

20. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 黒田 誠

概要

病原体ゲノム解析研究センターは、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、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) の増殖とそれを支える細胞因子の研究および HPV による発癌メカニズムの解析、ならびに HPV 感染実態の疫学調査を行った。HPV は表皮や粘膜の微小な傷から侵入し、上皮基底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ウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗 HPV 薬の開発基盤とするため、HPV 生活環と感染・発癌における宿主応答・防御機構の詳細な解析を継続した。HPV 疫学調査については、WHO にて標準化された HPV ジェノタイピング法を用いて、我が国の HPV 感染実態の調査を行った。さらに製剤担当室として、HPV ワクチンの国家検定を担当した。

第二室では、新興・再興感染症の発生に深く関与する易変異性 RNA ウイルスを研究対象とする。計算・情報・理論の技術を導入し、ウイルスゲノム配列情報から生体分子の立体構造・相互作用能・変化能の情報を抽出し、感染症の理解と制御に活用する新しい研究基盤を開発している。特に、(i) *in silico* 立体構造・分子間相互作用解析の研究基盤、(ii) 計算・情報・理論の技術を用いた分子多様性・進化の方向性の研究基盤、(iii) *in silico* 解析を軸とする分野横断的連携研究基盤の構築と活用に関与している。これにより、基盤的研究 (ウイルスの感染・増殖、薬剤耐性、免疫逃避、病原性、流行、適応進化などを司る構造・相互作用基盤の解明) を進めながら、成果を感染症対策研究 (創薬シーズ創出、抗原・抗体設計、変異ウイルスのリスク評価、リスク変異の予測など) の促進に活用している。平成 29 年度は、特にタンパク質の分子動力学解析基盤の強化を進めながら、(i) 抗体中和回避機構の解明、(ii) 創薬シーズ創出、(iii) 抗ウイルス物質の作用機序解明、(iv) 変異によるウイルスの性質変化の構造基盤解明等を目的とする基礎・開発

研究を進めた。

第三室は次世代シーケンサーを用いて病原体ゲノム情報の取得と情報解析に係る基盤整備を遂行している。病原体分離株の全ゲノム解析で病原性・薬剤耐性因子を同定するとともに、全ゲノム情報を基盤にしたゲノム分子疫学の基盤データベースの構築に取り組んでいる。また、各種病原体検査法で陰性であった感染症疑いの不明症例についてメタゲノム解析にて病原体検出を行っている。臨床検体に内在する全容を核酸配列として網羅的に検出するため、混合感染など総合的な病原体検査法として有効である。本年度は、大規模細菌ゲノム解析および完全長細菌ゲノム解析を行うための基盤作成および改良、ゲノムデータベース作成を中心に業務を展開した。バイオインフォマティクス解析を検査現場でも有効に執り行うことができるよう、ゲノムデータベース管理および次世代シーケンスデータ解析を同時に行えるシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan) を構築し運用を開始している。本システムを用いて、病原細菌、薬剤耐性菌、ウイルスのゲノム解析及びデータベース管理を実施している。また、それらデータベース上のゲノム情報を用いて、ゲノム比較解析、ゲノム分子疫学解析、時系列分子系統解析も遂行した。感染症が疑われる難病及び原因不明症例のメタゲノム解析も進めており、これらデータ解析も、本システムで運用している。また、既存培地による新規腸内細菌の分離、および、それら培地で増殖可能な細菌の網羅的解析も行い、本年度で 8 種類の新種を分離した。新種同定を行うことで、メタゲノム解析のための基礎的情報の整備がより整い、迅速な病原体検出が行えることが期待できる。

業績

調査・研究

I. HPV に関する研究

1. HPV の感染増殖機構の研究

(1) HPV 細胞侵入機構の解明

HPV 感染の初期過程に関わる細胞内因子を網羅的に同定するために、HSV-TK 遺伝子を一過性に発現する HPV18

型偽ウイルス (18PsV-TK) を作成した。18PsV-TK を接種した HeLa 細胞はガンシクロビル存在下で死滅した。18PsV-TK は HPV 侵入抵抗性を示す細胞のスクリーニングに使用できると判断された。(石井克幸)

(2) HPV 潜伏持続感細胞の探索

HPV が持続感染する細胞を見出すために、HPV16 型および 18 型の環状ゲノム DNA を初代角化細胞、分化能を有する不死化角化細胞 (NIKS 細胞)、不死化子宮外頸部細胞、不死化子宮内頸部細胞の 4 つのヒト細胞に導入し、継代ごとに HPV ゲノムコピー数を qPCR 法で定量した。4 つの細胞のうち、NIKS 細胞が極めて高い HPV ゲノム保持能を有することがわかった。HPV は増殖能かつ分化能を有する細胞に潜伏持続感染する可能性が示唆された。(石井克幸)

(3) HPV の遺伝子発現調節機構に関する研究

細胞転写因子 TEAD は HPV の遺伝子発現に関わることが報告されている。TEAD 自体には転写活性がなく、複合体を形成する転写共役因子に依存して転写を調節する。しかし、TEAD による HPV 遺伝子発現調節の分子機構や関与する共役因子は不明である。HPV 陽性癌細胞で、TEAD の共役因子の 1 つである VGLL1 をノックダウンすると、HPV 初期遺伝子の発現が低下し、細胞増殖が抑制された。VGLL1 は TEAD を介して HPV ゲノムの遺伝子発現調節領域に結合した。VGLL1 と TEAD を同時にノックダウンすると初期遺伝子の発現が回復したことから、VGLL1 は、TEAD による転写抑制作用を緩和することにより、HPV の遺伝子発現を維持していることが示唆された。(森 清一郎、終元 巖)

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 子宮頸癌および前癌病変での HPV 遺伝子型分布の調査

子宮頸癌及び前癌病変 (CIN2/3) の擦過細胞検体を慶應大学病院にて定期的に収集して、HPV DNA 検出と HPV ジェノタイプピングを継続的に行った。2012-2017 年の結果を集計したところ、子宮頸癌 (扁平上皮癌および腺癌) (248 検体) では HPV16 (54.8%)、HPV18 (17.7%)、HPV52 (8.1%)、HPV58 (5.2%)、HPV31 (2.0%) が検出された。本データは将来のワクチン効果判定のためのベースラインデータとして有用である。(中村浩美、終元 巖、岩田卓 [慶應大学])

(2) 日本人から分離された HPV16 ゲノムの配列解析

日本人女性の子宮頸癌及び CIN 病変に検出される HPV16 のウイルス全ゲノム配列を決定し、その配列多様性を解析した。子宮頸部擦過細胞検体から抽出した DNA から PCR にて HPV16 (100 検体) の全ゲノム領域を増幅し、ライブラリー化して、次世代シーケンサーによる配列解読を行った。系統樹解析の結果、全体としてバリエーション分布は sublineage A4 (アジア型) が大部分を占めており、頸癌への進展に伴ってその割合も上昇した。また、日本人に特徴的な HPV16 バリエーションの新規クラスターが見出された。(廣瀬佑輔、天神林友梨、中村浩美、終元 巖、岩田 卓 [慶應大学]、佐藤豊実 [筑波大学]、小貫麻美子 [昭和大学]、松本光司 [昭和大学])

(3) 子宮頸癌発癌リスクを予測するためのバイオマーカーの探索

子宮頸癌は、前駆病変である CIN を経て発症する。CIN は、軽度 (CIN1)、中等度 (CIN2)、高度 (CIN3) 病変に分けられる。発癌性 HPV に感染しても CIN3 に至るのは約 30 人に 1 人であり、多くは宿主の免疫応答によって自然退縮する。CIN の段階で発癌リスクを予測できれば、低リスク患者の不要な治療を減らし、高リスク患者の早期治療が可能となる。近年、ヒトの自然免疫に関わる APOBEC3B 遺伝子の欠失多型と発癌との関連が指摘されている。そこで、約 200 症例の CIN 患者の APOBEC3B 遺伝子の欠失多型を調べた。日本人対照群と比較した結果、APOBEC3B 遺伝子の欠失多型をもつ人は CIN2 以上を発症するリスクが高い可能性が示唆された。(森 清一郎、終元 巖、田口 歩 [都立駒込病院]、川名 敬 [日本大学])

(4) CIN 患者の腔細菌叢解析

腔細菌叢は局所免疫に大きな影響を与えることから、腔細菌叢と CIN 病変進展の関連について検討した。約 90 症例の CIN 患者について腔洗浄液の 16S-メタゲノム解析を行なった。主に 5 つの細菌属が検出され、Lactobacillus を主体とする健常腔細菌叢から、異形成に伴い偏性嫌気性菌、特に Prevotella, Sneathia, Gardnerella が顕著に増加することがわかった。特に、Gardnerella を中心とした Dysbiosis が生じ、複合的にその他嫌気性菌の増殖を助長している可能性が示唆された。(黒田 誠、関塚剛史、森 清一郎、終元 巖、田口歩 [都立駒込病院]、川名 敬 [日本大学])

3. HPV 感染による発癌機構の研究

(1) HPV による APOBEC3B 発現活性化に関する研究

これまでに HPV の癌タンパク質 E6 が細胞転写因子

TEAD4 の発現を誘導し、TEAD4 が APOBEC3B プロモーターに結合することで、APOBEC3B の発現を上昇させることを明らかにしている。そこで HPV のもう一つの癌タンパク質 E7 による APOBEC3B 誘導機構を検討した。テロメラーゼ導入により不死化したヒト子宮頸部角化細胞 (HCK1T) に、HPV16 E7 および Rb と結合できない E7 変異体 (D21G および L22V/C24S/E26D) を、レトロウイルスベクターを用いて発現させた。細胞抽出液のウェスタンブロット解析を行ったところ、E7 発現により TEAD4 の発現レベルが上昇した。この効果は E7 変異体では認められなかったことから、E7 による Rb 結合が TEAD4 誘導および APOBEC3B 誘導に必要なことが示唆された。(森 清一郎、柗元 巖、清野 透[国立がん研究センター研究所])

(2) 子宮頸癌で発現レベルが上昇する microRNA の同定

子宮頸癌診断の新たなバイオマーカーを確立するために、子宮頸部粘液中の microRNA に着目して、子宮頸癌で発現量が上昇する microRNA をマイクロアレイ解析にて網羅的に探索した。その結果、4 種類の microRNA (miR-126-3p, -20b-5p, -451a, -144-3p) の発現レベルが、正常子宮頸部と比較して有意に上昇することが分かった。ROC 曲線解析により、これらの microRNA の発現レベルを用いた検査が、子宮頸癌検出のための十分な感度と特異度を備えていることが示された。(柗元 巖、藤井 多久磨[藤田保健衛生大学])

(3) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノムの多様性解析

HPV ゲノム配列の患者内多様性を解析することを目的に、CIN および子宮頸癌の患者から、病変部の擦過細胞を収集した。DNA 抽出、HPV タイピングの後、HPV16, 52, 58 陽性の検体(計 151 検体)から、PCR にて全長 HPV ゲノムを増幅した。得られた HPV ゲノムを断片化してライブラリー化し、次世代シーケンサーによる配列解析を行った。その結果、0.5%以上の頻度で患者内多様性を示すゲノム部位が 1052 カ所見出された。その内、C > T および C > A の置換変異が高頻度に検出され、C > T の置換変異は APOBEC タンパク質が作用すると考えられている TpCpN 配列に集中していた。この C > T 変異は軽度 CIN 病変で最も頻繁に検出されたことから、APOBEC タンパク質が DNA 複製時の HPV ゲノムを標的にして、変異を導入することが示唆された。(廣瀬佑輔、天神林友梨、中村浩美、柗元 巖、岩田 卓[慶應大学]、佐藤豊実[筑波大学]、小貫麻美子[昭和大学]、松本光司[昭和大学])

(4) 次世代シーケンサーを用いた HPV 組込み部位の解析

日本人の子宮頸癌での HPV 組込み部位を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定するシステムの確立を試みた。子宮頸癌の擦過細胞検体 (24 検体) から抽出した DNA を断片ライブラリー化し、29 種類の HPV 遺伝子型のゲノム配列を含むビオチン化 DNA プローブを用いてキャプチャーした後、次世代シーケンサーによる配列解析を行った。その結果、4 検体で HPV DNA と細胞 DNA の融合 DNA を検出することが出来た。組込み部位は HPV ゲノムの E1 および E2 領域に認められた。(天神林友梨、柗元 巖、佐藤豊実[筑波大学]、小貫麻美子[昭和大学]、松本光司[昭和大学])

4. 次世代 HPV ワクチンの開発

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子導入により、抗 HPV 広域中和抗体を生体内で安定して発現させて幅広い型の HPV 感染を防ぐ受動免疫ワクチンの開発を行なった。マウス由来の広域中和抗体の可変領域とヒト IgG の定常領域を融合したキメラ抗体を発現する人工遺伝子を作成し、ヒト細胞株に導入した。培養上清から精製したキメラ抗体の 8 つの発癌性 HPV に対する中和活性は、もとのマウス抗体に比べ 10~60 倍高かった。AAV ベクターによってマウス体内で発現させたキメラ抗体の *in vitro* での中和活性は、マウス抗体と同レベルだったことから、発現する細胞によって広域中和抗体の中和活性が異なることが考えられた。マウス抗体をグリコシダーゼ処理すると中和活性が約 10 倍上昇したことから、マウス細胞に特異的な抗体の糖鎖修飾が中和活性を阻害することが示唆された。(森 清一郎、小谷 治)

II. ヒトノロウイルス感受性細胞の作出

ヒトノロウイルスが増殖できる細胞の作出を目指して、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件を検討した。胚体内胚葉 (definitive endoderm) から後腸 (hindgut) を経てオルガノイドを形成する系を用いた。胚体内胚葉あるいは後腸への分化においては、ほぼすべての細胞においてそれぞれの分化マーカーである FOXA2 および SOX17 あるいは CDX2 の発現を蛍光免疫染色にて確認することができた。また後腸への分化時点で球状に隆起した部分をマトリゲル中で三次元培養することによりオルガノイドと思われる内腔を持つ構造体を得ることができた。この際、従来用いられてきた組換え蛋白質を低分子化合物で置換することを行った。またオルガノイドの継代後の培養をマトリゲルではなく合成基質中で行う

ことを試みた。こうして得られた後腸の隆起部分あるいはオルガノイドを酵素で解離した細胞は、二次元培養での幹細胞の維持およびヒトノロウイルス感受性細胞への分化を誘導する条件検討の出発材料となる。(竹内隆正)

III. 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て行った。本年度は国内臨床研究において遺伝子治療との関係が疑われる重大事態の報告が1件あり、「レトロウイルスベクターの安全性についての遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の見解」作成にあたって意見を提出した。なおレトロウイルスベクターの安全性に関しては従来の考え方の踏襲でよいと考えられた。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、柗元 巖)

IV. in silico 構造・機能・変異研究

IV-1. ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

(1) HIV-1 中和抵抗性の構造基盤

HIV-1 エンベロープ三量体が中和抵抗性となる分子メカニズムの理解は、タンパク質構造に基づくワクチン抗原デザインや抗ウイルス薬による中和感受性の制御を可能にする。本研究では、HIV-1 エンベロープ三量体の構造セクターの推定により、中和抗体抵抗性の分子メカニズムを検討した。HIV-1 エンベロープ三量体分子モデルの分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを用いて、動的相互相関行列を計算した。動的相互相関行列をランダム行列理論とスペクトラルクラスタリングにより解析すると、20以上の構造セクターが推定された。その中には、中和エピトープ遮蔽の原因となる構造セクターが含まれていた。この領域が連動して運動することにより、中和抵抗性構造が維持されると考えられる。(横山勝、佐藤裕徳)

(2) HIV カプシド阻害剤候補の創出

HIV 粒子の主要成分である Gag は、HIV 生活環全般の進行に不可欠の働きをする。このため、次世代の魅力的な創薬標的とされる。しかし、Gag を標的とする認可薬は未だに無く、Gag 創薬の難易度が極めて高い。本研究では、既存の手法とは異なるアプローチとして、分子間相

互作用界面を標的とするカプシド阻害剤候補の in silico 設計を行った。カプシド C 末端ドメイン - C 末端ドメインのインターフェイスに注目した。このインターフェイスはコアの安定性に重要な部位である。立体構造を見てみると W184 および M185 がこのインターフェイスの結合に重要な相互作用を形成していた。そこで、WM ペプチドをもとに、カプシド阻害剤候補を計算機により設計した。候補物質の合成に成功し、抗 HIV 活性を確認した (EC50= 8.0 μ M) この化合物は、種々の HIV-1 亜株や薬剤耐性株の感染を阻害した (EC50=約 8 μ M 前後)。AMED 先行技術調査により物質の新規性を確認し、特許出願を完了した。(横山 勝、小谷 治、金子萌美 [東京医科歯科大]、小早川拓也 [東京医科歯科大]、村上 努[エイズセンター]、玉村啓和[東京医科歯科大]、佐藤裕徳)

(3) 抗 HIV 化合物の作用機序

HIV は、宿主の細胞内膜輸送系を利用して出芽する。膜輸送系の利用には、HIV の Gag p6 蛋白質と膜輸送系分子 TSG101 の結合が必須である。共同研究者の間には、p6 と TSG101 との相互作用を阻害する抗 HIV 化合物 (HSM-9 および-10) を同定した。この二種類の抗 HIV 化合物が p6 蛋白質のどの領域に結合するかを p6-化合物複合体の分子動力学解析により評価した。その結果、各化合物は、各化合物は p6 の PTAP モチーフ上に結合するが、p6 の構造の揺らぎが激しく、安定した結合には至らなかった。p6 は感染細胞内で Gag 前駆体の一部として存在する。今後は、Gag 前駆体モデルを構築して、結合様式を調べる予定である。(小谷治、横山勝、Loela Siarot [理化学研究所]、佐藤洋隆 [理化学研究所]、Nopporn Chutiwitoonchai [理化学研究所]、間陽子[理化学研究所]、佐藤裕徳)

IV-2. インフルエンザウイルス (IFV)

(1) 近年の IFV 流行株の性質変化の構造基盤

近年、IFVA (H3N2) の流行株クレード 3C.2a において、赤血球凝集活性が低下している。この変化は、ワクチン株選定の障害となっている。3C.2a は、HA タンパク質に特徴的な変異を持つ (A128T/N144S/S159Y/K160T)。この変異の効果を明らかにするために HA タンパク質の分子動力学計算を実施した。その結果、3C.2a 特異的な変異を持つと、HA 表面の糖鎖の相対配置が変化し受容体結合領域の開放度が低下することがわかった。この変化が、赤血球受容体との相互作用能低下に結びつくと考えられる。(横山 勝、小谷 治、藤崎誠一郎[インフルセンター]、伊藤公人[北大人獣センター]、渡邊真治[インフルセンタ

一]、小田切孝人[インフルセンター]、佐藤裕徳)

(2) 中和抗体エスケープ変異の作用機序

季節性インフルエンザ、および鳥インフルエンザの流行は社会に大きな損失をもたらす。共同研究者の長谷川らは、有効性の高いインフルエンザワクチンや抗体医薬の開発に向けて、様々なウイルスの感染を阻止できる広域中和抗体の開発に取り組んでいる。これまでに、様々なウイルス株の感染を阻止できる抗HA広域中和抗体F11を単離し、その耐性変異を同定した。しかし、抗体による中和と変異による中和回避の分子機序は全く不明である。そこで本研究では、耐性変異が標的分子(HAタンパク質三量体)の構造特性にどのような影響をもたらすかについてMDSにより調べた。その結果、耐性変異は、HA表面の疎水性に富んだ窪み(hydrophobic groove)の構造特性変化を誘起することがわかった。Hydrophobic grooveはF11のエピトープとなり、エスケープ変異は間接的にその構造特性を変えて抗体親和性を低下させている可能性がある。(小谷治、佐野芳[感染病理部]、齊藤慎二[インフルエンザウイルス研究センター]、相内章[感染病理部]、横山勝、鈴木忠樹[感染病理部]、長谷川秀樹[感染病理部]、佐藤裕徳)

IV-3. その他のRNAウイルス

(1) 抗ネコカリシウイルス(FCV)物質の創出

FCVプロテアーゼは、ウイルス前駆体タンパク質を切断することで感染性粒子の形成に必須の働きをする。FCVプロテアーゼが基質とどのように相互作用するかは未だ明らかでない。In silico解析により、基質-FCVプロテアーゼ相互作用の解明と創薬シーズ創出を試みた。まず基質と結合したFCVプロテアーゼの分子モデルを構築し、基質のP3およびP4の物理化学的特徴および配置を明らかにした。次に、ファーマコフォアベースのインシリコスクリーニングを行い、この物理化学的特徴および配置を持ち、FCVプロテアーゼに結合すると予測される化合物を同定した。この化合物はインビトロおよび細胞内でウイルスプロテアーゼ活性を阻害し、FCV感染細胞におけるウイルス複製を抑制する能力を有した。(横山 勝、岡 智一郎[ウイルス2部]、佐藤裕徳)

(2) エンテロウイルス A71(EV-A71)カプシド構造のアロステリック制御

エンテロウイルス A71(EV-A71)の細胞指向性、抗体感受性、神経病原性は、カプシド蛋白質VP1の145番目のアミノ酸がグリシン(G)かグルタミン酸(E)の違いに

より変化する。しかしその分子メカニズムは全く不明である。In silico解析により、その解明を試みた。EV-A71カプシドタンパク質(VP1-4)のVP1-145E及び145Gのプロトマーモデルを構築した。これらのモデルを用いて、分子動力学計算を実施した。その結果、145アミノ酸残基の置換は、変異箇所とは別に位置する様々な相互作用表面(受容体結合部位、エピトープなど)の揺らぎの変化を誘導することがわかった。145残基は、カプシド構造のアロステリック制御因子と考えられる(小谷治、横山勝、藤井健[東京都医学総合研究所]、小林 郷介[東京都医学総合研究所]、小池智[東京都医学総合研究所]、清水博之[ウイルス第二部]、佐藤裕徳)

V. パイオテロ・新興再興感染症・薬剤耐性菌対策としての超高速ゲノム解読・解析システムの構築

(1) 次世代シーケンサー(NGS)を活用した配列解読の高度化

パイオテロ・新興再興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムを既に構築してきた。これまで構築してきた超高速ゲノム解読システムは、ショートリードを取得するNGSを使用しており、細菌の完全長ゲノム配列を取得するには時間を要する。完全長ゲノム配列を取得することで、病原細菌の保有する病原因子及び薬剤耐性遺伝子の伝達様式を明確にする際に重要となり、ゲノム分子疫学解析の際の参照配列にもなる。今年度は、ロングリードを取得するNGS PacBioの解読データから完全長ゲノム配列を作成するための自動解析パイプラインを構築した。既に、20株以上の病原細菌の完全長ゲノム配列を取得している。

(関塚剛史、山下明史、加藤健吾、谷津弘仁、橋野正紀[AMEDリサーチレジデント]、伊藤環[AMEDリサーチレジデント]、稲嶺由羽、黒田誠、松井真理[薬剤耐性菌センター]、鈴木里和[薬剤耐性菌センター])

(2) 大規模ゲノム解析のための自動解析パイプラインの開発

細菌ゲノム解析を行う対象種が格段に増え、ゲノム解析を行う業務が多岐に渡ってきた。そのため、NGSの解読リードを用いたde novo assemble、解析対象サンプルの生物種推定、血清型推定、コンタミネーションの確認、MLSTによるタイピング、薬剤耐性遺伝子・病原遺伝子検索、プラスミド検索、遺伝子抽出および遺伝子のアノテーションを全て自動で行うためのパイプライン Automatic Microbial Genome Annotation (AMiGA)を構築

している。本年度は、解析速度を上げるためのプログラムの改変と、各種データベース管理の自動化プログラムを作成した。さらに、細菌ゲノムの NGS データを公開データベースより回収し、本プログラムにて解析を行い、データベース作成を開始した。

(関塚剛史、谷津弘仁、山下明史、黒田誠)

(3) 薬剤耐性プラスミドの由来をトレースする情報解析システムの開発

ブラウザ経由で NGS データを用いた網羅的なプラスミド解析ツールを開発している。本システム (Global Plasmidome Analyzing Tool: GPAT) は、NGS データからの配列アセンブリ、薬剤耐性遺伝子の検索、薬剤耐性遺伝子保有プラスミドをトレースする際に重要な手掛かりとなる不和合性タイピングを円滑に行うことが可能である。また、GPAT 解析結果から得られたプラスミド間の関係性をネットワークとして表示するシステム (inter Plasmid Analyzing Tool: iPAT) を構築し、毎年改良を加えてきた。本年度は、ネットワーク解析から予測されるプラスミド間の類縁性を明確に可視化するためのプログラムを構築した。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

(4) 結核菌全ゲノム薬剤耐性マーカー検出と感受性予測の構築

世界的にも多剤耐性が問題になっている結核菌のゲノム分子疫学解析パイプライン TGS-TB (Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis (TB)) を昨年度構築した。本年度は、薬剤耐性に関わる遺伝子の変異箇所を効率良く探索するためのプログラムを新たに開発し、公開した。現在、薬剤耐性結核菌のゲノムデータを用いて解析し、薬剤耐性に関与する新たな変異箇所の抽出と、データベースの構築を行なっている。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠、村瀬良朗[公益財団法人結核予防会結核研究所]、瀧井猛将[公益財団法人結核予防会結核研究所]、岩本朋忠[神戸市環境保健研究所]、御手洗聡[公益財団法人結核予防会結核研究所]、加藤誠也[公益財団法人結核予防会結核研究所])

(5) NGS データからウイルス配列を構築するシステムの開発

ブラウザ経由で NGS データからウイルス全長配列を再構築するシステム (Virus Genome-Targeted Assembly Pipeline: VirusTAP) を構築し公開している。VirusTAP は入力された NGS データから品質の悪い部分やウイルス

以外の配列を取り除いた後、配列アセンブルを行い、ウイルス全長配列を推定するソフトウェアである。本年度は、宿主ゲノム配列除去のプログラム及びデータベースを更新し、日本人固有のゲノム配列、及びヒト以外の動物を含む宿主ゲノム配列の除去も可能にした。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

(6) 不明症例に係る網羅的病原体検索の行政・依頼検査への対応

原因病原体不明の感染症患者サンプルに対して、NGS を用いた網羅的ゲノム解読により原因病原体の探索および医療現場への還元による原因診断法の確立を実施した。研究開発分担者である公立昭和病院小児科の大場邦弘医師の協力により、H29 年度は 34 患者 (133 検体) に対して NGS による原因病原体探索を実施した。何らかの病原微生物の関与が疑われたが通常診療では同定できなかった感染症疑い症例について、NGS 検査にて病原体候補を検出することができた。侵襲性 A 群レンサ球菌による重症呼吸器症例の解析や、地域流行したと思われるヒトパレコウイルス 3 型を特定した。NGS 検査は検体中の遺伝子を網羅的に解析するため、重複感染の病原体候補が検出されることがあり、病態への関与を判断することは遺伝子情報のみでは困難である。今後、免疫学的に応答したかを検査できる特異的 IgM 抗体測定を併用することで、より因果関係が明確になるものと思われる。

他、幼児突然死等の原因不明患者の外部依頼検査を 4 件担当し主治医へ情報提供した (結果については守秘義務があるため未公開)。

(関塚剛史、橋野正紀、大場邦弘[公立昭和病院]、黒田誠)

VI. 病原細菌ゲノム解析

VI-1 薬剤耐性菌

(1) 多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究

薬剤耐性 (AMR) 感染症が世界的に拡大しており、2015 年には WHO から AMR グローバルアクションプランが提唱され、サーベイランス・研究を通じた実態把握の強化が急務となっている。これまでに、ゲノムセンターでは所内および所外の研究者との共同研究で、多数の薬剤耐性菌のゲノム解析を行ってきた。それらデータを管理・運用し、且つ、多検体の解析を簡便に行うためのシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan) を構築した。GenEpid-J には、臨床・動物・環境由来の多種にわたる細菌のゲノムデータが蓄積されており、今年度

までに約 2,200 株、約 5,300 プラスミド配列を決定し、データベースを作成した。

(関塚剛史、谷津弘仁、山下明史、稲嶺由羽、黒田誠、松井真理[薬剤耐性菌センター]、鈴木里和[薬剤耐性菌センター]、秋庭正人[国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構]、川西路子[農林水産省動物医薬品検査所])

(2) 院内感染及び食中毒事例に係る原因細菌の比較ゲノム解析

国内で発生した 4 例の院内感染及び集団食中毒事例由来分離株の比較ゲノム解析を行った。これら解析の大部分は、GenEpid-J 上で解析を行った。分離日の時系列に合わせてゲノム上に塩基置換が段階的に数カ所ずつ入る事例と、時系列に添わず、菌株間で多数の塩基置換が確認される事例が確認された。特に、これまで国内でほとんど確認されなかった薬剤耐性遺伝子保有の同一 Inc 型プラスミドが検出され、輸入症例と推定される事例を経験した。

(関塚剛史、山下明史、稲嶺由羽、黒田誠、松井真理[薬剤耐性菌センター]、鈴木里和[薬剤耐性菌センター]、村上光一[感染症疫学センター])

(3) 環境中に存在する薬剤耐性腸内細菌科細菌に関する研究

薬剤耐性菌の研究では、ヒト、動物、食材から分離されたものを扱うことが多い。国外では、環境中の薬剤耐性菌汚染が深刻化しており、国内での実態を把握することが急務となっている。本年度は、東京近郊の下水処理場の放流水を採取し、メタゲノム解析による耐性因子の同定を行った。また、放流水から ESBL およびカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を分離し、特徴的な薬剤耐性遺伝子を保有する菌株は、完全長ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析にてその由来について検討した。

(関塚剛史、黒田誠)

(4) カルバペネム感性 IMP-6 保有大腸菌におけるプラスミド性転写調節因子 ArdK によるカルバペネマーゼ産生抑制機序の解析

国内でカルバペネム感性 *bla_{IMP-6}* 陽性大腸菌 (A56-1S) が分離された。この菌株をメロペネム含有培地で継代してカルバペネム耐性株 (A56-1R) を得た。この 2 株のカルバペネマーゼ産生判定および比較ゲノム解析を行った結果、A56-1S は IMP-6 メタロ β-ラクタマーゼ (MBL) を産生していないこと、A56-1R は IMP-6 MBL を産生し、かつ

プラスミド性転写調節因子 ArdK の遺伝子に挿入変異があることが明らかになった。ArdK が IMP-6 MBL の産生抑制に関与するかを検討するために、ArdK もしくは変異型 ArdK と、*bla_{IMP-6}* の上流領域をクローニングした共形質転換株を作製し、IMP-6 MBL をレポーターとしたレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、ArdK を発現する共形質転換株において IMP-6 MBL の産生が抑制されたが、変異型 ArdK を発現する共形質転換株では抑制されなかった。ArdK による IMP-6 MBL 産生抑制の機序を解析するために EMSA および Binding assay を行ったところ、*bla_{IMP-6}* 上流の 107bp の配列と ArdK が結合すること、その Kd 値が $2.93 \times 10^{-8} \text{M}$ であることが確認された。以上の結果から、ArdK は *bla_{IMP-6}* の上流領域に結合することによって、IMP-6 MBL の発現を抑制することが明らかになった。[瀬川孝耶、関塚剛史、鈴木里和 (AMR センター)、山下明史、松井真理 (AMR センター)、黒田誠]

VI-2 その他病原細菌の解析

(1) 脳膿瘍から分離された *Streptococcus intermedius* の病原性機構の解明

痙攣で外来受診し、脳膿瘍と診断された小児患者の脳膿ドレナージより、新規に *Streptococcus intermedius* が分離された。全ゲノム解読の結果、本菌の病原性に関与すると示唆される、phenol-soluble modulins β1 (PSM β1)、7 型分泌装置 (T7SS) および 19 個の細胞壁結合タンパク質 (CWAPs) 関連遺伝子が認められた。トランスポゾン挿入変異株ライブラリーをマウスに皮下接種し、膿瘍形成に貢献する遺伝子群も探索した。これら解析により、PSM β1、T7SS および CWAPs が膿瘍形成に関与することが強く示唆された。今年度は、本菌株が有する *in vitro* での細胞障害性について解析した。その結果、本菌株の分泌する T7SS のエフェクタータンパク質が、細胞障害性に重要であることが明らかとなった。

(橋野正紀 [AMED リサーチレジデント]、関塚剛史、黒田誠)

(2) 難治性腸疾患患者の腸内フローラ解析及び腸内細菌のゲノム解析

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、固有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン若しくはホスホマイシン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が 1 年以上緩解する治療例が報告されている。UC 患者より臨床分離された *Fusobacterium varium* Fv113-g1 株の全ゲノム解析の結

果、Type V secretion system (T5SS) および Fusobacterium adhesion FadA パラログが多数検出された。トランスクリプトーム解析の結果、複数存在する T5SS 及び FadA のうち、数種の遺伝子が、貧栄養条件下で発現量が増加することが明らかとなり、これら遺伝子が生存戦略に関与することが示唆された。

(関塚剛史、黒田 誠)

(3) 単純性尿路感染症の起因菌 *Staphylococcus saprophyticus* の比較ゲノム解析

単純性尿路感染症の起因菌として知られる腐生ブドウ球菌 *Staphylococcus saprophyticus* は、臨床学的に重要なコアグラゼ陰性ブドウ球菌であるが、大規模なゲノム分子疫学解析および比較ゲノム解析が行われた例はない。2003年に国内で分離されたヒト臨床検体および動物由来の117分離株とデータベースに公開されている6株を含む計123株の比較ゲノム解析を行った。コアゲノム分子系統解析およびパンゲノム解析の結果、本菌種は2系統群に大別され、各系統内で特徴的なアクセサリ遺伝子を保有していた。大別される2系統群を跨いで、同一なゲノムアイランド Staphylococcal cassette chromosome (SCC) を保有する株が確認され、本菌種間 SCC の水平伝達の可能性が強く示唆された。

(加藤健吾、関塚剛史、東出正人[株式会社江東微生物研究所]、山下明史、黒田誠)

(4) 未知・難培養細菌分離培養のための基礎的研究

腸内細菌叢と健康・疾患との関連が示唆されているが、具体的にどの細菌種がどのようなメカニズムで関与しているかは未解明な部分が多く、また、いまだ分離されていない細菌種の存在が示唆されている。そこで、既存培地による新規腸内細菌の分離が可能かを検討した。また、既存培地で増殖する細菌の網羅的解析も行った。28種類の既存培地に健常人の糞便を塗抹し、嫌気培養を行い、16S rRNA 遺伝子メタゲノム解析を行った。コロンビア CNA5% 羊血液寒天培地、Listeria 寒天培地を含む5種類の培地から数種類の新規腸内細菌が増殖していることが示唆され、合計8種類の新規腸内細菌が実際に単離でき、それら新規細菌の完全長ゲノム配列を決定した。新規分離株は、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託した。

(伊藤環[AMED リサーチレジデント]、関塚剛史、黒田誠)

VII 病原性ウイルスゲノム解析

(1) ノロウイルスの大規模ゲノム分子系統解析および

時系列分子系統解析

ノロウイルス (NoV) の世界規模の流行が発生している。特に、遺伝子型 GII.4 は、近縁、多くの急性胃腸炎症例の原因となっている。1974~2015年に得られた、国内外を含む、合計500株のNoV GII.4のVP1遺伝子の大規模系統解析、及び、BEAST2 (Bayesian evolutionary analysis by sampling trees 2) を用いた時系列分子系統解析を行った。BEAST2 使用時、計算量が膨大になったため、GPU を用いた方法を新たに採用し、解析を行った。本解析により、NoV GII.4 は、数十年で急速に進化し、多様な変異体が発生し、抗原性を変化してきたことが明らかとなった。また、BEAST2 を用いた時系列系統解析を円滑に行うための仕様書を作成し、共同研究期間に配布した。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、松島勇紀[川崎市健康安全研究センター]、木村博一[感染症疫学センター])

VIII その他ゲノム解析

(1) 感染成立に関与する宿主因子の探索に関する研究

細菌が産生する毒素、ウイルスタンパク質と結合及び相互作用する宿主側因子を把握することで、感染症が発症するメカニズムの解明のみならず、治療への応用にも展開することが出来る。CRISPR/Cas9 システムを用いた、培養細胞ノックアウトライブラリーを本研究所細胞化学部が作成している。本ライブラリーを用いて、各種毒素・ウイルスの感染実験を実施し、生存細胞を回収後、NGS による標的マーカーの deep sequencing を行うことで、感染に関与する宿主遺伝子を網羅的に回収することが可能となる。本年度は、NGS 解読データを取得後、標的遺伝子を絞り込むための自動パイプラインを作成した。本プログラムにより、細菌毒素に関与する宿主因子を網羅的に回収し、選別することが可能となった。

(関塚剛史、黒田誠、山地俊之[細胞化学部]、花田賢太郎[細胞化学部]、加藤大志[ウイルス第三部]、直亨則[ウイルス第三部]、竹田誠[ウイルス第三部])

品質管理に関する業務

HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチン (2 価ワクチンおよび 4 価ワクチン) の検定を製剤担当室として担当した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。また HPV ワクチンの製造・試験記録等要約書(summary lot protocol) の審査を実施した。(石井克幸、竹内隆正、終元 巖、黒田 誠)

国際協力関係業務

WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク (HPV ラボネット) の、西太平洋地域リファレンスラボとしての活動を行った。HPV DNA proficiency panel study に参加し、送られてきた検体の HPV タイピングを行い、その結果を報告して、十分な HPV タイピング能力を持つラボとしての認定を受けた。(中村浩美、嵯元 巖)

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Tenjimbayashi Y, Onuki M, Hirose Y, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Tasaka N, Satoh T, Morisada T, Iwata T, Miyamoto S, Matsumoto K, Sekizawa A, Kukimoto I. Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*, Aug 4;12:44. doi: 10.1186/s13027-017-0155-4 (2017)
- 2) Hirose Y, Onuki M, Tenjimbayashi Y, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Tasaka N, Satoh T, Morisada T, Iwata T, Miyamoto S, Matsumoto K, Sekizawa A, Kukimoto I. Within-host variations of human papillomavirus reveal APOBEC signature mutagenesis in the viral genome. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.00017-18 (2018)
- 3) Kawai S, Tsukamoto T, Kukimoto I, Saito M, Iwata T, Torii Y, Ohtani S, Kuroda M, Fujii T. A case of primary signet-ring cell carcinoma of the cervix containing full genome of human papillomavirus 16. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, in press.
- 4) Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H. Molecular dynamics simulation of the influenza A(H3N2) hemagglutinin trimer reveals the structural basis for adaptive evolution of the recent epidemic clade 3C.2a. *Front. Microbiol.*, 8:584, 2017.
- 5) Chutiwitoonchai N, Mano T, Kakisaka M, Sato H, Kondoh Y, Osada H, Kotani O, Yokoyama M, Sato H, Aida Y. Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of influenza A nucleoprotein and nuclear export protein as a novel target for antiviral drug development. *Virology*, 507:32-39, 2017.
- 6) Hou Y, Lin CM, Yokoyama M, Yount BL, Marthaler D, Douglas AL, Ghimire S, Qin Y, Baric RS, Saif LJ, Wang Q. Deletion of a 197 amino acid-region in the N-terminal domain of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in piglets. *J. Virol.*, 91(14):e00227-17, 2017.
- 7) Seki S, Nomura T, Nishizawa M, Yamamoto H, Ishii H, Matsuoka S, Shiino T, Sato H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. In vivo virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts. *PLoS Pathog.* 2017, 13(9):e1006638.
- 8) Yokoyama M, Oka T, Takagi H, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Tohya Y, Sato H. A proposal for a structural model of the feline calicivirus protease bound to the substrate peptide under physiological conditions. *Front. Microbiol.*, 8:1383, 2017. (The first two authors contributed equally)
- 9) Nomaguchi M, Doi N, Yoshida T, Koma T, Adachi S, Ode H, Iwatani Y, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Production of HIV-1 vif mRNA is modulated by natural nucleotide variations and SLSA1 RNA structure in SA1D2prox genomic region. *Front. Microbiol.*, 8:2542, 2017.
- 10) Chutiwitoonchai N, Mano T, Kakisaka M, Sato H, Kondoh Y, Osada H, Kotani O, Yokoyama M, Sato H, Aida Y. Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of influenza A nucleoprotein and nuclear export protein as a novel target for antiviral drug development. *Virology*. 2017, 507:32-39.
- 11) Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. *Front Microbiol.* 2017, 8:410.
- 12) K. Lee, T. Morita-Ishihara, S. Iyoda, Y. Ogura, T. Hayashi, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Ohnishi. A Geographically Widespread Outbreak Investigation and Development of a Rapid Screening Method Using Whole Genome Sequences of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121. *Front Microbiol*, vol. 8, p. 701, 2017.
- 13) T. Sekizuka, Y. Ogasawara, T. Ohkusa, and M. Kuroda. Characterization of *Fusobacterium varium* Fv113-g1 isolated from a patient with ulcerative colitis based on complete genome sequence and transcriptome analysis. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 12, p. e0189319, 2017.
- 14) H. Banno, K. Kimura, Y. Tanaka, T. Sekizuka, M. Kuroda, W. Jin, J.-I. Wachino, K. Yamada, K. Shibayama,

- and Y. Arakawa
Analysis of multidrug resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small, less hemolytic colonies. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 8, p. e0183453, 2017.
- 15) M. Kujiraoka, M. Kuroda, K. Asai, T. Sekizuka, K. Kato, M. Watanabe, H. Matsukiyo, T. Saito, T. Ishii, N. Katada, Y. Saida, and S. Kusachi
Comprehensive Diagnosis of Bacterial Infection Associated with Acute Cholecystitis Using Metagenomic Approach. *Front Microbiol*, vol. 8, p. 685, 2017.
- 16) T. Motoya, K. Nagasawa, Y. Matsushima, N. Nagata, A. Ryo, T. Sekizuka, A. Yamashita, M. Kuroda, Y. Morita, Y. Suzuki, N. Sasaki, K. Katayama, and H. Kimura
Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol*, vol. 8, p. 2399, 2017.
- 17) K. Takahashi, T. Sekizuka, H. Fukumoto, K. Nakamichi, T. Suzuki, Y. Sato, H. Hasegawa, M. Kuroda, and H. Katano. Deep-Sequence Identification and Role in Virus Replication of a JC Virus Quasispecies in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. Virol.*, vol. 91, no. 1, Jan. 2017.
- 18) M. Kawanishi, H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima
Prevalence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 61, no. 1, Jan. 2017.
- 19) N. Hasegawa, T. Sekizuka, Y. Sugi, N. Kawakami, Y. Ogasawara, K. Kato, A. Yamashita, F. Takeuchi, and M. Kuroda. Characterization of the Pathogenicity of *Streptococcus intermedius* TYG1620 Isolated from a Human Brain Abscess Based on the Complete Genome Sequence with Transcriptome Analysis and Transposon Mutagenesis in a Murine Subcutaneous Abscess Model. *Infect Immun*, vol. 85, no. 2, Feb. 2017.
- 20) D. Imamura, M. Morita, T. Sekizuka, T. Mizuno, T. Takemura, T. Yamashiro, G. Chowdhury, G. P. Pazhani, A. K. Mukhopadhyay, T. Ramamurthy, S.-I. Miyoshi, M. Kuroda, S. Shinoda, and M. Ohnishi
Comparative genome analysis of VSP-II and SNPs reveals heterogenic variation in contemporary strains of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Kolkata, India. *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 11, no. 2, p. e0005386, Feb. 2017.
- 21) K. Sakamoto, T. Sekizuka, T. Uehara, T. Hishima, S. Mine, H. Fukumoto, Y. Sato, H. Hasegawa, M. Kuroda, and H. Katano. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med*, vol. 6, no. 3, pp. 605–618, Mar. 2017.
- 22) T. Sekizuka, M. Kawanishi, M. Ohnishi, A. Shima, K. Kato, A. Yamashita, M. Matsui, S. Suzuki, and M. Kuroda. Elucidation of quantitative structural diversity of remarkable rearrangement regions, shufflons, in IncI2 plasmids. *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 928, Apr. 2017.
- 23) T. Kenri, M. Suzuki, A. Horino, T. Sekizuka, M. Kuroda, H. Fujii, T. Hashimoto, H. Nakajima, H. Ohya, and K. Shibayama. Complete Genome Sequences of the *p1* Gene Type 2b and 2c Strains *Mycoplasma pneumoniae* KCH-402 and KCH-405. *Genome Announc*, vol. 5, no. 24, Jun. 2017. (査読無し)
- 24) S. Mine, T. Hishima, A. Suganuma, H. Fukumoto, Y. Sato, M. Kataoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, T. Suzuki, H. Hasegawa, M. Fukayama, and H. Katano
Interleukin-6-dependent growth in a newly established plasmablastic lymphoma cell line and its therapeutic targets. *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 10188, Aug. 2017.
- 25) M. Kuramitsu, T. Sekizuka, T. Yamochi, S. Firouzi, T. Sato, K. Umeki, D. Sasaki, H. Hasegawa, R. Kubota, R. Sobata, C. Matsumoto, N. Kaneko, H. Momose, K. Araki, M. Saito, K. Nosaka, A. Utsunomiya, K.-R. Koh, M. Ogata, K. Uchimaru, M. Iwanaga, Y. Sagara, Y. Yamano, A. Okayama, K. Miura, M. Satake, S. Saito, K. Itabashi, K. Yamaguchi, M. Kuroda, T. Watanabe, K. Okuma, and I. Hamaguchi.
Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results. *J Clin Microbiol*, vol. 55, no. 9, pp. 2838–2849, Sep. 2017.
- 26) T. Sekizuka, E. Nai, T. Yoshida, S. Endo, E. Hamajima, S. Akiyama, Y. Ikuta, N. Obana, T. Kawaguchi, K. Hayashi, M. Noda, T. Sumita, M. Kokaji, T. Katori, M. Hashino, K. Oba, and M. Kuroda.
Streptococcal toxic shock syndrome caused by the dissemination of an invasive emm3/ST15 strain of *Streptococcus pyogenes*. *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, no. 1, p. 774, Dec. 2017.

- 27) K. Nagasawa, Y. Matsushima, T. Motoya, F. Mizukoshi, Y. Ueki, N. Sakon, K. Murakami, T. Shimizu, N. Okabe, N. Nagata, K. Shirabe, H. Shinomiya, W. Suzuki, M. Kuroda, T. Sekizuka, Y. Suzuki, A. Ryo, K. Fujita, K. Oishi, K. Katayama, and H. Kimura
Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017. *Front Microbiol*, vol. 9, p. 1, 2018.
- 28) C. Sakuma, T. Sekizuka, M. Kuroda, F. Kasai, K. Saito, M. Ikeda, T. Yamaji, N. Osada, and K. Hanada
Novel endogenous simian retroviral integrations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate. *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 644, Jan. 2018.
- 29) E. Nakayama, S. Tajima, A. Kotaki, K.-I. Shibasaki, K. Itokawa, K. Kato, A. Yamashita, T. Sekizuka, M. Kuroda, T. Tomita, M. Saijo, and T. Takasaki
A summary of the imported cases of Chikungunya fever in Japan from 2006 to June 2016.
J Travel Med, vol. 25, no. 1, Jan. 2018.
- 30) K. Nagasawa, Y. Matsushima, T. Motoya, F. Mizukoshi, Y. Ueki, N. Sakon, K. Murakami, T. Shimizu, N. Okabe, N. Nagata, K. Shirabe, H. Shinomiya, W. Suzuki, M. Kuroda, T. Sekizuka, A. Ryo, K. Fujita, K. Oishi, K. Katayama, and H. Kimura. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17.
Emerging Infect Dis, vol. 24, no. 1, pp. 144–148, Jan. 2018.
- 31) H. Ozawa, S. Tajima, E. Nakayama, K. Kato, A. Yamashita, T. Sekizuka, M. Kuroda, and S. Usuku
Isolation and Complete Genome Sequencing of Zika Virus Imported from the Dominican Republic to Japan.
Jpn. J. Infect. Dis., vol. 71, no. 1, pp. 72–74, Jan. 2018.

2. 和文発表

- 1) 黒田誠 「次世代シーケンサーによる病原体ゲノム網羅解析と感染症の原因究明」感染制御と予防衛生 2(1): 1 -1 2018
- 2) 黒田誠 「メタゲノム解析による病原体検出」最新医学社「最新医学」73巻4号特集
- 3) 黒田誠 「次世代シーケンサーを用いたウイルス検査の未来」小児内科 特集:ウイルス感染症 - 最近の動向・トピックス III コラム
- 4) 黒田誠 「次世代シーケンサーによる病原体検出と感染症診断のシンポ」先端医学社:「分子呼吸器病」vol. 22 no. 1

- 5) 黒田誠 「次世代シーケンサー」臨床とウイルス増刊号ウイルス検査法 (改訂第二版)
- 6) 黒田誠 「次世代シーケンサーを用いた感染症診断の最新事情[No. 15]」文光堂「病理と臨床」2018年臨時増刊号臨号((36巻) 「感染性疾患の病理」

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Kukimoto I., Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Matsumoto K, Mori S. Upregulation of APOBEC3B cytidine deaminase by HPV E6 and E7 via the TEAD transcription factor. DNA Tumour Virus Meeting (2017年7月、バーミンガム)
- 2) Kukimoto I., Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K. Whole-genome analysis of human papillomavirus 52/58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. AOGIN 2017 (2017年10月、東京)
- 3) Yoshikazu Ishii, Kotaro Aoki, Ayaka Kusano, Yukihiro Akeda, Syouta Nakamura, Kazuho Tomono, Tsuyoshi Sekizuka, Tetsuya Iida, Makoto Kuroda, Kazuhiro Tateda. Spreading of the blaCTX-M-8 carrying plasmid in human was mediated by its possessed *Escherichia coli* contaminated chicken meat; a public health concern. 13th beta-lactamase meeting (2017年5月 イタリア・ラクイラ)
- 4) Kimitoshi Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Toshiro Sugiyama, Makoto Kuroda, Toshifumi Ohkusa. Characterization of gut microbiome associated with improvement of ulcerative colitis after antibiotic combination therapy using fecal full metagenomic analysis. 25th United European Gastroenterology Week (UEGW2017) (2017年10月 スペイン・バルセロナ)
- 5) Takaya Segawa, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Satowa Suzuki, Mari Matsui, Makoto Kuroda. Transcriptional factor ArdK on IncN plasmid contributes to the repression of blaIMP-6 in concealed-type carbapenem-susceptible *Escherichia coli*. Keystone Symposia Conference T4: Antimicrobials and Resistance: Opportunities and Challenges (2017年10月 アメリカ・サンタフェ)
- 6) Akifumi Yamashita, Tomotada Iwamoto, Tsuyoshi Sekizuka, Yoshiro Murase, Kengo Kato, Takemasa Takii, Satoshi Mitarai, Seiya Kato, and Makoto Kuroda.

Antimicrobial Resistance Genetic Marker Prediction for *Mycobacterium tuberculosis*. International Congress of Chemotherapy and Infection 2017 (ICC 2017) (2017年11月 台湾・台北)

2. 国内学会

- 1) 柗元 巖、森 清一郎、ヒトパピローマウイルス癌タンパク質による APOBEC3B 発現誘導機構、第 16 回生命科学研究会 (2017 年 6 月、金沢)
- 2) Hirose Y, Tenjimbayashi Y, Onuki M, Minaguchi T, Iwata T, Matsumoto K, Kukimoto I. Intra-patient variation of human papillomavirus genomes revealed by deep sequencing. 第 76 回日本癌学会学術総会、(2017 年 9 月、横浜)
- 3) Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Nakao S, Iwata T, Matsumoto K, Kukimoto I. Whole-genome analysis of human papillomavirus 52 and 58 in Japanese women. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月、横浜)
- 4) Fujii T, Kukimoto I. MicroRNAs extracted from cervical mucus or exfoliated cells are promising biomarkers for cervical cancer screening. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月、横浜)
- 5) Kukimoto I, Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K. Whole-genome analysis of HPV52/58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (2017 年 10 月、大阪)
- 6) Mori S, Kotani O, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. Persistent expression of a broadly neutralizing monoclonal antibody against HPVs by AAV-mediated gene transfer. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (2017 年 10 月、大阪)
- 7) 柗元 巖、APOBEC 変異導入を介したヒトパピローマウイルス発癌機構、日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月、金沢)
- 8) 横山 勝、佐藤裕徳. Structural sectors that are contributed to neutralization escape in HIV-1 envelope glycoprotein trimer. (HIV-1 エンベロープ三量体における中和抗体逃避に寄与する構造セクター) 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017.
- 9) 小谷 治、横山 勝、Loela Siarot、佐藤洋隆、Nopporn Chutiwitoonchai、間 陽子、佐藤裕徳. Analysis of mechanism of action of antivirals targeting HIV-1 Gag p6. (HIV-1 Gag p6 蛋白質を標的とする抗ウイルス物質の作用機構解析) 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017.
- 10) 荻原香澄、引地優太、原田恵嘉、横山 勝、加藤由奈、佐藤浩平、間瀬暢之、吉村和久、鳴海哲夫. HIV の細胞侵入を阻害するオレアノール酸誘導体の構造活性相関研究. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会、熊本、2017.
- 11) Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Kasumi Ogihara, Yuta Hikichi, Hironori Sato, Tetsuo Narumi, Tetsuro Matano, Kazuhisa Yoshimura. Discovery of novel bifunctional entry inhibitors of HIV-1 using structure-based in silico screening. (In silico スクリーニング法を用いた新規 bifunctional HIV-1 侵入阻害剤の探索) 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017.
- 12) Kaori Sano, Shinji Saito, Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Osamu Kotani, Elly van Riet, Koshiro Tabata, Makoto Fujii, Yoshimasa Takahashi, Kiyoko Ogawa-Goto, Tsutomu Kageyama, Hideki Hasegawa. Enhancement of anti-viral potencies of an intranasal Influenza vaccine-derived broadly neutralizing antibody by IgA polymerization. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017.
- 13) Kay Hagiwara, Osamu Kotani, Naoko Iwata-Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata. Clarification of a mechanism of SAFV-induced demyelination in a mouse model. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017.
- 14) 増田貴夫、高畑辰郎、黄 渝倫、王 寶れい、長谷川温彦、徳永研三、飛梅 実、塩田達夫、武田英里、俣野哲朗、横山 勝、河合剛太、佐藤裕徳、神奈木真理. HIV-1 インテグラーゼ非酵素的機能の分子基盤. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会、シンポジウム「コアサイエンス」、東京、2017.
- 15) 横山 勝、佐藤裕徳. HIV-1 エンベロープ三量体における中和抗体逃避機構の解析. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会、ワークショップ「分子・細胞・集団」、東京、2017.
- 16) 原田恵嘉、野村 渉、鳴海哲夫、横山 勝、前田賢次、林 宏典、紺野奇重、引地優太、佐藤裕徳、玉村啓和、俣野哲朗、吉村和久. 網羅的 Env 標的阻害剤ライブラリーの構築-2. 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2017.
- 17) 横山 勝、佐藤裕徳. 分子動力学計算による HIV-1

- エンベロープ三量体の構造セクターの解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸, 2017.
- 18) 小谷 治, 横山 勝, Lowela Siarot, 佐藤洋隆, Nopporn Chutiwitoonchai, 間 陽子, 佐藤裕徳. 分子動力学計算を用いた抗 HIV ウイルス物質の作用機構解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸, 2017.
- 19) 梁田麻佳, 永田祥平, 富田勝, 佐藤裕徳, 金井昭夫. 配列類似性ネットワークを通じた HIV-1 におけるアンチセンスタンパク質遺伝子の進化解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸, 2017.
- 20) 黒田誠. 進化し続けるシーケンス技術と公衆衛生・感染症診断への応用 第 65 回日本化学療法学会学術総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 21) 山下明史, 瀧井猛将, 御手洗聡, 黒田誠. Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* (TGS-TB) による結核菌薬剤耐性マーカー検出と感受性予測法の構築. 第 65 回日本化学療法学会学術総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 22) 仙波敬子, 松井真理, 甲斐久美子, 鈴木里和, 柴山恵吾, 加藤健吾, 山下明史, 関塚剛史, 黒田誠, 四宮博人. 医療施設で分離されたカルバペネマーゼ GES-24 産生複数菌種株由来プラスミドのゲノム情報解析. 第 65 回日本化学療法学会学術総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 23) 鯨岡 学, 黒田 誠, 浅井浩司, 渡邊 学, 松清 大, 斎藤智明, 榎本俊行, 桐林孝治, 中村陽一, 片田夏也, 斉田芳久, 草地信也. 急性胆嚢炎迅速診断におけるメタゲノム解析の有用性に関する検討. 第 65 回日本化学療法学会学術総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 24) 鹿山鎮男, 矢野雷太, 久恒順三, 山下明史, 黒田誠, 柴山恵吾, 大毛宏喜, 菅井基行. 多剤耐性 *Acinetobacter* が保有する GES-24 プラスミドの解析. 第 65 回日本化学療法学会学術総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 25) 清田育男, 宇留間友宣, 黒田祐子, 川畑大輔, 黒田誠, 松本哲哉. 次世代シーケンサーを用いて 1 型壊死性筋膜炎の複合感染の解析を行った 1 例. 第 91 回日本感染症学会学術講演会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 26) 遠藤翔太, 秋山聡香, 大場邦弘, 小鍛治雅之, 松村壮史, 小椋雅夫, 石倉健司, 西村謙一, 伊藤秀一, 黒田誠. パラインフルエンザ 3 型感染症を契機に診断された若年性関節リウマチの 1 例. 第 120 回日本小児科学会学術集会 (港区, 2017 年 4 月)
- 27) Kenta Takahashi, Tsuyoshi Sekizuka, Hitomi Fukumoto, Kazuo Nakamichi, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Makoto Kuroda, Harutaka Katano. Deep-sequence identification and role in virus replication of a JCV quasispecies in PML patients. 第 106 回日本病理学会総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 28) 高橋 健太, 関塚 剛史, 福本 瞳, 中道 一生, 鈴木忠樹, 佐藤 由子, 長谷川 秀樹, 黒田 誠, 片野 晴隆. 次世代シーケンサーが明らかにした JC ウイルスのゲノム変異と PML の病態. 第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会 (千代田区, 2017 年 6 月)
- 29) 黒田 誠. 次世代シーケンサー技術と公衆衛生・感染症診断への応用. 第 20 回小児心血管分子医学研究会 (浜松市 2017 年 7 月)
- 30) 鯨岡 学, 黒田 誠, 浅井浩司, 渡邊 学, 松清 大, 斎藤智明, 片田夏也, 斉田芳久, 草地信也. メタゲノム解析を用いた急性胆嚢炎の起因菌同定, 重症度評価, 術中予測に関する検討. 第 72 回消化器外科学会 (金沢市 2017 年 7 月)
- 31) 白川崇大, 小澤真名緒, 川西路子, 内山万利子, 関塚剛史, 山下明史, 黒田誠, 木島まゆみ. 次世代シーケンサー (NGS) を利用した健康ブロイラー由来第 3 世代セファロsporin 耐性大腸菌の分子疫学的解析 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島市, 2017 年 9 月)
- 32) 新井暢夫, 関塚剛史, 玉村雪乃, 田中聖, 楠本正博, 山崎伸二, 日根野谷淳, 岩田剛敏, 渡部綾子, 黒田誠, 内田郁夫, 秋庭正人. 牛由来 *Salmonella Typhimurium* 及びその非定型株 (4:i:-) の全ゲノム系統解析と新規遺伝子型別法の構築. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島市, 2017 年 9 月)
- 33) 重村洋明, 村上光一, 野田多美枝, 松井真理, 鈴木里和, 関塚剛史, 黒田誠, 世良暢之. 養鶏産業におけるセフトオフルの使用自粛と鶏肉由来広域スペクトルセファロsporin 耐性サルモネラの減少. 第 160 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島市, 2017 年 9 月)
- 34) 新井暢夫, 関塚剛史, 玉村雪乃, 田中聖, 泉谷秀昌, 楠本正博, 山崎伸二, 日根野谷淳, 岩田剛敏, 渡部

- 綾子、黒田誠、内田郁夫、大西真、秋庭正人. 牛由来ネズミチフス菌とその非定型株の分子疫学. 第100回日本細菌学会関東支部総会(板橋区, 2017年9月)
- 35) 川端寛樹、関塚剛史、高野愛、黒田誠、佐藤梢、大西真. ゲノム情報から推定されたボレリア属細菌の進化イベント. 第63回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会(札幌市, 2017年10月)
- 36) 野本竜平、濱夏樹、宅見雄志、北井和志、稲嶺由羽、関塚剛史、黒田誠. 神戸市内で分離されたカンピロバクターの分子疫学解析. 第38回日本食品微生物学会(徳島市 2017年10月)
- 37) 鯨岡 学、黒田 誠、浅井浩司、渡邊 学、松清 大、齋藤智明、片田夏也、斉田芳久、草地信也. メタゲノム解析を用いた急性胆嚢炎の起因菌同定, 重症度評価, 術中難易度予測に関する有用性の検討. 日本外科感染症学会(新宿区 2017年11月)
- 38) 永瀬静香、親里嘉展、多屋馨子、新井智、奥野英雄、黒田誠、高崎智彦、片野晴隆、荻美貴、近平雅嗣、高橋幸利、榊原尚子、中尻智史、米谷昌彦. 詳細な検索によりウイルス感染の関与が示された抗 NMDA 型 GluR に対する抗体陽性脳炎の小児3症例. 第22回日本神経感染症学会総会・学術大会(北九州市 2017年10月)
- 39) 遠藤翔太、濱嶋恵美、秋山聡香、生田陽二、小花奈都子、川口隆弘、林健太、野田雅裕、吉田知広、大場邦弘、住田朋子、小鍛冶雅之、香取竜生、橋野正紀、黒田誠. 次世代シーケンサーにより診断に至った稀な合併症である水痘ウイルス性関節炎の女児例. 第49回日本小児感染症学会総会(金沢市 2017年10月)
- 40) 黒尾優太、鹿山鎮男、久恒順三、森三郎、黒田誠、大毛宏喜、菅井基行. 中国地方にて分離された *Delftia acidovorans* が保有する IMP-34 プラスミドの解析. 第65回日本化学療法学会西日本支部総会(長崎市 2017年10月)
- 41) 山地俊之、関塚剛史、佐久間智理、立田由里子、黒田誠、花田賢太郎. CRISPR ライブラリーを用いた糖脂質生合成に影響を及ぼす因子の探索. 2017年生命科学系学会合同年次大会(神戸市, 2017年12月)
- 42) 黒田誠 「進化し続けるシーケンシング技術と公衆衛生・感染症診断への利活用と将来展望」教育講演 日本獣医師会獣医学術学会(別府市 2018年2月)
- 43) 黒田誠 「次世代シーケンサーを用いた病原体診断」57回臨床検査・東海北陸支部会(金沢市 2018年3月)
- 44) 新井暢夫、関塚剛史、玉村雪乃、楠本正博、日根野谷淳、山崎伸二、岩田剛敏、黒田誠、内田郁夫、秋庭正人. 欧州に由来する *Salmonella enterica* ser. Typhimurium 非定型株の国内侵入後の小進化. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 45) 川端寛樹、関塚剛史、高野愛、黒田誠、佐藤梢、大西真. 比較ゲノム解析から推定されたボレリア属細菌の進化イベント. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 46) 瀧井猛将、御手洗聡、森重雄太、加藤健吾、山下明史、関塚剛史、大角晃弘、慶長直人、黒田誠、加藤誠也. 2007年に全国から収集した結核菌株の全ゲノム解析. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 47) 林美智子、鈴木里和、松井真里、関塚剛史、山下明史、加藤健吾、川村久美子、柴山恵吾、黒田誠. 大腸菌 ST131 H30R1 に順応した IncF[F1:A2:B20] プラスミドが blaCTX-M-14 の安定的保持に関与する. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 48) 伊藤環、関塚剛史、岸紀美、山下明史、加藤健吾、稲嶺由羽、黒田誠. 既存培地を用いた健常者便由来新種腸内細菌の分離および同定. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 49) 関塚剛史、大草敏史、黒田誠. 完全長ゲノム配列解析による潰瘍性大腸炎患者より分離された *Fusobacterium varium* Fv113-g1 株の特徴. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 50) 瀬川孝耶、関塚剛史、鈴木里和、山下明史、柴山恵吾、松井真理、黒田誠. カルバペネム感性大腸菌におけるプラスミド性転写調節因子 ArdK の blaIMP-6 発現抑制機序の解析. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- 51) 山下明史、岩本朋忠、関塚剛史、村瀬良朗、加藤健吾、瀧井猛将、御手洗聡、吉田志緒美、加藤誠也、黒田誠. TGS-TB に実装した結核菌薬剤耐性マーカーの in silico 検出ツールの感受性予測精度の検証. 第91回日本細菌学会総会(福岡市, 2018年3月)
- III. 学会等(財団等を含む)の学術賞受賞者
なし
- IV. 研究助成金等(財団等の競争的資金)獲得者
なし