

21. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 黒田 誠

概要

病原体ゲノム解析研究センターは、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) の増殖とそれを支える細胞因子の研究および次世代 HPV ワクチンの開発研究、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 生活環と感染における宿主応答・防御機構の詳細な解析を継続した。

また幅広い HPV 型に有効な、L2 の交差性中和エピトープを用いた次世代 HPV ワクチンの開発研究を行った。

HPV 疫学調査については、第一室は WHO による HPV ラボラトリーネットワークの西太平洋地域リファレンスラボに認定されており、WHO にて標準化された HPV ジェノタイプング法と HPV 抗体価測定法を用いて、我が国の HPV 感染実態の調査を行った。また HPV ワクチンによる免疫賦与効果についての臨床研究を開始した。

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、計算科学、情報科学、数学・物理理論を活用して、ウイルス分子の構造特性と進化を解析する新しい研究戦略の開発を続けた。現在、計算科学を用いて、蛋白質・核酸の高次構造や相互作用等を高精度で近似する *in silico* 構造解析技術が急速に進展している。また、情報科学や数学・物理理論を用いて生物進化の特性を解析する新しい技術の開発が試みられている。これらのポストゲノム解析技術は、培養や入手が困難な病原体や易変異性病原体の性質の理解やリスク評価に役立つと考え、病原性ウイルスへの応用研究を続けた。本年度は、ノロウイルスとヒト免疫不全ウイルスの粒子最外殻蛋白質について免疫逃避の構造基盤と進化の解析を進め、ウイル

スの持続感染、流行、進化の理解と動物モデル作製に還元した。ノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析を進め、阻害剤開発の基盤情報を得た。新型インフルエンザウイルスのリスク変異を解析・予測し、サーベイランスとリスク管理に還元した。

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。本年度は腸管出血性大腸菌 O111 株および *Kudoa* 属寄生虫のゲノム解読、サルモネラの宿主特異性に関連するゲノム領域の特定を遂行した。ゲノム分子疫学解析を検査現場でも有効に執り行うことができるよう、サルモネラや炭疽菌の公開ゲノム情報を基盤にしたゲノム分子疫学 GeoGSA パイプラインを構築した。また、院内のカルバペネム耐性腸内細菌科の伝播が注視されており、薬剤耐性を水平伝達するプラスミドを中心に伝達様式を俯瞰的に解析する GPAT, iPAT システムを開発した。次世代シーケンサーを活用した不明病原体の迅速同定を地方衛生研究所や病院の現場でも行えるよう MePIC パイプラインを開発し運用を開始した。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や川崎病の臨床検体から病態に関連する微生物因子の特定を行った。

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) HPV 感染におけるオートファジーの役割

HPV 感染初期過程においてオートファジーが宿主防御

として機能することが知られているが、個々のオートファジー因子の関与については不明である。5種類のオートファジー関連タンパク質の関与を、HPV16型偽ウイルス粒子(16PsV)とsiRNAノックダウンを用いて検討した。Vps34PI3キナーゼ複合体サブユニットであるVps34とBeclin-1をノックダウンしたHeLa細胞は、16PsVに対する高い感染感受性を示した。一方、ULK1キナーゼ複合体サブユニットであるULK1とATG13、およびATG9のノックダウンでは、16PsVに対し感染抵抗性を示した。ULK1複合体やATG9などオートファゴソーム形成初期に関わるタンパク質群は、HPV感染初期過程に必要な細胞内タンパク質であることが分かった。(石井克幸)

(2) L2によるTRAPPC8機能阻害の意義

TRAPPC8はゴルジ体層構造やオートファゴソーム形成初期に重要な役割を果たす細胞内タンパク質である。キャプシド副構成タンパク質L2とTRAPPC8の相互作用、それに伴うTRAPPC8の機能阻害は、HPV感染初期過程を成立させる上で重要であるが、ウイルス粒子L2との相互作用および機能阻害の意義については不明である。TRAPPC8-L2相互作用に必要なL2領域はN末75-150アミノ酸(aa)領域であり、重要配列は型間で高度に保存された配列SIVS(104-107aa)であることが分かった。16PsVをHaCaT細胞へ接種するとL2はTRAPPC8と共局在したが、SIVSをAAAAに置換した16PsV(16PsVmut3)ではL2は検出困難になり、TRAPPC8との共局在が消失した。16PsVmut3のトランスダクション効率は16PsVの約20%だったが、Vps34PI3キナーゼを不活化するオートファジー阻害剤3-MAを加えると、この効率は16PsVと同程度まで回復した。L2によるTRAPPC8の機能阻害は、オートファジーによる宿主防御を回避するためと考えられた。(石井克幸)

(3) HPV型間での複製干渉機構の研究

HPVには170の遺伝子型があり、多くの感染者が複数の型に同時感染している。昨年度までに、子宮頸癌に高頻度で検出されるHPV16型とHPV18型の間でのゲノム複製における相互作用を調べ、異なる型由来のHPV DNAヘリカーゼE1が混在すると、複製阻害が起こることを明らかにした。複製阻害には、E1の多量体形成に必要なドメインが不可欠であったことから、二つの型のE1間の相互作用が示唆された。今年度は、精製したE1蛋白質を用いて、HPV16型とHPV18型のE1蛋白質が直接結合することを示した。HPV16型とHPV18型が重感染した細胞では、E1ヘテロ多量体が形成され、複製干渉が起こると考えられる。(森 清一郎、松尾理加、終元 巖)

(4) E1と細胞チロシンキナーゼWee1の結合

HPVゲノム複製に働くウイルスDNAヘリカーゼE1と結合する細胞タンパク質として、Wee1チロシンキナーゼを同定した。Wee1はE1のヘリカーゼドメインに結合した。また、293細胞でWee1をノックダウンすると、発現させたFLAGタグ付きHPV16型E1(FLAG-E1)のタンパク量が減少した。またFLAG-E1を発現させると、細胞内のポリユビキチン化蛋白質の量が低下し、プロテアソーム系による分解が誘導された。E1はWee1との結合を介してプロテアソーム系による分解を免れ、細胞内で安定化している可能性が考えられた。(松尾理加、森 清一郎、終元 巖)

(5) HPVゲノム維持におけるWee1の役割

ヒト骨肉腫由来細胞U20SにHPV16の環状ゲノムを、ハイグロマイシン耐性プラスミドと共にトランスフェクションして薬剤選択することで、HPV16ゲノムを安定に維持するU20S/HPV16を作成した。U20S/HPV16でWee1をノックダウンすると、HPVゲノムのコピー数が著しく低下した。この現象は、HPV16陽性の子宮頸部CIN1病変から樹立されたW12細胞でも再現されたことから、Wee1がHPVゲノム維持に重要な役割を持つことが示唆された。(松尾理加、前濱朝彦[細胞化学部]、終元 巖)

2. HPV感染状況についての調査・研究

(1) 我が国のHPV遺伝子型分布の調査

我が国の女性に感染しているHPV遺伝子型の調査を継続して行った。NTT東日本病院婦人科を受診した女性から子宮頸管部細胞を定期的に収集し、DNAを抽出して、PGMYリバープロット法を用いてHPVタイピングを行った。これまでに2009-2013年の期間に、4043検体のHPVタイピングを実施した。(東 由香里、松尾理加、終元 巖、近藤一成[NTT東日本病院])

(2) 子宮頸癌および前癌病変でのHPV遺伝子型分布の調査

三カ所の拠点病院からCIN2/3および子宮頸癌の擦過細胞検体を定期的に収集し、PGMYリバープロット法によってHPV遺伝子型分布の調査を行った。647検体の解析の結果、CIN2/3ではHPV16/52/58の三タイプの検出率が高かった。また子宮頸癌でのHPV16/18の検出率は約70%であった。本データは、HPVワクチン導入前の日本のベースラインデータとして有用である。(東 由香里、松尾理加、竹内史比古、終元 巖、岩田 卓[慶應大学病院]、近藤一成[NTT東日本病院]、川名 敬[東京大学病院])

(3) 日本人での HPV16 抗体の保有状況の調査

日本の健康者集団での HPV16 感染状況を調べるために、感染研血清バンクの健康者 200 人分の血清を用いて、VLP ELISA 系にて HPV16 抗体価の測定を行った。その結果、抗体陽性率は女性では 6.8%、男性では 6.2%であった。抗体陽性者は女性では 40 代から、男性では 30 代から認められた。本データは、次年度から開始される感染症流行予測調査事業のベースラインデータとなる。(松尾理加、森 清一郎、石井克幸、終元 巖)

(4) 日本人男性 HIV 感染者における 4 価 HPV ワクチンの効果に関する研究

日本人男性 HIV 感染者 (22 例) に対して 4 価 HPV ワクチンを接種し、免疫賦与効果について検討した。HPV16/18 抗体陽性者は、接種前、HPV16 : 7 例 (32%)、HPV18 : 6 例 (27%) 接種後、HPV16 : 22 例 (100%)、HPV18 : 20 例 (91%) であった。接種前の HIV-RNA 量が接種後の HPV16/18 抗体価に与える影響をみるために、HIV-RNA \geq 200 copies/mL、HIV-RNA < 200 copies/mL の 2 群を比較したところ、HIV-RNA \geq 200 copies/mL 群で抗体価が低値であった。(菅沼明彦[都立駒込病院]、大石和徳[感染症疫学センター]、森 清一郎、終元 巖)

(5) 基礎疾患を有する女兒への HPV ワクチンによる抗体獲得に関する研究

免疫抑制治療中の小児リウマチ性疾患患児 (7 例) において HPV ワクチン接種後の HPV 抗体価を測定し、基礎疾患や治療薬による影響を評価した。全ての症例で HPV16 抗体価の上昇が認められたが、経口ステロイド薬や免疫抑制剤であるメトトレキサートを内服している 3 例では抗体価の上昇が弱かった。HPV ワクチン接種により、生物学的製剤投与中の若年性特発性関節炎患者でも HPV16 抗体を獲得できるが、経口ステロイド薬やメトトレキサート内服は抗体獲得を阻害すると考えられた。(金高太一[横浜市立大学付属病院]、森 清一郎、終元 巖)

3. 次世代 HPV ワクチンの開発研究

(1) 交差性中和エпитープをもつ次世代 HPV ワクチンの開発研究

HPV16 L2 キャプシドタンパク質のアミノ酸 56-75 領域 (L2-56/75) には複数の交差性中和エпитープがあり、全ての高リスク型 HPV に有効な次世代ワクチンとして開発されている。L2-56/75 領域を、B 型肝炎ウイルス (HBV) ワクチンである HBs 抗原に組み込んだキメラワクチンを

作成した。キメラワクチンはマウスにおいて、複数の高リスク型に有効な抗 HPV 中和抗体と抗 HBs 抗体を誘導したことから、HPV と HBV を標的とする多価ワクチンとして有用である。(森 清一郎、神田忠仁[理化学研究所]、化学及血清療法研究所との共同研究)

(2) HPV 型共通 L2 ペプチドに対するアプタマーの創製

HPV 型共通中和抗体を誘導することが示されている L2 ペプチドを用いて、HPV 型共通中和能をもつアプタマー創製を試みた。安定性を重視して一本鎖 DNA (オリゴヌクレオチド) を素材とし、磁気ビーズを用いた濃縮システムを構築した。L2 ペプチド単独、BSA、BSA-L2 ペプチド、HPV16 中空粒子を磁気ビーズに固定した。小規模な実験では L2 ペプチド磁気ビーズではオリゴヌクレオチドの濃縮は見られなかったが、BSA 磁気ビーズや BSA-L2 ペプチド磁気ビーズではオリゴヌクレオチドの濃縮が見られた。これらのオリゴヌクレオチドと HPV16 中空粒子磁気ビーズの結合を調べるとオリゴヌクレオチドは非特異的に結合した。L2 ペプチドに結合するオリゴヌクレオチドの同定には、BSA 磁気ビーズと BSA-L2 ペプチド磁気ビーズ各々に結合するオリゴヌクレオチドの配列を大量に取得し差分を得るか、低頻度に存在するものを選択できる大規模なスクリーニングが必要であると考えられた。(竹内隆正)

4. 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

様々な臓器の癌で、細胞の DNA/RNA 改編酵素である APOBEC3B (A3B) が高発現していることが示され、発癌との関連が注目されている。特に、HPV 感染が原因となる子宮頸癌や頭頸部癌で A3B の高発現が認められていることから、HPV の癌蛋白質である E6 及び E7 が A3B の発現に与える影響を調べた。正常ヒト角化細胞で HPV16 の E6 又は E7 を発現させると、A3B mRNA の発現が上昇した。レポーター実験で、HPV16 E6 又は E7 は、A3B プロモーターを活性化した。HPV の癌蛋白質が A3B の発現を活性化することにより、宿主ゲノムへの変異導入を促進することが示唆される。(森 清一郎、終元 巖)

(2) 3D-PCR 法による HPV ゲノム変異解析

HPV16 陽性の子宮頸部病変の臨床検体を用いて、HPV16 ゲノムの E2 領域の A/T hypermutation について、Differential DNA Denaturation-PCR (3D-PCR) 法により検討した。軽度病変 (CIN1) 11 例および高度病変 (CIN3) 27 例において、E2 領域の A/T hypermutation が CIN1 : 4

例 (36%)、CIN3 : 7 例 (26%) で検出された。子宮頸部の HPV16 感染病変において、APOBEC3 が変異導入に関わっている可能性が示唆される。(終元 巖、近藤一成[NTT 東日本病院]、若江享祥[金沢大学医学部]、村松正道[金沢大学医学部])

(3) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノム解析

次世代シーケンサー (MiSeq) により、CIN 患者から採取した子宮頸部擦過細胞に含まれる HPV16 ゲノムの多様性を解析した。8 検体の全長 HPV16 ゲノム配列を解読したところ、系統樹解析の結果、variant 型として Asian 型 (5 例) と European 型 (3 例) が検出された。また 1 例では、HPV16 ゲノムの非コード領域に 0.5-6%の頻度の塩基配列の多様性が認められた。さらに 1 例で、HPV16 ゲノムの細胞 PDE4D 遺伝子への組込みが検出された。(終元 巖、松本光司[筑波大学医学部]、小笠原由美子、関塚剛史、黒田 誠)

II. 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)

III. 病原性ウイルスのゲノム解析

1) 病原性ウイルスゲノムデータベースの構築

新興再興感染症や慢性感染症対策の一環として、病原体ゲノム情報のデータベース化を進めている。現在、病原体ゲノムデータベースには、インフルエンザ、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス、C 型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ブタ内在性レトロウイルス、サイトメガロウイルス、HIV-1 の最新のゲノム情報が、自動更新システムにより蓄積されている。本年度は、昨年度同様引き続き、アノテーションの修正機能を用いて、病原体ゲノムデータベースに蓄積されているノロウイルスのゲノム情報のアノテーションを修正した。また、これまで遺伝子型などの情報が明示されていなかったエントリーに、遺伝子型などの情報を付加した。(横山勝、佐藤裕徳)

2) ノロウイルスのゲノム解析

本研究では、ノロウイルス流行株の全ゲノム情報を基にゲノムと蛋白質を解析し、流行株の特性の理解と制御に役立てる。本年度は、パンデミック株 GII.4_2006b について、2006-2011 年の間に収集したゲノム全長配列 (N=250) の多様性の経時変化を解析した。その結果、ゲノム配列は年々多様性が増大する一方で、一般には高度可変とされるカプシド蛋白質は流行の間にほとんど変化しないことを見出した。カプシドは、5 年間、酵素 (3Cpro、3Dpol、NTPase) と同程度に高度に保存され続けた。カプシド配列のハミング距離の顕著な増加は無く、アミノ酸置換の蓄積は強く抑制されていた。全国規模で流行するノロウイルスは、その高い適応度を維持するために固有のカプシド構造を変えないと考えられる。パンデミック株の流行時のカプシドの変化が強く抑制されるのであれば、流行株の検出法やワクチンの有効性が保たれることが期待される (佐藤裕徳、中村浩美、横山勝、本村和嗣[日本・タイ共同研究センター]、岡智一郎[ウイルス 2 部]、片山和彦[ウイルス 2 部]、武田直和[日本・タイ共同研究センター]、野田衛[国立医薬品食品衛生研究所]、田中智之[堺市衛生研究所])

IV. *in silico* 構造解析を用いた基礎・応用研究

1) HIV-1 gp120 の構造制御機構の解析

本研究では、抗体逃避と細胞指向性決定を担う HIV-1 Env gp120 の立体構造制御機構を研究する。Gp120 の V1/V2 領域は通常~93 アミノ酸残基から成り、gp120 コアの外側に位置する。その機能はよくわかっていない。本年度は、V1/V2 が gp120 構造の揺らぎに与える影響を分子動力学計算により解析した。V1/V2 の有無によるゆらぎの変化を根平均二乗ゆらぎ (RMSF) により調べた。V1/V2 が無いときは、有るときに比べて全体的に RMSF は増加し、特に V3 の RMSF は 4 倍増加していた。ゆえに、V1/V2 は gp120 の安定性に寄与し、特に V3 ループのゆらぎを抑える働きがあると考えられる。(横山勝、佐藤裕徳)

2) マウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析

ヒトノロウイルスは、培養細胞を用いた増殖系が無い。一方、マウスノロウイルスは培養細胞で増殖できる。本研究では、マウスノロウイルス増殖系をヒトノロウイルス増殖阻害剤のスクリーニングに使う際の基盤情報収集を目的として、マウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構を計算科学的手法により解析した。マウスノロウイルスでは、基質切断部位上流 1 番目の残基はプロテアーゼのアミノ酸残基と水素結合を形成し、2 番目の残

基および4番目の残基は疎水性結合により認識されることが明らかになった。ヒトノロウイルスにおいても同様の結果が得られた。したがって、基質認識を模倣した阻害剤であれば、マウスノロウイルス増殖系をヒトノロウイルス増殖阻害剤のスクリーニングに使うことができると考えられる。(横山 勝、岡 智一郎[ウイルス2部]、片山和彦[ウイルス2部]、佐藤裕徳)

3) HIV-1 感染霊長類モデル構築の支援

本研究では、HIV-1 感染霊長類モデル構築に必要な基盤情報を収集する。HIV-1 のサル細胞での複製は、APOBEC3, TRIM5 α /TRIM5CypA, tetherin 等の抗ウイルス因子により抑制される。我々は、徳島大学の足立らのグループと共同で、サル細胞で効率良く増殖するサル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) の構築に取り組んでいる。足立らは HIV-1 のサル細胞への馴化実験と変異導入解析、我々は計算科学によるサル抗ウイルス因子耐性変異の探索を行い、両者の成果を相互に還元しながらサルの抗 HIV 因子耐性ウイルスの作製を試みている。今回、アカゲザル細胞の主な感染抑制因子全てに耐性を示す最初の HIV-1 (MN4/LSDQgtu) の作製に成功した。この HIV-1 クローンは、我々がこれまで報告した中で最もサル細胞での増殖能に優れていた HIV-1mt クローンの Gag と Vpu を改変したもので、カプシドに3つの変異 (M94L/R98S/G114Q) をもち、かつ Vpu が SIVgsn166 由来である。(横山 勝、佐藤裕徳、野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[徳島大])

4) インフルエンザウイルスのリスク管理支援 (1)

本研究では、新型インフルエンザウイルスの遺伝情報から蛋白質立体構造情報を抽出し、ウイルスのリスクを予測する新しい方法を研究する。成果をサーベイランス組織に提供し、危機管理に役立てる。平成 25 年 5 月、中国で鳥インフルエンザウイルス A(H7N9) のヒトへの感染が報告された。その時点で、A(H7N9) は大規模な流行には至らなかった。しかし、今後、変異を蓄積することで、ヒト-ヒト伝播効率の高い流行株が生じる可能性が危惧された。類縁の鳥インフルエンザウイルス H5N1 では、HA タンパク質の性質変化 (感染受容体指向性の変化、および三量体安定性の変化) がヒト-ヒト伝播効率を高める要因の一つになったと指摘されている。そこで、鳥インフルエンザウイルス H7N9 の HA タンパク質において、上記の変化をもたらさうる変異を包括的に抽出した。その結果、H7N9 ウイルスの受容体指向性の変化を誘起しうる変異として 44 種類の変異を特定し、H7N9 ウイルスの HA タンパク質三量体の安定化を誘起しうる変異として 14 種

類の変異を特定した。その後のインフルエンザウイルス研究センターの監視で、その後中国で散発的に発生した A(H7N9) はこれらの変異をもたないこと、したがって現時点では大規模な拡散のリスクは低いことが確認された。

(横山 勝、藤崎誠一郎[インフルセンター]、小田切孝人[インフルセンター]、佐藤裕徳)

5) インフルエンザウイルスのリスク管理支援 (2)

平成 25 年 11~12 月、札幌でオセルタミビル/ベラミビル耐性株が 6 株検出された (散発例)。同株は、全て NA 蛋白質に既知の H275Y 耐性変異をもち、分離ウイルスもオセルタミビル/ベラミビル耐性を示した。さらに、NA 蛋白質の安定性を昂進することでウイルスの伝播能を向上しうるとの報告がある部位が、未報告のアミノ酸に変異していた (N386K)。そこで、N386K 変異の構造安定性への影響を解析し、伝播能向上のリスクを考察した。アミノ酸置換前後の $\Delta\Delta G$ を指標として変異による NA 構造安定性の変化を調べた。残基 386 がリジンだと (札幌耐性株) NA 安定性は低下することが示唆された。したがって耐性株が 386K 変異をもたない感受性株より速やかにヒトに拡散するリスクは低いと判断した。その後のインフルエンザウイルス研究センターの監視で、札幌耐性株の全国的な拡散はおきていないことが確認された。

(横山 勝、高下恵美[インフルセンター]、藤崎誠一郎[インフルセンター]、小田切孝人[インフルセンター]、佐藤裕徳)

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

バイオテロ・新興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムを既に構築してきた。これまでに WHO 指定バイオテロ病原体である *Bacillus anthracis* 炭疽菌、*Yersinia pestis* ペスト菌、*Francisella tularensis* 野兎病菌、*Burkholderia pseudomallei* 類鼻疽菌のゲノム情報解析を行ってきた。また、近年問題となっている *Salmonella* を含む薬剤耐性菌のゲノム情報解析にも取り組んでいる。本年度は次世代シーケンサーによる解読リードを病院・地方衛生研究所等でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で炭疽菌およびサルモネラ菌の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 *Bacillus anthracis*: GcoGSA-BA および Global core Genome SNP Analysis *Salmonella*: GcoGSA-SA) を構築した。膨大な量の配列情報解析を習熟していない検査技師であっても簡

単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成した。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠)

VI. 薬剤耐性プラスミドを検出し、由来を推定するためのシステムの構築

近年、複数の抗菌薬に耐性を持つ細菌の出現が問題になっており、国連でも大きく取り上げられている。細菌に薬剤耐性を付与する遺伝子はプラスミド(薬剤耐性プラスミド)を媒介として異なる種類の細菌にも伝達されるため、尿路感染症・肺炎・血流感染などの日和見感染症を起こす細菌だけでなく、環境中に存在する細菌などが持つ薬剤耐性プラスミドの動向を把握することが重要である。薬剤耐性プラスミドの分離・シーケンシングは次世代シーケンサーの出現などにより大量に行うことができるようになってきたものの、薬剤耐性プラスミド遺伝子の発見・解析及び他の薬剤耐性プラスミドとの比較を行うには、高度な専門知識を持つ研究者が煩雑なコマンドライン操作を慎重に行う必要があり、一度に解析できるプラスミドの数には限界があった。そこで我々は総合的なプラスミド解析を Web ブラウザ上で行えるシステム (Global Plasmidome Analyzing Tool: GPAT 及び inter Plasmid Analyzing Tool: iPAT) を構築した。このシステムの構築により、研究者は煩雑なコマンドライン操作を行う必要がなくなり、Web ブラウザ上でのマウス操作で大量のデータを簡単に比較・解析できるようになった。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠、鈴木里和「細菌第二部」、松井真理「細菌第二部」)

VII. 不明症例に係る網羅的病原体検索の情報解析パイプラインの構築

ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) の改良

昨年度構築した MePIC を所内で仮運用し、様々な改良を行い、MePIC バージョン 2 として、全世界の行政及びアカデミックユーザーを対象に公開した。具体的には、ユーザーインターフェイスの改良、解析手法の追加、及び履歴機能の追加などを行った。これらの改良により、情報解析に習熟していない検査技師であっても簡単な講習会を受けることにより、より簡便に利用できるようになることが期待される。

(山下明史、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠)

VIII. 集団食中毒事例に係る病原細菌のゲノム解析

2011 年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌 (EHEC) 血清型 O111 を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、本事例分離菌株の完全長ゲノム配列決定を行っている。現段階で、λ ファージを含む 10 カ所の gap 箇所を残すのみであり、保有する 7 つの plasmid の完全長配列が得られた。その内、2 つ plasmid 上に、病原因子と予測される 2 つの Type V secretion system 型の protease (EpeA および EspC) がそれぞれ 1 つずつ存在していた。また、EpeA が存在する plasmid には、テトラサイクリン、アンピシリン、ストレプトマイシン耐性に関わる薬剤耐性遺伝子も存在していた。更に、本菌には Colicin-E5 プラスミドも存在していた。本菌の有する plasmid の特徴と、これまで報告されていた薬剤耐性試験およびコリシン活性試験の結果が一致した。染色体配列のみならず、plasmid も含めた包括的な解析を行い、本菌の特徴を解析する必要があると示唆された。

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

IX. 生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

ナナホシクドアの寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、ナナホシクドアが消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、クドアのゲノム解析を行っている。今年度は、ミトコンドリア遺伝子の多型により、ナナホシクドアが ST1 と ST2 の二つの系統に分類できることを明らかにした。韓国産成魚の殆どが ST1 であった。二系統の間で、食中毒病原性の違いは検出されなかった。また、ナナホシクドア 2 検体と *Kudoa neothunni*, *Kudoa iwatai* について、次世代 DNA シーケンサーを用いてミトコンドリアゲノムと核ゲノムの配列解読を行った。ミトコンドリアゲノムについては、ナナホシクドアの種内では塩基配列の 96~99% が同一であることを明らかにした。一方、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの遺伝子配列の違いは、検出系開発や疫学解析に応用できる。

ナナホシクドアについては、ゲノム配列解読に加えて、光学マッピングにより全ゲノム制限酵素地図を作成した。その結果、ゲノムサイズが 83Mb で 3 本の染色体からな

ることが分かり、また二倍体であることが示唆された。

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

X. 宿主特異性を示す細菌のゲノム解析

Salmonella 属菌は、三類感染症に指定される *S. Typhi* および *S. Paratyphi A* と、細菌性食中毒を起こすものに大別され、2,500 以上の血清型が存在する。本菌は、複数の宿主に対して病原性を示す血清型が存在するが、幾つかの血清型においては、宿主特異性が認められている。そこで、馬パラチフスの起因菌であり、馬以外の動物からの分離報告は稀である *S. Abortusequi* の全ゲノム塩基配列解析を行った。染色体のサイズは 4,738,978 bp、GC 含量 52% で 4,710 の ORF が抽出された。コアゲノムの一塩基多型に基づく系統解析では *S. Abortusequi* は *S. Choleraesuis* 及び *S. Paratyphi C* と近縁であることが示唆された。プラスミドのサイズは 93,820 bp、GC 含量 53% で、117 の ORF が抽出され、*S. Typhimurium* が保有する病原性プラスミド pSLT とほぼ同一であった。他血清型との pangenome 解析により、*S. Abortusequi* を含む一部血清型が保有または欠失する遺伝子を抽出し、馬への宿主特異性に関連することが予想される領域を推定した。

(関塚剛史、三好洋嗣[佐賀県中部家畜保健衛生所]、丹羽秀和[JRA 競走馬総合研究所]、木下優太[JRA 競走馬総合研究所]、黒田誠、楠本正博[動物衛生研究所]、李謙一[動物衛生研究所]、岩田剛敏[動物衛生研究所]、針生和久[JRA 競走馬総合研究所]、片山芳也[JRA 競走馬総合研究所]、秋庭正人[動物衛生研究所])

XI. 難治性疾患患者の腸内細菌フローラの網羅解析

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個々の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン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 28 名の治療前、治療後の腸内フローラの比較解析を横断的に行った。その結果、抗菌剤治療前では *Bacteroides*, *Escherichia* が多い傾向を示した。現在、更に検体数を増やし、治療前後の比較解析を行う予定である。

川崎病患児の腸内や咽頭に内在するあらゆる病原体を網羅的に把握するため、28名の川崎病患児の微生物フローラ・メタゲノム解析を行った結果、複数の患児の急性期便からレンサ球菌属 (*Streptococcus*) が相対的に多

く検出された。患児 P7 の急性期便からレンサ球菌の分離培養分離し、7株のゲノム分子系統の結果、患児 P7 のレンサ球菌は、肺炎球菌 *S. pneumoniae*, 心内膜炎・化膿性疾患に関わる *S. sanguinis* に近い系統群に分類されることが分かった。

(黒田 誠、関塚剛史、絹巻暁子「東京大」、濱田洋通「東京女子医大」)

XII. 難培養細菌分離培養のための基礎的研究

地球上に存在する細菌の内、現在までに分離培養可能な細菌の割合は非常に少ない。ヒト腸管内に生存する腸内細菌においても、難培養細菌は多く含まれている。そこで、ヒト腸管内の環境成分に類似した培地を作製し、難培養細菌の培養が可能かを検討している。パターンを変えた培地を作製し、ヒト糞便内の細菌を培養したところ、ある特有の細菌が増殖する事が示唆された。

(関塚剛史、黒田 誠)

XIII. 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

所外から直接、もしくは感染研担当窓口にお問い合わせがあった不明髄膜炎、不明熱等症例の依頼検査について、計9件の検査を行った。

厚労研究班 (H25-新興-指定-006) の分担として、計11症例の不明脳炎の髄液、血清、咽頭拭い液、便、尿等の検査材料から次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的病原体検査を施行した。脳炎に関与する Human herpesvirus 6 は DNA ウイルスであるが、DNA よりもむしろ RNA を解読 (RNA-seq) するほうが転写産物の特定に繋がりがつ感度も高い事が判明し、RNA-seq を基本とする NGS 検査法を採用した。不明脳炎症例から、Coxsackievirus B4 を特定するなど、既存検査プライマーでは検出できない変異 RNA ウイルスの特定につながった。

(黒田 誠、関塚剛史、片野晴隆「感染病理部」)

XIV. 所内ゲノムプロジェクト

H25 年度に渡り、所内の連携強化のためのゲノムプロジェクト 5 課題を遂行した。

- HCV (JFH-1 株) 感染感受性の変化した Huh7.5.1 由来亜株の RNA-Seq 解析 (細胞化学部 深澤征義)
- 全ゲノム解読法を活用した次世代結核菌型別分析法 (感染制御部 星野仁彦)
- 我が国のアシネトバクター属菌の実態調査とゲノム解析 (細菌第二部 鈴木仁人)

- インフルエンザウイルス特異的免疫応答の誘導に有用な腸内細菌の探索（感染病理部 一戸猛志、鈴木忠樹）
- コウモリ細胞のトランスクリプトーム解析を用いた自然免疫関連遺伝子群の解明とコウモリウイルス分離用細胞株作出への応用（動物管理室 河合康洋）
（関塚剛史、竹内史比古、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、松尾理加、柊元 巖、黒田 誠）

海外検定機関の訪問調査

海外のワクチン検定制度の状況を調査するために、オーストラリアのロトリリース機関である Therapeutic Goods Administration (TGA) への訪問調査を実施した。TGA はロトリリースだけではなく、承認審査、GMP 査察、市販後調査も担当しており、各部門の情報共有と連携が容易な仕組みになっていた。またロトリリースにおいて SLP 審査が必須条件になっており、試験の実施は限定的であることが分かった。（柊元 巖、藤田賢太郎[品質保証室]）

国際協力関係業務

WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク (HPV ラボネット) の、西太平洋地域リファレンスラボとしての活動を行った。HPV ラボネットが主催する HPV DNA proficiency panel に参加して、解析結果を WHO に返し、十分な能力をもつリファレンスラボとして認定を受けた。（東 由香里、松尾理加、柊元 巖）

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, Ogasawara Y, Kondo K, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Yamaji T, Takeuchi F, Hanada K and Kuroda M. Genetic Variation of Human Papillomavirus Type 16 in Individual Clinical Specimens Revealed by Deep

Sequencing. *PLoS One*, 8: e80583, 2013.

- 2) Ishii Y, Nakahara T, Kataoka M, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Takeuchi T and Kukimoto I. Identification of TRAPPC8 as a Host Factor Required for Human Papillomavirus Cell Entry. *PLoS One*, 8: e80297, 2013.
- 3) Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul A, Kukimoto I and Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16 DNA upon β -interferon stimulation. *J. Virol*, 88: 1308-1317, 2014.
- 4) Kusumoto-Matsuo R, Ghosh D, Karmakar P, May A, Ramsden D and Bohr VA. Serines 440 and 467 in the Werner syndrome protein are phosphorylated by DNA-PK and affects its dynamics in response to DNA double strand breaks. *Aging*, 6: 70-81, 2014.
- 5) Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Takeuchi T and Kukimoto I. Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1 helicases. *Virology J*, 11: 11, 2014.
- 6) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the monomer–monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J. Infect. Chemother.*, 2013.
- 7) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.*, 87(10):5424-36, 2013.
- 8) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. *TRIM5* genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 94:1318-1324, 2013.
- 9) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa K. Structure and Dynamics of the gp120 V3 Loop That Confers Noncompetitive Resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to Maraviroc. *PLoS ONE*, 8(6): e65115, 2013.
- 10) Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region

- confer CXCR4-tropism. *Sci Rep.* 3:2389, 2013.
- 11) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.*, 87(21):11447-111461, 2013. (The first two authors contributed equally)
 - 12) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS ONE*, 8(12): e84228, 2013.
 - 13) Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongkul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 88(6):3598-3604, 2014.
 - 14) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect.*, 16:320-327, 2014.
 - 15) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Akihide Ryo. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*, 11:9, 2014.
 - 16) Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, Sugiura N, Sharma N, Morikawa S, Yamada A. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One*. 2014 Feb 18;9(2):e89075.
 - 17) Otsuki N, Nakatsu Y, Kubota T, Sekizuka T, Seki F, Sakai K, Kuroda M, Yamaguchi R, Takeda M. The V protein of canine distemper virus is required for virus replication in human epithelial cells. *PLoS One*. 2013 Dec 17;8(12):e82343.
 - 18) Nakanaga K, Sekizuka T, Fukano H, Sakakibara Y, Takeuchi F, Wada S, Ishii N, Makino M, Kuroda M, Hoshino Y. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in clinical isolates by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):251-9.
 - 19) Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft Genome Sequence of *Helicobacter fennelliae* Strain MRY12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient. *Genome Announc.* 2013 Aug 8;1(4). pii: e00512-13. doi: 10.1128/genomeA.00512-13.
 - 20) Kai M, Nakata N, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:200-4.
 - 21) Matsuo J, Nakamura S, Ito A, Yamazaki T, Ishida K, Hayashi Y, Yoshida M, Takahashi K, Sekizuka T, Takeuchi F, Kuroda M, Nagai H, Hayashida K, Sugimoto C, Yamaguchi H. Protochlamydia induces apoptosis of human HEp-2 cells through mitochondrial dysfunction mediated by chlamydial protease-like activity factor. *PLoS One.* 2013;8(2):e56005.
 - 22) Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, Ogasawara Y, Mizuta K, Kuroda M. MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 67(1):62-65, 2014.
 - 23) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. *Pathogens.* 3(2):356-376, 2014
 - 24) Mather AE, Reid SW, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. *Science.* 2013 Sep 27;341(6153):1514-7.
 - 25) Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Shimizu Y, Ito S, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Kuroda M, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol.* 2013 Sep;58(1):188-93.

- 26) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol*. 2013 Sep;57(9):655-9.
- 27) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol*. 2013 Aug;18:168-73.
2. 和文発表
- 1) 終元 巖, HPV による発癌の分子機構、産科と婦人科、Vol. 80, No. 6, 701-705, 2013.
- 2) 黒田 誠。「メタゲノム解析による次世代型網羅的病原体検出の取り組み」 医学書院・検査と技術 Laboratory Practice. 2014年04月号(Vol. 42 No. 4)
- 3) 黒田 誠。「メタゲノム解析による網羅的病原体検索」 科学評論社 感染症内科 第1巻第1号 (2013年7月)
- II. 学会発表
1. 国際学会
- 1) Mori S, Kusumoto-Matsuo R and Kukimoto I. Molecular mechanism of replication interference between HPV16 and HPV18. DNA Tumour Virus Meeting (2013年7月、バーミンガム)
- 2) Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Liu G, Kukimoto I and Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16 DNA. DNA Tumour Virus Meeting (2013年7月、バーミンガム)
- 3) Kubo Y, Shigematsu S, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Sato H, Yamamoto N, Matsuyama T. Identification of a novel interferon-stimulated gene whose product significantly restricts HIV-1 replication. **Cold Spring Harbor Meeting**, May 20-25, 2013, NY USA.
- 4) Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4_2006b. **The Fifth International Calicivirus Conference**, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- 5) Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. **The Fifth International Calicivirus Conference**, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- 6) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. **The Fifth International Calicivirus Conference**, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
- 7) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, and Tokunaga K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. Keystone Symposia: Mobile Genetic Elements and Genome Evolution, March 9-14, 2014, Santa Fe, New Mexico, USA.
- 8) Ishida K, Matsuo J, Hayashida K, Sekizuka T, Kuroda M, Takeuchi F, Nagai H, Sugimoto C, Yamaguchi H. A unique genome feature of an amoebal endosymbiotic primitive chlamydia, *Neochlamydia*, showing intimate mutualistic interaction with *Acanthamoeba*. 113th ASM general meeting. May 18-21, 2013, Denver, USA.
- 9) M. Kai, N. Nakata, G. T. Chae, P. Saunderson, A. A. Maghanoy, M. F. Balagon, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, M. Makino. Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. The 18th International Leprosy Congress. 16-19 September, 2013. Brussels, Bergy.
- 10) Makoto Kuroda. Metagenomic analysis for the clinical investigation of possible pathogens. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM). 25 March, 2014. Tokyo, Japan.
- 11) Yasutoshi Kuroki, Junji Matsuo, Kasumi Ishida, Tomohiro Yamazaki, Chikayo Yamane, Shinji Nakamura, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Hiroki Nagai, Chihiro Sugimoto, Hiroyuki Yamaguchi. Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* restricts

Legionella growth in its host amoebae. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology (XII-JKISM). 25 March, 2014. Tokyo, Japan.

- 12) Noriyuki Otsuki, Tsuyoshi Sekizuka, Toru Kubota, Yuichiro Nakatsu, Fumio Seki, Kouji Sakai, Ryouji Yamaguchi, Hideo Fukuhara, Katsumi Maenaka, Makoto Kuroda, Makoto Takeda. Both the C and V proteins of canine distemper virus play essential roles for the virus replication in human epithelial cells. 16 - 21 June 2013, Granada, Spain
- 13) Tsuyoshi Sekizuka, Akihiko Yamamoto, Takako Komiya, Tsuyoshi Kenri, Fumihiko Takeuchi, Keigo Shibayama, Motohide Takahashi†, Makoto Kuroda and Masaaki Iwaki. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. 22 June – 26 June 2013: European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX16), Freiburg im Breisgau, Germany.

2. 国内学会

- 1) 終元 巖、森 清一郎、近藤一成：個々の臨床検体における HPV16 ゲノム多様性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会（2013 年 10 月、横浜）
- 2) 近藤一成、佐藤奈加子、角田 肇、森 清一郎、竹内隆正、石井克幸、終元 巖：子宮頸部細胞診異常者の年齢と HPV 型の関連における検討、第 72 回日本癌学会学術総会（2013 年 10 月、横浜）
- 3) 森 清一郎、松尾理加、終元 巖：ヒトパピローマウイルス 16 型と 18 型間での複製干渉機構、第 61 回日本ウイルス学会学術集会（2013 年 11 月、神戸）
- 4) 石井克幸、中原知美、森 清一郎、竹内隆正、終元 巖、松尾理加：HPV キャプシド副構成蛋白質 L2 は TRAPPC8 の機能を阻害する、第 61 回日本ウイルス学会学術集会（2013 年 11 月、神戸）
- 5) 松尾理加、森 清一郎、前濱朝彦、終元 巖：ヒトパピローマウイルス 16 型 E1 タンパク質に結合する細胞チロシンキナーゼの同定、第 61 回日本ウイルス学会学術集会（2013 年 11 月、神戸）
- 6) 村松正道、青山 慧、王 哲、喜多村晃一、アハサン モハメッド、劉 光炎、中村充弘、京 哲、終元 巖、近藤 悟、吉崎智一：HPV16 ウイルス DNA に観察される高頻度突然変異、第 61 回日本ウイルス学会学術集会（2013 年 11 月、神戸）
- 7) 若江亨祥、青山 慧、王 哲、喜多村晃一、劉 光炎、アハサン モハメッド、中村充弘、京 哲、終元 巖、村松正道：APOBEC3 は HPV ゲノムに hypermutation を導入する、日本生化学会北陸支部第 31 回大会、（2013 年 5 月、金沢）
- 8) 石井克幸：ヒトパピローマウイルス偽ウイルスはユニークなオートファゴソームを誘導する、第 36 回日本分子生物学会年会（2013 年 12 月、神戸）
- 9) 若江亨祥、青山 慧、Wang Zhe、Liu Guangyan、Ahsan Monjurul、今康美依子、小浦美樹、喜多村晃一、中村充弘、京 哲、近藤 悟、吉崎智一、終元 巖、西山智明、村松正道：APOBEC3 はヒトパピローマウイルス (HPV)-16 ゲノムに突然変異を導入する、第 36 回日本分子生物学会年会（2013 年 12 月、神戸）
- 10) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、横田恭子、横山 勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫. HIV-1 *pol* (4895-4933) の 1 塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 11) Juan F Arias、小山貴芳、横山 勝、佐藤裕徳、徳永研三. APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 12) 久保嘉直、神山陽香、泉田真衣、田中勇悦、安井潔、佐藤裕徳、山本直樹、松山俊文、林日出喜. インターフェロン γ 誘導因子 GILT による HIV 粒子産生抑制機構の解明. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 13) 佐藤裕徳、横山 勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之. ノロウイルス GII.4_2006b の capsid と酵素に働くアミノ酸変化の制約. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 14) 本村和嗣、横山 勝、大出裕高、中村浩美、佐藤彩、岡 智一郎、片山和彦、野田 衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan. ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 15) 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤裕徳. 分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日 (火-木)、神戸.
- 16) 横山 勝、佐藤裕徳. V1/V2 による HIV-1 gp120 の

- ゆらぎに与える影響. 第36回日本分子生物学会年会, 013年12月3日~6日(火-金)、神戸.
- 17) 関塚剛史、丹羽秀和、黒田誠、楠本正博、李謙一、岩田剛敏、秋庭正人。馬パラチフス原因菌 *Salmonella Abortusequi* のゲノム生物学的特徴。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 18) 鈴木仁人、松井真理、鈴木里和、黒田誠、柴山恵吾。アシネトバクターの薬剤耐性と拡散メカニズム。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 19) 泉谷秀昌、関塚剛史、黒田誠、大西真。サルモネラ病原因子パネルの検討について。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 20) 黒木靖敏、松尾淳司、石田香澄、山崎智弘、中村眞二、関塚剛史、黒田誠、永井宏樹、杉本千尋、山口博之。あるアメーバは *Legionella* 感染を回避するために *Neochlamydia* を内部共生させている。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 21) 小笠原由美子、藤本浩文、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠。新規 *Enterobacter* sp. のゲノム解読と染色体性 β -lactamase bla_{MIR-KINAN} の解析。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 22) 甲斐雅規、中田登、関塚剛史、黒田誠、牧野正彦。らい菌日本分離株で発見された特徴的な SNPs の解析。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 23) 長谷川紀子、小笠原由美子、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠。小児脳膿瘍から分離された連鎖球菌 *Streptococcus intermedius* TYG1620 のゲノム解析。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 24) 山下明史、関塚剛史、黒田誠。プラスミドネットワーク解析: プラスミド上の遺伝子の水平伝播ネットワーク解析。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 25) 綿引正則、木全恵子、磯辺順子、関塚剛史、黒田誠、大西真、佐多徹太郎。II型制限修飾遺伝子をもつStx2プロファージを保有する溶原菌が産生する制限酵素の部分精製。第87回日本細菌学会(江戸川区 2014年3月)
- 26) 山下明史、関塚剛史、黒田誠。Comprehensive analysis of horizontal plasmid transfer based on a component network analysis: Plasmidome network analysis. 第36回日本分子生物学会年会(神戸市 2013年12月)
- 27) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田誠、牧野正彦。SNPs解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴。第86回日本ハンセン病学会。(大宮市 2013年5月)
- 28) 片野晴隆、坂本康太、吉岡妙子、関塚剛、福本瞳、佐藤由子、長谷川秀樹、黒田誠。カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV/HHV-8)関連疾患におけるウイルス miRNA の発現。第102回日本病理学会総会。(札幌市 2013年6月)
- 29) 関塚剛史、三好洋嗣、丹羽秀和、木下優太、黒田誠、楠本正博、李謙一、岩田剛敏、針生和久、片山芳也、秋庭正人。馬パラチフス菌の全ゲノム塩基配列。第156回日本獣医学会学術集会。(岐阜市 2013年9月)
- 30) 阿部淳、黒田誠、中林一彦、高橋啓。川崎病患者のFFPE肺組織を用いたメタゲノム解析。第33回日本川崎病学会・学術集会。(富山市 2013年9月)
- 31) 野田雅裕、大場邦弘、斉藤真木子、阿部淳、黒田誠。川崎病様症状からショック状態となりTSSとの鑑別に苦慮した12歳男児の1例。第33回日本川崎病学会・学術集会。(富山市 2013年9月)
- 32) 陳内理生、原田哲也、河合高生、黒田誠、竹内史比古、久米田裕子。ミトコンドリアDNAを標的としたナナホシクドア検出法の開発。第34回日本食品微生物学会総会。(江戸川区 2013年10月)
- 33) 関塚剛史、三好洋嗣、丹羽秀和、木下優太、黒田誠、楠本正博、李謙一、岩田剛敏、針生和久、片山芳也、秋庭正人。完全長ゲノム配列決定による馬パラチフス菌のゲノム生物学的特徴。第96回日本細菌学会関東支部総会。(文京区 2013年10月)
- 34) 大槻紀之 中津祐一郎 久保田耐 関塚剛 關文緒 酒井宏治 黒田誠 山口良二 竹田誠。イヌジステンパーウイルスのVタンパクはヒト肺胞上皮細胞でのウイルス増殖において重要な役割を果たす。第61回日本ウイルス学会学術集会。(神戸市 2013年11月)
- 35) 片野晴隆、比島恒和2、坂本康太、上原妙子、佐藤由子、長谷川秀樹、関塚剛、黒田誠。EBV関連リンパ増殖性疾患におけるウイルス miRNA の発現プロファイル。第61回日本ウイルス学会学術集会。(神戸市 2013年11月)
- 36) 福本瞳、都築慎也、佐藤典子、峰宗太郎、望月眞、川名誠司、長谷川秀樹、黒田誠、片野晴隆。日本人からの Trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus のクローニング。第61回日本ウイルス学会学術集会。(神戸市 2013年

11月)

- 37) 大黒 徹、雄山由香利、矢島美彩子、関塚剛史、黒田誠、佐多徹太郎、武本眞清、白木公康。単純ヘルペスウイルス臨床分離株の次世代シーケンサーによる変異部位の網羅的解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。(神戸市 2013年11月)
- 38) 松井順子、伊藤麻美、新庄正宜、黒田誠、中原絵理、佐久間啓、武内俊樹、高橋孝雄。嫌気性菌感染が契機と推定される抗中枢神経抗体による自己免疫性脳炎の1例。第60回小児科関東地方会

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