. *Microbiol. Immunol.* 58: 530-535, (2014).
36. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 26: 223-227, (2014).
37. Marthaler D, Suzuki T, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnssens J. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172: 359-366, (2014).
38. 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.* 95: 1117-1125, (2014).
39. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. *J Virol.* 88: 7541-7555, 2014.
40. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. *J Virol.* 89: 2220-2232, 2015.
41. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 95: 2658-2667, 2014.
42. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 207: 38-44, 2014.
43. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. *Biosens Bioelectron.* 58:33-39, 2014.
44. Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A

- and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** in press.
45. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. **J. Virol.** 89: 2448-2452 (2015)
 46. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 44: 910-917 (2014)
 47. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. **J. Virol.** 88: 1308-1317 (2014)
 48. 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** 21 (1): 1-16 (2014)
 49. Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., **PLoS One**, 9: e98877 (2014)
 50. Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, 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**, 58 (3): 188-94 (2014)
 51. Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto, S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. **Microbiology and Immunology**, 58 (3): 180-7 (2014)
 52. Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yang T, Takeda N, and Wakita T. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. **Intervirology**. 2015, *In press*.
 53. Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Li TC, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. **BMC Vet Res.** 2015 Jan 27;11(1):11.
 54. Li TC, Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T and Maeda K. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. **JJID** 2015.68(1).60-62.
 55. Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, and Wakita T. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. **Emerg Infect Dis.** 2014.20 (4),709-712.
2. 学会発表
 1. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, September 11-12, 2014
 2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014
 3. Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S.,

- Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
4. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y., Noda M., Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
 5. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014
 6. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 11 回日本小児消化管感染症研究会、平成 27 年 2 月、大阪
 7. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 8. 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎：不活化 A 型肝炎ワクチンの互換性研究—エムゲンと HAVRIX—、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 9. 河端邦夫、清原知子、石井孝司、脇田隆字、金山敦宏、八幡裕一郎、松井珠乃、砂川富正、大石和徳：A 型肝炎の家族内感染についての疫学的解析 (2014 年上半期を中心に)、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 10. 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因子宿主候補に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 11. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、八幡裕一郎、河端邦夫、金山敦宏、山岸拓也、高橋琢理、有馬雄三、木下一美、齊藤剛仁、松井珠乃、大石和徳、砂川富正、脇田隆字：2014 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 12. 横川 寛、中村紀子、東濃篤徳、鈴木紗織、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HAV 粒子のマーモセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 13. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、平成 26 年 9 月、長野
 14. Nakanishi A., Tange S, Tasaki H, Zhou Y. Association of autophagic process during human astroviral infection. **American Society for Virology** (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, United States
 15. 中西 章、山本真由子. ポリオーマウイルスの細胞感染効率は Vp2/3 が関与する細胞内移行ステップに影響される. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 12 日 横浜
 16. Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A. Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes. 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 27 日 横浜
 17. 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
 18. Suzuki T. Whole-genome characterization of animal rotavirus C. IUMS2014, Montreal, Canada, Jul 2014.
 19. 鈴木 亨、馬渡隆寛、平野かおり、宮崎綾子、恒光 裕. 国内におけるウシロタウイルスの遺伝的多様性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.11.
 20. 森 清一郎、柗元 巖. ヒトパピローマウイルス 16 型のがん蛋白質 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの活性化 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月、横浜
 21. 柗元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名敬 日本人女性の CIN2/3 および子宮頸部浸潤癌での HPV 遺伝子型分布 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月、横浜
 22. 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柗元 巖 ヒトパピローマウイルス 16 型 E6/E7 による APOBEC3B プロモーターの

- 活性化機構 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月、横浜
23. 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柊元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道 APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染性を低下させる 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月、横浜
 24. 増田 雄司、柊元 巖、益谷 央豪 Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月、横浜
 25. Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I. Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16 29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
 26. Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology. 29th International Papillomavirus Conference, 2014年8月、米国 シアトル
 27. Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
 28. Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
 29. Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 30. Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 31. Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 32. Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
 33. Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 34. 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 35. 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染によるTGF- β スーパーファミリーにおけるSmad2/3とSmad1/5/9経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 36. 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
 37. 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C型肝炎ウイル

- ス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
38. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
39. Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第 6 2 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
40. 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白質の選択的分解機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月 25-27 日, 2014 年.
41. 李天成, 網康至, 須崎百合子, 浅沼秀樹, 岸田典子, 白倉雅之, 武田直和, 脇田隆字. フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性と E 型肝炎動物モデル. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月横浜.
42. 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因子候補に関する研究. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月横浜.
43. 李天成, 米満研三, 寺田豊, 片岡紀代, 網康至, 須崎百合子, 岸田典子, 白倉雅之, 浅沼秀樹, 前田健, 武田直和, 脇田隆字, Ferret HEV 抗体検出系の樹立およびその疫学調査, 第 1 5 7 回日本獣医学会, 2014 年 9 月 北海道
44. バキュロウイルスによるブタサーコウイルス 2 型(PCV2)カプシド蛋白の発現, 中江優貴, 岸塚慎吾, 久保田智江, 青木博史, 池田秀利, 鈴木孝子, 李天成, 福士秀悦, 第 1 5 7 回日本獣医学会, 2014 年 9 月 北海道
45. Reimar Johne, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzuki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, Tian-Cheng Li. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology, 18–21 March 2015 in Bochum, Germany.
46. Tian-Cheng Li, Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) July 27-August 1, 2014, Canada.
47. Tian-Cheng Li, Kaori Ochiai, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. The 10st Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC 2014 Conference). May 8-10, 2014. Vietnam.

G. 知的所有権の取得状況
なし