

## 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 ワクチンの承認前検査、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 28 年度は、(i) *in silico* 立体構造・分子間相互作用解析の精度向上、(iii) 連携基盤強化の 2 点を主目的として、特に分子動力学計算を取り入れた基盤的研究を感染研内外の研究グループ

と共同で推進した。

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、これまで当センター第三室で作成した解析パイプラインとの連携を行った。これにより、新規薬剤耐性遺伝子の迅速検出が可能となった。また、コレラ菌、薬剤耐性菌、ブドウ球菌属細菌、脳膿瘍形成に関わる連鎖球菌等のゲノム・プラスミド比較解析、ゲノム分子疫学解析、時系列分子系統解析を遂行した。感染症が疑われる難病も不明症例の一つでもあり、その観点から潰瘍性大腸炎の臨床検体から病態に関連する微生物因子の探索・解析を行った。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、細菌学・培地学・検査学を統合した研究の展開も開始した。

### 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) 感染時に HPV 粒子に近接する細胞表面蛋白質の解析

HPV の細胞侵入機構を解明するため、HPV 粒子に近接する細胞表面蛋白質を、HPV キャプシド抗体/POD 標識二次

抗体を介してビオチン標識し、アビジンカラムで回収して同定することを試みた。質量分析による回収蛋白質の網羅解析に先行して、ウェスタンブロットによる解析を行った。HPV の細胞内侵入に関わると報告のある蛋白質のうち、EGFR が効果的にビオチン化されることがわかった。HPV は EGFR に近接する細胞表面領域から内部に侵入する可能性が示唆された。(石井克幸)

#### (2) HPV 感染初期過程における細胞内防御機構の解析

HeLa 細胞は HPV 粒子侵入時にオートファジーを誘導しこれを排除することが知られている。そこで HPV の宿主細胞の一つである HaCaT 細胞で同様の実験を行って、オートファジー誘導を検討した。その結果、HeLa 細胞とは異なり、HPV 粒子と LC3 の細胞内共局在や、ATG7 や PIK3C3 ノックダウンによる感染性の上昇は観測されなかった。(石井克幸)

#### (3) HPV 複製蛋白質 E1 の細胞内レベル制御機構の解明

これまでに細胞内 E1 レベルへの各種阻害剤の効果を調べる中で、ポリ ADP リボースポリメラーゼであるタンキレース (TNKS1/2) の阻害剤 XAV939 の処理により、293 細胞で E1 レベルが上昇することを見出している。そこでその作用点を明らかにするために、XAV939 の標的蛋白質である TNKS1/2 もしくは PARP1 を siRNA ノックダウンして、E1 レベルに対する XAV939 の効果を検討した。その結果、TNKS1/2 ノックダウンでは XAV939 の効果に変化は認められなかった。一方、PARP1 のノックダウンにより、E1 レベル上昇効果が部分的に低下することが分かり、XAV939 の作用点として PARP1 が示唆された。PARP1 が細胞内 E1 レベルを負に制御している可能性が考えられる。(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 検出と型同定を継続的に行った。2012-2016 年の結果を集計したところ、CIN2 (462 検体) では HPV16 (32.0%)、HPV52 (31.8%)、HPV58 (20.1%)、CIN3 (380 検体) では HPV16 (49.5%)、HPV52 (23.9%)、HPV58 (13.2%)、子宮頸癌 (扁平上皮癌) (168 検体) では HPV16 (61.3%)、HPV18 (11.9%)、HPV52 (8.9%) 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[慶應大学病院])

#### (2) HPV52/58 の全ゲノム配列解析

HPV52 と HPV58 は日本を含む東アジア地域で感染者が多い HPV 遺伝子型である。そこで日本人女性の子宮頸癌及び CIN 病変に検出される HPV52/58 の全ゲノム配列を決定し、その配列多様性を解析した。臨床検体から抽出した DNA から PCR にて HPV52 (52 検体) と HPV58 (48 検体) の全ゲノム領域を増幅し、Nextera XT kit (イルミナ) を用いて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。その結果、HPV52/58 のバリエーション分布は、HPV52 で lineage B (50/52 検体)、HPV58 で lineage A (47/48 検体) に著しく偏っていた。また HPV52/58 間で、異なるウイルス遺伝子産物内にアミノ酸残基の多様性が観察された。(天神林友梨、廣瀬佑輔、中村浩美、終元 巖、岩田 卓[慶應大学病院]、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. 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

子宮頸癌を含む種々の癌で、細胞の DNA/RNA 改編酵素 APOBEC3B (A3B) の高発現が認められ、APOBEC に特徴的な変異が癌ゲノムに蓄積していることから、発癌における変異原として A3B が注目されている。これまでに、HPV の癌蛋白質 E6 が細胞転写因子 TEAD の発現を誘導することにより、A3B 遺伝子の発現を活性化することを見出している。今年度はその分子機構の詳細を調べ、TEAD が A3B 遺伝子プロモーターの MCAT motif 及び 2ヶ所の MCAT 様配列に結合することにより、転写を活性化することがわかった。また、HPV16 だけでなく HPV18 感染細胞でも TEAD と A3B の発現上昇が認められたことから、E6 による TEAD を介した A3B 遺伝子発現誘導は、発癌性 HPV に共通する現象と考えられた。TEAD の高発現は種々の癌で認められ、癌細胞の浸潤等に関与することが報告されていることから、発癌における E6 の新たな機能として重要である。(森清一郎、終元 巖)

#### (2) 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、前駆病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (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。そこで A3B と

TEAD の発現レベルと病態進行の関連を調べる目的で、約 50 症例の CIN1/2 病変について A3B と TEAD mRNA の発現を定量的 RT-PCR で調べた。A3B と TEAD の発現レベルに相関があり、症例間でこれらの発現レベルに差が認められた。今後さらに症例数を増やし、CIN 病変での A3B/TEAD の発現レベルが発癌のバイオマーカーと成り得るか調べる。(森 清一郎、終元 巖、田口 歩[都立駒込病院]、川名 敬[日本大学])

#### (3) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノムの多様性解析

患者体内での HPV ゲノム配列の多様性を次世代シーケンサーで解析することを目的に、CIN および子宮頸癌患者から子宮頸部擦過細胞を採取した。筑波大学病院を受診する患者から、これまでに 130 検体を収集し、DNA 抽出、HPV ジェノタイプングの後、HPV16/52/58 陽性の検体から long PCR にて全長 HPV ゲノムを増幅した。得られた PCR 産物を Nextera XT kit を用い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%以上の頻度で多様性を示すゲノム配列部位が多数見出された。その大部分が C to T または G to A 置換変異であったことから、APOBEC3 蛋白質の関与が示唆された。(廣瀬佑輔、天神林友梨、中村浩美、終元 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

日本人の子宮頸癌及び CIN 病変での 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解析系の確立を試みた。ハイブリダイゼーションにて HPV と細胞 DNA の融合 DNA をキャプチャーするため、29 種類の遺伝子型の HPV 配列を含むビオチン化 HPV DNA ライブラリーのデザイン・合成を行った。さらに培養細胞及び子宮頸癌の臨床検体を用いて、キャプチャーと配列解読の予備検討を実施した。(天神林友梨、廣瀬佑輔、終元 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) ベクターを用いて抗 HPV 交叉性中和抗体を生体内で安定して発現させることにより、幅広い型の HPV 感染を防ぐことを目的とした受動免疫ワクチンの開発を行った。マウス由来の抗 HPV 交叉性中和モノクローナル抗体をもとに作製したマウス/ヒトキメ

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 倍上昇していた。このキメラ抗体を発現する AAV ベクターを作成し、マウス骨格筋に接種した。接種後 1 年以上にわたって血清中にキメラ抗体が検出され、HPV16/18/58 に対する感染防御が認められた。今後、キメラ抗体で中和活性が上昇した原因を明らかにし、より有効な HPV 中和抗体発現ベクターの開発を目指す。(森 清一郎、小谷 治)

## II. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

弱毒生ワクチンの増殖を可能にすることを目指して新規のワクチン製造用培養細胞を作出する。本年度は、細胞質 DNA 認識経路上の TMEM173 (STING) 遺伝子とその下流の TBK1 遺伝子を標的とした。gRNA と Cas9 蛋白質の複合体をエレクトロポレーションにより導入した iPS 細胞をクローニングしたところ、両アレルにフレームシフト変異が導入されているものがそれぞれ 3 クローン中 1 クローン、7 クローン中 1 クローン得られた。後者は標的配列内に SNP が存在したため効率が落ちたと考えられた。またそれぞれ 1 箇所、3 箇所のオフターゲット候補を調べたが変異は認められなかった。(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。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、終元 巖)

## IV. *in silico* 構造解析の応用研究

### 1. ウイルスの複製機構研究：エンテロウイルス蛋白質の分子間相互作用解析

ウイルスカプシド蛋白質の分子間相互作用は、ウイルスの粒子形成・脱殻制御に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、その実態は十分に理解されていない。本研究では、*in silico* 技術を用いて、EV-A71 粒子の構造安定化を司る分子間相互作用の種類と位置を包括的に予測した。既報の EV-A71 粒子構造 (A-particle、Empty Capsid、Procapsid、Mature) を初期構造として、ウイルス複製過程の様々な粒子構造の分子モデルを構築した。

これらを比較し、ウイルス感染初期と後期で維持される疎水性相互作用を9箇所同定した。*In silico* 変異導入解析により、これらの相互作用はカプシド蛋白質多量体の構造安定性の制御因子であることが示唆された。情報エントロピー解析により、これらの相互作用を司るアミノ酸残基は、株間で高度に保存されていることがわかった。ウイルスの存続のために変化できない疎水性相互作用と考えられる。今後、リバーズジェネティクス技術を用いた変異導入解析を行い、個々の相互作用の生化学的、生物学的意義を実験で検証する。成果はウイルスの複製機構の理解と抗ウイルス物質設計に資する。(小谷治、横山勝、西村順裕 [ウイルス第二部]、永田典代 [感染病理部]、清水博之 [ウイルス第二部]、佐藤裕徳)

## 2. ウイルスの複製・免疫逃避・病原性発現機構研究： エンテロウイルス蛋白質の動的性質解析

EV-A71 カプシド表面蛋白質 VP1 は、ウイルスの性質(感染・増殖能、抗体感受性、神経病原性)を司る分子の1つとして知られている。小池ら、および清水らの研究グループは、特に、145番目の変異(E145G)がウイルスの多彩な性質変化と深くかかわることを独立に見出した。しかし、性質変化の分子メカニズムは不明である。本研究では、*in silico* 技術を用いて、E145G 変異が VP1 の動的構造特性に及ぼす影響を調べた。145番目のアミノ酸残基は、カプシド分子表面に位置する。しかし、E145G 変異は、カプシド単量体 (VP1-VP2-VP3-VP4 複合体) の構造安定性低下を招くことが *in silico* 変異導入解析によりわかった。145番目のアミノ酸残基は、カプシド蛋白質の溶液中での”breathing”を司る機能を持つ可能性がある。今後は、分子動力学解析を用いて、E145G 変異に伴う VP1 分子の揺らぎの特性変化を調べ、ウイルスの性質変化に責任を持つ構造特性変化を明らかにする。成果はウイルスの複製・免疫逃避・病原性発現・適応進化機構の理解と抗ウイルス物質設計に資する。(小谷治、横山勝、藤井健 [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)

## 3. 抗HIV化合物の作用機構研究

HIVは、宿主の細胞内膜輸送系を利用して細胞膜から出芽する。この過程は、Gag p6蛋白質と膜輸送系分子Tsg101の相互作用が起点となる。間らは、p6に結合し、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。本研究では、*in silico* 技術を用いて、これらの化合物の作用機序を解析した。結合シミュ

レーションにより、HSM-9および-10は、p6のPTAPモチーフ(Tsg101結合部位)またはその近傍のポケットのアミノ酸残基側鎖と水素結合を形成することが予測された。競合阻害機構が推察される。今後、分子動力学シミュレーションを行い、結合部位と結合様式を精査する。成果は抗ウイルス物質の改変に資する。(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)

## 4. ウイルスの抗体中和と逃避機構研究：HIV-1 Env 三量体における制限された構造ゆらぎ

HIV-1 Env の中和抵抗性となる分子メカニズムの理解は、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 Env の中和感受性を制御するための基盤情報として、HIV-1 Env 三量体の動的性質を調べた。HIV-1 Env 三量体の構造ゆらぎは、gp120のV4が最も大きく、gp120のV1/V2およびV3は小さかった。これはgp120単量体ではV1/V2およびV3の構造ゆらぎが大きいことと異なる。ゆえに、Env三量体ではV1/V2およびV3の構造ゆらぎが制限されていると考えられる。次に、HIV-1 Env 三量体内の相関運動部位を調べると、Env三量体においてV1/V2が他のV1/V2により運動が制限され、同一gp120内のV1/V2によりV3の運動が制限されることが示唆された。この相関運動により、V3を標的とする中和抗体が存在しても、Env三量体の中心に向かって配置するV3が露出することは無いため、HIV-1 Env 三量体は中和抗体から逃避できると考えられる。(横山勝、奥田萌 [お茶大]、中村浩美、小谷治、由良敬 [お茶大]、佐藤裕徳)

## 5. 構造ベースの抗原抗体設計研究：ノロウイルスカプシドにおける構造ゆらぎと相関運動

RNAウイルスは易変異性で、中和抗体から容易に逃避する。効果的なワクチン開発には標的とする蛋白質構造に基づく抗原抗体デザインが必要である。本研究では、構造ベースのワクチン開発のための基盤情報を得ることを目的として、ノロウイルスカプシドの構造ゆらぎおよび相関運動する部位の解析を行った。GI.1カプシドとGII.3U201カプシドのどちらにもShellドメインに大きくゆらぐグループがあった。それらは隣接する他のカプシドとの境界領域に位置し、Pドメインに隠されず露出している。次に、カプシド20量体内の相関運動を調べた。同一Protomer内および隣接する2量体を形成するProtomer間ではShellドメイン間またはPドメイン間の

それぞれで相関運動が見られた。(横山勝、奥田萌[お茶大]、中村浩美、小谷治、由良敬[お茶大]、佐藤裕徳)

6. ウイルスの適応進化機構研究: HIV-1 の異種細胞適応における Env gp120 の特性変化の構造基盤の解明  
HIV-1 Env gp120 の V1/V2 ループおよび V3 ループは、感染受容体である CD4 やケモカインレセプターの認識に重要な役割をしている。しかし、その構造基盤は明らかでない。本研究では、異種細胞適応における Env gp120 の特性変化の構造基盤を明らかにするために、CD4 結合前および結合後の全長 gp120 の分子モデルを構築した。分子動力学計算により CD4 結合前の gp120 では、V1/V2 ループが V3 ループの近傍に配置されることが明らかになった。CD4 結合後では、CD4 との結合をサポートするために V1/V2 ループの配置が大きく変わる。異種細胞適応において見出された適応変異は、V1/V2 ループおよび V3 ループに位置する。それらの位置を構造上に示すと、適応変異は CD4 やケモカインレセプターとの結合に影響を与えると考えられる。(横山勝、野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[徳島大]、佐藤裕徳)

7. 抗 HIV 化合物の作用機構研究: 融合阻害剤耐性 HIV-1 変異体における中和抗体感受性の増強  
HIV-1 は、抗ウイルス薬に対する耐性を容易に獲得する。抗体と融合阻害剤との組み合わせの有用性を評価するために、融合阻害剤に耐性である HIV-1 変異体における中和抗体の感受性の変化を調べると、Env gp41 の I37K 変異により中和抗体感受性が増強した。そのメカニズムを明らかにするために、HIV-1 JR-FL gp41 三量体の分子動力学計算を行った。I37K 変異を有する gp41 において、構造ゆらぎが顕著に増加した。特に、gp41 の N 末端部分の残基番号 20~65 の構造ゆらぎは、I37K 変異を有する gp41 三量体の全てのプロトマーにおいて増加した。この領域は、Env 三量体の gp41 と gp120 の結合界面である。この結果から、I37K 変異が、Env 三量体中の gp41 と gp120 との間の界面において顕著に構造ゆらぎの増加を誘導し、中和抗体感受性が増強したと考えられる。(横山勝、桑田岳夫[熊本大]、松下修三[熊本大]、佐藤裕徳)

8. リスク評価の基盤研究: 蛋白質構造情報を用いたインフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの受容体指向性解析  
鳥インフルエンザウイルスのヒト型受容体指向性を増強するアミノ酸変異の情報は、インフルエンザウイルスのリスク評価の指標となる。本研究では、インフルエン

ザウイルスのヘマグルチニンと宿主のシアロ糖鎖の相互作用をコンピュータ解析することで、ヒト型受容体指向性を増強するアミノ酸変異を調べた。H5N1 亜型ではヘマグルチニンの M230 が F、W、または Y に変異すると、また、H7N9 亜型では A138、V186、L226 が揃うとヒト型受容体への親和性が増加することが明らかになった。季節型インフルエンザウイルスである H3N2 亜型においても同様の解析を行うと、A138、F159、N225 が揃うとヒト型受容体への親和性がより増加した。これらの変異を有するウイルスはヒトにより適応していると考えられる。(奥田萌[お茶大]、由良敬[お茶大]、佐藤裕徳、横山勝)

## V. バイオテロ・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

バイオテロ・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。これまでに WHO 指定バイオテロ病原体である炭疽菌、ペスト菌、野兎病菌、類鼻疽菌のゲノム情報解析を行ってきた。また、近年薬剤耐性が問題となっているサルモネラ (Sa) および結核菌 (TB) のゲノム情報解析にも取り組み、ネットワーク経由で分子疫学解析を行うための情報解析パイプライン Global core Genome SNP Analysis: GcoGSA Sa および Total Genotyping Solution for TB: TGS-TB を構築してきた。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次世代シーケンサーを使用しており、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目的は、腸内細菌科細菌の薬剤耐性遺伝子保有プラスミドの伝達様式を明確にする際に重要となる。本年度は、ロングリードを取得する次世代シーケンサー PacBio での迅速な解読から解析までをシームレスに行うためのシステムを構築した。特に、簡便な長鎖 DNA 抽出方法、高速なライブラリー作成法、および解読後に完全長配列を得るためのパイプラインの基盤を作成した。

(関塚剛史、山下明史、加藤健吾、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]、黒田誠、松井真理[細菌第二部]、鈴木里和[細菌第二部])

## VI. 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

1. GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan) データベースの構築  
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 1,800 株、約 4700 プラスミド配列を決定し、データベースを作成した。2015 年に明らかとなったコリスチン耐性に関与する新規因子 MCR-1 遺伝子保有腸内細菌科細菌が国内でも分離されていたため、それら分離株の完全長ゲノム配列を決定し、*mcr-1* 保有プラスミドの比較解析を行った。その結果、国内で広がるそれら遺伝子は、IncI1 プラスミドに存在し、中国で最初に発見された *mcr-1* 保有 IncI1 プラスミドと高い相同性を示した。現在、これらプラスミドに存在する、接合伝達に関与する高度組換え領域 *shufflon* の定量的構造多様性の解析を行っている。

(関塚剛史、山下明史、谷津弘仁、加藤健吾、黒田誠、松井真理[細菌第二部]、鈴木里和[細菌第二部]、柴山恵吾[細菌第二部]、大西守[大西獣医微生物ラボラトリー]、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. 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

未だ先進国内において罹患率が高く、世界的にも多剤耐性が問題になっている結核菌のため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。薬剤耐性予測の公開ツールも組み込んでいるが、既知のデータベースとの照合を行うのみであり、偽陽性および偽陰性と判定される分離菌株が検出された。そのため、薬剤耐性予測データベースの改良と特異度・感度の高い薬剤感受性予測ツールの開発が急務となっている。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中である。

(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])

## 3. 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、次世代シーケンサー(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)を構築した。これまで、AMiGA は GenEpid-J のみに組み込まれていたが、GenEpid-J のユーザー以外にも使用できるよう、ブラウザ経由で次世代シーケンズデータを解析することが可能な公開版 AMiGA を作成した。

(関塚剛史、谷津弘仁、山下明史、黒田誠)

## 4. 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

前年度から、ブラウザ経由で次世代シーケンズ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、次世代シーケンズ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 GPAT を前述の GenEpid-J から使用できるようにするとともに、前年度に GPAT/iPAT システムからスピンアウトした公開版 open iPAT に、公開データベースから近縁のプラスミドを検索し *inc type*、保有薬剤耐性遺伝子、および NCBI 上のオリジナルデータへのリンクを表示する機能を追加した。また対象とするプラスミドの *pan genome* 解析、*core genome* 解析を行う機能を追加した。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

## 5. 院内感染事例に係る薬剤耐性細菌の比較ゲノム解析

国内で発生した 3 例の院内感染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がされな

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た。時系列と塩基置換数との相関は、原因となる耐性菌が近い過去で蔓延したのか、長期間に渡り蔓延していたかに関与する可能性が示唆された。各症例のゲノム情報を蓄積し、比較を行うことで、時系列とプラスミドに生じる塩基置換数の関係性を見出す基盤が作成できると期待される。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、松井真理[細菌第二部]、鈴木里和[細菌第二部]、柴山恵吾[細菌第二部])

## 6. 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、国外の河川および下水より分離された ESBL およびカルバペネム耐性大腸菌の大規模プラスミド解析を行った。その結果、異なるプラスミド間での組換えや融合等、多様な変異がプラスミドの進化を促進し、同様の遺伝的背景を有するプラスミドが国外の一部の範囲で広がっていることを示唆していた。本研究で行った解析手法を基盤とし、国内における薬剤耐性菌の汚染実態を把握する必要がある。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、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])

## VII. 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、未分離の未知細菌が多く存在する。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康人の糞便を塗抹し、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、3 種類の新規腸内細菌が実際に単離できた。また、既知選択培地に於いても、実際に報告されている菌種以外の細菌が嫌気条件下で増殖することがメタゲノム解析の結果明らかとなり、細菌検査学の基礎的情報にもなりうると期待できる。

(伊藤環[AMED リサーチレジデント]、関塚剛史、黒田誠)

## VIII. 各種病原細菌のゲノム解析

### 1. コレラ菌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

インドのコルカタ地方で 2007 年から 2014 年に分離された 80 株のコレラ菌のゲノムデータ、および、次世代シーケンズデータが公開されているものを含めた、合計 243 株のデータを用いて、大規模ゲノム分子系統解析を行った。その結果、本地域で広がるコレラ菌は、2つの系統群に大きく分かれることが明らかとなった。さらに、BEAST2 (Bayesian evolutionary analysis by sampling trees 2)を用いた時系列分子系統解析により、本地域でのコレラ菌の系統群の拡散の状態を年月で推測することが可能となった。本地域で蔓延する系統群が、2010 年を境にシフトし、これら系統群の祖先型は、共に 2006 年には出現していたことが示唆された。時系列および空間的分子系統解析は、感染症拡大の動向を把握する上で重要な基盤となるため、本センターでは時系列系統解析を主体とした解析パイプラインの構築を進める予定である。

(関塚剛史、黒田誠、森田昌知[細菌第一部]、大西真[細菌第一部]、今村大輔[岡山大学 インド感染症共同研究センター]、水野環[岡山大学 インド感染症共同研究センター]、竹村太地郎[長崎大学 熱帯医学研究所]、山城哲[長崎大学 熱帯医学研究所]、三好伸一[岡山大学 歯歯薬学総合研究科]、篠田純男[岡山大学 インド感染症共同研究センター])

### 2. 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 (PSMβ1)、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。C57BL/6 マウスを用いた本菌の感染実験では、脳接種による脳膿瘍形成は認められないものの、皮下接種による明瞭な皮下膿瘍が検出された。マウス皮下膿瘍、および、Brain Heart Infusion 培地による *in vitro* 培養の RNAseq 解析により、皮下膿瘍中で明瞭な転写変動が認められた本菌株の遺伝子が確認された。また、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、PSMβ1、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。

(長谷川紀子[東邦大学 理学部]、関塚剛史、杉由高、川上展弘[市立豊中病院小児科]、小笠原由美子、加藤健吾、山下明史、竹内史比古、黒田誠)

### 3. 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、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株の全ゲノム塩基配列決定後の詳細な比較ゲノム解析により、本菌株は、基準株である *F. varium* ATCC株よりも多数の病原性に関与すると思われる遺伝子が存在し、特に、Type V secretion system (T5SS)および *Fusobacterium* adhesion FadAパラログが多数検出された。また、本菌株のみに特徴的な Filamentous hemagglutininが検出された。

（関塚剛史、黒田 誠）

### 4. 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ウ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。また、これらアクセサリ遺伝子の多くが、50-kb程度のゲノムアイランドに含まれていた。本菌の外來性遺伝子群の獲得と種内系統の分岐が強く相関していることが示唆された。

（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）

## IX. 各種病原ウイルスのゲノム解析

### 1. 次世代シーケンズデータからウイルス配列を構築するシステムの開発

昨年度より、ブラウザ経由で次世代シーケンズ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）を構築している。VirusTAPは入力された次世代シーケンズ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。VirusTAPはまた、再構築した配列を公共塩基配列データベース（NCBI NT）と同様に

検索を行い、ウイルス種を推定することができる。さらに、再構築した配列に入力データをマッピングし、再構築した配列が正しいかどうか評価を行うことができる。本年度はVirusTAPに関するポスター発表を第5回生命医薬情報連合大会（IIBMP2016）にて行い、ポスター賞を受賞した。また、前述の GenEpid-J から連携して解析を行えるように改良した。

（山下明史、関塚剛史、黒田誠）

### 2. デングウイルス遺伝子型データベースおよびブラウザアプリの開発

昨年度より、最新の公共データベースから取得したデングウイルス配列を遺伝子型ごとに分類し、世界地図上にその分布を示す web アプリケーション Dengue Genographic Viewer (DGV) を開発してきた。DGVはデングウイルスの遺伝子型分布を地図上に示すだけでなく、相同配列検索機能や日本への輸入症例の図示機能も備えており、上で紹介した VirusTAP と組み合わせる使用することにより、輸入症例ウイルスの起源推定や、国内感染症例かどうかの推定を行うことが可能である。本年度は、GenEpid-J から連携して解析を行うための基盤作成を行った。

（山下明史、関塚剛史、黒田誠）

## X. 原因不明症例における病原体網羅的検査法の施行

原因病原体不明の感染症患者サンプルに対して、次世代シーケンサー（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、H28年度は31患者（90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36%の症例から病原微生物を検出することができた。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考えられた。

現段階の暫定的 NGS 検査法 SOP を公開した ([https://gph.niid.go.jp/gs\\_app/ngs\\_sop\\_draft\\_ver1.pdf](https://gph.niid.go.jp/gs_app/ngs_sop_draft_ver1.pdf))。

他、壊死性筋膜炎等の原因不明患者の外部依頼検査を6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)

### 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、柗元 巖、黒田 誠)

#### HPV ワクチンの承認前検査

承認申請された新規 9 価 HPV ワクチンの承認前検査を製剤担当室として担当した。メーカーから試験品の提供を受けて、試験方法の妥当性について検討を行い、最終報告書を取りまとめて提出した。また新規 9 価 HPV ワクチンの生物学製剤基準の制定に携わった。(石井克幸、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、西太平洋地域リファレンスラボとしての活動を行った。2016 年 11 月 15 日から 17 日に中国 Xiamen にて開催された、The Second WHO Workshop on Implementation of Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Human Papilloma Virus-like Particle Vaccines に出席して、アジア各国からのワクチン規制当局の代表者、製造販売業者および WHO から派遣された HPV 専門家と、HPV ワクチンの品質管理とロットリリースについて討議を行った。また JICA ワクチン NRA 研修において、HPV ワクチンの品質管理について講義を担当した。(柗元 巖)

### 発表業績一覧

#### I. I. 誌上発表

##### 1. 欧文発表

1) Y. Torii, T. Fujii, I. Kukimoto, M. Saito, T. Iwata, H. Takahashi, R. Ichikawa, S. Kawai, S. Otani, and D. Aoki. Comparison of methods using paraffin-embedded tissues and exfoliated cervical cells to evaluate human papillomavirus genotype attribution. *Cancer Science*, 107:1520-1526 (2016)

- 2) S. Mori, T. Takeuchi, Y. Ishii, T. Yugawa, T. Kiyono, H. Nishina, and I. Kukimoto. Human Papillomavirus 16 E6 Upregulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *Journal of Virology*, 91:e02413-16 (2017)
- 3) Miyatake H, Sanjoh A, Murakami T, Murakami H, Matsuda G, Hagiwara K, Yokoyama M, Sato H, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Molecular mechanism of HIV-1 Vpr for binding to importin- $\alpha$ . *J. Mol. Biol.*, 428:2744-57, 2016.
- 4) Hikichi Y, Yokoyama M, Takemura T, Fujino M, Kumakura S, Maeda Y, Yamamoto N, Sato H, Matano T, Murakami T. Increased HIV-1 Sensitivity to Neutralizing Antibodies by Mutations in The Env V3-Coding Region for Resistance to CXCR4 Antagonists. *J. Gen. Virol.*, 97:2427-40, 2016.
- 5) Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Miki M, Yen DH, Murakami K, Yokoyama M, Murata K, Nakanishi A, Katayama K. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld enable murine norovirus to internalize into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 113:E6248-55, 2016.
- 6) Kotani O, Suzuki T, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Nakajima N, Sato H, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Intracerebral inoculation of mouse-passaged Saffold virus type 3 affects cerebellar development in neonatal mice. *J. Virol.*, 90:10007-21, 2016.
- 7) Alam M, Kuwata T, Shimura K, Yokoyama M, Ramirez Valdez KP, Tanaka K, Maruta Y, Oishi S, Fujii N, Sato H, Matsuoka M, Matsushita S. Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. *Retrovirology*, 13:70, 2016.
- 8) Sakuragi S, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi J. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. *Retrovirology*, 13:79, 2016.
- 9) Takahata T, Takeda E, Tobiume M, Tokunaga K, Yokoyama M, Huang YL, Hasegawa A, Shioda T, Sato H, Kannagi M, Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) to Facilitate the IN Assembly and Non-enzymatic Function Through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J. Virol.*, 91:e02003-16, 2017.
- 10) Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K.

- Evolutionary constraints on the norovirus pandemic variant GII.4\_2006b over the five-year persistence in Japan. *Front. Microbiol.*, 8:410, 2017.
- 11) Tsutsui R, Tsukagoshi H, Nagasawa K, Takahashi M, Matsushima Y, Ryo A, Kuroda M, Takami H, Kimura H. Genetic analyses of the fusion protein genes in human parainfluenza virus types 1 and 3 among patients with acute respiratory infections in Eastern Japan from 2011 to 2015. *J Med Microbiol.* 2017 Feb;66(2):160-168.
  - 12) Hamada H, Sekizuka T, Oba K, Katano H, Kinumaki A, Terai M, Mizutani T, Kuroda M. Comprehensive pathogen detection associated with four recurrent episodes of Kawasaki disease in a patient during a single year using next-generation sequencing. *JMM Case Rep.* 2016 Feb 1;3(1):e005019.
  - 13) Imamura D, Morita M, Sekizuka T, Mizuno T, Takemura T, Yamashiro T, Chowdhury G, Pazhani GP, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Miyoshi SI, Kuroda M, Shinoda S, Ohnishi M. 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.* 2017 Feb 13;11(2):e0005386.
  - 14) Segawa T, Matsui M, Suzuki M, Tsutsui A, Kuroda M, Shibayama K, Suzuki S. Utilizing the Carba NP test as an indicator of expression level of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2017 Feb;133:35-39.
  - 15) Kurai D, Sasaki Y, Saraya T, Ishii H, Tsukagoshi H, Kozawa K, Ryo A, Ishioka T, Kuroda M, Oishi K, Takizawa H, Kimura H. Pathogen profiles and molecular epidemiology of respiratory viruses in Japanese inpatients with community-acquired pneumonia. *Respir Investig.* 2016 Jul;54(4):255-63.
  - 16) Sakamoto K, Sekizuka T, Uehara T, Hishima T, Mine S, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M, Katano H. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med.* 2017 Mar;6(3):605-618.
  - 17) Hasegawa N, Sekizuka T, Sugi Y, Kawakami N, Ogasawara Y, Kato K, Yamashita A, Takeuchi F, Kuroda M. 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.* 2017 Jan 26;85(2). pii:e00886-16.
  - 18) Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M. 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.* 2016 Dec 27;61(1). pii: e02057-16.
  - 19) Takahashi K, Sekizuka T, Fukumoto H, Nakamichi K, Suzuki T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M, Katano H. Deep-Sequence Identification and Role in Virus Replication of a JC Virus Quasispecies in Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J Virol.* 2016 Dec 16;91(1). pii: e01335-16.
  - 20) Hoshina S, Sekizuka T, Kataoka M, Hasegawa H, Hamada H, Kuroda M, Katano H. Profile of Exosomal and Intracellular microRNA in Gamma-Herpesvirus-Infected Lymphoma Cell Lines. *PLoS One.* 2016 Sep 9;11(9):e0162574.
  - 21) Osawa M, Mine S, Ota S, Kato K, Sekizuka T, Kuroda M, Kataoka M, Fukumoto H, Sato Y, Kanno T, Hasegawa H, Ueda K, Fukayama M, Maeda T, Kanoh S, Kawana A, Fujikura Y, Katano H. Establishing and characterizing a new primary effusion lymphoma cell line harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Infect Agent Cancer.* 2016 Aug 17;11:37.
  - 22) Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. DGV: Dengue Genographic Viewer. *Front Microbiol.* 2016 Jun 7;7:875.
  - 23) Nakayama E, Kotaki A, Tajima S, Kawada M, Miura K, Gemma A, Adachi T, Sekizuka T, Kato K, Yamashita A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Shibasaki K, Saijo M, Kuroda M, Takasaki T. Two different dengue virus strains in the Japanese epidemics of 2014. *Virus Genes.* 2016 Oct;52(5):722-6.
  - 24) Kimura H, Nagasawa K, Tsukagoshi H, Matsushima Y, Fujita K, Yoshida LM, Tanaka R, Ishii H, Shimojo N, Kuroda M, Ryo A. Molecular evolution of the fusion protein gene in human respiratory syncytial virus subgroup A. *Infect Genet Evol.* 2016 Sep;43:398-406.
  - 25) Shimizu H, Arai K, Abe J, Nakabayashi K, Yoshioka T, Hosoi K, Kuroda M. Repeated fecal microbiota transplantation in a child with ulcerative colitis. *Pediatr Int.* 2016 Aug;58(8):781-5.

- 26) Takajo I, Sekizuka T, Fujita H, Kawano A, Kawaguchi T, Matsuda M, Kubo K, Miyauchi S, Umekita K, Nagatomo Y, Kuroda M, Takasaki T, Okayama A, Ando S. Possible Case of Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis in Traveler Returning to Japan from India. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jun;22(6):1079-82.
- 27) Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nagasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep*. 2016 Jul 7;6:29400.
- 28) Fukumoto H, Hishima T, Hasegawa H, Saeki H, Kuroda M, Katano H. Evaluation of Vero-cell-derived simian endogenous retrovirus infection in humans by detection of viral genome in clinicopathological samples and commercialized vaccines and by serology of Japanese general population. *Vaccine*. 2016 May 23;34(24):2700-6.
- 29) Maruyama C, Niihara H, Izumikawa M, Hashimoto J, Shin-Ya K, Komatsu M, Ikeda H, Kuroda M, Sekizuka T, Ishikawa J, Hamano Y. tRNA-Dependent Aminoacylation of an Amino Sugar Intermediate in the Biosynthesis of a Streptothricin-Related Antibiotic. *Appl Environ Microbiol*. 2016 May 31;82(12):3640-8.
- 30) Akiba M, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Fujii Y, Murata M, Lee K, Joshua DI, Balakrishna K, Bairy I, Subramanian K, Krishnan P, Munuswamy N, Sinha RK, Iwata T, Kusumoto M, Guruge KS. Distribution and Relationships of Antimicrobial Resistance Determinants among Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant or Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Rivers and Sewage Treatment Plants in India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Apr 22;60(5):2972-80.
- 31) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline. *Front Microbiol*. 2016 Feb 2;7:32.
- 32) Kobayashi M, Matsushima Y, Motoya T, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Nishimura K, Yamashita Y, Kuroda M, Saruki N, Ryo A, Saraya T, Morita Y, Shirabe K, Ishikawa M, Takahashi T, Shinomiya H, Okabe N, Nagasawa K, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci Rep*. 2016 Jul 7;6:29400.
- 33) Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M, Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):284-5.
- 34) Devault AM, Mortimer TD, Kitchen A, Kieseewetter H, Enk JM, Golding GB, Southon J, Kuch M, Duggan AT, Aylward W, Gardner SN, Allen JE, King AM, Wright G, Kuroda M, Kato K, Briggs DE, Fornaciari G, Holmes EC, Poinar HN, Pepperell CS. A molecular portrait of maternal sepsis from Byzantine Troy *Elife*. 2017 Jan 10;6: e20983.

## 2. 和文発表

- 1) 森 清一郎、HPV による発癌機構：変異原としての HPV、医学のあゆみ、2016、258、139-143（2016年7月）
- 2) 佐藤裕徳、計算・情報科学の利活用による論理的創薬の基盤開発。IASR. HIV/AIDS 特集 2016. 37(9):10(176)-11(177).
- 3) 黒田誠 「公衆衛生および感染症診断に貢献する微生物ゲノム研究の変貌」医学検査のあゆみ 2016年7月号（第62巻7号）
- 4) 黒田誠 「ヒト病原体ゲノム解析、最近の動向」生体の科学 2017年04月号（通常号）（Vol. 68 No. 2）

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Y. Masuda, Y. Saeki, S. Yanaka, H. Kawai, I. Kukimoto, K. Kato, K. Tanaka, and C. Masutani. Mechanism of multiple lysine 48-linked ubiquitin chain synthesis by E6AP. FASEB Science Research Conference, UBIQUITIN & CELLULAR REGULATION（2016年6月、モンタナ）
- 2) K. Kawana, A. Taguchi, K. Adachi, D. Maeda, S. Mori, I. Kukimoto, T. Iwata, and A. Mitsunashi. Detection of HPV L1 gene expression in cervical exfoliated cells from CIN patients by RT-PCR using consensus primers. 31<sup>st</sup> International Papillomavirus Conference（2017年2月、ケープタウン）
- 3) Kotani O, Yokoyama M, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Hasegawa H, Shimizu H, Sato H, Nagata N. Scaffold virus in vivo passages drive the structural evolution of the

- capsid protein for enhancing replication fitness in neural cells. The 19<sup>th</sup> International Picornavirus Meeting; EUROPIC 2016. (2016年9月、スイス・レ・ディアブルレ)
- 4) Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Agoh M, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Shimizu H, Hasegawa H. Virulence of recent coxsackievirus B2 isolates in a neonatal mouse model. The 19<sup>th</sup> International Picornavirus Meeting; EUROPIC 2016. (2016年9月、スイス・レ・ディアブルレ)
  - 5) Fujii K, Sudaka Y, Imura A, Takashino A, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in SCARB2-dependent infection. The 19<sup>th</sup> International Picornavirus Meeting; EUROPIC 2016. (2016年9月、スイス・レ・ディアブルレ)
  - 6) Yokoyama M, Okuda M, Nakamura H, Kotani O, Yura K, Sato H. Structural Fluctuations and Correlated Motions in Norovirus Capsid Oligomer. The 6th International Calicivirus Conference, (2016年10月、アメリカ・サバンナ)
  - 7) Tsuyoshi Sekizuka, Tsuyoshi Kenri, Akihiko Yamamoto, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Takashi Hatakeyama, Hiroshi Nakajima, Motohide Takahashi, Keigo Shibayama and Makoto Kuroda. Genomic epidemiology of *Clostridium botulinum* isolates from Japanese Botulism Cases. 9th Meeting on Global Microbial Identifier (GMI) (2016年5月 イタリア・ローマ)
  - 8) Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Masato Higashide, Akifumi Yamashita, Yuba Inamine, Makoto Kuroda. Comparative genome analysis of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) elements among Staphylococcus saprophyticus, causative agent of uncomplicated urinary tract infections. 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI) (2016年8月 韓国・ソウル)
  - 9) Akifumi Yamashita, Tetsuya Sakamoto, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Tomohiko Takasaki and Makoto Kuroda. Visualizing genotype distribution of dengue virus. The 11th China-Japan International Conference of Virology (2016年7月 香川県・観音寺市)
  - 10) Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Mari Matsui, Keigo Shibayama and Satowa Suzuki, GenEpid-J: an integrated database of pathogen genomics and epidemiology focused on plasmids involving in the antimicrobial resistance. Plasmid Biology 2016 (2016年 イギリス・ケンブリッジ)
  - 11) Toshiyuki Yamaji, Tsuyoshi Sekizuka, Kinnosuke Yahiro, Yuriko Tachida, Chisato Sakuma, Makoto Kuroda and Kentaro Hanada, Application of genome editing technologies for studies on sphingolipid and glycan metabolisms. EMBO Workshop “Glycosylation in the Golgi complex” (2016年10月 イタリア・ヴィーコ・エクエンセ)
  - 12) Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Tomohiko Takasaki and Makoto Kuroda. DGV: Dengue Genographic Viewer. Joint International Tropical Medicine Meeting 2016 JITMM2016 (2016年12月 タイ・バンコク)
  - 13) Madoka Kuramitsu, Tsuyoshi Sekizuka, Chieko Matsumoto, Rieko Sobata, Yasuko Sagara, Makoto Kuroda, Masahiro Satake, Kazuo Itabashi, Kazuo Okuma and Isao Hamaguchi, Genomic feature of HTLV-1 in Western blot indeterminate. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses (2017年3月 東京都・千代田区)
- ## 2. 国内学会
- 1) S. Mori, T. Kiyono, H. Nishina, and I. Kukimoto. Activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6 through TEAD transcription factors. 第64回日本ウイルス学会学術集会 (2016年10月、札幌)
  - 2) S. Mori, H. Nishina, and I. Kukimoto. TEAD-dependent, YAP/TAZ-independent activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6. 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月、横浜)
  - 3) T. Fujii, I. Kukimoto, T. Iwata, and D. Aoki. Estimation of HPV genotype attribution using cervical exfoliated cells for monitoring the efficacy of HPV vaccines. 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月、横浜)
  - 4) 柊元 巖、HPV 発癌における APOBEC3B の役割、第25回昭和大学学士会シンポジウム (2016年7月、東京)
  - 5) Lowela Siarot, 佐藤洋隆, Nopporn Chutiwitoonchai, 小谷治、横山勝、佐藤裕徳、本田香織、近藤恭光、長田裕之、間陽子. ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) Gag と宿主因子 TSG101 との相互作用を標的とする新規 HIV 薬の開発。第159回日本獣医学会学術集会 (2016年9月、神奈川)

- 6) Chutiwitoonchai N, Kakisaka M, Mano T, Sato H, Kotani O, Yokoyama M, Sato H, Aida Y. Molecular mechanism of inhibition by a new compound DP2392-E10 against influenza virus replication. 第 159 回日本獣医学会学術集会 (2016 年 9 月、神奈川県)
- 7) 小谷治, 横山勝, 西村順裕、永田典代、清水博之、佐藤裕徳. Prediction of enterovirus A 71 functional region for the viral encapsidation. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 10 月、札幌市)
- 8) Fujii K, Sudaka Y, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Koike S. The VP1 amino acid residue 145 of EV71 is a virulence determinant in cynomolgus monkey 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 10 月、札幌市)
- 9) 横山勝, 奥田萌, 中村浩美, 小谷治, 由良敬、佐藤裕徳. Structural Fluctuations and Correlated Motions in Norovirus Capsid. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (2016 年 10 月、札幌市)
- 10) 横山勝. HIV envelope の構造と動的性質. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, シンポジウム「HIV envelope を標的とした感染防御」 (2016 年 11 月、鹿児島市)
- 11) 原田恵嘉、野村渉、鳴海哲夫、横山勝、前田賢次、林宏典、荻原香澄、石田有佑、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-1. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2016 年 11 月、鹿児島市)
- 12) 横山勝, 奥田萌, 中村浩美, 小谷治, 由良敬、佐藤裕徳. HIV-1 Env 三量体における制限された構造ゆらぎ. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 12 月、横浜)
- 13) 奥田萌, 横山勝, 佐藤裕徳, 由良敬. タンパク質構造情報を用いたインフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの受容体指向性解析. 第 6 回日本生物物理学会関東支部会 (2017 年 3 月、東京)
- 14) 見理剛、関塚剛史、鈴木仁人、堀野敦子、森茂太郎、藤井寛之、橋本徹、中嶋 洋、大屋日登美、黒田誠、柴山恵吾. P1 遺伝子 2b、2c 型の *M. pneumoniae* 株で見つかった細胞接着関連遺伝子 *orf6* の変化. 日本マイコプラズマ学会 第 43 回学術集会 (長崎市, 2016 年 6 月)
- 15) 山下明史、柴山恵吾、黒田誠、プラスミドネットワーク解析ツール iPAT. 第 64 回日本化学療法学会総会 (神戸市、2016 年 6 月)
- 16) 岩田剛敏、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、木下優太、丹羽秀和、片山芳也、秋庭正人. 馬パラチフス菌の宿主特異性に関する考察. 第 159 回日本獣医学会 (藤沢市, 2016 年 9 月)
- 17) 李 謙一、石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、小椋義俊、林哲也、関塚剛史、黒田誠、大西真、EHEC working group. 腸管出血性大腸菌サーベイランスにおける全ゲノム配列解析の有用性評価. 第 159 回日本獣医学会 (藤沢市, 2016 年 9 月)
- 18) 山地俊之、関塚剛史、八尋錦之助、鈴木佑典、榎泰典、黒田誠、花田賢太郎. ゲノム編集技術を用いたスフィンゴ脂質・糖鎖の代謝研究. 第 35 回日本糖質学会年会 (高知市, 2016 年 9 月)
- 19) Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. Virus genome-targeted assembly pipeline: VirusTAP. 第 5 回生命医薬情報学連合大会 (江東区, 2016 年 9 月)
- 20) 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 JC virus quasispecies in PML patients. 第 106 回日本病理学会総会 (新宿区, 2017 年 4 月)
- 21) 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)
- 22) 黒田誠、長谷川紀子、関塚剛史、杉由高、加藤健吾、山下明史. Characterization of the pathogenicity of *Streptococcus intermedius*. 第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 23) 伊藤環、関塚剛史、山下明史、加藤健吾、黒田誠. 既存培地を用いた健常者由来新規腸内細菌の探索および分離. 第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 24) 瀧井猛将、御手洗聡、岩本朋忠、慶長直人、吉田志緒美、土方美奈子、高木明子、関航平、若林靖貴、近松絹代、青野昭男、五十嵐ゆり子、村瀬良朗、加藤健吾、関塚剛史、山下明史、黒田誠、加藤誠也. アジアの結核菌のゲノムデータベース”GReAT”の構築. 第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 25) 関塚剛史、川西路子、島綾香、加藤健吾、山下明史、松井真理、鈴木里和、黒田誠. IncI2 プラスミドに存

在する高度組換え領域 shufflon の定量的構造多様性の解明。第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)

- 26) 秋庭正人、岩田強敏、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、木下優太、丹羽秀和、片山芳也。馬パラチフス菌の表現型と偽遺伝子の関連。第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 27) 橋野正紀、加藤健吾、伊藤環、松井真理、鈴木里和、山下明史、関塚剛史、黒田誠。PacBio library 作製における迅速かつ簡便な細菌長鎖 DNA 断片調整法の検討。第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 28) 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、関塚剛史、黒田誠、金万春、山田景子、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親。小さいコロニーを形成し低溶血性の PRGBS の解析。第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 29) 山下明史、岩本朋忠、関塚剛史、村瀬良朗、瀧井猛将、御手洗聡、加藤誠也、黒田誠。Prediction tool for drug-resistant genetic marker based on whole genome sequence of TB. 第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 年 3 月)
- 30) 李謙一、木全恵子、綿引正則、関塚剛史、石原朋子、伊豫田淳、黒田誠、大西真、EHEC Working Group。腸管出血性大腸菌 O111 における全ゲノム配列を用いた分子疫学解析。第 89 回日本細菌学会 (仙台市, 2017 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