

19. 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。計算科学の解析環境の整備・強化を進めながら、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連携して学際研究を展開することにより、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・機能に及ぼす影響をコンピュータシミュレーションする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てている。令和2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。

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。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サーデータ解析を同時に行えるシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan)をこれまでに構築し、継続して運用している。本システムを用いて、病原細菌、薬剤耐性菌、ウイルスのゲノム解析及びデータベース管理を実施している。それらデータベース上のゲノム情報を用いて、大規模ゲノム比較解析およびゲノム分子疫学解析も遂行した。また、細菌感染症において重要な生物種の公開ゲノム配列および生解読データを回収し、GenEpid システムで解析した結果をデータベース化する gGENEPID の開発・運用を引き続き運用している。感染症が疑われる難病及び原因不明症例のメタゲノム解析も進めており、これらデータ解析も、GenEpid システムで運用している。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、ESBL および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、真核生物のゲノム解析にも着手し、昆虫ゲノム解析およびヒト培養細胞のバイオインフォマティクス解析も進めている。本年度末は、SARS-CoV-2 のゲノム解析に重点を置き、地方自治体、本研究所の各部・センターと協力し、感染拡大を阻止するためのゲノムデータの蓄積および解析を行なっている。

業績 調査・研究

I. HPV に関する研究

1. HPV の感染増殖機構の研究

(1) HPV 細胞侵入機構の解明

HPV の細胞内侵入に関わる宿主タンパク質を網羅的に解析するため、ウシパピローマウイルス E2 タンパク質を発現するプラスミドを内包した HPV18 偽ウイルスを作成し、CRISPR ノックアウト HeLa 細胞ライブラリーに感染させた。14 日間の培養後、生存した細胞から染色体 DNA を抽出し、sgRNA 配列とリード数を次世代シーケンサー

で解析した。へパラン硫酸合成と ER/Golgi など小胞輸送に関連する sgRNA に加え、gamma secretase 複合体の sgRNA が顕著に濃縮された。HPV は細胞表面のへパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) に結合し取り込まれた後、細胞内を逆方向に移動する。Gamma secretase はこの逆行輸送に関与することが知られている。今回の網羅解析により、HPV 細胞内侵入過程における HSPGs と gamma secretase の重要性が示され、本システムが正しく機能していることがわかった。(石井克幸、関塚剛史、山地俊之 [細胞化学部])

(2) HPV ゲノム保持に働く転写因子 HOXC13 に関する研究

毛包に多く発現する転写因子 HOXC13 は HPV ゲノム保持能を有するヒト角化細胞 NIKS にも発現しており、siRNA によるノックダウンで HPV16 及び HPV18 の初期遺伝子の発現は低下する。また、HOXC13 は同 HPV 転写調節部位 (LCR) に結合する。HOXC13 発現プラスミドを NIKS 細胞と子宮頸外部細胞 Ect1 及び子宮頸内部細胞 End1 に導入し、HPV16 のプロモーター活性をルシフェラーゼによるレポーターアッセイで測定した。全ての細胞において活性の上昇が観測され、特に Ect1 細胞で顕著であった。HOXC13 は HPV16 の初期遺伝子の発現を正に調節することが遺伝子導入実験でも示された。(石井克幸)

(3) HPV ゲノム維持に関わる細胞タンパク質の探索

HPV16 ゲノムを安定に保持するヒト骨肉腫細胞 U2OS (U2OS/HPV16) を用いて宿主ヒト細胞の抗ウイルス因子のスクリーニングを行った結果、HPV16 ゲノム量を低下させる宿主タンパク質として RNA ヘリカーゼである MOV10 を見出した。ヒト子宮頸癌細胞 C33A にて、HPV 複製タンパク質 E1/E2 の共発現により、HPV 複製オリジン配列を含むルシフェラーゼプラスミドの複製レベルを定量化する細胞アッセイを用いて、内在性 MOV10 の siRNA ノックダウンの効果を調べたところ、MOV10 ノックダウンにより HPV 複製レベルが有意に低下することが示された。また U2OS/HPV16 で特異的に発現する細胞遺伝子群を探索するために、U2OS/HPV16 及び U2OS から全 RNA を精製し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った。その結果、U2OS/HPV16 において U2OS と比較して nerve development に関わる遺伝子群の発現低下が認められ、その中にはホメオボックス遺伝子 (HOXA5, HOXB2, HOXD3) が含まれていた。(田中恒成、終元巖)

(4) PTEN が HPV 複製に及ぼす作用の解析

これまでに PIP₃ を脱リン酸化する PTEN の活性が、U2OS/HPV16 で上昇していることが示唆されたことから、PTEN

活性が HPV DNA 複製に及ぼす効果を、培養細胞での一過性 HPV 複製系で検討した。HPV 複製オリジン配列をルシフェラーゼプラスミドに組み込み、ヒト子宮頸癌細胞 C33A にて HPV 複製タンパク質 E1/E2 の共発現によりオリジンプラスミドの複製を誘起して、HPV 複製レベルをルシフェラーゼ活性により定量化する細胞アッセイを用いた。C33A は内在性 PTEN の発現が認められないが、発現プラスミドの導入により FLAG タグ付き PTEN を過剰発現させると HPV DNA 複製が約 30%抑制された。一方、酵素活性を失った PTEN 変異体 (C124S, G129E) では抑制効果が若干減弱した。これらの結果から、PTEN 活性の上昇によりウイルスゲノム複製が低レベルに抑えられることが、宿主免疫系から逃れる HPV の潜伏持続感染につながっている可能性が考えられた。(田中恒成、終元巖、佐々木雄彦 [東京医科歯科大学])

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 子宮頸癌及び前癌病変での 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。本年度は 201 検体の HPV タイピングを実施した。2012 年からの累積検体数は 3169 検体となった。(中村浩美、終元巖、岩田卓 [慶應大学])

(2) HPV67 ゲノム配列解析

国際癌研究機関 (IARC) は、200 種以上の HPV 遺伝子型のうち、12 種を発癌性が認められる Group 1、1 種を発癌性がおそらくある Group 2A、7 種を発癌性が疑われる Group 2B と分類している。HPV67 は系統樹上は Group 1 の HPV16 と同じ species $\alpha 9$ に属するが、IARC の分類では Group 2B に含まれる。HPV67 が単一感染として検出された子宮頸部擦過細胞検体 (SCC, 2 例; CIN2/3, 6 例; NILM, 1 例) より DNA を抽出し、全長ウイルスゲノムを PCR にて増幅したのち、次世代シーケンサーを用いてその配列を決定した。得られた全長ゲノム配列に対して、最尤法による系統樹解析を行い、各検体の HPV67 バリエーション帰属を決定した。その結果、9 例の HPV67 陽性検体すべてが、lineage A に帰属しており、8 例が sublineage A1、1 例が sublineage A2 であった。(小暮剛太、終元巖、岩田卓 [慶應大学]、小貫麻美子 [昭和大学]、松本光司 [昭和大学])

(3) HPV ワクチン効果を検証するための疫学研究

前癌病変及び子宮頸癌と診断された 40 歳未満の日本人女性における HPV16/18 検出率を経年的に調べることで、人口レベルでの HPV ワクチン導入効果を検証することを目的と

している。そのために全国 22 か所の拠点病院で子宮頸部擦過細胞検体を収集し、国立感染症研究所に検体を集約して、精度と信頼度がバリデートされた HPV タイピングを実施する。令和 2 年度は合計 1087 例(CIN1 162 例、CIN2 242 例、CIN3 504 例、AIS 35 例、子宮頸部浸潤癌 144 例)の HPV タイピングを実施して、HPV 型判定結果を昭和大学の研究事務局に送付した。また PCR にて増幅されたが 31 種類の HPV 型特異的プローブで検出できなかった HPVX 検体(13 例)については、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い、その HPV 型判定を行った。本研究の以前の研究期間中に用いられていた HPV タイピング法(リニアアレイ)と、今回新たに採用した HPV タイピング法(PGMY-CHUV)との間の結果の一致度を検証し、HPV16/18 の検出に関して二つの方法は完全に一致することを確認した。(中村浩美、柗元巖、岩田卓[慶應大学]、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 の遺伝子発現機構に関する研究

HPV の初期遺伝子は、自身のゲノム複製や子宮頸癌細胞の増殖に必須なウイルスタンパク質をコードし、転写調節領域(LCR)により発現が制御される。これまでに、細胞の転写因子 TEAD1 と転写共役因子 VGLL1 の複合体が初期遺伝子の転写に必要なことを明らかにし、LCR に 11 カ所の TEAD1 結合配列を特定した。そのうち 6 カ所は、初期遺伝子の転写活性化因子である NFI の結合配列と部分的にオーバーラップしていた。TEAD1/VGLL1 と NFI が協調して転写を調節している可能性を考え、今年度はこれら 3 つのタンパク質間の相互作用を調べた。それぞれの発現ベクターを HEK293 細胞に同時にトランスフェクションし、NFI に対する免疫沈降を行った結果、TEAD1 及び VGLL1 が共沈した。NFI と VGLL1 の発現ベクターのみをトランスフェクションした場合、VGLL1 は共沈しなかったことから、NFI は TEAD1 を介して TEAD1/VGLL1 複合体に結合し、初期遺伝子の転写を活性化している可能性が示唆された。(森清一郎)

(2) HPV の遺伝子発現に関与する宿主因子の探索

TEAD1 と複合体を形成する他の宿主因子を探索する目的で、野生型及び TEAD1 結合配列に変異を導入した LCR-DNA に結合する子宮頸癌細胞の核タンパク質を Data independent acquisition(DIA)プロテオーム解析によって網羅的に調べた。変異導入により、TEAD1 と VGLL1 を含む約 50 種類の宿主タンパク質の LCR-DNA への結合が 1/3 以下に減少した。このうち約 20 種類のタンパク質について、siRNA を用いて HPV の遺伝子発現との関りを調べた。転写調節機能や RNA 結合能を持つ 5 つのタンパク質の発現をそれぞれノック

ダウンすると HPV16 及び HPV18 の初期遺伝子の発現が顕著に低下したことから、これらの宿主因子は TEAD1 と転写複合体を形成して HPV の遺伝子発現に寄与している可能性がある。(森清一郎)

(3) HPV16 E7 により発現が変動する細胞遺伝子の解析

HPV16 の三つのバリエーション(A1, A4, A5)は子宮頸癌の進展リスクが異なり、A4 は子宮頸癌で検出頻度が高く、A5 は子宮頸部軽度病変で検出頻度が高い。これらの HPV16 バリエーションは、それぞれ特徴的なアミノ酸配列を持つ E7 タンパク質をコードしている。これらの E7 の細胞機能の違いを明らかにするために、A1, A4, A5 の E7 を発現する組換えレトロウイルスを作成し、ヒト子宮頸部角化細胞株(HCK1T)に感染させて、それぞれの E7 を安定に発現する細胞(HCK1T_A1, HCK1T_A4, HCK1T_A5)を得た。同時にベクターウイルスを感染させた細胞(HCK1T_V)も作成した。これらの細胞から全 RNA を調製し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。TCC-GUI により発現変動遺伝子(DEG)群を探索した結果、10% FDR を満たす DEG として、HCK1T_A1/A4/A5 と HCK1T_V の比較では 59 遺伝子、HCK1T_A4 と HCK1T_A1/A5 の比較では 48 遺伝子、HCK1T_A5 と HCK1T_A1/A4 の比較では 37 遺伝子が抽出された。E7 を発現している HCK1T_A1/A4/A5 ではコントロールの HCK1T_V と比べて、MCM2, MCM5, MCM7 などの細胞周期に関連する遺伝子群の発現上昇、IFIT2, IFI44L などの抗ウイルス遺伝子の発現低下が認められた。さらに E7 バリエーション間で発現量が異なる遺伝子として、HCK1T_A4 で TOMM6 の発現上昇、ZC3H11A の発現低下、HCK1T_A5 で ZACN の発現上昇、MFS2B の発現低下が検出された。(柗元巖)

4. HPV 標的細胞についての研究

(1) HPV 標的細胞の探索

子宮頸部の扁平上皮と円柱上皮の境界部(SCJ)は高リスク型 HPV の感染部位と考えられているが、標的細胞は同定されていない。高リスク型である HPV18 の LCR で制御された GFP 発現レンチウイルスを作成し、臨床検体の SCJ を構成する細胞に感染させた。僅かだが GFP 陽性細胞が FACS により確認できた。この GFP 陽性細胞を解析することにより HPV 標的細胞の特性が明らかになる可能性がある。(豊原佑典[東京大学]、石井克幸、田口歩[東京大学])

(2) iPS 技術を用いた HPV 標的細胞の作成

HPV18 の LCR 制御 GFP 遺伝子をもつ iPS 細胞の作成を試みた。上記制御遺伝子を有するレンチウイルスを iPS 細胞に感染させ、薬剤耐性となるクローンを回収した。中間中胚葉に分化誘導させ、3 継代培養した後、HOXC13 遺伝子をトラン

スタクションした。9 クローンのうち 1 クローンが GFP 陽性を示した。HPV18 LCR 制御 GFP 遺伝子を組み込んだ iPS 細胞を作成することができた。(石井克幸)

II. 相同配列を避けた iPS 細胞のゲノム編集

ヒト iPS 細胞において相同配列が存在する領域に対してアレル特異的にゲノム編集を行う手法を調べた。置換変異を二段階で導入するために、人工スパーサー配列に挟まれた蛍光タンパク質遺伝子と薬剤耐性遺伝子を long ssDNA として準備し、HDR のドナーとして用いた。long ssDNA の導入効率を高くするような遺伝子導入条件により、CRISPR/Cas9 システムとともにこの long ssDNA をヒト iPS 細胞に導入し、薬剤耐性コロニーの出現を調べたが、コロニーの出現が見られなかった。ヒト iPS 細胞はゲノム編集過程の DNA 二本鎖切断に感受性が高いとされているため、p53 mRNA に対する siRNA を同時に導入することによりコロニー数の増加を図ったが、それでも 1 実験 (35mm dish) あたり数個にとどまり、さらなる最適化が必要と考えられた。(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会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。特記すべき有害事象は認められなかった。(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. HIV-1 の構造生物学研究

(1) 拡張アンサンブル法による HIV-1 エンベロープ三量体の構造的特徴の解析

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の粒子表面上のエンベロープタンパク質は、三量体を形成することで主要中和エпитープを遮蔽することが知られている。しかし、遮蔽構造の発現・維持の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。我々は、HIV-1エンベロープタンパク質三量体の構造的特徴を、拡張アンサンブル法の一つである Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GaMD) シミュレーションにより調べた。MDシミュレーションはAmber16のpmemd.cudaモジュールにより実行した。計算条件は、温度310K、圧力1 bar、塩濃度150 mM NaClとした。2 nsのConventional MD後、

2 μ sのGaMDを実行した。GaMDにより得られたトラジェクトリーは AmberTools17のcpptrajにより解析した。その結果、GaMDにより得られたエンベロープタンパク質三量体の平衡構造は、それぞれのプロトマーが非対称に配置されていた。さらに、それぞれのプロトマーがなす角度は、一定ではなく時間ともに変化していることが明らかになった。(横山勝、小谷 治、中村浩美、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 エンベロープにおける脆弱部位の推定

HIV-1 は易変異性ウイルスであり、変異を許容し難い脆弱部位は明らかでない。ウイルス粒子表面に位置するエンベロープの脆弱部位を知ることができれば、その部位はウイルスにとって致命的な治療標的となる。本研究では、統計的カップリング行列およびランダム行列理論により HIV-1 エンベロープにおける脆弱部位の推定を行った。我々の解析により得られた最大固有値のセクターを HIV-1 エンベロープ三量体の立体構造に表示すると、Clade BとClade Cのどちらにおいても、C-C loopに位置していた。最大固有値のセクターの多様性解析を行うと、アミノ酸残基は極めて保存されていた。このセクターを構成するアミノ酸残基に変異導入解析を行うと、いずれの変異もウイルス感染性が無くなることが明らかになった。このセクターは HIV-1 エンベロープの脆弱部位であると考えられる。(横山勝、小谷治、土肥直哉[徳島大]、駒 貴明[徳島大]、野間口雅子[徳島大]、佐藤裕徳)

(3) HIV カプシド阻害剤候補の探索

HIV Gagタンパク質は、HIVの生活環全体に関わる重要な構造タンパク質であるため、既存の抗HIV薬とは作用点の異なる新たなクラスの創薬シーズ創出が期待できる。我々は、これまで*in silico*スクリーニングによって、HIV-1カプシド(CA)の二量体化に関与するHelix9-Helix9相互作用を標的とする低分子化合物を複数選定してきた。本研究では、その中の一つで、MKN-3と命名した化合物の誘導体(TKB063)の抗HIV-1活性の評価および作用機序に関する基本的な解析を行った。新規抗HIV-1低分子化合物TKB063は、HIV-1複製後期過程においてCAに作用して、産生されるウイルスの感染性を低下させていることが示唆された。(横山勝、小谷治、村上努[エイズ研究センター]、倉上真樹 [東京医科歯科大]、小早川拓也 [東京医科歯科大]、辻 耕平[東京医科歯科大]、玉村啓和[東京医科歯科大]、佐藤裕徳)

(4) HIV-1多機能分子の構造生物学研究

HIV-1ゲノムRNAのLTR領域は、ウイルス複製の様々な素過程(逆転写、パッケージング、粒子形成)で機能する多機能分子の性質を持つ。特に、粒子形成におけるLTR構造・機能

研究は未開拓分野であり、次代の抗HIV創薬の有力標的となりうる。しかし、未だLTRの多機能発現の仕組みは不明である。今年度は、パッケージング能を低下させる塩基置換2箇所(G226/A227)がLTR構造に与える影響について調べた。既知のLTR構造情報(PDB ID: 2N1Q)から分子モデリングにより構築したLTRモデルを用いて、変異体モデル(G226/A227置換)を構築した。その変異体の準安定構造を獲得するために、MDシミュレーションを実施した。その結果、2塩基置換によりLTR構造が不安定化することがわかった。さらに2塩基置換はLTRの根幹構造であるthree-way junction 領域の動態、折畳み様式、相互作用ネットワークを変化させた。これらの結果より、G226/A227がLTRの構造安定性をシス制御する機能部位であることを明らかにした。(小谷治、横山勝、櫻木小百合[大阪大学 微生物病研究所]、櫻木淳一[大阪大学 微生物病研究所]、塩田達雄[大阪大学 微生物病研究所]、佐藤裕徳)

IV-2. インフルエンザウイルスの構造生物学研究

(1) 抗インフルエンザHAストーク抗体による中和と中和逃避の構造生物学的研究

様々なインフルエンザウイルス亜型に対して中和能を有する広域中和抗体の一つである抗HAストーク抗体の研究開発に向けて、抗HAストーク抗体F11クローンによる中和と中和逃避の構造基盤の構築を目指す。今年度は、既知のHA三量体/抗HAストーク抗体の結合様式(PDB ID: 5JW4)を鋳型にして、糖鎖付加型HA三量体/F11-Fab複合体モデルを構築した。その複合体モデルを用いて、MDシミュレーションを実施した。その結果、F11抗体は糖鎖付加型HAストーク構造上のHydrophobic groove近傍に結合し、二つのHA単量体を架橋して結合することがわかった。次にF11抗体改変に向けた抗体変異導入解析を実施し、HA親和性を上げるF11抗体アミノ酸変異部位4箇所を予測した。今後は、実験で予測した変異の効果(中和能、抗体結合能)を検証する。(小谷治、齊藤慎二[インフルエンザウイルス研究センター]、鈴木康司[インフルエンザウイルス研究センター]、相内章[感染病理部])

(2) インフルエンザ A (H3N2) HA タンパク質三量体の適応進化のための構造的基礎の解析

近年、インフルエンザウイルス A (H3N2) のクレード 3C. 2a において、赤血球凝集活性が低下している。この赤血球凝集低下の理由を明らかにするために、H3N2 HA タンパク質の分子動力学計算を実行し、3C. 2a 特異的突然変異(A128T/N144S/S159Y/K160T)が A (H3N2) HA タンパク質の立体構造に及ぼす影響を調べた。H3N2 のワクチン株と 3C. 2a 特異的突然変異を有する赤血球凝集低下株のシアル酸(三

糖および五糖)との結合エネルギーの比較を行った。ワクチン株では三糖も五糖と同様に強く結合する。一方、赤血球凝集低下株では五糖では結合するが、三糖では結合が困難であると考えられる。この解析結果は、糖鎖チップの実験結果を説明する。(横山 勝、小谷 治、中村浩美、藤崎誠一郎[インフルエンザウイルス研究センター]、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)

IV-3. SARS-CoV-2の構造生物学研究

(1) 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)S タンパク質の構造安定性評価系の構築

コロナウイルス粒子上のスパイク(S)タンパク質のアミノ酸置換は、ウイルスの受容体親和性や病原性の生物活性を変化させる。新型コロナウイルス SARS-CoV-2 について、変異が S タンパク質の構造・機能に与える影響を調べることは COVID-19 リスク評価の一助につながる。今年度は、国内の臨床試料中のウイルスにみられた 7 カ所のアミノ酸変異(S50L, R357K, E471K, D614G, R683G, A846V, D950Y)が S タンパク質の物性に与える影響について MD シミュレーションを用いて調べた。特にウイルスの感染・伝播能に関わる S タンパク質の構造安定性について評価した。S タンパク質三量体モデルの MD シミュレーションを実施し、熱力学的に準安定な S タンパク質三量体構造を取得した。その構造を用いて、in silico 変異導入解析から、7 カ所の変異による構造安定性への影響を評価した。その結果、S タンパク質の構造安定性を向上させる変異(S50L, A846V, D950Y; Stability -2.50 ± 0.74 kcal/mol)と低下させる変異(R357K, E471K, D614G; 2.08 ± 0.88 kcal/mol)に区分することができた。R683G 変異は構造安定性に影響しなかった(0.03 ± 0.64 kcal/mol)。これらの結果より、ウイルスが生存するために必要な S タンパク質の構造安定性には幅があると考えた。(小谷治、横山勝、関塚剛史、糸川健太郎、黒田 誠)

(2) 抗 SARS-CoV-2 S タンパク質抗体の中和・中和逃避の構造解析基盤の構築

SARS-CoV-2 ウイルス粒子表面にある S タンパク質は抗体の標的分子となるため、COVID-19 ワクチン開発における有力な抗原の一つである。しかし、抗 S 抗体による中和と中和逃避の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。今年度は、既知の S タンパク質/抗 S 抗体複合体の構造情報もとに抗 S 抗体の中和・中和逃避の構造解析基盤を構築した。SARS-CoV-2 S タンパク質三量体モデル(Close 型)と RBD 領域が露出した SARS-CoV-2 S タンパク質三量体モデル(Open 型)を用い、既知の S タンパク質/抗 S 抗体複合体の構造情報 4 種類(S309 抗体、CR3022 抗体、cc12.1 抗体、4A8 抗体)

を鋳型にし、それぞれ S タンパク質/抗 S 抗体複合体モデルを構築した。それらのモデルを用いて、MD シミュレーションを実施し、得られた準安定構造から結合様式を調べた。その結果、各抗体が相互作用する S タンパク質上のアミノ酸残基を特定した。次に、*in silico* mutagenesis 法を用いて、変異による S タンパク質変異体の抗体親和性への影響を調べた。その結果、変異による抗体親和性への影響は、①どのアミノ酸に変えても抗体親和性が下がる、②どのアミノ酸に変えても抗体親和性が上がる、③どのアミノ酸に変えても抗体親和性に影響しない、④アミノ酸の種類によって抗体親和性が変化する、4 つのグループに分類された。今後、分類されたアミノ酸群の構造特性について調べ、COVID-19 リスク評価に向けた構造解析基盤の構築を目指す。(小谷治、横山勝、関塚剛史、糸川健太郎、黒田誠)

IV-4. デングウイルスの構造生物学研究

(1) デングウイルス 2 型 E タンパク質と中和抗体の分子動力学計算による解析

デングウイルスによる感染症の重症型デング発症機序の一つとして抗体依存性感染増強 (ADE) があり、単クローン抗体には、増強活性の強い抗体と中和活性の強い抗体がそれぞれ存在する。デングウイルスと中和抗体の結合様式の解明は、ADE を避けた治療抗体やワクチンの開発に重要な基盤となる。本研究では、デングウイルス 2 型 (DV2) 特異的に強力な中和活性を示すマウス単クローン抗体 2-14-8 の結合部位を明らかにするために、DV2 の 16681 株 E/M タンパク質と 2-14-8 抗体の複合体の分子動力学 (MD) 計算を行い、DV2 の 16681 株と逃避変異株 (R89S 株) の比較を行った。E/M タンパク質と 2-14-8 抗体の結合エネルギーを計算すると、16681 株または R89S 株の 2-14-8 抗体との結合エネルギーは、それぞれ -35.28 ± 7.16 kcal/mol、 -1.70 ± 7.54 kcal/mol であった。R89S 株の 2-14-8 抗体との結合エネルギーは、16681 株よりも大きく低下することが明らかになった。(横山勝、中山英美 [大阪大学 微生物病研究所]、小谷 治、塩田達雄 [大阪大学 微生物病研究所]、佐藤裕徳)

V. 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

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。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 の構築している。現在、公衆衛生上重要となる病原細菌 36 種、合計約 95 万サンプルのゲノム解析データを格納している。更に、本年度は SARS-CoV-2 のゲノム解析を行う web アプリケーションの開発・改良も実施し、地方衛生研究所が解読したゲノム解読データの解析を行う基盤を構築した。(関塚剛史、谷津弘仁、糸川健太郎、黒田誠)

VI. 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これまで構築してきた。また、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、SARS-CoV-2 ゲノム配列決定に重点を置き、本年度までに、合計 20,402 サンプルの全長ゲノム配列を取得し、公開データベース GISAID にて公開済みである。(関塚剛史、糸川健太郎、橋野正紀、谷津弘仁、田中里奈、黒田誠)

VII-1. SARS-CoV-2 比較ゲノム分子疫学解析

2019 年 12 月より世界的に流行している新型コロナウイルス SARS-CoV-2 について、患者検体 RNA から効率的にウイルスの全ゲノム配列を決定するための実験プロトコルの改良・開発を行った。現在世界的に用いられている、ARTIC Network multiplex tiling PCR 法のプライマーの内、増幅に問題のある、12 本のプライマーについて改良を行い、より広範囲な条件でゲノム確定をすることが可能なプライマーセットを開発した。また、国内で流行している変異株について、変異によるミスマッチを考慮した改良を行い、継続的にゲノム解析を行えるように対応した。(糸川健太郎、関塚剛史、橋野正紀、田中里奈、黒田誠)

SARS-CoV-2 ゲノムの自動解析パイプラインを作成し、ネットワーク解析結果を描画・閲覧する web サイトの改良を行なった。国内における SARS-CoV-2 の lineage の推移をモニタリングし、本年度に国内で生じた感染ピークにおけるゲノム比較解析を行なった。また、海外より帰国した有症者から検出された本ウイルスのゲノム比較解析も実施し、懸念される変異系統 (variant of concern) の出現の監視と国内における伝播の有無の確認を行なった。

(関塚剛史、糸川健太郎、橋野正紀、田中里奈、谷津弘仁、黒田誠; 影山努、齊藤慎二、高山郁代、浅沼秀樹、長谷川秀樹 [インフルエンザウイルス研究センター]、松山州徳、白戸憲也、竹田誠 [ウイルス第三部]、高橋琢理、神谷元、山岸

拓也、柿本健作、鈴木基 [感染症疫学センター]、鈴木忠樹 [感染病理部]、脇田隆宇 [国立感染症研究所]、他多数の地方衛生研究所・保健所・検疫所関係者)

VII-2. ラボネットワーク強化のための SARS-CoV-2 ゲノム配列解読及び解析法の研修

自治体職員を対象に、新型コロナウイルスのゲノム解読法および解析法についての研修会を行った。令和2年度は、10月と3月に二度開催し、計18か所の自治体・機関からの参加があった。本研修会の成果により、多数の自治体において、単独でゲノム解読から解析まで行うことが可能となり、各自治体の行政へ、更に迅速にデータを報告することが可能となった。(糸川健太郎、関塚剛史、橋野正紀、田中里奈、黒田誠)

VIII. 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)を運用している。現在、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、今年度までに計約150株のゲノム配列を決定し、データベースを作成した。(関塚剛史、田中里奈、谷津弘仁、橋野正紀、黒田誠、金森肇[東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座・総合感染症学分野]、楠本正博[国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構])

IX. 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、結核菌の国内分離株の大規模分子系統解析を円滑に行うためのweb解析ツールの改変を行なった。(関塚剛史、谷津弘仁、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])

X. 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。TYG1620 株の病原性解明を目的に、全ゲノム解読および *in vivo* 実験を実施した結果、Type 7 Secretion System (T7SS) が病原性に寄与する事が示唆された。さらに、*in vitro* 実験により T7SS 依存的な細胞傷害性の保有を見出すとともに、Secretome 解析を実施し、T7SS 依存的な分泌毒素候補を同定した。昨年度までの研究成果を踏まえ、T7SS 依存的な分泌毒素候補の1つである Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa (ESAT-6) like protein に着目し、解析を実施した。ESAT-6 like protein は、T7SS を保有する他のグラム陽性病原細菌(結核菌、黄色ブドウ球菌)において、T7SS 依存的な毒素として報告されている。そこで、ESAT-6 like protein が TYG1620 株の示す T7SS 依存的細胞傷害性に寄与しているのかを確認するために、TYG1620 株を親株として相同組換え法により欠損変異株を作製した。作製した変異株については、次世代シーケンサーを使用し ESAT-6 like protein をコードする遺伝子の欠損を確認した。TYG1620 株と欠損変異株の濃縮培養上清を作製し、上皮細胞株に添加した結果、TYG1620 株と比較して欠損変異株では細胞傷害性が有意に減弱することが確認された。この結果から、ESAT-6 like protein が TYG1620 株の T7SS 依存的細胞傷害性に関与する事が示唆された。(橋野正紀、糸川健太郎、関塚剛史、黒田誠)

XI. 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

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により、細菌毒素、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が可能となる。NGS を用いた deep sequencing による網羅的な解析が必須であり、これまで、解析用 web アプリケーションを開発してきた。昨年度に引き続き、解析用 web アプリケーションの改良を実施した。また、パラミクソウイルスを接種した際のインタラクトーム解析を行い、ムンプスウイルスの感染に関与する宿主因子を抽出した。

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

XII. 薬剤耐性熱帯熱マラリア株の新規ゲノムアセンブリ

熱帯熱マラリア原虫のカンボジア由来感受性およびカンボジア由来抵抗性の計二株について、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行う事前準備として全ゲノムアセンブリを行った。それぞれの株からナノポアシーケンサーによるロングリードおよびイルミナ HiSeq によるショートリードのデータを取得した。これらのデータを用いてハイブリッド *de novo* アセンブリを行い、二つの系統それぞれで 14 本の染色体全てをアセンブルすることができた。得られた二つの系統のゲノムアセンブリおよび公開されている *P. falciparum* 3D7 株 (薬剤感受性) のレファレンスアセンブリの比較ゲノム解析を行ったところ、薬剤抵抗性株における構造変異 (遺伝子増幅、遺伝子欠失等) を複数個所見つけることができた。これらの構造変異に含まれる遺伝子は抵抗性株の持つ薬剤抵抗性の原因遺伝子の候補として次年度以降さらなる検証を行う。また、感受性と抵抗性株において SNP マーカーが各 14 本の染色体に十分な密度で存在していることを確認した。

(糸川健太郎、小林大介[昆虫医科学部]、新澤直明[東京医科歯科大])

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、4 価、9 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。また 9 価 HPV ワクチンのファクトシートを疫学センターと共同で作成した。(石井克幸、竹内隆正、森 清一郎、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。2021 年 3 月にオンライン開催された National HPV Reference Laboratories Conference に参加して、日本でのリファレンスラボ活動と HPV ワクチンの現状について講演した。(中村浩美、終元巖)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamaguchi-Naka M, Onuki M, Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Tasaka N, Satoh T, Morisada T, Iwata T, Sekizawa A, Matsumoto K, Kukimoto I. Molecular epidemiology of human papillomavirus 18 infections in Japanese women.

Infect Genet Evol. Sep;83:104345, 2020.

- 2) Kukimoto I, Matsumoto K, Takahashi F, Iwata T, Tanaka K, Yamaguchi-Naka M, Yamamoto K, Yahata H, Nakabayashi M, Kato H, Tsuda N, Onuki M, Yaegashi N; MINT Study II Group. Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Assay Suitable for Monitoring the Impact of the 9-Valent HPV Vaccine. *Tohoku J Exp Med.* Aug;251(4):287-294, 2020.
- 3) Taguchi A, Nagasaka K, Plessy C, Nakamura H, Kawata Y, Kato S, Hashimoto K, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Kawana K, Carninci P, Osuga Y, Fujii T. Use of Cap Analysis Gene Expression to detect human papillomavirus promoter activity patterns at different disease stages. *Sci Rep.* Oct 22;10(1):17991, 2020.
- 4) Hirose Y, Yamaguchi-Naka M, Onuki M, Tenjimbayashi Y, Tasaka N, Satoh T, Tanaka K, Iwata T, Sekizawa A, Matsumoto K, Kukimoto I. High Levels of Within-Host Variations of Human Papillomavirus 16 E1/E2 Genes in Invasive Cervical Cancer. *Front Microbiol.* Nov 24;11:596334, 2020.
- 5) Kawahara R, Fujii T, Kukimoto I, Nomura H, Kawasaki R, Nishio E, Ichikawa R, Tsukamoto T, Iwata A. Changes to the cervicovaginal microbiota and cervical cytokine profile following surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Sci Rep.* Jan 25;11(1):2156, 2021.
- 6) Song C, Takai-Todaka R, Miki M, Haga K, Fujimoto A, Ishiyama R, Oikawa K, Yokoyama M, Miyazaki N, Iwasaki K, Murakami K, Katayama K, Murata K. Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS Pathog.*, 16(7):e1008619, 2020.
- 7) Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual neuraminidase mutation isolated from immunocompromised patients. *Pathogens*, 9(9):725, 2020.
- 8) Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, Ainai A, van Riet E, Tabata K, Saito K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, Maruno T, Usami K, Uchiyama S, Ogawa-Goto K, Hasegawa H. An influenza HA stalk reactive polymeric

- IgA antibody exhibits anti-viral function regulated by binary interaction between HA and the antibody. *PLoS ONE*, 16(1):e0245244, 2021.
- 9) Kobayakawa T, Yokoyama M, Tsuji K, Fujino M, Kurakami M, Boku S, Nakayama M, Kaneko M, Ohashi N, Kotani O, Murakami T, Sato H, Tamamura H. Small-Molecule Anti-HIV-1 Agents Based on HIV-1 Capsid Proteins. *Biomolecules* 2021, 11, 208.
 - 10) Sakuragi S, Kotani O, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi J. Identification of a Novel Cis-Acting Regulator of HIV-1 Genome Packaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3435.
 - 11) Sato K, Kumagai Y, Sekizuka T, Kuroda M, Hayashi T, Takano A, Gaowa, Taylor KR, Ohnishi M, Kawabata H. Vitronectin binding protein, BOM1093, confers serum resistance on *Borrelia miyamotoi*. *Sci Rep.* 2021 Mar 9;11(1):5462.
 - 12) Sekizuka T, Itokawa K, Yatsu K, Tanaka R, Hashino M, Kawano-Sugaya T, Ohnishi M, Wakita T, Kuroda M: COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japanese Airport Quarantine. COVID-19 genome surveillance at international airport quarantine stations in Japan. *J Travel Med.* 2021 Feb 23;28(2):taaa217.
 - 13) Matsuoka S, Kuwata T, Ishii H, Sekizuka T, Kuroda M, Sano M, Okazaki M, Yamamoto H, Shimizu M, Matsushita S, Seki Y, Saito A, Sakawaki H, Hirsch VM, Miura T, Akari H, Matano T. A Potent anti-Simian Immunodeficiency Virus Neutralizing Antibody Induction Associated with a Germline Immunoglobulin Gene Polymorphism in *Rhesus Macaques*. *J Virol.* 2021 Jan 13;95(7):e02455-20.u
 - 14) Hayashi M, Matsui M, Sekizuka T, Shima A, Segawa T, Kuroda M, Kawamura K, Suzuki S. Dissemination of IncF group F1:A2:B20 plasmid-harboring multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 before the acquisition of *bla*_{CTX-M} in Japan. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Dec;23:456-465.
 - 15) Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Kawano-Sugaya T, Tanaka R, Yatsu K, Ohnishi A, Goto K, Tsukagoshi H, Ehara H, Sadamasu K, Taira M, Shibata S, Nomoto R, Hiroi S, Toho M, Shimada T, Matsui T, Sunagawa T, Kamiya H, Yahata Y, Yamagishi T, Suzuki M, Wakita T, Kuroda M. A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan. *mSphere.* 2020 Nov 11;5(6):e00786-20.
 - 16) Kuramitsu M, Okuma K, Horiya M, Sekizuka T, Kaneko N, Saito E, Sokunaga J, Kuroda M, Hamaguchi I. First case of molecularly identified and genetically characterized human T-cell leukemia virus type 2 infection in a pregnant woman in non-endemic Japan. *J Virol Methods.* 2021 Jan;287:114005.
 - 17) Morita M, Okada K, Yamashiro T, Sekizuka T, Roobthaisong A, Wongboot W, Chantaroj S, Tu ND, Xangsayarath P, Sithivong N, Noilath K, Vongdouangchanh A, Kuroda M, Hamada S, Izumiya H, Ohnishi M. Phylogenetic Analysis Revealed the Dissemination of Closely Related Epidemic *Vibrio cholerae* O1 Isolates in Laos, Thailand, and Vietnam. *Open Forum Infect Dis.* 2020 Oct 16;7(11):ofaa492.
 - 18) Sekizuka T, Katsukawa C, Kuroda M, Shibayama K, Otsuji K, Saito M, Yamamoto A, Iwaki M. Limitations of Ribotyping as Genotyping Method for *Corynebacterium ulcerans*. *Emerg Infect Dis.* 2020 Oct;26(10):2457-2459.
 - 19) Nagaoka H, Hirai S, Morinushi H, Mizumoto S, Suzuki K, Shigemura H, Takahashi N, Suzuki F, Mochizuki M, Asanuma M, Maehata T, Ogawa A, Ohkoshi K, Sekizuka T, Ishioka T, Suzuki S, Kimura H, Kuroda M, Suzuki M, Murakami K, Kanda T. Coinfection with Human Norovirus and *Escherichia coli* O25:H4 Harboring Two Chromosomal *bla*_{CTX-M-14} Genes in a Foodborne Norovirus Outbreak in Shizuoka Prefecture, Japan. *J Food Prot.* 2020 Sep 1;83(9):1584-1591.
 - 20) Kanamori H, Aoyagi T, Kuroda M, Sekizuka T, Katsumi M, Ishikawa K, Hosaka T, Baba H, Oshima K, Tokuda K, Hasegawa M, Kawazoe Y, Kushimoto S, Kaku M. *Chromobacterium haemolyticum* Pneumonia Associated with Near-Drowning and River Water, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2020 Sep;26(9):2186-2189.
 - 21) Nao N, Saikusa M, Sato K, Sekizuka T, Usuku S, Tanaka N, Nishimura H, Takeda M. Recent Molecular Evolution of Human Metapneumovirus (HMPV): Subdivision of HMPV A2b Strains. *Microorganisms.* 2020 Aug 21;8(9):1280.
 - 22) Wakabayashi Y, Sekizuka T, Yamaguchi T, Fukuda A, Suzuki M, Kawahara R, Taguchi M, Kuroda M, Semba K, Shinomiya H, Kawatsu K. Isolation and plasmid characterisation of *Salmonella enterica* serovar Albany harbouring *mcr-5* from retail chicken meat in Japan. *FEMS Microbiol Lett.* 2020 Aug 1;367(15):fnaa127

- 23) Sekizuka T, Itokawa K, Kageyama T, Saito S, Takayama I, Asanuma H, Nao N, Tanaka R, Hashino M, Takahashi T, Kamiya H, Yamagishi T, Kakimoto K, Suzuki M, Hasegawa H, Wakita T, Kuroda M. Haplotype networks of SARS-CoV-2 infections in the Diamond Princess cruise ship outbreak. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Aug 18;117(33):20198-20201.
- 24) Shimizu A, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Kuroda M, Koizumi A, Fujita M, Yamada Y, Saruki N. Meningitis and bacteremia by nonhemolytic Group B *Streptococcus* strain: A whole genome analysis. *Microbiol Immunol*. 2020 Sep;64(9):630-634.
- 25) Yoshida S, Iwamoto T, Arikawa K, Sekizuka T, Kuroda M, Inoue Y, Mitarai S, Tsuji T, Tsuyuguchi K, Suzuki K. Bacterial population kinetics in heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* harbouring rare resistance-conferring mutations in *gyrA* and *rpoB* imply an epistatic interaction of mutations in a pre-XDR-TB patient. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jul 1;75(7):1722-1725.
- 26) Shirakawa T, Sekizuka T, Kuroda M, Suzuki S, Ozawa M, Abo H, Furuya Y, Akama R, Matsuda M, Shimazaki Y, Kijima M, Kawanishi M. Comparative Genomic Analysis of Third-Generation-Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* Harboring the *bla*_{CMY-2}-Positive IncI1 Group, IncB/O/K/Z, and IncC Plasmids Isolated from Healthy Broilers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Jun23;64(7):e02385-19.
- 27) Shigemura H, Sakatsume E, Sekizuka T, Yokoyama H, Hamada K, Etoh Y, Carle Y, Mizumoto S, Hirai S, Matsui M, Kimura H, Suzuki M, Onozuka D, Kuroda M, Inoshima Y, Murakami K. Food Workers as a Reservoir of Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Jun17;86(13):e00072-20.
- 28) Adachi T, Chong JM, Nakajima N, Sano M, Yamazaki J, Miyamoto I, Nishioka H, Akita H, Sato Y, Kataoka M, Katano H, Tobiume M, Sekizuka T, Itokawa K, Kuroda M, Suzuki T. Clinicopathologic and Immunohistochemical Findings from Autopsy of Patient with COVID-19, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2020 Sep;26(9):2157-2161.
- 29) Takahashi K, Sato Y, Sekizuka T, Kuroda M, Suzuki T, Hasegawa H, Katano H. High expression of JC polyomavirus-encoded microRNAs in progressive multifocal leukoencephalopathy tissues and its repressive role in virus replication. *PLoS Pathog*. 2020 Apr 23;16(4):e1008523.
- 30) Itokawa K, Sekizuka T, Hashino M, Tanaka R, Kuroda M. Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR. *PLoS One*. 2020 Sep 18;15(9):e0239403.
- 31) Kenri T, Suzuki M, Sekizuka T, Ohya H, Oda Y, Yamazaki T, Fujii H, Hashimoto T, Nakajima H, Katsukawa C, Kuroda M, Shibayama K. Periodic Genotype Shifts in Clinically Prevalent Mycoplasma pneumoniae Strains in Japan. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Aug 6;10:385.
- 32) Sekizuka T, Kuramoto S, Nariai E, Taira M, Hachisu Y, Tokaji A, Shinohara M, Kishimoto T, Itokawa K, Kobayashi Y, Kadokura K, Kamiya H, Matsui T, Suzuki M, Kuroda M. SARS-CoV-2 Genome Analysis of Japanese Travelers in Nile River Cruise. *Front Microbiol*. 2020 Jun 5;11:1316.
- 33) Sugiura M, Kimoto F, Itokawa K, Kasai S. Novel CONCOMITANT mutations L932F and I936V in the Voltage-Gated Sodium Channel and Its Association With Pyrethroid Resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2021 Mar 12;58(2):798-806.
- 34) Faizah AN, Kobayashi D, Amoa-Bosompem M, Higa Y, Tsuda Y, Itokawa K, Miura K, Hirayama K, Sawabe K, Isawa H. Evaluating the competence of the primary vector, *Culex tritaeniorhynchus*, and the invasive mosquito species, *Aedes japonicus japonicus*, in transmitting three Japanese encephalitis virus genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Dec 28;14(12):e0008986.
- 35) Amoa-Bosompem M, Kobayashi D, Itokawa K, Faizah AN, Kuwata R, Dadzie S, Hayashi T, Yamaoka S, Sawabe K, Iwanaga S, Isawa H. Establishment and characterization of a cell line from Ghanaian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on Aedes-borne flavivirus susceptibility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2020 Oct;56(9):792-798.
- 36) Supriyono, Kuwata R, Torii S, Shimoda H, Ishijima K, Yonemitsu K, Minami S, Kuroda Y, Tatemoto K, Tran NTB, Takano A, Omatsu T, Mizutani T, Itokawa K, Isawa H, Sawabe K, Takasaki T, Yuliani DM, Abiyoga D, Hadi UK, Setiyono A, Hondo E, Agungpriyono S, Maeda K. Mosquito-borne viruses, insect-specific flaviviruses

(family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), Banna virus (family *Reoviridae*, genus *Seadornavirus*), Bogor virus (unassigned member of family *Permutotetraviridae*), and alphamesoniviruses 2 and 3 (family *Mesoniviridae*, genus *Alphamesonivirus*) isolated from Indonesian mosquitoes. *J Vet Med Sci.* 2020 Jul 31;82(7):1030-1041.

- 37) Faizah AN, Kobayashi D, Isawa H, Amoa-Bosompem M, Murota K, Higa Y, Futami K, Shimada S, Kim KS, Itokawa K, Watanabe M, Tsuda Y, Minakawa N, Miura K, Hirayama K, Sawabe K. Deciphering the Virome of *Culex vishnui* Subgroup Mosquitoes, the Major Vectors of Japanese Encephalitis, in Japan. *Viruses.* 2020 Feb 28;12(3):264.
- 38) Amoa-Bosompem M, Kobayashi D, Murota K, Faizah AN, Itokawa K, Fujita R, Osei JHN, Agbosu E, Pratt D, Kimura S, Kwofie KD, Ohashi M, Bonney JHK, Dadzie S, Sasaki T, Ohta N, Isawa H, Sawabe K, Iwanaga S. Entomological Assessment of the Status and Risk of Mosquito-borne Arboviral Transmission in Ghana. *Viruses.* 2020 Jan 27;12(2):147.
- 39) Fujita R, Inoue MN, Takamatsu T, Arai H, Nishino M, Abe N, Itokawa K, Nakai M, Urayama SI, Chiba Y, Amoa-Bosompem M, Kunimi Y. Late Male-Killing Viruses in *Homona magnanima* Identified as Osugoroshi Viruses, Novel Members of *Partitiviridae*. *Front Microbiol.* 2021 Jan 20;11:620623.
- 40) Itokawa K, Hu J, Sukehiro N, Tsuda Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Minakawa N, Sawabe K. Genetic analysis of *Aedes aegypti* captured at two international airports serving to the Greater Tokyo Area during 2012-2015. *PLoS One.* 2020 Apr 28;15(4):e0232192.
- 41) Kobayashi D, Murota K, Itokawa K, Ejiri H, Amoa-Bosompem M, Faizah AN, Watanabe M, Maekawa Y, Hayashi T, Noda S, Yamauchi T, Komagata O, Sawabe K, Isawa H. RNA virome analysis of questing ticks from Hokuriku District, Japan, and the evolutionary dynamics of tick-borne phleboviruses. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020 Mar;11(2):101364.

2. 和文発表

- 1) 終元巖、パルボウイルス、標準微生物学 (改訂第 14 版)、420-422, 2021.
- 2) 黒田誠 SARS-CoV-2 ゲノミクスとサーベイランス

への応用 ウイルス 第 70 巻 第 2 号 2021

- 3) 黒田誠 SARS-CoV-2 ゲノム解析からわかること 感染・炎症・免疫 第 51 巻 第 1 号 2021

II. 学会発表

1. 国際学会

なし

2. 国内学会

- 1) 終元巖、岩田卓、小貫麻美子、松本光司. 日本人女性での HPV18 ゲノム配列の分子疫学解析、第 79 回日本癌学会学術総会 (2020 年 10 月、広島)
- 2) 村上 努、小早川拓也、倉上真樹、横山 勝、小谷 治、辻 耕平、佐藤裕徳、玉村啓和. カプシド二量体化を標的とした新規抗 HIV-1 低分子化合物の解析. 第 34 回日本エイズ学会学術集会・総会 (2020 年 11 月、WEB 開催)
- 3) 糸川健太郎. 遺伝子・ゲノム・集団 ~NGS による衛生害虫のゲノム解析. 大会シンポジウム ポスト NGS の衛生動物学. 第 72 回日本衛生動物学会大会 (文京区、2020 年 4 月)
- 4) 黒田誠、関塚剛史、糸川健太郎、谷津弘仁. 病原細菌ゲノム情報データベース Global Genome Epidemiology Database (gGENEPIID)によるゲノム情報支援 第 94 回日本細菌学会総会 (オンライン開催、2021 年 3 月)
- 5) 橋野正紀、関塚剛史、糸川健太郎、黒田誠. *Streptococcus intermedius* の病原性における 7 型分泌装置の特性解析 第 94 回日本細菌学会総会 (オンライン開催、2021 年 3 月)
- 6) 関塚剛史、糸川健太郎、谷津弘仁、橋野正紀、黒田誠. 東京における下水処理排水のメタゲノムおよびレジストーム解析 第 94 回日本細菌学会総会 (オンライン開催、2021 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