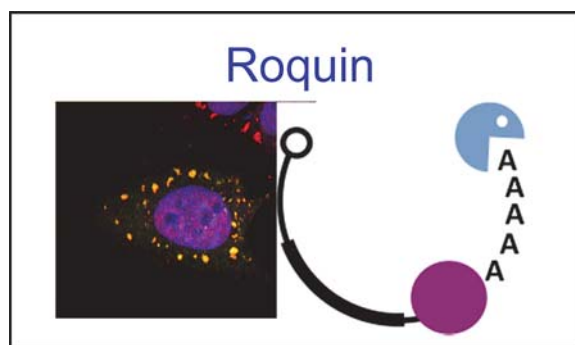
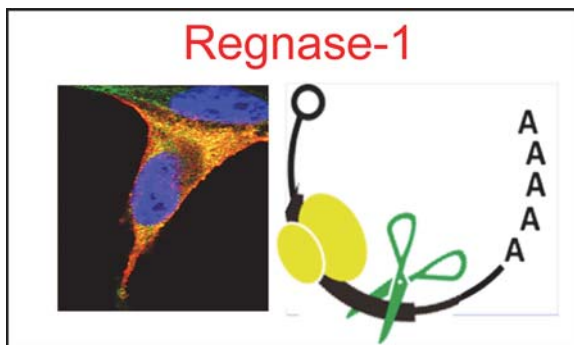


Annual Report of the Institute for Virus Research Kyoto University Volume 58

2015



**ANNUAL REPORT OF THE INSTITUTE
FOR VIRUS RESEARCH 2015**

京都大学ウイルス研究所年報

**ANNUAL REPORT OF THE INSTITUTE
FOR VIRUS RESEARCH, KYOTO UNIVERSITY**

VOLUME 58

Editorial Board
Sugita Masahiko (Editor in Chief)
Masao Matsuoka, Toshiyuki Otsuka,
Hiroki Kato

2015

THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH
KYOTO UNIVERSITY

PUBLISHED BY
THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH, KYOTO UNIVERSITY
SHOGGIN-KAWAHARACHO, SAKYO-KU, KYOTO 606-8507, JAPAN

Cover:

Inflammation-related mRNAs are degraded by two proteins Regnase-1 and Roquin in a spatiotemporally distinct manner. Whereas Regnase-1 cleaves translationally active mRNAs in endoplasmic reticulum (Top), Roquin degrades translationally inactive mRNAs in stress granules (Bottom). Lack of Regnase-1 in mice leads to the development of severe autoimmune inflammatory diseases (Middle right) compared with wild-type control (Middle left).

CONTENTS

<u>Chronological Table</u>	1
<u>Research Activities</u>	
Department of Viral Oncology （がんウイルス研究部門）	
Laboratory of Gene Analysis （がん遺伝子研究分野）	7
Laboratory of Cell Regulation （細胞制御研究分野）	17
Laboratory of Tumor Biogenesis （生体発がん機構研究分野）	22
Laboratory of Human Tumor Viruses （ヒトがんウイルス研究分野）	29
Department of Genetics and Molecular Biology （遺伝子動態調節研究部門）	
Laboratory of Molecular Genetics （分子遺伝学研究分野）	42
Laboratory of Biochemistry （情報高分子化学研究分野）	50
Department of Biological Responses （生体応答学研究部門）	
Laboratory of Biological Protection （生体防御研究分野）	60
Laboratory of Infection and Prevention （感染防御研究分野）	67
Department of Cell Biology （細胞生物学研究部門）	
Laboratory of Subcellular Biogenesis （構造形成学研究分野）	79
Laboratory of Growth Regulation （増殖制御学研究分野）	85
Laboratory of Signal Transduction （信号伝達学研究分野）	96
Laboratory of Integrated Biological Information （高次生体情報研究分野）	107
Center for Human Retrovirus Research （附属ヒトレトロウイルス研究施設）	
Laboratory of Viral Pathogenesis （ウイルス病態研究領域）	111
Laboratory of Virus Control （ウイルス制御研究領域）	122
Experimental Research Center for Infectious Diseases （附属感染症モデル研究センター）	
Laboratory of Ultrastructural Virology （ウイルス微細構造研究領域）	133
Laboratory of Primate Model （霊長類モデル研究領域）	136
Laboratory of Evolutional Virology （進化ウイルス研究領域）	144
Center for Emerging Virus Research （附属新興ウイルス研究センター）	155
Reproductive Engineering Team （動物実験委員会マウス作製支援チーム）	161
Computer Network of Institute for Virus Research （ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム）	165
<u>Seminars of the Institute for Virus Research</u>	168
Organization and Staff （構成員）	170

CHRONOLOGICAL TABLE

1956 April	Institute for Virus Research, Kyoto University, was founded with two departments (Pathology and Biophysics).
1956 April	Scientific Lectures for the Public were presented commemorating the opening of the Institute (the successive Memorial Lecture Series have been presented annually hereafter).
1957 April	Department of Biochemistry and Department of Serology and Immunology were established.
1958 April	Department of Prevention and Therapeutics was established.
1958 December	"Advances in Virology", Vol. 1 (in Japanese) was published as collection of the Memorial Lectures (the successive volumes were published annually hereafter until 1960).
1958 December	"Annual Report of the Institute for Virus Research", Vol. 1, was published (the successive volumes have been published annually hereafter).
1959 July	Virus Diagnosis Center was established.
1961 October	The 1st Symposium of the Institute for Virus Research was held under the auspices of the Institute with the nationwide participants. The proceedings of the Symposium were published as the first issue of the new series of "Advances in Virology" in Japanese (the successive Symposia have been held and their proceedings published annually hereafter).
1962 April	Department of Tumor Virus was established.
1962 October	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Medicine, and students of the School were first admitted to the Institute.
1962 December	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Science, and students of the School were first admitted to the Institute.
1964 April	Virus Diagnosis Center was renamed Virological Diagnosis Center.
1965 September	Construction of the new building for the Institute commenced.
1967 March	Construction of the new building was completed.
1968 April	Department of Genetics was established.
1974 April	Department of Molecular and Cellular Virology was established.
1977 April	Department of Neurological Virus Disease was established as such that Visiting Staff be appointed.
1978 April	Animal Laboratory for Experimental Virus Infection was established.
1981 March	Construction of extension of the main building was completed. Thus the main building now constitutes five floors with a basement occupying the aggregate area of 5,410m ² .

The major part (ca. 481m²) of the extended area serves for researches involving radioisotope labelling and in vitro DNA recombination experiments requiring the P3 facilities.

- 1986 May The memorial events for the 30th anniversary of foundation of this Institute were held on May 16-17.
- 1986 November Professor Yorio Hinuma was honoured as "Person of Cultural Merits (Bunkakorosha)"
- 1987 May Department of Biophysics and Department of Tumor Virology were reorganized to form Department of Viral Oncology which consists of 4 Laboratories.
- 1988 April Virological Diagnosis Center was reorganized to become Research Center for Immunodeficiency Virus which consists of Laboratory for AIDS Immunology and Laboratory of Viral Pathogenesis.
- 1989 April Department of Biochemistry and Department of Genetics were reorganized to form Department of Genetics and Molecular Biology which consists of 3 Laboratories.
- 1990 March Construction of a new building was partly completed.
- 1990 April Department of Pathology and Department of Molecular and Cellular Virology were reorganized to form Department of Cell Biology which consists of 3 Laboratories, while Department of Serology and Immunology, Department of Prevention and Therapeutics and Department of Neurological Virus Disease were reorganized to form Department of Biological Responses which consists of 2 laboratories and one for visiting staff.
- 1992 April Laboratory of Regulatory Information was established within the Department of Cell Biology to host a visiting professor as well as a research group.
- 1993 December Construction of the new building which accommodates three laboratories from this Institute as well as some from the Medical School and the Center for Molecular Biology and Genetics of the University was completed.
- 1994 October Construction of a new animal facility with some laboratories was completed.
- 1998 April One staff member was appointed academic staff of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and students of the school were first admitted to the Institute.
- 1998 April Research Center for Immunodeficiency Virus was reorganized to become Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome.
- 1998 April Laboratory of Virus Control in Research Center for Immunodeficiency Virus was established as such that Visiting Staff be appointed.
- 1999 April Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Biostudies, and students of the school were first admitted to the Institute.

2002 April	The Experimental Research Center for Infected Animals was abolished and the Experimental Research Center for Infectious Diseases was established instead.
2005 April	Research Center for Emerging Virus was established.
2009 June	The Institute commenced service as a Joint Usage / Research Center for fusion of advanced technologies and innovative approaches to viral infections and life science.
2010 April	Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome Research was reorganized to become Center for Human Retrovirus Research.
2010 April	Research Center for Emerging Virus was reorganized to become Center for Emerging Virus Research.
2013 October	Laboratory of Evolutional Virology was established in Experimental Research Center for Infectious Diseases.
2015 September	Laboratory of Ultrastructural Virology was established in Experimental Research Center for Infectious Diseases.

Research Activities

I. First Group

Members

Professor	Yoshinori Akiyama
Associate Professor	Hiroyuki Mori
Assistant Professor (Spe.)	Yohei Hizukuri (Center for Emerging Virus Research)
Research Fellow	Eiji Ishii
Graduate Student	Yasushi Daimon, Ryoji Miyazaki, Koichiro Akiyama, Kohei Yoshitani, Sohei Sakashita, Ayumi Ga, Naomi Myougo, Yutaro Yamagata, Taiga Yoneshige
Technical assistant	Michiyo Sano

Introduction

The research projects carried out in this group are concerned with post-translational events in the expression of genetic information. Specifically, processes of protein translation, protein translocation across and integration into the membrane, membrane protein proteolysis and extracytoplasmic stress responses are investigated by combined molecular genetic, biochemical biophysical and structural approaches.

Topics

1) A novel SRP recognition sequence in the homeostatic control region of heat shock transcription factor σ^{32} : R. MIYAZAKI, T. YURA¹, T. SUZUKI², N. DOHMAE², H. MORI and Y. AKIYAMA (1Kyoto Sangyo University, 2RIKEN)

Heat shock response plays a major role in sustaining protein homeostasis in all organisms. In *Escherichia coli*, the activity and amount of transcription factor σ^{32} , which is responsible for expression of heat shock genes, elevate transiently upon heat shock. The initial induction is followed by negative feedback to inactivate and degrade σ^{32} . Previous work revealed that, in addition to the molecular chaperones (DnaK/DnaJ and GroEL/GroES) and a membrane protease (FtsH), signal recognition particle (SRP) plays a critical role in this feedback control through targeting σ^{32} to the membrane¹. Here we identified *in vivo* “nearest neighbor” proteins of σ^{32} to decipher their molecular interaction properties. The results of *in vivo* photo-cross-linking experiments indicate that the homeostatic control region of σ^{32} interacts with Ffh (the protein subunit of SRP) and the molecular chaperones DnaK, DnaJ and HtpG at multiple positions. Importantly, the σ^{32} –Ffh

interaction observed was significantly affected by mutations in the control region that compromise the feedback regulation but not by a total deletion of DnaK and DnaJ. Furthermore, photo- and disulfide-cross-linking experiments demonstrated that Ffh uses its signal peptide-binding site to associate with the homeostatic control region of σ^{32} . On the basis of these findings, we propose that SRP delivers σ^{32} to the membrane by directly recognizing its control region, which lacks a continuous hydrophobic stretch but could form an amphipathic helix. Homeostatic regulation of the heat shock response thus requires a novel type of SRP recognition mechanism.

1) Lim, B., Miyazaki, R. *et al.* (2013). Heat shock transcription factor σ^{32} co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. *PLoS Biology*, 11, e1001735.

2) Marine *Vibrio* features alternative cation-dependence of SecDF paralogs regulated by a nascent polypeptide for salinity adaptation : E. ISHII, S. CHIBA², S. SAKASHITA, N. HASHIMOTO, S. KOJIMA¹, M. HOMMA¹, K. ITO², Y. AKIYAMA and H. MORI (¹Nagoya University, ²Kyoto Sangyo University)

The translocation of proteins across biological membranes is universally conserved from bacteria to animals. In bacteria, the translocation machinery is composed of SecYEG, the polypeptide-conducting channel, SecA, the essential motor ATPase, and SecDF, the membrane integrated complex. SecDF interacts with the SecYEG translocon in bacteria and enhances protein export in a proton-motive-force-dependent manner. *Vibrio alginolyticus*, a marine-estuarine bacterium, contains two SecDF paralogs, V.SecDF1 and V.SecDF2. We showed that the export-enhancing function of V.SecDF1 requires Na⁺ instead of H⁺, whereas V.SecDF2 is Na⁺-independent, presumably requiring H⁺. In accord with the cation-preference difference, V.SecDF2 was only expressed under limited Na⁺ concentrations whereas V.SecDF1 was constitutive. However, it is not the decreased concentration of Na⁺ per se that the bacterium senses to up-regulate the V.SecDF2 expression, because marked up-regulation of the V.SecDF2 synthesis was observed irrespective of Na⁺ concentrations under certain genetic/physiological conditions: (i) when the *secDF1_{VA}* gene was deleted and (ii) whenever the Sec export machinery was inhibited. VemP (*Vibrio* export monitoring polypeptide), a secretory polypeptide encoded by the upstream ORF of *secDF2_{VA}*, plays the primary role in this regulation by undergoing regulated translational elongation arrest, which leads to unfolding of the Shine–Dalgarno sequence for translation of *secDF2_{VA}*. Genetic analysis of *V. alginolyticus* established that the VemP-mediated regulation of V.SecDF2 is essential for the survival of this marine bacterium in low-salinity environments. These results reveal that a class of marine bacteria exploits nascent-chain ribosome interactions to optimize their protein export pathways to propagate efficiently under different ionic environments that they face in their life cycles.

List of Publications

Akiyama, K.^a, Mizuno, S.^a, Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., and Akiyama, Y. (2015). Role of membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. **eLife** 4, e08928.

^aequally contributed

Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y., and Mori, H. (2015). Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112, E5513–E5522.

Daimon, Y., Narita, S.-i., and Akiyama, Y. (2015). Activation of TA system toxins suppresses lethality caused by the loss of σ^E in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 197, 2316-2324.

檜作洋平、秋山芳展 (2015). 膜内部でのタンパク質分解とストレス応答制御 別冊・医学のあゆみ「レドックス UPDATE —ストレス制御の臨床医学・健康医学」(監修：平家俊男、淀井淳司) 医歯薬出版株式会社 pp 69-74.

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 13th International Student Seminar, Kyoto, Japan, March 3-7, 2015.

Mori, H., Ishii E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K. and Akiyama, Y. : Nascent chain-mediated regulation of a SecDF paralog optimizes sodium dependence of protein export for environmental adaptation of a marine-estuarine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program, First Symposium: From Genes to Human Diseases, Fukuoka, March 16-17, 2015

秋山芳展:大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の特徴的な膜内挿入ループ領域の機能解析. 2014 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」、三島、2015 年 3 月 23 日 - 24 日

森 博幸:新生鎖 VemP による V.SecDF2 の発現制御を利用した *Vibrio* 菌の環境適応. 2014 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」、三島、2015 年 3 月 23 日 - 24 日

大門康志、成田新一郎：大腸菌の表層ストレス応答に関わる σ^E の必須性は TA システムにおける toxin の活性化により解消される．第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、2015 年 3 月 26 日 - 28 日

大門康志、成田新一郎、秋山芳展： σ^E の欠失による大腸菌の致死性は TA システムトキシンの活性化により抑制される．2015 年度農芸化学学会大会、岡山、2015 年 3 月 26 日 - 30 日

檜作洋平、秋山芳展：表層ストレス応答制御に関与する RseP プロテアーゼの基質切断反応の細胞内蛍光イメージングに向けた取り組み．第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

大門康志、成田新一郎、秋山芳展：TA システムのトキシンの活性化や低濃度の抗生物質による、大腸菌の生育における σ^E の必須性の解消機構．第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

宮崎亮次、由良隆、鈴木健裕、堂前直、森博幸、秋山芳展：熱ショック転写因子 σ^{32} とシグナル認識粒子の相互作用機構の解析．第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別．第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

檜作洋平：細菌表層ストレス応答の制御機構と生体イメージング解析．第 2 回生命理学研究会、名古屋、2015 年 8 月 29 日

檜作洋平、秋山芳展：Live-cell imaging of a proteolytic event by an intramembrane protease RseP that regulates extracytoplasmic stress response. 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢、2015 年 9 月 13 日 - 15 日

森 博幸：タンパク質分泌を駆動する反復モーターの駆動原理．第 53 回生物物理学会年会シンポジウム「生体マシナリーにおける力発生と進化の共通原理」、金沢、2015 年 9 月 13 日 - 15 日

石井英治：翻訳アレストを介したビブリオ属細菌の低食塩環境適応機構、「新生鎖の生物学」第 2 回若手ワークショップ、山形、2015 年 9 月 28 日 - 30 日

秋山光市郎：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別。「新生鎖の生物学」第 2 回若手ワークショップ、山形、2015 年 9 月 28 日 - 30 日

宮崎亮次:熱ショック転写因子 σ^{32} との膜への輸送を介した新奇な機能制御機構.「新生鎖の生物学」第2回若手ワークショップ、山形、2015年9月28日-30日

米重大河: *in vitro* 膜透過実験系を用いた VemP の翻訳アレストの解除機構の解明.「新生鎖の生物学」第2回若手ワークショップ、山形、2015年9月28日-30日

坂下宗平: LacZ レポーターシステムを使用した VemP アレストモチーフの解明に向けて.「新生鎖の生物学」第2回若手ワークショップ、山形、2015年9月28日-30日

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 22nd East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Okinawa, Japan, November 11-14, 2015.

檜作 洋平、秋山 芳展: 細菌表層ストレス応答を制御する S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼの細胞内イメージング解析. 第38回日本分子生物学会大会・第88回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015年12月1日-4日

石井英治、橋本成祐、千葉志信、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森 博幸: ビブリオ属細菌の低食塩環境への適応: アレストペプチド VemP による SecDF 発現制御の役割. 第38回日本分子生物学会大会・第88回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015年12月1日-4日

宮崎亮次、由良隆、鈴木健裕、堂前直、森博幸、秋山芳展: 熱ショック転写因子 σ^{32} とシグナル認識粒子の相互作用. 第38回日本分子生物学会大会・第88回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015年12月1日-4日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展: S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別. 第38回日本分子生物学会大会・第88回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015年12月1日-4日

Mori, H., Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K. and Akiyama, Y.: Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. 第38回日本分子生物学会大会・第88回日本生化学会大会合同大会 Symposium “Nascent chains: the ribosome as a hub for protein quality control”, Kobe, Japan, December 1-4, 2015

II. Second Group

Members

Associate Professor

Hiroyuki Sakai

Assistant Professor

Shin-ichi Yanagawa

Topics

1) Analysis of Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway in vivo: S. YANAGAWA

I found that Keratin associated protein (Krtap) 13 binds to cytoplasmic portion of LRP6, a co-receptor for Wnt. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling. Krtap13 was found to induce co-clustering of LRP6 and Dvls, thereby inhibiting Axin mediated β -catenin destruction complex that leads to activation of Wnt signaling.

To analyze effect of ectopic overexpression of Krtap13 *in vivo*, I generated a Krtap13-trans-gene (Krtap13-Tg) consisting of CAG-promoter, loxp-polyA-loxp cassette, and 3XFLAG-tagged human Krtap13 cDNA and transgenic mouse lines carrying this Tg were established. This Krtap13-Tg can express Krtap13 only after Cre-induced recombination of Tg. By crossing these Krtap13-Tg mice with another transgenic mice that express Cre in a tissue-specific way, I generated a mice system that allowed tissue specific overexpression of Krtap13. Twenty-five% of mice born from crossing between Krtap13-Tg mice and CAG-Cre-Tg mice developed Lymphoma/ Leukemia 1~1.5 year after birth. Lymphoma/ Leukemia cell typing analyses using FACS are underway.

2) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4: H. SAKAI

HPV infection begins in the basal cells of the epithelium, and as these cells divide, differentiate, and migrate toward the surface of the epithelium, the virus is able to complete its life cycle. The viral life cycle depends on the differentiation of the epithelium, but how the life cycle is controlled is not well understood. It is interesting that although viral oncoproteins cause the increase of cellular proliferation and/or transformation, terminally cellular differentiation of epithelium is required for completion of the viral life cycle.

The expression of E1^{E4} occurs in the upper layers of the HPV-infected epithelium, coordinating with the onset of viral genome amplification and the expression of viral late genes. It is known that E1^{E4} disrupts the keratin networks. It is also known that E1^{E4} induces G₂/M cell cycle arrest. But it is yet to be known

well about the details of E1^{E4}. To investigate novel functions of E1^{E4}, we performed yeast two-hybrid assays and got several candidate proteins as which interacts with E1^{E4}. As the results, it is suggested that E1^{E4} associates with the Aggresome compartment that is one of cellular inclusion body systems. In the future, we will ascertain the function of E1^{E4} and its involvement in the viral life cycle.

3) Analysis of CAF formation mechanism using HPV positive cells: H. SAKAI

In many reports, the importance of the interaction between the cancer stem cells and the microenvironments has been indicated. In the previous studies, it was suggested that HPV E6, E7, c-Myc, and H-ras were the key factors for the establishment of the cancer stem cell in the cervical cancer. These factors might alter the microenvironment to be favorable for cancer development. To examine the effect of the cancer cells in fostering the cancer-associated fibroblasts (CAFs), HPV-positive cancer cells, SiHa, HeLa, and Caski, were applied to the organotypic raft culture, and the effects on the fibroblasts were analyzed by gene-expression profiling. The expressions of CD44 and α -SMA were used as the markers for the CAF induction. In another experiment, the fibroblasts expressing an oncogene, *myc*, *src*, or *ras* were used as the transformed fibroblasts, and normal HFKs or HeLa cells were overlaid on these cells. The effect of TGF β produced by CAFs on the EMT of normal and HPV-positive keratinocytes was also examined. These inter-cellular communications might be important for the progression of the cervical cancer.

List of Publications

I. First Group

教授	秋山芳展
准教授	森 博幸
特定助教	檜作洋平（新興ウイルス研究センター）
研究員	石井英治
大学院生	大門康志、宮崎亮次、秋山光市郎、吉谷亘平、坂下宗平、何あゆみ、 明後尚美、山形優太郎、米重大河
技術補佐員	佐野美智代

本年は、理学研究科大学院生（D1）として吉谷亘平さんが、理学研究科大学院生（M1）として明後尚美さん、山形優太郎さん、米重大河さんが、医学研究科大学院生（M1）として何あゆみさんが新たに加わりました。一方、博士研究員の田中夏子さんが名古屋大学に移動して新たなテーマのもとで研究を始め、又、三登一八さん、水野慎也さん、棕野翠さんが修士課程を終了し就職のため研究室を去りました。附属新興ウイルス研究センター特定助教の檜作洋平博士とは、引き続き密接な協力の下に研究を行っています。

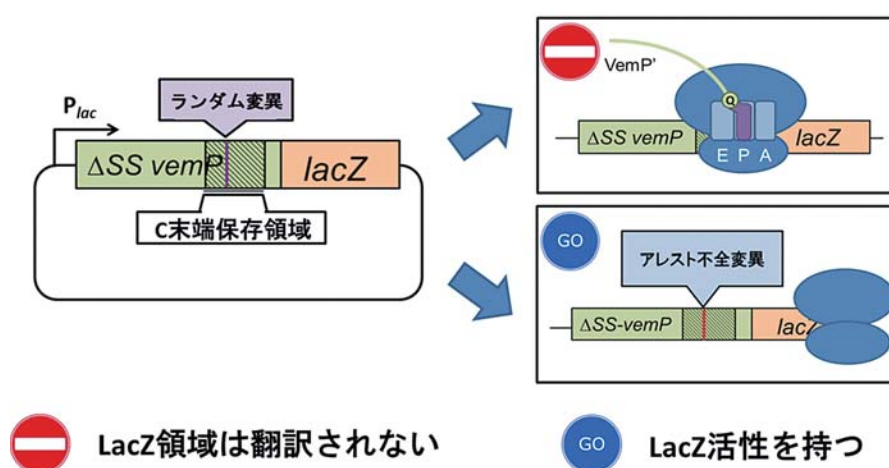


レポーター系を用いた分泌モニタータンパク質 VemP C 末端保存領域の網羅的変異解析

細菌のタンパク質膜透過には、膜透過チャネル SecYEG、駆動因子 SecA ATPase、膜透過促進因子 SecDF が主要な役割を果たしています。当研究室では、「SecDF は H^+ 輸送能と共役した自身の大きな構造変化により膜透過基質タンパク質を非細胞質側に引っ張り出す。」との作業仮説を提案しています¹。近年、海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* が、イオン選択性の異なる 2 種の SecDF を持ちそれらの発現が食塩環境変化に適応する為に巧妙に制御されていることを見いだしています。Na⁺ 駆動型タンパク質 V.SecDF1 の発現は恒常的に起こるのに対して、H⁺ 駆動型タンパク質 V.SecDF2 の発現は通常は厳密に抑制されています。一方で低食塩環境下などのタンパク質膜透過能が低下す

る状況において、V.SecDF2 の発現が劇的に上昇し、膜透過能の維持に働きます。この発現制御には *V.secDF2* と同一オペロン上流に存在する *vemP* 遺伝子によりコードされる分泌タンパク質 VemP (*Vibrio export monitoring polypeptide*) が必須の役割を持っています。VemP は、細胞のタンパク質膜透過能を自身の分泌能としてモニターし、分泌能が低下した際に、C 末端近傍で自身のタンパク質合成を停止させ、下流の V.SecD2 の翻訳を促します²。この VemP の翻訳停止には、C 末端保存領域とリボソーム内壁との特異的相互作用の重要性が示唆されていますが、相互作用に参与するアミノ酸残基の同定を含め詳細な分子機構は不明です。

この問題の解明を目指して、多数の変異体を簡便にかつ効果的にスクリーニング可能な LacZ レポーター系を構築しました。自身の翻訳を安定に停止させるためにシグナル配列を欠失させた Δ SS VemP を LacZ とインフレームで連結することにより、C 末端保存領域内への変異導入に伴い生じる翻訳停止能の低下を、LacZ 活性の上昇としてモニターすることができる系を作成しました（図参照）。



このレポーター系を用いて、VemP C 末端領域を構成するアミノ酸残基に対して網羅的なランダム変異解析を進めています。予備的な結果ではありますが、置換をほとんど許容しないアミノ酸残基等が見つかる等の興味深い知見が得られつつあります。

- 1) Tsukazaki *et al. Nature* **474**, 235 (2011); 2) Ishii *et al. PNAS* **112**, E5513 (2015)

(坂下、秋山、森)

II. Second Group

本年度はスタッフの酒井、柳川、それに加えてサポートスタッフとして、工学部の坂口くんが参加してくれています。

HPV 生活環とウイルス発がん機構の解明

HPV 感染症は代表的な STD (Sexually Transmitted Disease: 性感染症) であり、広く蔓延していることが知られています。また近年ではその感染が若年層に広がっていることが問題となっています。HPV 感染は発がんに関連することが知られていて、特に子宮頸癌では、ほとんどの発症例で HPV の感染が確認されており、HPV 感染が子宮頸癌発症の主要なリスクファクターであると考えられています。HPV 感染によるがん化を防ぐためには、HPV の感染・複製を抑制することが効果的であると考えられます。しかし HPV の複製・遺伝子発現の制御は、上皮細胞の分化に強く依存していて、通常の組織培養では HPV の生活環を再現できないので、これまでその制御機構はほとんど分かっていませんでした。私たちは既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を組織培養下で再現しています。この系をさらに発展させるべく、独自の HPV レプリコンを構築し、効率よく HPV の複製・遺伝子発現機構を解析する手法を検討しています。(酒井)

LRP6 結合蛋白 Krtap13 による Wnt シグナル伝達経路活性化のマウス個体での解析

柳川は、Wnt の Co-receptor である一回膜貫通型蛋白 LRP6 の細胞質ドメインに結合する蛋白として、Keratin associated protein 13 (Krtap13) を、見いだした。

Wnt 非存在下、Krtap13 を強制発現させるだけで、Wnt 経路の著しい活性化が生じた。Krtap13 は、細胞膜上で、LRP6 および Dvl と共に凝集体を形成するが、それは、通常の Wnt 経路を活性化の際に生じる LRP6 Signalosome の代わりをしていると考えられた。

Krtap13 による Wnt 経路の活性化が与える影響を、in vivo で解析する為、公汎な組織での発現が可能な CAG プロモーターとヒト Krtap13 の cDNA の間に lox-polyA-lox 配列を挿入した Trans gene (Tg) を作成した。この Tg マウスと種々の Cre マウスを交配する事より、recombinant Tg (R-Tg) 生じさせ、組織特異的に Krtap13 高発現させる事が出来た。CAG-Cre マウスとの交配によっては、R-Tg を持つマウスは、5%しか誕生しなかったが、そのうちの 25%のマウスは、24 ~ 39 週齢を経ると、悪性リンパ腫／白血病を発症した。名古屋大学 生体反応病理学の豊国先生に協力頂き解析中である。

(柳川)

Laboratory of Cell Regulation

Members

Professor	Masahiko Sugita
Assistant Professor	Daisuke Morita
Assistant Professor	Tatsuaki Mizutani
Graduate Student	Satoru Murata, Yukie Yamamoto, Ayumi Miyamoto, Yoshiharu Takama, Yuya Yoshioka, Toshiaki Ano, Eri Sakurai, Yoko Shima

Introduction

Presentation of protein-derived peptide antigens (Ags) by major histocompatibility complex (MHC)-encoded class I and class II molecules has been a central dogma in modern immunology. Peptide Ags bound to MHC molecules are recognized by T cells bearing alpha/beta T-cell receptors (TCRs). However, the paradigm that Ag-specific T cell activation only involved recognition of peptide Ags turned out to be incorrect. T cells bearing alpha/beta TCRs are now known to recognize lipid Ags in a group 1 CD1 (CD1a, -b, and -c)-dependent manner. Thus, the Ag-specific adaptive immune system comprises two separate pathways, one directed against peptide Ags (mediated by MHC molecules) and the other directed against lipid Ags (mediated by group 1 CD1 molecules). These two pathways function cooperatively to achieve highest levels of Ag-specific host defense.

Both MHC and CD1 pathways are equally important; however, only several laboratories, including ours, appear to focus intensely on the latter pathway. This is primarily due to the fact that mice and rats that are highly useful for immunological studies have deleted genes for group 1 CD1 family, and thus, lack the lipid recognition system that is comparable to that in humans. Therefore, we have attempted to develop three distinct but complementary animal models; namely, human CD1 transgenic (Tg) mice, guinea pigs, and rhesus monkeys. The human *CD1A* genome-Tg mice were established, in which the two major cell types, immature thymocytes and epidermal Langerhans cells, specifically expressed human CD1a proteins. Alternatively, we found guinea pigs invaluable for lipid immunity research as the animals have evolved the CD1 system that is equivalent to that in humans. Finally, our laboratory has made enormous efforts to set up lipid immunity research using non-human primates, such as rhesus macaques. As described below, rhesus monkeys have now been analyzed extensively in our laboratory for lipid immunity to mycobacteria and SIV, resulting in the identification of lipid-based vaccine candidates against tuberculosis and the discovery of viral lipopeptide-specific CTL responses.

Topics

1) Lipid-specific innate and adaptive immunity in tuberculosis: T. MIZUTANI, A. MIYAMOTO, S. MURATA, T. ANO, D. MORITA and M. SUGITA

Mycobacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex, possess highly lipid-rich cell walls that are critical not simply for their acid-fast properties but also for their survival and replication. The cell wall contains mycolic acids (MAs), an alpha-alkyl-beta-hydroxy fatty acid with extremely long carbon chains ($\sim C_{80}$), which are densely aligned in covalent association with the underlying arabinogalactan sugar layer. Arabinogalactan-linked MAs extend outward and interact non-covalently with carbon chains of the surface exposed mycolyl lipids, thereby forming the hydrophobic cell wall architecture that is unique to mycobacteria.

For the past several years, our research has focused on the immunobiology of glucose monomycolate (GMM), a mycolyl glycolipid presented by human CD1b and rhesus CD1b/CD1c molecules. Pathogenic mycobacteria biosynthesize this glycolipid species by utilizing host-derived glucose as a competitive substrate for their mycolyltransferases, and thus, GMM is a marker lipid for mycobacteria that sustain active metabolism in the host (*J. Biol. Chem.* **283**: 28835-28841, 2008). Furthermore, the host response to GMM is associated with skewed production of TH1 cytokines (*J. Biol. Chem.* **286**: 16800-16806, 2011) that occurs at the site of infection (*Infect. Immun.* **81**: 311-316, 2013). We have continued evaluating the potential of GMM as a lipid-based vaccine in the guinea pig and rhesus monkey models, resulting in the demonstration of the protective immunity conferred by the administration of GMM in liposomes (unpublished).

The innate immune recognition of mycolyl lipids has also been addressed in our laboratory. We previously found that glycerol monomycolate (GroMM) functioned as a potent ligand for human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle (*J. Biol. Chem.* **289**: 15405-15412, 2014). This year, we detected the granulomatogenic activity of GroMM, and, by generating neutralizing anti-guinea pigs Mincle monoclonal antibodies, we are now evaluating directly how Mincle functions impact on the formation of granuloma, a hallmark of tuberculosis pathology (unpublished).

2) Lipopeptide-specific immunity in AIDS: D. MORITA, Y. YAMAMOTO, Y. YOSHIOKA, Y. TAKAMA, Y. SHIMA, E. SAKURAI, T. MIZUTANI and M. SUGITA

By taking full advantage of IVR's superb research environments, we have been encouraged to address a fundamental and potentially important question as to how lipid immunity functions in host defense against viral infections. Given that some of the viral proteins require modification with host-derived fatty acids for their critical functions, we hypothesized that the host immunity might be able to detect lipidated viral proteins (lipoproteins). Indeed, we previously found that rhesus macaque monkeys infected with the simian immunodeficiency virus (SIV) mounted cytotoxic T lymphocyte responses to N-myristoylated SIV Nef 5-mer

lipopeptide (C14nef5) (*J. Immunol.* **187**: 608-612, 2011; *J. Virol.* **87**: 482-488, 2013). This year, the molecular mechanisms underlying the lipopeptide presentation were finally elucidated. Despite our initial prediction, CD1 molecules are not required for the lipopeptide presentation; instead, the MHC class I-encoded molecule, termed Mamu-B*098, was identified as a critical element for lipopeptide presentation, being capable of binding C14nef5 and presenting it to specific T cells. The crystal structure of the MHC class I:C14nef5 was determined, detecting a unique groove structure suitable for accommodating lipopeptides rather than long peptides. These findings now challenge the well known paradigm for antigen presentation that MHC class I molecules mediate the presentation of 8-10mer peptides (*Nat. Commun.* **7**: 10356, 2016).

List of Publications

Morita, D and Sugita, M.: "Discovery of a lipopeptide Ag-presenting molecule: its molecular identity and X-ray crystallographic structure", The 10th International Symposium of the Institute Network, Sapporo, 23-24 July, 2015.

Morita, D and Sugita, M.: "Discovery of lipopeptide Ag-presenting molecules: its molecular identity and X-ray crystallographic structure", The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, 18-20 Nov, 2015.

杉田昌彦：脂質免疫：結核菌やエイズウイルスに対抗する新しい獲得免疫システム、第 89 回日本感染症学会総会、京都、2015 年 4 月 16 日

教授	杉田昌彦
助教	森田大輔
特定助教	水谷龍明
大学院生	邑田 悟、山本侑枝、宮本歩己、高間義晴、吉岡佑弥、阿野敏明、 櫻井絵理、嶋 耀子

MHC 分子は、タンパク質断片であるペプチドを結合し、T 細胞に抗原提示する。これによって活性化したタンパク質抗原特異的 T 細胞は、標的細胞の傷害やさまざまなサイトカイン産生を通して、有効な獲得免疫を成立させる。一方、私たちの研究室では「脂質免疫」を切り口として、タンパク質免疫と対峙する獲得免疫経路の研究を展開してきた。ヒトグループ 1CD1 分子が結核菌由来の脂質を結合し、脂質特異的 T 細胞応答を誘起することは、これまでも Annual Report の紙面で紹介してきた通りである。つまり、獲得免疫はタンパク質を標的とした MHC 依存的経路と脂質を標的とした CD1 依存的経路の総和として成立するという発想であった。今回、旧来の MHC 概念だけでなく、私たちが描く MHC/CD1 両立パラダイムすら修正が必要となる新しい発見があった。

ウイルス感染防御における脂質免疫の存在や意義を考え始めたのは、2005 年頃であったと記憶している。ウイルスには固有の脂質などない、したがって脂質免疫は存在しない、と誰もがそう考えていた。しかし、たとえばエイズウイルス Nef タンパク質が免疫抑制機能を発揮するためには、脂質修飾（ミリスチン酸修飾）を受けることは必須である。脂質修飾を受けたタンパク質の断片、すなわちリポペプチドが新たな獲得免疫のターゲットになったら面白いのでは、と考えたのであった。さっそくアカゲザルエイズモデルを用いた検証作業に入る。Nef リポペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞が樹立できた。簡単に CD1 拘束性が示せるかと思ったが、どうやってもポジティブな結果が得られない。いまから思うと、少し落とし穴があって、MHC 拘束性も見えなかった。新しい抗原提示分子の存在を確信し、リポペプチド特異的 T 細胞応答を阻害するモノクローナル抗体を多数得て、そこから抗原提示分子を認識する抗体を探すことになる。結果、MHC クラス 1 分子を認識するモノクローナル抗体が得られてきたのは、なんとも遠回りで皮肉であるが、これも研究の面白さだろう。アカゲザル MHC は複雑であり、候補遺伝子の単離に難渋したが、ようやく full-length cDNA が単離できた。リコンビナントタンパク質を得、cell-free アッセイで TCR による特異的認識を実証できた時点で、MHC 分子がリポペプチドを提示する確信を得た。

最終段階は、リポペプチドを結合した MHC クラス 1 分子の結晶構造を解き明かすことである。結晶化の条件を決定するだけでも 1 年近くを要した。苦労は大きかったが、得られた結晶構造に息をのんだ。リガンドのミリスチン酸部分がきれいに折り畳まれて、本来アンカーアミノ酸が収納される B ポケットに納まっている。嵩のある疎水性のアシル鎖を収納すべく、この MHC クラス 1 分子の B ポケットの壁面・底面には、小さな側鎖を持つアミノ酸や疎水性アミノ酸が程よく配置されていた。逆に、F ポケットは小さく、ミリスチン酸修飾にエッセンシャルなアミノ酸であるセリンをアンカー残基として収納していた（図参照）。まさに、ミリスチン酸修飾リポペプチドを提示するために進化してきた MHC クラス 1 アリルと言って過言ではない。

リポペプチド免疫パラダイムの確立に向けた第一歩が踏み出されたと思う。杉田研らしいコツコツとした努力を積み重ねれば、少し時間はかかるかもしれないが、ゴールが見えてくるだろう。そう確信した 1 年であった。

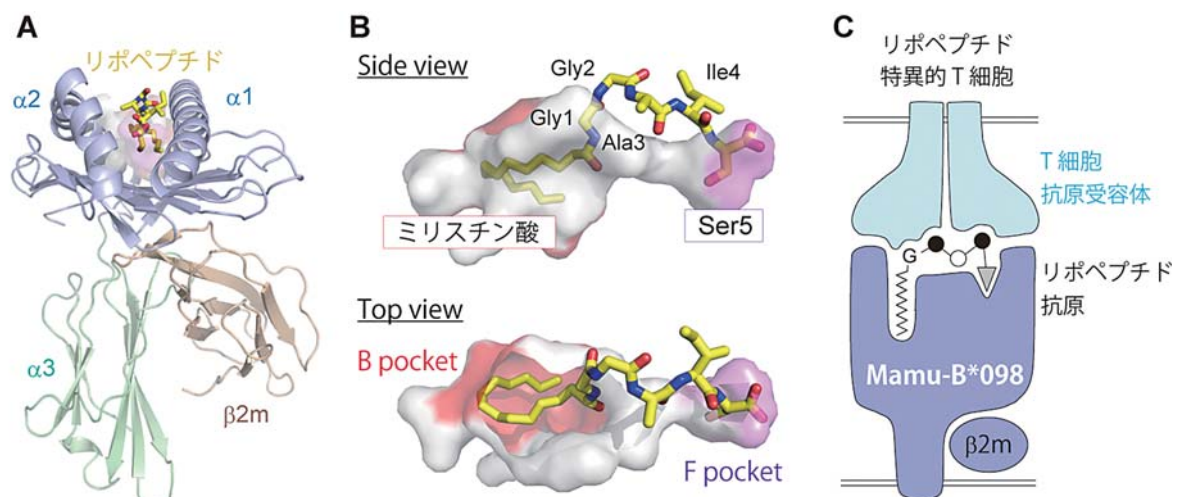


図. リポペプチドの抗原提示様式

- A.** MHC クラス 1: リポペプチド複合体の全体構造（解像度 1.76 Å）。
- B.** 抗原結合溝の構造。リポペプチド（黄色スティック）の両末端、ミリスチン酸と C 末端アミノ酸（セリン）残基が溝内に深く収納されており、アンカーとして機能する（上図）。ミリスチン酸は大きく疎水性の高い B ポケット（赤色）、C 末端アミノ酸は親水性の小さな F ポケット（紫色）に収納される（下図）。
- C.** リポペプチド抗原提示モデル。両末端が MHC クラス 1 分子への結合に関わり、ペプチド中央の 3 アミノ酸が T 細胞の認識に関わる。

Laboratory of Tumor Biogenesis

Members

Professor

Shin Yonehara

Assistant Professor

Akira Murakami

Introduction

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in many biological processes, including embryogenesis, development of immune system, maintenance of tissue homeostasis, and elimination of virus-infected and tumor cells. We found cell surface Fas antigen (Fas), which can directly mediate apoptosis-inducing signals into cells by stimulation with agonistic anti-Fas mAb or Fas ligand. Our main research project is to understand the intracellular signal transduction mechanism of cell death including apoptosis and caspase-independent novel types of cell death, and the biological significance/physiological role of cell death and cell death-regulating molecules. Investigations of molecular mechanisms and physiological roles of cell death are important for a better understanding of mammalian immune system, embryogenesis and tumorigenesis.

Topics

1) Caspase-8 and RIP kinases regulate retinoic acid-induced necroptosis and cell differentiation: M. SOMEDA, S. KUROKI, M. TACHIBANA and S. YONEHARA

Caspase family members are involved in execution of apoptosis. Among them caspase-8 (Casp8) is unique with associated critical activities to induce and suppress death receptor-mediated apoptosis and necrosis, respectively. Casp8 inhibits necroptosis, a form of necrosis, through suppressing the function of receptor interacting protein kinase 1 (RIP1 or RIPK1) and RIP3 (RIPK3). Disruption of *Casp8* expression causes embryonic lethality in mice at embryonic day (E) 11.5, which is rescued by depletion of *RIP3*, suggesting that the defect of *Casp8*-deficient embryos is traced back to its activity to suppress necroptosis.

To examine the role of Casp8 in embryogenesis, we established ES cells with tetracyclin/doxycyclin-inducible (Tet-On) expression system of short hairpin RNA specific for *Casp8*. Induced knockdown of *Casp8* expression was shown to markedly enhance retinoic acid (RA)-induced cell death and differentiation of embryonic stem (ES) cells as well as RA-induced gene expression. Interestingly, expression levels of RIP1, RIP3 and MLKL (an execution molecule of necroptosis) were markedly increased by treatment with RA in the absence of Casp8, suggesting that the enhancement of RA signaling enhances sensitivity to necroptosis.

The marked enhancement of RA signaling was dependent on RIP1 and RIP3 but independent of MLKL. Knockdown of Casp8 expression induced nuclear transportation of RIP3 and complex formation of retinoic acid receptor (RAR) to RIP1 and RIP3 in nucleus. RA treatment induced binding of the complex to RA response element (RARE) at the promoter region of RA-responsible genes. Furthermore, RA-dependent gene expression was strengthened in *Casp8*-deficient mouse embryos around E 10.5. Administration of RA antagonist to pregnant mice significantly suppressed the lethality of *Casp8*-deficient embryos at E 11.5, but did not at E12.5. Thus abnormality of *Casp8*-deficient embryo, which is dependent on necroptosis mediated by RIP1, RIP3 and MLKL, is regulated by RIP1/RIP3-mediated abnormal stimulation of RA signaling in the absence of Casp8.

2) Caspase-10 plays an essential role in survival of human cancer cells: Y. MORI and S. YONEHARA

Stimulation of Fas (CD95) with FasL in human cells induces the formation of death-inducing signaling complex (DISC), containing FADD, cFLIP, Caspase-8 and Caspase-10. Caspase-8 is activated in the DISC, leading to initiation of apoptosis. Activation of Caspase-8 was also reported to be involved in non-apoptotic signaling pathways, such as activation of ERK, NF- κ B and Akt pathways. In contrast to Caspase-8, physiological roles of Caspase-10 in apoptotic and non-apoptotic pathways have been poorly understood. The reason for the lack of understanding is that Caspase-10 cannot be examined in mouse system owing to the deletion of *Caspase-10* gene in mice. To reveal the functions of Caspase-10, we utilized Doxycycline (Dox)-inducible *Caspase-10* knockdown system in various types of human cells.

Downregulation of *Caspase-10* expression was shown to induce cell death in human cancer cell lines, such as Jurkat, U937, HCT116 and U2OS cells. Interestingly, knockdown of *Caspase-10* expression did not show any effects in an untransformed diploid fibroblast, WI-38. In Jurkat cells, downregulation of *Caspase-10* expression increased the number of apoptotic cells with cleaved Caspase-3. Treatment of the cells with either zVAD-fmk (a pan-caspase inhibitor) or zLEHD-fmk (a Caspase-9-specific inhibitor) inhibited the cell death induced by *Caspase-10* knockdown. Thus Caspase-10 was shown to always inhibit apoptosis in human cancer cells. In addition, we find that the inhibition of the apoptosis in *Caspase-10* knockdown cancer cells triggered induction of another type of necrosis-like cell death. Taken together, Caspase-10, which is involved in the apoptosis-inducing signal *via* death receptors, always inhibits both Caspase-9/Caspase-3-dependent apoptosis and a novel type of necrotic cell death in human cancer cells.

3) A novel function of FLASH/casp8ap2 in regulation of nonapoptotic cell death: A. KAKO and S. YONEHARA

Programmed cell death is involved in maintenance of homeostasis, and regulation of morphogenesis in developmental stage. The failure of cell death results in a multiple of disease, such as cancer and autoimmune disease. Thus, better understanding the mechanism of cell death is important for therapeutic development of

incurable disease. Programmed cell death is mainly composed of apoptosis and necroptosis, and both are regulated by caspase-8: caspase-8 is at an initiator of Fas-mediated apoptosis and an inhibitor of necroptosis. FLASH (FLICE-associated huge protein)/casp8ap2 was originally identified as a caspase-8-associated protein, and has been shown to play a role in multiple cellular processes including regulation of apoptosis, cell cycle progression, processing histone mRNA, and transcriptional control. In various types of cell lines derived from carcinoma and sarcoma, downregulation of FLASH expression was clearly shown to inhibit cell cycle progression in the S-phase; however, in several cancer cell lines from leukemia, we found that FLASH-knockdown does not affect cell cycle progression. Then, we analyzed effects of FLASH-knockdown on apoptosis and necroptosis in human histiocytoma-derived U937 cells. In U937 cells, FLASH knockdown enhanced sensitivity to not only apoptosis but also necroptosis induced by TNF- α stimulation. These results indicate that FLASH can regulate the two types of programmed cell death, apoptosis and necroptosis, independently on its effects on cell proliferation.

4) A role of Wnt signals in the mesodermal differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI

ES cells are induced to differentiate into cells at the mesoderm lineage under culture conditions forming embryoid bodies. Among many signaling pathways or factors involved in the process, we are currently interested in a Wnt signaling pathway. An inhibitor of Wnt signals completely blocks the mesoderm induction. So far, Wnt3 and Wnt8a have been identified to play a role in the mesoderm induction through an activation of Brachyury expression, one of key factors. In addition, several other Wnt family members are expressed at earlier stages, suggesting their role in the differentiation.

From the earlier stages of the differentiation, embryoid bodies are covered with a layer of visceral endoderm. Our current hypothesis is that the visceral endoderm is induced via Wnt signals and then involved in the mesoderm induction. An inhibitor of Wnt signals, IWP-2, inhibited expression of visceral endoderm markers including Gata6, a key factor of visceral endoderm induction. Knockdown of Gata6 expression resulted in down regulation of Wnt3 and Wnt8a expression, and suppressed the mesoderm induction as well. Among the Wnt family members, Wnt1 seems to play a role in the visceral endoderm formation, as knockdown of Wnt1 expression suppressed expression of visceral endoderm markers as well as those of the mesoderm. Thus, Wnt signals seem to function at two stages of the mesoderm induction. One is for the induction of visceral endoderm and the other is for the direct induction of mesoderm through an activation of Brachyury expression.

List of Publications

Chalabi-Dchar M, Cassant-Sourdy S, Duluc C, Fanjul M, Lulka H, Samain R, Roche C, Breibach F, Delisle MB, Poupot M, Dufresne M, Shimaoka T, Yonehara S, MATHONNET M, PYRONNET S, and Bousquet C. (2015). Loss of somatostatin receptor subtype 2 promotes growth of KRAS-induced pancreatic tumors in mice by

activating PI3K signaling and overexpression of CXCL16. **Gastroenterology** 148, 1452-1465.

Yonehara S: Caspase-8 and RIP Kinase Regulate Retinoic Acid-Induced Cell Differentiation. Japan Australia Meeting on Cell Death, Melbourne, October 21-23, 2015.

米原 伸：招待講演．生命科学からみた老化と寿命、国際高等研究所「老いを考える」第6回研究会、木津川市（京都府）、1月24日、2015.

米原 伸：Caspase-8 と RIP キナーゼが制御する細胞死と細胞分化，第24回日本 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム I「細胞死とミトコンドリア、Hippo pathway」、吹田市（大阪府）、7月11日、2015.

米原 伸：特別講演．細胞の死が支える生体の生と機能 ～自爆するための細胞表層レセプターの発見から多様なプログラム細胞死の解析について～、洛友会東京支部 秋の講演会、東京、11月10日、2015.

Sakaguchi S, Kuroki S and Yonehara S: Novel types of programmed necrosis induced by IFN- γ in wild-type and caspase-8 KO mouse embryonic fibroblasts. Short-Talk session. The 13th International Student Seminar, Kyoto, 3-4 February 2014.

Kako A and Yonehara S: Analysis of the function of FLASH/casp8ap2 in regulation of apoptotic and nonapoptotic cell death. Poster session. The 13th International Student Seminar, Kyoto, 3-4 February 2014.

加古彩華、米原伸：FLASH/casp8ap2 の非アポトーシス性細胞死制御という新規機能、第38回日本分子生物学会年会、神戸市、2015年12月1-4日.

森勇貴、米原伸：Caspase-10 はヒトがん細胞の生存維持に寄与する、第38回日本分子生物学会年会、神戸市、2015年12月1-4日.

教授 米原 伸

助教 村上 昭

当研究分野は生命科学研究科に所属しているが、米原はウイルス研生体発がん機構研究分野を併任し、村上はウイルス研に所属している。

平成 27 年の 4 月に、生命科学研究科の修士課程に大西景子、和田柚季、そして台湾から江佳臻が入学した。生命科学研究科修士課程を 3 月に修了した学生では、加古彩華が博士後期課程に進学し、田畑祐貴と鈴木雄太は就職した。また、中国からの留学生である黄達度と董晟璐は 9 月に修士課程を終了し、新たな道に進んだ。修士課程を終了後も在籍していた山本那由と博士後期課程に在籍していた胡曉恬も巣立っていった。研究費の経理を初めとする研究室の秘書業務は中橋直子が執り行い、研究室の円滑な運営が行われている。また、生命科学研究科とウイルス研究所が共催する国際学生セミナーの秘書として西村美穂が参加し、国際学生セミナー学生実行委員会の活動を支援している。

本研究分野では、米原が発見・命名したアポトーシス誘導レセプター分子 Fas の研究を出発点とし、アポトーシスやそれ以外の新しい細胞死に関する研究、細胞死関連分子の多様な生物活性に関する研究を行っている。各個人の研究内容について簡単に紹介する。

1) caspase-8 と RIP キナーゼが調節する多様な細胞死と細胞分化

Fas が媒介するアポトーシスでは、開始 caspase として caspase-8 の活性化が必要不可欠である。アポトーシスの誘導では、Fas を中心にアダプター分子である FADD と caspase-8 前駆体が複合体を形成し、その中で caspase-8 前駆体が隣接した caspase-8 前駆体を切断し活性化する。活性化した caspase-8 は下流の実行 caspase である caspase-3 の前駆体を切断・活性化し、活性化 caspase-3 が様々な細胞内の基質タンパク質 (death substrates) を切断することによってアポトーシスが実行される。一方、Fas などの Death receptor 遺伝子の KO マウスは個体発生の異常は認められないのに対し、下流の FADD や caspase-8 の KO マウスは胎生致死である。FADD や caspase-8 は Fas を介するアポトーシス以外の機能を有する可能性が考えられたが、その機能は計画的ネクローシスの一種であるネクロプトーシス (caspase-8 が抑制し、RIP キナーゼ 1 と 3 が媒介する) の抑制であることが示され、caspase-8 KO マウスの胎生致死という表現型はネクローシスの亢進によると考えられている。この

ような状況のもと、ES 細胞を用いて遺伝子の発現や発現抑制を誘導する系を用いて、染田真孝は caspase-8 の発現抑制を誘導すると分化誘導に重要なレチノイン酸シグナル伝達系が RIPK1 と 3 依存的に強く増強されるという現象を見いだした。そして、レチノイン酸シグナルが RIPK 依存的にネクロシスを強く誘導することが、caspase-8 KO マウスの胎生初期での死亡に関与することを明らかにしている。

また、当研究室では γ 型インターフェロンが caspase-8 の発現や活性が阻害された条件下で RIPK3 に依存した計画的ネクロシスを誘導するという新しい系を見いだしている。阪口翔太は caspase-8 KO マウス由来細胞と caspase-8 の活性が阻害された細胞では、 γ 型インターフェロンがネクロシスを同じように誘導するが、その分子機構が RIPK1 の必要性和ネクロシスの実行段階におけるミトコンドリアの必要性の両方において異なっていることを見だし、解析を行っている。陳建成は、 γ 型インターフェロンが誘導するネクロシスでは、細胞死に先立ち細胞膜のホスファティジルセリンの露出が誘導されるという新しい現象を見だし、その分子機構を解析している。

ヒトには caspase-8 と類似した caspase-10 が存在するが、マウスには caspase-10 は存在しない。森勇貴は caspase-10 の発現抑制誘導系を立ち上げ、様々なヒト細胞株における効果を解析し、caspase-10 の発現抑制によって、多くの腫瘍由来細胞株ではアポトーシスが誘導されるが、正常細胞では細胞死は誘導されないという興味深い結果を見だし、この活性には caspase-10 の二種類のアイソタイプが必要であることを示している。また、大西景子はマウス caspase-8 とヒト caspase-8 および caspase-10 の相互関係について解析を進めている。

2) 細胞死・細胞増殖関連分子の多様な生理・病理機能の関係

我々が Fas シグナルとの関連で見いだした巨大分子 FLASH は、癌腫や肉腫由来細胞株の細胞周期 S 期の進行に必要不可欠であるが、正常細胞、造血系腫瘍細胞株や ES 細胞では細胞増殖に必要なではない。この細胞種の特異性を解明するために、Akila Ram は正常細胞に発現する責任遺伝子の同定を目指している。加古彩華は、FLASH の発現抑制が細胞周期進行を阻害するだけでなく、caspase-8 発現条件下でもネクロトーシス細胞死を誘導すること、また細胞種が異なればその感受性を増強することを見だし、そのメカニズムを解析している。松本礼美は、FLASH が細胞周期特異的ヒストンバリエントの発現に関わることから、FLASH 発現抑制が細胞内のヒストンバリエントの種類を変化させることが細胞増殖制御に関連するかを解析し、FLASH 発現抑制時に発現するノンカナリカルヒストン H1 の一つの分子種が細胞周期 S 期進行を抑制する活性を見いだしている。和田柚季は、FLASH の細胞周期進行に必要な新しいドメインとその機能の研究を行っている。

齊藤圭亮と南美都里は、当研究室で開発されたレンチウイルスベクターと shRNA 発現誘導系を用いることにより、がん治療の標的分子として開発が進んでいる Caprin-1 について研究を行っている。興味深いことに、Caprin-1 の発現抑制を誘導すると細胞増殖が抑制されるが、がん細胞株では

新しいタイプの未知の細胞死が誘導される一方、正常細胞では細胞死は一切誘導されない結果を取得し、解析を行っている。また、武田仁紀は、分裂期の染色体凝縮を担うコンデンシンのサブユニットである Smc-2 の発現抑制を誘導することによって、がん細胞株では細胞死が誘導され、正常細胞では細胞老化に類似した表現型が誘導される系の解析を行っている。

3) B 細胞からの IgE 産生を増強させる Fas-expressing natural helper (F-NH) 細胞

当研究室では、Balb/c の遺伝的背景下の Fas KO マウスが高 IgE 産生を伴うアレルギー炎症を発症することを見だし、このマウスを用いて B 細胞からの IgE 産生を強く誘導する新しい細胞種を同定し、Fas-expressing natural helper (F-NH) 細胞と命名している。その実態と機能を明らかにするために、大嶋夏美が F-NH 細胞の増殖機構などの解析を行っている。

4) マウス初期発生における Wnt シグナルの解析

村上は、マウスの胚発生初期に、内・中・外胚葉が誘導される機構を、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いて解析している。特に、中胚葉への分化の誘導に関与している Wnt シグナルに焦点を当てている。近年は、内胚葉からのシグナルによる中胚葉の誘導過程に、どのような Wnt シグナルが、如何に関与しているのかを明らかにしたいと考えている。



Laboratory of Human Tumor Viruses

I. First Group

Members

Professor	Keizo Tomonaga
Assistant Professor	Tomoyuki Honda
Project Associate Professor	Akiko Makiko
Project Researcher	Dan Takeuchi
Graduate Student	Kozue Sofuku, Shoko Nakamura, Yusuke Yamamoto, Shohei Kojima, Yuto Koike, Xiaoshu Ryu, Mako Yanai, Ryo Komorizono, Tomoya Tokunaga, Bea Clarise Garcia
Assistant Clerk	Kazumi Wakaki

Introduction

The researches carried out in our group are focused on animal-derived RNA viruses, especially negative strand RNA viruses replicating in the cell nucleus, such as bornaviruses and influenza viruses. Our projects aim to understand the fundamental mechanisms of the replication and pathogenesis of the viruses. In addition, we are investigating the function of endogenous bornaviruses, which exist in many mammalian genomes, including humans, as remnants of ancient bornavirus infection. Furthermore, we are conducting the development of a novel RNA virus vector using bornaviruses for gene and cellular therapies.

Topics

1) Bornavirus

Borna disease virus possesses an NF- κ B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene: A. MAKINO, K. FUJINO, N.F. PARRISH, T. HONDA and K. TOMONAGA.

Borna disease virus (BDV) has a non-segmented, negative-stranded RNA genome and causes persistent infection in many animal species. Previous study has shown that the activation of the I κ B kinase (IKK)/NF- κ B pathway is reduced by BDV infection even in cells expressing constitutively active mutant IKK. This result suggests that BDV directly interferes with the IKK/NF- κ B pathway. To elucidate the mechanism for the inhibition of NF- κ B activation by BDV infection, we evaluated the cross-talk between BDV infection and the NF- κ B pathway. Using Multiple EM for Motif Elicitation analysis, we found that the nucleoproteins of BDV (BDV-N) and NF- κ B1 share a common ankyrin-like motif. When THP1-CD14 cells were pre-treated with the

identified peptide, NF- κ B activation by Toll-like receptor ligands was suppressed. The 20S proteasome assay showed that BDV-N and BDV-N-derived peptide inhibited the processing of NF- κ B1 p105 into p50. Furthermore, immunoprecipitation assays showed that BDV-N interacted with NF- κ B1 but not with NF- κ B2, which shares no common motif with BDV-N. These results suggest BDV-N inhibits NF- κ B1 processing by the 20S proteasome through its ankyrin-like peptide sequence, resulting in the suppression of IKK/NF- κ B pathway activation. This inhibitory effect of BDV on the induction of the host innate immunity might provide benefits against persistent BDV infection.

2) Endogenous bornaviruses

1. piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals: N.F. PARRISH, K. FUJINO, Y. SHIROMOTO, Y. IWASAKI, HS. HA, JC. XING, A. MAKINO, S. KURAMOCHI-MIYAGAWA, T. NAKANO, H. SIOMI, T. HONDA and K. TOMONAGA.

Endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements (EBLNs) are sequences within vertebrate genomes derived from reverse transcription and integration of ancient bornaviral nucleoprotein mRNA via the host retrotransposon machinery. While species with EBLNs appear relatively resistant to bornaviral disease, the nature of this association is unclear. We hypothesized that EBLNs could give rise to antiviral interfering RNA in the form of PIWI-interacting RNAs (piRNAs), a class of small RNA known to silence transposons but not exogenous viruses. We found that in both rodents and primates, which acquired their EBLNs independently some 25–40 million years ago, EBLNs are present within piRNA-generating regions of the genome far more often than expected by chance alone ($P = 8 \times 10^{-3}$ – 6×10^{-8}). Three of the seven human EBLNs fall within annotated piRNA clusters and two marmoset EBLNs give rise to bona fide piRNAs. In both rats and mice, at least two of the five EBLNs give rise to abundant piRNAs in the male gonad. While no EBLNs are syntenic between rodent and primate, some of the piRNA clusters containing EBLNs are; thus we deduce that EBLNs were integrated into existing piRNA clusters. All true piRNAs derived from EBLNs are antisense relative to the proposed ancient bornaviral nucleoprotein mRNA. These observations are consistent

with a role for EBLN-derived piRNA-like RNAs in interfering with ancient bornaviral infection. They raise the hypothesis that retrotransposon-dependent virus-to-host gene flow could engender RNA-mediated, sequence-specific antiviral immune memory in metazoans analogous to the CRISPR/Cas system in prokaryotes.

2. Transcription profiling demonstrates epigenetic control of non-retroviral RNA virus-derived elements in the human genome: K. SOFUKU, N.F. PARRISH, T. HONDA and K. TOMONAGA.

Endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements (EBLNs) are DNA sequences in vertebrate genomes formed by the retrotransposon-mediated integration of ancient bornavirus sequence. Thus, EBLNs evidence a

mechanism of retrotransposon-mediated RNA-to-DNA information flow from environment to animals. Although EBLNs are non-transposable, they share some features with retrotransposons. Here, to test whether hosts control the expression of EBLNs similarly to retrotransposons, we profiled the transcription of all Homo sapiens EBLNs (hsEBLN-1 to hsEBLN-7). We could detect transcription of all hsEBLNs in at least one tissue. Among them, hsEBLN-1 is transcribed almost exclusively in the testis. In most tissues, expression from the hsEBLN-1 locus is silenced epigenetically. Finally, we showed the possibility that hsEBLN-1 integration at this locus affects the expression of a neighboring gene. Our results suggest that hosts regulate the expression of endogenous non-retroviral virus elements similarly to how they regulate the expression of retrotransposons, possibly contributing to new transcripts and regulatory complexity to the human genome.

3) Influenza virus

Influenza A virus-induced expression of a GalNAc transferase, GALNT3, via microRNAs is required for enhanced viral replication: S. NAKAMURA, M. HORIE, T. DAIDOJI, T. HONDA, M. YASUGI, A. KUNO, T. KOMORI, D. OKUZAKI, H. NARIMATSU, T. NAKAYA and K. TOMONAGA.

Influenza A virus (IAV) affects the upper and lower respiratory tracts and rapidly induces the expression of mucins, which are common O-glycosylated proteins, on the epithelial surfaces of the respiratory tract. Although mucin production is associated with the inhibition of virus transmission as well as characteristic clinical symptoms, little is known regarding how mucins are produced on the surfaces of respiratory epithelial cells and how they affect IAV replication. In this study, we found that two microRNAs (miRNAs), miR-17-3p and miR-221, which target GalNAc transferase 3 (GALNT3) mRNA, are rapidly downregulated in human alveolar basal epithelial cells during the early stage of IAV infection. We demonstrated that the expression of GALNT3 mRNA is upregulated in an IAV replication-dependent fashion and leads to mucin production in bronchial epithelial cells. A lectin microarray analysis revealed that the stable expression of GALNT3 by human alveolar basal epithelial cells induces mucin-type O-glycosylation modifications similar to those present in IAV-infected cells, suggesting that GALNT3 promotes mucin-type O-linked glycosylation in IAV-infected cells. Notably, analyses using short interfering RNAs and miRNA mimics showed that GALNT3 knockdown significantly reduces IAV replication. Furthermore, IAV replication was markedly decreased in embryonic fibroblast cells obtained from galnt3-knockout mice. Interestingly, IAV-infected galnt3-knockout mice exhibited high mortality and severe pathological alterations in the lungs compared to those of wild-type mice. Our results demonstrate not only the molecular mechanism underlying rapid mucin production during IAV infection but also the contribution of O-linked glycosylation to the replication and propagation of IAV in lung cells.

List of Publications

Kuhn JH, Dürrwald R, Bào Y, Briese T, Carbone K, Clawson AN, deRisi JL, Garten W, Jahrling PB,

Kolodziejek J, Rubbenstroth D, Schwemmle M, Stenglein M, Tomonaga K, Weissenböck H and Nowotny N. (2015). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. **Arch Virol.** 160:621-632.

Makino A, Fujino K, Honda T, Parrish NF and Tomonaga K. (2015) Borna disease virus possesses an NF- κ B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene. **Sci. Rep.** 5:8696.

Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Tomonaga K, Sakaguchi T and Irie T. (2015). IFN- β -inducible, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA type-dependent manner. **Front. Microbiol.** 6:804.

Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T and Tomonaga K. (2015). piRNA derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. **RNA** 21:1691-1703.

Sofuku K, Parrish NF, Honda T and Tomonaga K. (2015). Transcription profiling demonstrates epigenetic control of non-retroviral RNA virus-derived elements in the human genome. **Cell Rep.** 12:1548-1554.

Sassa Y, Bui VN, Saitoh K, Watanabe Y, Koyama S, Endoh D, Horie M, Tomonaga K, Furuya T, Nagai M, Omatsu T, Imai K, Ogawa H, Mizutani T. (2015). Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild birds samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan. **Virus Genes** 51:234-243.

Hirai Y, Honda T, Makino A, Watanabe Y and Tomonaga K. (2015). X-linked RNA-binding motif protein (RBMX) is required for the maintenance of Borna disease virus nuclear viral factories. **J. Gen. Virol.** 96:3198-3203.

Nakamura S, Horie M, Daidoji T, Honda T, Yasugi M, Kuno A, Komori T, Okuzaki D, Narimatsu H, Nakaya T and Tomonaga K. (2016). Influenza A virus-induced expression of a GalNAc transferase, GALNT3, via miRNAs is required for enhanced viral replication. **J. Virol.** 90:1788-1801.

本田 知之， 朝長 啓造. (2015). ボルナ病ウイルス感染症の病態研究. **化学療法の領域**. 31(4):114-121.

牧野 晶子， 朝長 啓造. (2015). ボルナウイルスの細胞核内持続感染の機構と病原性. **化学療法の領域**. 31(9): 81-92.

Honda T, Yamamoto Y, Matsumoto Y, Makino A and Tomonaga K: A novel RNA virus vector system for RNAi therapies based on Borna disease virus. Negative Strand Viruses 2015, Siena Italy, 14-19 June, 2015.

Makino A, Honda T, and Tomonaga K: IGF2 is involved in the regulation of Borna disease virus production. Negative Strand Viruses 2015, Siena Italy, 14-19 June, 2015.

Sofuku K, Honda T, and Tomonaga K: Involvement of DNA damage response in Borna disease virus infection, Negative Strand Viruses 2015, Siena Italy, 14-19 June, 2015.

Honda T, Yamamoto Y, Makino A, and Tomonaga K: A novel RNA virus vector system for small RNA delivery based on Borna disease virus. The European Society of Gene and Cellular Therapy and Finland Society of Gene Therapy Collaborative Congress, Helsinki, 17 -20 September, 2015.

Makino A: A novel RNA virus-based episomal vector system for long-term stem cell modification. The European Society of Gene and Cellular Therapy and Finland Society of Gene Therapy Collaborative Congress, Helsinki, 17 -20 September, 2015.

Tomonaga K : Life in the nucleus: the unknown relationship between an RNA virus and host cells. 1st International Symposium - Intranuclear Infection and Host Immunity-. Kyoto, 27-28 January, 2015.

朝長啓造:マイナーウイルス研究の挑戦と醍醐味、大阪大学微生物病研究所アドバンスセミナー、大阪、2015 年 2 月 18 日

朝長啓造 : ボルナウイルス : RNA ウイルスと宿主の共進化、第 30 回中国四国ウイルス研究会、岡山、2015 年 6 月 27 日

朝長啓造 : ボルナウイルスから探る RNA ウイルス共進化、第 17 回京都大学生命科学研究科シンポジウム、京都、2015 年 7 月 2-3 日

朝長 啓造 : 「ボルナウイルス : 進化を共にした内なるウイルス」、みちのくウイルス塾、仙台、2015 年 7 月 18 日

朝長啓造 : ボルナウイルス : 希少ウイルス研究の醍醐味と新展開、第 52 回日本ウイルス学会九州支部大会、大分、2015 年 9 月 4-5 日

Tomonaga K: Exploring the Host Mechanisms that Impact RNA Virus Replication in the Cell Nucleus, 第 6 回広島カンファレンス、広島、2015 年 10 月 23 日

Tomonaga K : Co-evolution of bornaviruses and their hosts、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

朝長啓造 : ボルナウイルス : RNA ウイルスによる細胞核ヒッチハイキング、BMB2015、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

牧野晶子 : IGF2 によるボルナ病ウイルス粒子産生制御機構の解析、第 4 回 NSV-J、沖縄、2015 年 1 月 19-21 日

中村祥子 : ムチン型糖転移酵素 Galnt3 ノックアウトマウスを用いた A 型インフルエンザウイルス感染動態の解析、第 4 回 NSV-J、沖縄、2015 年 1 月 19-21 日

小嶋将平 : 熱ストレスを用いたコンビナントボルナ病ウイルス作成効率の改善、第 4 回 NSV-J、沖縄、2015 年 1 月 19-21 日

平井悠哉 : 超解像映像によるボルナ病ウイルス特異的核内封入体の構造観察および機能の解明、第 4 回 NSV-J、沖縄、2015 年 1 月 19-21 日

牧野晶子、藤野寛、平井悠哉、惣福梢、本田知之、朝長啓造 : IGF2 によるボルナ病ウイルス産生制御機構の解析、第 8 回ボルナウイルス研究会、京都、2015 年 3 月 24 日

惣福梢、本田知之、朝長啓造 : DNA ダメージとボルナ病ウイルスとの関連性の解析、第 8 回ボルナウイルス研究会、京都、2015 年 3 月 24 日

Nadine Gillich, 小嶋将平、朝長啓造、Martin Schwemmle, 堀江真行 : Cre リコンビナーゼ発現組換えボルナ病ウイルスの作出と性状解析、第 8 回ボルナウイルス研究会、京都、2015 年 3 月 24 日

松永秀典、本田知之、佐々悠木子、朝長啓造 : ヒトにおけるジュウシマツ由来トリボルナウイルスに対する抗体の測定、第 8 回ボルナウイルス研究会、京都、2015 年 3 月 24 日

佐々悠木子、堀江真行、鈴木研太、加藤真樹、香川紘子、鈴木和彦、渋谷淳、Chanathip Thammakarn, 竹原一明、古谷哲也、本田知之、朝長啓造、岡ノ谷一夫、水谷哲也 : ジュウシマツに見つかったトリボルナウイルス (MuBV-1) の免疫組織学的解析と分離、第 8 回ボルナウイルス研究会、京都、2015 年 3 月 24 日

本田知之 : Identification of host surveillance system for RNA viruses in the nucleus, 第 10 回研究所ネット

ワーク国際シンポジウム、札幌、2015 年 7 月 23-24 日

惣福梢、本田智之、朝長啓造：ヒト内在性ボルナウイルス様 N エlement 転写産物による周辺遺伝子発現制御機構、第 17 回日本 RNA 学会年会、札幌、2015 年 7 月 15-17 日

Tomonaga K, Makino A, Holditch SJ, Lu B, Ikeda Y : An intranuclear RNA virus-based episomal vector system for long-term stem cell modification, 第 21 回日本遺伝子治療学会、大阪、2015 年 7 月 24-25 日

Makino A: The regulation of Borna disease virus production、第 14 回あわじ感染症・免疫フォーラム、兵庫、2015 年 9 月 8-11 日

Kojima S, Honda T, Tomonaga K: Analysis of antiviral role and its mechanism of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein in Borna disease virus infection、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Tokunaga T, Honda T, Makino A, Tomonaga K: Screening of host kinases associated with Borna disease virus infection、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Komorizono R, Horie M, Honda T, Makino A, Tomonaga K: Sequence analysis of a novel parrot bornavirus 5、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga : The involvement of IGF2 in the regulation of Borna disease virus production ボルナ病ウイルス産生への IGF2 の関与、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Akasaka T, Fujino K, Kohl C, Gillich N, Mueller M, Corman VM, Wibbelt G, Kurth A, Ogawa H, Imai K, Suzuki Y, Schwemmler M, Tomonaga K : A putative RNA-dependent RNA polymerase gene derived from an ancient bornavirus in bats、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Honda T, Makino A, Tomonaga K: Analysis of possible interaction between Borna disease virus and LINE-1、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Sofuku K, Honda T, Tomonaga K: Involvement of DNA damage response in Borna disease virus infection、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Nakamura S, Daidoji T, Honda T, Nakaya T, Komori T, Tomonaga K: Dynamics of influenza A virus

infection in mucin-type glycosyltransferase Galnt3-knockout mice、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

本田知之、朝長 啓造：RNA ウイルス配列の内在化により宿主が獲得したウイルス抵抗性の解明、BMB2015、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

平井悠哉、本田知之、牧野晶子、岡村英幸、朝長啓造：RBMX はボルナウイルスが形成する核内構造体の構造を維持する、BMB2015、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

朝長啓造：Bornavirus: Finding a new field of RNA virus research、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

小池悠斗：ボルナ病ウイルス P タンパク質による自然免疫抑制作用に重要なアミノ酸領域の探索、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

小森園亮：ボルナウイルスの宿主特異性の進化学的解析、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

惣福梢：ヒト内在性ボルナウイルス様 N エLEMENT のエピジェネティック制御機構とその機能、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

柳井真湖：Identification of amino acid regions of Bornavirus nucleoprotein important for the formation of transcription-competent viral RNPs、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

II. Second Group

Members

Associate Professor

Makoto Hijikata

Graduate Student

**Yuichi Akahori, Minami Lee, Hitomi Okamura, Machiko Sasai,
Yohei Miyayama**

Introduction

The major purpose of our research group is clarification of lifecycles of human hepatitis viruses, hepatitis B virus and hepatitis C virus at the molecular level. Development of drugs against these viruses and

understanding of chronic liver diseases caused by infection of these viruses are also in the scope of our research. To accomplish those aims, we are now investigating the interaction between those viruses and host cells by using several hepatitis virus culture systems including human hepatocyte derived cells system developed originally in our laboratory.

Topics

1. Saturated fatty acid plays a role in production of hepatitis B virus particles: H. OKAMURA, Y. AKAHORI, S. Kim, Y. NIO, K. WATASHI, T. WAKITA, M. HIJIKATA

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major causative agents for chronic hepatitis, liver cirrhosis and liver cancer. More than 780,000 people die because of such hepatitis B related-disorders worldwide every year. The vaccine and a limited number of drugs against HBV are available and effective but the appearance of HBV resistant against the drugs used in the treatment has become a big problem for the human society. Hence, the development of new anti-HBV drug suppresses proliferation of HBV resistant to the existing drugs is still required. However, the non-cancer derived cells which reproduce the proliferation of HBV normally is not available for the drug screening except expensive and awkward primary human hepatocytes (PHH).

Therefore we attempted to develop a new HBV culture system using HuS-E/2 cells, the immortalized human hepatocytes. When HuS-E/2 cells were cultured in three-dimensional (3D) condition for a week, the gene expression pattern became similar to PHH. When HuS-E/2 cells were transfected with plasmids including HBV genome DNA, the intracellular HBV RNA, the index of virus gene expression, was kept more stable in 3D condition than in normal flat culture condition. In addition, DNase resistant HBV DNA in the culture medium, the index of virus particles, was maintained at high level during the experimental period in spite of the reduction of residual plasmid DNA. Moreover, the similar results were observed in the cases of several HBV genotypes. Our results suggested that HuS-E/2 cells cultured in 3D condition have a potential for establishment of a new in vitro system for HBV research.

2. Development of cell culture system for hepatitis B virus using immortalized human hepatocyte derived cell line cultured in three dimensional condition: Y. AKAHORI, H. Kato, T. FUJITA, K. MORIISHI, K. WATASHI, T. WAKITA, M. HIJIKATA

Hepatitis B virus (HBV) is a hepatotropic DNA virus that causes liver diseases in humans. As HBV cell culture systems, that support whole HBV life cycle, have been developed, it became possible to perform anti-HBV drug screening and pharmacological study. Those systems, however, are not suitable for molecular biological studies. We, therefore, aimed to develop the new HBV culture system using immortalized human hepatocyte cell line, HuS-E/2 cells, cultured in the three-dimensional (3D) condition with thermoreversible

gelation polymer, “Mebiol gel”. We established HuS-E/2-NTCP-tGFP cells that are HuS-E/2 cells stably producing an HBV receptor molecule, human sodium/taurocholate cotransporting polypeptide (hNTCP), fused with TurboGFP (tGFP) at the C-terminal, as hNTCP gene expression was relatively low in HuS-E/s cells. After one week culture in Mebiol gel, HuS-E/2-NTCP-tGFP cells forming spheroids were drew from the gel and infected with HBV produced from HepG2.2.15.7 cells, stable HBV producer cells, in the presence of 4% PEG8000 at 37 ° C overnight. Then those spheroids were re-placed and cultured in Mebiol gel. Time dependent expression of HBV pregenomic RNA (pgRNA) in the cells was analyzed by the quantitative RT-PCR . The levels of HBV pgRNA in the cells were increased from 5 to 7 days post-infection, while those were quite low in the cells pre-treated with pre-S1 lipopeptide, an inhibitor of HBV infection. These results suggested that 3D cultured HuS-E/2-NTCP-tGFP cells support HBV infection and proliferation and that this system possibly enable us to investigate the interaction between HBV and host cells.

土方 誠、阿部雄一、茶山一彰 (2015). HCV 感染性粒子産生機構 日本臨床 新ウイルス性肝炎 73 巻増刊号学 9 (通巻第 1090 号) 98-103.

Akahori Y., Kato H., Fujita T., Moriishi K., Watashi K., Wakita T., Hijikata M.: Development of a cell culture and infection system for hepatitis B virus using 3D cultured immortalized human hepatocytes. International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Bad Nauheim, Germany, Oct. 3-8, 2015.

Okamura H., Akahori Y., Kim S., Nio Y., Watashi K. , Wakita T., Hijikata M.: Long chain saturated fatty acid contributes to efficient egression of hepatitis B virus particles. 2014 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Bad Nauheim, Germany, Oct. 3-8, 2015.

Akahori Y., Kato H., Fujita T., Moriishi K., Watashi K., Wakita T., Hijikata M.: Development of a cell culture and infection system for hepatitis B virus using 3D cultured non-neoplastic HuS-E/2 cells. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 福岡 2015 年 11 月 22 日

Okamura H., Akahori Y., Kim S., Nio Y., Watashi K. , Wakita T., Hijikata M. : Egression of hepatitis B virus particles is promoted by long chain saturated fatty acid. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 福岡 2015 年 11 月 22-24 日

岡村 瞳：長鎖飽和脂肪酸は HBV の粒子放出を促進させる、ウイルス研究所リトリート、滋賀、2015 年 12 月 21-22 日

I. First Group

教授	朝長啓造
助教	本田知之
特定助教	牧野晶子
特定研究員	竹内 壇
大学院生	惣福 梢、中村祥子、山本祐介、小嶋将平、小池悠斗、劉 笑舒、 柳井真瑚、小森園亮、徳永智哉、Bea Clarise Garcia
事務補佐員	若城佳寿美

平成 27 年は、生命科学研究科大学院生修士課程 1 年として小森園亮、徳永智哉が 4 月に、Bea Clarise Garcia が 10 月に入学した。また、平成 27 年 4 月より特定研究員として竹内 壇が加わった。

1 月には朝長が主宰を務めた JSPS Core-to-Core Program, 1st International Symposium on Virus Infections and Host Responses-2015 Kyoto University meeting on Nuclear Infections and Host Immunity-, を京都大学芝蘭会館で開催した。また、朝長は 6 月の中四国ウイルス研究会（倉敷）、7 月のみちのくウイルス塾（仙台）、9 月の日本ウイルス学会九州支部会（別府）、10 月の広島大学国際シンポジウム（広島）、11 月の日本ウイルス学会（福岡）、12 月の日本分子生物学会（神戸）にて招待講演を行った。6 月の Negative Strand Virus meeting（Siena）では、本田、牧野、惣福が発表を行った。9 月の European Society of Gene and Cellular Therapy meeting（Helsinki）では本田と牧野が発表を行った。その他、教室員の多くが、11 月の日本ウイルス学会年会（福岡）で研究発表を行った。小嶋優秀ポスター賞、

研究活動では、(1) ボルナウイルス、(2) 内在性ボルナウイルス、ならびに (2) インフルエンザウイルスに関する研究を遂行した。(1) では、ボルナ病ウイルス（BDV）の N タンパク質のアンキリン様配列を介した NF- κ B 活性化阻害を牧野らが報告した。この研究は朝長が取得している「挑戦的萌芽研究」において推進された。(2) では、ヒトおよびマウスゲノムに存在する内在性ボルナウイルス様ヌクレオプロテイン（EBLN）の発現と機能について成果を報告した。この中で、惣福らがヒトゲノムに内在化している EBLN の発現制御機構について新たな知見を報告するとともに、昨年まで日本学術振興会海外研究員として在籍していた Parrish らがマウスゲノム中の EBLN 局在より機能性の小分子 RNA が発現していることを発表した。内在性ボルナウイルスに関する研究テーマは、朝長の「基盤研究（A）」の研究テーマのとして推進した。これらの研究に加えて、朝長

はBDVベクターの開発研究を「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」において進めた。平成27年は米国のMAYO clinicとの共同研究によりiPS細胞へのBDVベクターの適用方法の開発を行なった。(3)では、日本学術振興会特別研究員である中村が、O型糖鎖修飾であるGALNT3とA型インフルエンザウイルスに関する研究を進めた。特に、*ganlt3*のノックアウトマウスを用いることで、A型インフルエンザウイルスの複製と体内伝播に関わるGALNT3の役割について詳細な解析を行ない報告した。

II. Second Group

本年度、研究に参加しているのは、准教授の土方誠、研究補佐員の松尾頌子、大学院生では、生命科学研究科の赤堀祐一(D3)、岡村瞳(D1)、笹井麻千子(M1)、宮山陽平(M1)の4名と医学研究科の李宗南(D3)が在籍している。

当研究分野土方グループでは、C型肝炎ウイルス(HCV)ならびにB型肝炎ウイルス(HBV)とその感染標的であるヒト肝細胞の研究を中心におこなっている。肝炎ウイルスの研究ではその生活環境を分子レベルで解明することと、その結果をもとに抗ウイルス薬剤開発を目指した研究をおこなっている。また、ヒト肝細胞に関しては不死化ヒト肝細胞やヒト肝幹細胞を用いた肝分化と肝炎ウイルス感染の研究から肝臓などの慢性肝疾患の発症機構を明らかにするための研究をおこなっている。

HCVに関する研究

HCV感染増殖に関わる宿主細胞の同定とその機能解析

本年度は、これまで独自に明らかにしてきたHCVの感染性粒子産生機構とHCVの感染増殖を阻害する細胞因子について、さらに解析を進めた。これまでに、肝細胞のアラキドン酸カスケード内のトロンボキサン合成酵素(TXAS)の阻害剤Ozagrelによって細胞内においてHCV感染性粒子の形成が阻害されることを明らかにしている。しかしながら、Ozagrelによって合成が阻害されるトロンボキサン(TXA₂)がHCV感染性粒子の形成に果たす役割に関する分子機構については不明であった。そこでHCV感染性粒子を産生しているヒト肝がん由来細胞であるHuH-7細胞をもちいて、Ozagrel処理未処理ものについて、それらの遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較して、HCV感染性粒子形成に関わる細胞因子の解析を進めている。また、前年度に引き続きインターフェロン(IFN) alphaでは誘導されず、IFN lambda特異的に発現誘導される抗HCV因子の解析を行っている。

HBV に関する研究

これまで HBV 感染により引き起こされる正常ヒト肝細胞の変化を解析するために安価で有用な実験系は存在しない。そこで肝細胞に近い性質を保持した不死化ヒト肝細胞（HuS-E/2 細胞）を用いて、HBV と肝細胞の相互作用を解析することが可能な HBV 感染効率の良い培養細胞系の開発をおこなっている。HuS-E/2 細胞にヒト NTCP（HBV 受容体分子）発現プラスミドを導入し、薬剤選択により NTCP 高発現細胞株を樹立した。得られたクローン細胞株を立体培養することで HBV が感染増殖することが確認された。また、HBV が細胞内で複製している既存の培養細胞系を用いてケミカルバイオロジーの手法より、HBV の生活環に関わる細胞因子を数種類同定しており、それら細胞因子を標的とした新たな抗 HBV 薬の開発のための基礎研究を進めている。

Laboratory of Molecular Genetics

Members

Professor	Takashi Fujita
Associate Professor	Hiroki Kato
Assistant Professor	Amane Kogure
Research Fellow	Ryo Narita
Research Fellow	Yuta Tsukamoto
Research Fellow	Michaela Gerlach
Technical Fellow	Seigyoku Go
Graduate Student	Wan-Ling Yao, Shintaro Yamada, Dacqin Kasumba, Qin Mian, Hideo Onisawa, Ahmed Abu Tayeh, Fumihiko Takeuchi, Lee Sumin, Mai Wakimoto, Takara Hajyake, Sotaro Ikeda, Taisuke Ohto, Tim-Wai Sha, Amanda Horton, Jumana Khalil, Hsu Chung Chen, Yukie Ootakaki, Shota Shimuzu, Saki Sugiyama, Fumitaka Miyoshi, Reo Yoshimura, Ivana Duic, Hiroto Abe, Yoshikazu Iwasawa, Nobumasa Soda, Shoko Nishimura, Shiori Fujiwara, Zhu Mengjie
Visiting Researcher	Masahide Funabiki
Technical Assistant	Emi Yamato
Technical Assistant	Etsu Murakami
Technical Assistant	Kazumi Koba
Secretary	Satomi Koshiba

Introduction

We have been studying on antiviral innate immunity, particularly on the mechanism of type I interferon (IFN) gene regulation. More than 10 years ago, we identified viral RNA sensors, collectively termed as RIG-I-Like receptor. We have been focusing on the mechanism how RLR recognizes non-self RNA from self RNA. We also try to understand how viral replication within the cells is sensed and triggers signals to activate antiviral program, by live cell imaging. We study different viruses including Polio, Influenza A, SFTS, hepatitis B viruses in the context of antiviral immune responses of the host.

Topics

1) Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis: ANDERSEN, L.L, MØRK, N., REINERT, L.S., KOFOD-OLSEN, E., NARITA, R., JØRGENSEN, S.E., SKIPPER, K.A., HÖNING, K., GAD, H.H., ØSTERGAARD, L., ØRNTOLT, T.F., HORNUNG, V., PALUDAN, S.R., MIKKELSEN, J.G., FUJITA, T., CHRISTIANSEN, M., HARTMANN, R. AND MOGENSEN, T.H.

Herpes simplex encephalitis (HSE) in children has previously been linked to defects in type I interferon (IFN) production downstream of Toll-like receptor 3. Here, we describe a novel genetic etiology of HSE by identifying a heterozygous loss-of-function mutation in the IFN regulatory factor 3 (IRF3) gene, leading to autosomal dominant (AD) IRF3 deficiency by haploinsufficiency, in an adolescent female patient with HSE. IRF3 is activated by most pattern recognition receptors recognizing viral infections and plays an essential role in induction of type I IFN. The identified IRF3 R285Q amino acid substitution results in impaired IFN responses to HSV-1 infection and particularly impairs signaling through the TLR3-TRIF pathway. In addition, the R285Q mutant of IRF3 fails to become phosphorylated at S386 and undergo dimerization, and thus has impaired ability to activate transcription. Finally, transduction with WT IRF3 rescues the ability of patient fibroblasts to express IFN in response to HSV-1 infection. The identification of IRF3 deficiency in HSE provides the first description of a defect in an IFN-regulating transcription factor conferring increased susceptibility to a viral infection in the CNS in humans.

2) The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response. OKAZAKI, T., HIGUCHI, M., TAKEDA, K., IWATSUKI-HORIMOTO, K., KISO, M., MIYAGISHI, M., YANAI, H., KATO, A., YONEYAMA, M., FUJITA, T., TANIGUCHI, T., KAWAOKA, Y., ICHIJO, H. AND GOTOH, Y.

Viral infection activates host defense mechanisms, including the production of type I interferon (IFN) and the apoptosis of infected cells. We investigated whether these two antiviral responses were differentially regulated in infected cells. We showed that the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase (MAPKKK) apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) was activated in cells by the synthetic double-stranded RNA analog polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] and by RNA viruses, and that ASK1 played an essential role in both the induction of the gene encoding IFN- β (IFNB) and apoptotic cell death. In contrast, we found that the MAPKKK ASK2, a modulator of ASK1 signaling, was essential for ASK1-dependent apoptosis, but not for inducing IFNB expression. Furthermore, genetic deletion of either ASK1 or ASK2 in mice promoted the replication of influenza A virus in the lung. These results indicated that ASK1 and ASK2 are components of the antiviral defense mechanism and suggested that ASK2 acts as a key modulator that promotes apoptosis rather than the type I IFN response. Because ASK2 is selectively present in epithelium-rich tissues, such as the lung, ASK2-dependent apoptosis may contribute to an antiviral defense

in tissues with a rapid repair rate in which cells could be readily replaced.

3) Influence of genes suppressing interferon effects in peripheral blood mononuclear cells during triple antiviral therapy for chronic hepatitis C: IJIMA, S., MATSUURA, K., WATANABE, T., ONOMOTO, K., FUJITA, T., ITO, K., IIO, E., MIYAKI, T., FUJIWARA, K., SHINKAI, N., KUSAKABE, A., ENDO, M., NOJIRI, S., JOH, T. AND TANAKA Y.

The levels of expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in liver are associated with response to treatment with pegylated interferon (PEG-IFN) plus ribavirin (RBV). However, associations between the responses of ISGs to IFN-based therapy and treatment efficacy or interleukin-28B (IL28B) genotype have not yet been determined. Therefore, we investigated the early responses of ISGs and interferon-lambdas (IFN- λ s) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) during PEG-IFN/RBV plus NS3/4 protease inhibitor (PI) therapy. We prospectively enrolled 50 chronic hepatitis C patients with HCV genotype 1, and collected PBMCs at baseline, 8 and 24 h after the initial administration of PEG-IFN/RBV/PI. Levels of mRNAs for selected ISGs and IFN- λ s were evaluated by real-time PCR. All 31 patients with a favorable IL28B genotype and 13 of 19 with an unfavorable genotype achieved sustained virological responses (SVR). Levels of mRNA for A20, SOCS1, and SOCS3, known to suppress antiviral activity by interfering with the IFN signaling pathway, as well as IRF1 were significantly higher at 8 h in patients with an unfavorable IL28B genotype than in those with a favorable one ($P = 0.007, 0.026, 0.0004, 0.0006$, respectively), especially in the non-SVR group. Particularly, the fold-change of IRF1 at 8 h relative to baseline was significantly higher in non-SVR than in SVR cases with an unfavorable IL28B genotype ($P = 0.035$). In conclusion, levels of several mRNAs of genes suppressing antiviral activity in PBMCs during PEG-IFN/RBV/PI differed according to IL28B genotypes, paralleling treatment efficacy.

LIST OF PUBLICATIONS

Andersen LL, Mørk N, Reinert LS, Kofod-Olsen E, Narita R, Jørgensen SE, Skipper KA, Höning K, Gad HH, Østergaard L, Ørntoft TF, Hornung V, Paludan SR, Mikkelsen JG, Fujita T, Christiansen M, Hartmann R, Mogensen TH. (2015). Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. **J. Exp. Med.** 212, 1371-9.

Okazaki T, Higuchi M, Takeda K, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Miyagishi M, Yanai H, Kato A, Yoneyama M, Fujita T, Taniguchi T, Kawaoka Y, Ichijo H, Gotoh Y. (2015). The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response. **Sci. Signal.** 8, doi:10.1126/scisignal.aab1883.

Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N,

Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. (2015). Influence of genes suppressing interferon effects in peripheral blood mononuclear cells during triple antiviral therapy for chronic hepatitis C. **PLoS One** 10, doi: 10.1371/journal.pone.0118000.

Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.** 32, 48-53. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.012.

Kato H, Fujita T: RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. (2015). **Curr. Opin. Immunol.** 37, 40-45. doi: 10.1016/j.coi.2015.10.002.

Takashi Fujita: Dysregulation of MDA5-dependent signaling causes autoimmune disorder. JSPS Core-to-Core Program 1st International Symposium on Virus Infections and Host Responses “Intranuclear Infection and Host Immunity”, Kyoto, January 27 - 28, 2015.

藤田尚志：ウイルス感染が誘導する自然免疫シグナルの時空間解析 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業平成 26 年度成果報告会、東京、2015 年 3 月 16 日

Takashi Fujita: Dysregulation of MDA5-dependent signaling causes autoimmune disorder 1st Kyoto University-UC San Diego Joint Symposium “New Era of Trans-Pacific Knowledge Interactions”, Kyoto, March 11, 2015.

Kato, H., Funabiki, M., Onizawa, H., Miyachi, M., Yoshida, A., Deguchi, K., Takeyasu, K., Noda, T. and Fujita, T.: ウイルスセンサー、RIG-I Like Receptor の機能異常による自己免疫疾患（基調講演）第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015 年 7 月 17 日

脇本舞、呉成旭、藤原敬宏、石館文善、加藤博己、藤田尚志：抗ウイルスシグナル分子 IPS-1 のミトコンドリアを介した抗ウイルス応答機構の解明（ポスター）第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015 年 7 月 17 日

成田亮、米山光俊、加藤博己、藤田尚志：自然免疫系における Puvilio タンパク質の機能解析（ポスター）第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2015 年 7 月 18 日

Fujita, T.: Dysregulation of RIG-I-Like Receptor-dependent signaling causes autoimmune disorder The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2015.

Fujita, T.: Autoimmunity due to constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. Cytokine “Symphonies in Health and Disease”, Bamberg, October 11-14, 2015.

Narita, R., Takahasi, K., Yoneyama, M., Kato, H. and Fujita, T.: A Novel Function of Human Pumilio Proteins in Antiviral Innate Immunity (poster). Cytokine “Symphonies in Health and Disease”, Bamberg, October 11-14, 2015.

藤田尚志：ウイルスセンサー、RIG-I Like Receptor の機能異常による自己免疫疾患 第8回基礎と臨床を結ぶ分子病態研究会、東京、 2015 年 10 月 31 日

Kato, H., Onizawa, H., Funabiki, M., Miyachi, M., Yoshida, A., Deguchi, K., Takeyasu, K., Noda, T. and Fujita, T.: Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors RIG-I- like receptors. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, Sapporo, November 18-20, 2015.

Narita, R., Kato, H. and Fujita, T.: A Novel Function of Human Pumilio Proteins in Cytoplasmic Sensing of Viral Infection. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society of Immunology, Sapporo, November 18-20, 2015.

Narita, R., Yoneyama, M., Kato, H. and Fujita, T.: A Novel Function of Human Pumilio Proteins in Antiviral Innate Immune Responses (oral). The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 22-24, 2015.

Yamada, S., Shimojima, M., Narita, R., Kato, H., Saijo, M. and Fujita, T.: Analysis of innate immune responses in SFTSV infection (oral). The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 22-24, 2015.

Oh, S-W., Onomoto, K., Wakimoto, M., Onoguchi, K., Yoneyama, M., Kato, H. and Fujita, T.: Leader-containing uncapped viral transcript activates RIG-I in antiviral stress granules (oral). The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 22-24, 2015.

Kogure, A., Yoneyama, M., Kato, H. and Fujita, T.: TATA-binding protein (TBP) blocks influenza virus replication in a type I IFN signaling pathway-dependent manner (oral). The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, November 22-24, 2015.

教授	藤田尚志
准教授	加藤博己
助教	木檜周
非常勤職員・研究員	成田亮 塚本雄太 Gerlach Michaela
非常勤職員・技術補佐員	呉成旭
大学院生	Yao Wan-Ling (姚琬玲)、山田辰太郎、Kasumba Dacquín、 Qin Mian (覃勉)、鬼澤秀夫、Abu Tayeh Ahmed、竹内文彦、 Lee Sumin (李受玫)、脇本舞、羽者家宝、池田宗太郎、大音泰介、 Sha Tim-Wai (沙添威)、Horton Amanda、Khalil Jumana、 Hsu Chung Chen (許伸辰)、大高木結媛、清水翔太、杉山沙希、 三好史高、吉村礼桜、Duic Ivana、阿部寛人、岩澤嘉一、早田信正、 西村祥子、藤原栞、Zhu Mengjie (朱梦婕)
共同研究者	船曳正英
技術職員	山戸恵未 村上絵津 木庭一美
秘書	小柴里美

当研究分野ではウイルス感染に応答して引き起こされるⅠ型インターフェロンの発現誘導などの、自然免疫反応のメカニズムを研究している。この一連の反応は細胞がウイルスの感染を感知することから開始される。この反応をつかさどるセンサー分子が retinoic acid-inducible gene-I, (RIG-I) であることを発見した。RIG-I に類似した MDA5、LGP2 という分子も存在しており、これらを総称して RIG-I like receptor (RLR) と呼ぶ。

研究プロジェクト

- 1) RIG-I の細胞内局在と活性化の解析 (呉、脇本、清水、成田、加藤)
- 2) RLR と自己免疫疾患の解析 (鬼澤、大音、Abu Tayeh、Lee、清水、杉山、早田、加藤、船曳、

木庭、村上)

- 3) 木酢液及び天然化合物の抗ウイルス活性 (成田、加藤)
- 4) 植物由来の二重鎖 RNA による抗ウイルス応答の研究 (羽者家、Kasumba、三好、Zhu、加藤)
- 5) 抗ウイルス応答における新規因子の研究 (Sha、成田、Horton、Hsu、木檜、加藤)
- 6) 抗ウイルス応答の生細胞での可視化 (呉、脇本、藤原、西村)
- 7) 原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析 (Duic、吉村、平野、加藤)
- 8) B 型肝炎の新規治療薬を開発するための研究 (塚本、Yao、Qin、池田、竹内、大高木、岩澤、平野、加藤)
- 9) SFTSV による自然免疫阻害機構の研究 (山田、Khalil、塚本、加藤)
- 10) 核内 RIG-I の生理機能の解明 (Gerlach、加藤)
- 11) インターフェロン応答を抑制する薬剤の探索 (阿部、加藤)

共同研究 (敬称略)

小池 智 ((財) 東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト) 「ピコルナウイルス感染に応答した自然免疫誘導機構の解析」

下島昌幸、西條政幸 (国立感染症研) 「マウスを用いた SFTSV 感染実験」

迫田義博、喜田宏 (北海道大学) 「天然二重鎖 RNA を用いた抗ウイルス状態誘導の研究」

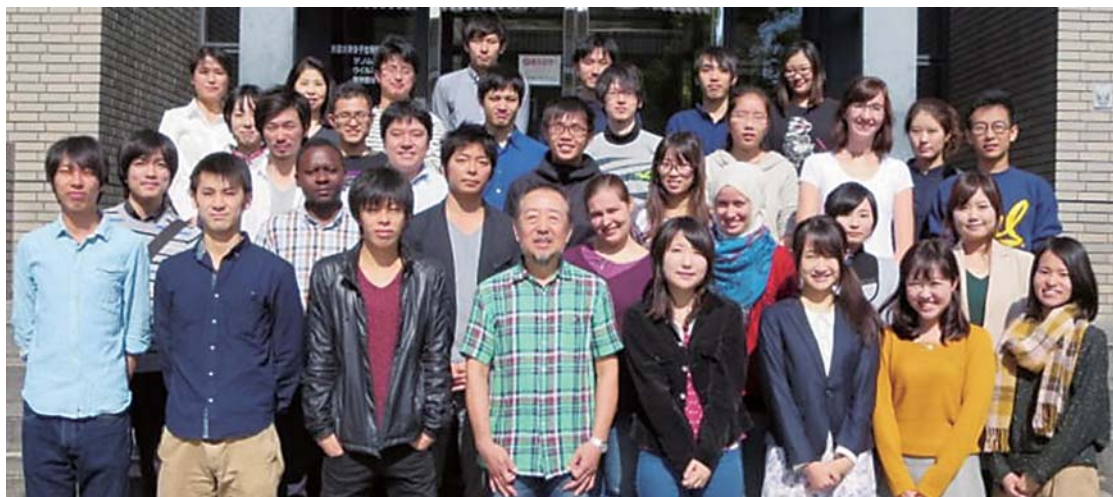
竹安邦夫、吉村成弘 (生命科学研究科) 「原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析」

藤原敬宏 (iCeMS) 「抗ウイルス応答の可視化」

三森経世 (医学研究科) 「RLR と自己免疫疾患の解析」

西小森隆太、平家俊男 (京大病院・小児科) 「自己炎症性疾患の解析」

井上麻紀 (理研バイオリソースセンター) 「腎炎発症マウスの解析」



高見正道（昭和大学）「自己炎症性疾患の解析」
吉村長久（京大病院・眼科）「自己炎症性疾患の解析」
木村寛之（京都薬科大）「自己炎症性疾患の解析」
竹内恒（産総研）「IRF-3 活性化阻害化合物の探索」
渡辺隆司（生存研）「木酢液の抗ウイルス活性」
米山光俊（千葉大）「抗ウイルス自然免疫応答の解析」

サマースチューデント

Mustafa Samet Pir（Bilkent University, Turkey）6/15-8/14

Hien Phan Ngoc Minh（Charles Sturt University, Australia）6/29-8/28

相内志津子（山口大学）7月 -12月

Laboratory of Biochemistry

Members

Professor	Mutsuhito Ohno
Assistant Professor	Makoto Kitabatake
	Ichiro Taniguchi
Postdoctoral Fellow	Tomoko Sakata (until Nov., 2015)
	Toshihiko Takeiwa
Graduate Student	Takahito Kawamoto
	Kan Suzuki

In eukaryotic cells, many genes are separated by introns into multiple exons that should be joined together. In addition, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule. In addition, we are also working on quality control mechanisms of eukaryotic ribosome particles.

1) RNA distribution in the cell:

1-1) Identification of the 3'-processing factor for human U snRNA precursors

Attempts were made to biochemically identify the 3'-processing factor for human U snRNA precursors. If ³²P-labeled human U1 snRNA precursor was incubated in HeLa cell cytoplasmic extracts, a band whose electrophoretic migration was similar to the one for the mature U1 snRNA was generated. Analysis of the 3'-end sequences of the band suggested that the band indeed corresponded to the mature (or almost mature) U1 snRNA, suggesting that the HeLa cell cytoplasmic extracts contain the 3'-processing factor for human U snRNA precursors. We are now setting up the conditions for purifying the factor from the cytoplasmic extracts.

1-2) Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates

The Signal Recognition Particle is a ribonucleoprotein complex that is essential for the translocation of nascent proteins into the endoplasmic reticulum. It has been shown that the RNA component (SRP RNA) is exported from the nucleus by CRM1 in the budding yeast. However, how SRP RNA is exported in higher species has been elusive. Here we show that SRP RNA does not use the CRM1 pathway in *Xenopus* oocytes.

Instead, SRP RNA utilizes the same export pathway as pre-miRNA and tRNA as demonstrated by cross-competition experiments. Consistently, the recombinant Exportin-5 protein specifically stimulated export of SRP RNA as well as of pre-miRNA and tRNA, whereas an antibody raised against Exportin-5 specifically inhibited export of the same RNA species. Moreover, biotinylated SRP RNA can pull down Exportin-5 but not CRM1 from HeLa cell nuclear extracts in a RanGTP-dependent manner. These results, taken together, strongly suggest that the principal export receptor for SRP RNA in vertebrates is Exportin-5 unlike in the budding yeast.

1-3) Analysis of RNA sorting system for nuclear export in *Drosophila*

Different RNA species are exported from the nucleus by distinct export factors. Although this specificity indicates that each RNA species is distinguished in the nucleus, the mechanism is not well understood. We have recently revealed that, in vertebrates, mRNA and spliceosomal U snRNA are sorted according to their lengths, in which hnRNP C tetramer measures RNA length as a molecular ruler. However, *Drosophila melanogaster* has no apparent hnRNP C homologs. To understand mRNA/U snRNA classification in *Drosophila*, we performed an *in vitro* RNA-protein binding assay with purified *Drosophila* proteins and S2 whole cell lysate. We have obtained the result suggesting that, also in *Drosophila*, mRNA and U snRNA are sorted by their lengths.

1-4) Identification of the specific interactors of the human lariat RNA debranching enzyme 1 protein

In eukaryotes, pre-mRNA splicing is an essential step for gene expression. We have been analyzing post-splicing intron turnover steps in higher eukaryotes. Here, we report protein interaction between hDbr1 and several factors found in the Intron Large (IL) complex, which is an intermediate complex of the intron degradation pathway. The hDbr1 protein specifically interacts with Xab2. We also attempted to identify specific interactors of hDbr1. Co-immunoprecipitation experiments followed by mass spectrometry analysis identified a novel protein as one of the specific interactors of hDbr1. This protein is well conserved among many species and shows the highest similarity to yeast Drn1, so it is designated as hDrn1. hDrn1 directly interacts with hDbr1 through protein-protein interaction. Furthermore, hDrn1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm, as hDbr1 protein does. These findings suggest that hDrn1 has roles in both the nucleus and the cytoplasm, which are highly likely to involve hDbr1.

2) rRNA quality control mechanisms:

How the eukaryotic cells deal with non-functional RNA molecules that were either mutated or damaged? We are searching for novel RNA quality control mechanisms in mammalian and yeast cells by mainly focusing on ribosomal RNAs.

Quality control mechanisms operate in various steps of ribosomal biogenesis to ensure the production of functional ribosome particles. It was previously reported that mature ribosome particles containing

nonfunctional mutant rRNAs are also recognized and selectively removed by a cellular quality control system (nonfunctional rRNA decay; NRD).

2-1) Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay

Nonfunctional mutant ribosomal RNAs in 40S or 60S subunits are selectively degraded in eukaryotic cells. We previously reported that NRD of 25S rRNA required cullin-E3 ligase Rtt101 and its associating factor Mms1, both of which are involved in DNA repair. Although Mms22, an accessory component of the E3 complex, was suggested to direct the E3 complex to DNA repair, the factor that directs the complex to 25S NRD remained unknown. Here we show that another accessory component, Crt10 is required for 25S NRD, but not for DNA repair, suggesting that this accessory component specifies the function of the E3 complex differently. We also show that the Crt10-containing E3 complexes can be further divided into sub-complexes, one of which contains Paf1 complex, a Pol-II binding complex modulating the transcription of stress-related genes. Our results show the convergence of multiple pathways for stresses that harm nucleic acids and provide a molecular framework for the substrate diversity of the complex.

2-2) identification of a 60S-associating protein essential for nonfunctional 25S rRNA decay

The eukaryotic ribosomes are composed of 4 rRNAs and 80 ribosomal proteins. We and others previously reported that the defective ribosomal subunits containing mutations in their rRNAs are selectively eliminated from the cytoplasm by ubiquitin-proteasome system (nonfunctional rRNA decay, NRD). Here we show a 60S-associating protein essential for the degradation of mutant 25S rRNAs. Importantly, this protein is physically associated with the E3 ubiquitin ligase involved in 25S NRD. Biochemical analysis revealed that this “bridge” protein is highly enriched on the 60S particles containing a nonfunctional mutant 25S rRNAs, suggesting a central role of this bridge protein in the functional inspection of the 60S subunits.

LIST OF PUBLICATIONS

Takeiwa, T., Taniguchi, I. and Ohno, M. (2015). Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. **Genes to Cells**. 20(4), 281-291.

Masaki, S., Yoshimoto, R., Kaida, D., Hata, A., Satoh, T., Ohno, M. and Kataoka, N. (2015). Identification of the specific interactors of the human lariat RNA debranching enzyme 1 protein. **Int. J. Mol. Sci.** 16(2), 3705-21.

谷口一郎、大野睦人 . 適正な RNA 核外輸送複合体形成の保証機構 . 生化学 第 87 巻第 1 号 68-74

Sakata, T., Fujii, K., Kitabatake, T. and Ohno, M. (2015). Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 457(1), 90-4.

北畠真、大野睦人：真核生物リボソームの合成時における品質管理、第 18 回 Tokyo RNA Club. 東京、2015 年 1 月 14 日

Taniguchi, I. and Ohno, M. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. East Asia Joint Symposium, Okinawa, 11-14 Nov. 2015.

Ohno, M. A cellular mechanism that sorts RNA transcripts according to their lengths. The 10th International Symposium for the Inter-institutional Network (ISIIN), Sapporo, 23-24 July, 2015.

北畠真、坂田知子、藤井耕太郎、大野睦人：真核生物 60S リボソームの品質管理とストレス応答経路との関わり、第 3 回 RIBOSOME MEETING、宮崎、2015 年 3 月 17・18 日

教授	大野睦人
助教	北畠 真
助教	谷口一郎
博士研究員	坂田知子 (2015 年 11 月まで)
	竹岩俊彦
大学院生	川本崇仁
	鈴木 完

細胞の中の RNA の大部分は裸ではなくタンパク質との複合体 (RNP) として存在し機能する。当研究室は、RNP の形成・構造変換・輸送・解体・品質管理など、RNP をめぐる様々な現象に興味を持っている。

昨年と同様、大野研究室には、教授、秘書、2 名の助教、2 名の研究員、1 名の博士後期課程大学院生、1 名の修士課程大学院生が在籍した。ただし、研究員の内 1 名は、11 月に外部に就職した。

I. RNP の核細胞質間の輸送

核外輸送される主要な RNA には、翻訳に関わるリボソーム RNA (rRNA) や転移 RNA (tRNA)、スプライシングに関わるウリジンリッチ 核内低分子 RNA (U snRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA (miRNA) などがあるが、これらの RNA は、それぞれの RNA 種に固有の輸送因子群が核内で結合した後、細胞質へと輸送される。核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命 (局在化、翻訳、安定性など) をも規定することが明らかになってきた。つまり、RNA の種類は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこれら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。

他方、snoRNA や scaRNA など、おそらく核外輸送されずに核内の様々なドメインに輸送される RNA も存在する。さらに、一種の RNA 品質管理機構として、イントロンを含む mRNA 前駆体などの未成熟 RNA は成熟化するまで核の中に留められる。また、ウイルスの中には、RNA 輸送を制御することによって増殖するものが多数ある。

以上のような RNA の選択的分配制御は遺伝子発現に非常に重要であるが不明な点が多い。このような RNA の選別は RNA 上のどのような目印を識別して行われるのか、またその識別を行うタン

パク質因子群はどのようなものなのか？本研究は、関連したいくつかの点に焦点を絞り、細胞内の RNP 分配における制御機構を明らかにすることを目的とする。

1. ヒト U snRNA 前駆体の 3'-プロセッシング因子の探索

適切な遺伝情報を有する mRNA の合成を行うためには、mRNA 前駆体のスプライシング反応が正確に行われること、延いては反応の担い手、即ち RNA とタンパク質の複合体である U snRNP が正しく形成することが必須である。これまでの研究で、ヒトを含む高等真核生物における U snRNP の RNA 成分 (U snRNA) の成熟過程の中で、「細胞質における U snRNA 前駆体の 3' 末端に存在する余分な配列の除去過程 (3'-プロセッシング)」を行う因子は同定されていない。

ヒト U snRNA 前駆体の 3'-プロセッシングを行う因子の同定を目的とし、研究を開始した。まず、試験管内転写反応によって放射性標識した U1 snRNA 前駆体をヒト培養細胞の細胞質画分 (S100) 中で反応させたところ、成熟型 U1 snRNA の長さとはほぼ一致する RNA が生成した。その生成 RNA の 3' 末端側の配列を解析したところ、データベース上の U1 snRNA の配列とはほぼ一致した。また、生成 RNA にはキャップ結合タンパク質複合体 (CBC) が結合したことから、RNA の 5' 末端は正常に保持されていることが分かった。以上の結果は、S100 中には U1 snRNA 前駆体 3'-プロセッシングを行う因子が存在することを示唆している。現在、この 3'-プロセッシング因子を S100 から精製するための条件を検討している。

2. 脊椎動物における SRP RNA の核外輸送の研究

真核細胞では、核内において様々な RNA が転写されており、その多くが転写後に核膜孔を通過して細胞質へと輸送される。過去の研究から、RNA が細胞質へと輸送されるためには核外輸送とよばれるタンパク質と複合体を形成する必要があることが示されている。さらに、RNA はそれぞれに特異的な核外輸送によって細胞質へと輸送されることが明らかにされている。

現在までに多くの RNA の核外輸送について研究が行われ、その分子機構が解明されつつある一方で、本研究の研究対象である SRP RNA の核外輸送については、特に脊椎動物において、研究が立ち遅れていた。SRP RNA は、真核細胞において、膜タンパク質や分泌タンパク質を小胞体へとリクルートする RNA-タンパク質複合体であるシグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle: SRP) の RNA 成分である。

出芽酵母において、SRP RNA は CRM1 とよばれる核外輸送因子により輸送されることが示されている。一方で、脊椎動物においても、ラットの培養細胞を CRM1 の阻害剤で処理すると SRP RNA が核に蓄積することから、出芽酵母と同様に CRM1 が SRP RNA を輸送すると予想されていた。しかしながら上述のラットの培養細胞を用いた実験において、CRM1 阻害の間接的な影響により SRP RNA が核に蓄積した可能性は排除できず、CRM1 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかは不

明瞭であった。そのため、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構は、核外輸送因子の実体からして、ほとんど未知の状態にあった。そこで、我々は脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構の解明を目的として研究を開始した。まず脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存しているかどうか、RNA 輸送研究においてよく用いられるアフリカツメガエル卵母細胞への微量注入系を用いて解析した。

その結果、脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存していないことを見出した。次に、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子を同定するために、様々な RNA を用いた cross-competition assay を行った。その結果、SRP RNA は pre-miRNA や tRNA と共通した因子により輸送されることが示唆された。そのため、pre-miRNA や tRNA の核外輸送因子である Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子の候補として浮上した。

そこで、Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかを調べるために、以下の実験を行った。まず、Exportin-5 のリコンビナントタンパク質または Exportin-5 に対する抗体を卵母細胞の核に注入して SRP RNA の核外輸送に与える影響を調べた。その結果、リコンビナントタンパク質の注入により SRP RNA の輸送は促進される一方、抗体の注入により SRP RNA の輸送は阻害された。

次に、ビオチン化した SRP RNA を HeLa 細胞核抽出液と混和後にプルダウンする実験を行った。その結果、Exportin-5 が輸送基質と結合するために必要とする cofactor である RanGTP の存在下において CRM1 ではなく Exportin-5 が沈降したことから、SRP RNA は Exportin-5 と相互作用することが示唆された。以上の結果から、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子は Exportin-5 であることが示唆された。

本研究から、Exportin-5 がどのようにして SRP RNA を認識するのか、なぜ出芽酵母と脊椎動物で SRP RNA の核外輸送因子が異なるのかといった問題が新たに浮上した。これらに関して考察を行った。以上の結果を論文発表した。

3. ショウジョウバエにおける RNA polymerase II 転写産物の仕分け機構の解析

真核細胞では多くの種類の RNA が核内で転写された後、細胞質へと輸送される。この際、異なる RNA 種には異なる輸送複合体が形成されるが、これはそれぞれの RNA 種が核内で識別されることを意味している。しかし、この識別の分子的メカニズムは未知な部分も多い。中でも spliceosomal U snRNA と mRNA は RNA polymerase II によって転写されるなどいくつかの共通点を持っていて、両者の識別機構は長らく不明であった。我々の研究室はこの識別機構に関して、mRNA が U snRNA に比べて長いことに着目して研究を進めた。そして、脊椎動物では RNA の長さが両者の識別に重要であること、その長さを測る因子として hnRNP C が働くことを以前明らかにした。

ショウジョウバエでは、脊椎動物と同様に U snRNA の成熟過程で核外輸送が行われるので、U

snRNA と mRNA 間の識別は重要であるはずである。ところが、ショウジョウバエは hnRNP C の明確なホモログを持たない。そこで本研究ではショウジョウバエにおける U snRNA/mRNA の識別機構の解明を試みた。U snRNA の輸送因子である CBC と PHAX のレコンビナントタンパク質と様々な長さの RNA を用いて、hnRNP C を同定した時と同様のアッセイを行ったところ、ショウジョウバエ S2 細胞破砕液中に、長い RNA から優先的に PHAX を除去する活性を見出した。このことからショウジョウバエにおいても U snRNA/mRNA の識別は RNA の長さに応じて行われていることが強く示唆された。現在我々は S2 細胞破砕液中からこの識別を担う責任因子の同定を試みているが、活性が失活しやすく未だ成功していない。

4. その他

ヒトデブランチング酵素と相互作用する因子の同定について論文報告を行った。

II. RNP の品質管理

細胞は正しい RNP を作るために多大なエネルギーコストを払っているが、リボソームやスプライセオソームのような巨大で複雑な RNP の場合、合成の過程で異常な RNP が生成してしまうことも珍しくないだろう。一方、遺伝子 DNA の突然変異あるいは紫外線や化学物質、活性酸素などの様々な環境ストレスにより、完成品 RNP 中の RNA あるいはタンパク質成分が変異したり損傷を受けたりすることもあるだろう。このような原因で異常な RNP が生成してしまったときに、細胞はそれらをどのように処理するのであろうか。RNA 分子の品質管理の研究は盛んに行われているが、実は RNP の品質管理という観点から行われた研究は多くなく、その理解はようやく端緒についたばかりである。本研究室では、リボソーム粒子をモデル系として、RNP の品質管理機構を探っている。

出芽酵母で活性中心に点突然変異を持つようなリボソーム RNA は、生合成過程での品質管理機構に引っかからず、完成品リボソーム粒子にまで組み立てられる。25S rRNA の PTC (peptidyl transferase center、ペプチド転移活性中心) に点変異を持つものは完成品の大 (60S) サブユニットまで、18S rRNA の decoding center (暗号解読センター) に点変異を持つものは完成品の小 (40S) サブユニットまでそれぞれ組み立てられるが、いずれも翻訳のための活性は失っている。これらのような一見正常だが機能喪失した完成品リボソーム中の rRNA は、総称して NRD (non-functional rRNA decay) と呼ばれる RNA 品質管理機構で分解される。

1. 機能不全リボソームの分解に関わるユビキチンリガーゼ複合体の解析

60S リボソーム中の 25S rRNA の NRD (25S NRD) には、Rtt101 と Mms1 からなる Cullin 型 E3 ユビキチンリガーゼによるリボソームのユビキチン化が必要である。60S リボソームの処理にはまず

ユビキチン-プロテアソーム系によるリボソームタンパク質の分解が必要だと考えられた。

リボソームの品質管理機構の解明のため、リボソームのユビキチン化に注目して研究を開始した。Rtt101-Mms1 E3 リガーゼ複合体は、機能不全リボソームを認識するレセプタータンパク質を備えていると考えられるが、その正体はわかっていない。このレセプタータンパク質の探索のため、Mms1 との物理的相互作用が知られているタンパク質の中から 25S NRD に必要なものがあるかを調べた。その結果、Crt10 という WD40 リピートをもつタンパク質が 25S NRD に必要であることを発見した。Crt10 は Rtt101-Mms1 からなる E3 リガーゼ複合体と協力して、機能不全リボソームをユビキチン化することが確認された。

しかし、Rtt101-Mms1-Crt10 複合体とリボソームとの物理的相互作用は実験的に検出することができなかった。そのため、両者をつなぐ新たな因子が存在する可能性を考え、Mms1 と Crt10 の二段階免疫沈降により、新たな因子の同定を試みた。質量分析の結果、Paf1 Complex (Paf1C) と呼ばれる転写調節複合体が強く結合していることがわかった。Paf1 は、1996 年に RNA polymerase II に結合するタンパク質として同定され、ヒストン修飾酵素など、転写を調節する様々な因子が結合するプラットフォームとして機能すると考えられている。Paf1C によって発現量が制御される遺伝子は細胞周期・ストレス応答関連遺伝子など数多い。しかし、Paf1C は 25S NRD に関与しないことがわかった。Crt10 を含む E3 リガーゼ複合体は、Paf1C を介して 25S NRD 以外の働きをしていると予想される。

Rtt101-Mms1 複合体は Mms22 と結合し、Mms22 は DNA 修復に関わることが知られている。Mms22 と Crt10 は相互排他的に Mms1 に結合する。mms1 Δ 株や rtt101 Δ 株、mms22 Δ 株が DNA 変異原に感受性となるのに対し、crt10 Δ 株では野生株と変わらなかった。この結果は、Crt10 の関与する 25S NRD が、DNA 修復とは遺伝的に別個の経路であることを示している。

核酸にダメージを与えるストレス下では多種の問題が発生するが、Rtt101-Mms1 からなる E3 リガーゼ複合体は多数のアダプタータンパク質を使い分けることで、一斉に対処することができる。本研究により、Crt10 がこの E3 リガーゼ複合体を 25S NRD に適用させるがわかった。さらに Crt10 が Paf1 と結合することから、転写中の DNA や RNA に障害が生じた場合に、この複合体が Crt10 と Paf1C を介して転写を制御する可能性を示唆している。以上の結果を論文発表した。

2. 機能不全 60S 上に濃縮するタンパク質因子の同定

真核生物のリボソームは 4 本の RNA と 80 個のタンパク質から構成される巨大複合体である。このうち活性部位の多くは RNA に担われているが、RNA に変異を持つ機能不全リボソームはユビキチン化に関連した経路にしたがって選択的に分解されることが分かってきた。本研究では機能不全 60S 粒子がユビキチン リガーゼ複合体に認識されるために、どのような特徴をもっているかの分析を続けた結果、あるタンパク質が機能不全 60S 上に濃縮すること、この因子がユビキチンリガーゼ

複合体をリクルートするために必要であること、などを生化学的な実験によって示した。この因子はリボソームの機能を検査する品質管理機構においてこの因子は中心的な役割を果たす因子であることが示唆される。

Laboratory of Biological Protection

Members

Professor	Koichi Ikuta
Assistant Professor	Shizue Tani-ichi
Assistant Professor	Takahiro Hara
Research Fellow	Guangwei Cui
Graduate Student	Akihiro Shimba, Shinya Abe, Makoto Ogawa
Research Student	Hisa Mukouhira, Yuanbo Zhu

Introduction

Our laboratory has made two major achievements. First, we have found that fetal and adult hematopoietic stem cells have different developmental potential to differentiate into lymphocytes. Second, we have demonstrated that interleukin-7 (IL-7) controls DNA recombination of lymphocyte antigen receptor genes by changing chromatin structure. Both of them are related with fundamental questions in medicine and biology. Based on these findings, we are now pursuing research on development and regulation of the immune system, focusing on the following questions: (1) function of IL-7 receptor (IL-7R) in the immune system; (2) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (3) regulation of immune response by IL-7R expression; and (4) distribution and function of IL-7- and IL-15-producing cells in lymphoid organs.

Topics

1) STAT5 orchestrates local epigenetic changes for chromatin accessibility and rearrangements by direct binding to the TCR γ locus: K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI, B. LIANG, S. SHITARA, K. ISHIHARA¹, M. ABE², H. MIYACHI³, S. KITANO³, T. HARA, M. NANNO⁴, H. ISHIKAWA⁴, K. SAKIMURA², M. NAKANO¹, H. KIMURA⁵, and K. IKUTA (¹Kumamoto University, ²Niigata University, ³Reproductive Engineering Team, IVR, ⁴Yakult Central Institute, ⁵Tokyo Institute for Technology)

The transcription factor STAT5, which is activated by the IL-7R, controls chromatin accessibility and rearrangements of the T cell receptor (TCR) γ locus. Although STAT binding motifs are conserved in J γ promoters and E γ enhancers, little is known about their precise roles in rearrangements of the TCR γ locus *in vivo*. To address this question, we established two lines of J γ 1 promoter mutant mice: one harboring a deletion

in the *Jy1* promoter including three STAT motifs (*Jy1P^{Δ/Δ}*), and the other carrying point mutations in the three STAT motifs in that promoter (*Jy1P^{mS/mS}*). Both *Jy1P^{Δ/Δ}* and *Jy1P^{mS/mS}* mice showed impaired recruitments of STAT5 and chromatin remodeling factor BRG1 at the *Jy1* gene segment. This resulted in severe and specific reduction in germline transcription, histone H3 acetylation, and histone H3 lysine 4 methylations of the *Jy1* gene segment in adult thymus. Rearrangement and DNA cleavage of the segment were severely diminished, and *Jy1* promoter mutant mice showed profoundly decreased numbers of $\gamma\delta$ T cells of $\gamma1$ cluster origin. Finally, compared to controls both mutant mice showed severe reduction in rearrangements of the *Jy1* gene segment, perturbed development of $\gamma\delta$ T cells of $\gamma1$ cluster origin in fetal thymus, and fewer $V\gamma3^+$ dendritic epidermal T cells. Furthermore, interaction with *Jy1* promoter and *Ey1*, a TCR γ enhancer, was dependent on STAT motifs in *Jy1* promoter. Overall, this study strongly suggests that direct binding of STAT5 to STAT motifs in the *Jy* promoter is essential for local chromatin accessibility and *Jy/Ey* chromatin interaction, triggering the rearrangements of the TCR γ locus.

2) An enhancer of the IL-7 receptor α -chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells: A. ABE, S. TANI-ICHI, S. SHITARA, G. CUI, H. YAMADA¹, H. MIYACHI², S. KITANO², T. HARA, R. ABE³, Y. YOSHIKAI¹, and K. IKUTA (¹Kyushyu University, ²Reproductive Engineering Team, IVR, ³Tokyo University of Science)

The IL-7R plays critical roles in lymphocyte development and homeostasis. Although IL-7R expression is strictly regulated during lymphocyte differentiation and the immune response, little is known regarding its *in vivo* regulation. To address this issue, we established a mouse line with targeted deletion of the conserved non-coding sequence 1 (CNS1) element found 3.6-kb upstream of the IL-7R α promoter. We report that IL-7R α is expressed normally on T and B cells in thymus and bone marrow of CNS1^{-/-} mice except for in regulatory T cells. In contrast, these mice show reduced IL-7R α expression in conventional CD4 and CD8 T cells as well as regulatory T, natural killer T, and $\gamma\delta$ T cells in the periphery. CD4 T cells of CNS1^{-/-} mice showed IL-7R α up-regulation in the absence of growth factors and IL-7R α downregulation by IL-7 or T-cell receptor stimulation, although the expression levels were lower than control mice. Naive CD4 and CD8 T cells of CNS1^{-/-} mice show attenuated survival by culture with IL-7 and reduced homeostatic proliferation after transfer into lymphopenic hosts. CNS1^{-/-} mice exhibit impaired maintenance of antigen-stimulated T cells. Furthermore, IL-7R α up-regulation by glucocorticoids and TNF- α was abrogated in CNS1^{-/-} mice. This work demonstrates that the CNS1 element controls IL-7R α expression and maintenance of peripheral T cells, suggesting differential regulation of IL-7R α expression between central and peripheral lymphoid organs.

List of publications

Nakamura, M., Shibata, K., Hatano, S., Sato, T., Ohkawa, Y., Yamada, H., Ikuta, K., and Yoshikai, Y. (2015). A genome-wide analysis identifies a Notch-RBP-J κ -IL-7R α axis that controls IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell

homeostasis in mice. **J. Immunol.**, 194, 243-251.

Huang, Y., Heiser, R. A., Detanico, T. O., Getahun, A., Kirchenbaum, G. A., Aydintug, M. K., Smith, C. W., Carding, S. R., Ikuta, K., Huang, H., Wysocki, L. J., Cambier, J. C., O'Brien, R. L., and Born, W. K. (2015). $\gamma\delta$ T cells affect IL-4 production and B cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 112(1), E39-48.

Alp, Ö. S., Durlanik, S., Schulz, D., McGrath, M., Grün, J. R., Bardua, M., Ikuta, K., Sgouroudis, E., Riedel, R., Zehentmeier, S., Hauser, A. E., Tsuneto, M., Melchers, F., Tokoyoda, K., Chang, H-D., Thiel, A., and Radbruch, A. (2015). Memory CD8⁺ T cells colocalize with IL-7⁺ stromal cells in bone marrow and rest in terms of proliferation and transcription. **Eur. J. Immunol.**, 45, 975-987.

Wagatsuma, K., Tani-ichi, S., Liang, B., Shitara, S., Ishihara, K., Abe, M., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Nanno, M., Ishikawa, H., Sakimura, K., Nakano, M., Kimura, H., and Ikuta, K. (2015). STAT5 orchestrates local epigenetic changes for chromatin accessibility and rearrangements by direct binding to the TCR γ locus. **J. Immunol.**, 195, 1804-1814.

Abe, A., Tani-ichi, S., Shitara, S., Cui, G., Yamada, H., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Abe, R., Yoshikai, Y., and Ikuta, K. (2015). An enhancer of the IL-7 receptor α -chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells. **J. Immunol.**, 195, 3129-3138.

Adachi, T., Kobayashi, T., Sugihara, E., Yamada, T., Ikuta, K., Pittaluga, S., Saya, H., Amagai, M., and Nagao, K. (2015). Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. **Nat. Med.**, 21, 1272-1279.

Nishijima, H., Kitano, S., Miyachi, H., Morimoto, J., Kawano, H., Hirota, F., Morita, R., Mouri, Y., Masuda, K., Imoto, I., Ikuta, K., and Matsumoto, M. (2015). Ectopic Aire expression in the thymic cortex reveals inherent properties of Aire as a tolerogenic factor within the medulla. **J. Immunol.**, 195, 4641-4649.

生田宏一、崔広為、原崇裕 . (2015) . 生体内リンパ器官におけるサイトカインニッチの解明 . **感染・炎症・免疫**, 45, 143-145.

Shitara, S.: Evidence for the thymic origin of $\gamma\delta$ IEL. The 13th International Student Seminar, Kyoto, March 4, 2015.

Ikuta, K.: Visualizing the immune microenvironment by reporter mice. Seoul National University College of

Medicine, Seoul, Korea, June 16, 2015.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., Ikuta, K.: Characterization of the IL-15 niche in vivo. The 6th FIMSA Congress, Singapore, July 1, 2015.

榛葉旭恒、谷一靖江、生田宏一：グルコルチコイドは IL-7R を誘導し、CXCR4 を介した T 細胞体内分布の日内変動を制御する、第 25 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2015 年 5 月 16 日

原崇裕、生田宏一：Identification and characterization of IL-7 niche in gut-associated lymphoid tissue、第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015 年 11 月 19 日

崔広為、榛葉旭恒、谷一靖江、小川真、阿部真也、原崇裕、生田宏一：STAT5 and PI3K signals of the IL-7R play differential roles in T cell development and homeostasis revealed by novel IL-7R α mutant mice、第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015 年 11 月 19 日

榛葉旭恒、谷一靖江、増田喬子、崔広為、小川真、阿部真也、原崇裕、河本宏、生田宏一：Differential roles of IL-7 and IL-2 receptor signals in lymphocyte differentiation and development revealed by IL-7R α /IL-2R β chimera knock-in mice、第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015 年 11 月 19 日

谷一靖江、生田宏一：Regulation of IL-7R expression in dendritic cells、第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015 年 11 月 20 日

阿部真也、原崇裕、生田宏一：腸管関連リンパ組織における IL-7 ニッチの同定と特徴、BMB2015、神戸、2015 年 12 月 1 日

榛葉旭恒：グルコルチコイドによる IL-7R および CXCR4 の発現を介した T 細胞維持への影響、平成 27 年度京都大学ウイルス研究所リトリート、大津、2015 年 12 月 22 日

崔広為：Competitive balance between STAT5 and PI3K signaling pathway of IL-7R modulates T cell development and homeostasis、平成 27 年度京都大学ウイルス研究所リトリート、大津、2015 年 12 月 22 日

教授	生田宏一
助教	谷一靖江
助教	原 崇裕
研究員	崔 広為
大学院生	榛葉旭恒、阿部真也、小川 真
研究生	向平妃沙、朱媛博

2015 年 3 月に設楽宗一郎が生命科学研究科大学院博士課程、崔広為が医学研究科大学院博士課程を修了し、学位を取得した。崔は 4 月から日本学術振興会外国人特別研究員として引き続き在籍している。また、4 月から阿部真也と小川真が医学研究科大学院修士課程に進学した。10 月に朱媛博が中国から来日し研究生として参加した。したがって、生体防御研究分野は現在、教授 1 名、助教 2 名、研究員 1 名、大学院生 3 名、研究生 2 名の総勢 9 名となっている。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン 7 レセプター (IL-7R) の免疫系における機能、IL-7 による T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子の制御、IL-7R の発現制御、IL-7 と IL-15 産生細胞の可視化と機能解析を中心に研究を進めている。本年に論文として発表した研究成果を以下に記載する。

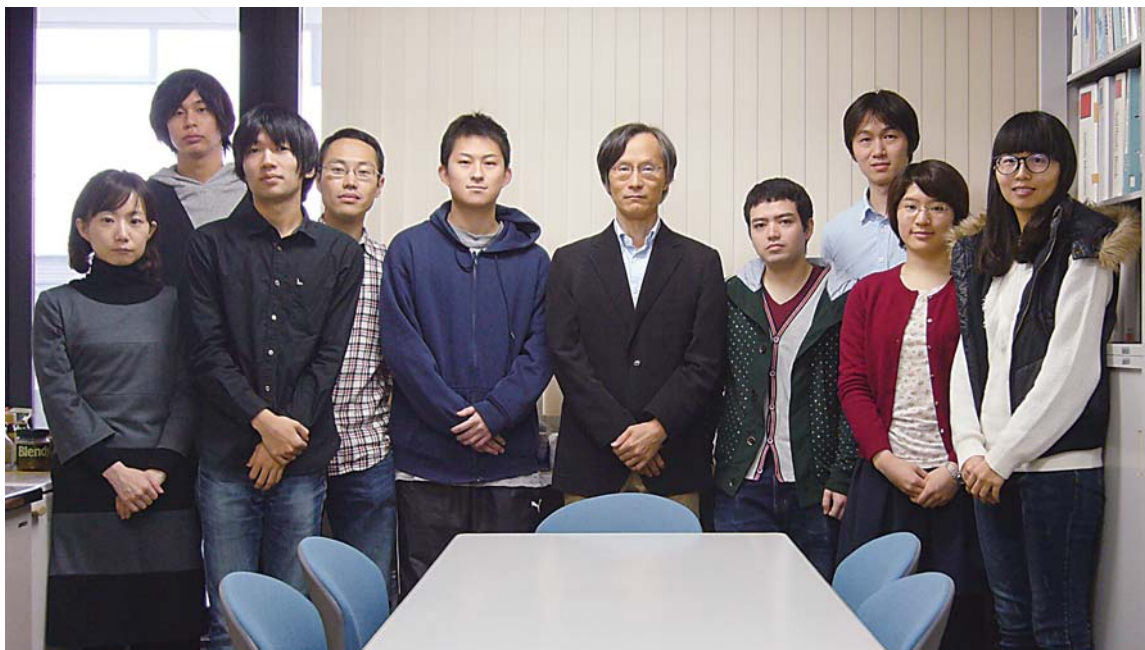
1) STAT5 は T 細胞受容体 γ 遺伝子座に直接結合することでクロマチンのアクセシビリティと再編成のための局所的なエピジェネティクス変化を制御する

インターロイキン 7 受容体 (IL-7R) は転写因子 STAT5 を活性化し、T 細胞受容体 (TCR) γ 遺伝子座のアクセシビリティと再編成を制御する。STAT 結合配列が J γ プロモーターや E γ エンハンサーに保存されているが、TCR γ 遺伝子再編成におけるその生体内機能は未だ不明である。この問題を明らかにするため、3つの STAT モチーフを含む 940 塩基対の J γ 1 プロモーター領域を欠失した J γ 1P $^{\Delta/\Delta}$ マウスと、J γ 1 プロモーター内の 3 つの STAT モチーフに点変異を導入した J γ 1P $^{mS/mS}$ マウスを作製した。まず、J γ 1P $^{mS/mS}$ マウス胸腺細胞において、STAT5 の J γ 1 プロモーターへの結合が完全に障害されていることを確認した。次に、J γ 1P $^{\Delta/\Delta}$ および J γ 1P $^{mS/mS}$ マウス胸腺細胞において、クロマチンのアクセシビリティの指標である germline 転写、ヒストン H3 アセチル化、H3 リジン 4 のメチル化を解析したところ、いずれも J γ 1 遺伝子特異的に著しく低下していた。また、クロマチンリモデリン

グ因子の触媒サブユニット BRG1 の J γ 1 領域への結合も著しく低下していた。さらに、J γ 1P^{Δ/Δ} および J γ 1P^{mS/mS} マウス胸腺細胞において J γ 1 遺伝子の DNA 二重鎖切断と組換えが著しく低下しており、J γ 1 遺伝子と組換えをおこす V γ 2、V γ 5 遺伝子を発現する $\gamma\delta$ T 細胞が、胸腺や小腸上皮で大きく減少していた。同様に J γ 1P^{Δ/Δ} および J γ 1P^{mS/mS} マウス胎仔胸腺細胞において J γ 1 遺伝子の組換えが著しく低下しており、成体における V γ 3 陽性表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞が減少していた。最後に、J γ 1 プロモーターと E γ 1 エンハンサーのループ形成を Chromosome Conformation Capture (3C) 法を用いて解析したところ、コントロールマウス胸腺細胞では J γ 1 と E γ 1 が結合していたが、J γ 1P^{mS/mS} マウスではそれが著しく障害されていた。以上の結果から、STAT5 が J γ プロモーターの STAT モチーフへ結合することが、J γ 領域の局所的なアクセシビリティと J γ と E γ クロマチンのループ形成に必須であり、TCR γ 遺伝子座の組換えを誘導することが示された。(Wagatsuma, Tani-ichi et al, *J. Immunol.* 195:1804, 2015)。

2) IL-7R α 遺伝子座のエンハンサーは末梢 T 細胞における IL-7 レセプターの発現と維持を制御する

IL-7R はリンパ球の分化と維持に重要な役割を果たしている。リンパ球の分化や免疫応答の際に IL-7R の発現は厳密に制御されているが、生体内の制御機構は不明である。そこで、生体内における IL-7R の発現制御機構を明らかにするために、IL-7R α プロモーターの 3.6 kb 上流に存在する保存された非翻訳配列 1 (CNS1) を欠失したマウスを作製し、リンパ球の各分化段階における IL-7R α の発現を解析した。CNS1⁺ マウスでは、胸腺細胞と骨髄 B 細胞における IL-7R α の発現に変化はなかったが、胸腺の Treg 細胞において発現が低下していた。また、CNS1⁺ マウスの末梢組織において、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、Treg 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞で IL-7R α の発現が低下していた。CNS1⁺ CD4 T 細胞において IL-7R α の発現が低下しているものの、IL-7 や TCR のシグナルが解除された際の IL-7R α の発現の上昇が起こり、IL-7 や TCR のシグナルによる IL-7R α の発現の抑制も正常に起こった。CNS1⁺ ナイーブ T 細胞では、IL-7 で培養した際の生存が低下し、Rag2⁺ マウスに移入した際の増殖も低下していた。さらに、グルココルチコイドと TNF- α による IL-7R α の発現の誘導が消失していた。また、CNS1⁺ CD8 T 細胞においては、抗原刺激後のクローン増幅とメモリー T 細胞の維持が障害されていた。これらの結果から、CNS1 が末梢 T 細胞において IL-7R α の発現を維持しており、IL-7R の発現制御が中枢と末梢において異なる可能性が示唆された。(Abe et al, *J. Immunol.* 195:3129, 2015)。



2015 年 12 月撮影

Laboratory of Infection and Prevention

I. First Group

Members

Professor	Osamu Takeuchi
Assistant Professor	Takashi Mino
Office Administrator	Momoko Tsuji
Postdoctoral Fellow	Atsuko Wakabayashi
	Daisuke Ori
	Tomoko Imamura
	Sarang Tartey
Graduate Student	Yoshinari Nakatsuka, Masaki Abe, Xiaotong Cui, Akitoshi Sadahiro, Kae Hatano, Kotaro Akaki, Hitomi Sano, Daichi Yamasoba
Research Student	Masanori Yoshinaga, Fabian Hia, Chong YeeKien, Shinnosuke Yamada

Introduction

The research projects carried out in this group are aiming to uncover the molecular mechanisms of the regulation of inflammation in innate immunity. Since inflammation is mediated by the production of proinflammatory cytokines, we are studying the cytokine gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels.

Topics

1) Regulatory mechanism for the Regnase-1-mediated mRNA decay in innate immunity and its post-transcriptional regulation: T. MINO, T. IMAMURA, D. ORI, Y. NAKATSUKA, M. ABE, X. CUI, A. SADAHIRO, K. AKAKI, H. SANO, D. YAMASOBA, M. YOSHINAGA, F. HIA, S. YAMADA and O. TAKEUCHI

Gene expression in response to inflammatory stimuli is controlled by the transcriptional and post-transcriptional mechanisms in immune cells. Post-transcriptional regulation that modifies mRNA stability and translation provides rapid and flexible control of gene expression. Control of mRNA stability is mediated by a set of RNA binding proteins including Roquin and Regnase-1. Roquin (RING finger and CCCH zinc finger

protein) prevents development of autoimmunity in mice by destabilizing the mRNA such as *inducible T cell costimulator (Icos)* and *tumor necrosis factor (Tnf)*. Roquin recognizes a stem-loop (SL) structures in their 3' UTRs and Roquin-mediated mRNA decay takes place in processing-body (PB) or stress granules (SGs) where translationally inactive mRNAs are targeted and a CCR4-CAF1-NOT deadenylase complex is recruited for degradation. We identified Regnase-1 (also known as Zc3h12a and Mcpip1) as an RNase critical for preventing a severe autoimmune inflammatory disease in mice by destabilizing inflammation-related mRNAs such as *Interleukin-6 (Il6)* and *Regnase-1* itself in innate immune cells. Regnase-1 is shown to control not only innate immune cells, but also acquired immune cells for maintaining the homeostasis by targeting genes such as *Icos*, *c-Rel* and *Ox40* for degradation. Recently, we have reported that Regnase-1 recognizes a set of SL-containing mRNAs that overlaps with those targeted by Roquin. In contrast to Roquin, Regnase-1 localizes to endoplasmic reticulum (ER) and ribosomes, but not to PBs and SGs. Regnase-1 destabilizes translationally active mRNAs and requires RNA helicase UPF1, similar to nonsense-mediated mRNA decay (NMD).

Although UPF1 is essential for Regnase-1-mediated mRNA decay (RMD), the molecular mechanisms of how UPF1 is involved in RMD are not yet understood. In this study, we demonstrate that SMG1-mediated phosphorylation of UPF1 at T28 regulates association of Regnase-1 with UPF1 and is required for RMD. We investigated Regnase-1-associated region of UPF1 by co-immunoprecipitation. An N-terminal deletion mutant of UPF1 did not associate with Regnase-1, suggesting that N-terminal region of UPF1 is required for association with Regnase-1. Because both the N- and C-terminal regions of UPF1 have evolutionarily conserved S/TQ residues at T28, S1073, S1078, S1096 and S1116, we investigated whether phosphorylation of UPF1 regulates association with Regnase-1 by co-immunoprecipitation. Treatment with λ protein phosphatase reduced association of UPF1 with Regnase-1 and T28A mutant of UPF1 did not associate with Regnase-1. Reconstitution of T28A mutant of UPF1 increased Regnase-1 target mRNA expression and inhibited RMD, suggesting that phosphorylation of UPF1 at T28 regulates association of Regnase-1 and is required for RMD. Because it has been reported that SMG1, which is a member of the family of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related protein kinases (PIKKs), plays a critical role in NMD through the direct phosphorylation of UPF1, we investigated whether SMG1 regulates RMD. Knockdown of SMG1 decreased phosphorylation of UPF1 at T28 and association of Regnase-1 with UPF1. Additionally, knockdown of SMG1 increased Regnase-1 target mRNA expression and inhibited RMD. Moreover, Reconstitution of kinase dead mutant of SMG1 increased Regnase-1 target mRNA expression and inhibited RMD, suggesting that SMG1 regulates association of Regnase-1 with UPF1 through the direct phosphorylation of UPF1 at T28 and is required for RMD. Thus, SMG1 is a new regulator for cytokine expression at posttranscriptional level through RMD.

2) Role of Akirin2 in Toll-like receptor-mediated cytokine gene expression in macrophages: S. TARTEY, A. WAKABAYASHI, K. HATANO, C. YEEKIEN and O. TAKEUCHI

Recognition of microbial components via Toll-like receptors (TLRs) leads to the activation of a set of transcription factors including NF- κ B and AP-1 for inducing pro-inflammatory cytokine genes. Transcriptional regulation of inflammatory gene expression has been at the forefront of studies of innate immunity and tightly regulated control of this gene expression is a paramount, and often foremost, goal of most biological endeavors. The growing evidences for involvement of chromatin in the regulation of gene expression in innate immune cells, has uncovered an evolutionarily conserved role of microbial sensing and chromatin remodeling. However, it remains unclear how microbial sensing initiates chromatin remodeling. Here we show that Akirin2, an evolutionarily conserved nuclear protein, bridges NF- κ B and the chromatin remodeling SWI/SNF complex by interacting with BRG1 Associated Factor 60 (BAF60) proteins as well as transcriptional key regulator I κ B- ζ , which forms a complex with the NF- κ Bp50 subunit. These interactions are essential for Toll-like receptor-, RIG-I- and Listeria-mediated expression of pro-inflammatory genes including *Il6* and *Il12b* in macrophages. Consistently, effective clearance of Listeria infection required Akirin2. Akirin2 (I κ B- ζ) recruitment to the *Il6* promoter upon LPS stimulation was found to depend on I κ B- ζ (Akirin2) and NF- κ Bp50 subunit, where it regulates chromatin remodeling and histone modification. BAF60 proteins were also essential for the induction of *Il6* in response to LPS stimulation. Collectively, the I κ B- ζ -Akirin2-BAF60 complex physically links the NF- κ B and SWI/SNF complexes in innate immune cell activation.

Having shown that chromatin remodeling in macrophages requires Akirin2 and its target gene expression is impaired in the absence of Akirin2, we further demonstrated that the similar phenomenon can be observed in the B cells of Akirin2 mice by specifically ablating Akirin2 in the B cells. We show that the B cells would also be defective in the recruitment of SWI/SNF complex upon its target gene promoters, thereby regulating B cell death and proliferation. Indeed, the ChIP analysis revealed that Brg1 is recruited to the putative-binding sites on the *Myc* and *Ccnd2* promoter (involved in various aspects of cell growth and proliferation) in response to CD40 stimulation in control B cells. In contrast, Akirin2 deficiency abrogated the recruitment of Brg1 to the *Myc* and *Ccnd2* promoter, indicating that Akirin2 is critical for the recruitment of the SWI/SNF complex to the *Myc* and *Ccnd2* promoter. Moreover, Akirin2 is also required for the appropriate induction of humoral immune responses by controlling SWI/SNF complex, further emphasizing the significant function of this enigmatic protein Akirin2 not only in the innate, but also in adaptive immune cells.

List of Publications

(英語原著論文)

Kitai, Y., Takeuchi, O., Kawasaki, T., Ori, D., Sueyoshi, T., Murase, M., Akira, S., Kawai, T. (2015). Negative

Regulation of Melanoma Differentiation-associated Gene 5 (MDA5)-dependent Antiviral Innate Immune Responses by Arf-like Protein 5B. **J. Biol. Chem.** 290, 1269-1280.

Patel, M.N., Bernard, W.G., Milev, N.B., Cawthorn, W.P., Figg, N., Hart, D., Prieur, X., Virtue, S., Hegyi, K., Bonnafoos, S., Bailly-Maitre, B., Chu, Y., Griffin, J.L., Mallat, Z., Considine, R.V., Tran, A., Gual, P., Takeuchi, O., Akira, S., Vidal-Puig, A., Bennett, M.R., Sethi, J.K. (2015). Hematopoietic IKBKE limits the chronicity of inflammasome priming and metaflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112, 506-511.

Asakawa, S., Kishimoto, Y., Takano, T., Okita, K., Takakuwa, S., Sato, T., Hiratsuka, M., Takeuchi, O., Hirasawa, N. (2015). Nickel ions selectively inhibit lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production by decreasing its mRNA stability. **PLoS One** 10, e0119428.

Maruyama, K., Fukasaka, M., Uematsu, S., Takeuchi, O., Kondo, T., Saitoh, T., Martino, M., Akira, S. (2015). 5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival. **J. Biol. Chem.** 290, 9377-9386.

Fukasaka, M., Asari, D., Kiyotoh, E., Okazaki, A., Gomi, Y., Tanimoto, T., Takeuchi, O., Akira, S., Hori, M. (2015). A Lipopolysaccharide from *Pantoea Agglomerans* Is a Promising Adjuvant for Sublingual Vaccines to Induce Systemic and Mucosal Immune Responses in Mice via TLR4 Pathway. **PLoS One** 10, e0126849.

Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandenbon, A., Wessels, H.-H., Ori, D., Uehata, T., Tartey, S., Akira, S., Suzuki, Y., Vinuesa, C.G., Ohler, U., Standley, D.M., Landthaler, M., Fujiwara, T., Takeuchi, O. (2015). Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. **Cell** 161, 1058–1073.

Tartey, S., Matsushita, K., Imamura, T., Wakabayashi, A., Ori, D., Mino, T., Takeuchi, O. (2015). Essential Function for the Nuclear Protein Akirin2 in B Cell Activation and Humoral Immune Responses. **J. Immunol.** 195, 519-527.

(英語総説)

Takeuchi, O. (2015). HuR keeps Interferon- β mRNA stable. **Eur. J. Immunol.** 45, 1296-1299.

Mino, T., Takeuchi, O. (2015). Regnase-1 and Roquin regulate inflammatory mRNAs. **Oncotarget** 6, 17869-17870.

Tartey, S., Takeuchi, O. (2015). Chromatin Remodeling and Transcriptional Control in Innate Immunity: Emergence of Akirin2 as a Novel Player. **Biomolecules** 5, 1618-1633.

(日本語総説)

三野享史, 竹内 理. (2015) . Regnase-1 と Roquin は時空間的に異なる分子機構により共通の mRNA の分解を制御する. **ライフサイエンス新着論文レビュー** .

三野享史, 竹内理. (2015) . マクロファージの分化機構と癌における役割. **The Frontiers in Life Sciences シリーズ がんと免疫** 111-119.

中塚賀也, 竹内理. (2015) . TLR. **生体の科学** 66 (5) , 458-459.

吉永正憲, 竹内理. (2015) . 炎症制御の分子機構. **臨床免疫・アレルギー科** 64 (4) , 416-420.

(海外招待講演)

Takeuchi O.: "Regulation of inflammatory responses by RNA binding proteins Regnase-1 and Roquin", RNA Stability 2015, Estes Park, Colorado, USA, 1–4 June, 2015.

(国内招待講演)

Takeuchi O.: "Regulatory mechanisms of cytokine gene expression in macrophage", JSPS Core-to-Core Program International Research Network for Virus Infections and Host Responses 1st International Symposium "Intranuclear Infection and Host Immunity", Kyoto, Japan, 27–28 January, 2015.

竹内 理: "自然免疫による炎症の惹起とその調節メカニズム", 第14回高知県ウイルス感染症研究会, 高知, 2015年2月6日.

竹内 理: "mRNA 分解による免疫制御", 第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015年3月18–20日.

竹内 理: "自然免疫による炎症の惹起とその調節機構", 第89回日本感染症学会総会・学術講演会, 京都, 2015年4月15–16日.

竹内 理: "mRNA 分解による炎症制御メカニズム", 第113回「細胞シグナリング」研究会, 横浜, 2015年5月15日.

竹内 理: "自然免疫の転写後制御メカニズム", 第30回千葉基礎・臨床免疫セミナー, 千葉, 2015年5月22日.

竹内 理: "病原体センサー分子による炎症応答の転写後調節機構", 第33回日本生化学会北陸支部大会, 富山, 2015年5月23日.

Takeuchi O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses by RNA binding proteins Regnase-1 and Roquin", IMS-JSI International Symposium on Immunology 2015 "Infection and Immunity", Yokohama, Japan, 18–19 June, 2015.

竹内 理: "RNA 分解酵素 Regnase-1 による炎症の転写後調節機構の解析", 第67回日本細胞生物学会大会, 東京, 2015年6月30日–7月1日.

竹内 理: "mRNA 分解による炎症制御メカニズム", 第25回日本病態生理学会大会, 愛媛, 2015年7月31日–8月1日.

竹内 理: "mRNA 分解による免疫の制御機構", 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科セミナー, 奈良, 2015年11月13日.

竹内 理: "Regnase-1 と Roquin による炎症関連 mRNA の時空間制御", BMB2015 [ワークショップ 4W27-p] mRNA 分解の機能破綻がもたらす多様な疾患病態, 神戸, 2015年12月1–4日.

(国内一般演題)

Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Landthaler, M., Fujiwara, T. and Takeuchi, O.: "Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms", The 17th

RNA meeting of the RNA Society of Japan, Sapporo, Japan, 15–17 July, 2015.

Tartey, S., Takeuchi, O.: "Essential Function for the Nuclear Protein Akirin2 in B Cell Activation and Humoral Immune Responses", The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 8–11 September, 2015.

Tartey, S., Takeuchi, O.: "Essential Function for the Nuclear Protein Akirin2 in B Cell Activation and Humoral Immune Responses", The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Sapporo, Japan, 18–20 November, 2015.

Wakabayashi, A., Takeuchi, O.: "Critical roles of TANK in the control of Pristane-induced pulmonary hemorrhage", The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Sapporo, Japan, 18–20 November, 2015

Ori, D., Murakawa Y., Kiryu H. and Takeuchi O.: "Zc3h12a and Zc3h12c redundantly function in early B cell differentiation", RNA Frontier Meeting 2015, Zao, Japan, 8–10 December, 2015.

Abe, M., and Takeuchi, O.: "RNA 結合蛋白質 Helz の免疫細胞における機能解析 ", The IVR Retreat, Shiga, Japan, 21–22 December, 2015.

Imamura, T., and Takeuchi, O.: "N4bp1-mediated nascent RNA decay controls cytokine mRNA expression", The IVR Retreat, Shiga, Japan, 21–22 December, 2015.

Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O.: "A novel role of Regnase-1 in the iron homeostasis and anemia", The IVR Retreat, Shiga, Japan, 21–22 December, 2015.

II. Second Group

Members

Associate Professor

Hiroshi Masutani

Graduate Student

Cristiane Lumi Hirata

Introduction

The research projects carried out in this group are studies on α -arrestin family proteins including thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) also referred as thioredoxin interacting protein (Txnip) or Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1). Txnip/ TBP-2 has attracted much attention as a multifunctional regulator in cancer suppression, energy metabolism, as well as immune response. Txnip also acts as a negative regulator of thioredoxin. The other subject is redox signaling and host defense mechanism against oxidative stress. Thioredoxin is a key component of redox regulation and plays a protective role in various diseases, associated with oxidative stress and inflammation.

Topics

Regulation of glucose metabolism and protein degradation by Txnip in cancer suppression: Cristiane Lumi HIRATA and Hiroshi MASUTANI

Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a multifunctional regulator of processes such as immunity, inflammation and glucose metabolism. Txnip expression is downregulated in many cancer tissues and its gene is mutated in bladder cancer. Previously, we showed that Txnip regulates TGF-beta signaling and Epithelial-Mesenchymal-Transition and acts as a cancer suppressor. However, the precise molecular mechanism of the cancer suppression is not elucidated. Here we present that Txnip protein expression was markedly induced by glucose, a proteasome inhibitor and suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA), a HDAC inhibitor in MCF7 breast and PC3 prostate cancer cells, and Txnip protein degradation was regulated through the AMPK pathway. Txnip binding proteins were investigated by tandem affinity purification and proteomics analyzes, where several candidate proteins were identified. Txnip has conserved PPXY motifs which are thought to interact with WW domains containing NEDD family ubiquitin ligases. These results indicate the role of Txnip in the regulation of glucose metabolism and protein degradation in cancer cells.

List of Publications

Nagano, S., Takahashi, Y., Yamamoto, K., Masutani, H., Fujiwara, N., Urushitani, M., Araki, T. (2015). A cysteine residue affects the conformational state and neuronal toxicity of mutant SOD1 in mice: relevance to the pathogenesis of ALS. **Hum Mol Genet.** 24, 3427-3439.

増谷 弘 : (2015) 酸化ストレスシグナルと酸化ストレス防御、別冊医学のあゆみ、レドックス UPDATE、10-14

Hirata, C.L., Tateiri, K., Mizutani, Y., Ito, S., Masutani, H.: Regulation of glucose metabolism and protein degradation by Txnip in cancer suppression. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 8-10 日

I. First Group

教授	竹内 理
助教	三野 享史
秘書	辻 桃子
博士研究員	若林 敦子
	織 大祐
	今村 智子
	Sarang Tartey
大学院生	中塚 賀也, 阿部 壮岐, Xiaotong Cui, 貞廣 暁利, 波多野 華恵, 赤木 宏太朗, 佐野 仁美, 山嵜 大智
研究生	吉永 正憲, Fabian Hia, Chong YeeKien, 山田 信之輔

当研究室には、平成 27 年 4 月に医学研究科博士課程 1 年の Xiaotong Cui と貞廣 暁利、生命科学研究所修士課程 1 年の赤木 宏太朗、佐野 仁美、山嵜 大智、研究生の Fabian Hia, Chong YeeKien, 山田 信之輔が新たに加わった。

竹内は、12 月に「第 12 回（平成 27 年度）日本学術振興会賞」及び「第 12 回日本学士院学術奨励賞」を受賞した。また、6 月に米国コロラド州エステス・パークでの RNA Stability 2015 において講演を行った。加えて、1 月に JSPS Core-to-Core Program International Research Network for Virus Infections and Host Responses（京都）、2 月にウイルス感染症研究会（高知）、4 月に日本感染症学会総会・学術講演会（京都）、5 月に「細胞シグナリング」研究会（横浜）、千葉基礎・臨床免疫セミナー（千葉）および日本生化学会北陸支部大会（富山）、6 月に IMS-JSI International Symposium on Immunology 2015（横浜）および日本細胞生物学会大会（東京）、7 月に日本病態生理学会大会（愛媛）、11 月に奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科セミナー（奈良）および日本分子生物学会ワークショップ（神戸）にて発表を行った。三野は、7 月に第 17 回日本 RNA 学会年会（札幌）にて発表した。その他、教室員の多くが、日本免疫学会学術集会（札幌）等の学会で発表した。

我々の研究室では、自然免疫の観点から炎症の惹起・調節に関わる分子メカニズムの研究を行っている。特に、遺伝子改変マウスの作製および解析と分子生物学的な手法によって研究を進め、炎症を制御しているシグナル伝達や転写後調節機構の解明を試みている。今年度の成果および研究活

動は以下の通りである。

1) 炎症の転写後調節における Regnase-1 の作用機構

免疫刺激に対する遺伝子発現は、転写および転写後調節により厳密に制御されている。中でも RNA の安定性や翻訳を制御する転写後調節は遺伝子発現を制御する重要なプロセスの一つであり、Roquin および Regnase-1 などの RNA 結合タンパク質による転写後調節は炎症などの免疫応答の開始や終結の制御にも重要である。Roquin (Rc3h1, Rc3h2, RING finger and CCH zinc finger protein) は *Icos* や *Tnf* mRNA 分解を誘導することで自己免疫疾患となることを防いでいることが知られており、標的 mRNA の 3' UTRs に存在する stem-loop 構造を認識し、processing bodies (PBs) や stress granules (SGs) に局在してタンパク質翻訳が生じていない (translationally inactive) 標的 mRNA の脱アデニル化を誘導してその分解を促進する。また、これまで我々の研究室では、新規 RNase である Regnase-1 (Zc3h12a, Mcpip1) が *Interleukin-6* (*Il6*) や *IL12p40* などのサイトカイン mRNA の分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている事を見出した。また、Regnase-1 はマクロファージなどの自然免疫細胞だけでなく、獲得免疫 T 細胞において *c-Rel* や *Icos*, *Ox40*, *Il2* などの mRNA を分解することによって過剰な T 細胞活性化を抑制していることを報告した。そして最近、Regnase-1 は Roquin と共通の stem-loop 構造を認識して、RNA helicase UPF1 依存的にタンパク質翻訳が生じている (translationally active) mRNA を分解していることを明らかにした。しかしながら、どのように UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解に関与しているのかほとんど分かっていない。本年は、SMG1 による UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御し、Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を明らかにした。Regnase-1 と相互作用している UPF1 の領域を免疫沈降法により検討した。その結果、UPF1 の N 末端欠損体は Regnase-1 と相互作用を生じなく、UPF1 の N 末端領域が Regnase-1 との相互作用に必要である事が分かった。UPF1 は N 末端と C 末端に進化的に保存された S/TQ 残基 (T28, S1073, S1078, S1096, S1116) を有するため、次に UPF1 のリン酸化が Regnase-1 との相互作用に必要なかどうかを免疫沈降法により検討した。その結果、protein phosphatase 処理により UPF1 と Regnase-1 との相互作用が減少し、また UPF1 の T28A 変異体は Regnase-1 と相互作用しなかった。更に、UPF1 の T28A 変異体の再構成により Regnase-1 の標的 mRNA の発現量が増加し、Regnase-1 による mRNA 分解が阻害された。これは、UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 との相互作用を制御することで Regnase-1 による mRNA 分解に必要であることを示唆している。これまでの研究により、PI3 キナーゼのファミリーの 1 つである SMG1 が UPF1 をリン酸化することでナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) において重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、SMG1 が Regnase-1 による mRNA 分解にも関わっているかどうかを検討した。SMG1 のノックダウンにより UPF1 の T28 リン酸化および UPF1 と Regnase-1 の相互作用が減少した。そして、SMG1 のノックダウンにより Regnase-1 の

標的 mRNA の発現量が増加し、Regnase-1 による mRNA 分解が阻害された。更に、キナーゼ活性を欠損した SMG1 の変異体の再構成により Regnase-1 の標的 mRNA の発現量が増加し、Regnase-1 による mRNA 分解が阻害された。これは、SMG1 は UPF1 の T28 リン酸化を介して Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御することで Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を示唆している。以上の結果より、SMG1 は Regnase-1 による mRNA 分解を介してサイトカインの転写後調節の新しい制御因子である事が明らかとなった。

2) マクロファージでの Akirin2 によるサイトカイン遺伝子発現調節における役割

マクロファージは Toll-like receptor (TLR) を始めとした受容体により病原体構成成分を認識し、細胞内シグナル伝達系を活性化させ NF- κ B や AP-1 などの転写因子を活性化させることにより炎症性サイトカイン遺伝子の転写を促す。また、この遺伝子発現は、転写因子とクロマチン調節により協調的にコントロールされている。しかしながら、自然免疫がどのようにクロマチンリモデリングを誘導しているかのメカニズムはこれまで十分わかっていなかった。今回、私たちはショウジョウバエからヒトまで進化的に保存された核タンパク質である Akirin2 が、NF- κ B とクロマチンリモデリング複合体をつなぐ働きをすることを明らかにした。これは、SWI/SNF 複合体の構成タンパク質である BAF60 タンパク質と I κ B- ζ タンパク質が直接結合することにより担われている。この結合は、TLR や RIG-I 刺激、またリステリア感染に対する Il6 や Il12b といったサイトカイン遺伝子発現に必須であった。Akirin2 は NF- κ Bp50 サブユニットや I κ B- ζ 依存性に Il6 プロモーターにリクルートされ Il6 プロモーターにおいてクロマチンリモデリングやヒストンメチル化を調節した。したがって、I κ B- ζ -Akirin2-BAF60 が複合体を形成することにより、NF- κ B と SWI/SNF 複合体を物理的にリンクさせ自然免疫細胞を活性化させていることが明らかとなった。

Akirin2 はクロマチンリモデリングに関わることから、この分子が自然免疫細胞のみではなく獲得免疫細胞の機能調節にも関与している可能性を考え B 細胞における Akirin2 の機能解析を行った。Akirin2 欠損 B 細胞は TLR や CD40 刺激に対する増殖応答が障害されており、細胞死が亢進していた。CD40 刺激に対する細胞周期活性化に必要な Myc や Ccnd2 遺伝子プロモーターには SWI/SNF 複合体の Brg1 がリクルートされるが、これには Akirin2 の存在を必要とした。さらに、Akirin2 は抗原特異的抗体応答にも重要であることから、Akirin2 は自然免疫細胞に加え、獲得免疫細胞における遺伝子発現を調節する重要な因子であることが明らかとなった。



II. Second Group

准教授	増谷 弘
大学院生	Cristiane Lumi Hirata

2015 年現在、当グループでは増谷 弘准教授の他、ブラジルより文部科学省国費外国人留学生 Cristiane Lumi Hirata さんが医学研究科博士課程大学院生として研究を行っている。また、西條美佐博士と藍野大学臨床工学科教授水谷陽一博士および舘入 圭さんが共同研究者として研究に参加した。増谷准教授は学術振興会レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会の委員として活動を行っている。ウイルス研究所共同研究者として前田道之博士は、博士が樹立した多数の HTLV-I 感染細胞株の整理・保存・データベース化に携わり、研究材料の提供を行った。

1) thioredoxin ファミリーによるレドックス・酸化ストレス防御の研究と thioredoxin interacting protein (Txnip) / thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) による癌抑制とエネルギー代謝制御の分子機構の解明

レドックス（酸化還元）調節に中心的な役割を果たし、酸化ストレス防御や炎症抑制に作用する thioredoxin ファミリーの分子を中心として、共同研究を実施した。今年度は国立精神・神経医療研

究センターとの共同研究によって変異型 SOD による筋萎縮性側索硬化症モデルにおける脳内でのシステイン結合の開裂への thioredoxin の関与についての解析を報告した。

アルファアレスチンファミリーに属する Txnip/TBP-2 は、ウイルス感染症、免疫・炎症制御、癌抑制に関わる多機能の調節因子である。Txnip が膀胱癌においてかなりの頻度で変異が見られることが多施設の解析により報告され、癌研究における Txnip の分子機構解析の重要性が示唆されている。医学研究科との共同研究によるプロテオミクス解析により、Txnip と相互作用する候補分子を同定した。これらの分子について、癌細胞における Txnip のサイレンシングをバイパスした新たな癌抑制法の開発を目指して、Txnip の分子動作機構の解析を進めている。一方、Txnip はエネルギー代謝制御に重要な働きを持つ分子であることを示してきた。Txnip は転写レベルと蛋白質安定化の両方の機構で glucose により誘導されることを明らかにした。薬学研究科との共同研究により Txnip の発現に影響を与える新規化合物を同定し、これらの化合物がエネルギー代謝に与えることを示した。さらに、ケミカルバイオロジーによるアプローチにより、Txnip 蛋白質発現調節の分子機構・シグナル伝達機構を解析することにより、エネルギー代謝制御、ウイルス感染症制御への応用を目指して研究を行っている。

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Members

Professor	Fumiko Toyoshima
Assistant Professor	Shigeru Matsumura Yukako Oda
Lab Manager	Yoko Ohta
Graduate Student	Riki Ishibashi, Megumi Ikeda, Ryo Ichijo, Mitsuko Fukuhara Hiroki Kobayashi, Yuki Komatsuzaki, Satoshi Kozuki Chika Higashiura, Yui Iizuka

Introduction

Oriented cell division plays an essential role in asymmetric cell division of stem cells and tissue morphogenesis. Our group seeks to explore the molecular mechanisms underlying the determination of cell division axis that governs the cell fate determination and tissue homeostasis. Our research is focused on the following subjects:

- 1, Molecular networks and transcriptional control of regulators for the oriented cell division.
- 2, Asymmetric/symmetric cell division of adult tissue stem cells under physiological condition.
- 3, Mechanisms of stem cell activation and quiescence

Topics

1) Transcriptional regulation of Inscuteable gene during mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via c-Rel: R. ISHIBASHI, S. KOZUKI, S. KAMAKURA, H. SUMIMOTO, and F. TOYOSHIMA

Inscuteable (Insc) regulates cell fate decisions in several types of stem cells. Although it is recognized that the expression levels of mInsc govern the balance between symmetric and asymmetric stem cell division, regulation of mInsc gene expression remains poorly understood. We have found that *mInsc* expression transiently increases in mouse embryonic stem (mES) cells during differentiation into bipotent mesendoderm that capable of producing both endoderm and mesoderm. We identified the minimum transcriptional regulatory element that drives mInsc transcription in mES cells within a region more than 5 kb upstream of the *mInsc* transcription start site. We identified the transcription factor c-Rel that bound to the minimum element and promoted mInsc expression. In addition, short interfering RNA-mediated knockdown of either

mInsc or c-Rel protein decreased mesodermal cell populations without affecting differentiation into the mesendoderm or endoderm. Furthermore, overexpression of mInsc rescued the mesoderm-reduced phenotype induced by knockdown of c-Rel. These results indicate that regulation of mInsc expression by c-Rel modulates cell fate decisions during mES cell differentiation.

2) CKD family PCTK1 regulates spindle orientation: S. IWANO, A. SATOU, S. MATSUMURA, N. SUGIYAMA, Y. ISHIHAMA and F. TOYOSHIMA

Integrin-dependent cell–extra cellular matrix (ECM) adhesion is a determinant of spindle orientation. However, the signaling pathways that couple integrins to spindle orientation remain elusive. Here, we show that PCTAIRE-1 kinase (PCTK1), a member of the cyclin-dependent kinases (CDK) whose function is poorly characterized, plays an essential role in this process. PCTK1 regulates spindle orientation in a kinase-dependent manner. Phosphoproteomic analysis together with an RNA interference screen revealed that PCTK1 regulates spindle orientation through phosphorylation of Ser83 on KAP0, a regulatory subunit of PKA. This phosphorylation is dispensable for KAP0 dimerization and for PKA binding, but is necessary for its interaction with myosin X, a regulator of spindle orientation. KAP0 binds to the FERM domain of myosin X and enhances the association of myosin X-FERM with β 1 integrin. This interaction between myosin X-FERM and β 1 integrin appeared to be crucial for spindle orientation control. We propose that PCTK1–KAP0–myosin X– β 1 integrin is a functional module providing a link between ECM and the actin cytoskeleton in the ECM-dependent control of spindle orientation.

List of Publications

Ishibashi, R., Kozuki, S. Kamakura, S., Sumimoto, H., and Toyoshima, F. (2015). Identification of DNA regulatory elements governing expression of *Inscuteable* during mouse embryonic stem cell differentiation. **J. Biol. Chem.** Epub ahead of print

Hanafusa, H, Kedashiro, S., Tezuka M., Funatsu, M., Usami, S., Toyoshima, F., and Matsumoto, K. (2015). PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. **Nat. Cell Biol.** 8, 1024-1035.

Iwano, S., Satou, A., Matsumura, S., Sugiyama, N., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. (2015). PCTK1 regulates integrin-dependent spindle orientation via PKA regulatory subunit KAP0 and myosin X. **Mol. Cell. Biol.** 35, 1197-1208.

Ishibashi, R., Kozuki, S., Toyoshima, F.: “Identification of DNA regulatory elements governing expression of *inscuteable* during mouse embryonic stem cell differentiation”, Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 7-8 October, 2015.

Ishibashi, R., Kozuki, S., Toyoshima, F.: “Mouse *Inscuteable* regulates mesodermal cell fate decision during mouse ES cells differentiation”, The 13th International Student Seminar, Kyoto, 3-7 March, 2015.

松村 繁 : Caveolin1 による細胞分裂軸制御機構、第 7 回定量生物学の会、福岡、2015 年 1 月 11 – 12 日

石橋理基、上月智司、豊島文子 : Mouse *Inscuteable* regulates cell fate decision during mouse ES cells differentiation, 第 48 回日本発生生物学会大会、茨城、2015 年 6 月 2-5 日

石橋理基、上月智司、豊島文子 : Mouse *Inscuteable* regulates cell fate decision during mouse ES cells differentiation. 第 67 回日本細胞生物学会大会、東京、2015 年 6 月 30 日 -7 月 2 日

福原充子、馬悦、長澤和夫、豊島文子 : H19 長鎖非 翻訳 RNA の新規 発現制御機構の同定 , 第 17 回 RNA 学会、札幌、2015 年 7 月 15 日 -18 日

Ikeda, M, and Toyoshima, F.: “Dormant cells emerging from Embryonic Stem Cells sustain pluripotency in differentiation condition”, East Asia Joind Symposium, Okinawa, 10-15 November, 2015.

松村繁、豊島文子 : Keratin8 は Caveolin1 を介して細胞分裂軸を制御する , 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

石橋理基、上月智司、豊島文子 : マウス ES 細胞分化時における *Inscuteable* 遺伝子発現調節領域の同定 , 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

小林大毅、一條遼、米田早織、松村繁、豊島文子 : 妊娠期の皮膚では真皮線維芽細胞が活性化し表皮細胞の増殖を促進する , 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

一條遼、小林大毅、米田早織、本田哲也、松村繁、豊島文子 : 妊娠期の皮膚伸展を実現させる表皮基底細胞の分裂・分化制御機構、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

池田愛、豊島文子 : 神経分化誘導下における ES 細胞の休眠状態への移行 , 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

福原充子、馬悦、長澤和夫、豊島文子:H19 はその 5' 末端に グアニン四重鎖 (G4) を形成し、転写を制御する, 第 38 回日本分子生物学会年回、神戸、2015 年 12 月 1-4 日

教授	豊島文子
助教	松村繁 小田裕香子
大学院生	石橋理基、池田愛、一條遼、福原充子、小林大毅、小松崎友紀、 上月智司、東浦千夏、飯塚ゆい

当研究室には、4月から生命科学研究科大学院生として飯塚ゆいが新たに加わった。岩野さやかが博士学位（生命科学）を取得し、国立精神・神経医療センターの博士研究員に着任した。森加奈恵、米田早織が生命科学研究科修士課程を終了し、4月から就職した。

当分野では、「幹細胞の分裂と分化」をキーワードに、「細胞分裂軸の方向を決めるメカニズム」「組織幹細胞の対称/非対称分裂」「幹細胞の活性化とクワイエセンス」について研究を進めている。本年に論文発表した研究成果のうち、2課題を下記に記載する。

1) 非対称分裂制御因子 *Inscuteable* の遺伝子発現制御機構の解明

対称・非対称分裂は、生体内に存在する幹細胞の維持と分化に重要な役割を果たす。対称分裂は二つの同じ形質を持った娘細胞を生み出し、非対称分裂は二つの異なる性質を持った娘細胞を生み出す。そのため、対称・非対称分裂のバランスによって幹細胞と分化細胞の数が制御され、生体内の秩序が保たれる。*Inscuteable* (*Insc*) は非対称分裂制御因子であり、その遺伝子の発現量を変化させることで、種々の幹細胞の対称・非対称分裂の振り分けを調整できることが報告されている。しかし、*mInsc* 遺伝子の発現制御機構についてはこれまで不明であった。我々は、マウス胚性幹細胞 (mES 細胞) を二分化能をもつ中内胚葉を経て中胚葉と内胚葉へ分化させる際に、*mInsc* 遺伝子が一過的に上昇することを見出した。この分化培養系を用いて *mInsc* 遺伝子の転写調節機構を解析した結果、転写開始点上流 5kb 地点に最小転写調節領域が存在することを見出した。また、この領域に NF- κ B ファミリーに属する転写因子 c-Rel が結合し、*mInsc* の発現を促進することが分かった。c-Rel や *mInsc* の発現を阻害すると mES 細胞の中胚葉分化が抑制され、また、c-Rel の発現を抑制した細胞に *mInsc* を過剰発現させると中胚葉分化が回復することから、c-Rel は *mInsc* の発現を促進することで、中胚葉分化を誘導することが明らかとなった。c-Rel による *mInsc* 遺伝子の発現制御機構が、生体内の幹細胞運命決定においてどのような働きを持つのかを解明することが、今後の課題である。本研究は、J. Biol. Chem. に発表した (石橋)。

2) CDK ファミリー PCKT1 による細胞分裂軸制御機構の解明

PCKT1 は CDK16 と呼ばれる CDK ファミリーに属するセリン/スレオニン キナーゼであり、高度に保存されたキナーゼドメインと、他の CDK と比べて長い N- 末端と C- 末端領域を有している。PCKT1 は小胞輸送や神経突起伸長、筋芽細胞の移動といった細胞周期非依存的な現象に関与することが報告されているが、細胞分裂軸に関する機能は報告されておらず、活性化機序、生理機能共に不明な点の多い分子である。我々はまず、HeLa 細胞において PCKT1 を siRNA でノックダウンすると、細胞外基質に対する分裂軸が異常になることを見出した。この分裂軸の異常は、siRNA 耐性の野生型 PCKT1 ではレスキューされるが、キナーゼ不能型 PCKT1 ではレスキューされなかったことから、PCKT1 はキナーゼ活性依存的に分裂軸を制御していることが分かった。次に、リン酸化プロテオーム解析と siRNA スクリーニングによって PCKT1 の基質を探索した結果、PCKT1 は PKA の調節サブユニットである KAP0 の Ser83 をリン酸化することで分裂軸を制御していることが分かった。また、Ser83 のリン酸化は、分裂期に上昇することを示した。さらに、Ser83 のリン酸化は KAP0 の二量体形成能や PKA 触媒サブユニットとの結合能に影響しなかったが、分裂軸制御因子の 1 つとして知られる myosin X との結合に必要であることを明らかにした。KAP0 は myosin X の FERM ドメインと結合し、myosin X-FERM と $\beta 1$ integrin との結合を促進した。さらに、この myosin X-FERM と $\beta 1$ integrin の結合が分裂軸の制御に必須であることを示した。以上より PCKT1-KAP0-myosin X- $\beta 1$ integrin が機能的モジュールとして細胞外基質とアクチン細胞骨格を結びつけ、細胞外基質依存的に分裂軸を制御していることが分かった。本研究は、Mol. Cell. Biol. に発表した（岩野）。

Laboratory of Growth Regulation

Members

Professor	Ryoichiro Kageyama
Associate Professor	Toshiyuki Ohtsuka
Assistant Professor	Taeko Kobayashi
Hakubi Associate Professor	Itaru Imayoshi
Hakubi Assistant Professor	Tomoko Tateya
iCeMS Assistant Professor	Hiromi Shimojo
PRESTO Researcher	Akihiro Isomura
Research Fellow	Yukiko Harima, Takahiko Matsuda, Miwako Masugi
Graduate Student	Kumiko Kobayashi, Shama Ratiram Bansod, Susumu Sakamoto, Yuki Maeda, Anna Araki, Akari Takagi, Takashi Kaise, Shohei Ochi, Kohei Jino, Marina Matsumiya

Introduction

The research interest of this laboratory is to understand the molecular mechanism of cell differentiation and organogenesis. Particularly, we are interested in basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that regulate various developmental processes including neural development and somite formation. We previously showed that bHLH proneural genes such as *Ascl1* (also called *Mash1*) and *Math3* promote neuronal versus glial fate determination, whereas the bHLH repressor genes *Hes1* and *Hes5* regulate maintenance of neural stem cells by repressing proneural gene expression. These results indicate that the balance between bHLH proneural and bHLH repressor genes is important for a choice favoring neuronal differentiation or neural stem cell proliferation.

We also found that in neural stem cells, *Hes1* expression oscillates by negative feedback with a period of about 2-3 hours. *Hes1* oscillations drive cyclic expression of the proneural genes *Ascl1* and *Neurog2* and the Notch ligand gene *Delta-like1* (*Dll1*). In contrast, the expression of *Ascl1*, *Neurog2* and *Dll1* is sustained (non-oscillatory) in postmitotic differentiating neurons. Similarly, *Hes1* expression oscillates in neural stem cells, but it becomes up-regulated and sustained during astrocyte formation. The bHLH factor *Olig2* expression also oscillates in neural stem cells but becomes up-regulated and sustained during oligodendrocyte formation. We further showed that *Ascl1* and *Dll1* oscillations are very important for the maintenance of neural stem cells. These results suggest that the multipotency is a state of oscillatory expression of multiple fate determination

factors, while the fate determination is a process of dominant expression of a selected single bHLH factor, which represses the other fate determination factors. Thus, the expression dynamics are very important for a choice between neural stem cell proliferation and specific cell fate determination.

Topics

1) bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells: T. KOBAYASHI, Y. IWAMOTO, K. TAKASHIMA, A. ISOMURA, Y. KOSODO, K. KAWAKAMI, T. NISHIOKA, K. KAIBUCHI and R. KAGEYAMA

Hairy and enhancer of split 1 (Hes1), a basic helix-loop-helix transcriptional repressor protein, regulates the maintenance of neural stem/progenitor cells by repressing proneural gene expression via Notch signaling. Previous studies showed that Hes1 expression oscillates in both mouse embryonic stem cells and neural stem cells, and that the oscillation contributes to their potency and differentiation fates. This oscillatory expression depends on the stability of Hes1, which is rapidly degraded by the ubiquitin/proteasome pathway. However, the detailed molecular mechanisms governing Hes1 stability remain unknown. We analyzed Hes1-interacting deubiquitinases purified from mouse embryonic stem cells using an Hes1-specific antibody, and identified the ubiquitin-specific protease 27x (Usp27x) as a new regulator of Hes1. We found that Hes1 was deubiquitinated and stabilized by Usp27x and its homologs ubiquitin-specific protease 22 (Usp22) and ubiquitin-specific protease 51 (Usp51). Knockdown of Usp22 shortened the half-life of Hes1, delayed its oscillation, and enhanced neuronal differentiation in mouse developing brain, whereas mis-expression of Usp27x reduced neuronal differentiation. These results suggest that these deubiquitinases modulate Hes1 protein dynamics by removing ubiquitin molecules, and thereby regulate neuronal differentiation of stem cells.

2) Hbp1 regulates the timing of neuronal differentiation during cortical development by controlling cell cycle progression: N. WATANABE, R. KAGEYAMA and T. OHTSUKA

In the developing mammalian brain, neural stem cells (NSCs) initially expand the progenitor pool by symmetric divisions. NSCs then shift from symmetric to asymmetric division and commence neurogenesis. Although the precise mechanisms regulating the developmental timing of this transition have not been fully elucidated, gradual elongation in the length of the cell cycle and coinciding accumulation of determinants that promote neuronal differentiation might function as a biological clock that regulates the onset of asymmetric division and neurogenesis. We conducted gene expression profiling of embryonic NSCs in the cortical regions and found that the expression of high mobility group box transcription factor 1 (Hbp1) was upregulated during neurogenic stages. Induced conditional knockout mice of Hbp1, generated by crossing with Nestin-CreER(T2) mice, exhibited a remarkable dilatation of the telencephalic vesicles with a

tangentially expanded ventricular zone and a thinner cortical plate containing reduced numbers of neurons. In these Hbp1-deficient mouse embryos, neural stem/progenitor cells continued to divide with a shorter cell cycle length. Moreover, downstream target genes of the Wnt signaling, such as cyclin D1 (Cnd1) and c-jun (Jun), were upregulated in the germinal zone of the cortical regions. These results indicate that Hbp1 plays a crucial role in regulating the timing of cortical neurogenesis by elongating the cell cycle and that it is essential for normal cortical development.

3) In vivo overactivation of the Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium: T. TATEYA, S. SAKAMOTO, I. IMAYOSHI and R. KAGEYAMA

Notch signaling is thought to play important roles in both prosensory domain specification and cell fate determination during inner ear development. Inhibition of the Notch signaling pathway in prosensory cells results in excessive hair cell formation, while activation of the Notch signaling pathway by overexpression of activated Notch1 (Notch1-intercellular domain, NICD) in the cochlear epithelium results in ectopic sensory patches where NICD is expressed. However, the effect of Notch activation on the prosensory domain is not fully understood. To elucidate the precise roles of Notch signaling in cochlear prosensory epithelium we examined the effects of Notch overactivation on cochlear prosensory cells of transgenic mice with conditional NICD expression. The histology of the cochlear epithelium was investigated in these mice. The cochlear duct of conditional NICD embryos was wide and short, and the epithelium formed an abnormal tubular structure. Hair cell numbers were reduced though some hair cells developed where NICD was overexpressed. The decrease in hair cells was not accompanied by Hes5-positive and Prox1-positive supporting cell overproduction. Ectopic expression of early prosensory markers, such as Jag1 and Hes/Hey genes, was observed but no expression of Hes5 was found. Our data shows that NICD overexpression disrupts the extension of cochlear epithelium, and reduces the total numbers of hair cells and supporting cells in the sensory epithelium. Thus, an appropriate level of Notch signaling is needed for the normal extension of the cochlear epithelium and for differentiation of both hair cells and supporting cells.

4) Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in the multipotency and fate choice of neural stem cells: I. IMAYOSHI, F. ISHIDATE and R. KAGEYAMA

The basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors Ascl1/Mash1, Hes1, and Olig2 regulate the fate choice of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, respectively; however, these factors are coexpressed in self-renewing multipotent neural stem cells (NSCs) even before cell fate determination. This fact raises the possibility that these fate determination factors are differentially expressed between self-renewing and differentiating NSCs with unique expression dynamics. Real-time imaging analysis utilizing fluorescent proteins is a powerful strategy for monitoring expression dynamics. Fusion with fluorescent reporters makes it possible to analyze the dynamic behavior of specific proteins in living cells. However, it is technically

challenging to conduct long-term imaging of proteins, particularly those with low expression levels, because a high-sensitivity and low-noise imaging system is required, and very often bleaching of fluorescent proteins and cell toxicity by prolonged laser exposure are problematic. Furthermore, to analyze the functional roles of the dynamic expression of cellular proteins, it is essential to image reporter fusion proteins that are expressed at comparable levels to their endogenous expression. In this review, we introduce our recent reports about the dynamic control of bHLH transcription factors in multipotency and fate choice of NSCs, focusing on real-time imaging of fluorescent reporters fused with bHLH transcription factors. Our imaging results indicate that bHLH transcription factors are expressed in an oscillatory manner by NSCs, and that one of them becomes dominant during fate choice. We propose that the multipotent state of NSCs correlates with the oscillatory expression of several bHLH transcription factors, whereas the differentiated state correlates with the sustained expression of a single bHLH transcription factor.

List of Publications

Kageyama, R., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2015). Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. **Cell Tissue Res.** 359, 125-133.

Kato, T., Sakata-Yanagimoto, M., Nishikii, H., Miyake, Y., Yokoyama, Y., Asabe, Y., Kamada, Y., Ueno, M., Obara, N., Suzukawa, K., Hasegawa, Y., Kitabayashi, I., Uchida, K., Hirao, A., Yagita, H., Kageyama, R., and Chiba, S. (2015). Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. **Leukemia**, 29, 576-585.

Hosokawa, S., Furuyama, K., Horiguchi, M., Aoyama, Y., Tsuboi, K., Sakikubo, M., Goto, T., Hirata, K., Tanabe, W., Nakano, Y., Akiyama, H., Kageyama, R., Uemoto, S., and Kawaguchi, Y. (2015). Impact of Sox9 dosage and Hes1-mediated Notch signaling in controlling the plasticity of adult pancreatic duct cells in mice. **Sci. Rep.** 5, 8518.

Sugita, S., Hosaka, Y., Okada, K., Mori, D., Yano, F., Kobayashi, H., Taniguchi, Y., Mori, Y., Okuma, T., Chang, S.H., Kawata, M., Taketomi, S., Chikuda, H., Akiyama, H., Kageyama, R., Chung, U., Tanaka, S., Kawaguchi, H., Ohba, S., and Saito, T. (2015). Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 112, 3080-3085.

Schnell, S.A., Ambesi-Impiombato, A., Sanchez-Martin, M., Belver, L., Xu, L., Qin, Y., Kageyama, R., and Ferrando, A.A. (2015). Therapeutic targeting of HES1 transcriptional programs in T-ALL. **Blood** 125, 2806-2814.

Kobayashi, T., Iwamoto, Y., Takashima, K., Isomura, A., Kosodo, Y., Kawakami, K., Nishioka, T., Kaibuchi, K., and Kageyama, R. (2015). Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation. **FEBS J.** 282, 2475-2487.

Nakano, Y., Negishi, N., Gocho, S., Mine, T., Sakurai, Y., Yazawa, M., Abe, K., Yagita, H., Habu, S., Kageyama, R., Kawaguchi, Y., and Hozumi, K. (2015). Disappearance of centroacinar cells in the Notch ligand-deficient pancreas. **Genes Cells** 20, 500-511.

Watanabe, N., Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (2015). Hbp1 regulates the timing of neuronal differentiation during cortical development by controlling cell cycle progression. **Development** 142, 2278-2290.

Imayoshi, I., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2015). Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in the multipotency and fate choice of neural stem cells. **Front. Cell. Neurosci.** 9, 288.

Tateya, T., Sakamoto, S., Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2015). In vivo overactivation of Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. **Hearing Res.** 327, 209-217.

Imai, Y., Kobayashi, Y., Inoshita, T., Meng, H., Arano, T., Uemura, K., Asano, T., Yoshimi, K., Zhang, C.-L., Matsumoto, G., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Kiyonari, H., Shioi, G., Nukina, N., Hattori, N., and Takahashi, R. (2015). The Parkinson's disease-associated protein kinase LRRK2 modulates Notch signaling through the endosomal pathway. **PLoS Genet.** 11, e1005503.

Goto, M., Hojo, M., Ando, M., Kita, A., Kitagawa, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Miyamoto, S. (2015). *Hes1* and *Hes5* are required for differentiation of pituicytes and formation of the neurohypophysis in pituitary development. **Brain Res.** 1625, 206-217.

影山龍一郎：神経幹細胞における遺伝子発現の動的制御．再生医療シリーズ「脳神経系の再生医学」45-49. 2015.

影山龍一郎、今吉格、磯村彰宏：神経幹細胞分化制御機構．分子脳科学 242-248. 2015.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in somitogenesis and neurogenesis. Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, USA, 4 March, 2015.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in multipotent neural stem cells. CDB Symposium 2015:

Time in Development, Kobe, 23-25 March, 2015.

Kageyama, R.: Plenary Lecture: Molecular control of neural stem cells. IBRO 9th World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 7-11 July, 2015.

Imayoshi, I.: Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in neural stem cells. IBRO 9th World Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 7-11 July, 2015.

Isomura, A. : Interrogating oscillatory gene expression by optogenetics. International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th Symposium of Biochemical Systems Theory (BST2015), Fukuoka, 17-18 September, 2015.

Kageyama, R.: Dynamic control of neural determination factors in multipotency and fate choice. Workshop “Development and Adult Neurogenesis in the Central Nervous System”, Baeza, Spain, 5-7 October, 2015.

Kageyama, R.: Oscillatory control of neural stem cells. JST CREST-PRESTO Joint International Symposium, 東京 , 5-6 November, 2015.

Kageyama, R.: Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem cells. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 12-14 November, 2015.

Isomura, A., Ogushi, F., Kori, H., and Kageyama, R.: Controlling natural genetic oscillators by light. 3rd Annual Winter q-bio Meeting, Hawaii, USA, 17-20 February, 2015.

Isomura, A.: Single-cell robustness of mammalian genetic oscillators revealed by optogenetic perturbation. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 23-25 March, 2015.

Kobayashi, T.: Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 23-25 March, 2015.

Shimojo, H.: Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. CDB Symposium 2015: Time in Development, Kobe, 23-25 March, 2015.

Kobayashi, K.: Single-cell analysis of mouse segmentation clock. East Asia Joint Symposium 2015, Okinawa, 11-14 November, 2015.

Shimojo, H., Isomura, A., Kori, H., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R.: Dynamic expression of

Notch ligand Dll1 during development. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 12-14 November, 2015.

Isomura, A., Ogushi, F., Kori, H., and Kageyama, R.: Dynamic responses of genetic oscillators revealed by optogenetic perturbation. EMBO/EMBL Symposium “Biological Oscillators”, Heidelberg, Germany, 12-14 November, 2015.

影山龍一郎: 多分化能と運命決定における bHLH 因子のダイナミックな制御, 第 92 回茨城県脳神経外科集談会, つくば, 2015 年 3 月 14 日.

影山龍一郎: 遺伝子発現振動の分子機構と意義, 生命動態の分子メカニズムと数理, 京都, 2015 年 3 月 16 日～17 日.

Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, T., and Kageyama, R.: Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会, 神戸, 2015 年 3 月 21 日～23 日.

今吉格: bHLH 型転写因子の発現振動による神経幹細胞の自己複製能と多分化能の制御およびその光操作, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会, 神戸, 2015 年 3 月 21 日～23 日.

Kageyama, R.: Dynamic control of bHLH factors in multipotency and fate choice of neural stem cells. 4th International Symposium on Molecular Clock, 京都, 2015 年 3 月 27 日.

Imayoshi, I.: 第 19 回分子神経科学研究センター国際シンポジウム, 大津, 2015 年 10 月 8 日.

影山龍一郎: 神経幹細胞の光遺伝学的操作、KRI ワークショップ, 京都, 2015 年 10 月 29 日～30 日.

影山龍一郎: 神経幹細胞の理解る操作を目指して、第 50 回慶應ニューロサイエンス研究会, 東京, 2015 年 10 月 31 日.

Imayoshi, I., and Kageyama, R.: Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expression. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1 日～4 日.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R.: Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. BMB2015, 神戸, 2015 年 12 月 1 日～4 日.

磯村彰宏：遺伝子発現リズムの動的応答の定量計測，定量生物学の会 第七回年会，福岡，2015 年 1 月 11 日～12 日．

Imayoshi, I.: Impairment of hippocampal postnatal neurogenesis and its involvement in the neurodevelopmental disorders. 第 38 回日本神経科学大会，神戸，2015 年 7 月 28 日～31 日．

磯村彰宏、小串典子、郡宏、影山龍一郎：光遺伝学による遺伝子発現リズムの動的応答の定量計測．BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

Tateya, T., Sakamoto, S., Imayoshi, I., and Kageyama, R.: In vivo overactivation of the Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

Kobayashi, K., Niino, Y., Miyawaki, A., and Kageyama, R.: Quantification of synchronized oscillation in mouse segmentation clock. BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

荒木杏菜、今吉格、湊原圭一郎、金亮、川島尚之、影山龍一郎、尾藤晴彦、奥野浩行：限定された時間枠における活性化細胞集団の持続標識法．BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

前田勇樹、磯村彰宏、影山龍一郎：オプトジェネティクスを用いた Hes1 の発現振動による細胞周期制御メカニズムの解析．BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

大塚俊之、影山龍一郎：Hes1 強制発現により大脳皮質ニューロン産生が遷延し生後脳における神経幹細胞プールが増大する．BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

渡邊直希、影山龍一郎、大塚俊之：大脳皮質形成期において Hbp1 は細胞周期の長さを延長することによってニューロン分化のタイミングを制御する．BMB2015, 神戸，2015 年 12 月 1 日～4 日．

教授	影山龍一郎
准教授	大塚俊之
助教	小林妙子
白眉准教授	今吉格
白眉助教	楯谷智子
iCeMS 助教	下條博美
さがけ研究者	磯村彰宏
研究員	播磨有希子、松田孝彦、馬杉美和子
大学院生	Shama Ratiram Bansod、小林久美子、前田勇樹、坂本進、貝瀬峻、 荒木杏菜、高木あかり、越智翔平、神尾航平、松宮舞奈

当研究室には、平成 27 年 4 月から医学研究科博士課程 1 年の高木あかり、越智翔平が新たに加わった。一方、医学研究科博士課程の渡邊直希は、学位取得後に滋賀医科大学に助教として赴任した。また、医学研究科の安藤充重は脳外科にもどった。

影山は、3 月に米国シンシナチおよびスタンフォード、7 月にはブラジル・リオデジャネイロでの IBRO 世界大会、10 月にスペイン、11 月にドイツでの EMBO/EMBL シンポジウムで招待講演を行った。磯村はハワイで開催された qBIO meeting で、今吉はブラジルの IBRO 世界大会で発表した。また、ドイツの EMBO/EMBL シンポジウムでは、下條と磯村が発表した。下條はベストポスター賞、磯村は口頭発表に選ばれた。さらに、沖縄の OIST で開催された東アジアシンポジウムでは、小林久美子が発表を行い、TOMY 賞を受賞した。その他、教室員の多くが BMB2015 等の学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生・分化の分子機構を明らかにするというもので、塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス因子（bHLH 因子）に注目して解析を行っている。本年は、以下に記すように、神経分化制御機構に関する研究が進展した。

(1) Hes1 の脱ユビキチン化酵素は、Hes1 の安定性と神経分化を制御する

bHLH 型の転写因子である Hes1 はリプレッサーであり、神経分化を促進する転写因子群の発現を抑制して、神経幹細胞の維持に機能する。Hes1 の発現は、ES 細胞や神経幹細胞において振動（オシレーション）していることが報告されており、その発現振動によって、未分化性の維持や分化の

方向性を制御していると考えられている。Hes1 のオシレーションは、Hes1 タンパク質の急速な分解によって制御されるが、その詳細な分子機構は明らかになっていなかった。我々は、ES 細胞のライセートを用いたアフィニティ精製により、Hes1 と相互作用する新規脱ユビキチン化酵素 Usp27x を同定した。Hes1 は Usp27x により脱ユビキチン化され、安定化された。また、そのホモログである Usp22 や Usp51 も Hes1 の脱ユビキチン化酵素として機能することが分かった。Usp22 のノックダウンは Hes1 を不安定化し、オシレーション周期を遅らせ、神経分化を促進すること、一方で、Usp27x の過剰発現は、Hes1 を安定化し、神経分化を抑制した。以上の結果は、Hes1 の脱ユビキチン化酵素群が、ユビキチン除去を介して Hes1 タンパク質の安定性と Hes1 の発現のダイナミクスを調節し、神経分化を制御していることを示している。(小林妙子)

(2) 大脳皮質形成期において Hbp1 は細胞周期の長さを延長することによってニューロン分化のタイミングを制御する

哺乳動物の脳の発生過程において、神経幹細胞はまず対称分裂によって幹細胞プールを増大し、その後非対称分裂に移行してニューロン産生を開始する。この移行のタイミングを制御するメカニズムは十分には解明されていないが、発生過程に伴う細胞周期の延長とそれに伴った神経分化を促進する運命決定因子の蓄積が、非対称分裂とニューロン産生の開始を制御する生物時計として働くことが示唆されている。我々はマウス胎児の大脳皮質領域の神経幹細胞における遺伝子発現プロファイリングを行い、Hbp1 (*high mobility group box transcription factor 1*) の発現がニューロン産生期に増加することを見出した。Nestin-CreER^{T2} マウスとの交配により神経幹細胞／前駆細胞特異的な Hbp1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し解析したところ、胎児の終脳において顕著な脳室および脳室周囲帯の拡大と、ニューロン数の減少を伴う皮質板の菲薄化を認めた。このマウスの大脳皮質領域では神経幹細胞／前駆細胞が短い細胞周期で活発に細胞分裂を続けており、この細胞増殖帯において Wnt シグナルの標的因子である *cyclin D1* および *c-jun* の発現上昇を認めた。これらの結果から、Hbp1 は神経幹細胞／前駆細胞の細胞周期を延長することにより大脳皮質ニューロン産生のタイミングを制御する重要な役割を有しており、正常な大脳皮質発生に必須の因子であることが示された。(渡邊直希、大塚俊之)



2015 年 4 月 撮影

Members

Associate Professor

Takayuki Miyazawa

Introduction

Our research objective is to understand the pathogenesis of animal retroviruses, functions of endogenous retroviruses and potential iatrogenic risks by infection of endogenous retroviruses in xenotransplantation, vaccination and regenerative medicine. We are currently studying simian retroviruses, feline endogenous retroviruses, bovine endogenous retroviruses and koala retroviruses. In addition, we are studying an emerging virus called feline morbillivirus which is considered to be associated with renal failure.

Topics

1) Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques : R. YOSHIKAWA, M. OKAMOTO, S. SAKAGUCHI, S. NAKAGAWA, T. MIURA, H. HIRAI and T. MIYAZAWA

In 2001-2002, six of seven Japanese macaques (*Macaca fuscata*) died after developing hemorrhagic syndrome at the Kyoto University Primate Research Institute (KUPRI). While the cause of death was unknown at the time, we detected simian retrovirus 4 (SRV-4) in samples obtained from a similar outbreak in 2008-2011, during which 42 of 43 Japanese macaques died after exhibiting hemorrhagic syndrome. In this study, we isolated SRV-4 strain PRI-172 from a Japanese macaque showing severe thrombocytopenia. When inoculated into four Japanese macaques, the isolate induced severe thrombocytopenia in all within 37 days. We then constructed an infectious molecular clone of strain PRI-172, termed pSR415, and inoculated the clone-derived virus into two Japanese macaques. These animals also developed severe thrombocytopenia in just 31 days after inoculation, and the virus was reisolated from blood, bone marrow, and stool. At necropsy, we observed bleeding from the gingivae and subcutaneous bleeding in all animals. SRV-4 infected a variety of tissues, especially in digestive organs, including colon and stomach, as determined by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) and immunohistochemical staining. Furthermore, we identified the SRV-4 receptor as ASCT2, a neutral amino acid transporter. ASCT2 mRNA was expressed in a variety of tissues, and the distribution of SRV-4 proviruses in infected Japanese macaques correlated well with the expression levels of ASCT2 mRNA. From these results, we conclude that the causative agent of hemorrhagic syndrome in KUPRI Japanese macaques was SRV-4, and its receptor is ASCT2.

2) Repeated invasions of a feline infectious retrovirus into host genomes : S. SHIMODE, S. NAKAGAWA and T. MIYAZAWA

Endogenous retroviruses (ERVs) are remnants of ancient retroviral infections of host germ-line cells. Although most ERVs are inactivated through the accumulation of mutations and deletions, some are active and have the potential to produce infectious viral particles. The RD-114 virus is a replication-competent feline ERV, and several feline cell lines produce infectious RD-114 viral particles. The RD-114 virus was first isolated from human rhabdomyosarcoma (RD) cells after transplantation in the brain of fetal kitten and was mistakenly regarded as the first human retrovirus. All domestic cats are considered to have an ERV locus encoding a replication-competent RD-114 virus in their genomes; however, the locus has not been identified. We investigated RD-114 virus-related proviral loci in genomes of domestic cats, and found that none were capable of producing infectious viruses. We also found that all domestic cats have an RD-114 virus-related sequence on chromosome C2, termed RDRS C2a, but possessions of the other RDRSs are different depending on the regions where cats live or breed. Our results indicate that RDRS C2a, the oldest RD-114-related provirus, entered the genome of the common ancestor of domestic cat and small wildcat from 3.4 to 3.0 million years ago and the other new RDRSs might have integrated into migrating cats in Europe. We also show that infectious RD-114 viral particles can be resurrected by the recombination between two non-infectious RDRSs. From these data, we conclude that cats do not harbor infectious RD-114 viral loci in their genomes and RD-114-related viruses invaded cat genomes multiple times.

3) Comparison between S+L- assay and LacZ marker rescue assay for detecting replication-competent gammaretroviruses : A. HASHIMOTO-GOTOH, R. YOSHIKAWA and T. MIYAZAWA

S+L- assay is classically used as the infectivity assay to prevent the contamination of infections gammaretrovirus in biological samples such as vaccine. By contrast, lacZ marker rescue (LMR) assay is developed recently as infectivity assay, utilizing X-gal staining for contamination detection. Here, we compared and contrasted S+L- assay with LacZ marker rescue (LMR) assay to evaluate the capability of detectable infectious gammaretrovirus. Among viruses tested, porcine endogenous retroviruses (PERVs) as well as feline leukemia virus subgroup B were not detected by S+L- assay, whereas LMR was capable of the detection. Moreover, LMR assay achieved detection of infectious gammaretrovirus at lower virus titer than that of S+L- assay. Our study indicates LMR assay as the better alternative of S+L- assay with advanced detectability against infectious retroviruses.

4) Host range of feline morbillivirus and establishment of its rapid detection method : S. SAKAGUCHI, R. KOIDE, M. OGAWA and T. MIYAZAWA

Feline morbillivirus (FmoPV) is a novel morbillivirus in domestic cats. It is reported that infection rate of FmoPV in stray and housed cats is high in China and Japan. Because humans and cats often live in close areas, the risk of zoonotic infection of FmoPV has to be determined. The existence of FmoPV infection has been reported in four countries; China, Japan, Germany and Italy. There is a possibility that unknown vectors might be spreading this virus. Therefore, establishment of a suitable detection method for vector research is necessary.

Although it was reported that Vero cell originated from African green monkey (AGM) is susceptible to FmoPV, it has never been examined whether FmoPV infects cells originated from other species. To study the in vitro host range of FmoPV, we inoculated FmoPV strain SS1 to cell lines derived from 13 species including human. As a result, only cell lines derived from cats and AGMs were susceptible to FmoPV. No infectivity of FmoPV, which is wild type or AGM-adopted virus, was observed in human cell lines.

Next, we established rapid and economical RT-LAMP method for FmoPV detection. As a result, the RT-LAMP assay successfully detected Japanese FmoPV isolates. The assay demonstrated 100-fold higher sensitivity compared with a conventional RT-PCR, and the detection limit was 0.12 TCID₅₀ per reaction.

In conclusion, FmoPV didn't grow in human cells. However, there is a possibility that FmoPV may gain virulence in human by mutations. Therefore, we need to establish a rescue system of FmoPV to study a possible mechanism of species transmission. Moreover, the established RT-LAMP assay was shown to be highly specific and sensitive for FmoPV detection, and it makes suitable for use in field studies.

5) Susceptibility of domestic animals to a pseudotype virus bearing RD-114 virus envelope protein : R. N. MIYAHO, S. Nakagawa, A. HASHIMOTO-GOTOH, Y. NAKAYA, S. SHIMODE, S. SAKAGUCHI, R. YOSHIKAWA, M. UEDA-TAKAHASHI and T. MIYAZAWA

Retroviral vectors are used for gene transduction into cells and have been applied to gene therapy. Retroviral vectors using envelope protein (Env) of RD-114 virus, a feline endogenous retrovirus, have been used for gene transduction. In this study, we investigated the susceptibility to RD-114 Env-pseudotyped virus in twelve domestic animals including cattle, sheep, horse, pig, dog, cat, ferret, mink, rabbit, rat, mouse, and quail. Comparison of nucleotide sequences of ASCT2 (SLC1A5), a receptor of RD-114 virus, in 10 mammalian and 2 avian species revealed that insertion and deletion events at the region C of ASCT2 where RD-114 viral Env interacts occurred independently in the mouse and rat lineage and in the chicken and quail lineage. By the pseudotype virus infection assay, we found that RD-114 Env-pseudotyped virus could efficiently infect all cell lines except those from mouse and rat. Furthermore, we confirmed that bovine ASCT2 (bASCT2) functions as a receptor for RD-114 virus infection. We also investigated bASCT2 mRNA expression in cattle tissues and found that it is expressed in various tissues including lung, spleen and kidney.

These results indicate that retrovirus vectors with RD-114 virus Env can be used for gene therapy in large domestic animals in addition to companion animals such as cat and dog.

LIST OF PUBLICATIONS

Yoshikawa, R., Miyaho, R. N., Hashimoto, A., Abe, M., Yasuda, J. and Miyazawa, T. (2015). Suppression of production of baboon endogenous virus by dominant negative mutants of cellular factors involved in multivesicular body sorting pathway. **Virus Res.** 196, 128-134.

Yoshikawa, R., Takeuchi, J. S., Yamada, E., Nakano, Y., Ren, F., Tanaka, H., Münk, C., Harris, R. S., Takayuki, M., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2014). Vif determines the requirement for CBF- β in APOBEC3 degradation. **J. Gen. Virol.** 96, 887-892.

Shimode, S., Nakagawa, S. and Miyazawa, T. (2015). Multiple invasions of an infectious retrovirus in cat genomes. **Sci. Rep.** 5, 8164.

Okamoto, M., Miyazawa, T., Morikawa, S., Ono, F., Nakamura, S., Sato, E., Yoshida, T., Yoshikawa, R., Sakai, K., Mizutani, T., Nagata, N., Takano, Okabayashi, S., Hamano, M., Fujimoto, K., Nakaya, T., Iida, T., Horii, T., Miyabe-Nishiwaki, T., Watanabe, A., Kaneko, A., Saito, A., Matsui, A., Hayakawa, T., Suzuki, J., Akari, H., Matsuzawa, T. and Hirai, H. (2015). Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. **Sci. Rep.** 5, 8850.

Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Miura, T., Hirai, H. and Miyazawa, T. (2015). Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques. **J. Virol.** 89, 3965-3975.

Koide, R., Sakaguchi, S. and Miyazawa, T. (2015). Basic biological characterization of feline morbillivirus. **J. Vet. Med. Sci.** 77, 565-569.

Hashimoto-Gotoh, A., Matsuki, T. and Miyazawa, T. (2015). Evaluation of membrane filtration system using the “Pore Diffusion” for eliminating viruses. **J. Vet. Med. Sci.** 77, 733-737.

Miyaho, R. N., Nakagawa, S., Hashimoto-Gotoh, A., Nakaya, Y., Shimode, S., Sakaguchi, S., Yoshikawa, R., Takahashi, M. U. and Miyazawa, T. (2015). Susceptibility of domestic animals to a pseudotype virus bearing RD-114 virus envelope protein. **Gene** 567, 189-195.

Nitta, T., Ha, D., Galvez, F., Miyazawa, T. and Fan H. (2015). Human and murine APOBEC3s restrict replication of koala retrovirus by different mechanisms. **Retrovirology** 12, 68.

Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Takeuchi, J. S., Miura, T., Okamoto, M., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Ito M., Kiyazawa, T. and Koyanagi, Y. (2015). Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. **Sci. Rep.** 5, 14040.

Hashimoto-Gotoh, A., Yoshikawa, R. and Miyazawa, T. (2015). Comparison between S+L- assay and LacZ marker rescue assay for detection replication-competent gammaretroviruses. **Biologicals** 43, 363-368.

Sakaguchi, S., Koide, R. and Miyazawa, T. (2015). In vitro host range of feline morbillivirus. **J. Vet. Med. Sci.** 77, 1485-1487.

Yoshikawa, R., Izumi T., Yamada E., Nakano Y., Misawa, N., Ren F., Carpenter, M. A., Ikeda, T., Münk, C., Harris, R. S., Miyazawa, T., Koyanagi Y. and Sato K. (2015). A naturally occurring domestic cat APOBEC3 variant confers resistance to FIV infection. **J. Virol.** 90, 474-485.

Imakawa, K., Nakagawa, S. and Miyazawa, T. (2015). Baton pass hypothesis: successive incorporation of unconserved endogenous retroviral genes for placentation during mammalian evolution. **Genes Cells** 20, 771-788.

Nakaya, Y.* and Miyazawa, T. (2015). The roles of syncytin-like proteins in ruminant placentation. **Viruses** 7, 2928-2942.

Koshi, K., Nakaya, Y., Kizaki, K., Ishiguro-Oonuma, T., Miyazawa, T., Spencer, T. E. and Hashizume, K. (2015). Induction of ovine trophoblast cell fusion by syncytin-1 in vitro. **Anim. Sci. J.** (Epub ahead of print)

Koide, R., Sakaguchi, S., Ogawa, M. and Miyazawa, T. (2015). Rapid detection of feline morbillivirus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **J. Vet. Med. Sci.** (Epub ahead of print)

宮沢孝幸 *, 坂口翔一 (2015) . 猫モルビリウイルス研究の最前線 **Felis** 7, 110-116.

仲屋友喜、宮沢孝幸 (2015) . 霊長類および反芻類の胎盤形成に関与する内在性レトロウイルス 生物科学 67, 28-37.

宮沢孝幸、中川 草 (2015) . レトロウイルスの起源と進化「感染症：いま何が起きているのか」実験医学（増刊） 33, 117-126

Shimode, S., Nakagawa, S. and Miyazawa, T.: Identification of endogenous retrovirus in the fixation process to cat genomes. Society for Molecular Biology and Evolution, Vienna, Austria, 12-16 July, 2015.

宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス研究 UPDATE アニコムセミナー、東京都新宿区、2015 年 5 月 28 日（招待講演）

下出紗弓 ネコの旅路を内在性レトロウイルスから探る 第 17 回 日本進化学会、東京都文京区、2015 年 7 月 20-23 日（招待講演）

宮沢孝幸 レトロウイルスの起源と進化 日本微生物生態学会第 30 回大会、茨城県土浦市、2015 年 10 月 19-20 日（招待講演）

宮沢孝幸 レトロウイルスの起源と内在性レトロウイルスの機能 阪大微生物病研究会学術セミナー、香川県観音寺市、2015 年 10 月 28 日（招待講演）

下出紗弓、中川草、宮沢孝幸 ネコゲノムへと複数回侵入した感染性レトロウイルスの発見 第 1 回 小動物ウイルス病研究会、京都府京都市、2015 年 3 月 28-29 日

坂口翔一、宮沢孝幸 ネコ血液中の内在性レトロウイルス由来蛋白質による外来性レトロウイルスの受容体非依存性感染 第 1 回 小動物ウイルス病研究会、京都府京都市、2015 年 3 月 28-29 日

宮穂（中岡）里江、中川草、宮沢孝幸 さまざまな動物における RD-114 ウイルスに対する感受性評価 第 1 回 小動物ウイルス病研究会、京都府京都市、2015 年 3 月 28-29 日

橋本暁、宮沢孝幸 動物用ワクチンのウイルス汚染防止にもちいる感染性試験法の比較検討 第 1 回 小動物ウイルス病研究会、京都府京都市、2015 年 3 月 28-29 日

小出りえ、坂口翔一、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルスの生物学的性状の解析 第 1 回 小動物ウイルス病研究会、京都府京都市、2015 年 3 月 28-29 日

宮沢孝幸 RD-114 ウイルス物語 第 18 回日本レトロウイルス研究会 夏期セミナー、愛知県名古屋市、2015 年 7 月 10-11 日

橋本 暁 レトロウイルスと内在性エボラウイルスの相似性 第 18 回日本レトロウイルス研究会 夏期セミナー、愛知県名古屋市、2015 年 7 月 10-11 日

下出紗弓、中川草、宮沢孝幸 ネコの家畜化の内在性レトロウイルス 第 158 回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015 年 9 月 7-9 日

吉川禄助、竹内（柴田）淳子、山田英里、中野雄介、木村雄一、橋本暁、宮沢孝幸、佐藤佳、小柳義夫 自然発生 Vif 変異によるレンチウイルスの弱毒化 第 158 回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015 年 9 月 7-9 日

坂口翔一、川端涼子、小出りえ、入江崇、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルスのミニゲノム系の作出 第 158 回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015 年 9 月 7-9 日

坂口翔一、小出りえ、桑原千恵子、酒井沙知、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス感染実験系の作出と不活化ワクチンの有効性試験 第 158 回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015 年 9 月 7-9 日

小出りえ、坂口翔一、小川誠、宮沢孝幸 RT-LAMP 法によるネコモルビリウイルス検出法の開発 第 158 回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015 年 9 月 7-9 日

Sakaguchi, S., Koide, R., Ogawa, M. and Miyazawa, T.: In vitro host range of feline morbillivirus. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, Fukuoka, 22-24 November, 2015.

Koide, R., Sakaguchi, S., Ogawa, M. and Miyazawa, T.: One-step nucleic acid detection of feline morbillivirus from clinical specimens. Fukuoka, 22-24 November, 2015.

Hashimoto-Gotoh, A., Yoshikawa, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S. and Miyazawa, T.: No sign of infectious gammaretrovirus production from SNL feeder layer cells. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka, 22-24 November, 2015.

下出紗弓、中川草、宮沢孝幸 ネコ内在性レトロウイルスの獲得と宿主機能へ及ぼした影響 第 38 回 日本分子生物学会、兵庫県神戸市、2015 年 12 月 1-4 日

准教授

宮沢孝幸

2015 年は、医学研究科大学院博士課程の下出紗弓さん、坂口翔一君、人間・環境学研究科大学院博士課程の宮穂（中岡）里江さん、医科学研究科大学院修士課程の橋本 暁君、小出りえさん、技術補佐員の正玄裕子さん、そして私の総勢 7 名でスタートした。3 月には下出紗弓さんが博士号（医学）を取得し、4 月より日本学術振興会特別研究員のポスドクとなった。同じく 4 月には、橋本暁君が医科学研究科大学院博士課程に進学した。一昨年から引き続き宮沢は、附属感染症モデル研究センター（進化ウイルス研究領域）の准教授を兼任している。

当研究分野は、動物由来の病原性レトロウイルスと内在性レトロウイルスの研究をメインに行っている。内在性レトロウイルスは太古の昔に流行していたレトロウイルスが生殖細胞に感染し、組み込まれたものである。すべての細胞（体細胞と生殖細胞）にレトロウイルス由来の配列は含まれているが、ほ乳類のゲノムは、およそ 10% が内在性レトロウイルスの配列で占められている。

病原性レトロウイルスを対象とした研究では、ニホンザルで血小板減少症を引き起こすサルレトロウイルス、コアラで白血病や免疫不全を引き起こすコアラレトロウイルスの研究を行っている。コアラレトロウイルスは内在化しつつある極めて珍しいレトロウイルスであり、レトロウイルスの内在化機構を解明するモデルとしても期待されている。

感染性の内在性レトロウイルスは、異種移植や再生医療の際に問題となるばかりではなく、異種の動物由来細胞を用いて製造される生物学的製剤（ワクチンなど）にも迷入する可能性がある。また、内在性レトロウイルス由来の RNA は、市販の逆転写酵素にも混入しており、メタゲノム解析やレトロウイルス感染症を研究する際の障害となっている。内在性レトロウイルスは潜在的な危険性を有しているが、その一方で宿主によって有利に働いている場合もある。内在性レトロウイルスが病原性レトロウイルスの感染防御に働いている例は古くから知られていたが、最近、ほ乳類の発生段階に内在性レトロウイルスが重要な役割を担うことがわかりつつある。我々は、ウシや霊長類において、内在性レトロウイルスが胎盤においてどのように関わっているかどうかを調べている。

我々の 2015 年の主な研究テーマは以下の通りである。1) 霊長類研究所で発生したニホンザル血小板減少症の病因解明、2) 霊長類由来内在性レトロウイルスの進化的意義、3) 霊長類由来フォーミーウイルスによる群移動歴の解析、4) ネコ内在性レトロウイルスを用いたレトロウイルスベクターの開発、5) 異種間臓器移植や再生医療などで問題となる動物由来内在性レトロウイルスの研究、6) ガンマレトロウイルスの内在化と種間感染のモデルとしてのコアラレトロウイルスの解析、

7) 尿細管間質性腎炎を引き起こす新規モルビリウイルスの生物学的性状の解析と診断系の確立

ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスの同定

2001-2002 年及び 2008 年 -2011 年において京都大学霊長類研究所で飼育されていた多数のニホンザルが血小板減少症を呈して死亡した。その後の核酸ベースの解析 (PCR、RT-PCR やメタゲノム解析) によってサルレトロウイルス 4 型 (SRV-4) との関連が強く示唆された。本研究では発症個体 (PRI-172) の血漿、末梢血単核球 (PBMC)、骨髄及び糞より SRV-4 の分離に成功した。また、PRI-172 血漿由来の SRV-4 感染性分子クローン (pSRV-415) の作製に成功した。次に血漿より分離した SRV-4 を健常なニホンザル 4 頭及び pSRV-415 由来の SRV-4 を健常なニホンザル 2 頭に実験感染したところ約 1 ヶ月で血小板減少症が発症した。これらの個体の全身臓器から DNA を抽出し、SRV-4 の感染を PCR で確認したところ、SRV-4 は確認したすべての臓器に感染していることを見出した。また、これら実験感染個体の血漿、PBMC 及び骨髄より SRV-4 の再分離に成功した。さらに、SRV-4 はニホンザルの中性アミノ酸トランスポーター (ASCT2) を利用することを同定し、この分子が多く発現している部位 (肺や消化管) で SRV-4 が特に効率的に増殖していることを確認した。本研究により、感染症の病原体を特定する際の指針であるコッホの三原則を満たしたことから、霊長類研究所で発生したニホンザル血小板減少症は SRV-4 が原因ウイルスであることが確定した。

感染性ネコレトロウイルスの繰り返された宿主ゲノムへの侵入

内在性レトロウイルス (Endogenous retroviruses, ERVs) は過去に生殖細胞へと感染したレトロウイルスの痕跡である。多くの ERV は変異・欠失の集積により不活化されているが、活性を保ち感染性ウイルス粒子の産生能を保持するものもある。RD-114 ウイルスは複製可能なネコの ERV で、ネコ由来の株化細胞の中には感染性の RD-114 ウイルス粒子を産生するものもある。RD-114 ウイルスは当初、ネコ胎子の脳内で継代培養されたヒトの横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma, RD) 細胞から分離され、ヒトの最初のレトロウイルスではないかと誤って認識されていた。すべてのイエネコは複製可能な RD-114 ウイルスをコードする ERV 座位をゲノム上に保持すると考えられてきたが、その座位は特定されていなかった。我々はイエネコゲノム上の RD-114 ウイルス関連プロウイルスを精査し、それらがすべて非感染性であることを発見した。さらに、すべてのイエネコは C2 染色体に共通の RD-114 ウイルス関連配列 (RD-114 virus-related sequence, RDRS) である RDRS C2a を保持するが、その他の RDRS の保有の有無については、それぞれのイエネコの生息地域および品種による差異があることがわかった。我々の結果より、最も古い RD-114 ウイルス関連プロウイルスである RDRS C2a は 300 ～ 340 万年前にイエネコと小型野生ネコの共通祖先ゲノムに侵入し、その後、ヨーロッパへと移動するイエネコゲノムに新たな RDRS が侵入したことが示唆された。さらに、非感染性の RDRS 間で細胞内組換え反応が起こり、感染性の RD-114 ウイルス粒子が産生されること

を明らかにした。本研究成果により、イエネコゲノム上に感染性の RD-114 ウイルス座位は存在しないということ、RD-114 ウイルス関連ウイルスが複数回にわたって宿主ゲノムへと侵入したことがわかった。

感染性内在性レトロウイルス汚染を検出するための感染性試験の比較検討

ワクチンやバイオ医薬品などの生物学的製剤の安全性を担保する上で、感染性のガンマレトロウイルスの迷入を否定する事は必須である。ガンマレトロウイルス迷入否定試験法の中でもっとも感度が高く信頼できるのは感染性試験である。欧米や日本の規制当局は、Sarcoma-positive, Leukemia-negative (S+L-) アッセイと呼ばれる感染性試験法を推奨している。我々は内在性レトロウイルスを含む様々なガンマレトロウイルスを用いて、LacZ マーカーレスキュー (LMR) アッセイと、S+L- アッセイの感度を比較した。その結果、調べた限りのすべてのガンマレトロウイルスに関しては、LMR アッセイは S+L- アッセイよりも感度が高く、さらに、ブタ内在性レトロウイルスサブグループ A および B やネコ白血病ウイルスサブグループ B は従来の S+L- アッセイではまったく検出できないことを見いだした。このことから、LMR アッセイはより広範囲のガンマレトロウイルス検出が可能であり、より高感度であることが示された。

ネコモルビリウイルスの宿主域と迅速検出法の開発

ネコモルビリウイルス (FmoPV) は 2012 年にネコから発見されたモルビリウイルスである。中国の野外ネコや、日本の飼いネコにおいて感染率が高い。ネコはヒトの生活圏内に多く存在することから、ヒトに対する危険性評価が必要である。またこのウイルスは、中国、日本、ドイツ、イタリアで検出され、様々な地域でウイルス感染が認められている。このウイルスが何らかのベクターに感染し、広まっている可能性が考えられ、ベクター探索をするためのフィールド調査に適した検出法の確立が必要である。

そこで、FmoPV の分離株 (SS1 株) を、ヒトおよび 12 動物種由来培養細胞に接種し、*in vitro* における FmoPV の宿主域を調べた。その結果、ネコおよびアフリカミドリザル由来の培養細胞のみでウイルス増殖が認められ、ヒト由来の培養細胞ではウイルス増殖は認められなかった。さらに、アフリカミドリザルの腎臓由来培養細胞 (Vero 細胞) で増殖・複製した FmoPV をヒトの腎臓由来培養細胞 (HEK293T 細胞) に接種し、霊長類に馴化したウイルス株のヒトへの感染性を調べたが、ウイルス増殖はみられなかった。

次に、迅速で簡易な診断法である LAMP 法を用い、FmoPV 特異的 RT-LAMP 法を開発し、その実用性を検討した。その結果、この FmoPV 特異的 RT-LAMP 法は、日本で分離された FmoPV 株すべてを検出することができた。さらに、従来の FmoPV 特異的 RT-PCR 法と比較して感度 100 倍高く、1 反応あたり 0.12 TCID₅₀ のウイルスを検出出来ることが分かった。

本研究では、ヒト由来細胞における FmoPV の増殖はみられなかった。しかし、変異の獲得によって、ヒトにおける感染・増殖能を獲得する可能性は考えられる。今後、リバーシジェネティクス技術を用い、種間伝播の可能性について検討する予定である。また、今回開発した FmoPV 検出法は特異性及び感度に優れており、恒温槽などの簡易な機器を用いて検出が可能であることから、様々な場所でのフィールド調査に有用である。

RD-114 ウイルスベクターの遺伝子導入用ベクターとしての有用性

レトロウイルスベクターは細胞への遺伝子導入や遺伝子治療に用いられる。ネコの内在性レトロウイルスである RD-114 ウイルスの、エンベロープタンパク質を用いたレトロウイルスベクターはすでに遺伝子導入に使用されている。今回我々は、RD-114 ウイルスのエンベロープタンパク質を用いたレトロウイルスベクターが、どのような動物種に遺伝子導入用ベクターとして適用可能であるか 12 種類の家畜（ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、フェレット、ミンク、ウサギ、ラット、マウス、ウズラ）で調べた。RD-114 ウイルスの受容体である ASCT2（別名 SLC1A5）の塩基配列を 10 種類の哺乳類と 2 種類の鳥類で比べたところ、RD-114 ウイルスのエンベロープタンパク質が結合すると考えられている C 領域において、齧歯類（マウスとラット）と鳥類（ニワトリとウズラ）で独立に挿入と欠失（Indel）が同時に起こっていることを見いだした。さらにシュードタイプウイルス感染試験により、RD-114 ウイルスのエンベロープタンパク質を用いたベクターは、マウスとラット以外の細胞に効率良く遺伝子導入できることが分かった。さらに我々は、ウシ ASCT2 が RD-114 ウイルスの受容体として機能することを確認した。ウシ ASCT2 の mRNA は肺、脾臓、腎臓を含む様々な臓器に発現していることを見いだした。これらの結果から、RD-114 ウイルスのエンベロープタンパク質を用いたレトロウイルスベクターは、イヌやネコなどの伴侶動物以外にウシなどの大型の家畜にも遺伝子導入用ベクターとして使用できることが示された。

Laboratory of Integrated Biological Information

Members

Professor	Daron M Standley
Research Fellow	Wijaya Edward
Research Student	Ana Cecilia Davila Crespo

Introduction

We develop novel computational methods in order to understand the biological function of proteins involved in immune responses. In 2015, we made progress in several areas: 3D modeling of immune repertoires, miRNA integration with gene expression data and heterogeneous gene expression analysis.

Topics

1) Structural modeling of immune repertoires

Emerging technology is enabling the sequencing of individual antibody and T cell receptors on a vast scale, opening up the possibility of observing the dynamics of adaptive immune responses under various conditions. We have extended the view of such data to the molecular level by modeling antibodies and T cell receptors in 3D to atomic resolution and then carrying out clustering and flexible docking of epitopes. Such simulations have several practical uses. First, we can use structure-based clustering to identify populations of antibodies or T cell receptors that appear in specific cohorts (e.g., high vs. low risk groups) or time points (e.g., pre/post vaccination). Second, we can analyze binding propensities of complementary determining regions in order to understand which epitopes are driving observed B or T cell populations. Third, we can dock putative epitopes or antibodies to structural models of T cell receptors or antibodies. The success of such a structure-based approach depends largely on the accuracy of the underlying simulations. For this reason, we have developed various structural modeling resources, including OSCAR, an atomic-level protein force-field; Kotai Antibody Builder, a tool for modeling antibodies and TCRs in 3D; aaRNA, a tool for residue-level prediction of nucleotide binding sites on proteins. We demonstrated the accuracy of our approach by flexible docking of a single-stranded DNA antigen to an SLE-derived auto-antibody. The model was subsequently validated by x-ray crystallography (manuscript in preparation).

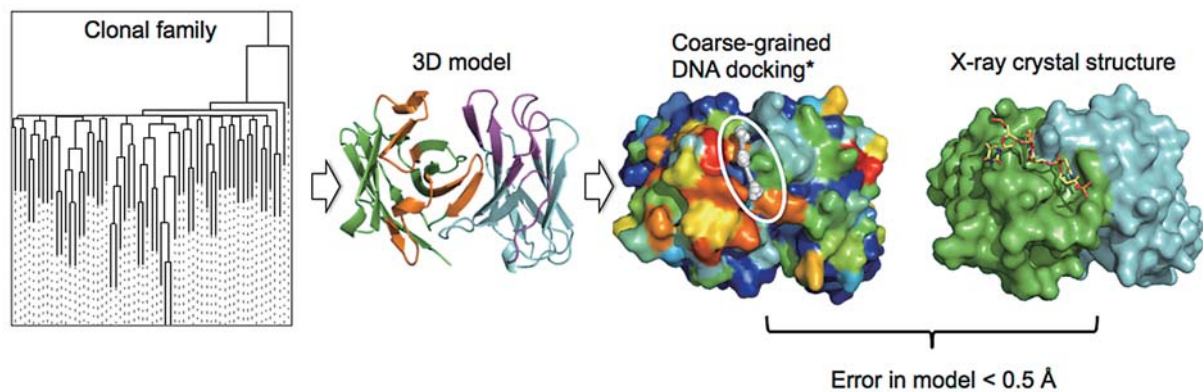


Figure1. From deep-sequencing data to a novel antibody-antigen complex structure.

2) Analysis gene immunological gene expression data

Analysis of gene expression data is often complicated by the existence of multiple cell populations in the sample. Recently, *in silico* deconvolution techniques have become an attractive solution to address this issue. There is a need therefore, for a user-friendly and extendable framework to facilitate analysis of heterogeneous data. We developed ICEPOP, an open source framework that provides a systematic way to obtain, preprocess and dissect such microarray data (manuscript in preparation). Additionally, we provide a web-based application as a user-friendly platform for biologists to examine and evaluate heterogeneous gene expression data. ICEPOP is freely available as web application <http://sysimg.ifrec.osaka-u.ac.jp/icepop> and as Python package <https://github.com/ewijaya/icepop>.

3) Integration of immune gene expression and microRNA data sets

In the last decade, circulating micro RNAs (miRNAs) have gained attention as a new class of disease biomarkers due to their stability, strong correlation with disease states, and accessibility. In order to be applicable in clinical practice, however, it is important to understand the molecular mechanism of a biomarker's role in disease. When such a "mechanistic" role of an miRNA is identified, it may then be possible to use the biomarker to discover new therapeutic targets, which is an important bottleneck in the pharmaceutical industry. Many miRNAs are important post-transcriptional regulators of gene expression; as such, a mechanistic understanding involves knowledge of their target mRNAs, which can be gained using a range of target prediction methods. Given a set of putative targets for a given circulating miRNA, a natural question to ask is: In which cells or tissues are these genes expressed? As circulating miRNAs co-localize with many immune cells, which, in turn, mediate host responses to many different diseases, we speculated that the target genes of circulating miRNAs might be enriched in peripheral immune cells. It has previously been shown that more than half of solid tumor biomarkers reported in the literature are highly expressed in blood cells. Independently, a number of important miRNAs targeting immune pathways have been described

in the literature.

Given the co-localization of circulating miRNA and immune cells, we sought to quantify the relationship between circulating miRNAs and genes preferentially expressed in mammalian immune cells. Specifically, we proposed two testable hypotheses:

1. Circulating miRNAs are more immune-specific than other miRNAs
2. Immune-related genes are more circulating miRNA-specific than other genes

These two hypotheses can be compared against publically available data using previously defined immune-related genes sets for humans and mice along with established target prediction methods. To this end, we constructed a consensus-based predictor.

The target prediction accuracy was improved by the consensus-based method. Our consensus-based predictor combined target predictions from several methods: Diana-MicroT-CDS, TargetScan, miRDB and miRanda. We validated it on a set of 380 randomly chosen high-confidence miRNA-mRNA targets. We included both high-confidence experimental data and high-throughput HITS-CLIP and PAR-CLIP interaction. The accuracy of the prediction method (as measured by the Matthews correlation coefficient, MCC, generally decreased with addition of high-throughput data. The consensus method achieved an average MCC value of .42 +/- .06 in 10 independent runs, which was higher than that of any of the individual predictors (.38 +/- .07, .36 +/- .04, .36 +/- .04, .23 +/- .08 for Diana-MicroT-CDS, TargetScan, miRDB and miRanda, respectively).

Using the consensus method, we confirmed that human circulating miRNAs have an immune-specificity of 0.89 compared with non-circulating miRNAs (0.54), a relationship that was highly significant (p-value < 0.001). Moreover, the same relationship was observed in mice (0.74 for circulating vs. 0.23 for non-circulating miRNAs). Next we confirmed the second hypothesis, that immune-related genes are more circulating miRNA-specific than other genes. The specificity of human immune-related genes to be targeted by circulating miRNAs was 0.34 compared to non-immune genes (0.24). Again, the results were highly significant (p-value < 0.001) and were observed across species (manuscript in preparation).

List of Publications

Kamikawa, Y., Hori, Y., Yamashita, K., Jin, L., Hirayama, S., Standley, D.M., and Kikuchi, K. (2016). Design of a protein tag and fluorogenic probe with modular structure for live-cell imaging of intracellular proteins. **Chemical Science**.

Kouwaki, T., Okamoto, T., Ito, A., Sugiyama, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Kusakabe, S., Hirano, J., Fukuhara, T., Yamashita, A., *et al.* (2016). Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication through

interaction with HBx. **Journal of virology**.

Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandenbon, A., Wessels, H.H., Ori, D., Uehata, T., Tartey, S., Akira, S., Suzuki, Y., *et al.* (2015). Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. **Cell** *161*, 1058-1073.

Ohshima, J., Sasai, M., Liu, J., Yamashita, K., Ma, J.S., Lee, Y., Bando, H., Howard, J.C., Ebisu, S., Hayashi, M., *et al.* (2015). RabGDIalpha is a negative regulator of interferon-gamma-inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii*. **Proc. Natl .Acad. Sci. U S A** *112*, E4581-4590.

Onishi, M., Ozasa, K., Kobiyama, K., Ohata, K., Kitano, M., Taniguchi, K., Homma, T., Kobayashi, M., Sato, A., Katakai, Y., *et al.* (2015). Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Spikes Local Inflammation That Induces Th2 Cell and T Follicular Helper Cell Responses to the Coadministered Antigen. **Journal of immunology** *194*, 2673-2682.

Standley, D.M: A structural view of immune repertoires, Australian National University & Institute for Protein Research Joint Symposium 2015, The Australian National University, Canberra, Australia, 14-16 November, 2015.

Yamashita, K, Standley, D.M: NGS data-driven docking of protein-RNA complexes, Institute for Protein Research Seminar, Osaka, 6 March, 2015.

Laboratory of Viral Pathogenesis

Members

Professor	Yoshio Koyanagi
Assistant Professor	Hiroataka Ebina
Assistant Professor	Kei Sato
Research Fellow	Taisuke Izumi
Research Fellow	Rokusuke Yoshikawa
Research Fellow	Yusuke Nakano
Graduate Student	Eri Yamada, Shuhei Ueda, Miyu Moriwaki
Government Scholarship	Andrew Soper
Technical assistant	Naoko Misawa

Introduction

We have been focusing on basic researches of retroviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), simian immunodeficiency virus (SIV) and other animal retroviruses. The goal of our researches is to elucidate the molecular mechanisms of viral pathogenesis and find the strategy for treatment. We have a project to introduce a method to "quantitatively" describe the virus infection and discuss the potential of mathematical based analyses for Virology. Then, we quantitatively elucidated the dynamics of cell-to-cell and cell-free HIV-1 infection modes (Iwami and Takeuchi *et al.* eLife, 2015). We also found how APOBEC3 in their anti-viral modes and an evolutionary arms race between the domestic cat and its cognate lentivirus (Yoshikawa *et al.*, *J. Virol*, 2015). We have other series of projects from genome tools combined with cell culture systems. We created a genome-editing tool targeting HIV-1 using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) system and developed a procedure to remove HIV-1 provirus from infected T cells (Ebina *et al.* PLoS One, 2015).

Topics

1) Experimental-mathematical investigation on HIV-1 cell-to-cell infection: K. SATO, S. IWAMI and Y. KOYANAGI

Cell-to-cell viral infection, in which viruses spread through contact of infected cell with surrounding uninfected cells, has been considered as a critical mode of virus infection. However, since it is technically difficult to experimentally discriminate the two modes of viral infection, namely cell-free infection and cell-

to-cell infection, the quantitative information that underlies cell-to-cell infection has yet to be elucidated, and its impact on virus spread remains unclear. To address the fundamental question in Virology, we quantitatively analyzed the dynamics of cell-to-cell and cell-free HIV-1 infections through experimental-mathematical investigation. Our analyses demonstrated that the cell-to-cell infection mode accounts for approximately 60% of viral infection, and this infection mode shortens the generation time of viruses by 0.9 times and increases the viral fitness by 3.9 times. Our results suggest that even a complete block of the cell-free infection would provide only a limited impact on HIV-1 spread (Iwami and Takeuchi *et al*, *eLife*, 2015).

2) Evolutionary arms race between cats and their lentiviruses: R. YOSHIKAWA, Y. NAKANO, E. YAMADA, T. IZUMI, K. SATO, and Y. KOYANAGI

Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) DNA cytosine deaminases can be incorporated into progeny virions and inhibit lentiviral replication. On the other hand, viral infectivity factor (Vif) of lentiviruses antagonizes APOBEC3-mediated anti-viral activities by degrading APOBEC3 proteins. It is known that domestic cat (*Felis catus*) APOBEC3Z3, the ortholog of human APOBEC3H, potently suppresses the infectivity of *vif*-defective feline immunodeficiency virus (FIV). Although a recent report has shown that domestic cat encodes 7 haplotypes (hap I-VII) of APOBEC3Z3, the relevance of APOBEC3Z3 polymorphism in domestic cats with FIV Vif has yet to be addressed. In this study, we found that these feline APOBEC3Z3 variants suppress *vif*-defective FIV infectivity. We also found that the codon 65 of feline APOBEC3Z3 is a positively selected site, and that APOBEC3Z3 hap V is under positive selection during evolution. Particularly noteworthy, feline APOBEC3Z3 hap V is resistant to FIV Vif-mediated degradation and still inhibits *vif*-proficient viral infection. Moreover, the side chain size, but not its hydrophobicity, of the amino acid positioned at 65 determines the resistance to FIV Vif-mediated degradation. Furthermore, phylogenetic analyses infer that feline APOBEC3Z3 hap V emerged approximately 60,000 years ago. Taken together, these findings suggest that feline APOBEC3Z3 hap V may have been selected to escape from an ancestral FIV. This is the first evidence for an evolutionary arms race between the domestic cat and its cognate lentivirus. (Yoshikawa *et al*, *J. Virol.*, 2015).

3) Genome-editing for HIV cure: H. EBINA, S. UEDA, M. MORIWAKI, N. MISAWA and Y. KOYANAGI

While highly active anti-retroviral therapy (HART) has dramatically decreased mortality from HIV-1 infection, there is currently no effective strategy to target the latent form of HIV-1 proviruses. We validated an HIV-1 proviral-editing strategy by using CRISPR/Cas9 system. We have previously demonstrated that HIV-1 proviral DNA could be excised from the chromosomal DNA of infected T cells after introduction of a RNA-guided endonuclease (RGN) targeting HIV-1 LTR (Ebina *et al. Sci. Rep.* 2013). In this study, we constructed a TALEN system targeting the same HIV-1 LTR site that resulted in more than 90% of HIV-1 proviral DNA

being successfully removed from the T cell lines when mRNA is used as the vehicle for transfection (Ebina *et al. PLoS One*. 2015). Recently, we also found that HIV-1 replication is clearly suppressed in the T cell culture when the RGN targeting LTR was constitutively transduced with lentiviral vector. Our results indicated that genome-editing technologies targeting LTR have a great potential to suppression of HIV-1 replication and can be an alternative strategy for HIV therapy for cure.

4) HIV genome imaging with genome editing technologies: H. EBINA, T. IZUMI, S. UEDA and Y. KOYANAGI

We have developed an HIV genome imaging systems. To visualize HIV-1 provirus, multiple copies of LacO repeat sequences was firstly inserted into provirus with RGN-mediated knock-in method. Then, the LacO repeat sequence was visualized by transduction of LacI fusion protein with GFP. This provirus imaging system revealed the distribution of HIV-1 provirus locus in nuclei to be located at nuclear rim. We also developed HIV-1 RNA imaging system in virion with custom pentatricopeptide repeat (PPR) proteins. We collaborated with Dr. Nakamura at Kyusyu University. We are able to design several customized PPR proteins binding HIV-1 RNA sequences. Viral RNA incorporated into viral particle was detected when the PPR fusion proteins with GFP were transduced in virus-producing cells. These novel HIV genome-imaging technologies are promising tool to reveal the dynamics of viral genome in living cell.

List of Publications

Yoshikawa, R.*, Takeuchi, J.S.*, Yamada, E., Nakano, Y., Ren, F., Tanaka, H., Münk, C., Harris, R.S., Miyazawa, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2015). Vif determines the requirement for CBF- β in APOBEC3 degradation. **J. Gen. Virol.**, 96, 887-892. *Equal contribution.

Yamada, E., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Misawa, N., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2015). Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: illuminating the roles of viral accessory proteins *in vivo*. **Viruses** 7, 1373-1390.

Kakizoe, Y., Morita, S., Nakaoka, S., Takeuchi, Y., Sato, K., Miura, T., Beauchemin, C.A. and Iwami, S. (2015). A conservation law for virus infection kinetics *in vitro*. **J. Theor. Biol.** 376, 39-47.

Nakano, Y., Matsuda, K., Yoshikawa, R., Yamada, E., Misawa, N., Hirsch, V.M., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2015). Down-modulation of primate lentiviral receptors by Nef proteins of simian immunodeficiency virus (SIV) of chimpanzees (SIVcpz) and related SIVs: implication for the evolutionary event at the emergence of SIVcpz. **J. Gen. Virol.** 96, 2867-2877.

Iwami, S.*, Sato, K.*, Morita, S., Inaba, H., Kobayashi, T., Takeuchi, J.S., Kimura, Y., Misawa, N., Ren, F., Iwasa, Y., Aihara, K. and Koyanagi, Y. (2015). Pandemic HIV-1 Vpu overcomes intrinsic herd immunity mediated by tetherin. **Sci. Rep.** 5, 12256. *Equal contribution.

Sato, K., Kobayashi, T., Misawa, N., Yoshikawa, R., Takeuchi, J.S., Miura, T., Okamoto, M., Yasunaga, J-i., Matsuoka, M., Ito, M., Miyazawa, T. and Koyanagi, Y. (2015). Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. **Sci. Rep.** 5, 14040.

Iwami, S.*, Takeuchi, J.S.*, Nakaoka, S., Mammano, F., Clavel, F., Inaba, H., Kobayashi, T., Misawa, N., Aihara, K., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2015). Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. **eLife** 4, e08150. *Equal contribution.

Takeuchi, J.S.*, Ren, F.*, Yoshikawa, R.*, Yamada, E., Nakano, Y., Kobayashi, T., Matsuda, K., Izumi, T., Misawa, N., Shintaku, Y., Wetzel, K.S., Collman, R.G., Tanaka, H., Hirsch, V.M., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2015). Coevolutionary dynamics between tribe *Cercopithecini* tetherins and their lentiviruses. **Sci. Rep.** 5, 16021. *Equal contribution.

Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N., Sakuma, T., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Koyanagi, Y. (2015). A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. **PLoS One** 10, e0120047.

蝦名博貴、小柳義夫 (2015) ゲノム編集の HIV への応用 株式会社エヌ・ティー・エス 進化するゲノム編集技術、271-278.

蝦名博貴、小柳義夫 (2015) ゲノム編集と AIDS 治療 . 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ 252、189-193.

Koyanagi Y.: Genome-editing technologies for HIV proviral DNA, JSPS Core-to-Core Program 1st International Symposium on Virus Infections and Host Responses, Kyoto 2015 年 1 月 27 日 .

Koyanagi Y. and Ebina H.: Genome-editing technologies for excision of HIV provirus. The U.S-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Taipei, 2015 年 1 月 29 日 .

Koyanagi Y., Ebina H., Sakuma T. and Yamamoto T.: Genome-editing technologies for excision of HIV proviral DNA, Palm Springs Symposium on HIV/AIDS, 2015 年 3 月 7 日 .

Sato, K., Misawa, N., Takeuchi, J. S., Kobayashi, T., Yamada, E., Nakano, Y., Yoshikawa, R., and Koyanagi, Y.: Experimental adaptive evolution of SIVcpz to humans using humanized mouse model, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2015 年 5 月 21 日 .

Yoshikawa, R., T. Izumi, Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Ren, F., Carpenter, M. A., Ikeda, T., Münk, C., Harris, R. S., Miyazawa, T., Sato, K., and Koyanagi, Y.: A naturally occurring domestic cat APOBEC3 variant confers resistance to FIV infection, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2015 年 5 月 22 日 .

蝦名博貴、上田修平、三沢尚子、金村優香、小柳義夫：ゲノム編集法の HIV 感染症治療への有用性，第 62 回日本実験動物学会総会シンポジウム（招待講演）、京都、2015 年 5 月 .

佐藤佳：チンパンジーからのエイズウイルス適応原理の解析，第 17 回白馬シンポジウム，米子，2015 年 6 月 19 日 .

蝦名博貴：ゲノム編集を利用した HIV 研究，第 18 回日本レトロウイルス研究会夏季セミナー、名古屋、2015 年 7 月 10 日 .

上田修平、蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫：ゲノム編集レンチウイルスベクターによる HIV-1 の複製抑制，第 18 回日本レトロウイルス研究会夏季セミナー、名古屋、2015 年 7 月 10 日 .

吉川禄助，泉泰輔，山田英里，中野雄介，任鳳蓉，宮沢孝幸，佐藤佳，小柳義夫：ネコ APOBEC3Z3 多型と FIV 感染感受性との関係性，第 21 回野生動物医学会，江別，2015 年 8 月 1 日 .

山田英里，中野雄介，吉川禄助，泉泰輔，小林朋子，任鳳蓉，宮沢孝幸，小柳義夫，佐藤佳：ウシ族の進化とレンチウイルスの関連についての考察，第 21 回野生動物医学会，江別，2015 年 8 月 1 日 .

泉 泰輔，佐藤 佳，小柳 義夫：宿主因子 APOBEC3 の多様化に伴うレトロウイルスの適応進化，第 17 回日本進化学会（シンポジウム），東京，2015 年 8 月 20 日 .

吉川禄助，泉泰輔，山田英里，中野雄介，任鳳蓉，宮沢孝幸，佐藤佳，小柳義夫：動物レンチウイルスからみるウイルスと宿主の共進化，第 17 回日本進化学会，東京，2015 年 8 月 20 日 .

吉川禄助、竹内（柴田）潤子、山田英里、中野雄介、木村雄一、橋本暁、宮沢孝幸、佐藤佳、小柳義夫：自然発生 Vif 変異によるレンチウイルスの弱毒化，第 158 回日本獣医学会，十和田，2015 年 9 月 7 日 .

Koyanagi, Y. and Sato K.: Host restriction factors for HIV infection, IFOM-KU Joint Symposium (シンポジウム), Kyoto, 2015 年 10 月 6 日 .

Sato, K. : Evolutionary dynamics of HIV-1-lineage lentiviruses and primates: evolutionary arms race between viral protein and host protein, Innovative Mathematical Modeling for the Analysis of Infectious Disease Data, Sapporo, 2015 年 10 月 30 日 .

Yoshikawa, R., T. Izumi, Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Ren, F., Miyazawa, T., Sato, K., and Koyanagi, Y.: Evolutionary arms race between domestic cat (*Felis catus*) and its cognate lentivirus (FIV), 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 , 福岡 2015 年 11 月 22 日 .

Yamada, E., Yoshikawa, R., T. Izumi, Nakano, Y., Misawa, N., Kobayashi, T., Ren, F., Sato, K., and Koyanagi, Y.: Functional positive selection of a bovine APOBEC3 driven by bovine lentivirus, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 , 福岡 , 2015 年 11 月 22 日 .

Sato, K.: Dynamics of HIV-1 infection in humanized mouse model, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 (シンポジウム), 福岡 , 2015 年 11 月 24 日 .

Sato, K.: Evolutionary arms race between viruses and mammals: an interdisciplinary research of experimental virology and molecular phylogenetic, 日本バイオインフォマティクス学会生命システム理論研究会 (招待講演), 東京 , 2015 年 11 月 27 日 .

Sato, K. and Koyanagi, Y.: Impact of genetic and functional changes in HIV-1 and SIVcpz transmission, 第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会 (シンポジウム), 東京 , 2015 年 11 月 30 日 .

上田真保子、泉泰輔、佐藤佳、中川草.: エボラウイルス糖蛋白質 (GP) 遺伝子の分子進化解析, BMB2015, 神戸 , 2015 年 12 月 3 日 .

中野雄介、山田英里、吉川禄助、泉泰輔、小林朋子、三沢尚子、任鳳蓉、佐藤佳、小柳義夫.: ウシ族の進化過程における APOBEC3Z2 蛋白質の発現レベル多様性の出現 , BMB2015, 神戸 , 2015 年 12 月 3 日 .

蝦名博貴、上田修平、三沢尚子、金村優香、小柳義夫 : Application of genome editing technologies in HIV research, 第 38 回日本分子生物学会シンポジウム (招待講演)、神戸、2015 年 12 月 3 日 .

上田修平、蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫 : RGN 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制 , 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 4 日 .

小柳 義夫、佐藤佳、蝦名博貴：HIV 感染抑制のための細胞性分子標的，北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染・免疫・炎症・発癌」、札幌．2015 年 12 月 18 日．

【その他】

1. アウトリーチ活動として、12 月 11 日に大阪府立大手前高等学校（スーパーサイエンスハイスクール）の生徒が研究室見学に訪れ、講義を行った．
2. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会で、佐藤佳助教が杉浦奨励賞を受賞した。

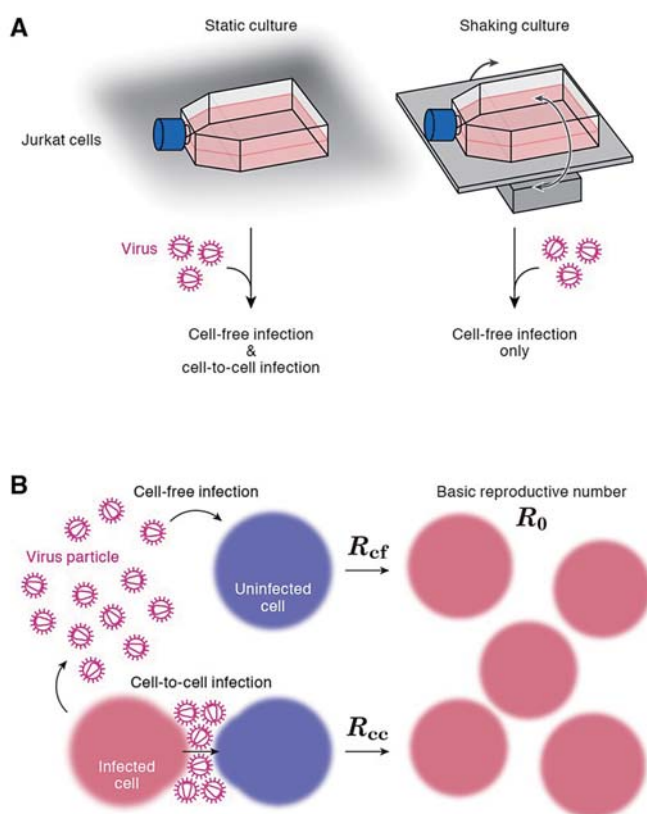
教授	小柳義夫
助教	蝦名博貴
助教	佐藤 佳
研究員	泉 泰輔
研究員	吉川禄助
研究員	中野雄介
大学院生	山田英里、上田修平、森脇美優
国費留学生	Andrew Soper
教務補佐員	三沢尚子

金村優香は平成 27 年 3 月に医科学博士課程を修了し、就職した。森脇美優は平成 27 年 4 月に生命科学研究科修士課程に入学した。Andrew Soper は平成 27 年 3 月にニュージーランドより国費留学生として来日した。中野雄介と泉泰輔が平成 27 年 4 月より研究員となった。佐藤佳が 7 月から 10 月までグラスゴー大学に長期出張した。11 月の日本ウイルス学会学術集会で、佐藤佳助教が杉浦奨励賞を受賞した。

以下の 4 つのテーマについて研究を遂行している。

1. HIV-1 複製モードの数理科学的解析

HIV-1 の感染には、細胞外に放出されたウイルス粒子が新たな標的細胞に感染する“cell-free 感染”と、感染細胞が大量のウイルス粒子を標的細胞に接触して直接受け渡す“cell-to-cell 感染”という 2 つの様式（モード）がある。本研究では、培養細胞を用いたウイルス学実験を行う際に、HIV-1 の cell-to-cell 感染を阻害するために、培養プラス

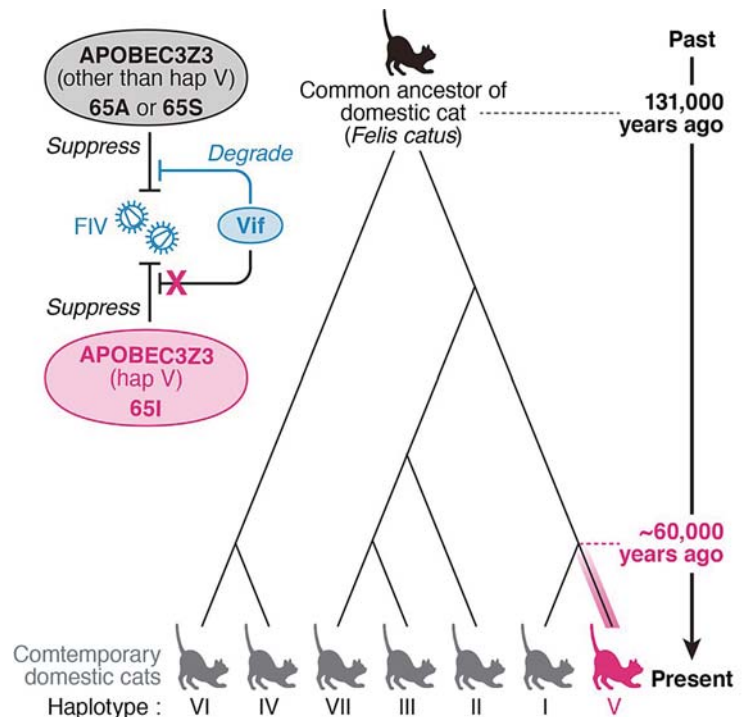


コを揺らしながらウイルス感染実験を行うことで細胞間の接触を物理的に阻害し、ウイルス感染様式から cell-to-cell 感染を排除した（上図 A）。上図の B の基本再生産数“ R_0 ”は、ひとつの感染細胞が生み出す次代の感染細胞数を表す指標であり、Cell-free 感染によって生じる感染細胞の基本再生産数を R_{cf} 、cell-to-cell 感染によって生じる感染細胞の基本再生産数を R_{cc} と定義し、実験データの数理解析を行い、コンピューターシミュレーションを駆使して、cell-to-cell 感染と cell-free 感染が混在する通常の培養系（静置培養）からの取得時系列データと、cell-free 感染のみの振とう培養系から取得した時系列データを解析することで、それぞれの感染様式の寄与率を数学的指標により定量化した。本研究成果は、HIV-1 の感染を防ぐためのまったく新しい作用メカニズムをもつ抗ウイルス薬の開発を加速させることに繋がることが期待される。本研究は岩見真吾博士（九州大学）との共同研究である（Iwami and Takeuchi *et al. eLife*, 2015）。（佐藤佳、岩見真吾、小柳義夫）

2. レンチウイルスと宿主因子の進化的軍拡競争の解析

ほ乳類がコードする DNA シチジン脱アミノ化酵素 APOBEC3 は、レンチウイルス粒子に取り込まれ、その感染・複製を強力に阻害する活性を持つ。一方、レンチウイルスがコードする Vif タンパク質は、ウイルス産生細胞内の APOBEC3 タンパク質をユビキチン・プロテアソーム経路依存的に分解することにより、その抗ウイルス活性を拮抗阻害する。HIV に代表されるレンチウイルスは、その進化過程において、宿主の抗ウイルス因子を拮抗阻害するタンパク質を獲得してきた。その例として、HIV-1 の起源であるサル免疫不全ウイルス（SIV）と、サルの抗ウイルス因子 APOBEC3 の関連が知られている。SIV は、アフリカに棲息するさまざまなサルに自然感染し、それぞれのサル種ごとに独自のウイルスとして進化・適応している。SIV のサルへの適応進化過程において、それぞれの宿主の APOBEC3G とそれぞれの SIV の Vif の間には、遺伝的・機能的相違性が知られている。霊長類以外のほ乳類にもレンチウイルスは見出されており、またほとんどのレンチウイルスが Vif をコードしていることから、Vif と APOBEC3 の進化的軍拡競争は、レンチウイルスとほ乳類に共通する事象であると推察される。その一例として、イエネコ（*Felis catus*）がコードする抗ウイルス因子 APOBEC3Z3 と、イエネコの病原性レンチウイルスである FIV の Vif の関連性が挙げられる。近年、イエネコの APOBEC3Z3 遺伝子には多型があり、少なくとも 7 つのハプロタイプ（Hap I ~ VII）があることが報告された（de Castro *et al. Infect Genet Evol*, 2014）。しかしながら、このイエネコ APOBEC3Z3 の多型と FIV Vif の機能的・進化的関連については不明であった。本研究では、実験ウイルス学と分子系統学を融合させ、イエネコの APOBEC3Z3 と FIV の進化的軍拡競争を実験的に検証した。まず、イエネコ APOBEC3Z3 遺伝子を分子系統学的に解析した結果、この遺伝子が正の淘汰を受けていること、また 65 番目のアミノ酸が正に選択されていることが示唆された。次に、7 つのイエネコ APOBEC3Z3 ハプロタイプの抗ウイルス活性について、実験ウイルス学的解析を行った結果、すべてのイエネコ APOBEC3Z3 ハプロタイプが同等の抗ウイルス活性を有している

ことが判った。一方、Hap V 以外のイエネコ APOBEC3Z3 ハプロタイプの抗ウイルス活性は FIV Vif タンパク質によって拮抗阻害されるのに対し、イエネコ APOBEC3Z3 Hap V (65 番目のアミノ酸がイソロイシン) は、検討したすべての FIV Vif タンパク質に対して耐性であることが明らかとなった。そこで、65 番目のアミノ酸の点変異体シリーズを作製し、Hap V の Vif 耐性が何によって規定されているかを実験的に検討した結果、表面積の大きいアミノ酸残基を持つ APOBEC3Z3 は、FIV Vif 耐性になることが明らかとなった。最後に、7 つのイエ



ネコ APOBEC3Z3 遺伝子ハプロタイプの配列情報、および、イエネコ (*Felis catus*) の分岐年代情報を基に、Bayesian evolutionary analysis by sampling trees (BEAST) 解析を行い、イエネコ APOBEC3Z3 Hap V の出現年代を推定した。その結果、イエネコ APOBEC3Z3 Hap V は、約 60,000 年前（後期更新世）に正の選択によって出現したことが示唆された。以上の結果から、イエネコの進化過程において、APOBEC3Z3 Hap V が正に選択されてきたこと、またその進化が祖先の FIV Vif タンパク質によって駆動されたことが強く示唆された。本研究は、ある宿主とウイルスの共進化過程で起こった進化的軍拡競争を実験的に実証する初めての知見である (Yoshikawa et al, *J Virol*, 2015)。(吉川禄助、中野雄介、山田英里、泉泰輔、佐藤佳、小柳義夫)

上図の説明：7 つのイエネコ APOBEC3Z3 遺伝子ハプロタイプの進化系譜。7 つのイエネコ APOBEC3Z3 遺伝子ハプロタイプの配列情報、および、イエネコ (*Felis catus*) の分岐年代情報を基に、Bayesian evolutionary analysis by sampling trees (BEAST) 解析を行い、イエネコ APOBEC3Z3 Hap V の出現年代を推定した。その結果、イエネコ APOBEC3Z3 Hap V は、約 60,000 年前（後期更新世）に正の選択によって出現したことが示唆された。

3. HIV 感染細胞除去に向けたゲノム編集法

現行の抗 HIV 剤併用療法では HIV 潜伏感染細胞の除去は不可能であり、そのため HIV 感染症の治癒は望めない。そこで我々は、細胞プロウイルスの任意の配列に切断と変異を誘導するゲノム編集技術を用いて、ウイルスの不活化ならびに除去する新規 HIV 治療技術の開発を行なっている。これまでに、HIV LTR を標的とする CRISPR/Cas システムの HIV 感染潜伏細胞への導入より、LTR プ

ロモーターへの indel 変異の誘導による HIV プロウイルスの不活性化、ならびに、プロウイルス両端にある LTR の同時切断によるプロウイルス内部配列の除去が可能であることを見いだした (Ebina *et al. Sci. Rep.* 2013)。さらに、同じ LTR を標的とする TALENs の改良により、きわめて強力なプロウイルスの不活性化と排除が可能であることを見いだした (Ebina *et al. PLoS One.* 2015)。現在は、さらなるプロウイルス編集効率の向上を目指し、組換え TALENs の精製、並びに、その導入方法に関する研究を行っている。その他、レンチウイルスベクター導入系を用いた HIV 標的 CRISPR/Cas システムを開発し、HIV 感染抵抗性を付与することが可能であることも見出した。ゲノム編集技術の応用により、HIV 感染症の治癒を現実化されるかもしれない。(蝦名博貴、上田修平、森脇美優、三沢尚子、小柳義夫)

4. ゲノム編集技術開発

ゲノム編集法を応用したウイルスゲノムのイメージング法の開発を行っている。CRISPR/Cas システムを用いてプロウイルス特異的に LacO 反復配列をノックインし、その細胞に GFP 融合 LacI を発現させることで、HIV プロウイルスの核内座位の解析を可能とした。その結果、プロウイルスは核膜近郊に存在する傾向があることを見出した。また、九州大学の中村崇裕准教授との共同研究により、HIV RNA ゲノムを特異的に認識するカスタム pentatricopeptide repeat (PPR) 蛋白質を構築し、HIV RNA ゲノムの標識も可能とした。蛍光蛋白質融合 PPR 蛋白質をウイルス産生細胞に導入することで、ウイルス粒子への PPR 蛋白質の取り込みが確認されたことから、ウイルス粒子内のウイルス RNA の標識に利用可能であることが示唆された。これらウイルスゲノム標識システムを用いることで、HIV プロウイルスの潜伏化、活性化の核内動制御システム、ならびに、ウイルス RNA ゲノムの動態制御に関する新たな知見を見出すことが可能となる。(蝦名博貴、泉泰輔、上田修平、小柳義夫)

Laboratory of Virus Control

Members

Professor	Masao Matsuoka
Lecturer	Jun-ichirou Yasunaga
Assistant Professor	Kazuya Shimura
Research Fellow	Kenji Sugata
Research Fellow	Guangyong Ma
Research Fellow	Yuichi Mitobe
Medical laboratory technologist	Chiho Onishi
Secretary	Yu Furukawa
Graduate Student	Keiko Yasuma, Akihiro Kawatsuki, Yu Mitagami, Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed, Rie Furuta, Haruka Kinoshita, Takashi Matsumoto, Sotaro Komohara
Research Student	Guillermo Juárez Fernández

Introduction

Both human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and human immunodeficiency virus (HIV) are pathogenic human retroviruses. HTLV-1 promotes clonal proliferation of CD4⁺ T cells, which leads to adult T-cell leukemia (ATL), while HIV destroys CD4⁺ T cells resulting in onset of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Our research objectives are to understand the molecular mechanisms of virus-induced diseases, and to develop novel therapeutic strategies through research of these human retroviruses.

Topics

1) Molecular mechanisms of HTLV-1-induced pathogenesis: J. YASUNAGA, C. ONISHI, K. SUGATA, G. MA, Y. MITOBE, K. YASUMA, A. KAWATSUKI, Y. MITAGAMI, M. MOHAMED, R. FURUTA, H. KINOSHITA, T. MATSUMOTO, S. KOMOHARA, G. FERNANDEZ, and M. MATSUOKA.

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an etiological retrovirus of a neoplastic disease of CD4⁺CD25⁺ T cells, adult T-cell leukemia (ATL), and several inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis. HTLV-1 provirus encodes two oncogenes *tax*

and *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* in its plus and minus strand, respectively. It is suggested that Tax is critical in viral replication and transmission, while HBZ plays important roles in clonal proliferation of infected cells, inflammation, and oncogenesis. We generated HBZ-transgenic (HBZ-Tg) mice and reported that HBZ-Tg mice developed inflammation and T-cell lymphoma. We further established HBZ-Tg/interferon-gamma (IFN- γ) knockout mice, and found that IFN- γ promotes inflammation and lymphomagenesis induced by HBZ. And, importantly, severity of inflammation was closely related to development of lymphoma, suggesting that inflammation accelerates malignant transformation of HBZ-transgenic CD4⁺ T cells. Those findings were reported in PLoS Pathogens. Previously we reported that HBZ functions in two different molecular forms, HBZ protein and *HBZ* RNA, and both could promote proliferation of CD4⁺ T cells. Regarding apoptosis, *HBZ* RNA and HBZ protein have the opposite effect; the former inhibits apoptosis, but the latter enhances it. As the molecular mechanisms, we found that *HBZ* RNA induces anti-apoptotic factor, survivin, at the transcriptional level, whereas HBZ protein binds to Rb protein and overactivates E2F-1 resulting in the activation of the p53/p73 pathways. These results were published in Cancer research and Oncogene, respectively.

2) Analysis of dynamics of HTLV-1-infected cells in vivo and its molecular mechanisms: J. YASUNAGA, K. SUGATA, G. MA, R. FURUTA, and M. MATSUOKA.

It is known that HTLV-1 predominantly infects peripheral mature CD4⁺ T cells. However, the mechanisms remain unclear. Furthermore, HTLV-1 infection in immature thymocytes has not been investigated so far. Immature T cells in thymus express high level of two transcription factors named TCF1 and LEF1 for normal thymocyte development. We found that TCF1 and LEF1 inhibit activities of viral Tax protein that is indispensable for HTLV-1 replication. On the other hand, in peripheral mature T cells, TCF1 and LEF1 are expressed lower than in thymus and consequently facilitate HTLV-1 replication in this population. Tax is also able to down-regulate the expression of TCF1 and LEF1, further enhancing HTLV-1 replication. These findings indicate the molecular mechanisms by which HTLV-1 preferentially targets peripheral T cells. These findings were published in PNAS.

3) Analysis of anti-HTLV-1 immunity in vivo and development of anti-HBZ vaccine: J. YASUNAGA, K. SUGATA, and M. MATSUOKA.

We evaluated the effects of HBZ-expressing vaccinia virus as a vaccine, and confirmed that it could induce significant immune response against HBZ in mice and Rhesus macaques. Simian T-cell leukemia virus type 1 (STLV-1) is a Delta type retrovirus related to HTLV-1, and the structure of these viruses is very close. We noticed that approximately 60% of Japanese macaques are naturally infected with STLV-1, and found that the dynamics of STLV-1-infected cells in the monkeys are quite similar to that of HTLV-1-infected cells in the human carriers. STLV-1 infected mainly CD4⁺ T cells, and induced the clonal proliferation of infected cells,

leading to malignant transformation of T cells in a small number of the infected macaques. STLV-1 Tax and STLV-1 bZIP factor (SBZ) have the same molecular functions of HTLV-1 Tax and HBZ, respectively. These observations indicate that STLV-1-infected Japanese macaque is a highly valuable animal model to study the association between viral pathogenesis and immune response in HTLV-1 carriers, and to develop new antiviral treatments. We are trying to develop the effective anti-HTLV-1 vaccines using this animal model.

4) HBZ-mediated suppression of immune response against HTLV-1: J. YASUNAGA, K. SHIMURA, K. SUGATA, K. YASUMA, and M. MATSUOKA.

According to the results of RNA-Seq, we found that a co-inhibitory molecule, T cell immunoglobulin and ITIM domain (*TIGIT*) was upregulated by HBZ. HBZ induced IL-10 production through TIGIT in HBZ-expressing CD4⁺ T cells, and, in addition, IL-10 was also induced in dendritic cells through a ligand of TIGIT, CD155, on their surface. It is suggested that TIGIT impairs anti-HTLV-1 immune responses through the immunosuppressive cytokine, IL-10. These findings show that HTLV-1 utilizes a co-inhibitory molecule on infected cells to evade the host immune responses.

5) Effect of HIV-1 infection pathway on infectivity and drug susceptibility: K. SHIMURA and M. MATSUOKA

HIV-1 infects target cells more efficiently via the cell-to-cell pathway, compared to the cell-free pathway. In order to analyze the impact of cell infection route on infectivity and drug susceptibility, we developed an assay system, which enabled the precise evaluation of virus infection using flow cytometry. Using this system, we revealed that anti-HIV drugs that target viral replication cycles including adsorption, fusion, reverse transcription, and integration, showed a decreased level of activity in the cell-to-cell pathway. Moreover, we established latently HIV-1-infected cells, and analyzed the potency of several latency-reversing agents on HIV-1 reactivation and the activity of anti-HIV drugs in cell-to-cell infection using reactivated cells. We found that JQ-1, a BRD4 inhibitor, efficiently reactivated HIV, as evidenced by the up-regulation of a reporter gene and the induction of virus production, but without cellular activation. Furthermore, we observed that several anti-HIV drugs, such as AZT and TDF, showed weak activity against cell-to-cell infection using reactivated HIV-1-infected cells.

List of Publications

Yasuma K, Yasunaga JI, Takemoto K, Sugata K, Mitobe Y, Takenouchi N, Nakagawa M, Suzuki Y, and Matsuoka M. (2016). HTLV-1 bZIP factor impairs anti-viral immunity by inducing co-inhibitory molecule, T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). **PLoS Pathog**, 12: e1005372.

Kawatsuki A, Yasunaga JI, Mitobe Y, Green PL, and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4⁺ T cells. **Oncogene** (in press).

Mitobe Y, Yasunaga JI, Furuta R, and Matsuoka M. (2015). HTLV-1 bZIP factor (HBZ) RNA and protein impart distinct functions on T cell proliferation and survival. **Cancer Res**, 75: 4143-4152.

Yasuma K, Matsuzaki T, Yamano Y, Takashima H, Matsuoka M, Saito M. HTLV-1 subgroups associated with the risk of HAM/TSP are related to viral and host gene expression in peripheral blood mononuclear cells, independent of the transactivation functions of the viral factors. **J Neurovirol**, (in press).

Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga JI, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon S, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. (2015). Integrated molecular analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Nat Genet**, 47: 1304-1315.

Mitagami Y, Yasunaga JI, Kinoshita H, Ohshima K, and Matsuoka M. (2015). Interferon- γ promotes inflammation and development of T-cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor transgenic mice. **PLoS Pathog**, 11: e1005120.

Sugata K, Yasunaga JI, Mitobe Y, Miura M, Miyazato P, Kohara M and Matsuoka M. (2015). Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. **Blood**, 126: 1095-1105.

Sato K, Kobayashi T, Misawa N, Yoshikawa R, Takeuchi JS, Miura T, Okamoto M, Yasunaga JI, Matsuoka M, Ito M, Miyazawa T, and Koyanagi Y. (2015). Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. **Sci Rep**, 5:14040.

Shimura K, Miyazato P, Oishi S, Fujii N, and Matsuoka M. (2015). Impact of HIV-1 infection pathways on susceptibility to antiviral drugs and on virus spread. **Virology** 484:364-376.

Ma G, Yasunaga JI, Akari H, and Matsuoka M. (2015). TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 112: 2216-2221.

Okazaki S, Oishi S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Matsuoka M, Fujii N. (2015).

Investigations of possible prodrug structures for 2-(2-mercaptophenyl) tetrahydropyrimidines: reductive conversion from anti-HIV agents with pyrimidobenzothiazine and isothiazolopyrimidine scaffolds. **Org Biomol Chem** 13: 4706-4713.

Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. (2015). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. **Cancer Sci**, 106: 461-465.

Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. (2015). Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leukemia** 29: 1425-1444.

Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Matsuoka M, Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Fukuda T, Miura O, Takaishi S, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. (2015). Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukemia/lymphoma in a pilot study. **Br J Haematol** 169: 356-367.

Okazaki S, Mizuhara T, Shimura K, Murayama H, Ohno H, Oishi S, Matsuoka M, Fujii N. (2015). Identification of anti-HIV agents with a novel benzo [4,5]isothiazolo [2,3-a]pyrimidine scaffold. **Bioorg & Med Chem** 23: 1447-52.

Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. (2015). Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. **Transfusion**, 55: 880-889.

Masao Matsuoka : Role of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Viral Pathogenesis : Keystone Symposia Meeting Series : Viruses and Human Cancer, Big Sky, Montana, USA, March 29-April 3, 2015

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の生き残り戦略と病原性、第 22 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、長野、2015 年 10 月 23 日

Masao Matsuoka : HTLV-1 bZIP factor (HBZ) and Tax : the Yin and Yang of viral survival and pathogenesis. : 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV & Related Viruses, Martinique, June 18-21, 2015

Kenji Sugata, Junichirou Yasunaga, Kisato Nosaka and Masao Matsuoka: Anti-CCR4 antibody activates virus specific immune response in HTLV-1 infected Japanese monkey. : 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV & Related Viruses, Martinique, June 18-21, 2015

Keiko Yasuma, Jun-ichirou Yasunaga, Keiko Takemoto, Kenji Sugata, Norihiro Takenouchi, Masanori Nakagawa, Yutaka Suzuki, Masao Matsuoka : Identification of TIGIT as an HBZ-Induced gene by genome-wide analyses: its association with evasion of host defense. : 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV & Related Viruses, Martinique, June 18-21, 2015

松岡雅雄: Molecular pathogenesis by HTLV-1 : JSPS Core-to Core Program International Research Network for Virus Infections and Host Responses 1st International Symposium Intranuclear Infection and Host Immunity、京都、2015 年 1 月 27-28 日

馬広勇 : TCF1 and LEF1 are T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax : 平成 26 年度文部科学省新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、東京、2015 年 1 月 27-28 日

Masao Matsuoka : Roles of HTLV-1 bZIP factor(HBZ) and tax genes in pathogenesis by HTLV-1 : The 5th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Kobe, February 26-27 2015

水戸部悠一、安永純一郎、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor RNA attenuates apoptosis through enhanced expression of survivin: 第 10 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、北海道、2015 年 7 月 23-24 日

水戸部悠一、安永純一郎、松岡雅雄 : HTLV-1 bZIP factor RNA は増殖を促進しアポトーシスを阻害する : 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2015 年 8 月 21-23 日

菅田謙治、安永純一郎、古田梨愛、松岡雅雄 : HBZ は CCR4 発現を誘導する : 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2015 年 8 月 21-23 日

内藤忠相、水戸部悠一、安間恵子、松岡雅雄、齊藤峰輝 : HAM 発症関連ウイルス型が Tax および HBZ の標的遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析 : 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2015 年 8 月 21-23 日

末廣陽子、飯野忠史、長谷川温彦、渡辺信和、崔日承、福田哲也、田野崎隆二、宇都宮與、松岡雅雄、豊嶋崇徳、赤司浩一、神奈木真理、鵜池直邦、岡村純 : ATL に対する Tax 標的樹状細胞ワクチ

ン療法：第 I 相臨床研究長期追跡結果：第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2015 年 8 月 21-23 日

安永純一郎、野坂生郷、小原道法、松岡雅雄：Immune response to STLV-1 bZIP factor is enhanced in STLV-1 infected Japanese monkeys after anti-CCR4 antibody treatment：第 74 回日本癌学会学術総会、愛知、2015 年 10 月 8 日 -10 日

紀ノ定明香、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor promotes proliferation of CD4⁺ T cells by interfering PD-1 inhibitory pathway：第 74 回日本癌学会学術総会、愛知、2015 年 10 月 8 日 -10 日

安間恵子、安永純一郎、松岡雅雄：Genome-wide analyses identify TIGIT as an HTLV-1 bZIP factor-induced gene：第 74 回日本癌学会学術総会、愛知、2015 年 10 月 8 日 -10 日

水戸部悠一、安永純一郎、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor RNA attenuates apoptosis through enhanced expression of survivin：第 74 回日本癌学会学術総会、愛知、2015 年 10 月 8 日 -10 日

Jun-ichirou Yasunaga, Yu Mitagami, Haruka Kinoshita, Koichi Ohshima, Masao Matsuoka：Pathogenic link between chronic inflammation and lymphomagenesis induced by HTLV-1 bZIP factor：第 77 回日本血液学会学術集会、石川、2015 年 10 月 16 日 -18 日

Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami, Kazuya Takizawa, Kenji Sugata, Madoka Kuramitsu, Kiyoko Nozima, Haruka Momose, Yoshihisa Asada, Atsushi Iwama, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi：The c-kit-SCF signaling in the leukemic stem cells development and differentiation in ATL mod1 mice：第 77 回日本血液学会学術集会、石川、2015 年 10 月 16 日 -18 日

Keisuke Kataoka, Teppei Shimamura, Akira Kitanaka, Genta Nagae, Yasunobu Nagata, Junichiro Yasunaga, Aiko Sato-Otsubo, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Kenichi Shiba, Hiroko Tanaka, Hiromichi Suzuki, Yusuke Sato, Yusuke Shiozawa, Tetsuichi Yoshizato, Kenichi Yoshida, Kotaro Shide, Yoko Kubuki, Tomonori Hidaka, Takuro Kameda, Masakatsu Hishizawa, Hidehiro Itonaga, Yoshitaka Imaizumi, Yasushi Miyazaki, Akifumi Takaori-Kondo, Satoru Miyano, Masao Matsuoka, Hiroyuki Aburatani, Kazuya Shimoda, Seishi Ogawa：Aberrant CpG island hypermethylation in adult T-cell leukemia/lymphoma：第 77 回日本血液学会学術集会、石川、2015 年 10 月 16 日 -18 日

Masao Matsuoka：How HTLV-1 causes diseases：第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Yu Mitagami, Jun-ichirou Yasunaga, Haruka Kinoshita, Koichi Ohshima, Masao Matsuoka：The role of

interfereon- γ in development of T-cell Lymphoma and inflammation by HTLV-1 bZIP factor : 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

総説

菅田謙治、松岡雅雄（2015）HTLV-1 感染の疫学と病原性発現機構 日本臨床 73 巻増刊号 8

教授	松岡 雅雄
講師	安永 純一郎
助教	志村 和也
研究員	菅田 謙治
	馬 広勇
教務補佐員	水戸部 悠一
臨床検査技師	大西 知帆
秘書	古川 悠
大学院生	安間恵子、川月章弘、三田上侑生、 Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed、古田梨愛、紀ノ定明香、 松本 尚、菰原聡大郎
研究生	Guillermo Juárez Fernández

当研究室には平成 27 年 4 月から薬学研究科修士課程 1 年の菰原聡大郎君とスペインからの研究生 Guillermo Juárez Fernández 君が加入し、総勢 17 名となった。松岡雅雄教授は昨年から引き続きウイルス研究所附属ヒトレトロウイルス研究施設の施設長を務めている。松岡教授は 3 月に米国モンタナ州で開催された Keystone Symposia Meeting Series、10 月に長野で開催された日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム等で招待講演を行った。さらに、6 月にフランス領マルティニーク島で行われた 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV & Related Viruses では基調講演を行った。

我々の研究室はヒトレトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 及びヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) の研究を行っている。HTLV-1 は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や様々な炎症性疾患の原因となり、HIV は免疫系の破壊により後天性免疫不全状態 (エイズ) を引き起こす。これらヒトレトロウイルスの研究を通じて “がん” “免疫” “ウイルス” の解析を行うと共に、その克服を目指した研究を推進している。

1) HTLV-1 病原性発現機構の解析

HTLV-1 は、CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球の悪性腫瘍である ATL、HTLV-1 関連脊髄症や HTLV-1

ぶどう膜炎といった炎症性疾患の原因となるヒトレトロウイルスである。HTLV-1 プロウイルスは、そのプラス鎖に *tax*、マイナス鎖に *HTLV-1 bZIP factor* (HBZ) をコードし、HTLV-1 の複製及び病原性に重要な役割を果たしている。これまでの解析から、Tax は HTLV-1 の複製や個体間伝播に必須であり、HBZ は感染者体内における感染細胞のクローナル増殖、炎症、発がん重要な役割を果たすと考えている。我々が樹立した HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) は皮膚炎、肺炎などの炎症や T リンパ腫を発症し、HTLV-1 感染者と類似した表現型を呈する。HBZ-Tg では制御性 T 細胞 (Treg) 及びインターフェロン γ (IFN- γ) 産生細胞が増加しており、病態への関与が示唆されていた。HBZ-Tg と IFN- γ ノックアウト (IFN γ KO) マウスを交配し、HBZ-Tg/IFN γ KO マウスを作製、解析したところ、IFN γ が HBZ による炎症と発がんに促進的に作用すること、また炎症が T リンパ腫の発症に関連していることが示唆された。本研究は PLoS Pathogens に掲載された。我々は 2006 年に、HBZ 遺伝子から転写される HBZ RNA は、タンパク質に翻訳される鋳型となるだけでなく、機能的 RNA として作用することも報告したが、その分子機構はほとんど不明であった。HBZ をマウスのプライマリー CD4⁺ T cell に遺伝子導入し、その形質を解析したところ、HBZ RNA およびタンパク質は共に細胞増殖を促進する一方で、HBZ RNA は発現細胞にアポトーシス抵抗性、HBZ タンパク質はアポトーシス誘導性を付与することが判明した。さらなる解析により、HBZ RNA の抗アポトーシス活性は抗アポトーシス因子である survivin の発現誘導により、HBZ タンパク質の活性は Rb との複合体形成による E2F-1 の異常活性化と p53/p73 経路の活性化によることが明らかとなった。これらの結果は Cancer research、Oncogene にそれぞれ発表した。

2) HTLV-1 感染細胞の生体内感染動態とその分子機構

HTLV-1 は主に末梢の成熟した CD4 陽性 T 細胞に感染しているが、胸腺などに存在する未熟な T リンパ球における感染の程度や、末梢性成熟 T リンパ球への指向性を規定する機構については知られていなかった。胸腺細胞など未熟 T リンパ球では、その分化に必須である転写因子 TCF-1 と LEF-1 を高発現しているが、我々はこれらが Tax の機能を阻害することを見出した。そのため HTLV-1 は TCF-1/LEF-1 の発現が少ない成熟した末梢 T リンパ球を標的として感染を拡大すると考えられた。さらに Tax は感染細胞で TCF-1 と LEF-1 の発現を抑制することでウイルスの拡大に有利に機能することも明らかとなった。この所見は HTLV-1 感染により成熟 T リンパ球の白血病、リンパ腫が惹起される分子機構の解明に繋がると考えられ、PNAS に掲載された。

3) HTLV-1 に対する免疫応答の解析とワクチン開発

HBZ は全ての感染細胞に発現するため、格好の治療標的である。HBZ を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルスを用いて、マウスおよびアカゲザルに HBZ 特異的免疫応答を誘導しうることが Blood に報告した。本研究結果は同雑誌の巻頭コメントにも取り上げられた。HTLV-1 とサル T

細胞白血病ウイルス 1 型 (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) は共にデルタレトロウイルス属に含まれ、約 9 割の塩基配列に相同性がある。我々の研究室は、本邦の固有種であるニホンザルの約 60% が STLV-1 に自然感染しており、STLV-1 感染と HTLV-1 感染の動態が極めて似ていることを報告した。例えば、STLV-1 は末梢 CD4 陽性 T 細胞を主な宿主とし、生体内で感染細胞のクローナルな増殖を惹起し、最終的に一部のサルは T 細胞性リンパ腫を発症する。STLV-1 は HTLV-1 Tax および HBZ に相当する STLV-1 Tax、STLV-1 bZIP factor (SBZ) をコードするが、これらの機能も HTLV-1 と同等であった。これらの所見は、STLV-1 感染ニホンザルが HTLV-1 研究に極めて有用な動物モデルであることを示しており、治療法開発に有用であると考えている。現在本モデルを用いて HTLV-1 に対するワクチンの開発を進めている。

4) HBZ による抗ウイルス免疫応答抑制機構の解析

HBZ 遺伝子を導入した細胞を用いて RNA-seq を行い、抑制性共刺激分子である T-cell immunoglobulin and ITIM domain receptor (TIGIT) の発現が HBZ により上昇することを見出した。HBZ は TIGIT の発現上昇により T 細胞からの IL-10 の産生を促進すると同時に、TIGIT のリガンドである CD155 を発現する樹状細胞からの IL-10 の産生も促すことが明らかとなった。IL-10 は抑制性サイトカインであり、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞に発現する TIGIT が宿主免疫からの回避に関与することを示唆している。

5) HIV-1 細胞感染経路がウイルス感染性・抗ウイルス薬感受性に与える影響

HIV-1 が細胞に感染する経路は、細胞外のウイルス粒子によるセルフリー感染と、感染細胞からの直接的な感染伝播による細胞間感染に大別される。我々は、両感染経路を区別してウイルスの感染性を定量可能な系を樹立して、抗 HIV 薬の感受性を感染経路別に解析した。その結果、吸着、融合、逆転写、ならびにインテグレーションの各複製ステップを標的とする抗 HIV 薬は、セルフリー感染と比べて、細胞間感染において低活性を示した。さらに、HIV-1 潜伏感染モデル細胞を作製し、種々の再活性化試薬の効果を検討すると主に、再活性化後の細胞間 HIV-1 感染伝播における抗 HIV 薬の活性を評価した。その結果、BRD4 阻害剤である JQ-1 により T 細胞活性化を伴わない効果的なレポーター遺伝子の発現誘導とウイルス産生が認められた。さらに、本化合物で処理した潜伏感染細胞からの細胞間感染においては、セルフリー感染に比べ抗 HIV 薬の感受性が低下していた。引き続き、両ウイルス感染経路におけるエンベロープの機能解析などを進めている。

Laboratory of Ultrastructural Virology

Members

Professor

Takeshi Noda

Research Fellow

Masahiro Nakano

Yukiko Muramoto

Keiko Shindo

Introduction

Virus infections are accompanied by numerous morphological changes in viral and cellular components. Our laboratory has been investigating the replication mechanism of influenza and Ebola viruses from the ultrastructural point of view, by using different microscopic analytical methods such as electron microscopy and high-speed atomic force microscopy. Visualization and characterization of the virus life cycle at the nano-mesoscopic level give us unique knowledge and novel paradigms, which will advance our understanding of molecular basis for the replication mechanism.

Topics

1) Transcription mechanisms of influenza virus genome

Influenza virus RNP is composed of the viral genome, the viral nucleoprotein (NP), and the viral RNA polymerase complex. The RNP consists of NP monomers and a single strand of viral RNA (vRNA), which is folded back on itself to create a loop at one end; the strand is coiled on itself to form a double-stranded helix, except at the loop. The polymerase complex is located at the opposite end of the loop in the RNP. The vRNA is transcribed in the form of RNP. However, from an ultrastructural point of view, it remains unknown whether the RNP changes its helical structure during transcription and how mRNA production proceeds. To reveal the ultrastructure of RNPs during transcription, we have been examining in vitro-transcribed RNPs using high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) and cryo-electron tomography (cryo-ET).

2) Structural analysis of Ebola virus nucleocapsid

Ebola virus nucleocapsid has a helical structure and consists of viral genomic RNA (vRNA), nucleoprotein, VP24, VP30, VP35 and polymerase L, which is responsible for transcription and replication of vRNA. We have reported that vRNA-NP complex serves as a core for the formation of helical nucleocapsids.

To elucidate morphogenesis of Ebola virus nucleocapsids, we have been examining the structure of vRNA-NP complex by using cryoelectron microscopy.

List of Publications

Koga, R., Sugita, Y., Noda, T., Yanagi, Y., and Ohno, S. (2015). Actin-modulating protein Cofilin is involved in the formation of measles virus ribonucleoprotein complex at the perinuclear region. **J. Virol.** 89, 10524-10531.

Oda, S., Noda, T., Wijesinghe, K.J., Halfmann, P., Bornholdt, Z.A., Abelson, D.M., Armbrust, T., Stahelin, R.V., Kawaoka, Y., and Saphire, E.O. (2015). Crystal structure of Marburg virus VP40 reveals a broad, basic patch for matrix assembly and a requirement of the N-terminal domain for immunosuppression. **J. Virol.** 90, 1839-1848.

野田岳志 (2015) エボラウイルス・アウトブレイクからの教訓 実験医学別冊 Vol.33 No.17、14-19.

Noda, T.: “Ultrastructural analysis of influenza virus genome transcription” JST CREST-PRESTO joint international symposium Structural Biological Dynamics: from molecules to life with 60 trillion cells. Tokyo, Japan, 5-6 November, 2015

野田岳志：インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構、SSSEM 研究部会&生理研研究会合同ワークショップ、岡崎（愛知）、2015 年 11 月 18-19 日

野田岳志：形から読むウイルス学、第 63 回日本ウイルス学会学術集会市民公開講座、福岡（福岡）、2015 年 11 月 21 日

Takeshi Noda: Ultrastructural analysis of influenza virus genome transcription. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡（福岡）、2015 年 11 月 22-24 日

野田岳志：顕微鏡法を用いたインフルエンザウイルス増殖機構の解析、ナノカーボンバイオセンサーの医療応用研究会、名古屋（愛知）、2015 年 12 月 10 日

中野雅博：転写中インフルエンザウイルス RNP の微細構造解析、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium、恩納村（沖縄）2016 年 1 月 25 日

教授	野田岳志
研究員	中野雅博
	村本裕紀子
	神道慶子

2015 年 9 月に本研究室が発足した。教授 1 名・博士研究員 3 名で研究室を立ち上げ、10 月に秘書 1 名が加わり、2015 年 12 月現在の構成員は 5 名である。

野田は 11 月に SSSEM 研究部会&生理研研究会、日本ウイルス学会、12 月にナノカーボンバイオセンサーの医療応用研究会にて招待講演を行った。11 月に日本ウイルス学会市民公開講座にて講演を行った。10 月に JST CRESTO-PRESTO joint international symposium で発表を行った。中野は 12 月に行われたウイルス研究所リトリートにて特別賞（ポスター賞）を受賞した。

我々の研究室では、インフルエンザおよびエボラウイルス病の制御を目標とし、インフルエンザウイルスおよびエボラウイルスの細胞内増殖機構に関する研究を進めている。

1) インフルエンザウイルスのゲノム転写機構の解析

インフルエンザウイルスのゲノム RNA (vRNA) は、NP およびヘテロ 3 量体ポリメラーゼとともに、螺旋状のリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) を形成する。RNP は vRNA の転写を担うが、転写機構の全貌は未だ明らかにされていない。本年度は、*in vitro* 転写系と高速原子間力顕微鏡ならびにクライオ電子顕微鏡を用いて、転写中の RNP ならびに合成される mRNA の微細構造解析を行った。現在、我々が明らかにしつつある RNP および mRNA の微細構造を基に、ゲノム転写機構の新たなモデルの提唱を目指している。

2) エボラウイルスヌクレオカプシドの構造解析

ヌクレオカプシドはゲノム RNA (vRNA) の転写・複製を担う螺旋構造体であり、vRNA, NP, VP24, VP30, VP35 および L から構成される。我々は以前、vRNA-NP 複合体が螺旋構造体の核となる構造を形成することを明らかにした。本年度は、ヌクレオカプシドのアセンブリー機構の詳細を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡を用いて vRNA-NP 複合体の構造解析を行った。本研究は、沖縄科学技術大学院大学の Matthias Wolf 准教授との共同研究である。

Laboratory of Primate Model

Members

Associate Professor	Tomoyuki Miura
Research Fellow	Ai Himeno
Technical Assistant	Hiromi Mori, Kanako Matsuura, Minako Kikukawa, Yumiko Kagawa
Graduate Student	Yuki Ishida, Akihiko Kawakami

Introduction

It has been 33 years since human immunodeficiency virus (HIV-1), the causative agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) was first identified. Since then, our knowledge on HIV-1 and the pathophysiology of AIDS has grown enormously. Unfortunately, however, we have not yet developed an effective prophylactic measure or a thorough therapeutic intervention, and AIDS remains top priority among global public health agenda.

To develop effective preventive or therapeutic measures against AIDS, we need an experimental model system that recapitulates HIV-1 infection in humans. From the beginning of AIDS epidemic, HIV-1 has been known for its narrow host range. To overcome the narrow host range of HIV-1 and develop a dependable animal model for AIDS, our laboratory, first in the world, generated a chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV), that carries HIV-1 derived *tat*, *rev*, *vpu* and *env* genes in the backbone of simian immunodeficiency virus, a closely related simian virus to HIV-1. Since then, SHIV/macaque model has been further developed and there are currently several SHIV strains available in the field and some of them cause acute disease followed by AIDS-like clinical manifestations.

We have been pursuing the following subjects,

1. Development and improvement of SHIV/macaque models,
2. SHIV-induced pathogenesis,
3. Development of novel vaccines and evaluation using SHIV/macaque system,
4. Identification of virus reservoir in HIV-1 infected individuals under highly active anti-retroviral therapy (HAART) using SIV infected monkeys as a model.

In addition to the abovementioned projects, we have been making efforts to establish non-human primate disease model for flavivirus infection, especially, dengue hemorrhagic fever.

Topics

1) Development of prevention and cure for HIV infection using the nonhuman primate model: T. MIURA

To develop preventive or therapeutic measures for AIDS, we need experimental infection model systems for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is a causative agent of AIDS. Since HIV-1 infect only humans and chimpanzees, it is difficult to perform infection animal experiment using HIV-1 itself. On the other hand, simian immunodeficiency virus (SIV) infects Rhesus monkey and causes an AIDS-like symptom. By the monkey infection experiments of SIV, extremely important knowledge for AIDS research was revealed as follows; *nef* gene is important to pathogenicity of the AIDS, effectiveness of the attenuated live vaccine for AIDS, and the main target organ of the HIV is intestinal tract. In these studies, detailed analysis of the deep part organ by necropsy. Furthermore, to overcome the narrow host range of HIV-1 and develop a dependable animal model for AIDS, our laboratory, first in the world, engineered chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) between SIV and HIV-1. In late years, from SHIV research, it became clear that a target cell and pathogenesis greatly affected according to the second receptor (CCR5 and CXCR4) affinity determined by *env* gene of HIV-1, and CCR5 tropic virus is important for AIDS pathogenesis. Conventionally, a lot of studies using CXCR4 tropic SHIV have been made but CCR5 tropic SHIV study is now demanded.

2) Generation of a new CCR5 tropic and neutralization-resistant SHIV: Y. ISHIDA, M. YONEDA, H. OTSUKI, Y. WATANABE, F. KATO, K. MATSUURA, M. KIKUKAWA, S. MATSUSHITA, T. HISHIKI, T. IGARASHI and T. MIURA

Previously, we reported that a new genetically diverse CCR5 (R5) tropic simian/human immunodeficiency virus (SHIV-MK38) adapted to rhesus monkeys became more neutralization resistant to SHIV-infected plasma than did the parental SHIV-KS661 clone. Here, to clarify the significance of the neutralization-resistant phenotype of SHIV in a macaque model, we initially investigated the precise neutralization phenotype of the SHIVs, including SHIV-MK38 molecular clones, using SHIV-MK38-infected plasma, a pooled plasma of HIV-infected individuals, soluble CD4 (sCD4), and anti-HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies, the epitopes of which were known. The results show that SHIV-KS661 had tier 1 neutralization sensitivity, but monkey-adapted R5 tropic SHIV-MK38 acquired neutralization resistance similar to that of tier 2 or 3 as a clone virus. Sequence analysis of the *env* gene suggests that the neutralization-resistant phenotype of SHIV-MK38 was acquired by conformational changes in Env associated with the net charge and potential N-linked glycosylation sites. To examine the relationship between neutralization phenotype and stably persistent infection in monkeys, we performed *in vivo* rectal inoculation experiments using an SHIV-MK38 molecular clone. The results show that one of three rhesus monkeys

exhibited durable infection with a plasma viral load of 10^5 copies/ml despite the high antibody responses that occurred in the host. While further improvements are required in the development of a challenge virus, it will be useful to generate a neutralization-resistant R5 tropic molecular clone of the SHIV-89.6 lineage commonly used for vaccine development, a result that can be used to explore the foundation of AIDS pathogenesis.

3) Development of a method for determining the duration and distribution of the eclipse phase of *in vitro* infection with a highly pathogenic SHIV: Y. KAKIZOE, S. NAKAOKA, A. A. CATHERINE, C. A. A. BEAUCHEMIN, S. MORITA, H. MORI, T. IGARASHI, K. AIHARA, T. MIURA and S. IWAMI

The time elapsed between successful cell infection and the start of virus production is called the eclipse phase. Its duration is specific to each virus strain and, along with an effective virus production rate, plays a key role in infection kinetics. How the eclipse phase varies amongst cells infected with the same virus strain and therefore how best to mathematically represent its duration is not clear. Most mathematical models either neglect this phase or assume it is exponentially distributed, such that at least some if not all cells can produce virus immediately upon infection. Biologically, this is unrealistic (one must allow for the translation, transcription, export, etc. to take place), but could be appropriate if the duration of the eclipse phase is negligible on the time-scale of the infection. If it is not, however, ignoring this delay affects the accuracy of the mathematical model, its parameter estimates, and predictions. Here, we introduce a new approach, consisting in a carefully designed experiment and simple analytical expressions, to determine the duration and distribution of the eclipse phase *in vitro*. We find that the eclipse phase of SHIV-KS661 lasts on average one day and is consistent with an Erlang distribution.

List of Publications

Kakizoe, Y., Nakaoka, S., Catherine, A. A., Beauchemin, C. A. A., Morita, S., Mori, H., Igarashi, T., Aihara, K., Miura, T., and Iwami, S. (2015). A method to determine the duration of the eclipse phase for *in vitro* infection with a highly pathogenic SHIV strain. **Scientific Reports**, 5, 10371.

Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Miura, T., Hirai, H., and Miyazawa, T. (2015). Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese Macaques. **J. Virol.**, 89, 3965-3975.

Sato, K., Kobayashi, T., Misawa, N., Yoshikawa, R., Takeuchi, J., Miura, T., Okamoto, M., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Ito, M., Miyazawa, T., and Koyanagi, Y. (2015). Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. **Scientific Reports**, 5, 14040.

Kakizoe, Y., Morita, S., Nakaoka, S., Takeuchi, Y., Sato, K., Miura, T., Beauchemin, C. A., Iwami, S. (2015). A conservation law for virus infection kinetics *in vitro*. **J. Theor. Biol.**, 376, 39-47.

Mizuguchi, T., Harada, S., Miura, T., Ohashi, N., Narumi T., Mori, H., Irahara, Y., Yamada, Y., Nomura, W., Matsushita, S., Yoshimura, K., and Tamamura, H. (2016). A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV entry inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, 397-400.

Seki, Y., Saito, A., Yoshida, T., Satou, Y., Harada, S., Yoshimura, K., Watanabe, Y., Iwatani, Y., Yasutomi, Y., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: Novel elite controller model by HIV-1mt-infected cynomolgus macaques. 33rd Annual symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, 13-16 October, 2015.

Harada, S., Saito, A., Yoshida, T., Seki, Y., Watanabe, Y., Iwatani, Y., Yasutomi, Y., Miura, T., Matano, T., Akari, H. and Yoshimura, K.: Detection of potency and breadth of HIV-1 neutralizing antibodies in macaque-tropic HIV-1 infected cynomolgus monkeys using novel test panel viruses. 33rd Annual symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, 13-16 October, 2015.

Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yokoyama, M., Sato, H., Miura, T., Koyanagi, Y., and Matano, T.: Viral genome mutations resulting in escape from protective MHC-I-associated CD8⁺ T cells can be maintained after multiple SIV transmissions among MHC-I-mismatched macaques. 33rd Annual symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, 13-16 October, 2015.

三浦智行：霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発、第 62 回日本実験動物学会シンポジウム 2 「感染症の予防と治療に貢献する動物実験」、京都、2015 年 5 月 28-30 日

Ishida, Y., Yoneda, M., Otsuki, H., Hishiki, T., Igarashi, T., Miura, T. : Generation of CCR5 tropic and neutralization-resistant SHIV、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Watanabe, Y., Iwami, S., Matsuura, K., Mori, H., Hishiki, T., Miura, T., Akari, H., Igarashi, T. : 高病原性 SHIV 感染サルにおいてウイルス感染 CD163 陽性マクロファージは様々な半減期を持つ集団から構成され、最も半減期の長い集団は ART 下のリザーバーとなり得る、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Kato, F., Tajima, S., Takasaki, T., Miura, T., Igarashi, T., Hishiki, T.: Generation of novel recombinant DENV for development of non-human primate model、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yokoyama, M. Sato, H., Miura, T., Koyanagi, Y., Matano, T.:

Accumulation of viral genome mutations in multiple SIV transmissions、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

藤田悠平、関根将、橋本隼、三浦智行、伊吹謙太郎:サル免疫細胞を持つマウスへの SIV 感染実験、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

石田裕樹、加藤文博、川上朗彦、高崎智彦、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行:デングウイルス感染霊長類モデル構築に向けた基盤研究、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 22-24 日

渡部祐司、岩見真吾、松浦嘉奈子、森ひろみ、日紫喜隆行、三浦智行、明里宏文、五十嵐樹彦:CD163 陽性細胞は高病原性 SHIV 感染サルの治療下におけるウイルス RNA 陽性細胞である、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 11 月 30-12 月 1 日

関洋平、芳田剛、齊藤暁、佐藤賢文、原田恵嘉、吉村和久、渡部祐司、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文:R5 指向性 HIV-1mt 感染カニクイザルによる新規エリートコントローラーモデルの開発、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 11 月 30-12 月 1 日

石田有佑、水口貴章、原田恵嘉、三浦智行、小谷みさと、山田裕子、苛原優、野村渉、松下修三、吉村和久、玉村啓和:新規 CD4 ミミックの創製と薬物動態解析、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 11 月 30-12 月 1 日

小谷みさと、苛原優、石田有佑、原田恵嘉、大橋南美、山田裕子、水口貴章、三浦智行、野村渉、松下修三、吉村和久、玉村啓和:HIV 外皮タンパク質 gp120 を標的とする mono-cyclohexyl 型低分子 CD4 ミミックの創製研究、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 11 月 30-12 月 1 日

水口貴章、苛原優、原田恵嘉、三浦智行、小谷みさと、石田有佑、山田裕子、大橋南美、野村渉、松下修三、吉村和久、玉村啓和:薬物動態の改善を志向した低分子 CD4 ミミックの創製研究、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 11 月 30-12 月 1 日

准教授	三浦智行
研究員	姫野 愛
教務補佐員	森ひろみ
技術補佐員	松浦嘉奈子
オフィス／アシスタント	加川裕美子
大学院生	石田裕樹、川上朗彦

2015 年 3 月に渡部祐司が医学研究科博士課程を単位取得退学し、4 月に特定研究員としてウイルス研究所進化ウイルス研究領域に移籍した。5 月に森ひろみ技術補佐員が教務補佐員となった。7 月に日紫喜隆行助教が主任研究員として東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクトに、また、加藤文博博士研究員が博士研究員として国立感染症研究所ウイルス第一部に移籍した。11 月に姫野愛が研究員として、また、医学部 2 回生の加川裕美子がオフィス・アシスタントとして研究室のメンバーに加わった。

当研究室ではレトロウイルス（HIV, SIV, SHIV）、フラビウイルス（DENV, TBEV）およびアルテリウイルス（PRRSV）の感染を分子・培養細胞・感染個体レベルで総合的に解析することにより、これらウイルスの病原性を解明し、ウイルス疾患の治療と予防法を開発することを目的としている。2015 年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

1. 霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発のための実証的研究

急務とされるエイズ予防・治療法開発のためには、感染個体レベルで実験的に解析できる実験動物モデルが必須であるが、HIV-1 はヒトとチンパンジーにしか感染しないため、HIV-1 そのものを用いて感染動物実験を行うことは困難である。一方、HIV-2 に近縁な SIV がマカク属のサルに感染し、エイズ様症状を引き起こす。SIV のサル感染実験により、エイズ研究において極めて重要な知見が明らかにされたが、これらの研究では、ヒトでは不可能な適時的剖検による深部組織の詳細な解析が威力を発揮した。また、SIV は遺伝的に HIV-1 とは異なるウイルスであることから、我々のグループは SIV をベースにして HIV-1 遺伝子を組み換えた SHIV を世界に先駆けて作製した。SHIV 研究により、HIV-1 の *env* 遺伝子により決定されるセカンドレセプター（CCR5 や CXCR4）指向性によって感染個体における標的細胞・組織や病態が大きく異なることが明らかとなり、ヒトのエイ

ズ病態に重要なのは CCR5 指向性ウイルスであることがわかってきた。また、全ゲノムの 9 割以上が HIV-1 由来の組換え体ウイルス HIV-1mt が近年報告されている。我々は、これら SIV / SHIV / HIV-1mt の霊長類モデルによるエイズの病態解析や予防・治療法開発のための基盤的研究を行っている。

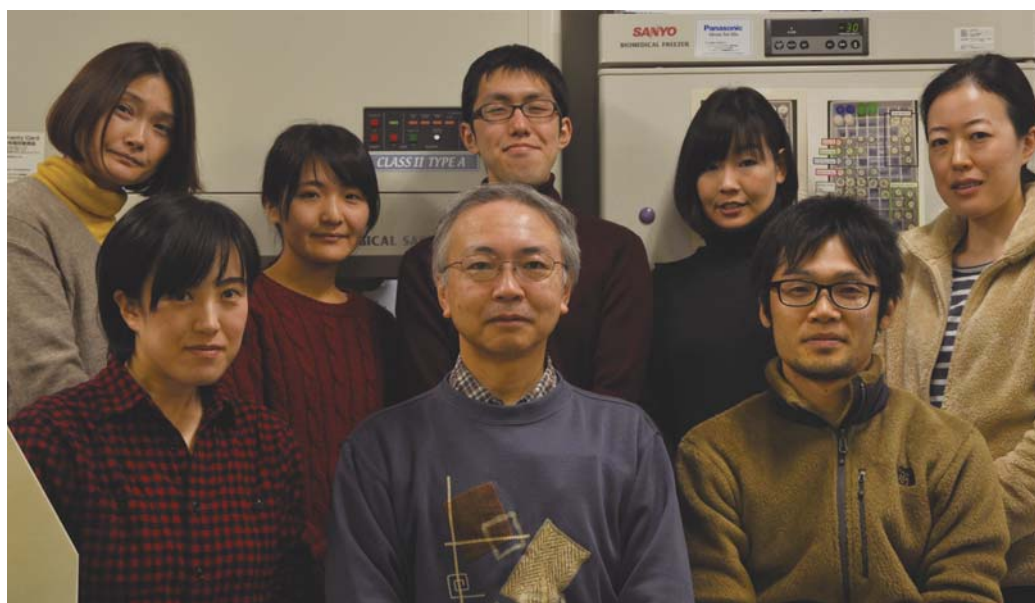
2. 新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗の解析

HIV-1 は *env* 遺伝子により決定されるセカンドレセプターの指向性 (CCR5 や CXCR4) によって、その感染伝播や病態が大きく異なる。CCR5 指向性ウイルスは、感染初期に検出されるウイルスであるためワクチン開発などに重要とされるが、サル動物モデルで扱われる SHIV において CCR5 指向性でありかつ中和抗体抵抗性を示すものは未だ少ない。本研究の目的は、中和抗体抵抗性の CCR5 指向性 SHIV アカゲザルモデルを確立することである。ウイルスの共受容体決定部に相当する *env* の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸置換を加え、既存の CXCR4 指向性ウイルスである SHIV-KS661 を CCR5 指向性のウイルスへ転換した。このウイルスはアカゲザル個体内で複製能を示し、*in vivo* で順化を繰り返したところ 3 代目のサルで高い血漿ウイルス RNA 量の持続が確認され、これを分離し MK38 と命名した。MK38 は CCR5 指向性を維持しており、V3 領域には復帰変異は認められなかった。MK38 は、KS661 や順化前の MK-1 と比べ感染サル血漿中の中和抗体に対して抵抗性を示した。また MK38 は、継代前は感受性であった抗 V3 モノクローナル抗体 KD-247 に対しても、中和抵抗性を示した。*env* の遺伝子解析を行った結果、KD-247 対する中和エピトープは継代後も保存されており、V2 領域で糖鎖修飾部位やチャージの変化を伴うアミノ酸変異が起きていた。中和抗体抵抗性を獲得した理由として、V2 領域の変異による *env* の立体構造の変化やグリカンシールドによる抗体に対する立体遮蔽の可能性が示唆される。現在、ウイルスの中和抵抗性獲得に不可欠なアミノ酸配列の変異の解析を進めている。

3. 高病原性 SHIV 株の *in vitro* 感染における暗黒期持続時間とその分布を決定する方法の開発

ウイルスの細胞への感染成立からウイルス生産の開始までの間の経過時間を暗黒期と呼ぶ。その期間は、それぞれのウイルス株に特異的であり、効果的なウイルス産生速度と共に、感染動態において重要な役割を果たしている。同じウイルス株に感染した細胞間で暗黒期がどのように変化するか、すなわち、暗黒期を数学的に表現する最善の方法はまだ明確になっていない。殆どの数学的モデルは、暗黒期を無視するか、または、必ずしも全ての細胞が感染するとすぐにウイルスを生産できるわけではないと言うことで暗黒期が指数関数的に分布すると仮定する。実際には、転写・翻訳・輸送などの時間がかかるため、生物学的にはこの仮定は非現実的であるが、暗黒期が感染の時間的スケールで無視できるものである場合には適切であろう。しかしながら、そうでない場合には、暗黒期の無視は、その数学モデルのパラメーター推定や予測の精度に影響を及ぼす。今回、我々は *in*

vitro での暗黒期の持続時間と分布を決定するために、慎重に設計された実験と簡単な解析式で構成される新しいアプローチを開発した。この方法によって、高病原性 SHIV-KS661 の暗黒期は、平均 1 日間でありアーラン分布に一致することを明らかにした。



Laboratory of Evolutional Virology

Members

Professor	Hirofumi Akari
Program-Specific Researcher	Yohei Seki
	Yuji Watanabe
Assistant Research Staff	Megumi Murata
Assistant Technical Staff	Kaoru Tsuji
Graduate Student	Saori Suzuki



Introduction

This laboratory is newly established in 2013 for active and effective collaboration between Institute for Virus Research and Primate Research Institute of Kyoto University. We are interested in the co-evolution between hosts and intractable viruses. Viral infection to a new host may lead to small but life-or-death war, while in due course they could finally compromise and live together (symbiosis). Probably, each battle

between viruses and hosts should include a variety of long and exciting story, for example, hosts seek to control viral invasion by innate and acquired immunity and then viruses try to develop new weapon to evade the immunity. Unfortunately, this endless chicken race may accidentally cause viral acquisition of life-threatening pathogenicity to the hosts. Exploring cellular and molecular machinery for the co-evolution will provide us precious hints to survive, either win against viruses or live together. With this in mind, we are investigating the mechanisms for the viral persistency and pathogenesis of intractable viruses, HIV and HCV, by employing non-human primate models for the viral infection.

Topics

1. Novel HIV-1 latency model by HIV-1mt-infected cynomolgus macaques: Y. SEKI, Y. WATANABE, M. Murata and H. AKARI

Recent advance of antiretroviral therapy (ART) may result in infectious diseases caused by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection to be controllable. However, a number of issues still remain to be solved for most HIV-infected individuals, which include the need to take medicine through life with the risks of adverse drug reactions and emergence of drug-resistant virus, and viral reactivation under the immunocompromised status with aging. It is therefore anticipated to develop novel therapeutics by which functional or hopefully sterilizing cure would become feasible. In fact, the Berlin patient is thought to have achieved a “sterilizing cure” given that no replication competent virus has been found after hematopoietic stem cells graft from a C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)-deficient donor. A number of studies for the cure have been conducted to date, however, the clinical application awaits further breakthrough by extensive investigations. Here, we present a novel HIV-1 latency macaque model suitable for the basic and preclinical studies for the cure. We prepared macaque-tropic HIV-1 (HIV-1mt) carrying the R5-tropic Env. In vivo adaptation of the HIV-1mt yielded the isolate AS38-P2 that caused a high level of plasma viral load ($>10^6$ copies/ml) in the acute phase of infection in cynomolgus macaques, but an undetectable level by 5 months without set point. Our follow-up studies showed that (i) the viral load remained virtually negative for more than 2 years; (ii) the activated HIV-1-specific antibody response was maintained at 1 year post infection; (iii) the proviral DNA-positive cells (PVL) were observed in lymph nodes as well as PBMC, however, they were scarcely observed in spleen and BM. Interestingly, the elimination of CD8⁺ T lymphocytes with the anti-CD8 antibody M-T807R1 administered to the monkeys at 2 years after infection led to reactivation of HIV as shown in substantial levels of plasma viral loads, indicating the maintenance of reservoir cells. These results indicate that HIV-1mt-infected cynomolgus macaques appear to be equivalent to the latently HIV-1-infected humans and will be useful as an HIV-1 latency model for the purpose of further characterizing HIV reservoir as well as research and development of new therapy for the cure.

2. Basic research of the establishment of novel therapeutic strategies aimed for HIV-1 cure : Y. WATANABE, Y. SEKI, M. Murata and H. AKARI

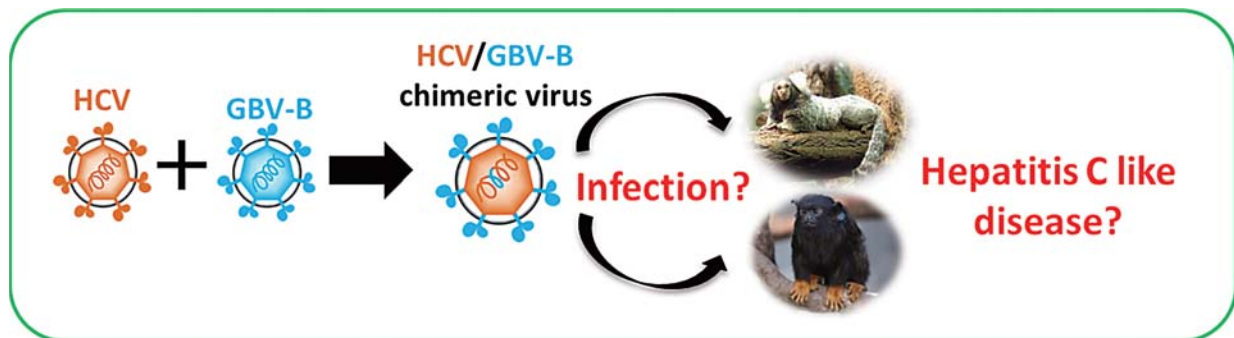
Toward realization of the HIV-1 cure, the existence of reservoir cells that continues to produce new virus during the treatment is the most considerable issue. Recently the effective inspection of new method to activate transcription of HIV and then to remove a reservoir cells by ART (shock and kill therapy) is in progress. A large number of new drugs important to HIV-1 cure including HDACi (Histone deacetylase inhibitor) and PKC (protein kinase C) activator are developed as Latency Reversing Agents (LRA). The advisability of the HIV activation from reservoir cells by LRA will play very important role on HIV-1 cure. The most difficult obstacle of the newly strategy for HIV-1 cure is evaluation of effective and safety. An intervention examination to perform for the elite controllers that plasma viral RNA becomes undetected level without ART is ideal for inspection of LRA effectiveness, however it is impossible practically because of healthy risk. Therefore, HIV-1 controllers whose plasma viral loads decrease lower than detection limit received ART are subjects of PD-1 antibody medication. In that case, even if HIV-1 reactivated from reservoir by LRA, it is very difficult to evaluate virus inducibility appropriately because ART controls HIV-1. Furthermore, it is difficult to carry out optimization such comparison of dose and frequency of different LRA for HIV-1 infected patients. For these reasons, prior to a clinical study for the HIV-1 cure, the preclinical study by appropriate primate models is expected. Considering these background in mind, we are seeking to evaluate and establish novel shock and kill therapy by using a novel nonhuman primate model of HIV latency.

3. Epidemiological study of STLV-1 infection of Japanese macaques : M. Murata and H. AKARI

Simian T-lymphotropic Virus Type 1 (STLV-1) belongs to Genus *Deltaretrovirus* and is highly related to human T-lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). We have recently shown that the STLV-1-infected Japanese macaques are useful for the analyses of in vivo dynamics of HTLV-1 infection and also development of novel therapeutics. It was revealed that about 60% the Japanese macaques breeding and rearing in the Primate Research Institute are infected with STLV-1, through a joint research with Dr. Matsuoka Lab. In order to clarify the cause of the high infection rate of STLV-1, we surveyed antibody titers against STLV-1 in plasma and the provirus load (PVL) in PBMCs of 200 individuals. Interestingly, about 50% of the children whose mothers were positive for PVL were also PVL-positive, suggesting efficient maternal transmission of STLV-1. Moreover, about 10% of individuals became positive for STLV-1, suggesting that both vertical and horizontal transmission routes should be considered for the viral prevalence.

4. HCV based chimeric virus of which envelope is derived from GBV-B infects tamarin persistently: S. SUZUKI and H. AKARI

The development of effective Hepatitis C virus (HCV) vaccines is essential for the prevention of further HCV dissemination. However, the animals of which immunity are comparable to human and also permissive for HCV infection is only chimpanzee, while no more available for invasive research. We thus sought to establish feasible and immunocompetent surrogate animal model of HCV infection, which would greatly help accelerate evaluating the prophylactic and therapeutic efficacies of newly developing HCV vaccine candidates. In order to circumvent narrow host range of HCV, an HCV genotype 1b-based chimeric clone carrying E1, E2 and p6 regions from GB virus B (GBV-B), which is closely related to HCV, was generated. The chimera between HCV and GBV-B, named HCV/G, replicated more efficiently as compared with the HCV clone in primary marmoset hepatocytes, and was implied to form viral particle. Furthermore, it was found that the chimera persistently replicated in a red-handed tamarin (*Saguinus midas*) for more than two years after intrahepatic inoculation of chimeric RNA. The viral RNA loads in plasma were relatively low (<200 copies/ml) but were detectable intermittently during the observation period. Of note, the chimeric RNA was found in the pellet fraction obtained by ultracentrifugation of the plasma at 73 weeks, indicating production of the chimeric virus. Our results will help establish the novel non-human primate model for HCV infection on the basis of the HCV/G chimera in the major framework of HCV genome. This model will be able to evaluate hepatitis C vaccines which induce cellular immune responses against HCV core or nonstructural proteins.



5. Evaluation of safety and efficacy of a novel hepatitis C vaccine candidate composed of inactivated hepatitis C virus particle: S. SUZUKI and H. AKARI

Hepatitis C vaccine is not available so far due to lack of appropriate animal model. In this study, we aimed to establish the novel vaccine of HCV by exploiting the cell culture-generated HCV (HCVcc), and validated the efficiency of neutralizing antibodies (NAb) and *IFN* γ mRNA induction in non-human primate model in collaboration with Dr. Kato and his colleagues in Department of Virology II, National institute of Infectious Disease. Common marmosets were subcutaneously and intramuscularly immunized with

inactivated HCVcc in combination with adjuvants (Alum or K3-SPG). Vaccination-related abnormality by immunization was not detected in blood tests in all vaccinated animals. We evaluated the expression of *IFN γ* mRNA in splenocytes to investigate activation of cellular immune response. The expression was increased after stimulation with HCV core peptides in marmosets which were inoculated HCVcc and K3-SPG. In addition, anti-E2, core antibodies and NAb were induced in marmosets which were inoculated HCVcc and K3-SPG. These results show that the combination of HCVcc and K3-SPG works as the potent and safe vaccine of HCV in non-human primate model.

List of Publications

Ma, G., Yasunaga, J.-i., Akari, H., Matsuoka, M. (2015). TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 112, 2216-2221.

Okamoto, M., Miyazawa, T., Morikawa, S., Ono, F., Nakamura, S., Sato, E., Yoshida, T., Yoshikawa, R., Sakai, K., Mizutani, T., Nagata, N., Takano, J., Okabayashi, S., Hamano, M., Fujimoto, K., Nakaya, T., Iida, T., Horii, T., Miyabe-Nishiwaki, T., Watanabe, A., Kaneko, A., Saito, A., Matsui, A., Hayakawa, T., Suzuki, J., Akari, H., Matsuzawa, T., Hirai, H. (2015). Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. **Scientific Reports** 5, 8850.

Nomura, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Akari, H., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. (2015). Broadening of virus-specific CD8⁺ T-cell responses is indicative of residual viral replication in aviremic SIV controllers. **PLoS pathogens** 11, e1005247.

Suzuki, S., Mori, K.I., Higashino, A., Iwasaki, Y., Yasutomi, Y., Maki, N., Akari, H. (2016). Persistent replication of hepatitis C virus genotype 1b-based chimeric clone carrying E1, E2 and p6 regions from GB virus B in a New World monkey. **Microbiology and Immunology** 30, 26-34.

Sultana, T., Nakayama, E.E., Tobita, S., Yokoyama, M., Seki, Y., Saito, A., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., Sato, H., Shioda, T. (2016). Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. **Journal of General Virology**, Epub Jan 20.

Yohei Seki, Akatsuki Saito, Takeshi Yoshida, Yorifumi Satou, Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Yuji Watanabe, Yasumasa Iwatani, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Tomoyuki Miura, Hirofumi Akari: Novel

elite controller model by HIV-1mt-infected cynomolgus macaques. 33rd Annual Symposium on NHP Models for AIDS, Monterey, October 13-16, 2015.

Saori Suzuki, Atsunori Higashino, Ken-ichi Mori, Hirotaka Ode, Kazuhiro Matsuoka, Yasumasa Iwatani, Wataru Sugiura, Yuko Katakai, Noboru Maki, Hirofumi Akari: Genetic and immunological escape in persistent GBV-B infection. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, Oct 9-13, 2015.

Shigeyoshi Harada, Akatsuki Saito, Takeshi Yoshida, Yohei Seki, Yuji Watanabe, Yasumasa Iwatani, Yasuhiro Yasutomi, Tomoyuki Miura, Tetsuro Matano, Hirofumi Akari, Kazuhisa Yoshimura: Detection of potency and breadth of HIV-1 Neutralizing Antibodies in macaque-tropic HIV-1 infected cynomolgus monkeys using novel test panel viruses. 33rd Annual Symposium on NHP Models for AIDS, Monterey, October 13-16, 2015.

関洋平、芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦互、明里宏文：サル指向性 HIV-1 の *in vivo* における増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本実験動物学会、京都、2015 年 5 月 28 日

鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、片貝祐子、槇昇、明里宏文：HCV ベースの HCV/GBV-B キメラウイルスはタマリンへ長期感染する。第 62 回日本実験動物学会学術集会、京都、2015 年 5 月 28 日

東濃篤徳、鈴木紗織、森健一、**大出裕高**、**松岡和弘**、**片貝祐子**、岡林佐知、槇昇、岩谷靖雅、杉浦互、明里宏文：小型霊長類において持続感染したヘパチウイルスゲノムの経時的変異。第 62 回日本実験動物学会学術集会、京都、2015 年 5 月 28 日

鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、大出裕高、松岡和弘、岩谷靖雅、杉浦互、片貝祐子、槇昇、明里宏文。新世界ザルにおける液性免疫応答の機能低下は霊長類肝炎ウイルスの持続感染に寄与する。第 31 回日本霊長類学会大会、京都、2015 年 7 月 18 日

関洋平、齊藤暁、芳田剛、佐藤賢文、原田恵嘉、吉村和久、渡部祐司、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：HIV-1mt 感染カニクイザルによる新規エリートコントローラーモデル、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 23 日

渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、日紫喜隆行、三浦智行、明里宏文、五十嵐樹彦：高病原性 HIV 感染サルにおいてウイルス感染 CD163 陽性マクロファージは様々な半減期を持つ集団から構成され、最も半減期の長い集団は多剤併用療法下のリザーバーと成り得る、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015 年 11 月 23 日

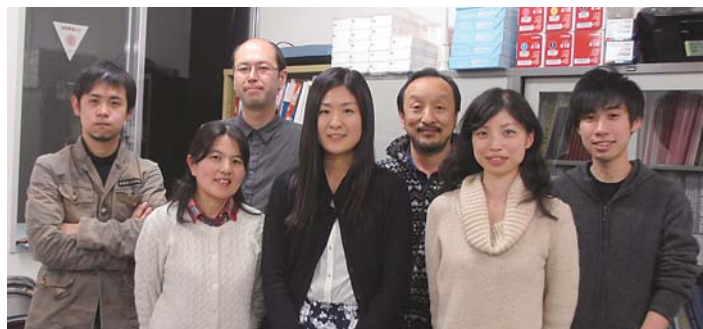
鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、大出裕高、松岡和弘、岩谷靖雅、杉浦互、片貝祐子、槇昇、明里宏文：慢性 GBV-B 感染における envelope 変異および液性免疫からの逃避．第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 23 日、福岡

東濃篤徳、鈴木紗織、**大出裕高**、**松岡和弘**、森健一、**片貝祐子**、岡林佐知、槇昇、岩谷靖雅、杉浦互、明里宏文：霊長類へパチウイルス慢性感染後寛解におけるウイルスゲノム変異の意義．第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 23 日、福岡

関洋平、芳田剛、齊藤暁、佐藤賢文、原田恵嘉、吉村和久、渡部祐司、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：R5 指向性 HIV-1mt 感染カニクイザルによる新規エリートコントローラーモデルの開発、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 12 月 1 日

渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、日紫喜隆行、三浦智行、明里宏文、五十嵐樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおいて、ART 治療下で観察されたウイルスの減衰に関する検証、第 29 回日本エイズ学会学術集会、東京、2015 年 12 月 1 日

教授	明里宏文
研究員	関 洋平 渡部祐司
教務補佐員	村田めぐみ
技術補佐員	辻 薫
大学院生	鈴木紗織



当研究室は、京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センターに所属しているが、ウイルス研究所と霊長類研究所の共同事業として新たに新興ウイルス感染症の起源と機序を探ることを目的に設置された「進化ウイルス研究領域」を兼務している。当研究室には、平成 27 年 4 月から研究員として渡部祐司が、6 月から教務補佐員として村田めぐみ、11 月から技術補佐員として辻薫が新たに加わった。また、3 月に特定助教の芳田剛が助教として東京医科歯科大学へ、8 月に研究員の東濃篤徳が特定助教として自然科学研究機構生理学研究所へそれぞれ転出した。

当研究室は、霊長類モデルを用いて難治性ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）を中心に、病原性や持続感染の原因を明らかにすることを目指し以下のテーマについて研究を進めている。

1. 霊長類モデルを用いた HIV 感染症根治のための基盤研究：(1) HIV-1mt 感染カニクイザルによる新規 HIV 潜伏感染モデルの確立及びそのリザーバー解析への応用

近年、多彩な抗 HIV 薬の併用による ART 療法が画期的な進展を遂げた結果、HIV 感染症は慢性疾患の一つとなったと言える。しかしながら、HIV 感染者は生涯に渡る薬の服用が必須であり、それに伴う薬剤の副作用や薬剤耐性ウイルスの出現、さらに加齢に伴う HIV の再活性化など検討課題は尚山積している。現在、完全治癒や機能的治癒の実現に向けた様々な基礎研究が行われているが、それらの有効性や安全性を評価するための介入試験を HIV 感染者において実施することは難しいのが実情である。当研究室では、この課題を克服するため、これまでカニクイザルで増殖可能なサル指向性 HIV-1（HIV-1mt）による HIV-1 感染霊長類モデルを構築してきた。これまでの研究において、HIV-1 の感染伝播に重要な CCR5 指向性を有する新規サル馴化 HIV-1（HIV-1mt）をカニクイザルに実験感染させたところ、感染初期に高い血中ウイルス RNA レベル（ 10^6 copies/ml）を示すにも関わらず、セットポイントを示さず、感染 3 カ月以降、2 年以上経過した時点においても血中ウ

ウイルス RNA は検出限界以下であった。そこで、本研究では、この HIV-1mt 感染サル の 潜 伏 感 染 モ デ ル として の 有 用 性 を 検 証 す べ く、よ り 詳 細 な 解 析 を 行 っ た。ま ず HIV-1mt 感 染 サ ル に お け る 抗 体 応 答 に つ い て 追 跡 調 査 を 行 っ た。そ の 結 果、す べ て の 感 染 個 体 で 感 染 後 1 年 以 上 を 経 過 し 長 期 に 渡 り 血 中 ウ イ ル ス RNA が 検 出 さ れ な い に も 関 わ ら ず、中 和 活 性 を 有 す る 高 い 抗 体 価 が 持 続 さ れ て い る こ と が 示 さ れ、抗 原 刺 激 が 持 続 し て い る こ と が 示 唆 さ れ た。次 に、感 染 後 1 年 以 上 経 過 し た サ ル 個 体 か ら 摘 出 し た 各 リ ン パ 組 織 中 の プ ロ ウ イ ル ス DNA 陽 性 細 胞 (PVL) 数 を 測 定 し た と ころ、腋 窩、鼠 径、腸 管 膜、肺 門 の 各 リ ン パ 節 お よ び PBMC に お い て PVL が 検 出 さ れ た。検 出 さ れ た PVL 数 は 感 染 初 期 の 血 中 ウ イ ル ス RNA 量 の ピ ー ク 値 と 良 く 相 関 し て い た。さ ら に 当 該 個 体 に 抗 CD8 抗 体 を 投 与 し CD8+ T 細 胞 を 枯 渇 さ せ た と ころ、約 10^4 copy/ml の 血 中 ウ イ ル ス RNA が 検 出 さ れ た こ と か ら、HIV 再 活 性 化 が 可 能 な リ ザ ー バ ー 細 胞 が 存 在 す る 潜 伏 感 染 状 態 に あ る こ と が 実 証 さ れ た。以 上 の 結 果 よ り、R5-tropic HIV-1mt 感 染 カ ニ ク イ ザ ル は、HIV 潜 伏 感 染 モ デ ル として リ ザ ー バ ー 細 胞 の 実 証 お よ び そ の 定 量 化 や 生 体 内 分 布 等、さ ら に HIV 感 染 症 の 根 治 に 向 け た 新 規 治 療 法 の 開 発 推 進 に 大 き く 寄 与 す る も の と 期 待 さ れ る。

2. 霊長類モデルを用いた HIV 感染症根治のための基盤研究: (2) 新規治療戦略の確立に向けた基礎研究

HIV 根治の実現に向け、治療下でもウイルスを保持・産生し続けている細胞：リザーバーの存在が最大のネックとなっている。現在、HIV の転写を活性化しつつ ART によりリザーバー細胞を排除しようとする方法 (Shock and Kill 治療法) の有効性検証が進められている。この治療法に重要な Latency Reversing Agents (LRA) として HDACi (ヒストンデアセチラーゼ阻害剤) や PKC (プロテインキナーゼ C) activator など多数の新規薬剤が開発されている。HIV 根治には LRA によるリザーバー細胞からの HIV 活性化の可否が非常に重要な役割を担っている。

上述のような HIV 根治を目指した新規治療法の開発における最大のハードルは、その有効性および安全性評価の困難さにある。LRA の有効性を検証する場合、無治療状態で血中ウイルスが検出限界以下となっているエリートコントローラーを対象として行う介入試験が理想的ではあるが、現実的にはリスクの高さ故ほぼ不可能であろう。従って実際は ART 療法を受け血中ウイルスが検出限界以下となっている HIV コントローラーが対象となる。その場合 LRA によりリザーバーから HIV が誘導されたとしても、ART 治療により HIV が抑制されるため、ウイルス誘導能を適切に評価することは非常に難しい。さらに HIV 感染者を対象として、異なる LRA の比較検討や投与量・頻度などの最適化を実施することはかなりのハードルを伴う。これらの理由から、HIV 根治に向けた臨床研究に先立ち、適切な霊長類モデル等による前臨床研究が望まれる。

先に述べたように当研究室では、これまでにカニクイザルに感染性を有する「サル指向性 HIV-1」を用いた新規霊長類モデルを樹立した。そこで本研究では、当該霊長類モデルを評価系として、新

規 LRA による Shock and Kill 治療法の評価・確立を目指し検討を行っている。

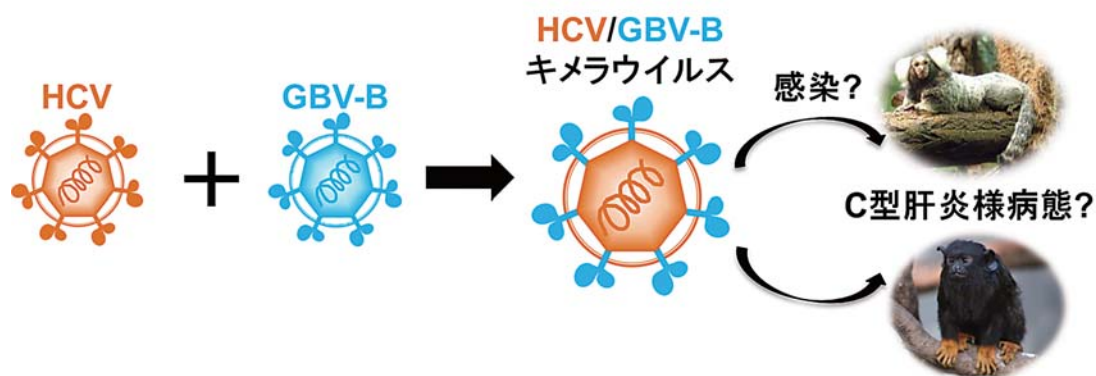
3. STLV-1 感染ニホンザルに関する疫学調査

サル T 細胞白血病ウイルス I 型 (STLV-1) はデルタレトロウイルス属に含まれ、HTLV-1 と非常に類似している。これまでに松岡研との共同研究で、生体内における HTLV-1 感染機構や ATL の新期治療法開発に向けた基礎的研究において、STLV-1 感染ニホンザルは非常に有用なモデル動物であることを示してきた。一連の調査において、霊長研で飼育されているニホンザルの約 60% が STLV-1 に感染していることが明らかとなり、HTLV-1 感染と比較して感染率が顕著に高いことが伺える。興味深いことに、感染個体のうち母ザルが provirus load (PVL) 陽性である場合はその仔ザルの約 50% もの割合で PVL 陽性キャリアとなっており、母子感染による効率的な感染伝播が示唆された。さらに 4 年間で STLV-1 陰性個体中の約 10% が STLV-1 に新たに感染したことが確認された。放飼場におけるクローズドコロニー飼育による影響も含め、現在経年的なフォローアップ検討を進めている。

4. HCV/GBV-B キメラウイルスによる C 型肝炎霊長類モデルの構築

C 型肝炎ウイルス (HCV) はヒトに慢性肝炎や肝細胞がんを引き起こすウイルスで、世界で約 1 億 7 千万人ものキャリアが存在するが、予防・治療ワクチンはない。ワクチン開発が遅れている原因としては、HCV の宿主域が狭くヒトやチンパンジーにのみ感染するため適切な動物評価モデルがないことが挙げられる。GB ウイルス B (GBV-B) は HCV と同じフラビウイルス科ヘパシウイルス属に属する。GBV-B はタマリンやマーモセットなどの新世界ザルに感染するため、HCV の代替ウイルスとして注目されている。当研究室では、GBV-B 感染マーモセットが慢性化に移行し血中ウイルス量や ALT 値の上昇、肝繊維化といった慢性 C 型肝炎様病態を呈することを見出した。従って HCV/GBV-B キメラウイルスと新世界ザルを用いて C 型肝炎霊長類モデルを作製し、将来的に新規ワクチン候補の評価モデルを確立することを目的とした。

劇症 C 型肝炎患者から得られた HCV を基に構築された TPF1 感染性クローン (genotype 1b) お



よび GBV-B クローンから、envelope 以外は HCV ベースの HCV/GBV-B キメラクローン (HCV/G) を作製した。合成したキメラウイルス RNA をヒト肝細胞およびマーマセット初代肝細胞へトランスフェクションしたところ、マーマセット初代肝細胞で選択的に粒子産生することが示唆された。さらにこのキメラウイルス RNA をアカテタマリンに接種したところ、2 年以上血漿および末梢血単核球からウイルスが検出された。ウイルス接種後約 1 年半後の血漿を超遠心し、ウイルスペレットからシーケンズを行ったところ、接種したキメラウイルスのシーケンズを確認できた。このことからタマリン体内で HCV/G が複製増殖していることが明らかとなった。この結果からエンベロープのみ GBV-B 由来で HCV ベースのキメラウイルスが新世界ザル個体レベルで複製可能であることが初めて明らかになった。今後はこのキメラウイルスをさらに改良し、効率良く感染増殖して肝炎病態を引き起す霊長類モデルを確立したい。

5. 不活化 C 型肝炎ウイルス粒子からなる新規 C 型肝炎ワクチン候補の安全性と有効性評価

C 型肝炎に対する治療薬は近年飛躍的に進歩したが、ワクチンは未だに開発されていない。本研究では、国立感染症研究所ウイルス第二部の加藤先生らと共同で、不活化 HCV 全粒子を作製しマーマセットに投与して安全性と有効性の評価を行った。接種時にはアジュバントとして Alum または新期アジュバントである K3-SPG を投与した。接種後、どの個体からも体重減少や接種部位の発赤などの異常は見られなかった。また脾細胞の IFN γ mRNA の発現を比較したところ、K3-SPG をアジュバントとした個体において発現の増加が認められた。E2, core に対する抗体価も増加しており、特に K3-SPG をアジュバントとした個体において中和抗体価の誘導が見られた。誘導された中和抗体は cross-genotypic に中和活性を示すことも明らかとなった。これらの結果から、不活化 HCV 全粒子と K3-SPG を用いた免疫方法が、細胞性免疫・液性免疫共に活性化させることが初めて示された。

Center for Emerging Virus Research

I. First Group

Members

Assistant Professor (Spe.) Yohei Hizukuri

Introduction

The cell surface of bacteria is always exposed to a variety of stresses caused by environmental changes; bacteria therefore evolved the 'extracytoplasmic stress response (ESR)' mechanisms to cope with these stresses. The ESRs play important roles not only in bacterial survival in natural environments but also in resistance of virulent bacteria such as *Salmonella* Spp. to host defense systems. Thus understanding of the whole picture of the ESRs is an important issue from a medical point of view. This research group focuses on and aims for clarifying the mechanism and physiological roles of the σ^E -pathway ESR, one of the major ESR pathways in *Escherichia coli*.

In the σ^E -pathway ESR, cell envelope stresses such as accumulation of malfolded outer membrane proteins (OMPs) caused by, for instance, exposure to heat or alkali trigger sequential cleavage of RseA, a membrane-spanning anti- σ^E protein, leading to eventual activation of the transcriptional factor σ^E to regulate expression of stress-responsive proteases and chaperones. This sequential cleavage of RseA is executed by membrane-anchored protease DegS (site-1 cleavage) and intramembrane-cleaving protease RseP (site-2 cleavage). RseP is a member of the S2P (site-2 protease) family proteases that are highly conserved among all organisms and known to be involved in regulation of important cellular events including cholesterol metabolism and the ER unfolded protein response in eukaryotic cells. Thus, in the σ^E -pathway ESR, cell surface stress signals are transduced into the cell interior across the cell membrane through the two-step proteolysis of RseA.

Topics

1) Visualization and dynamic analysis of proteolytic events catalyzed by RseP, the intramembrane-cleaving protease that regulates the σ^E -pathway extracytoplasmic stress response: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA

We are interested in the σ^E -pathway ESR as a complicated and exquisitely regulated signal transduction system. We hope to understand this dynamic cellular event that occurs around the membrane by using biophysical approaches such as a fluorescent microscopic observation of the related factors and a single cell imaging analysis. We constructed derivatives of RseP, the essential key regulator, and RseA, the proteolytic

substrate of RseP, that have a fluorescent protein (*e.g.* GFP) moiety to examine these proteins in the living cells by fluorescent microscopy. Now we are developing a single-cell time-lapse imaging system using an agar-pad on the stage to monitor the liberation of a fluorescent substrate from the membrane to the cytoplasm accompanying a substrate-cleavage by RseP. We are also visualizing and analyzing dynamic behavior of novel candidates of RseP substrates.

List of Publications

Akiyama, K.^a, Mizuno, S.^a, Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., and Akiyama, Y. (2015). Role of membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. *eLife* 4, e08928.

^aequally contributed

檜作 洋平, 秋山 芳展 (2015) 膜内部での蛋白質分解とストレス応答制御 別冊・医学のあゆみ「レドックス UPDATE —ストレス制御の臨床医学・健康医学」(監修: 平家 俊男, 淀井 淳司) 69-74.

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 13th International Student Seminar, Kyoto, Japan, March 3-7, 2015.

檜作洋平、秋山芳展: 表層ストレス応答制御に関与する RseP プロテアーゼの基質切断反応の細胞内蛍光イメージングに向けた取り組み. 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展: S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別. 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2015 年 6 月 4 日 - 5 日

檜作洋平: 細菌表層ストレス応答の制御機構と生体イメージング解析. 第 2 回生命理学研究会、名古屋、2015 年 8 月 29 日

檜作洋平、秋山芳展: Live-cell imaging of a proteolytic event by an intramembrane protease RseP that regulates extracytoplasmic stress response. 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢、2015 年 9 月 13 日 - 15 日

Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., Akiyama, Y.: Analysis of the conserved

membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease. The 22nd East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Okinawa, Japan, November 11-14, 2015.

檜作洋平、秋山芳展：細菌表層ストレス応答を制御する S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼの細胞内イメージング解析．第 38 回日本分子生物学会大会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015 年 12 月 1 日 - 4 日

秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森 博幸、禾 晃和、秋山芳展：S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別．第 38 回日本分子生物学会大会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015 年 12 月 1 日 - 4 日

II. Second Group

Members

Assistant Professor (Spe.) Akiko Makino

Topics

The regulation of Borna disease virus production

Borna disease virus (BDV) is an enveloped non-segmented negative stranded RNA viruses belonging to the family *Bornaviridae*, order *Mononegavirales*. BDV causes a long-term persistent infection in the cell nucleus, and production of the infectious particle into culture supernatant is strikingly suppressed. Here we identified a host factor, which suppresses BDV production from infected cells by screening of human shRNA library. Knockdown (KD) of IGF2 in BDV-infected cells led to the promotion of virus production into supernatants by more than 30-fold, compared with control. IGF2 KD also enhanced a reporter protein, firefly luciferase (FLuc), expression by recombinant BDV-FLuc in infected cells. In the IGF2 KD cells infected with BDV-FLuc, the FLuc activity was rescued by overexpression of IGF2 with off-target sequence against shRNA as well as in control shRNA-transduced cells with BDV-FLuc.

To evaluate if IGF2 pathway via its receptors is related to BDV production, recombinant human IGF2 was added to BDV-infected cells at various concentration. The addition of IGF2 into the culture medium had no effect on BDV production from BDV-infected cells and FLuc activity by BDV-FLuc. Also pre-treatment of cell with IGF2 caused no effect on the BDV susceptibility. Immunoprecipitation assay showed that IGF2 interacted with GP1, which is N-terminus domain of BDV-G. Furthermore BDV-G production in both BDV-infected cells and BDV particles was strongly increased by IGF2 KD, while the production of BDV-N and -M

were not. These results indicate that IGF2 is involved in the suppression of BDV production through the regulation of BDV-G expression.

List of Publication

Parrish, N.F., Fujino, K., Shiromoto, Y., Iwasaki, Y.W., Ha, H., Xing, J., Makino, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Siomi, H., Honda, T., Tomonaga, K. (2015). piRNAs derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. **RNA** 21, 1691-1703.

Hirai, Y., Honda, T., Makino, A., Watanabe, Y., Tomonaga, K. (2015). X-linked RNA-binding motif protein (RBMX) is required for the maintenance of Borna disease virus nuclear viral factories. **J Gen Virol** 96, 3198-3203

Ikeda, Y., Makino, A., Matchett, W.E., Holditch, S.J., Lu, B., Dietz, A.B., Tomonaga, K. (2015). A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification. **Gene Ther** [Epub ahead of print]

海外一般演題

Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga: “IGF2 is involved in the regulation of Borna disease virus production” Negative Strand Virus meeting 2015, Siena, Italy, 14-19 June, 2015.

Akiko Makino, Ryo Komorizono, Sara J. Holditch, Brian Lu, Tomoyuki Honda, Yasuhiro Ikeda, Keizo Tomonaga: “A novel RNA virus-based episomal vector system for long-term stem cell modification” European Society of Gene and Cell Therapy, Helsinki, Finland, 17-20 Sep, 2015

Akiko Makino, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga: “The regulation of Borna disease virus production” The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 8-11 Sep, 2015

国内一般演題

牧野晶子、本田知之、朝長啓造 : The involvement of IGF2 in the regulation of Borna disease virus production、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22 日 -24 日

小森園亮、堀江真行、本田知之、牧野晶子、朝長啓造 : Sequence analysis of novel parrot borna virus 5、第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015 年 11 月 22 日 -24 日

I. First Group

特定助教

檜作洋平

細菌表層ストレス応答を制御する膜内切断プロテアーゼによる基質切断反応の生細胞内イメージングとダイナミクス解析

単細胞生物である細菌の細胞表層は外環境の変化等に起因する多様なストレス、すなわち「表層ストレス」に常に曝されています。細菌はこのような細胞表層ストレスに対処するために「表層ストレス応答」機構を進化させてきました。表層ストレス応答は細菌の生存戦略において重要な位置を占め、例えばサルモネラ菌などの病原性細菌が、宿主生物に感染・侵入した際の防御応答に対抗するための主要な機構の1つでもあり、病原性にも大きく関わることから、その解明は医学的見地からも重要と言えます。大腸菌における主要な経路の一つである σ^E 経路表層ストレス応答では、熱やアルカリなどの外環境変化によって生じた細胞外ストレスにより変性外膜タンパク質 (OMP) 等が蓄積すると、それがトリガーとなり膜貫通型アンチ σ^E 因子である RseA が二つの膜結合型プロテアーゼである DegS と RseP により連続的に切断されることによって σ^E が活性化され、ストレス応答が引き起こされます (図 1)。二段階目の切断を担う RseP は、脂質二重層内部でペプチド結合の加水分解を触媒するという特徴的な性質をもった「膜内切断プロテアーゼ」の一員です。RseP の属する S2P ファミリープロテアーゼは細菌からヒトまで全ての生物で保存されており、コレステロール代謝や小胞体ストレス応答などの生物学的にも重要な現象に関与することが知られています。

私たちは σ^E 経路表層ストレス応答が細胞質膜を中心として膜の内外で起こる複雑なシグナル伝達イベントであることに注目し、関連因子群の蛍光顕微鏡観察による生細胞内イメージングを通して、細胞外ストレスに対するダイナミックな細胞応答を理解したいと考えています。現在は RseP プロテアーゼやその生理基質である RseA に GFP や mCherry などの蛍光タンパク質を融合して一細胞での蛍光顕微鏡観察を行っています。また、アガーパッドを用いた一細胞タイムラプス観察系により、RseP の発現誘導に依存し

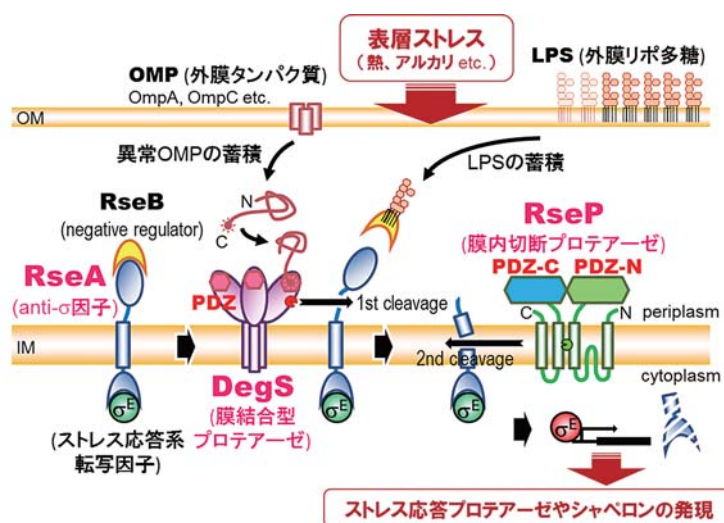


図1. 大腸菌の σ^E 経路表層ストレス応答

た蛍光性基質の局在変化を観察する系を構築し、その解析を進めています。RseP の切断基質スクリーニングによって新たに見出されてきた新規基質に関しても、蛍光顕微鏡観察をはじめとした生物物理学的、生化学的解析に取り組んでいます。

II. Second Group

特定助教

牧野晶子

Insulin-like growth factor 2 はボルナ病ウイルスの粒子産生を制御する

ボルナ病ウイルス (BDV) は脊椎動物に広く宿主域を持ち、ウマや羊に中枢神経系の疾患を引き起こす。BDV は細胞の核に持続感染を起こすが、細胞外への粒子の放出は著しく抑制されている。BDV のエンベロープ蛋白質である G 蛋白質が細胞膜へ輸送されず小胞体に停滞するため、粒子の産生が抑制されているという報告があるが詳細は明らかではない。そこで本研究では、ヒトのシグナル伝達経路関連遺伝子群を標的として shRNA ライブラリを用いて、BDV の粒子産生制御に関与する宿主因子の同定をおこなった。

スクリーニングの結果、Insulin-like growth factor 2 (IGF2) が候補分子として同定された。IGF2 をノックダウンした細胞からの BDV 粒子産生は陰性対照と比較して 30 倍ほど上昇した。またホタルルシフェラーゼを発現する組換え BDV が持続感染した細胞の IGF2 をノックダウンすると、細胞内のルシフェラーゼの活性は上昇した。IGF2 ノックダウン細胞に IGF2 を強制発現させると、BDV の増殖は減少した。さらに IGF2 の mRNA 発現量が高い横紋筋由来 TE671 細胞では、同発現量が低い細胞と比較して BDV の増殖が抑制されていた。この TE671 細胞の IGF2 をノックダウンすると、BDV の増殖は上昇した。IGF2 の作用点を明らかにするため、BDV の遺伝子と IGF2 を免疫沈降に供したところ、G 蛋白質の N 末端部位と IGF2 が相互作用することが示唆された。IGF2 をノックダウンした細胞から産生されたウイルス粒子中の G 蛋白質量は陰性対照と比較して高くなっていた。これらのことから、IGF2 は G 蛋白質のウイルス粒子への取り込みを抑制することで BDV のウイルス粒子産生を抑制している可能性が示唆された。

上述の研究成果及び BDV ベクターの幹細胞への応用に関する研究成果の報告として、1 月には Negative Strand Virus-Japan で口頭発表、6 月にはイタリアで行われた Negative Strand Virus meeting でポスター発表、また 9 月にフィンランドで開催された European Society of Gene and Cell Therapy で口頭発表をし、Top10 の抄録に選ばれた。同じく 9 月に行われた 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity にてポスターおよび口頭発表、11 月には日本ウイルス学会にてポスター発表をおこなった。

Reproductive Engineering Team

Members

Technical Specialist	Hitoshi Miyachi
Technical Staff	Satsuki Kitano

Introduction

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse (Tg) and knockout mouse (KO) under the animal committee of our institute. We also perform cryopreservation of mouse fertilized eggs. Current staffs are Kitano and Miyachi. Results of last three years are as follows.

1) Freezing embryos

2013	198 strains	52,272 embryos
2014	194 strains	85,005 embryos
2015	146 strains	40,165 embryos

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2013	71	27,924	67(0.2%)
2014	37	18,236	142(0.8%)
2015	35	17,122	139(0.8%)

3) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2013	70	5,510	129(2.3%)
2014	23	2,442	82(3.6%)
2015	22	2,249	107(4.8%)

4) CRISPR/Cas9

	No of constructs	No of embryos	No of genome edited mouse
2013	18	6,301	66(1.05%)
2014	32	14,839	47(0.32%)
2015	15	5,906	17(0.29%)

List of Publications

Reproductive engineering team

Abe, A., Tani-Ichi, S., Shitara, S., Cui, G., Yamada, H., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Abe, R., Yoshikai, Y., and Ikuta, K. (2015). An Enhancer of the IL-7 Receptor alpha-Chain Locus Controls IL-7 Receptor Expression and Maintenance of Peripheral T Cells. **J. Immunol.** 195, 3129-3138.

Inoue, M., Iwai, R., Yamanishi, E., Yamagata, K., Komabayashi-Suzuki, M., Honda, A., Komai, T., Miyachi, H., Kitano, S., Watanabe, C., Teshima, W., and Mizutani, K. (2015). Deletion of Prdm8 impairs development of upper-layer neocortical neurons. **Genes Cells** 20, 758-770.

Kuroki, S., Akiyoshi, M., Ideguchi, K., Kitano, S., Miyachi, H., Hirose, M., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., and Tachibana, M. (2015). Development of a general-purpose method for cell purification using Cre/loxP-mediated recombination. **Genesis** 53, 387-393.

Nishijima, H., Kitano, S., Miyachi, H., Morimoto, J., Kawano, H., Hirota, F., Morita, R., Mouri, Y., Masuda, K., Imoto, I., Ikuta, K., and Matsumoto, M. (2015). Ectopic Aire Expression in the Thymic Cortex Reveals Inherent Properties of Aire as a Tolerogenic Factor within the Medulla. **J. Immunol.** 195, 4641-4649.

Wagatsuma, K., Tani-Ichi, S., Liang, B., Shitara, S., Ishihara, K., Abe, M., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Nanno, M., et al. (2015). STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the TCRgamma Locus. **J. Immunol.** 195, 1804-1814.

技術専門職員 宮地 均
技術職員 北野 さつき

マウス作製支援チームはウイルス研究所動物委員会の下でマウス受精卵の凍結保存をはじめトランスジェニックマウス (Tg) やノックアウトマウス (KO) の作製支援を行っている。また、生殖工学技術を用い、体外受精によるマウスコロニーの拡大、ホモマウス作製、胎生期解析用の受精卵準備や ICSI (顕微授精)、卵巣移植なども実施可能である。最近では CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集マウスの作製も実施している。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。 <http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tgkoivf/index.htm> 過去 3 年間の実績は下記の通りである。

1) 胚の凍結保存

2013 年	198 系統	52,272 個
2014 年	194 系統	85,005 個
2015 年	146 系統	40,165 個

2) トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数	Tg 産仔数
2013 年	71	27,924	67(0.2%)
2014 年	37	18,236	142(0.8%)
2015 年	35	17,122	139(0.8%)

3) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2013 年	70	5,510	129(2.3%)
2014 年	23	2,442	82(3.6%)
2015 年	22	2,249	107(4.8%)

4) その他

CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集マウスの作製

	依頼数	使用胚数	遺伝子編集マウス数
2013 年	18	6,301	66
2014 年	32	14,839	47
2015 年	15	5,906	17

受精卵の個体復元数

	依頼数	使用胚数	仮親マウス数
2014 年	77	7,488	358
2015 年	88	8,236	412

Computer Network of Institute for Virus Research

Members

Assisitant Professor

Keiko Takemoto

Institute for Virus Research LAN system (IVR-LAN) has administrated by the network committee consisted of four staffs (Prof. Toyoshima, Prof. Akiyama, Associate Prof. Mori and Instructor Takemoto). IVR-LAN service has covered for researchers of some medical departments as well as IVR, and the primary purpose of IVR-LAN is to offer accessibility to the Internet in support of their studies. IVR-LAN has provided a variety of network services, including E-Mail, WEB-mail, WWW, File-sharing, online reservation of seminar rooms, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. Main services are working on Linux workstations.

This year we installed a high-memory server for bioinformatics, specifically for doing Next Generation Sequencing (NGS) data analysis. Many researchers have begun to study comparative analyses of gene expression on a genomic scale, the interactions between invading viruses and the host immune system and so on. We also plan to provide NGS Data Analysis learning program, introducing to computational thinking and large-scale data analysis on UNIX platform.

However IVR-LAN has adequately equipped, we must have a responsibility for sending/getting data. A few accidents have occurred in this year. IVR-LAN users need to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto University.

In addition to the administration of network, Takemoto have studied the epigenetic regulation of mouse endogenous retroviruses during cell differentiation. Conditional knockdown mice of histone methyltransferase ESET, and/or DNA de novo methyltransferase Dnmt1 have been analyzed with RNA-seq and ChIP-seq.

LIST OF PUBLICATIONS

Yasuma K., Yasunaga J-i., Takemoto K., Sugata K., Mitobe Y., Takenouchi N., Nakagawa M., Suzuki Y., Matsuoka M. (2016). HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). **PLoS Pathog** 12(1): e1005372.

竹本経緯子、加藤雅紀、眞貝 洋一: 内在性レトロウイルスのエピジェネティックな発現制御と配列特異性、NGS 現場の会第4回研究会、つくば、2015年7月1-3日

Keiko Takemoto, Masaki Kato and Yoichi Shinkai: Silencing of endogenous retroviruses mediated by Setdb1/Eset、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 3 日

ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム

Computer Network of Institute for Virus Research

助教

竹本 経緯子

ウイルス研究所ネットワークシステムは、秋山教授、生田教授、豊島教授、竹本助教より構成されるネットワーク委員会によって管理され、ウイルス研究所、附属ゲノム医学センターおよび医学部分子医学専攻の3部局が含まれる分子生物学実験研究棟、および動物実験棟へサービスを提供している。本研究所LANは、Linuxサーバー及びウインドウズサーバ等を用いて、情報伝達の高速性・機能性・安全性を満たすサービスの提供を第一に、電子メール・WEB・ファイル・ライセンスサーバー等を運用している。

今年度は高性能の遺伝子情報解析サーバーを導入し、所内のパソコンからリモートログインできる環境を整えた。技術革新によって生み出される遺伝情報は膨大な量になっており、それらを解析し使いこなす事は、ウイルス学、医学、分子生物学研究にとって必須なリテラシーである。コンピュータ室にはExome解析のパイプラインが組んであるワークステーションが一台と、高性能解析サーバーにリモートログインできるパソコンが4台用意されている。これらのパソコンを用いて公共データベースからディープシーケンス等データをダウンロードし発現解析を行うなどの実習・講習会も行っている。

ハードウェアの管理やOS・ソフトウェアの脆弱性に関して、今年度も京都大学情報環境機構の提供するシステムを用いてサーバーのぜい弱性検査を行い、設定の不備や不要なサービスをチェックした。一方、無線アクセスマルターの管理はいまだ完全とは言えず、無線機器の増加に管理側が追いついていないのが現状である。個々のルーターにMACアドレス制限をかける等の徹底を今後も呼びかけてゆく必要がある。研究活動にネットワークを介した情報アクセスが欠かせないものである以上、全ユーザーの情報リテラシーの向上が望まれる。

研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は次世代シーケンサーのデータ解析を行っている。ヒト及びマウスのディープ・シーケンスデータを用いてChIP-Seq、RNA-seq、レトロエレメントのエピジェネティックな発現制御の研究等に関わっている。

SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Twenty-four seminars were held at the Institute for Virus Research under the auspices of the Institute in 2015. Eighteen lectures were from abroad and six others were from Japan.

January 21	Dr. David H. Rowitch, University of California, San Francisco, US. “Heterogeneous spatial origins and functions of astrocytes in the mammalian CNS ”
February 4	Dr. Yasuhiro Murakawa, Berlin Institute for Medical Systems Biology, Germany. “Genome-wide Study of the Post-transcriptional Gene Regulation ”
February 26	Dr. Nagatoshi Fujiwara, Tezukayama University, Japan. “Pathological roles of lipid molecules that are specific for acid-fast bacilli”
March 26	Dr. Connie Cepko, Harvard Medical School, US. “Determination of Cell Fate in the Vertebrate Retina ”
March 26	Dr. Andrew C. Oates , MRC-National Institute for Medical Research, UK. “Segmenting the embryonic body axis with oscillations”
March 26	Dr. Pavel Tomancak, Max Plank Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Germany. “Guide to light sheet microscopy for adventurous biologists ”
March 30	Dr. Gregory Moseley, The University of Melbourne, Australia. “Virus-host cell interactions in lyssavirus infection: the molecular biology of rabies disease ”
April 22	Dr. James Briscoe, The Francis Crick Institute, UK. “The Gene Regulatory Logic for Reading the Sonic Hedgehog Gradient In The Vertebrate Neural Tube ”
May 20	Dr. Makoto Sato, Kanazawa University, Japan. “Notch-mediated lateral inhibition regulates proneural wave propagation in combination with EGF-mediated reaction diffusion ”
May 29	Dr. Erling Norrby, The Royal Swedish Academy of Sciences, Sweden . “DNA and the Nobel Prize ”
July 3	Dr. Seiji Kojima, Nagoya University, Japan. “Development of flagellar motor in bacteria”
July 14	Dr. Yoshimasa Takahashi, National Institute of Infectious Diseases, Japan. “B cell memory and vaccine development against influenza virus”
July 22	Dr. Yusuke Oba, Hokkaido University, Japan. “Visualization of intracellular signal transmission by fluorescence bio-imaging and its applications”
August 4	Dr. Katsura Asano. Kansas State University, US. “Translational control by eIF5-mimic proteins”
August 6	Dr. Masayuki Sakamoto, Columbia University, US. “Imaging voltage in neurons with genetically encoded indicators”

August 13	Dr. Yasutsugu Suzuki, The Pennsylvania State University, US. “Control of malaria parasites in mosquitos by paratransgenesis using densovirus”
September 8	Dr. Jerome Zack, University of California, Los Angeles, US. “Novel activators for HIV latency reversal”
September 16	Dr. Takahiro Ito, University of Georgia, Athens GA, US. “Don't misbehave : reprogramming cell fates in the control of stem cells and cancer”
October 23	Dr. Takuya Yamamoto, National Institute of Biomedical innovation, Japan. “The effective immunological responses against HIV”
October 27	Dr. Jacob Hald, Novo Nordisk A/S, Denmark. “From NBEs to NBEs and in-between”
October 28	Dr. Tomozumi Imamichi, Frederick National Laboratory for Cancer Research, US. “A therapeutic potential of interleukin-27 for controlling HIV infection”
November 16	Dr. Batu Erman, Faculty of Engineering and Natural Sciences Sabanci University, Turkey. “Targeting the p53 Tumor Suppressor: An inhibitory role for the Patz1 transcription factor”
November 26	Dr. Hideki Ebihara, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, USA. “Molecular biological approaches to unraveling the mechanisms for replication and the pathogenesis of Ebola virus”
November 30	Dr. Masashi Yamaji, The Rockefeller University, US. “DND1 destabilizes target mRNAs in germline development by direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylation complex”

ORGANIZATION AND STAFF

(as of December, 2015)

(Numerals in parentheses indicate year of association with the Institute)

Director	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc.
Deputy Director	Yoshinori Akiyama, D.Sc.
Professors Emeriti	Yoshimi Kawade, D.Sc. (1956-1988) Yorio Hinuma, M.D., D.Med.Sc. (1980-1988) Masao Hanaoka, M.D., D.Med.Sc. (1959-1989) Mutsuo Imai, D.Sc. (1965-1991) Takashi Yura, D.Sc. (1960-1993) Masakazu Hatanaka, M.D., D.Med.Sc. (1980-1995) Akinori Ishimoto, M.D., D.Med.Sc. (1964-1968, 1978-2002) Yoshiaki Ito, M.D., D.Med.Sc. (1984-2002) Masanori Hayami, D.V.M., D.Agr. (1988-2006) Koreaki Ito, D.Sc. (1971-2007) Kunitada Shimotohno, Pharm.D. (1996-2007) Junji Yodoi, M.D., D.Med.Sc. (1989-2010)

Department of Viral Oncology

Laboratory of Gene Analysis

Professor	Yoshinori Akiyama, D.Sc. (1988)
Associate Professor	Hiroyuki Sakai, D.Med.Sc. (1996) Hiroyuki Mori, D.Sc. (1996)
Assistant Professor	Shin-ichi Yanagawa, D.Agr. (1986)

Laboratory of Cell Regulation

Professor	Masahiko Sugita, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Daisuke Morita, D.Med.Sc. (2013)
Assistant Professor (Spe.)	Tatsuaki Mizutani, Ph. D. (2014)

Laboratory of Tumor Biogenesis

Professor	Shin Yonehara, D.Sc. (1994) (concurrent)
Assistant Professor	Akira Murakami, D.Sc. (1979)

Laboratory of Human Tumor Viruses

Professor	Keizo Tomonaga, D.V.M., D.Vet.Med. (2011)
Associate Professor	Makoto Hijikata, D.Med.Sc. (1997)
Assistant Professor	Tomoyuki Honda, M.D., D.Med.Sc. (2011)

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

Professor	Takashi Fujita, D.Sc. (2005)
Associate Professor	Hiroki Kato, D.Med.Sc. (2010)

Laboratory of Biochemistry

Professor	Mutsuhito Ohno, D.Sc. (2001)
Assistant Professor	Makoto Kitabatake, D.Sc.(2004)
	Ichiro Taniguchi, D.Sc. (2007)

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

Professor	Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)
Assistant Professor	Keiko Takemoto, D.Sc. (1992)
	Shizue Tani-ichi, D.Health Sc. (2007)
	Takahiro Hara, D. Bio. (2008)
Technical Staff	Satsuki Kitano (Konaka) (2004)

Laboratory of Infection and Prevention

Professor	Osamu Takeuchi, M.D., Ph.D. (2012)
Associate Professor	Hiroshi Masutani, M.D., D.Med.Sc. (1992)
Assistant Professor	Takashi Mino, D.Eng. (2012)

Bioresponse Regulation Laboratory

Visiting Professor	Yoshihiro Kawaoka, D.V.M., D.Med.Sc. (2010)
Visiting Assistant Professor	Yasumasa Iwatani, Ph.D. (2014)

Department of Cell Biology

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Professor	Fumiko Toyoshima, D.Sc. (2008)
Assistant Professor	Shigeru Matsumura, D.Bio. (2008)
Assistant Professor	Yukako Oda, D.Sc. (2014)

Laboratory of Growth Regulation

Professor	Ryoichiro Kageyama, M.D., D.Med.Sc. (1997)
Associate Professor	Toshiyuki Ohtsuka, M.D., D.Med.Sc. (2000)
Associate Professor (Spe.)	Itaru Imayoshi, D.Bio. (2008)
Assistant Professor	Taeko Kobayashi, D.Sc. (2005)

Laboratory of Signal Transduction

Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005)
---------------------	--

Laboratory of Regulatory Information

Visiting Professor	Susumu Tonegawa, Ph.D, D.Sc. (1992)
--------------------	-------------------------------------

Laboratory of Integrated Biological Information

Professor	Daron M. Standley, Ph.D. (2014)
-----------	---------------------------------

Center for Human Retrovirus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

Professor	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Hirofumi Akari, D.Med.Sc. (2009)
	Kei Sato, D.Med.Sc. (2012)

Laboratory of Virus Control

Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
Lecturer	Jun-ichirou Yasunaga, M.D., D.Med.Sc. (2010)
Assistant Professor	Kazuya Shimura, D.Med.Sc. (2011)
Technical Staff	Chiho Ohnishi (2014)

Laboratory of Viral Immunology

Visiting Professor	Charles R. M. Bangham, Ph.D., MRC Path., Sc.D. (2014)
--------------------	---

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Ultrastructural Virology

Professor	Takeshi Noda, D.V.M., D.Vet.Med. (2015)
-----------	---

Laboratory of Primate Model

Associate Professor	Tomoyuki Miura, D.V.M., D.Agr. (1988)
---------------------	---------------------------------------

Laboratory of Virus Evolution

Professor	Hirofumi Akari, D.V.M., D.Med.Sc. (2013) (concurrent)
Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005) (concurrent)
Assistant Professor (Spe.)	Amane Kogure, D.Med.Sc. (2013)

Technical Specialist

Technical Staff	Hitoshi Miyachi (2006)
	Hiromi Sakawaki (2015)
	Ryota Mizuta (2014)

Center for Emerging Virus Research

Head•Professor

Assistant Professor (Spe.)	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (2014)
	Akiko Makino, D.V.M.Ph.D (2012)
	Yohei Hizukuri, D.Sc (2013)
	Hirofumi Watanabe Pharm.D. (2015)

Lecturers (part time)

Toru Yoshihisa
Seiji Kojima
Yusuke Oba
Takumi Koshiba
Kenji Ichiyanagi
Koich Watashi
Yoshimasa Takahashi
Osamu Nureki

Toru Nakano
Masamichi Muramatsu
Junichiro Inoue
Tomohiko Takasaki

Research Fellows

Eiji Ishii (Laboratory of Gene Analysis)
Dan Takeuchi (Laboratory of Human Tumor Viruses)
Yuta Tsukamoto (Laboratory of Molecular Genetics)
Toshihiko Takeiwa (Laboratory of Biochemistry)
Tomoko Imamura (Laboratory of Infection and Prevention)
Daisuke Ori (Laboratory of Infection and Prevention)
Atsuko Wakabayashi (Laboratory of Infection and Prevention)
Sarang Tartey (Laboratory of Infection and Prevention)
Yukiko Harima (Laboratory of Growth Regulation)
Edward Wijaya (Laboratory of Integrated Biological Information)
Taisuke Izumi (Laboratory of Viral Pathogenesis)
Yusuke Nakano (Laboratory of Viral Pathogenesis)
Guangyong Ma (Laboratory of Virus Control)
Yukiko Muramoto (Laboratory of Ultrastructural Virology)
Masahiro Nakano (Laboratory of Ultrastructural Virology)
Keiko Shindo (Laboratory of Ultrastructural Virology)
Ai Himeno (Laboratory of Primate Model)

Library

Committee Chairman

Masahiko Sugita

Administration Office

Chief Officer
General Affairs

Katsumi Sakamoto (2013)
Kazue Hattori (2013)
Takayuki Ishikawa (2015)

Note

*Spe. = Specific

■構 成 員（2015 年 12 月）

所 長
副 所 長

協 議 員

ウイルス研究所教授（併）
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授
ウイルス研究所教授

小 柳 義 夫
秋 山 芳 展

米 原 伸
影 山 龍一郎
松 岡 雅 雄
大 野 睦 人
生 田 宏 一
小 柳 義 夫
杉 田 昌 彦
藤 田 尚 志
秋 山 芳 展
豊 島 文 子
朝 長 啓 造
竹 内 理 志
野 田 岳 志

研 究 部

がんウイルス研究部門 がん遺伝子研究分野

教 授・京大理博
准 教 授・京大医博
准 教 授・阪大理博
助 教・京大農博

秋 山 芳 展
酒 井 博 幸
森 博 幸
柳 川 伸 一

細胞制御研究分野

教 授・京大医博
助 教・京大生命博
特定助教・東大医博

杉 田 昌 彦
森 田 大 輔
水 谷 龍 明

生体発がん機構研究分野

教 授（併）・京大理博
助 教・京大理博

米 原 伸
村 上 昭

ヒトがんウイルス研究分野

教 授・東大獣医博
准 教 授・信大医博
助 教・阪大医博

朝 長 啓 造
土 方 誠
本 田 知 之

遺伝子動態調節研究部門

分子遺伝学研究分野

教 授・早大理博
准 教 授・阪大医博

藤 田 尚 志
加 藤 博 己

情報高分子化学研究分野

教 授・京大理博
助 教・京大理博
助 教・京大理博

大 野 睦 人
北 畠 真 郎
谷 口 一 郎

生体応答学研究部門

生体防御研究分野

教 授・京大医博
助 教・京大理博
助 教・阪大保健博
助 教・京大生命博
技術職員

生 田 宏 一
竹 本 経緯子
谷 一 靖 江
原 崇 裕
小中(北野) さつき

感染防御研究分野

教 授・阪大医博
准 教 授・京大医博
助 教・京大工博

竹 内 理
増 谷 弘 史
三 野 享 史

応答調節研究分野

教 授・(客)
准 教 授・(客)

河 岡 義 裕
岩 谷 靖 雅

細胞生物学研究部門

構造形成学研究分野

教 授・京大理博
助 教・京大生命博
助 教・京大理博

豊 島 文 子
松 村 繁
小 田 裕香子

増殖制御学研究分野

教 授・京大医博
准 教 授・京大医博
特定准教授・京大生命博
助 教・京大理博

影 山 龍一郎
大 塚 俊 之
今 吉 格
小 林 妙 子

信号伝達学研究分野

准 教 授・東大獣医博

宮 沢 孝 幸

情報制御学研究分野

教 授・(客)

利根川 進

高次生体情報研究分野

特定教授・コロンビア大博

Daron M. Standley

附属ヒトレトロウイルス研究施設

ウイルス病態研究領域

教 授・京大医博
助 教・東北大医博
助 教・京大医博

小 柳 義 夫
蝦 名 博 貴
佐 藤 佳

ウイルス制御研究領域

施 設 長・教 授・熊大医博
講 師・熊大医博
助 教・京大医博
技術職員（臨床検査技師）

松 岡 雅 雄
安 永 純一朗
志 村 和 也
大 西 知 帆

ウイルス免疫研究領域

教 授・(客)

Charles R. M. Bangham

附属感染症モデル研究センター

センター長・教授・東大獣医博
技術専門職員
技術職員
技術職員

ウイルス微細構造研究領域

教授・北大獣医博

霊長類モデル研究領域

准教授・東大農博

進化ウイルス研究領域

教授（兼）・山口大獣医博
准教授（兼）・東大獣医博
特定助教・阪大医博

附属新興ウイルス研究センター

センター長・教授・熊大医博
特定助教・東大医博
特定助教・名大理博
特定助教・京大薬博

非常勤講師

事務部

事務長
総務掛長
掛員

研究員

がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（ヒトがんウイルス）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（情報高分子化学）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）

朝長啓造
宮地均
阪脇廣美
水田量太

野田岳志

三浦智行

明里宏文
宮沢孝幸
木檜周

松岡雅雄
牧野晶子
檜作洋平
渡邊裕之

吉久徹
小嶋誠司
大場雄介
小柴琢己
一柳健司
渡士幸一
高橋宜聖
濡木理
仲野徹
村松正道
井上純一郎
高崎智彦

坂本雄美
服部和枝
石川貴之

石井英治
竹内壇
塚本雄太
竹岩俊彦
今村智子
織大祐
若林敦子

Sarang Tartey

細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（高次生体情報）
ヒトレトロウイルス（ウイルス病態）
ヒトレトロウイルス（ウイルス病態）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）
感染症モデル（ウイルス微細構造）
感染症モデル（ウイルス微細構造）
感染症モデル（ウイルス微細構造）
感染症モデル（霊長類モデル）

大学院生

理学研究科大学院生

がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
遺伝子動態調節（情報高分子化学）
遺伝子動態調節（情報高分子化学）

医学研究科大学院生

がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（がん遺伝子）
がんウイルス（細胞制御）
がんウイルス（ヒトがんウイルス）
がんウイルス（ヒトがんウイルス）
生体応答学（生体防御）
生体応答学（生体防御）
生体応答学（生体防御）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（信号伝達学）
細胞生物学（信号伝達学）
細胞生物学（信号伝達学）
ヒトレトロウイルス（ウイルス病態）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）

播磨有希子
Edward Wijaya
泉泰輔
中野雄介
馬広勇
村本祐紀子
中野雅博
神道慶子
姫野愛

宮崎亮次
秋山光市郎
古谷亘平
坂下宗平
山形優太郎
米重大河
明後尚美
川本崇仁
鈴木完

大門康志
何あゆみ
邑田悟
惣福梢
中村祥子
榛葉旭恒
阿部真也
小川真
貞廣曉利

Cristiane Lumi Hirata
Shama Ratiram Bansod

白石敦士
小林久美子
荒木杏奈
越智翔平
高木あかり
貝瀬峻
坂口翔一
橋本暁
小出りえ
山田英里
川月章弘
安間恵子
古田梨愛
三田上侑生

ヒトレトロウイルス（ウイルス制御） Mohamed, Mohamed
Mahgoub Mohamed Ahmed

薬学研究科大学院生

ヒトレトロウイルス（ウイルス制御） 松 本 尚
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御） 菰 原 聡太郎

人間・環境学研究科大学院生

細胞生物学（信号伝達学） 宮 穂 里 江
感染症モデル（霊長類モデル） 石 田 裕 樹
感染症モデル（霊長類モデル） 川 上 朗 彦

生命科学研究科大学院生

がんウイルス（細胞制御） 山 本 侑 枝
がんウイルス（細胞制御） 宮 本 歩 己
がんウイルス（細胞制御） 吉 岡 佑 弥
がんウイルス（細胞制御） 高 間 義 晴
がんウイルス（細胞制御） 阿 野 敏 明
がんウイルス（細胞制御） 櫻 井 絵 理
がんウイルス（細胞制御） 嶋 耀 子
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 山 本 祐 介
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 小 嶋 将 平
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 劉 笑 舒
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 小 池 悠 斗
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 柳 井 真 瑚
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 小森園 亮
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 徳 永 智 哉
がんウイルス（ヒトがんウイルス） Bea clarise B.Garcia
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 赤 堀 祐 一
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 岡 村 瞳
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 笹 井 麻千子
がんウイルス（ヒトがんウイルス） 宮 山 陽 平

Yao Wan Ling

遺伝子動態調節（分子遺伝） 山 田 辰太郎
遺伝子動態調節（分子遺伝） 覃 勉

Daquin Kasumba Muhandwa

遺伝子動態調節（分子遺伝） 池 田 宗太郎
遺伝子動態調節（分子遺伝） 羽者家 宝
遺伝子動態調節（分子遺伝） 脇 本 舞
遺伝子動態調節（分子遺伝） 竹 内 文 彦
遺伝子動態調節（分子遺伝） 李 受 玫

Ahmed AbuTayeh

Amanda Horton

遺伝子動態調節（分子遺伝） 沙 添 威
遺伝子動態調節（分子遺伝） 許 仲 辰
遺伝子動態調節（分子遺伝） 吉 村 礼 桜
遺伝子動態調節（分子遺伝） 三 好 史 高
遺伝子動態調節（分子遺伝） 杉 山 沙 希
遺伝子動態調節（分子遺伝） 清 水 翔 太

遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
遺伝子動態調節（分子遺伝）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
生体応答学（感染防御）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（構造形成学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
細胞生物学（増殖制御学）
ヒトレトロウイルス（ウイルス病態）
ヒトレトロウイルス（ウイルス病態）
ヒトレトロウイルス（ウイルス制御）

大高木 結 媛
Khalil Jumana A.T.
IVANA DUIĆ

朱 梦 婕
藤 原 栞
西 村 祥 子
早 田 信 正
岩 澤 嘉 一
阿 部 寛 登
阿 部 壮 岐

Xiaotong Cui

波多野 華 恵
赤 木 宏太朗
山 唄 大 智
佐 野 仁 美
石 橋 理 基
福 原 充 子
池 田 愛 遼
一 條 遼
小松崎 友 紀
東 浦 千 夏
上 月 智 司
小 林 大 毅
飯 塚 ゆ い
前 田 勇 樹
安 枝 侑 平
松 宮 舞 奈
神 尾 航 平
上 田 修 平
森 脇 美 優
紀ノ定 明 香

発 行 日	2016 年 5 月 11 日
発 行	京都大学ウイルス研究所
編 集	杉 田 昌 彦
発行責任者	小 柳 義 夫



Institute for Virus Research
Kyoto Universtiy