

21. 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ならびに遺伝子治療に使うウイルスベクターに関する研究を行った。

HPV は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 生活環と感染における宿主応答・防御機構の詳細な解析を続けた。

HPV は 100 以上の遺伝子型に分類されており、そのうち 15 の型 (ハイリスク型) が子宮頸癌の原因となる。欧米で開発された第一世代 HPV ワクチンは、主キャプシド蛋白質 L1 をワクチン抗原にしており、ハイリスク型 HPV のうち 2 種の感染阻止に限定した予防効果を持つ。我々は、L2 にみられる型共通アミノ酸領域が、幅広い型に有効な中和抗体を誘導することを見出しており、この抗 L2 抗体の性状解析を進めた。

WHO は HPV の感染実態とワクチン導入による影響を把握するために、HPV ラボネットワークを構築している。第一室は西太平洋地域の拠点ラボに指定されており、我が国の HPV 遺伝子型分布の調査を行った。また Virus-like particle (VLP) を用いた新たな HPV16/18 抗体価測定系を確立した。

HPV ワクチンの承認前検査、生物学的製剤基準の策定、検定項目の選定、SLP 作成を担当した。また、これら HPV ワクチンの国家検定を担当した。

遺伝子治療は、マスコミの過熱報道が収まった後も着実に進歩し、先天性遺伝病の治療や末期癌患者の QOL の改善に成果を上げている。ウイルスの持つ高い感染性や標的臓器の特異性を利用するウイルスベクターが使われるが、いわば人工のウイルスを多量に、直接患者に投

与することになるので、安全の確保が重要となる。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。臨床応用が期待されるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの性能をインスレーター導入と骨格筋特異的な安定・高発現の改良型として向上させた。また、ベクター挿入変異による悪性腫瘍の発生が想定されることから、次世代シーケンサーを活用したベクター組込み部位の同定法の確立を試みた。

第二室では、バイオインフォマティクス技術と実験データ、臨床データを活用して、ウイルスの性質を解析する新しい研究戦略の開発を続けた。計算科学を駆使して、蛋白質・核酸の高次構造、酵素反応、分子間相互作用などを高精度で近似する技術が急速に進展している。この技術は、培養が困難な病原体や易変異性病原体の解析に役立つことから、ホモロジーモデリング法、分子動力学法、結合シミュレーション等の精度を検証し、抗ウイルス因子の機能、ウイルス蛋白質の構造特性、ウイルス酵素の反応機構、ウイルスの複製や免疫逃避、薬剤耐性機構などを予測する研究を進めた。これらの研究戦略を HIV が中和抗体から逃避する分子機構や薬剤耐性獲得機構の解析、ノロウイルスの分子疫学に役立てるとともに、さらに、新規抗ウイルス剤の設計に役立てる研究へと進展させている。サポウイルスプロテアーゼに基質が結合した複合体の分子モデルを構築し、プロテアーゼ活性阻害物質のスクリーニングから有効なリード化合物を見いだした。

2009-2011 シーズン富山県で見られたパンデミックインフルエンザ (H1N1) は、低ヘマグルチニン (HA) 価つまり赤血球凝集能が低く、阻害アッセイが困難であった。このシーズンの HA 遺伝子解析と構造解析の結果、HA 蛋白質の 197 番目のスレオニンのアラニンへのアミノ酸置換が HA 価の減少に影響していることが明らかになった。また、インフルエンザウイルス研究センターに協力し、分離株のシーケンシングと解析を担当した。

第三室は、次世代シーケンサーを使って、様々な感染症の研究を行っている。方法論からは、ゲノム解析と

メタゲノム解析の二つに大別できる。ゲノム解析においては、単一病原体の全ゲノム配列を解読して、その生物の全貌から感染症を理解することを目指す。一方、病原体が不明の場合に有効なのがメタゲノム解析であり、ここでは病原体と非病原体が混在する検体の核酸配列を網羅的に解読し、情報解析により病原体を同定することを目指す。

ゲノム解析としては、薬剤耐性が問題になっているNDM-1 陽性大腸菌やジフテリア類似新興感染症の *Corynebacterium ulcerans* の解析を行い、薬剤耐性遺伝子や毒素遺伝子の伝播様式を明らかにした。また食中毒を引き起こすナナホシクドアの解析により、検査系開発の基礎情報を得た。

メタゲノム解析が威力を発揮する分野の一つに、不明病原体の迅速同定がある。バイオテロ病原体を想定した事例として野兎病の同定と系統解析を行い、0111 食中毒事例において、患者便そのままの核酸解読による病原体同定を行った。一方で、メタゲノム解析は、感染症が疑われる難病の病因同定にも有効であり、その観点から潰瘍性大腸炎や川崎病の解析を行った。

ワクチンの品質管理業務として、HPV ワクチンの承認前検査、生物学的製剤基準の策定、検定項目の選定、SLP 作成を担当した。また、これら HPV ワクチンの国家検定を担当した。

業績

調査・研究

I. 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て行った。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、終元 巖)

2. インスレーターを用いた高発現 AAV ベクターの開発

(1) AAVS1 インスレーター機能の解析

ヒトゲノム上の AAVS1 インスレーター内の ZNF143 結合配列以外の機能配列の検索を行った。ZNF143 結合配列以外の部位に 20bp の塩基置換を導入した変異 AAVS1 インスレーターを作成し、それを搭載したルシフェラーゼ発現

AAV ベクターを作成した。これらの AAV ベクターを分化 C2C12 細胞に感染させルシフェラーゼ活性を測定したが、単独で有意な活性低下を示す変異配列は見つからなかった。ZNF143 単独で発現増強効果を示す可能性、あるいは ZNF143 同様に複数の結合配列が冗長に機能している可能性が考えられた。(竹内隆正)

(2) AAV ベクター組込み部位同定法の検討

遺伝子治療による重大な有害事象として挿入変異による悪性腫瘍の発生があり、AAV ベクターを用いた動物実験でも肝腫瘍発生の報告がある。次世代シーケンサーを活用した組込み部位同定法の予備実験を行った。AAV ベクターが組み込まれた HeLa 細胞クローンをモデル系として用いた。Nextera DNA Sample Prep Kit を用いた DNA の断片化およびアダプター配列の付加に続いて 3 回の PCR による増幅を行うことにより、片側を AAV ベクター内の配列に固定した次世代シーケンサーでの解読に適した増幅産物が得られた。(竹内隆正、関塚剛史)

II. HPV に関する研究

1. HPV の感染増殖機構の研究

(1) HPV 感染の初期過程に必要な宿主因子の解析

HPV キャプシドの副構成蛋白質 L2 は HPV 感染の初期過程で重要な役割を果たすことから、L2 に特異的に作用する宿主蛋白質を探索し、HPV 感染における役割を調べた。Transport protein particle complex subunit 8 (Trappc8) が同定され、siRNA により Trappc8 の発現が抑制された上皮細胞は、複数の型の HPV 偽ウイルスおよび authentic virion の感染に抵抗性を示した。Trappc8 は核、細胞質、細胞表面に局在し、細胞表面の Trappc8 のみが L2 と相互作用した。細胞表面の Trappc8 は HPV 偽ウイルス接種後速やかに増加した。HPV 偽ウイルスは Trappc8 の発現が抑制された細胞の表面に結合するが、侵入することは無かった。HPV は Trappc8 に依存したエンドサイトーシス機構を利用して、細胞内に侵入する可能性が示唆された。(石井克幸)

(2) 三次元培養表皮を用いた HPV 増殖系の確立

ヒト角化細胞に HPV ゲノムを導入し、三次元培養により分化誘導することで、HPV を産生する方法を確立した。loxP 配列に挟まれるようにベクターにクローニングした HPV16 または 58 ゲノムを、Cre 組換え酵素発現プラスミドとともに初代ヒト角化細胞にトランスフェクションし、Cre/loxP 組換えによりベクター配列が除かれ環状化

した HPV ゲノムをもつ角化細胞を作成した。これらの細胞を、コラーゲンと繊維芽細胞からなるマトリックス上で 20 日間三次元培養し、分化誘導した。分化層から HPV 粒子を抽出、精製した。HPV16 及び 58 とともに、約 10^6 個の細胞から約 10^7 genome copy のウイルスが得られた。HPV16 または 58 を接種した角化細胞株で、ウイルス初期遺伝子転写産物が RT-PCR により検出されたことから、これらのウイルスは感染性をもつことがわかった。HPV16 及び 58 の細胞への感染は、抗 HPV16L1 抗体及び抗 HPV58L1 抗体でそれぞれ中和された。三次元培養表皮を用いた HPV 増殖系は、HPV の増殖や中和機構の解析に有用である。(森 清一郎、中原知美[国立がん研究センター])

(3) チロシンキナーゼによる HPV DNA 複製の抑制

FLAG-E1 に結合してリン酸化するチロシンキナーゼとして前年度に同定した FRK (Fyn-related kinase) は上皮細胞に発現が見られる非受容体型チロシンキナーゼで、細胞質に存在する通常非受容体型チロシンキナーゼと異なり、核内に局在するというユニークな特徴をもつ。HPV 複製の場が核内であることから、細胞内でのリポータープラスミドの発現を指標にした HPV DNA 複製アッセイを用いて、FRK が HPV 複製に及ぼす効果を検討した。その結果、HEK 293 細胞および C33A 細胞において、FRK 発現により HPV DNA 複製の顕著な阻害が認められた。一方、FRK のキナーゼ活性を欠失させたアミノ酸変異体 K262R では、HEK 293 細胞での複製阻害は部分的に弱まったが、C33A 細胞では変わらず阻害が見られた。従って、FRK はそのキナーゼ活性を介さずに、E1 依存性の HPV 複製を阻害している可能性が示唆される。(松尾理加、終元 巖)

(4) HPV DNA 複製に対する PTEN の効果

FRK は癌抑制蛋白質である PTEN との結合およびリン酸化を介して、PTEN の細胞内での安定性を高めることが示されている。FRK による HPV DNA 複製抑制のメカニズムを調べるために、PTEN の強制発現が HPV DNA 複製に及ぼす効果を検討した。HEK293 細胞での HPV DNA 複製アッセイで、PTEN の過剰発現により HPV DNA 複製が抑制された。角化細胞の分化の際に PTEN 量が減少することから、PTEN が分化依存的な HPV 複製の制御に関わっている可能性が示唆された。(終元 巖、前濱朝彦[細胞化学部])

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 我が国の HPV 遺伝子型分布の調査

前年度に開始した我が国の女性に感染している HPV 遺伝子型の調査を継続して行った。NTT 東日本病院婦人科を受診した女性から子宮頸管部細胞を収集し、DNA を抽出して、PGMY リバースプロット法を用いて HPV タイピングを行った。細胞診陽性の 326 検体の内、HPV DNA 陽性は 307 検体 (94%)、その内の 30%から複数の HPV 型が同時に検出された。HPV DNA の検出率は ASC-US で 83% (49/59)、ASC-H で 91% (20/22)、LSIL で 97% (130/134)、HSIL で 99% (85/86) だった。HSIL で検出頻度が高いのは HPV16 (36%)、HPV52 (24%)、HPV58 (14%) であった。(近藤一成[NTT 東日本病院]、松尾理加、終元 巖)

(2) Virus-like particle (VLP) を用いた新たな HPV16/18 抗体価測定系の確立

HPV に対する血清抗体価の測定は、HPV の自然感染歴や HPV ワクチン接種の効果を検討する上で重要である。VLP を用いた、ELISA 法による簡便で信頼性の高い HPV16/18 抗体価測定系を確立した。HPV16 および 18 の L1/L2 キャプシド蛋白質を HEK293FT 細胞で発現させ、HPV16 および 18 の VLP を調製した。VLP を 96 穴プレートに固相化して、VLP-ELISA 法により血清サンプル中の HPV16/18 抗体価を測定した。VLP-ELISA 法で得られた抗体価は、HPV 偽ウイルスの細胞への感染阻害を調べる中和抗体測定系で得られた抗体価と高い相関を示した。本アッセイ系はハイスループット化が可能なことから、多検体での HPV 抗体の疫学調査が可能になる。今後は他の発癌性 HPV (HPV31, 33, 35, 51, 52, 58) の抗体価測定についても、VLP-ELISA 法を確立する。(森 清一郎、松尾理加、石井克幸、近藤一成[NTT 東日本病院]、終元 巖)

3. 交差性中和エпитープに対する抗 HPV-L2 抗体の解析

HPV のキャプシド蛋白質 L2 には、複数の交差性中和エピトープがあり、型共通のワクチン抗原として開発されている。抗 L2 抗体の各 HPV 型に対する中和活性は、これまで主に HPV 偽ウイルスを使用して調べられてきた。三次元培養表皮由来の HPV16、31、58 を用いて、抗 L2 抗体の中和活性を調べた。HPV を角化細胞株 (HaCaT) に接種し、ウイルス初期遺伝子の発現を RT-PCR で検出することで感染をモニターした。交差性エピトープを含む HPV16 L2 のアミノ酸 56 から 75 に対する抗血清、および同領域を認識するモノクローナル抗体は、HPV16、31、58 の感染を中和した。三次元培養表皮由来 HPV でも、抗 L2 抗体が複数の型に有効であることが確認された。(森 清一郎、神田忠仁[理化学研究所])

III. 病原性ウイルスのゲノム解析

1. ノロウイルス (NoV) のゲノム解析

2006年5月～2011年3月の間に全国20カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い、計382のNoV遺伝子型GII/4のゲノム全長の塩基配列を得た。2006年来、流行の主流となっている亜株 (GII.4 2006b) について、パンデミック発生時からの進化様式を解析した。BEAUti and BEAST を用いて、ベイズ推定に基づく分岐年代を推測した。2006bは、世界的流行がおきた2006年の2-3年前には存在し、2006/07パンデミック発生後1年以内に30以上のマイクロクレードに分岐したと推測された。パンデミック発生とともに感染者個々の体内環境に適応して、急速な適応放散がおきたと推察される。

(本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、岡智一郎[ウイルス二部]、片山和彦[ウイルス二部]、佐藤裕徳)

糞便試料の収集は以下の27名の方々の協力による(敬称略)。田中智之(堺市衛生研究所)、野田衛(国立医薬品食品衛生研究所)、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)、高橋朱実、蛇口哲夫、高橋知子(岩手県環境保健研究センター)、篠崎邦子(千葉県衛生研究所)、吉田徹也(長野県環境保全研究所)、田村務(新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則(富山県衛生研究所)、東方美保(福井県衛生環境研究センター)、小林慎一(愛知県衛生研究所)、内野清子(堺市衛生研究所)、入谷展弘(大阪市立環境科学研究所)、飯塚節子(島根県保健環境科学研究所)、福田伸治(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、阿部勝彦、伊藤文明(広島市衛生研究所生物科学部)、近藤玲子、山下育孝(愛媛県立衛生環境研究所)、増本久人、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)、岩切章(宮崎県衛生環境研究所)

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、病原体ゲノム情報のデータベース化を進めている。現在、病原体ゲノムデータベースには、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、プタ内在性レトロウイルス、サイトメガロウイルス、HIV-1の最新のゲノム情報が、自動更新システムにより蓄積されている。本年度は、昨年度同様引き続き、アノテーションの修正機能を用いて、病原体ゲノムデータベースに蓄積されているノロウイルスのゲノム情報のアノテーションを修正した。(横山勝、佐藤裕

徳)

3. 病原性ウイルスの中和に関わる領域の構造解析

HIV-1 gp120が抗V3抗体中和を逃避するしくみを理解するため、V1/V2ドメインを含む糖鎖付 HIV-1 gp120三量体分子モデルの構築を行い、gp120の抗V3抗体中和におけるV1/V2ドメインの影響を検討した。HIV-1 gp120三量体分子モデルより、V1/V2ループは、ウイルス粒子の最外殻に配置され、まるで傘のようにgp120を覆う。さらに、糖鎖がgp120外側ドメインおよびV1/V2ドメインにあるため、gp120はほぼ全体が糖鎖に覆われる。中和抵抗性株であるgp120三量体分子モデルは、同一のgp120内のV1/V2ドメインによるV3エピトープのマスクングを示唆していた。したがって、V1/V2ドメインとV3の相対的配置が、中和と逃避に重要な役割を果たしていると考えられる。

(横山勝、佐藤裕徳)

4. 病原性ウイルスの薬剤設計に関する構造解析

サポウイルスプロテアーゼに基質が結合した複合体の分子モデルを構築し、基質結合に関わるプロテアーゼのアミノ酸残基を予測した。この領域に結合するサポウイルスプロテアーゼ活性阻害物質のスクリーニングを行った。サポウイルスプロテアーゼの基質認識に重要な基質側の構造的特徴を持つ化合物を、化合物データベース(139369化合物)から151化合物を抽出した。これらの化合物を用いて、化合物存在下における³⁵S標識ORF1ポリプロテインの切断産物パターンをSDS-PAGEによって解析すると、3化合物に阻害効果が見られた

(横山勝、岡智一郎[ウイルス2部]、片山一彦[ウイルス2部]、小島宏建[東大創薬オープンイノベーションセンター]、岡部隆義[東大創薬オープンイノベーションセンター]、長野哲雄[東大創薬オープンイノベーションセンター]、佐藤裕徳)

5. 病原性ウイルスの性質変化に関わる領域の構造解析

(1)2010/11シーズンに急増した低HA価のA(H1N1)2009ウイルス分離株HAの構造解析

2009-2011シーズン富山県で見られたパンデミックインフルエンザ(H1N1)は、低ヘマグルチニン(HA)価を示し、赤血球凝集阻害アッセイが困難である。このウイルスは著しく2010年から2011年シーズンに増加した。遺伝子解析の結果、HA蛋白質の197番目のスレオニンのアラニンへのアミノ酸置換が低いHA価に影響していると考えられた。この変異の役割を理解するため、HA

蛋白質の構造解析を行った。その結果、A197T は HA1 の 190 ヘリックス近傍に位置していた。190 ヘリックスはレセプタ結合に関与することから、A197T は間接的にレセプタ結合に影響する可能性が示唆された。

(横山勝、小渕正次[富山衛研]、堀元栄詞[富山衛研]、小原真弓[富山衛研]、岩井雅恵[富山衛研]、滝澤剛則[富山衛研]、佐多徹太郎[富山衛研]、佐藤裕徳)

(2) GAG-Pol 前駆体切断に重要である HIV-1 逆転写酵素のアミノ酸残基の同定

HIV-1 GAG-Pol の効率的なプロセッシングは、プロテアーゼだけでなく、逆転写酵素 (RT) およびインテグラーゼによっても影響する。RT の Thr128 および Tyr146 の Ala への置換は著しく MA/CA、p66/p51 及び RT/IN のプロセッシングに影響を与え、これらの変異は *in vitro* での RT 二量体形成にも影響を与えた。この RT 二量体形成にも影響する理由を理解するため RT の構造解析を行った。その結果、T128 および Y146 は RT 二量体形成に関与する $\beta 7$ - $\beta 8$ ループの根元に位置し、この位置の変異は RT 二量体形成に影響すると考えられる。

(横山勝、西辻裕紀[千葉工大]、高久 洋[千葉工大]、佐藤裕徳)

IV. 薬剤耐性食中毒菌に係るゲノム配列レベルでの解析

ニューデリーメタロベクターラクタマーゼ (NDM-1)陽性大腸菌による感染症事例が、国内で発生した。本菌 (NDM-1_Dok01 株) の特徴を理解するために、全ゲノム解析を行った。本菌株は、multilocus sequence typing type: ST38 に属しており、IncA/C 型の 195.5 kb のプラスミドを有していた。本プラスミド(pNDM-1_Dok01)は、*bla*_{CMY-2} 遺伝子を有する IncA/C 型の大腸菌 AR060302 株および *Salmonella* Newport のプラスミドに類似していた。*bla*_{NDM-1} 遺伝子は、このプラスミド内に IS903 に挟まれた状態で存在しており、composite transposon を形成していた。近傍には *drfA12*, *aasA2*, *sul1* を有する class 1 integron 及び、*armA*, *mel* および *mph2* の薬剤耐性遺伝子が存在していた。*bla*_{NDM-1} を含む他の plasmid 配列との比較解析の結果、*bla*_{NDM-1} はそれぞれの plasmid 内に異なる形式で挿入されてきた事が明らかとなった。また、pNDM-1_Dok01 の NDM-1 composite transposon には、分子シャペロンである *groEL* および *groES* が存在していた。これら分子シャペロンの系統解析および GC 含量の比較解析の結果、NDM-1_Dok01 株の染色体上に存在する物とは異なる、 α -プロテオバクテリアの植物病原細菌 (*Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas*)に近い事が明ら

かとなった。本研究により、NDM-1 は、環境中に存在する細菌から composite transposon を介して水平伝播された事が示唆された。

(関塚剛史、黒田誠、竹内史比古、松井真理[細菌二部]、山根一和[細菌二部]、大西真[細菌第一部]、荒川宜親[名古屋大]、菱沼昭[獨協医大])

V. 新興感染症に係る病原細菌のゲノム解析

ジフテリア類似の症状を呈する *Corynebacterium ulcerans* による感染症が国内でも発生している。本菌の特徴を理解し、ジフテリア毒素がどのように獲得されたかを明らかにするため、*C. ulcerans* 0102 株の全ゲノム配列決定を行った。0102 株は、2,579,188 bp の環状染色体を持ち、plasmid は存在しなかった。近縁種である *C. pseudotuberculosis* FRC41 および *C. diphtheriae* NCTC 13129 株のゲノム比較解析の結果、synteny は同じであり、0102 株は FRC41 株と高い相同性を示した。染色体上には 3 つの prophage が存在し、そのうちの 1 つ (Φ CULC0102-I)にジフテリア毒素をコードする *tox* 遺伝子が存在した。 Φ CULC0102-I と *C. diphtheriae* NCTC 13129 株の *tox* を有する prophage およびその近傍領域の比較解析の結果、phage integrase および *tox* は塩基配列レベルで約 90%の相同性を有し、prophage の挿入位置は同様な位置であった。prophage 内に存在するファージ骨格に関連する遺伝子の構成は、2 者間で類似していたが、塩基配列の相同性は低く、異なる物であった。本研究により、ジフテリア症状を呈する *C. ulcerans* は、ジフテリア毒素を *C. diphtheriae* から phage を介して直接水平伝播で獲得したのではなく、異なる由来から毒素を獲得してきた事が示唆された。

(関塚剛史、黒田誠、竹内史比古、岩城正昭[細菌二部]、山本明彦[細菌二部]、見理 剛[細菌二部]、柴山恵吾[細菌二部]、小宮貴子[細菌二部]、高橋元秀[医薬品医療機器総合機構])

VI. 生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

ヒラメ生食による食中毒が近年増加しており、その多くでヒラメに寄生する粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* (ナナホシクドア) が検出されている。ナナホシクドアと食中毒の関連は疫学的には立証されているが、食中毒発症の生物学的機序は未解明である。ゲノム解読による生物の全遺伝子の一覧を作ることにより、食中毒の作用機序と関連因子の探索するうえの基盤情報となる。

ナナホシクドアにはミトコンドリアゲノムと核ゲノムがあり、本年度はミトコンドリアゲノムを解読した。食

中毒の作用機序を理解することと同時に、検査システムの充実には核ゲノムおよびミトコンドリア・ゲノム情報は欠かせない。ナナホシクダアの全ミトコンドリア・ゲノム配列を解読した結果、最も近縁の真核生物と比べてゲノム退化していることが示唆され、5つのタンパク遺伝子と2つのリボソームRNA遺伝子しかなかった。*Kudoa*属は形態的にはクラゲなどの刺胞動物に類すると想定されていたが、ミトコンドリア遺伝子配列による系統解析を行ったところ、ナナホシクダアはより高等な生物である左右相称動物に分類されるべき系統関係であることが分かった。

本年度の成果の応用として、解読したミトコンドリア遺伝子を標的にしたナナホシクダアの高感度かつ高精度の検出系開発のための基盤情報を得ることができた。ミトコンドリアゲノムは細胞中に大量に存在するため、18S-rRNAなどの核ゲノムを対象とした検査系よりも高感度なPCR検出が可能である。また、ミトコンドリア・ゲノムの変異導入率が高いことから、18S-rRNAよりも明確な*Kudoa*属の分類法を確立することが可能だと思われる。他種のミトコンドリア遺伝子を同定して比較することにより、食中毒に起因する種のみを検出系も開発できると考えている。

(竹内史比古、関塚剛史、黒田誠、野崎智義[寄生動物部]、大西真[細菌第一部]、小西良子[国立医薬品食品衛生研究所]、大西貴弘[国立医薬品食品衛生研究所])

VII. バイオテロ・新興感染症対策としての超高速ゲノム解読システムの構築

バイオテロ・新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。これまでに、*Bacillus anthracis*炭疽菌のゲノム解読、株系統解析法開発とゲノムワイドなキノロン耐性領域の探索、WHO指定バイオテロ病原体である*Yersinia pestis*ペスト菌、*Francisella tularensis*野兔病菌、*Burkholderia pseudomallei*類鼻疽菌のゲノム情報解析を行ってきた。本年度では、患者病巣を用いて網羅配列解読を行い、病原体の検出のみならず、病原体の系統関係および病原性の評価も行った。野兔病感染症を発症した一人の患者の生検組織標本(膿瘍)から得られた核酸を、次世代シーケンサーを用いて病原体およびヒトゲノム配列を含む核酸配列を網羅的に解読した。得られた38,285,502本の配列中に、833の細菌由来の配列が存在していた。これら配列は、全て*F. tularensis*由来の物であった。得られた配列を用いて、検体中に含まれていた*F.*

*tularensis*のSNPを用いた系統解析を行ったところ、66箇所のSNP系統解析に使用可能な配列が抽出され、弱毒型の*F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*, Type B)に属するものであった。海外から持ち込まれた強毒型の*F. tularensis* subsp. *tularensis*ではなく、日本に土着している弱毒型の野兔病菌による感染事例である事が明らかとなった。

(黒田誠、関塚剛史、竹内史比古、菅野隆行[感染病理部]、佐多徹太郎[富山県衛生研究所]、浅野重之[いわき市立総合警城共立病院]、新谷史明[いわき市立総合警城共立病院])

VIII. 集団食中毒事例に係る病原細菌のゲノム解析および腸内細菌叢のメタゲノム解析

2011年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌(EHEC)血清型O111を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、過去に分離されたO111菌株も含めた、ゲノム配列情報による系統解析と比較解析を行った。本事例の大腸菌分離株は、O111血清型の系統であることがゲノム配列を用いたSNP解析によっても明らかとなった。また、本事例分離菌3株は、分離地域およびベロ毒素(verotoxin: VT)2を有するファージ(VT2ファージ)の有無に関わらず同一クローン由来であり、本事例以前に分離された他のO111分離株とは同一ではなかった。VT2ファージとそのゲノム挿入部位の比較解析の結果、溶血性尿毒症候群(HUS)発症株3株のVT2ファージはO157 clade8のVT2ファージに類似性が認められたが、同一ではなかった。本事例分離菌株は3つのプラスミドを有し、それら完全長配列を決定したが、既知の病原因子の存在は見いだせなかった。また、本事例の患者糞便検体中の実態を調べるため、患者糞便中のDNAを網羅配列解読にて解析した。供試した全患者検体は、非常に類似した細菌叢を構成していた。血清型と相関する遺伝情報を用いた系統解析の結果、本食中毒事例は大多数の血清型O111の大腸菌による事例であることを示唆していた。さらに、本事例はO111とO157の両方が分離されているが、患者糞便中の存在比率を定量的に解析したところ、O111が圧倒的にO157よりも多く、主にO111による事例であることが示唆された。

(関塚剛史、黒田誠、竹内史比古、大西真[細菌第一部]、綿引正則[富山県衛生研究所]、磯部順子[富山県衛生研究所]、佐多徹太郎[富山県衛生研究所])

IX. 難治性腸疾患患者の腸内細菌フローラの網羅解析

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個々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/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。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と関連するのかは不明である。本研究では、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で 16S rRNA 遺伝子を用いた網羅解析およびメタゲノム解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行なった。治療前、治療一ヶ月後および三ヶ月後の腸内フローラの比較解析を行ったところ、治療後に減少する細菌の候補が幾つか認められた。*Bifidobacterium* 属細菌が治療後に増加しており、抗菌剤治療により UC 患者の腸内環境が改善している事が示唆された。

(関塚剛史、黒田誠)

X. 感染症の関与が疑われる難治性疾患の病原体検索・解析

難治性疾患として登録される所謂“難病”は未だその病因論 (etiology) が確立していない。その一つに川崎病が挙げられ、小児 (主に6ヶ月~5歳) の200人に1人が川崎病に罹患する。川崎病は小児の急性発熱性疾患のひとつで、その本態は急性全身性血管炎である。

感染症が病態増悪に関与しているかどうか検討するため、次世代シーケンサーによる網羅配列解読で病原体候補を検索した。はじめに、川崎病患者の血清・咽頭ぬぐい液から共通する病原体候補の探索を試みたが、患者ごとの病歴・治療歴等が影響しているためか、特定の共通因子を見出すことができなかった。患者ごとの固有因子も否定出来ないため、グロブリン治療前後の血清を網羅配列解読し、急性期と回復期における差異を指標にして病原体候補を探索した。免疫グロブリン治療により *Streptococcus* 属の減少傾向が顕著に見られた。*Streptococcus* 属にはスーパー抗原を産生する A 群溶血性レンサ球菌 *S. pyogenes* が知られており、その関与が疑われて久しいが、患者の血液培養等の培養検査では全て陰性であるため、他の *Streptococcus species* を念頭において総合的に解釈する必要があり、現在、川崎病に関連する *Streptococcus species* の分離培養を行っている。

(黒田 誠、関塚剛史、絹巻暁子「東京大」、片野晴隆[感染病理部])

XI. 呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの引き起こす重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。本研究は、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体 (各種臓器・組織検体) から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログ作製を目的としている。山形県で小流行した呼吸器感染症の疑いのある不明病検体 (咽頭・便検体) の網羅配列解読の結果、Human parechovirus (HPeV) の塩基配列を検出し、HPeV 全長配列の決定により HPeV-3 型のウイルス感染の疑いがあることを明らかにした。HPeV-3 の VP1 配列に対する特異プライマーを用いて RT-PCR 検査したところ、他便検体から6検体の陽性バンドを確認し、他咽頭・髄液検体からは検出されなかった。不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することができた。多種多様に変異導入する RNA ウイルス全てを検出するためには次世代シーケンサーによる検出・鑑別法は有用と考えられる。手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適応されると想定されるため、将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れて広範な感染症対策に貢献するシステムを構築していきたい。

(関塚剛史、黒田 誠、木村博一[感染症情報センター]、水田克己[山形衛研])

XII 所内ゲノムプロジェクト

H22, 23 年度に渡り、所内の連携強化のためのゲノムプロジェクト7課題を遂行中である。

- C型肝炎ウイルスゲノムの quasispecies 解析 (ウイルス第二部 脇田隆字)
- 淋菌の Panmictic population と耐性化機構との関連-セフトリアキソン耐性淋菌のゲノム解析- (細菌第一部 大西真)
- 高病原性の新型クリプトコックスのゲノム情報解析 (生物活性物質部 宮崎義継)
- ゲノム・EST 解析による原虫病原機構の解明 (寄生動物部 津久井久美子)
- High through-put のシーケンサーによる病理組織検体を用いた未知、あるいは、既知の病原体遺伝子の検出とウイルス感染症の病態の解明 (感染病理部 片野晴隆)
- サルエイズモデルにおける MHC 遺伝子型別ウイルスゲノム変異およびプロウイルス挿入部位の解析

(エイズ研究センター 竹村太地郎)

- 比較ゲノムによるらい菌の増殖能・病原性に関する遺伝子解析 (感染制御部 甲斐雅規)

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)の様式を作成し、審査試行を開始した。(竹内隆正、石井克幸、森 清一郎、柗元 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 Regional Reference Laboratory としての活動を行った。HPV ラボネットが主催する HPV DNA proficiency panel に参加し、十分な能力を持つ HPV ラボとして認定を受けた。また HPV18 抗体国際標準品の collaborative study に参加し、VLP-ELISA による抗体価データを WHO に返した。(柗元 巖、森 清一郎、近藤一成 [NTT 東日本病院]、川名 敬 [東京大学医学部産婦人科教室])

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Murakami, I., Takeuchi, T., Mori-Uchino, M., Mori, S., Fujii, T., Aoki, D., Nakagawa, K., and Kanda, T. An adeno-associated virus vector efficiently and specifically transduces mouse skeletal muscle. *Mol Biotechnol.* 49(1):1-10, 2011.
- 2) Enomoto, T., Kukimoto, I., Kawano, M. A., Yamaguchi, Y., Berk, A. J., and Handa, H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. *Virology.* 420:1-9, 2011.
- 3) Kitamura-Muramatsu, Y., Kusumoto-Matsuo, R., Kondo, K., Mori, S., Saito, S., Tsukahara, Y., and Kukimoto, I. Novel multiplexed genotyping of human papillomavirus using a veracode-allele specific primer extension method. *Microbiol Immunol.* 56: 128-133, 2012.
- 4) Ode H, Yokoyama M, Kanda T, Sato H. Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. *J. Mol. Model.*, 17:391-9, 2011.
- 5) SahBandar IN, Takahashi K, Motomura K, Djoerban Z, Firmansyah I, Kitamura K, Sato H, Pohan HT, Sato S. The Indonesian variants of CRF33_01B: Near-full length sequence analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 27:97-102, 2011.
- 6) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-45, 2011.
- 7) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 90:33-41, 2011.
- 8) Yoshii H, Kamiyama H, Goto K, Oishi K, Katunuma N, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One.* 6(4):e19352, 2011.
- 9) Miyamoto T, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Nakayama E. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α . *PLoS One* 6(7):e22779, 2011.
- 10) Takanashi S, Chen N, Shen Q, Jung K, Zhang Z, Yokoyama M, Lindesmith L, Wang Q, Saif LJ. Characterization of the emerging GII.g/GII.12 norovirus from a gastroenteritis outbreak in US in 2010. *J. Clin. Microbiol.*, 49:3234-44, 2011.
- 11) Obuchi M, Yokoyama M, Horimoto E, Obara M, Iwai M, Sato H, Sata T, Takizawa T. Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009-2011 influenza seasons. *Jpn J Infect Dis.* 64:448-50, 2011.
- 12) Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 585:3372-7, 2011.
- 13) Kamiyama H, Kubo Y, Sato H, Yamamoto N,

- Fukuda T, Ishibashi F, Iwao M. Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin α 20-sulfate analogues. *Bioorg Med Chem*. 19:7541-50, 2011.
- 14) Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzu P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S. The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS One*. 6(11):e27696, 2011.
- 15) Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. Complete sequencing of the *bla*_{NDM-1}-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One*. 2011;6(9):e25334. Epub 2011 Sep 23. PubMed PMID: 21966500; PubMed Central PMCID: PMC3179503.
- 16) Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep;55(9):4114-21. Epub 2011 Jun 27. PubMed PMID: 21709089; PubMed Central PMCID: PMC3165313.
- 17) Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Mar;77(5):1572-80. Epub 2011 Jan 14. PubMed PMID: 21239559; PubMed Central PMCID: PMC3067281.
- 18) Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K, Takahashi M, Kuroda M, Iwaki M. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiol*. 2012 May 14;12(1):72. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22583953.
- 19) Kuroda M, Sekizuka T, Shinya F, Takeuchi F, Kanno T, Sata T, Asano S. Detection of a possible bioterrorism agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen by use of next-generation direct DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1810-2. Epub 2012 Feb 15. PubMed PMID: 22337979; PubMed Central PMCID: PMC3347159.
- 20) Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(8):1046-52. Epub 2012 Jan 26. PubMed PMID: 22281845.

2. 和文発表

- 1) 森清一郎、神田忠仁 “ヒトパピローマウイルス (HPV) のタイピング” SRL 宝函、32: 51-54、2011.
- 2) 横山 勝. ゲノミクス、計算科学、実験科学の手法に基づく HIV の中和抗体逃避機構の研究. ウイルス、61:49-58、2011.
- 3) 大出裕高. パイオインフォマティクスに基づく HIV-1 の薬剤耐性研究. ウイルス、61:35-48、2011.
- 4) 岸田典子, 高下恵美, 藤崎誠一郎, 徐 紅, 伊東玲子, 土井輝子, 江島美穂 金 南希, 菅原裕美, 佐藤 彩, 今井正樹, 小田切孝人, 田代真人, 本村和嗣, 横山 勝, 終元 巖, 佐藤裕徳, 小口晃央, 山崎秀司, 藤田信之, 地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ. 2010/11 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原体微生物情報 (IASR), 32:317-323, 2011.
- 5) 黒田誠 医学のあゆみ Vol.236 No.6 2011 次世代シーケンサーで変わる臨床ゲノム学 “変貌する感染症研究”
- 6) 黒田誠 化学療法の領域 9月号 Vol.27 No.9 2011. 「超高速シーケンサーによる病原体検索」

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Enomoto, T., Yamaguchi, Y., Kukimoto, I., Berk, A. J., and Handa, H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. ICGEB DNA Tumour Virus Meeting (2011年7月、トリエステ)
- 2) Kukimoto, I. Genotyping of HPV DNA in Japanese women with abnormal cervical cytology using PGMY-Lineblot assay. 27th International Papillomavirus

- Conference (2011年9月、ベルリン)
- 3) Mori, S., Nakao, S., Kondo, K., Yoshikawa, H., and Kanda, T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in HPV16 L2 aa56-75 region. 27th International Papillomavirus Conference (2011年9月、ベルリン)
 - 4) Sakuragii J, Ode H, i Sakuragi S, Shioda T, and Sato H. A proposal of new structural model of HIV-1 DLS. 8th International Retroviral NC Symposium, Sep 18-21. 2011, Barcelona, Spain.
 - 5) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto S, Ebina H, Strebel K, Sato H, and Koyanagi Y. Mutagenesis and molecular modeling studies reveal structural insights into human tetherin recognition by HIV-1 vpu. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb 27-Mar 2. 2011.
 - 6) Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, and Sato H. V3 region-regulated conformations of HIV-1 gp120 outer domain bring insights into structural mechanisms of immune evasion. XV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 7) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Kanda T, Sato H. Structural features for the substrate recognition by sapovirus 3C-like protease. XV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 8) Motomura K, Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H. Structural dynamics of norovirus GII/4 genome in nature. XV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 9) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda Sato H, and Nakayama EE. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α . CAXV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 10) Izumi T, Io K, Yokoyama M, Shinohara M, Shirakawa K, Matsui M, Uchiyama T, Sato H, Sindo K, and Takaori-kondo A Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. XV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 11) Kamiyama H, Kubo Y, Sato H, Yamamoto N, Fukuda T, and Iwao M. Structure-activity relationship of anti-HIV-1 compound, lamellarin sulfates. XV International Congress of Virology (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.
 - 12) Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka. Characterization of Quasispecies of Pandemic 2009 Influenza A Virus (A/H1N1/2009) by *de novo* Sequencing using a Next-generation DNA Sequencer. 111th American Society for Microbiology (2011年5月)
 - 13) Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda. A Comprehensive And Quantitative 16S rDNA Deep-sequencing Analysis For Microbial Flora Using Next-generation Sequencer. 111th American Society for Microbiology (2011年5月)
 - 14) M. KURODA1, M. IZUMIYA 1, T. SEKIZUKA 1, M. TAGUCHI 2, H. WATANABE 1, M. OHNISHI. IsI-mediated Horizontal Acquisition Of Multiple Antibiotics Resistance In *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 17-21 September 2011, Chicago USA.
 - 15) Makoto Kuroda, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Masumi Taguchi, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. IUMS 2011 (2011年9月)
 - 16) Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda. A comprehensive and quantitative 16S ribosomal DNA deep-sequencing analysis for microbiota using next-generation sequencer. IUMS 2011 (2011年9月)
 - 17) Shizunobu Igimi, Akiko Ishiwa, Shuko Monden, Yumiko Okada, Hiroshi Asakura, Tetsuo Asai, Akemi Kai, Masumi Taguchi, Yoshikazu Ishii, Makoto Kuroda and Haruo Watanabe. Antimicrobial Susceptibility Profiles and PFGE Typing of *Campylobacter jejuni* Isolated from Various Sources in Japan. Vancouver August 28 - September 1, 2011. the 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms.
 - 18) Makoto Kuroda, Yoshimichi Hamada, Seiichi Sato, Kunihiro Oba, Harutaka Katano, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Masaaki Mori, Masaru Terai, Tetsuya Mizutani. The 10th International Kawasaki Disease Symposium 第

10回国際川崎病シンポジウム (京都市 2012年2月7-9日)

- 19) Akiko Kinumaki, Tsuyoshi Sekizuka, Masaru Takamizawa, Takashi Igarashi, Makoto Kuroda.
Longitudinal analysis of gut flora in Kawasaki disease patients using next generation DNA sequencing
The 10th International Kawasaki Disease Symposium 第10回国際川崎病シンポジウム (京都市 2012年2月7-9日)

2. 国内学会

- 1) 柊元 巖、近藤一成、森 清一郎、石井克幸、竹内隆正、神田忠仁：本邦における細胞診陽性検体のPGMYラインプロット法による解析：HPV検出頻度と遺伝子型、第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月、名古屋)
- 2) 中尾砂理、森 清一郎、近藤一成、吉川裕之、神田忠仁：HPV16副キャプシドタンパク質L2の交叉性中和エピトープを認識するモノクローナル抗体の分離と解析、第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月、名古屋)
- 3) 柊元 巖：HPV侵入・複製の新規メカニズム、「感染・免疫・炎症・発癌」北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会 (2011年12月、札幌)
- 4) 佐藤裕徳、病原性ウイルス研究と計算科学、MOEフォーラム2011、7月13日、2011年、東京。
- 5) 佐藤 裕徳、本村 和嗣、大出 裕高、横山 勝。In vivo directed evolution of HIV-1 through immune escape (免疫逃避を介しての生体内指向進化)：日本蛋白質科学会 ワークショップ「分子認識・ネットワーク解析の新たなキーワードとしての分子共進化」6月7-9日、2011年、大阪。
- 6) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆宇、片山和彦：カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月7-10日 (火-金)、神戸。
- 7) 松永智子、澤崎達也、小島良績、森下了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦互、梁明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたXenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析。日本プロテオーム学会2011年大会、7月28-29日、2011年、新潟。
- 8) 小渕正次、堀元栄詞、小原真弓、岩井雅恵、滝澤剛則、横山勝、佐藤裕徳、佐多徹太郎。2010/11シーズンに急増した低HA価のA(H1N1)2009ウイルス分離株について。第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2011年6月2日(木)-4日(土)、2011年、富山。
- 9) 佐藤裕徳：ヒト免疫不全ウイルスの免疫逃避と進化を司る構造基盤。ハイテクリサーチセンター 公開セミナー、明治薬科大学、9月5日、2011年、東京。
- 10) 岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、佐藤彩、田代真人、小田切孝人：インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性をもとに評価した2010/11シーズンA/H3およびB型ワクチンの効果。第15回日本ワクチン学会学術集会。12月10-11、2011年、東京。
- 11) 櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳：HIV-1ゲノム二量体化シグナルの新規構造モデル。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2011年11月30-12月2日(水-金)、東京。
- 12) 大出裕高、本村和嗣、横山勝、瀧永博之、佐藤裕徳：Roche-454 genome sequencer FLX TitaniumによるHIV準種解析系の構築。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2011年11月30-12月2日(水-金)、東京。
- 13) 久保嘉直、神山陽香、鹿子木桂、田中勇悦、林日出喜、松山俊、佐藤裕徳、山本直樹：エンドソームに局在する宿主自然免疫因子によるHIV-1増殖抑制。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2011年11月30-12月2日(水-金)、東京。
- 14) 佐藤裕徳：病原体ゲノム解析研究センターとHIV/AIDS研究。HIVカンファレンス、名古屋医療センター、2011年12月13日、名古屋。
- 15) 高野 愛、関塚剛史、黒田誠、杉森千恵子、大西真、川端寛樹。マダニ媒介性の新型ボレリア *Borrelia turcica* の比較ゲノム解析。第63回日本衛生動物学会 (新宿区 2011年4月)
- 16) 関塚剛史、黒田誠。動物腸管内の原生動物に内在する細菌と細菌叢と原生動物叢の共生関係。第80回日本寄生虫学会 (港区 2011年7月)
- 17) 片野晴隆、坂本康太、関塚剛史、黒田誠。KSHVがコードしている16 baseのunusual small RNAの発現。第8回EBウイルス研究会 (大阪市 2011年7月)

- 18) 関塚剛史。腸炎起病性菌のゲノム解析の現状と今後の展望。第4回日本カンピロバクター研究会(相模原市 2011年12月)
- 19) 朝倉宏、江川智哉、関塚剛史、黒田誠、五十君静信。 *Campylobacter jejuni* 国内分離株の遺伝学的多様性。第4回日本カンピロバクター研究会(相模原市 2011年12月)
- 20) 関塚剛史、松井真理、山根一和、竹内史比古、大西真、荒川宜親、黒田誠。国内初のNDM-1陽性大腸菌ST38分離株の *bla_{NDM-1}* 陽性 IncA/C プラスミドの完全長配列と植物病原細菌との関連性。第85回日本細菌学会(長崎市 2012年3月)
- 21) 黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing法による野兔病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索。第85回日本細菌学会(長崎市 2012年3月)
- 22) 黒田誠 Deep sequencingで得られた解読リードの各種解析法。第85回日本細菌学会(長崎市 2012年3月)
- 23) 佐藤法仁、阿戸学、松村隆之、本田尚子、山崎利雄、関塚剛史、黒田誠、中山真彰、土田耕三、小林和夫、大原直也。Streptomycin依存性結核菌における遺伝子変異の解明とStreptomycin耐性をもたらす新たな遺伝子変異 第64回日本細菌学会・中国四国支部会(岡山市 2011年10月22-23日)
- 24) 大西真、黒田誠 網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索 第16回日本神経感染症学会(東京都千代田区 2011年11月4-5日)
- 25) 佐藤法仁、阿戸学、松村隆之、本田尚子、山崎利雄、関塚剛史、黒田誠、中山真彰、土田耕三、小林和夫、大原直也 Analysis of the 16S rRNA gene of the streptomycin-dependent *Mycobacterium tuberculosis* strain18b and phenotypic revertant strains. 第34回分子生物学会年会(横浜市 2011年12月13-16日)
- 26) Hoshino Y, Kai M, Nakanaga K, Nakata N, Sekizuka T, Kuroda M, and Makino M. Whole genome sequence of *Mycobacterium massiliense* 日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会 第46回日米合同会議(大宮市 2011年7月20-22日)
- 27) Francis Shahada、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、大石大樹、松本敦子、岡崎ひづる、田中聖、内田郁夫、泉谷秀昌、渡邊治雄、玉村雪乃、岩田剛敏、秋庭正人 多剤耐性ゲノミックアイランドを保有するセファロスポリン耐性 *Salmonella Typhimurium* の出現 第152回日本獣医学学会(大阪府立大学 2011年9月19-21日)
- 28) 黒田誠、関塚剛史、片野晴隆、絹巻暁子、佐藤誠一、大場邦弘、浜田洋通、寺井勝、緒方昌平、森雅亮、水谷哲也 次世代シーケンサーによる川崎病の病原体候補の探索 第31回日本川崎病学会(横浜 2011年9月30日-10月1日)
- 29) 大場邦弘、絹巻暁子、水谷哲也、黒田誠、上村茂川崎病診断時における血清免疫グロブリンの検討 第31回日本川崎病学会(横浜 2011年9月30日-10月1日)
- 30) 絹巻暁子、高見沢勝、五十嵐隆、黒田誠 川崎病患児における細菌叢の経時的変動解析 第31回日本川崎病学会(横浜 2011年9月30日-10月1日)
- 31) 大槻紀之、關文緒、酒井宏治、Watanyoo Pratakpiriya、伊藤由梨、福原秀雄、前仲勝実、黒田誠、山口良二、竹田誠 野外分離イヌジステンパーウイルスはイヌおよびヒト nectin4 を受容体として利用できるが、麻疹ウイルスと異なりヒト上皮細胞では増殖できない マイナス鎖 RNA ウイルス研究会(長崎 2012年1月20-22日)
- 32) 黒田誠 新下痢原性寄生虫クドアの発見 第81回日本寄生虫学会(西宮市 2012年3月23-24日)