

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 ジェノタイプング法を用いて、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・再興感染症の病原となる易変異性 RNA ウイルスの基礎・応用研究を推進している。計算科学環境の整備・強化を進め、ウイルス学、病原体サーベイランス組織、有機合成化学等の専門家と学際研究を展開することにより、病原体研究の質と速度の向上を図っている。特に変異が生体高分子の構造と機能に及ぼす影響を再現するコンピュータシミュレーション技術を重点的に強化し、様々な感染現象の構造原理の解明、創薬シーズ探索、変異病原体のリスク評価などに役立っている。平成30年度は、分子モデリングと分子動力学シミュレーションを用いて、ウイルスの感染、複製、中和、適応進化の構造生物学研究を進め、成果を関連部署・研究グループに提供した。また、創薬シーズ探索と季節性インフルエンザ流行予測の基盤開発を進めた。

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、大規模細菌ゲノム比較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、および、ゲノムデータベース作成を中心に業務を展開した。薬剤耐性細菌のワンヘルスアプローチの一環として、下水処理排水のメタゲノム解析、カルバペネム耐性細菌の分離およびゲノム解析も進めている。更に、病原体のベクターとなる昆虫のゲノム解析にも着手し、より広範囲な感染症対策に向けた業務の展開を開始した。

業績

調査・研究

1. 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 偽ウイルス(18PsV-TK)を作成した。この偽ウイルスを CRISPR-Cas9 による遺伝子ノックアウト HeLa 細胞ライブラリーに感染させ、ガンシクロビル存在下で生き残る細胞を回収した。今後この細胞から、HPV18 の感染成立に必要な細胞タンパク質を同定する。(石井克幸;山地俊之[細胞化学部])

(2) HPV 持続感染機構の解明

NIKS 細胞は分化能を維持しているヒト不死化角化細胞であり、子宮頸外部細胞(Ect 細胞)や子宮頸内部細胞(End 細胞)に比べ高い HPV ゲノム保持能を有する。この原因を解明するため、各種の細胞で定量的 PCR による HPV 遺伝子の発現解析を行った。NIKS 細胞における HPV 初期遺伝子の発現は、Ect 細胞や End 細胞に比べて有意に高く、HPV 初期プロモーターの活性化と相関していた。NIKS 細胞では未分化の状態、HPV 複製に必要な初期遺伝子の発現を担う初期プロモーターが活性化されていると考えられた。(石井克幸)

(3) HPV の遺伝子発現機構に関する研究

細胞の転写因子 TEAD は DNA に結合するが転写活性はなく、転写共役因子と複合体を形成して転写を調節する。TEAD が HPV の遺伝子発現に関わることが報告されている

が、4 つの TEAD (TEAD1/2/3/4) のうちのどれが必要か調べられておらず、共役因子も不明である。HPV16 陽性の表皮角化細胞または子宮頸癌細胞で TEAD1 をノックダウンすると、HPV の遺伝子発現が低下した。TEAD2/3/4 をノックダウンしても発現の低下は認められなかった。in vitro で、TEAD1 は HPV16 の遺伝子発現調節領域 (LCR) の複数の部位に結合した。既知の TEAD 共役因子のうち、VGLL1 をノックダウンすると HPV の遺伝子発現および初期プロモーター活性が低下し、細胞の増殖が抑制された。VGLL1 は、TEAD への結合能に依存して HPV16 の LCR に結合した。VGLL1 には DNA 結合能がないことから、LCR 上の TEAD1 に VGLL1 が結合することにより転写を活性化すると考えられる。(森清一郎、終元巖)

(4) TEAD4 の発現誘導機構に関する研究

TEAD4 は細胞の増殖・移動能を制御する細胞遺伝子群の発現制御に関わる転写因子であり、これまでに HPV 癌タンパク質 E6 が TEAD4 の発現レベルを上昇させ、細胞の変異原タンパク質 APOBEC3B の発現を誘導することを明らかにしている。HPV による TEAD4 発現誘導機構をさらに検討するために、ヒト TEAD4 遺伝子のプロモーター領域 (700 bp) を、ヒト培養細胞 DNA から PCR 増幅し、リポータープラスミドにクローニングした。HeLa 細胞及び 293 細胞でのリポーターアッセイにより、TEAD4 遺伝子断片は有意なプロモーター活性を示した。このプロモーター領域を上流から削って、293 細胞でのリポーターアッセイによりプロモーター活性に必要な領域を検討した。その結果、700~500 bp の領域にプロモーター活性を上昇させる配列が存在することが分かった。(中摩佑子、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 ジェノタイプングを継続的に行った。2012-2018 年の結果を解析したところ、子宮頸癌 (257 検体) では HPV16 (55.6%)、HPV18 (17.9%)、HPV52 (7.0%)、HPV58 (5.4%)、HPV31 (3.9%) が検出された。子宮頸癌の組織型ごとの HPV 型分布を検討したところ、扁平上皮癌では HPV16 (62.8%)、HPV18 (11.1%)、HPV52 (6.7%)、腺癌では HPV16 (39.0%)、HPV18 (33.8%)、HPV52 (7.8%) が検出された。腺癌では扁平上皮癌と比べて HPV18 の割合が高いことが示された。(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部 (正常、CIN、子宮頸癌) 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ところ、日本人に特徴的な新たな HPV16 バリエント (A5) を見出した。A5 バリエントは正常子宮頸部での検出割合が高く、頸癌への進展に伴ってその割合が減少した。A5 バリエントは特徴的なアミノ酸置換を持つ E7 タンパク質 (L28F) をコードしており、ヒト子宮頸部細胞にレトロウイルスベクターで L28F を発現させると、他のバリエント (A1, A4) の E7 と比較して pRb 分解活性が低下していた。(廣瀬佑輔、中摩佑子、天神林友梨、中村浩美、終元巖、森清一郎; 岩田卓[慶應大学]、佐藤豊実[筑波大学]、小貫麻美子、松本光司[昭和大学])

3. HPV 感染による発癌機構の研究

(1) HPV ゲノムの患者内多様性の解析

HPV ゲノム配列の患者内多様性の生物学的意義を検討するために、健康女性および子宮頸癌患者から子宮頸部擦過細胞を収集し、HPV タイピングの後、HPV16 陽性の検体 (計 53 検体) から、PCR にて全長 HPV16 ゲノムを増幅した。得られた HPV16 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、10% 以上の高頻度な患者内多様性を示す変異部位が合計 11 カ所見出された。その内の 10 カ所は子宮頸癌患者の HPV16 ゲノムに検出された。それら 10 カ所の内、HPV 複製に必要な E1/E2 遺伝子に 6 カ所の変異部位が認められた。子宮頸癌では positive selection により、これらの変異が選択されている可能性が示唆された。(廣瀬佑輔、中摩佑子、天神林友梨、中村浩美、終元巖; 岩田卓[慶應大学]、小貫麻美子、松本光司[昭和大学])

(2) 子宮頸癌罹患リスクに関連するヒト感受性遺伝子の探索

日本人及び中国人の子宮頸癌患者・対照健康者においてゲノムワイド関連解析を行い、子宮頸癌への罹患と強く関連する SNP を網羅的に探索した。その結果、ゲノムワイドに有意な 2ヶ所の新規 SNP を、rs59661306 in 5q14 ($P = 2.4 \times 10^{-11}$) と rs7457728 in 7p11 ($P = 1.2 \times 10^{-8}$) に見出した。さらに Hi-C 解析により、5q14 の領域が ARRDC3 (arrestin domain-containing 3) 遺伝子のプロモーター領域と三次元的に相互作用していることを見出した。HPV 感染への ARRDC3 の関与を検討したところ、ARRDC3 ノックダウンにより HeLa 細胞に対する HPV 感染効率が著しく抑制された。HPV 感染の成立過程に ARRDC3 が働くことが明らかになり、子宮頸癌の罹患リスクに関連する新たな細胞遺伝子として示唆された。(竹内史比古[国立国際医療センター研究所]、終

元巖、森清一郎、黒田誠)

(3) 子宮頸癌で発現量が変動するサイトカインの同定

子宮頸部粘液中のサイトカインを網羅的に定量することで、子宮頸部病変の進展に伴って量が変動するサイトカインの探索を行った。臨床検体にて18種類のサイトカインを同時に測定した結果、4種類のサイトカイン(IFN- γ , GM-CSF, RANTES, cotaxin)のレベルが、病変進展に伴って有意に上昇することが示された。一方、HPV陽性検体では、G-CSFの分泌量が有意に低かった。また幾つかのサイトカインの組み合わせが、HPV陽性検体で有意に上昇していることが分かった。(終元巖、中村浩美;藤井多久磨[藤田医科大学])

4. 次世代 HPV ワクチンの開発

少なくとも8つの型の発癌性HPVを中和できるモノクローナル抗体(24B)を、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生体内で長期間、安定に発現させてHPV感染を防ぐ受動免疫ワクチンの開発を試みた。昨年度までに、24Bを発現するAAVベクターをマウスに接種し、その後1年以上にわたって血中に24Bが分泌され、HPV16、HPV18、HPV58の感染が阻害されることを確認した。一方、ヒト細胞株で発現させた24B(hu24B)の*in vitro*の中和活性は、マウス体内で発現させた24B(mo24B)や、ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体(hy24B)よりも約10倍高かった。今年度はその詳細を調べた。精製したhu24Bまたはhy24Bをマウスに接種し、その後、レポーターを発現するHPV16を経膣感染させた。*in vivo*でもhu24Bはhy24Bより高い感染防御効果を示した。hy24Bから糖鎖を除去すると*in vitro*の中和活性が約10倍上昇した。レクチンの結合性の違いから、hy24Bはhu24Bより多くのN-アセチルガラクトサミンをもつことがわかった。これらの結果から、発現する細胞によって抗体の糖鎖構造が異なり、中和活性に影響することが示唆された。(森清一郎)

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。ヒトiPS細胞から分化誘導した腸管オルガノイドにおいて各種分化マーカーの発現をqRT-PCR(CDX2, LGR5, Villin1)及び免疫組織染色(CDX2, CDH1)により確認した。

一方でゲノム編集によるFUT2遺伝子のノロウイルス感受性アレルへの変換を試みた。FUT2遺伝子には近傍(23kb上流)にSEC1P偽遺伝子が存在する。変換対象となるSNP

(rs601338)を含む領域は両者で保存されており、SEC1P遺伝子ではFUT2遺伝子の感受性アレルと同一の配列であった。そのためFUT2遺伝子の非感受性アレルを標的とするgRNAとSEC1P遺伝子にはミスマッチが存在する。しかしCas9-gRNA複合体と修復鋳型オリゴヌクレオチドを導入後の細胞クローンを調べるとSEC1PとFUT2の融合遺伝子が検出されSEC1P遺伝子も切断されている可能性が示唆された。この場合機能的なFUT2タンパク質の発現は望めない。FUT2遺伝子の変換にはマーカー遺伝子の挿入と削除を伴う二段階の方法が必要だと考えられた。(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* 解析を用いた構造生物学研究

IV-1. カプシドタンパク質の構造生物学研究

(1) HIV-1 Gagカプシドタンパク質の不定形領域によるウイルス粒子形成制御

近年、タンパク質内で定まった構造を取らない"disorder領域"がタンパク質の機能発現や機能調節に重要な役割を果たすことがわかってきた。HIV-1 Gagタンパク質カプシド(CA)に存在するinterdomain linker(IL)は、CAのN末端ドメインとC末端ドメインを連結する5アミノ酸残基から成るdisorder領域である。しかし、その機能はほとんど分かっていない。本研究では、*in silico*と実験を併用してILの構造・機能解析を実施した。その結果、ILは、(i)NTDとCTDに存在するCA-CA分子間相互作用界面の構造を制御する機能を持つこと(物理化学的機能)、(ii)細胞内におけるGag重合化の効率を制御する機能を持つこと(生化学的機能)、(iii)ウイルスの粒子形成効率を制御する機能を持つこと(生物学的機能)を見出した。未だ謎の多いdisorder領域の機能の解明、並びにHIVカプシドの構造機能制御とウイルス粒子形成制御の理解に貢献するとともに、新たなクラスの創薬標的の同定につながる知見を得た。(小谷治;駒貴明[徳島大学]、宮川敬、梁明秀[横浜市立大学]、横山勝;土肥直哉[徳島大学]、足立昭夫[関西医科大学]、野間口雅子[徳島大学]、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

清水(感染研ウイルス二部)、小池(東京都医学総合研究所)らの先行研究により、EV-A71カプシド構成因子VP1の145番目のアミノ酸置換は、EV-A71の抗体感受性、増殖能、病原性など多彩な性質を同時に変化させることが知られている。しかし、これら一連の変化の分子機序は全く謎のまま残されている。我々は、分子モデリングと分子動力学解析により、145変異がカプシド構造に与える影響を調べた。その結果、145アミノ酸置換は、置換箇所とは異なる遠隔領域に存在する中和エピトープや受容体結合部位の構造揺らぎの変化を誘導することを見出した。台湾Chan Gung Memorial Hospitalから、エピトープが判明している抗EV-A71カプシド単抗体を入手した。145変異により単抗体中和感受性が変化した株では、例外なくエピトープ部位の構造揺らぎの変化が認められた。この結果は、145アミノ酸残基は、離れた場所にあるカプシド相互作用部位の構造特性を調節するアロステリック制御部位であることを示唆する。(小谷治、中村浩美;Kuan-Ying Arthur Huang[Chan Gung Memorial Hospital]、横山勝;小林郷介[東京都医学総合研究所]、清水博之[ウイルス第二部]、小池智[東京都医学総合研究所]、佐藤裕徳)

(3) HIV-1 Gag 前駆体分子の折畳み様式に基づくウイルス複製制御

HIV-1 Gag前駆体タンパク質(Pr55^{Gag})は、ウイルス粒子形成機構に中心的役割を果たす構造タンパク質である。翻訳後、Pr55^{Gag}は特異的に細胞膜に結合し、Pr55^{Gag}を起点にしてウイルス分子の集合と未成熟粒子の形成が進む。このため、Pr55^{Gag}には、様々な相互作用部位が存在する。しかし、多彩な分子間相互作用がどのように制御されて粒子形成が順序立って進むのかは、ほとんどわかっていない。本研究では、分子動力学法を用いて溶液下のPr55^{Gag}全構造モデルを構築し、その構造特性を調べた。その結果、Pr55^{Gag}は、粒子形成初期に必要な分子内相互作用表面を露出し、後期に必要な相互作用表面は遮蔽するように折畳まれることを見出した。Gag前駆体の折畳み様式が粒子形成時の一連の相互作用に秩序と方向性を与えている可能性が示唆された。(小谷治、横山勝;小野陽[ミシガン大学]、佐藤裕徳)

(4) ノロウイルスカプシドと血液型抗原の結合様式

本研究では、ノロウイルスのカプシドを標的とする抗ウイルス薬を探索するための基盤情報として、カプシドと血液型抗原との相互作用の詳細を分子動力学計算により調べた。初めに、平衡構造を得るために初期構造からの構造変化を調

べた。いずれの血液型抗原も 50 ns 以上で安定な二量体構造を形成し、ほぼ平衡構造に達していた。次に、血液型抗原の結合様式を調べた。100 ns におけるスナップショットを見ると、いずれの血液型抗原もフコースがほぼ同じ位置に結合していた。フコース以外の糖は血液型抗原によって異なる位置にあった。次に、血液型抗原とカプシドの間に形成される水素結合の頻度を調べた。いずれの血液型抗原もフコースが高い頻度でカプシドの Thr344, Arg345, Asp374 と水素結合を形成していた。最後に、血液型抗原の結合エネルギーを調べた。Lewis Y 抗原の結合エネルギーが最も大きく、B 抗原と Lewis A 抗原の結合エネルギーが小さいことが明らかになった。(横山勝、小谷治、中村浩美、佐藤裕徳)

IV-2.エンベロープタンパク質の構造生物学研究

(1) HIV-1 エンベロープの適応進化

HIV-1 のサル細胞への適応の理解は、霊長類モデル開発の基盤となる。本研究では、HIV-1 NL4-3 が HIV-1 の複製を制限する性質を持つマカクザル細胞に、どのようにして Env を適応させるかを調べた。1つまたは2つ変異を持つウイルスがマカクザル細胞系、およびヒト CD4 またはマカクザル CD4 を発現するヒト細胞系において、著しく増強された複製能を示した。さらに、3つの適応変異を有するウイルスが常に最も良く増殖した。親株と変異ウイルスの増殖キネティクスは類似していたが、変異体は親ウイルスよりも可溶性 CD4 により著しく阻害された。CD4 と Env の複合体の分子動力学計算は、3つの変異が溶液中の CD4 に対する Env の結合親和性を高めることを示唆した。したがって、変異体 Env の CD4 に対する親和性は、親株 Env と比較して増強されている可能性が高い。CD4 結合部位抗体に対する変異体の中和感受性は、親ウイルスと有意差はなかったが、変異体は CD4 誘導エピトープ抗体および Env V1/V2 抗体による中和に対して高い耐性を示した。これらの結果は、3つの適応変異が CD4 親和性の増加を介して協調的にウイルス増殖を促進することを示唆している。(横山勝;土肥直哉、駒貴明[徳島大]、小谷治;野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[関西医大]、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 エンベロープの中和感受性制御

HIV-1 は、血中の抗体を逃れて持続感染を維持する。しかし、抗体感受性制御の構造原理は十分解明されていない。本研究では、HIV-1 エンベロープ三量体の分子動力学計算を行い、中和感受性株と中和抵抗性株の構造と動的性質の比較を行った。エンベロープ三量体構造を、NL4-3 と JR-FL で比較すると、V3 が三量体の中心に向かって配置され、NL4-3 と JR-FL で同一の傾向であった。しかし、NL4-3 の V3 tip は V1/V2 stem の外側に配置されていたが、JR-FL の V3

tip は V1/V2 stem の内側に配置されていた。次に、構造ゆらぎを知るために RMSF (根平均二乗ゆらぎ) を指標にして調べた。NL4-3 の RMSF は JR-FL の RMSF に比べ大きく、NL4-3 の V3 は JR-FL の V3 よりも大きくゆらいでいることが分かった。NL4-3 の V3 tip は V1/V2 stem の外側に配置され RMSF が大きい。一方、JR-FL の V3 tip は V1/V2 stem の内側に配置され RMSF が小さい。これは、NL4-3 では V3 tip が V1/V2 stem による構造ゆらぎの制限を受けていないが、JR-FL では構造ゆらぎの制限を受けていることを意味している。したがって、V3 tip の配置と構造ゆらぎは中和感受性を制御する因子であると考えられる。(横山勝、佐藤裕徳)

(3) HIV Env 阻害剤のスクリーニング

新しい作用機作を持つ抗 HIV 剤の開発は依然として重要度が高い。これまでに標的細胞受容体 CD4 の類似低分子化合物 (CD4mc: 新規 Env 標的薬) が、HIV Env gp120 の立体構造変化を誘起し、エピトープを露出させることで抗 HIV-1 抗体の中和活性を増強させることを見出している。この研究成果を進展させて、脆弱な状況の Env を誘導する新規 Env 標的阻害剤 (二機能性 Env 阻害剤) の研究開発を進めている。合成展開および評価で得られている二機能性 Env 阻害剤ライブラリー化合物の中でも、特に顕著な活性を示したトリテルペン誘導體群に対して、Env 結合機序解析を目的に分子動力学計算を実行した。分子動力学計算に用いる初期構造はホモロジーモデリング法により構築した。分子動力学計算は Amber16 の pmemd.cuda.MPI により実行した。力場はタンパク質には Amber ff14SB を、トリテルペン誘導體には GAFF2 を用いた。計算条件は、圧力を 1 bar、温度を 310K、塩濃度を 150 mM NaCl、時間を 100 ns とした。結果、これらの結合領域が gp120-gp41 境界領域であることが新たに示された。(横山勝; 原田恵嘉 [エイズ研究センター]、鳴海哲夫 [静岡大学]、吉村和久 [エイズ研究センター]、佐藤裕徳)

(4) 季節性インフルエンザ流行予測の基盤開発

季節性インフルエンザの流行は、それまでに流行していた株から分岐した変異株集団により維持される。そこでまず、近年の流行株の HA タンパク質の構造特性を調べ、変異の効果をも *in silico* で解析する基盤を作った。分子動力学法を用いて、A(H3N2) の糖鎖付加型 HA 三量体分子モデルを構築した。直近の季節性 H3N2 亜型流行株 (Clade 3C.2a) が共有する特徴的な HA 変異セットが HA の基質親和性に与える影響を調べ、実験結果との整合性を検証した。その結果、HA タンパク質の頭頂部 (受容体結合) 付近の構造変化により抗体防御能が高まる一方、立体障害により特定の形状を持つ基質でなければ結合できなくなっていること示した。さらにこ

の予測が実際の実験データと整合性を持つことを確認した。新たに出現した HA 抗原変異株がヒト集団で流行するには、HA タンパク質が「ヒト型受容体結合能」を維持する必要がある。この要件を *in silico* 定量的に判定する基盤ができた。(横山勝; 渡邊真治 [インフルエンザウイルス研究センター]、佐藤裕徳)

V. バイオテロ・新興再興感染症・薬剤耐性菌・媒介有害昆虫対策

V-1. 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ことは、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、昨年度に構築したロングリードを取得する次世代シーケンサー 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改良し、本年度までに、合計、216 株の病原細菌の完全長ゲノム配列を取得した。一部配列は、既に公開データベース上に公開済みである。

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

V-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、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) を構築している。本年度は、各種データベース管理の自動化プログラムを改変し、同一種内で近縁なゲノム配列を保有するデータを *kmer search* により回収するプログラムの構築を開始した。また、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 gGENEPID の開発を行った。現在、公衆衛生上重要となる病原細菌 34 種、合計

約 56 万サンプルのゲノム解析データを格納している。

(関塚剛史、谷津弘仁、黒田誠)

V-3. 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)) を構築し、運用している。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も開発し、運用している。本年度は、ピラジナミドに対する抵抗性関連遺伝子の変異箇所データベースの改良を行い、より効率よく薬剤耐性予測が可能となった。

(関塚剛史、黒田誠; 村瀬良朗、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、加藤誠也[公益財団法人結核予防会結核研究所])

V-4. 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、今年度までに合計、約 2,800 株、約 6,700 プラスミド配列を決定し、データベースを作成した。家禽より分離された薬剤耐性大腸菌の解析を行い、大規模ゲノム解析を実施した。その結果、多様な系統の CMY-2 産生 ESBL 大腸菌が、広範囲の地域の家禽腸管内に存在していることが明らかとなった。その一方で、これら分離株の一部では、高い保存性を有する *bla*_{CMY-2} 陽性プラスミドを保有しており、プラスミドの水平伝達が、家禽の大腸菌内で生じていることが強く示唆された。

(関塚剛史、谷津弘仁、稲嶺由羽、黒田誠; 松井真理、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])

V-5. 薬剤耐性プラスミドの由来をトレースする情報解析シ

テムの開発

ブラウザ経由で次世代シーケンス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、次世代シーケンス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、プラスミド間の類似性の3次元プロットによる図示化、および、階層的クラスタリング解析を実装させ、プラスミド間の関連性をより明確化するための開発を行った。

(関塚剛史、糸川健太郎、黒田誠)

V-6. 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2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。ゲノム分子系統解析の結果、1事例では、数塩基の差異しか認められず、同一クローンによる院内感染であることが強く示唆された。もう一方の事例では、時系列に沿ってゲノム上に塩基置換が段階的に数カ所ずつ生じ、カルバペネマーゼ遺伝子保有プラスミドにも、composite transposon を介して新たに ESBL 遺伝子が獲得されていた事例も確認された。また、院内で分離された、従来の細菌同定法では同定不能であった、カルバペネム耐性新規腸内細菌科細菌のゲノム解析も行い、菌種特定を行った。

(関塚剛史、山下明史、稲嶺由羽、黒田誠; 松井真理、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])

V-7. 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、国内の下水処理水を採取し、メタゲノム解析を行った。また、ESBL およびカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を分離後、完全長ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析を行った。その結果、国内の下水処理水より、*bla*_{KPC-2} 保有の肺炎桿菌が検出された。本分離株は、中国で分離された *bla*_{KPC-2} 保有肺炎桿菌に近縁であることが明らかとなった。国内での臨床分離株の報告が少ないにもかかわらず、

自然環境中の下水処理水より簡便に CPE を分離できたことから、下水処理水のモニタリングが、ワンヘルスアプローチに基づく薬剤耐性細菌の早期検知に貢献すると思われる。
(関塚剛史、谷津弘仁、黒田誠)

V-8. カルバペネム感性 *bla*_{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たところ、カルバペネム耐性株(A56-1R)が得られた。この2株のカルバペネマーゼ産生およびゲノムの比較解析を行った結果、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。昨年度までの研究により、*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。本転写因子が、その他遺伝子の転写調節も行なっていることが示唆されるため、RNAseq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、大腸菌の染色体上の遺伝子の発現調節も行っていることが強く示唆され、表現形質との相関も確認できた。
(瀬川孝耶、関塚剛史; 鈴木里和[薬剤耐性菌センター]、山下明史; 松井真理[薬剤耐性菌センター]、黒田誠)

V-9. 病原真菌の比較ゲノム解析に関する研究

近年、多剤抗真菌剤耐性 *Candida auris* が世界的に問題となっている。本真菌による感染患者の致死率も高く、国外では、アウトブレイクの報告も認められる。本真菌は、国内でも分離されているものの、主に外耳道感染由来であり、大部分の分離株では、薬剤耐性は認められていない。国内で分離された *C. auris* の全ゲノム解読を行い、国外株との比較ゲノム解析を行った。その結果、国内株は、国外株と比較してゲノムサイズが小さく、複数の環境ストレス応答関連遺伝子および細胞壁タンパク質遺伝子が欠損していることが明らかとなった。
(関塚剛史、黒田誠; 梅山隆、宮崎義継[真菌部]、槇村浩一[帝京大学大学院医学研究科 医真菌学]、井口成一、菊池賢[東京女子医科大学 医学部])

V-10. 疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性遺伝子解析ツールの開発

疾病媒介蚊の防除に最も用いられている殺虫剤であるピレスロイド類は、神経軸索で働く電位依存性ナトリウムイオンチャンネル(VGSC)の機能を阻害するが、ピレスロイドの効力を著

しく低下させる VGSC 上の変異が数多く知られている。我々はこれまでに標的シーケンシング技術により効率的に VGSC 遺伝子の配列解析を行う方法を開発しているが、この NGS リードデータから遺伝子型判定までを自動化したバイオインフォマティクスツール MoNaS (Mosquito Na⁺ channel mutation Search)を開発した。MoNaS は現在、ヒトスジシマカ、ネッタイシマカ、アカイエカ類のゲノムに対応しており、これ以外の衛生害虫についても順次対応を増やす予定である。MoNaS はオープンソースプログラムとして、そのソースコードを GitHub 上で無償公開している (<https://github.com/ItokawaK/MoNaS>)。また、インターネットを経由して広く研究者に利用できるように、MoNaS をサーバーに実装し WEB サービスとして提供を開始した (<https://gph.niid.go.jp/monas>)。
(糸川健太郎、谷津弘仁、関塚剛史、黒田誠; 葛西真治[昆虫医科学部])

VI. 病原性及び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、次世代シーケンサー(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。昨年度、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ており、本年度は、web アプリケーション用に改良した。ユーザーフレンドリー且つシームレスな機能ゲノム解析を実施するための基盤を構築した。
(関塚剛史、黒田誠; 山地俊之、花田賢太郎[細胞化学部]、加藤大志、直亨則、竹田誠[ウイルス第三部])

VII. 脳膿瘍患者由来 *Streptococcus intermedius* における7型分泌装置依存的細胞傷害性の解析

小児脳膿瘍患者の膿瘍サンプルより原因菌として *Streptococcus intermedius* TYG1620 株が分離された。これまでに本分離菌株の病原性解明を目的に、全ゲノム解読・in vivo 実験・in vitro 実験を実施した結果、7型分泌装置(T7SS)が重要な役割を担っていることが確認された。特に in vitro 実験では、上皮細胞株に対して T7SS 依存的な細胞傷害性を保有することが明らかとなった。つまり、TYG1620 株の上皮細胞株に対する細胞傷害性には T7SS 依存的分泌毒

素が責任因子として機能していることが示唆された。本年度は、細胞傷害性因子の同定を目的に TYG1620 株と T7SS 変異株の培養上清を用いた Secretome 解析を実施した。Secretome 解析の結果、T7SS 変異株培養上清中での Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa (ESAT-6) like protein の顕著な分泌量の減少が確認された。一方で、既知の病原因子である Intermedilysin, Sialidase A, Hyaluronate lyase 等の分泌量に顕著な変動は確認されなかった。ESAT-6 like protein は、結核菌およびグラム陽性病原細菌において T7SS 依存的な分泌毒素として報告されており、TYG1620 株においても上皮細胞に対する T7SS 依存的な細胞傷害因子として機能していることが強く示唆された。

(橋野正紀[AMED リサーチレジデント]、関塚剛史、稲嶺由羽、黒田誠)

VIII. 赤痢アメーバの比較ゲノム解析に関する研究

国内の腸アメーバ症患者および無症候性感染者由来の赤痢アメーバ分離株、KU50 および KU27 の全ゲノム解析を行い、詳細な比較ゲノム解析を行った。その結果、無症候性株 (KU27) で欠失している遺伝子、EHI_176590 を同定した。本遺伝子は、AIG1 ファミリータンパク質の一つであることが機能推定で予測されたが、実際の機能は不明であった。寄生動物部での詳細な解析の結果、EHI_176590 を強制発現させた際、細胞接着性が亢進することが明らかとなった。また、無症候性感染者由来の臨床検体に比べ、臨床症状を示す患者由来の検体では、EHI_176590 を保有する比率が有意に高かった。比較ゲノム解析を手掛かりとして、赤痢アメーバの遺伝的多様性、および、病態を決定に関連する病原因子の1つが明らかとなった。

(関塚剛史、黒田誠;津久井久美子[寄生動物部]、野崎智義[東京大学大学院医学系研究科])

IX. 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

次世代シーケンサー (NGS) を活用した感染症疑いの原因不明症例の病原体探索の依頼に対応した。

(1) 福岡県の高齢者施設の集団呼吸器感染症

10 名の患者咽頭拭い液のうち 1 名から NGS メタゲノム解析法にてヒトライノウイルス C を検出し、さらに感度の高い Nested-PCR 法にて 10 名中 8 名が同一のヒトライノウイルス C を検出した。ヒトライノウイルス C はピコルナウイルス科ライノウイルス属に分類され、遺伝子変異が激しく既存の検査法のみでは検出が困難になるケースが見られる。小児を中心に幅広い年代層が罹患する上気道炎の主な原因である一方で、高齢者においては集団感染事例の原因となる可能性が

有り、重症化することも考慮する必要がある。

(2) 溺水患者の重症肺炎および敗血症から分離された *Chromobacterium haemolyticum*

東北地方・都市圏の河川で溺水し、重症肺炎と敗血症を発症した患者の喀痰および血液から *Chromobacterium* 属の細菌が分離された。迅速同定法では正確な菌種が特定できなかったため、全ゲノム解析を実施し、*Chromobacterium haemolyticum* に該当することを突き止めた。

(3) 医療従事者の肝生検を介して感染した *Mycoplasma* による溶血性肝障害

肝障害を示す原因不明患者の治療中に医療従事者も当該患者と同様の症状を呈したため感染症が疑われた。病院の既存検査法で病原体が特定できなかったため、NGS メタゲノム解析の依頼があり実施した。血液検体の全 RNA の~30% を新規の *Mycoplasma* sp. が占めており、明らかに *Mycoplasma* 菌血症であることが判明した。レボフロキサシン投薬により一時的に寛解へ近づいたものの再燃したため、改めて血液検体の NGS メタゲノム解析を実施し GyrA のアミノ酸置換を認めたため、モキシフロキサシン・ミノサイクリンの併用投薬にて再燃を抑えることに成功した。

(橋野正紀[AMED リサーチレジデント]、関塚剛史、稲嶺由羽、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、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。(中村浩美、終元巖)

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kawai S, Fujii T, Kukimoto I, Yamada H, Yamamoto N, Kuroda M, Otani S, Ichikawa R, Nishio E, Torii Y, Iwata A. Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. *Sci Rep*,

- 2018 May 4;8(1):7070.
- 2) Takeuchi F, Kukimoto I, Li Z, Li S, Li N, Hu Z, Takahashi A, Inoue S, Yokoi S, Chen J, Hang D, Kuroda M, Matsuda F, Mizuno M, Mori S, Wu P, Tanaka N, Matsuo K, Kamatani Y, Kubo M, Ma D, Shi Y. Genome-wide association study of cervical cancer suggests a role for ARRDC3 gene in human papillomavirus infection. *Hum Mol Genet*, 2019 Jan 15;28(2):341-348.
 - 3) Masuda Y, Kanao R, Kawai H, Kukimoto I, Masutani C. Preferential digestion of PCNA-ubiquitin and p53-ubiquitin linkages by USP7 to remove polyubiquitin chains from substrates. *J Biol Chem*, 2019, 294(11):4177-4187.
 - 4) Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Kotani O, Sato H, Sekimukai H, Fukushi S, Suzuki T, Sato Y, Takeda M, Tashiro M, Hasegawa H, Nagata N. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*. 93: e01818-18, 2018.
 - 5) Doi N, Yokoyama M, Koma T, Kotani O, Sato H, Adachi A, Nomaguchi M. Concomitant Enhancement of HIV-1 Replication Potential and Neutralization-Resistance in Concert with Three Adaptive Mutations in Env V1/C2/C4 Domains. *Front Microbiol*. 2018.
 - 6) Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Mizuta K, Matsuzaki Y, Koike S. VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection. *J Virol*. 92: e00682-18, 2018.
 - 7) Siarot L, Chutiwitoonchai N, Sato H, Chang H, Sato H, Fujino M, Murakami T, Aono T, Kodama E, Kuroda K, Takei M, Aida Y. Identification of human immunodeficiency virus type-1 Gag-TSG101 interaction inhibitors by high-throughput screening. *Biochem Biophys Res Commun*. 503:2970-2976, 2018.
 - 8) Kawata T, Tada K, Kobayashi M, Sakamoto T, Takiuchi Y, Iwai F, Sakurada M, Hishizawa M, Shirakawa K, Shindo K, Sato H, Takaori-Kondo A. Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*. J109:103-111, 2018.
 - 9) Iwamoto T, Murase Y, Yoshida S, Aono A, Kuroda M, Sekizuka T, Yamashita A, Kato K, Takii T, Arikawa K, Kato S, Mitarai S. Overcoming the pitfalls of automatic interpretation of whole genome sequencing data by online tools for the prediction of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2019 Feb 28;14(2):e0212798.
 - 10) Yamaji T, Sekizuka T, Tachida Y, Sakuma C, Morimoto K, Kuroda M, Hanada K. A CRISPR Screen Identifies LAPTM4A and TM9SF Proteins as Glycolipid-Regulating Factors. *iScience*. 2019 Jan 25;11:409-424.
 - 11) Sekizuka T, Matsui M, Takahashi T, Hayashi M, Suzuki S, Tokaji A, Kuroda M. Complete Genome Sequence of bla (IMP-6)-Positive *Metakosakonia* sp. MRY16-398 Isolate From the Ascites of a Diverticulitis Patient. *Front Microbiol*. 2018 Nov 22;9:2853.
 - 12) Segawa T, Sekizuka T, Suzuki S, Shibayama K, Matsui M, Kuroda M. The plasmid-encoded transcription factor ArdK contributes to the repression of the IMP-6 metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP-6}*, leading to a carbapenem-susceptible phenotype in the *bla_{IMP-6}*-positive *Escherichia coli* strain A56-1S. *PLoS One*. 2018 Dec 11;13(12):e0208976.
 - 13) Kuroda M, Sekizuka T, Matsui H, Suzuki K, Seki H, Saito M, Hanaki H. Complete Genome Sequence and Characterization of Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* Clinical Isolate KUB3006 Carrying a *cfv(B)*-Transposon on Its Chromosome and *optR*-Plasmid. *Front Microbiol*. 2018 Oct 25;9:2576.
 - 14) Sekizuka T, Yatsu K, Inamine Y, Segawa T, Nishio M, Kishi N, Kuroda M. Complete Genome Sequence of a *bla_{KPC-2}*-Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan. *mSphere*. 2018 Sep 19;3(5). pii: e00314-18.
 - 15) Ito T, Sekizuka T, Kishi N, Yamashita A, Kuroda M. Conventional culture methods with commercially available media unveil the presence of novel culturable bacteria. *Gut Microbes*. 2019;10(1):77-91.
 - 16) Hayashi T, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Ishikawa D, Imai M, Fujita M, Kuroda M, Saruki N. Next-generation DNA sequencing analysis of two *Streptococcus suis* ST28 isolates associated with human infective endocarditis and meningitis in Gunma, Japan: a case report. *Infect Dis (Lond)*. 2019 Jan;51(1):62-66.

- 17) Kubota H, Uwamino Y, Matsui M, Sekizuka T, Suzuki Y, Okuno R, Uchitani Y, Ariyoshi T, Aoki W, Suzuki S, Kuroda M, Shinkai T, Yokoyama K, Sadamasu K, Funakoshi T, Murata M, Hasegawa N, Iwata S. FRI-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolated in Tokyo, Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Nov 1;73(11):2969-2972.
- 18) Nanbo A, Katano H, Kataoka M, Hoshina S, Sekizuka T, Kuroda M, Ohba Y. Infection of Epstein-Barr Virus in Type III Latency Modulates Biogenesis of Exosomes and the Expression Profile of Exosomal miRNAs in the Burkitt Lymphoma Mutu Cell Lines. *Cancers (Basel).* 2018 Jul 19;10(7). pii: E237.
- 19) Morimoto K, Aono A, Murase Y, Sekizuka T, Kurashima A, Takaki A, Sasaki Y, Igarashi Y, Chikamatsu K, Goto H, Yamada H, Kuroda M, Mitarai S. Prevention of aerosol isolation of nontuberculous mycobacterium from the patient's bathroom. *ERJ Open Res.* 2018 Jul 3;4(3). pii: 00150-2017.
- 20) Nakada-Tsukui K, Sekizuka T, Sato-Ebine E, Escueta-de Cadiz A, Ji DD, Tomii K, Kuroda M, Nozaki T. AIG1 affects in vitro and in vivo virulence in clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 2018 Mar 19;14(3):e1006882.
- 21) Shigemura H, Matsui M, Sekizuka T, Onozuka D, Noda T, Yamashita A, Kuroda M, Suzuki S, Kimura H, Fujimoto S, Oishi K, Sera N, Inoshima Y, Murakami K. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int J Food Microbiol.* 2018 Jun 2;274:45-51.
- 22) Ozaki K, Matsushima Y, Nagasawa K, Motoya T, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase Region in Norovirus Genogroup II. *Front Microbiol.* 2018 Dec 18;9:3070.
- 23) Ashizuka Y, Nakamura A, Yoshitomi H, Kobayashi T, Kajiwara J, Katsuki S, Kuroda M. Study on the Outbreak of Human Rhinovirus Species C Infection in a Welfare Facility in Fukuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2018 Nov 22;71(6):479-481.
- 24) Muthuirulandi Sethuvel DP, Anandan S, Devanga Ragupathi NK, Gajendiran R, Kuroda M, Shibayama K, Veeraraghavan B. IncFII plasmid carrying antimicrobial resistance genes in *Shigella flexneri*: Vehicle for dissemination. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Mar;16:215-219.
- 25) Lin YC, Kuroda M, Suzuki S, Mu JJ. Emergence of an *Escherichia coli* strain co-harboring *mcr-1* and *bla*(NDM-9) from a urinary tract infection in Taiwan. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Mar;16:286-290.
- 26) Alshahni MM, Yamada T, Yo A, Murayama SY, Kuroda M, Hoshino Y, Ishikawa J, Watanabe S, Makimura K. Insight into the draft whole-genome sequence of the dermatophyte *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Sci Rep.* 2018 Oct 11;8(1):15127.
- 27) Larsson DGJ, Andremont A, Bengtsson-Palme J, Brandt KK, de Roda Husman AM, Fagerstedt P, Fick J, Flach CF, Gaze WH, Kuroda M, Kvint K, Laxminarayan R, Manaia CM, Nielsen KM, Plant L, Ploy MC, Segovia C, Simonet P, Smalla K, Snape J, Topp E, van Hengel AJ, Verner-Jeffreys DW, Virta MPJ, Wellington EM, Wernersson AS. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ Int.* 2018 Aug;117:132-138.
- 28) Takahashi M, Nagasawa K, Saito K, Maisawa SI, Fujita K, Murakami K, Kuroda M, Ryo A, Kimura H. Detailed genetic analyses of the HN gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture, Japan. *Infect Genet Evol.* 2018 Apr;59:155-162.

2. 和文発表

- 1) 柗元 巖 APOBEC 変異導入を介したヒトパピローマウイルス発がん機構。薬学雑誌、2019;139(1):75-79.
- 2) 佐藤裕徳 *In silico* 分子間相互作用解析基盤の開発とウイルス研究への活用。"in silico 創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術" 第 1 章 10 節、pp107-115.技術情報協会、2018.1.31 発刊

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Hirose Y, Tenjimbayashi Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K, Kukimoto I. APOBEC signature mutagenesis in HPV16/52/58 genomes and its relevance to cervical carcinogenesis, 32nd International Papillomavirus Conference (2018年10月、シドニー)
- 2) Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I.

- Transcriptional cofactor VGLL1 is required for TEAD-mediated transcription of HPV early genes, 32nd International Papillomavirus Conference (2018年10月、シドニー)
- 3) Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K, Kukimoto I. Whole-genome analysis of HPV52/58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer, 32nd International Papillomavirus Conference (2018年10月、シドニー)
- 4) Baba S, Taguchi A, Kawata A, Hara K, Eguchi S, Adachi K, Mori S, Iwata T, Mitsuhashi A, Maeda D, Komatsu A, Nagamatsu T, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Kukimoto I, Kawana K. HPV16, 18, 52, and 58 differentially express virus-derived transcripts dependent on CIN grade, 32nd International Papillomavirus Conference (2018年10月、シドニー)
- 5) Kawata A, Taguchi A, Baba S, Eguchi S, Adachi K, Mori S, Iwata T, Mitsuhashi A, Maeda D, Nagamatsu T, Oda K, Osuga Y, Fujii T, Kukimoto I, Kawana K. Infiltration of plasma cells into stroma is possibly associated with higher grade of CIN, 32nd International Papillomavirus Conference (2018年10月、シドニー)
- 6) Sato H. A challenge for bridging virology and computational science (2018年5月、アメリカ合衆国、NIAID, NIH)
- 7) Sato H. A challenge for bridging virology and computational science (2018年5月、アメリカ合衆国、HIV Dynamics and Replication Program, NCI, NIH)
- 8) Kotani O, Yokoyama M, Ono A, Sato H. A proposal of molecular dynamics based structural models of the full-length, ligand-free pr55Gag precursor of HIV-1. Cold spring harbor 43rd annual meeting on Retroviruses. (2018年5月、アメリカ合衆国、Cold spring harbor)
- 9) Sumner C, Kotani O, Olson E, Musier-Forsyth K, Sato H, Ono A. The role of tRNA post-transcriptional modifications in inhibition of HIV-1 Gag membrane binding. Cold spring harbor 43rd annual meeting on Retroviruses. (2018年5月、アメリカ合衆国、Cold spring harbor)
- 10) Murakami T, Masayuki Fujino M, Yokoyama M, Kobayakawa T, Takeuchi H, Masuda T, Kotani O, Tamamura H, Sato H. Biological and molecular characterization of a novel anti-HIV-1 compound created by in silico design and de novo organic synthesis. Cold spring harbor 43rd annual meeting on Retroviruses. (2018年5月、アメリカ合衆国、Cold spring harbor)
- 11) Sakuragi S, Kotani O, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi J. The analysis of HIV-1 genome packaging by comparison of subtype sequences. Cold spring harbor 43rd annual meeting on Retroviruses. (2018年5月、アメリカ合衆国、Cold spring harbor)
- 12) Kotani O, Yokoyama M, Fujii K, Kobayashi K, Nagata N, Shimizu H, Koike S, Sato H. Cis-allosteric regulation of the interaction surfaces of enterovirus A71 capsid protein by the VP1 single amino acid residue at position 145. The 20th International Picornavirus Meeting; EUROPIC2018. (2018年6月、オランダ王国、Egmond aan Zee)
- 13) Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. Negative Strand Virus 2018 (2018年6月、イタリア Verona)
- 14) Ken-ichi Lee, Sunao Iyoda, Tomoko Morita-Ishihara, Keiko Kimata, Msanori Watahiki, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Makoto Ohnishi, EHEC Working Group Applicability of whole genome sequencing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 in the national surveillance. VTEC2018 10th International Symposium (2018年5月 イタリア・フィレンツェ)
- 15) Michiko Hayashi, Satowa Suzuki, Mari Matsui, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. The maintenance of antimicrobial resistance genes by multireplicon IncF plasmid F1:A2:B20 in epidemic clone *Escherichia coli* ST131. Plasmid Biology 2018 (2018年8月 アメリカ・シアトル)
- 16) Tsuyoshi Sekizuka, Koji Yatsu, Takaya Segawa, Yuba Inamine, and Makoto Kuroda. Complete genome sequence of a *bla*_{KPC-2}-positive *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the effluent of an urban sewage treatment plant in Japan. ESCMID/ASM Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance (2018年9月 ポルトガル・リ

スポン)

- 17) Tsuyoshi Sekizuka, Masanori Hashino, Yuba Inamine, and Makoto Kuroda. Growth Inhibition of *Streptococcaceae* in Healthy Gut Flora by Interocin of *Streptococcus intermedius* TYG1620 Isolated from a Human Brain Abscess. ESCMID/ASM Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance (2018年9月 ポルトガル・リスボン)
 - 18) Hidekazu Niwa, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Eri Uchida, Yuta Kinoshita, Yoshinari Katayama, Mitsutoshi Senoh, Haru Kato. Whole genome analysis of *clostridioides difficile* strains isolated from horses in Japan. 6th International Clostridium difficile Symposium (2018年9月 スロベニア・ブレッド)
 - 19) Takuya Yamagishi, Mari Matsui, Tsuyoshi Sekizuka, Hiroaki Ito, Munchisa Fukusumi, Tomoko Uehira, Miyuki Tsubokura, Atsushi Miyamoto, Akihiro Tawa, Shoji Nakamori, Hideki Yoshida, Makoto Kuroda, Satowa Suzuki, Keigo Shibayama, Tamano Matsui and Kazunori Oishi. A prolonged multispecies outbreak of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* due to transmissible plasmid with carbapenemase gene. ID week 2018 (2018年10月 アメリカ・サンフランシスコ)
2. 国内学会
- 1) 田中恒成、森定徹、岩田卓、佐伯直彦、飯島朋子、仲村勝、田中京子、青木大輔、柊元巖 子宮頸部細胞診 ASC-US における HPV 型と病理結果に関する検討。第 59 回日本臨床細胞学会 (2018年6月、札幌)
 - 2) 森定徹、佐伯直彦、飯島朋子、仲村勝、岩田卓、田中京子、青木大輔、柊元巖 当院における子宮頸部細胞診 ASC-US における HPV 型と病理結果に関する検討。第 59 回日本臨床細胞学会 (2018年6月、札幌)
 - 3) Hirose Y, Tenjimbayashi Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K, Kukimoto I. APOBEC signature mutagenesis in the genome of human papillomavirus and its relevance to cervical carcinogenesis、第 77 回日本癌学会学術総会 (2018年9月、大阪)
 - 4) 天神林友梨、廣瀬佑輔、小貫麻美子、松本光司、柊元巖 HPV58 バリエーション間での E7 タンパク質の機能解析。第 77 回日本癌学会学術総会 (2018年9月、大阪)
 - 5) Kukimoto I, Hirose Y, Tenjimbayashi Y, Onuki M, Iwata T, Matsumoto K. APOBEC signature mutagenesis in HPV genomes and its relevance to cervical carcinogenesis、第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 6) Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. 転写共役因子 VGLL1 による転写因子 TEAD を介したヒトパピローマウイルス初期遺伝子の転写。第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 7) Ishii Y, Taguchi A, Kukimoto I. HPV 持続感染細胞の探索。第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 8) 村田和義、ソン・チホン、戸高玲子、芳賀慧、藤本陽、横山勝、宮崎直幸、岩崎憲治、片山和彦 マウスノロウイルスキャプシドのクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析。日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会 (2018年6月、福岡)
 - 9) Song C, Todaka R, Haga K, Fujimoto A, Yokoyama M, Miyazaki N, Iwasaki K, Katayama K, Murata K. Capsid Structure of Murine Norovirus S7 revealed by cryo-electron microscopy. 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会 (2018年6月、福岡)
 - 10) ソンチホン、戸高玲子、三木元博、芳賀慧、藤本陽、横山勝、宮崎直幸、岩崎憲治、片山和彦、村田和義 マウスノロウイルス MNV-S7 のクライオ電顕単粒子構造解析。第 56 回日本生物物理学会年会 (2018年9月、岡山)
 - 11) 倉上真樹、小早川拓也、横山勝、村上努、金子萌美、小谷治、佐藤裕徳、玉村啓和 HIV-1 CA タンパク質の構造を基にした低分子型抗 HIV-1 剤の構造活性相関研究。第 62 回日本薬学会 関東支部大会 (2018年9月、東京)
 - 12) 佐藤裕徳 計算科学と下痢症ウイルス研究の橋渡し。第 30 回ウイルス性下痢症研究会 特別講演 (2018年10月、京都)
 - 13) 小谷治、横山勝、小林郷介、永田典代、清水博之、小池智、佐藤裕徳 VP1-145 アミノ酸によるエンテロウイルス A71 カプシド蛋白質相互作用表面のシス-アロステリック制御機構。第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 14) 横山勝、小谷治、中村浩美、佐藤裕徳 ノロウイルスカプシド - 血液型抗原複合体の分子動力学計算。第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 15) 駒貴明、小谷治、土肥直哉、宮川敬、梁明秀、横山勝、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 複製後期過程における Gag-CA リンカードメインの役割。第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018年10月、京都)
 - 16) 佐野芳、齊藤慎二、小谷治、Elly van Riet、相内章、田畑耕史郎、高橋宜聖、横山勝、佐藤裕徳、鈴木忠樹、

- 長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチン接種者由来
広域中和抗体のエスケープ変異体ウイルスの解析。第
66 回日本ウイルス学会学術集会 (2018 年 10 月、京都)
- 17) Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M,
Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe
S, Odagiri T. In vitro characterization of
multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses
carrying a dual amino acid substitution associated with
reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第 66
回日本ウイルス学会学術集会 (2018 年 10 月、京都)
- 18) 佐藤裕徳 感染症研究と計算科学の橋渡し: 病原体の
理解と制御に向けて。第 45 回防菌防黴学会年次大会
シンポジウム招待講演 (2018 年 11 月、東京)
- 19) 佐野芳、齊藤慎二、小谷治、相内章、Elly van Riet、田
畑耕史郎、高橋宜聖、横山勝、佐藤裕徳、鈴木忠樹、
長谷川秀樹 経鼻ワクチンにより誘導された抗インフル
エンザ HA ステム抗体のウイルス感染防御機構。第 22
回日本ワクチン学会学術集会 (2018 年 12 月、神戸)
- 20) Kotani O, Yokoyama M, Ono A, Sato H. A proposal of
molecular dynamics based structural models of the
Pr55Gag precursor of HIV-1. 第 32 回日本エイズ学会
学術集会・総会 (2018 年 12 月、大阪)
- 21) 横山勝、佐藤裕徳 HIV-1 エンベロープ三量体におけ
る中和感受性に関連する構造とゆらぎ。第 32 回日本エ
イズ学会学術集会・総会 2018 年 12 月、大阪)
- 22) Lowela S, Nopporn C, 佐藤洋隆、Hao C、小谷治、横
山勝、佐藤裕徳、藤野真之、村上努、近藤恭光、本田
香、長田裕之、上田一樹、伊藤嘉浩、青野俊裕、児玉
栄一、黒田和道、武井正美、間陽子 Characterization
of novel HIV-1 inhibitors targeting Gag-TSG101
interaction. 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会
(2018 年 12 月、大阪)
- 23) 原田恵嘉、野村渉、鳴海哲夫、横山勝、前田賢次、竹
内怜音、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-3。第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会
(2018 年 12 月、大阪)
- 24) 小早川拓也、倉上真樹、横山勝、村上努、金子萌美、
小谷治、佐藤裕徳、玉村啓和 HIV-1 カプシドタンパク
質の構造を基盤とした低分子型抗 HIV-1 剤の構造活性
相関研究。日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月、千葉)
- 25) 関塚剛史、加藤公敏、黒田誠、大草敏史 潰瘍性大腸
炎患者由来 *Fusobacterium varium* Fv113-g1 株のゲノ
ム・トランスクリプトーム解析。第 22 回腸内細菌学会
(2018 年 5 月、江戸川区)
- 26) 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、渡部綾子、黒田誠、秋庭正
人 *Salmonella* genomic island 3 は integrative and
conjugative element である。第 161 回日本獣医学会学
術集会 (2018 年 9 月、つくば市)
- 27) 池田昌輝、里村和浩、関塚剛史、花田賢太郎、遠藤俊
徳、長田直樹 旧世界ザルゲノムに存在する内在性サ
ルレトロウイルス (SERV) 配列の探索と分子系統解析。
日本遺伝学会第 90 回大会 (2018 年 9 月、生駒市)
- 28) Hiroshi Katoh, Tsuyoshi Sekizuka, Masafumi Sakata,
Yuichiro Nakatsu, Reiko Nakagawa, Minoru Kidokoro,
Makoto Kuroda, Makoto Takeda. The R2TP complex
modulates viral RNA synthesis of mumps virus. 第 66 回
日本ウイルス学会 (2018 年 10 月、京都市)
- 29) 橋野正紀、関塚剛史、稲嶺由羽、黒田誠 小児脳膿瘍
患者より分離された *Streptococcus intermedius* TYG1620
株における Type Seven Secretion System の機能解析。
第 101 回日本細菌学会関東支部総会 (2018 年 11 月、
港区)
- 30) 瀬川孝耶、関塚剛史、鈴木里和、柴山恵吾、松井真理、
黒田誠 プラスミド性転写調節因子 ArdK によるカルバ
ペネマーゼ遺伝子 *bla_{IMP-6}* 転写抑制機序の解析。第
101 回日本細菌学会関東支部総会 (2018 年 11 月、港
区)
- 31) 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、渡部綾子、黒田誠、秋庭正
人 *Salmonella* genomic island 3 は integrative and
conjugative element であり、宿主の重金属抵抗性を増
強させる。日本細菌学会関東支部総会 (2018 年 11 月、
港区)