

20. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 黒田 誠

概要

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

第一室では、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) の増殖とそれを支える細胞因子の研究および HPV による発癌メカニズムの解析、ならびに HPV 感染実態の疫学調査を行った。HPV は表皮や粘膜の微小な傷から侵入し、上皮基底細胞の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程でウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗 HPV 薬の開発基盤とするため、HPV 生活環と感染・発癌における宿主応答・防御機構の詳細な解析を継続した。HPV 疫学調査については、WHO にて標準化された HPV ジェノタイピング法と 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。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。カルタヘナ議定書の履行に伴い、新興再興ウイルスが海外で発生・流行した際には、分離ウイルスの迅速入手と性質決定が困難になることが予想される。また、培養細胞や動物を用いた感染・増殖系そのものが確立していないウイルスも未だ多い。さらには、テロ対策や倫理上の問題から、リスク変異の実験的探索が制限される事態も生じている。二室では、これら材料と方法の問題が内在する新興再興ウイルス研究を補完する目的で、ゲノム情報から蛋白質の

構造・機能・進化情報を迅速に抽出し、所内外のサーベイランス関係者やウイルス研究者に提供している。平成 26 年度は、以前より推進している計算科学の応用研究に加えて、数理学の原理を導入した新たな研究に着手した。蛋白質の構造機能制御と分子進化の基本原理の探求、リスク変異予測、創薬・ワクチン開発などへの還元をめざしている。

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 株および新興感染症に関わる病原性細菌 *Mycobacterium massiliense* のゲノム解読、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌のプラスミド比較解析、バイオテロ対策としての国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析を遂行した。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、国内の主要な血清型のサルモネラ菌のゲノム情報を基盤にしたゲノム分子疫学 GcoGSA 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。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 キャプシド蛋白質 L2 と TRAPPC8 の相互作用の役

割

感染初期過程における HPV16 キャプシド蛋白質 L2 と膜融合を制御する細胞蛋白質 TRAPPC8 の相互作用の意義について調べた。TRAPPC8 と相互作用する野生型 L2 を含む pseudovirion (WT) と相互作用しない変異 L2 を含む pseudovirion (Mut3) を作成し、不死化ヒト角化細胞 HaCaT に接種後、L2 と脱殻 DNA の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。それぞれの L2 はトランスゴルジネットワークに同程度に局在したが、WT L2 は Mut3 L2 に比べ TRAPPC8 と多く共局在し、Mut3 L2 は WT L2 に比べゴルジ体に多く局在した。WT の脱殻 DNA の割合は Mut3 より有意に高く、その多くが TRAPPC8 局在部位とその近接領域で観測された。これらの結果は、L2 による TRAPPC8 の機能阻害が、HPV を含む輸送小胞膜とゴルジ体膜との融合を阻害し、HPV の脱殻を促すことを示唆する。HPV は膜融合阻害による膜の不安定化を利用し、細胞質へ移行・脱殻すると考えられる。(石井克幸)

(2) HPV 複製蛋白質 E1 によるプロテアソーム活性化

HPV ゲノム複製には DNA ヘリカーゼである E1 の機能が必須であることから、E1 発現量の調節機構についてヒト 293 細胞を用いて解析を行い、E1 が自身の ATPase 活性に依存する形で分解されることを見出した。細胞をプロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理すると E1 発現量が上昇し、ポリユビキチン化された E1 が検出されたことから、ユビキチン・プロテアソーム系にて E1 が分解されることが示された。さらに E1 発現により、ユビキチン化された細胞内蛋白質の全量が低下すること、また E1 により細胞内のプロテアソーム活性自体が上昇することが明らかになった。これらの結果は、E1 が自身の ATPase 活性によって細胞内ユビキチン・プロテアソーム系の活性化を誘導し、細胞内環境を変化させることを示している。(松尾理加、終元 巖)

(3) HPV16 転写開始部位の transcriptome 解析

Cap-analysis gene expression (CAGE) sequencing 法を用いて、HPV16 陽性の培養細胞 (W12, SiHa, CaSki) や CIN1 病変での HPV16 mRNA の開始部位を網羅的に同定した。子宮頸癌細胞 (SiHa, CaSki) では、ほとんどの HPV16 mRNA が癌蛋白質 E6/E7 の発現を担う p97 プロモーターから転写されていたが、CIN1 由来細胞 (W12) や CIN1 臨床検体では、p670 プロモーターを含む様々な転写開始部位が検出された。またこれまでに報告の無いアンチセンス方向の転写開始部位が見出された。(田口 歩[東京大学病院]、長阪一憲[東京大学病院]、松尾理加、終元 巖、

川名 敬[東京大学病院])

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

拠点病院から子宮頸癌及び前癌病変 (CIN2/3) の擦過細胞検体を定期的に収集して、HPV DNA 検出と型同定を継続的に行った。合計 647 検体の解析の結果、CIN2 では HPV16 (29.3%)、HPV52 (27.4%)、HPV58 (22.0%)、CIN3 では HPV16 (44.9%)、HPV52 (26.0%)、HPV58 (17.4%)、子宮頸癌では HPV16 (47.7%)、HPV18 (23.5%)、HPV52 (8.7%) が検出された。本データは将来のワクチン効果判定のための、ワクチン導入前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])

(2) ホルマリン固定パラフィン切片からの HPV タイピングの検討

子宮頸部病変を実際に引き起こしている原因型 HPV を同定するために、CIN 病変部から採取したバイオプシー検体のホルマリン固定パラフィン切片からの HPV タイピングを検討した。パラフィン切片から QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN) にて DNA を抽出して、Modified GP5+/6+ PCR で HPV DNA を増幅し、Bio-Plex ビーズソーターにて検出する方法を用いることで、高感度な HPV DNA 検出と型同定が可能であった。(中村浩美、終元 巖、藤井多久磨[藤田保健衛生大学])

3. HPV 感染による発癌機構の研究

(1) HPV による APOBEC3B 発現活性化に関する研究

様々な臓器の癌で、細胞の DNA/RNA 改変酵素である APOBEC3B (A3B) が高発現しており、APOBEC によるとみられる変異がゲノムに蓄積していることから、A3B 高発現と発癌との関連が注目されている。昨年度までに、HPV の癌蛋白質 E6 及び E7 が A3B 遺伝子プロモーターを活性化することを明らかにした。今年度は、その活性化機構を調べた。欠変異を導入した A3B プロモーター領域を使用したレポーター実験により、転写開始点上流にあるプロモーター活性に必要な領域 (BPR: Basal Promoter Region) と、転写開始点近傍にあるプロモーター活性に抑制的に働く領域 (IR: Inhibitory Region) を同定した。HPV16 E6 による A3B プロモーター活性化は BPR と IR の両方を介していた。さらに、E6 による IR を介した A3B プロモーター活性化に、宿主転写因子 ZNF384 が関わるこ

とがわかった。HPV 発癌に重要な役割を果たしていると考えられるので、分子機構の詳細をさらに調べる必要がある。(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 例を解析した結果、E2 領域の hypermutation が CIN1 で 4 例 (36%)、CIN3 で 6 例 (22%) 検出された。3D-PCR 増幅産物の配列を解析したところ、E2 のコード鎖に C to T の置換変異が集積していることが分かった。また、CIN1 と比較して CIN3 で有意に高い変異塩基数を示した。一方で、hypermutation の有無で年齢差は認められなかった。さらに C-to-T 置換変異の標的配列を調べたところ、TpC および CpC に偏って変異が導入されていたことから、APOBEC3 蛋白質の関与が想定された。(終元 巖、近藤一成 [NTT 東日本病院])

(3) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノム解析

CIN1 患者から採取した子宮頸部擦過細胞および CIN1 由来 HPV16 陽性培養細胞に含まれる HPV16 ゲノムの hypermutation を、次世代シーケンサーにより解析した。4 検体から得られた HPV16 配列データを、HyperMut プログラムを用いて解析したところ、CIN1 患者由来の 1 検体で 446463 本の read の内、92 本の hypermutation read (>3 mutations) が LCR, E7, E1 領域に検出された。最大 13 カ所の C-to-T 置換変異が認められる read 配列が抽出されており、APOBEC3 による processive な変異導入が示唆された。(終元 巖、近藤一成 [NTT 東日本病院]、西山 智明 [金沢大学]、村松正道 [金沢大学])

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

弱毒生ワクチンの増殖を可能にすることを目指して新規のワクチン製造用培養細胞を作出する。そのために CRISPR/Cas9 システムによる iPS 細胞のゲノム編集系を立ち上げた。ヒト iPS 細胞 (Tic 細胞) をヒトラミン 521 でコートした容器上で単細胞から培養した。標的配列を 17 塩基長まで短縮したガイド RNA (tru-gRNA) を用いることとし、ヒト 9 番染色体の I 型インターフェロン遺伝子群のテロメア側、セントロメア側の領域でオフターゲット切断が起こりにくい標的配列を検索した。該当する配列に基づき PCR で tru-gRNA 転写用の鋳型を作成し、

in vitro で RNA を転写したのち、Cas9 蛋白質との複合体を形成させ、in vitro で標的配列の切断活性を確認した。Cas9-tru-gRNA 複合体をエレクトロポレーションにより iPS 細胞へ導入し、DNA 二本鎖切断後の修復過程での変異導入が起こっていることを確認した。(竹内隆正)

III. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及び Nature Medicine 等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続して行った。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、終元 巖)

IV. in silico 構造解析の応用

1) 病原性ウイルスゲノムデータベースの構築

ゲノム情報の基盤構築の一環として、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付加した。(横山勝、佐藤裕徳)

2) サル TRIM5 α 抵抗性となる HIV-1 カプシド N 末端ドメインにおけるアミノ酸置換

TRIM5 α は HIV-1 カプシドに結合する抗ウイルス因子である。最近、我々のグループと他のグループが、TRIM5 α による宿主間の障壁を克服する 2 つの異なる HIV-1 カプシドを報告した。本研究では、サルにおける TRIM5 の制約を回避する 2 つの HIV-1 カプシドの異なる変異の効果を比較するために、カプシドのみが異なる 2 つのサル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) クローンの構築し、TRIM5 を過剰発現したヒト細胞とサル細胞での複製を調べた。アミノ酸配列およびホモロジーモデリング法により構築した構造の比較解析を行うと、2 つのカプシド蛋白質は物理化学的性質の似たアミノ酸変異を獲得しているが、N 末端ドメインの構造が異なっていた。2 つのカプシドは SIVmac239 カプシドに比べ、TRIM5 α 抵抗性は不完全であ

ったが、2つの HIV-1mt クローンは、ともにサル細胞で増殖した。以上より、HIV-1 に重要な TRIM5 抵抗性を与えるカプシド蛋白質の変異のパターンは、複数存在すると考えられる。(横山 勝、野間口雅子[徳島大]、足立昭夫[徳島大]、佐藤裕徳)

3) インフルエンザウイルス H1N1pdm09 薬剤耐性株のリスク評価

インフルエンザウイルス H1N1pdm09 オセルタミビル/ベラミビル耐性株の NA 蛋白質の V241I および N369K 変異は、H275Y 耐性変異ウイルスの安定化に寄与することが報告されている。2013/14 シーズンに、札幌で検出された H1N1pdm09 のオセルタミビル/ベラミビル耐性株は、V241I と N369K 変異に加えて N386K 変異をもっていた。本研究では、N386K 変異が NA 構造安定性に与える影響を解析することで、この耐性株の全国的拡散のリスク評価を行った。その結果、N386K 変異はウイルスの安定化には寄与しないため、ウイルスの安定化に寄与する新たな二次変異を獲得しない限り、ヒトで大規模な流行を引き起こすリスクは低いことが示唆された。(横山 勝、高下恵美[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)

4) サフォードウイルスマウス小脳継代株のカプシドタンパク質の構造解析

本研究では、サフォードウイルス臨床分離株（無菌性髄膜炎患者の脳脊髄液由来）を、マウス小脳で五回継代することにより作出された小脳継代株について、カプシドタンパク質の *in silico* 構造解析を試みた。継代を進めるにつれ、VP2 領域に 2 カ所、VP3 領域に 1 カ所のアミノ酸置換が生じた。同属であるタイラーウイルスのカプシドタンパク質の構造情報 (PDB:1TME) を鋳型にし、小脳継代株の立体構造を予測した。その結果、VP2 領域のアミノ酸置換部位は、レセプター結合に関与する可能性のあるポケット領域近傍であることが判明し、VP3 アミノ酸置換部位と新たに水素結合を獲得したことが示唆された。(横山勝、小谷治[研究生・感染病理部]、永田典代[感染病理部]、佐藤裕徳)

V. 数理解析の応用

1) ランダム行列理論による HIV gp120 の動的性質の解析

中和抵抗性 HIV-1 gp120 の中和抗体逃避のメカニズムは、未だ不明な点が多い。本研究では、HIV-1 gp120 の中和抗体からの逃避および機能発現の分子メカニズムを検討した。抗 V3 抗体中和を逃避する分子メカニズムを知

るために、分子動力学計算により得られた動的相互相関行列からランダム行列理論を用いてアロステリックパスの情報を抽出した。V2、 β 17、ループ F、V3 のアミノ酸残基により構成されるアロステリックパスの存在が示唆された。したがって、V1/V2 はこのアロステリックパスを介して V3 の配置を制御することで、V3 を三量体において抗体がアクセスできない位置に配置し、抗体から逃れていると考えられる。次に、このアロステリックパスの機能発現での役割について検討した。このアロステリックパスの近傍にはレセプターである CD4 が結合する Phe43 キャビティがある。ゆえに、このキャビティはコレセプターとの相互作用部位をもつ V3 とアロステリックパスを介して繋がっている。したがって、このアロステリックパスには CD4 結合後の V3 の構造変化を導く役割があると考えられる。(横山勝、佐藤裕徳)

2) ノロウイルス GII.4 カプシドにおける共変異部位の推定

我々はこれまでに 2006/07 に大流行した GII.4_2006b 変異株は、長期に渡りウイルス粒子表面に位置するカプシドのアミノ酸残基に変化の制約が生じていることを明らかにしてきた。本研究では、ノロウイルス GII.4 カプシドにおけるアミノ酸変化の制約の原因となる、機能または構造を維持するために重要な共変異部位の推定を行った。ノロウイルス GII.4 カプシドの共変異部位として、4つのセクタを推定しセクタ 1~4 とした。それらをカプシド二量体構造に表示すると、セクタを構成するアミノ酸残基はアミノ酸配列では離れていても、立体構造では近傍に位置しているものが多かった。セクタ 2 および 3 は主にカプシドの P2 表面の血液型抗原結合部位周辺、および二量体境界面に位置していた。セクタは機能または構造を維持するために、セクタ内のアミノ酸残基は共変異しなければならないことから、セクタ 2 と 3 はそれぞれ抗体などからの逃避変異によるカプシド二量体の安定性の低下を補償する領域であり、カプシドの構造を維持する役割を果たしていると考えられる。(横山勝、中村浩美、佐藤裕徳)

VI. 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読システムの構築

バイオテロ・新興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムを既に構築してきた。これまでに 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* (Sa) 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。昨年度より、次世代シーケンサーの解読リードを病院・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分子疫学解析を行うための情報解析パイプライン Global core Genome SNP Analysis: GcoGSA Sa を構築している。本年度は、国内の主要な血清型のサルモネラ菌(*Typhimurium* (Ty), *Enteritidis* (En)および *Infantis*(In)) のゲノム分子系統解析パイプラインを構築した。国内で多く分離される主要血清型の詳細な分子系統解析が可能となり、PFGE では分解能が低い血清型でも、詳細な型別を行えることが可能になった。また、バイオテロ病原体として問題となるボツリヌス菌の解析も行い、PFGE、MLVA では同一と判定される株が、高分解能なゲノム分子疫学解析を行うことで詳細な比較が可能となり、トレーサビリティに重要であることが示された。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、見理 剛[細菌第二部]、山本明彦[細菌第二部]、岩城正昭[細菌第二部]、小宮貴子[細菌第二部]、畠山 敬[宮城県保健環境センター微生物部]、中嶋 洋[岡山県環境保健センター]、高橋元秀[医薬品医療機器総合機構]、柴山恵吾[細菌第二部])

VII. 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

大阪市内で、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) による院内感染事例が発生した。本事例では、IMP-1 型および CTX-M-2 グループの β -ラクタマーゼ遺伝子を有する多種にわたる腸内細菌科細菌が検出され、PFGE による分子疫学的解析では同一菌株および同一クローンによる伝播の可能性が低い菌株も認められた。従来の集団院内感染事例とは異なる様式を示す本事例の特徴を明らかにするために、本事例の 2011~2014 年に分離された CRE の全プラスミドの配列解析を行った。網羅的全プラスミド解析の結果、*bla*_{IMP-6} を持つ plasmid は、主に incompatibility group (Inc) N レプリコンに属するプラスミド上に存在したが、全ての Inc N プラスミドは完全に一致するものではなく、部分的な配列の変異もしくは欠失を生じていた。また、年代が進むにつれ、Inc N プラスミドと他のプラスミドとの融合プラスミドが生じていることも明らかにした。*bla*_{IMP-6} 保有プラスミドは、Inc N プラスミドの骨格を主体とする *bla*_{IMP-6} 保有プラスミドの塩基置換、挿入欠失、他の Inc 型との融合もしくは相同組換え、*bla*_{IMP-6}

を含む近傍領域の水平伝播、および、種・属を跨いだ広範なプラスミドの水平伝達が生じていたことが示唆された。2006 年に広島で *bla*_{IMP-6} および *bla*_{CTX-M-2} 保有 Inc N プラスミドが分離されており、本事例で得られたプラスミドと非常に類似していたが、完全に一致はしていなかった。2006 年には国内に上記プラスミドは存在し、変異の蓄積が始まっており、本事例の 4 年間で大きな変化を生じていたと推測され、少なくとも 2011 年以前から CRE の脅威に晒されていた可能性が示唆された。

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

VIII. 薬剤耐性プラスミドの由来をトレースする情報解析システムの開発

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。上に報告した通り、薬剤耐性プラスミドによる院内感染事例が国内でも 2011 年以前から起きていた可能性が示唆されている。昨年度我々は、ブラウザ経由で次世代シーケンズデータを用いて網羅的なプラスミド解析を行うことのできるシステム (Global Plasmidome Analyzing Tool: GPAT) と、GPAT 解析結果から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) を構築した。平成 26 年度は GPAT 中で使用するプログラムやパラメーターの見直しを行い、使用者がより容易に正しい結果を導き出しやすくする工夫を行った。また、GPAT 解析データが蓄積し必要なデータを発見することが難しくなってきたため、蓄積した膨大なデータの中から必要なデータを発見しやすくするための結果一覧表示機能を実装した。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

IX. 集団食中毒事例に係る病原細菌のゲノム解析および腸内細菌叢のメタゲノム解析 (O111 の比較ゲノムの結果)

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、

本事例の富山の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株(EHEC O111 110512 株)の完全長ゲノム配列決定を行っている。現段階で、7つの完全長 plasmid を決定し、染色体の gap 箇所は stx2 ファージを除く λ ファージ領域 3 箇所である。本事例の特徴的な領域を抽出するために、国内分離株 106 株の配列決定を行い、染色体配列および plasmid も含めた包括的な解析を行った。O111 110512 株 reference にし、O111 分離菌株の BLAST atlas 解析を行ったところ、一箇所の λ group phage および Stx2 prophage の領域で高頻度に欠失を生じている箇所が認められた。詳細な比較をしたところ、Stx2 prophage の stx2AB の上流領域において、本事例の O111 110512 株と 80%以上の相同性を有する ORF を持つ株が少ない傾向が認められた。本事例の HUS 発症患者由来 O111 分離株以外に、2008 年に分離された HUS 発症患者由来 O111 EHEC 株でも stx2AB の上流領域が高度に保存されていることが明らかとなった。国内分離株では HUS 発症患者由来の株数が少ないため、臨床情報が明記されている 2002～2012 年にデンマークで分離された non-O157 EHEC 株のゲノムデータ (n=96, BioSample ID: SAMEA2593950 ～ SAMEA2593983)を用いて、Stx2 prophage の比較解析を同様に行った。HUS 発症 non-O157 の 19 株中、8 株 (O26: 3 株, O86: 1 株, O103: 3 株および O111: 1 株)においても、同様に stx2AB の上流領域が保存されていた。stx2AB を有する国内分離 O111 株およびデンマーク non-O157 EHEC 株の HUS 発症患者由来株(n=20)および未発症由来株(n=79)の stx2AB 上流領域上の ORF の保有率を Fisher の正確確率統計で検定を行った結果、HUS 発症患者由来 stx2 陽性 non-O157 EHEC 株に於いて、nin region 内の ninG から general recombination region の recombinase bet の領域、antirepressor および adenine methylase の保有率が有意に高かった。本事例に特徴的であり、他の O111 分離株およびその他の血清型大腸菌は存在しない ORF は認められなかった。O111 110512 株には、7つの plasmid が存在しているため、供試した国内分離株間のそれら plasmid の保有パターンと比較も行った。pEBS512-01 (multiple antibiotic resistance virulence plasmid)、-02 (virulence plasmid)、-05 および pEBS512-06 の保有率は全体的に高い傾向を示していたが、本事例に特徴的および重症患者由来特徴的 plasmid の存在は、確認されなかった。以上の結果より、HUS 発症患者由来 EHEC に特徴的な ORF が Stx2 prophage 上に存在することが示唆された。

(関塚剛史、黒田 誠、竹内史比古、伊豫田淳[細菌第一部]、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])

X. 難治性腸疾患患者の腸内細菌フローラ解析

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン若しくはホスホマイシン/メトロニダゾール)を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と関連するのかは不明である。本研究では、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後でメタゲノム解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行なった。UC 患者 59 名の治療前、治療後(合計 161 サンプル)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*, *Enterobacter*, *Rothia*, *Leuconostoc* を含む 17 属が多い傾向にあり、治療後では、*Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Ruminococcus* を含む 13 属が増える傾向を示した。また、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者より臨床分離された *F. varium* Fv113 株の全ゲノム塩基配列決定を行い、染色体と 2つのプラスミドの完全長配列を決定した。染色体、2つのプラスミド配列の全長配列は、それぞれ、3,965,155 bp, 89,623 bp および 68,063 bp であった。現在、詳細なゲノム比較解析を行っている。

(関塚剛史、黒田 誠)

XI. 川崎病患児の腸内細菌フローラ解析

川崎病症例の細菌培養検査に使用した便検体をメタゲノム解析法にて細菌フローラ解析を行った。川崎病に関連して検出頻度の高い細菌種を塩基配列の相同性検索と LEfSe 法にて特徴的な細菌種を特定した。患者急性期便から *Streptococcus* spp. が優位な検出量として得られたため、本研究のために培養分離を行い確保した。各分離株の全ゲノム解読の結果、肺炎球菌 *S. pneumoniae* もしくは *Streptococcus mitis* group と系統が近い細菌種であると推定された。16S-rRNA および全ゲノム遺伝子の分子系統解析結果から新種の菌株であることが判明した。それぞれの分離株ゲノム情報にはスーパー抗原様の毒素は保有しておらず、明確な病原性因子を特定することができなかった。そこでマウス C57BL/6 に当該菌の腹腔接種にて病原性評価を行ったが、マウスへの顕著な病原性を示す菌株はなかった。腹腔内投与のみでは評価が不十分なため、静注投与による病原性評価とともにアジュバント併用で自己免疫様の病態を惹起するなど工夫を要すると推察された。

(関塚剛史、黒田誠、絹巻暁子[東京大学・小児科]、濱田洋通[東京女子医大・八千代医療センター])

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。加熱および非加熱滅菌による糞便を用いた培地を作製し、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した。16S metagenome 解析を行ったところ、非加熱滅菌糞便液体培地、加熱滅菌糞便液体培地および GAM 液体培地それぞれで、少なくとも 1.07%、5.55%および 14.01%の未知・難培養細菌が存在することが予測された。特に、加熱滅菌糞便液体培地では、2.53%および 1.35%の配列が新規 *Ruminococcus* 属細菌であることが予測された。GAM 液体培地では、大部分が新規 *Megasphaera* 属細菌であることが予測された。

(関塚剛史、黒田 誠)

XIII. 新興感染症に関わる病原性細菌の比較ゲノム解析

Mycobacterium massiliense, *M. abscessus sensu stricto* および *M. bolletii* を含む *M. abscessus* group subsp. は、土壌、水等の自然環境中に存在するのみならず、呼吸器、皮膚および皮下組織病変からも分離される病原体である。*M. massiliense* の特徴をゲノムレベルで明らかにするため、*M. massiliense* JCM 15300 の完全長ゲノム配列を決定し、*Mycobacterium* spp. および *M. abscessus* group subsp. 間で比較ゲノム解析を行った。その結果、*M. massiliense* には特徴的なゲノムアイランド *M. massiliense* Genomic Island 1 (MmGI-1) が存在し、MmGI-1 には、β酸化に関連する遺伝子が多数存在する事が明らかとなった。また、*M. massiliense* には、嫌気呼吸およびミコール酸のシクロプロパン合成に関与する事が示唆される遺伝子も存在していた。これら *M. massiliense* に特徴的な遺伝子領域の保有率を国内分離株の *M. abscessus* および *M. massiliense* で確認したところ、国内株でも高い保存性が認められた。培養実験の結果、MmGI-1 陽性 *M. massiliense* は、MmGI-1 陰性株よりも増殖能力が高く、付加的な脂質代謝が増殖に有利に働く事が示唆された。また、MmGI-1 上の遺伝子は、*M. avium* complex (MAC) の遺伝子と相同性を有する事から、*M. massiliense* と MAC 間で遺伝子の水平伝播もしくは組換えが生じた事が示唆された。

(関塚剛史、甲斐雅規[ハンセン病研究センター]、中永和枝[ハンセン病研究センター]、中田登[ハンセン病研究センター]、鹿住祐子[結核予防会・結核研究所]、前田伸

司[結核予防会・結核研究所]、牧野正彦[ハンセン病研究センター]、星野仁彦[ハンセン病研究センター]、黒田 誠)

XIV. 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

全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。分担研究者は、急性脳炎・脳症の原因究明を目的とした次世代シーケンサー (next-generation sequencing: NGS) による網羅的病原体検索を担当した。

本年度は 30 名の不明脳炎・脳症患者について、網羅的病原体検索が必要と判断された検体の検査を行った (P10-P44 35 症例のうち 5 症例は NGS 検査前に当該病原体が確定)。それぞれの患者髄液から、日本脳炎ウイルス、Human herpes virus-4, 8, Human parainfluenza virus 4b, Human bocavirus, Norovirus, 大腸菌等、様々な病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液から Human adenovirus C, Human herpes virus-5, 6B, 7, Enterovirus B, Human parainfluenza virus 3 を検出し、呼吸器感染症の憎悪も関連している可能性が示唆された。血液関連検体 (血清、血漿、全血) から、主に Torque teno virus (亜種含む) を検出する症例が多く、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症にともなって再活性化している可能性が示唆された。個別 PCR (対象配列が短く限定的) で検出できない症例においても、NGS は病原体ゲノム DNA の欠片でも検出でき、感度もおよそ 10 倍程度高いことが報告されているため、感染症の疑いが濃厚な症例においては非常に有効な検査手法である。ただし、研究段階の高度な核酸検査法であって確定検査診断ではないため、抗体検査法による IgM 陽転を検討するなど相補的な検査法をもって検証すべきだと思われる。

(関塚剛史、黒田誠、片野晴隆[感染病理部]、高崎智義[ウイルス第一部]、多屋馨子[感染症疫学センター])

品質管理に関する業務

HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチン (2 価ワクチンおよび 4 価ワクチン) の検定を製剤担当室として担当した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。また HPV ワ

クチンの製造・試験記録等要約書(summary lot protocol)の審査を実施した。(石井克幸、竹内隆正、柗元 巖、黒田 誠)

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 ワクチンの WHO ガイドラインの改訂を目的とした WHO 会議 (ジュネーブ) に参加し、改訂版ドラフトに関して討議を行った。(柗元 巖)

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44: 910-917 (2014)
- 2) Ohba K, Ichiyama K, Yajima M, Gemma N, Nikaido M, Wu Q, Chong P, Mori S, Yamamoto R, Wong JE, Yamamoto N. In vivo and in vitro studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS ONE.* 9: e97787 (2014)
- 3) Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology. *J. Virol.* 89: 2448-2452 (2015)
- 4) Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457: 295-299 (2015)
- 5) Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. Identification of APOBEC3B promoter elements responsible for activation by human papillomavirus type 16 E6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460: 555-60 (2015)
- 6) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J. Virol.*, 88(8):4145-4160, 2014.
- 7) Nomaguchi M, Nakayama E.E, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5α. *Microbes Infect.*, 16:936-944, 2014.
- 8) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013/2014 influenza season in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5): 2607-2617, 2015.
- 9) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: a global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis*. *Health Secur.* 2015 Jan-Feb;13(1):64-8. Epub 2015 Jan 28. PubMed PMID: 25812430; PubMed Central PMCID: PMC4389694.
- 10) Lee K, Kusumoto M, Sekizuka T, Kuroda M, Uchida I, Iwata T, Okamoto S, Yabe K, Inaoka T, Akiba M. Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Front Microbiol.* 2015 Feb 10;6:78. doi: 10.3389/fmicb.2015.00078. eCollection 2015. PubMed PMID: 25713569; PubMed Central PMCID: PMC4322709.
- 11) Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01553-14. doi: 10.1128/genomeA.01553-14. PubMed PMID: 25676762; PubMed Central PMCID: PMC4333662.

- 12) Sugita-Konishi Y, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A, Ohnishi T. New validated rapid screening methods for identifying *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Jpn J Infect Dis. 2015;68(2):145-7. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.133. Epub 2014 Dec 24. PubMed PMID: 25672358.
- 13) Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. Sci Rep. 2015 Feb 2;5:8185. doi: 10.1038/srep08185. PubMed PMID: 25640899; PubMed Central PMCID: PMC4313092.
- 14) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, Tayag E, Columna-Vingno AB, Malbas FF Jr, Bolo GC Jr, Sejvar JJ, Eagles D, Playford G, Dueger E, Kaku Y, Morikawa S, Kuroda M, Marsh GA, McCullough S, Foxwell AR. Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014. Emerg Infect Dis. 2015 Feb;21(2):328-31. doi: 10.3201/eid2102.141433. PubMed PMID: 25626011; PubMed Central PMCID: PMC4313660.
- 15) Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. Infect Genet Evol. 2014 Dec;28:183-91. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.030. Epub 2014 Oct 2. PubMed PMID: 25283803.
- 16) Doi I, Nagata N, Tsukagoshi H, Komori H, Motoya T, Watanabe M, Keta T, Kawakami M, Tsukano T, Honda M, Ishioka T, Takeda M, Ryo A, Kuroda M, Oishi K, Kimura H. An outbreak of acute respiratory infections due to human respiratory syncytial virus in a nursing home for the elderly in Ibaraki, Japan, 2014. Jpn J Infect Dis. 2014;67(4):326-8. PubMed PMID: 25056086.
- 17) Tsuyoshi Sekizuka, Masanori Kai, Kazue Nakanaga, Noboru Nakata, Yuko Kazumi, Shinji Maeda, Masahiko Makino, Yoshihiko Hoshino and Makoto Kuroda. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 in the *Mycobacterium abscessus* group reveal a conserved genomic island MmGI-1 related to putative lipid metabolism. PLoS One. 9(12):e114848, 2014
- 18) Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. Pathogens. 3(2):356-76, 2014
- 19) Yoshitaka Shirasago, Tsuyoshi Sekizuka, Kyoko Saito, Testuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Makoto Kuroda, Ryo Abe and Masayoshi Fukasawa. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. Jpn J Infect Dis. (in press) 2014
- 20) Wataru Kitagawa, Miyako Hata, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda and Jun Ishikawa. Draft Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824, an Aurachin RE Antibiotic Producer. Genome Announc. 9;2(5), 2014
- 21) Naoki Osada, Arihiro Kohara, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda and Kentaro Hanada. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. DNA Res. 21(6):673-83, 2014
- 22) Yuko Matsumoto, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda and Makoto Ohnishi. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 58(12):7545-7, 2014
- 23) Shinya Tsuzuki, Hitomi Fukumoto, Sohtarō Mine, Noriko Sato, Makoto Mochizuki, Hideki Hasegawa, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Takeji Matsushita and Harutaka Katano.

Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl.

Int J Clin Exp Pathol. 7(8):5308-12, 2014

- 24) Tsuyoshi Kenri, Tsuyoshi Sekizuka, Akihiko Yamamoto, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Takashi Hatakeyama, Hiroshi Nakajima, Motohide Takahashi, Makoto Kuroda and Keigo Shibayama.
Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.
Appl Environ Microbiol. 80(22):6954-64, 2014
- 25) Tsuyoshi Sekizuka, Ken-ichi Lee, Makoto Kuroda, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, Ikuo Uchida, Kiyoshi Tanaka, Yukino Tamamura and Masato Akiba.
Whole-Genome Sequence of CMY-2 β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain L-3553.
Genome Announc. 2(4), 2014
- 26) Fuminori Mizukoshi, Makoto Kuroda, Hiroyuki Tsukagoshi, Tsuyoshi Sekizuka, Keiji Funatogawa, Yukio Morita, Masahiro Noda, Kazuhiko Katayama and Hirokazu Kimura.
A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan.
Microbiol Immunol. 58(9):536-9, 2014
- 27) Kasumi Ishida, Tsuyoshi Sekizuka, Kyoko Hayashida, Junji Matsuo, Fumihiko Takeuchi, Makoto Kuroda, Shinji Nakamura, Tomohiro Yamazaki, Mitsutaka Yoshida, Kaori Takahashi, Hiroki Nagai, Chihiro Sugimoto and Hiroyuki Yamaguchi.
Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* genome sequence illuminates the bacterial role in the defense of the host amoebae against *Legionella pneumophila*.
PLoS One. 9(4):e95166, 2014
- 28) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Toru Kubota, Masaki Anraku, Masako Abe, Noriko Nakajima, Tsuyoshi Sekizuka, Kazuya Shirato, Yuriko Suzuki, Akira Ainai, Yuichiro Nakatsu, Kazuhiko Kanou, Kazuya Nakamura, Tadaki Suzuki, Katsuhiko Komase, Eri Nobusawa, Katsumi Maenaka, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro and Makoto Takeda.

The host protease TMPRSS2 plays a major role in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.

J Virol. 88(10):5608-16, 2014

2. 和文発表

- 1) 柗元 巖、HPV ワクチン、臨床と微生物、Vol. 41, No. 6, 725-729, 2014.
- 2) 黒田誠 病原体ゲノム解析の急速な進歩と細菌学の新たな展開 「感染・炎症・免疫」第44巻 第4号 374-377 (2015年1月)

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Maehama T, Kukimoto I. Wee1 binds to and stabilizes the E1 helicase of human papillomavirus type 16, 29th International Papillomavirus Conference (2014年8月、シアトル)
- 2) Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Kamoto H, Bonetti A, Kukimoto I, Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T. Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 and host interactions using CAGE technology, 29th International Papillomavirus Conference (2014年8月、シアトル)
- 3) Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Motomura K. Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada, 2014.
- 4) Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute Gastroenteritis. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada, 2014.
- 5) Yokoyama M, Sato H. Structural dynamics and correlated motions of HIV-1 gp120 revealed by molecular dynamics simulation. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal,

Canada, 2014.

- 6) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Toru Kubota, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. TMPRSS2 is essential for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) (2014年7月、カナダ・モントリオール)
- 7) Yoshitaka Shirasago, Tsuyoshi Sekizuka, Kyoko Saito, Testuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Makoto Kuroda, Ryo Abe, Masayoshi Fukasawa. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. HCV meeting 2014 (2014年9月 カナダ・バンフ)
- 8) M. Kai, N. T. Sekizuka, A. A. Maghanoy, M. F. Balagon, P. Saunderson, M. Makino, M. Kuroda. Comparison of genome sequences between *Mycobacterium leprae* prepared before and after passaging in nude mice footpad. The Join Meeting The XVIII International Symposium on Gnotobiology (XVIII-ISG) III International Ecologic Forum "Environment and human health" (EcoForum) (2014年9月 St-Petersburg, ロシア)
- 9) Jun Abe, Tyota Ebata, Naoki Saito, Kentaro Okunushi, Kazuhiko Nakabayashi, Makoto Kuroda. Human oral, gut and blood microbiota in patients with Kawasaki disease. International Kawasaki Disease Symposium 2015 (2015年2月 アメリカ・ハワイ)

2. 国内学会

- 1) 柗元 巖、ヒトパピローマウイルスと子宮頸癌の基礎、安全性評価研究会 (2014年4月、大阪)
- 2) 柗元 巖、ヒトパピローマウイルスのゲノム変異と子宮頸部発癌、第24回感染研シンポジウム(2014年5月、東京)
- 3) 森 清一郎、柗元 巖、ヒトパピローマウイルス16型のがん蛋白質E6/E7によるAPOBEC3Bプロモーターの活性化、第73回日本癌学会学術総会 (2014年9月、横浜)
- 4) 柗元 巖、近藤 一成、岩田 卓、川名 敬、日本人女性のCIN2/3および子宮頸部浸潤癌でのHPV遺伝子型分布、第73回日本癌学会学術総会 (2014年9月、横浜)
- 5) 森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柗元 巖、ヒトパピローマウイルス16型E6/E7による

APOBEC3Bプロモーターの活性化機構、第62回日本ウイルス学会学術集会 (2014年11月、横浜)

- 6) 若江 亨祥、Ahasan M Monjurul、王 哲、喜多村 晃一、森 清一郎、柗元 巖、中村 充弘、藤原 浩、村松 正道、APOBEC3はHPV16 Pseudovirionの感染性を低下させる、第62回日本ウイルス学会学術集会 (2014年11月、横浜)
- 7) 増田 雄司、柗元 巖、益谷 央豪、Mechanisms of ubiquitin chain elongation on p53 by a HECT E3 ligase, E6AP-E6 complex、第37回日本分子生物学会年会 (2014年11月、横浜)
- 8) 横山 勝、中村浩美、佐藤裕徳。ノロウイルスGII.4 カプシドにおける共変異部位の推定。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 9) 佐藤裕徳、横山 勝、本村和嗣、中村浩美、田村 務、吉澄志磨、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田 衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan. ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 10) 本村和嗣、飯塚節子、中村昇太、元岡大祐、大出 裕高、杉浦互、佐藤裕徳、田中智之、武田直和。ノロウイルス集団食中毒事例におけるウイルス亜集団遺伝系統の包括的解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 11) 泉泰輔、横山 勝、白川康太郎、酒井遥介、宮崎 恭行、佐藤裕徳、高折晃史。The Possibility for developing a novel antiHIV-1 Drug targeting APOBEC3GVif interaction. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 12) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山 勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤 彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所。2013/14 シーズンにおけるNA 阻害剤耐性A (H1N1) pdm09 ウイルスの地域流行。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 13) 関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山 勝、佐藤裕徳、團塚 愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗。SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014.
- 14) 引地優太、横山 勝、竹村太地郎、藤野真之、熊倉 成、山本直樹、佐藤裕徳、俣野哲朗、村上 努。新規CXCR4 阻害剤KRH3955 耐性HIV1 の誘導とその解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、

- 2014.
- 15) 原田恵嘉、横山 勝、Boonchawalit Samatchaya、佐藤裕徳、松下修三、吉村和久。CD4 類似低分子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性プロファイルと分子動力的機構解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.
 - 16) 岡智一郎、横山 勝、高木弘隆、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、遠矢幸伸、片山和彦、佐藤裕徳。カリシウイルスプロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価。第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.
 - 17) 佐藤 裕徳、本村 和嗣、横山 勝。環境ウイルスとヒト集団の関わり。第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.
 - 18) 横山 勝、佐藤裕徳。ランダム行列理論による HIV gp120 の動的性質の解析。第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.
 - 19) 横山 勝、佐藤裕徳。HIV-1 gp120 における中和逃避のためのアロステリックパス。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.
 - 20) 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 114 回日本皮膚科学会総会 (横浜市, 2015 年 5 月)
 - 21) 磯部順子、木全恵子、清水美和子、金谷潤一、増田千恵子、関塚剛史、黒田誠、大西真、佐多徹太郎、綿引正則。2011 集団食中毒検体から分離された Stx2 フェージの特徴。第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (京都市 2014 年 7 月)
 - 22) 黒木靖敏、松尾淳司、石田香澄、山崎智弘、山根千夏世、中村眞二、関塚剛史、黒田誠、杉本千尋、永井宏樹、山口博之。原始的なクラミジア Neochlamydia S13 が共生するアカントアメーバのレジオネラ撃退機序を解明するための基礎的な検討。日本細菌学会北海道支部会 (札幌市、2014 年 8 月)
 - 23) 熊谷翔大、松尾淳司、石田香澄、山崎智弘、中村眞二、関塚剛史、黒田誠、杉本千尋、永井宏樹、山口博之。比較ゲノム解析から紐解くクラミジアの多様性と進化。日本細菌学会北海道支部会 (札幌市、2014 年 8 月)
 - 24) 李 謙一、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、内田郁夫、岩田剛敏、岡本晋、矢部希見子、稲岡隆史、秋庭正人。サルモネラ薬剤耐性アイランド多コピー化の様式解明。第 157 回日本獣医学会学術集会。(札幌市 2014 年 9 月)
 - 25) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、関塚剛史、駒瀬勝啓、長谷川秀樹、黒田誠、河岡義裕、田代真人、竹田誠。宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は、インフルエンザウイルスの生体内活性化酵素である。第 157 回日本獣医学会学術集会。(札幌市 2014 年 9 月)
 - 26) 関塚剛史、李 謙一、黒田誠、楠本正博、岩田剛敏、内田郁夫、田中聖、玉村雪乃、秋庭正人。多剤耐性 *Salmonella Typhimurium* のゲノム生物学的特徴。第 157 回日本獣医学会学術集会。(札幌市 2014 年 9 月)
 - 27) 烏谷竜哉、関塚剛史、山下明史、黒田 誠、野村恭晴、調 恒明、仙波敬子、宮本 仁志、四宮博人。*Salmonella enterica* serovar 4:i:- 株の次世代シーケンサーによるゲノム解析。第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会 (徳島市 2014 年 10 月)
 - 28) 趙娜、中山真彰、関塚剛史、黒田誠、阿戸学、中島千絵、鈴木定彦、井上哲圭、大原直也。*metK* の変異は BCG にパラアミノサリチル酸に対する耐性を付与する。第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会 (徳島市 2014 年 10 月)
 - 29) 堀江亜矢、関塚剛史、竹内史比古、黒田 誠、花田賢太郎、山地俊之。志賀毒素の細胞傷害作用に対するゲノムワイド shRNA スクリーニング。第 87 回日本生化学会大会 (京都市 2014 年 10 月)
 - 30) 阿部淳、中林一彦、江畑亮太、黒田誠。川崎病患者の末梢血、咽頭・直腸スワブのメタゲノム解析。第 34 回日本川崎病学会・学術集会 (千葉県八千代市 2014 年 10 月)
 - 31) 福本瞳、高橋健太、佐藤由子、峰宗太郎、保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀樹、黒田誠、片野晴隆。網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用。第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜市 2014 年 11 月)
 - 32) 稲崎倫子、名古屋真弓、板持雅恵、嶋一世、小渕正次、稲畑良、長谷川澄代、黒田誠、佐多徹太郎、滝澤剛則。次世代シーケンサーによる感染性胃腸炎集団事例患者検体からのサポウイルス GV.2 の検出。第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜市 2014 年 11 月)
 - 33) 稲崎倫子、名古屋真弓、板持雅恵、嶋一世、小渕正次、稲畑良、長谷川澄代、黒田誠、佐多徹太郎、

- 滝澤剛則。 感染性胃腸炎集団事例患者検体からの次世代シーケンサーによるサポウイルス GV.2 の検出。 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜市 2014 年 11 月)
- 34) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠。 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスの生体内必須活性化酵素である。 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜市 2014 年 11 月)
- 35) 黒田誠、関塚剛史。川崎病患者の腸内細菌フローラ解析。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 36) 烏谷竜哉、関塚剛史、山下明史、黒田誠、調恒明、仙波敬子、木村千鶴子、野村恭晴、宮本仁志、四宮博人。サルモネラ 4,5,12:i:-株のゲノム構造および多剤耐性の性状について。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 37) 趙娜、中山真彰、関塚剛史、黒田誠、本田尚子、阿戸学、中島千絵、鈴木定彦、大原直也。抗酸菌におけるパラアミノサリチル酸に対する新たな耐性機序の可能性。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 38) 本田尚子、佐藤法仁、阿戸学、松村隆之、山崎利雄、関塚剛史、黒田誠、中山真彰、小林和夫、大原直也。A single base insertion in 16S rRNA gene confers Streptomycin dependence in *Mycobacterium bovis* BCG。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 39) 甲斐雅規、中田登、関塚剛史、黒田誠、牧野正彦。日本で分離されたらい菌 Kyoto-2 の特徴的なゲノタイプ。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 40) 関塚剛史、甲斐雅規、中永和枝、中田登、前田伸司、牧野正彦、黒田誠。比較ゲノム解析により明らかとなった *Mycobacterium massiliense* の脂質代謝関連ゲノムアイランド。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 41) 長谷川紀子、関塚剛史、山下明史、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 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 42) 山下明史、関塚剛史、黒田誠。GcoGSA-BA: NGS データから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 43) 松井真理、鈴木里和、関塚剛史、山下明史、鈴木仁人、黒田誠、柴山恵吾。IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ保有プラスミドの全塩基配列解読で判明した他菌種の腸内科細菌の院内感染。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 44) 鈴木仁人、松井真理、鈴木里和、関塚剛史、黒田誠、柴山恵吾。VI 型エフェクター・免疫蛋白質の進化と多様性。第 88 回日本細菌学会 (岐阜市, 2015 年 3 月)
- 45) 長谷川紀子、川上展弘、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 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会 (福岡市, 2014 年 6 月)
- 46) 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 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会 (福岡市, 2014 年 6 月)
- 47) 山下明史、黒田誠。プラスミドームネットワーク解析: プラスミド上の遺伝子水平伝達ネットワーク解析。第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会 (福岡市, 2014 年 6 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