

第 32 回中国四国ウイルス研究会 プログラム・抄録集

会期 : 平成 29 年 6 月 10 日 (土) ~ 6 月 11 日 (日)
会場 : 川崎医科大学 (岡山県倉敷市松島 577)
会長 : 齊藤 峰輝 (川崎医科大学 微生物学教室)
協賛 : 新学術領域研究「ネオウイルス学」

第 32 回中国四国ウイルス研究会 開催要項

1. 研究会会場・日時

会場：川崎医科大学 校舎棟 7 階 M-702 講義室

〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577

(JR 中庄駅から徒歩 10 分) Tel: 086-462-1111 Fax: 086-462-1199

日時： 第 1 日目 平成 29 年 6 月 10 日 13:00 ~ 17:50

第 2 日目 平成 29 年 6 月 11 日 9:00 ~ 12:30

2. 参加受付

① 会場にて、6 月 10 日 12:00 より参加受付を行います。

② 受付にて、参加費および懇親会費（懇親会参加者のみ）をお支払ください。名札とプログラム・抄録集をお渡しいたします。

参加費 1,000 円

懇親会費 5,000 円（一般）

2,000 円（大学院生、学部学生、学術研究員、技術職員）

3. 発表

① 発表時間

特別講演 発表 40 分、質疑応答 5 分

一般演題 発表 7 分、質疑応答 3 分

② 発表形式

発表は、Windows10/Powerpoint2013 で行います。発表データを USB メモリに入れてお持ちください。発表前に、講演者用 PC にデータを入れてください。

動画使用、Mac 使用の方は各自パソコンをご持参ください。

4. 幹事会

第 1 日目終了後、M-706 講義室にて開催いたします。17:50 ~ 18:20 を予定しています。

5. 懇親会

第 1 日目終了後、18:30 より川崎医科大学附属病院 本館 8 階のレストラン「楷の木」にて開催いたします。

6. 連絡先

第 32 回中国四国ウイルス研究会事務局

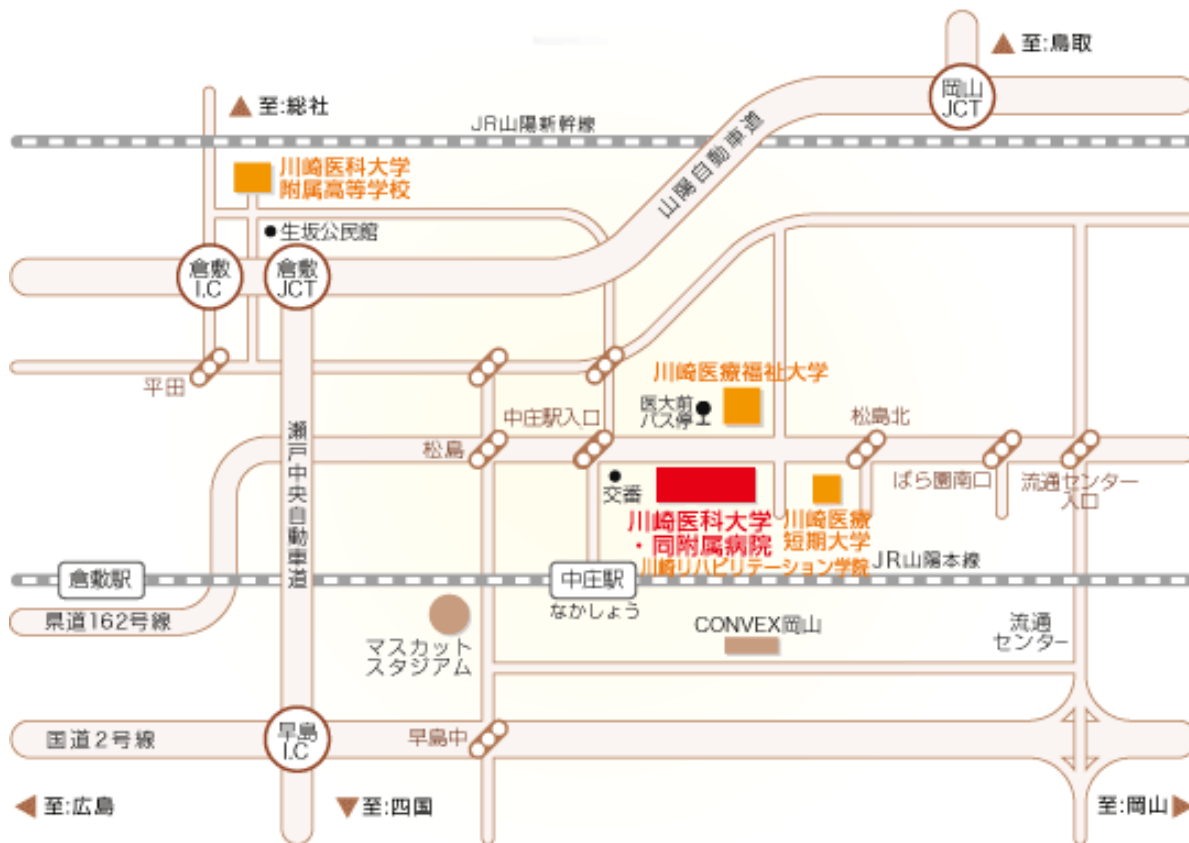
川崎医科大学微生物学教室

〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577

Tel: 086-462-1111 ext. 26518 Fax: 086-462-1199

E-mail: microbiology@med.kawasaki-m.ac.jp

交通案内



自動車の場合



山陽自動車道 倉敷 I C から

料金所を出ると、すぐの信号（倉敷方面）を右折して、突き当たりを左折。

約 2km 先、二子西交差点を右折。一つ目の信号（松島交差点）を左折



瀬戸中央自動車道 早島 I Cから

料金所を出ると、岡山方面と倉敷方面に分岐。岡山方面から国道 2 号線へ合流し、約 1km 先、早島中交差点を左折。約 3km 先、松島交差点を右折。

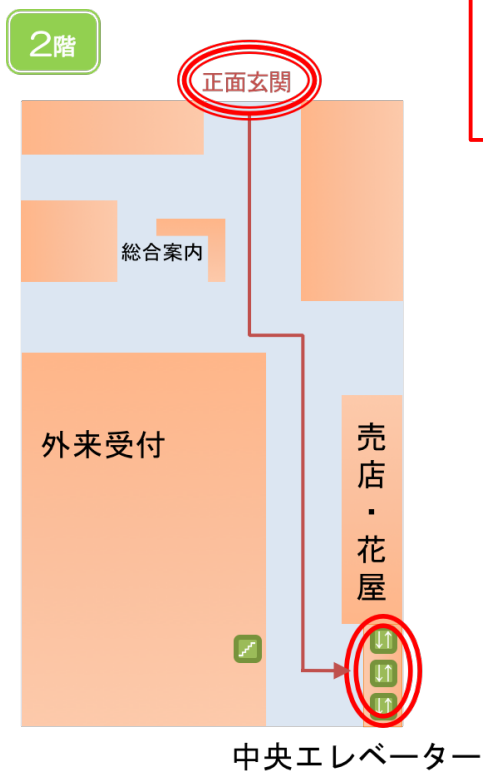
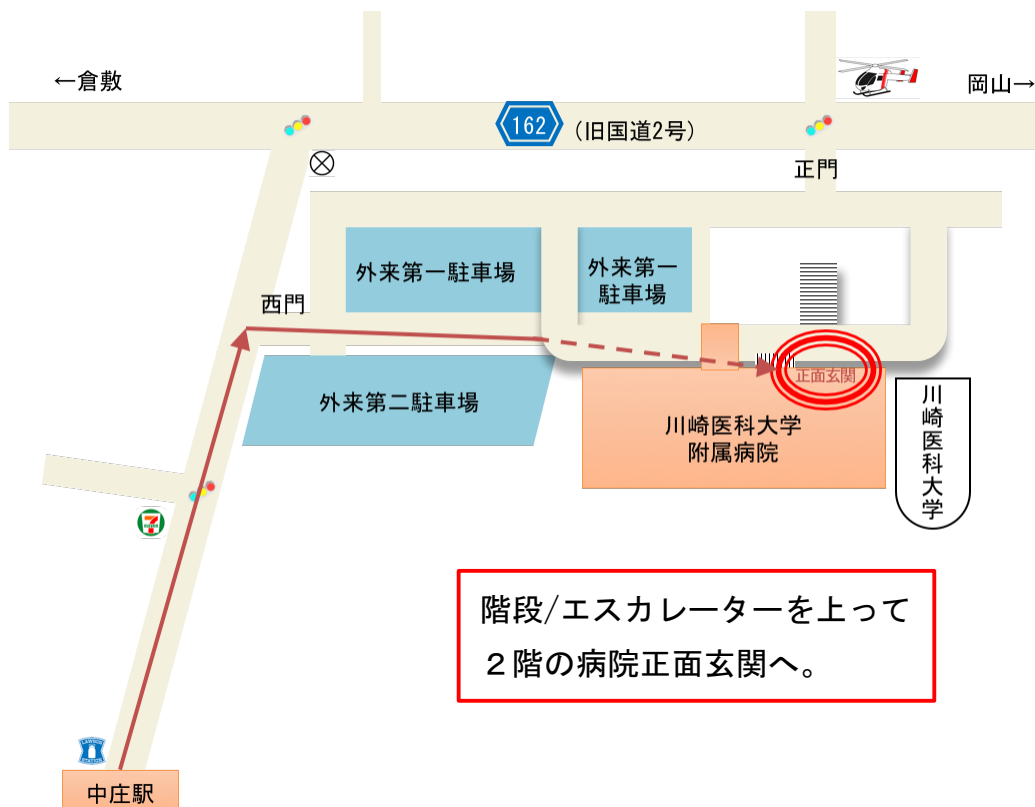
外来第一・第二駐車場をご利用ください。駐車場出入り口に自動車専用ゲートが設置されています。駐車券を取って入構し、出構時にゲートで精算となります。駐車料金は、入構後 30 分までは無料、30 分以上 1 時間未満は 100 円で、以後 1 時間ごとに 100 円加算されます。7 時間以上のご利用に関しましては 700 円の 15 時間サービス券を用意しておりますのでお声がけください。

第二駐車場のみ 24 時間毎の最高限度額が 1200 円となっております。

電車の場合

JR 山陽本線・伯備線「中庄（なかしょう）駅」下車。徒歩 10 分。

（注）快速「サンライナー」は中庄駅に停車しません。



病院正面玄関から入って直進し、突き当たり左手の中央エレベーターで7階へ。受付・会場は渡り廊下を渡って校舎棟の7階です。



プログラム

1 日目 2017 年 6 月 10 日 (土曜日)

開会の挨拶と連絡事項 12:55-13:00

一般演題セッション 1 13:00-13:50

座長:坂口 剛正(広島大学)

1. ヒト不死化肝細胞株を用いた新規 HBV 感染増殖システムの開発

○團迫 浩方¹、今井 大誉¹、上田 優輝¹、佐藤 伸哉¹、下遠野 邦忠²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²国立国際医療研究センター 肝炎免疫センター

2. ヒト cGAS の発現を亢進するインターフェロン γ と新規薬剤の探索

◎今井 大誉、團迫 浩方、上田 優輝、佐藤 伸哉、加藤 宣之

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

3. 抗 HCV 薬リバビリンの脂質生合成抑制機序の解明

○佐藤 伸哉¹、小野村 大地¹、上田 優輝¹、團迫 浩方¹、池田 正徳²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²鹿児島大学 難治ウイルス病態制御研究センター 分子ウイルス感染研究分野

4. HCV レポーターアッセイ系を用いた DAA に抵抗性を示す新規アミノ酸置換の同定

○上田 優輝¹、團迫 浩方¹、佐藤 伸哉¹、池田 正徳²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²鹿児島大学 難治ウイルス病態制御研究センター 分子ウイルス感染研究分野

5. 抗 HCV 薬として開発中の N-89 と N-251 に対する抵抗性獲得機序の解析

◎谷 焯琳、上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、加藤 宣之

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

休憩 (15 分間) 13:50-14:05

一般演題セッション 2 14:05-14:55

座長:景山 誠二(鳥取大学)

6. インフルエンザウイルス流行株の増殖能の安定性について

○常城 朱乃、金井 亨輔、景山 誠二、鳥取県感染症懇話会関係者

鳥取大学 医学部 ウイルス学分野

7. トリプシン非要求性細胞株 MDCK(+)における TMPRSS2 の発現

○坂口 剛正、吉元 玲子、奈良井 清香、川端 涼子、小田 康祐、福士 雅也、入江 崇

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 ウイルス学研究室

8. 感冒時に適応となる漢方薬のインフルエンザウイルス増殖抑制作用

◎野村 俊仁、小田 康祐、福士 雅也、入江 崇、坂口 剛正

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 ウイルス学研究室

9. チョウセンイタチ(*Mustela sibirica*)およびニホンイタチ(*Mustela itatsi*)は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染し、家禽への感染源になりえる

○笛吹 達史、富岡 幸子、曾田 公輔、伊藤 啓史、伊藤 壽啓、山口 剛士
鳥取大学 農学部 附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター

10. ベトナムの家禽から分離された H3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析

◎柏原 美奈¹、曾田 公輔¹、Ung Hong Trang²、Nguyen Khanh Hang²、伊藤 啓史¹、高桑 弘樹³、
Le Quynh Mai²、伊藤 壽啓¹

¹鳥取大学、²National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam、³京都産業大学

休憩 (15 分間)

14:55-15:10

一般演題セッション 3

15:10-16:00

座長:加藤 宣之(岡山大学)

11. 本州におけるダニ媒介性フラビウイルスの侵潤状況の調査

○下田 宙、水野 純子、米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、Supriyono、野口 慧多、鋤田 龍星、高野 愛、
前田 健
山口大学 共同獣医学部 獣医微生物学教室

12. 横隔膜や心筋からの Meat juice を用いた抗体検出法

◎米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、鋤田 龍星、下田 宙、高野 愛、前田 健
山口大学 連合獣医学研究科 獣医微生物学教室

13. ニューカッスル病ウイルスの水禽に対する病原性に関する研究

◎日高 千晴¹、伊藤 啓史^{1,2}、曾田 公輔^{2,3}、伊藤 壽啓^{1,2}

¹鳥取大学 農学部 獣医公衆衛生、²鳥取大学 農学部 附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター

³鳥取大学 農学部 獣医感染症

14. デングウイルス NS4B を標的とする宿主 E3 ユビキチンリガーゼの同定と機能解析

◎鮫島 祐紀¹、高橋 宏隆¹、鈴木 陽一²、澤崎 達也¹

¹愛媛大学 プロテオサイエンスセンター、²大阪医科大学 予防・社会医学講座

15. デングウイルスの複製に関与する脱ユビキチン化酵素の探索とその機能解析

◎岡田 健吾¹、高橋 宏隆¹、鈴木 陽一²、後藤 栄治³、徳永 文穂³、澤崎 達也¹

¹愛媛大学 プロテオサイエンスセンター、²大阪医科大学 予防・社会医学講座

³大阪市立大学大学院 医学研究科・医学部医学科 分子生体医学講座 分子病態学

休憩 (15 分間)

16:00-16:15

座長:鈴木 信弘(岡山大学)

「インフルエンザウイルス感染マウスの生体イメージング研究」

福山 聡¹、植木 紘史¹、仲尾 朋美¹、三竹 博道¹、Dongming Zhao¹、桂 廣亮¹、今井 正樹¹、野田 岳志²、河岡 義裕^{1,3,4}¹東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野²京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野³東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 高病原性感染症研究部門⁴Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

特別講演 2

17:00-17:45

座長:齊藤 峰輝(川崎医科大学)

「ヒトゲノムに組み込まれたレトロウイルスの制御機構」

佐藤 賢文

熊本大学 エイズ学研究センター 国際先端医学研究施設

幹事会

17:50-18:20

懇親会

18:30-20:30

2 日目 2017 年 6 月 11 日 (日曜日)

連絡事項

8:55-9:00

一般演題セッション 4

9:00-10:00

座長:前田 健(山口大学)

16. 様々な水圏微生物試料からの RNA ウイルス探索

○長崎 慶三¹、高野 義人¹、布浦 拓郎²、浦山 俊一²¹高知大学、²JAMSTEC

17. 蚊のゲノムにみられる内在性ウイルス様配列の解析

◎鳥井 駿¹、楢田 龍星¹、Supriyono^{1,2}、野口 慧多¹、長田 奈緒¹、南 昌平¹、米満 研三¹、下田 宙¹、Upik Kesumawati²、糸川 健太郎³、伊澤 晴彦³、沢辺 京子³、前田 健¹¹山口大学 共同獣医学部、²Bogor Agricultural University、³国立感染症研究所 昆虫医科学部

18. 猫における重症熱性血小板減少症候群の発症

◎長田 奈緒¹、水野 純子¹、米満 研三¹、南 昌平¹、楢田 龍星¹、下田 宙¹、高野 愛¹、鈴木 和男²、沖見 朝代³、森川 茂⁴、前田 健¹¹山口大学 獣医微生物学教室、²田辺市ふるさと自然公園センター、³なぎさ動物病院⁴国立感染症研究所 獣医科学部19. Properties of a mitochondrially replicating positive-sense RNA virus isolated from a filamentous ascomycete, *Cryphonectria parasitica*◎Sabitree Shahi¹、Bradley I. Hillman²、鈴木 信弘¹¹岡山大学 資源植物科学研究所、²Rutgers University

20. Comparison of the behaviors of mycoreovirus 1 and 2 in the fungal host, *Cryphonectria parasitica*, reveals natural variation in antiviral RNAi

◎Annisa Aulia¹、Bradley I. Hillman²、鈴木 信弘¹

¹岡山大学 資源植物科学研究所、²Rutgers University

21. 唾液検査で判明した健康人のヒトパピローマウイルス 16 型高保有率

◎宮崎 誠¹、清水 みさと²、金行 真澄²、安田 彩夏²、増成 彩華²、城尾 有紀²、木村 美幸¹、
荒尾 雄二郎¹

¹岡山大学大学院 保健学研究科 検査技術科学分野、²岡山大学 医学部保健学科 検査技術科学専攻

休憩（15 分間）

10:00-10:15

一般演題セッション 5

10:15-11:15

座長：山田 雅夫(岡山大学)

22. マウスヘルペスウイルスを用いた Epstein-Barr virus 肝炎の発症機序の研究

○金井 亨輔^{1,2}、朴 雅美²、渡部 明子²、有川 智博³、安居 輝人⁴、吉田 裕樹⁵、角田 郁生²、義江 修^{2,6}

¹鳥取大学 医学部 ウイルス学分野、²近畿大学 医学部 微生物教室、³金沢医科大学 一般教育機構

⁴医薬基盤研究所 感染制御プロジェクト、⁵佐賀大学 医学部 分子生命科学講座、⁶健康漢方研究所

23. 一過性睡眠不足及びストレス負荷によるヒトヘルペスウイルス 6 型 DNA 検出率の増大

○福島 実莉¹、大西 巧真²、川西 悟史²、長谷 友紀²、徳永 成未²、木村 美幸¹、荒尾 雄二郎¹

¹岡山大学大学院 保健学研究科 検査技術科学分野、²岡山大学医学部 保健学科 検査技術科学専攻

24. 集団保育児における唾液中の HHV-6 と HHV-7 DNA の排泄

○難波 ひかる¹、渡辺 正博²、鳥越 貞義³、山下 信子¹、小川 寛人¹、山田 雅夫¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病原ウイルス学、²すずかこどもクリニック

³アクエア・メディカル・ステーション

25. Epstein-Barr ウイルスの LMP2A 遺伝子は、ETS 転写因子による BART miRNA の転写活性化を介して、潜伏感染を維持する

◎キム ヒョジ、飯笹 久、シントユ フェカドゥ、金廣 優一、吉山 裕規

島根大学 微生物学講座

26. 山口捕集蚊から分離された新規 RNA ウイルスの遺伝子発現機構

○欽田 龍星、鳥井 駿、野口 慧多、米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、Spriyono、Ngo Thuy Bao Tran、

下田 宙、高野 愛、前田 健

山口大学 共同獣医学部

27. 東～南アジアに分布するヤママユガ科野蚕核多角体病ウイルスのゲノム配列と構造に関する進化的考察

◎佐々木 邦¹、小林 淳^{1,2}

¹鳥取大学大学院 連合農学研究科、²山口大学大学院 創成科学研究科

休憩（15 分間）

11:15-11:30

座長: 荒尾 雄二郎 (岡山大学)

28. 肺で発現する正常プリオン蛋白質の機能解析

○千田 淳司、原 英之、坂口 末廣

徳島大学 先端酵素学研究所 次世代酵素学研究領域 神経変性病態学分野

29. アンチセンス RNA を用いたファージ療法の基盤技術開発

○川野 光興、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

30. 抗原性が異なるインフルエンザに対する交叉防御能を担う細胞の解析

○後川 潤、内藤 忠相、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

31. 繊維状インフルエンザウイルスの運動パターン

○堺 立也、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

32. センダイウイルス C タンパク質による STAT1:STAT2 ヘテロ二量体の阻害機構の解明○小田 康祐¹、小田 隆²、的場 康幸³、入江 崇¹、佐藤 衛²、坂口 剛正¹¹広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 ウイルス学研究室²横浜市立大学 生命医科学研究科 構造生物學研究室³広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 遺伝子制御科学研究室**33. モノネガウイルス遺伝子間塩基配列の発現制御機能**川端 涼子¹、吉田 明日香²、中西 真人³、章 博浩¹、夏原 啓暉¹、坂口 剛正¹、○入江 崇¹¹広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 ウイルス学研究室、²メリーランド大学 獣医学部³産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 ヒト細胞医工学研究ラボ

優秀発表者の表彰および閉会の挨拶

12:30-12:40

集合写真撮影

12:40-12:50

「インフルエンザウイルス感染マウスの生体イメージング研究」

福山 聡¹、植木 紘史¹、仲尾 朋美¹、三竹 博道¹、Dongming Zhao¹、桂 廣亮¹、
今井 正樹¹、野田 岳志²、河岡 義裕^{1,3,4}

¹東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野

²京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野

³東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 高病原性感染症研究部門

⁴Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染すると致死性の肺障害を高率で引き起こすことが知られている。インフルエンザウイルスに感染した肺の組織障害には、好中球やマクロファージなどの免疫系が複雑に関与すると考えられているが、そのメカニズムは未だ十分に解明されていない。

そこで私達は、インフルエンザウイルス感染における肺組織障害や抗ウイルス応答メカニズムを明らかにするために、インフルエンザウイルス感染マウスの生体イメージングシステムの開発に取り組んでいる。近年、私達が作製したレポーターインフルエンザウイルス(Color-flu)は、ウイルスの病原性が保たれ、感染細胞内で蛍光タンパク質を安定的に発現しているため、生体内での感染細胞の動態を正確に評価することが出来る。さらに、高病原性鳥 H5N1 ウイルスをバックボーンにした Color-flu を解析するために、バイオセーフティレベル(BSL)3施設内に2光子レーザー顕微鏡やマイクロ CT などのイメージング機器を導入した。

本研究会では、Color-flu と BSL3 イメージングシステムを組み合わせた様々なインフルエンザ生体イメージング解析の試みについて紹介したい。

「ヒトゲノムに組み込まれたレトロウイルスの制御機構」

佐藤 賢文

熊本大学 エイズ学研究センター 国際先端医学研究施設

y-satou@kumamoto-u.ac.jp

レトロウイルスは宿主細胞の細胞質へ侵入した後、ウイルス RNA ゲノムを鋳型とし逆転写酵素反応で cDNA を作成する。その後ウイルスゲノムは2重鎖 DNA となり、宿主細胞ゲノムへと組み込まれ、プロウイルス DNA となる。感染細胞ゲノムに存在するプロウイルスは、ウイルス粒子産生の鋳型となるばかりでなく、ウイルスの持続潜伏感染や病原性と密接に関わると考えられているが、その制御メカニズムには不明な点が多い。

感染細胞の核内にあるプロウイルスは、細胞ゲノムと同様にクロマチン化され、エピジェネティックな転写制御を受けていると考えられる。最近の我々の研究で、レトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス1型 (Human T-cell leukemia virus type 1; HTLV-1) のプロウイルスゲノムに、宿主細胞の DNA 結合タンパク CTCF が直接結合する事を明らかにした¹⁾。CTCF は細胞ゲノムの高次クロマチン構造制御において、極めて重要な働きをする分子として知られる。つまり宿主ゲノムに組み込まれたレトロウイルス HTLV-1 が、宿主細胞タンパクである CTCF を利用してウイルスゲノムのエピゲノム構造を制御し、感染細胞内での生き残りを図っていると考えられる。

本セミナーでは宿主細胞ゲノム DNA に組み込まれた、レトロウイルスの制御機構について紹介し、核内におけるウイルスと宿主細胞のクロストークについて論じたい。

1. Satou Y, Miyazato P, Ishihara K, Yaguchi H, Melamed A, Miura M, Fukuda A, Nosaka K, Watanabe T, Rowan A, Nakao M, and Bangham CRM.
The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome.
PNAS, 113: 3054-59, 2016.

ヒト不死化肝細胞株を用いた新規 HBV 感染増殖システムの開発

○團迫 浩方¹、今井 大誉¹、上田 優輝¹、佐藤 伸哉¹、下遠野 邦忠²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²国立国際医療研究センター 肝炎免疫センター

dansako@md.okayama-u.ac.jp

【目的】B型肝炎ウイルス(HBV)が感染増殖するヒト肝細胞株として、HepG2細胞やHepaRG細胞といった肝がん細胞株がこれまでに報告されている。HepG2細胞はHBV感染受容体であるヒト sodium taurocholate cotransporting polypeptide(NTCP)を強制発現させることにより、HBV感染増殖性を獲得することが知られている(HepG2/NTCP細胞)。今回、当教室が所有するいくつかのヒト不死化肝細胞株にNTCPを強制発現させ、新規HBV感染増殖システムの構築を試みたので報告する。

【方法】ヒト不死化肝細胞株であるPH5CH細胞、NKNT-3細胞及びOUMS29細胞にNTCPを強制発現させた(PH5CH/NTCP細胞、NKNT-3/NTCP細胞及びOUMS29/NTCP細胞)。HBV感染増殖性はHBV/NanoLucアッセイ系により評価した。HBV感染後の経時的なHBV total transcript量の変化やHBV感染13日後のHBV DNA量は定量的RT-PCR法により測定した。限界希釈法によりNKNT-3/NTCP細胞をサブクローニングし、親細胞より高いHBV感染増殖性を示す細胞クローンを探索した。

【結果】PH5CH/NTCP細胞、NKNT-3/NTCP細胞及びOUMS29/NTCP細胞のうち、NKNT-3/NTCP細胞がHBV感染増殖性を示した。しかし、NKNT-3/NTCP細胞のHBV感染増殖性はHepG2/NTCP細胞のそれよりも10倍程度低かった。そこで、限界希釈法によるNKNT-3/NTCP細胞のサブクローニングを行い、解析を進めた結果、親細胞より高いHBV感染増殖性を示す細胞クローンが幾つか得られた。これらの細胞クローンのサブクローニングを繰り返すことにより、さらに高いHBV感染増殖性を示す細胞クローンが得られた。

【考察】HepG2細胞と同様に、NKNT-3細胞はNTCPの強制発現により、HBV感染増殖性を獲得したことから、HBV感染増殖に必要な宿主因子を発現しているものと思われる。現在、限界希釈法によるサブクローニングを繰り返し、さらに高いHBV感染増殖性を示すNKNT-3/NTCP細胞クローンを探索中である。本研究で樹立したヒト不死化肝細胞株を用いる新規HBV感染増殖システムは、従来の肝がん細胞株では難しいHBVの持続感染による肝発がん機構の解明に有用である。

ヒト *cGAS* の発現を亢進するインターフェロン γ と新規薬剤の探索

◎今井 大誉、團迫 浩方、上田 優輝、佐藤 伸哉、加藤 宣之

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

hirotaka.i@s.okayama-u.ac.jp

【目的】 cyclic GMP-AMP synthase (*cGAS*)はウイルス DNA を認識後、自然免疫応答を誘導する抗ウイルス性の宿主因子である。最近、我々は *cGAS* が B 型肝炎ウイルス (HBV)のゲノム DNA を認識後、自然免疫応答を誘導し、最終的に HBV 感染性粒子の形成を阻害することを報告した。この研究成果から、我々は *cGAS* の発現レベルを特異的に亢進させることができれば、HBV の増殖抑制に有効であると考えた。今回、*cGAS* プロモーターの細胞アッセイシステムを構築し、各種インターフェロン (IFN)の効果を検討した。さらに、FDA 認可薬ライブラリーから、このプロモーター活性を亢進させる薬剤の探索を行ったので報告する。

【方法】 *cGAS* の上流領域(翻訳開始点の直前塩基から転写開始点上流 2kb までの様々な長さの領域)を組み込んだ各種レポータープラスミドを作成した。*cGAS* のプロモーター活性は、これらのレポータープラスミドをヒト不死化肝 NKNT-3 細胞に導入後、ルシフェラーゼの発光強度にて評価した。各種 IFN と FDA 認可薬ライブラリーに含まれる薬剤の *cGAS* のプロモーター活性に対する効果を評価した。

【結果】 *cGAS* のプロモーター活性は、転写開始点の上流 100 から 2kb までで認められた。この結果から、*cGAS* の転写調節領域が転写開始点の上流 100 から、少なくとも 2kb まで及んでいることが示唆された。そこで、*cGAS* のプロモーターアッセイには、転写開始点の上流 2kb までを組み込んだレポータープラスミドを使用することとした。*cGAS* のプロモーター活性に対する各種 IFN の効果を検討した。その結果、IFN- γ のみが *cGAS* のプロモーター活性を有意に亢進させることがわかった。さらに、FDA 認可薬ライブラリーから *cGAS* のプロモーター活性を有意に亢進させる薬剤を幾つか見出した。

【考察】 *cGAS* の上流領域の塩基配列には GC box 配列が存在しており、基本転写因子による制御を受けていることが示唆された。この領域には I 型や III 型 IFN に応答する ISRE 配列ではなく II 型 IFN である IFN- γ に応答する GAS 配列が存在していたので、実験結果と良く合致していた。今後、構築した細胞アッセイシステムを用いて、*cGAS* のプロモーター活性を亢進させる薬剤をさらに探索する予定である。

抗 HCV 薬リバビリンの脂質生合成抑制機序の解明

○佐藤 伸哉¹、小野村 大地¹、上田 優輝¹、團迫 浩方¹、池田 正徳²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²鹿児島大学 難治ウイルス病態制御研究センター 分子ウイルス感染研究分野

sisatoh@okayama-u.ac.jp

[目的]

核酸類縁体の抗 HCV 薬リバビリンは、最近では HCV を直接標的とする Direct acting antivirals (DAAs)製剤と併用して C 型慢性肝炎治療に用いられている。我々はリバビリンが細胞内の脂質生合成を抑制するという新たな機能をこれまでに見出している。本研究では、その機序の解明を目的として実験を行った。

[材料と方法]

リバビリンを細胞内で代謝活性化するアデノシンキナーゼ(ADK)を過剰発現させた肝がん細胞株あるいは不死化肝細胞株を樹立し解析に用いた。リバビリン添加における遺伝子発現動態や中性脂質量変化を指標に、それらに関わる因子を遺伝子の過剰発現法あるいはノックダウン法により実験を行い同定した。

[結果と考察]

リバビリンを細胞に添加すると脂質生合成関連遺伝子の発現は抑制される。しかしながら、グアノシンを同時に添加すると、この抑制はキャンセルされた。この結果から、リバビリンによる細胞内 GTP の枯渇が脂質生合成の抑制を誘引する事が明らかとなった。さらに、この抑制効果には AMPK-related kinases (AMPK-RKs)が関与している事や核内受容体 RXR α のダウンレギュレーションが関わっている事が明らかとなった。過剰な脂質生合成は脂肪肝および肝がん発症に強く影響する事から、リバビリンが C 型慢性肝炎のみならずそれら病態発症の予防薬となりうる事が示唆される。

HCV レポーターアッセイ系を用いた DAA に抵抗性を示す新規アミノ酸置換の同定

○上田 優輝¹、團迫 浩方¹、佐藤 伸哉¹、池田 正徳²、加藤 宣之¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野

²鹿児島大学 難治ウイルス病態制御研究センター 分子ウイルス感染研究分野

yukinon@md.okayama-u.ac.jp

【目的と方法】我々は、安価に合成可能な抗マラリア薬候補 N-89 とその誘導体である N-251 に強い抗 HCV 活性を見出し、臨床試験に向けて研究を進めている。これまでに、独自に開発した全長 HCV-RNA が複製する HuH-7 或は Li23 細胞株由来のレポーターアッセイ系 (OR6 や ORL8 等) を用いて、各種 DAA (direct-acting antiviral) 製剤に抵抗性を示す細胞株を樹立した。これらの DAA 抵抗性細胞にも N-89 や N-251 が強い抗 HCV 活性を示すことを明らかにした。さらに、DAA 抵抗性細胞由来の HCV の遺伝子解析により DAA 抵抗性に寄与する可能性がある新規アミノ酸置換が検出された。今回、これらのアミノ酸置換が DAA 抵抗性に寄与するかどうかを明らかにしたので報告する。

【結果と考察】DAA 抵抗性に寄与する既知のアミノ酸置換 4 種類と新規アミノ酸置換候補 5 種類について、Point mutagenesis の手法を用いて、それぞれのアミノ酸置換を持つように改変した HCV-RNA を作成した。得られた HCV-RNA を Electroporation 法により細胞に導入し、4 日後に各種 DAA や N-89 (N-251) に対する感受性をレポーターアッセイにより定量的に評価した。その結果、既知のアミノ酸置換は、いずれも DAA に対して既報と同程度の抵抗性を示した。一方、新規アミノ酸置換候補については、NS3 領域の 2 種類のアミノ酸置換 (D79G と S174Y) が DAA に対して抵抗性を示すことが分かった。これらのアミノ酸置換は、実際の臨床データにも存在していた。DAA 抵抗性に寄与することが分かったこれら全てのアミノ酸置換に対しても N-89 (N-251) は強い抗 HCV 活性を示したことから、DAA に抵抗性を示す患者にも N-89 (N-251) は有効であることが示唆された。

抗 HCV 薬として開発中の N-89 と N-251 に対する 抵抗性獲得機序の解析

◎谷 焯琳、上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、加藤 宣之
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学分野
guweilin1992@s.okayama-u.ac.jp

【目的と方法】

我々は、独自に開発した全長 HCV-RNA が複製するレポーターアッセイシステム (HuH-7 細胞株由来の OR6 細胞や Li23 細胞株由来の ORL8 細胞など) を用いて、以前、抗マラリア薬候補 N-89 とその誘導体である N-251 に強い抗 HCV 活性を見出した。その作用機序の解明を目的として前回の発表では、N-89 や N-251 に抵抗性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞を用いた解析から、抵抗性の獲得には宿主とウイルス側の両方の因子が同程度に関与することを明らかにした。今回、N-251 に強い抵抗性を示す ORL8 N-251r 細胞を用いて詳細な解析を行い、抵抗性の獲得に寄与する宿主因子について検討したので報告する。

【結果と考察】

まず、ORL8 N-251r 細胞は、N-89 にも抵抗性を示すことを確認した。次に、ORL8 (高感受性の親細胞) と ORL8 N-251r 細胞由来の HCV-RNA を相互に入れ替えて新たに作成した 4 種類の HCV-RNA 複製細胞を用いて N-89 への感受性評価を行った。その結果、前回示した N-251 への感受性評価の結果と同じく、抵抗性の獲得には宿主とウイルス側の両方の因子が同程度に関与することを確認した。さらに、ウェスタンブロット解析によっても上記解析結果を支持する結果を得た。以上の結果から、N-89 と N-251 の抗 HCV 活性の作用機序は同じであることが示唆された。次に、N-89 や N-251 に対して感受性或いは抵抗性を示す 5 種類の細胞 (ORL8, ORL8 N-251r など) を用いて cDNA マイクロアレイの比較解析を行った。その結果、抵抗性の獲得に寄与する可能性のある遺伝子として、抵抗性を示す細胞で発現レベルが亢進した遺伝子 22 種類と逆に低下した遺伝子 17 種類を抽出することができた。現在、発現レベルが亢進した遺伝子 (*SOCS2*, *DPYSL3*, *CUX2* など) について先行して解析を進めており、RT-PCR 法による遺伝子発現レベルの定量解析や上記候補遺伝子を強制発現させた細胞における N-89 (N-251) への感受性評価についての結果を発表する予定である。

インフルエンザウイルス流行株の増殖能の安定性について

○常城 朱乃、金井 亨輔、景山 誠二、鳥取県感染症懇話会関係者

鳥取大学 医学部 ウイルス学分野

atsuneki@med.tottori-u.ac.jp

【背景】我々は、インフルエンザウイルス流行株の増殖能に注目し、株による違いを解析してきた。A(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型において高増殖能株と低増殖能株が存在し、新型の登場した2009年を除き全ての流行期に高増殖能株と低増殖能株が検出された。また、別の型・亜型との同時感染事例が20%以上を示す流行期が見られた。本研究会では、同時感染は流行株の増殖能に影響を与えるか検討した。さらに、ウイルス増殖の安定性を調べるため、ウイルスの継代を繰り返した。

【材料と方法】2009年から2015年に、鳥取県内のインフルエンザ患者からウイルスを分離し、型・亜型を判別した(n=555)。Madin-Darby canine kidney細胞に、3,300 copies/mlのウイルス分離株A(H1N1)亜型(n=52)、A(H3N2)亜型(n=31)、B型(n=56)を感染させ、72時間後に到達するウイルス量より増殖能を決定した。増殖能が 10^8 copies/mL以上の株を高増殖能株、 10^8 copies/mL以下の株を低増殖能株と定義した。また、高増殖能株のウイルスについて単一感染時の増殖能と別の型・亜型と同時感染させた時の増殖能を比較した。さらに、3,300 copies/mlの高増殖能株と低増殖能株をそれぞれ細胞に感染させ、5代目までのウイルス増殖能の安定性を評価した。

【結果】2009年から2015年の流行期に高増殖能株は毎年検出され、A(H1N1)亜型では46株、A(H3N2)亜型では9株、B型では44株が検出された。また高増殖能株のA(H1N1)亜型とB型を同時感染時の増殖ウイルス量は、単一感染時と同等であった。A(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型株をそれぞれ継代したところ、全てにおいて増殖能は変化することなく安定であった。

【考察】高増殖能株はすべての流行期、すべての型・亜型に見られ、流行株の過半数に認められたことから、流行の主流を作っていると考えられる。また、他の型・亜型との同時感染時、継代時において、その性質に影響を受けず次世代に受け継がれることから、流行株の性質を評価する指標として有効であると考えられる。

トリプシン非要求性細胞株 MDCK(+)における TMPRSS2 の発現

○坂口 剛正、吉元 玲子、奈良井 清香、川端 涼子、小田 康祐、福士 雅也、入江 崇
広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 ウイルス学研究室

tsaka@hiroshima-u.ac.jp

ヒトインフルエンザウイルス、鳥インフルエンザウイルス弱毒株、ニューカッスル病ウイルス弱毒株、センドライウイルス等は、増殖のためにその膜融合蛋白質前駆体が宿主のトリプシン様プロテアーゼによって開裂活性化されることが必要である。以前に、当研究室の野間、藤井、吉田らは、トリプシン非要求性にインフルエンザウイルスが増殖する MDCK 変異細胞株を報告した (MDCK(+)細胞、Arch. Virol. 143:1893-1909, 1998)。しかし、この細胞に存在すると想定されるウイルス活性化プロテアーゼは不明である。一方、宿主のウイルス活性化プロテアーゼについては数々同定されてきている。最近、ノックアウトマウスを用いた解析から、インフルエンザウイルスの一部は TMPRSS2 によって開裂活性化されることが明らかになった。

MDCK(+)細胞ライセートに対して TMPRSS2 抗血清を用いたウェスタンブロットをおこなったところ、バンドが検出された。そこで MDCK(+)細胞からヒト TMPRSS2 と相同な cDNA をクローニングし、登録されているオオカミの TMPRSS2 様の配列とも比較して、イヌ TMPRSS2 であると結論した。この配列をもとに設定したプライマーを用いたリアルタイム PCR で、通常の MDCK 細胞に比べて、数十倍、発現が更新していることがわかった。さらにイヌ TMPRSS2 を 293T 細胞で発現させて、インフルエンザウイルスの HA 蛋白質を開裂できることを確認した。現在、MDCK(+)細胞の TMPRSS2 をノックアウトした細胞株の樹立を行っている。

1998 年の時点では未知であった、MDCK(+)細胞のウイルス活性化プロテアーゼは TMPRSS2 である可能性が高いと考えられる。

感冒時に適応となる漢方薬のインフルエンザウイルス増殖抑制作用

◎野村 俊仁、小田 康祐、福士 雅也、入江 崇、坂口 剛正

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 ウイルス学研究室

d160744@hiroshima-u.ac.jp

【背景】 インフルエンザウイルス感染症の流行は毎年起きている。また、新型インフルエンザ、耐性ウイルスの出現に伴うパンデミックも危惧される。そのため、インフルエンザウイルスに対して抗ウイルス作用を持つ薬物の検索は重要な課題である。

【目的】 漢方薬は日本で広く用いられている伝統的な治療薬であり、感冒時やインフルエンザ罹患時においても使用されている。麻黄湯が最もインフルエンザ罹患時の漢方薬として選択される頻度が高く、臨床的な効果が報告されている。麻黄湯の成分である生薬：マオウによる感染細胞を用いたインフルエンザウイルス増殖抑制作用の報告もなされている。しかし、他の漢方薬による抗ウイルス作用の研究、報告は十分でない。今回、我々は感冒時に適応となる葛根湯、滋陰降火湯、川芎茶調散、麦門冬湯の4つの漢方薬の抗ウイルス作用を検討した。比較対象として麻黄湯も同時に検討した。

【方法】 インフルエンザウイルス(A/Udorn/72(H3N2)、香港型の実験室株)を用いて Madin-Darby イヌ腎臓細胞(MDCK 細胞)での感染実験を行った。Cytotoxicity LDH Assay を行い、細胞障害性のない濃度で細胞維持液を調整し、48時間後の培養上清のウイルス量をHemagglutinin (HA) 試験と感染価試験で定量して比較した。

【結果】 感冒時に適応となる漢方薬にもウイルス増殖抑制作用を認めるものがあった。

【結果、考察】 葛根湯は麻黄湯と同様に、マオウを含むため同様の作用があったと考えられた。他の漢方薬はマオウを含んでおらず、別の成分による作用であると考えられた。今回の研究で、これまでに報告のない漢方薬による抗ウイルス作用を確認することができた。今後、更なる研究、臨床経験の蓄積により、インフルエンザに対する新たな治療選択となりうる可能性がある。

チョウセンイタチ(*Mustela sibirica*)およびニホンイタチ(*Mustela itatsi*)は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染し、家禽への感染源になりえる

○笛吹 達史、富岡 幸子、曾田 公輔、伊藤 啓史、伊藤 壽啓、山口 剛士
鳥取大学 農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター
usutatsu@muses.tottori-u.ac.jp

【背景】近年、国内に H5N1、H5N8、H5N6 と様々な亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) が侵入し、家禽や野鳥で全国的な流行をおこしている。家禽への感染源はいまだ特定されていないが、養鶏場に侵入する野生哺乳動物が、家禽にウイルスを伝播する役割をになう可能性が懸念されている。我々は第 31 回本研究会において、チョウセンイタチ(*Mustela sibirica*)が H5N8 亜型 HPAIV に感染し、高力価のウイルスを 5-7 日間排出することを報告した。本研究では 2010 年に国内流行した H5N1 亜型 HPAIV のチョウセンイタチおよびニホンイタチ(*Mustela itatsi*)に対する感受性を検討した。

【材料と方法】 養鶏場で捕獲したニホンイタチおよびチョウセンイタチ各 3 匹に A/chicken/Shimane/1/2010(H5N1)(農研機構・動物衛生研究部門より分与)を 10^7 EID₅₀/0.5 ml 経鼻接種した。ウイルス接種後 14 日間の臨床観察、ウイルス排出状況および抗体応答から H5N1 亜型 HPAIV に対する感受性を評価した。

【結果】ウイルス接種後 9 日目にチョウセンイタチ 1 匹が死亡、他 2 匹のチョウセンイタチおよびニホンイタチ 3 匹は臨床徴候を呈することなく 14 日間耐過した。両イタチ種において、接種 1 日目から 5~7 日目までに採取した鼻腔または口腔スワブからウイルスが分離され、ピーク時のウイルス力価は報告されている 50%ニワトリ致死量の 10^3 EID₅₀を上回った。死亡時または観察終了時に採取した血清中に HI 抗体が検出されことから、H5N1 亜型 HPAIV が両イタチ種に感染、増殖したことが確認された。

【考察】ニホンイタチとチョウセンイタチがともに H5N1 亜型 HPAIV に感染し、ニワトリに伝播しうる量のウイルスを環境中に排出する可能性が示された。西日本に分布するチョウセンイタチに加え、北海道から九州まで広く生息するニホンイタチの感受性が示されたことから、日本国内のあらゆる地域において、鶏舎に侵入するイタチが家禽へのウイルス感染源となる可能性が示された。

本研究は、「農林水産省・平成 28 年度国際共同研究による重要家畜伝染病対策事業」の一環として実施した。

ベトナムの家禽から分離された H3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析

◎ 柏原 美奈¹、曾田 公輔¹、Ung Hong Trang²、Nguyen Khanh Hang²、伊藤 啓史¹、高桑 弘樹³、
Le Quynh Mai²、伊藤 壽啓¹

¹鳥取大学、²National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam、³京都産業大学

toshiito@muses.tottori-u.ac.jp

【背景】ベトナムでは生鳥市場や農場の家禽で鳥インフルエンザウイルス(AIV)が維持されている。当地における AIV のコントロールに資するため、本研究室では 2011 年より主に当地の市場の家禽を対象にウイルスサーベイランスを継続して行っており、これまでに家禽のスワブ材料 2,090 検体から計 105 株の H3 亜型 AIV が分離されている。本研究では分離された H3AIV の遺伝子と抗原性を解析し、その流行動態について検討した。

【材料と方法】2011 年 9 月～2016 年 2 月にベトナムの生鳥市場の家禽から分離された H3AIV 計 34 株の各遺伝子分節の塩基配列を決定し、系統解析を行った。H3 ヘマグルチニン(HA)の系統に基づいて代表株を選出し、各株に対する鶏免疫血清を作製した。免疫血清と H3AIV の交差反応性を HI 試験により評価した。

【結果】分離された H3AIV は HA 遺伝子の系統解析により、7 つのグループ(Ⅰ～Ⅶ)に分類された。グループⅠおよびⅡには野生水禽由来の H3AIV も包含された。2011～13 年までグループⅡの H3AIV が流行し、家禽で維持されていたが、2012～13 年にグループⅣおよびⅦに属する H3AIV が分離され始め、流行株の変動が認められた。近年(2015～16 年)はグループⅣAIV に加え、2011 年に一時分離されていたグループⅠAIV が再び流行しており、両グループ間では HA の抗原性が異なっていた。他の遺伝子分節においても分離株間で遺伝的多様性が認められた。

【考察】遺伝的背景および抗原性が異なる H3AIV が、現在に至るまでベトナムの家禽で維持されていることが示された。ベトナムの生鳥市場では家禽が野外で飼育されており、野鳥との接触が生じやすい環境にある。このような場において、自然宿主である野生水禽から家禽へのウイルス伝播が繰り返され、特定の株が家禽群に定着し、系統進化、遺伝子再集合および抗原変異を起こしているものと推察される。

本州におけるダニ媒介性フラビウウイルスの侵潤状況の調査

○下田 宙、水野 純子、米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、Supriyono、野口 慧多、鍬田 龍星、
高野 愛、前田 健

山口大学 共同獣医学部 獣医微生物学教室

hshimoda@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】

2016 年に北海道で 23 年ぶりとなるダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)感染患者および国内初の死亡例が報告された。我々は本研究会でイノシシより本州で初めて TBEV に近縁であるヤマグチウイルス(YGV)の遺伝子検出に成功したことを報告した。今回、国内における TBEV の侵潤状況を知るために、近縁なランガットウイルス(LGTV)を用いた血清疫学的調査およびマダニからの遺伝子検出を実施した。

【結果】

1. 大分県、山口県、兵庫県、和歌山県、愛媛県、香川県、岐阜県、栃木県のイノシシ(計 666 頭)、兵庫県のアライグマ 198 頭、ハクビシン 65 頭から血清を回収した。LGTV および蚊媒介性の日本脳炎ウイルス(JEV)感染 BHK 細胞溶解液を抗原として ELISA を実施した。1 次抗体として 100 倍希釈した血清を、2 次抗体として HRP 標識した Protein A/G を使用した。OD 値が 0.5 以上の個体を暫定的に陽性と判定した。その結果、栃木県以外のすべての県のイノシシで LGTV 陽性個体が認められ、兵庫県(18%)、和歌山県(21%)、山口県(8%)、大分県(10%)、香川県(6%)、岐阜県(19%)で LGTV に対してのみ陽性の個体が認められた。アライグマやハクビシンにおいて陽性個体は確認されなかった。また、山口県のイノシシにおける LGTV と JEV に対する中和試験を実施したところ、38 頭中 14 頭で LGTV 中和抗体陽性となり、LGTV のみ陽性の個体が 2 頭確認された。
2. 2014 年から 2016 年にかけて山口県、和歌山県、島根県隠岐島にて旗摺り法によりマダニの捕集を行い、YGV の遺伝子検出に供した。捕集したマダニ(計 2,095 匹、255 プール)の乳剤より RT-PCR により YGV 特異的プライマーを用いて遺伝子検出を実施した。その結果、山口県で 56 プール中 4 プール、和歌山県で 156 プール中 16 プールのマダニから遺伝子陽性が確認された。陽性が確認されたマダニはチマダニ属のフタトゲチマダニ、キチマダニ、フタトゲチマダニであった。

【考察】

今回、西日本のイノシシより TBEV に近縁な LGTV に対する抗体が検出された。同地域のアライグマやハクビシンなど、他の野生動物では陽性個体がほとんどいないことから、イノシシが主な自然宿主であることが考えられた。また、和歌山県および山口県のマダニより YGV が検出されていることから、同ウイルスがダニ媒介性ウイルスであることが確認された。本州にも、TBEV に近縁なウイルスがイノシシとマダニの間で感染環を形成していることが証明された。ヒトを含めた動物における病原性に関する調査研究が必要である。

横隔膜や心筋からの Meat juice を用いた抗体検出法

◎米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、鉦田 龍星、下田 宙、高野 愛、前田 健
山口大学 連合獣医学研究科 獣医微生物学教室
v019tm@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】

野生動物における各種感染症の感染状況を調べる上で、血清疫学調査が最も効率的な方法である。しかし、野生動物の血清収集には分離のための機器が必要であり、血清の回収を行うことができる現場は多くない。今回、それらの問題点を解決するために、筋肉からの滲出液である Meat juice を用いた抗体検査系の確立、評価を行なった。

【材料と方法】

山口県下関市で 2016 年 10 月から 2017 年 2 月に捕獲されたイノシシ 44 頭から血液、心臓、横隔膜を回収した。定法通り血液から遠心分離により血清を回収した。心臓及び横隔膜は約 100g をジップロックに回収し、冷凍した後、室温で解凍することにより Meat juice を得た。血清及び Meat juice は検査に使用するまで -20°C で保存した。抗 E 型肝炎ウイルス(HEV)抗体及び抗日本脳炎ウイルス(JEV)抗体検出のために、HEV のカプシドタンパクを発現した 293T 細胞溶解液及び JEV 感染細胞溶解液をそれぞれ抗原とした ELISA を行なった。一次抗体として血清(100 倍)及び Meat juice(10 倍、20 倍、40 倍)を使用し、二次抗体として protein A/G を使用した。

【結果】

1. 心臓及び横隔膜を回収した 44 頭のイノシシのうち、43 頭(98%)から心臓の Meat juice、34 頭(77%)から横隔膜の Meat juice が得られた。
2. Meat juice を用いた ELISA で抗ウイルス抗体検出に成功した。
3. 血清を用いた ELISA と比較した結果、Meat juice を 20 倍希釈で用いた結果が血清 100 倍希釈の結果と類似していた。

【考察】

Meat juice を用いた抗体検出の結果から、Meat juice にはおよそ血清の 5 分の 1 量の抗 HEV 抗体、抗 JEV 抗体が存在していることが示された。Meat juice は血清に比べて低い希釈倍率で検査に使用する必要はあるが、それによる非特異的な反応はほとんど見られず、感度・特異度ともに優秀な結果が得られた。心臓の方が横隔膜よりも Meat juice が得られる確率が高く、検査材料に適していると考えられた。Meat juice は特殊な技能や機器がなくても容易に得ることができることから、野生動物の感染状況調査を行う上で非常に優れた材料であると言える。今後、Meat juice を用いた他のウイルスについての検査系の確立、Meat juice からのウイルス遺伝子検出、また、他の動物種における調査を行う予定である。

ニューカッスル病ウイルスの水禽に対する病原性に関する研究

◎日高 千晴¹、伊藤 啓史^{1,2}、曾田 公輔^{2,3}、伊藤 壽啓^{1,2}

¹鳥取大学 農学部 獣医公衆衛生、²鳥取大学 農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター

³鳥取大学 農学部 獣医感染症

toshiito@muses.tottori-u.ac.jp

【背景】 ニューカッスル病ウイルス(NDV)は、ニワトリに対する病原性により致死率の高い強毒型、若齢鶏に限り高致死率を示す中等毒型、日齢に関わらず致死性を示さない弱毒型の3型に分類される。しかし、その病原性は対象鳥種によって異なり、一般にニワトリやシチメンチョウ等に対しては致死적でも、カモ等の水禽類にはほとんど症状を示さないことが知られている。ところが近年、水禽に対して致死的なNDVが報告された。そこで、本研究ではNDVの水禽に対する病原性発現機序の解明を目的として、NDVを水禽で継代し、継代ウイルスの病原性評価及び遺伝子解析を行った。

【材料及び方法】 野生水禽由来の弱毒型 NDV 分離株 Goose/Alaska/415/91 をニワトリ雛の気嚢で9代、脳で5代継代することにより得られた強毒型変異株(9a5b株; Shengqing *et al.*, 2002)を、アヒル雛の気嚢で5代、脳で10代継代してda5b10株を得た。さらにこれを脳で10代継代してda5b20株を得た。継代は雛の気嚢または脳にウイルスを接種して経過を観察し、死亡時あるいは接種後3～4日目に感染個体の肺または脳を採材して作製した臓器乳剤を次代の接種材料として用いた。水禽に対する病原性を評価するため、2日齢アヒル10羽の脳内に $10^{6.7}$ EID₅₀/羽のウイルスを接種した。その後観察期間8日間中の症状を毎日点数化(症状なし0、症状あり1、死亡2)して、その合計値を延べ羽数で除した値を病原性指数とした。また、1週齢アヒル10羽の鼻腔に 10^7 EID₅₀/羽のウイルスを接種して、うち6羽については病原性指数の測定を行い、残り4羽は接種3及び5日後に2羽ずつ安楽殺して、各臓器(脳、気管、肺、肝、脾、腎、直結腸)中のウイルス力価の測定に供した。またda5b10株およびda5b20株の全長ゲノム塩基配列を決定し、9a5b株のそれと比較した。

【結果及び考察】 脳内接種における病原性指数は9a5b株が1.21、da5b10株が1.85、そしてda5b20株が1.88であった。また鼻腔接種における病原性指数は各々0.29、1.06、1.25であり、継代によるアヒルへの病原性増強が確認された。鼻腔接種3及び5日後において、継代2株はアヒルの全臓器から検出されたのに対し、9a5b株は脳(3日目)、気管、肝、脾(5日目)から検出されず、継代株のアヒルでの増殖能の上昇が認められた。9a5b株とda5b10株には、アミノ酸置換が10箇所(P蛋白227、229位、V蛋白230位、M蛋白44、123、F142位、HN蛋白271、538位、L蛋白1676、1844、2017位)認められた。そのうち3箇所(P227、HN271、L2017)は、da5b20では9a5bのアミノ酸配列に戻り、新たな3箇所のアミノ酸置換(M342、F304、L2024)が認められたことから、これらのいずれかあるいはいくつかの組み合わせが本ウイルスの水禽への病原性増強に関与した可能性が考えられた。今後はリバーシジェネティクスによりda5b20株と9a5b株のゲノムを部分的に組換えた変異ウイルスを作出し、水禽への病原性を評価することで、どのアミノ酸置換がda5b20株の水禽への病原性増強に関与したのかを明らかにしていきたい。

デングウイルス NS4B を標的とする宿主 E3 ユビキチンリガーゼの同定と機能解析

◎鮫島 祐紀¹、高橋 宏隆¹、鈴木 陽一²、澤崎 達也¹

¹愛媛大学 プロテオサイエンスセンター、²大阪医科大学 予防・社会医学講座

e844013k@mails.cc.ehime-u.ac.jp

【目的と意義】 デングウイルス(DENV)はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスである。NS4B は DENV の非構造タンパク質の1つであり、小胞体上でウイルス複製複合体形成の足場となることが報告されている。一方、宿主細胞はタンパク質をポリユビキチン化(ポリ Ub 化)し分解するユビキチン-プロテアソーム機構が存在し、E3 ユビキチンリガーゼ(E3)が基質の認識を担っている。先行研究では細胞内在性の E3 によって NS4B がポリ Ub 化されることが判明している。本研究では NS4B と相互作用する宿主 E3 タンパク質を同定するとともに、E3 タンパク質の細胞における DENV 複製制御への役割について明らかにする。

【材料と方法】 AlphaScreen 法を用いてコムギ無細胞系で合成した 287 種類の E3 プロテインアレイと NS4B の相互作用をハイスループットに検出した。NS4B との強い結合を示す E3 と NS4B を HEK293T 細胞で共発現させ、ウエスタンブロッティング法で NS4B の発現量を検出した。また、コムギ無細胞系および Huh7.5.1 細胞発現系を用いて NS4B のポリ Ub 化の検出を行った。E3 の DENV 複製能への影響は、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ DENV レプリコン恒常発現細胞を用いて行った。さらに、E3 を高発現させた Huh7.5.1 細胞に DENV を感染させ、ウエスタンブロッティング法で NS4B の発現量を検出した。また、この培養上清中の感染性ウイルス粒子を Plaque assay にて定量した。

【結果】 AlphaScreen において NS4B に高い結合を示した E3 について、上位 15 種を細胞内で NS4B と共発現させた結果、NS4B の発現量を減少させる E3 を2種類見出した。そのうち NS4B と共局在が予想される RNF26 について、詳細な解析を行った。コムギ無細胞系と細胞発現系の両方において、RNF26 の共発現によって NS4B のポリ Ub 化が確認された。レプリコン細胞を用いた解析の結果、E3 酵素活性依存的な DENV のゲノム複製の低下が観察された。さらに、DENV 感染細胞内の NS4B は RNF26 の高発現により発現量の低下が確認されると共に、培養上清中の感染性ウイルス量の顕著な低下が認められた。

【考察】 RNF26 は NS4B のポリ Ub 鎖形成とプロテアソーム分解誘導を誘導していることが強く示唆された。また DENV 感染細胞において RNF26 は NS4B を標的として DENV 複製における複合体形成を抑制していると考えられる。よって RNF26 は DENV 複製を抑制する新規宿主因子である可能性が示唆された。

デングウイルスの複製に関与する脱ユビキチン化酵素の探索とその機能解析

◎岡田 健吾¹、高橋 宏隆¹、鈴木 陽一²、後藤 栄治³、徳永 文稔³、澤崎 達也¹

¹愛媛大学 プロテオサイエンスセンター、²大阪医科大学 予防・社会医学講座

³大阪市立大学大学院 医学研究科・医学部医学科 分子生体医学講座 分子病態学

e844006h@mails.cc.ehime-u.ac.jp

〔目的と意義〕 デングウイルス(DENV)はフラビウイルス科フラビウイルス属の一本鎖(+) RNA ウイルスで、日本での感染リスクが高まりつつあるウイルスである。近年、ユビキチン化などの翻訳後修飾によるウイルスタンパク質の機能制御が、ウイルス感染の成立に重要であることが報告されている。このうち、脱ユビキチン化酵素(DUB)はタンパク質に付加されたユビキチンを取り除くことで、ユビキチン化を負に制御しており、ウイルス複製を制御していることが報告されている。また、DENV 感染細胞におけるゲノムレベルでの RNAi スクリーニングにより、DUB が DENV の複製を制御する宿主因子であることが明らかになりつつある。しかし、RNAi スクリーニングによって見出された DUB は必ずしもウイルスタンパク質を標的としていない可能性がある。そのため、本研究において、DENV タンパク質と直接相互作用する DUB を同定し、ウイルスタンパク質の制御を行う宿主因子としての DUB の役割の解明を目指す。

〔材料と方法〕 本研究では、ポリプロテインのプロセッシングなど重要な酵素活性を持つ DENV の NS3 に着目し、NS3 と相互作用する DUB の探索を行った。DENV NS3 とヒトの 85 種類の DUB について、酵母細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を発現した。DENV NS3 と高い結合能を示す DUB を AlphaScreen 法で同定した。また、AlphaScreen 法で NS3 と高い結合能を示した DUB と NS3 の結合を免疫沈降法で評価した。これらの解析によって得られた NS3 結合性 DUB について、NS3 の発現量やユビキチン化への影響をヒト培養細胞によって評価した。

〔結果と考察〕 AlphaScreen 法によって 85 種類の DUB タンパク質の中から NS3 と高い結合能を示した DUB を複数種類同定した。これらの DUB のうち、免疫沈降法によっても NS3 と強く結合することが確認できた USP20 に着目して、詳細な解析を行った。まず、HEK293T 細胞に野生型 USP20 もしくは酵素活性欠損変異体 USP20 を NS3 と共発現させた結果、野生型 USP20 においては NS3 の発現量の増加が認められたが、酵素活性変異体ではこのような増加は認められなかった。次にプロテアソーム阻害剤の存在下では、野生型 USP20 で見られた NS3 の発現量の増加は認められなかった。更に、野生型もしくは酵素活性変異体を NS3 と共発現させたときのユビキチン量の変化を評価したところ、野生型 USP20 のユビキチン量が酵素活性変異体と比較して減少するという結果が得られた。以上のことから、細胞内において USP20 は NS3 を脱ユビキチン化することで、発現量を制御している可能性が示唆された。現在、USP20 依存的な NS3 発現抑制が DENV の複製に与える影響について調べている。

様々な水圏微生物試料からの RNA ウイルス探索

○長崎 慶三¹、高野 義人¹、布浦 拓郎²、浦山 俊一²

¹高知大学、²JAMSTEC

nagasaki@kochi-u.ac.jp

【目的】 従来、水圏ウイルス研究分野では、ウイルスが有する宿主に対する殺藻性に焦点を当てた研究が多く成されてきた。しかしながら近年、宿主とウイルスの多様な関係性を探る上できわめて有用な新技術(FLDS法:Urayama et al. 2015)が開発・改良され、微細藻類等の宿主と共存するウイルスの存在も検出可能となった。本報では、内湾で発生した渦鞭毛藻ブルーム時に得られた細胞ペレット、ならびに淡水魚飼育水槽排水溝のスライムから検出されたRNAウイルス(とくにdsRNAウイルス)の特性を概説するとともに、水圏をフィールドとした新たなウイルス研究のビジョンを合わせて紹介する。

【方法】 高知県浦ノ内湾で2016年晩秋期に発生した渦鞭毛藻ブルームに際し、現場海水を目合い20 μ mのプランクトンネットで濃縮後、さらに遠心分離により浮遊細胞をペレット化した。また、淡水排水溝スライムの $<200 \mu$ m画分より同様に細胞ペレットを得た。それぞれを液体窒素中で粉碎後、FLDS法に供し、dsRNA画分の精製、断片化、逆転写、ならびに増幅を行った。得られたDNA断片をMiSeq(イルミナ社製)で解読、アセンブル後、相同性解析によりdsRNAウイルスゲノム情報を検出し、渦鞭毛藻ブルーム中に共存していたRNAウイルスの特性について考察した。得られた配列について、より詳細な解析を現在進めているところである。

【結果】 赤潮試水中の優占渦鞭毛藻は*Lingulodinium* sp.および*Prorocentrum triestinum*であったが、得られた生物試料の中に占める割合は小さかった。スクリーニングの段階で検出された抽出試料をFLDS法に供し、逆転写産物の塩基配列を解読した結果、線虫・植物・カビなどのdsRNAウイルスとの高い相同性がみられた。また、淡水スライム中には多様な藍藻・珪藻・緑藻等が混在していた。相同性解析の結果、菌類・紅藻類・酵母・昆虫等を宿主とするトチウイルス科dsRNAウイルス由来のRNA依存性RNAポリメラーゼ等に高い相同性を示す断片が検出された。いずれの場合についても、植物共生ウイルスとして知られるエンドルナウイルスへのヒットが検出された点は興味深い。これらのことから、陸上生態系だけでなく、水圏生態系においても同様の共生性ウイルスの存在が示唆された。

【謝辞】

本研究の一部は、新学術領域研究「ネオウイルス学(課題番号 16H06437)」ならびに平成 28-29 年度農林水産技術会議委託プロジェクト「農林水産分野における気候変動対応のための研究開発:有害プランクトンに対応した迅速診断技術の開発」の助成を受けて行われた。この場を借り両助成に対し深く感謝する。

蚊のゲノムにみられる内在性ウイルス様配列の解析

◎鳥井 駿¹、鋤田 龍星¹、Supriyono^{1,2}、野口 慧多¹、長田 奈緒¹、南 昌平¹、米満 研三¹、
下田 宙¹、Upik Kesumawati²、糸川 健太郎³、伊澤 晴彦³、沢辺 京子³、前田 健¹

¹山口大学 共同獣医学部、²Bogor Agricultural University、³国立感染症研究所 昆虫医科学部
t024tb@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】

レトロウイルス遺伝子に相同性を示す配列が生物のゲノムに組み込まれていることは以前より知られているが、近年、非レトロウイルスの配列も様々な生物のゲノムに内在化していることが明らかになってきた。私たちは、本邦コガタアカイエカから分離されたラブドウイルス *Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus* (CTRV) の配列の一部が、蚊のゲノムに内在化していることを発見した。現在、その生物学的意義を解明するため解析を行っている。

【材料と方法】

CTRV の配列と、蚊ゲノム上に認められたウイルス様配列の相同性から特異的プライマーを作成した。イエカ属の蚊について、野外捕集または系統維持されている蚊よりゲノム DNA を抽出し、PCR による内在性配列の検出を行った。また、内在性配列周辺のゲノム領域のゲノム構造を決定し、比較をおこなった。

【結果】

- 1) アカイエカ種群(アカイエカ、チカイエカ、ネツタイイエカ)の蚊で内在性配列が認められた。一方、CTRV が分離されたコガタアカイエカを含め、他のイエカ属蚊からは内在性配列は検出されなかった。
- 2) アカイエカ種群の蚊において、内在性配列の有無には個体差が認められた。
- 3) 内在性配列周辺の遺伝子構造は、少なくとも 3 つのパターンに分類された。

【考察】

アカイエカ種群内において、内在性配列の有無に個体差が認められたことから、ウイルス遺伝子の蚊ゲノムへの内在化は、比較的近年に起こったと考えられた。今後、内在化のメカニズムとその生物学的機能について解析を続ける。

猫における重症熱性血小板減少症候群の発症

◎長田 奈緒¹、水野 純子¹、米満 研三¹、南 昌平¹、楢田 龍星¹、下田 宙¹、高野 愛¹、
鈴木 和男²、沖見 朝代³、森川 茂⁴、前田 健¹

¹山口大学 獣医微生物学教室、²田辺市ふるさと自然公園センター、³なぎさ動物病院

⁴国立感染症研究所 獣医科学部

w009tm@yamaguchi-u.ac.jp

【背景と目的】

重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)は致死率の高いマダニ媒介性人獣共通感染症であり、本研究会でも2014年からSFTSVの野生動物・飼育動物における感染状況の調査結果を報告してきた。今回、2016年に実施したSFTSV感染状況の調査結果およびSFTS発症猫を報告し、新たな知見とともにSFTSVのリスクについて考察する。

【材料と方法】

- 1) 供試検体:2016年12月31日までに日本各地で捕獲された野生動物および飼育動物の血清およびSFTS自然感染猫の糞便、直腸スワブおよび血清
- 2) ELISA:血清は100倍希釈して用いた。SFTSV HB29株感染HuH7細胞溶解液を抗原として、HRP標識Protein A/Gを2次抗体として使用した。
- 3) 血清よりRNAを抽出しSFTSVのS分節特異的プライマーによりRT-PCRを実施した。

【結果】

- 1) 2007年度から野生動物の調査を行っている和歌山県において、アライグマの抗SFTSV抗体陽性率の急激な上昇を認めた2015年から更なる陽性率の上昇は認めなかったが、一部の地区では60%近い抗体保有率となった。
- 2) イノシシにおいて陽性率が高い地域が存在した。
- 3) 飼育猫にSFTS発症を認めた。ヒトの患者と同様の症状を呈し、血清中と直腸スワブおよび糞便からウイルス遺伝子が検出された。

【考察】

和歌山県のアライグマにおけるSFTSV感染は、捕獲個体の約半数が抗体保有という非常に高い陽性率のまま定常状態に入った可能性がある。アライグマの捕獲時の平均年齢は2歳程度といわれており、SFTSVの感染率が高いことが判明した。また、イノシシは一般的にブタと同様に抗体保有率が低いと考えられていたが、高い地域が存在していることが判明した。異なるマダニ種が媒介している可能性も考えられる。地域によってはアライグマやイノシシが増幅動物となっている可能性が示唆された。アライグマのSFTSV濃厚感染地域において、SFTS様の臨床症状を呈した飼育猫にSFTSV感染を認めた。このことは、SFTSVはヒト以外の動物では不顕性感染するというこれまでの見解に大きな影響を与える可能性がある。このSFTS感染猫の糞便中からSFTSV遺伝子が検出されたことから、環境中へのウイルス汚染とそれに伴うヒトへの感染リスクに関して緊急に調査・研究が必要である。

Properties of a mitochondrially replicating positive-sense RNA virus isolated from a filamentous ascomycete, *Cryphonectria parasitica*

◎Sabitree Shahi¹、Bradley I. Hillman²、鈴木 信弘¹

¹岡山大学 資源植物科学研究所、²Rutgers University

ss.savitri.shahi@gmail.com

Mitoviruses (positive-sense RNA viruses, genus *Mitovirus*, family *Narnaviridae*) have the simplest genomes of 2.3 to 3.6 kb) with single ORFs and are ubiquitously detected in filamentous fungi. However, their replication mechanism and host range remain largely elusive. The first mitovirus to be reported was *Cryphonectria mitovirus 1* (CpMV1) from the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*), a model filamentous fungus for studying virus/host interactions.

Here, we established a foundation for studying CpMV1 replication and obtained some of its properties. First, we developed a protoplast fusion protocol for artificial introduction of CpMV1 to transfer CpMV1 from *C. parasitica* strain NB631 into the standard *C. parasitica* strain EP155 and its RNA silencing deficient strains. Comparison of CpMV1 accumulation in between the two host strains showed the virus to be unaffected by RNA silencing. Furthermore, taxonomically distinct ascomycetous fungi such as *C. radicalis* and *Valsa ceratosperma* were shown to support the replication of CpMV1. These will be utilized to further unravel the replication mechanism.

Comparison of the behaviors of mycoreovirus 1 and 2 in the fungal host, *Cryphonectria parasitica*, reveals natural variation in antiviral RNAi

◎Annisa Aulia¹, Bradley I. Hillman², 鈴木 信弘¹

¹岡山大学 資源植物科学研究所、²Rutgers University

pin977hl@s.okayama-u.ac.jp

Two mycoreoviruses MyRV1 and MyRV2 were isolated from two different strains, 9B21 and C18, of an ascomycetous phytopathogen, *Cryphonectria parasitica* in West Virginia. It is known that MyRV1 activates RNA silencing via upregulation of two RNA silencing key genes, dicer-like 2 (*dcl2*) and argonaute-like 2 (*agl2*). Preliminary comparative studies showed different behaviors of the two viruses in two fungal strains, the standard *C. parasitica* strain EP155 and C18; that is, MyRV1 can replicate well in both fungal strains, while MyRV2 can be maintained stably only in C18, but not in EP155. We hypothesized that RNA silencing was involved in the difference of MyRV2 maintenance in between EP155 and C18 as well as in behaviors of the two viruses in EP155.

Here we show that C18 exhibits a lower capability of transcriptional upregulation of *dcl2* upon virus infection compared to EP155, which appears to allow the relatively stable maintenance of MyRV2 in C18. We took advantage of two RNA silencing defective strains derived from EP155, Twtp29 expressing a RNA silencing suppressor, p29 of the prototype hypovirus CHV1-EP713 and $\Delta dcl2$ lacking the *dcl2* gene. Transfection of the two fungal strains with MyRV2 virions resulted in its relatively stable maintenance. MyRV2 accumulation in $\Delta dcl2$ was comparable to that in C18. Northern analysis revealed that transcription levels of *dcl2* in MyRV1- or MyRV2-infected C18 was lower than in MyRV1-infected EP155. It should be noted that several SNPs were found in the promoter and coding region between C18 and EP155. We developed a *dcl2* monitoring reporter cassette carrying *egfp* under the control of the *dcl2* promoter derived from EP155 and C18. These constructs were introduced into the two fungal strains to monitor *dcl2* expression. Both promoter constructs gave lower levels of *egfp* expression upon infection by MyRV1 in C18 relative to EP155.

These combined results showed natural variation of *C. parasitica* in antiviral RNA silencing activation level that is not attributable to difference in the *dcl2* promoter. This study also suggested that MyRV1 is more tolerant to antiviral RNA silencing than MyRV2.

唾液検査で判明した健常人のヒトパピローマウイルス 16 型高保有率

◎宮崎 誠¹、清水 みさと²、金行 真澄²、安田 彩夏²、増成 彩華²、城尾 有紀²、木村 美幸¹、
荒尾 雄二郎¹

¹岡山大学大学院 保健学研究科 検査技術科学分野、²岡山大学 医学部保健学科 検査技術科学専攻
yujiarao@md.okayama-u.ac.jp

【目的と意義】

ヒトパピローマウイルス 16 型 (HPV16) は、子宮頸癌だけではなく口腔咽頭癌にも関与するウイルスである。米国の調査では HPV16 関連口腔咽頭癌の発生は増加傾向にあり、その対策としてワクチン接種による新規感染の予防が考えられている。この予防策は、唾液などを検体とした調査で健常人からの HPV16 DNA 検出率が低率 (平均 2.1 %) であり、大多数の健常人が HPV16 陰性と考えられることに基づく。しかし、健常人唾液中に排出される HPV16 DNA の量は極めて少量であり、かつ変動すると推測される。故に、従来からの 1 人 1 回の検査では正確な保有率はわからないと危惧される。そこで、1 人当たり複数回の検査で健常人 HPV16 保有者を調査した。

【材料と方法】

18 名の 20 歳代健常人を対象として HPV16 DNA の有無を 1 人当たり 20 回検査した。16 時から 18 時の間にドローリング法で採取した安静時唾液を検体として使用した。HPV16 DNA は nested PCR で検出した。

【結果】

360 検体中 24 検体から HPV16 DNA が検出された。従って、唾液検体の HPV16 DNA 検出率は 6.7% であった。18 名中 12 名から HPV16 DNA が 1 回以上検出された。この結果から HPV16 保有率は 66.7% と算定された。

【考察】

本研究で得られた唾液検体の HPV16 DNA 検出率、6.7%、は、既知の報告における健常人唾液の HPV16 DNA 検出率、0.0%～20.0% (平均 2.1%)、の範囲内であった。従って、本研究で対象とした被験者は健常人と考えて差し支えないと思われる。他方、HPV16 保有率は 66.7% と算定された。既知の報告では、被験者 1 人 1 回の検査で HPV16 保有率を推定したため、HPV16 保有率は平均 2.1% と考えられてきた。これと比較して 66.7% はかなり高い値である。3 分の 2 の健常人が既に HPV16 保有者であるとなれば、HPV16 関連口腔咽頭癌の予防対策を再考する必要があるかもしれない。

マウス γ ヘルペスウイルスを用いた Epstein-Barr virus 肝炎の発症機序の研究

○金井 亨輔^{1,2}、朴 雅美²、渡部 明子²、有川 智博³、安居 輝人⁴、吉田 裕樹⁵、角田 郁生²、
義江 修^{2,6}

¹⁾鳥取大学 医学部 ウイルス学分野、²⁾近畿大学 医学部 微生物教室、³⁾金沢医科大学 一般教育機構

⁴⁾医薬基盤研究所 感染制御プロジェクト、⁵⁾佐賀大学 医学部 分子生命科学講座、⁶⁾健康漢方研究所
kkanai@med.tottori-u.ac.jp

Epstein-Barr Virus (EBV) が成人に初感染する際発症する Infectious Mononucleosis (IM) は稀に重篤な肝炎を起こす。慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) では症例の 47% に肝炎が見られる。EBV 肝炎は CD8+T 細胞集積を特徴とするが EBV は肝細胞に感染しないことから宿主免疫応答による副次的影響によると考えられる。EBV に対する免疫応答を解析するために Murine γ -herpesvirus 68 (MHV68) 感染マウスが用いられている。MHV68 は EBV 同様 γ ヘルペスウイルス亜科に属し感染時に肝脾腫を起こすが自然治癒することから IM の動物モデルとして用いられている。我々は MHV68 感染マウスで Interleukin-27 (IL-27) 産生が亢進することを見出したことから関連遺伝子を欠失 (KO) した組換えマウスを用いた検討を行った。IL-27 は Th1 型免疫応答の初期誘導、制御性 T 細胞誘導、炎症性サイトカイン産生の抑制など、炎症の促進と抑制の両方に関わる。MHV-68 を気道内に接種した IL-27KO マウスは肝臓の重篤な炎症、肝逸脱酵素量増加を示したことから、MHV68 感染 IL-27 KO マウスは EBV 肝炎のモデルとなると考えられた。また、肝臓における IFN γ + CD8+T 細胞の浸潤が亢進しており、さらに CD8+T 細胞遊走に関わる CXCR3 リガンドケモカイン産生が亢進していた。CXCR3 リガンドケモカイン産生は IFN γ 及び LPS, Peptidoglycan (PDG) との共刺激により亢進すること、肝臓は腸内細菌産物が門脈により運ばれ豊富であることが知られている。そこで、飲水中に Neomycin を加え MHV68 感染 IL-27KO マウスの腸内細菌を除いたところ、体重減少の抑制、肝逸脱酵素量減少、浸潤 CD8+T 細胞数の減少、そして CXCR3 リガンドケモカイン産生の減少が見られた。この結果から、門脈を介して肝臓に運ばれる腸内細菌産物が CXCR3 リガンドケモカインの産生亢進に寄与し、結果 CD8+T 細胞の肝臓への浸潤を促進することで肝炎を生じさせている可能性が示された。

一過性睡眠不足及びストレス負荷による ヒトヘルペスウイルス6型 DNA 検出率の増大

○福島 実莉¹、大西 巧真²、川西 悟史²、長谷 友紀²、徳永 成未²、木村 美幸¹、荒尾 雄二郎¹

¹岡山大学大学院 保健学研究科 検査技術科学分野、²岡山大学 医学部保健学科 検査技術科学専攻
yujiarao@md.okayama-u.ac.jp

【目的と意義】

危険因子のない健常人でもウイルス感染症が重篤化してしまう人とそうでない人がいる。一般的には個人差で片付けられてしまうこの違いの原因を探る手掛かりを得るために、健常人唾液からヒトヘルペスウイルス6型(HHV6)DNAを検出し、被験者たちの日常生活の記録と照合した。

【材料と方法】

9名の20歳代健常人を対象として、唾液中のHHV6 DNAの有無を検査した。検体としては、17時から18時の間にドローリング法で採取した安静時唾液を使用した。HHV6 DNAはnested PCRで検出した。

【結果】

健常人唾液からのHHV6 DNA検出率を有意に増加させた日常生活の因子は、一過性睡眠不足とストレス負荷であった。前日の睡眠時間が7時間以上であった日のHHV6 DNA検出率は12.5%であったのに対して、5時間未満であった日は39.1%と高かった($p < 0.05$)。病院実習参加のストレスが負荷されなかった日のHHV6 DNA検出率は28.7%であったのに対して、負荷された日は45.9%と高かった($p < 0.05$)。また、就職活動のストレスが負荷されなかった日のHHV6 DNA検出率は29.0%であったのに対して、負荷された日は62.5%と高かった($p < 0.05$)。さらに、演歌鑑賞のストレスが負荷されなかった日のHHV6 DNA検出率は29.0%であったのに対して、負荷された日は75.0%と高かった($p < 0.05$)。

【考察】

一過性睡眠不足またはストレス負荷があった日は、それらがなかった日と比較して有意にHHV6 DNA検出率が高かった。一過性睡眠不足は炎症関連因子を増加させ、ストレス負荷はストレス応答因子を増加させる。これらの生体因子がHHV6などの持続感染ウイルスの体内増加または唾液中への排出に関与しているかもしれない。

集団保育児における唾液中の HHV-6 と HHV-7 DNA の排泄

○難波 ひかる¹、渡辺 正博²、鳥越 貞義³、山下 信子¹、小川 寛人¹、山田 雅夫¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病原ウイルス学、²すずかこどもクリニック

³アクエア・メディカル・ステーション

hnamba@okayama-u.ac.jp

【背景と目的】 ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス7型(HHV-7)は突発性発疹の原因ウイルスである。乳幼児期に感染・発症したのち体内に潜伏・持続感染し、成人の唾液中からもウイルスDNAが検出される。よって、伝播経路は唾液による飛沫感染と考えられるが、不明な点も多い。これまで、突発性発疹の減少と発症年齢の高年齢化について報告してきた。その理由として核家族化や少子化、保育所利用率の増加などが考えられる。そこで集団保育における HHV-6、HHV-7 の感染動態を明らかにするため、保育園児と未就園児における唾液中のウイルス DNA について比較検討した。

【方法】 保育園児においては新入园児が加わった 2015 年新学年時(前期)とその半年後(後期)に、未就園児では随時受診児に、唾液を FLOQSwabsTM で採取し、DNA 抽出後、real-time PCR を実施した。

【結果】 A 保育園前期 88 人、後期 90 人(2 人退園、4 人入园)、B 保育園前期 67 人、後期 64 人(3 人退園)、未就園児 50 人から検体を採取した。年齢は A 保育園前期 3.3 ± 1.4 歳、B 保育園前期 3.4 ± 1.5 歳、未就園児 1.7 ± 1.2 歳と未就園児が有意に低年齢だった。ウイルス DNA 陽性率は A 保育園前期→後期、B 保育園前期→後期、未就園児で、HHV-6 が 21.6%→58.9%、14.9%→31.3%、14%、HHV-7 が 29.5%→46.7%、32.8%→56.3%、16%であった。どちらの保育園も後期に陽性率が高くなっていた。後期における 0 から 5 歳のクラス別陽性率は、HHV-6 は 2 歳、HHV-7 は 5 歳が最も高かった。保育園児における前期、後期の陽性率は HHV-6 単独が 23.8%、47.4%、HHV-7 単独が 37.0%、50.6%、HHV-6 と HHV-7 両方が 11.9%、26%であった。

【考察】 保育園児の HHV-6、HHV-7 DNA の陽性率は前期から後期の 6 ヶ月間に増加した。陽性率が最も高かった年齢は HHV-6 が 2 歳、HHV-7 が 5 歳であり異なった感染様式が示唆された。

Epstein-Barr ウイルスの LMP2A 遺伝子は、 ETS 転写因子による BART miRNA の転写活性化を介して、潜伏感染を維持する

◎キム ヒョジ、飯笹 久、シンタユ フェカドウ、金廣 優一、吉山 裕規
島根大学 微生物学講座
kims890@med.shimane-u.ac.jp

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は 90%の成人が感染しているヘルペスウイルスである。EBV は上皮細胞と B 細胞に持続感染し、腫瘍を形成する。EBV がコードする 40 種類の BamHIA rightward transcript (BART) miRNAs は、EBV の潜伏感染を維持する。また、EBV 陽性 B 細胞に比べ、EBV 陽性上皮細胞に強く発現する。しかし、BART miRNAs の発現調節機構はあまり知られていなかった。

昨年の本研究会では、従来よりも長い領域を用いたプロモーターアッセイの結果、EBV 陽性上皮細胞では EBV 陰性上皮細胞よりもプロモーターが強く働くことより、BART miRNAs は上皮細胞特有の転写調節を受けていることを報告した。

今年度は、部分的に欠損させたプロモーターを用いて、BART 領域には ETS 転写因子群の結合領域が4箇所あることを明らかにした。定量的 PCR を行い、調べた全ての EBV 陽性上皮細胞において4種類の ETS 転写因子が強く発現していることも明らかにした。siRNA を用いた抑制実験を行い、そのうち3種類の ETS 転写因子が BART 領域の転写を活性化することがわかった。そのうち、ETS family gene A を CRISPR 法で欠損させた感染細胞では、BART miRNAs の転写が低下し、EBV の潜伏感染が維持されず、溶解増殖感染が進行した。

また、EBV 潜伏感染遺伝子に含まれる LMP2A 遺伝子が ETS family gene A の発現を活性化した。LMP2A 欠損組換え EBV に感染した上皮細胞では、野生型 EBV 感染細胞に比べて、ETS family gene A の発現が低下し、BART miRNAs の転写も低下した。

以上の結果より、EBV 陽性上皮細胞では、潜伏感染遺伝子 LMP2A が ETS family gene A の発現を活性化することで、BART miRNA の転写活性化を介して、潜伏感染を維持することが考えられる。

山口捕集蚊から分離された新規 RNA ウイルスの遺伝子発現機構

○楢田 龍星、鳥井 駿、野口 慧多、米満 研三、南 昌平、長田 奈緒、Spriyono、
Ngo Thuy Bao Tran、下田 宙、高野 愛、前田 健
山口大学 共同獣医学部
rkuwata@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】

蚊やマダニは動物を吸血する際に病原微生物を媒介する公衆衛生上の重要な節足動物である。我々は、蚊やマダニが保有する病原微生物の網羅的探索を行う過程で、分子系統学的に植物ウイルスと近縁な新規 RNA ウイルスを蚊から分離することに成功した。今回、この新規 RNA ウイルスが有する特殊な遺伝子発現機構について報告する。

【材料と方法】

蚊培養細胞を用いて、山口捕集シロハシエカから新規 RNA ウイルス(ヒメヤマウイルス、HMYV)を分離することに成功した。次世代シーケンシングと RT-PCR により HMYV ゲノムの全塩基配列を決定し、遺伝子構造解析を行った。HMYV ゲノム上の ORF について、ノーザンブロット及び RACE による遺伝子発現解析を行った。次に、HMYV ORF についてペプチド抗体を作製し、イムノブロットによる HMYV 蛋白質の検出を試みた。また、発現プラスミドによる HMYV 蛋白質の発現を行った。

【結果】

- 1) HMYV ゲノムの全塩基配列を決定した結果、約 11kb の一本鎖(+)RNA 上に 4 つの ORF が認められた
- 2) ノーザンブロット及び RACE による HMYV 遺伝子の発現解析を行った結果、ORF1、2、4 の mRNA は検出されたが、ORF3 の mRNA は検出されなかった
- 3) ウェスタンブロットによる HMYV ORF2-4 由来蛋白質の検出を試みているが、今のところ ORF3 由来蛋白質の検出には至っていない

【考察】

HMYV は植物ウイルスに近縁であるが昆虫に感染する興味深いウイルスであり、分子系統学的に新規のウイルス科(属)となる可能性が高い。特殊な遺伝子発現あるいは翻訳機構を有する可能性が示されたが、まだその証明には至っていない。今後も引き続き解析を行い、HMYV の遺伝子発現機構を明らかにしたい。

東～南アジアに分布するヤマモユガ科野蚕核多角体病ウイルスの ゲノム配列と構造に関する進化的考察

◎佐々木 邦¹, 小林 淳^{1,2}

¹鳥取大学大学院 連合農学研究科、²山口大学大学院 創成科学研究科

s013gm@yamaguchi-u.ac.jp

我々はこれまでに、東～南アジアにおいて絹糸生産に利用されているヤマモユガ科野蚕から分離された核多角体病ウイルス(NPV)の全ゲノム配列を決定し、それらの比較を行ってきた。その結果、全ての野蚕 NPV ゲノムは極めて高い配列相同性と同一の構造を有しており、分離株間および株内に見られる若干の ORF の有無は variant と見なせることを明らかにしてきた。野蚕 NPV が属するバキュロウイルス科アルファバキュロウイルス属(チョウ目 NPV)については、37 のコア遺伝子配列(翻訳産物のアミノ酸配列)に基づく系統樹がすでに作製されており、共通の祖先からグループ I と II に分岐し、グループ I は *Autographa californica* NPV (AcNPV) を含む Clade A と野蚕 NPV を含む Clade B に分岐したと推定されている。我々は、コア遺伝子以外の ORF の有無および各 ORF のゲノム上の位置と方向に注目して、全ゲノム配列が決定されている Clade B NPV を比較し、メンバー間の顕著な変異はゲノム中の 6 (あるいは 7) 領域に集中して生じていることを見出した。そこで、これらの領域における変異が、Clade B NPV の系統樹に沿ってどのように生じたかを検討した結果、Clade A と分岐した Clade B の共通祖先のうち、conotoxin 様遺伝子 (*ctl-1*) が転座せず、superoxide dismutase 遺伝子 (*sod*) と前初期遺伝子 (*ie-2*) に逆位が生じ、さらに野蚕 NPV に特有な apoptosis 抑制遺伝子 (*iap-3*) の欠損と OpORF135 ホモログに逆位が生じたと推定された。その後、野蚕 NPV では、上記の 6 (あるいは 7) 領域以外に、ecdysteroid UDP-glucose 転移酵素遺伝子 (*egt*) および cathepsin 遺伝子 (*v-cath*) ～chitinase 遺伝子 (*chiA*) の欠損など若干の ORF の欠損あるいは挿入などの変異が生じ、*Antheraea* 属を宿主とする variant A と *Samia* 属を宿主とする variant S に分岐したと考えられる。なお、日本に生息するテンサン (*Antheraea yamamai*) からも variant A が分離されているが、同じく日本に生息するシンジュサン (*Samia cynthia*) から最近分離された NPV は、variant S ではなく variant A であることが判明した。したがって、日本は中国南部および東南アジアのエリサン (*S. ricini*) から分離された variant S の分布域に含まれておらず、variant A がシンジュサンに宿主範囲を拡大した可能性が示唆された。

肺で発現する正常プリオン蛋白質の機能解析

○千田 淳司、原 英之、坂口 末廣

徳島大学 先端酵素学研究所 次世代酵素学研究領域 神経変性病態学分野

jchida@tokushima-u.ac.jp

正常プリオン蛋白質 (PrP^C) は細胞表面に局在する糖蛋白質であり、全身で発現し、特に中枢神経系でその発現は高い。PrP^C の構造変異体 (PrP^{Sc}) は凝集体を形成して「プリオン病」を引き起こすことが知られている。しかし、PrP 遺伝子欠損 (*Prnp*^{0/0}) マウスは正常に発育成長することから、PrP^C の生体機能はこれまで不明であった。

Prnp^{0/0} マウスは野生型マウスと比べて、インフルエンザ A ウイルス (IAV) 感染に対して高感受性を示すことが、最近の我々の研究で明らかになってきた。逆に、PrP トランスジェニックマウスは IAV 感染に対して抵抗性を示すことから、肺で発現する PrP^C は IAV の増殖あるいはそれに起因する肺炎や浮腫等を抑制しているものと推定された。

抗 PrP 抗体による免疫染色像から、PrP^C は肺を構成する I 型、II 型肺胞上皮細胞、クララ細胞でその発現が認められた。次に、PrP^C の機能領域を明らかにするため、PrP^C の N-末領域に存在するオクタペプチドリピート (OR) 領域を欠損したトランスジェニック (TgPrP Δ OR/*Prnp*^{0/0}) マウスへの IAV 感染試験を試みたところ、*Prnp*^{0/0} マウスと同等の致死率であった。以上の結果から、PrP^C の OR 領域が IAV 感染によるマウス重症化の回避に必須であることが明らかになった。

神経細胞では PrP^C の OR 領域は銅イオンと結合し、抗酸化酵素である Cu/Zn SOD (SOD1) の酵素活性を調節することが報告されている。そこで、TgPrP Δ OR/*Prnp*^{0/0} マウス肺の銅イオン含有量を調べたところ、野生型マウスと比べて TgPrP Δ OR/*Prnp*^{0/0} マウスでは肺の銅イオン含有量が低下していること、さらに SOD1 の酵素活性が低下していることを見出した。

今回の我々の研究で神経細胞に限らず肺でも PrP^C は細胞内の銅イオンを保持することで SOD1 の酵素活性を調節し、IAV 感染後の活性酸素の産生を減少させることで、肺の細胞死を抑制していることが明らかになった。

アンチセンス RNA を用いたファージ療法の基盤技術開発

○川野 光興、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

mkawano@med.kawasaki-m.ac.jp

近年の抗生物質多用による抗生物質耐性菌の増加により、従来の抗生物質に非依存的な細菌感染症新規治療技術の開発が求められている。本研究では F 因子を保持する大腸菌を特異的に標的とする M13 系ファージミドに着目し、遺伝子工学によって改変されたファージミドを用いたファージ療法の基盤技術開発を行うことを目的とする。

感染された大腸菌の増殖を阻害する方法として三つのアプローチを考えた。一つ目は、ファージミドから転写された人工アンチセンス RNA により、生育に必須な遺伝子の発現を抑制する方法。二つ目は大腸菌のトキシン-アンチトキシン系遺伝子のアンチトキシンの発現をアンチセンス RNA によって抑制し、内在性トキシン遺伝子を発現亢進することにより生育を阻害する方法。三つ目は、大腸菌トキシン-アンチトキシン系遺伝子のトキシン遺伝子を過剰発現することによる増殖制御法である。これらの方法は一般的なファージ療法と異なり、宿主細胞を溶解や破壊することなく死滅させることができ、環境中への副次的影響を極力抑えることができると考えられる。

大腸菌リボソームタンパク質 L14 をコードしている *rplN* mRNA をアンチセンス RNA の標的としてファージミド感染実験を行ったところ、感染した大腸菌の生育を 99%以上阻害することができた。ファージ療法研究において初めて、発現誘導したアンチセンス RNA による抗菌作用を得ることができた。本研究会では最新の研究成果と今後の展望についても報告する。

抗原性が異なるインフルエンザに対する交叉防御能を担う細胞の解析

○後川 潤、内藤 忠相、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

river@med.kawasaki-m.ac.jp

【背景・目的】

インフルエンザウイルス感染において、抗原性が異なる(抗体で中和できない)ウイルスに対する交叉防御能の獲得には細胞性免疫の働きが重要であることが報告されているが、詳細は明らかではない。本研究では、A 型インフルエンザ感染マウスモデルを用いて、インフルエンザ発症から回復過程における宿主免疫細胞の分布とフェノタイプ、抗原性が異なるウイルスに対する交叉防御能の付与効果について検討した。

【方法】

インフルエンザを発症したマウスの脾臓(SPL)細胞とリンパ節(LN)細胞を回収し、交叉反応性や防御能付与効果について ELISPOT、FACS 解析および動物実験等で検討した。

【結果・考察】

感染後期(回復期)の SPL 細胞と感染初期の LN 細胞中に存在する CD8⁺T 細胞が、抗原性が異なるウイルスに対する交叉防御能を付与できる責任細胞である可能性が示唆された。抗原性の異なるウイルスに特異的に反応する免疫細胞の出現時期は、SPL 細胞と LN 細胞とで異なっていた。

感染後の LN 細胞中にのみ CD4⁺CD8⁺T 細胞の出現が認められた。感染初期には、細胞傷害活性の指標である CRTAM(CD355)陽性の CD4⁺CD8⁺T 細胞が高頻度に認められた。

現在、インフルエンザ発症および抗原性が異なるウイルスに対する交叉防御能付与における CRTAM⁺CD4⁺CD8⁺T 細胞の機能について解析を続けている。

繊維状インフルエンザウイルスの運動パターン

○堺 立也、齊藤 峰輝

川崎医科大学 微生物学教室

sakai@med.kawasaki-m.ac.jp

インフルエンザウイルスは、宿主細胞にエンドサイトーシスされることで感染が成立する。そこでウイルスはエンドサイトーシスのおきる領域(クラスリン被覆ピットなど)まで移動しなければならない。我々は、インフルエンザウイルスがヘマグルチニンと受容体(シアロ糖蛋白質あるいはシアロ糖脂質)との結合を入れ替えること(受容体交換)で細胞表面を移動することを、A 型および C 型インフルエンザウイルスで明らかにした。さらに繊維状の形態をとる C 型ウイルスでは運動が直進的であり運動方向の制御機構があることも分かった。この運動方向制御が C 型ウイルス特有の特徴であるかどうかを調べるため、繊維状の A 型インフルエンザウイルスの運動パターンを調べた。

ウイルスは、A/Udorn/1972(H3N2)株を用いた。ウイルス運動の観察のため、細胞表面を模した *in vitro* 系、受容体としてフェツインを結合させたカバーガラス、を作製した。このガラス表面でのウイルスの運動を表面反射干渉顕微鏡により観察した。

繊維状 A 型ウイルスはフェツインコートしたガラス表面上で、不規則に形態を屈曲させながらランダム運動をおこなった。また、A 型ウイルスは繊維構造全体ではなく構造中の数箇所ですら表面と結合し、この結合箇所は経時的に変化することが観察された。

以上の結果から、繊維状 A 型ウイルスは受容体交換による運動をおこなうが、運動方向の制御は繊維状 C 型ウイルスにくらべ低いことがわかった。我々は、C 型ウイルスの直進的な運動は、エステラーゼにより受容体を破壊することでウイルスの前後で受容体密度の差が生じ、ヘマグルチニンがこの密度差を感知することで生じると考えている。繊維状 A 型ウイルスは、繊維構造全体ではなく部分的に受容体と結合し、結合部位を入れ替えながら動くため、ノイラミダーゼによる破壊で生じた受容体密度の変化をヘマグルチニンが感知しづらく、その結果ランダムに近い運動になると考えている。

センダイウイルス C タンパク質による STAT1:STAT2 ヘテロ二量体の阻害機構の解明

○小田 康祐¹、小田 隆²、的場 康幸³、入江 崇¹、佐藤 衛²、坂口 剛正¹

¹広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 ウイルス学研究室

²横浜市立大学 生命医科学研究科 構造生物學研究室

³広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 遺伝子制御科学研究室

kosuke-81@hiroshima-u.ac.jp

センダイウイルス (SeV) は、マウスに感染し呼吸器疾患を引き起こすパラミクソウイルスである。SeV C タンパク質は、宿主転写因子 STAT1 および STAT2 のリン酸化を阻害し、IFN- α/β のシグナル伝達を阻害することで、自然免疫の回避に関与する。C タンパク質によるこれら STATs のリン酸化阻害機構は不明だが、C タンパク質と STAT1 との結合が重要であると考えられている。本研究では、C タンパク質が STAT1 および STAT2 のリン酸化を阻害する構造基盤を明らかにすることを目的とした。

STAT1ND は、STAT2ND とホモログであり、STAT2ND とヘテロ二量体を形成する可能性がある。STAT1ND と STAT2ND の間をリンカーペプチドで繋ぎ、X 線小角散乱実験より、両者がヘテロ二量体を形成できることを示した。また STAT1ND に対する親和性を減少させた STAT2 変異体の安定発現株を樹立し、IFN 感受性の水疱性口内炎ウイルス (VSV) に先立ち SeV を感染させると、VSV の増殖は抑制された。さらに、この細胞を用いてレポーターアッセイを試みたところ、Y3 による IFN- α のシグナル伝達阻害率は著しく減少した。これらの結果より、STAT1ND と STAT2ND の間の相互作用は、C タンパク質によるシグナル伝達の阻害に重要であると考えられる。次に、STAT1ND と STAT2ND 間をジスルフィド結合で繋ぎ、STAT1ND:STAT2ND ヘテロ二量体構造をもつ組換え体を作製した。ゲルろ過分析の結果、ひとつの Y3 がこの組換え体に結合することが示された。以上の結果を基にし、C タンパク質による IFN- α/β シグナル伝達阻害機構を予測した。1 分子の C タンパク質は、STAT1ND と STAT2ND のヘテロ二量体に結合する。すなわち、C タンパク質が結合した STAT1:STAT2 ヘテロ二量体は、アンチパラレル型の構造に誘導され、脱リン酸化が促進される。

モノネガウイルス遺伝子間塩基配列の発現制御機能

川端 涼子¹、吉田 明日香²、中西 真人³、章 博浩¹、夏原 啓暉¹、坂口 剛正¹、○入江 崇¹

¹広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 ウイルス学研究室、²メリーランド大学 獣医学部

³産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 ヒト細胞医工学研究ラボ

tirie@hiroshima-u.ac.jp

モノネガウイルスは、狂犬病、エボラ出血熱、ニパ・ヘンドラウイルス感染症、麻疹など、ヒト及び動物の重要な感染症の原因ウイルスを数多く含むウイルス群であり、マイナス鎖一本鎖 RNA ゲノムを共通の特徴とする。ゲノム上には、一部例外を除いて各ウイルス蛋白質遺伝子が転写開始及び転写終結シグナル配列に挟まれた形態で、1～数十塩基の遺伝子間配列を挟んでタンデムにコードされている。各遺伝子は、ゲノムの3'末端にエンターしたウイルス由来 RNA ポリメラーゼにより連続的に順番に転写され、次の遺伝子への移動の際にポリメラーゼが脱落することで、上流から下流に向かって各遺伝子の転写量が減少していくと考えられている。各遺伝子がゲノム上にコードされる順番はモノネガウイルス間で保存されており、各ウイルス蛋白質の必要量が調節されていると考えられるが、その調節における遺伝子間配列の重要性はほとんど明らかにされていない。

本研究では、モノネガウイルスのプロトタイプの一つとして古くから研究されているセンダイウイルス (SeV) をモデルに、遺伝子発現における遺伝子間塩基配列の重要性を明らかにすることを試みた。ウイルス蛋白質の発現に与える影響が最小となるように、ゲノム上の最下流にコードされた RNA ポリメラーゼ蛋白質遺伝子 (L) の直前に外来遺伝子として赤色蛍光蛋白質 (Katushka) を導入した組換えウイルスを作製した。SeV の遺伝子間配列は3塩基で構成されているが、外来遺伝子直前の遺伝子間配列の塩基配列及び長さの改変を行い、外来遺伝子発現に与える影響を評価した。

解析の結果、モノネガウイルス遺伝子発現における遺伝子間塩基配列の重要性が明らかとなった。また本研究の成果は、ウイルスベクターとしての応用が進められている SeV ベクターの導入遺伝子発現量調節への利用が期待される。

第 32 回 中国四国ウイルス研究会 参加者名簿

(所属機関・部局 50 音順)

	所属機関		名前 (敬称略)
1	東京大学医科学研究所感染・免疫部門ウイルス感染分野	特任准教授	福山 聡
2	熊本大学エイズ学研究センター国際先端医学研究施設	准教授	佐藤 賢文
3	一般財団法人阪大微生物病研究会	研究員	執行 康平
4	一般財団法人阪大微生物病研究会	課長	佐溝 浩佑
5	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	教授	澤崎 達也
6	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	講師	高橋 宏隆
7	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	大学院生	岡田 健吾
8	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	大学院生	鮫島 祐紀
9	岡山大学資源植物科学研究所	教授	鈴木 信弘
10	岡山大学資源植物科学研究所	大学院生	Sabitree SHAHI
11	岡山大学資源植物科学研究所	大学院生	Annisa Aulia
12	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	教授	加藤 宣之
13	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	准教授	團迫 浩方
14	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	助教	佐藤 伸哉
15	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	助教	上田 優輝
16	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	大学院生	今井 大誉
17	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	大学院生	谷 焯琳
18	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍ウイルス学	大学院生	小野村 大地
19	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原ウイルス学	教授	山田 雅夫
20	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原ウイルス学	助教	山下 信子
21	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原ウイルス学	助教	難波 ひかる
22	岡山大学大学院保健学研究科	教授	荒尾 雄二郎
23	岡山大学大学院保健学研究科	大学院生	宮崎 誠
24	岡山大学大学院保健学研究科	大学院生	福島 実莉
25	香川大学医学部看護学科	教授	藤井 豊
26	高知学園短期大学	准教授	村上 雅尚
27	高知学園短期大学	学部学生	藤原 典
28	高知大学	教授	長崎 慶三
29	徳島大学先端酵素学研究所	教授	坂口 末廣
30	徳島大学先端酵素学研究所	助教	千田 淳司
31	鳥取大学医学部	教授	景山 誠二
32	鳥取大学医学部	講師	金井 亨輔
33	鳥取大学医学部	助教	常城 朱乃
34	島根大学医学部微生物学講座	教授	吉山 裕規
35	島根大学医学部微生物学講座	准教授	飯笹 久
36	島根大学医学部微生物学講座	大学院生	Kim Hyoji

37	鳥取大学農学部(共同獣医学科獣医衛生学教育研究分野)	准教授	笛吹 達史
38	鳥取大学農学部獣医公衆衛生	教授	伊藤 壽啓
39	鳥取大学農学部獣医公衆衛生	准教授	伊藤 啓史
40	鳥取大学農学部獣医公衆衛生	学部学生	柏原 美奈
41	鳥取大学農学部獣医公衆衛生	学部学生	日高 千晴
42	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	教授	坂口 剛正
43	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	准教授	入江 崇
44	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	助教	小田 康祐
45	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	大学院生	松原 稔樹
46	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	大学院生	野村 俊仁
47	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	技術職員	川端 涼子
48	広島大学大学院医歯薬保健学研究科ウイルス学研究室	技術職員	吉元 玲子
49	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	教授	前田 健
50	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	助教	下田 宙
51	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学術研究員	鍬田 龍星
52	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	野口 慧多
53	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	米満 研三
54	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	長田 奈緒
55	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	南 昌平
56	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	Supriyono
57	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	大学院生	Ngo Thuy Bao Tran
58	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	神先 芽衣
59	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	黒田 雄大
60	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	青木 栞
61	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	鳥井 駿
62	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	岡田 愛
63	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	井上 雄介
64	山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室	学部学生	中尾 蘭那
65	山口大学大学院創成科学研究科	教授	小林 淳
66	鳥取大学大学院連合農学研究科	大学院生	佐々木 邦
67	川崎医科大学微生物学教室	教授	齊藤 峰輝
68	川崎医科大学微生物学教室	講師	沖野 哲也
69	川崎医科大学微生物学教室	講師	堺 立也
70	川崎医科大学微生物学教室	講師	川野 光興
71	川崎医科大学微生物学教室	助教	後川 潤
72	川崎医科大学微生物学教室	助教	内藤 忠相
73	川崎医科大学微生物学教室	助教	瀬島 寛恵
74	川崎医科大学微生物学教室	研究補助員	的場 久美子