

## 20 . 病原体ゲノム解析研究センター

### センター長 神田 忠仁

#### 概 要

当センター(平成17年10月発足)は、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、遺伝子治療に用いられるウイルスベクターに関する研究と子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルスの研究を進めた。遺伝子治療は先天性遺伝病に対する根治療法になりうる。これまでの臨床試験の成績は、治療に用いる遺伝子の導入効率の向上と導入遺伝子の発現調節機能を持つウイルスベクターの必要性を示しており、新型ウイルスベクターが内外で開発されている。一方、いわば人工のウイルスであるベクターを、非健康者に大量に、しかも自然感染とは異なる経路で投与する臨床応用では、重大な副作用を引き起こすことがある。アデノウイルスベクターによる患者の死亡やレトロウイルスベクターによる白血病の発症が報告されており、安全性の確保が厚生行政の課題となっている。我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立てるため、内外のウイルスベクターの安全性、有効性に関する情報収集に努めた。今後、臨床応用が増えると考えられるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの性質を調べる研究を継続した。また、ベクターDNAが細胞染色体に組み込まれる際に生ずる挿入変異が細胞癌化の原因となり得ることから、非組み込み型ベクターの開発を進めた。

HPVは性行為等で生じた粘膜の微少なキズから侵入し、表皮基底細胞(幹細胞)の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程で順次ウイルスゲノムの複製とキャプシド蛋白質の発現が起こり、子孫ウイルスが形成される。このようなHPV生活環の中で、偶然HPVゲノムが細胞染色体に組み込まれて、HPV初期遺伝子群の発現が継続的に起こると細胞は不死化し、やがて発癌に至る。HPVの潜伏・持続感染に介入し、それを排除する方法を開発するために、表皮形成とHPVの生活環を支える分子機構の解析をした。また、15種の発がん性HPVの感染を予防するワクチン抗原の開発を行った。米国や欧州の製薬会社で開発された第一世代HPVワクチンの導入が近いと予想されるので、その安

全性、有効性の実用的な評価系の作製を開始した。

第二室では、ノロウイルス(ウイルス性下痢症の主因)、C型肝炎ウイルス、HIV、内在性ブタレトロウイルス等を中心に、ゲノム情報のデータベースを構築した。これらのRNAウイルスのゲノムには変異が高頻度で起こることが知られている。蓄積したゲノム情報を解析し、変異に基づく抗原性、増殖能や感染宿主域の変化を予測することが研究の目標で、得られる情報はウイルス感染の迅速診断や予防・治療に役立つ。ウイルス蛋白質の結晶構造を基に、変異によって生じる構造変化と機能修飾を計算科学で解析する技法を導入し、発展させる研究を行った。臨床材料や情報の取得が重要であり、感染研内外との共同研究を積極的に進めた。

臓器移植に用いる移植用臓器の不足を補うため、ブタ臓器を利用する研究が進められている。我が国でも、ヒトの補体による拒絶反応を軽減できる遺伝子改変ブタが開発されているが、内在性レトロウイルスは臓器の品質管理では排除できず、被移植患者に感染する可能性がある。遺伝子改変ブタ臓器からレトロウイルスが検出されたので、その詳しい性状を調べている。ドナー動物由来感染症が生じると、患者から周辺の人々に感染が拡大する危惧があり、異種移植の安全性確保に不可欠な研究である。

第三室では、細菌のゲノム情報をもとに病原性を解析する研究を立ち上げた。病原性大腸菌のように、常在菌であっても外来性の毒素産生能や薬剤耐性を獲得して、病原性を持つので、非病原性常在菌のゲノム情報の蓄積は、病原性因子の同定・解析の基盤となる。また、培養環境とヒト体内環境で増殖している細菌では遺伝子群の発現が異なることから、臨床試料中の細菌で発現している遺伝子群の直接解析が重要となる。このような背景の下に、偏性嫌気性グラム陰性桿菌 *Fusobacterium varium* のゲノム解析を開始した。*F. varium*は、健康者の細菌叢からも分離されるが、難病指定されている潰瘍性大腸炎の増悪因子である可能性が強く示唆されている。さらに、黄色ブドウ球菌をモデルに、生体内感染期における遺伝子発現の制御と病原性の関連を解析している。

## 業績

### 調査・研究

#### ・遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

##### 1. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及び Nature Medicine 等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続した。[ 竹内隆正、森 清一郎、柘元 巖、石井克之、神田忠仁 ]

##### 2. AAV ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

###### (1) 自然感染したカニクイザルでの AAV の体内分布の解析

AAV には多くの遺伝子型があり、ヒトを含む霊長類に広く潜伏持続感染しているが、体内動態は殆ど知られていない。14 頭のカニクイザルの様々な組織から DNA を抽出し、自然感染した AAV10、11、cy7 型 DNA を型特異的プライマーを用いた PCR で増幅・検出した。いずれの型も、脾臓、リンパ節などのリンパ系組織と回腸を中心に様々な組織に検出された。AAV は腸管から宿主体内へ侵入し、免疫系細胞に感染すると推定した。また、AAV10、cy7 型は脳、脊髄にも検出され、中枢神経系への遺伝子導入に適したベクターの素材となる可能性が示された。[ 森清一郎、佐多徹太郎（感染病理部）、神田忠仁 ]

###### (2) AAV2 型の感染レセプターの探索

HeLa 細胞に感染する AAV2 型と感染しない 10 型のキャプシド蛋白質を繋ぎ合わせたキメラウイルスを作製し、HeLa 細胞への感染性を調べる研究を継続した。2 型キャプシド蛋白質のアミノ酸 236~315 領域が感染に必要であることがわかった。この領域に蛍光蛋白質 (DsRed) を融合した蛋白質を組換えバキュロウイルス/昆虫細胞系で発現・精製してウェストウェスタン法でのプローブとした。約 280kDa の HeLa 細胞蛋白質がプローブと特異的に結合した。この蛋白質は界面活性剤に不溶性の膜蛋白質であり、AAV2 型のレセプターであることが示唆された。[ 森清一郎、神田忠仁 ]

##### 3. 非組み込み型遺伝子治療用ベクターの開発

###### (1) 非分裂細胞への遺伝子導入ベクターの開発

insulator 等を付加したルシフェラーゼ発現 AAV ベクターを作成し、マウス骨格筋に投与した。付加した配列は、AAV のヒト染色体への組込み領域である AAVS1 内の DNase I hypersensitive 部位 (DHS-S1)、ニワトリ グロビン 5'HS4 コア領域 (cHS4)、ウニアリルサルファターゼ insulator (ArsI) あるいはヒトインターフェロン遺伝子 matrix attachment region (IFNMAR) である。10<sup>9</sup> ゲノムコピーの各 AAV ベクターを Balb/c マウスに筋注後 1 ヶ月の時点で、筋肉内のルシフェラーゼ活性を測定した。DHS-S1 付加により約 1000 倍、cHS4 付加により約 100 倍、ArsI 付加により約 10 倍、ルシフェラーゼ活性が上昇した。IFNMAR 付加ではルシフェラーゼ活性はむしろ低下した。高発現ベクターは有効性に寄与するだけでなく、必要投与量の削減によって安全性にも直結する。[ 竹内隆正、内野蘭代、神田忠仁 ]

###### (2) 分裂細胞への遺伝子導入ベクター開発

matrix attachment region を転写ユニット内に持つプラスミドが分裂細胞において複製・分配され、安定して保持されるという報告があるので、ルシフェラーゼおよびネオマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミドを用いて、HeLa S3 細胞へのトランスフェクション後のプラスミドの動態が IFNMAR の付加により変化するかどうか調べた。a) トランスフェクション後薬剤選択をしなかった場合のルシフェラーゼ活性の経時変化、b) 薬剤耐性コロニー数、c) 薬剤耐性細胞中の plasmid-safe DNase 耐性 DNA 量のいずれにおいても IFNMAR の付加による有意な差を認めず、IFNMAR 付加プラスミドが HeLa S3 細胞において安定に保持される確率は低いことが分かった。[ 竹内隆正、神田忠仁 ]

#### ・HPV に関する研究

##### 1. HPV の増殖制御機構の研究

###### (1) 角化細胞転写因子 hSkn-1a による HPV16 DNA 複製の促進-2

HPV ゲノムの複製が角化細胞の分化を誘導する転写因子 hSkn-1a によって促進される機構を調べた。組換え hSkn-1a 蛋白質を用いたゲルシフト法によって、HPV16 オリジン領域に二ヶ所の hSkn-1a 結合部位を見つけた。クロマチン免疫沈降法によって、hSkn-1a が細胞内でこれらの部位に結合することを確認した。二ヶ所の hSkn-1a 結合部位に hSkn-1a との結合が減弱する塩基置換を導入すると、複製促進作用が消失した。hSkn-1a が HPV16 オリジンに直接結合することで、ウイルス複製促進を導く可能性が示唆された。[ 柘元 巖、森 清一郎、

神田忠仁]

(2) 無細胞 HPV DNA 複製系の構築

HPV16 複製蛋白質 E1 及び E2 をそれぞれ昆虫細胞バキ  
ュロウイルス発現系及び大腸菌発現系にて作成し、これ  
らの組換え蛋白質を用いて 293 細胞抽出液中で HPV オリ  
ジンプラスミドを複製させる実験系を構築した。E1/E2  
の共存下にオリジン依存性の HPV DNA 複製が起こるこ  
とを確認した。また無細胞クロマチン再構成系にて作成し  
た HPV クロマチンが、この DNA 複製系で複製されること  
が分かった。この無細胞 DNA 複製系を用いて、HPV クロ  
マチン複製の分子機構の解析を進める。[ 柗元 巖、神田  
忠仁 ]

(3) Brd4 ノックダウンによる HPV 複製阻害

HPV の E2 と結合してウイルス転写を制御することが示  
されているヒト細胞蛋白質 Brd4 と HPV 複製の関連を検討  
した。293 細胞にて E1/E2 の発現下に HPV オリジンプラ  
スミドを一過性に複製させる実験系に、Brd4 をノックダ  
ウンする siRNA を導入するとオリジンプラスミドの複製  
量が約二分の一に低下した。Brd4 が E2 との結合を介し  
て、ウイルス複製に関わる可能性が示された。[ 佐藤英貴、  
柗元 巖、神田忠仁 ]

(4) HPV16 型キャプシド主構成タンパク質 L1 のシステ  
イン残基を持つチオールの機能

HPV16 には 12 のシステイン残基があり、そのうち 2 つ  
はキャプシド形成に必要なことが知られているが、他の  
システイン残基の役割は不明である。感染性偽ウイルス  
(pseudovirion、PV) とチオール試薬を反応させると結  
合することが分かった。質量分析により、少なくとも  
C146 (146 番目のシステイン残基) C225 及び C229 がチ  
オールを持つことがわかった。チオール反応試薬と結合  
した PV は透過型電子顕微鏡での観察等で形態の異常は  
認められなかったが、感染性は消失した。チオール反  
応試薬と結合した PV の細胞表面への結合量は半減し、細胞  
内へ取り込まれた後に速やかに分解された。L1 のチオー  
ルは細胞内侵入から核内への輸送に重要な役割を果たす  
と考えられる。[ 石井克幸、近藤一成、松本玉恵、田中恵  
子 ( 感染病理部 )、大内史子・萩原健一 ( 細胞化学部 )、  
神田忠仁 ]

2. 交差性中和エピトープをもつワクチン抗原の作製

HPV16L1 のアミノ酸 430 と 433 の間に、L2 のアミノ  
酸 18 から 38、56-75、96 から 115 領域に相当するペプチ

ドを挿入したキメラを作製した。これらのキメラ L1 は、  
ウイルス様粒子 (virus-like particle; VLP) を形成し、  
ウサギに免疫して得た抗血清は、HPV16、18、31、52、58  
を中和した。これらの VLP は 15 の発癌性 HPV 群に有効な  
ワクチン抗原となる可能性がある。[ 近藤一成、松本玉恵、  
神田忠仁 ]

・病原性ウイルスのゲノム解析

1. RNA ウイルスゲノムの解析

(1) ノロウイルス (NoV) のゲノム解析

新型変異 NoV の発生を監視し、その伝播を阻止する方  
法を示すために、ウイルス二部と共同で NoV のゲノム解  
析を行った。2006 年 10 月から 2007 年 1 月に、11 の都道  
府県で発生した 55 例の NoV 感染者糞便を調べ、37 の試  
料から G11/4 ゲノム全長 (約 7.5 kbps) の塩基配列を得  
た。キャプシド蛋白質 VP1・VP2 をコードする領域につ  
いて系統樹解析を行ない、全国各地で流行した株はキャ  
プシド蛋白質の最も外側のループ領域に変異をもつ新型で、  
5 月に富山で出現し、11~12 月までに全国に広がったこ  
と、などがわかった。抗原性が変化した変異株がヒトを  
介して伝播している可能性があるため、引き続き、次年  
度の流行株を解析する。[ 本村和嗣、中村浩美、守宏美、  
岡智一郎・武田直和 (ウイルス第二部)、神田忠仁、佐藤  
裕徳 ]

糞便試料の収集は以下の方々の協力による。

田中智之 (堺市衛生研究所) 吉澄志磨 (北海道立衛生研  
究所) 三上稔之 (青森県環境保健センター) 斉藤博之  
(秋田県健康環境センター) 植木洋 (宮城県保健環境セ  
ンター) 滝澤剛則 (富山県衛生研究所) 小林慎一 (愛  
知県衛生研究所) 内野清子 (堺市衛生研究所) 野田衛  
(広島市衛生研究所、現国立医薬品食品衛生研究所) 近  
藤玲子 (愛媛県立衛生環境研究所) 船津丸貞幸 (佐賀県  
衛生薬業センター) 松岡由美子 (熊本市環境総合研究所)

(2) C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム解析

HCV 持続感染の維持とウイルス変異の関連を知るため  
に、HCV 持続感染者の HCV ゲノムの網羅的解析を開始し  
た。日本での主な流行株は、遺伝子型 1b で、IFN 治療効  
果が低いことが知られている。昭和大学医学部と共同で、  
持続感染症 37 例 (IFN 治療例を含む) の血液中 HCV1b の  
ゲノム解析を進め、現在までに、10 症例についてゲノム  
全長 (約 9.6 kb) の塩基配列を得た。

[ 本村和嗣、中村浩美、守宏美、伊藤敬義・井廻道夫 (昭  
和大学医学部)、神田忠仁、佐藤裕徳 ]

(3) ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のゲノム解析  
HIV-1 の高変異性は持続感染の維持や治療効果の低減に結びついている。日本を含むアジアでは、HIV-1 CRF01\_AE の感染が拡大している。CRF01\_AE の持続感染の維持とウイルス変異の関連を知るために、国立国際医療センターと共同で、CRF01\_AE 持続感染者の全ゲノム情報の解析を始めた。現在、23 症例 (未治療感染者と治療効果が認められない症例等) の血液中の CRF01\_AE ゲノムの塩基配列を解析している。

[ 本村和嗣、中村浩美、守宏美、瀧永 (国立国際医療センター)、佐藤裕徳 ]

(4) ブタ内在性レトロウイルス (PERV) のゲノム解析  
移植用臓器として利用が計画されている遺伝子改変ブタには PERV のプロウイルスが存在し、常時、多様な感染性粒子を産生している。PERV の変異と感染宿主域の拡大に関する基盤情報を得るために、PERV の全ゲノム解析を始めた。移植用に関与が進められている遺伝子改変ブタの卵巣細胞と HeLa 細胞の共培養により、PERV が感染した HeLa 細胞を樹立した。ブタ卵巣細胞と HeLa 細胞中のプロウイルス DNA を解析し、現在までに、4 クローンについてゲノム全長 (約 8.9 kb) の塩基配列を得た。

[ 本村和嗣、神田忠仁、佐藤裕徳 ]

## 2. 病原性ウイルスゲノムデータベースの構築

新興再興感染症や慢性感染症対策の一環として、昨年度から病原性ウイルスゲノム情報のデータベース化を進めている。主に RNA ウイルスを対象とし、公共データベース情報と独自解析情報を継続的に蓄積していく予定である。本年度は、ゲノム情報の整理・統合・解析を行なう計算機環境を整備した。統合データマイニングプラットフォーム KDE、統合計算化学システム MOE、分子動力学シミュレーションパッケージ Amber8 の Altix350 での稼働性を確認した。また、前年度までにゲノム塩基配列情報を収集しているウイルス (インフルエンザ、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス、C 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ブタ内在性レトロウイルス、サイトメガロウイルス) に加えて、さらに HIV-1 について公開データベースからゲノム塩基配列情報を自動収集するシステムを作った。[ 横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳 ]

## 3. 病原性ウイルス蛋白質の立体構造解析

(1) インフルエンザ A 型ウイルス HA 蛋白質の立体構造解析

トリインフルエンザウイルスがヒト細胞への感染能を

獲得する際、HA 蛋白質の変異によりヒト型感染受容体への親和性が増すと推察される。計算科学によって HA 変異体と感染受容体の親和性を迅速に推定する方法を検討した。まずトリインフルエンザ H5N1 株の HA 結晶構造をもとに、野生型および、ヒト型感染受容体への親和性が増すことが実験的に立証された変異 HA 蛋白質のモデルを構築した。次に HA 蛋白質モデルに SA $\alpha$ 2,3-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (トリ型基質) および SA $\alpha$ 2,6-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (ヒト型基質) のドッキングシミュレーションを行い、結合エネルギーを算出した。結合エネルギー変化は、実験による感染受容体の特異性変化を反映した。計算科学によって感染宿主域の変化を予測する可能性を示している。[ 横山 勝、守 宏美、神田忠仁、佐藤裕徳 ]

(2) カリシウイルスプロテアーゼの立体構造解析

カリシウイルスの増殖ではの ORF1 から作られたポリプロテインが、その一部であるプロテアーゼによって切断され、機能を担う蛋白質群になる。ノロウイルスプロテアーゼを鋳型として、サボウイルス Mc10 株、ネコカリシウイルス F4 株、ラゴウイルス FRG 株のプロテアーゼ分子の立体構造をホモロジーモデリング法により構築した。これらのプロテアーゼのアミノ酸配列は 20% 以下のホモロジーしかないが、プロテアーゼ変異体の解析で、活性発現に重要とされた 4 つのアミノ酸 (H, E, C, H) が全ての分子モデルで GDCG モチーフ周辺に配置され、高度に保存されていることがわかった。カリシウイルスプロテアーゼ基質認識機構、阻害剤開発等の研究に役立つ情報である。[ 横山勝、岡智一郎・武田直和 (ウイルス第二部)、佐藤裕徳 ]

(3) TRIM5 $\alpha$  感受性の HIV-2 キャプシド蛋白質の立体構造解析

HIV-1 がヒトにのみ感染し増殖する性質を示す要因となる宿主因子の一つに、TRIM5 $\alpha$  がある。旧世界ザルの TRIM5 $\alpha$  は HIV-1 の細胞侵入直後の複製過程を阻害するため、HIV-1 はサル細胞で増殖できない。一方、HIV-2 のサル TRIM5 $\alpha$  に対する感受性は一律ではなく、ウイルス分離株ごとに異なる。HIV2 のキャプシド蛋白質の 120 番目のアミノ酸が P の場合 (120P) は感受性を示すが、120A 及び 120Q は耐性である。これらの 3 種のキャプシド蛋白質の分子モデルを構築し、比較した。感受性の株では耐性の株に比べ、ヘリックス 6 と 7 の間のループ (L6/7) はヘリックス 4 と 5 の間のループ (L4/5) に接近している。120 番目のアミノ酸は L6/7 に存在し、L6/7 の構造と立体配置を制御するアミノ酸であることが予測された。

[ 横山 勝、塩田達男 ( 阪大微研 )、佐藤裕徳 ]

## ・病原性細菌のゲノム解析

### 1. 病原性細菌のゲノム解析

#### (1) *Fusobacterium varium* のゲノム解析

潰瘍性大腸炎 ( UC ) 患者より分離された *F. varium* 113 臨床株のホールゲノムショットガンライブラリー ( 平均 1.6 kb、15,000 クローン以上 ) を作製し、全ゲノム塩基配列決定を進めている。これまでに得られた塩基配列を解析すると、約半数の遺伝子は口腔内に存在する *Fusobacterium nucleatum* と 60% 以上の相同性を示し、残りの半数は腸内フローラとしてもっとも多量に存在する *Clostridium* 属と高い相同性を示した。腸内に常在する *F. varium* と口腔内に存在する *F. nucleatum* との比較ゲノム解析により、*Fusobacterium* 属に共通の因子と、腸内環境に関連する因子に分類できる可能性が示唆された。[ 関塚剛史、黒田 誠、大草敏史 ( 順天堂大学・消化器内科 ) ]

#### (2) 細菌フローラの網羅的解析

常在菌が混在する検体から重要な起因菌を簡便・迅速に同定する手法の開発は重要である。微生物ゲノムデータベースを利用し、網羅的に細菌フローラを同定する Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism ( T-RFLP ) に、Emulsion-PCR を併用した精度の高い解析手法の開発を目指した。様々な環境変化、生活習慣で細菌フローラが変動し、アトピー疾患などの病態を増悪することが指摘されており、予防医学的な細菌検査法になり得るかどうかが検討している。加えて、今後発展が予想される微生物メタゲノム解析への足がかりになる解析手法である。[ 黒田 誠、関塚剛史 ]

### 2. 細菌感染における病原性因子の転写調節と定着因子の解析

#### (1) 黄色ブドウ球菌の Maus 感染モデルの解析

培養状態と動物体内で増殖した状態で黄色ブドウ球菌の遺伝子発現プロファイルを比較した。黄色ブドウ球菌を Maus の腹腔内に接種し、経時的に臓器ごとの定着菌数を測定した。接種 4 日後までに肝臓・脾臓・腎臓での定着を確認した。4 日以降では、接種部位に皮下膿瘍が認められた。4 日めに臓器から細菌由来の RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によって病原性因子レギュレーター ( RNA III、*sarA*、*sarS*、*sarT*、*sarU*、*sigB* ) と定着因子である細胞壁架橋型蛋白質群 ( *clfA* など 21 遺伝子 ) の転写発現量を測定した。Fibrinogen、Fibronectin と

いった細胞外マトリクスの定着因子 ClfA、ClfB、FnbA、FnbB や鉄獲得系 IsdB の転写が、肝臓および皮下膿瘍で昂進していた。一方、機能・結合特性が不明である SasG の転写は肝臓感染時では昂進し、皮下膿瘍では顕著に抑制されていた。SasG の過剰発現株は菌凝集・バイオフィーム形成が昂進することが明らかになり、臨床で見られる微小膿瘍の形成に関わっている可能性が示唆された。SasG 近傍に存在する SarU 転写因子が同様な転写変動を示し、SarU 過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析によって、SarU が SasG を正に転写調節するレギュレーターであることを明らかにした。培養下では SarU 転写因子は発動しないため、Maus 感染時においてどのような要素が SarU を活性化し、SasG による菌凝集、微小膿瘍形成、そして抗菌薬治療の難治化に関与しているのか明らかにすることが今後の課題である。[ 黒田 誠、関塚剛史 ]

### 3. *Bacillus anthracis* の分子疫学調査

#### (1) *B. anthracis* プラスミドの塩基配列の解析

日本で分離された *B. anthracis* 臨床分離株 BA103 のプラスミド pX01 ( 180 kb ) 及び pX02 ( 90 kb ) の全塩基配列の解読を行った。約 700 本のプライマーを用いたウォーキング法を進め、pX01 及び pX02 共に、全長の約 95% まで配列を明らかにした。Ames 株のプラスミドと比較すると、BA103 株の pX01 及び pX02 共に 3 つの SNPs があり、塩基挿入・欠失は pX01 では 4 つ、pX02 では 1 つ存在した。さらにリピート配列のユニット数が 1 回多い領域が pX01 及び pX02 共に 1 つずつ存在した。これらの塩基配列の特徴は、日本株に特有であると思われる。[ 関塚剛史、黒田 誠、奥谷晶子・井上 智 ( 獣医科学部 ) ]

#### (2) 日本における *B. anthracis* の遺伝型と地理的分布

Multiple-locus variable number of tandem repeats analysis ( MLVA ) を用いて、現在保管している日本で分離された炭疽菌のゲノム上に存在する可変領域を網羅的に解析し、国内における炭疽菌の遺伝型と世界各国の分離株とを比較検討する準備を進めた。[ 関塚剛史、黒田 誠、奥谷晶子・井上 智 ( 獣医科学部 ) ]

## 発表業績一覧

### ・誌上発表

#### 1. 欧文発表

1) Takizawa, S., Nagasaka, K., Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Yashgi, T., Takeuchi, T., Kanda, T., Huibregtse, J.M., Akiyama, T., and Taketani, Y.: Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated

- degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Gene to Cell*, 11:453-464, 2006.
- 2) Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 Pseudovirions with Antisera Induced by Immunizing Rabbits with Synthetic Peptides Representing Segments of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 Surface Region. *Virology*, 358 : 266-272, 2007.
- 3) Matsumoto, K., Yasugi, T., Oki, A., Fujii, T., Nagata, C., Sekiya, S., Hoshiai, H., Taketani, Y., Kanda, T., Kawana, T., and Yoshikawa, H. : IgG Antibodies to HPV 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Letter*, 231:309-313,2006
- 4) Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Taketani, Y., and Kanda, T. Human papillomavirus type 16 P670 promoter is negatively regulated by CCAAT displacement protein. *Virus Genes*, in press, 2007
- 5) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Iwata, N., Sata, T., and Kanda, T. Biodistribution of a low dose of intravenously administered AAV-2, 10, and 11 vectors to cynomolgus monkeys. *Jpn J Infect Dis*. 59:285-93, 2006.
- 6) Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Kanda, T. Inhibitory cis-element-mediated decay of human papillomavirus type 16 L1-transcript in undifferentiated cells. *Mol Cell Biochem*. 288:47-57, 2006.
- 7) Kukimoto, I, Takeuchi, T., and Kanda, T. :CCAAT-Enhancer Binding Protein • Binds to and Activates the P<sub>670</sub> Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *Virology*, 346:98-107, 2006.
- 8) Matsuoka-Aizawa S, Gatanaga H, Sato H, Koike K, Kimura S, and Oka S.: Cooperative contribution of gag substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. *Antiviral Research*, 70:51-9, 2006.
- 9) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, and Sata T.: Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J. Virol.*, 81:1848-1857. 2007.
- 10) Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi K, Tohya Y, Sato H, and Takeda N.: Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J. Virol.*, 81:6798-806, 2007.
- 11) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, and Shioda T: A single amino acid of Human immunodeficiency virus type 2 capsid determines susceptibility to cynomolgus monkey and human TRIM5 $\alpha$  restriction. *J. Virol.*, 81:7280-5, 2007.
- 12) Kuroda M, Nagasaki S, Ito R, Ohta T. : Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 273(1):28-34, 2007; Epub 2007 Jun 7.
- 13) Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K. : Subinhibitory concentrations of  $\beta$ -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett*. 268(1):98-105, 2007
- 14) Kuroda M, Nagasaki S, Ohta T. : Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to  $\beta$ -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 59(3):425-32, 2007; Epub 2007 Jan 22.

## 2. 和文発表

- 1) 神田忠仁、柗元 巖: ヒトパピローマウイルスと子宮頸癌、日本ウイルス学会誌、56 (2)、219-230、2006
- 2) 神田忠仁: HPV 感染予防ワクチン、細胞、38(13)、24-27、2006
- 3) 神田忠仁、森 清一郎: 微生物感染による発がんのリスクと対策、公衆衛生、71(2)、113-116、2007

## . 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Motomura K, Chen J, Hu Wei-Shau, "HIV-1 and HIV-2 Interspecies Recombination and its Restriction", Cold Spring Harbor Meeting, U.S.A., May.23-28/2006.
- 2) T. Nakasone, J. Takamatsu, W. Sugiura, H. Sato, M. Nishizawa, S. Yamamoto, N. Yamamoto. Rapid and convenient enzymatic phenotyping of HIV-RT by using a real-time Amp-RT assay. XVI International AIDS Conference, 13-18 August 2006, Toronto Canada.
- 3) Motomura K, Chen J, Boyko V, Leavitt M, Gorelick R, Pathak V. K., Fu W, Nikolaitchik O, and Hu W.-S. "Interactions Between HIV-1 and HIV-2: Protein

Complementation and Genetic Recombination” 7TH ANNUAL SYMPOSIUM ON ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE, U.S.A., NOVEMBER 12-15/2006.

- 4) Wadchara Pumpradit P, Tomita Y, Yokoyama M, Naganawa S, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K and Sato H. : Characterization of neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1CRF01\_AE molecular clones with different coreceptor usages. 14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 25-28, 2007, Los Angeles, USA.
- 5) Ito, R., Kuroda, M. and Ohta, T.: *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular adhesion and biofilm formation. 107<sup>th</sup> ASM general meeting. (2007年5月、Toronto, Canada)
- 6) Kuroda, M., Nagasaki, S. and Ohta, T.: Sesquiterpene Farnesol Affects Lipase Activity of *Staphylococcus aureus* as a Competitive Inhibitor. 107<sup>th</sup> ASM general meeting. (2007年5月、Toronto, Canada)
- 7) Kanda, T.:Development of Human Papillomavirus Vaccine Against a Broader Spectrum of Oncogenic Types. Vaccines for Viral Infection in Developing Countries (2006年、7月27-28日、横浜)

## 2. 国内学会

- 1) 神田忠仁:臨床試験における組換えウイルスの使用に関する法律。第12回日本遺伝子治療学会、(2006年8月、東京)
- 2) 神田忠仁、近藤一成、越智寛幸、吉川裕之:ヒトピローマウイルス感染予防ワクチン。第65回日本癌学会学術総会(2006年9月、東京)
- 3) 神田忠仁:ヒトピローマウイルス感染と子宮頸癌。第54回日本ウイルス学会学術総会(2006年11月、名古屋)
- 4) 神田忠仁:ヒトピローマウイルスの生活環と感染予防ワクチン戦略。第19回日本性感染症学会シンポジウム(2006年12月、金沢)
- 5) 岡智一郎、山本真民、横山勝、小川智子、Hansman S. Grant、片山和彦、宮下佳奈、高木弘隆、遠矢幸伸、佐藤裕徳、武田直和:ネコカリシウイルスのプロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基の同定。第54回ウイルス学会学術集会(2006年11月、名古屋)
- 6) 神山陽香、吉居廣明、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、四童子好廣、久保嘉直:ピタミンA類似体 geranylgeranoic acid(GGA)によるHIV-1感染の抑制。第54回ウイルス学会学術集会、(2006年11月、名古屋)
- 7) 久保嘉直、横山勝、吉居廣明、神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹:CXCR4糖鎖付加によるHIV-1感染防御と、その回避機構。第54回ウイルス学会学術集会、(2006年11月、名古屋)
- 8) 吉居廣明、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直:HeLa細胞におけるCD4非依存性HIV-1の細胞侵入抑制機構。第54回ウイルス学会学術集会、(2006年11月、名古屋)
- 9) 駒野淳、二橋悠子、磯貝まや、浜武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野禎一郎、武部豊、山本直樹:挿入変異を伴う多剤耐性HIV-1(CRF01\_AE)における薬剤耐性亢進のメカニズム-薬剤耐性獲得におけるRNaseH活性の関与。第54回ウイルス学会学術集会、(2006年11月、名古屋)
- 10) 横山勝、守宏美、佐藤裕徳:HIV-1 RTにおけるATP結合阻害因子の酵素活性と耐性発現に及ぼす影響。第20回日本エイズ学会学術集会(2006年12月、東京)
- 11) 駒野淳、二橋悠子、磯貝まや、浜武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野禎一郎、武部豊、山本直樹:HIV-1逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性変異が誘導するRNaseH活性の低下と耐性亢進への寄与。第20回日本エイズ学会学術集会(2006年12月、東京)
- 12) 本村和嗣、Jianbo CHEN, Wei-Shau HU, “HIV-1とHIV-2のゲノム組換えの可能性”,第20回日本エイズ学会学術集会(2006年12月、東京)
- 13) 岡智一郎、山本真民、横山勝、小川智子、Hansman Grant S.、片山和彦、宮下佳奈、高木弘隆、遠矢幸伸、佐藤裕徳、武田直和:カリシウイルスプロテアーゼの構造機能解析。日本薬学会第127年会(2007年3月、富山)
- 14) 柗元 巖、竹内隆正、神田忠仁:角化細胞転写因子hSkn-1aによるHPV16 DNA複製の促進、第54回日本ウイルス学会学術集会(2006年11月、名古屋)
- 15) 伊藤隆太、的場公男、黒田誠、太田敏子: SarAホモログであるSarT、SarU過剰発現による細菌凝集塊形成。第51回日本ブドウ球菌研究会(2006年9月、岩手市) 長崎さなえ、黒田誠、太田敏子: 精油テルペノイド・Farnesol が有する黄色ブドウ球菌の薬剤感受性増強および毒素活性の抑制。第89回日本細菌学会関東支部会(2006年10月、伊香保市)
- 16) 伊藤隆太、的場公男、黒田誠、太田敏子。黄色ブドウ球菌・細胞壁架橋型タンパク質SasGによるバイオフィーム形成能。第80回日本細菌学会総会(2007年3月、大阪市)
- 17) 長崎さなえ、黒田誠、太田敏子。精油テルペノイドFarnesol が有する黄色ブドウ球菌の薬剤感受性増強メカニズムの解析。第80回日本細菌学会総会(2007年3月、大阪市)

- 18) 黒田誠、太田敏子。黄色ブドウ球菌の超巨大蛋白質 Ebh による耐塩機構の解析。第 80 回日本細菌学会総会（2007 年 3 月、大阪市）
- 19) 黒田誠。(W5. 近縁ゲノム配列比較から病原性へ)比較ゲノム解析から見えるブドウ球菌属の種特徴的な病原性と生存機構。第 80 回日本細菌学会総会（2007 年 3 月、大阪市）