

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点 平成 28 年度成果報告書

① 霊長類 P3 感染実験

研究課題	
No. 1 : アカゲザルを用いた HIV-1 の個体内複製機構・病原性発現機構の解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授 足立 昭夫	三浦 智行
研究成果	
<p>研究代表者らは、HIV-1/AIDS 霊長類感染モデル解析システムの確立に向け、細胞馴化法によるウイルスの改変及び感染評価系の構築に精力的に取り組んでいる。本研究の主要成果は以下のようにまとめられる。(1) CCR5 指向性 HIV-1rmt クローンは確実にアカゲザル個体で増殖する。しかし、C X C R4 指向性 HIV-1rmt クローン MN4/LSDQgtu に比較すると、おおよそ四分の一程度であり、持続感染を個体で成立させるためには更なる改善が必要である。(2) アカゲザル M1.3S 細胞を用いたウイルスの細胞馴化法により、プロトタイプ HIV-1rmt クローン 5gtu (J. Virol. 87: 11447-11461, 2013. これまでに報告のあるうちでベストの増殖性) より顕著に増殖能が向上した 2 種類のクローン (gtu+CI1 及び gtu+A4CI1) を得た (論文投稿中)。いずれも臨床分離株由来の env 遺伝子を持つクローンである。この他、上記 6 種類の CCR5 指向性 HIV-1rmt クローンの混合感染等から、増殖効率が上昇した分子クローンが多数得られている。これらの成果に基づき、M1.3S 細胞での確認試験を行うとともに、アカゲザル個体感染実験を予定している。(3) アカゲザル直腸生検材料由来の粘膜固有層リンパ球を用いたウイルス感染効率の測定系を構築した。比較対象に用いた SIVmac239 (SIV の病原性標準クローン) と異なり、臨床分離株由来 env 遺伝子を持つ HIV-1rmt では、個体によって感染効率に差が認められた。n 数を増やして腸管由来細胞におけるウイルス感染の個体差を調べる必要があり、これに基づき個体内複製や病原性との関連を解析する。</p> <p>今後、より多くのアカゲザル個体を用い、研究成果の (1) ~ (3) を更に発展させ、最終目標の達成に努めたい。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
<p>Naoya Doi, Chieko Ishifune, Koji Yasutomo, Tomoyuki Miura, Yosuke Sakai*, Kumpei Fujimoto*, Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Masako Nomaguchi, Akio Adachi: Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral growth ability in gut-derived cells. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25, 2016.</p> <p>Yosuke Sakai*, Kumpei Fujimoto*, Naoya Doi, Masako Nomaguchi, Akio Adachi: Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25, 2016.</p>	

研究課題名	
No. 2 : インフルエンザウイルスの霊長類感染モデルを用いた研究	
研究代表者	受入研究者（代表）
東京大学医科学研究所 教授 河岡 義裕	三浦 智行
研究成果（詳細）	
<p>サルモデルにおいて、インフルエンザウイルスのエアロゾル感染系を確立するため、市販のネブライザーを用いて、エアロゾル化した 4×10^7 個の高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスをカニクイザルに噴霧した。コントロール群では、通常行っている感染方法である経鼻・経口・気管内・眼内投与方法を用いて、10^7 個/ml に調整したウイルス液 4 ml をサルに接種した。感染後 4 日目に、それぞれの群のサルを安楽殺した後、肺サンプルを採取し、ウイルス学的解析を行った。その結果、エアロゾル感染群では、全ての個体の 6 つの肺葉において、10^4 個程度のウイルスが分離された。それに対して、従来の投与方法によってウイルス液を接種したコントロール群では、個体や肺葉によるウイルス力価の差が大きく、肺葉から全くウイルスが分離されない場合もあった。以上の結果から、エアロゾル化した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスを投与したサルでは、通常の投与方法によってウイルス液を接種したサルに比べて、ウイルスが全ての肺葉に効率よく感染することが分かった。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
渡辺登喜子、岩附研子、木曾真紀、伊藤睦美、河岡義裕：サルモデルにおけるインフルエンザウイルスのエアロゾル感染系の確立. 2016 年日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6 日－8 日	

研究課題名	
No. 3 霊長類モデルによる HIV 感染症根治のための基盤研究	
研究代表者	受入研究者（代表）
京都大学霊長類研究所 教授 明里 宏文	三浦 智行
研究成果	
<p>H27 年度までの長期 HIV 潜伏感染カニクイザルを用いた解析において、リザーバー細胞は少なくとも腋窩、鼠径、腸管、肺門等の各リンパ節（LN）に存在していることが示唆された。一方、近年、リンパ節の胚中心（GC）に CD8+ T 細胞がほとんど局在しないこと、また ART による HIV/SIV コントローラーにおいて GC 内に存在する T 細胞の一種である TFH 細胞がウイルス複製の場であることが報告されている。そこで、感染 1 年後のカニクイザル 2 頭から摘出した LN 細胞を用いて解析を行った結果、TFH 細胞におけるプロウイルス DNA 陽性細胞数（PVL）の割合、および、T 細胞活性化マーカーである CD69 陽性細胞数の割合が他の CD4+ T 細胞に比べ顕著に高いことが示された。加えて、HIV 潜伏感染個体への CD8+ T 細胞枯渇処理により誘導された血漿ウイルスのゲノム変異について解析を行った結果、興味深いことに感染急性期に比べ再活性化時では <i>gag</i> および <i>pol</i> 遺伝子領域に計 18 個の変異が挿入されており、そのうち 7 個はアミノ酸変異を伴うものであった。仮に、潜伏期においてウイルス複製が全く起こっていないとすれば、ゲノム変異の蓄積は見られないと考えられることから、潜伏期においてもウイルス複製が TFH 細胞をはじめとするリンパ局所等で持続しており、CTL からの逃避変異が誘導されることによってリザーバーが維持されているのではなかと推測される。上記の CD8+ T 細胞枯渇処理において、当該細胞の枯渇状態が 3 カ月以上維持出来たにも関わらず、血中のウイルス RNA 量は枯渇処理の 1~2 週後にピーク値を示した後減少に転じ、低レベルで推移した。このことから、ウイルス増殖は CD8+ CTL および中和抗体など他の抗ウイルス免疫による制御を受けている可能性が考えられた。そこで、この期間における中和抗体活性を測定したところ、ウイルス再活性化後に中和抗体価が顕著に上昇し、それと相反して血中ウイルス RNA 量は減少していた。これらのことから、潜伏感染状態の維持に細胞性免疫および液性免疫の両方が寄与していることが明らかとなった。以上のことから、本霊長類モデルは、HIV リザーバーの動態把握や HIV 複製制御機構の解析に大きく寄与すると共に、LN 中の TFH 細胞におけるプロウイルス DNA 量を指標とすることで Shock and kill 療法など HIV 感染症の根治に向けた新規治療法の有効性や安全性の検証に有用なモデルとなると期待される。</p>	
論文発表	
<p>Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, <u>Akari H</u>, Sato H, Shioda T: Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. <i>Journal of General Virology</i> 97, 963-976, 2016</p> <p>Nakashima M, Tsuzuki S, Awazu H, Hamano A, Okada A, Ode H, Maejima M, Hachiya A, Yokomaku Y, Watanabe N, <u>Akari H</u>, Iwatani Y: Mapping Region of Human Restriction Factor APOBEC3H Critical for Interaction with HIV-1 Vif. <i>Journal of Molecular Biology</i>, in press.</p>	

学会発表

Yohei Seki, Akatsuki Saito, Yorifumi Sato, Shigeyoshi Harada, Hirotaka Ode, Hiroshi Ishii, Takeshi Yoshida, Megumi Murata, Hiroyuki Kangawa, Yuji Watanabe, Yasumasa Iwatani, Kazuhisa Yoshimura, Yasuhiro Yasutomi, Tomoyuki Miura, Tetsuro Matano, Hirofumi Akari: Long-term Latency of HIV-1mt Infection in Cynomolgus Macaques is Reserved in Follicular Helper T Lymphocytes. 34th Annual Symposium on

Nonhuman Primate Models for AIDS, Louisiana, USA, October 11 - 14, 2016

”

Hirofumi Akari, Yohei Seki, Akatsuki Saito, Yorifumi Satou, Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Takeshi Yoshida, Megumi Murata, Yuji Watanabe, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Tomoyuki Miura: R5-tropic HIV-1 infection leads to long-term latency in cynomolgus macaques. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016年10月23日-25

日

研究課題名	
No. 4 ； 粘膜感染サルエイズモデルにおける CTL 誘導に関する研究	
研究代表者	受入研究者（代表）
国立感染症研究所エイズ研究センター 教授 俣野 哲朗	三浦 智行
研究成果	
<p>SIV 感染サルより経時的に採血し分離した血漿およびリンパ球を用いて、血漿ウイルス量定量、ウイルスゲノム塩基配列解析、末梢血 CD4 陽性 T 細胞数測定、SIV 特異的 T 細胞反応測定等を行い、感染免疫動態解析を継続してデータを蓄積した。特に伝播ウイルス感染サルの解析では、ドナーサルの MHC 拘束性 CTL からの逃避変異がレシピエントサルにおいてもほとんど復帰変異を生じず、SIV 伝播により MHC 関連変異が蓄積し、その結果 SIV の in vitro 複製能低下に結びつくことを明らかにした。安楽殺・解剖時に得られたサンプルだけでなく、直腸生検より得られたサンプルを用いた SIV 特異的 T 細胞反応解析系を構築することにより、ワクチン後および SIV 感染後の経時的な腸管粘膜免疫解析を可能とした。一方、iPS 細胞由来 CTL 接種実験に向けた第一段階として、京都大学 iPS 細胞研究所の金子新准教授の協力のもと、サルの末梢血より分離した CD8 陽性 T 細胞由来の iPS 細胞をもとに樹立した自己 iPS 由来非特異的 CD8 陽性細胞のサルへの導入実験を行い、導入細胞の動態解析系を検討した。</p>	
論文発表	
<p><u>Ishii, H.</u>, <u>Matsuoka, S.</u>, Nomura, T., <u>Nakamura, M.</u>, Shiino, T., Sato, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., <u>Mizuta, K.</u>, <u>Sakawaki, H.</u>, <u>Miura, T.</u>, Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. Sci. Rep. 6:30153, 2016.</p>	
学会発表	
<p><u>Matano T.</u> Virus-host immune interaction in SIV infection. The 17th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 11/1/2016.</p>	

②マウス P3 感染実験

研究課題名	
No. 1 : ヒト化マウスを用いた HIV-1 潜伏感染モデルの確立	
研究代表者	受入研究者 (代表)
京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 教授 高折 晃史	小柳 義夫
研究成果	
<p>昨年に引き続き以下の項目を検討した。</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vpx VLP を用いた静止期 T 細胞の SAMHD1 ノックダウンの系の確立を試みた。VPX を導入した静止期 T 細胞に高効率なレンチウイルス導入法を用いて HIV-LTR プロモーターで発現する GFP および EF1a プロモーターで発現する mCherry をもつデュアルレポーターウイルス (GMC ウイルス) の感染を試みたが、Cherry 陽性細胞は得られなかった。SAMHD1 のノックダウン効率が低いことが問題と考えられ条件を検討中である。今後初代培養 T 細胞を用いて各分画をソーティングし RNAseq を試みる予定である。 • R5 型 Env を有する複製可能なデュアルレポーターウイルス (MKO) の作製を試みたうまくいかず検討中である。 	
論文発表	
Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Shirakawa K, Kobayashi M, <u>Takaori-Kondo</u> A. (2016) Core Binding Factor β Protects HIV, Type 1 Accessory Protein Viral Infectivity Factor from MDM2- mediated Degradation. <i>J Biol Chem</i> 291(48):24892-24899.	
学会発表	
なし	

③遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

研究課題名	
No. 1 : B型肝炎ウイルス高効率感染培養系の樹立とこれを利用した新規抗ウイルス剤探索	
研究代表者	受入研究者（代表）
国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官 渡士 幸一	土方 誠
研究成果	
<p>新規 HBV 感染増殖系としては、これまで報告されてきた肝がん細胞を用いたものではなく、できるだけ本来の肝細胞に類似した細胞を用いることを目的としてきた。当研究室で独自に樹立した不死化ヒト肝細胞 HuS-E/2 細胞に HBV 感染受容体である NTCP 分子を発現させた細胞株 E/NtG8 細胞を樹立し、これを Cellbed を用いた立体培養することで、安価で再現性の高く、B型肝炎ウイルス（HBV）の感染増殖を再現する非がん細胞を用いた培養系の構築に成功した。この HBV 培養系では HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウス血清由来の遺伝子型 A と C の HBV の高効率感染増殖が観察可能であり、感染増殖は約一ヶ月間持続することがわかった。また、この間培養液中に産生された HBV は再感染能を有することが明らかになった。この HBV 培養系の利便性を検証するために、siRNA の効果の持続性を検討したところ、siRNA による遺伝子発現の抑制効果は細胞に siRNA を導入してから 14 日後においても持続しており、この系は siRNA を用いた各種遺伝子発現抑制による HBV 感染増殖関連細胞因子の解析に有用であることがわかった。また一方、ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いて、この細胞中における外来遺伝子発現の効率と持続性を検討した結果、ルシフェラーゼの発現も 2 週間以上持続することが確認された。以上の結果から、この HBV 培養系は、本来のヒト肝細胞に類似した性質を有する細胞で HBV 感染増殖を再現し、分子生物学的解析可能な新たな培養系であることが確認された。抗 HBV 薬のスクリーニングは上記新規 HBV 培養系の至適化と同時に進めていたところ、脂肪酸生合成系酵素阻害薬により HBV 粒子産生が抑制されることを明らかにした。Fatty acid synthase (FASN) の阻害剤 GSK1995010 は容量依存的に HBV 粒子産生細胞からの HBV 粒子産生を用量依存的に阻害するが、同時に産生された HBV 粒子の感染性を低下させることを見出した。各種脂肪酸を同時添加することで、その GSK1995010 の抗 HBV 効果に対する抑制効果を検証した結果、長鎖飽和脂肪酸が効果を有することが明らかとなり、このことから長鎖飽和脂肪酸の産生が HBV 粒子産生に関与することがわかった。</p>	
論文発表	
Okamura, H. *, Nio Y., Akahori Y., Kim S., <u>Watashi K.</u> , Wakita T., <u>Hijikata M.</u> (2016) Fatty acid biosynthesis is involved in the production of hepatitis B virus particles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 475, 87-92.	
学会発表	
Okamura H., Akahori Y., Nio Y., <u>Watashi K.</u> , <u>Wakita T.</u> , <u>Hijikata M.</u> : Fatty acid biosynthesis specifically regulates hepatitis B virus particle production. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 2016 年 11 月 23-25 日	
岡村 瞳、赤堀祐一、金ソレイ、 <u>渡士幸一</u> 、脇田隆宇、 <u>土方 誠</u> : 脂肪酸生合成経路の阻害による HBV 粒子産生抑制機構の解析、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016 年 5 月 13 日～15 日、名古屋	

研究課題名	
No. 2 放射線腸障害におけるトリガー因子の同定と新規治療法の開発	
研究代表者	受入研究者（代表）
千葉大学大学院医学研究院粘膜免疫学 教授 植松 智	竹内 理
研究成果	
<p>腸管粘膜固有層には大量の好酸球が存在しているが、通常は絨毛の粘膜固有層に局在しており、粘膜下層には殆ど認められない。ところが、γ線腹部限局照射 12 週の Balb/C のマウスにおいて、線維化している漿膜下の粘膜下層に好酸球の著明な浸潤が認められる。GATA-1 の発現を正にオートレギュレーションするエンハンサーの GATA 結合領域 (dblGATA) を欠損させたマウス ΔdblGATA マウスでは、好酸球が特異的に消失している (Dyer K. D., et al. J. Immunol. 179:1693, 2007)。我々は、ΔdblGATA マウスを解析の結果、腸管粘膜固有層の好酸球が完全に消失していることを確認した。興味深いことに、ΔdblGATA マウスに γ 線腹部限局照射を行うと、12 週における線維化が著明に抑制されていることが明らかになり、放射線による線維化に好酸球が必須の役割を果たすことが分かった。放射線照射によって、通常は死なない陰窩部の細胞が定期的に細胞死を誘導していることが分かった。これらの死細胞成分によって、筋線維芽細胞が活性化され好酸球遊走因子の eotaxin を誘導し、好酸球を粘膜下層に遊走させていることが明らかになった。さらに、活性化した筋線維芽細胞から出されるサイトカインによって好酸球が活性化、脱顆粒し I 型コラーゲンの誘導を促進させることも分かった。</p>	
論文発表	
未発表	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 3 ； 内在性ボルナウイルス様配列の生物学的意義の解明	
研究代表者	受入研究者（代表）
鹿児島大学共同獣医学部 特任助教 堀江 真行	朝長 啓造
研究成果（詳細）	
<p>BLASTによりデータベース上に存在する種のコウモリゲノムに内在する EBL 配列を同定した。それぞれの EBL 配列に関して、網羅的な ORF スクリーニングを行ったところ、<i>E. fuscus</i> ゲノムに存在する L 遺伝子由来 EBL (eEBLL-1)、<i>M. natalensis</i> のゲノムに存在する N 遺伝子由来 EBL (miEBLN-1) が、それぞれ大きな ORF (eEBLL-1 は 1718 アミノ酸、miEBLN-1 は 376 アミノ酸のタンパク質をコードし得る) を持つことを突き止めた。</p> <p>(1) eEBLL-1</p> <p><i>E. nilssonii</i> および <i>E. serotinus</i> のゲノムにも相同な eEBLL-1 が存在することを実験的に証明した。3 種のコウモリの分岐年代が約 1180 万年前と推定されていることから、eEBLL-1 は 1180 万年以上前に内在化したことが示唆された。分子進化学的解析により、eEBLL-1 は負の自然選択圧の存在下において進化していたことが明らかとなった。</p> <p>実験的には、eEBLL-1 が <i>E. serotinus</i> および <i>E. nilssonii</i> の体内において転写されていることを明らかにした。さらに、抗 eEBLL-1 抗体の作成を試みたが、免疫原の準備および免疫に時間がかかったため、平成 28 年度に評価することはできなかった。</p> <p>(2) miEBLN-1</p> <p><i>M. fuliginosus</i> のゲノムにも相同な miEBLN-1 が存在することを実験的に証明した。これらの分岐年代が約 1720 万年前と推定されていることから、miEBLN-1 の内在化は 1720 万年以上前に起こったことが示唆された。また、<i>M. fuliginosus</i> の肝臓から miEBLN-1 の転写産物を確認した。さらに抗 miEBLN-1 抗体作成のため、大腸菌における組換え miEBLN-1 の発現・精製を行った。平成 29 年度には免疫原として使用する予定である。</p>	
論文発表	
<p>Horie, M., Kobayashi, Y., Honda, T., Fujino, K., Akasaka, T., Kohl, C., Wibbelt, G., Muhldorfer, K., Kurth, A., Muller, M.A., Corman, V.M., Gillich, N., Suzuki, Y., Schwemmler, M., Tomonaga, K., 2016. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. <i>Sci. Rep.</i> 6, 25873.</p>	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 4 免疫応答における IL-7 レセプターの機能解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
九州大学生体防御医学研究所 教授 吉開 泰信	生田 宏一
研究成果	
<p>内在性のグルココルチコイド（GC）が IL-7R の発現を制御しているのかどうかを明らかにするために、IL-7Rα 遺伝子エンハンサーの GR 結合モチーフに点突然変異を導入した IL-7Rα-GRmut マウスを解析した。マウスの血中の GC 濃度は夜に高く昼に低い。まず、正常マウス T 細胞の IL-7R 発現レベルは夜に高く昼に低い日内変動を示したが、IL-7Rα-GRmut マウスではこの変動が消失していた。また、CD4Cre GRcKO マウスでも同様の結果を示した。さらに、正常マウスでは脾臓の T 細胞数が夜に増加し昼に減少する一方、末梢血中では逆に昼に増加し夜に減少した。これに対し、二種類の変異マウスではこのような T 細胞数の日内変動が見られなかった。また、正常マウスでは脾臓へのホーミングに必要な CXCR4 の発現レベルが IL-7R と同様の日内変動を示したが、二種類の変異マウスではその変動が消失していた。OVA を発現するリステリア菌を正常マウスに感染させると、夜に感染させた場合には昼と比較して脾臓における OVA 特異的な CD8 T 細胞が多くなるが、二種類の変異マウスではこの変動が消失して低値のままであった。以上の結果から、GC は IL-7R と CXCR4 の発現を誘導することで、T 細胞の体内分布と免疫応答を制御していることが示された。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
<p>榛葉旭恒、崔広為、阿部真也、朱媛博、向平妃沙、谷一靖江、原崇裕、生田宏一：Role of glucocorticoids in T cell homeostasis and T cell response、The 23rd East Asia Joint Symposium、台北、2016 年 10 月 19 日</p> <p>Akihiro Shimba, Guangwei Cui, Shizue Tani-ichi, Takahiro Hara, and Koichi Ikuta: Regulation of IL-7 receptor expression by a proximal enhancer. KTCC 2017, Kyoto, March 16, 2017</p>	

研究課題名	
No. 5 大規模配列解析によるフィロウィルスの病原性に関するアミノ酸サイトの同定と機能解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
東海大学医学部 助教 中川 草	小柳 義夫
研究成果	
<p>エボラウイルスは、現在までに 5 種類が報告されている。中でもザイール (Zaire) 種は、アウトブレイクの発生頻度が高く、特に 2014-15 年に西アフリカで多くの死者を出した。2014-15 年のアウトブレイクは過去に例をみない規模の流行であったことから、その一因として、2014-15 年に流行したウイルスは、ヒトへの感染効率をあげるような変異を GP が獲得している可能性があると考えた。そこで、Zaire 種の糖蛋白質 (Glycoprotein, GP) をコードする遺伝子 147 配列 (重複配列を除いた) を用い、非同義置換 (dN) と同義置換 (dS) の進化速度の比率 (dN/dS) を計算し、正の淘汰を受けた、すなわち生存に有利な突然変異として集団に広がったアミノ酸置換サイトを推定した。その結果、2 つのアミノ酸サイトで統計的に有為な正の淘汰 (A82V と T544I) を同定した。また、2014-15 年のアウトブレイクで流行した Makona 株の全ゲノム配列を用いた系統解析では、これらの二つの変異体の集団への広まり方が、まったく異なることを発見した。A82V 変異は 2014 年 5 月あたり、ギニアからシエラレオネへの感染拡大の過程において生じて集団に固定されたのに対し、T544I 変異はアウトブレイクのごく初期に少なくとも 3 回生じたが、集団に固定することなく消失したことが分かった。さらに、これらのアミノ酸変異がウイルスの感染価に与える影響について、Makona GP を用いたシュードタイプレポーターアッセイで調べたところ、祖先型 (A82/T544) の Makona GP と比べ、A82V と T544I 変異型の GP の感染価はそれぞれ 1.8 倍、4.3 倍上昇していた。従って、T544I と比べ緩やかな感染能の上昇を示した A82V の変異が集団に固定し、広まったと考えられる。以上の結果は、エボラウイルスのヒトに対する感染能の著しい上昇は、むしろエボラウイルスの増殖には悪影響があり、緩やかな上昇のほうが集団での広がりにより有利であったことを示唆していると考察した。我々は本成果を Genes to Cells 誌に報告した (Ueda et al., Genes Cells 2017)。本研究で同定した A82V については我々以外にアメリカ、イギリス、ドイツを中心としたグループが私達に僅差で先行してそれぞれ報告した (Diehl et al., Cell 2016; Urbanowicz et al., Cell 2016; Dietzel et al., J Virol 2017)。また、T544I 変異についても感染価の向上についてドイツとアメリカの研究グループらも私達の後に続けて報告した (Hoffmann et al., J Virol 2017; Wang et al., Cell Host Microbe. 2017)。</p>	
論文発表	
<p><u>Ueda MT</u>, Kurosaki Y, Izumi T, Nakano Y, Oloniniyi OK, Yasuda J, <u>Koyanagi Y</u>, Sato K, <u>Nakagawa S</u>. (2017) Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. Genes Cells. 22(2):148-159.</p>	
学会発表	
<p><u>Ueda, M.</u>, Kurosaki, Y., Izumi, T., Nakano, Y., Oloniniyi, O.K., Yasuda, J., <u>Koyanagi, Y.</u>, <u>Sato, K.</u> and <u>Nakagawa, S.</u> Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. 日本進化学会第 18 回東京大会、東京、8 月 25-28 日、2016.</p>	

上田真保子、黒崎陽平、泉泰輔、中野雄介、Oloniniy K. Olamide、安田二郎、小柳義夫、佐藤佳、中川草。エボラウイルス糖蛋白質 (GP) の 82 番目と 544 番目のアミノ酸変異は感染効率に関与する。第 39 回日本分子生物学会年会，横浜，11 月 30 日-12 月 2 日。

研究課題名	
No.6 : Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system	
研究代表者	受入研究者 (代表)
UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing Associate professor An, Dong Sung	小柳 義夫
研究成果	
<p>A highly efficient CRISPR/Cas9 delivery system is critical for hematopoietic stem cell (HSC) based gene therapy for many diseases. Current, non-viral and viral methods (lentivirus and adeno-associated virus serotype 6) in common use for delivery of CRISPR/Cas9 have several drawbacks including limited efficiencies in HSCs. Persistence of DNA based viral vectors may also lead to greater off-target effects in the long-term. In previous work, we repurposed Sendai virus (SeV), as a delivery system for highly efficient Cas9-mediated gene editing (~75-98% without selection) in human cells, including primary human macrophages, with minimal off-target effects. SeV is non-pathogenic in humans, has an established safety record, and has been extensively studied and modified for gene therapy applications. SeV is an RNA virus that replicates solely in the cytoplasm and has no viral DNA phase, thereby eliminating any potential for undesired random integration into the host genome. Flanking the guide RNA with self-cleaving ribozymes allowed this RNA vector to produce the precise ends required for gRNA function, and we showed for the first time that self-cleaving ribozymes were tolerated within the paramyxovirus genome. Here, we show further safety improvements in our SeV CRISPR/Cas9 delivery system by introducing mutations to confer temperature sensitivity (ts) that allows removal of the virus at non-permissive temperatures (37-38° C) once editing at a permissive temperature (~34° C) has occurred. This non-cytopathic ts rSeV-Cas9 vector transduced human fetal liver and peripheral blood mobilized CD34+ hematopoietic stem cells at ~90% and resulted in ~80% mutagenesis of the targeted locus (ccr5) within 2 days. Shifting to 37° C resulted in rapid loss of the rSeV-Cas9 vector. Introducing ts mutations into replication-deficient SeV vectors (e.g. by removing the fusion protein essential for virus entry) will likely synergistically enhance the safety of our SeV-Cas9 vectors for clinical applications requiring highly efficient gene editing in HSCs.</p>	
論文発表	
<p>Shimizu S, Yadav SS, <u>An DS</u> (2016) Stable Delivery of CCR5-Directed shRNA into Human Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells via a Lentiviral Vector. <i>Methods Mol Biol</i> 1364:235-48</p> <p>Pernet O, Yadav SS, An DS. (2016) Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. <i>Adv Drug Deliv Rev.</i> 2016 Aug 1;103:187-201. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027. Epub 2016 May 2. Review.</p>	

学会発表

Dong Sung An. A novel chemoselection strategy for genetically modified HIV protected hematopoietic stem/progenitor cells. The 2016 Palm Springs Symposium Host Versus Pathogens

Dong Sung An. A novel chemoselection strategy for genetically modified HIV protected hematopoietic stem/progenitor cells. Conference on Cell & Gene Therapy for HIV Cure 2016

Dong Sung An. A novel chemoselection strategy for genetically modified HIV protected hematopoietic stem/progenitor cells. Strategies for an HIV Cure 2016

Oliver Pernet, Dong Sung An. Highly Efficient Sendai Virus Mediated CRISPR/Cas9 ccr5 Editing in Hematopoietic Stem Cells. The 2017 Palm Springs Symposium on HIV/AIDS
“HIV Disease from Resistance to Cure”

研究課題名	
No. 7 Ⅱ 構造決定に向けた細菌型 S2P ホモログの変異体作製	
研究代表者	受入研究者（代表）
横浜市立大学大学院国際総合科学群自然科学系列 准教授 禾 晃和	秋山 芳展
研究成果	
細菌型 S2P ホモログに抗体のエピトープ配列を変異として導入したコンストラクトを作製し、発現精製を行った。本課題で取り上げた S2P ホモログ 2 種類について、いずれも安定して精製でき、また分散状態も良好な試料が得られ、これらは抗体 Fab 断片とも強固に結合することが確かめられた。この S2P ホモログと Fab 断片の複合体を用いて、結晶化など構造解析に向けた研究に取り組んだ。	
論文発表	
Nagae, M., Mishra, S.K., Neyazaki, M., Oi, R., Ikeda, A., Matsugaki, N., Akashi, S., Many, H., Mizuno, M., Yagi, H., Kato, K., Senda, T., Endo, T., <u>Nogi, T.</u> , Yamaguchi, Y. (2017) 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. Genes Cells. in press.	
<u>Nogi, T.</u> , Mihara, E., Yasui, N., Takagi, J. (2017) Immunoaffinity Purification of the Glycosylated Extracellular Fragment of Mouse Plexin A2 Produced in a Mammalian Expression System. Methods Mol. Biol. 1493, 57-72.	
学会発表	
<u>禾 晃和</u> ：マルチドメイン型細胞表面受容体によるリガンド結合と解離の調節。蛋白質研究所セミナー・「膜タンパク質の構造ダイナミクス」 Structural dynamics of membrane proteins、大阪府吹田市、2016年5月12-13日	
下地 恵令奈、浴本 亨、山根 努、 <u>禾 晃和</u> 、池口 満徳：神経軸索伸長ガイダンス分子セマフォリンと受容体プレキシンのタンパク質複合体の分子モデリング。第16回日本蛋白質科学会年会、福岡、2016年6月7-9日	
<u>禾 晃和</u> :LDL 受容体ファミリーの立体構造解析から見えてきた脂質代謝のメカニズム。金沢大学超然プロジェクト講演会、金沢、2016年10月31日	

研究課題名	
No. 8 ； インフルエンザウイルス・転写複製装置のクライオ電子顕微鏡解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
沖縄科学技術大学院大学 生体分子電子顕微鏡解析ユニット 博士研究員 杉田 征彦	野田 岳志
研究成果	
<p>精製 RNP を用いた in vitro transcription/replication 実験系、クライオ電子線トモグラフィ法、三次元再構築ソフトウェア (IMOD)、およびボリュームセグメンテーション用のモデリングソフトウェア (FEI Amira 6) によって、転写・複製反応によって合成された RNA の構造を解析した。その結果、酵素反応中において RNP の螺旋構造が崩れ、ループ状の RNA を形成することが明らかになった。また、不均一な構造を持つ野生型 RNP の解析と並行して、ゲノム RNA の一部を人工的に欠損させ均一な構造を持つ組換え RNP を試料として用いることで、より詳細な構造解析を目指している。組換え RNP を哺乳細胞内で再構築し精製する実験手法を基本的なパイプラインを確立した。現在は、ネガティブ染色法およびクライオ電子顕微鏡法により精製 RNP の品質確認と精製方法改善へのフィードバック、および氷包埋による単粒子解析法のための試料凍結条件の最適化を行っている。</p>	
論文発表	
<p><u>Sugita Y</u>, Kawaoka Y, <u>Noda T</u>, <u>Wolf M</u> (2016) Structure of the Ebola Virus Nucleocapsid Core by Single Particle Cryo-Electron Microscopy. <i>Microscopy and Microanalysis</i>. 2016 July 1; 22(S3): 66-67</p>	
学会発表	
<p>杉田征彦、河岡義裕、<u>野田岳志</u>、<u>Matthias Wolf</u>: エボラウイルス NP helix のクライオ電子顕微鏡解析. 5th Negative Strand Virus-Japan symposium、沖縄、2016年1月25-27日</p> <p><u>Yukihiko Sugita</u>, Masahiro Nakano, Keiko Shindo, Yukiko Muramoto, Noriyuki Kodera, Yoshihiro Kawaoka, <u>Takeshi Noda</u>, <u>Matthias Wolf</u>: Cryo-electron tomographic analysis of influenza viral transcription. Three Dimensional Electron Microscopy Gordon Research Conference, Hong Kong, June 19-24, 2016</p> <p>杉田征彦、松波秀行、河岡義裕、<u>野田岳志</u>、<u>Matthias Wolf</u>: エボラウイルス・ヌクレオキャプシドの中核構造. 6th Negative Strand Virus-Japan symposium、沖縄、2017年1月16-18日</p>	

研究課題名	
No. 9 Ⅱ SLOT 法を用いたインフルエンザウイルスに対する亜型交差性中和抗体の創出	
研究代表者	受入研究者（代表）
慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授 井上 浄	野田 岳志
研究成果	
<p>京都大学ウイルス研究所にて、SLOT 法に必要な小動物用麻酔器、リンパ組織移植用の手術機材等のセッティングならびにデータ解析用のフローサイトメーター等の機器のセッティングを行った。次にインフルエンザウイルスの HA 抗原を用いてマウスに免疫を行い、そのマウスの 2 次リンパ組織を用いて SLOT を行った。また、リンパ球の解析ならびに抗体産生の測定系のチューニングを行った。実際に SLOT を行ったマウスの解析では HA 抗原に対する抗体産生が認められ、今後亜型交差性について検討を進める予定である。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 10 新規神経幹細胞分化法によるサブタイプ特異的ニューロン産生技術の開発	
研究代表者	受入研究者（代表）
Korea Brain Research Institute (KBRI) Dept. of Neural Development & Diseases Lab Head 小曾戸 陽一	小林 妙子
研究成果	
<p>平成 28 年度の共同研究として、上記に記したとおり、ヒト培養細胞である U2OS 細胞を主に用いた生細胞内染色体ダイナミクス可視化のための条件検討を遂行した。染色体の一部を標識するための方法として、まず、Cy3-dUTP を短時間培養液に加えることで、染色体の一部を標識し、引き続き京都大学 iCeMS の LSM880Airy を用いて、超解像顕微鏡観察を遂行した。標識および染色体動態の観察は成功したが、本手法による標識は細胞膜の一部に物理的ダメージを与えることが必要であり、幹細胞において活用することに困難が生じる可能性がある。そこで次に、CRISPR/Cas9 技術を応用し染色体の特定部位（テロメア領域など）を蛍光蛋白質で標識する手法を試行した。結果として、良好な標識および生細胞内での動態観察に成功した。平成 29 年度では、後者の手法を発展させ神経および多能性幹細胞の染色体動態の解析を共同研究として遂行していく。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 11 ； HTLV-1 関連脊髄症モデルマウスを用いた疾患病態解明と新規治療法の開発	
研究代表者	受入研究者（代表）
川崎医科大学微生物学 教授 齊藤 峰輝	安永 純一郎
研究成果	
<p>約 20%の 2D2-HBZ-トランスジェック (Tg) または 2D2-Tax-Tg マウスに、6-8 週齢で HAM 類似の下肢対麻痺が自然発症した。病理組織学的所見では、くも膜下腔から脊髄実質に直接、あるいは尖通血管に沿って脊髄実質に CD4 陽性 T 細胞主体の単核球浸潤が認められ、髄鞘、軸索、神経細胞の変性脱落を伴っていた。また、浸潤細胞の周囲には多数の Iba1 陽性活性化ミクログリアが認められたことから、ミクログリア由来の炎症性サイトカインが神経変性の本態に関与している可能性が考えられた。一方、脊髄炎を発症した Tg マウスは、同じ遺伝子型の未発症マウスと比較して有意に血漿中の CXCL10 濃度が上昇していた。これらの所見は、いずれも HAM 患者の特徴と一致しており、本 Tg マウスは HAM の動物モデルとして有用であると考えられる。</p>	
論文発表	
<p>Yasuma, K., Matsuzaki, T., Yamano, Y., Takashima, H., <u>Matsuoka, M.</u>, and <u>Saito, M.</u> (2016) 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. 22(4). 416-30.</p>	
学会発表	
<p>Hiroshi Ushirogawa, Shiho Arishima, Jun-ichirou Yasunaga, Ryuji Kubota, Koichi Ohshima, Shuji Izumo, <u>Masao Matsuoka</u>, <u>Mineki Saito</u> : Establishment of a novel small animal model for HAM/TSP. The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Tokyo, Japan. 2017. 3. 10.</p>	

研究課題名	
No. 12 : 天然脂質の免疫機能解析と応用	
研究代表者	受入研究者（代表）
帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科 教授・学科長 藤原 永年	杉田 昌彦
研究成果	
<p>非結核性抗酸菌 <i>M. avium complex</i> のグルコースモノミコール酸合成酵素として同定されたミコール酸転移酵素 Ag85A に着目し、そのリコンビナントタンパク質を調整した。グルコースをロードしたのち結晶化へと進み、得られた結晶を X 線結晶構造解析に供した。その結果、グルコース基質は従来の想定 (J Biol Chem. 2008; 283(43):28835-41) とは異なり、酵素活性中心に直接的に結合する様式が明らかとなった。本研究により、グルコースミコール酸合成酵素の活性を人為的に操作するための構造学的基盤が確立された。また、天然グリセロールモノミコール酸を高度精製し、それをリポソームに包含したのちモルモットに静脈注射したところ、肺において顕著な慢性肉芽腫応答が誘起されることを初めて見出した。同様の応答は、野生型マウスでは見られなかったが、ヒト Mincle トランスジェニックマウスにおいて再現されたことから、Mincle 依存的慢性肉芽腫応答には種差が存在することが明らかとなった。本研究は、グリセロールモノミコール酸の生物活性を初めて明らかにすることにより、結核病態の解明と制御に貢献するものである。</p>	
論文発表	
2 報を投稿準備中	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 13 ； デングウイルス感染症非ヒト霊長類モデル構築に向けた基盤研究	
研究代表者	受入研究者（代表）
公益財団法人東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト 主任研究員 日紫喜 隆行	三浦 智行
研究成果	
<p>インターフェロンα処理によってデングウイルスの複製が減弱するが、予めインフルエンザウイルスのNS1タンパク質を細胞内で発現させておくとインターフェロンα存在下でもデングウイルスが効率よく複製した。次に、デングウイルスの感染性分子クローン 02-20/pMW119 の 3' 非翻訳領域内の可変領域に IRES (internal ribosomal entry sequence) と共にインフルエンザ NS1 遺伝子を挿入した組み換えウイルスを作製した。続いて、作製したウイルスの増殖能を培養上清中のウイルス力価を測定することによって解析した結果、親株 (02-20) と比較し同程度であることが示された。さらに、インターフェロンα に対する感受性が親株と比較し顕著に低下することが明らかとなった。今後、サル PBMC (末梢血単核球細胞) での増殖能を解析する予定である。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 14 Ⅱ 妊娠期における表皮幹細胞の増殖・分化ダイナミクスの解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
京都大学医学部附属病院皮膚科 講師 本田 哲也	豊島 文子
研究成果	
<p>生体内で細胞周期をイメージングできる Fucci マウスを用いて、非妊娠・妊娠期マウス腹側皮膚を二光子顕微鏡で解析した結果、S/G2/M 期の細胞の割合が妊娠期に有意に上昇することが分かった。Ki67 および EdU の取り込みでも同様の結果が得られたことから、妊娠期には腹側皮膚に増殖性の細胞集団が出現することが分かった。次に、Axin-Cre-ER/Rosa26/loxP-stop-loxP-GFP-H2B マウスを用いて、薬剤誘導的に表皮幹細胞をラベルし表皮幹細胞の系譜解析を行った結果、妊娠期には幹細胞コロニーが拡大し続ける現象が観察された。また、短時間トレースにより表皮幹細胞の分裂様式を解析した結果、妊娠期には水平方向の非対称分裂により、増殖性の細胞が基底層に出現することが分かった。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
* <u>一條遼</u> 、 <u>小林大毅</u> 、 <u>米田早織</u> 、 <u>松村繁</u> 、 <u>本田哲也</u> 、 <u>豊島文子</u> 皮膚幹細胞と TA 細胞が妊娠期の皮膚伸展を可能とする 第 65 回日本細胞生物学会大会、京都、2016 年 6 月 15-17 日	

研究課題名	
No. 15 ； 自然免疫応答における転写後調節の解明	
研究代表者	受入研究者（代表）
近畿大学薬学部生化学教室 教授 藤原 俊伸	竹内 理
研究成果	
<p>これまでの研究により、CCCH-type zinc-finger domain を有し RNA 結合タンパク質と考えられる Zc3h7a の自然免疫における役割を解明するために、Zc3h7a ノックアウトマウスを作製し、Zc3h7a の機能解析を行った結果、Zc3h7a 欠損マクロファージでは Interleukin 6 (I16)や I112p40 などのサイトカイン産生量(タンパク質量)が減少していた。しかしながら、サイトカイン mRNA の発現量に変化はなかった。この結果は、Zc3h7a がサイトカイン mRNA の翻訳の亢進に関わっている可能性があることを示唆している。そこで、Zc3h7a がサイトカイン mRNA の翻訳の亢進に関わっているか検証するために、translationally active mRNA が局在する polysome 分画のサイトカイン mRNA 量を、共同研究でマクロファージを用いて解析した。その結果、マクロファージ刺激により、Polysome に存在するサイトカイン mRNA の割合が亢進することが明らかとなった。今後、Zc3h7a をノックアウトした自然免疫細胞を用いて、超遠心を用いた細胞分画により polysome 分画の mRNA 量が減少するかどうかを解析する計画を立てている。</p>	
論文発表	
Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, <u>Fujiwara T</u> , Takeuchi O . (2015) Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. Cell. 161. 1058-73.	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 16 Ⅱ RNA 結合タンパク質の標的 RNA 構造解析とその機能的意義	
研究代表者	受入研究者（代表）
国立研究開発法人理化学研究所予防医療・診断技術開発プログラム マネージャー 村川 泰裕	竹内 理
研究成果	
<p>Flag タグ付加 Regnase-1 ファミリータンパク質を Tet promoter 下に発現する HEK293 細胞を作製し、High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP) もしくは PAR (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced)-CLIP 法を用いて結合 RNA 配列を網羅的に解析した。今後、結合 RNA 配列の解析を進め、さらにその配列、構造を実験的に検証する。</p>	
論文発表	
<p>Mino T, <u>Murakawa Y</u>, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, <u>Takeuchi O</u>. (2015) Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. Cell. 161. 1058-73.</p>	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 17 哺乳類間の脳の大きさの違いを作り出す仕組みの解明	
研究代表者	受入研究者（代表）
熊本大学発生医学研究所 助教 畠山 淳	影山 龍一郎
研究成果	
<p>我々が同定したカニクイザル胚の脈絡叢に特異的に発現する分泌因子について、まずは霊長類の神経幹細胞の増殖にどのような作用があるのか検討した。ヒト ES 由来の神経幹細胞を用いて、候補因子を培養液中に添加し、増殖を促進するかどうか解析した。その結果、ヒト神経幹細胞の増殖を促進する因子を同定した。その内の1つについてさらに詳細に解析し、マウスの神経幹細胞の増殖を促進すること、マウス胚の脳に強制発現させるとの台の皮質が拡大化する傾向にあることがわかった。この因子は、マウス胚の脳では発現していないことから、この因子が霊長類の脳の拡大化に一部貢献していることが示唆される。このことから、脳脊髄液に含まれる因子の違いが脳の種間差創出に関わるということが強く示唆された。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
<p>畠山淳*、佐藤晴香、松下理香、影山龍一郎、斎藤通紀、土屋英明、嶋村健児：霊長類の脳はいかにして大きくなったか？ 日本進化学会第18回大会、東京都目黒区、2016年8月25日～28日、招待講演</p> <p>Kenji Shimamura*, Jun Hatakeyama, Haruka Sato-Takemoto, Rika Matsushita, Hideaki Tsuchiya, Kotaro Sasaki, Mitinori Saitou, Akihiro Isomura, Hiromi Shimojo, Ryoichiro Kageyama: A role for the choroid plexus in the cortical expansion in primates. CDB symposium 2017, Kobe, March 27-29, 2017</p> <p>Jun Hatakeyama: Roles of extrinsic factors in the cortical expansion in primates. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 50th, Tokyo, May 10-13, 2017</p> <p>Jun Hatakeyama: Extrinsic factors and the cortical expansion in primates. The 40th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Chiba, July 20-23, 2017</p>	

研究課題名	
No. 18 : インターフェロン誘導性抗デングウイルス因子 RyDEN の分子機能の解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
大阪医科大学予防社会医学講座微生物学教室 講師 鈴木 陽一	小柳 義夫
研究成果（詳細）	
<p>インターフェロン誘導性因子 RyDEN (Repressor of yield of DENV/C19orf66) はその中央領域に核移行シグナルと推測されるアミノ酸配列 (NLS 様配列) を有しているが、変異体 RyDEN を用いた免疫染色実験の結果より、この配列は積極的な核移行シグナルとして機能しておらず、RyDEN は細胞質に局在することが示された。一方、RyDEN は細胞内で PolyA-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1) と複合体を形成することが示されているが、PABPC1 との結合は RyDEN の NLS 様配列を介していることが明らかとなった。興味深いことに、PABPC1 との結合能を消失した RyDEN の NLS 様配列変異体は、デングウイルスの抑制活性も失っていることがわかった。このことは、PABPC1 との結合が RyDEN の抗ウイルス活性に必要であることを示している。次に、組換え RyDEN タンパクと Alpha テクノロジーを用いた in vitro RNA 結合アッセイをおこなったところ、RyDEN は配列非特異的な RNA 結合タンパクであることが示された。しかしながら、デングウイルス RNA への結合特異性は組換え PABPC1 タンパクの存在によって高まった。PABPC1 は mRNA からのタンパク翻訳に関与する分子であることから、これらの結果は RyDEN が PABPC1 を介してデングウイルス RNA に特異的に結合し、ウイルスタンパクの合成を負に制御する可能性を示唆するものであり、これはインターフェロン誘導性因子による新しい抗ウイルスメカニズムを示している。</p>	
論文発表	
<p><u>Suzuki Y</u>, Chin WX, Han Q, Ichiyama K, Lee CH, Eyo ZW, Ebina H, Tan BH, Hishiki T, Ohba K, Matsuyama T, <u>Koyanagi Y</u>, Tan YJ, Chu JH, Vasudevan SG, Sano K, Yamamoto N. Characterization of RyDEN (C19orf66) as a novel interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. PLoS Pathogens 12:e1005357, 2016.</p> <p>Wu H, Nakano T, <u>Suzuki Y</u>, Ooi Y, Sano K. Enhancement of adherence of Helicobacter pylori to host cells by virus: possible mechanism of development of symptoms of gastric disease. Med Mol Morphol. 2017 Mar 10.</p>	
学会発表	
<p>佐野浩一、中野隆史、呉紅、<u>鈴木陽一</u>：フラビウイルスのタンパク翻訳を阻害する細胞側機構の解明。第 36 回近畿腸管微生物研究会、大阪、2016 年 6 月 11 日</p> <p><u>Youichi Suzuki</u>, Takashi Nakano, Hong Wu, Kouichi Sano, Naoki Yamamoto: Expression of LY6E, an interferon-stimulated gene, accelerates dengue virus entry. 第 64 回日本ウイルス学会、札幌、2016 年 10 月 23 日-25 日</p> <p><u>鈴木陽一</u>、呉紅、中野隆史、佐野浩一：インターフェロン誘導性因子 RyDEN/C19orf66 のフラビウイルス抑制メカニズムの解析。第 69 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、2016 年 11 月 19 日</p>	

研究課題名	
No. 19 : mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA ができあがる仕組み	
研究代表者	受入研究者 (代表)
藤田保健衛生大学総合医科学研究所遺伝子発現機構学研究部門 教授 前田 明	谷口 一郎
研究成果	
<p>前年度の成果を踏まえ、mRNA 核外輸送経路に関わる因子のノックダウン実験を行った。mRNA 核外輸送経路に関与する因子 TAP のノックダウン時に ciRS-7 が核に蓄積した事実から、ciRS-7 の TAP による核外輸送が強く示唆された。同時に RNA-Seq データの配列解析を行い、ciRS-7 と同じ MIR 反復配列依存的な生合成経路で circRNA を発現するレポータープラスミドを複数作製した。</p> <p>次の段階として circRNA を発現するレポータープラスミドをアフリカツメガエルの卵母細胞の核に微量注入して、核外輸送の状況を綿密に観察した。その結果、アフリカツメガエルの卵母細胞においてもレポータープラスミドから circRNA が産生され、細胞質に核外輸送されることが確認できた。さらに培養細胞での結果を踏まえ、mRNA 核外輸送阻害剤 CTE による阻害実験を行ったところ、予想通り circRNA の輸送が阻害された。以上のことから circRNA は mRNA 核外輸送経路を用いて核外輸送されていることがわかった。今後 circRNA 側の TAP のアダプター因子を探索することにより、mRNA 核外輸送経路との違いに注目しつつ、circRNA の輸送複合体の全貌を明らかにする。具体的には EJC, TREX あるいは未知の複合体の関与を精査する予定である。</p>	
論文発表	
<p>前田 明 (2015) 生命現象を支える多種多様の蛋白質が正しく作られる仕組: 遺伝子に隠されたスプライシング調節暗号を解く. <i>DNA 多型</i> 23, 3-8.</p> <p><u>Yoshimoto, R.</u>, <u>Mayeda, A.</u>, Yoshida, M., Nakagawa, S. (2016) MALAT1 long non-coding RNA in cancer. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 1859, 192-199.</p> <p>芳本 玲, <u>前田 明</u> (2016). 環状 RNA (circRNA). 廣瀬哲朗, 泊幸秀編 DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「ノンコーディング RNA-RNA 分子の全体像を俯瞰する」. 化学同人 (京都). pp. 271-279.</p> <p>Yoshimoto, R., Kaida, D., Furuno, M., Burroughs, S., Noma, S., Suzuki, Y., Kawamura, Y., Hayashizaki, Y., Mayeda, A., Yoshida, M. (2017). Global analysis of pre-mRNA subcellular localization following splicing inhibition by spliceostatin A. <i>RNA</i> 23, 47-57.</p>	
学会発表	
<p>芳本 玲, 亀山 俊樹, Hansen, T.B., Kjems, J., <u>前田 明</u>: 環状 RNA の生合成: コーディング RNA から捨てられたノンコーディング RNA が生かされる仕組み. 2015 年 日本分子生物学会年会/日本生化学会大会 合同年会, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.</p> <p><u>Mayeda, A.</u>: Topological constraint and solution to generate circular RNA (circRNA) from linear</p>	

RNA (pre-mRNA). NAIST International Workshop 'New era of pre-mRNA splicing world' . Nara Institute of Science and Technology, Nara, March 14-15, 2016.

Yoshimoto, R., Hansen, T.B., Kjems, J., Mayeda, A. : The functional circular RNA, ciRS-7/CDR1as, is biosynthesized from back-splicing promoted by Inverted MIR (not Alu) Elements. The 21th Annual Meeting of the RNA Society / The 18th Annual Meeting of the RNA Society of Japan, Kyoto, June 28-July 2, 2016.

Mayeda, A. : Pre-mRNA splicing generates not only linear coding RNA (mRNA), but also circular non-coding RNA (circRNA), Mini-Symposium on ncRNA, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, September 29, 2016.

研究課題名	
No. 20 : SIV に感染するサル免疫細胞を持つマウスの作製	
研究代表者	受入研究者 (代表)
京都大学医学研究科人間健康科学科系専攻 准教授 伊吹 謙太郎	三浦 智行
研究成果	
<p>3～5 歳令のアカゲザルから骨髓液約 4 ml/ 頭を採取し、NH₄Cl-tris で処理することにより全骨髓細胞を分離した。一部はその後 CD4+細胞をビーズ法により除去した。NOD/Shi-SCID/IL-2γ null マウス (NOG マウス) (6 週齢, 雌) 3 頭に CD4 除去全骨髓細胞 1.1\times10⁷ 個/頭 (A 群)、2 頭に全骨髓細胞 8.75\times10⁶ 個/頭 (B 群) を脛骨骨髓内より移植 (IBMI 法) した。これらのマウスについて移植後経時的に末梢白血球の細胞表面抗原を解析したところ、A 群では 3 頭中 1 頭で移植後 11 週目の時点でもサル CD45+細胞が 30%の割合で認められ、他の 2 頭でも移植後 7 週目の時点でサル CD45+細胞が 3.5-9.0%認められた。B 群では 2 頭中 1 頭で移植後 2 週目に 43.9%のサル CD45+細胞が検出されたが、残る 1 頭では 9 週目以降は 1%以下となった。以上から、末梢血サル CD45+細胞の生着率には差が見られるものの、B 群の 1 個体を除く全てのマウスで持続的にサル CD45+細胞が認められ、マウス体内にサル細胞が定着していることが明らかとなった。また、観察期間中に GVHD 様症状を示すマウス個体は認められず、全骨髓細胞移植がサル化マウス作製に有効な移植細胞群であることがわかった。次にこれらサル細胞の定着が認められたサル化マウスに対して、SIVmac239 (1.5\times10⁶TCID₅₀/匹) の腹腔内接種を行った。ウイルス接種後、マウス末梢血中のサル CD45+細胞群は両群のマウス共に接種後 2 週目までに接種前の値の 1/3-1/10 量にまで減少することがわかった。また、すべての個体の血漿検体においてウイルス接種後 1 週目より SIV RNA が、末梢血リンパ球においてウイルス接種後 3 週目よりウイルス DNA が検出され、SIV 感染が成立していることがわかった。ウイルス接種後 9-10 週目において、これらの個体を剖検し、深部臓器におけるウイルス DNA の検出を行なったところ、肺、脾臓、腸間膜リンパ節、胸腺等のリンパ組織及び子宮において SIV DNA が検出され、全身で SIV 感染が成立していることが明らかとなった。本研究では、サル全骨髓細胞を移植用細胞として用いることでマウスへのサル免疫系細胞の生着率を上昇させると共に、GVHD 様症状を起こさないサル化マウスの作製に成功した。また、このマウスの作製により SIV 感染サル化マウスの長期に渡る病態観察が可能となり、今後 AIDS の感染病態研究や治療法開発研究に寄与できると考えられた。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
<p>関根将*、藤田悠平、陣野萌恵*、三浦智行、伊吹謙太郎：サル骨髓造血幹細胞移植マウスへのサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染実験. 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会、神戸、2016 年 8 月 31 日- 9 月 2 日</p> <p>関根将*、藤田悠平、陣野萌恵*、三浦智行、伊吹謙太郎：サル免疫細胞を持つマウス (サル化マウス) へのサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染. 第 159 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2016 年 9 月 6 日- 8 日</p>	

研究課題名	
No. 21 成人 T 細胞白血病リンパ腫の病態解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
久留米大学医学部病理学 教授 大島 孝一	松岡 雅雄
研究成果	
<p>HBZ により T 細胞表面の CCR4 発現が増加することを見出していたため CCR4 と細胞増殖に関してさらに解析を行った。HBZ トランスジェニックマウスの生体内で増殖している CD4 陽性 T 細胞は CCR4 を強く発現し、同様にその増殖細胞は CD103 も高発現していた。実際の ATL 症例における皮膚病変を用いて組織解析を行ったところ、ATL の皮膚浸潤の特徴であるポーターエ微小膿瘍に存在する ATL 細胞が CCR4 及び CD103 を高発現し、同時に Ki67（細胞増殖マーカー）も陽性であることが判明した。本共同研究により、HBZ は CCR4 発現を誘導することで感染細胞及び ATL 細胞の皮膚浸潤を促進し、さらに CD103 を介したシグナルによって ATL 細胞の増殖を亢進させる結果、ATL 特有の皮膚病変を形成することが明らかとなった。</p>	
論文発表	
<p>Sugata K, <u>Yasunaga JI</u>, Kinoshita H*, Mitobe Y, Furuta R*, Mahgoub M*, Onishi C, <u>Nakashima K</u>, <u>Ohshima K</u>, <u>Matsuoka M</u>. HTLV-1 Viral Factor HBZ Induces CCR4 to Promote T-cell Migration and Proliferation. Cancer Res, 76:5068-5079, 2016.</p>	
学会発表	
なし	

研究課題名	
No. 22 大腸菌ヒスチジンキナーゼセンサーPhoQのリガンド結合ポケットの解析	
研究代表者	受入研究者（代表）
近畿大学生物理工学 講師 江口 陽子	秋山 芳展
研究成果	
<p>PhoQ の発現量の差が SafA による PhoQ/PhoP 系の活性化に影響することを明らかにした。そこで、比較する株間で PhoQ の発現量を一定に保つために phoQ 5' 末端の制限酵素サイトの有無を統一すること、また、PhoQ と SafA の発現を異なるプロモーターから行うことを検討した。これらの条件下で、レポーターアッセイおよび in vivo 光架橋法を用いて、SafA と変異型 PhoQ の相互作用解析を進めている。</p>	
論文発表	
なし	
学会発表	
なし	