

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 5,410 m ² . The major part (ca. 481 m ²) 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 Jun	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.

ORGANIZATION AND STAFF

(as of December, 2010)

(Numerals in parentheses indicate year of association with the Institute)

Director	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc.
Deputy Director	Yoichi Shinkai, D.Med.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) 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)
Associate Professor	Isamu Matsunaga, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Hiroataka Kuwata, D.D.S., Ph.D. (2010)

Laboratory of Tumor Biogenesis

Professor	Shin Yonehara, D.Sc. (1994) (concurrent)
-----------	--

Laboratory of Human Tumor Viruses

Associate Professor	Makoto Hijikata, D.Med.Sc. (1997)
---------------------	-----------------------------------

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)

Laboratory of Genetic Information Analysis

Associate Professor	Haruo Ohmori, D.Sc. (1979)
---------------------	----------------------------

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

Professor	Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)
Assistant Professor	Masamichi Ueda, D.Sc. (1978) Keiko Takemoto, D.Sc. (1992) Shizue Tani-ichi, D.Health Sc. (2007) Takahiro Hara, D. Bio. (2008)

Laboratory of Infection and Prevention

Associate Professor	Hiroshi Masutani, M.D., D.Med.Sc. (1992)
---------------------	--

Bioresponse Regulation Laboratory

Visiting Professor Yoshihiro Kawaoka, D.V.M., D.Med.Sc. (2010)
Visiting Associate Professor Katsuji Sugie, M.D., D.Med.Sc. (2010)

Department of Cell Biology

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Professor Fumiko Toyoshima, D.Sc. (2008)
Assistant Professor Shigeru Matsumura, D.Bio. (2008)

Laboratory of Growth Regulation

Professor Ryoichiro Kageyama, M.D., D.Med.Sc. (1997)
Associate Professor Toshiyuki Ohtsuka, M.D., D.Med.Sc. (2000)
Assistant Professor Taeko Kobayashi, D.Sc. (2005)

Laboratory of Signal Transduction

Associate Professor Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005)
Assistant Professor Akira Murakami, D.Sc. (1979)

Laboratory of Regulatory Information

Visiting Professor Susumu Tonegawa, Ph.D, D.Sc. (1992)

Center for Human Retrovirus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

Head• Professor Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor Hirotaka Ebina, D.Med.Sc. (2009)

Laboratory of Virus Control

Professor Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
Associate Professor Junichiro Yasunaga, M.D., D.Med.Sc. (2010)
Assistant Professor Yorifumi Satou, M.D., D.Med.Sc. (2008)

Laboratory of Viral Immunology

Visiting Professor Masafumi Takiguchi, M.D., D.Med.Sc. (2010)

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

Professor Yoichi Shinkai, D.Med.Sc. (1998)
Associate Professor Makoto Tachibana, D.Agr. (1998)
Assistant Professor Toshiaki Tsubota, D.Sc. (2009)

Laboratory of Primate Model

Head• Professor Tatsuhiko Igarashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2007)
Associate Professor Tomoyuki Miura, D.V.M., D.Agr. (1988)
Assistant Professor Takeshi Kobayashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2008)

Center for Emerging Virus Research

Head• Professor Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2010)
Assistant Professor Kei Sato, D.Med.Sc. (2010)
Assistant Professor Shin-ichiro Narita, D.Sc. (2010)

Lecturers (part time)

Toru Kiyono
Yasuhito Tanaka
Yoshiharu Matsuura
Hisashi Arase
Junji Takeda
Hiroaki Takeuchi
Yusuke Yanagi
Takeshi Noda
Kyoko Shinya

Michinori Kohara
Koichi Morita

Library

Committee Chairman

Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)

Administration Office

Chief Officer
General Affairs
Finance

Kazumi Inui(2010)
Tomoko Kimura (2009)
Yoshifumu Yamasaki (2008)

Research Fellows

Yohei Hizukuri
Takashi Yura
Yoshiyuki Matsuo
Aitor Gonzalez
Hiromi Shimojo
Akihiro Isomura
Shigeki Hoshino
Eiji Sato
Fan Jun
Yasuteru Sakurai

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Ctr. HuRetro. Re. (Lab. Virus Control)
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)

Graduate Students

Graduate School of Science

Kosuke Terushima
Yukiko Machida
Hisashi Kiryu
Atsumi Miyata
Tatsuya Suzuki
Asako Mc Closkey
Reiko Takemura
Megumi Hujita
Kotarou Fujii
Tomoko Sakata
Toshihiko Takeiwa
Hiroto Izumi
Tokie Sakai
Haruki Nishio

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)

Graduate School of Medicine

Bingfei Liang
Keisuke Wagatsuma
Guangwei Cui
Zhe Chen
So Masaki
Mitsuhiro Matsunaga
Tan Sloklay
Naoki Watanabe
Masaya Okada
Yuuki Nakaya
Tomoko Kobayashi

Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis)

Tadashi Watanabe	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis)
Peter Gee	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis)
Yuka Kanemura	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis)
Keita Hagiya	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Takeshi Naito	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Azusa Nakanishi	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Nanae Taguchi	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Kenji Sugata	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Guangyong Ma	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Aaron Coutts	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Takehisa Isobe	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Michi Miura	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Hiroaki Togami	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Akihiro Kawatsuki	Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control)
Hiroyuki Ohotsuki	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Takahiro Kawagishi	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Mika Yasui	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Yuji Watanabe	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

Graduate School of Human and Environmental Studies

Takuji Ohata	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Rokusuke Yoshikawa	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Ryosuke Hyuga	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Mariko Horiike	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Yasuhisa Fujita	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Sakiko Nakasone	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

Graduate School of Biostudies

Naoko Kajitani	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Tokuya Hattori	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Daisuke Morita	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Tetsuo Urakawa	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Chisa Kobayashi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Yuki Hattori	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Yue Qi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Yukihiro Kushima	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Yuichi Abe	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Makiko Seiki	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Youji Tsugawa	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Ryo Narita	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Seigyoku Go	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Maiko Kageyama	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Anna Wrabel	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Yoo Ji Seung	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Ryota Ouda	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Michihiko Jogi	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Shiori Takamatsu	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Ayumi Takahashi	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Ng Chen Seng	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Yurie Koga	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Nao Miyata	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular Genetics)
Akifumi Abe	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Soichiro Shitara	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Eiji Yoshihara	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dorys Adriana Lopez	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)

Mayumi Hamasaki
Keisuke Ikawa
Sayaka Iwano
Miko Watanabe
Masayuki Sakamoto
Yukiko Harima
Seiji Yamamoto
Yasutsugu Suzuki
Ayako Tsumura
Yuichi Mitobe
Shuzo Okuno
Yang Chia-Ming
Katsuaki Deguchi
Daisuke Muramatsu
Mayuko Inoue
Yutaro Yamaguchi

[illegible]

CONTENTS

Research Activities

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

LABORATORY OF GENE ANALYSIS

I. First Group

- 1) Functions of SecDF, a protein export enhancing membrane component: H. MORI, T. TSUKAZAKI¹, Y. ECHIZEN¹, O. NUREKI¹ and K. ITO² (¹School of Sci., The Univ. Tokyo and ²Kyoto Sangyo Univ.) ...3
- 2) Toward identification of SecDF nearest neighbors using *in vivo* site-directed photo cross-linking: Y. MACHIDA, Y. AKIYAMA and H. MORI ...3
- 3) Membrane targeting of heat shock factor σ^{32} is required for feedback control of heat shock response: T. YURA, H. MORI, K. ITO¹, B. LIM², C. GROSS² and Y. AKIYAMA (¹Kyoto Sangyo University, ²University of California) ...4
- 4) Roles of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*, in regulation of its protease function: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA ...5
- 5) An attempt to identify a substrate motif for *E. coli* rhomboid protease GlpG: K. TERUSHIMA, H. MORI and Y. AKIYAMA ...6
- 6) X-ray crystal structural analysis of membrane bound ATP-dependent protease FtsH: R. SUNO, A. ABE, Y. AKIYAMA, S. IWATA¹ and M. YOSHIDA² (¹Department of Medicine, Kyoto University, ²the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology) ...6
- 7) Biochemical analysis of the substrate-translocating mechanism of ATP-dependent Protease FtsH: R. SUNO, M. SHIMOYAMA¹, A. ABE, N. SHIMODATE¹, Y. AKIYAMA and M. YOSHIDA¹ (¹the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology) ...7

II. Second Group

- 1) Analysis of molecular mechanism underlying keratin-associated protein 13-induced activation of canonical Wnt signaling pathway: S. YANAGAWA ...7
- 2) Growth control by estrogen in the HPV positive cells: A. SATSUKA, N. KAJITANI and H. SAKAI ...8
- 3) Analysis of CAF formation mechanism using HPV positive cells: A. SATSUKA, N. KAJITANI and H. SAKAI ...8
- 4) Identification of novel function of human papillomavirus E4: N. KAJITANI, A. SATSUKA and H. SAKAI ...8

LIST OF PUBLICATIONS

LABORATORY OF CELL REGULATION

- 1) Reconstitution of the human CD1a expression and function in mice: C. KOBAYASHI, T. SHIINA¹ and M.

	SUGITA (¹ Tokai Univ.)	···12
2)	Identification of a mycobacteria-derived glycolipid that delayed-type hypersensitivity targets: T. KOMORI, I. MATSUNAGA, Y. HATTORI, H. KUWATA, H. HARASHIMA ¹ and M. SUGITA (¹ Hokkaido Univ.)	···12
3)	Lipid biology of dormant mycobacteria: T. URAKAWA, I. MATSUNAGA, N. FUJIWARA and M. SUGITA	···13
4)	Lipid immunity in AIDS: D. MORITA, M. HORIIKE ¹ , T. IGARASHI ¹ and M. SUGITA (¹ Laboratory of Primate Model, IVR)	···13
	LIST OF PUBLICATIONS	···13

LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

1)	Identification of functional regions defining different activity in caspase-3 and caspase-7 within cells: N. NAKATSUMI and S. YONEHARA	···15
2)	Analysis of interaction between FLASH and ARS2 by alanine scanning mutagenesis and its role in cell cycle progression: T. HAMAUCHI, M. KIRIYAMA and S. YONEHARA	···15
3)	Establishment of inducible gene expression and knockdown systems in mouse embryonic stem cells to analyze the functions of various genes in differentiation: M. SOMEDA and S. YONEHARA	···16
4)	An Essential role of the Wnt signals in both self renewal and differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI	···17
	LIST OF PUBLICATIONS	···17

LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES

1)	The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of core protein.: Y. KUSHIMA, T. WAKITA and M. HIJIKATA	···19
2)	IRF7 dependent IFN- α response in the early phase of the viral infected hepatocytes: Y. QI, H. H. ALY, C. TSUTSUI, T. FUJITA and M. HIJIKATA	···19
	LIST OF PUBLICATIONS	···20

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

1)	Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change: K. TAKAHASHI, K. M. HORIUCHI, K. FUJII, S. NAKAMURA, N. N. NODA, M. YONEYAMA, T. FUJITA and F. INAGAKI	···22
2)	Virus-Infection or 59ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1: K. ONOBUCHI, K. ONOMOTO, S. TAKAMATSU, M. JOGI, A. TAKEMURA, S. MORIMOTO, I. JULKUNEN, H. NAMIKI, M. YONEYAMA and T. FUJITA	···22
3)	LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses: T. SATOH, H. KATO, Y.	

KUMAGAI, M. YONEYAMA, S. SATO, K. MATSUSHITA, T. TSUJIMURA, T. FUJITA, S. AKIRA
and O. TAKEUCHI ···23

LIST OF PUBLICATIONS ···23

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

1) RNA distribution in the cell : ···27

1-1) Identity elements used in mRNA export ···27

1-2) Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursor ···27

2) rRNA quality control mechanisms: ···28

LIST OF PUBLICATIONS ···28

LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

1) Overlapping of human REV7- and MAD2-binding motif sequences: T. HANAFUSA, T.HABU¹, J. TOMIDA¹, E. OHASHI², Y. MURAKUMO³ and H. OHMORI (¹Kyoto University Radiation Biology Center, ²Kyushu University, ³Nagoya University) ···31

2) Intracellular interaction between REV7 and REV3 in DT40 cells: K. TAKENAKA¹, H. OHMORI and Y. MIKI¹ (¹Tokyo Medical and Dental University) ···31

3) Interaction between REV3 and REV7 in *S. pombe*: T. HANAFUSA, J. TERUNUMA¹, M. UCHIYAMA¹, F. HANAOKA¹ and H. OHMORI (¹Gakushuin University) ···32

LIST OF PUBLICATIONS ···33

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES

LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

1) Activation of the mouse TCR γ enhancers by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···34

2) Pre-TCR signal silences the TCR γ locus by inhibiting the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers: S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···34

3) STAT5 controls the rearrangement of TCR J γ gene segments through STAT-binding motifs in the J γ promoters: K. WAGATSUMA, B. LIANG, S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···35

4) IL-7R controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells: S. TANI-ICHI, A. ABE and K. IKUTA ···36

5) Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid tissues: T. HARA, S. SHITARA, G. CUI, S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···36

6) Local function of IL-7 in vivo: T. HARA, B. LIANG, S. SHITARA, K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···37

7) ELISA kit system for detecting calreticulin in urine: M. UEDA ···37

LIST OF PUBLICATION ···37

LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

- 1) Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation: Z. CHEN, DA. LOPEZ-RAMOS, E. YOSHIHARA, Y. MAEDA, H. MASUTANI, K. SUGIE, M. MAEDA and J. YODOI ...39
- 2) Differential roles of Annexin A1 (ANXA1/lipocortin-1/lipomodulin) and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) in glucocorticoid signaling of HTLV-I-transformed T cells: Z. CHEN, E. YOSHIHARA, A. SON, Y. MATSUO, H. MASUTANI, K. SUGIE, M. MAEDA and J. YODOI ...39
- 3) Thioredoxin binding protein-2 mediates metabolic adaptation in response to lipopolysaccharide in vivo: S. OKA, W. LIU, E. YOSHIHARA, MK. AHSAN, DA. RAMOS, A. SON, H. OKUYAMA, L. ZHANG, H. MASUTANI, H. NAKAMURA and J. YODOI ...40
- 4) Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity: E. YOSHIHARA, S. FUJIMOTO, N. INAGAKI, K. OKAWA, S. MASAKI, J. YODOI and H. MASUTANI ...41

LIST OF PUBLICATIONS

...41

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

- 1) Genome-wide screening of the kinases required for the control of cell division axis: S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA¹, T. YAMAMOTO², E. NISHIDA³ and F. TOYOSHIMA (¹ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, ²iCeMS, Kyoto University, ³Graduate School of Biostudies, Kyoto University) ...44
- 2) Roles of cholesterol in the progression of mitosis: M. HAMASAKI and F. TOYOSHIMA ...44
- 3) Regulation of the early endosomes during mitosis: K. IKAWA, S. MATSUMURA, ¹M. FUKUDA and F. TOYOSHIMA (1Department of Developmental Biology and Neurosciences, Tohoku University) ...45

LIST OF PUBLICATIONS

...45

LABORATORY OF GROWTH REGULATION

- 1) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains: I. IMAYOSHI, M. SAKAMOTO, M. YAMAGUCHI, K. MORI and R. KAGEYAMA ...46
- 2) Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling: T. KOBAYASHI and R. KAGEYAMA ...47
- 3) Zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain: T. SHIMIZU, M. NAKAZAWA, S. KANI, Y.-K. BAE, T. SHIMIZU, R. KAGEYAMA and M. HIBI ...47

- 4) Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells: T. INOUE, B. COLES, K. DORVAL, R. BREMNER, Y. BESSHO, R. KAGEYAMA, S. HINO, M. MATSUOKA, C. CRAFT, R. MCINNES, F. TEMBLAY, G. PRUSKY, Y. TANO and D. VAN DER KOOTY ...48
 - 5) HES1 and HES5 are dispensable for cartilage and endochondral bone formation: C. KARLSSON, C. BRANTSING, R. KAGEYAMA and A. LINDAHL ...48
- LIST OF PUBLICATIONS** ...49

LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

- 1) Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines: R. YOSHIKAWA, E. SATO, T. IGARASHI¹ and T. MIYAZAWA (¹Laboratory of Primate Model, IVR) ...52
 - 2) Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines: M. OKADA, R. YOSHIKAWA, T. SHOJIMA, K. BABA and T. MIYAZAWA ...52
 - 3) Identification of novel endogenous betaretroviruses which are transcribed in the bovine placenta: K. BABA, Y. NAKAYA, T. SHOJIMA, Y. MUROI¹, K. KIZAKI², K. HASHIZUME², K. IMAKAWA¹ and T. MIYAZAWA (¹Laboratory of Animal Breeding, the University of Tokyo and ²Laboratory of Veterinary Physiology, Iwate University) ...53
 - 4) An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV: E. SATO, R.A. FURUTA¹ and T. MIYAZAWA (¹Japanese Red Cross Osaka Blood Center) ...53
 - 5) Adaptation of feline immunodeficiency virus subtype B strain TM2 to a feline astrocyte cell line (G355-5 cells): M. ISHIKAWA, K. BABA, M. SHIMOJIMA¹, M. OKADA, T. SHOJIMA, T. MIURA² and T. MIYAZAWA (¹Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, The University of Tokyo and ²Laboratory of Primate Model, IVR) ...54
- LIST OF PUBLICATIONS** ...55

CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH

LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

- 1) Molecular analysis on interaction of HIV-1 protein and host restriction factor: T. KOBAYASHI, K. SATO, Y. SUZUKI, S. YAMAMOTO, P. GEE, T. WATANABE, A. TSUMUR, N. MISAWA, H. EBINA and Y. KOYANAGI ...58
 - 2) Viral pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA, T. KOBAYASHI and Y. KOYANAGI ...58
 - 3) HIV integration and its latency: H. EBINA, Y. KANEMURA and Y. KOYANAGI ...59
 - 4) Mechanism of Herpes virus neuropathogenesis: P. GEE, T. WATANABE and Y. KOYANAGI ...60
- LIST OF PUBLICATIONS** ...60

LABORATORY OF VIRUS CONTROL

- 1) Analyses of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) gene in the pathogenesis of HTLV-1: J. YASUNAGA, Y. SATOU, P. MIYAZATO, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, A. NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE, A. KAWATSUKI and M. MATSUOKA ...64
 - 2) Identification of cellular proteins interacting with HBZ and characterization of virological and pathological significance of the interaction: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, G. MA, A. KAWATSUKI, Y. SATOU and M. MATSUOKA ...64
 - 3) Nonsense mutations in HTLV-1-encoded genes and their significances in leukemogenesis of HTLV-1-infected cells: J. FAN, G. MA and M. MATSUOKA ...65
 - 4) Characterization of DNA repair proteins involved in retroviral integration: Y. SAKURAI and M. MATSUOKA ...65
 - 5) Resistance mechanism to the next-generation HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA ...66
 - 6) Development of novel small-molecule inhibitors for HIV: K. SHIMURA, H. TOGAMI, T. ISOBE, T. NAITO and M. MATSUOKA ...66
- LIST OF PUBLICATIONS ...66

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

LABORATORY OF MOUSE MODEL

- 1) Roles of the histone lysine demethylases Jmjd1a and Jmjd1b in murine embryonic development: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI ...69
 - 2) Analysis of epigenetic regulation of mammalian sex differentiation: M. TACHIBANA ...69
 - 3) Analysis of the role of histone modification in DNA damage repair: T. TSUBOTA and Y. SHINKAI ...70
 - 4) Profiling of histone lysine methylation during mouse germ cell development: K. DEGUCHI and Y. SHINKAI ...71
- LIST OF PUBLICATIONS ...71

LABORATORY OF PRIMATE MODEL

- 1) Generation of the pathogenic R5-tropic simian/human immunodeficiency virus SHIVAD8 by serial passaging in rhesus macaques: Y. NISHIMURA, M. SHINGAI, R. WILLEY, R. SADJADPOUR, W. R. LEE, C. R. BROWN, J. M. BRENCHLEY, A. BUCKLER-WHITE, R. PETROS, M. ECKHAUS, V. HOFFMAN, T. IGARASHI and M. A. MARTIN ...74
- 2) Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in simian/human immunodeficiency virus KS661-infected rhesus macaques in the presence of low viral load: K. INABA, Y. FUKAZAWA, K. MATSUDA, A. HIMENO, M. MATSUYAMA, K. IBUKI, Y. MIURA, Y. KOYANAGI, A.

	NAKAJIMA, R. S. BLUMBERG, H. TAKAHASHI, M. HAYAMI, T. IGARASHI and T. MIURA	・・・75
3)	<i>In vivo</i> analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6: K. MATSUDA, K. INABA, Y. FUKAZAWA, M. MATSUYAMA, K. IBUKI, M. HORIIKE, N. SAITO, M. HAYAMI, T. IGARASHI and T. MIURA	・・・76
4)	Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus: A. HIMENO, T. AKAGI, T. UTO, X. WANG, M. BABA, K. IBUKI, M. MATSUYAMA, M. HORIIKE, T. IGARASHI, T. MIURA and M. AKASHI	・・・76
5)	An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses: T. KOBAYSHI, L. S. OOMS, M. IKIZLER, J. D. CHAPPELL and T. S. DERMODY	・・・77
	LIST OF PUBLICATIONS	・・・77

CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH

1)	HIV and EBV pathogenesis: K. SATO and Y. KOYANAGI	・・・80
2)	Role of the envelope stress response system in the biosynthesis and quality control of envelope proteins. S. NARITA and Y. AKIYAMA ¹ (¹ Department of Viral Oncology, IVR)	・・・80
	LIST OF PUBLICATIONS	・・・81

	REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM	・・・84
	LIST OF PUBLICATIONS	・・・85

	COMPUTER NETWORK OF INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH	・・・86
	Staff Changes of the Institute	・・・87
	The Scientific Lectures of the Institute for Virus Research	・・・88
	Seminars of the Institute for Virus Research	・・・89

ウイルス研究所 - - - 2010

	がんウイルス研究部門・がん遺伝子研究分野	・・・95
	がんウイルス研究部門・細胞制御研究分野	・・・98
	がんウイルス研究部門・生体発がん機構研究分野	・・・99
	がんウイルス研究部門・ヒトがんウイルス研究分野	・・・101
	遺伝子動態調節研究部門・分子遺伝学研究分野	・・・102
	遺伝子動態調節研究部門・情報高分子化学研究分野	・・・106

遺伝子動態調節研究部門・遺伝子情報解析研究分野	・・・111
生体応答学研究部門・生体防御研究分野	・・・113
生体応答学研究部門・感染防御研究分野	・・・116
細胞生物学研究部門・構造形成学研究分野	・・・118
細胞生物学研究部門・増殖制御学研究分野	・・・120
細胞生物学研究部門・信号伝達学研究分野	・・・122
ヒトレトロウイルス研究施設・ウイルス病態研究領域	・・・126
ヒトレトロウイルス研究施設・ウイルス制御研究領域	・・・131
感染症モデル研究センター・ゲノム改変マウス研究領域	・・・134
感染症モデル研究センター・霊長類モデル研究領域	・・・137
新興ウイルス研究センター	・・・140
マウス作製支援チーム	・・・143
ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム	・・・144
外部資金獲得状況	・・・145
構成員	・・・148

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF GENE ANALYSIS

I. First Group

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 and structural approaches.

- 1) Functions of SecDF, a protein export enhancing membrane component: H. MORI, T. TSUKAZAKI¹, Y. ECHIZEN¹, O. NUREKI¹ and K. ITO² (¹School of Sci., The Univ. Tokyo and ²Kyoto Sangyo Univ.)**

The SecYEG translocon and the SecA ATPase cooperatively facilitate protein export across the bacterial cytoplasmic membrane. Although efficient protein export requires transmembrane proton-motive force as well as SecD-SecF, a pair of membrane integrated Sec factors, their mechanisms of actions remain unknown. We showed that a post-initiation translocation step that can proceed in the absence of ATP requires both SecDF and the proton-motive force, and that the first periplasmic domain (P1) of SecDF interacts with translocating substrates. To obtain a structural basis for its function, we have determined the crystal structure of SecDF from *Thermus thermophilus* at 3.3 Å resolution (see last year's report). The full-length structure revealed a pseudo-symmetrical, 12-helix transmembrane domain, belonging to the RND exporter superfamily. Structural and functional analyses showed that the substrate-binding P1 domain undergoes functionally important conformational changes. In accordance with its similarity with the RND proteins, we found that conserved Asp and Arg residues in the transmembrane SecD/SecF-interface are essential for protein export. Finally, our finding of a Na⁺-dependent SecDF paralog in *Vibrio alginolyticus* provided physiological evidence for the cation-coupled translocation mediated by SecDF. Based on these results, we propose that SecDF functions as a dynamic, membrane-integrated chaperone, which is powered by the cation-motive force to facilitate ATP-independent continuation and completion of protein translocation.

- 2) Toward identification of SecDF nearest neighbors using *in vivo* site-directed photo cross-linking: Y. MACHIDA, Y. AKIYAMA and H. MORI**

SecD and SecF form a membrane integrated protein complex that facilitates protein export using PMF generated across the cytoplasmic membrane (see above). Although these proteins are

suggested to form complexes with the SecYEG translocon and YidC, an integral protein involved in membrane protein biogenesis, little is known about the nature of subunit contacts in these complexes. To elucidate how SecD and SecF interact with other proteins *in vivo*, we utilized the *in vivo* site-directed photo crosslinking approach developed by P. Schultz and co-workers (1). Based on the crystal structure of *Thermus thermophilus* SecDF, we constructed eight *E. coli* SecD derivatives containing a pBPA (p-benzoyl-phenylalanine, a photo reactive amino acid analogue) in the membrane boundary regions of transmembrane segment (TM) 2, 3, 5 or 6, which are predicted to locate on the surface of the SecDF complex, and carried out *in vivo* photo-crosslinking experiments. Upon UV-irradiation, specific cross-linked products were detected when pBPA was introduced at positions 580, 584 and 595 in the SecD TM6 region. Now we are trying to identify partner factors of the cross-linked products by immunoblotting using specific antibodies against candidate proteins.

(1) Chin, J.W., Martin, A..B., King, D.S., Wang, L. and Schultz, P.G. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 ,11020-4

3) Membrane targeting of heat shock factor σ^{32} is required for feedback control of heat shock response: T. YURA, H. MORI, K. ITO¹, B. LIM², C. GROSS² and Y. AKIYAMA (¹Kyoto Sangyo University, ²University of California)

Heat shock response is a major homeostatic mechanism for controlling the state of protein folding and degradation in all organisms. Expression of heat shock genes in *E. coli* is under positive control by σ^{32} and negative feedback control (inactivation/degradation of σ^{32}) by chaperones (DnaK/J, GroEL/S) that bind native σ^{32} . σ^{32} is extremely unstable *in vivo* and is degraded by the membrane-localized FtsH protease; whereas chaperones contribute to rapid degradation of σ^{32} *in vivo*, degradation *in vitro* is very slow and not enhanced by chaperones. Although a simple model based on the binding competition between chaperones and RNA polymerase for σ^{32} had long been thought to explain feedback control, our recent work with σ^{32} mutants defective in feedback control revealed unexpected complexity in regulation (1).

In searching for missing factors, we found a novel feedback-resistant mutant with a transposon inserted upstream of the chromosomal *ftsY* gene (encoding SRP receptor) which reduces the FtsY level. Genetic and biochemical analyses of interplay between σ^{32} and the SRP-pathway, mostly done during T.Y.'s stay in UCSF, suggested a novel regulatory pathway for the heat shock response, namely the SRP-dependent targeting of σ^{32} to the membrane. To further extend this line of work, we examined the involvement of N-terminal sequence of σ^{32} in membrane targeting and feedback control of σ^{32} . By using a transposon probe *TnphoA*, we found that N-terminal 52 amino acids of σ^{32} containing part of the conserved 'region 2.1' acts as a signal for SRP-dependent export of alkaline phosphatase to the periplasm: this export is markedly reduced by several mutations affecting feedback control including the Tn5 insertion into *PftsY*, an 'integration-defective' SecY

translocon mutation, and feedback-resistant mutations within region 2.1 of σ^{32} identified previously (1). These results suggest that the same (or overlapping) sequence serves as a signal for membrane targeting of σ^{32} for feedback control during normal growth and upon heat stress to sustain protein homeostasis. We expect that the membrane localization of σ^{32} facilitates inactivation and/or degradation of σ^{32} under excess chaperones and help co-ordinate the cellular responses to changing protein-folding states between cytoplasm and the membrane.

(1) Yura, T., Guisbert, E., Poritz, M., Lu, C.Z., Campbell, E. and Gross, C.A. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 17638-17643.

4) Roles of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*, in regulation of its protease function: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA

The *E. coli* σ^E pathway of extracytoplasmic stress response (ESR) is activated through sequential proteolytic cleavages of a membrane-bound anti- σ^E protein, RseA, by membrane proteases DegS and RseP. RseP has tandem, circularly permuted PDZ domains (PDZ-N and PDZ-C) in its periplasmic region. Our recent *in vivo* and *in vitro* studies showed that several mutations in the putative ligand-binding pocket of PDZ-N make RseP capable of cleaving full-length RseA independently of the first cleavage by DegS, suggesting that the PDZ-N domain plays an important role in regulation of the two-step proteolysis of RseA through binding of an as yet unidentified ligand (1). Recently, Li and colleagues proposed a new model based on the crystal structures of PDZ-N/C and the *in vitro* experiments using solubilized proteins, in which cleavage of RseA by RseP is facilitated through direct recognition by PDZ-C of the newly exposed carboxyl-terminal residue of the DegS-cleaved RseA (2). We tested this model by *in vivo* experiments. Li *et al.* have reported that the identity of the newly exposed C-terminal residue Val¹⁴⁸ of the site-1 cleaved RseA is important for efficient site-2 cleavage, because its substitution with charged or dissimilar amino acid abolished the site-2 cleavage *in vitro*. However, our results showed that a derivative of RseA148 (the DegS-cleaved form of RseA) having any one of the other 19 a.a. residues at its C-terminus (position 148) was efficiently cleaved by RseP *in vivo*. Moreover, although Li *et al.* have reported that a mutation in the putative ligand-binding grooves of the PDZ domains (I215A of PDZ-N or I304A of PDZ-C) almost completely prevented cleavage of RseA *in vitro*, we found that the RseP variants with these mutations cleaved RseA model substrates as efficiently as wild type RseP *in vivo*. These results strongly suggest that recognition of the exposed substrate C-terminal residue by the RseP PDZ domains makes little, if at all, contribution to substrate cleavage by RseP *in vivo*. Furthermore, we constructed a strain carrying the chromosomal *rseP*(Δ PDZ-C) gene encoding an RseP derivative devoid of the PDZ-C domain and found that this mutant exhibited normal σ^E activation in response to overproduction of OmpC, a cue for the σ^E pathway ESR. This result suggests that the RseP PDZ-C domain is not required for regulation of RseP in the OMP-induced stress response. Now we are trying to identify a physiological ligand of

RseP PDZ by using site-directed *in vivo* photo-cross-linking experiment. We have preliminarily detected some cross-linked products.

(1) Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K. -i., Akiyama, S., and Akiyama, Y. (2008) J. Biol. Chem., 283, 35042-35052.

(2) Li, X., Wang, B., Feng, L., Kang, H., Qi, Y., Wang, J., and Shi, Y. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106, 14837-14842.

5) An attempt to identify a substrate motif for *E. coli* rhomboid protease GlpG: K. TERUSHIMA, H. MORI and Y. AKIYAMA

Rhomboid proteases, a family of intramembrane cleaving proteases (I-CLiPs) that are thought to hydrolyze substrate membrane proteins within the membrane, are involved in a wide range of biological events including EGFR signaling, host cell invasion by protozoan parasites and bacterial quorum sensing. We have been studying *E. coli* GlpG, a member of rhomboid proteases. As a model rhomboid enzyme, GlpG has been extensively studied biochemically and structurally, but its physiological substrate and cellular function remain unknown. Recently, Strisovsky *et al.* (1) showed that several residues (at positions P4, P1 and P2') surrounding the cleavage site are crucial for cleavage of rhomboid substrates and proposed the "consensus substrate motif" recognized by rhomboid proteases. However, the proposed motif does not completely fit with our previous data obtained from the analysis of model substrate cleavage by GlpG, suggesting that the motif recognized by GlpG somewhat deviates from the proposed consensus. To elucidate the GlpG recognition motif, we started systematic mutational analysis against the cleavage site region in a model substrate of GlpG. Our preliminary results suggest that position P1' is additionally important for substrate cleavage by GlpG. We will further extend the analysis to elucidate the GlpG-specific substrate motif, which would help us to identify a physiological substrate and cellular roles of GlpG.

(1) Strisovsky, K., Sharpe, H.J., and Freeman M. (2009) Mol. Cell, 36, 1048-1059.

6) X-ray crystal structural analysis of membrane bound ATP-dependent protease FtsH: R. SUNO, A. ABE, Y. AKIYAMA, S. IWATA¹ and M. YOSHIDA² (¹Department of medicine, Kyoto University, ²the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

ATP-dependent proteases are involved in various cellular processes including cell division, cell differentiation, signal transduction, and stress response. FtsH degrades not only misassembled subunits of membrane protein complexes for their quality control but also some short-lived cytosolic regulatory proteins for cellular regulation. FtsH comprises an N-terminal transmembrane segment and a C-terminal cytosolic region, which consists of AAA⁺ (ATPases associated with diverse cellular activities) and protease domains. Previously, we successfully crystallized and

determined a soluble region of FtsH (sFtsH) containing ADP from *T. thermophilus* at 3.9 Å resolution. In the hexameric structure, a substrate polypeptide can reach the active protease catalytic sites through a tunnel leading from AAA⁺ domain of the adjacent subunit, but not from the central axial region. This raises a possibility of direct delivery of a polypeptide through this tunnel. Recently, we succeeded in crystallizing sFtsH with several kinds of ATP analogues to understand the molecular mechanism of FtsH in detail. The diffraction data were collected at the beamline BL41 XU at Spring-8 at 100 K. These crystals diffracted at least 3.5 Å resolution. Now, we are analyzing these data to determine new crystal structures of sFtsH bound several ATP analogues.

- 7) **Biochemical analysis of the substrate-translocating mechanism of ATP-dependent Protease FtsH: R. SUNO, M. SHIMOYAMA¹, A. ABE, N. SHIMODATE¹, Y. AKIYAMA and M. YOSHIDA¹** (¹the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

The structural analysis also suggested that several mobile regions play an important role in the operating mode of FtsH. Based on the structural information, it is conceivable that a β -hairpin and a lid-helix, which presumably form the tunnel, are involved in translocating the polypeptide. The lid-helix covering the protease catalytic site can kink at the position of the highly conserved Gly448. Substitution of this residue by other amino acids resulted in the decrease of ATPase activity and the complete loss of ATP-dependent protease activity. It was considered that these mutations impaired the flexibility of the lid-helix, leading to a more rigid FtsH with impaired functionality.

II. Second Group

- 1) **Analysis of Molecular Mechanism Underlying Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway: S. YANAGAWA**

Wnt is known to promote recruitment of Axin by Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6), a co-receptor for Wnt that leads to accumulation of β -catenin and activation of Wnt pathway. I found that Keratin associated protein (Krtap) 13, a cysteine-rich cytoplasmic protein binds to LRP6. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling, suggesting that Krtap13 activates Wnt signaling by mimicking some aspects of normal Wnt signal transduction. Actually, Krtap13 overexpression induced accumulation of β -catenin. In addition, I found that Krtap13 binds to both LRP6 and Dvl and that overexpression of Krtap13 promotes Dvl-aggregates formation. Wnt treatment is known to induce plasma membrane-associated LRP6

aggregates (LRP6 signalosomes), which contain Dvl and Axin. Thus, a possible molecular mechanism underlying Krtap13-induced activation of Wnt signaling is to induce co-clustering of LRP6 and Dvls, thereby mimic function of LRP6 signalosomes.

To analyze effect of ectopic expression of Krtap13 in vivo, I am trying to establish transgenic mouse lines that express Krtap13 in a tissue specific manner. For this purpose, 4 lines of transgenic mouse carrying a trans-gene consisting of CAG-promoter, loxp-polyA-loxp cassette, and 3XFLAG-tagged human Krtap13 cDNA were established. By crossing these Krtap13-transgenic mice with another transgenic mice that express Cre in a tissue-specific way, I am expecting to analyze effect of tissue specific overexpression of Krtap13 in mice.

2) Growth control by estrogen in the HPV positive cells: A. SATSUKA, N. KAJITANI and H. SAKAI

The estrogen has been reported to be involved in several types of cancer development. Recent reports suggested that the estrogen and its nuclear receptor promoted cervical cancer. However the effects of estrogen in the HPV replication remains to be understood. We examined the regulation of the HPV gene expression by the estrogen treatment.

The estrogen treatment repressed the activity of HPV early promoter in HPV positive cell line and the cell growth. Estrogen might promote the cervical cancer progression, but the shut down of its pathway seems to be essential to maintain the cancer cell proliferation.

3) Analysis of CAF formation mechanism using HPV positive cells: A. SATSUKA, N. KAJITANI and 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.

4) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4: N. KAJITANI, A. SATSUKA and 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 viral oncoproteins cause the increase of cellular proliferation and/or transformation, but terminally cellular differentiation of epithelium is required for completion of the viral life cycle.

The expression of 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 E4 disrupts the keratin networks. It is also known that E4 induces G₂/M cell cycle arrest. But it is yet to be known well about the details of E4. To investigate novel functions of E4, we performed yeast two-hybrid assays and got several candidate proteins as which interacts with E4. We carry on the analysis about the interactions between the each candidates and E4 in vitro or in vivo. In the future, we will ascertain the function of E4 and its involvement in the viral life cycle.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

LABORATORY OF GENE ANALYSIS

I. First Group

Hizukuri, Y., Kojima, S. and Homma, M. Disulphide cross-linking between the stator and the bearing components in the bacterial flagellar motor. *J. Biochem.* 148, 309–318, 2010.

鈴木守、稲葉謙次、前川憲一、秋山修志、伊藤維昭、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインの構造解析. 第 23 回日本放射光学会年会、姫路、2010 年 1 月 6 日—9 日

Tsukazaki, T., Mori, H., Ito, K., and Nureki, O.: Structural Analysis of Bacterial Sec Translocon machinery. Gordon Research Conferences on Protein Transport Across Cell Membranes, Galveston, U.S.A, March 7-12, 2010

鈴木守、稲葉謙次、前川憲一、秋山修志、伊藤維昭、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の X 線結晶構造解析. 第 27 回 PF シンポジウム、つくば、2010 年 3 月 9 日—10 日

照島功祐、遠藤政幸、勝田陽介、日高久美、杉山弘：RNA ポリメラーゼの DNA ナノ構造上

での 1 分子観測. 日本化学会第 90 春季年会、大阪、2010 年 3 月 26 日—3 月 29 日

森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭：バクテリアのタンパク質膜透過装置の構造と機能. 日本細菌学会ワークショップ「細菌のタンパク質分泌系」、横浜、2010 年 3 月 27 日—29 日

森 博幸：タンパク質膜透過装置補助因子 SecDF の構造と機能 遺伝研研究会「単細胞システムの細胞構築と増殖機構の研究」、三島、2010 年 3 月 30 日—31 日

Akiyama, Y.: New function of RseP, the *E. coli* S2P family protease. Gordon Research Conference on Proteolytic enzymes & their inhibitors, Lucca, Italy, May 2-7, 2010.

檜作 洋平、秋山芳展：表層ストレス応答に関わる膜内プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによる活性制御機構解析. 第 7 回 21 世紀大腸菌研究会、熊本、2010 年 6 月 3 日—4 日

塚崎智也、森 博幸、越前由香、石谷隆一郎、深井周也、田中剛史、Perederina, A., Vassilyev, D. G., 河野俊之、伊藤維昭、濡木理：Sec トランスロコンと共に機能する SecDF 膜タンパク質の構造 第 10 回蛋白質科学会年会、札幌、2010 年 6 月 16 日—18 日

檜作 洋平、秋山芳展：細菌表層ストレス応答に関与する膜内プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによる活性制御機構解析. 特定領域研究「タンパク質の社会」若手ワークショップ、福岡、2010 年 7 月 1 日—3 日

Ito, K., Chiba, C., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic "nascentome" of the cell. FASEB Summer Research Conference "Protein Folding in the Cell", Saxtons River, U.S.A., July 25-30, 2010.

森 博幸：細菌のタンパク質膜透過装置の構造と機能. 第 4 回細菌学若手コロッセウム、修善寺、2010 年 8 月 26 日—28 日

Mori, H., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K. and Akiyama, Y.: A functionally important intramolecular interaction in SecA: involvement of hydrophobic amino acids in motif IV and anti-parallel beta sheet in translocase activation. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010

Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Ito, K. and Nureki, O.: Crystal structure of SecDF, a Sec translocon-associated membrane protein. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010

Yura, T., Lim, B., Gross, C., Ito, K., Mori, H. and Akiyama, Y.: SRP-dependent targeting of sigma 32 to the membrane: A critical step for the chaperone-mediated feedback control in bacterial heat shock response. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010

- Ito, K., Chiba, C., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic "nascentome" of the cell. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010
- Suno, R., Shimoyama, M., Shimodate, N., Abe, A., Akiyama, Y., and Yoshida, M.: The role of the mobile regions in the ATP-dependent protease activity of FtsH. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, September 13-16, 2010
- Hizukuri, Y. and Akiyama, Y.: Roles of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*, in regulation of its protease function. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Japan, September 13-16, 2010
- 町田裕紀子 : in vivo 光架橋実験による SecDF-SecYEG interface の同定. 第6回学生フェスティバル、京都、2010年11月1日
- 寿野良二、下立夏香、下山真和、阿部明子、秋山芳展、吉田賢右 : 膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の構造と機能. 日本生体エネルギー研究会、大阪、2010年11月18日ー20日
- 斎藤 啓、千葉志信、松尾英一、西村 紀、伊藤維昭、秋山芳展 : Fate of signal peptides in bacteria: post liberation cleavage by S2P protease. 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「膜タンパク質の構造・機能から見るオルガネラの進化」、神戸、2010年12月7日ー10日
- Mori H., Tsukazaki, T., Akiyama Y., Nureki O. and Ito K.: Structure, function and evolution of bacterial protein translocation machinery. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「進化からみたタンパク質社会」、神戸、2010年12月7日ー10日
- 檜作 洋平、秋山芳展 : 大腸菌表層ストレス応答に関わる S2P 膜内プロテアーゼ RseP の PDZ ドメイン機能の解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月7日ー10日

II. Second Group

- Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H., and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. Cancer Sci. 101: 536-542, 2010.

- 柳川伸一 : Analysis of molecular mechanism underlying Keratin-associated protein13-induced activation of canonical Wnt signaling pathway. 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月7日ー10日
- 佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸 : エストロジェン刺激による HPV 陽性細胞の増殖制御. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日ー9日
- 佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸 : Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第69回日

本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22日—24日

佐塚文乃、梶谷直子、酒井博幸 : Novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the antiviral effects of cytokines. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学大会合同大会、神戸、2010年12月7日—10日

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF CELL REGULATION

The universe of antigens recognized by T lymphocytes has recently been expanded to include not only protein antigens but also lipid antigens. Unlike conventional MHC molecules that present protein-derived peptide antigens, molecules of the human group 1 CD1 family (CD1a, CD1b, CD1c) mediate presentation of lipid antigens to specific T lymphocytes. By taking lipid chemical and immunological approaches and by developing appropriate animal models (human CD1 transgenic mice, guinea pigs, and non-human primates), we aim at determining how CD1 has evolved to function critically in host defense against microbial infection and cancer. Further, inappropriate immune responses to lipids may result in induction of allergy and autoimmune diseases. These critical aspects of the newly recognized lipid-specific immunity have now been addressed in our laboratory.

1) Reconstitution of the human CD1a expression and function in mice: C. KOBAYASHI, T. SHIINA¹ and M. SUGITA (¹Tokai Univ.)

Mice and rats are useful animals for many immunological studies, but important exceptions exist. These animals have deleted genes for group 1 CD1 family, and thus, lack the lipid recognition system that is comparable to that in humans. Given the necessity of appropriate small animal models for monitoring CD1-mediated immune responses *in vivo*, we attempted to develop two distinct, but complementary, animal systems; namely, guinea pigs and CD1 transgenic mice. We have recently found that guinea pigs have evolved the CD1 system equivalent to that in humans, capable of mounting the CD1-restricted T cell response to mycobacterial lipids. On the other hand, the paucity of critical reagents often hampers detailed analysis of CD1-mediated immune responses in guinea pigs. As an alternative animal model, we generated CD1a transgenic mice carrying the human *CD1A* genome. The expression of CD1a molecules in these mice was detected exclusively in epidermal Langerhans cells and immature thymocytes, thus precisely representing CD1a distribution in humans. By establishing CD1a transgenic mice that lack the expression of either GM-CSF, sulfatide, or MHC class II, we are now analyzing how CD1a expression is regulated and what T cell subsets may react to CD1a molecules.

2) Identification of a mycobacteria-derived glycolipid that delayed-type hypersensitivity targets: T. KOMORI, I. MATSUNAGA, Y. HATTORI, H. KUWATA, H. HARASHIMA¹ and M. SUGITA (¹Hokkaido Univ.)

In guinea pig models of infection with bacillus Calmette-Guerin (BCG), an attenuated

vaccine strain of *Mycobacterium bovis*, we obtained evidence for the delayed-type hypersensitivity (DTH) directed against a glycolipid antigen. Pathogenic mycobacteria produce glucose monomycolate (GMM), a glucosylated species of mycolic acids, by utilizing host-derived glucose as a substrate for mycolyltransferases. The host CD1b-based immunity detects GMM and mounts potent Th1-type T cell responses. Given that Th1 cytokines, such as interferon- γ and TNF- α , are critical for host defense against mycobacterial infection, GMM is now considered as a good candidate of lipid-based vaccines against tuberculosis and related diseases. This possibility has been addressed in monkeys by setting up a collaboration with Prof. Igarashi of the Institute.

3) Lipid biology of dormant mycobacteria: T. URAKAWA, I. MATSUNAGA, N. FUJIWARA and M. SUGITA

Control of latent tuberculosis, or infection with dormant mycobacteria, is one of the most critical challenges for global health. Having established an experimental model of dormant mycobacteria, we now detect lipid biosynthesis that occurs preferentially in dormant mycobacteria. Candidate glycolipids detected preferentially in dormant mycobacteria have been identified, and their interaction with the host innate and acquired immunity is being assessed.

4) Lipid immunity in AIDS: D. MORITA, M. HORIIKE¹, T. IGARASHI¹ and M. SUGITA (¹Laboratory of Primate Model, IVR)

By taking advantage of IVR's superb research environments and close collaboration with Prof. Igarashi's laboratory, this newly launched project addresses how CD1-dependent immunity functions in host defense against retrovirus infection. We have finished delineating the CD1 system in monkeys, highlighting not only expected similarities but also unexpected differences between humans and monkeys. We have now set out to analyze CD1-dependent immunity in SIV-infected monkeys and have identified an array of virus-derived lipidic molecules that the host immunity is able to recognize specifically.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

LABORATORY OF CELL REGULATION

杉田昌彦：新しい結核免疫 総合臨床 59: 117-119, 2010.

Sugita M : Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Boston,

U.S.A., July 13-15, 2010.

森田大輔、堀池麻理子、三浦智行、森直樹、五十嵐樹彦、杉田昌彦：リポペプチド：エイズ免疫の新たな標的分子 第 13 回京都免疫ワークショップ学術集会 大阪 2010 年 2 月 13 日

杉田昌彦：ミコール酸含有糖脂質の生合成と免疫認識～抗酸菌バイオロジーの新たな世界～ 第 85 回日本結核病学術集会 京都 2010 年 5 月 20-21 日

杉田昌彦：結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答 第 53 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 京都 2010 年 11 月 12-13 日

松永勇、小森崇矢、藤原永年、杉田昌彦：*Mycobacterium avium* の血清型非特異的糖ペプチド脂質に対する抗体産生 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2010 年 12 月 7-10 日

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

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 mAbs 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.

1) Identification of functional regions defining different activity in caspase-3 and caspase-7 within cells: N. NAKATSUMI and S. YONEHARA

Caspases are central to apoptosis, and the principal executioner caspases, caspase-3 and -7, were reported to be similar in activity, primary structure, and three-dimensional structure. Here, we identified different activity in caspase-3 and -7 within cells and examined the relationship between their structure and function using human cells expressing almost equal amounts of exogenous caspase-3, caspase-7 and/or chimeric constructs after down-regulation of endogenous caspase-3 and -7 expression. Caspase-3 (produced in human cells) showed much stronger cleaving activity than caspase-7 against a low molecular weight substrate in vitro dependent on four specific amino acid regions. Within cells, however, an additional three regions were required for caspase-3 to exert much stronger protease activity than caspase-7 against cellular substrates. Three of the former four regions and the latter three regions were shown to form two different three-dimensional structures that were located at the interface of the homodimer of procaspase-7 on opposite sides. In addition, procaspase-3 and -7 revealed specific homodimer-forming activity within cells dependent on five amino acid regions, which were included in the regions critical to the cleaving activity within cells. Thus, human caspase-3 and -7 exhibit differences in protease activity, specific homodimer-forming activity, and three-dimensional structural features, all of which are closely interrelated.

2) Analysis of interaction between FLASH and ARS2 by alanine scanning mutagenesis and its role in cell cycle progression: T. HAMAUCHI, M. KIRIYAMA and S. YONEHARA

FLASH (FLICE/caspase-8-associated huge protein/CASP8AP2) was identified by yeast two-hybrid screening using two tandemly repeated death-effector domains of procaspase-8 as a bait in our laboratory. Recent studies indicated that FLASH plays an important role in cell cycle progression, and expression of histone. In our laboratory, it was shown that 1) FLASH-down-regulated cells are arrested in S phase, 2) FLASH is associated with arsenite resistance protein 2 (ARS2) through its central region composed of 13 amino acids (FARB region), and 3) interaction of FLASH with ARS2 is involved in S phase progression. ARS2 was originally identified as a gene product conferring resistibility to arsenite in an arsenite-hypersensitive cell line, and ARS2-down-regulated cells was indicated to cause growth retardation. Here, by alanine scanning mutagenesis, we identified 3 critical glutamic acid residues in FARB that are necessary to bind to ARS2. Then we generated FLASH mutants where the important glutamic acid residues are replaced by alanine. The mutants of FLASH can neither interact with ARS2 nor sufficiently rescue the growth of endogenous FLASH-down-regulated cells. Thus, interaction of FLASH with ARS2 was indicated to be important in cell growth and cell cycle progression. Moreover, we found that down-regulation of ARS2 expression induces down-regulation of FLASH expression. However, expression of exogenous FLASH in ARS2-down-regulated cells cannot rescue the cell growth retardation. Collectively, we concluded that down-regulation of ARS2 expression induces cell growth retardation in a FLASH independent manner.

3) Establishment of inducible gene expression and knockdown systems in mouse embryonic stem cells to analyze the functions of various genes in differentiation: M. SOMEDA and S. YONEHARA

Embryonic stem (ES) cells, which are derived from the inner cell mass of blastocyst, have the pluripotency to differentiate into various cell types, including neuron. Recent studies on neuronal differentiation of ES cells have suggested that analysis of *in vitro* generation of neural cells from ES cells is a powerful tool to examine neuronal development. To understand gene functions during neuronal differentiation, we established inducible gene expression and knockdown system in mouse ES cells. This system makes exogenous genes or shRNAs available to express in a timely fashion during whole neuronal differentiation. ES clones stably expressing a mutated hormone-binding domain of mouse estrogen receptor Mer-Cre-Mer chimera molecule (MerCreMer) was infected with a lentiviral vector, Lex-puro/EGFP, which carries a puromycin resistant gene (*puro^r*) flanked on both sides by a lox site and an EGFP gene. Because of the presence poly(A) site connecting to the *puro^r* gene, EGFP cannot express until the *puro^r*-poly(A) is deleted by the functions Cre. MerCreMer, which usually remains cytoplasm, translocates into the nucleus and exert its enzymatic activity after treatment with the synthetic ligand to Mer, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT). We also utilized inducible expression system of shRNAs under control of the Tet-On

system. All the ES cell lines we established were shown to be able to differentiate into neural cells by various methods used in *in vitro* neuronal differentiation. In Fas-mediated apoptosis, the death-inducing signaling complex (DISC), composed of death receptor Fas, adaptor protein FADD and caspase-8, mediates the extrinsic pathway inducing apoptosis. Recent studies, however, have indicated that these molecules have non-apoptotic functions in both embryonic development and maintenance of living body. In this study, we investigated functions of these apoptosis-related genes during neuronal differentiation using the inducible gene expression and knockdown systems in mouse ES cells.

4) An Essential role of the Wnt signals in both self renewal and differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI

Wnt signaling pathways were reported to play an important role in the process of differentiation at the gastrulation stage during embryogenesis. We have been studying a role of the Wnt signals in the differentiation process using mouse ES cells. The ES cells could be induced to differentiated cells under several culture conditions. In case of the ES cells, however, increased Wnt signals rather inhibit differentiation and maintain “stemness” of the cells.

Among the Wnt family members, we have detected Wnt3 and Wnt8a expression in ES cells. Both are assessed as a signaling molecule that stimulates the Wnt canonical pathway. Nevertheless, Knock down of each expression by introducing the shRNA and overexpression of each molecule revealed that Wnt3 and Wnt8a are involved in the opposite processes in ES cells. We are now analyzing what is the difference between signaling pathways mediated by the Wnt3 and Wnt8a, and how they could play such a different role in the differentiation process of ES cells.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

Nakatsumi H, and Yonehara S. Identification of functional regions defining different activity between caspase-3 and caspase-7 within cells. J Biol Chem, 285, 25418-25425, 2010.

Maria Kiriya, Motoki Saito, Fuyuki Ishikawa, and Shin Yonehara. “Interaction of FLASH with Arsenite Resistance Protein 2 in involved in cell cycle progression at S phase.” The 8th International Student Seminar. March 3-6, 2010, Kyoto.

Yoshitaka Minamida, and Shin Yonehara. "FLASH is indispensable for early embryonic development, but dispensable for proliferation of ES cells." The 8th International Student Seminar. March 3-6, 2010, Kyoto.

Masataka Someda, and Shin Yonehara. "Establishment of inducible gene expression system in mouse embryonic stem cells to analyze gene function during neuronal differentiation." The 8th International Student Seminar. March 3-6, 2010, Kyoto.

Ryo Ito, Masato Ogawa, Yasuo Uchiyama, and Shin Yonehara. "DNA damage induced caspase-independent cell death in p53-deficient cells." APRU Research Symposium "The interface between molecular biology and nano-biology". November 24-26, 2010, Kyoto.

Masataka Someda, Shin Yonehara. "Establishment of inducible gene expression and knockdown systems in mouse embryonic stem cells to analyze the functions of various genes in differentiation." APRU Research Symposium "The interface between molecular biology and nano-biology". November 24-26, 2010, Kyoto.

米原 伸：「細胞死関連因子の多様な生理機能」、第9回 細胞死研究会、京都市、1月18日、2010.

米原 伸：「細胞死研究の歴史とその生命科学における意義」、兵庫医科大学セミナー、西宮市、1月20日、2010.

米原 伸：「細胞死関連因子の多様な生理機能」、第12回 京都大学生命科学研究科シンポジウム、京都市、7月1日、2010.

米原 伸：「多様な細胞死と がんとの関わり」、第69回日本癌学会学区術総会、がん研究入門コース、大阪市、9月23日、2010.

米原 伸：「細胞死（アポトーシス）：細胞死は生物が生きるために必要な現象である。遺伝子の働きで細胞は積極的に死ぬ」、「天校アカデメイア」講演会（大阪府立天王寺高校講演会）、大阪市、11月8日、2010.

米原 伸：「Caspase-independent cell death in multinucleated cells with chromosomal aberrations」、BMB2010（第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会）、がん研究入門コース、神戸市、12月8日、2010.

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

1) The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of core protein : Y. KUSHIMA, T. WAKITA and M. HIJIKATA

Hepatitis C virus (HCV) core protein forms the nucleocapsid of the HCV particle. Although many functions of core protein have been reported, how the HCV particle is assembled is not well understood. Here we show that the nucleocapsid-like particle (capsid) of HCV is composed of a disulfide-bonded dimer of core (dbd-core). Mutational analysis revealed that the cysteine residue at amino-acid position 128 (Cys128) of core, a highly conserved residue among all reported isolates, is responsible for dbd-core formation. Amino-acid substitution at Cys128 resulted in significant reductions in infectious particle production and loss of dbd-core formation. Additionally, the Cys128 mutant core showed a dominant-negative effect in terms of HCV particle production. These results suggest that this disulfide bond is critical for the HCV virion. We also showed that the sensitivity of the dbd-core of HCV capsid against proteinase K but not to trypsin, suggesting that this capsid is built up of a tightly packed structure of the core with its N-terminal arginine-rich region of the core inside and C-terminal hydrophobic region outside.

2) IRF7 dependent IFN- α response in the early phase of the viral infected hepatocytes: Y. QI, H. H. ALY, C. TSUTSUI , T. FUJITA and M. HIJIKATA

The transcription factors, IRF3, IRF7 and NF- κ B are known to play crucial roles in innate immune system of the cells. These factors cooperate to induce type I interferon genes after activation by viral infection. Our previous research indicated that IRF7 plays a more important role in the suppression of HCV infection in HuS-E/2 cells, immortalized human hepatocytes, than IRF3. We also observed that IRF7 is constitutively produced in human primary hepatocytes without virus infection, although the expression of IRF7 gene is known to occur by IFN- β induced by activated IRF3 in many cells. These suggested that there is a human hepatocyte-specific innate immune system. So we further analyzed the response of the genes related with innate immune system against viral infection. We found that IFN- α gene expression was induced in the early phase of the virus infection (3 hours post-infection) in both primary hepatocytes and HuS-E/2 cells. It came before induction of IFN- β gene. The suppression of IFN- α 1 gene induction in the early phase was observed in HuS-E/2 cells expressing the dominant negative form of IRF7, suggesting that this early induction of IFN- α gene by viral infection is IRF7 dependent.

LIST OF PUBLICATIONS
DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES

Kushima Y., Wakita T., Hijikata M.: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. J.Virol., 84(18), 9118-9127, 2010.

Kushima Y., Wakita T., Hijikata M.: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14, 2010.

Qi Y., Aly H. H., Tsutsui C., Fujita T., Hijikata M.: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14, 2010.

Kushima Y., Wakita T., Hijikata M.: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26, 2010.

Abe Y., Wakita T., Hijikata M.: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26, 2010.

Kushima Y, Wakita T, Hijikata M: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th East Asia Joint and 9th Cross-Straight Symposium on Biomedical Research, IVR-1, Taiwan, July, 2010.

Kushima Y, Wakita T, Hijikata M: Disulfide bonded dimer form of the core protein is a basal component of hepatitis C virus particle. 第8回国際学生セミナー、0-21、京都、2010年2月

久島透嘉、脇田隆字、土方誠：C型肝炎ウイルス粒子形成とコアタンパク質の動態
第6回広島肝臓研究センターシンポジウム、広島、2010年6月4日

久島透嘉、脇田隆字、土方誠：CoreによるS-S結合型二量体はC型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第58回日本ウイルス学会学術総会、徳島、平成22年11月7-9

日

阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠：感染性 HCV 粒子
産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、
徳島、平成 22 年 11 月 7-9 日

土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、斉月、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠：
シンポジウム 06 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、
臨床分離 HCV 株の培養と性状、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、徳島、平成 22
年 11 月 7-9 日

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- 1) Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change: K. TAKAHASI, M. HORIUCHI, K. FUJII, S. NAKAMURA, N. N. NODA, M. YONEYAMA, T. FUJITA and F. INAGAKI**

The transcription factor IRF-3 is activated by microbial invasions and produces a variety of cytokines including type-I interferon. Upon microbial infection, IRF-3 is phosphorylated at its C-terminal regulatory domain, then oligomerized, translocated into the nucleus, and here it binds to CBP/ p300. Although a number of studies have been reported investigating the activation mechanism of IRF-3, there are a number of unresolved issues, especially on the phosphorylation sites, the oligomerization process and the binding mechanism with CBP/ p300. In this report, the phosphorylated IRF-3 regulatory domain (IRF-3 RD) was prepared using the kinase IKK-i, and the active form of phosphorylated IRF-3 RD was identified. The paper also reports the crystal structure of the active form of the phosphorylated IRF-3 RD. Furthermore, the phosphorylation of Ser386 was found to be essential for its dimerization and binding with CBP/ p300 using mutational analysis and mass spectrometry. Thus, we conclude that the phosphorylation of Ser386 is essential for activation of IRF-3.

- 2) Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1: K. ONOGUCHI, K. ONOMOTO, S. TAKAMATSU, M. JOGI, A. TAKEMURA, S. MORIMOTO, I. JULKUNEN, H. NAMIKI, M. YONEYAMA and T. FUJITA**

In virus-infected cells, RIG-I-like receptor (RLR) recognizes cytoplasmic viral RNA and triggers innate immune responses including production of type I and III interferon (IFN) and the subsequent expression of IFN-inducible genes. Interferon- β promoter stimulator 1 (IPS-1, also known as MAVS, VISA and Cardif) is a downstream molecule of RLR and is expressed on the outer membrane of mitochondria. While it is known that the location of IPS-1 is essential to its function, its underlying mechanism is unknown. Our aim in this study was to delineate the function of mitochondria so as to identify more precisely its role in innate immunity. In doing so we discovered that viral infection as well as transfection with 5'ppp-RNA resulted in the redistribution of IPS-1 to form speckle-like aggregates in cells. We further found that Mitofusin 1 (MFN1), a key regulator of mitochondrial fusion and a protein associated with IPS-1 on the outer membrane of mitochondria, positively regulates RLR-mediated innate antiviral responses. Conversely, specific

knockdown of MFN1 abrogates both the virus-induced redistribution of IPS-1 and IFN production. Our study suggests that mitochondria participate in the segregation of IPS-1 through their fusion processes.

3) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses: T. SATOH, H. KATO, Y. KUMAGAI, S. SATO, K. MATSUSHITA, T. TSUJIMURA, T. FUJITA, S. AKIRA and O. TAKEUCHI

RNA virus infection is recognized by retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs), RIG-I, and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) in the cytoplasm. RLRs are comprised of N-terminal caspase-recruitment domains (CARDs) and a DExD/H-box helicase domain. The third member of the RLR family, LGP2, lacks any CARDs and was originally identified as a negative regulator of RLR signaling. In the present study, we generated mice lacking LGP2 and found that LGP2 was required for RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. In particular, LGP2 was essential for type I IFN production in response to picornaviridae infection. Overexpression of the CARDs from RIG-I and MDA5 in Lgp2(-/-) fibroblasts activated the IFN-beta promoter, suggesting that LGP2 acts upstream of RIG-I and MDA5. We further examined the role of the LGP2 helicase domain by generating mice harboring a point mutation of Lys-30 to Ala (Lgp2 (K30A/K30A)) that abrogated the LGP2 ATPase activity. Lgp2 (K30A/K30A) dendritic cells showed impaired IFN-beta productions in response to various RNA viruses to extents similar to those of Lgp2(-/-) cells. Lgp2(-/-) and Lgp2 (K30A/K30A) mice were highly susceptible to encephalomyocarditis virus infection. Nevertheless, LGP2 and its ATPase activity were dispensable for the responses to synthetic RNA ligands for MDA5 and RIG-I. Taken together, the present data suggest that LGP2 facilitates viral RNA recognition by RIG-I and MDA5 through its ATPase domain.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. :LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 1512-7, 2010.

Ranjan P, Jayashankar L, Deyde V, Zeng H, Davis WG, Pearce MB, Bowzard JB, Hoelscher MA, Jeisy-Scott V, Wiens ME, Gangappa S, Gubareva L, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM, Fujita T, Sambhara S. :5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian

H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication, *Virology Journal*, 7, 102-109, 2010.

Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T.: Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathog.*;6(7):e1001012, Jul 22, 2010.

Takahashi K., Horiuchi, M., Fujii, K., Nakamura, S., Nobuo N Noda, N.N., Yoneyama, M., Fujita, T. and Inagaki, F.: Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. *Genes to Cells*. 15, 901-910, 2010.

Tokunaga T., Naruke Y., Shigematsu S., Kohno T., Yasui K., Ma Y., Chua K.J., Katayama I., Nakamura T., Hishikawa Y., Koji T., Yatabe Y., Nagayasu T., Fujita T., Matsuyama T. and Hayashi H.: Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer. *BBRC* 397, 202-207, 2010.

Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, Sykes A, Dahdaleh S, Clarke DL, Belvisi MG, Kon OM, Fujita T, Jeffery PK, Johnston SL, Edwards MR.: Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.*;6(11):e1001178, Nov 4, 2010.

Yoneyama, M. and Fujita T.: Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Reviews in Medical Virology* 20, 4-22, 2010.

Kazuhide Onoguchi, Kiyohiro Takahashi, Mitsutoshi Yoneyama, and Takashi Fujita: Chapter 2 Type I interferon production by viruses, in *Viruses and Interferon: Current Research*, Ed. Karen Mossman, Caister Academic Press, 2010.

Onoguchi K, Yoneyama M, Fujita T.: Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors. *J Interferon Cytokine Res.* 2010 Oct 15. [Epub ahead of print]

Onomoto K, Onoguchi K, Takahashi K, Fujita T.: Type I interferon production induced by RIG-I-like receptors. *J Interferon Cytokine Res.*;30(12):875-81, Dec, 2010.

高松詩穂理、藤田尚志：RLRはC型肝炎の形成にどのようにかわるのか 分子消化器病 7 (3) : 53-58 : 2010

藤田尚志：抗ウイルス自然免疫応答-明らかになってきた非自己核酸認識システム「基礎の基礎」細胞工学 29 (10) : 970-975 : 2010

小野口和英、藤田尚志：ミトコンドリアと抗ウイルス自然免疫 細胞工学 29 (10) : 983-987 : 2010

常喜儒彦、米山光俊：自然免疫に対抗するウイルスの阻害分子 細胞工学 29 (10) : 988-993 : 2010

加藤博己：RNAiとウイルス 細胞工学 29 (10) : 999-1003 : 2010

-
- Fujita T.: Mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors and activation of antiviral program: 2nd International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Workshop on Human RNA viruses. New Dehli, India . 2.10-2.12, 2010.
- Fujita T.: Recognition of viral nucleic acids by RLRs in antiviral innate immunity. 3rd International Workshop on Cell Communication in Health and Disease. Vienna, Austria. February 17-18, 2010
- 應田涼太、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：ウイルスセンサーRIG-I によって誘導される miRNA の機能解析 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北九州 2010. 6. 25-26
- 尾野本浩司、西川千紘、米山光俊、藤田尚志：血球系細胞活性化時における RIG-I シグナルの機能解析、第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北九州 2010. 6. 25-26
- 常喜儒彦、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染時における RLRs の細胞内局在の解析、第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、北九州、2010. 6. 25-26
- Onoguchi, K., Fujita T.: Regulation of innate antiviral signaling mediated by mitochondria. The 17th East Asia Joint and 9th Cross-Strait Symposium on Biomedical Research. Taipei, Taiwan. July 1-2, 2010.
- Fujita T.: Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN. 3rd International Workshop on Cell Communication in Health and Disease. Osaka, Japan . July 12-13, 2010.
- Fujita T.: Regulation of the innate antiviral response by local condensation of IPS-1 mediated by mitochondrial dynamism. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010
- Onoguchi K., Yoneyama, M., Fujita T.: The local condensation of IPS-1 mediated by mitochondrial dynamics. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan . August 22-27, 2010.
- Onomoto, K., Yoneyama, M., Fujita T.: Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RIG-I. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan . August 22-27, 2010.
- Fujita T.: Regulation of the innate antiviral response by local condensation of IPS-1 mediated by mitochondrial dynamism. 50th ICAAC. Boston, USA. September 12-15, 2010.
- 藤田尚志：ウイルス増殖の感知と抗ウイルス自然免疫応答. 蛋白質研究所セミナー「疾患と膜動態の蛋白質科学」大阪、2010. 9. 17-18
- Fujita T.: Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. Cytokines 2010: Cancer in Infectious Diseases, Autoimmune Disorders and Cancer. Boston, U.S.A. October 3-7, 2010.
- Fujita T.: Sensing viral RNA and activation of antiviral innate immune responses. 3rd HKU - PASTEUR IMMUNOLOGY COURSE. Hong Kong. November 10, 2010.
- Yoo, J-S., Onomoto, K., Nagamine, Y., Fujita, T.: AU-rich RNA element (ARE) binding protein

interacts with antiviral proteins and regulates innate immune signaling. BMB 2010（第33回
日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会）Kobe, Japan . December 7-10.

藤田尚志：抗ウイルス自然免疫応答：ウイルスRNAの感知と細胞内シグナル伝達機構、第11
回桜山感染症研究会、名古屋市立大、名古屋、2010. 12. 22

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

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, Assistant Prof. Kitabatake's subgroup is focusing on quality control mechanisms of eukaryotic ribosome particles.

1) RNA distribution in the cell:

1-1) Identity elements used in mRNA export

Different RNA species, such as tRNAs, U snRNAs, mRNAs and rRNAs, utilize distinct export pathways, i.e., distinct sets of export factors. Accumulating evidence shows that the pathway of RNA export can influence the fate of a given RNA in the cytoplasm, indicating the biological importance of the choice of RNA export pathway. This means that the cellular export machinery must be able to discriminate distinct RNA species, and therefore each RNA species should have identifying features that specify its export pathway ("identity elements"). We are mainly focusing on mRNAs and performing a systematic search for identity elements used in export of mRNAs. To this end, we make various chimeric RNAs between mRNA and U1 snRNA, and look for RNA features that make the chimeric RNAs behave like an mRNA rather than a U snRNA in nuclear export process. We also look for the trans-acting factors that recognize the identity elements to elucidate the mechanisms of RNA export pathway choice.

1-2) Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursors

Intron-containing pre-mRNAs are normally retained in the nucleus until they are spliced to produce mature mRNAs that are exported to the cytoplasm. The nuclear retention of pre-mRNAs is essential for proper gene expression. It secures pre-mRNAs to be efficiently spliced since splicing mainly occurs in the nucleus. It also secures pre-mRNAs not to be translated since translation of pre-mRNAs would possibly produce toxic abnormal proteins for the cell. However, the nuclear retention mechanisms of pre-mRNAs are not well understood, especially in vertebrates. We are trying to understand such mechanisms.

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). Here, we show that the NRD of 25S rRNA requires a ubiquitin E3 ligase component Rtt101p and its associated protein Mms1p, previously identified as factors involved in DNA repair. We revealed that a group of proteins associated with nonfunctional ribosome particles are ubiquitinated in a Rtt101-Mms1-dependent manner. 25S NRD was disrupted when ubiquitination was inhibited by the overexpression of modified ubiquitin molecules, demonstrating a direct role for ubiquitin in this pathway. These results uncovered an unexpected connection between DNA repair and the quality control of rRNAs. Our findings support a model in which responses to DNA and rRNA damages are triggered by a common ubiquitin ligase complex, during genotoxic stress harmful to both molecules.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

北畠真、藤井耕太郎、大野睦人：真核生物リボソームの生合成と品質管理. 実験医学：Vol. 28 No. 10. 150－155. 2010.

Suzuki, T. , Izumi, H. and Ohno, M. Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. J. Cell Biol. 190:4 603-612. 2010.

大野睦人：RNAサーベイランスーRNAータンパク質複合体の品質管理. 実験医学：Vol. 28 No. 16. 2611～2617. 2010.

Takeiwa, T., Taniguchi, I. and Ohno, M. : Analysis of cis- and trans- acting elements for nuclear Pre-mRNA retention. The 8th International Student Seminar. Mar 3-6. 2010.

Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M., Miyata, A. and Ohno, M : Functional decay of nonfunctional 25S rRNA requires proteasome activity. The 8th International Student Seminar. Kyoto, Japan. March 3-6, 2010.

Izumi, H., McCloskey, A., Taniguchi, I. and Ohno, M.: Identification of a candidate factor that promotes nuclear export of U snRNAs. The 8th International Student Seminar. Mar 3-6. 2010.

- Ohno, M. : A mechanism to measure RNA length prior to RNA export from the nucleus. 19th CDB Meeting. May 10-12. 2010.
- Kitabatake,M., Fujii,K., Sakata,T., Miyata,A. and Ohno,M. : Selective degradation of nonfunctional ribosomal RNAs mediated by the Ubiquitin-proteasome system. 19th CDB Meeting. May 10-12. 2010.
- Fujii,K., Sakata,T., Kitabatake,M., Miyata,A. and Ohno, M.: Functional decay of nonfunctional 25S rRNA requires proteasome activity. 19th CDB Meeting. May 10-12. 2010.
- Takeiwa, T., Takemura, R.,Taniguchi, I. and Ohno, M.: Cis-acting RNA elements and trans-acting factors for nuclear Pre-mRNA retention. 19th CDB Meeting. May 10-12. 2010.
- Izumi, H., McCloskey, A.,Taniguchi, I. and Ohno, M.: Identification of a candidate factor that promotes nuclear export of U snRNAs. 19th CDB Meeting. May 10-12. 2010.
- McCloskey, A., Taniguchi, I. and Ohno, M : HnRNPC1/C2 tetramer measures RNA length prior to RNA export from the nucleus 2010 RNA meeting. Jun 22-26. 2010.
- Ohno, M. and Suzuki.T :A role of Cajal bodies for surveillance of export U snRNP assembly. 2010 RNA meeting. Jun 22-26. 2010.
- Kitabatake,M., Fujii,K., Sakata,T., Miyata,A. and Ohno,M : Biochemical purification and characterization of nonfunctional mutant ribosomes. 2010 RNA meeting. Jun 22-26. 2010.
- Fujii, K., Kitabatake, M. and Ohno, M:Multistep RNA degradation mechanism in nonfunctional 25S rRNA decay. 2010 RNA meeting. Jun 22-26. 2010.
- Sakata, T.,Kitabatake, M. and Ohno, M:Distinct ubiquitinations of ribosomal particles caused by translation elongation inhibitors. 2010 RNA meeting. Jun 22-26. 2010.
- Takeiwa,T., Taniguchi,I. and Ohno, M:Cis-acting RNA elements and trans-acting factors for nuclear pre-mRNA retention. The 17th East Asia Joint Symposium. Jun 30 - Jul 3.
- 北畠真、藤井耕太郎、酒井朗恵、大野睦人 : Selective Degradation of nonfunctional ribosomal particles. 第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- 谷口一郎、馬淵直人、大野睦人:RNA核外輸送における HIV-1 タンパク質 Rev の新規機能、第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- マクロースキー亜紗子、大野睦人:HnRNPC1/C2 4量体は RNA核外輸送の際に RNAの長さを測る、第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- 坂田知子、北畠真、大野睦人:翻訳阻害剤等によるリボソーム複合体のユビキチン化の解析、第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- 和泉光人、マクロースキー亜紗子、谷口一郎、大野睦人:U snRNAの核外輸送を促進する因子の同定、第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- 酒井朗恵、藤井耕太郎、北畠真、大野睦人:リボソームの品質管理における機能不全 25S rRNAの分解、第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月27-29日
- 西尾治幾、和泉光人、マクロースキー亜紗子、谷口一郎、大野睦人 : RNAの長さを測る因子の候補 SAFB1 の解析、RNA フロンティアミーティング 2010、静岡、2010年9

月 27-29 日

酒井朗恵、北畠真、藤井耕太郎、大野睦人：リボソームの品質管理における機能不全 25S rRNA の分解、RNA フロンティアミーティング 2010、静岡、2010 年 9 月 27-29 日

北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、宮田淳美、大野睦人：A Role for Ubiquitin in the Clearance of Nonfunctional Ribosomal RNAs. 第 39 回環境変異原学会、つくば市、2010 年 11 月 16・17 日

北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、酒井朗恵、大野睦人：真核生物における機能不全リボソームの選択的分解、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 7-10 日

マクロースキー亜紗子、谷口一郎、大野睦人：HnRNPC1/C2 4 量体は RNA 核外輸送の際に RNA の長さを測る、平成 22 年度京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2010 年 12 月 10 日

DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

- 1) Overlapping of human REV7- and MAD2-binding motif sequences: T. HANAFUSA, T.HABU¹, J. TOMIDA¹, E. OHASHI², Y. MURAKUMO³ and H. OHMORI** (¹Kyoto University Radiation Biology Center, ²Kyushu University, ³Nagoya University)

Pol ζ , a DNA polymerase specialized for trans-lesion DNA synthesis (TLS), contains at least, two subunits, the REV3 catalytic subunit (consisted of 3130 amino acids) and the REV7 accessory subunit (211 aa). The human REV7 (hREV7) protein is known to interact with hREV3, hREV1 (another TLS protein) and some other proteins such as ADAM9 (a disintegrin and metalloprotease) and ELK-1 (an Ets-like transcriptional factor). hREV7 is alternatively termed hMAD2L2, because its primary sequence shows 26% identity to that of hMAD2. Because hMAD2 plays crucial roles in spindle assembly checkpoint (SAC) *via* interactions with hMAD1 or hCDC20, hMAD2L2/REV7 was to interact with hCDH1, an hCDC20 homologue, as hMAD2 does with hCDC20. As a step to examine whether hREV7/MAD2L2 is involved in both TLS and SAC, we investigated the molecular basis for the interactions of hREV7/MAD2L2 and hMAD2 with their binding partners. Our results revealed that a short sequence of hREV3 (1877-ILKPLMSPP-1885, designated minimum core sequence, MCS in short) was necessary and sufficient for interaction with hREV7, although the presence of several amino acid residues C-terminal to MCS enhanced the hREV7-interaction. Surprisingly, hMAD2 also bound to the MCS in hREV3, while hMAD2 did not bind to a similar sequence in ADAM9 or ELK-1, and hREV7 did not bind to the hMAD2-binding sequence in hMAD1 or hCDC20. While we could detect intracellular interaction between a hREV3 fragment carrying the 1759-2004 sequence and the endogenous hREV7 protein, we could not detect such an interaction between the hREV3 fragment and an over-expressed hMAD2. We infer that the hREV3 sequence surrounding MCS may confer an inhibitory effect on the hREV3-hMAD2 interaction. Furthermore, by yeast two-hybrid assay, we could not detect any interaction between hREV7 and hCDH1, under the conditions where the interaction between hMAD2 and hCDC20 was detected. Thus, we conclude that while hREV7 and hMAD2 have similar recognition sequences, each of them functions separately for TLS and SAC, respectively.

- 2) Intracellular interaction between REV7 and REV3 in DT40 cells: K. TAKENAKA¹, H. OHMORI and Y. MIKI¹** (¹Tokyo Medical and Dental University)

We have shown that hREV7 and hMAD2 bind to a 9-aa sequence within hREV3,

1877-ILKPLMSPP-1885, and that amino-acid substitutions in the hREV3 MCS conferred different effects on interactions with hREV7 or hMAD2. For example, I1877A or L1878A substitution in the hREV3 MCS completely abolished the interaction with hMAD2, but either substitution by itself showed no or little effect on the interaction with hREV7 while the I1877A/L1878A double substitution abolished the hREV7-interaction. On the other hand, P1880F substitution abolished the hREV7-interaction, but it fully retained the hMAD2-interaction. Taking advantage of these *in vitro* results, we wished to examine effects of such amino-acid substitutions on intracellular interaction between hREV3 and hREV7 or hMAD2. Since we know it very difficult to detect the intact hREV3 even when over-expressed, we used a truncated form of hREV3 with a FLAG-tag at the N-terminus, FLAG-hREV3(1759-2004), and introduced I1877A or P1880F substitution into the construct. When FLAG-hREV3(1759-2004) carrying the wild-type, I1877A or P1880F mutant sequence was expressed in HEK293 cells, we could detect interaction of the wild-type and I1877A mutant, but not for P1880F mutant, with the endogenous hREV7. To further examine the above mutations for interaction with REV7 *in vivo*, we decided to use DT40, a chicken pre-B cell line that is suited for gene manipulation. The chicken REV7 shows 96% sequence identity with the human REV7 and the chicken REV3 possesses the sequence identical to hREV3 MCS at the identical position. We successfully introduced I1877A or P1880F mutation into the genomic sequence of the DT40 *REV3* gene. Characterizations of such mutant cells should provide more insights into the REV3-REV7 interaction *in vivo*.

3) **Interaction between REV3 and REV7 in *S. pombe*: T. HANAFUSA, J. TERUNUMA¹, M. UCHIYAMA¹, F. HANAOKA¹ and H. OHMORI (¹Gakushuin University)**

Our results showed that human REV7 and MAD2, having 23% sequence identity in their primary structures, bind to the same short sequence within hREV3. This indicates that, while the similarity between the entire sequences of hREV7 and hMAD2 is not so high, they share a conserved structure crucial for recognizing a short motif sequence. We then examined if there is any overlapping between REV7- and MAD2-binding motif sequences in other organisms. For this purpose, we studied on REV3-REV7 interaction in *Schizosaccharomyces pombe* (Sp). Using yeast two-hybrid assay, we found that SpREV7 bound to the 517-535 region (517-SFVYKQQPPSTDDLYGTMK-535) of SpREV3 (consisted of 1480 amino acids), which contains a sequence (underlined) with a similarity to the hREV3 MCS. However, SpREV7 bound very weakly to the 9-aa MCS-like sequence and required the downstream sequence for exhibiting a stronger binding. SpMAD2 also bound to the 517-SFVYKQQPP-525 sequence, but its binding was significantly reduced when the upstream sequence was attached to it, as in 513-SQHESFVYKQQPP-525. Furthermore, SpMAD2 bound to the hREV3 MCS, while SpREV7 did not bind to it. Thus, our results indicate that not only in humans but also in yeasts, both REV7

and MAD2 recognize a short motif sequence present within REV3, while their interactions with the MCS-like sequence are differently affected by the surrounding sequences. It should be also noted that the similarity between SpMAD2 and hMAD2 (47% identity) is higher than that between SpREV7 and hREV7 (38% identity). We are now trying to introduce some mutations into the genomic sequence of the *S. pombe* *REV3* gene and examine intracellular interactions of altered SpREV3 proteins with SpREV7, because SpREV3 is much shorter than hREV3. We'll examine phenotypes of SpREV3 mutants that have completely lost the interaction with SpREV7.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

T. Hanafusa, T. Habu, J. Tomida, E. Ohashi, Y. Murakumo and H. Ohmori.: Overlapping of human REV7- and MAD2-binding motif sequences, *Genes Cells*, 15, 281-296, 2010

J. Akagi, K. Suzuki, E. Ohashi, H. Ohmori and F. Hanaoka : Translesion DNA polymerase Polk acts as an alternative TLS polymerase upon UV-induced DNA lesions in mouse cells、第 32 回日本分子生物学会年会 第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、12 月 7～10 日、2010

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES
LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

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) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (2) regulation of immune response by IL-7 receptor (IL-7R) expression; and (3) distribution and function of IL-7-producing cells in lymphoid organs.

1) Accessibility control of TCR V γ region by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The signal of the IL-7R and STAT5 plays an essential role in $\gamma\delta$ T cell development by inducing V-J recombination in the T cell receptor (TCR) γ locus. Previously, we have shown that STAT5 binds to the J γ promoters and controls chromatin accessibility by histone acetylation. However, little is known on control mechanism of V γ region by the IL-7R. To elucidate the regulation by STAT5, we first analyzed the chromatin status of V γ region in primary thymocytes. The levels of histone H3 acetylation are high at V γ 5, HsA element and V γ 2 in Rag2^{-/-} thymocytes but low in IL-7R α -deficient early thymocytes, suggesting that IL-7R signaling controls the accessibility of the V γ region. In addition, high levels of histone H3 acetylation and germline transcription were induced at V γ 5 and HsA by cytokine and STAT5 in cytokine-dependent Ba/F3 and other hematopoietic cell lines. Importantly, the chromatin accessibility of V γ 5 gene is increased by cytokine signal. Furthermore, STAT5 was not recruited to a non-canonical STAT-binding motif in the endogenous chromatin of the V γ 5 promoter by cytokine stimulation in vivo, while STAT5 binds to a consensus motif in the HsA element. In accordance with this result, STAT5 does not directly activate the V γ 5 promoter by reporter assay. These results suggest that while STAT5 directly binds to HsA element and induces its histone acetylation, STAT5 indirectly activates the V γ 5 promoter. Thus, this study implies a potential role of STAT5 in accessibility control of the V γ region, especially at V γ 5 and HsA.

2) Pre-TCR signal silences the TCR γ locus by inhibiting the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers: S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The mouse TCR γ locus is controlled by transcription factors STAT5 and Runx. While the TCR γ locus is frequently rearranged, its transcription is repressed in $\alpha\beta$ T cells. This phenomenon, known as TCR γ silencing, depends on pre-TCR-induced proliferation of thymocytes. The molecular basis for the TCR γ silencing, however, is largely unknown. We showed that pre-TCR signal reduces the transcription and histone acetylation of the TCR γ locus irrespective of V-J rearrangements. We also demonstrated that Runx is recruited to the enhancer elements of the TCR γ locus, E γ and HsA, mainly at CD4⁺CD8⁻ double negative stage and that its binding is decreased at later stages. Importantly, anti-CD3 Ab treatment decreases the levels of IL-7R expression, STAT5 phosphorylation, and recruitment of STAT5 and Runx to E γ and HsA elements in RAG2-deficient thymocytes, suggesting that pre-TCR signal inhibits the binding of STAT5 and Runx to the enhancer elements. Furthermore, we observed that introduction of STAT5 or Runx expression vector induces the transcription of TCR γ genes in a DP cell line, DPK. Finally, we showed that the transcription of TCR γ genes is induced in $\alpha\beta$ T cells of Runx3 transgenic mice, suggesting that Runx3 has potential to counteract the TCR γ silencing in $\alpha\beta$ T cells *in vivo*. Thus, our results demonstrate that pre-TCR signal inactivates the TCR γ enhancers by inhibiting the recruitment of STAT5 and Runx and imply that this might be an important step for the TCR γ silencing in $\alpha\beta$ T cells.

3) STAT5 controls the rearrangement of TCR J γ gene segments through STAT-binding motifs in the J γ promoters: K. WAGATSUMA, B. LIANG, S. TANI-ICHI and K. IKUTA

We previously showed that STAT5 activated by IL-7 binds to STAT motifs in J γ promoters and increases histone acetylation, germline transcription and chromatin accessibility. However, it remains unclear whether the STAT motifs in the J γ promoters play a critical role in the rearrangements of the TCR γ locus *in vivo*. To address this issue, we generated two kinds of J γ 1 promoter mutant mice. One of them carries mutations in STAT motifs in the J γ 1 promoter (J γ 1P-Stat-mut), and the other has deleted the J γ 1 promoter including the STAT motifs (Δ J γ 1P). Flow cytometric analysis showed that V γ 2⁺ and V γ 5⁺ T cells of γ 1 cluster were severely decreased in the thymus and the small intestine of these mutant mice. In addition, dendritic epidermal T cells exclusively expressing V γ 3 were also reduced in these mice. In contrast, $\gamma\delta$ T cells expressing V γ 1.1 of γ 4 cluster were unchanged. Furthermore, V γ -J γ rearrangements were substantially impaired in the γ 1 cluster of these mice, while the rearrangements of other clusters were unchanged. These results demonstrate that recruitment of STAT5 to the STAT motifs in the J γ 1 promoter is essential for rearrangements of the TCR γ 1 cluster *in vivo*, and support the idea that STAT motifs controls local accessibility of the J γ gene segments.

4) IL-7R controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells: S. TANI-ICHI, A. ABE and K. IKUTA

The IL-7R is essential for differentiation and survival of T cells. We previously showed that IL-7R α -deficient mice have severely reduced numbers of $\alpha\beta$ T cells and completely lack $\gamma\delta$ T cells. However, the role of the IL-7R was not precisely determined in late stages of T cell development, because IL-7R α -deficient mice have profound detrimental effects on early thymocytes. To address this question, we established IL-7R α -floxed mice and crossed with CD4-Cre transgenic mice. In thymus, total cell numbers of CD4-Cre x IL-7R $\alpha^{\text{floxed/floxed}}$ mice were similar to control mice. Whereas differentiation of CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4 single positive (SP) cells and $\gamma\delta$ T cells were not affected, the numbers of mature CD8 SP cells were markedly reduced in CD4-Cre x IL-7R $\alpha^{\text{floxed/floxed}}$ thymus. In addition, the development of NKT cells and regulatory T cells were partially impaired in the thymus of CD4-Cre x IL-7R $\alpha^{\text{floxed/floxed}}$ mice. In periphery, although CD4-Cre x IL-7R $\alpha^{\text{floxed/floxed}}$ mice have comparable numbers of lymph nodes and Peyer's patches to control mice, there were a selective loss of CD4 and CD8 T cells and a selective gain of $\gamma\delta$ T cells. These data demonstrate that the IL-7R is essential for differentiation of CD8 T cells, NKT cells and regulatory T cells in thymus and maintenance of naive CD4 and CD8 T cells in periphery.

5) Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid tissues: T. HARA, S. SHITARA, G. CUI, S. TANI-ICHI and K. IKUTA

IL-7 is an essential cytokine for lymphocyte development and survival produced by mesenchymal and epithelial cells in lymphoid organs. However, little is known about the precise nature and distribution of IL-7-expressing cells in vivo. To address this question, we established IL-7-GFP knock-in mice. We found that the majority of thymic epithelial cells (TEC) express GFP in the cortex and medulla. A large number of cortical TEC express GFP at high levels, while most medullary TEC express GFP at low levels. Their expression levels decrease gradually with aging. In the lymph node paracortex, fibroblastic reticular cells (FRC) express GFP at intermediate levels. In addition, we detected high levels of GFP expression in lymphatic endothelial cells of lymph nodes, intestines, and skin. In the spleen, FRC scattered in the white pulp express GFP at low levels. Moreover, we found intermediate levels of GFP expression in the stromal cells lining the marginal zone and surrounding central arterioles. In the bone marrow, some VCAM-1⁺ stromal cells express GFP at high levels. In the colon, some epithelial cells express high levels of GFP. After induction of acute colitis with DSS, GFP expression was elevated in the intestinal epithelial cells. Thus, the IL-7-GFP knock-in mouse reveals unreported types of IL-7-expressing cells and provides a powerful tool to analyze the IL-7-niche in the lymphoid organs under physiological and pathological conditions.

6) Local function of IL-7 in vivo: T. HARA, B. LIANG, S. SHITARA, K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI and K. IKUTA

IL-7 is an essential cytokine for lymphocyte development and survival produced by epithelial and mesenchymal cells. However, little is known about the local function of IL-7 produced by each cell type in vivo. To address this question, we established IL-7-floxed mice and crossed with FoxN1-Cre Tg mice to obtain the conditional knockout (cKO) mice deficient in IL-7 production from TEC. FoxN1-Cre x IL-7^{flox/flox} mice showed 15-fold reduced numbers of thymocytes compared with control mice. In addition, $\gamma\delta$ T and NKT cells are similarly reduced. Interestingly, the reduction and phenotype are less severe than IL-7^{-/-} mice (50-fold reduction), suggesting the possibility that IL-7 produced by mesenchymal cells might play a minor role. In the spleen, the numbers of T cells are partially restored in the cKO mice, indicating homeostatic expansion in the periphery. Therefore, these results suggest that IL-7 produced from TEC plays a major role in proliferation and survival of thymocytes. Interestingly, $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes (IEL) of the small intestine were severely reduced in FoxN1-Cre x IL-7^{flox/flox} mice but not in villin-Cre x IL-7^{flox/flox} mice expressing Cre in intestinal epithelial cells. This result implies the thymic origin of $\gamma\delta$ IEL. Next, we crossed the IL7-floxed mice with albumin (Alb)-Cre Tg mice to obtain the cKO mice deficient in IL-7 production from hepatocytes. Alb-Cre x IL-7^{flox/flox} mice showed slightly reduced numbers of NKT cells in adult liver. In addition, B cell development is partially impaired in late fetal and neonatal liver of the cKO mice. These results suggest that IL-7 produced by hepatocyte plays a role in NKT cell maintenance and B cell development in the liver. Thus, this study revealed unknown functions of IL-7 produced from different cells in vivo.

7) ELISA kit system for detecting calreticulin in urine: M. UEDA

Calreticulin (CRT) is the protein that was found in bladder urothelial carcinoma cells. The amount of CRT in urine from patients of bladder urothelial carcinoma was more than that from other urogenital patients. These data were obtained from the immunoblot analyses with PVDF membrane (Kageyama et al. Clin Chem 2004). For diagnosis of urogenital cancer, we tried to construct the assay kit system by ELISA method with HRP. Five independently obtained monoclonal antibodies were used. The sensitivity of these systems was not efficient, and the effective assay kit system for CRT could not be obtained. The other monoclonal antibodies will be produced for this kit system.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES

LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R. L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. Essential role of interleukin-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.*, 184:4414–4422, 2010.

Tani-ichi, S., Lee, H.-C., Ye, S.-K., and Ikuta, K. Accessibility control of TCR V γ region by STAT5. *Int. Immunol.*, 22:693-703, 2010.

Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid organs. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 23, 2010.

Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K.: Molecular mechanism of TCR γ silencing. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 24, 2010.

Liang, B., Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Local function of IL-7 produced by thymic and epidermal epithelial cells. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 25, 2010.

Abe, A., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: IL-7 signal controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, August 25, 2010.

生田宏一：リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能。東北大学 GCOE セミナー、仙台、2 月 15 日、2010。

原崇裕、梁冰霏、生田宏一：IL-7 産生細胞の体内分布と局所機能。第 20 回 Kyoto T Cell Conference、京都、6 月 4 日、2010。

生田宏一：クロマチン構造変換による免疫系の多様性獲得機構。神戸膠原病研究会、神戸、10 月 22 日、2010。

生田宏一：リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能。三重大学医学研究科大学院セミナー、津、12 月 14 日、2010。

我妻慶祐、谷一靖江、生田宏一：STAT5 による TCR γ 遺伝子座の組換え制御機構。第 7 回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、12 月 10 日、2010。

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSE
LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

The research projects carried out in this group are studies on thioredoxin and thioredoxin-related proteins including thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)/thioredoxin interacting protein (Txnip)/ Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) and transmembrane thioredoxin-related protein (TMX). Molecular biology of these proteins is investigated, especially focusing on their important medical and biological aspects such as cancer suppression, as well as the regulation of metabolism and inflammation.

1) Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation: Z. CHEN, DA. LOPEZ-RAMOS, E. YOSHIHARA, Y. MAEDA, H. MASUTANI, K. SUGIE, M. MAEDA and J. YODOI

Although glucocorticoid (GC) is widely used for treating hematopoietic malignancies including adult T-cell leukemia (ATL), the mechanism by which leukemic cells become resistant to GC in the clinical course remains unclear. Using a series of T-cell lines infected with human T lymphotropic virus type-I (HTLV-I), the causative virus of ATL, we have dissected the transformation from interleukin (IL)-2-dependent to -independent growth stage. The transformation associates the loss of thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2), a tumor suppressor and regulator of lipid metabolism. Here we show that TBP-2 is responsible for GC-induced apoptosis in ATL cells. In the IL-2-dependent stage, dexamethasone induced TBP-2 expression and apoptosis, both of which were blocked by GC receptor (GR) antagonist RU486. Knockdown of TBP-2 consistently reduced the amount of GC-induced apoptosis. In IL-2-independent stage, however, expression of GR and TBP-2 was suppressed and GC failed to induce apoptosis. Forced expression of GR led the cells to mild sensitivity to GC, which was also accomplished by treatment with suberoylanilide hydroxamic acid, a TBP-2 inducer. A transfection experiment showed that TBP-2 expression induced apoptosis in IL-2-independent ATL cells. Thus, TBP-2 is likely to be one of the key molecules for GC-induced apoptosis and a potential target for treating the advanced stage of ATL.

2) Differential roles of Annexin A1 (ANXA1/lipocortin-1/lipomodulin) and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) in glucocorticoid signaling of HTLV-I-transformed T cells: Z. CHEN, E. YOSHIHARA, A. SON, Y. MATSUO, H. MASUTANI, K. SUGIE, M. MAEDA and J. YODOI

Glucocorticoid (GC) is widely used for therapeutic purposes in immunological and

hematological disorders. Annexin A1 (ANXA1/lipocortin-1/lipomodulin), a GC-inducible molecule, was regarded as a vital anti-inflammatory mediator of GC. Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP), a regulator of redox reactions, cell growth and lipid metabolism, was also reportedly induced by GC. HTLV-I infected T cells undergo the transition from the IL-2 dependent to IL-2 independent growth during the long-term culture in vitro. We found that these T cells responded to GC with growth arrest and apoptosis in the IL-2 dependent growth stage, whereas they failed to respond to GC after their growth had shifted into the IL-2 independent stage. Here we employed these T cell lines and studied the roles of ANXA1 and TBP-2 in mediating GC-induced apoptosis. In GC-sensitive T cells, ANXA1 expression was negligible and unaffected by GC treatment, whereas TBP-2 was expressed and induced by GC treatment. In GC-resistant T cells, however, ANXA1 was highly expressed regardless of GC treatment and promoted cellular proliferation. In contrast, TBP-2 expression was lost and could not mediate the GC-induced apoptosis. In conclusion, these results suggest that TBP-2, but not ANXA1, is directly involved in the switching of GC sensitivity and GC resistance in HTLV-I infected T cell lines, whereas ANXA1 may be a biomarker indicative of the advanced stage of the transformation.

3) Thioredoxin binding protein-2 mediates metabolic adaptation in response to lipopolysaccharide in vivo: S. OKA, W. LIU, E. YOSHIHARA, MK. AHSAN, DA. RAMOS, A. SON, H. OKUYAMA, L. ZHANG, H. MASUTANI, H. NAKAMURA and J. YODOI

Endotoxin triggers a reorganization of the energy metabolic pathway, including the promotion of fatty acid utilization to adapt to a high energy demand during endotoxemia. However, the factors responsible for the metabolic adaptation and characteristic pathologies resulting from defective utilization fatty acids during endotoxin response have not been fully clarified. The thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) knockout (TBP-2) mouse is an animal model of fatty acid oxidation disorder. The aim of this study was to determine whether and how TBP-2 is involved in metabolic regulation in a lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia model in mice. TBP-2 and wild control mice were intraperitoneally injected with LPS. Mortality, serum levels of markers of hepatorenal injuries, cytokines, insulin, glucose and lipid derivatives, and the hepatic signaling pathway regulating gluconeogenesis were investigated. Following the administration of LPS, TBP-2 mice showed a predisposition for death without any significant elevation of inflammatory cytokines, compared to the wild mice. LPS-challenged TBP-2 mice showed fat deposition in the liver and kidney, organ injuries, glycogen depletion, and elevation of serum lipid derivatives such as free fatty acids, triglyceride and cholesterol. Hyperinsulinemia and hypoglycemia were observed in TBP-2 mice after LPS injection. Death due to the LPS administration was prevented by supplementation of glucose. Phosphorylation of Akt and FoxO1, an inhibitory pathway of

gluconeogenesis in the liver of LPS-challenged TBP-2 mice was demonstrated, suggesting the enhancement of insulin signaling. TBP-2 is involved in metabolic control during LPS-induced endotoxemia. After the LPS challenge, TBP-2 mice showed several characteristic aspects, such as hepatorenal injuries, and dysregulation of the lipid and glucose metabolisms. Furthermore, hypoglycemia promoted by hyperinsulinemia may be a critical risk factor for mortality in circumstances in which fatty acid utilization is impaired during endotoxemia.

4) Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity: E. YOSHIHARA, S. FUJIMOTO, N. INAGAKI, K. OKAWA, S. MASAKI, J. YODOI and H. MASUTANI

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by defects in both insulin sensitivity and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and is often accompanied by obesity. In this study, we show that disruption of thioredoxin binding protein-2 (TBP-2, also called Txnip) in obese mice (ob/ob) dramatically improves hyperglycaemia and glucose intolerance, without affecting obesity or adipocytokine concentrations. TBP-2-deficient ob/ob mice exhibited enhanced insulin sensitivity with activated insulin receptor substrate-1/Akt signalling in skeletal muscle and GSIS in islets compared with ob/ob mice. The elevation of uncoupling protein-2 (UCP-2) expression in ob/ob islets was downregulated by TBP-2 deficiency. TBP-2 overexpression suppressed glucose-induced adenosine triphosphate production, Ca(2+) influx and GSIS. In β -cells, TBP-2 enhanced the expression level and transcriptional activity of UCP-2 by recruitment of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α to the UCP-2 promoter. Thus, TBP-2 is a key regulatory molecule of both insulin sensitivity and GSIS in diabetes, raising the possibility that inhibition of TBP-2 may be a novel therapeutic approach for T2DM.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSE

LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

Chen, Z., Lopez-Ramos, D.A., Yoshihara, E., Maeda, Y., Masutani, H., Sugie, K., Maeda, M., and Yodoi, J. Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation. *Leukemia*, 2010.

Chen, Z., Yoshihara, E., Son, A., Matsuo, Y., Masutani, H., Sugie, K., Maeda, M., and Yodoi, J. Differential roles of Annexin A1 (ANXA1/lipocortin-1/lipomodulin) and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) in glucocorticoid signaling of HTLV-I-transformed T cells. *Immunol Lett* 131, 11-18, 2010.

Kamimoto, Y., Sugiyama, T., Kihira, T., Zhang, L., Murabayashi, N., Umekawa, T., Nagao, K., Ma,

- N., Toyoda, N., Yodoi, J., and Sagawa, N. Transgenic mice overproducing human thioredoxin-1, an antioxidative and anti-apoptotic protein, prevents diabetic embryopathy. *Diabetologia* 53, 2046-2055, 2010.
- Kong, L., Zhou, X., Li, F., Yodoi, J., McGinnis, J., and Cao, W. Neuroprotective effect of overexpression of thioredoxin on photoreceptor degeneration in Tubby mice. *Neurobiol Dis* 38, 446-455, 2010.
- Luo, F.C., Wang, S.D., Li, K., Nakamura, H., Yodoi, J., and Bai, J. Panaxatriol saponins extracted from *Panax notoginseng* induces thioredoxin-1 and prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *J Ethnopharmacol* 127, 419-423, 2010.
- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L.A., Harris, J., Coll, R.C., Mills, K.H., Mok, K.H., Newsholme, P., Nunez, G., Yodoi, J., Kahn, S.E., Lavelle, E.C., and O'Neill, L.A. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11, 897-904, 2010.
- Mogami, H., Yura, S., Tatsumi, K., Fujii, T., Fujita, K., Kakui, K., Kondoh, E., Inoue, T., Fujii, S., Yodoi, J., and Konishi, I. Thioredoxin binding protein-2 inhibits excessive fetal hypoglycemia during maternal starvation by suppressing insulin secretion in mice. *Pediatr Res* 67, 138-143, 2010.
- Oka, S., Liu, W., Yoshihara, E., Ahsan, M.K., Ramos, D.A., Son, A., Okuyama, H., Zhang, L., Masutani, H., Nakamura, H., and Yodoi, J. Thioredoxin binding protein-2 mediates metabolic adaptation in response to lipopolysaccharide in vivo. *Crit Care Med* 38, 2345-2351, 2010.
- Torii, M., Wang, L., Ma, N., Saito, K., Hori, T., Sato-Ueshima, M., Koyama, Y., Nishikawa, H., Katayama, N., Mizoguchi, A., Shiku, H., Yodoi, J., Kuribayashi, K., and Kato, T. Thioredoxin suppresses airway inflammation independently of systemic Th1/Th2 immune modulation. *Eur J Immunol* 40, 787-796, 2010.
- Urata, Y., Goto, S., Kawakatsu, M., Yodoi, J., Eto, M., Akishita, M., and Kondo, T. DHEA attenuates PDGF-induced phenotypic proliferation of vascular smooth muscle A7r5 cells through redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 489-494, 2010.
- Watanabe, R., Nakamura, H., Masutani, H., and Yodoi, J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther* 127, 261-270, 2010.
- Yoshihara, E., Chen, Z., Matsuo, Y., Masutani, H., and Yodoi, J. Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling. *Methods Enzymol* 474, 67-82, 2010.
- Yoshihara, E., Fujimoto, S., Inagaki, N., Okawa, K., Masaki, S., Yodoi, J., and Masutani, H. Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity.

Chen Zhe、Dorys Lopez-Ramos、吉原栄治、前田裕弘、増谷 弘、杉江勝治、前田道之、淀井淳司：Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) is a potential prognostic and therapeutic target for Adult T-cell leukemia、第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月

Chen Zhe、吉原栄治、Dorys Lopez-Ramos、増谷 弘、杉江勝治、前田道之、淀井淳司：Differential roles of Annexin A1 (ANXA1/lipocortin-1/lipomodulin) and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) in glucocorticoid signaling of HTLV-I-transformed T cells、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月

増谷 弘、吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也：Thioredoxin Binding Protein-2/Txnip による糖尿病病態・Inflammasome 制御、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同学会ワークショップ《レドックスバランスと細胞機能》、神戸、2010年12月

松尾禎之、増谷弘、淀井淳司：炎症応答における膜貫通型チオレドキシシンファミリー分子 TMX の機能解析、第63回日本酸化ストレス学会学術集会、横浜、2010年6月

松尾禎之、Dorys Lopez、淀井淳司、増谷弘：Increased susceptibility to LPS-induced liver injury in mice deficient in the oxidoreductase TMX、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月

望月芳香、栄長裕晴、増谷弘：Thioredoxin regulates G1 phase via C-Raf/ERK pathway、第63回日本酸化ストレス学会学術集会、横浜、2010年6月

吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、淀井淳司、増谷弘：糖尿病モデルにおける TBP-2 の糖・脂質代謝制御機構、第53回日本糖尿病学会年次学術集会、岡山、2010年5月

吉原栄治：Thioredoxin binding protein-2 による膵 β 細胞のエネルギー代謝制御と糖尿病発症機構、第10回 islet Biology 研究会、東京、2010年7月

吉原栄治：糖尿病モデルにおける TBP-2 の糖・脂質代謝制御機構の解析、TK Diabetes Data Club、東京、2010年9月

吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、淀井淳司、増谷弘：Disruption of TBP-2/Txnip ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同学会、神戸、12月、2010年

吉原栄治：Thioredoxin binding protein-2 による膵 β 細胞のエネルギー代謝制御と糖尿病発症機構、第2回内分泌・代謝学セミナー 山口大学医学部、2010年12月

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY
LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

- 1) Genome-wide screening of the kinases required for the control of cell division axis: S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA¹, T. YAMAMOTO², E. NISHIDA³ and F. TOYOSHIMA** (¹ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, ²iCeMS, Kyoto University, ³Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Oriented cell division, which is determined by the axis of a mitotic spindle, plays an essential role in morphogenesis, asymmetric cell division and stem cell self-renewal. There is increasing evidence for the implication of spindle misorientation in mammalian diseases, including tumorigenesis and polycystic kidneys. However, the mechanisms regulating spindle orientation in mammals remain largely unknown. The reasons for this include the lack of established approaches in mammalian cells to survey the molecules required for the spindle orientation. We have utilized a simple approach for analyzing spindle orientation in human HeLa cells, in which the mitotic spindles are oriented parallel to the cell-substrate adhesion plane. We used a commercially available siRNA library, which targets 719 genes of human kinases and kinase-related molecules with three individual siRNAs per gene. In the first screening, we scored the spindle orientation of each metaphase cell in a 3-point scale and identified 31 genes as candidates. Then, 31 genes were subjected to the 2nd screening. In the 2nd screening, to quantify the spindle orientation, we measured the angle between the axis of the spindle and that of substratum in metaphase cells. We newly developed an image analyzing software, which automatically detects two poles of mitotic spindles from a series of Z stack images and calculate the spindle angle. We identified 5 genes that are required for the proper spindle orientation in HeLa cells. Inhibition of one of the kinases by the specific chemical inhibitors results in the spindle misorientation in both HeLa cells and in the epithelial cells in the mouse skin, suggesting that this kinase plays an essential role in the spindle orientation not only in the cultured cells but also in the mouse epithelium(submitted).

- 2) Roles of cholesterol in the progression of mitosis: M. HAMASAKI and F. TOYOSHIMA**

In this year, we have been investigating the roles of cholesterol in the progression of mitosis. We have found that depletion of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin, results in the increases of the proportion of the mitotic cells with multipolar spindles. Moreover, knockdown of squalene synthase, an enzyme essential for the de-novo synthesis of cholesterol, and/ or LDL receptors, also induced multipolar spindles. These results suggest that the cholesterol and/or its metabolites regulate the spindle formation during mitosis.

3) Regulation of the early endosomes during mitosis: K. IKAWA, S. MATSUMURA, ¹M. FUKUDA and F. TOYOSHIMA (1Department of Developmental Biology and Neurosciences, Tohoku University)

Early endosomes play central roles in endocytic trafficking. During mitosis, it is known that the fusion and recycling of early endosomes are suppressed. However, the regulatory mechanisms for the early endosomes during mitosis are poorly understood. We have found that one of the mitotic regulators controls early endosome by changing the activity of Rab family proteins, the regulator of early endosomes.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

Mitsushima, M., Aoki, K., Ebisuya, M., Matsumura, S., Yamamoto, T., Matsuda, M.,

Toyoshima, F., Nishida, E. Revolving movement of a dynamic cluster of actin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 191, 453-462, 2010.

濱崎眞弓、豊島文子：コレステロール代謝産物プレグネノロンは細胞分裂期の紡錘体形成を制御する。第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7-10 日

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY
LABORATORY OF GROWTH REGULATION

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 developmental processes such as neural development and somite formation. We are characterizing the functions of bHLH genes by misexpressing the genes with retrovirus and electroporation (gain-of-function study) and by generating knock-out mice (loss-of-function study). During neural development, the following steps occur sequentially: (1) maintenance of neural stem cells, (2) neurogenesis and (3) gliogenesis. Our results indicate that all three steps are regulated by bHLH genes. bHLH genes such as *Hes1* and *Hes5* regulate maintenance of neural stem cells and promotion of gliogenesis, while bHLH genes such as *Mash1* and *Math3* regulate specification of the neuronal fate. During somite formation, the bHLH genes *Hes1* and *Hes7* display oscillatory expression with periodicity of about two hours and regulate the timing of somite segmentation. By making and evaluating mathematical modeling, we are now studying how the dynamics of gene expression are controlled during somite formation.

Interestingly, new neurons are continuously born from neural stem cells in the adult brain, and it has been shown that this continuous neurogenesis is essential for many brain activities. We found that Notch signaling genes are highly expressed by adult neural stem cells, and that ablation of *Rbpj*, an essential Notch signaling mediator, leads to depletion of adult neural stem cells and the subsequent loss of adult neurogenesis. Thus, Notch signaling plays an essential role in maintenance of adult neural stem cells and continuation of adult neurogenesis, raising the possibility that Notch signaling genes are therapeutic targets for many brain disorders.

1) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains: I. IMAYOSHI, M. SAKAMOTO, M. YAMAGUCHI, K. MORI and R. KAGEYAMA

Activation of Notch signaling induces the expression of transcriptional repressor genes such as *Hes1*, leading to repression of proneural gene expression and maintenance of neural stem/progenitor cells. However, a requirement for Notch signaling in the telencephalon was not clear, because in *Hes1;Hes3;Hes5* triple-mutant mice, neural stem/progenitor cells are depleted in most regions of the developing central nervous system, but not in the telencephalon. Here, we investigated a role for Notch signaling in the telencephalon by generating tamoxifen-inducible conditional knock-out mice that lack *Rbpj*, an intracellular signal-mediator of all Notch receptors. When *Rbpj* was deleted in the embryonic brain, almost all telencephalic neural stem/progenitor cells prematurely differentiated into neurons and were depleted. When *Rbpj* was deleted in the

adult brain, all neural stem cells differentiated into transit-amplifying cells and neurons. As a result, neurogenesis increased transiently, but three months later all neural stem cells were depleted and neurogenesis was totally lost. These results indicated an absolute requirement of Notch signaling for the maintenance of neural stem cells and a proper control of neurogenesis in both embryonic and adult brains.

2) Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling: T. KOBAYASHI and R. KAGEYAMA

Embryonic stem (ES) cells display heterogeneous responses upon induction of differentiation. Recent analysis has shown that *Hes1* expression oscillates with a period of about 3-5 hours in mouse ES cells and that this oscillating expression contributes to the heterogeneous responses: Hes1-high ES cells are prone to the mesodermal fate while Hes1-low ES cells are prone to the neural fate. These outcomes of Hes1-high and Hes1-low ES cells are very similar to those of inactivation and activation of Notch signaling, respectively. These results suggest that Hes1 and Notch signaling lead to opposite outcomes in ES cell differentiation, although they work in the same direction in most other cell types. Here, we found that Hes1 acts as an inhibitor but not as an effector of Notch signaling in ES cell differentiation. Our results indicate that sustained *Hes1* expression delays the differentiation of ES cells and promotes the preference for the mesodermal rather than the neural fate by suppression of Notch signaling.

3) Zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain: T. SHIMIZU, M. NAKAZAWA, S. KANI, Y.-K. BAE, T. SHIMIZU, R. KAGEYAMA and M. HIBI

Precise control of neuronal differentiation is necessary for generation of a variety of neurons in the forebrain. However, little is known about transcriptional cascades, which initiate forebrain neurogenesis. Here we show that zinc finger genes *Fezf1* and *Fezf2*, which encode transcriptional repressors, are expressed in the early neural stem (progenitor) cells and control neurogenesis in mouse dorsal telencephalon. *Fezf1*- and *Fezf2*-deficient forebrains display upregulation of *Hes5* and downregulation of neurogenin 2, which is known to be negatively regulated by *Hes5*. We show that FEZF1 and FEZF2 bind to and directly repress the promoter activity of *Hes5*. In *Fezf1*- and *Fezf2*-deficient telencephalon, the differentiation of neural stem cells into early-born cortical neurons and intermediate progenitors is impaired. Loss of *Hes5* suppresses neurogenesis defects in *Fezf1*- and *Fezf2*-deficient telencephalon. Our findings reveal that *Fezf1* and *Fezf2* control differentiation of neural stem cells by repressing *Hes5* and, in turn, by derepressing neurogenin 2 in the forebrain.

4) Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells: T. INOUE, B. COLES, K. DORVAL, R. BREMNER, Y. BESSHO, R. KAGEYAMA, S. HINO, M. MATSUOKA, C. CRAFT, R. MCINNES, F. TEMBLAY, G. PRUSKY, Y. TANO and D. VAN DER KOOT

Retinal stem cells (RSCs) are present in the ciliary margin of the adult human eye and can give rise to all retinal cell types. Here we show that modulation of retinal transcription factor gene expression in human RSCs greatly enriches photoreceptor progeny, and that strong enrichment was obtained with the combined transduction of OTX2 and CRX together with the modulation of CHX10. When these genetically modified human RSC progeny are transplanted into mouse eyes, their retinal integration and differentiation is superior to unmodified RSC progeny. Moreover, electrophysiologic and behavioral tests show that these transplanted cells promote functional recovery in transducin mutant mice. This study suggests that gene modulation in human RSCs may provide a source of photoreceptor cells for the treatment of photoreceptor disease.

5) HES1 and HES5 are dispensable for cartilage and endochondral bone formation: C. KARLSSON, C. BRANTSING, R. KAGEYAMA and A. LINDAHL

Notch signalling, via its downstream mediators HES1 and HES5, regulates development of several different tissues. In vitro studies suggest that these genes are also involved in chondrogenesis and endochondral bone formation. In order to investigate the importance of HES1 and HES5 for these developmental processes, mice lacking chondrogenic expression of HES1 and HES5 were constructed by interbreeding HES5(-/-) mice homozygous for the floxed HES1 allele (HES1(flox/flox)) with COL2A1-Cre transgenic mice, creating conditional HES1;HES5 double mutant mice. The formation of cartilage and endochondral bone was studied in these mice using histological and immunohistochemical stainings, including Alcian Blue van Gieson, Safranin-O, modified Mallory Aniline Blue, tartrate-resistant acid phosphatase and collagen type II stainings. The mice were also studied using several different morphometrical analyses and the differentiation potential of the chondrocytes was evaluated in vitro. Unexpectedly, the conditional HES1;HES5 double mutant mice did not display impaired development of cartilage or endochondral bone. Lack of altered phenotype in the conditional HES1;HES5 double mutant mice can be explained either by the HES1 and HES5 genes not being involved in cartilage and endochondral bone development or by functional redundancy between the genes belonging to the family of HES genes: that is, disruption of one gene could be compensated for by the activity of another. Our results further shed light on the compensatory reserves available during the developing cartilage and bone.

LIST OF PUBLICATIONS
DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY
LABORATORY OF GROWTH REGULATION

- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. *J. Neurosci.* 30, 3489-3498. 2010.
- Kobayashi, T. and Kageyama, R. Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. *Genes to Cells* 15, 689-698. 2010.
- Kageyama, R., Niwa, Y., and Shimojo, H. Developmental timing and oscillating gene expression. *McGraw-Hill 2010 YearBook of Science & Technology*, pp102-104. 2010.
- Kobayashi, T. and Kageyama, R. Hes1 oscillation: making variable choices for stem cell differentiation. *Cell Cycle* 9, 207-208. 2010.
- Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., and Hibi, M. Zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. *Development* 137, 1875-1885. 2010.
- Inoue, T., Coles, B., Dorval, K., Bremner, R., Bessho, Y., Kageyama, R., Hino, S., Matsuoka, M., Craft, C., McInnes, R., Temblay, F., Prusky, G., Tano, Y., and van der Kooy, D. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. *Stem Cells* 28, 489-500. 2010.
- Karlsson, C., Brantsing, C., Kageyama, R., and Lindahl, A. HES1 and HES5 are dispensable for cartilage and endochondral bone formation. *Cells Tissue Organs* 192, 17-27. 2010.
- Kageyama, R., Niwa, Y., Shimojo, H., Kobayashi, T., and Ohtsuka, T. Ultradian oscillations in Notch signaling regulate dynamic biological events. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 311-331. 2010.
- González, A., and Kageyama, R. Automatic reconstruction of the mouse segmentation network from an experimental evidence database. *Byosystems* 102, 16-21. 2010.
- 今吉格、坂本雅行、影山龍一郎：成体脳ニューロン新生の分子メカニズムと機能的意義。実験医学、28:823-829. 2010.
- 小林妙子、影山龍一郎：幹細胞分化の運命決定に寄与するリズム現象。医学のあゆみ、235:953-954. 2010.

Kageyama R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neurogenesis, 18th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Lisbon, Portugal, 6月6日～6月9日 2010.

Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events, Meeting

on Inference and Modeling of Regulatory Networks in Multicellular Systems、横浜、6 月 11 日～6 月 12 日 2010.

Kageyama, R.: Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells、Cambridge Oncology Seminar、Cambridge, UK、6 月 15 日 2010.

Kageyama, R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、ENP Neural Stem Cell Meeting、Abbaye des Vaux de Cernay, France、6 月 17 日～6 月 19 日 2010.

Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events、7th iCeMS International Symposium、京都、6 月 24 日 2010.

Kageyama, R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、Perspectives of Stem Cells、Sao Paulo, Brazil、9 月 20 日～9 月 24 日 2010.

Kageyama, R.: The significance and mechanism of ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events、International Workshop on Timing and Dynamics in Biological Systems、Dresden, Germany、9 月 26 日～9 月 30 日 2010.

Kageyama, R.: Essential roles of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、Notch and Stem Cells、Athens, Greece、10 月 3 日～10 月 6 日 2010.

Imayoshi, I. and Kageyama, R.: Role of Notch-Hes signaling in adult neural stem cells、ENP Neural Stem Cell Meeting、Abbaye des Vaux de Cernay, France、6 月 17 日～6 月 19 日 2010.

Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and Kageyama R.: ESET regulates neural differentiation in the developing mouse brain、ENP Neural Stem Cell Meeting、Abbaye des Vaux de Cernay, France、6 月 17 日～6 月 19 日 2010.

Kobayashi, T.: Hes1 contributes to diverse differentiation responses of ES cells by regulating Notch signaling、Notch and Stem Cells、Athens, Greece、10 月 3 日～10 月 6 日 2010.

影山龍一郎:短周期遺伝子発現リズムと形態形成、第57回日本実験動物学会総会、京都、5 月 12 日、2010.

影山龍一郎:2時間リズムと生命現象、第5回リズム現象の研究会、東京、5月28日～5 月 29 日、2010.

影山龍一郎:2時間リズムと生命現象、第38回 Sleep Apnea カンファレンス、東京、5 月 29 日、2010.

影山龍一郎:成体脳の神経幹細胞とニューロン新生、第37回日本神経内分泌学会学術集会、京都、10 月 22 日～10 月 23 日、2010.

影山龍一郎:神経幹細胞における Notch シグナルの役割、大阪大学蛋白質研究所セミナー「神経科学と構造生物学の融合」、大阪、10 月 28 日～10 月 29 日、2010.

影山龍一郎:成体脳神経幹細胞における Notch-Hes 経路の役割、第9回成体脳のニューロン新生懇談会、東京、11 月 27 日、2010.

影山龍一郎:Oscillatory gene expression with ultradian rhythms in many biological events、BMB2010、神戸、12 月 7 日～12 月 10 日、2010.

影山龍一郎:Notch シグナルによる神経幹細胞制御、発達障害研究所公開セミナー「神経発生と脳の組織構築」、春日井 愛知、12月22日、2010.

小林妙子:振動遺伝子 Hes1 による ES 細胞の多様な分化応答、第2回細胞システムの動態と論理、和光 埼玉、4月8日～4月9日、2010.

小林妙子:転写因子 Hes1 の発現振動による ES 細胞の分化調節機構、第3回時空間ダイナミクスの定量生物学年会、東京、11月26日～11月28日、2010.

Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and R Kageyama R: Dual role of ESET in regulating neural differentiation and repressing ERV emergence in the developing mouse brain、BMB2010、神戸、12月7日～12月10日、2010.

下條博美:神経発生における遺伝子発現モードによる神経分化制御機構の解明、第2回細胞システムの動態と論理、和光 埼玉、4月8日～4月9日、2010.

Takashima Y, Ohtsuka T, Miyachi H, and Kageyama R: Intronic delay is essential for Oscillatory expression in the segmentation clock、第43回日本発生生物学会年会、京都、6月20日～6月23日、2010.

小林妙子、影山龍一郎:振動遺伝子 Hes1 は Notch シグナル制御を介して ES 細胞の多様な分化応答に寄与する、第33回日本神経科学大会、神戸、9月2日～9月4日、2010.

今吉格、坂本雅行、影山龍一郎:成体脳神経幹細胞における Hes1 は NotchHes シグナルの役割、第33回日本神経科学大会、神戸、9月2日～9月4日、2010.

坂本雅行:副嗅球に組み込まれる成体脳新生ニューロンの解析、第33回日本神経科学大会、神戸、9月2日～9月4日、2010.

Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and R Kageyama R: Dual role of ESET in regulating neural differentiation and repressing ERV emergence in the developing mouse brain、BMB2010、神戸、12月7日～12月10日、2010.

Kobayashi, T.: Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling、BMB2010、神戸、12月7日～12月10日、2010.

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY
LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

- 1) Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines: R. YOSHIKAWA, E. SATO, T. IGARASHI¹ and T. MIYAZAWA** (¹Laboratory of Primate Model, IVR)

All domestic cats have a replication-competent endogenous retrovirus, termed RD-114 virus, in their genome and several feline cell lines produce RD-114 viruses. Recently, we found that a portion of live attenuated feline and canine vaccines produced using feline cell lines was contaminated with infectious RD-114 viruses (Miyazawa *et al.*, (2010) J. Virol.). We determined the entire nucleotide sequences of RD-114-related viruses isolated from CRFK cells and a vaccine manufactured using CRFK cells. These RD-114-related viruses were nearly identical to the authentic RD-114 virus (Yoshikawa *et al.*, (2010) J. Clin. Microbiol.). In this study, we expanded our survey and examined canine vaccines produced using 'non-feline' cell lines. Consequently, we found two vaccines containing RD-114 viral RNA by reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) and real-time RT-PCR. We also confirmed the presence of infectious RD-114 virus in the vaccines by the LacZ marker rescue assay and PCR to detect proviral DNA in TE671 cells (human rhabdomyosarcoma cells) inoculated with the vaccines. It is impossible to investigate the definitive cause of contamination with RD-114 virus; however, we suspect that a seed canine parvovirus type 2 was contaminated with RD-114 virus, because many canine parvoviruses have been isolated and attenuated using feline cell lines. To exclude RD-114 virus from live attenuated vaccines, we must pay attention to the contamination of seed viruses with RD-114 virus in addition to avoiding feline cell lines producing RD-114 virus when manufacturing vaccines.

- 2) Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines: M. OKADA, R. YOSHIKAWA, T. SHOJIMA, K. BABA and T. MIYAZAWA**

RD-114 virus is a replication-competent feline endogenous retrovirus that has been classified as a xenotropic virus. In this study, we examined the expression of the receptors for RD-114 virus in feline cell lines by conducting a pseudotype virus infection assay. Six out of eight feline cell lines were susceptible to the RD-114 pseudotype virus and two cell lines (MCC and FER cells) were resistant. The two resistant cell lines and one cell line (CRFK cells) weakly sensitive to the RD-114 pseudotype virus were found to produce replication-competent RD114-like viruses by the LacZ marker rescue assay and the interference assay. These data strongly suggest that RD-114 virus is polytropic and resistance to RD-114 virus in certain cell lines is due to receptor interference

but not polymorphism of the RD-114 receptors. In addition, we determined the amino acid sequences of the envelope region of RD-114-like viruses produced from MCC, FER and CRFK cells. The sequences were identical with the authentic RD-114 virus. Because many feline cell lines are used to manufacture live attenuated vaccines for companion animals, attention should be paid to contamination of the RD-114 virus in vaccines.

3) Identification of novel endogenous betaretroviruses which are transcribed in the bovine placenta: K. BABA, Y. NAKAYA, T. SHOJIMA, Y. MUROI¹, K. KIZAKI², K. HASHIZUME², K. IMAKAWA¹ and T. MIYAZAWA (¹Laboratory of Animal Breeding, the University of Tokyo and ²Laboratory of Veterinary Physiology, Iwate University)

Sequences of retroviral origin occupy approximately 10% of mammalian genomes. Various infectious endogenous retroviruses (ERVs) and functional retroviral elements have been reported for several mammals but not cattle. Here, we identified two proviruses, designated bovine endogenous retrovirus K1 (BERV-K1) and BERV-K2, containing full-length envelope (*env*) genes in the bovine genome. Phylogenetic analysis revealed that they belong to the genus Betaretrovirus. By reverse transcription (RT)-PCR, both BERV-K1 and -K2 *env* mRNAs were detected in the placenta and cultured bovine trophoblast cells. Real-time RT-PCR analysis using RNAs isolated from various bovine tissues revealed that BERV-K1 *env* mRNA was preferentially expressed in the placenta. Moreover, we also found the expression of doubly spliced transcripts, named the REBK1 and REBK2 genes. Both the REBK1 and REBK2 proteins have motifs for a putative nuclear localization signal and a nuclear export signal. REBK1 and REBK2 fused with green fluorescent proteins were localized mainly in the nuclei when they were expressed in bovine and porcine cells. In the *env* and 3' long terminal repeats of BERV-K1 and -K2, we found regulatory elements responsible for the splicing and transport of viral RNAs and/or translation of the *env* genes. Although we have not identified the expressed Env proteins in bovine tissues, these data suggest that both BERV-K1 and BERV-K2 express Env proteins and that these proteins may have physiological functions in vivo.

4) An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV: E. SATO, R.A. FURUTA¹ and T. MIYAZAWA (¹Japanese Red Cross Osaka Blood Center)

During pilot studies to investigate the presence of viral RNA of xenotropic murine leukemia virus (MLV)-related virus (XMRV) infection in sera from chronic fatigue syndrome (CFS) patients in Japan, a positive band was frequently detected at the expected product size in

negative control samples when detecting a partial gag region of XMRV using a one-step RT-PCR kit. We suspected that the kit itself might have been contaminated with small traces of endogenous MLV genome or XMRV and attempted to evaluate the quality of the kit in two independent laboratories. We purchased four one-step RT-PCR kits from four manufacturers in Japan. To amplify the partial gag gene of XMRV or other MLV-related viruses, primer sets (419F and 1154R, and GAG-I-F and GAG-I-R) which have been widely used in XMRV studies were employed. The nucleotide sequences of the amplicons were determined and compared with deposited sequences of a polytropic endogenous MLV (PmERV), XMRV and endogenous MLV-related viruses derived from CFS patients. We found that the enzyme mixtures of the one-step RT-PCR kit from one manufacturer were contaminated with RNA derived from PmERV. The nucleotide sequence of a partial gag region of the contaminant amplified by RT-PCR was nearly identical (99.4% identity) to a PmERV on chromosome 7 and highly similar (96.9 to 97.6%) to recently identified MLV-like viruses derived from CFS patients. We also determined the nucleotide sequence of a partial *env* region of the contaminant and found that it was almost identical (99.6%) to the PmERV. In the investigation of XMRV infection in patients of CFS and prostate cancer, researchers should prudently evaluate the test kits for the presence of endogenous MLV as well as XMRV genomes prior to PCR and RT-PCR tests.

5) Adaptation of feline immunodeficiency virus subtype B strain TM2 to a feline astrocyte cell line (G355-5 cells): M. ISHIKAWA, K. BABA, M. SHIMOJIMA¹, M. OKADA, T. SHOJIMA, T. MIURA² and T. MIYAZAWA (¹Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, The University of Tokyo and ²Laboratory of Primate Model, IVR)

Based on receptor usage during infection, feline immunodeficiency virus (FIV) isolates can be divided into two groups; those that require feline CD134 (fCD134) as a primary receptor in addition to CXCR4 to enter the cells, and those that require CXCR4 only. Most primary isolates, including strain TM2, belong to the former group and cannot infect a feline astrocyte cell line (G355-5 cells) due to a lack of fCD134 expression. In a previous study, we found that G355-5 cells transduced with fCD134 (termed G355-5/fOX40 cells) were susceptible to strain TM2 and the inoculated cells became persistently infected. In this study, we examined the phenotype of the virus prepared from the persistently infected cells (termed strain TM2PI). Intriguingly, strain TM2PI replicated well in naïve G355-5 cells and the inoculated G355-5 cells (termed G355-5/TM2PI cells) became persistently infected. The infection of TM2PI in G355-5 cells was inhibited by CXCR4 antagonist AMD3100 and TM2PI infected other fCD134-negative, CXCR4-positive cell lines, FeTJ and 3201 cells. Four amino acid substitutions were found in the Env protein of the strain TM2PI when compared with that of the parental strain TM2. Among the substitutions, the Env amino acid

position at 407 of TM2PI was substituted to lysine which has been known to be responsible for the FIV tropism for Crandell feline kidney cells. The strain TM2PI will be useful for studying the receptor switching mechanism and FIV pathogenesis in cats.

LIST OF PUBLICATIONS

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

- Nakaya, Y., Shojima, T., Yasuda, J. and Miyazawa, T. Unusual permeability of porcine endogenous retrovirus subgroup A through membrane filters. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 67-71, 2010.
- Nakaya, Y., Shojima, T., Hoshino, S. and Miyazawa, T. Focus assay on FeLIX-dependent feline leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 117-121, 2010.
- Miyazawa, T., Yoshikawa, R., Golder, M., Okada, M., Stewart, H. and Palmarini, M. Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets. *J. Virol.* 84, 3690-3694, 2010.
- Yamamoto, A., Kobayashi, C., Yamashita, S., Miyazawa, T., Okabe, M., Fukuzawa, M. and Miyagawa, S. Expression of complement regulatory protein on porcine endogenous retrovirus (PERV) depends on molecular size. *Transpl. Immunol.* 23, 71-76, 2010.
- Nakamura, M., Sato, E., Miura, T., Baba, K., Shimoda, T. and Miyazawa, T. Differential diagnosis of feline leukemia virus subgroups using pseudotype viruses expressing green fluorescent protein. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 787-790, 2010.
- Miyazawa, T. Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines. *Biologicals* 38, 371-376, 2010.
- Yoshikawa, R., Sato, E., Igarashi, T. and Miyazawa, T. Characterization of RD-114 virus isolated from a commercial canine vaccine manufactured using CRFK cells. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3366-3369, 2010.
- Sato, E., Furuta, R.A. and Miyazawa, T. An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology* 7, 110, 2010.
- Miyazawa, T., Shojima, T., Yoshikawa, R. and Ohata, T. Isolation of koala retroviruses from koalas in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2010 Aug 25. [Epub ahead of print]
- Nakaya, Y., Shojima, T., Yasuda, J., Imakawa, K. and Miyazawa, T. Epigenetic regulation on the 5'-proximal CpG island of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B. *Microbes Infect.* 2010 Oct 14. [Epub ahead of print]
- Okada, M., Yoshikawa, R., Shojima, T., Baba, K. and Miyazawa, T. Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines. *Virus Res.* 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

- Baba, K., Nakaya, Y., Shojima, T., Muroi, Y., Kizaki, K., Hashizume, K., Imakawa, K. and Miyazawa, T. Identification of novel endogenous betaretroviruses which are transcribed in the bovine placenta. J. Virol. 2010 Nov 17. [Epub ahead of print]
- Sassa, Y., Yamamoto, H., Mochizuki, M., Umemura, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Miyazawa, T. Successive deaths of a captive snow leopard (*Uncia uncia*) and a serval (*Leptailurus serval*) by infection with feline panleukopenia virus at Sapporo Maruyama Zoo. J. Vet. Med. Sci. 2010 Nov 24. [Epub ahead of print]
- Ishikawa, M., Baba, K., Shimojima, M., Okada, M., Shojima, T., Miura, T. and Miyazawa, T. Adaptation of feline immunodeficiency virus subtype B strain TM2 to a feline astrocyte cell line (G355-5 cells). Vet. Microbiol. 2010 Nov 25. [Epub ahead of print]
- Yoshikawa, R., Sato, E. and Miyazawa, T. Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. Biologicals 2010 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 宮沢孝幸 動物用生ワクチン中に混入するRD114ウイルス NJK（日本獣医師回覧板）第10巻 第4号 pp18-23 2010.
- 宮沢孝幸 動物用生ワクチンに混入する感染性レトロウイルス JSAVBR（動物用ワクチンバイオ医薬品研究会）NEWS letter 第2巻 pp19-21 2010.
-

- Nakaya, Y., Baba, K., Shojima, T. and Miyazawa, T.: Endogenous retroviruses expressed in bovine placenta. The 8th International Student Seminar, Kyoto, March 3-6, 2010.
- Fukuma, A., Abe, M., Morikawa, Y., Miyazawa, T. and Yasuda, J.: Cellular and viral factors regulate the budding of feline endogenous retrovirus. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Retroviruses”, Cold Spring Harbour, New York, USA, May 24-29, 2010.
- Abe, M., Fukuma, A., Miyazawa, T. and Yasuda, J.: Inhibition of the budding/release of porcine endogenous retrovirus. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Retroviruses”, Cold Spring Harbour, New York, USA, May 24-29, 2010.
- Miyazawa T.: Potential risk of iatrogenic infection by endogenous retroviruses (ERVs): an infectious ERV contaminates some live vaccines for pets. The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institutes Network, Kanazawa, June 24-25, 2010.
- Miyazawa T.: Risk of iatrogenic infection by endogenous retroviruses. The 17th East Asian Joint and 9th Cross-Strait Symposium on Biomedical Research, Taiwan, July 1-2, 2010.
- Nakaya, Y., Koshi, K., Kizaki, K., Baba, K., Imakawa, K., Hashizume, K. and Miyazawa T.: Functional characterizations and expressional profiles of bovine endogenous retrovirus K envelope proteins. The 22nd Workshop on Retroviral Pathogenesis, California, USA, November 17-21, 2010.
- 仲屋友喜、宮沢孝幸：ブタ内在性レトロウイルス受容体の転写制御 第13回日本異種移植

研究会、東京、2010年3月14日

宮沢孝幸：内在性レトロウイルスと胎盤形成 第13回日本レトロウイルス研究会、愛知、
2010年8月31日－9月1日

吉川祿助、佐藤英次、宮沢孝幸：イヌパルボウイルス分離株への RD-114 ウイルスの混入
第150回日本獣医学会学術集会、帯広、2010年9月16日－18日

吉川祿助、下島昌幸、前田 健、宮沢孝幸：RD-114 ウイルスのイヌへの感染性第150回日
本獣医学会学術集会、帯広、2010年9月16日－18日

仲屋友喜、星野重樹、庄嶋貴之、安田二郎、宮沢孝幸：ブタ内在性レトロウイルスサブグ
ループBのエンペロープタンパク質に対する単クローン抗体の作製 第150回日本獣
医学会学術集会、帯広、2010年9月16日－18日

宮沢孝幸、吉川祿助、佐藤英次：感染性ネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) の
生ワクチンへの迷入 第2回動物用ワクチン－バイオ医薬品研究会シンポジウム、
帯広、2010年9月18日

星野重樹、大畑拓司、庄嶋貴之、宮沢孝幸：コアラ内在性レトロウイルスの解析 第58回
日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日－9日

吉川祿助、下島昌幸、前田 健、宮沢孝幸：ネコ内在性レトロウイルスの異種感染 第58
回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日－9日

仲屋友喜、越 勝男、木崎景一郎、馬場健司、今川和彦、橋爪一善、宮沢孝幸：ウシ内在
性レトロウイルスのエンペロープタンパク質の発現と機能解析 第58回日本ウイル
ス学会学術集会、徳島、2010年11月7日－9日

佐藤英次、古田里佳、倉恒弘彦、庄嶋貴之、中富康仁、保井一太、宮沢孝幸：慢性疲労症
候群患者血液における xenotropic murine leukemia virus-related virus の核酸調査 第58
回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日－9日

古田里佳、杉山武毅、宮沢孝幸、佐藤英次、倉恒宏彦、中富康仁、保井一太、平山文也：
Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) 抗体特異性の解析 第58回日本
ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7日－9日

福岡藍子、阿部真澄、宮沢孝幸、森川裕子、安田二郎：ネコ Tetherin/BST-2 による RD-114
ウイルスの産生制御 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月
7日－9日

宮沢孝幸、吉川祿助、佐藤英次：感染性ネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) の
生ワクチンへの迷入 動物用ワクチン－バイオ医薬品研究会シンポジウム、東京、2
010年11月7日－9日

仲屋友喜：胎盤形成過程におけるウシ内在性レトロウイルスの役割 第7回 京都大学ウ
イルス研究所学術交流会、京都、2010年12月10日

宮沢孝幸：胎盤で機能しうる内在性レトロウイルスの in silico 探索と機能評価 平成22
年度 北海道大学 遺伝子病制御研究所 共同研究集会 「感染・炎症・発癌」、札
幌、2010年12月20日－21日

CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH
LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

A long standing goal of our research group is to elucidate the molecular mechanisms of viral infection and pathogenesis. We have been focusing on human viruses, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and Epstein-Barr virus (EBV).

1) Molecular analysis on interaction of HIV-1 protein and host restriction factor: T. KOBAYASHI, K. SATO, Y. SUZUKI, S. YAMAMOTO, P. GEE, T. WATANABE, A. TSUMURA, N. MISAWA, H. EBINA and Y. KOYANAGI

Tetherin, also known as BST-2/CD317/HM1.24, is an antiviral cellular protein that inhibits the release of HIV-1 particles from infected cells. HIV-1 viral protein U (Vpu) is a specific antagonist of human tetherin that might contribute to the high virulence of HIV-1. We recently found that three amino acid (AA) residues (I34, L37, and L41) in the transmembrane (TM) domain of human tetherin are critical for the interaction with Vpu by using a live cell based assay. We also found that conservation of an additional AA at position 45 and two residues downstream of position 22, absent in monkey tetherins, are required for the antagonism by Vpu. Moreover, computer-assisted structural modeling and mutagenesis studies suggest that an alignment of these four AA residues (I34, L37, L41, and T45) on the same helical face in the TM domain is crucial for the Vpu-mediated antagonism of human tetherin. These results contribute to the molecular understanding of human tetherin specific antagonism by HIV-1 Vpu.

We are also attempting to identify HIV-associated host factors using a variety of genetics- and protein chemistry-based methods. Candidates of the HIV-associated host factor under investigation are cytokines, signal molecules, and membrane proteins.

2) Viral pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA, T. KOBAYASHI and Y. KOYANAGI

Studies on viral infection in a small animal model that can support both *de novo* human hematopoiesis and systemic viral infection can greatly contribute to the understanding on the pathogenesis. We generated NOG-hCD34 mice by transplanting newborn NOD/SCID/IL2R γ^{null} mice with hCD34⁺ cells via hepatic injection. EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) is a rare yet devastating disorder caused by EBV infection in humans. However, the mechanism of this disease has yet to be elucidated due to a lack of appropriate animal models. We reproduced pathological conditions resembling EBV-HLH in humans using NOG-hCD34 mice. By 10 weeks postinfection, two thirds of the infected mice died after exhibiting high and persistent

viremia, leukocytosis, IFN- γ cytokinemia, normocytic anemia, and thrombocytopenia. EBV-infected mice also showed systemic organ infiltration by activated CD8⁺ T cells and prominent hemophagocytosis in bone marrow, spleen, and liver. Notably, the level of EBV load in plasma correlated directly with both the activation frequency of CD8⁺ T cells and the level of IFN- γ in plasma. Moreover, high levels of EBER1 were detected in plasma of infected mice, reflecting what has been observed in patients. These findings suggest that our EBV infection model mirrors virological, hematological, and immunopathological aspects of EBV-HLH. Furthermore, in contrast to CD8⁺ T cells, we found a significant decrease of NK cells, MDCs, and PDCs in spleen of infected mice, suggesting that the collapse of balanced immunity associates with the progression of EBV-HLH pathogenesis.

3) HIV integration and its latency: H. EBINA, Y. KANEMURA and Y. KOYANAGI

Retroelements, such as non LTR-retrotransposon, LTR-retrotransposon and retrovirus, have ability to insert reverse transcribed cDNA into the host chromosome in the replication cycle. Among the retroelements, retrovirus family possesses an efficient DNA-fragment incorporation machinery by acquirement of integrase which catalyzes viral cDNA into chromosome DNA. Because the cDNA integration is essential for the viral replication, the integrase-targeted anti-viral drugs have been created and the clinical investigation of the treated AIDS patients showed significant outcome to reduce viral load after initiation of the drug administration. However, it is well known the non LTR-retrotransposon family of retroelements can insert its genome into the host chromosome through integrase independent machinery such as DNA repair system of non-homologous end joining and/or homologous recombination pathway. It appears that exogenous DNAs have a potential to integrate into the host chromosome. Therefore, we hypothesized that HIV cDNA, which is imported into the nucleus under integrase-depleted condition, can be inserted into host chromosome. To verify this, we prepared the VSV pseudotype lentiviral vector lacking integrase activity with D64V mutation and analyzed the efficiency. As the results, very low efficiency of the cDNA integration, only 0.2% of the event compared to that of wild type integrase vector, could be detected in D64V-infected cells. However, the cDNA insertion of the D64V mutant was clearly increased after treatment with dsDNA break agent before viral infection. Similarly, cDNA integration event and HIV-1 production of WT HIV-1 in the presence of integrase inhibitor could be restored by pre-treatment of target cells with the dsDNA break agent. These results suggest that retroviral cDNA is inserted into the host chromosome through host DNA repair pathway aside from integrase dependent pathway. Furthermore, we found that the HIV-1 provirus generated through integrase independent pathway has a potential to produce progeny viruses.

4) Mechanism of Herpes virus neuropathogenesis: P. GEE, T. WATANABE and Y. KOYANAGI

HSV-1 is a causative agent for fatal encephalitis in human. We generated a HSV-1 encephalitis-survivor model. When a GFP-expressing HSV-1 was inoculated into brain of infant rat, we found that some HSV-1-injected rats (27%; designated as severe) died within 48 hour after showing symptoms of quadriplegia or seizure or some injected rats (22%; designated as mild) died around 72 hour after showing weight loss or paresis. In the brain tissues, we found vast hemorrhagic necrotic damages and largely disseminated GFP⁺ region. We detected many GFP⁺ cells, which were confirmed as HSV-1⁺ cells by staining with anti-HSV antibody along with extensive cell infiltration of CD3⁺ T cells and CD68⁺ macrophages, indicating massive dissemination of HSV-1 in brain. However, the other HSV-1-inoculated rats survived after showing the transient mild symptoms such as weight loss or paresis but not quadriplegia or seizure. In the brain tissue taken from recover-rats 36 hour after disappearing paralysis, we found focal neuronal tissue damages along with a small number of cell infiltration of CD3⁺ T cells and CD68⁺ macrophages in parenchyma and a fewer GFP⁺ cells in the brain of the recover-rats compared with the number of GFP⁺ cells in the brain of severe rats. These data indicated that limited but obvious HSV-1 infection occurred in brain of the recover-rats. To find novel host factors that function against HSV-1 infection in brain tissue, we used microarray analysis of messenger RNA comparing that of the recover-rat and the mock-infected brains. Some neuron-specific factors have been found.

LIST OF PUBLICATIONS

CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

- Sato K., Nie C., Misawa N., Tanaka Y., Ito M., Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. Vaccine, 28S2:B32-37, 2010.
- Inaba K., Fukazawa Y., Matsuda K., Himeno A., Matsuyama M., Ibuki K., Miura Y., Koyanagi Y., Nakajima A., Blumberg R.S., Takahashi H., Hayami M., Igarashi T., Miura T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in simian/human immunodeficiency virus KS661-infected rhesus macaques in the presence of low viral load. J. Gen. Virol. 91,773-781, 2010.
- Urano E., Ichikawa R., Morikawa Y., Yoshida T., Koyanagi Y., Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. Vaccine, 28S2, B68-74, 2010.
- Suzuki Y., Ogawa K., Koyanagi Y., Suzuki Y. Functional disruption of the moloney murine

leukemia virus preintegration complex by vaccinia-related kinases. *J. Biol. Chem.* 285, 24032-43, 2010.

Hoshino S., Konishi M., Mori M., Shimura M., Nishitani C., Kuroki Y., Koyanagi Y., Kano S., Itabe

H., Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukoc. Biol.* 87, 1133-1143, 2010.

Sato K., Izumi T., Misawa N., Kobayashi T., Yamashita Y., Ohmichi M., Ito M., Takaori-Kondo A.,

Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84, 9546-9556, 2010.

Izumi T., Io K., Matsui M., Shirakawa K., Shinohara M., Nagai Y., Kawahara M., Kobayashi M., Kondoh H., Misawa N., Koyanagi Y., Uchiyama T. and Takaori-Kondo A. HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 20798-20803, 2010.

佐藤 佳、小柳義夫 HIV-1 のウイルス-宿主相互作用と新規治療薬の開発 実験医学 第 28 号 第 18 号 pp2961-2968 2010.

小柳義夫、渡部匡史 HIV 増殖機構と抗 HIV 薬の作用機序 日本臨床 第 68 号第 3 号 pp378-381 2010.

小柳義夫：EBV 活動性感染モデルマウス。北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染と癌」2010 年 1 月 18 日-19 日

Sato K., and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st International Young Investigator Symposium, Kumamoto, Japan, 2010 年 3 月 4 日-5 日

Sato K., Izumi T., Misawa N., Ito M., Takaori-Kondo A. and Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hypermutation in vivo by Apobec3 proteins. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010 年 5 月 24 日-29 日

Yamamoto S.P., Okawa K., Masuda T., Morikawa Y., Koyanagi, Y. and Suzuki Y. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor, Huw1. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010 年 5 月 24 日-29 日

Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P., Ebina H. and Koyanagi Y. Characterization of species-specific interaction between Bst-2 transmembrane domain and HIV-1 Vpu in lipid bilayers of living cells. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010 年 5 月 24 日-29 日

Sato K. A novel animal model for active EBV infection in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010 年 7 月 1 日-2 日

- Kobayashi T., Ode H., Sato H., Koyanagi Y. HIV-1 Vpu counteracts the antiviral factor tetherin/BST-2 by binding it in lipid bilayer. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010 年 7 月 1 日-2 日
- Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010 年 8 月 22 日-27 日
- Iwami S., Sato K., Misawa N., Kobayashi T., de Boer R.J. and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd Synthetic Immunology Workshop, Kyoto, Japan, 2010 年 12 月 8 日
- Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P. Ebina H. and Koyanagi Y. Live cell-based mutagenesis studies reveals the structural insights for human tetherin recognition by HIV-1 Vpu. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2010 年 10 月 6 日-8 日
- 小柳義夫 HIV 増殖制御宿主因子：BST-2 の機能と構造，第 12 回白馬シンポジウム，徳島，2010 年 5 月 14 日-15 日
- Sato K., Misawa N., Nie C., Takahashi R., Ito M., Kuzushima K., Takada K. and Koyanagi Y. T cell and cytokine responses determine the fate of humanized mice with active Epstein-Barr virus infection, 第 7 回 EBV 研究会，札幌，2010 年 7 月 9 日
- Sato K., Izumi T., Misawa N., Kobayashi T., Ito M., Takaori-Kondo A. and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム，淡路島，2010 年 9 月 7 日-10 日
- 佐藤佳，岩見真吾，三沢尚子，伊藤守，小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -動物実験-，第 20 回日本数理生物学会大会，札幌，2010 年 9 月 13 日-16 日
- 岩見真吾，佐藤佳，Rob J. de Boer，小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -数理モデル-，第 20 回日本数理生物学会大会，札幌，2010 年 9 月 13 日-16 日
- 佐藤佳，三沢尚子，Chuanyi Nie，佐藤賢文，松岡雅雄，高橋玲，伊藤守，高田賢蔵，小柳義夫. ヒト化マウスを用いた EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立，第 58 回日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010 年 11 月 7 日-9 日
- 小柳義夫、小林朋子 HIV のアクセサリ蛋白質 Vpu とその阻害蛋白テザリン、第 58 回日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010 年 11 月 7 日-9 日
- 小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、山元誠司、蝦名博貴、小柳義夫 HIV-1 Vpu 相互作用に必須な tetherin/Bst-2 膜貫通領域アミノ酸の同定，第 58 回日本ウイルス学会

学術集会，徳島，2010 年 11 月 7 日-9 日

蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、津村斐子、小柳義夫 HIV cDNA のインテグラーゼ非依存性組込みとウイルス複製 第 58 回日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010 年 11 月 7 日-9 日

小林朋子、大出裕高、佐藤佳，Gee Peter、山元誠司、蝦名博貴、佐藤裕徳、小柳義夫 Human tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第

24 回日本エイズ学会学術集会，東京，2010 年 11 月 24 日-26 日

Sato K, Koyanagi Y, Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第 24 回日本エイズ学会学術集会，東京，2010 年 11 月 24 日-26 日

Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S., Ebina H. and Koyanagi Y. Identification of

amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第 33 回日本分子生物学会年会，神戸，2010 年 12 月 7 日-10 日

蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、津村斐子、小柳義夫 細胞内 DNA 修復システムによるレトロウイルス cDNA 組込み機能の代償 第 33 回日本分子生物学会年会，神戸，2010 年 12 月 7 日-10 日

小柳義夫 個体内における抗 HIV-1 因子 APOBEC3 による遺伝子変異 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 「感染、炎症、発癌」2010 年 12 月 20-21 日

**CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH
LABORATORY OF VIRUS CONTROL**

- 1) Analyses of *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* gene in the pathogenesis of HTLV-1: J. YASUNAGA, Y. SATOU, P. MIYAZATO, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, A. NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE, A. KAWATSUKI and M. MATSUOKA**

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the first retrovirus that induces diseases in human. HTLV-1 causes a neoplastic disease, adult T-cell leukemia (ATL), and the inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis. HTLV-1 belongs to complex retrovirus, which encodes regulatory genes (*tax* and *rex*) and several accessory genes, such as *p30*, *p12*, *p13* and *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)*. Among them, *tax* is thought to play a central role in transformation of infected cells. However, since it is a major target of cytotoxic T-lymphocytes, its expression is often silenced in ATL cells to escape the host immune system. The *HBZ* gene, which is encoded by the minus strand of HTLV-1, contains a basic leucine zipper domain. Our previous studies showed that 3'LTR is intact and unmethylated in all ATL cells. From our studies, transcription of the *HBZ* gene was detected in all of the ATL cell lines and primary ATL cases, while *tax* gene transcription was frequently undetectable. In HBZ-transgenic mice, the number of CD4⁺ T cells was increased, indicating that HBZ promotes proliferation of CD4⁺ T cells *in vivo*. Dermatitis is frequently observed in HBZ transgenic mice, and in the skin, infiltration of CD4⁺ T cells is also found. In addition, CD4⁺ T cells infiltrate into alveolar septum. Among CD4⁺ T cells increased in HBZ transgenic mice, we found that the population of regulatory T cells (Tregs) was especially increased, and their suppressive function was impaired compared with wild type. Interestingly, HBZ transgenic mice develop T-cell lymphomas more frequently than non-transgenic littermate, and those lymphoma cells expressed a master gene of Tregs, *foxp3*, suggesting the association between HBZ-induced Treg proliferation and its oncogenesis. Those phenotypes of HBZ transgenic mice, such as infiltration of CD4⁺ T cells to various tissues and onset of T cell lymphomas, are very similar to that of HTLV-1 carriers. These finding suggest that *HBZ* has a crucial role for both leukemogenesis and HTLV-1-associated inflammatory diseases. Furthermore, we are now investigating cellular and molecular mechanism in the HBZ-induced pathogenesis.

- 2) Identification of cellular proteins interacting with HBZ and characterization of virological and pathological significance of the interaction: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, G. MA, A. KAWATSUKI, Y. SATOU and M. MATSUOKA**

We are trying to identify cellular factors interacting with HBZ by using yeast two hybrid or functional analyses of various signaling pathways. In this study, we found that HBZ specifically suppressed NF- κ B-driven transcription mediated by p65 and tax but not the alternative NF- κ B signaling pathway. Using coimmunoprecipitation, we demonstrated the direct interaction between HBZ and p65, and this physical association abrogated the DNA binding capacity of p65. In other aspect, HBZ induced p65 degradation through ubiquitination-dependent pathway. In addition, HBZ repressed transcription of selected classic NF- κ B target genes. This study suggests that this selective binding to p65 modulates Tax mediated NF- κ B activation. We got other cellular candidates interacting with HBZ using yeast two hybrid screening. We are investigating their significances in pathogenesis of HTLV-1-induced diseases.

3) Nonsense mutations in HTLV-1-encoded genes and their significances in leukemogenesis of HTLV-1-infected cells: J. FAN, G. MA and M. MATSUOKA

Genetic changes in the *tax* gene in ATL cells were reported in about 10% of ATL cases. To determine genetic changes that may occur throughout the provirus, we determined the entire sequence of the HTLV-1 provirus in 60 ATL cases. Abortive genetic changes, including deletions, insertions, and nonsense mutations, were frequent in all viral genes except the *HBZ* gene, suggesting that HBZ is critical in the process of ATL genesis. G-to-A base substitutions were the most frequent mutations in the provirus of ATL cells. The sequence context of G-to-A mutations was in accordance with the preferred target sequence of human APOBEC3G (hA3G). The target sequences of hA3G were less frequent in the plus strand of the *HBZ* coding region than in other coding regions of the HTLV-1 provirus. Thus, HBZ can escape mutations by hA3G since it is encoded in the minus strand.

4) Characterization of DNA repair proteins involved in retroviral integration: Y. SAKURAI and M. MATSUOKA

Retrovirus synthesizes viral dsDNA by reverse transcription and integrates the DNA into the host genome by integration. There are virus-specific preferences in retroviral integration sites. Murine leukemia virus (MLV) prefers genomic regions near transcriptional start sites, CpG islands and DNase hypersensitive sites for its integration, while the molecular mechanism for this preference remains unknown. In this study, we analyzed a huge number of the integration sites by massively parallel sequencing, and found that mutant cells lacking a DNA repair protein NBS1 showed decreased MLV integration frequency near transcriptional start sites, CpG islands and DNase hyper sensitive sites compared to NBS1-complemented cells. NBS1-deficient cells also showed decreased integration within H3K4me3 and H3K9me1 regions, which are epigenetic marks

associated with active promoters. In contrast, the NBS1-deficient cells showed increased integration within H3K79me3 regions, which are detected near silent promoters. Moreover, we demonstrated physical interaction of NBS1 and viral DNA before integration in MLV-infected cells by using ChIP assay. This study indicates that a DNA repair protein NBS1 is a host factor controlling MLV integration targeting.

5) Resistance mechanism to the next-generation HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA

Enfuvirtide (T-20), an HIV-1 gp41-derived peptide, efficiently inhibits HIV infection. However, effective therapy has been hindered by the emergence of resistant variants. We have developed two potential second-generation fusion inhibitors (FIs), SC34 and SC34EK, rationally designed to stably form six-helix bundles. We reported that SC34 and SC34EK selected several mutations in gp41, which were required to confer resistance to both FIs. In addition to the gp41 mutations, SC34 and SC34EK selected several mutations in gp120. Although these mutations did not confer any resistance to FIs by themselves, they enhanced the resistance caused by SC34- and SC34EK-selected gp41 mutations to T-20. SC34- and SC34EK-selected mutations in gp120 enhanced the replication kinetics attenuated by the gp41 mutations. The multiple mutations in the gp41 are necessary for the resistance to SC34 and SC34EK, while those in gp120 act as secondary mutations that restore replication kinetics diminished by the gp41 mutations.

6) Development of novel small-molecule inhibitors for HIV: K. SHIMURA, H. TOGAMI, T. ISOBE, T. NAITO and M. MATSUOKA

Highly active anti-retroviral therapy (HAART) potently suppresses viral replication, and improves prognosis of HIV-1 infected individuals. However, long-term usage of anti-retrovirus drugs allows emergence of resistant viruses. In order to develop novel small-molecule HIV inhibitors, we screened more than 30,000 compounds and identified several that showed anti-HIV activity by inhibiting the early-phase of HIV replication cycle. Among them, some compounds target steps other than attachment/fusion, reverse transcription, or integration, suggesting that a novel mode of action is involved in their activity. We will further enhance their anti-HIV activity and identify the mechanism of action.

LIST OF PUBLICATIONS

**CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH
LABORATORY OF VIRUS CONTROL**

- Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M. APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes *in vivo*. J Virol 84: 7278-7287, 2010.
- Izumi K, Nakamura S, Nakano H, Shimura K, Sakagami Y, Oishi S, Uchiyama S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Fujii N, Matsuoka M, Kodama E. Characterization of HIV-1 resistance to a fusion inhibitor, N36, derived from the gp41 amino terminal heptad repeat. Antiviral Res 87: 179-86, 2010.
- Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Ohshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, Matsuoka M, Utsunomiya A, Yoshino T. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). Am J Pathol 176: 402-415, 2010.
- Inoue T, Coles BL, Dorval K, Bremner R, Bessho Y, Kageyama R, Hino S, Matsuoka M, Craft CM, McInnes RR, Tremblay F, Prusky GT, van der Kooy D. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. Stem cells 28: 489-500, 2010.
- Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, Matsuoka M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. Int J Biochem Cell Biol. 42:1482-8, 2010.
- Shimura K, Nameki D, Kajiwara K, Watanabe K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama E. Resistance profiles of novel electrostatically HIV-1 fusion inhibitors. J Biol Chem, 285: 39471-80, 2010.
- Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: How the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. J Clin Exp Hematop. 50:1-8, 2010.
- Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor gene: its roles in HTLV-1 pathogenesis. Molecular Aspects of Medicine, 31: 359-66, 2010.
- Yasunaga J, Jeang KT. Cellular checkpoint dysregulation and HTLV-1 transformation. In: Lever A, Jeang KT, Berkhout B, eds. Recent advances in human retroviruses: principles of replication and pathogenesis. Hackensack, NJ: World Scientific Publishing; 2010.
- 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん機構 癌と化学療法 vol. 37 10-13, 2010
- 松岡雅雄: ウイルス感染による発がんメカニズム Medical Bio 第7巻(2010年3月) 12-13, 2010
- 佐藤賢文、松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-1)による発がん Medical Bio 第7巻(2010年3月) 34-39, 2010
- 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の持続感染機構 化学療法の領域 vol. 26(6) 80-85, 2010
- 安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 分子病態研究の新たな展開 血液・腫瘍科 vol. 60(5)

- 趙鉄軍、佐藤賢文、今村健志、松岡雅雄：Human T-cell Leukemia virus Type 1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300/CBP coactivators：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
- 中西梓、佐藤賢文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor inhibits expression of a proapoptotic factor, Bim:implication in leukemogenesis：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
- 佐藤賢文、安永純一郎、趙鉄軍、大島孝一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor transgenic mice induce chronic inflammations and T-cell lymphoma：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
- 松岡雅雄：The HTLV-1 bZIP factor gene is responsible for leukemogenesis of adult T-cell leukemia：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
- 佐藤賢文、Jun Fan、Guangyong Ma、野坂生郷、田邊順子、松岡雅雄：APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes in vivo：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
- 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：HBZ gene expression in CD4+T cells impairs cell-mediated immunity against *Listeria monocytogenes*：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
- 松岡雅雄：HTLV-1 アクセサリー遺伝子 HBZ の機能と意義：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 佐藤賢文：HTLV-1 bZIP factor による T 細胞発がん機構：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 菅田謙治、佐藤賢文、松岡雅雄：HBZ 発現は IFN- γ 産生を抑制し、HSV-2 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 田口奈々絵、佐藤賢文、Miyazato Paola、吉田美香、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による慢性炎症惹起機構：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 馬広勇、Fan Jun、柳川伸一、松岡雅雄：DAPLE, a novel HBZ-binding protein, regulates Wnt signaling pathway in ATL cells：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- Masao Matsuoka. Pathogenesis and therapeutic strategies of human retroviruses:HTLV-1 and HIV. Mahidol-Kyoto Universities International Symposium 2010. Bangkok, Thailand. December, 16-17, 2010.

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

LABORATORY OF MOUSE MODEL

Our research objective is to understand the molecular mechanisms that control chromatin function and genome diversity & stability in mammals. To address this question, we are currently analyzing functional molecules which are expressed in the nucleus.

1) **Roles of the histone lysine demethylases Jmjd1a and Jmjd1b in murine embryonic development: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI**

Histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation is a repressive epigenetic mark for heterochromatin formation and transcriptional silencing. Our research purpose is to understand the dynamics of H3K9 methylation in mammalian development and to identify the molecule(s) that regulate H3K9 methylation. We previously showed that coordinated expression of the H3K9 methyltransferase G9a and the H3K9 demethylase Jmjd1a dynamically regulate H3K9 methylation levels during male meiosis in mice (Tachibana et al., 2007). To elucidate further molecular function of Jmjd1a during murine development, we have established *Jmjd1a* knockout (KO) mice. *Jmjd1a*-KO mice are born at a Mendelian ratio and become adult, suggesting that Jmjd1a is not essential for embryonic development. However, methylation levels of H3K9me2 are not significantly changed in *Jmjd1a*-KO embryos. Jmjd1a has two homologues, Jmjd1b and Jmjd1c in mammals, and Jmjd1b can also catalyze H3K9 demethylation. mRNA and protein for *Jmjd1a* and *Jmjd1b* genes are expressed similarly in post-implantation embryos, suggesting the redundant function(s) of these two enzymes. To examine the functional redundancy between Jmjd1a and Jmjd1b, first we established *Jmjd1b*-KO mice by a conventional KO strategy. *Jmjd1b*-KO mice were born at sub-Mendelian ratio and no morphological abnormalities were detected between wild-type and *Jmjd1b*-KO embryos at E12.5, suggesting that Jmjd1b is also not essential for murine embryogenesis until mid-gestation. Again, methylation levels of H3K9me2 were indistinguishable between wild-type and *Jmjd1b*-KO embryos. To investigate a redundant role of Jmjd1a and Jmjd1b on mouse embryogenesis, mice carrying both *Jmjd1b*^{+/-} and *Jmjd1b*^{+/-} alleles were intercrossed. We could not obtain offspring carrying both *Jmjd1a*^{-/-} and *Jmjd1b*^{-/-} alleles, suggesting that *Jmjd1a/b* double KO (DKO) mice are embryonic lethal. So far, no *Jmjd1a/b*-DKO embryos were detectable even at E7.5 stage. To summarize, it was revealed that Jmjd1a and Jmjd1b are redundantly essential for mouse embryogenesis. Currently we are identifying the lethal point of *Jmjd1a/b*-DKO embryos and examining these phenotypes including the status of H3K9 methylation.

2) **Analysis of epigenetic regulation of mammalian sex differentiation: M. TACHIBANA**

Sex differentiation is the process of development of the differences between males and females from an undifferentiated zygote. This event is essential for sexually reproducing organisms to pass a combination of genetic material to offspring, resulting in increased genetic diversity. In mammal, the presence of *Sry* in the bipotential fetal gonads switches the developmental program into testes (Koopman et al., 1991). Once sex has been established, that is maintained throughout the life. It is still unknown how epigenetic machinery contributes to this sex determination process. In addition, the responsible enzymes are unclear which contribute the epigenetic maintenance of sex specific gene-expression profiles. To gain insight of these phenomena, we are planning to analyze the sex-specific epigenome structure in mammalian gonadal somatic cells. To purify mice gonadal somatic cells, we designated transgenic (TG) mice that express human low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) without intracellular domains. We chose Ad4BP/SF1 promoter to drive LNGFR, since Ad4BP/SF1 is specifically expressed embryonic gonadal somatic cells from E10.5 onwards in both sexes. Bacmids containing all exons for Ad4BP/SF1 were modified in order to generate TG mice. Briefly, ATG sequences corresponding to start codon of Ad4BP/SF1 were replaced with LNGFR open reading frame. The modified bacmids were injected into pronucleus in C57BL/6 zygote. Finally, it was found that three lines of offspring carried the integrated bacmids. Among them, mRNA and protein of LNGFR were strongly expressed in embryonic gonad in two-lines. Immunohistochemical analyses reveals the LNGFR protein were expressed in gonadal somatic lineage but not in germ cells, suggesting successful generation of Ad4BP/SF1-LNGFR TG lines. Next, we performed the purification of gonadal somatic cells using anti-LNGFR antibodies and magnetic separation system. More than 95% cells purified were positive for Ad4BP/SF1 protein. Currently we are planning to optimize this purification process.

3) Analysis of the role of histone modification in DNA damage repair: T. TSUBOTA and Y. SHINKAI

Histone modification is required for not only transcriptional regulation but also DNA repair. After DNA damage, checkpoint protein ATM is rapidly activated and cell cycle checkpoint and DNA repair are stimulated. It has been reported that when DNA damage is occurred in heterochromatin, ATM activation requires H3K9 methylation catalyzed by SUV39H1/H2 enzymes (*Nature Cell Biology*, p1376, 2009). However, DNA damage is often occurred in euchromatin, and its chromatin regulation is almost unknown. Since the characteristics are quite different between heterochromatin and euchromatin, the regulation with DNA damage could be also different. Therefore, we tested this hypothesis by using *G9a* knockout (KO) mouse ES cells that reduce H3K9 methylation mainly in euchromatin. Although *Suv39h1/h2*-DKO cells showed the delay of ATM activation with DNA damage, *G9a*-KO cells showed the stimulation. Furthermore, H3K56 acetylation which is important for DNA repair in yeast is accumulated in *G9a*-KO cells but not in

Suv39h1/h2-DKO cells, suggesting some crosstalk may exist between H3K9 methylation in euchromatin and H3K56 acetylation. Since the accumulation of H3K56 acetylation is also recently reported in several cancers, we will focus on to elucidate the molecular mechanism of the abnormal histone modification pattern and ATM activation seen in *G9a*-KO cells, in comparison with cancer cells. Knockout of other H3K9 methyltransferase, ESET does not alter the ATM activation pattern. However, *ESET*-KO cells show the higher protein expression level of p53 and are more resistant against a DNA damage agent. We would like to reveal this mechanism, too.

4) Profiling of histone lysine methylation during mouse germ cell development: K. DEGUCHI and Y. SHINKAI

Somatic and germ cells develop during embryogenesis. Somatic cell is required for maintenance of homeostasis and germ cell is essential for maintenance of species. Our laboratory studies the role of histone post-translational modifications in biological processes. Many reports suggest that histone methylation is needed for germ cell development and functions.

We analyzed histone lysine methylation status in germ-lineage cells during embryogenesis after sex determination. We found that the methylation status of multiple histone lysine residues are different between male and female. Especially, global level of histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) is low in male germ-lineage cells. In mouse, histone lysine methyltransferases G9a and GLP form a heteromeric complex and cooperatively regulate H3K9me2 and me1. GLP but not G9a is extremely low in male germ-lineage cells at the developmental stages we examined. It was reported that *Glp* mRNA is not expressed in primordial germ cells before sex determination. However, *Glp* mRNA is detected in male germ-lineage cells after sex determination as that in somatic cells. Interestingly, GLP is also not detectable in undifferentiated spermatogonia which is reported to have low H3K9me2. We suggest that H3K9me2 is not deposited in embryonic male germ-lineage cells and undifferentiated spermatogonia since GLP protein expression is suppressed by post-transcriptional regulation. We are currently investigating this suppression mechanism.

LIST OF PUBLICATIONS

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

LABORATORY OF MOUSE MODEL

Matsui T[#], Leung D[#], Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC* and Shinkai Y*. Proviral silencing in ES cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*, 464:927-931, 2010.

Hashimoto H, Takami Y, Sonoda E, Iwasaki T, Iwano H, Tachibana M, Takeda S, Nakayama T, Kimura H and Shinkai Y*. Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome

architecture. *Nucleic Acid Research*, 38:3533-3545, 2010.

Balemans MCM*, Huibers MMH, Eikelenboom NWD, Kuipers AJ, van Summeren RCJ, Pijpers MMCA, Tachibana M, Shinkai Y, van Bokhoven H and van der Zee CEEM. Reduced exploration, increased anxiety, and altered social behavior: autistic-like features in *Ehmt*^{+/-} mice. *Behavioral Brain Research*, 208:47-55, 2010.

Chang, Y. Ganesh, T. Horton, J.R. Spannhoff, A. Liu, J. Sun, A. Zhang, X. Bedford, M.T. Shinkai, Y. Snyder, J.P. and Cheng, X*. Adding a lysine mimic in the design of potent inhibitors of histone lysine methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 400:1-7, 2010.

眞貝洋一、松井稔幸：「ヒストンメチル化酵素ESETによる胚性幹細胞でのプロウイルス抑制機構」実験医学、Vol. 28:2246-2250, 2010.

松井稔幸、眞貝洋一：「レトロトランスポゾンの発現制御機構」生化学、第82巻 237-246, 2010.

立花誠：「ヒストンH3のリジンメチル化、脱メチル化酵素の新たな機能」実験医学、vol. 28:2354-2359, 2010

坪田智明：「ヒストンメチル化修飾による転写、DNA修復、複製の制御機構とその破綻によるゲノム疾患」医学のあゆみ・2010年・12月号「エピゲノム研究最前線」、医歯薬出版株式会社

Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., Shinkai, Y.: Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. Gordon Research Conference "Chromatin Structure and Function", Bryant University, Smithfield, RI, USA. July 25-10, 2010.

Shinkai, Y.: Epigenetic Regulation of Gene Expression by Histone Methylation. The Children's Hospital, Boston, USA. July 30, 2010.

Shinkai, Y.: Regulation and biological function of histone lysine methylation. The 20th Hot Spring Harbor Symposium and joint with the 6th Global COE International Symposium "New Horizons for Modern Science: Biology and Medicine at the Crossroads", Fukuoka, Japan. Aug 19, 2010.

Shinkai, Y.: Regulation and biological function of histone lysine methylation. National Institute of Biological Sciences, Beijing, China. Oct 11, 2010.

Shinkai, Y.: Histone methyltransferase ESET constrains endogenous retrovirus (ERV) transcription. International Symposium on "Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells". Fukuoka, Japan. November 22-24, 2010.

Tachibana, M.: G9a-mediated H3K9 methylation is required for trophectoderm-specific gene silencing. Advances in epigenetics, Sant Feliu de Guixols, Spain. May 10-14, 2010.

- Tachibana, M.: Regulation of long-range and lineage-specific gene silencing by histone methylation. Genetics and Developmental Biology Department seminar, Institut Curie, Paris, France. May 17, 2010.
- Tsubota, T., Paul KD., Shinkai, Y. : Molecular analysis of the epigenetical functions of histone H3-lysine 56 modification in DNA repair, transcription, and chromatin structure regulation.第5回研究所ネットワーク国際シンポジウム, Kanazawa, Japan. June 24-25, 2010.
- Deguchi, K. and Shinkai, Y: Profiling of histone lysine methylation during mouse germ cell development. International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells”. Fukuoka, Japan .November 22-24, 2010.
- 眞貝洋一:「エピジェネティクスと生命機能の制御」ライブセルイメージング研究所シンポジウム、大阪府立大学、2010年2月1日
- 眞貝洋一、松井稔幸:「ヒストンリジンメチル化酵素 ESET による内在性レトロウイルス抑制機構」日本遺伝学会第82回大会、札幌、2010年9月20日
- 眞貝洋一:「ヒストンメチル化調節による生命機能制御」第1回 Molecular Cardiovascular Conference II、余市、2010年9月3-5日
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化の制御とその機能」東京大学先端科学研究センターセミナーシリーズ、2010年11月10日
- 立花誠:「ヒストンのメチル化修飾による細胞系列特異的な転写機構」日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、松島、2010年6月
- 立花誠:「ヒストンのメチル化修飾による細胞系列特異的な遺伝子発現機構」、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会ワークショップ、神戸、2010年12月
- 坪田智明、Paul Kaufman、眞貝洋一:「ヒストンシャペロン因子依存的なヒストン H3 の 56 番目のリジン (H3K56) のアセチル化機能の解析」、染色体ワークショップ、御殿場、2010年1月21-22日
- 坪田智明、眞貝洋一:「DNA 損傷修復におけるヒストン化学修飾の機能解析」、第33回日本分子生物学会、神戸、2010年12月8-10日

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

LABORATORY OF PRIMATE MODEL

It has been 27 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.

- 1) **Generation of the pathogenic R5-tropic simian/human immunodeficiency virus SHIVAD8 by serial passaging in rhesus macaques: Y. NISHIMURA, M. SHINGAI, R. WILLEY, R. SADJADPOUR, W. R. LEE, C. R. BROWN, J. M. BRENCHLEY, A. BUCKLER-WHITE, R. PETROS, M. ECKHAUS, V. HOFFMAN, T. IGARASHI and M. A. MARTIN**

A new pathogenic R5-tropic simian/human immunodeficiency virus (SHIV) was generated following serial passaging in rhesus macaques. All 13 animals inoculated with SHIVAD8 passaged lineages experienced marked depletions of CD4⁺ T cells. Ten of these infected monkeys became normal progressors (NPs) and had gradual losses of both memory and naïve CD4⁺ T lymphocytes, generated antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, and sustained chronic immune activation

while maintaining variable levels of plasma viremia (10^2 to 10^5 RNA copies/ml for up to 3 years postinfection [p.i.]). To date, five NPs developed AIDS associated with opportunistic infections caused by *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium avium*, and *Campylobacter coli* that required euthanasia between weeks 100 and 199 p.i. Three other NPs have experienced marked depletions of circulating CD4⁺ T lymphocytes (92 to 154 cells/ μ l) following 1 to 2 years of infection. When tested for coreceptor usage, the viruses isolated from four NPs at the time of their euthanasia remained R5 tropic. Three of the 13 SHIVAD8-inoculated macaques experienced a rapid-progressor syndrome characterized by sustained plasma viremia of $>1 \times 10^7$ RNA copies/ml and rapid irreversible loss of memory CD4⁺ T cells that required euthanasia between weeks 19 and 23 postinfection. The sustained viremia, associated depletion of CD4⁺ T lymphocytes, and induction of AIDS make the SHIVAD8 lineage of viruses a potentially valuable reagent for vaccine studies.

2) Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in simian/human immunodeficiency virus KS661-infected rhesus macaques in the presence of low viral load: K. INABA, Y. FUKAZAWA, K. MATSUDA, A. HIMENO, M. MATSUYAMA, K. IBUKI, Y. MIURA, Y. KOYANAGI, A. NAKAJIMA, R. S. BLUMBERG, H. TAKAHASHI, M. HAYAMI, T. IGARASHI and T. MIURA

Human immunodeficiency virus type 1, simian immunodeficiency virus and simian/human immunodeficiency virus (SHIV) infection generally lead to death of the host accompanied by high viraemia and profound CD4⁺ T-cell depletion. SHIV clone KS661-infected rhesus macaques with a high viral load set point (HVL) ultimately experience diarrhoea and wasting at 6–12 months after infection. In contrast, infected macaques with a low viral load set point (LVL) usually live asymptotically throughout the observation period, and are therefore referred to as asymptomatic LVL (Asym LVL) macaques. Interestingly, some LVL macaques exhibit diarrhoea and wasting similar to the symptoms of HVL macaques and are termed symptomatic LVL (Sym LVL) macaques. This study tested the hypothesis that Sym LVL macaques have the same degree of intestinal abnormalities as HVL macaques. The proviral DNA loads in lymphoid tissue and the intestines of Sym LVL and Asym LVL macaques were comparable and all infected monkeys showed villous atrophy. Notably, the CD4⁺ cell frequencies of lymphoid tissues and intestines in Sym LVL macaques were remarkably lower than those in Asym LVL and uninfected macaques. Furthermore, Sym LVL and HVL macaques exhibited an increased number of activated macrophages. In conclusion, intestinal disorders including CD4⁺ cell reduction and abnormal immune activation can be observed in SHIV-KS661-infected macaques independent of virus replication levels.

3) ***In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6: K. MATSUDA, K. INABA, Y. FUKAZAWA, M. MATSUYAMA, K. IBUKI, M. HORIIKE, N. SAITO, M. HAYAMI, T. IGARASHI and T. MIURA**

Although X4 tropic SHIVs have been studied extensively, they show distinct infection phenotypes from those of R5 tropic viruses, which play an important role in HIV-1 transmission and pathogenesis. To augment the variety of R5 tropic SHIVs, we generated a new R5 tropic SHIV from the highly pathogenic X4 tropic SHIVKS661, a derivative of SHIV-89.6. Based on consensus amino acid alignment analyses of subtype B R5 tropic HIV-1, five amino acid substitutions in the third variable region successfully changed the secondary receptor preference from X4 to R5. Improvements in viral replication were observed in infected rhesus macaques after two passages, and reisolated virus was designated SHIV-MK38. SHIV-MK38 maintained R5 tropism through *in vivo* passages and showed robust replication in infected monkeys. Our study clearly demonstrates that a minimal number of amino acid substitutions in the V3 region can alter secondary receptor preference and increase the variety of R5 tropic SHIVs.

4) **Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus: A. HIMENO, T. AKAGI, T. UTO, X. WANG, M. BABA, K. IBUKI, M. MATSUYAMA, M. HORIIKE, T. IGARASHI, T. MIURA and M. AKASHI**

We previously reported that biodegradable amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles (NPs) carrying the recombinant gp120 env protein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) were efficiently taken up by dendritic cells, and induced strong CD8⁺ T cell responses against the gp120 in mice. To evaluate gp120-carrying NPs (gp120-NPs) as a vaccine candidate for HIV-1 infection, we vaccinated rhesus macaques with these gp120-NPs and examined the immuneresponse and protective efficacy against a challenge inoculation of simian and human immunodeficiency chimeric virus (SHIV). We found that gp120-NP vaccination induced stronger responses for both gp120-specific cellular and humoral immunity than gp120-alone vaccination. After the challenge inoculation with SHIV, however, the peak value of viral RNA in the peripheral blood was higher in the vaccinated groups, especially the gp120-NP vaccinated group, than naive control group. Higher value of viral load was also maintained in gp120-NP vaccinated group. Furthermore, CD4⁺ T cells from the peripheral blood decreased more in the vaccinated groups than the control group. Thus, induced immune responses against gp120 enclosed in NPs were not effective for protection but, conversely enhanced the infection, although the gp120-NPs showed a

stronger induction of immune responses against the vaccinated antigen in rhesus macaques. These results support the importance of determining immune correlate of protective immunity for vaccine development against HIV-1 infection.

5) An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses: T. KOBAYASHI, L. S. OOMS, M. IKIZLER, J. D. CHAPPELL and T. S. DERMODY

Mammalian orthoreoviruses (reoviruses) are highly useful models for studies of double-stranded RNA virus replication and pathogenesis. We previously developed a strategy to recover prototype reovirus strain T3D from cloned cDNAs transfected into murine L929 fibroblast cells. Here, we report the development of a second-generation reovirus reverse genetics system featuring several major improvements: (1) the capacity to rescue prototype reovirus strain T1L, (2) reduction of required plasmids from 10 to 4, and (3) isolation of recombinant viruses following transfection of baby hamster kidney cells engineered to express bacteriophage T7 RNA polymerase. The efficiency of virus rescue using the 4-plasmid strategy was substantially increased in comparison to the original 10-plasmid system. We observed full compatibility of T1L and T3D rescue vectors when intermixed to produce a panel of T1LxT3D monoreassortant viruses. Improvements to the reovirus reverse genetics system enhance its applicability for studies of reovirus biology and clinical use.

LIST OF PUBLICATIONS

**EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES
LABORATORY OF PRIMATE MODEL**

- Nishimura, Y., Shingai, M., Willey, R., Sadjadpour, R., Lee, W. R., Brown, C. R., Brenchley, J. M., Buckler-White, A., Petros, R., Eckhaus, M., Hoffman, V., Igarashi, T., and Martin, M. A. Generation of the Pathogenic R5-Tropic Simian/Human Immunodeficiency Virus SHIVAD8 by Serial Passaging in Rhesus Macaques. *J. Virol.*, 84: 4769-4781, 2010
- Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J. Gen. Virol.*, 91: 773-781, 2010
- Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T. *In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*, 399: 134-143, 2010
- Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T., and Akashi, M. Evaluation of the immune response and protective

- effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus. *Vaccine*, 28: 5377-5385, 2010
- 武久盾、三浦智行：HIV の起源と進化. *日本臨床*, 68: 410-414, 2010
- Nakamura, M., Sato, E., Miura, T., Baba, K., Shimoda, T., and Miyazawa, T. Differential Diagnosis of Feline Leukemia Virus Subgroups Using Pseudotype Viruses Expressing Green Fluorescent Protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 787-790, 2010
- Matsumoto, Y., Miura, T., Akari, H., Goto, Y., and Haga, T. Peripheral blood CD4 CD8 double-positive T cells of rhesus macaques become vulnerable to simian immunodeficiency virus by in vitro stimulation due to the induction of CCR5. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 1057-1061, 2010
- Ooms L. S., Kobayashi T., Dermody. T. S., and Chappell J. D. A Post-entry step in the mammalian orthoreovirus replication cycle is a determinant of cell tropism. *J. Biol. Chem.*, 285: 41604-41613, 2010
- Kobayashi T., Ooms L. S., Ikizler M., Chappell J. D., and Dermody. T. S. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology*, 398:194-200, 2010
-

- 中村仁美：相同組み換えによって作製した新規サルヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、 2010 年 2 月 11-13 日
- 堀池麻里子：サルエイズモデルにおける多剤併用療法の確立と未同定リザーバーに関する研究、第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、 2010 年 2 月 11-13 日
- 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル／ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 149 回日本獣医学会学術集会、東京、2010 年 3 月 26-28 日
- S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. KSIAM, Chungnam National University, April 24-25, 2010
- S. Iwami, Y. Takeuchi, T. Igarashi and T. Miura: Estimate of viral productivity and infectivity in vitro. CMPD3, Bordeaux, France, May 31- June 4, 2010
- 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル／ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 19 回サル疾病ワークショップ、東京、2010 年 7 月 3 日
- S. Iwami, M. Horiike, T. Miura and T. Igarashi: Contribution of long-lived productively infected cells in SIV infection. SIAM Conference on Life Science, Pittsburgh, Pennsylvania, July 12-15, 2010
- 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：計算ウイルス学・免疫学の展開-ウイルス感染力推定法の開発-、日本応用数理学会、東京、2010 年 9 月 8 日
- 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、竹内康博、守田智、三浦智行：保存量を用いたウイルス感染力推定法の開発、第 20 回日本数理生物学会、札幌、2010 年 9 月 14 日

- 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、稲葉寿、守田智、五十嵐樹彦：SIV 感染アカゲザルによる HAART 治療モデルのデータ解析とその理論、第 20 回日本数理生物学会、札幌、2010 年 9 月 14 日
- 岩見真吾、多田哲子、三浦智行：保存量を用いたウイルス感染力推定法の開発、日本数学会、名古屋、2010 年 9 月 24 日
- 岩見真吾、多田哲子、五十嵐樹彦、三浦智行：数理モデルによるウイルス感染力推定法の開発、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7 日-9 日
- 大附寛幸、藤田泰久、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術による R5 指向性 clade C env を持つサル指向性 HIV-1 の創出、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7 日-9 日
- 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗：サルエイズモデルにおける HAART 実施前後の CTL 反応の比較、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日、
- 仲宗根咲子、松山めぐみ、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：マクロファージにおける霊長類レンチウイルス出芽様式の超微形態学的解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 堀池麻里子、松山めぐみ、安井美加、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：多剤併用療法実施下のサルエイズモデルにおけるリンパ節内でのウイルス新規感染の可能性、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
- 三浦智行：霊長類エイズモデル研究の新展開、第 6 回霊長類医科学フォーラム、つくば、2010 年 11 月 18 日
- 五十嵐樹彦、堀池麻里子：サルエイズモデルを用いた多剤併用療法下におけるウイルスリザーバーの検索、第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010 年 11 月 24-26 日
- 岩見真吾、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦：SIV 感染アカゲザルによる HAART 治療モデルのデータ解析、第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010 年 11 月 24-26 日
- 中村仁美、大附寛幸、松田健太、小林剛、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル指向性ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010 年 11 月 24-26 日
- 藤田泰久、大附寛幸、小林剛、三浦智行、五十嵐樹彦：新規組換え技術による CCR5 指向性 clade C HIV-1 株の env 領域を持った SHIV の作製、第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010 年 11 月 24-26 日

CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH

1) **HIV and EBV Pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA and Y. KOYANAGI**

Human APOBEC3G was identified as an HIV-1 restriction factor, which edits nascent HIV-1 DNA by inducing G-to-A hypermutations and debilitates the infectivity of *vif*-deficient HIV-1. On the other hand, HIV-1 Vif protein has the robust potential to degrade APOBEC3G protein. Although following investigations have revealed that lines of APOBEC3 family proteins have the capacity to mutate HIV-1 DNA, it remains unclear whether these endogenous APOBEC3s including APOBEC3G contribute to mutations of *vif*-proficient HIV-1 provirus *in vivo*. We use NOG-hCD34 mouse model and demonstrate the predominant accumulation of G-to-A mutations in *vif*-proficient HIV-1 provirus displaying characteristics of APOBEC3-mediated mutagenesis. Notably, the APOBEC3-associated G-to-A mutation of HIV-1 DNA that leads to the termination of translation was significantly observed. We further provide a novel insight suggesting that HIV-1 G-to-A hypermutation is independently induced by individual APOBEC3 protein. In contrast to the observation in proviral DNA, viral RNA possessed less G-to-A mutations. Taken together, these results provide the evidence indicating that endogenous APOBEC3s are associated with G-to-A mutation of HIV-1 provirus *in vivo*, which can result in the abrogation of HIV-1 replication.

2) **Role of the envelope stress response system in the biosynthesis and quality control of envelope proteins. S. NARITA and Y. AKIYAMA¹** (¹Department of Viral Oncology, IVR)

The aim of research in this group is to clarify the survival strategy of gram-negative bacteria. Various bacterial species in this phylum have been identified as causative microorganisms of many infectious diseases. It is of great importance, therefore, to understand their survival strategy to cope with emerging infectious diseases. Cell structure of gram-negative bacteria is characterized by the presence of the outer membrane surrounding the cytoplasmic membrane and the periplasmic space. These envelope structure functions as a permeability barrier against toxic compounds and serves to maintain homeostasis of the cytoplasm. Because the outer membrane is essential for the growth of gram-negative bacteria, knowledge of the biosynthesis and quality control systems of the outer membrane would contribute to develop new drugs against gram-negative pathogenic bacteria. We study these systems using *Escherichia coli*, the model organism that has ever been most extensively studied.

The σ^E stress response system senses misfolded outer membrane proteins (OMPs) in the

periplasmic space and regulates expression of a set of genes that cope with envelope stresses. Upon activation of σ^E , expression of genes for periplasmic chaperones/proteases and components for OMP and lipopolysaccharide assemblies are up-regulated while those for OMPs are down-regulated, both contributing to reduce the threat to periplasmic accumulation of misfolded OMPs. Although there are several genes encoding periplasmic proteases that are up-regulated upon the activation of σ^E , their physiological roles in the stress response are not fully understood. We found that an *E. coli* strain deleted for a σ^E -regulated putative periplasmic metalloprotease exhibits increased sensitivity to an anionic detergent, SDS, and several antibiotics including erythromycin and rifampicin, indicating that this protease is required to maintain the integrity of the outer membrane. Furthermore, deleterious effects of loss of this protease were synergistically increased by additional disruption of either *bamB* or *surA*, genes encoding a component of the OMP assembly machinery and a periplasmic chaperon, respectively. These results suggested a novel function of a σ^E -regulated protease involved in quality control of OMPs through its proteolytic activity.

LIST OF PUBLICATIONS

CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH

1) First Group

Sato K., Nie C., Misawa N., Tanaka Y., Ito M., Koyanagi Y. Dynamics of memory and naïve CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, 28S2:B32-37, 2010.

Sato K., Izumi T., Misawa N., Kobayashi T., Yamashita Y., Ohmichi M., Ito M., Takaori-Kondo A., Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in *vif*-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84, 9546-9556, 2010.

佐藤 佳、小柳義夫 HIV-1 のウイルス-宿主相互作用と新規治療薬の開発 実験医学第 28 号第 18 号 pp2961-2968 2010.

Sato K., and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st International Young Investigator Symposium, Kumamoto, Japan, 2010 年 3 月 4 日—5 日

Sato K., Izumi T., Misawa N., Ito M., Takaori-Kondo A. and Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hypermutation in vivo by APOBEC3 proteins. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010 年 5 月 24 日—29 日

- Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P., Ebina H. and Koyanagi Y. Characterization of species-specific interaction between Bst-2 transmembrane domain and HIV-1 Vpu in lipid bilayers of living cells. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010 年 5 月 24 日—29 日
- Sato K. A novel animal model for active EBV infection in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Taipei, Taiwan, 2010 年 7 月 1 日—2 日
- Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010 年 8 月 22 日—27 日
- Iwami S., Sato K., Misawa N., Kobayashi T., de Boer R.J. and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd Synthetic Immunology Workshop, Kyoto, Japan, 2010 年 12 月 8 日.
- Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P. Ebina H. and Koyanagi Y. Live cell-based mutagenesis studies reveals the structural insights for human tetherin recognition by HIV-1 Vpu. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2010 年 10 月 6 日—8 日
- Sato K., Misawa N., Nie C., Takahashi R., Ito M., Kuzushima K., Takada K. and Koyanagi Y. T cell and cytokine responses determine the fate of humanized mice with active Epstein-Barr virus infection, 第 7 回 EBV 研究会, 札幌, 2010 年 7 月 9 日
- Sato K., Izumi T., Misawa N., Kobayashi T., Ito M., Takaori-Kondo A. and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, 2010 年 9 月 7 日—10 日
- 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -動物実験-, 第 20 回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010 年 9 月 13 日—16 日
- 岩見真吾, 佐藤佳, Rob J. de Boer, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -数理モデル-, 第 20 回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010 年 9 月 13 日—16 日
- 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 高橋玲, 伊藤守, 高田賢蔵, 小柳義夫. ヒト化マウスを用いた EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010 年 11 月 7 日-9 日
- 小林朋子, 芳田剛, 佐藤佳, Peter Gee, 山元誠司, 蝦名博貴, 小柳義夫 HIV-1 Vpu 相互作用に必須な tetherin/Bst-2 膜貫通領域アミノ酸の同定, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010 年 11 月 7 日-9 日
- 小林朋子, 大出裕高, 佐藤佳, Gee Peter, 山元誠司, 蝦名博貴, 佐藤裕徳, 小柳義夫 Human

tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility.

第 24 回日本エイズ学会学術集会, 東京, 2010 年 11 月 24 日-26 日

Sato K, Koyanagi Y, Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1

provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第 24 回日本エイズ学会学術集会, 東京, 2010 年 11 月 24 日-26 日

Kobayashi T., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S., Ebina H. and Koyanagi Y.

Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for

HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年

12 月 7 日—10 日

2) Second Group

Morita, Y., Narita, S., Tomida, J., Tokuda, H. and Kawamura, Y. Application of an inducible system to engineer unmarked conditional mutants of essential genes of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. Methods. 82, 205-213, 2010.

Tao, K., Watanabe, S., Narita, S. and Tokuda, H. A periplasmic LolA derivative with a lethal disulfide bond activates the Cpx stress response system. J. Bacteriol. 192, 5657-5662, 2010.

Sakamoto, C., Satou, R., Tokuda, H. and Narita, S. Novel mutations of the LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins despite their inner membrane retention signals. Biochem. Biophys. Res. Commun. 401, 586-591, 2010.

Narita, S. and Tokuda, H. Sorting of bacterial lipoproteins to the outer membrane by the Lol system. A. Economou (ed.), Protein secretion: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology Vol. 619) Chapter 7. Humana Press (Totowa, USA) 2010.

Narita, S. and Tokuda, H. Biogenesis and membrane targeting of lipoproteins. A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. Chapter 4.3.7. ASM Press (Washington, DC, USA) 2010.

成田新一郎：グラム陰性細菌の細胞表層形成に関与する ABC トランスポーターの研究.

日本農芸化学会 2010 年度大会、東京、2010 年 3 月 27 日

成田新一郎、徳田元：細菌リポタンパク質の外膜局在化を司る ABC トランスポーター

LolCDE の機能. 第 5 回トランスポーター研究会年会、東京、2010 年 7 月 11 日

成田新一郎：グラム陰性細菌の細胞表層形成に関与する ABC トランスポーターの研究.

日本農芸化学会関東支部 2010 年度第 1 回支部例会、筑波、2010 年 7 月 17 日

Narita, S. and Tokuda, H. Overexpression of LolCDE suppresses the growth defect of an

Escherichia coli mutant that lacks apolipoprotein N-acyltransferase. The 3rd International Symposium on Protein Community. September 13-16. Nara, 2010.

REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM

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

2008	62 strains	20,525 embryos
2009	75 strains	20,337 embryos
2010	101 strains	18,620 embryos

2) Introduction of mouse strains from outside

	Frozen embryos	Live mice
2008	4 strains	2 strains
2009	7 strains	2 strains
2010	4 strains	6 strains

3) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2008	52	20,379	125 (0.6%)
2009	94	33,821	190 (0.6%)
2010	90	32,875	124 (0.3%)

4) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2008	49	7,252	357 (4.9%)
2009	52	4,587	242 (5.3%)
2010	106	7,106	394 (5.5%)

LIST OF PUBLICATIONS

REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM

Takeo, T., Kondo, T., Haruguchi, Y., Fukumoto, K., Nakagawa, Y., Takeshima, Y., Nakamuta, Y., Tsuchiyama, S., Shimizu, N., Hasegawa, T., Goto, M., Miyachi, H., Anzai, M., Fujikawa, R., Nomura, K., Kaneko, T., Itagaki, Y., Nakagata, N. Short-term Storage and Transport at Cold Temperatures of 2-Cell Mouse Embryos Produced by Cryopreserved Sperm. *Journal of the American Association for Laboratory Science*.49, 1-5, 2010.

Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, IA., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, MC., Shinkai, Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 464, 927-31, 2010.

宮地 均、北野 さつき、竹尾 透、福本紀代子、近藤朋子 2、春口幸恵、竹下由美、中牟田裕子、土山修治、金子武人、眞貝 洋一、中潟 直己：凍結融解マウス2細胞期胚の低温保存（4℃）に関する研究. 第57回日本実験動物学会総会、京都、2010年5月12日～14日

宮地 均、北野 さつき、眞貝 洋一：海外ノックアウトプロジェクトから導入したES細胞からのキメラマウス作製の実際. 第44回日本実験動物技術者協会、旭川、2010年9月3日・4日

COMPUTER NETWORK OF INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

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, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. Main services are working on Sun Sparc platform with Solaris 10 and DELL with Linux.

All servers had been settled in a neighboring building during repair work which had made our institute earthquake-resistant. We started Juniper SSL VPN service on purpose to maintain our services including the exclusive ones such as a license management during relocation. It ensured the connection into IVR-LAN for users outside our network. Though there were shutdowns of all servers twice a year, we were able to come back to home building without serious network troubles. This year we have begun MAC address filtering, which means you have to register the MAC address belonging to your personal computer in order to connect into IVR-LAN. Because the number of Wi-Fi devices and wireless users are increasing significantly nowadays, a rogue hotspot could lead to open up security holes. 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.

STAFF CHANGES OF THE INSTITUTE

Appointments

During the period of January to December 2010, the following new staffs were appointed; Dr. Yoshihiro Kawaoka as a Visiting Professor of Department of Biological Responses, Dr. Masafumi Takiguchi as a Visiting Professor of Laboratory of Viral Immunology, Dr. Katsuji Sugie as a Visiting Associate Professor of Department of Biological Responses, Dr. Hiroki Kato as an Associate Professor of Department of Genetics and Molecular Biology, Dr. Jun-ichiro Yasunaga as a Lecture of Center for Human Retrovirus Research, Dr. Hirotaka Kuwata as an Assistant Professor of Department of Viral Oncology, Drs. Kei Sato, Shin-ichiro Narita and Ayano Satsuka as an Assistant Professor of Center for Emerging Virus Research, Drs. Toru Kiyono and Yasuhito Tanaka as a Lecture (part time) of Department of Viral Oncology, Drs. Yoshiharu Matsuura and Hisashi Arase as a Lecture (part time) of Department of Genetics and Molecular Biology, Dr. Junji Takeda as a Lecture (part time) of Department of Biological Responses, Dr. Hiroaki Takeuchi as a Department of Cell Biology, Drs. Yusuke Yanagi, Takeshi Noda, Kyoko Shinya and Michinori Kohara as a Lecture (part time) of Center for Human Retrovirus Research, Dr. Koichi Morita as a Lecture (part time) of Experimental Research Center for Infectious Diseases.

Departure

Dr. Mitsutoshi Yoneyama moved to Medical Mycology Research Center, Chiba University, Dr. Eiji Ido moved to Tokyo Medical and Dental University, Dr. Yoichi Suzuki moved to National University of Singapore, Dr. Shinobu Chiba moved to Kyoto Sangyo University, Dr. Aoi Son moved to National Center for Global Health and Medicine, Dr. Junji Yodoi retired from the Institute in March, Drs. Yousuke Takahama, Hideyuki Tanabe, Hironori Niki, Hideki Nishitoh, Tetsuro Matano, Jun Nishihira, Masaaki Miyazawa, Hiroyuki Mano, Takeshi Imamura, Tomohiko Takasaki, Ryuzo Torii, Chieko Kai left the Institute. 2010

THE SCIENTIFIC LECTURES OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

The annual scientific lecture of this Institute was held on July 15, 2010 at the Kyoto University Hall.

Program

Opening Remarks: Masao Matsuoka

1. Mechanism of pathogenesis by HTLV-1 bZIP factor, Masao Matsuoka, this Institute
2. HCV, replication in cell culture and mechanism of chronic infection in vivo, Takaji Wakita, National Institute of Infectious Diseases
3. Regulation of neural stem cells : Brain formation and maintenance, Ryoichiro Kageyama, this Institute
4. Research in regenerative medicine and drug development employing iPS cells and gene-modified non-human primate, Hideyuki Okano, Keio University

SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Twenty-two seminars were held at the Institute for Virus Research under the auspices of the Institute in 2010. Seventeen lectures were from abroad and five others were from Japan.

- | | |
|-------------|--|
| February 10 | Dr. Alain Krol, CNRS, France. "An unanticipated complexity to incorporate selenocysteine into proteins important for health and disease". |
| March 9 | Dr. Man Lung Yeung, National Institute of Health, U.S.A. "HTLV-1 and small RNAs". |
| March 11 | Dr. Tadaaki Miyazaki, Hokkaido University, Japan. " Study of host defence mechanism and pathogenesis in influenza virus infection". |
| March 17 | Dr. Rod Bremner, Toronto Western Research Institute, U.S.A. "Integrating the cell cycle with neurogenesis". |
| March 29 | Dr. Yang Shi, Harvard Medical School, U. S. A. "Histone demethylases: mechanism of action and connection to human diseases " |
| April 22 | Dr. Yuichiro Justin Suzuki, Georgetown University Medical Center, U.S.A. "Search for therapeutic strategies to treat pulmonary hypertension". |
| April 26 | Dr. Hiroyuki Niida, Nagoya City University, Japan. "Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase". |
| May 14 | Dr. Yoichi Kosodo, RIKEN, Japan. "Comprehensive study of the interkinetic nuclear migration of neural progenitor cells; Temporal and spacial analysis of cellular behaviors in the developing tissue " |

- June 9 Dr. Elias Arnér, Karolinska Institutet, Sweden. “Human thioredoxin reductase 1 splice variants regulate cell function through intriguingly complex mechanisms”.
- July 16 Dr. Stefano Stifani, Montreal Neurological Institute McGill University, Canada. “ Molecular mechanisms controlling brain development from pluripotent neural stem/progenitor cells”.
- August 25 Dr. Ayumu Akahata, National Institutes of Health, U. S. A. “Development of an anti-Chikungunya virus vaccine employing virus-like particles”.
- September 14 Dr. Srinivas S. Rao, National Institutes of Health, U.S.A. “Comparing the efficacy of immunogens and evaluating aerosol delivery of gene-based vaccines against influenza in ferrets, HIV/SIV in monkeys”.
- October 8 Dr. Charles R.M.Bangham, Imperial College London, UK. “How does HTLV-1 persist in vivo? ”.
- October 29 Dr. Renaud Mahieux, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France. “HTLV-1&HTLV-2 similarities and major differences”.
- November 5 Dr. Cecilia Cheng-Mayer, Aaron Diamond AIDS Research Center, U. S. A. “Tropism Switch in R5 SHIV infected macaques”.
- November 5 Dr. Sarah Bray, University of Cambridge, UK. “Decoding the Notch response”.
- November 12 Dr. Junji Takeda, Osaka University, Japan. “Establishment of mutant ES cell bank ready to analyze gene functions and available for many scientists”.
- November 15 Dr. Yi Zhang, University of North Carolina, U. S. A. “Could the DNA demethylase please stand up?”.

- November 25 Dr. Anna Bigas, PRBB Barcelona, Spain. “Notch signaling in the generation of hematopoietic stem cells”.
- December 2 Dr. Yukako Nishimura, National Institutes of Health, U.S.A.
“An RNAi screen of microtubule-regulatory proteins identifies MARK2/Par1 as an effector of Rac1 that mediates polarized microtubule growth”.
- December 14 Dr. Masafumi Takiguchi, Kumamoto University, Japan. “Evolution of escape mutant HIV from cytotoxic T cells”.
- December 16 Dr. Kiyo Sakagami, Jules Stein Eye Institute, UCLA , U.S.A.
“Essential roles of PTEN/PI3K signaling in proper retinal network formation”.

I. First Group (秋山、森)

千葉志信助教が、4月より京都産業大学の助教として転出しました。代わって、博士研究員として由良隆名誉教授が、理学研究科大学院生(M1)として照島功祐さん、町田裕紀さんが新たに加わりました。また、特定助教として7月に附属新興ウイルス研究センターに赴任した成田新一郎博士と密接な協力の下に研究を始めました。一方、大学院生の斎藤啓さん、田中夏子さんが、それぞれ就職、他研究科への進学のために研究室を去りました。

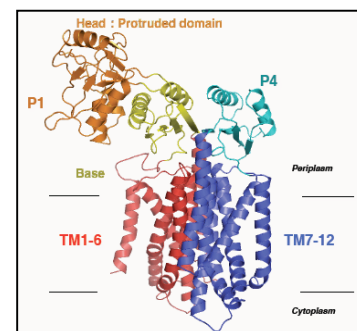
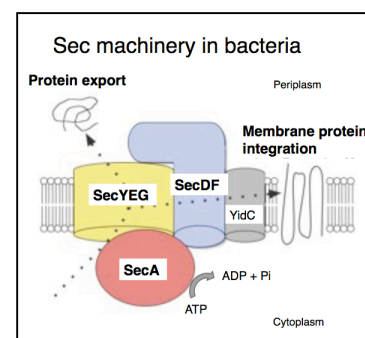
タンパク質膜透過促進因子 SecDF の機能解析

細菌におけるタンパク質の膜透過には、駆動モータ SecA ATPase と SecYE トランスロコンが中心的な役割を果たしています。これらの必須因子に加えて、膜タンパク質複合体 SecDF も、トランスロコンと複合体を形成し膜透過の促進に関わると考えられていますが、その立体構造並びに膜透過促進機構は殆ど解っていません。

タンパク質膜透過は、SecA により利用される ATP 加水分解エネルギーと、細胞質膜内外で形成されるプロトン駆動力(PMF)により駆動されます。PMF は必須のエネルギー源ではありませんが、タンパク質分泌能の昂進に大きく寄与し、SecA の役割とは独立に機能することが示唆されています。しかしながら、PMF のターゲット因子の同定も含め、PMF による膜透過昂進の分子メカニズムは依然として不明なままです。

私達は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を材料に用い、東大・理学研究科の塚崎智也博士、濡木理教授との共同研究として、これら Sec 因子の構造解析を進め、これまでに SecA ATPase, SecYE トランスロコン, SecDF の高分解能の立体構造を明らかにしてきました。加えて、これらの立体構造情報に基づいた機能解析によりタンパク質膜透過の駆動機構の解明を目指しています。

本年度は、SecDF による膜透過昂進に関して大きな進展が得られましたので、以下に紹介します。①*in vitro* タンパク質膜透過実験により、ATP に依存しないタンパク質膜透過の継続・完了には、SecDF と PMF の両者が必要であることを見いだしました。**SecDF は、PMF のエネルギーを用いて膜透過を駆動する因子**と考えることができます。②X 線結晶構造解析の結果から、高度好熱菌 SecDF は、12 回の膜貫通領域と 2 つの大きなペリプラズムドメイン(P1, P4)を持つ(右図)ことを明らかとしました。③種々の生化学実験から、SecD



の P1 領域は、生きた細胞内で少なくとも 2 つの構造状態を取る得ること、P1 ドメインの可動性が、SecDF によるタンパク質膜透過促進機能に重要であることを見いだしました。④単離 P1 ドメインが基質タンパク質を直接結合する能力を持ち、基質の結合・解離には、このドメイン内の構造変化が重要であることを示唆する結果を得ました。⑤部位特異的 *in vitro* 光架橋実験により、タンパク質膜透過途上鎖と完全長 SecD の P1 ドメイン内のクレバスとが直接相互作用することを見いだしました。②～⑤の結果から、「**SecD の P1 ドメインは、自身の構造変化に伴い、SecYE チャネルから出て来た膜透過途上の基質タンパク質と結合・解離を繰り返すことにより、基質分子の逆行を防ぐ分子ラチェットとして機能している。**」と解釈することができます。興味深いことに、⑥SecDF の膜貫通領域の配置は、同じ RND スーパーファミリーに属する薬剤—プロトンアンチポーター AcrB のそれと極めて類似していました。AcrB においては、膜貫通領域内に、プロトンの移動に必須の荷電アミノ酸残基が複数存在しています。これらのアミノ酸残基の幾つかは、SecDF においても高度に保存されており、それらの部位への変異導入により SecDF の機能は完全に失われました。⑦海洋ビブリオ菌由来の SecDF を発現した大腸菌においては、大腸菌由来の SecDF と異なり、培地中の Na^+ の濃度勾配に依存して膜透過能を発揮することを見いだしました。以上の結果から、**SecDF は、細胞質膜内外で形成される一価カチオン濃度勾配エネルギーを利用して、イオンを細胞質側に取り込む際に生じる膜貫通領域の構造変化を引き金に、P1 領域の構造変化を引き起こし、基質タンパク質の膜透過を促進するカチオントランスポーターであると結論づけました。**

本研究により、これまで不明であった PMF のターゲットの 1 つが SecDF であることが明らかになり、PMF を利用したタンパク質膜透過昂進の分子メカニズムの一端が解明できたものと考えています。(森 博幸)

II. Second Group (酒井・柳川)

本年度はスタッフの酒井、柳川と、大学院生の梶谷直子さん、さらに昨年度まで当グループの大学院生であった佐塚文乃さん（現在は京都大学薬学研究科・特定助教）の 4 人で研究を行っています。それに加えてサポートスタッフとして、秋までは医学部保健学科の加藤木くん、冬から工学部の岡元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。また一方で、機能のよく分かっていないウイルス制御遺伝子、特に E4 と E5 に注目し、それらの生物活性の同定を行っています。これらの遺伝子機能から、ウイルス複製の調節機構を探り、抗ウイルス剤開発の標的を見出したいと考えています。(梶谷、佐塚、酒井)

LRP6 結合蛋白 Krtap13 による Wnt シグナル伝達経路活性化の分子機構の解析

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新規蛋白として、Keratin associated protein 13 (Krtap13)を、見いだした。

驚いた事に、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る事が、レポーターアッセイにより明らかになった。Krtap13 は、ヒトでは 174 アミノ酸からなり、Cys-Gln に富む 10 アミノ酸からなる反復構造を持ち、毛包、汗腺、などでの発現が知られているが、その機能や Wnt 経路との関係は不明である。

Krtap13 の強制発現は、 β -catenin 蛋白質の蓄積を誘導した。また、LRP6 と Dvl は Krtap13 を介して ternary complex を形成する事が判明した。蛍光免疫二重染色を行うと、Krtap13 と Dvl は細胞膜上で Dot 状に共局在した。Krtap13 は、LRP6-Dvl 凝集体を形成させ、そこへ Wnt 経路の負の制御因子 Axin を引き寄せる事を介して、Wnt 経路を活性化しているとのモデルが考えられた。また、Krtap13 は、細胞の増殖を促進する事、さらに Krtap13 の発現は、Wnt の標的遺伝子、Dkk1 の発現を誘導した。

現在、Krtap13 の高発現の影響を、in vivo で解析するプロジェクトを進めている。そのため、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 は、Cre の存在下においてのみ Krtap13 の発現がなされる。現在、4 系統の Tg マウスを作成しており、これらの Tg マウスと組織特異的に Cre を発現する Tg マウスを交配する事によって、組織特異的に Krtap13 を高発現させる。Tg マウスでの腫瘍の発生の有無や、器官形成への影響を解析している。また一方、Krtap13 が新たな癌遺伝子として働く事を想定し、Krtap13a の著しい高発現、あるいは異所が、Wnt 経路を活性化し、癌を誘導している可能性を検討している。(柳川)

脂質生物学と免疫学の有機的連携をもとに、「脂質免疫」という新しい生体応答システムの全容解明とそれを基盤にした新しいワクチンパラダイムの確立を目指した研究を展開している。結核を中心とした抗酸菌感染症研究は、菌と宿主の co-evolution の視点から研究を深め、新たな遅延型アレルギー応答の実証へと結実した。また、脂質免疫はウイルス感染症においても重要な役割を果たしているとの考えから、当研究所霊長類モデル研究領域・五十嵐教授との共同研究を進め、SIV 感染サルにおける脂質免疫標的分子を同定した。脂質免疫という切り口から結核やエイズの制御を目指す研究室の活動は、来年度以降さらに大きく展開するものと期待している。

松永勇准教授は、教室の結核プロジェクトを主導するとともに、薬剤耐性に関わる新たな遺伝子を同定し、その解析を進めている。また、平成 22 年 2 月に特定助教として着任した桑田啓貴博士は、表在性膀胱がんに対する BCG 療法の作用機序の解明を視野に、膀胱粘膜免疫の成立基盤を明らかにする研究を開始した。ウイルス研究所共同研究者の藤原永年博士（大阪市立大学講師）は、脂質生化学的手法を駆使して、結核菌感染細胞における脂質代謝を追究している。

また教室の学生は、それぞれ目覚ましい研究展開を見せた。小森崇矢君（医学部に進学）は脂質を標的にした遅延型アレルギー応答の本態を、BCG 感染モルモットを用いて解明し、現在論文を投稿中である。森田大輔君 (D3) は、サルエイズモデルを用いた研究を継続し、標的となるウイルス脂質を同定するとともに、その T 細胞応答の詳細な分子細胞機序を明らかにし、論文投稿の準備をしている。浦川哲生君 (M2) は、休眠結核菌の実験系を確立し、休眠状態において特異的に発現する脂質分子を同定した。小林千紗さん (M2) は CD1aTg/GM-CSF KO マウスの解析から、表皮ランゲルハンス細胞や胸腺 T 細胞における CD1a 分子の発現が、内因性 GM-CSF 非依存的であることを明らかにした。また新たに教室に加わった服部祐季さん (M1) は、モルモットの研究を精力的に展開し、休眠菌に関連した好酸球性アレルギー応答を見いだした。

結核とエイズを軸に、脂質免疫の本態の解明とその臨床応答を目指す研究は、ようやく目に見える形になってきた。教室員は、感染症研究の推進をもとに、ウイルス研究所の発展ならびに社会への貢献を目指し、日夜精力的に研究を行っている。

今年は、生命科学研究科の修士一回生として末永康裕、鈴木輔、前田一樹、松下正浩と横山智子の五名が入学し、中西育久は修士課程を修了してサンスター（株）に就職した。当研究室で博士研究員として研究を行っていた小林洋平は、理化学研究所脳科学総合研究センターを経て Harvard 大学に博士研究員として転出した。また、桐山真利亜は生命科学研究科で博士（生命科学）を取得し、Sysmex（株）の研究員として転出した。生命科学研究科博士後期課程の単位を取得した高橋涼香は徳島大学の研究員、南田佳孝は東レ（株）の研究員として転出した。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可能となっている。また、高村綾子は国際学生セミナーのサポートや研究科長業務の補助を行っている。米原は生命科学研究科の研究科長として2年目となり多忙を極めている。今年は研究室のメンバーが大きく入れ替わったが、研究室の新たに発展していくことが期待される。

本研究分野では、米原らが見いだ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。

当研究室で見いだした「染色体凝縮不全→二核細胞の出現→細胞増殖の進行（染色体の不安定化を伴い、がん化の原因となる）→EF-1 α （eEF1A1）の発現低下→caspase に依存しない新しい細胞死の誘導」という経路の生理機能をさらに解析するため、高市剛 eEF1A1 を高発現するトランスジェニックマウス（この新規細胞死が阻害されるマウス）の作製を試みている。伊藤亮は、p53 が機能しない細胞（多くのがん化しつつある細胞の状態）では、染色体に傷害を受けた後に生じる多核細胞に caspase に依存しない新規の細胞死が誘導されるという現象を見だし、その誘導の分子機構の解析を行っている。

我々が Fas シグナルとの関連で見いだした巨大分子 FLASH が付着がん細胞株の細胞周期 S 期の進行に必要不可欠であることを示してきたが、濱内珠美は FLASH と ARS2 の会合が細胞周期進行に関わる分子機構を解析し、ARS2 は FLASH と会合することにより FLASH タンパク質の安定化に寄与していることを示している。また、Kuang Wan-Fen は FLASH が転写制御分子複合体（CoREST 複合体）と会合していることを証明し、その結合様式や生物学的意義について解析を進めている。

一方、アポトーシスに必要不可欠の caspase に関する研究も行っている。黒木は caspase-8 が血球系細胞の分化と増殖にどのように関わるかについて、胎児肝細胞を用いた骨髓キメラマウスを作製して解析し、caspase-8 が血球形細胞の分化と増殖に必須であることを示した。また、この解析を発展させ、不死化する以前のマウス線維芽細胞において、caspase-8 が caspase に依存しない非アポトーシス細胞死の誘導を阻止していることを見いだしている。一方、ES 細胞を用いた遺伝子の発現誘導系や発現抑制誘導系を染田真孝が構築したが、この系において caspase-8 の発現抑制誘導を行って解析したところ、分化誘導に重要な特異的シグナル伝達系が強く増強されるとい

う新しい知見を見いだしている。これらの研究から caspase-8 の新たな機能が分子レベルで解明されると期待される。

異なったアポトーシス誘導機構に関わる Fas と Bim は免疫系で重要な機能を有してる。Fas に関しては、Balb/c の遺伝的背景下において Fas KO マウスが非常に高い血中 IgE レベルを示し、アレルギー性眼瞼炎を発症することを見いだしているが、福岡あゆみが兵庫医大の中西憲司研究室と共同研究を行い、B 細胞から IgE 産生を強く誘導する新しい細胞種の同定と解析を行っている。また、脾臓由来 B 細胞の抗原レセプターを慢性的に刺激すると、アポトーシスを抑制する CD40 刺激が存在しても、Bim に依存したアポトーシスが誘導されることを見いだした高園園は、この細胞死を抑制することによって、試験管内で IgG2a や 2b といった抗体を産生するプラズマ細胞へと向かう B 細胞を調製できることを示し、その解析を行っている。

助教の李慶權は、アポトーシスと細胞増殖の調節機能の相関関係を、新たな観点から分子レベルで解析している。

生命科学研究科の助教（特命）の風間啓敬は、ネクローシス細胞から放出される HMGB1 は獲得免疫を誘導する活性を示すが、アポトーシス細胞からの HMGB1 は免疫応答を抑制のするという研究を進め、その免疫応答抑制に関わるホスト因子を同定している。

准教授の酒巻和弘は、様々なモデル生物（メダカ、カエルなど）を用いた caspase の機能解析、caspase-8 の進化学的解析、数理モデルを組み込んだ caspase の活性化と生理機能の関連解析を行う宇土同時に、新たに同定している caspase-8 特異的な基質タンパク質の機能解析も行っている。

助教の村上昭は、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。近年、活発な iPS 細胞研究等により、ES 細胞を未分化状態に保つ多くの因子が見出されている。しかし、分化を誘導した際に、その初期に関与する因子は殆ど知られていない。Wnt シグナルに注目して解析した結果、異なる Wnt シグナルが、一方では分化の抑制に、他方では分化の推進に働くという、相反する役割を果たしていることを見いだした。

本年度は、生命科学研究科の津川陽司（M1）が新たに加わりました。研究に参加しているのは、准教授の土方誠、研究補佐員の松田裕子、他の大学院生では、生命科学研究科の久島透嘉（D3）、Qi Yue（D3）、阿部雄一（D1）、清木麻季子（M2）の4名が在籍しています。

C型肝炎ウイルス(HCV)粒子はジスルフィド結合により二量体化したコアタンパク質で構成される。

我々は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染細胞の培養上清中に S-S 結合型 core 複合体を発見した。この培養上清の HCV 粒子画分にはこの core 複合体しか含まれておらず、また、NP-40 存在下でのみ protease K に感受性を示したことから、HCV のヌクレオキャプシドはジスルフィド結合型 core 複合体を基本単位として構成されていると考えられた。また、これは HCV 複製細胞内において小胞体で形成されており、この core 複合体は core の二量体であった。さらに core 二量体化には、アミノ酸残基 Cys128 が関与していることを明らかにした。Cys128 への点変異解析により、HCV 複製能、core の RNA 結合能や LD への局在には影響しなかったが、培養上清への HCV RNA や core の放出が著しく抑制され、それに関連して感染性も抑制された。また、競合阻害実験により変異株が野生株の粒子産生を阻害したことから、core 二量体が粒子形成に関与していることを発見した。ヌクレオキャプシド中の core 二量体はトリプシンに対して非感受性であったことから、トリプシン切断部位を多く含む core の N 末端側領域はそのほとんどがキャプシドの内側に存在する緻密な構造体を構成していると考えられた。

ヒト肝細胞ではウイルス感染初期に IRF7 依存的なインターフェロン α 遺伝子発現が起こる。

IRF3 や IRF7 は細胞の自然免疫系において重要な役割をもつことが知られている。これらの因子は RNA ウイルスが感染すると活性化されて 1 型インターフェロンの誘導に機能する。我々はこれまでに独自に樹立した不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞をもちいて C型肝炎ウイルスの感染増殖抑制には IRF7 が主要な役割を果たすことを示してきた。また IRF7 は多くの細胞においてウイルス感染によって誘導されたインターフェロン β によって誘導発現されることが知られているが、ヒト初代肝細胞ではウイルス感染なしに恒常的に発現していることがわかった。このことから我々はヒト肝臓特異的な自然免疫機構が存在すると考え、その詳細を検討している。そして我々はヒト初代肝細胞や不死化肝細胞ではウイルス感染の極初期（3 時間以内）にインターフェロン α 遺伝子の発現が誘導されることを見出した。IRF7 や RIG-I のドミナントネガティブ体の発現などの実験からこのインターフェロン α 遺伝子発現誘導は IRF7 依存的であり、RIG-I には依存しないことが明らかになった。

2010年度のメンバーは、藤田尚志（教授）、加藤博己（準教授）、高橋清大（助教）、尾野本浩司（非常勤職員）、小野口和英（非常勤研究員）、成田亮、呉成旭（生命科学研究科博士課程3年）、影山麻衣子、Yoo Ji-Seung（劉知昇）（生命科学研究科博士課程2年）、船曳正英（医学研究科博士課程2年）、應田涼太、常喜儒彦（千葉大学へ研究指導委託）、高松詩穂理、（生命科学研究科博士課程1年）、高橋あゆみ、Ng Chen-Seng（吳展昇）（生命科学研究科修士課程2年）、宮田奈緒、古賀悠里恵（生命科学研究科修士課程1年）、Wang Xiao（復旦大学、10-3月、交流学生）、Evren Karayel（Research Center for Molecular Medicine, Vienna, Austria、4-6月、共同研究）、Gabriel Fung（University of British Columbia, Canada、5-7月、インターンシップ）、竹村明澄、森本志保（技術職員）、森田裕弥（秘書）の延べ23名であった。研究室は本館耐震工事のため7月よりプレハブ建て北実験棟2階に移転し、2011年2月に本館4階へ戻る予定である。

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。

本年度の主要な研究成果である、ミトコンドリアによるRLRシグナル伝達機構の解明（PLoS Pathog. 2010 Jul 22;6(7):e1001012.）に関して概略を記す。

ウイルス感染細胞ではRIG-I-like receptor (RLR) が細胞質に蓄積したウイルス由来RNAを感知してI/III型インターフェロン遺伝子の活性化をはじめとする抗ウイルス自然免疫応答を誘導する。Interferon- β promoter stimulator 1 (IPS-1: MAVS, VISA, Cardifとも称される) はRLRから直接シグナルを受ける分子であるが、ミトコンドリアの外膜上に発現していることが知られている。IPS-1がミトコンドリア上に発現することがその機能に必須であることが知られているが、その分子機構については不明であった。ミトコンドリアがどのようにして抗ウイルス応答を制御しているかを解明することを目的として研究を行った。細胞内での分子局在を解析したところ、ウイルス感染、あるいは5'ppp-RNAを細胞内に導入することによってIPS-1が粒子状に凝集することを見いだした（図1）。

A

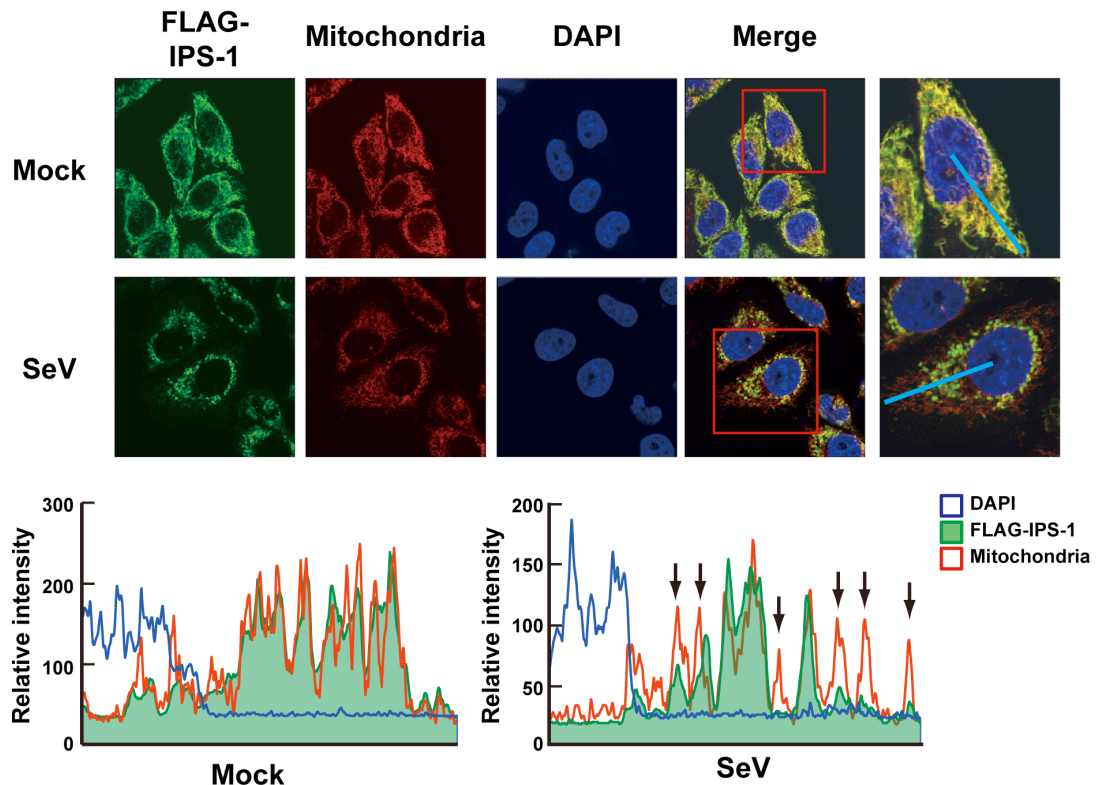


図 1 センダイウイルス (SeV) 感染によって誘導される IPS-1 の粒子状の凝集体

非感染 (Mock) および SeV 感染 HeLa 細胞を 12 時間後に固定し、IPS-1 (FLAG)、ミトコンドリア (Mitotracker) および DNA (DAPI) を染色によって可視化した。非感染細胞ではミトコンドリアの染色と IPS-1 の染色は完全に一致していることが蛍光強度の定量によって示されている (上図右端の青線の定量結果を下図左に示す)。これに対して感染細胞ではミトコンドリアと IPS-1 の染色が一部のミトコンドリアにおいて一致しない (ウイルス感染細胞での青線の定量結果を下図右に示す)。IPS-1 が凝集することによって IPS-1 の含量の少ないミトコンドリアが生じていることを示す。

さらにミトコンドリアの融合を制御している分子である Mitofusin 1 (MFN1)がこのIPS-1の凝集形成に関与しており、MFN1の過剰発現、ノックダウン、ノックアウトの結果、IPS-1の凝集、抗ウイルス応答に必須であることを見いだした。これらの結果はウイルス感染によって誘導されたシグナルがミトコンドリア上でアダプター分子の会合によって制御されていることを強く示唆する (図 2)。

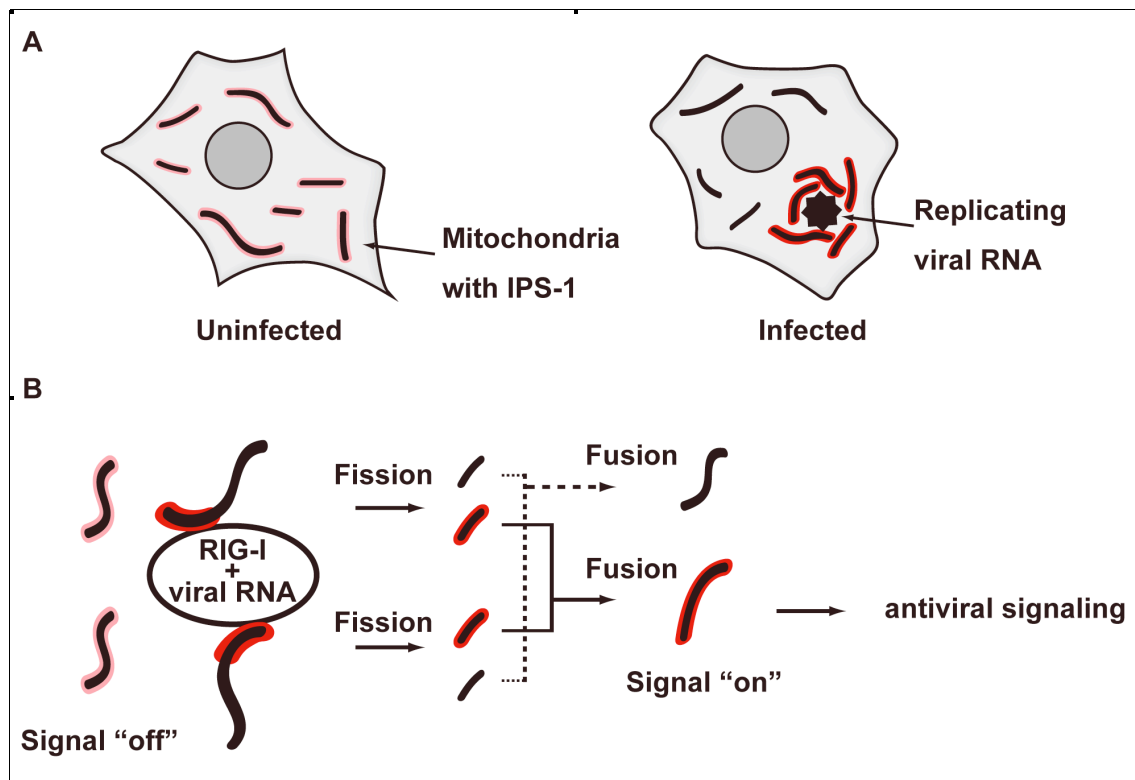


図2 MFN1 による IPS-1 の活性制御

A ウイルス感染によりミトコンドリア上に均一に分布していた IPS-1 は一部のミトコンドリア上に集積しそこで凝集体を形成する。この凝集体はウイルス感染の結果形成される、ウイルス RNA、RIG-I を含む複合体の周辺に形成される。

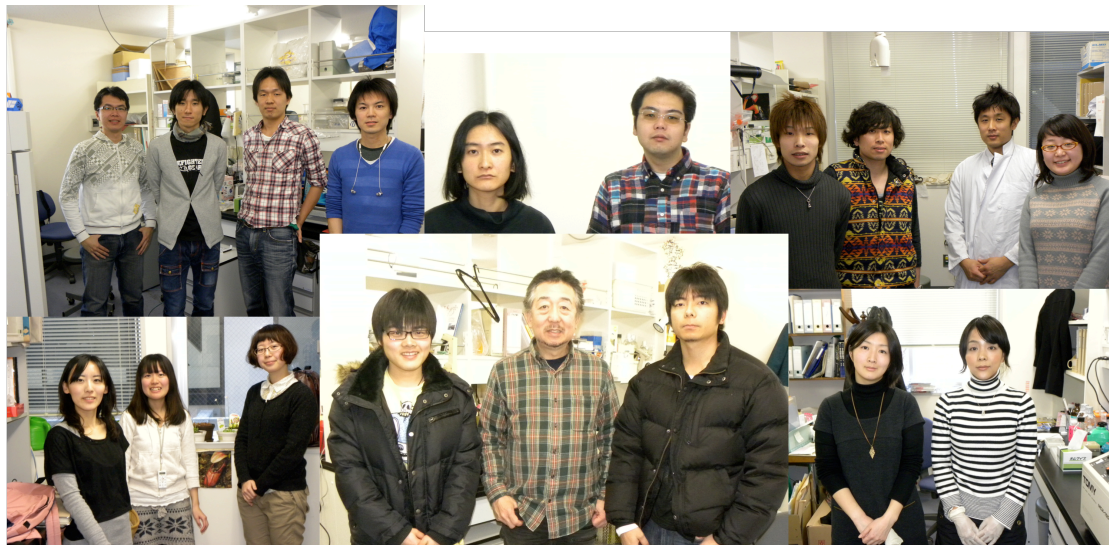
B ウイルス RNA、RIG-I を含む複合体は IPS-1 を誘引し、部分的な IPS-1 の凝集を引き起こす。ミトコンドリアの分裂、融合の結果、IPS-1 の凝集はさらに濃縮され、IPS-1 の活性化状態を維持することになり、転写因子のリン酸化などによるシグナルを下流に伝達する。

研究プロジェクト

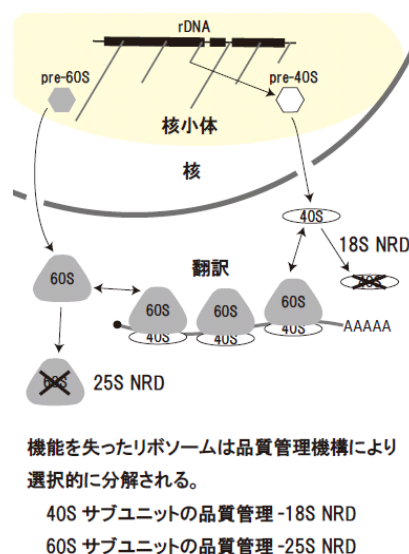
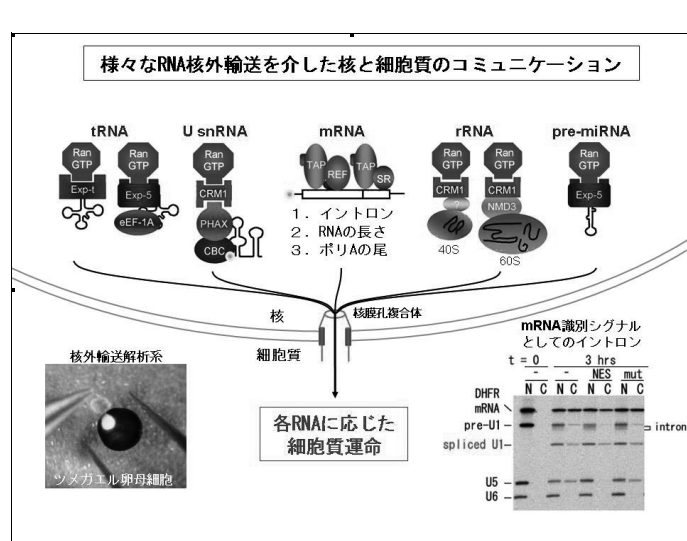
- 1) RIG-I の立体構造と活性化機構の解析 (高橋清、成田、影山)
- 2) RIG-I の細胞内局在と活性化の解析 (尾野本、呉、常喜、竹村、加藤)
- 3) マウス個体での RLR の機能の解析 (船曳、尾野本、森本、加藤)
- 4) RLR と自己免疫疾患の解析 (船曳、高橋あ、尾野本、加藤)
- 5) 各種細胞における抗ウイルス応答の網羅的解析 (尾野本、森本)
- 6) 抗ウイルス自然免疫反応とマイクロ RNA (應田、加藤)
- 7) 植物由来の二重鎖 RNA による抗ウイルス応答の研究 (宮田、尾野本)
- 8) 抗ウイルス応答におけるミトコンドリアの機能 (小野口、高松、)

- 9) 抗ウイルス応答における新規ヘリカーゼの関与の研究 (Yoo、尾野本)
- 1 0) 抗ウイルス応答の生細胞での可視化 (Ng、Wang、尾野本、小野口)
- 1 1) 5' ppp 構造に結合する蛋白質の探索 (古賀、小野口、成田、加藤)

当研究室で監修した、細胞工学：特集：抗ウイルス自然免疫応答-明らかになってきた非自己核酸認識システム-が出版されました。



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。中でも、「RNP の核細胞質間の輸送」と「RNP の品質管理機構」を大きな 2 つの柱として研究している。



2010 年には、3 月に 3 名が異動し、4 月に 2 名の M1 が入学した。その結果、大野研究室には、教授、秘書、2 名の助教、7 名の博士後期課程大学院生、3 名の修士課程大学院生が在籍することとなった。

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. 核外輸送における mRNA の ID エLEMENT の探索

我々は特に mRNA に焦点を絞り、mRNA がもつ様々な特徴を、別種の RNA である U snRNA に移植したキメラ RNA を作製し、その RNA の核外輸送を調べることで、mRNA を mRNA として識別させている特徴 (mRNA の ID ELEMENT) を探索してきた。「イントロンが存在すること」、イントロンがない場合には「強い高次構造をとらない、ある長さ以上の RNA 領域が存在すること」あるいは「適切な長さのポリ A 配列が存在すること」の 3 つの内、どれかの特徴を 1 つでも持つ RNA は、核内で mRNA と認識され、mRNA の輸送因子群が RNA 上に集合することを、現在までに明らかにした。

このイントロン ID 発動の実働分子は、当初は、おそらく別グループにより報告された EJC (Exon Junction Complex) と呼ばれるタンパク質複合体であると考えられた。EJC はスプライシング反応に共役してスプライシングの完了した mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする。しかし、スプライシング依存的に mRNA 上に特異的に形成され、mRNA の核外輸送因子を RNA 上に呼び込む働きをする、もうひとつのタンパク質複合体 TREX (TRANSCRIPTION EXPORT) 複合体が後ほど同定され、mRNA の ID の実体についての情報は現在やや混乱している。

RNA の長さ ID を認識するタンパク質に関しては後述する。ポリ A 配列 ID の認識には、既知のポリ A 結合タンパク質が関与していると思われるが、詳細な機構は現時点では不明である。

2. RNA の長さを図る機構

上の結果は、細胞の中の何らかのタンパク質因子が、核外輸送の際に RNA の長さを検知している事を強く示唆している。この現象を再現する試験管内の系をつくり、長い RNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構に迫ろうとしている。2010 年は、長い RNA 上から、U snRNA の輸送因子 PHAX を解離させる活性を精製し、質量分析によりその候補因子を複数同定した。現在、これらの候補因子が本当に RNA の長さを図る因子であるかどうかを調べているところである。

3. U snRNA 核外輸送に関与する新規因子

上の精製の過程で、RNA への PHAX の結合を増強する別の活性を同定し、その活性を精製し質量分析を行うことにより候補因子を同定した。この因子は、U snRNA 核外輸送に関与する新規因子であ

ることが期待される。

4. mRNA 前駆体の核内保持機構

イントロンが除かれる前の mRNA 前駆体が細胞質に輸送されてしまうと大きな問題が起こる。まず、スプライシングが起こらないため正しいタンパク質が発現できなくなる。また、mRNA 前駆体が翻訳されてしまうとドミナントネガティブ活性のある異常タンパク質が産生されるおそれがある。ところが実際は、mRNA 前駆体はスプライシングが終わるまで核中に留められていて細胞質に現れることはない。この mRNA 前駆体の核内保持の分子機構は、遺伝子発現に重要であるにも関わらず、よく分かっていない。出芽酵母を用いたいくつかの遺伝学的先行研究があるのみである。脊椎動物では、酵母と比べてその遺伝子が桁違いに多くのイントロンを含んでいることから、酵母よりもさらに周知な機構によって mRNA 前駆体の核内保持を行っていると考えられるが、その機構の研究には全く手がつけられていない。変異解析の結果、アフリカツメガエルの卵母細胞内では、イントロンの 3' スプライスシグナルが mRNA 前駆体の核内保持のために最重要であるという結果を得た。それに結合する U2AF という因子が既に同定されているので、U2AF が mRNA 前駆体の核内保持に関与すると考えられ、その詳細な機構を調べている。また、哺乳類培養細胞でも、因子のノックダウン法や RNA への因子の tethering 法によって、mRNA 前駆体の核内保持に関与する配列、トランス因子候補を別途探索している。

5. HIV-1 Rev タンパク質による RNA 核外輸送複合体のリモデリング

上述のように、通常はイントロンを含む mRNA 前駆体は細胞質へ輸送されず、スプライシングにより成熟 mRNA に変換されるまで核内に留まる。エイズウイルス HIV-1 は、自身のゲノムにコードされる Rev 蛋白質を用いて、スプライシングを全くあるいは部分的にしか受けていないウイルス RNA を細胞質に輸送させる。これは、核外輸送シグナル (NES) を持つ Rev がウイルス RNA 上の RRE と呼ばれる RNA 配列に結合することによって、RNA 核外輸送経路を通常の mRNA のそれから、NES 受容体 CRM1 依存性のそれへとスイッチする事によって成し遂げられる。この RNA 核外輸送経路のスイッチングにおいて、ウイルス特異的因子 Rev と宿主側の mRNA 輸送因子群の間の相克がいかにして解消されるのかについては全く明らかではない。アフリカツメガエルの卵母細胞核への微量注入法を用い、イントロンを含むウイルス RNA を模擬したモデル RNA の核外輸送経路が、Rev によって宿主型からウイルス型へスイッチすることを確認した。さらに、Rev が輸送経路をウイルス型にするだけでなく、宿主側の輸送経路を阻害していることがわかった。この阻害効果の分子機構を解析すると共に、実際の HIV-1 感染細胞に近い系でも同様の現象が見られるかどうかを検定している。

6. M 期における遺伝子発現制御

哺乳類では、M 期にはほとんどすべての遺伝子発現はオフになることが知られている。その分子機構の一端を研究するため、我々は、mRNA スプライシング因子であると同時に mRNA の核外輸送因子でもある UAP56 という因子の活性が、細胞周期においてどのように調節されているのかを詳細に調べている。特に、細胞周期特異的リン酸化による制御に焦点を当てている。

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。

1. 機能不全リボソーム粒子の分解機構

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。我々は、25S NRD の分子機構を明らかにする目的で遺伝学的スクリーニングを行った結果、特定のユビキチンリガーゼ複合体の構成因子が 25S rRNA の分解に必要であることを明らかにすることができた。また、機能喪失した 60S サブユニット上のタンパク質因子がユビキチン化されていることも分かった。さらに、25S NRD にはプロテアソームの関与が必要であることも明らかになり、翻訳の過程で異常と認定されたリボソーム粒子上の (少なくとも一部の) タンパク質成分がプロテアソームによって分解されてから、RNA 成分が分解されるというシナリオが浮かび上がってきた。巨大で極端に安定な完成品 RNP を解体する際にまずプロテアソームでタンパク質成分を分解するというのは、ひょっとしたら一般的な原則なのかも知れない。ただし、小(40S)サブユニットの品質管理 (18S NRD) にユビキチン/プロテアソーム

系が関与しているという証拠は今のところない。

2. 紫外線で損傷した rRNA の修復

上記のように、異常な RNA は基本的に分解される。DNA の場合と違って相補鎖によって情報のバックアップがなされていないので元通りに修復することが難しいし、RNA は遺伝子 DNA というマスターファイルからいくらかでもコピーすることができるからである。他方タンパク質の場合、変性してしまったら細胞はまず構造の巻き戻しを行おうとし、それが無理であれば分解する。RNA 分子は、一部のウイルスでは DNA にかわってゲノムとして利用されているしタンパク質のように触媒活性を発揮することもできることから考えて、DNA とタンパク質の両方の性質を持っているともいえる。このことから、異常な RNA は常に分解経路に入るわけではなく、修復される場合もあるのではないかという予想が生まれる。しかし、DNA の場合と違って相補鎖がないので、修復といってもかなり特殊な機構になるだろうことは想像に難くない。実際、アルキル化剤によってアルキル化された RNA が細胞内で酵素的に脱アルキル化されるという例がある。また、リボトキシンによって切断された tRNA 断片がライゲーションされ、しかも同じリボトキシンによって 2 度と切断されることのないように切断部位の塩基が修飾されるという RNA 修復かつ一種の免疫機構が示唆されている。本研究室では、完成品リボソーム粒子に起こった紫外線障害が一種の修復を受けることを示唆する結果を得ていて、その分子機構を研究している。

当グループに大学院生、そして教務補佐員として約6年間在籍した花房朋は2010年3月に学位を取得して、国立遺伝学研究所の博士研究員として移動した。技術補佐員の佐々木克仁も2010年3月で退職したが、森下和茂は引き続き技術補佐員として勤務した。

染色体の複製に関わる DNA ポリメラーゼは遺伝情報を忠実にコピーするという役割を果たすために、正常な鋳型 DNA の塩基の向かい側に相補的な塩基を挿入し、ごく稀に誤った塩基を挿入した場合には自らの持つ 3'-5' exonuclease 活性による校正機能によってその誤まって挿入した塩基を除去して正しい塩基を挿入して、再び複製を継続する。しかし、染色体 DNA は内的、あるいは外的要因によって常に損傷を受けており、このような忠実度の高い複製型 DNA ポリメラーゼが損傷部位に遭遇するとそこで進行を停止してしまう。そのような場合には、校正機能を持たず、活性部位が広く、大きいために損傷を受けた塩基をも鋳型として DNA 合成を行う損傷バイパス型の DNA ポリメラーゼが複製型 DNA ポリメラーゼに置き換わって損傷塩基とそれに続く数塩基ほどをコピーし、その後には再び複製型 DNA ポリメラーゼが DNA 合成を行うと考えられている。

このような損傷バイパス (Trans-Lesion DNA synthesis、以下においては TLS と略す) に関わる DNA ポリメラーゼは大腸菌からほ乳類まで広く保存されて存在することが、2000年の前後に明らかになった。それらの多くは、従来の DNA ポリメラーゼ (A-, B-, C-及び X-ファミリーに分類されていた) とはアミノ酸配列上で類似性が認められなかったもので、新たに Y-ファミリーとして分類された。ヒトでは Y-ファミリーの酵素として Pol η , Pol ι , Pol κ および REV1 の4種類が存在するが、構造的にはそれらとは異なる Pol ξ もまた TLS に関わると考えられている。真核生物では DNA ポリメラーゼは発見順にギリシャ語のアルファベット順にで表すことになっており、Pol ξ は出芽酵母において Pol α , Pol β , Pol γ , Pol δ , Pol ϵ に続く6番目に見つかった DNA ポリメラーゼである。ゲノム配列の分かった真核生物のほぼ全てに Pol ξ , Pol η および REV1 は存在し、一方 Pol ι あるいは Pol κ を持たないものも存在する。Y-ファミリーに属する Pol η , Pol ι , Pol κ および REV1 はそれぞれ一つのサブユニットから成るのに対して、Pol ξ は REV3 触媒サブユニットと REV7 補助サブユニットから構成される。REV3 は Pol δ の触媒サブユニットとアミノ酸配列が類似しているので、B-ファミリーに分類される。機能的には、Y-ファミリーの DNA ポリメラーゼが損傷の向かい側に塩基を挿入して、それ以降の伸長反応を行うことが出来ない場合に Pol ξ はその後の数塩基分の伸長反応を行うと考えられている。

ヒト Pol ξ の REV3 サブユニットは全長が 3,130 アミノ酸の大きなタンパク質であるが、REV7 サブユニットは全長が 211 アミノ酸からなり、スピンドルアッセムブリーチェックポイント (以下、略して SAC とする) に関わる MAD2 と 20 数%の相同性を持つことから MAD2L2 (あるいは MAD2B など) とも呼ばれる。MAD2 は細胞分裂時に相同染色体が娘細胞に分配されるときに、セントメロメアにス

ピンドルが結合していない場合のチェックポイント機構に働き、MAD1 と結合して活性型になると Anaphase-promoting complex (APC) の活性化因子である CDC20 と結合してその機能を阻害する。MAD2L2/REV7 は、CDC20 のホモログであり、CDC20 の後に APC の活性化に働く因子である CDH1 と結合して、その活性を阻害するという報告が過去になされていた。また、赤痢菌がヒト細胞に感染した場合には赤痢菌のコードする IpaB タンパク質が MAD2L2/REV7 に結合するので、CDH1 の機能を制御できなくなるというモデルも提唱されている。また、hREV7 は REV3 以外にも REV1 の C 末端領域、そして TLS には無関係と思われる ADAM9 (a disintegrin and metalloprotease) や ELK-1 (Ets-like transcription activator) にも結合することが知られている。

当グループでは hREV7 が hREV3 のどの部分に結合するかについて解析し、hREV3 の中央部分に存在する 1877-ILKPLMSPP-1885 という 9 アミノ酸からなる短い配列 (Minimum Core Sequence, 略して MCS) が hREV7 との結合に必要、且つ十分であり、またその C 末端側の数アミノ酸が存在すると hREV7 との結合が促進されることを見いだした。更には、ADAM9 や ELK-1 にはこの 9 アミノ酸に類似した配列が存在し、そこに hREV7 が結合することも明らかになったが、それらの場合には C 末端側の配列が存在することが hREV7 との結合に不可欠であった。意外なことに、hMAD2 もまたその 9 アミノ酸に結合することが分かった。しかし、hMAD2 は ADAM9 や ELK-1 の hREV7 結合配列には結合せず、一方 hREV7 は MAD1 や CDC20 の hMAD2 結合配列には結合しなかった。hMAD2 と hREV7 との相同性は全体としては 20 数%に過ぎないが、両者のタンパク質間相互作用に重要なアミノ酸は良く保存されているので、同じアミノ酸配列を認識するのであろう。Pol ζ が安定な複合体として存在するには hREV3 と hREV7 との結合はかなり強固なものである必要があるので、hREV3-MCS は hREV7 の結合に (最) 適化した配列であると考えられる。そのために、hMAD2 も hREV3-MCS に結合しうるのであろう。一方、hREV7/MAD2L2 が結合するとされてきた CDH1 には hREV3-MCS に類似した配列は存在せず、酵母 2-ハイブリッドアッセイでは hMAD2 と hCDC20 との結合が観察されるのと同じ条件下でも hREV7/MAD2L2 と hCDH1 との相互作用は観察されなかった。また、REV7 を完全に欠失させた DT40 変異株や hREV7 の発現をノックダウンさせたヒト細胞などにおいてもチェックポイント異常は見つかっていないので、hREV7 と hMAD2 はそれぞれ TLS と SAC に働くと考えられる。

出芽酵母の REV7 と hREV7 との間におけるアミノ酸配列の相同性は 25% であるが、出芽酵母の MAD2 と hMAD2 との間の相同性は 43% である。出芽酵母の MAD2 は hREV3-MCS に結合するが、出芽酵母の REV7 は hREV3-MCS に結合しないことも分かった。進化を通じて、MAD2 は良く保存されているのに対して、REV7 の保存度はそれほど高く無い。それは何故であろうか？ 出芽酵母や分裂酵母の REV3 において、それぞれの REV7 と結合する配列を決定した。確かに、類似性はあるが、微妙に異なっている。REV7 の構造上の違いが、結合認識配列の違いとどう関連しているのか、興味ある問題である。

今年、2010 年 3 月に教務補佐員の坂部朋美が退職した。4 月には我妻慶祐が医学研究科博士課程に、崔広為が医学研究科修士課程に、設楽宗一郎が生命科学研究科修士課程に入学した。さらに、6 月には技術補佐員として林寛之が参加した。このような推移で、生体防御研究分野は現在、教授 1 名、助教 3 名、大学院生 5 名、技術職員 1 名、技術補佐員 1 名、秘書 1 名の総勢 12 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細胞系列決定と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 (IL-7) による T 細胞抗原受容体 (TCR) 遺伝子の制御、IL-7 レセプター (IL-7R) の発現制御、IL-7 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。

(1) STAT5 による TCR V γ 領域のクロマチン制御

IL-7R α ノックアウトマウスでは、J γ 遺伝子だけでなく V γ 遺伝子の germline 転写も低下している。また、TCR γ 遺伝子座では、STAT5 の結合モチーフが J γ プロモーターのみならず V γ 領域内の制御領域 HsA にも保存されている。以上のことから、IL-7R シグナルにより STAT5 が HsA と結合して V γ 領域のクロマチンを制御している可能性が示唆される。まず、RAG-2 KO マウス胸腺細胞では、V γ 5、V γ 2、HsA のヒストンアセチル化のレベルが高く、IL-7R α KO マウスでは低下していた。また、サイトカイン依存性細胞株 Ba/F3 細胞において、サイトカイン刺激により V γ 5 と HsA のヒストンアセチル化と germline 転写が上昇した。さらに、この時 V γ 5 のクロマチン accessibility も上昇していた。また、RAG-2 KO マウス胸腺細胞やプレ T 細胞株 Scid.adh を IL-7 で刺激すると、STAT5 が HsA にリクルートされた。一方、STAT5 は V γ 5 プロモーターには結合しなかったし、V γ 5 プロモーターを直接活性化することはなかった。以上の結果から、STAT5 が HsA に直接結合しヒストンアセチル化を誘導する一方、V γ 5 プロモーターは間接的に活性化することが示唆された。(谷一靖江、生田宏一)

(2) プレ TCR シグナルは STAT5 と Runx のエンハンサーへの結合を抑制して TCR γ 遺伝子座をサイレンシングする

マウス TCR γ 遺伝子座は $\alpha\beta$ T 細胞において転写が抑制されており、TCR γ サイレncing と呼ばれている。これまでに、プレ TCR シグナルによる胸腺細胞の増殖がサイレンシングを誘導することが知られていた。また、転写因子の STAT5 と Runx はエンハンサーである E γ と HsA と結合して TCR γ 遺伝子座の転写を亢進させる。そこで、CD3 抗体を投与後の RAG-2 KO マウス胸腺細胞を解析すると、IL-7R の発現、STAT5 のリン酸化、STAT5 と Runx の E γ と HsA への結合が低下していた。また、 $\alpha\beta$ T 細胞株に STAT5 や Runx の発現ベクターを導入すると、TCR γ 遺伝子の転写が誘導された。さらに、Runx3 トランスジェニック (Tg) マウスでも、 $\alpha\beta$ T 細胞において TCR γ 遺伝子の転写が誘導されていた。以上の結果から、プレ TCR シグナルが、STAT5 と Runx

の E γ と HsA への結合を抑制し、TCR γ サイレンシングを誘導していることが示唆された。（谷一靖江、生田宏一）

（３）STAT5 は J γ プロモーターの STAT モチーフを介して J γ 遺伝子の組換えを制御する

マウス TCR γ 遺伝子座は、それぞれ V γ 、J γ 、C γ 遺伝子断片とエンハンサーを持つ γ 1 $\sim\gamma$ 4 の４つのクラスターからなる。これまでに、STAT5 が J γ プロモーターに存在する STAT モチーフに結合し、転写共役因子のリクルートとヒストンアセチル化によりクロマチンを開くことで、転写と V-J 組換えを誘導することを報告した。しかし、この STAT モチーフの生体内における機能は不明であった。そこで、J γ 1 プロモーターの STAT モチーフ変異マウス（J γ 1P-Stat-mut）と J γ 1 プロモーター欠失マウス（ Δ J γ 1P）を作製した。胸腺細胞や小腸上皮内リンパ球をフローサイトメトリーで解析した結果、いずれの変異マウスにおいても γ 1 クラスターの V γ 2 や V γ 5 を発現する $\gamma\delta$ T 細胞が著しく減少した。また、皮膚上皮内に局在する V γ 3 $^{+}$ T 細胞も減少した。一方、 γ 4 クラスターの V γ 1.1 $^{+}$ T 細胞には変化がなかった。さらに、いずれのマウスにおいても γ 1 クラスターの V-J 組換えが著しく障害されていたが、他のクラスターの組換えは変化がなかった。以上の結果から、J γ 1 プロモーターへの STAT5 の結合が生体内における J γ 1 遺伝子の組換えに不可欠であることが明らかになった。（我妻慶祐、梁冰霏、谷一靖江、生田宏一）

（４）IL-7R は CD8 T 細胞の分化と末梢 T 細胞の維持を制御する

IL-7R はリンパ球の分化と維持に重要な働きをしている。IL-7R α KO マウスでは $\alpha\beta$ T 細胞が劇的に減少し、 $\gamma\delta$ T 細胞は完全に欠失する。しかし、T 細胞分化の後期における IL-7R の役割については詳しく解析されていない。この問題を明らかにするために、我々は第 2 エクソンの両側に loxP 配列を挿入した IL-7R α -floxed マウスを作製し、Cre 組換え酵素を胸腺 CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ 段階から発現する CD4-Cre Tg マウスと交配してコンディショナル KO マウスを得た。その結果、CD4-Cre x IL-7R α ^{flox/flox} マウスでは、胸腺の全細胞数は変化しないが、CD8 T 細胞の細胞数が著明に減少した。末梢では、リンパ節やパイエル板の数は変化がなかったが、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞が減少し、 $\gamma\delta$ T 細胞が増加していた。これらの結果から、IL-7R が CD8 T 細胞の分化と末梢の CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の維持を制御することが明らかとなった。（谷一靖江、阿部昌史、生田宏一）

（５）リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布

IL-7 は胸腺や骨髄のストローマ細胞や上皮細胞が産生するサイトカインであり、リンパ球の増殖・生存・分化・成熟に不可欠である。しかしながら、リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能については不明の点が多い。我々は、この問題を明らかにするために、IL-7-GFP knock-in マウスを作製した。IL-7-GFP マウスでは骨髄ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、腸管上皮細胞とともに、リンパ節やパイエル板の T 細胞領域ストローマ細胞やリンパ管内皮細胞で GFP が発現していた。さらに、DSS にて大腸炎を誘導すると大腸上皮細胞における GFP の発現が上昇した。したがって、IL-7-GFP マウスは生理的ならび病的状態における IL-7 産生細胞を明らかにするために有用であることがわかった。（原崇裕、設楽宗一郎、崔広為、谷一靖江、生田宏一）

（６）IL-7 の局所における機能

IL-7 は皮膚・腸管・胸腺の上皮細胞、骨髄・胸腺の間葉系ストローマ細胞、そして脾臓とリンパ節の細網細胞によって産生される。しかし、それぞれの細胞が産生する IL-7 の局所における役割についてはほとんどわかっていない。この問題を明らかにするために、我々は IL-7-floxed マウスを作製した。このマウスを FoxN1-Cre Tg マウスと交配し、それぞれ胸腺上皮細胞でのみ IL-7 を欠損したコンディショナル KO (cKO) マウスを得た。FoxN1-Cre x IL-7^{flox/flox} マウスでは胸腺の全細胞数と $\gamma\delta$ T 細胞数が 1/15 に減少した。この結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が胸腺細胞の増幅と生存に大きなはたらきをしていることが明らかとなった。さらに、小腸の $\gamma\delta$ 型上皮内リンパ球が著しく減少したことから、この細胞集団が胸腺に由来することが示唆された。次に、Albumin-Cre Tg マウスと交配し、肝細胞でのみ IL-7 を欠損した cKO マウスを得た。このマウスでは成体肝臓における NKT 細胞が減少し、胎児肝臓における B 細胞の分化が低下していた。この結果から、肝細胞が産生する IL-7 が肝臓における NKT 細胞の維持や B 細胞の分化に一定のはたらきをしていることが明らかとなった。（原崇裕、梁冰霏、設楽宗一郎、我妻慶祐、谷一靖江、生田宏一）

（７）膀胱癌細胞に発現しているタンパク質カルレティキュリン測定キットの作成

ヒト尿中のカルレティキュリン (CRT) をデュラポアフィルターによるイムノブロット法で定量すると、膀胱癌患者では対照患者に比べて非常に高い値が得られている（影山ら Clin Chem 2004）。そこで、尿中の CRT を測定する ELISA 検査キットの開発を試みた。既に作成している抗 CRT モノクローナル抗体 5 種を組み合わせた酵素 (HRP) 発色による測定キットモデルでは、上記で用いてきたイムノブロット法とは異なり、CRT 検出に十分な感度が得られなかった。新規抗体の組み合わせを試行するために、新たなモノクローナル抗体の作成を行う予定である。（上田正道）

2010 年は 3 月に淀井淳司(教授)が退官し名誉教授となった。また、孫安生(助教)が異動し、望月芳香はスイスに留学した。現在、感染防御分野では増谷弘(准教授)、松尾禎之(研究員)、渡辺理江(共同研究員)、古川鈴代(教務補佐員)、医学研究科大学院生、陳吉吉(D4)、正木聡(D3)、生命科学研究所大学院生、吉原栄治(D3)、Dorys Andriana Lopez-Ramos (M2)、の総勢 8 名で研究を行っている。

感染防御分野では、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞株から単離したチオレドキシン (thioredoxin)、およびその関連分子 thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)/Txnip や transmembrane thioredoxin-related protein (TMX)を中心に、ウイルス感染症、発ガン抑制、糖尿病、炎症制御の分子機構の解析を行っている。今年度の成果、研究活動は以下のとおりである。

1. thioredoxin

thioredoxin はペルオキシレドキシンと共役して活性酸素種を消去する抗酸化タンパク質として働くほか、タンパク質の酸化還元 (レドックス) を調節する。現在、TRX の臨床応用を目指し、急性肺障害や慢性閉塞性肺疾患の病態の解明と治療法開発のための thioredoxin および関連分子の抗炎症作用の分子機構の解析を進めている (医薬基盤研受託事業 H18-H22 年度 ; チオレドキシンによる急性呼吸器疾患新規治療法の開発)。さらに、共同研究によりインフルエンザウイルス感染症に対する thioredoxin の効果を検討している。thioredoxin の様々なストレスに対する生体防御機能が期待されている。経済産業省「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発／植物利用高付加価値植物製造基盤技術開発」(H18-H22 年度 ; 「医・農・工融合によるヒトチオレドキシン 1 産生レタスの生産技術の開発」) では、奈良先端科学技術大学院大学との共同研究を進めている。

2. Transmembrane Thioredoxin-related Protein (TMX)

TMX は松尾らによって同定された小胞体膜上に存在する膜貫通型の TRX ファミリー分子である。TMX は主に膜タンパク質を標的とした酸化還元酵素として働き、タンパク質の品質管理に関わることを示してきた。また、TMX 遺伝子欠損マウスを作製し、ストレス応答におけるチオレドキシンファミリー分子の生理機能について解析を進めている。TMX 遺伝子欠損マウスでは炎症応答の異常、特に酸化ストレスの発生を伴う肝障害モデルにおいて、細胞死のシグナルに対する感受性の増大が認められた。現在、薬剤投与後の肝臓における遺伝子の発現変動、および標的分子との相互作用等を指標に、TMX の示す生体防御作用の分子機構について解析を行っている。

3. TBP-2

thioredoxin の結合蛋白質として当研究室で同定した TBP-2 は Txnip と呼ばれ、 α arrestin ファミリーに属する蛋白質であり、癌抑制、糖・脂質代謝、樹状細胞活性化、NKT 細胞などの免疫炎症制御などに多彩な機能を持つことをこれまで示してきた。また、TBP-2 遺伝子欠損 (TBP-2^{-/-}) マウスの検討から TBP-2 は絶食応答に必須の分子であることを示してきた。

今年度は、TBP-2 は、成人 T 細胞白血病(ATL)などの治療に用いられる、グルココルチコイドによる白血病細胞のアポトーシス制御に重要な分子であり、グルココルチコイド感受性に重要な分子であることを、前田道之博士の樹立したインターロイキン 2 (IL-2)依存性、非依存性増殖を示す HTLV-I 感染細胞株を用いた検討より明らかにした。

さらに、菌体成分 lipopolysaccharide (LPS)の TBP-2^{-/-}マウスへの投与により、TBP-2^{-/-}マウスは、炎症性サイトカインの変化を認めなかったが、高インスリン血症、低血糖、肝障害を起こし、致死に到ることを明らかにした。この結果より、TBP-2 が細菌感染症時のエンドトキシン血症時の代謝調節に重要な役割を果たすことを示した。

次に、京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学との共同研究で TBP-2^{-/-}マウスと糖尿病モデル ob/ob 肥満マウスとの交配実験を行うと、肥満は改善しないにもかかわらず、高血糖が顕著に改善することを明らかにした。その機構として、TBP-2^{-/-}マウスでは骨格筋での insulin receptor substrate (IRS)-1/Akt シグナルの活性化を伴ってインスリンの感受性が亢進しており、膵 β 細胞においてはミトコンドリア脱共役因子 uncoupling protein-2 (UCP-2)の発現抑制を伴って、グルコース刺激性のインスリン分泌が改善することを明らかにした。さらに、TBP-2 は、peroxisome proliferator- γ co-activator-1 α (PGC-1 α)の UCP-2 プロモーター上へのリクルートの増加を介して UCP-2 の転写を調節していることを示した。これらの結果より、TBP-2 は、糖尿病病態の悪化に関与している分子であると考えられ、TBP-2 を標的とした新たな糖尿病治療薬開発の可能性を示した。

本年度は、岩野さやかさんと渡邊美子さんが生命科学研究科 M1 として新たに参加し、総勢 7 人でスタートしました。当分野では、細胞増殖について、細胞分裂軸の方向を決めるメカニズム、分裂と代謝の連携、増殖と膜輸送の関連との観点から研究を進めています。

1. 細胞分裂軸制御に関わるキナーゼの網羅的スクリーニングと機能解析

細胞分裂軸を一定の方向に配置する現象は、様々なモデル生物の発生過程の器官形成で見られ、分裂軸により娘細胞の増殖能と分化能が左右されることが分かってきた。従って、分裂軸制御機構の解明は、臓器や器官の形成・機能維持を担う幹細胞の細胞運命決定機構の解明に繋がると考えられる。我々は、ヒト培養細胞の HeLa 細胞において、ゲノムワイドな siRNA スクリーニングを行い、インテグリン依存的に紡錘体を基質に平行に配置して分裂軸を制御する新しい機構を探索してきた。一次スクリーニングでは、各細胞の紡錘体軸の傾きを目視によって 3 段階評価し、31 遺伝子を候補として得た。二次スクリーニングでは、細胞の接着面と紡錘体軸との為す角度の数値を計測した。Z 軸方向に連続撮影した画像から紡錘体の 2 極を自動的に割り出し、紡錘体の傾きを自動的に計算する画像解析ソフトを新たに開発し、定量的に絞り込み有望な遺伝子を見出した。このひとつはチロシンキナーゼであり、阻害剤も既に存在したことからさらなる解析を行った。siRNA による抑制によって分裂軸がランダムになってしまうが、mouse cDNA を用いて add back を行うと分裂軸がまた水平になる、即ちレスキューされたことから、確かに分裂軸方向を制御する新たな遺伝子が見出されたことがわかった。一方でキナーゼ活性のない変異体を add back させてもレスキューできなかったことから、チロシンキナーゼの活性が重要であることが示唆された。このことはキナーゼ活性阻害薬での処理によっても分裂方向がランダムになったことから確かめられた。このチロシンキナーゼのキナーゼ活性は細胞周期依存的に変動し分裂期に最大となり、キナーゼ活性と分裂軸の方向制御のタイミングが一致することがわかった。また阻害剤のマウスへの投薬により、胎仔皮膚基底層での細胞分裂軸方向にも異常が生じることを見出した。さらに、ノックアウトマウスを用いて胎仔皮膚基底層での細胞分裂軸方向を調べたところ、やはりランダムになってしまうことが観察された。現在、更なる分子メカニズムの解明と分裂軸方向の異常が皮膚発生に与える影響について解析を行っている（松村）。

2. コレステロール代謝産物と細胞分裂

コレステロールは様々なステロイドホルモンやビタミンの原料であり、生体内の恒常性の維持に必須の物質である。細胞内のコレステロール量は細胞周期の進行に伴って変動すること、細胞分裂

の進行にコレステロールが必要であることが報告されている。しかしコレステロール代謝産物が細胞分裂期において、どのような役割を担っているかについてはまほとんど検討がなされていない。本年度は、細胞分裂期におけるコレステロールの役割について、HeLa 細胞を用いて検討を行った。methyl- β -cyclodextrin の添加によりコレステロール除去すると、多極化した紡錘体をもつ細胞の割合が顕著に増加した。さらに、コレステロール合成に必須の squalene synthase や、細胞外からのコレステロールの供給を司る LDL receptor の発現を siRNA によりノックダウンした場合でも同様の異常が観察された。現在、コレステロール代謝物の関与について検討を行っている（濱崎）。

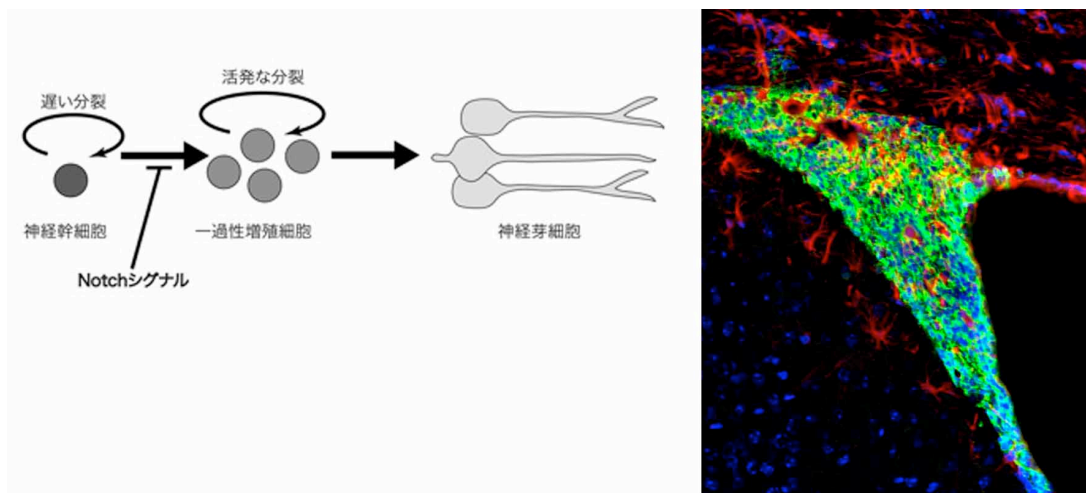
3. 分裂期制御因子による分裂期の初期エンドソーム制御機構

初期エンドソームは細胞内に取り込まれた分子を、その後の行き先に応じて仕分けする役割をもつ。分裂期において、初期エンドソームは生体膜融合の阻害や、細胞膜へのリサイクリング経路の抑制などの制御を受ける。このことは、初期エンドソームにおける分裂期特異的な輸送制御機構の存在を示唆するが、その詳細な分子メカニズムはよく解っていない。本研究では初期エンドソームにおける輸送が分裂期制御因子によって制御される可能性について検討した。その結果、分裂期制御因子が初期エンドソーム制御因子である Rab ファミリーを介して、分裂期の初期エンドソームの動態や輸送を制御することを見出した（井川）。

当研究室には、平成 22 年 4 月から理学部 4 年の平野響子が新たに加わった。一方、日本学術振興会特別研究員の丹羽康貴は、神戸理研にポスドクとして移った。影山は、2 月はプサン、4 月は台湾、6 月はリスボン、ロンドン、パリ、9 月から 10 月にかけてサンパウロ、ドレスデン、アテネで招待講演を行った。今吉格と Tan SiokLay は 6 月にパリで、小林妙子は 10 月にアテネで開催されたミーティングにおいて発表を行った。その他、教室員の多くが、発生生物学会（京都）、神経科学会（神戸）、生化学会・分子生物学会合同大会（神戸）等の国内学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生過程を転写因子レベルで明らかにするというもので、特に、塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ因子(bHLH 因子)に注目している。bHLH 因子 Hes1 や Hes7 は 2 時間周期の生物時計として機能するが、その分子機構や役割については不明の点が多く、今後さらに解析する予定である。

本年は、以下に記すように、成体脳における神経幹細胞の制御機構や胚性幹細胞の分化制御機構に関していくつかの重要な研究成果をあげることができた（下図）。また、当研究室の胚性幹細胞研究が 4 月 3 日の NHK サイエンス ZERO で、成体脳ニューロン新生の研究が 6 月 26 日の NHK サイエンス ZERO で紹介され、注目を集めた。



図：成体脳ニューロン新生。（左図）成体脳では、神経幹細胞はゆっくりと分裂し、一過性増殖細胞を生み出す。一過性増殖細胞は、しばらく活発に増殖した後、神経芽細胞に分化する。神経幹細胞は、Notch シグナルによって維持される。（右図）Notch シグナルに必須な遺伝子 Rbpj を成体脳でノックアウトして 3 週間が経過した側脳室上衣下層。新生ニューロン(DCX 陽性)は緑色に、神経幹細胞およびアストロサイト(GFAP 陽性)は赤色に染色。Notch シグナルの阻害によって新生ニューロンが過剰生産されている。

(1) 胎児および成体脳の神経幹細胞の維持に Notch シグナルは必須な役割をもつ

Notch シグナルは胎児発生期の神経幹細胞の分化抑制と維持に必須な役割を果たしており、Notch シグナルが遮断されると神経幹細胞のニューロンへの分化が亢進し過ぎて、神経幹細胞維持ができなくなる事が解っている。成体脳神経幹細胞における Notch シグナルの役割を明らかにするために、Notch シグナルの細胞内伝達に必須の因子である RBPj の遺伝子を、成体脳神経幹細胞特異的にノックアウトし解析を行った。その結果、Notch シグナルが遮断されると、神経幹細胞は一過性増殖細胞へと分化するため維持されず、神経幹細胞が枯渇してニューロン新生が起こらなくなることが明らかになった。したがって、Notch シグナルは、一過性増殖細胞への分化を抑制することで、神経幹細胞を長期的に維持し、新生ニューロンが一生涯継続的に産生されることを可能にしていると考えられる。(今吉格)

(2) Hes1 は Notch シグナルを抑制することによって胚性幹細胞分化を制御する

胚性幹細胞は多様な分化応答を示す。(小林妙子)

2010 年は、ポスドクとして佐藤英次君、星野重樹君、医学研究科大学院博士課程の庄嶋貴之君、仲屋友喜君、人間・環境学研究科大学院博士課程の吉川禄助君、同修士課程の大畑拓司君、技術補助員（秘書兼務）の正玄裕子さん、そして私の総勢 8 名でスタートした。10 月には庄嶋君が就職して研究室を離れた。6 月にはウイルス研究所本館の耐震工事のために、研究室は再生医科学研究所（京都大学病院南西病棟）に移動した。移動に伴い、研究室のスペースは若干狭くなったが、居室が実験スペースから独立し、研究室のメンバーが落ち着いて実験や論文執筆を行うことができるようになった。

私がウイルス研究所に着任して 4 年が経過した（2010 年 12 月で 5 年）。現在行っている研究テーマのほとんどがウイルス研究所着任後に開始したテーマであり、研究室（新興ウイルス感染症センター病態解明チーム）設立当初のメンバーには、非常に苦勞をかけたと思っている。2010 年は、研究室設立当時のメンバーが蒔いた研究の「種」が芽生え、成長して、論文としての成果が出始めた年になった。幸いにして 2010 年は研究室の論文として（すなわち宮沢が責任著者の論文）、英文原著論文 13 報、英文総説 1 報、日本語総説 2 報を発表することができた。これらの成果は、研究室設立当初のメンバーと現在のメンバーの献身的な努力の賜物であると思っている。2011 年はさらなる飛躍があり、すばらしい成果が得られることを期待している。喜ばしいことに、大学院生の仲屋君と吉川君が 2011 年 3 月に開催される第 151 回日本獣医学会大会長賞の受賞が内定した。この受賞が研究室の発展の起爆剤となることを祈っている。

我々の現在の研究テーマは以下の通りである。1) 異種間臓器移植や再生医療などの新たな医療や、生ワクチンなどの生物学的製剤の製造の際に問題となる動物由来内在性レトロウイルスの研究、2) ウシ胎盤形成時に発現するウシ内在性レトロウイルスの探索と機能解析、3) 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、4) 慢性疲労性症候群患者における新規ヒトレトロウイルス (XMRV) の感染疫学調査、5) エイズの動物モデルとしてのネコ免疫不全ウイルスの研究、6) 霊長類研究所で発生したニホンザル出血症の病因解明。

1) 感染性ネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) の生物学的製剤への迷入

すべてのネコ属は感染性の内在性レトロウイルスである RD-114 ウイルスのゲノムを保有している。いくつかのネコ株化細胞 (CRFK 細胞) は感染性の RD-114-related ウイルスを産生している。そのため、それらの細胞を用いて製造されたワクチン中に感染性の RD-114-related ウイルスが混入するおそれがあると考えられた。我々は以前いくつかのネコの細胞を用いて製造されたネコ及びビヌ用弱毒生ワクチン中に感染性の RD-114-related ウイルスが混入していることを報告した (Miyazawa *et*

al., J. Virol.)。今回、ネコ株化細胞を用いずに製造されているイヌ用弱毒生ワクチン 2 種で感染性の RD-114-related ウイルスを検出した (Yoshikawa *et al.*, Biologicals)。これらのワクチンには弱毒化したイヌパルボウイルス (CPV) が含まれており、多くの CPV は CRFK 細胞を用いて分離されることから、CPV の種ウイルスに混入していたためにワクチン内に混入したと考えられる。また我々は、CRFK 細胞及び CRFK 細胞を用いて製造されたワクチン中より RD-114-related ウイルスを分離し、全塩基配列を決定したところ、RD-114-related ウイルスは RD-114 ウイルスとアミノ酸レベルでほとんど同一であることを証明した (Yoshikawa *et al.*, J. Clin. Microbiol.)。さらに我々は、CRFK 細胞由来の RD-114-related ウイルスより感染性クローンの作製に成功した (Yoshikawa *et al.*, J. Clin. Microbiol.)。

RD-114 ウイルスはこれまで異種指向性とされてきたため、ネコに感染しないと考えられてきた。しかし、今回我々は、いくつかのネコ由来株化細胞に対して RD-114 ウイルスが感受性であることを確認し、RD-114 ウイルスは多指向性であることを証明した (Okada *et al.*, Virus Res.)。現在のところ、RD-114 ウイルスの危険性に関して不明であるため、今後はネコ及びイヌに感染実験を行い、RD-114 ウイルスの危険性に関して調べていく必要があると考えられる。

2) ウシ胎盤で発現する新規内在性ベータレトロウイルスの同定

哺乳類のゲノムの約 10% はレトロウイルス由来の配列で構成されている。現在までに、様々な種で内在性レトロウイルス (ERV) 由来の感染性レトロウイルス粒子や機能的なタンパクの発現が確認されてきたが、ウシにおける報告はまだない。最近我々は、完全長のエンベロープ遺伝子 (*env*) が保存された 2 種のウシ ERV を同定し、それぞれを BERV-K1 および BERV-K2 と命名した (Baba *et al.*, J. Virol.)。分子系統樹解析を行った結果、BERV-K1 と BERV-K2 はともにベータレトロウイルス属に分類された。ウシの各組織について RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR を行ったところ、BERV-K1、BERV-K2 *env* はウシ胎盤や栄養膜由来細胞において発現していることが確認されたが、特に BERV-K1 *env* は胎盤で特異的に発現していることが明らかとなった。さらに我々は、各 *env* 内でのスプライシングにより発現する遺伝子を同定し、それぞれを *REBK1* および *REBK2* と命名した。REBK1 と REBK2 の機能について詳細な解析を行ったところ、どちらも核局在のタンパク質で、それぞれ BERV-K1 と BERV-K2 *env* mRNA の核外輸送に関わることが示唆された。また、BERV-K1 と BERV-K2 の *env* およびロングターミナルリピートには、*env* 内におけるスプライシング制御や *env* mRNA の核外輸送や翻訳に関わるモチーフが存在することが強く示唆された。現在までに、ウシ組織における BERV-K1 および BERV-K2 のエンベロープタンパク (Env) の発現は確認できていないが、以上の結果より、これらの Env が生理学的な機能を担うことは想像に難くない。今後、さらなる解析を行い、ウシにおける BERV-K Env の機能を明らかにしたい。

3) One step RT-PCR キットへのマウス内在性レトロウイルス由来 RNA の混入

我々が日本において慢性疲労症候群(CFS)患者の血漿中に異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス(XMRV)のウイルス RNA が存在するか否かを調査する前実験を行っていた際、One step RT-PCR キットを用いて XMRV の *gag* 遺伝子領域の一部を検出しようとしたところ、陰性対照の検体で陽性のバンドが予想通りの大きさと頻繁に検出された。我々はそのキット自体に内在性マウス白血病ウイルス (MLV) のゲノムまたは XMRV が極少量混入していたかも知れないと考え、2つの独立した研究室でそのキットの品質評価を試みた。(Sato *et al.*, Retrovirology)

One step RT-PCR キットは日本で4社から購入した。XMRV や他の MLV 関連ウイルスの *gag* 遺伝子を増幅させるために、XMRV 研究で広く使われているプライマーセット(419F と 1154R、GAG-I-F と GAG-I-R)を使用した。増幅された産物の塩基配列を決定し、既知の内在性多指向性 MLV (PmERV)、CFS 患者から分離された XMRV や他の MLV 関連ウイルスの塩基配列と比較した。

我々は1社の One step RT-PCR キットの酵素 mix に PmERV 由来の RNA が混入していることを見つけた。RT-PCR により増幅された混入産物の *gag* 領域の一部は第7染色体上の PmERV の配列とほぼ同一(99.4%の相同性)であり、最近 CFS 患者から検出・同定された MLV 様ウイルスに極めて類似していた(96.9 ~ 97.6%)。我々はその混入産物の *env* 配列の一部も決定し、それは PmERV の配列とほぼ同一(99.6%)であることがわかった。

CFS や前立腺癌患者における XMRV 感染の調査を行うときには、研究者は PCR や RT-PCR 検査に着手する前に XMRV ゲノムと同様に内在性 MLV ゲノムの混入の有無を注意深く評価すべきである。

4) ネコ免疫不全ウイルスのレセプタースイッチング現象の in vitro 解析

ネコ免疫不全ウイルス (FIV) は、細胞への侵入に①CXCR4 とネコ CD134 (fCD134) の両方を必要とするグループ、②CXCR4 のみ必要なグループ、の2つに分けられる。TM2 株を含む最初に分離されたウイルス株は、①のグループであり、それは、fCD134 が発現していないネコアストロサイト (G355-5 細胞) には感染することができない。前回の報告で、fCD134 を導入した G355-5 細胞 (G355-5 / fOX40 細胞) は TM2 株に感受性になり、持続感染細胞になった。本研究は、持続感染細胞から産生されるウイルス (TM2PI 株) のフェノタイプを解析した。興味深いことに、TM2PI 株はナイーブな G355-5 細胞でよく増殖し、TM2PI を接種した G355-5 細胞 (G355-5 / TM2PI 細胞) は持続感染細胞になった。TM2PI 株の G355-5 細胞への感染は、CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 によって阻害され、さらに、TM2PI 株は FeTJ 細胞や 3201 細胞のような、他の fCD134 陰性かつ CXCR4 陽性細胞にも感染した。さらに、TM2PI 株は、親株である TM2 株と比較したときに、Env タンパクに4つのアミノ酸置換が見られた。TM2PI 株は、FIV が CRFK 細胞に感染する際のトロピズムを決定していることで知られている Env の 407 番目のアミノ酸が lysine に置換して

いることが分かった。TM2PI 株は、ネコにおけるレセプタースイッチングのメカニズム解明と FIV 病態の研究で有用なツールになると思われる。(Ishikawa *et al.*, Vet. Microbiol.)

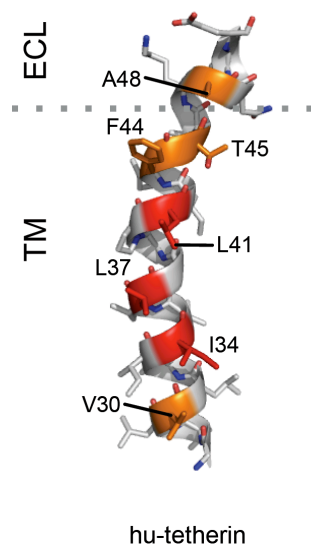
平成 22 年 1 月より 8 月まで、Harmen Kloosterboer がオランダのユトレヒト大学より短期インターンとして在籍した（医学研究科所属）。3 月に安藤良徳が生命科学研究科博士課程を修了・学位を取得し、塩野義製薬に就職、篠田康彦が医学研究科博士課程を修了・学位を取得し、豊田合成に就職した。佐藤佳が、医学研究科博士課程を早期修了・学位を取得し、4 月より JSPS ポストドク、そして、7 月より新興ウイルス研究センターの特定助教となり、本研究室で研究を行っている。4 月より医学研究科修士課程に金村優香が、生命科学研究科修士課程に津村斐子が入学した。6 月にトロント大学より Chuanyi Nie が短期滞在した。8 月より浦田こずえがテクニシャンとして参加した。11 月より生命科学研究科博士課程の鈴木康嗣は、シンガポール国立大学医学部に 4 月に赴任した鈴木陽一博士のもとに留学した。

以下の 4 つのテーマについて研究を遂行している。

1. HIV やレトロウイルス感染に関わる宿主因子の解析

tetherin(別名 BST-2/CD317)は HIV-1 粒子の細胞外への放出を抑制する宿主因子として近年新たに同定され、注目されている。HIV-1 はアクセサリ蛋白質である Vpu が tetherin の、この活性を拮抗することにより、効率良く複製増殖すると考えられている。しかしながら、Vpu がどのように tetherin の作用を拮抗するのか、その詳しい分子機構は未だ明らかになっていない。そこで、tetherin と Vpu の相互作用ドメインの詳細解明のために、bi-molecular fluorescent complementation(BiFC)法による Vpu とヒト tetherin(hu-tetherin)の相互作用定量検出系をまず構築した。この定量系を用いて Vpu と結合能がないマウス tetherin と hu-tetherin のキメラ分子による相互作用解析を行ったところ、hu-tetherin の膜貫通領域(TM)が Vpu との結合に唯一必須な領域であることがわかった。次に hu-tetherin TM のアラニン置換変異体により I34、L37 および L41 が相互作用にそれぞれ必須なアミノ酸残基であることがわかった。これらの 3 つのアラニン置換変異体は、ウイルス放出実験において Vpu による促進作用に対して抵抗性を示すことから、これらのアミノ酸は Vpu との相互作用だけでなくその反応性の決定基であることを見出した。興味あることに、これらのアミノ酸残基は Vpu に拮抗されない非ヒト科霊長類の tetherin TM においても広く保存されている。しかしながら、非ヒト科霊長類 tetherin では上流に 2 アミノ酸欠損があり、さらに 2 アミノ酸挿入により Vpu との結合能を獲得することがわかった。そこで、種特異的な Vpu 反応性が、TM の構造的相違に起因する可能性を考え、脂質二重膜における hu-tetherin とアフリカミドリザル tetherin(agm-tetherin) TM の立体構造予測を分子動力学計算法により解析した。その結果、hu-tetherin TM の構造は、同定されたアミノ酸がひとつのヘリックス面に集約している

と予測された（図1）。さらに、Vpu に反応性のない agm-tetherin の TM は、同定されたアミノ酸がヘリックス構造の多方面に散逸することが分かった。すなわち、同定された3つのアミノ酸は相互作用に重要であり、その立体的な配置がVpuに対する相互作用および反応性を決定することが明らかとなった（J. Virol. 85: 932-945, 2011）。本研究は、大出裕高、佐藤裕徳博士（国立感染症研究所）との共同研究である。さらに、遺伝学的ならびに蛋白質化学的手法により、新規 HIV やレトロウイルス関連宿主因子の探索研究を行った。現在、その候補分子として解析を行っているのは、サイトカイン、シグナル分子、ユビキチン関連分子、インフラマソーム関連蛋白質などである（J. Biol. Chem. 285, 24032-43, 2010, Microbes Infect. 印刷中）。（小林朋子、佐藤佳、鈴木康嗣、渡部匡史、山元誠司、Peter Gee、三沢尚子、蝦名博貴、小柳義夫）



Kobayashi, *J Virol*, 2011

図1 分子動力学計算によるヒト tetherin の予想構造

I34, L37, L41、そして T45 が同一面に 配座

2. ヒト化マウスを用いた EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立

EBV は、ヒトを固有宿主とするガンマヘルペスウイルスであり、90%以上の成人が保有しているウイルスである。EBV は主としてヒト B 細胞に潜伏感染し、免疫抑制状態において感染細胞をがん化させることが知られている。一方で、EBV は、重度の貧血を伴う致死的な疾患である血球貪食性リンパ組織球症（EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: EBV-HLH）と関連があることが知られている。しかしながら、EBV の宿主域がヒトに限られることから、モデル動物を用いて EBV-HLH の病態を解析することは不可能であり、その病態はいまだに不明な点が多い。ヒト CD34 陽性造血幹細胞を NOG マウスに移植することにより、ヒト造血能を有するマウス（NOG-hCD34）を

作製した (Vaccine, 28S2:B32-37, 2010, J. Virol. 84, 9546-9556, 2010, Exp. Biol. Med. 印刷中)。NOG-hCD34 マウスに EBV を感染させ、(i) ウイルス学的解析；(ii) 血液学的解析；(iii) 免疫学的・病理学的解析を行った。感染後 10 週における EBV 感染 NOG-hCD34 マウスの生存率は 27% であった。また、感染マウスは、(i) EBV 溶解感染を伴う高レベルのウイルス血症；(ii) 正球性正色素性貧血と血小板減少、骨髓、脾臓、肝臓における組織球の増加と顕著な血球貪食像；(iii) ヒト CD8 陽性 T 細胞の異常活性化と臓器浸潤、ヒト IFN- γ 量の劇的な増加を示した。以上の結果から、EBV 感染 NOG-hCD34 マウスが EBV-HLH と酷似する病態を示すことが明らかとなった。このモデル動物は、EBV-HLH 発症機序 (図 2) を明らかにする上で有用なツールとなると考えられ、現在詳細な解析を進めている。(佐藤佳、三沢尚子、Chuanyi Nie、小柳義夫)

本研究は、佐藤賢文、松岡雅雄 (京大ウイルス研)、高橋玲 (同志社女子大)、伊藤守 (実中研)、岩切大、高田賢蔵 (北大遺制研) 博士との共同研究である。

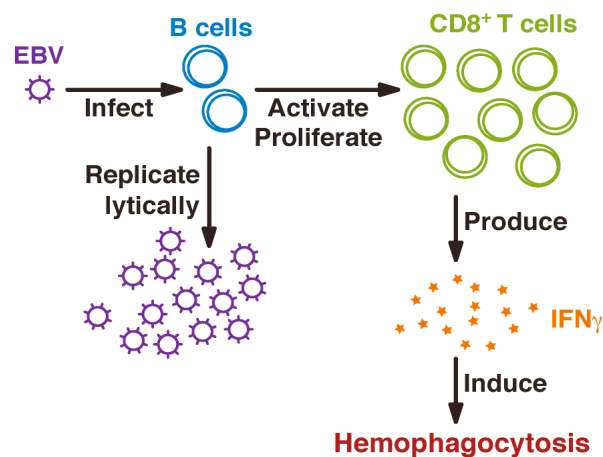


図 2 EBV may be a strong accelerator to CD8⁺ T cell proliferation independent of HLA-restricted antigen stimulation and its *de novo* infection

3. HIV cDNA のインテグラーゼ非依存性組込みとウイルス複製

レトロウイルスは自己がコードする Integrase(IN) により、宿主染色体へのウイルス cDNA の効率的な組込みを完遂させる。これまで、HIV IN 酵素活性部位欠失ミュータントウイルスベクターを使って、HIV は細胞内 DNA 修復機構によってもその cDNA を細胞染色体に組込むことを明らかにしてきた。近年 Raltegravir のような IN 阻害剤が臨床の場に登場し、その有効性が期待されている。しかしながら、細胞内 DNA 修復機構を介したウイルス cDNA の組込みは IN 阻害剤の存在下でも観察され、その危険性が憂慮される。そこで、DNA 修復機構を介して組込まれたプロウイルスが、機能的なプロウイルスとしてウイルスを産生しうるかの可能性を検討した。放射線照射、および過酸化水素による

DNA損傷環境下においては、IN欠損ウイルスの遺伝子組込み効率は最大10倍に増加し、その導入効率は3%を超えた。このDNA損傷誘導性の遺伝子組込みは、IN阻害剤存在下において野生型INをもつウイルスでも確認された。DNA修復機構を介して組込まれたプロウイルスLTRからの遺伝子発現量は、INを介して組込まれたものに比べて約20%低かったが、その転写が認められた。そこで、複製可能なHIV-1を用いてIN阻害剤存在下における感染実験を行ったところ、放射線によりDNA損傷を誘導した細胞では非照射群に比して明らかに効率的なウイルス複製が観察された。以上の結果から、IN阻害剤存在下の生体内でも酸化ストレスなどの影響下ではHIV cDNAは効率的に組込まれる可能性があること、そのプロウイルスを保持する細胞はウイルス産生細胞となる危険性が示唆された。また、このIN阻害剤存在下でもDNA損傷依存的に組込まれるプロウイルスは、IN阻害剤耐性ウイルスの出現頻度を増強することも考えられる。(蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、津村斐子、小柳義夫)

4. HSV-1 ラット脳炎回復モデルの確立

生後5日齢、7日齢、そして、10日齢の哺乳ラット脳内にGFP発現HSV-1を接種すると、すべてのラットは体重減少と麻痺などの全脳炎症状を示し、死亡した。一方、生後14日齢の哺乳ラットに接種すると、約半数は脳炎により死亡するが、残りは一過性に体重減少や震えなどの脳炎症状を示したが、数日後には回復し、症状は消失し、体重も増加した。そして、生後18日齢、21日齢、そして28日齢のいずれのラットにウイルスを接種しても症状はなく、すべてのラットは生存した。すなわち、生後14日齢哺乳ラットへの脳内接種法により、接種ラットの約半数は一過性脳炎を発症後に回復する脳炎回復モデルになることがわかった。このHSV-1脳炎を回復する脳では、ウイルス播種領域は限定的であり、CD3陽性T細胞ならびにCD68陽性マクロファージの細胞浸潤レベルも非常に軽度であった。すなわち、脳炎回復ラットではウイルスの感染の広がりは限局しており、さらに血球細胞の脳実質内へ浸潤も限定的であった。この回復過程を明らかにするために、HSV-1を接種し麻痺などを指標に脳炎発症を確認、そして、その症状が消失後、12時間目、24時間目、36時間目、72時間目それぞれにラットを屠殺し、脳組織におけるHSV-1の播種レベルを解析したところ、脳炎症状消失後12時間目の回復過程早期においては、HSV-1播種レベルは広範囲に及ぶものの、その時間を経るほどに、その播種領域は減少することがわかった。すなわち、これらの結果は脳組織が一過性の脳炎から急速に回復する能力を有することを示している。脳炎回復過程において、どのような細胞性遺伝子の発現が特異的に亢進しているかを明らかにするために、脳炎回復後のラット脳のGFP陽性領域とその周辺組織、そして、HSV-1非接種ラット脳からRNAを抽出し、transcriptome解析を行った。その結果、脳炎回復ラット脳において、非接種ラットのそれに比し2倍以上発現が亢進していたのは、75個のプローブにより検出された60種類の遺伝子であった。その中にはIRF7などのインターフェロン関連分子、C2, C3, C4aなどの補体関連分子、神経細胞関連分子、MHCクラスIあるいはMHCクラスII関連分子などが含まれていた。一方、cytokineならびにchemokineという

免疫反応に関わる分子群をコードする遺伝子発現は有意に亢進していなかった。脳炎回復ラットモデルの確立により、このウイルスの脳内におけるウイルス抑制過程を明らかにすることができると考えている。現在、詳細な抑制分子機構の解析を行っている(Peter Gee, 渡部匡史、小柳義夫)。本研究は川口寧博士（東大医科研）との共同研究である。

1. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の HTLV-1 病原性における機能解析

HTLV-1 はヒトの疾患との関連がはじめて示されたレトロウイルスである。造血器腫瘍である成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-1 関連脊髄症などを引き起こす。HTLV-1 の pX 領域には、*tax*、*rex*、*p30*、*p12*、*p13*、*HBZ* などの修飾遺伝子がコードされている。その中で *tax* は HTLV-1 感染細胞の不死化に中心的な役割を果たしていると考えられているが、その反面で細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的分子でもあり、ATL 細胞においてはしばしば発現が抑制され宿主免疫を回避している。HBZ は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされ、CREB/ATF ファミリーや c-Jun との相互作用によりウイルス転写を抑制することが知られている。我々は ATL 細胞において Tax の発現はしばしば抑制されているのに対し HBZ mRNA は全ての細胞で発現していることを見出した。HBZ トランスジェニックマウスを用いた解析では、野生型マウスと比較して脾臓中の CD4 陽性細胞が増加していること、胸腺細胞における抗 CD3 抗体に対する反応性が増強していることが明らかとなった。HBZ トランスジェニックマウスは皮膚炎や間質性肺炎を自然発症し、炎症組織では CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認めた。HBZ トランスジェニックマウスにて増加している CD4 陽性細胞においては制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Tregs) の分画が顕著に増加しており、その機能はむしろ阻害されていることを見出した。さらに HBZ トランスジェニックマウスは T 細胞性リンパ腫を高頻度に発症することが分かり、その腫瘍細胞は Tregs のマスター遺伝子である *foxp3* を高率に発現することが判明した。これらの所見は HBZ が何らかの機序により Tregs の増殖および腫瘍化を誘導している可能性を示唆させる。HBZ トランスジェニックマウスにて認められるこれらの表現型、すなわち CD4 陽性細胞の組織浸潤や Tregs 陽性 T 細胞性リンパ腫の発症は、HTLV-1 キャリアおよび ATL 患者における臨床所見と酷似しており、HBZ が HTLV-1 の病原性発現機構に重要な役割を果たすことが示唆される。現在、我々は、その分子機構を解析している。

2. HBZ 分子と相互作用する宿主側タンパクの同定、及びそのウイルス病原性における意義の検討

我々は yeast two hybrid や種々の細胞内シグナル伝達経路に関する機能的解析を行い HBZ と相互作用する宿主側因子の同定を行っている。そして HBZ が p65 や Tax による NF- κ B の活性化を抑制することを見いだした。免疫沈降解析により HBZ と p65 が結合し、p65 の DNA への結合能が低下することを明らかにした。その一方で HBZ がユビキチン依存的な p65 の分解を促進することが判明した。HBZ を発現させた T 細胞株では古典的 NF- κ B 経路の標的遺伝子発現抑制を認めた。以上のことから HBZ と p65 の相互作用は Tax による NF- κ B の活性化を調節している可能性が示唆された。さらに HBZ と結合する宿主因子を複数同定しており、病原性発現における意義について解析中である。

3. HTLV-1 がコードするウイルス遺伝子における変異の同定と HTLV-1 病原性における意義の検討

tax 遺伝子の変異は 10% の ATL 患者由来の腫瘍細胞に認められ、ATL 細胞の宿主免疫からの回避

に重要な役割を果たしていると考えられる。我々はプロウイルス全領域の塩基配列を 60 例の ATL 症例を用いて解析したところ、プロウイルス一部の欠損、挿入、ナンセンス変異を HBZ 以外の全てのウイルス遺伝子に見出した。この所見は HBZ が ATL 発症過程に必須であることを示唆している。それぞれの変異を解析すると G から A 塩基への変異が最も高率に発生しており、シチジン脱アミノ酵素である APOBEC3G (hA3G) の関与が疑われた。HTLV-1 は宿主免疫から回避する手段として、宿主の hA3G の機能を利用していると考えられる。

4. レトロウイルスの組み込み過程に関与する DNA 修復タンパクの同定及びその機能解析

レトロウイルスは、逆転写反応により二重鎖 DNA を合成し、それを宿主ゲノムへと組み込む。その組み込み領域にはウイルス特異的な指向性があることがわかっている。マウス白血病ウイルス (MLV) は転写開始点、CpG island、及び DNase 高感受性領域の近傍に多く組み込まれることが報告されている。しかしながら、その分子メカニズムは解明されていない。我々は高速シーケンサーを用いて組み込み部位の大量解析を行った結果、DNA 修復タンパクである NBS1 を欠損した細胞において、MLV が転写開始点、CpG island、及び DNase 高感受性領域の近傍に組み込まれる効率が低下していることを発見した。NBS1 欠損細胞では、活性化しているプロモーター付近に認められる H3K4me3 や H3K9me1 領域への組み込み効率の低下も認められ、逆に不活性化されているプロモーター付近に多く認められる H3K79me3 領域への組み込み効率の上昇が認められた。さらに、クロマチン免疫沈降法により、ウイルス感染細胞内において組み込み過程前に NBS1 とウイルス DNA が結合していることがわかった。以上のことから、DNA 修復タンパクである NBS1 は MLV の組み込み部位指向性を制御する宿主因子であることが明らかとなった。

5. 次世代ペプチド性 HIV-1 融合阻害剤の耐性獲得機序解明

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) がコードする外皮糖タンパク質 gp120 および gp41 は、HIV が宿主細胞に感染する際の最初のステップである、吸着・融合反応において重要な役割を果たしている。HIV と宿主細胞の膜融合反応を標的とした第一世代融合阻害剤 enfuvirtide (T-20) は、HIV-1 gp41 C 末端ヘリックス領域 (C-HR) のアミノ酸配列に由来するペプチド製剤であり、C-HR と N 末端ヘリックス領域 (N-HR) の相互作用をデコイとして競合することにより膜融合反応を阻害し抗 HIV 活性を示す。我々はこれまでに、SC34 や SC34EK といった次世代ペプチド性融合阻害剤を開発し、T-20 に対する耐性 HIV にも効果を示すことを報告してきた。SC34 や SC34EK はその直接の作用点である gp41 領域内に多数の変異を誘導し、これらの変異が蓄積することで耐性を示す。一方、gp120 領域内にも変異が導入されており、これらの変異は HIV-1 複製能の改善に寄与していることから、二次変異としての機能を有することを明らかにした。以上の結果は、HIV-1 は gp41 領域内に一次変異を、および gp120 領域内に二次変異を巧みに導入しながら、次世代融合阻害剤に対する耐性を獲得することを示している。

6. 低分子化合物を基盤とした抗 HIV 化合物療法剤の開発

現在臨床応用されている抗 HIV 薬は、核酸誘導体やペプチドミメティクスといった複雑な化学構造からなる化合物が多く、医薬品原料の製造原価が比較的高価である。そこで、我々は本学薬学研究科と共同で、新規な低分子抗 HIV 薬剤の開発を目指して、これまで 30,000 種以上に及ぶ小分子化合物のスクリーニングを行い、HIV の複製前期過程に作用すると想定される数種類の新規抗 HIV-1 リード化合物を同定した。これらの中には、既存の抗 HIV-1 薬の作用点である、吸着・融合、逆転写酵素、インテグラーゼ以外の作用点を標的としている可能性がある化合物も含まれる。現在、リード化合物を出発材料とした高活性用機序の同定を進めている。

2010 年、当研究室では新たなメンバーとして、4 月より 2 名の技術補佐員、秋吉美歌、秋瀬さんを迎えた。一方、生命科学研究科大学院生だった駒井妙、松井稔幸、村上万里絵の 3 名が 3 月で卒業した。研究室はスタッフ 3 名、大学院生 5 名、技術補佐員 3 名、事務補佐員 1 名の 12 名の構成となった（2010 年 12 月末時点）。

引き続き、当研究室では哺乳類における染色体機能の調節、遺伝情報の普遍性および多様性をコントロールしている分子機構を明らかにすることを目指して研究を行っている。特に「細胞記憶」「エピジェネティック制御と生命現象」「核構造の機能」などをキーワードに研究を展開しており、新たな発見に遭遇すべく日々研究に励んでいる。

1. ヒストンリジン脱メチル化酵素、Jmjd1a、Jmjd1b がマウスの胎児発生に果たす役割

ヒストン H3 のリシン 9(H3K9)のメチル化は、遺伝子発現の抑制やヘテロクロマチン化に重要なエピジェネティックマークの 1 つである。本研究の目的は、哺乳類の発生過程における H3K9 のメチル化のダイナミズムを理解することと、それを司る役者を同定することである。我々は以前、H3K9 メチル化酵素である G9a と H3K9 脱メチル化酵素である Jmjd1a が協調的に発現・機能することによって、マウスの雄の減数分裂前期の H3K9 のメチル化レベルがダイナミックに調節されていることを報告した (Tachibana et al., 2007)。Jmjd1a がマウスの発生に果たす機能をより詳細に知る目的で、*Jmjd1a* ノックアウト (KO) マウスを作製した。*Jmjd1a*-KO マウスはメンデルの法則に従って生まれてくるし、大人のマウスになることも可能であった。これらのことは *Jmjd1a* 遺伝子産物がマウス胎児の発生に必須ではないことを示した。重要な点として、*Jmjd1a*-KO 胎児では野生型と比較して大幅な H3K9 のメチル化亢進が認められなかった。これとは対照的に、既報通りに成体の *Jmjd1a*-KO マウスは雄が不妊となり、また雄雌共に肥満の表現型を示した (Inagaki et al., 2009)。*Jmjd1b* は H3K9 の脱メチル化を触媒出来る *Jmjd1a* のホモログである。mRNA でもタンパクのレベルでも着床後のマウス胎児での発現が認められることから、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* はマウスの発生において重複した機能を担っていることが予測された。通常のやり方に従って我々は *Jmjd1b*-KO マウスを樹立した。その致死性を解析した結果、メンデルの法則にしたがった予測よりも低い頻度で *Jmjd1a*-KO マウスが生まれることが分かった。受精後 12.5 (E12.5) 日胚を調べた結果、形態学的には *Jmjd1a*-KO と野生型の胎児に差が認められなかった。このことは、少なくとも胎生中期までの発生には *Jmjd1b* は必須ではないことを示唆した。H3K9 のメチル化は *Jmjd1a* の時と同様に野生型と比べて顕著な変化は見られなかった。次に、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の発生に対する重複機能を調べる目的で、*Jmjd1a*+/-、*Jmjd1b*+/-の双方のアリルを持つ雌雄同士の交配を行った。その結果、*Jmjd1a/b* のダブル KO (DKO)マウスの新生児が生まれてくることはなかった。このことは *Jmjd1a/b*-DKO 胎

児が致死であることを示した。これまでに解析した結果、E7.5 日胚でも *Jmjd1a/b*-DKO 胚は観察されていない。ここまでの結果をまとめると、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の機能は重複しており、マウスの発生に必須であることが分かった。現在、*Jmjd1a/b*-DKO 胚の致死のステージを明らかにすることと、その表現型の解析を進めている。(立花、眞貝)

2. 哺乳類の性決定におけるエピジェネティック制御系の役割について

性分化は未分化な接合子から次第に雌雄の質的な差が生じる分化の過程である。性分化は有性生殖を行う生物が遺伝情報を子孫に伝えるためにも、ひいてはその結果遺伝的多様性を獲得するためにも必須のイベントである。哺乳類では未分化性腺において *Sry* 遺伝子の存在が雄化のスイッチを入れることが知られている(Koopman et al., 1991)。胎児期に一旦確立した性はその後変わることなく生涯にわたって維持される。性決定の過程にどのようなエピジェネティック因子が関与しているのかについては不明である。さらに、一旦確立した性特異的な遺伝子発現プロファイルがどのようにして生涯にわたって維持されるのか、そのエピジェネティックな機構についても明らかになっていない。これらの現象を分子レベルで明らかにすべく、哺乳類の生殖腺体細胞における性特異的なエピゲノム構造を明らかにすることを研究の目的とした。まずは生殖腺体細胞を精製する系を樹立するため、ヒト low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) 分子を発現するトランスジェニック (TG) マウスの樹立を試みた。シグナルが入らないようにするため、LNGFR の細胞質ドメインを削った分子の cDNA を使用した。LNGFR をドライブするプロモーターには *Ad4BP/Sf1* を用いた。*Ad4BP/Sf1* は E10.5 日胚の生殖腺体細胞で発現する。*Ad4BP/Sf1* の全エキソンを含むバックミドの開始コドンで LNGFR の翻訳領域に置き換えたものを C57BL/6 受精卵の前核に注入した。得られた産仔のうち 3 ラインで LNGFR 遺伝子が陽性であった。その中の 2 ラインにおいて、胎児生殖腺での LNGFR の発現が高かった。免疫組織学的な解析によって、これらのラインでは LNGFR が生殖腺体細胞でのみ発現が見とめられ、生殖細胞系列では検出されなかった。さらに抗 LNGFR 抗体とマグネットビーズを用いた精製実験を行ったところ、精製した細胞のうち 95%以上が *Ad4BP/Sf1* 陽性の細胞であった。現在精製条件の至適化を検討中である。(立花)

3. DNA 損傷修復における H3K9 メチル化を中心としたヒストン化学修飾の機能解析

ヒストン化学修飾は、転写制御だけでなく DNA 損傷修復等にも重要な役割を果たすことが明らかになってきている。損傷が起こるとまずチェックポイント因子 ATM が活性化され、下流因子をリン酸化して細胞周期制御や DNA 修復が促進される。これまでに、密集した構造を取るヘテロクロマチン領域で DNA 損傷が生じた場合、ATM の活性化にヒストンメチル化酵素 SUV39H1/H2 による H3K9 メチル化が重要であることが報告されている。しかし、細胞内で DNA 損傷が頻発して起こるユークロマチン領域におけるクロマチン制御機構は不明であった。そこで、マウス胚性幹細胞において、ユークロマチン領域の H3K9 メチル化を低下させた *G9a* ノックアウト (KO) 細胞の

DNA 損傷に対する ATM 活性化速度を検証した。その結果、ATM 活性化速度は低下するどころか、むしろ促進されていることが判明した。この表現型は、ヘテロクロマチン領域の場合とは逆であるため、ユークロマチン領域では何らかの未知のクロマチン制御機構が存在することが示唆される。そこで、出芽酵母において DNA 修復に重要な役割を果たすことが明らかにされているヒストン H3 の 56 番目のリジン (H3K56) のアセチル化レベルを調べた結果、*G9a*-KO 細胞ではこれが有意に上昇していた。*SUV39H1/H2*-KO 細胞ではこのような上昇は見られない。H3K56 アセチル化は最近、卵巣ガンや皮膚ガン等において亢進していることが報告されている。そのため、今後は *G9a*-KO 細胞およびガン細胞における H3K56 アセチル化異常の発生メカニズムについて、ATM 活性化の制御機構との関連も含めて明らかにしていきたい。また、別の H3K9 メチル化酵素 ESET の KO 細胞では ATM 活性化速度に影響は見られなかった。しかし、*ESET*-KO 細胞では DNA 損傷応答の中心因子の一つである p53 の蛋白質レベルが上昇していることを見出した。また、*ESET*-KO 細胞は DNA 傷害剤に対して野生型細胞よりも耐性を示した。今後、ESET の DNA 損傷応答／修復における細胞内機能を明らかにしていきたい。(坪田、眞貝)

4. マウス生殖細胞発生過程におけるヒストンリジンメチル化状態の解析

体細胞は個体の恒常性維持に、生殖細胞は個体の遺伝情報を維持するのに必須の細胞で、生殖細胞の発生ならび機能にヒストンのメチル化が必要であると多数報告されている。

本研究では、性決定後の胚性期生殖細胞におけるヒストンリジンのメチル化状態について解析した。性決定後の雌雄間の胚性期生殖細胞において様々なヒストンリジンメチル化状態が異なっていることを示し、特にゲノムワイドにヒストン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化 (以後 H3K9me2) が胚性期雄性生殖細胞において低下していた。マウスにおいて、ヒストンリジンのメチル化酵素として知られている *G9a* と *GLP* は、細胞内ではヘテロダイマーを形成することで H3K9me2、me1 を入れることが知られている。そこで我々は、胚性期雄性生殖細胞において *G9a* と *GLP* の発現状態を調べ、*GLP* が発現していないことを突き止めた。以前の報告で *Glp* mRNA が性決定前の始原生殖細胞の発生段階において転写抑制されていることが知られていたために、性決定後の胚性期有性生殖細胞においてもこの状況が維持されているのではないかと考え、*Glp* mRNA の発現を解析したところ mRNA の発現が周辺の体細胞同様に認められた。また、*GLP* のタンパクがなく mRNA のみが存在するという状況は、成体精巣内の生殖幹細胞においても維持されていることがわかった。

我々は、胚性期雄性生殖細胞において H3K9me2 が低下している原因として、*Glp* mRNA が転写後に何らかの制御を受けることによって蛋白質として安定的に存在できないためだと推察している。

現在、*Glp* mRNA がどのような転写後制御を受けているかを調べている。H3K9me2 が低いことが生殖細胞の発生においてどのような意義があるのかを見いだすことが我々の最終的な目標である。

(出口、眞貝)

2010 年 3 月に松田健太が本学人間・環境学研究科博士課程（人間・環境学）を、中村仁美が本学人間・環境学研究科修士課程（人間・環境学）を、梁瀬賢志が本学医学研究科医科学専攻修士課程を修了した。松田は、米国・国立衛生研究所に留学、梁瀬は医療法人清幸会土肥病院に就職した。4 月には、川岸崇裕、安井美加、渡部祐司が本学医学研究科医科学専攻修士課程に入学した。

当研究室の主要研究課題はヒトのレトロウイルス（HIV と HTLV）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。また、レトロウイルス感染症に加えて、フラビウイルス感染症（デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス）の研究も行っている。2010 年の研究の進展は、以下のとおりである。

1. アカゲザル継代による病原性 CCR5 指向性 SHIV AD8 の作出

アカゲザル継代により、新たに病原性 CCR5 指向性 SHIVAD8 を作出した。動物継代を通じて SHIVAD8 系統のウイルスを接種した 13 頭の個体はすべて顕著な CD4 陽性 T 細胞数の減少を呈した。これらのうち 10 頭は normal progressor となった、即ち、メモリー及びナイーブ CD4 陽性 T 細胞が漸減、抗ウイルス CD4 および CD8 陽性細胞を産生し、慢性的な免疫活性化及び 10^2 - 10^5 RNA コピー/ml の範囲で異なるレベルのウイルス血症を最長で 3 年間にわたって示した。現時点で normal progressor のうち 5 頭が、カリニ肺炎、トリ型結核菌、カンピロバクター感染等の日和見感染を伴ったエイズを発症し、感染 100 から 199 週で安楽殺を要する状態になった。残りの normal progressor の 3 頭は接種 1-2 年経過した時点で、末梢血 CD4 陽性 T 細胞が 94-154 個/ μ l に激減している。4 頭の normal progressor から分離されたウイルスは CCR5 指向性を維持していた。SHIV AD8 感染サル全 13 頭中 3 頭が、持続的に 10^7 copies/ml を超えるウイルス血症および急激でかつ非可逆的なメモリー CD4 陽性 T 細胞の減少を伴う rapid progressor 症候群を呈し、感染 19-23 週後に安楽殺を要する状態となった。SHIV AD8 は、CD4 陽性 T 細胞の枯渇及び持続的なウイルス血症を起こすことから、ワクチン開発において潜在的価値を有するツールと言える。

2. 低ウイルス量を示す SHIV-KS661 感染アカゲザルにおける CD4⁺細胞減少と腸病変

HIV-1 感染によって、宿主は高ウイルス血症と CD4⁺T 細胞の減少を伴い死に至る。腸は体内のリンパ球の 70%以上を含む最大の免疫臓器であり、HIV-1 の垂直感染および同性間性交渉感染における重要な侵入門戸である。HIV-1 感染において、腸は主要なウイルス増殖の場となり、AIDS の特徴である CD4⁺T 細胞の減少をはじめとする様々な病理学的変化が引き起こされる。近年の研究から、HIV-1 の主要な標的細胞である CD4⁺T 細胞の減少は末梢血よりも腸で激しく起こることが分かってきた。臨床的にも、消化器症状の一つである下痢は AIDS の主症状であることが知られている。このように、AIDS 病態を考える上で腸は非常に重要

な臓器であることから、HIV-1 感染における腸の詳細な解析を行う必要があると考えられる。しかし、ヒトに対する組織レベルでの詳細な解析を行うのは非常に難しいため、動物モデルによる研究が行われてきた。HIV と近縁なウイルスである SIV や、HIV と SIV のキメラウイルスである SHIV はアカゲサルに感染し、AIDS 様病態を引き起こす。我々は SHIV-KS661 をアカゲサルに接種すると接種後 4 週間以内に全身の CD4⁺T 細胞を枯渇させることを見いだした。また、SHIV-KS661 感染アカゲサルの長期的観察から、高ウイルス血症（HVL）を呈する感染アカゲサルはウイルス感染後半年から 1 年で下痢を起こし衰弱死することが分かっている。一方、低ウイルス血症（LVL）の SHIV-KS661 感染サルの多くは、少なくとも我々が観察した期間は無症状に経過する。こういった感染サルを Asymptomatic LVL (Asym LVL) と呼ぶ。興味深いことに、LVL を呈した 6 頭の感染サルのうち 2 頭が HVL と同様に下痢を起こして衰弱死してしまった。このような感染サルを Symptomatic LVL (Sym LVL) と呼ぶ。我々は、Sym LVL は下痢を起こし衰弱死したことから、HVL と同レベルの腸障害を引き起こしているのではないかという仮説を立て、これを検証した。Sym LVL および Asym LVL 両者の腸およびリンパ組織中プロウイルス量は数十コピーから数百コピー程度であり、1000 コピー以上の高いプロウイルス量を示した HVL と比べて明らかに低かった。Sym LVL および Asym LVL の血中 CD4⁺T 細胞数にも明らかな違いは認められなかった。しかし、Sym LVL における腸およびリンパ節の CD4⁺T 細胞頻度はウイルス非感染サルおよび Asym LVL のそれと比べて明らかに低かった。さらに、Sym LVL は HVL と同様に腸の絨毛萎縮やマクロファージの活性化が認められたが、Asym LVL ではそれらは認められなかった。結論として、SHIV-KS661 感染アカゲサルでは、ウイルス増殖レベルが低くても、腸の CD4⁺T 細胞減少、絨毛萎縮、マクロファージの活性化などの腸における AIDS 様病態を呈することが明らかになった。この結果は、ウイルス増殖を制御しているにもかかわらず、病態進行が認められる HIV-1 感染者において、腸では CD4⁺T 細胞が減少している可能性を示唆している。

3. 新規 CCR5 指向性 SHIV の作製とアカゲサルへの順化

HIV-1 が感染する動物種は限られていることから、我々は HIV-1 に近縁なサル免疫不全ウイルス(SIV)の外皮蛋白(env)遺伝子を中心とした約半分のゲノム領域を HIV-1 のものと置き換えたサル／ヒト免疫不全キメラウイルス(SHIV)によるサルエイズモデルを開発した。近年、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や病態が大きく異なることが明らかになった。本研究では感染伝播と感染後の病原性に重要な CCR5 指向性 SHIV によるサルエイズモデルの確立を目的とした。CXCR4 指向性強毒 SHIV-KS661 の V3 領域に変異を導入し CCR5 指向性に改変した。この変異体ウイルスをアカゲサルに静脈接種し、経時的に血漿中ウイルス RNA 量や血中と小腸におけるリンパ球サブセットの解析を行った。接種した 4 頭中 3 頭のサルで感染 12 週までに血中のウイルス RNA 量が検出限界以下まで減少したが、1 頭のサルでは 12 週以降も $10^3 \sim 10^4$ copies/ml 程度のウイルス RNA 量を維持した。CD4 陽性 T 細胞の減少はメモリー T 細胞の割合が多い小腸において顕著にみられたが、血中においては緩やかな減少傾向を見せた。ウイルス RNA 量を維持したサルから別のサルへウイルスの継代を行ったところ、3 代目

のサルにおいて高い血中ウイルス RNA 量のピークと維持、小腸での著しい CD4 陽性 T 細胞の減少が観察された。新規 CCR5 指向性 SHIV を作製し、アカゲザルへの順化を行った。よりよいワクチン評価系の確立が期待される。

4. 抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験および SHIV 攻撃接種による感染防御能の評価

生分解性高分子ナノ粒子 (NP) に HIV の組換え外皮タンパク (gp120) を封入した gp120-NP がマウスの樹状細胞に効率よく取り込まれ、その結果 CD8 陽性細胞の応答が強く得られることがわかっている。本研究ではヒトへの応用を考えて gp120-NP をアカゲザルに免疫し、その免疫誘導能を評価し、SHIV に対する感染防御効果を検討することを目的とした。gp120-NP、gp120 単独、PBS (control) をそれぞれアカゲザル 3 頭に初回免疫を 0 週として、4、8 週の計 3 回経鼻免疫し、その後 12 週と 16 週に皮下に追加免疫を行った。免疫後、経時的に採血を行い、抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数と抗原特異的細胞増殖活性、血漿中の抗体産生、そして免疫細胞群の変動を解析した。その後、全頭に SHIV-KU2 株を静脈内接種し、血漿中ウイルス RNA 量と免疫細胞群の変動を解析し、ウイルス感染に対する防御効果を評価した。gp120-NP 群と gp120 単独群で 12 週以降の抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数と 13 週以降の抗原特異的細胞増殖活性の増加を確認した。17 週以降には、gp120-NP 群全頭で抗原特異的細胞増殖活性が有意に上昇し、gp120-NP 群の方が強力に免疫を誘導することが示された。しかしながら、SHIV-KU2 株の攻撃接種後、血中ウイルス RNA 量は、gp120-NP 群と gp120 単独群でピークが PBS 群より高く、gp120-NP 群ではセットポイントも高値を示した。また、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞も gp120-NP 群と gp120 単独群で大幅に減少した。今回の結果から、サルにおいてもマウス免疫実験と同様に gp120-NP は優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。しかしながら、NP に内包した gp120 抗原に対する免疫は感染防御には有効でないことが示唆された。

5. 哺乳類レオウイルスにおけるリバーシジェネティクス系の改良

哺乳類レオウイルス (レオウイルス) は 10 分節の 2 本鎖 RNA ゲノムを持つ非エンベロープウイルスである。多分節の 2 本鎖 RNA ウイルスでは、ウイルスゲノム内に任意の変異を導入できる技術 (リバーシジェネティクス系) の開発が遅れており、レオウイルスにおいてのみ、plasmid-based のリバーシジェネティクス系が確立されている。本研究では、レオウイルスのリバーシジェネティクス系の開発・改良を行った。1) T3D 株のリバーシジェネティクス系に加えて、新たに T1L 株のリバーシジェネティクス系を確立し、T3D 由来および T1L 由来 cDNA を組み合わせることで、T3D×T1L モノリアソータントを作出した。2) レオウイルス cDNA プラスミドの数を 10 から 4 個へと減少させることで、従来法と比較して、高効率のリバーシジェネティクス系の開発を行った。3) T7RNA ポリメラーゼ発現 BHK 細胞を用いてリバーシジェネティクス系を確立した。以上の成果より、レオウイルスのリバーシジェネティクス系の改良はレオウイルスの基礎研究ならびに臨床応用に広く貢献できると考えられる。

新興ウイルス感染症研究センター（H17-H21 年度プロジェクト組織）の改組にともない、平成 22 年 4 月に新興ウイルス研究センターが新たに発足し、特定助教として佐藤佳、成田新一郎が 7 月 1 日に赴任した。

以下のテーマについて研究を遂行している。

1. 個体内における抗 HIV-1 因子 APOBEC3 による遺伝子変異

シチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3G(A3G)は、ウイルス粒子形成過程でウイルス粒子に取り込まれ、感染細胞内において HIV-1 ゲノム RNA を鋳型に新規合成されるマイナス鎖 HIV-1 cDNA 中の C を U に変換する。このマイナス鎖 HIV-1 cDNA の C→U 変異は、HIV-1 二本鎖 DNA の G→A 変異に帰結する。培養細胞を用いた解析から、他の APOBEC3(A3)タンパク質 (A3B, A3C, A3DE, A3F) も A3G と同様の機能を有していることは知られている。この A3 分子群に対し、HIV-1 は、virus infectivity factor (Vif) と呼ばれるタンパク質を自らのゲノム中にコードしている。Vif は、ウイルス産生細胞内に存在する A3、特に A3F, A3G と結合し、プロテアソーム依存的経路による分解の促進により、そのウイルス粒子への取り込みを阻害する。Vif により、HIV-1 は A3 発現細胞においても効率良い複製が可能となる。しかしながら、生体内での HIV-1 などのウイルス複製における内在性 A3 分子群の寄与についてはこれまで不明であった。

最近、われわれはヒト造血幹細胞を重度免疫不全マウスに移植法により、ヒト造血能を有する "ヒト化マウス" を作製し、HIV-1 を in vivo 環境で増殖・複製させることが可能な実験系を開発した (Nie C, et al Virology 394:64-72, 2009, Sato K, et al. Vaccine, 28S2:B68-B74, 2010、図 1 参照)。そこでまず、ヒト化マウス中の CD4 陽性 T 細胞とヒト末梢血中 CD4 陽性 T 細胞における内在性 A3 遺伝子の発現レベルを比較したところ、ヒト化マウス内のヒト CD4+T 細胞は、ヒト末梢血の CD4+T 細胞と同程度の A3 遺伝子を発現していることがわかった。次に、野生型 HIV-1 と Vif 欠損 HIV-1 をヒト化マウスに接種し、それぞれの生体内における複製効率を経時的に解析したところ、野生型 HIV-1 は効率良くかつ持続的に増幅するのに対し、Vif 欠損 HIV-1 はまったく増幅しなかった。この結果より、内在性 A3 分子群によって Vif 欠損 HIV-1 の複製が著しく阻害されたことから、野生型 HIV-1 の増殖・複製過程における内在性 A3 分子群の影響を評価すべく、Vif を有する野生型 HIV-1 を接種後 15 週のヒト化マウス脾臓から DNA を抽出し、HIV-1 DNA (逆転写酵素をコードする 1,002bp の領域) の変異効率を検討した。その結果、きわめて高頻度の G→A 変異が確認された。それぞれの A3 分子による G→A 変異挿入部位には指向性がある、たとえば、A3G は GG→AG を優先的に挿入し、A3B と A3F は GA→AA を優先的に挿入することから、観察されたこれらの G→A 変異部位の前後 5 塩基について検討を行った。その結果、G→A 変異部位

の下流の 1 塩基にのみ非ランダムな指向性が確認され ($P = 0.0000012$)、また、この箇所には G または A が顕著に確認された。この傾向は A3 (特に A3B, A3F, A3G) の指向性と一致することから、野生型 HIV-1 感染ヒト化マウスで確認された G→A 変異の大部分は、内在性の A3 分子群により引き起こされたことが強く示唆され、その結果、ストップコドンの発生を誘発していた。さらに、内在性 A3 分子群に起因すると思われる高頻度な G→A 変異を有する HIV-1 DNA も複数クローン確認された(Sato K, et al. J. Virol. 84:9546-56, 2010)。以上の結果から、生体内での野生型 HIV-1 複製においても、少数の内在性の A3 分子群によって複数の遺伝子変異が導入され、HIV-1 複製が負に制御されることが強く示唆された。さらに、ヒト化マウスの現状について、総説としてまとめた (Exp. Biol. Med. 印刷中)

(佐藤佳、三沢尚子、小柳義夫)

図 1. ヒト化マウス



2. 細菌表層タンパク質の生合成と品質管理機構

「オペロン説」によって 1965 年度ノーベル生理学医学賞を受賞したジャック・モノー (Jacques Monod) の言葉に「大腸菌にあてはまることは、ゾウにもあてはまる」というフレーズがあります。分子生物学の黎明期以来、大腸菌はこの言葉の通り、細菌からヒトまで通じる生命現象の基本的原理の解明に貢献してきました。現在においても、大腸菌を用いた研究を通じて見いだされた現象が、高等生物にも当てはまる普遍的な事象であると確認されることがしばしばあります。がんウイルス研究部門・がん遺伝子研究分野の秋山芳展教授と密接な協力の下、私たちはこの史上最も多くの研究がなされてきたモデル生物の利点を最大限に生かし、生物の生存戦略の理解に向けて研究を進めます。これらの研究を通じて得られる知見は、新興感染症の克服といった応用

分野においても貢献することが期待されます。

生物とは何かを考えると、いくつかの条件が挙げられます。これらの一つに「全体が外的環境から物理的に隔離されていること」があります。この外的環境から隔離された区画は細胞と呼ばれ、細胞を現出させているのが細胞膜です。したがって細胞の形成は細胞膜の形成に他なりません。私たちは大腸菌の細胞膜がどのように形成され、維持されているかに焦点を当てて研究を行っています。細胞膜は外的環境に直接晒されるため、様々なストレス（表層ストレス）を受けます。これに対して細胞は、ストレスを受けても細胞内の恒常性を保つために、表層ストレス応答機構を備えています。この機構を使って細胞は外的環境の変化に順応して細胞膜の性質をダイナミックに変えることもわかってきました。私たちは表層ストレス応答の分子機構とその生物学的意義を解明し、細胞の生存戦略の一端を明らかにしたいと考えています。表層ストレス応答は活発に増殖する細胞ではなく、定常期に入った細胞でより活性化されることがわかっています。このため、私たちの研究は低成長期における細胞の成長戦略、即ち量的成長から質的成長へと転換する機構、そしてその意義を探求することになります。これらの研究を通じて得られる知見は、生物学の範疇にとどまらず、様々な分野における概念の転換に貢献するかもしれません。

大腸菌をはじめとするグラム陰性細菌は、細胞を取り囲む細胞質膜の外側にもう一つの膜構造、外膜を持っています。また、細胞質膜と外膜の間には親水的なペリプラズム空間があります。このような表層構造を持つことは、グラム陰性細菌が外的環境の様々な変化に順応して細胞質の恒常性を維持して生育するために必須です。グラム陰性細菌が細胞表層の品質を維持する上で重要なストレス応答機構に、 σ^E ストレス応答システムがあります。外膜タンパク質のミスフォールディングなどによって σ^E が活性化されると、ペリプラズムのシャペロンや外膜タンパク質の膜挿入に働くタンパク質の発現が上昇するとともに、外膜タンパク質の発現が抑制されることが知られています。 σ^E によって転写が活性化される遺伝子の中には、ペリプラズムのプロテアーゼをコードする遺伝子が存在することが知られていましたが、私たちはこれらの遺伝子を欠損する大腸菌変異株では外膜の透過性が上昇することを見いだしました。現在、プロテアーゼ活性を介した細胞表層の品質管理機構について検討を進めています。

（成田新一郎）

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。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>

メンバーはゲノム改変マウス研究領域所属の宮地（技術専門職員）と生体防御研究分野所属の北野（技術職員）の2名。過去3年間の実績は下記の通りである。

1) 胚の凍結保存

2008 年	62 系統	20,525 個
2009 年	75 系統	20,337 個
2010 年	101 系統	18,620 個

2) 外部機関からのマウス導入

	凍結胚	生体
2008 年	4 系統	2 系統
2009 年	7 系統	2 系統
2010 年	4 系統	6 系統

3) 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
2008 年	52	20,379	125 (0.6%)
2009 年	97	33,821	190 (0.6%)
2010 年	90	32,857	124 (0.3%)

4) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2008 年	49	7,252	357 (4.9%)
2009 年	52	4,587	242 (5.3%)
2010 年	106	7,106	394 (5.5%)

ウイルス研究所ネットワークシステムは、豊島教授、秋山教授、生田教授、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、SUN ワークステーション及びウインドウズサーバなどを用いて、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・WWW・ファイル・ライセンスサーバー等を運用している。

今年度は研究所の耐震改修工事の年に当たり、研究グループが様々な地区に一時移転した。ネットワークサーバー室は 2010 年 6 月に分子実験研究棟に引越し、2011 年 2 月に本館に戻った。引越し作業に伴い、全サーバーの停止、ネットワーク構成の変更が行われたが、出来る限り KUINS ネットワークと協調しつつ、所内独自の柔軟なサービスを継続して提供した。大きなトラブルなく復旧でき、ユーザーに多大な不便をかける事なく進められたと思っている。

引越し期間中、各地区に研究室が分散したため、研究所 LAN のファイルサーバーやライセンスサーバーにどこからでもアクセスできるように、VPN/SLL サーバーを導入しユーザーの便宜を図った。当研究所では WEB システムを利用し所内広報を行っており、これまでも事務連絡や公募情報などを掲示してきたが、本年は加えて各種シンポジウムや国内外学会の連絡や掲示を WEB 上で入力・閲覧できるようにした。このようにサービス内容を充実させると同時に、セキュリティの強化のために SQL サーバによる MAC アドレス管理および登録許可制に移行した。

ハードウェアの管理や OS・ソフトウェアの脆弱性の点検等は日ごろから心がけているが、セキュリティ教育の徹底や情報資産の格付けなど今後取り組まなくてはならない課題が残っている。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、管理グループだけでなくユーザー全体の知識の底上げがますます重要になっている。

平成22年度外部資金獲得状況

1. 科学研究費補助金

単位:千円

部門名	分野・領域名	研究種目	氏名	2010年度交付金額	補助金総額	研究課題名	採択年度
がんウイルス研究部門	がん遺伝子	基盤研究(B)	秋山 芳展(代表) 森博幸(分担)	5,700	15,600	大腸菌内膜ストレス応答機構の解析	平成20年度
	がん遺伝子	特定領域研究	秋山 芳展(代表) 森博幸(分担)	14,400	72,000	大腸菌膜タンパク質の機能発現と秩序維持機能	平成19年度
	がん遺伝子	特定領域研究	千葉 志信(代表) 秋山 芳展(分担)	3,200	6,400	膜内切断(RIP)プロテアーゼの細胞機能	平成21年度
	がん遺伝子	基盤研究(B)	森 博幸(代表) 秋山 芳展(分担)	5,900	12,500	タンパク質膜透過におけるSecDFの機能とプロトン駆動力の役割	平成22年度
	がん遺伝子	特定領域研究	森 博幸(代表)	3,200	6,400	SecAに依存したタンパク質膜透過反応機構の解明	平成21年度
	がん遺伝子	挑戦的萌芽研究	森 博幸(代表)	1,500	3,100	部位特異的in vivo光架橋実験によるSecトランスロコンの網羅的相互作用解析	平成21年度
	がん遺伝子	基盤研究(C)	柳川 伸一	1,560	3,260	新規LRP6結合蛋白質Krtap131によるWnt経路活性化の生理的意義の解明	平成22年度
	がん遺伝子	厚生省科研費	酒井 博幸	4,200	4,200	ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究	平成22年度
	細胞制御	地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協働研究事業)	杉田 昌彦	400	400	国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備	平成22年度
	細胞制御	新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業	杉田 昌彦	2,500	7,500	持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究	平成20年度
	細胞制御	基盤研究(B)	杉田 昌彦	4,000	13,500	糖脂質特異的免疫応答に着目した新たな抗結核ワクチンの開発	平成21年度
	細胞制御	特定領域研究	杉田 昌彦	5,000	9,900	MHCとCD1の機能連関による免疫制御の新戦略	平成22年度
	細胞制御	挑戦的萌芽研究	杉田 昌彦	900	2,800	CD1・脂質免疫応答に着目した、エイズワクチン開発の新戦略	平成22年度
	細胞制御	研究活動スタート支援	桑田 啓貴	1,230	2,360	サル結核モデルを用いた新たな脂質ワクチンの検証	平成22年度
	細胞制御	特別研究員奨励費	森田 大輔	600	1,800	脂質化ペプチドを標的とした、新たなウイルス制御機構の解明	平成20年度
	生体発がん	基盤研究(B)	米原 伸	5,200	14,200	FLASHの有する多面的生物活性の分子機構と生理機能の解析	平成22年度
	ヒトがんウイルス	厚生労働科学研究費補助金(脇田班)	土方 誠	3,700	3,700	肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究	平成22年度
	ヒトがんウイルス	厚生労働科学研究費補助金(松浦班)	土方 誠	3,000	3,000	肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究	平成22年度
	ヒトがんウイルス	厚生労働科学研究費補助金(茶山班)	土方 誠	3,000	8,000	ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究	平成20年度
	ヒトがんウイルス	厚生労働科学研究費補助金(HS脇田班)	土方 誠	2,000	2,000	C型肝炎ウイルス感染防止が可能なヒト型感染中和抗体の開発	平成22年度
遺伝子動態調節研究部門	分子遺伝学	特定領域研究	藤田 尚志	18,700	79,418	ウイルス感染における細胞内二重鎖RNA認識受容体の機能解析	平成18年度
	分子遺伝学	特別研究員奨励費	成田 亮	700	1,400	RIG-Iファミリー分子による非自己RNA認識機構の解析	平成21年度
	情報高分子化学	新学術領域研究	大野 睦人	20,900	94,290	核と細胞質間のRNA分配制御	平成20年度
	情報高分子化学	新学術領域研究	北畠 真	4,680	9,490	機能不全リボソームRNAを選択的に認識する因子の同定	平成21年度
	情報高分子化学	新学術領域研究	大野 睦人(分担者)	650	2,730	RNAプログラム研究の総合的推進	平成20年度
	情報高分子化学	若手研究(B)	谷口 一郎	1,300	2,730	ヒト免疫不全ウイルスのRevタンパク質によるウイルスRNAの核外輸送機構の解析	平成21年度
	情報高分子化学	特別研究員奨励費	T.S	700	2,100	機能不全リボソームを選択的に分解する新たな品質管理機構	平成21年度
	情報高分子化学	特別研究員奨励費	K.F	700	1,400	リボソームの品質管理におけるユビキチンの新しい機能	平成20年度
生体応答学研究部門	生体防御学	基盤研究(C)	生田 宏一	1,560	4,680	IL-7産生細胞の生体内における分布と機能	平成21年度
	生体防御学	若手研究(B)	谷一 靖江	1,300	2,470	胸腺細胞分化と末梢メモリーT細胞形成におけるIL-7Rの発現制御機構	平成22年度
細胞生物学研究部門	構造形成学	若手研究(A)	豊島 文子	6,700	21,600	細胞分裂期における小胞輸送の制御機構	平成21年度
	構造形成学	特定領域(公募研究)	豊島 文子	2,900	5,700	皮膚基底細胞の非対称分裂におけるc-Ab1の機能解析	平成22年度
	増殖制御学	新学術領域(公募研究)	豊島 文子	2,400	4,800	ボロキナーゼによるインテグリントラフィッキング制御とその破綻	平成21年度
	増殖制御学	基盤研究(A)	影山 龍一郎	10,500	44,170	成体脳におけるニューロン新生の意義について	平成21年度
	増殖制御学	新学術領域	影山 龍一郎	14,000	93,600	幹細胞多様性形成機構	平成22年度
	増殖制御学	本学分担者用	影山 龍一郎	260	260	神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築	平成22年度

	増殖制御学	外国人特別研究員	影山 龍一郎	972	972	神経幹細胞におけるNotchシグナルの下流因子の解析	平成22年度
--	-------	----------	--------	-----	-----	----------------------------	--------

細胞生物学研究部門	増殖制御学	基盤研究(C)	大塚 俊之	900	4,550	神経幹細胞の多能性維持・脱分化機構の解明	平成20年度
	増殖制御学	若手研究(A)	小林 妙子	7,000	21,800	幹細胞の多様化機構の分子基盤の解明および均一分化方法の開発	平成22年度
	増殖制御学	特別研究員奨励費	楯谷 智子	900	1,900	マウス蝸牛ラセン神経節の有毛細胞前駆細胞	平成21年度
	信号伝達学	特別研究員奨励費	坂本 雅行	700	1,400	成体脳におけるニューロン新生の生理的意義の解析	平成22年度
	信号伝達学	基盤研究(B)	宮沢 孝幸	4,000	11,700	ネコ免疫不全ウイルスの感染増殖機構の解明	平成21年度
	信号伝達学	挑戦的萌芽研究	宮沢 孝幸	1,000	2,800	病原性コアラレトロウイルスの解明と制御へ向けての基礎研究	平成22年度
	信号伝達学	特別研究員奨励費	仲屋 友喜	700	1,400	胎盤構築過程におけるウシ内在性レトロウイルスの貢献	平成22年度
ヒトレトロウイルス研究施設	ウイルス病態	特定領域研究	小柳 義夫	36,400	182,000	レトロウイルス(HIV、その他)の増殖・生活環および病原性発現機構の研究	平成18年度
	ウイルス病態	基盤研究(B)	小柳 義夫	4,940	18,850	ウイルスエンベロープ形成とウイルス伝播を制御する細胞性膜分子の機能解析研究	平成21年度
	ウイルス病態	若手研究(B)	蝦名 博貴	2,210	4,030	HIV潜伏感染モデル動物の構築と潜伏化メカニズムの解明	平成22年度
	ウイルス病態	特別研究員奨励費	佐藤 佳	600	1,800	HIV感染症動物モデル系の確立とAIDS発症メカニズムの解明	平成20年度
	ウイルス病態	特別研究員奨励費	山元 誠司	700	1,400	レトロウイルスインテグラーゼに結合するユビキチンE3リガーゼの同定と解析	平成21年度
	ウイルス制御	厚生労働科学研究費補助金	松岡 雅雄	13,800	38,288	ヒトT細胞白血病ウイルス1型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と発症危険性へのアプローチ	平成21年度
	ウイルス制御	厚生労働科学研究費補助金	松岡 雅雄	10,606	32,000	新規標的に対する小分子化合物を基盤とした抗HIV化学療法剤の開発	平成22年度
	ウイルス制御	厚生労働科学研究費補助金	松岡 雅雄	5,000	5,000	難治性HIV感染症に対する治療法開発の基礎的研究	平成21年度
	ウイルス制御	厚生労働科学研究費補助金	安永 純一朗	1,500	1,500	成人T細胞性白血病(ATL)の根治を目指した細胞療法確立およびそのHTLV-1抑制メカニズムの解明に関する研究	平成22年度
	ウイルス制御	科学研究費補助金	松岡 雅雄	1,200	1,200	新規抗ヘルペス薬開発による難治性ウイルス性疾患・腫瘍の治療戦略	平成21年度
	ウイルス制御	科学研究費補助金	松岡 雅雄	6,200	8,060	HTLV-1 bZIP factorによる炎症・免疫異常機構と関連疾患	平成22年度
	ウイルス制御	科学研究費補助金	松岡 雅雄	20,900	20,900	感染・炎症が加速する発がんスバイラルとその遮断に向けた制がんペクトル変換	平成22年度
	ウイルス制御	科学研究費補助金	松岡 雅雄	10,000	10,000	がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動	平成22年度
	ウイルス制御	科学研究費補助金	佐藤 賢文	1,900	1,900	ウイルス遺伝子HBZによる制御性T細胞の異常とHTLV-1病原性発現機構解析	平成22年度
感染症モデル研究センター	ゲノム改変マウス	特定領域研究・計画研究	眞貝 洋一	21,200	93,300	ヒストンメチル化ダイナミクスの制御と生殖系列での機能	平成19年度
	ゲノム改変マウス	挑戦的萌芽研究	眞貝 洋一	3,300	3,300	蛋白質リジンメチル化のプロテオミクス解析システムの確立	平成22年度
	ゲノム改変マウス	基盤研究(B)	立花 誠	4,200	16,460	ヒストンのメチル化のダイナミクスと生体機能	平成21年度
	霊長類モデル	厚生労働科研費 エイズ対策研究事業	五十嵐 樹彦	2,462	14,257	エイズ多剤併用両方中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究	平成20年度
	霊長類モデル	厚生労働科研費 創薬基盤推進研究事業・松下修三	五十嵐 樹彦	5,000	28,000	HIV-1エンベロープ蛋白(Env)の立体構造変化誘導剤(NBD誘導体)の臨床応用に向けた基礎研究	平成22年度
	霊長類モデル	創薬・ヒューマンサイエンス振興財団 政策創薬総合研究事業・志田壽	五十嵐 樹彦	1,500	22,000	増殖型バクターiBCGとワクシニアm8Δ免疫の霊長類における評価	平成21年度
	霊長類モデル	特定領域研究・杉田昌彦	五十嵐 樹彦	1,500	9,900	HIVの感染防止、AIDS発症防止に関する免疫学的基礎研究	平成22年度
	霊長類モデル	挑戦的萌芽研究・杉田昌彦	五十嵐 樹彦	300	2,800	HIVの感染防止、AIDS発症防止に関する免疫学的基礎研究	平成21年度
	霊長類モデル	基盤研究(B)	三浦 智行	3,800	17,160	霊長類エイズモデル感染病態に関わるウイルスゲノム基盤に関する研究	平成21年度
	霊長類モデル	厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業・森一泰	三浦 智行	2,000	32,400	HIVの感染防止、AIDS発症防止に関する免疫学的基礎研究	平成21年度
	霊長類モデル	若手研究(B)	小林 剛	1,600	3,770	サルにおけるデングウイルス感染症モデルの開発	平成21年度
新興ウイルス研究センター	若手研究(B)		成田 新一郎	2,600	3,600	細菌リボ蛋白質の輸送装置による基質認識機構の解明	平成22年度
	特定領域研究		成田 新一郎	1,000	3,000	大腸菌エンベロープ形成機構の解明(研究代表者:徳田元)	平成19年度
合 計		71 件	40 名	341,730	1,186,855		

2. 受託研究費

単位：千円

部門名	分野・領域名	機関名	氏名	研究課題	研究費
がんウイルス	がん遺伝子	科学技術振興機構	森 博幸（分担）	ダイナミクスを考慮した膜蛋白質の構造モデリング手法の開発	1,500
遺伝子動態調節研究部	情報高分子学	科学技術振興機構	北畠 真	紫外線によって生じるRNA損傷の修復機構	8,800
生体応答学研究部門	感染防御	医薬基盤研	増谷 弘	チオレドキシンによる急性呼吸器疾患新規治療法の開発	27,000
細胞生物学研究部門	増殖制御学	独立行政法人 科学技術振興機構	影山 龍一郎	短周期遺伝子発現リズムの動作原理	47,040
	増殖制御学	独立行政法人科学技術振興機構	影山 龍一郎	生体脳の神経幹細胞	5,000
	増殖制御学	独立行政法人科学技術振興機構	松田 孝彦	生体網膜におけるニューロン新生・新規回路形成の可視	9,500
	増殖制御学	独立行政法人科学技術振興機構	今吉 格	生体脳ニューロン新生の機能的意義	10,000
	信号伝達学	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物系特定産業技術研究支援センター	宮沢 孝幸	レトロエレメントの解析と高度利用に向けた基盤技術の開発	19,500
	信号伝達学	農林水産省農林水産技術会議	宮沢 孝幸	臓器移植用モデルブタの研究開発	4,500
	信号伝達学	厚生労働省	宮沢 孝幸	我が国における新規ヒトレトロウイルスXMRVの検査法確立等に関する研	500
ヒトレトロウイルス研究施設	ウイルス病態	独立行政法人 科学技術振興機構	小柳 義夫	AIDSワクチン開発への理論的介入－SHIV感染実験と数理モデル－	3,900
感染症モデル研究センター	ゲノム改変マウ	NEDO	眞貝 洋一	後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発	5,000
	ゲノム改変マウ	さきがけ	立花 誠	哺乳類の初期発生を制御するメチル化エピゲノムの解明	10,600
	霊長類モデル	科学技術振興機構（岩見真吾）	三浦 智行	AIDSワクチン開発への理論的介入－SHIV感染実験と数理モデル－	6,500
計		14 件	11 名		159,340

3. 奨学寄付金の受け入れ

単位：円

株式会社 医学生物学研究所	
上原記念生命科学財団	
共立製薬K K	
(財) コスメトロジー研究振興財団	
(財) 清水免疫学振興財団	
武田科学振興財団医学系研究奨励金	
内藤記念科学振興財団研究助成金	
(財) 日本生物科学研究所	
ノバルティス科学振興財団研究奨励金	
(財) 発酵研究所	
三菱財団	
メリアル・ジャパンK K	
藤原記念財団	
ヤクルト	
京都大学	
京都大学ウイルス研究所奨学金	
計	52, 006, 361

■構 成 員

所 長 松 岡 雅 雄
副 所 長 眞 貝 洋 一

協 議 員

ウイルス研究所教授 (併) 米 原 伸
ウイルス研究所教授 影 山 龍一郎
ウイルス研究所教授 松 岡 雅 雄
ウイルス研究所教授 大 野 睦 人
ウイルス研究所教授 生 田 宏 一
ウイルス研究所教授 眞 貝 洋 一
ウイルス研究所教授 小 柳 義 夫
ウイルス研究所教授 杉 田 昌 彦
ウイルス研究所教授 藤 田 尚 志
ウイルス研究所教授 秋 山 芳 展
ウイルス研究所教授 五十嵐 樹 彦
ウイルス研究所教授 豊 島 文 子

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 秋 山 芳 展
准 教 授・京大医博 酒 井 博 幸
准 教 授・阪大理博 森 博 幸
助 教・京大農博 柳 川 伸 一

細胞制御研究分野

教 授・京大医博 杉 田 昌 彦
准 教 授・大阪市大医博 松 永 勇
特定助教・阪大歯博 桑 田 啓 貴

生体発がん機構研究分野

教 授 (併)・京大理博 米 原 伸

ヒトがんウイルス研究分野

准 教 授・信大医博 土 方 誠

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 藤 田 尚 志
准 教 授・阪大医博 加 藤 博 己

情報高分子化学研究分野

教 授・京大理博 大 野 睦 人
助 教・京大理博 北 畠 真
助 教・京大理博 谷 口 一 郎

遺伝子情報解析研究分野

准 教 授・阪大理博 大 森 治 夫

生体応答学研究部門

生体防御研究分野

教 授・京大医博 生 田 宏 一
助 教・京大理博 上 田 正 道
助 教・京大理博 竹 本 経緯子
助 教・阪大保健博 谷 一 靖 江
助 教・京大生命博 原 崇 裕
技術職員 小 中 さつき

感染防御研究分野

准 教 授・京大医博 増 谷 弘

応答調節研究分野

教 授 (客)・北大獣医博 河 岡 義 裕
准 教 授 (客)・京大医博 杉 江 勝 治

細胞生物学研究部門

構造形成学研究分野

教 授・京大理博 豊 島 文 子
助 教・京大生命博 松 村 繁

増殖制御学研究分野

教 授・京大医博 影 山 龍一郎
准 教 授・京大医博 大 塚 俊 之
助 教・京大理博 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
助 教・京大理博 村 上 昭

情報制御学研究分野

教 授・(客) 利 根 川 進

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

施 設 長・教 授・京大医博 小 柳 義 夫
助 教・東北大医博 蝦 名 博 貴

ウイルス制御研究領域

教 授・熊大医博 松 岡 雅 雄
講 師・熊大医博 安 永 純一朗
助 教・京大医博 佐 藤 賢 文
技術職員 (臨床検査技師) 田 邊 順 子

ウイルス免疫研究領域

教 授 (客) 東大医博 滝 口 雅 文

附属感染症モデル研究センター
ゲノム改変マウス研究領域

教 授・順天堂大医博	眞 貝 洋 一
准 教 授・東大農博	立 花 誠
特定助教・奈良先端大医博	坪 田 智 明
技術専門職員	宮 地 均

霊長類モデル研究領域

センター長・教授・阪大医博	五十嵐 樹 彦
准 教 授・東大農博	三 浦 智 行
助 教・阪大医博	小 林 剛
技術職員	阪 脇 廣 美

附属新興ウイルス研究センター

センター長・教 授・京大医博	小 柳 義 夫
特定助教・京大医博	佐 藤 佳
特定助教・京大理博	成 田 新一郎
特定助教・京大理博	佐 塚 文 乃

非常勤講師

清 野 透
田 中 靖 人
松 浦 善 治
荒 瀬 尚
竹 田 潤 二
竹 内 寛 明
柳 雄 介
野 田 岳 志
小 原 道 法
新 矢 恭 子
森 田 公 一

事 務 部

事 務 長	乾 和 己
専門職員（総務担当）	木 村 智 子
専門職員（財務担当）	山 崎 義 文
主 任	大 槻 薫
事務職員	今 井 敦 宣

研 究 員

がんウイルス(がん遺伝子)	檜 作 洋 平
がんウイルス(がん遺伝子)	由 良 隆
生体応答学(感染防御)	松 尾 禎 之

細胞生物学(増殖制御学)	Aitor Gonzalez-Gonzalez
細胞生物学(増殖制御学)	下 條 博 美
細胞生物学(増殖制御学)	磯 村 彰 宏
細胞生物学(信号伝達学)	星 野 重 樹
細胞生物学(信号伝達学)	佐 藤 英 次
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	FAN JUN
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	櫻 井 康 晃

大 学 院 生

理学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)	照 島 功 祐
がんウイルス(がん遺伝子)	町 田 裕紀子
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	霧 生 尚 志
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	宮 田 淳 美
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	Mc Closkey 亜紗子
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	竹 村 玲 子
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	藤 井 耕太郎
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	坂 田 知 子
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	竹 岩 俊 彦
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	和 泉 光 人
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	酒 井 朗 恵
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	西 尾 治 幾

医学研究科大学院生

生体応答学(生体防御)	梁 冰 霏
生体応答学(生体防御)	我 妻 慶 祐
生体応答学(生体防御)	崔 広 為
生体応答学(感染防御)	陳 喆
生体応答学(感染防御)	正 木 聡
細胞生物学(増殖制御学)	松 永 充 博
細胞生物学(増殖制御学)	陳 素 麗
細胞生物学(増殖制御学)	渡 邊 直 希
細胞生物学(信号伝達学) (休)	岡 田 雅 也
細胞生物学(信号伝達学)	仲 屋 友 喜
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	小 林 朋 子
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	渡 部 匡 史
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	Peter Gee
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	金 村 優 香
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	萩 屋 啓 太
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	磯 部 武 久
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	内 藤 武 志
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	中 西 梓
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	田 口 奈々絵
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	菅 田 謙 治
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	馬 広 勇

ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	Aaron Coutts
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	三浦未知
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	戸上博昭
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	川月章弘
感染症モデル(霊長類モデル)	大附寛幸
感染症モデル(霊長類モデル)	川岸崇裕
感染症モデル(霊長類モデル)	安井美加
感染症モデル(霊長類モデル)	渡部祐司

人間・環境学研究科大学院生

細胞生物学(信号伝達学)	大畑拓司
細胞生物学(信号伝達学)	吉川禄助
感染症モデル(霊長類モデル)	日向亮輔
感染症モデル(霊長類モデル)	堀池麻里子
感染症モデル(霊長類モデル)	藤田泰久
感染症モデル(霊長類モデル)	仲宗根咲子

生命科学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)	梶谷直子
がんウイルス(がん遺伝子)	服部徳哉
がんウイルス(細胞制御)	森田大輔
がんウイルス(細胞制御)	浦川哲生
がんウイルス(細胞制御)	小林千沙
がんウイルス(細胞制御)	服部祐季
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	斉月
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	久島透嘉
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	阿部雄一
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	清木麻希子
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	津川陽司
遺伝子動態調節(分子遺伝)	成田亮
遺伝子動態調節(分子遺伝)	呉成旭
遺伝子動態調節(分子遺伝)	影山麻衣子
遺伝子動態調節(分子遺伝)	Anna Wrabel
遺伝子動態調節(分子遺伝)	劉知昇
遺伝子動態調節(分子遺伝)	應田涼太
遺伝子動態調節(分子遺伝)	常喜儒彦
遺伝子動態調節(分子遺伝)	高松詩穂理
遺伝子動態調節(分子遺伝)	高橋あゆみ
遺伝子動態調節(分子遺伝)	Ng Chen Seng
遺伝子動態調節(分子遺伝)	古賀悠里恵
遺伝子動態調節(分子遺伝)	宮田奈緒
生体応答学(生体防御)	阿部昌史
生体応答学(生体防御)	設楽宗一朗
生体応答学(感染防御)	吉原栄治
生体応答学(感染防御)	Dorys Adriana Lopez
細胞生物学(構造形成学)	濱崎真弓

細胞生物学(構造形成学)	井川敬介
細胞生物学(構造形成学)	岩野さやか
細胞生物学(構造形成学)	渡邊美子
細胞生物学(増殖制御学)	坂本雅行
細胞生物学(増殖制御学)	播磨有希子
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	山元誠司
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	鈴木康嗣
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	津村斐子
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	水戸部悠一
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	(休)奥野周蔵
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	楊嘉銘
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	出口勝彰
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	村松大輔
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	山口祐太郎
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	井上真悠子