## 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		
	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 <sup>2</sup> . The major part (ca. 481 m <sup>2</sup> ) of the extended area serves for researches		

	involving radioisotope labelling and in vitro DNA recombination experiments
1986 May	The memorial events for the 30th anniversary of foundation of this Institute were hald 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 Virol Opeology 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 Virus Pathagenesis
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 stuff member was appointed academic staff of the Graduate School of
Ĩ	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 Stuff 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 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, 2011)

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

Director Deputy Director	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. Yoshio Koyanagi, M.D., 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				
Protessor	Yoshinori Akiyama, D.Sc. (1988)			
Associate Professor	Hiroyuki Sakai, D.Meu.Sc. (1990) 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 Laboratory of Tumor Biogenesi	HIIOtaka Kuwata, D.D.S., PILD. (2010)			
Professor	Shin Yonehara, D.Sc. (1994) (concurrent)			
Assistant Professor	Akira Murakami, D.Sc. (1979)			
Laboratory of Human Tumor V	iruses			
Professor	Keizo Tomonaga, D.V.M., D.Vet.Med. (2011)			
Associate Professor	Makoto Hijikata, D.Med.Sc. (1997)			
Assistant Floressoi	Tomoyuki Honda, WLD., D.Wied.Sc. (2011)			
Department of Genetics and Mo	lecular Biology			
Laboratory of Molecular Geneti	cs			
Professor	Takashi Fujita, D.Sc. (2005)			
Associate Professor	HIROKI KATO, D.Med.Sc. (2010)			
Professor	Mutsuhito Ohno, D.Sc. (2001)			
Assistant Professor	Makoto Kitabatake, D.Sc.(2004)			
	Ichiro Taniguchi, D.Sc. (2007)			
Laboratory of Genetic Informat	ion Analysis			
Associate Professor	Haruo Onmori, D.Sc. (1979)			
Department of Biological Responses				
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 Labora	tory		
Visiting Professor	Yoshihiro Kawaoka, D.V.M., D.Med.Sc. (2010)		
Department of Coll Biology			
Laboratory of Subsellular Diag	anadia		
Laboratory of Subcellular Biog			
Professor	Fumiko Toyoshima, D.Sc. (2008)		
Assistant Professor	Shigeru Matsumura, D.Bio. (2008)		
Assistant Professor	Momoko Maekawa, D.Bio. (2011)		
Laboratory of Growth Regulation	on		
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)		
Associate Professor(Spe.)	Itaru Imayoshi, D.Bio.(2008)		
Laboratory of Signal Transduct	ion		
Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D.Vet.Med. (2005)		
Assistant Professor	Takeshi Kobayashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2008)		
Laboratory of Regulatory Infor	mation		
Visiting Professor	Susumu Tonegawa, Ph.D, D.Sc. (1992)		

## **Center for Human Retrovirus Research**

Laboratory of Viral Pathogenes	is
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)
Assistant Professor	Kazuya Shimura, D.Med.Sc. (2011)
Laboratory of Viral Immunolog	ý
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 Yosh

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)
Assistant Professor	Ayano Satsuka, D.Bio (2010)

## Lecturers (part time)

Kenji Nakahigashi Yasuhiko Horiguchi Sho Yamasaki Yasuhito Tanaka Kazufumi Matsushita Yutaro Kumagai Yukihiro Nishiyama Yoichiro Iwakura Yoshiyuki Suzuki Osamu Takeuchi Tatsuo Shioda Hirofumi Akari Tatsuya Tsurumi Tsuneo Morishima Ikuo Wada Koki Taniguchi

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

#### **Administration Office**

Committee Chairman

Chief Officer General Affairs Finance

Library

Yohei Hizukuri Kotarou Fujii Aitor Gonzalez Hiromi Shimojo Akihiro Isomura Tomoko Tateya Takahiko Matsuda Shigeki Hoshino Yuuki Nakaya Tiejun Zhao Masaki Kato Shingo Iwami

#### Graduate School of Science

Kosuke Terushima Yukiko Machida Ryoji Miyazaki Narimasa Hashimoto Tomoko Sakata Toshihiko Takeiwa Hiroto Izumi Tokie Sakai Haruki Nishio

#### Graduate School of Medicine

Yasushi Daimon Akifumi Kawate Kan Fujino Yusuke Matsumoto Shoko Nakamura Kazumi Inui (2010) Hiroyuki Matsunaga (2011) Satoshi Matsushita (2011)

#### **Research Fellows**

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.) Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.) Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.) Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.) Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

#### **Graduate Students**

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

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.) Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.) Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses) Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses) Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses) **Bingfei** Liang Keisuke Wagatsuma Guangwei Cui So Masaki Tan Sloklay Naoki Watanabe Sayumi Shimode Peter Gee Yuka Kanemura Natsumi Kasai Azusa Tanaka Nanae Taguchi Kenji Sugata Guangyong Ma Michi Miura Hiroaki Togami Akihiro Kawatsuki Yu Mitagami Hiroyuki Ohotsuki Takahiro Kawagishi Mika Yasui Yuji Watanabe Yuki Ishida Megu Oue Fumihiro Kato

#### Graduate School of Human and Environmental Studies

Rokusuke Yoshikawa Ryosuke Hyuga Mariko Horiike Sakiko Nakasone

#### Graduate School of Biostudies

Naoko Kajitani Tokuya Hattori Yuki Hattori Riki Ishibashi Syo Hanakawa Yukie Yamamoto Yuichi Abe Youji Tsugawa Yuma Hotta Yuichi Akahori Seigyoku Go Maiko Kageyama Yoo Ji Seung Ryota Ouda Shiori Takamatsu Ng Chen Seng Yurie Koga Nao Miyata Takeshi Watanabe Vo Dang Nghiem Akifumi Abe Soichiro Shitara

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. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.) Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.) Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.) Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.) Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.) Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses) Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics) Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.) Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)

Mayumi Hamasaki Keisuke Ikawa Sayaka Iwano Miko Watanabe Masayuki Sakamoto Yukiko Harima Miyuki Nishi Kyoko Hirano Yasutsugu Suzuki Yuichi Mitobe Naoki Sono Yang Chia-Ming Katsuaki Deguchi Mayuko Inoue Yutaro Yamaguchi Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellular Biogenesis.) Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Viral Pathogenesis) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control.) Ctr. HuRetro. Res. (Lab. Virus Control.) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model) Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)

## CONTENTS

#### **Research Activities**

## DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY LABORATORY OF GENE ANALYSIS

#### I. First Group

- Possible substrate binding function of a periplasmic crevasse of SecD: H. MORI, T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>,
   O. NUREKI<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and K. ITO<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Gradate School of Science, the University of Tokyo and <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University) ....3
- 2) Identification of SecD nearest neighbors by *in vivo* site-directed photo-cross-linking: Y. MACHIDA, T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, O. NUREKI<sup>1</sup>, K. ITO<sup>2</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Gradate School of Science, the University of Tokyo and <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University) ....4
- Different expression of SecD paralogues in *Vibrio alginolyticus*: N. HASHIMOTO, S. KOJIMA<sup>1</sup>,
   M. HOMMA<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Gradate School of Science, Nagoya University)

•••5

- 4) Roles of the PDZ domains in the proteolytic function of RseP, a key protease involved in the  $\sigma^{E}$ -pathway of *E. coli* extracytoplasmic stress response: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA ....5
- 5) An attempt to identify physiological substrates of *E. coli* rhomboid protease GlpG: K. TERUSHIMA and Y. AKIYAMA ····6
- 6) Site-directed *in vivo* photo-cross-linking analysis of the membrane targeting-mediated negative regulation of *E. coli* heat shock factor  $\sigma^{32}$ : R. MIYAZAKI, T. YURA<sup>1</sup>, H. MORI and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University) ....7
- Possible involvement of toxin-antitoxin systems in σ<sup>E</sup>-dependent extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*: Y. DAIMON, S. NARITA<sup>1</sup> and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Center for Emerging Virus Research, IVR)
- X-ray crystal structural analysis of membrane bound ATP-dependent protease FtsH: R. SUNO, T. Shimamura<sup>1</sup>, T. HINO<sup>1</sup>, A. ABE, T. ARAKAWA<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA, S. IWATA<sup>1</sup> and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Gradate School of Medicine, Kyoto University, <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)
- 9) Biochemical analysis of the substrate-translocating mechanism of ATP-dependent Protease FtsH: R. SUNO, M, SHIMOYAMA<sup>1</sup>, A. ABE, N. SHIMODATE<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University) ....9

#### II. Second Group

 Analysis of keratin-associated protein 13-induced activation of canonical wnt signaling pathway in vivo: S. YANAGAWA ····9

- Analysis of CAF formation mechanism using HPV positive cells: A. SATSUKA, N. KAJITANI and H. SAKAI
   ··10
- Identification of novel function of human papillomavirus E4: N. KAJITANI, A. SATSUKA and H. SAKAI
- Interaction of human papillomavirus E2 with E7 and effect on host cells: A. KAWATE, N.
   KAJITANI, A. SATSUKA and H. SAKAI

•••11

•••16

LIST OF PUBLICATIONS

## LABORATORY OF CELL REGULATION

- Reconstitution of the human CD1a expression and function in mice: C. KOBAYASHI, T. SHIINA<sup>1</sup>, A. TOKIOKA, Y. HATTORI, T, KOMORI, M. KOBAYASHI-MIURA<sup>2</sup>, T. TAKIZAWA<sup>3</sup>, K. TAKAHARA<sup>4</sup>, K. INABA<sup>4</sup>, H. INOKO1, M. TAKEYA<sup>5</sup>, G. DRANOFF<sup>6</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Tokai Univ., <sup>2</sup>Shimane Univ., <sup>3</sup>Nippon Med. Sch., <sup>4</sup>Graduate Sch. Biostudies, Kyoto Univ., <sup>5</sup>Kumamoto Univ., <sup>6</sup>Dana-Farber Cancer Inst.) ....14
- Identification of mycobacteria-derived glycolipids as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity: T. KOMORI, T. NAKAMURA<sup>1</sup>, I. MATSUNAGA, D. MORITA, Y. HATTORI, T. URAKAWA, H. KUWATA, N. FUJIWARA<sup>2</sup>, K. HIROMATSU<sup>3</sup>, H. HARASHIMA<sup>1</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Osaka City Univ., <sup>3</sup>Fukuoka Univ.) ....14
- A new aspect of lipid immunity against AIDS: D. MORITA, T. IGARASHI<sup>1</sup>, M. HORIIKE<sup>1</sup>, N. MORI<sup>2</sup>, and M. SUGITA (<sup>1</sup>Laboratory of Primate Model, IVR, <sup>2</sup>Graduate Sch. Agriculture, Kyoto Univ.)

LIST OF PUBLICATIONS

## LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

- Bim regulates B cell receptor-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-preactivated splenic B cells differentiating into plasma cells: Y. GAO, H. KAZAMA and S. YONEHARA
   Double-faced functions of caspase-8 in induction and protection of programmed cell death: S. KUROKI, M. KIKICHI, S. SAKAGUCHI and S. YONEHARA
   A deale for the birther birther birther for a ES of the A MUDAKAMU and S.
- 3)A role of wnt signals in the differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI•••19LIST OF PUBLICATIONS•••20

#### LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES

I. First Group

 Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) and neurological abnormalities of transgenic mice expressing Borna disease virus phosphoprotein: T. HONDA, K. FUJINO, Y. MATSUMOTO, M. HORIE, T DAITO and K. TOMONAGA ....21

- Intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein in living cells: T. DAITO, K. 2) FUJINO and K. TOMONAGA ···22
- 3) Evolutional analysis of endogenous Borna-like nucleoprotein elements in primate species: Y. KOBAYASHI<sup>1</sup>, M. HORIE, K. TOMONAGA and Y. SUZUKI<sup>1</sup>. (<sup>1</sup>Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University) ···22
- 4) Generation of Borna disease virus vector stably expressing foreign proteins from an intercistronic noncoding region: T. DAITO, K. FUJINO, T. HONDA, Y. MASTUMOTO and K. TOMONAGA

···23

···24

- II. Second Group
- Infectious viral particle production is modulated by prostanoids in the cells: Y. ABE, T. WAKITA, 1) M. HIJIKATA ···23
- 2) IFN- $\lambda$ 3 response in the early phase of the viral infected hepatocytes: Y. Tsugawa, Y. Qi, K. Onomoto, H. Kato, T. FUJITA, M. HIJIKATA ···24

LIST OF PUBLICATIONS

## DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

#### LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- 1) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C: K. ONOMOTO, S. MORIMOTO, T. KAWAGUCHI, H. TOYODA, M. TANAKA, M. KURODA, K. UNO, T. KUMADA, F. MATSUDA, K. SHIMOTOHNO, T. FUJITA and Y. MURAKAMI ···28 Retinoic acid-inducible gene i-inducible mir-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses 2)
- through downregulation of the very low density lipoprotein receptor: R. OUDA, K. ONOMOTO, K. TAKAHASI, EDWARDS. M. R, H. KATO, M. YONEYAMA and T. FUJITA ···28
- 3) 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation: M. KAGEYAMA, K. TAKAHASI, R. NARITA, R. HIRAI, M. YONEYAMA, H. KATO and T. FUJITA ···29 ···30

LIST OF PUBLICATIONS

#### LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

RNA distribution in the cell:	32
Identity elements used in mRNA export	32
Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursors	32
rRNA quality control mechanisms:	33
F PUBLICATIONS	33
	RNA distribution in the cell: Identity elements used in mRNA export Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursors rRNA quality control mechanisms: F PUBLICATIONS

## LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

- Interaction between TLS DNA polymerases and PCNA: K. MORISHITA<sup>1</sup>, M. YAMAGUCHI<sup>1</sup> and 1) H. OHMORI (<sup>1</sup>Kyoto Institute of Technology) •••36
- Intracellular interaction between REV7 and REV3 in DT40 cells: K. TAKENAKA<sup>1</sup>, H. OHMORI 2) and Y. MIKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Medical and Dental University) ···37
- Bypass of BPDE-dG in mouse cells lacking TLS polymerases: K. HASHIMOTO<sup>1</sup>, Y. CHO<sup>1</sup>, I-Y. 3) YANG<sup>1</sup>, J-I. AKAGI<sup>2</sup>, E. OHASHI<sup>3</sup>, S. TATEISHI<sup>4</sup>, N. de WIND<sup>5</sup>, F. HANAOKA<sup>2</sup>, H. OHMORI and M. MORIYA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Stony University, <sup>2</sup>Gakushuin University, <sup>3</sup>Kyushu University, <sup>4</sup>Kumamoto University, <sup>5</sup>Leiden University,) ···38

•••39

•••43

LIST OF PUBLICATIONS

## DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES

## LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

- 1) The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCRy locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers: S. TANI-ICHI and K. IKUTA ....40
- 2) STAT5 controls the rearrangement of TCR J $\gamma$  gene segments through STAT-binding motifs in the J $\gamma$ promoters: K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI, B. LIANG, T. HARA and K. IKUTA ···41
- 3) IL-7R controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells: S. TANI-ICHI, A. ABE, T. HARA and K. IKUTA ···41
- Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid tissues: T. HARA, S. SHITARA, G. CUI, S. 4) TANI-ICHI and K. IKUTA ···42
- Evidence for the thymic origin of γδ IEL: S. SHITARA, B. LIANG, T. HARA, K. WAGATSUMA, 5) S. TANI-ICHI and K. IKUTA ···42
- ELISA kit system for detecting calreticulin: M. UEDA, S. KAGEYAMA<sup>1</sup> and T. YOSHIKI<sup>2</sup> 6) (<sup>1</sup>Department of Urology, Shiga University of Medicine, <sup>2</sup>Department of Clinical Oncology, Kyoto Pharmaceutical University) •••43

## LIST OF PUBLICATIONS

## LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

- 1) Thioredoxin binding protein (TBP)-2/ Txnip and  $\alpha$ -arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus.: H. MASUTANI, E. YOSHIHARA and S. MASAK •••46
- 2) Deficiency of thioredoxin binding protein (TBP)-2 enhances TGF- $\beta$  signaling and contributes to TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition: S. MASAKI and H. MASUTANI •••46 ···47

## LIST OF PUBLICATIONS

#### **DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**

#### LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

- 1) ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin: S. MATSUMURA, M HAMASAKI, M. EBISUYA<sup>1</sup>, T. YAMAMOTO<sup>2</sup>, E. NISHIDA<sup>3</sup> and F. TOYOSHIMA (<sup>1</sup>ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, <sup>2</sup>iCeMS, Kyoto University, <sup>3</sup>Graduate School of •••49 **Biostudies**, Kyoto University)
- 2) Roles of cholesterol metabolites in the control of cell division: M. HAMASAKI, S. MATSUMURA and F. TOYOSHIMA •••49
- Regulation of the early endosomes during mitosis: K. IKAWA, S. MATSUMURA, <sup>1</sup>M. 3) FUKUDA and F. TOYOSHIMA (1Department of Developmental Biology and Neurosciences, Tohoku University) ···50

## LIST OF PUBLICATIONS

#### LABORATORY OF GROWTH REGULATION

- 1) Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock: Y. TAKASHIMA, T.OHTSUKA, A. GONZALEZ, H. MIYACHI and R. KAGEYAMA ····52
- 2) Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development: T. TATEYA, I. IMAYOSHI, I. TATEYA, J. ITO and R. KAGEYAMA ....53
- 3) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses: M. SAKAMOTO, I. IMAYOSHI, T. OHTSUKA, M. YAMAGUCHI, K. MORI and R. KAGEYAMA

....54

···50

- 4) Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis: Y. NIWA, H. SHIMOJO, A. ISOMURA, A. GONZALEZ, H. MIYACHI and R. **KAGEYAMA** ···54
- Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural 5) differentiation during cortical development: T. OHTSUKA, H. SHIMOJO, M. MATSUNAGA, N. WATANABE, K. KOMETANI, N. MINATO and R. KAGEYAMA •••55
- Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial 6) development: K. IKEDA, R. KAGEYAMA, Y. SUZUKI and K. KAWAKAMI ...55
- 7) Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glial differentiation in neural stem cells: A. MATSUMOTO, I. ONOYAMA, T. SUNABORI, R. KAGEYAMA, H. OKANO and K.-I. NAJAYAMA •••56
- 8) Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing  $\gamma\delta T$  cells: K. SHIBATA, H. YAMADA, T. SATO, T. DEJIMA, M. NAKAMURA, T. IKAWA, H. HARA, S. YAMASAKI, R. KAGEYAMA, Y. IWAKURA, H. KAWAMOTO, H. TOH and Y. YOSHIKAI ···57

```
LIST OF PUBLICATIONS
```

## LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

- 1) Comparison of two quantitative assays for xenotropic murine leukemia virus-related virus: E. SATO, R. YOSHIKAWA and T. MIYAZAWA ....61
- Identification of functional receptors for RD-114 virus in dogs: R. YOSHIKAWA, T KOBAYASHI and T MIYAZAWA ....61
- 3) Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B: Y. NAKAYA, S. HOSHINO, J. YASUDA<sup>1</sup> and T. MIYAZAWA (<sup>1</sup>Department of Emerging Infectious Diseases, Nagasaki University) ....61
- Identification and characterization of feline UBE1L gene: S. SHIMODE, T. MIYAZAWA, T. KOBAYASHI<sup>1</sup>, H. SATO<sup>2</sup> and T. TANABE<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Laboratory of Primate Model, IVR and <sup>2</sup>Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Kitasato University) ....62
- Analysis of newly identified KoRV-related sequences: S. HOSHINO, T. KOBAYASHI and T. MIYAZAWA ····62

•••63

•••69

## LIST OF PUBLICATIONS

## CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH

## LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

- Interaction of HIV protein and host restriction factor: P. GEE, H. EBINA, K. SATO, N. MISAWA, Y. KANEMURA, N. KASAI and Y. KOYANAGI ....67
- 2) HIV-1 pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA and Y. KOYANAGI ····67
- 3) HIV Integration and Latency: H. EBINA, Y. KANEMURA, Y. SUZUKI, K. URATA and Y. KOYANAGI ....68
- APOBEC1-mediated attenuation of herpes simplex virus 1 indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis: P. GEE, H. EBINA, Y. KANEMURA and Y. KOYANAGI ....68

LIST OF PUBLICATIONS

## LABORATORY OF VIRUS CONTROL

- Pathogenesis of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) in vivo: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO, J.TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, Y. MITOBE, Y. MITAGAMI, M. TANABE and M. MATSUOKA ....73
- Molecular functions of HBZ in ATL leukemogenesis: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO,T.
   ZHAO, J.FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, A. TANAKA-NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE, M.
   MIURA, N. SONO, A.KAWATSUKI, Y. MITAGAMI, M. TANABE and M. MATSUOKA ....73
- Characterization of DNA repair proteins involved in retroviral integration: Y. SAKURAI and M. MATSUOKA ....74

- 4) Novel resistance mechanism to HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA ...74
- 5) Development of new small-molecule inhibitors for HIV: K. SHIMURA, H. TOGAMI and M. MATSUOKA ···75

LIST OF PUBLICATIONS

## EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

## LABORATORY OF MOUSE MODEL

Roles of the histone lysine demethylases Jmjd1a and Jmjd1b in murine embryonic development: 1) M.TACHIBANA, S. KUROKI and Y. SHINKAI ...79 2) Analysis of epigenetic regulation of mammalian sex differentiation: M. TACHIBANA •••79 3) Roles of endogenous retroviruses repressor, ESET, in DNA repair/genome integrity: T. TSUBOTA and Y. SHINKAI ···80

LIST OF PUBLICATIONS

## LABORATORY OF PRIMATE MODEL

- 1) T cells monitor N-myristoylation of the nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys: D. MORITA, T. IGARASHI, M. HORIIKE, N. MORI and M. SUGITA ····83
- 2) Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge: Y. TAKAHARA, S. MATSUOKA, T. KUWANO, T. TSUKAMOTO, H. YAMAMOTO, H. ISHII, T. NAKASONE, A. TAKEDA, M. INOUE, A. IIDA, H. HARA, T. SHU, M. HASEGAWA, H. SAKAWAKI, M. HORIIKE, T. MIURA, T. IGARASHI, T. K. NARUSE, A. KIMURA and T. MATANO ···84
- 3) Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-infected rhesus macaque by phage display: T. KUWATA, Y. KATSUMATA, K. TAKAKI, T. MIURA and T. IGARASHI

···84

...75

···81

- 4) Recombination Mediated Changes in Coreceptor Usage Confers an Augmented Pathogenic Phenotype in a Non-human Primate Model of HIV-1 Induced AIDS: Y. NISHIMURA, M. SHINGAI, W. R. LEE, R. SADJADPOUR, O. K. DONAU, R. WILLEY, J. M. BRENCHLEY, R. IYENGAR, A. BUCKLER-WHITE, T. IGARASHI and M. A. MARTIN ....85
- 5) Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques: M. NAKAMURA, Y. TAKAHARA, H. ISHII, H. SAKAWAKI, M. HORIIKE, T. MIURA, T. IGARASHI, T. K. NARUSE, A. KIMURA, T. MATANO and S. MATSUOKA ···85 ···86

## LIST OF PUBLICATIONS

## **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH**

HIV and EBV pathogenesis: K. SATO and Y. KOYANAGI 1)

2)	Role of cell surface protease in the outer membrane	protein	assembly:	S.	NARITA	and $\mathbf{Y}$ .
	AKIYAMA <sup>1</sup> ( <sup>1</sup> Department of Viral Oncology, IVR)					89
LIST OF	F PUBLICATIONS					•••90

•••93

•••94

## **REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM** LIST OF PUBLICATIONS

COMPUTER NETWORK OF INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH	•••95
STAFF CHANGES OF THE INSTITUTE	•••96
THE SCIENTIFIC LECTURES OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH	•••97
SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH	•••98

## ウイルス研究所 - - - 2011

がんウイルス研究部門・がん遺伝子研究分野	•••103
がんウイルス研究部門・細胞制御研究分野	•••107
がんウイルス研究部門・生体発がん機構研究分野	•••108
がんウイルス研究部門・ヒトがんウイルス研究分野	•••110
遺伝子動態調節研究部門・分子遺伝学研究分野	•••114
遺伝子動態調節研究部門・情報高分子化学研究分野	•••118
遺伝子動態調節研究部門・遺伝子情報解析研究分野	•••123
生体応答学研究部門・生体防御研究分野	•••125
生体応答学研究部門・感染防御研究分野	•••128
細胞生物学研究部門・構造形成学研究分野	•••129
細胞生物学研究部門・増殖制御学研究分野	•••131
細胞生物学研究部門・信号伝達学研究分野	•••135
附属施設ヒトレトロウイルス研究施設・ウイルス病態研究領域	•••139
附属施設ヒトレトロウイルス研究施設・ウイルス制御研究領域	•••142
附属施設感染症モデル研究センター・ゲノム改変マウス研究領域	•••144
附属施設感染症モデル研究センター・霊長類モデル研究領域	•••147
附属施設新興ウイルス研究センター	•••150
マウス作製支援チーム	•••152
ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム	•••153
外部資金獲得状況	•••154
構成員	···157

## 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 biophysical and structural approaches.

Possible substrate binding function of a periplasmic crevasse of SecD: H. MORI, T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, O. NUREKI<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and K. ITO<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Gradate School of Science, the University of Tokyo and <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)

The SecYEG translocon and the SecA ATPase cooperate to facilitate protein export across the bacterial cytoplasmic membrane. In addition to these essential core components, SecDF, a pair of membrane integrated Sec factors, play important roles in efficient protein export in vivo. We determined the crystal structure of SecDF from Thermus thermophilus at 3.3Å resolution and proposed a working hypothesis based on structure-instructed biochemical and biophysical studies (1). According to the model, the first large periplasmic domain (P1) of SecD binds a substrate and undergoes functionally important conformational changes powered by the cation-motive force across the membrane. In support of this model, isolated P1 domain was capable of binding denatured polypeptides with varying affinities according to its conformational states. However, it has remained to be shown that the intact, full-length SecD indeed interacts with a translocating substrate polypeptide. To show this, we performed site-directed photo cross-linking using inverted membrane vesicles (IMVs) bearing a substrate in a state of translocation intermediate. We prepared IMVs containing E. coli SecD derivatives, in which a photo-reactive amino acid analogue, para-benzoyl phenylalanine (pBPA), had been placed on the molecular surface of the P1 domain. The translocation intermediate generated for this experiment was a proOmpA derivative having a disulfide loop near its C-terminus. IMVs with SecD (Arg407pBPA) produced a SecD-proOmA cross-linked product, specifically when the proOmpA derivative was in the intermediate state. Thus, the P1 domain of intact SecD in the membrane is in close proximity to the substrate polypeptide emerging from the translocon. On the structure of TtSecDF we have determined, the residue Val228 that corresponds to Arg407 in E.coli SecD is located within a crevasse with an opening toward the periplasm, suggesting that this cavity in the P1 domain might have a substrate-binding function.

(1) Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Matsurana,

A., Ito, K. and Nureki O. (2011) Nature 474, 235-238.

2) Identification of SecD nearest neighbors by *in vivo* site-directed photo-cross-linking: Y. MACHIDA, T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, O. NUREKI<sup>1</sup>, K. ITO<sup>2</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Gradate School of Science, the University of Tokyo and <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)

Our recent structural and functional analyses of SecDF strongly suggest that SecDF forms a complex with SecYEG translocon, captures a substrate polypeptide emerging from the translocon by its P1 domain and undergoes conformational changes using the PMF (proton motive force) energy to facilitate forward movement of the polypeptide (1). However, the mode of interactions between SecDF and Sec-related factors including SecYEG remain largely unknown. To gain information on this issue, we carried out systematic in vivo site-directed photo-cross-linking analysis targeting SecD. This method has been successfully applied to identify SecA neighboring sites in SecY (2). Based on the Thermus thermophilus SecDF structure, we designed E. coli SecD mutations so as to introduce a photoreactive amino acid analogue, pBPA on the molecular surface of the protein. We constructed total of 50 SecD derivatives. Photo-cross-linking experiments with these mutants gave the following results. 1) When pBPA was introduced at some positions in TM4 or TM5 that ate located in interface with SecF, strong cross-linked products reacting with anti-SecF antibody were observed in a UV-irradiation-dependent manner. These results support the idea that SecDF in the membrane assumes a conformation similar to the crystal structure. 2) When pBPA was introduced at a position on the membrane-proximal surface of the P1 domain, a SecY-SecD cross-linked product was generated, suggesting that the P1 domain is located near the SecYEG translocon. 3) Upon UV irradiation, SecD (R268pBPA) mutant generated a slowly migrating band, which presumably represents an intra-molecular cross-linked product and could serve as an indicator to monitor a conformational state (termed I form) of the P1 domain. Interestingly, when cells expressing this SecD derivative were treated with CCCP (a proton ionophore) to collapse PMF across the membrane, the cross-linked product dramatically reduced. Furthermore, when the mutation was combined with the SecD (Asp519Asn) or SecF(Arg247Met) mutation that abolishes both proton conductance and protein export enhancing activities of SecDF, the cross-linked product almost completely disappeared. These results are nicely consistent with our working hypothesis that the proton conductance of SecDF somehow couples with movement of the P1 domain. 4) SecD derivatives containing pBPA on an a-helical region of the P1 domain facing periplasmic space generated several slowly migrating cross-linked bands. We identified partner proteins of the some products as Skp and DegP, periplasmic chaperones that prevent newly translocated outer membrane proteins from aggregating and facilitate their delivery to outer membrane. An interesting hypothesis is that the P1 domain could act as not only a binding site for a translocating substrate but

also a docking platform for the periplasmic chaperones to promote translocation and folding of the substrate polypeptide.

 Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Matsurana, A., Ito, K. and Nureki, O. (2011) Nature 474, 235-238.

(2) Mori, H. and Ito, K (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 16159-16164

# 3) Different expression of SecD paralogues in Vibrio alginolyticus: N. HASHIMOTO, S. KOJIMA<sup>1</sup>, M. HOMMA<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Gradate School of Science, Nagoya University)

Genome sequence analysis revealed that marine bacteria Vibrio species contain two sets of secDF genes, designated V.secDF1 and V.secDF2. The former is more closely related to the E. coli secDF genes. Surprisingly, we found that V.SecDF1 can support effective protein export in a SecD-deficient *E. coli* mutant cells (*secD1*) in a Na<sup>+</sup>-dependent manner, providing physiological evidence for the Na<sup>+</sup>-coupled protein translocation mediated by V.SecDF1 (1). V.SecDF2 also promoted protein export in the secD1 mutant cells, but in this case it did not show any Na<sup>+</sup>-dependence, presumably representing the H<sup>+</sup>-coupled function of V.SecDF2 as is the case with E.coli SecDF. These results raise the following questions: 1) Do both of the Vibrio SecDF paralogues are indeed expressed in *Vibrio* species? 2) If so, how their expressions are regulated? 3) Is there any functional difference between these two paralogues? To address these questions, we examined accumulation of the SecD paralogues in *V. alginolyticus* under various culture conditions by immunoblotting using specific antibody against each SecD paralogue. When cells were cultured in a normal rich medium containing 500 mM NaCl (pH 7.0), we detected V.SecD1, but not V.SecD2. Interestingly, when  $Na^+$  concentration in the medium was reduced to 50 mM, we detected a small amount of V.SecD2 and further decreasing of medium Na<sup>+</sup> (to 10 mM) resulted in increased accumulation of V.SecD2. We also found that even in the presence of 500 mM NaCl, acidification of the medium to pH5.5 caused increase in the cellular amount of V.SecD2. The environmental conditions such as low Na<sup>+</sup> content and/or low pH in the medium seem to be more suitable for protein translocation by H<sup>+</sup>-driven SecDF2 than by Na<sup>+</sup>-driven SecDF1. These results strongly suggest that V. alginolyticus possesses regulatory mechanisms for expression of SecDF paralogues to adjust to its environment.

 Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Matsurana, A., Ito, K. and Nureki, O. (2011) Nature 474, 235-238.

## 4) Roles of the PDZ domains in the proteolytic function of RseP, a key protease involved in the $\sigma^{E}$ -pathway of *E. coli* extracytoplasmic stress response: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA

In the *Escherichia coli*  $\sigma^{E}$ -pathway of extracytoplasmic stress response, anti- $\sigma^{E}$  protein RseA is sequentially processed by two membrane proteases DegS (site-1 cleavage) and RseP (site-2), resulting in the release of  $\sigma^{E}$  from the membrane and its eventual activation. Normally RseP can cleave only the DegS-cleaved intermediate of RseA. The proteolytic function of RseP is speculated to be controlled by its two PDZ domains. Recently, binding of the exposed carboxyl terminal residue (Val148) of DegS-processed RseA to the second PDZ domain of RseP has been proposed to facilitate the site-2 cleavage by RseP (1). Since this model was mainly based on in vitro and structural studies, we investigated whether it can be extended to physiological situations. Mutations in the ligand-binding region in the RseP PDZ domain and even the deletion of the PDZ domains little affected the cleavage of RseA and its derivative model substrates in vivo. Amino acid substitutions of the exposed C-terminal residue Val148 of the model substrate mimicking the DegS-processed RseA also gave minimal effect on substrate cleavage efficiencies. These results suggest that the recognition of the exposed C-terminal residue of RseA by the RseP PDZ domain makes little, if any, contribution to the cleavage of RseA in vivo. Moreover, we replaced the chromosomal *rseP* gene by a mutant gene encoding an RseP-derivative lacking either of the two PDZ domains and revealed that these mutants showed normal growth at any temperature examined and exhibited almost normal  $\sigma^{E}$ -activation in response to overproduction of OmpC, an outer membrane protein (OMP). These results suggest that neither of the two PDZ domains is essential for the conventional OMP-induced  $\sigma^{E}$  activation process. Together with our previous observations (2), we are speculating that the RseP PDZ domains are involved in the OMP-independent  $\sigma^{E}$ activation pathway through binding of a still unknown-ligand. To address this hypothesis, we are trying to identify a physiological ligand of RseP PDZ by using site-directed in vivo photo cross-linking approach targeted against the putative ligand-binding sites of the RseP PDZ domains. We have preliminarily detected some cross-linked products and their characterization is now under progress.

(1) Li, X., Wang, B., Feng, L., Kang, H., Qi, Y., Wang, J., and Shi, Y. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 14837-14842.
 (2) Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K. -i., Akiyama, S., and Akiyama, Y. (2008) J. Biol. Chem., 283, 35042-35052.

# 5) An attempt to identify physiological substrates of *E. coli* rhomboid protease GlpG: K. TERUSHIMA 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 GlpG, an *E.coli* 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 surrounding the cleavage site are crucial for rhomboid proteases. However, the proposed motif does not completely fit with our previous data obtained form the analysis of model substrate cleavage by GlpG, suggesting that the motif recognized by GlpG somewhat deviates from the proposal consensus. To elucidate the GlpG recognition motif, we carried out systematic mutational analysis against the cleavage site region in a model substrate of GlpG. Our results showed that residues at two additional positions (P1' and P3') are crucial for cleavage by GlpG. On the other hand, as a more direct approach to identify GlpG substrates, we systematically screened single spanning membrane proteins for their GlpG-dependent cleavage and identified several candidates. These two approaches would help us to identify a physiological substrate and elucidate a cellular function and substrate cleavage mechanism of GlpG.

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

# 6) Site-directed *in vivo* photo-cross-linking analysis of the membrane targeting-mediated negative regulation of *E. coli* heat shock factor σ<sup>32</sup>: R. MIYAZAKI, T. YURA<sup>1</sup>, H. MORI and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)

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 both under positive control by  $\sigma^{32}$ , a transcription factor dedicated to the heat shock response, and under negative feedback control (inactivation/degradation of  $\sigma^{32}$ ) by stress-inducible molecular chaperones (DnaK/J-GrpE, GroEL/S).  $\sigma^{32}$  is extremely unstable *in vivo* and is degraded by membrane-localized protease FtsH. Chaperones contribute to rapid degradation of  $\sigma^{32}$  *in vivo*, whereas its degradation *in vitro* is very slow and not enhanced by chaperones. It is possible that some other factors are involved in degradation of  $\sigma^{32}$  *in vivo*.

Recent work by Yura *et al.* (unpublished results) suggests that signal recognition particles (SRP), its receptor FtsY and SecYEG translocon, which are involved in membrane protein biogenesis, are required for the chaperone-dependent feedback inhibition of  $\sigma^{32}$ . It has been also suggested that region 2.1 of  $\sigma^{32}$  is important for the negative feedback control (1). These observations raise the possibility that  $\sigma^{32}$  is targeted to degradation at the membrane through recognition of region 2.1 by cellular factors including chaperones, SRP, FtsY, SecYEG, and FtsH. In order to identify proteins interacting with region 2.1 *in vivo*, we employed site-directed *in vivo* photo-cross-linking approach. We constructed and expressed nineteen  $\sigma^{32}$  derivatives containing a photo-reactive amino acid analog (pBPA) around region 2.1. We detected several cross-linked products and reveal their roles in negative regulation of  $\sigma^{32}$ .

(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.

7) Possible involvement of toxin-antitoxin systems in  $\sigma^{E}$ -dependent extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*: Y. DAIMON, S. NARITA<sup>1</sup> and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Center for Emerging Virus Research, IVR)

Bacteria respond to and cope with extracytoplasmic stresses that cause damage to envelope components by altering their gene expressions. In gram-negative bacteria, this 'extracytoplasmic stress response (ESR)' is required for the maintenance of cell envelope as well as for expression of virulence.  $\sigma^{E}$  (RpoE) is an alternative sigma factor that governs a major signaling pathway ( $\sigma^{E}$  pathway) of ESR in *Escherichia coli*.  $\sigma^{E}$  is activated by extracytoplasmic stresses produced under envelope-damaging conditions such as heat shock, overexpression of outer membrane proteins, and mutational alterations of chaperones and machinery required for folding and assembly of outer membrane proteins. In addition to the important role during stressed conditions.  $\sigma^{E}$  is also known to be required for growth of *E. coli* cells even under normal or non-stressed conditions. However, the essential role of  $\sigma^{E}$  for cell viability remains to be elucidated. Although a deletion of *ydcQ*, a gene for an antitoxin protein of a chromosomally-encoded toxin-antitoxin (TA) system, has been reported to suppress the lethality caused by the *rpoE* null mutation (1), the mechanism of the suppression is unknown. To gain insight into the essentiality of  $\sigma^{E}$ , we are studying possible involvement of TA systems in the  $\sigma^{E}$ -dependent stress response.

(1) Ruiz, N., Gronenberg, L.S., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 5537-5542.

8) X-ray crystal structural analysis of membrane bound ATP-dependent protease FtsH:
 R. SUNO, T. SHIMAMURA<sup>1</sup>, T. HINO<sup>1</sup>, A. ABE, T. ARAKAWA<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA, S.
 IWATA<sup>1</sup> and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Gradate School of Medicine, Kyoto University, <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)

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<sup>+</sup> (<u>A</u>TPases <u>a</u>ssociated with diverse cellular <u>a</u>ctivities) and protease domains. Previously, we successfully crystallized and determined a soluble region of FtsH (sFtsH) containing ADP from *T. thermophilus* at 3.9Å resolution. In the hexameric structure, a substrate polypeptide can reach the active protease catalytic sites through a tunnel leading from AAA<sup>+</sup> 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. Furthermore, we succeeded in crystallizing sFtsH with several kinds of ATP analogues to

understand the molecular mechanism of FtsH in detail. These crystals diffracted at least 3.5Å resolution. Among them, we are analyzing the sample crystallized in the presence of ADP • AlFx. The primary phases were initially estimated by the molecular replacement (MR). Now, the atomic model are refining by using REFMAC and Phaser.

9) Biochemical analysis of the substrate-translocating mechanism of ATP-dependent Protease FtsH: R. SUNO, M, SHIMOYAMA<sup>1</sup>, A. ABE, N. SHIMODATE<sup>1</sup>, Y. AKIYAMA and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, <sup>2</sup>Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University)

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  $\beta$ -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 Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway in vivo: S. YANAGAWA

Using yeast two-hybrid system, I found that Keratin associated protein (Krtap) 13, a cysteine-rich cytoplasmic protein binds to Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6), a co-receptor for Wnt. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling and promotes Dvl-aggregates formation. Wnt treatment is known to induce LRP6 aggregates, 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 recruiting Axin to the plasma membrane that leads to activation of Wn signaling.

To analyze effect of ectopic overexpression of Krtap13 in vivo, I generated a Krtap13-trans-gene (Krtap13-Tg) consisting of CAG-promoter, loxp-polyA-loxp cassette, and 3XFLAG-tagged human Krtap13 cDNA and transgenic mouse lines carrying this Tg were established. This Krtap13-Tg can express Krtap13 only after Cre-induced recombination of Tg. By crossing these Krtap13-Tg mice with another transgenic mice that express Cre in a tissue-specific way, I can analyze effect of tissue specific overexpression of Krtap13 in mice. From crossing between Krtap13-Tg mice and CAG-Cre-Tg mice, 107 mice were born. However, mouse carrying

recombinant-Tg (and Cre) was never found in these neonates, suggesting that mice overexpressing Krtap13 in broad range of tissues are embryonic lethal. I am analyzing reason of this lethality. However, crossing between Krtap13 Tg mice and keratine5-Cre Tg mice, 12 mice carrying recombinant-Tg (and Cre) were born and they grew normally, suggesting that overexpression of Krtap13 in skin has little effect.

# 2) 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  $\alpha$ -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 $\beta$  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.

# 3) 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 E1<sup>E4</sup> occurs in the upper layers of the HPV-infected epithelium, coordinating with the onset of viral genome amplification and the expression of viral late genes. It is known that E1<sup>E4</sup> disrupts the keratin networks. It is also known that E1<sup>E4</sup> induces  $G_2/M$  cell cycle arrest. But it is yet to be known well about the details of E1<sup>E4</sup>. To investigate novel functions of E1<sup>E4</sup>, we performed yeast two-hybrid assays and got several candidate proteins as

which interacts with  $E1^{E4}$ . We carry on the analysis about the interactions between the each candidates and  $E1^{E4}$  in vitro or in vivo. In the future, we will ascertain the function of  $E1^{E4}$  and its involvement in the viral life cycle.

# 4) Interaction of Human Papillomavirus E2 with E7 and Effect on Host Cells: A. KAWATE, N. KAJITANI, A. SATSUKA and H. SAKAI

HPV encodes E2 and E7. E2 is a transcription factor, and E7 is an oncoprotein interacting with many proteins such as pRb, cdk2, cyclin A. Previous studies showed that E2 formed a complex with E7. Their interaction was analyzed in immunoprecipitation method and in light scattering measurement. However, the biological role of the interaction remains to be elucidated. In order to analyze it, we investigates the effect of the interaction on the E2-mediated transcriptional regulation. We found that E7 suppressed the transcription activity of E2. The result suggests that E7 might regulate the HPV gene expression pattern by interfering the E2 function. Fine tuning of the E2-mediated gene expression of HPV by E7 could be involved in the differentiation-dependent viral lifecycle.

## LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY LABORATORY OF GENE ANALYSIS

#### I. First Group

- Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. PLoS ONE, 6, e28413, 2011.
- Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E.-i., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K., and Akiyama, Y. Post liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the S2P protease in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 13740–13745, 2011.
- Tsukazaki, T.<sup>a</sup>, Mori, H.<sup>a</sup>, Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T, Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K. Nureki, N. Structure and function of SecDF, a protein export-enhancing membrane component. Nature, 474, 235–238, 2011.
  <sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.
- Chiba. S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K. Recruitment of a species-specific arrest module to monitor different cellular processes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 6073-6078, 2011.

成田新一郎、秋山芳展:大腸菌表層タンパク質の品質管理に関わる新規プロテアーゼホモ

ログの解析.第8回21世紀大腸菌研究会、南木曽、2011年5月18日-19日 檜作洋平、秋山芳展:異常外膜タンパク質蓄積ストレスに応答する表層ストレス応答因子

**σ**<sup>E</sup>の未知の活性化経路の可能性. 第8回21世紀大腸菌研究会、南木曽、2011年 5月18日-19日

- 海老瀬広規、村上聡史、佐藤 守、安藤昭一、齋藤明広:放線菌 Streptomyces coelicolor A3(2) における MsiK-ABC 輸送系複合体の探索. 第8回21世紀大腸菌研究会 南木曽、2 011年5月18日-19日 ロ頭発表
- 森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木 理、伊藤維昭:プロトン駆動力を用いた SecDF に よる蛋白質膜透過の昂進機構 第 11 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「細胞 膜ダイナミクス: In vitro 再構成系によるアプローチ」大阪 2011年6月7日-9日
- Akiyama, Y. and Hizukuri, Y.: Function and regulation of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Symposium "Bacterial Stress responses", Sapporo, Japan, September 6-10, 2011
- Ito, K., Tsukazaki, T., Mori, H. and Nureki, O.: Structure, function and regulation of bacterial Sec machinery. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Symposium "Bacterial Protein Transport", September 6-10, Sapporo, Japan 2011
- 森 博幸、塚崎智也、越前友香、秋山芳展、濡木 理、伊藤維昭:蛋白質膜透過を促進す る膜内在性因子 SecDF の構造と機能. 第84回日本生化学会大会 シンポジウム「生 体膜エネルギー変換装置の超分子科学」、京都、2011年9月21日-24日
- 檜作洋平、秋山芳展:大腸菌表層ストレス応答に関与する膜内切断プロテアーゼ RseP の生 理的 PDZ リガンドの探索. 第84回 日本生化学会大会、京都、2011年9月21 日-24日
- Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualization of cellular polypeptidyl-tRNAs uncovers futile protein synthesis in E. coli Cold Spring Harbor Asia Conference "Protein Homeostasis in Health and Disease" Suzhou, China, September 26-30, 2011
- Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: Modularity and species-specificity of translation arrest motifs in translocation monitor proteins. Cold Spring Harbor Asia Conference "Protein Homeostasis in Health and Disease" Suzhou, China, September 26-30, 2011
- 森 博幸:細菌の蛋白質膜透過装置の構造・機能・病原性との関わり. 第 48 回細菌学会 中部支部会(特別講演)、名古屋、2011年10月21日-22日
- 森 博幸:バクテリアの蛋白質膜透過チャネル SecYEG と相互作用する因子の解析. 理研 シンポジウム「第3回生体分子の分離・解析法の進展-膜タンパク質への応用」、和光、 2011年10月28日
- Akiyama, Y.: Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. The 18th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Shanghai, China,

December 7-9, 2011

- Chiba, S., Kanomori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: *In vitro* study of translation arrest of MifM, a regulatory nascent chain that monitors membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. 第34回日本分子生物学会年会、Symposium "Regulatory systems mediated by programmed ribosomal stalling". 横浜、2011年12月13日-16日
- 森 博幸、塚崎智也、越前友香、町田裕紀子、秋山芳展、Andres D. Maturana、濡木 理、 伊藤維昭:タンパク質の分泌を促進する SecDF 複合体の構造と機能. 第37回日本 生体エネルギー研究会、京都、2011年12月20日-22日
- 千葉志信、金森 崇、上田卓也、秋山芳展、Kit Pogliano、伊藤維昭:翻訳途上鎖のダイナ ミズムによる翻訳伸長の制御とそれを利用した蛋白質局在化モニタリング機構.第3 7回日本生体エネルギー研究会、京都、2011年12月20日-22日

#### **II. Second Group**

- 柳川伸一: Analysis of Keratin-associated protein13-induced activation of canonical Wnt signaling pathway in vivo. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13日— 12月16日
- 佐塚文乃、梶谷直子、川手章史、酒井博幸: Analysis of HPV genome replication. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep11-16
- 梶谷直子、佐塚文乃、川手章史、酒井博幸: HPV 18 E1^E4, a viral gene product encoded by the early gene region of HPV genome, interacts with vimentin intermediate filaments in vitro and
- in vivo. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Sep11-16 佐塚文乃、梶谷直子、川手章史、酒井博幸: HPV ゲノムの複製メカニズムの解析. 第70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日-5日
- 梶谷直子、佐塚文乃、川手章史、酒井博幸: Identification of a function of Human papillomavirus 18 E1^E4. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3日-5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.

Reconstitution of the human CD1a expression and function in mice: C. KOBAYASHI, T. SHIINA<sup>1</sup>, A. TOKIOKA, Y. HATTORI, T, KOMORI, M. KOBAYASHI-MIURA<sup>2</sup>, T. TAKIZAWA<sup>3</sup>, K. TAKAHARA<sup>4</sup>, K. INABA<sup>4</sup>, H. INOKO<sup>1</sup>, M. TAKEYA<sup>5</sup>, G. DRANOFF<sup>6</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Tokai Univ., <sup>2</sup>Shimane Univ., <sup>3</sup>Nippon Med. Sch., <sup>4</sup>Graduate Sch. Biostudies, Kyoto Univ., <sup>5</sup>Kumamoto Univ., <sup>6</sup>Dana-Farber Cancer Inst.)

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 found previously 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 function of GM-CSF, a potent CD1a inducer *in vitro* we have demonstrated that the high-level expression of CD1a in epidermal Langerhans cells occurs independently of this cytokine. (J. Invest. Dermatol. 132: 241-244, 2012.)

Identification of mycobacteria-derived glycolipids as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity: T. KOMORI, T. NAKAMURA<sup>1</sup>, I. MATSUNAGA,
D. MORITA, Y. HATTORI, T. URAKAWA, H. KUWATA, N. FUJIWARA<sup>2</sup>, K. HIROMATSU<sup>3</sup>, H. HARASHIMA<sup>1</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Osaka City Univ., <sup>3</sup>Fukuoka Univ.)

In the guinea pig model of infection with bacillus Calmette-Guerin (BCG), an attenuated vaccine strain of *Mycobacterirum 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 CD1-based immunity detects GMM and mounts potent Th1-type T cell responses. Given that Th1 cytokines, such as interferon- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , are critical for host defense against mycobacterial infection, GMM is now considered as an excellent candidate of lipid-based vaccines against tuberculosis and related diseases. (J. Biol. Chem. 286: 16800-16806, 2011.)

In contrast to the Th1 dominant response induced by GMM, glycerol monomycolate (GroMM), a latent tuberculosis-associated lipid species, elicits a totally different form of hypersensitivity responses in sensitized animals. The GroMM challenge resulted in local infiltration of eosinophils, rather than mononuclear cells, associated with a skewed induction of Th2-type cytokines, such as IL-5 and IL-10. We predict that the host response to GroMM produced by dormant mycobacteria would contribute to their long-term survival in the host. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 409: 304-307, 2011.)

3) A new aspect of lipid immunity against AIDS: D. MORITA, T. IGARASHI<sup>1</sup>, M. HORIIKE<sup>1</sup>, N. MORI<sup>2</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Laboratory of Primate Model, IVR, <sup>2</sup>Graduate Sch. Agriculture, Kyoto Univ.)

By taking advantage of IVR's superb research environments and close collaboration with Prof. Igarashi's laboratory, we have set out to how lipid immunity functions in host defense against viral infection. Viruses do not express their own lipids, but some of the viral proteins require modification with host-derived fatty acids for their critical function, suggesting the possibility that the host immunity might be able to detect lipidated viral proteins (lipoproteins). Indeed, we found that rhesus macaque monkeys infected with SIV mounted CTL responses to N-myristoylated SIV Nef lipopeptide. Given that the peptide portion of the lipopeptide is difficult to introduce amino acid mutations without disrupting the tightly regulated N-myristoylation motif, viruses would not be able to easily escape from the CTL response. Therefore, we predict that lipopeptides can function as a new class of vaccines against AIDS. (J. Immunol. 187: 608-612, 2011.)

## LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY LABORATORY OF CELL REGULATION

- Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Kuwata H, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M. A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. J. Biol. Chem. 286: 16800-16806, 2011.
- Morita D, Igarashi T, Horiike M, Mori N, Sugita M. Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. J. Immunol. 187: 608-612, 2011.
- Hattori Y, Matsunaga I, Komori T, Urakawa T, Nakamura T, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 409: 304-307, 2011.
- Matsunaga I, Sugita M. New insights into lipidic secondary metabolites in Mycobacteria. Curr. Chem. Biol. 5: 52-63, 2011.
- Layre E, Sweet L, Hong S, Madigan CA, Desjardins D, Young DC, Cheng TY, Annand JW, Kim K, Shamputa IC, McConnell MJ, Debono CA, Behar SM, Minnaard AJ, Murray M, Barry CE 3rd, Matsunaga I, Moody DB. A Comparative Lipidomics Platform for Chemotaxonomic Analysis of Mycobacterium tuberculosis. Chem. Biol. 18:1537-1549, 2011.
- 服部祐季、杉田昌彦:結核菌細胞壁糖脂質の生合成と免疫認識 化学療法の領域 27: 1448-1453, 2011.
- 服部祐季、杉田昌彦:結核菌および抗酸菌の細菌学 日本臨床 69:1356-1360, 2011.
- 山本侑枝、杉田昌彦:脂質を標的にした新しい皮膚遅延型アレルギー応答 フレグランス ジャーナル 39: 32-35, 2011.
- Sugita M: Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. The 6th International Symposium of Institute Network. Tokyo, Japan. June 9-10, 2011.
- Sugita M: A mycobacteria-derived glycolipid, glucose monomycolate, functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Saitama, Japan, December 7-9, 2011.
- Matsunaga I., Maeda S., Nakata N., Naka T., Fujiwara N., Sugita M. Biosynthesis of mycoketide and the related compounds in mycobacteria. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, September 6-9, 2011.
- 松永 勇:宿主にモニターされる抗酸菌脂質とその多様性 京都大学微生物科学寄付研究

部門主催シンポジウム「微生物科学の現状と展望」,京都,2011 年 6 月 23 日

- 松永勇、前田伸司、中田昇、中崇、藤原永年、杉田昌彦:マイコバクテリアのポリケチド 合成酵素Pks12によるポリメチル脂肪酸の産生.第84回日本生化学会大会,京都, 2011年9月21日-24日
- Nef 蛋白質のミリスチン酸修飾をモニターする新たな免疫システム 第25回日本エイズ学 会学術集会 東京 2011年11月30日-12月2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) Bim regulates B cell receptor-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-preactivated splenic B cells differentiating into plasma cells: Y. GAO, H. KAZAMA and S. YONEHARA

B cell receptor (BCR)-mediated apoptosis is critical for B cell development and homeostasis. CD40 signaling has been shown to protect immature or mature B cells from BCR-mediated apoptosis. In this study, to understand the fate of CD40-preactivated splenic B cells stimulated by BCR engagement in the presence of CD40 signaling, murine splenic B cells were cultured with anti-Igk and anti-CD40 Abs after preactivation with anti-CD40 Ab. We found that apoptosis was induced in the cultured B cells even in the presence of CD40 signaling during the 3-4 days cultivation. We detected upregulation of Bim expression followed by Bax activation in this apoptotic process, and cessation of the apoptosis in Bim-deficient B cells, indicating that Bim is a key regulator of the BCR-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-preactivated B cells. Importantly, this BCR-mediated apoptosis in CD40-preactivated B cells was shown to be induced at the initiation of plasma cell differentiation at around the preplasmablast stage, and Bim-deficient B cells cultured under these conditions differentiated into plasma cells. Additionally, TGF-B was found to protect CD40-preactivated B cells from BCR-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling. Our identified BCR-mediated apoptosis, which is unpreventable by CD40 signaling, suggests a potential mechanism that regulates the elimination of autoreactive peripheral B cells, which should be derived from non-specific T-dependent activation of bystander B cells and continuous stimulation with self-antigens in the presence of T cell help through CD40.

# 2) Double-faced functions of caspase-8 in induction and protection of programmed cell death: S. KUROKI, M. KIKICHI, S. SAKAGUCHI and S. YONEHARA

Caspase-8 plays a critical role in induction of apoptosis through death receptors, such as Fas. Meanwhile, we recently found that caspase-8 has an essential role in cell survival. As a result of caspase-8 knockdown in mouse T-lymphoma cells, cell death associated with reactive oxygen species (ROS) accumulation was observed. The cell death was completely inhibited by treatment with ROS scavengers, but inhibited only in part by treatment with caspase inhibitors, expression of Bcl-xL, and knockdown of Atg-7, indicating that apoptosis and autophagy-associated cell death are simultaneously induced. Furthermore, RIP1 and RIP3, which have been reported to play an essential role in induction of necroptosis, regulate this multiple cell death as well as accumulation of ROS. Taken together, RIP1 and RIP3 were indicated to simultaneously induce not only nonapoptotic but also apoptotic cell death through ROS production in the absence of caspase-8. We also found that embryonic fibroblasts from caspase-8 KO mice are susceptible to cell death induced by IFN-y. This cell death was not inhibited by treatment with caspase inhibitors, 3-methyladenie (inhibitor of autophagy) or necrostatin-1 (inhibitor of RIP-1), indicating that the cell death is not apoptosis, autophagic cell death and necroptosis. Interestingly, knockdown of RIP-3 expression clearly inhibited the IFN-y-induced cell death. In addition, electron microscopic analyses indicate that the cell death is necrosis, suggesting that the cell death is a novel type of programmed necrosis mediated by RIP-3 but not by RIP-1. Thus, caspase-8 was shown to play essential rules not only in induction of death-receptor mediated apoptosis but also in protection of apoptosis, autophagic cell death, necroptosis and programmed necrosis.

## 3) A role of Wnt signals in the differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI

ES cells are induced to differentiated cells under various culture conditions. Although many factors to maintain undifferentiated state and self-renewal are reported, the factors to induce an initial step of the differentiation are poorly known. We have been studying a role of Wnt signals in this step. Recently, we confirmed that ES cells consist of two populations, Nanog positive and negative cells. When ES cells were treated with an inhibitor of FGF or MAPK signaling pathway, which is known to repress the differentiation, the cells formed an almost homogeneous population of Nanog positive cells. Therefore, presence of the Nanog negative cell population is likely to be prerequisite for ES cells to differentiate. Preliminary experiments showed that Wnt signals are involved in transition of the cells to be Nanog negative as well as Nanog positive. Analysis of precise mechanisms of the cell transition by the Wnt signals is underway.

## LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS

伊藤 亮、米原 伸:「がんの細胞死(アポトーシスを中心に)」、「がん生物学イラス トレイテッド 第4章がん細胞の特性」、羊土社、2011.

- Ayumi Fukuoka, Shizue Yumikura-Futatsugi, Suzuka Takahashi, Hirotaka Kazama, Kenji Nakanishi, and Shin Yonehara. "Balb/c FasKO mouse develops allergic blepharitis associated with hyper-production of IgE antibody" The 9th International Student Seminar. March 7-9, 2011, Kyoto.
- Tamami Hamauchi, Maria Kiriyama, and Shin Yonehara. "Analysis of interaction between FLASH and ARS2 by alanine scanning mutagenesis and its role in cell cycle progression", The 9th International Student Seminar. March 7-9, 2011, Kyoto.
- Masataka Someda, and Shin Yonehara. "Establishment of inducible expression and knockdown systems in mouse embryonic stem cells to analyze the functions of various genes in differentiation", The 9th International Student Seminar. March 7-9, 2011, Kyoto.
- Shunsuke Kuroki, and Shin Yonehara. "Caspase-8 plays a protective role against a novel type of cell death induced by IFN-γ", 13th International TNF Conference TNF2011, May 15-18, 2011, Awaji, Hyogo.
- Ayumi Fukuoka, Shizue Yumikura-Futatsugi, Suzuka Takahashi, Hirotaka Kazama, Kenji Nakanishi, and Shin Yonehara. "Balb/c FasKO mice develop allergic blepharitis associated with hyper-production of IgE", 13th International TNF Conference TNF2011, May 15-18, 2011, Awaji, Hyogo.
- Shin Yonehara. "Apoptosis and Disorders: Allergic Blepharitis Associated with Hyper-Production of IgE in Balb/c Fas Knockout Mouse", Bio-Rheumatology International Congress (BRIC2011), Plenary Session –Immunology–. November 14-15, 2011, Urayasu, Chiba.
- 米原 伸:「非アポトーシス細胞死と生命」、第13回 京都大学生命科学研究科シンポジウ ム、京都市、7月8日、2011.
- 米原 伸:「新しいタイプのプログラムされた細胞死」、第20回 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム、東京、7月29日、2011.
- 米原 伸:「新しいタイプのプログラム細胞死」、第84回 日本生化学会シンポジウム:多様な生物における細胞死と細胞死関連分子の多彩な機能、京都市、9月21日、2011.

## DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES

## I. First Group

The researches carried out in this group are focused on RNA viruses, especially negative strand RNA viruses replicating in the cell nucleus, such as bornavirus and influenza virus. All our projects aim to understand the fundamental mechanisms of the replication and pathogenesis of the viruses. In current researches we are investigating the replication and persistent mechanism of the bornavirus in the cell nucleus. The understanding the biological significance of the endogenous element of bornavirus nucleoprotein (EBLN) in mammalian genomes is one of the main focuses of bornavirus researches. We also aim to develop a novel RNA virus vector using bornavirus, which can express stably functional small RNAs. In Influenza virus researches we examine the quick response of host cells to the virus infection by analyzing the alteration of the expression profile of miRNA in infected human alveolar epithelial cells.

## 1) Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) and neurological abnormalities of transgenic mice expressing Borna disease virus phosphoprotein: T. HONDA, K. FUJINO, Y. MATSUMOTO, M. HORIE, T. DAITO and K. TOMONAGA.

In a previous study, we demonstrated that transgenic mice expressing Borna disease virus (BDV) phosphoprotein (P) in the astrocytes show striking neurobehavioral abnormalities resembling those in BDV-infected animals, and suggested that transgenic mice, P-Tg, could be a useful model to investigate the molecular mechanisms of neurobehavioral disorders. Here we report that P-Tg displays neurological deficits similar to those in autism spectrum disorders (ASD) in the features of not only neuropathological and behavioral abnormalities but also molecular disturbance in the brain. By further analyses of both the neuropathological and behavioural deficits of P-Tg, we found that P-Tg significantly reduced the density of Purkinje cells, particularly in lobule VI to VIII, of the cerebellum and showed disabled social interaction, both of which are commonly found in ASD patients. Expression profiling analyses revealed that insulin-like growth factor binding protein 3 is significantly upregulated in the cerebellum to a similar extent in a genetic factor-based animal model of ASD, the methyl-CpG-binding protein 2-null mouse. Furthermore, we demonstrated that insulin-like growth factor (IGF) signaling is suppressed in the P-Tg cerebellum and that its stimulation rescues the viability of Purkinje cells of P-Tg in the cerebellar culture system. Finally, by using database analyses we found that IGF signaling may be a commonly affected pathway in the brains of ASD patients. Our data demonstrated that IGF signaling might be a key cascade involved in ASD neuropathology. We also propose here that P-Tg may be an integral animal model

### of ASD.

# 2) Intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein in living cells: T. DAITO, K. FUJINO and K. TOMONAGA.

Borna disease virus (BDV) is a non-segmented, negative-strand RNA virus that is characterized by nuclear replication and persistent infection. A unique feature of BDV is that it releases only a small number of infectious particles from infected cells. Although these characteristics might make it difficult to obtain a large amount of recombinant viruses in a reverse genetics system, the mechanism underlying the budding or assembly of BDV particle has remained largely unknown. In this study, as a first step toward understanding the virion formation of BDV, we investigated the intracellular distribution and mobility of the fluorescent marker fusion envelope glycoprotein (G) of BDV in living cells. Expression analysis revealed that fusion proteins seem to cleave into functional subunits and localize in the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi apparatus, as well as the authentic BDV G. Furthermore, we demonstrated using fluorescence recovery after photobleaching analysis that BDV G fluorescence shows rapid recovery in both the ER/Golgi and plasma membrane regions, indicating that BDV G fusion protein may be a useful tool to investigate not only the maturation of BDV G but also the budding and assembly of BDV particles in living cells.

3) Evolutional analysis of endogenous Borna-like nucleoprotein elements in primate species: Y. KOBAYASHI<sup>1</sup>, M. HORIE, K. TOMONAGA and Y. SUZUKI<sup>1</sup>. (<sup>1</sup>Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University)

Endogenous Borna-like nucleoprotein (EBLNs) elements were recently discovered as non-retroviral RNA virus elements derived from bornavirus in the genomes of various animals. Most of EBLNs appeared to be defective, but some of primate EBLN-1 to -4, which appeared to be originated from four independent integrations of bornavirus nucleoprotein (N) gene, have retained an open reading frame (ORF) for more than 40 million years. It was therefore possible that primate EBLNs have encoded functional proteins during evolution. To examine this possibility, natural selection operating on all ORFs of primate EBLN-1 to -4 was examined by comparing the rates of synonymous and nonsynonymous substitutions. The expected number of premature termination codons in EBLN-1 generated after the divergence of Old World and New World monkeys under the selective neutrality was also examined by the Monte Carlo simulation. As a result, natural selection was not identified for the entire region as well as parts of ORFs in the pairwise analysis of primate EBLN-1 to -4 and for any branch of the phylogenetic trees for EBLN-1 to -4 after the divergence of Old World and New World monkeys. Computer simulation also indicated that the absence of premature termination codon in the present-day EBLN-1 does not necessarily support the
maintenance of function after the divergence of Old World and New World monkeys. These results suggest that EBLNs may not have been functional during this period.

## 4) Generation of Borna disease virus vector stably expressing foreign proteins from an intercistronic noncoding region: T. DAITO, K. FUJINO, T. HONDA, Y. MASTUMOTO and K. TOMONAGA.

Borna disease virus (BDV), a nonsegmented, negative-strand RNA virus, infects a wide variety of mammalian species and readily establishes a long-lasting, persistent infection in brain cells. Therefore, this virus could be a promising candidate as a novel RNA virus vector enabling stable gene expression in the central nervous system (CNS). Previous studies demonstrated that the 5' untranslated region of the genome is the only site for insertion and expression unit of a foreign gene. In this study, we established a novel BDV vector, in which an additional transcription cassette has been inserted into an intercistronic noncoding region between the viral phosphoprotein (P) and matrix (M) genes. The recombinant BDV (rBDV) carrying green fluorescent protein (GFP) between the P and M genes, rBDV P/M-GFP, expressed GFP efficiently in cultured cells and rodent brains for a long-period of time without attenuation. Furthermore, we generated a non-propagating rBDV,  $\Delta$ GLLP/M, which lacks the envelope glycoprotein (G) and a splicing intron within the polymerase gene (L), by the trans-complementation system with either transient or stable expression of the G. Interestingly, rBDV  $\Delta$ GLLP/M established a persistent infection in cultured cells with stable expression of GFP in the absence of the expression of G. Using persistently infected rBDV  $\Delta$ GLLP/M-infected cells, we determined the amino acid region in the cytoplasmic tail (CT) of BDV G important for the release of infectious rBDV particles and also demonstrated that the CT region may be critical for the generation of pseudotyped rBDV having vesicular stomatitis virus G protein. Our results revealed that the newly established BDV vector constitutes an alternative tool, not only for stable expression of foreign genes in the CNS but also for understanding the mechanism of the release of enveloped virions.

#### **II. Second Group**

#### 1) Infectious viral particle production is modulated by prostanoids in the cells: Y. ABE, T. WAKITA and M. HIJIKATA

Previously, we reported the development of three dimensional (3D) cell culture system which reproduces the lifecycle of HCV from patients. Then we found that HCV infection, replication and virus particle production were enhanced in 3D condition compared with normal culture condition (2D) of immortalized hepatocytes, HuS-E/2 cells. In this study, we compared the difference of gene expression profiles between 2D-, and 3D-cultured HuS-E/2 cells, to identify the

signal pathways related with HCV lifecycle. Microarray analysis between 2D-, and 3D-cultured HuS-E/2 cells was performed to identify signal pathways that are modulated in 3D culture condition. Then, the relationship between those signal pathways and HCV lifecycle were analyzed by using recombinant HCV (JFH1) producing cells treated with several compounds affecting the signal pathways. Microarray analysis showed differential mRNA expression levels of prostaglandin (PG) synthases in 3D-cultured cells, compared with 2D cultured-cells. Treatments with several inhibitors to the enzymes included in the arachidonic acid cascade did not largely affect the amounts of HCV RNA in the cells and culture medium, suggesting this pathway is not related with HCV genome replication and release of HCV particles. However, cyclooxygenase-1 and Thromboxane A<sub>2</sub> synthetase inhibitors decreased infectivity of HCV particles released in culture medium. This finding will provide new insight about the mechanism of infectious particle production as well as a new target for anti-HCV drugs.

### IFN-λ3 response in the early phase of the viral infected hepatocytes: Y. TSUGAWA, Y. QI, K. ONOMOTO, H. KATO, T. FUJITA and M. HIJIKATA

Several viruses are known to infect in human hepatocytes and cause the hepatitis, but the interferon (IFN) response, a first-line defense against viral infection, is not clearly defined for virus-infected hepatocytes. Here, we investigated the early innate immune responses of human hepatocytes infected with an RNA virus, Sendai virus (SV), using human primary hepatocytes, immortalized hepatocytes (HuS-E/2 cells), and hepatocellular carcinoma-derived HuH-7 cells. Within a few hours after SV infection, we observed the induction of the IFN $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\lambda$ 3 (also known as IL28B) genes in the primary hepatocytes and HuS-E/2 cell, but not in HuH-7 cells. We examined the contribution of retinoic acid-inducible gene (RIG)-I to those early innate immune responses using HuS-E/2 cells in which RIG-I was knocked down. The induction of IFN $\alpha$ 1 gene expression was similar in RIG-I knockdown and nomal control HuS-E/2 cells, but expression of IFN $\beta$  and  $\lambda$ 3 was significantly decreased in the RIG-I knockdown cells relative to the controls. These results indicated that early IFN $\alpha$  induction in virus-infected human hepatocytes is independent of RIG-I. Furthermore, we also found the IFN $\lambda$ 3 is induced by virus infection in human hepatocytes in RIG-I dependent manner.

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

#### I. First Group

Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M and Tomonaga

K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express Borna disease virus phosphoprotein. J. Virol. 85: 4567-4571. 2011.

- Daito T, Fujino K, Watanabe Y, Ikuta K and Tomonaga K. Analysis of intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein fused with fluorescent markers in living cells. J. Vet. Med. Sci. 73: 1243-1247. 2011.
- Kobayashi Y, Horie M, Tomonaga K and Suzuki Y. No evidence for natural selection on endogenous Borna-like nucleoprotein elements after the divergence of Old World and New World monkeys. PLoS One 6:e24403. 2011.
- Daito T, Fujino K, Honda T, Matsumoto Y, Watanabe Y and Tomonaga K. A novel Borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. J. Virol. 85: 12170-12178. 2011.
- Horie M and Tomonaga K. Non-retroviral fossils in vertebrate genomes. Viruses 3:1836-1848. 2011.
- 松本 祐介, 藤野 寛, 朝長 啓造. ボルナウイルスの基本性状. 臨床獣医. 29:12-16. 2011.
- Horie M., Yasugi M., Okuzaki D., Honda T. and Tomonaga K. Upregulation of GALNT3 at the early stage of influenza A virus infection through the miRNA pathway. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011.
- Matsumoto Y., Daito T., Horie M., Fujino K. and Tomonaga K. Chromatin environment-dependent transcriptional activity of Borna disease virus ribonucleoprotein in persistently infected cells. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011.
- Fujino K., Daito T., Horie M., Matsumoto Y. and Tomonaga K. Generation and characterization of recombinant Borna disease virus lacking both matrix and envelope glycoprotein. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011.
- Daito T., Fujino K. and Tomonaga K. Localization of Borna disease virus glycoprotein at the nuclear membrane. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011.
- Tomonaga K. The life cycle of bornavirus reveals unknown interactions between RNA viruses and host cells. NTU-JST Joint meeting on RNA and biofunctions –Asia Studies. Taipei Taiwan. 10-12 November 2011.
- Tomonaga K., Fujino K. and Horie M. Endogenous bornaviruses reveal a novel evolutionary interaction between RNA viruses and hosts. The 18th East-Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Shanghai China. 7-9 December 2011.
- Matsumoto Y., Horie M., Daito T., Fujino K., Omori H. and Tomonaga K. Chromatin-dependent transcriptional regulation of Borna disease virus. The 18th East-Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Shanghai China. 7-9 December 2011.

- Horie M., Kobayashi Y., Honda T., Suzuki Y., Gojobori T and Tomonaga K. The discovery of endogenous non-retroviral RNA virus elements and their endogenization process. 第6回研 究所ネットワーク国際シンポジウム. 東京. 2011年6月9日
- 朝長啓造:ボルナウイルス RNAウイルス研究の新たな展開を目指して . 平成23年度京都大学ウイルス研究所学術講演会. 京都. 2011年7月5日.
- 朝長啓造.内在性ボルナウイルス因子の発見とその意義.ワークショップ「ウイルスの進化学的研究の新展開」第83回日本遺伝学会.京都.2011年9月20-23日
- 朝長啓造. ボルナウイルスの性状と鳥ボルナウイルス研究の現状. 第2回ボルナウイルス研 究会公開シンポジウム. 大阪. 2011年9月21日
- K Tomonaga. Virus within us: The novel interaction of RNA viruses and host genomes. Plenary lecture "Genome Virology". XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011.
- K Tomonaga. Discovery of endogenous nonretroviral viruses in mammalian genomes: new insights into virus-host interaction. Singapore-Japan Joint Forum Emerging Concepts in Microbiology. Singapore. 15-16 November 2011.
- K Tomonaga. Bornavirus: towards developing a new avenue of RNA virus research. 徳島大学ミ ニリトリート. 徳島. 2011年12月15-16日.

#### II. Second Group

- Y Ariumi, M Kuroki, Y Kushima, K Osugi, M Hijikata, M Maki, M Ikeda, N Kato: Hepatitis c virus hijacks p-body and stress granule components around lipid droplets. J. Virol., 85(14), 6882-6892, 2011
- T Wakita, T Suzuki, M J. Evans, K Shimotohno, K Chayama, Y Matsuura, M Hijikata, K Moriishi, T Seya, N Enomoto, K Koike, N Kato, T Kanto, H Hotta: Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17<sup>th</sup> International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses, Gastroenterology, 141(1), E1-E5, 2011
- Hussein Aly, K Shimotohno, M Hijikata, T Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, Microbiol. Immunol., 2011
- Y Kushima, Y Abe, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Novel targets for anti HCV drugs preventing infectious virus particle production. The 3<sup>rd</sup> JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Chiba, Japan, March 1-3, 2011.
- Y Abe, H Aly, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. The 6th International symposium of institute network. Tokyo, Japan, June 9-10, 2011

- 阿部雄一、下遠野邦忠、脇田隆字、土方 誠:HCV粒子の感染性獲得に関与する肝細胞内 シグナルの解析、第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、平成23 年7月1日、広島、2011年
- Y Abe, T Wakita, K Shimotohno, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus particle production. 18th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Seattle, USA, Sept 8-12, 2011
- Y Abe, H Aly, T Wakita, M Hijikata: Identification of signal pathway involved in infectious Hepatitis C virus (HCV) particle production. 平成 23 年 12 月 12-15 日、横浜、2011 年
- 土方 誠:プロスタノイドによるHCVの感染性粒子産生制御、平成23年度 北海道大学遺 伝子病制御研究所 研究集会『感染、免疫、炎症、発癌』、平成23年12月4-5日、札 幌 2011

#### DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

1) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C: K. ONOMOTO, S. MORIMOTO, T. KAWAGUCHI, H. TOYODA, M. TANAKA, M. KURODA, K. UNO, T. KUMADA, F. MATSUDA, K. SHIMOTOHNO, T. FUJITA and Y. MURAKAMI

Background: Despite being expensive, the standard combination of pegylated interferon (Peg-IFN)- $\alpha$  and ribavirin used to treat chronic hepatitis C (CH) results in a moderate clearance rate and a plethora of side effects. This makes it necessary to predict patient outcome so as to improve the accuracy of treatment. Although the antiviral mechanism of genetically altered IL28B is unknown, IL28B polymorphism is considered a good predictor of IFN combination treatment outcome. Methodology: Using microarray, we quantified the expression profile of 237 IFN related genes in 87 CH liver biopsy specimens to clarify the relationship between IFN pathway and viral elimination, and to predict patients' clinical outcome. In 72 out of 87 patients we also analyzed IL28B polymorphism (rs8099917). Principal Findings: Five IFN related-genes (IFI27, IFI 44, ISG15, MX1, and OAS1) had expression levels significantly higher in nonresponders (NR) than in normal liver (NL) and sustained virological responders (SVR); this high expression was also frequently seen in cases with the minor (TG or GG) IL28B genotype. The expression pattern of 31 IFN related-genes also differed significantly between NR and NL. We predicted drug response in NR with 86.1% accuracy by diagonal linear discriminant analysis (DLDA). Conclusion: IFN system dysregulation before treatment was associated with poor IFN therapy response. Determining IFN related-gene expression pattern based on patients' response to combination therapy, allowed us to predict drug response with high accuracy. This method can be applied to establishing novel antiviral therapies and strategies for patients using a more individual approach.

#### 2) Retinoic acid-inducible gene I-inducible mir-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through downregulation of the very low density lipoprotein receptor: R. OUDA, K. ONOMOTO, K. TAKAHASI, M. R. EDWARDS, H. KATO, M. YONEYAMA and T. FUJITA

In mammals, viral infections are detected by innate immune receptors, including Toll-like receptor and retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR), which activate the type I interferon (IFN) system. IFN essentially activates genes encoding antiviral proteins that inhibit various steps of viral replication as well as facilitate the subsequent activation of acquired immune responses. In this study, we investigated the expression of non-coding RNA upon viral infection or

RLR activation. Using a microarray, we identified several microRNAs (miRNA) specifically induced to express by RLR signaling. As suggested by Bioinformatics (miRBase Target Data base), one of the RLR-inducible miRNAs, miR-23b, actually knocked down the expression of very low density lipoprotein receptor (VLDLR) and LDLR-related protein 5 (LRP5). Transfection of miR-23b specifically inhibited infection of rhinovirus 1B (RV1B), which utilizes the low density lipoprotein receptor (LDLR) family for viral entry. Conversely, introduction of anti-miRNA-23b enhanced the viral yield. Knockdown experiments using small interfering RNA (siRNA) revealed that VLDLR, but not LRP5, is critical for an efficient infection by RV1B. Furthermore, experiments with the transfection of infectious viral RNA revealed that miR-23b did not affect post-entry viral replication. Our results strongly suggest that RIG-I signaling results in the inhibitions of infections of RV1B through the miR-23b-mediated down-regulation of its receptor VLDLR.

# 3) 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation: M. KAGEYAMA, K. TAKAHASI, R. NARITA, R. HIRAI, M. YONEYAMA, H. KATO and T. FUJITA

In virus-infected cells, viral RNA with non-self structural pattern is recognized by DExD/Hbox RNA helicase, RIG-I. Once RIG-I senses viral RNA, it triggers a signaling cascade, resulting in the activation of genes including type I interferon, which activates antiviral responses. Overexpression of N-terminal caspase activation and recruitment domain (CARD) is sufficient to activate signaling; however basal activity of full-length RIG-I is undetectable. The repressor domain (RD), initially identified as a.a. 735–925, is responsible for diminished basal activity; therefore, it is suggested that RIG-I is under auto-repression in uninfected cells and the repression is reversed upon its encounter with viral RNA. In this report, we further delimited RD to a.a. 747-801, which corresponds to a linker connecting the helicase and the Cterminal domain (CTD). Alanine substitutions of the conserved residues in the linker conferred constitutive activity to full-length RIG-I. We found that the constitutive active mutants do not exhibit ATPase activity, suggesting that ATPase is required for de-repression but not signaling itself. Furthermore, trypsin digestion of recombinant RIG-I revealed that the wild-type, but not linker mutant conforms to the trypsin-resistant structure, containing CARD and helicase domain. The result strongly suggests that the linker is responsible for maintaining RIG-I in a "closed" structure to minimize unwanted production of interferon in uninfected cells. These findings shed light on the structural regulation of **RIG-I** function.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- Onomoto K., Morimoto S., Kawaguchi T., Toyoda H., Tanaka M., Kuroda M., Uno K., Kumada K., Matsuda F., Shimotohno K., Fujita T. and Murakami Y.: Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. PLoS One 2011 Volume 6 | Issue 5 | e19799
- Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. J. Biol. Chem. 286, 26210-219 (2011)
- Kageyama M, Takahasi K, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Kato H, Fujita T.: 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Oct 12. [Epub ahead of print]
- Bowzard JB, Davis WG, Jeisy-Scott V, Ranjan P, Gangappa S, Fujita T, Sambhara S.: PAMPer and tRIGer: ligand-induced activation of RIG-I. Trends Biochem Sci. 36, 314-9 (2011)
- Onoguchi K, Yoneyama M, Fujita T.: Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors. J Interferon Cytokine Res. 31, 27-31 (2011)
- Kato, H., Takahasi, K. and Fujita, T.: RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. Immunological Reviews 243, 91-98 (2011)
- Yoneyama, M. and Fujita, T.: Chapter 5 Cytoplasmic Sensing of Viral Double-Stranded RNA and Activation of Innate Immunity by RIG-I-Like Receptors, in Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy, Ed. Rong-Fu Wang (2011)
- Seiji P. Yamamoto, Ryo Narita, Seigyoku Go, Kiyohiro Takahasi, Hiroki Kato and Takashi Fujita: Intracellular Viral RNA Sensors: RIG-I Like Receptors in Nucleic Acid Sensors and Antiviral Immunity, Ed. Suryaprakash Sambhara and Takashi Fujita (2011)
- 船曳正英、藤田尚志:第3章免疫不全モデル 第4節自然免疫欠損マウス 第3項 核酸 受容体:497-502:2011 「疾患モデルの作製と利用-免疫疾患」<series モデル動物 利用マニュアル> 岩倉洋一郎編 株エルs・アイ・シー
- 高松詩穂理:抗ウイルス自然免疫応答におけるアダプター分子 IPS-1 のシグナル伝達機構の解析 第9回感染症沖縄フォーラム 2011年2月10-12日沖縄
- Yoo J-S.: AU-rich Element (ARE)-binding protein interacts with anti-viral protein and regulates innate immune signaling 第9回感染症沖縄フォーラム 2011 年 2 月 10-12 日沖縄
- Fujita T.: Antiviral innate immune response in the cytoplasm. International Symposium "Virus, host

and diseases" March 11, 2011, Kyoto Japan

- Fujita T.: Antiviral Innate Immunity: Recognition of Viral RNA and Signal Transduction. 21st Annual Meeting of the Society for Virology March 25, 2011 Freiburg, Germany
- Fujita T.: Antiviral Innate Immunity: Sensing Viral RNA and Signal Transduction. JSICR-MMCB 2011 May 25, 2011 Osaka, Japan
- Fujita T.: Activation of an antiviral program through the cytoplasmic recognition of non-self RNA patterns by RIG-I-Like Receptors. 9th Kyoto University and National Taiwan University Joint-Symposium "Molecular and Cell Biology Symposium" June 4, 2011 Kyoto, Japan
- Ng C-S.: Inhibition of Virus-Induced Interferon Through Modulation Of Cytoplasmic Stress Responses By A Viral Protease. 9th Kyoto University and National Taiwan University Joint-Symposium "Molecular and Cell Biology Symposium" June 4, 2011 Kyoto, Japan
- Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2011 June 6-8, 2011 Tokyo Japan
- Fujita T.: Antiviral Innate Immunity Induced by RIG-I-Like Receptors. Inter-University Biochemistry Postgraduate Symposium in Hong Kong June 11, 2011 Hong Kong
- Fujita T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. CSH Asia Conferences Infection and Immunity September 8-12, 2011 Suzhou, China
- Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011 September 13, 2011 Sapporo, Japan
- Fujita, T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction November 19-20, 2011 Tainan, Taiwan
- Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: RIG-I-inducible miR-23b inhibits infections by minor group rhinoviruses through down-regulation of the receptor VLDL. The 18th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research Dec. 7-9, 2011Shanghai, China

#### 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 eukarysotic 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. We have identified 'RNA length' as one of such identity elements and we are about to identify the responsible trans-acting factor.

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

Intron-containing pre-mRNAs are retained in the nucleus until they are spliced. This mechanism is essential for proper gene expression. Although the formation of splicing complexes on pre-mRNAs is thought to be responsible for this nuclear retention activity, the details are poorly understood. In mammalian cells in particular, very little information is available regarding the retention factors. Using a model reporter gene, we show here that U1 snRNP and U2AF but not U2 snRNP are essential for the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells, demonstrating that E complex is the major entity responsible the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells. By focusing on factors that bind to the 3'-splice site region, we found that the 65-kD subunit of U2AF (U2AF65) is important for nuclear retention and that its multiple domains have nuclear

retention activity per se. We also provide evidence that UAP56, a DExD-box RNA helicase involved in both RNA splicing and export, cooperates with U2AF65 in exerting nuclear retention activity. Our findings provide new information regarding the pre-mRNA nuclear retention factors in mammalian cells.

#### 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 triggerd 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

- Takemura,R., Takeiwa,T,.McCloskey,A., Taniguchi,I. and Ohno,M. Multiple factors in the early splicing complex are involved in the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells. Genes to Cells,1035-49,2011.
- Kataoka,N., Diem,M,D., Yoshida,M., Hatai,C., Dobashi,I., Dreyfuss,G., Hagiwara,M. and Ohno,M. Specific Y14 domains mediate its nucleo-cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. Sci. Rep., 1, 92; DOI:10.1038/ srep00092 .2011.
- Izumi,H., McCloskey,A., Taniguchi,I. and Ohno,M. p54nrb and PSF promote Nuclear Export of U snRNAs. The 9th International Student Seminar. Kyoto, Japan, Mar 7-9,2011.

- Fujii,K., Sakata,T., Kitabatake,M., Miyata,A. and Ohno,M. Functional Decay of Nonfunctional 25S rRNA Requires Proteasome Activity. The 9th International Student Seminar. Kyoto, Japan, Mar 7-9,2011.
- Kitabatake, M., Fujii, K., Sakata, T., Sakai, T. and Ohno, M. Unraveling the Molecular Mechanism of Nonfunctional 25S rRNA Decay: Proteasome-Dependent Step-wise Degradation of Mutant rRNAs in S. cerevisiae. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- Taniguchi,I., Mabuchi,N. and Ohno,M. A novel activity of HIV-1 Rev protein to remodel export RNPs in directing virus-specific RNA export. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- McCloskey, A. and Ohno, M. HnRNPC1/C2 tetramer measures RNA length to ensure the proper nuclear export of messenger RNAs. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- Miyata,A., Kitabatake,M., Suzuki,T., Sakata,T., Kobayashi,Y., Yonehara,S. and Ohno,M. In vivo reversal of a UV-induced lesion on mouse 28S rRNA. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- Izumi,H., McCloskey,A., Taniguchi,I. and Ohno,M. p54nrb and PSF promote Nuclear Export of Spliceosomal U snRNA precursors. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- Nishio,H., Izumi,H., McCloskey,A. and Ohno,M. Identification of Scaffold Attachment Factor B1 (SAFB1) as a candidate factor that measures RNA length. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- Sakai,T., Fujii,K., Sakata,T., Kitabatake,M. and Ohno,M. Xrn1 and the exosome are involved in nonfunctional 25S rRNA decay. RNA 2011 Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. Kyoto, Japan, Jun 14-19,2011.
- 宮田淳美、北畠真、鈴木健夫、小林洋平、坂田知子、米原伸、森和俊、鈴木勉、大野睦人: マウス細胞内における 28S rRNA 上に生じた紫外線損傷の修復:RNA フロンティア ミーティング 2011、大府市、2011 年 8 月 30 日-9 月 1 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 核外輸送の新規因子の 同定: RNA フロンティアミーティング 2011、大府市、2011 年 8 月 30 日-9 月 1 日
- 大野睦人、マクロースキー亜紗子: hnRNPCの四量体は 核外輸送に際して RNA の長さを 測る: 第10回核ダイナミクス研究会、北広島市、2011 年 10 月 26-28 日
- 大野睦人: RNA の核外輸送や品質管理における RNA 識別: 2nd Forum in DOJIN、熊本市、2011 年 11 月 4 日
- 北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、酒井朗恵、大野睦人: 真核生物におけるリボソーム RNA の品質管理のメカニズム:第34回日本分子生物学会年会、横浜市、2011年12月 13-16日

- Taniguchi,I., Mabuchi,N. and Ohno,M. A novel activity of HIV-1 Rev protein to remodel export RNPs in directing virus-specific RNA export. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、 2011 年 12 月 13-16 日
- マクロースキー亜紗子、谷口一郎、新名主カオリ、大野睦人: HnRNP C の 4 量体は RNA の長さを測り、核外輸送へ向けて RNA polymerase II 由来の転写産物を仕分けする: 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年 12 月 13-16 日
- Fujii,K., Kitabatake,M.,Sakata,T., Sakai,T. and Ohno,M. Nonfunctional rRNA decay functionally requires proteasome activity. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年 12 月 13-16 日
- 坂田 知子、北畠 真、藤井 耕太郎、大野 睦人:機能不全リボソームを分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼ複合体の解析:第34回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年12月13-16日
- Sakai,T. Fujii,K., Kitabatake,M. and Ohno,M. Characterization of a degradation intermediate of the nonfunctional ribosome. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜市、2011 年 12 月 13-16 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 核外輸送を促進する因 子の解析: 平成 23 年度京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都市、2011 年 12 月 19 日

#### DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

## 1) Interaction between TLS DNA polymerases and PCNA: K. MORISHITA<sup>1</sup>, M. YAMAGUCHI<sup>1</sup> and H. Ohmori (<sup>1</sup>Kyoto Institute of Technology)

Chromosomal DNA is constantly damaged by various genotoxins of both endogenous and exogenous origins. DNA damages are mostly fixed by multiple DNA repair mechanisms, but some damages escape from DNA repair and inhibit the progression of DNA replication fork by replicative DNA polymerases such as Pol  $\delta$  and Pol  $\epsilon$ . The replicative DNA polymerase stalled at DNA lesion site needs to be replaced with a different DNA polymerase specialized for trans-lesion DNA synthesis (TLS). Mammals have multiple TLS DNA polymerases, which include REV1, Pol n, Pol ι, Pol κ and Pol ζ. Since REV1, Pol η, Pol ι and Pol κ share multiple motifs in common, they are all classified into Y-family. Each of the four Y-family enzymes is consisted of a single subunit, whereas Pol  $\zeta$  is composed of at least two subunits, the catalytic subunit REV3 and the accessory subunit REV7. Since the REV3 subunit has a high similarity to the catalytic subunit of the replicative DNA polymerase Pol  $\delta$ , Pol  $\zeta$  is classified into B-family, together with Pol  $\alpha$ , Pol  $\delta$  and Pol  $\varepsilon$ . TLS is separated into two steps, the insertion of a nucleotide opposite a lesion and the extension of the inserted nucleotide, up to several nucleotides before the replicative polymerase takes over again. In general, the Y-family polymerases function in the insertion step and Pol  $\zeta$ functions in the extension step. Each of the Y-family polymerases shows a different specificity or preference for lesion to bypass; however, it remains to be clarified how each of them is selectively recruited to its cognate lesion site. REV1 is believed to play a key role during intracellular TLS, because it interacts with all of the other TLS polymerases, via its C-terminal domain (CTD,  $(1150-1251)^{1}$ .

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) is a ring-shaped homotrimeric protein and interacts with a number of proteins involved in DNA replication, repair, recombination and checkpoint. When once loaded onto double-stranded DNA, PCNA moves along it, thereby functioning as a sliding clamp for many DNA polymerases. Recently, PCNA was shown to undergo mono-ubiquitination by the RAD6-RAD18 complex in DNA-damaged cells. The modified PCNA is considered to be a hallmark for the stalled replication fork. Consistent with this idea, all the four Y-family polymerases contain one or two copies of ubiquitin-binding domain, in addition to PCNA-binding site(s) such as PCNA-interacting protein (PIP)-box sequence. We have shown that Pol  $\eta$  and Pol  $\kappa$  have a potent PIP-box sequence at the C-terminus and Pol  $\iota$  has an internal potent PIP-box sequence, in the immediate downstream of the N-terminal catalytic domain. We reported the crystal structures of the complex made of PCNA and a peptide containing each of such PIP-box sequence<sup>2</sup>. Pol  $\eta$  and Pol  $\kappa$  each have another, weak PIP-box sequence in the downstream of the

N-terminal catalytic domain, similarly as in the case of Pol  $\iota^1$ .

It still remains controversy which region in human REV1 is responsible for PCNA binding<sup>1</sup>. Our results obtained with yeast two-hybrid assay revealed that two separate regions of hREV1 exhibit PCNA-binding activity, for example, one (386-825) containing the central catalytic domain and the other (1085-1251) containing the CTD, while a previous paper reported that in mouse REV1, the BRCT domain near the N-terminus should be the PCNA-binding site<sup>3</sup>. A recent paper dealing with the interaction between REV1 and PCNA in yeasts indicated that PAD (polymerase-associated domain), a portion near the C-end of the catalytic domain, is responsible for PCNA binding<sup>4</sup>. Furthermore, the paper showed that the PAD domain of yREV1 binds to the interface of PCNA subunit, while PIP-box sequences bind to an internal region of PCNA monomer, IDCL (interdomain-connecting loop) within PCNA monomer. It seems likely that the PAD in hREV1 is one of the two PCNA-binding sites aforementioned. As to the other C-terminal PCNA-binding site in hREV1, we noticed that the sequence 1110-QKLIDGFL-1117 present ahead of the CTD is similar to the consensus sequence of PIP-box, often represented as Qxx(I, L, M)xxFF (x is any residue). However, in our yeast two-hybrid assay, we could not detect any significant PCNA-binding activity with 1102-1124 or 1150-1251 fragment of REV1, each containing the above PIP-like sequence or CTD, respectively. We are now trying to identify which sequence in the 1085-1251 region is critical for PCNA binding.

Pol  $\zeta$  is considered to function at the extension step during TLS, depending on the interaction of the REV7 subunit with REV1. The C-terminal domain of REV3 was reported to contain a sequence similar to the PCNA-interacting motif sequence of the human AlkB homologue 2 (APIM)<sup>5</sup>. However, thus far, we have been unable to detect PCNA-binding activity with the original APIM sequence by yeast two-hybrid assay or *in vitro* pull-down assay, under the conditions where we successfully detected a potent PCNA-binding activity with the PIP-box sequence of the human p21 protein. Further experiments are necessary to clarify how Pol  $\zeta$  interacts with PCNA.

#### References

- 1. H. Ohmori et al., Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 78:99-146, 2009.
- 2. M. Hishiki et al., J. Biol. Chem., 284:10552-10560, 2009.
- 3. C. Guo et al., Mol. Cell, 23:265-271, 2006.
- 4. N. M. Sharma et al., J. Biol. Chem., 286:33557-33566, 2011.
- 5. K. M. Gilljam et al., J. Cell Biol., 186:645-654, 2009.

## Intracellular interaction between REV7 and REV3 in DT40 cells: K. TAKENAKA<sup>1</sup>, H. OHMORI and Y. MIKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Medical and Dental University)

As described above, human Pol  $\zeta$  is composed of at least two different subunits, hREV3

and hREV7. The accessory subunit hREV7 is also called hMAD2L2, as it has a similarity to hMAD2, a protein involved in spindle assembly checkpoint. We have shown that both hREV7 and hMAD2 bind to a 9-aa sequence within hREV3, 1877-ILKPLMSPP-1885, which we called MCS (minimum core sequence)<sup>1</sup>. Interestingly, amino-acid substitutions in the hREV3 MCS conferred different effects on in-vitro interactions with hREV7 or hMAD2. For example, I1877A or L1878A substitution in the hREV3 MCS completely abolished the interaction with hMAD2, but either of the substitutions by itself showed 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 did not affect the hMAD2-interaction. To further examine the effects of such mutations on *in-vivo* interaction with REV7, 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 introduced I1877A or P1880F mutation into the genomic sequence of the DT40 REV3 gene and examined phenotypes of such mutants. The P1880F mutant showed mild sensitivities to UV-irradiation and cisplatin treatment, much weaker than those of REV3 or REV7 null mutant, while the I1877A mutant showed no difference with the wild-type DT40 cells. This result suggested that REV3 might have another REV7-binding site(s), while the REV3 MCS is the predominant REV7-binding site.

#### Reference

1, T. Hanafusa et al., Genes to Cells, 15:281-296, 2010.

3) Bypass of BPDE-dG in mouse cells lacking TLS polymerases: K. HASHIMOTO<sup>1</sup>, Y. CHO<sup>1</sup>, I-Y. YANG<sup>1</sup>, J-I. AKAGI<sup>2</sup>, E. OHASHI<sup>3</sup>, S. TATEISHI<sup>4</sup>, N. de WIND<sup>5</sup>, F. HANAOKA<sup>2</sup>, H. OHMORI and M. MORIYA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Stony Brook University, <sup>2</sup>Gakushuin University, <sup>3</sup>Kyushu University, <sup>4</sup>Kumamoto University, <sup>5</sup>Leiden University,)

The four Y-family DNA polymerases show different specificity or preference for DNA lesion to bypass *in vitro*. For example, Pol  $\eta$  bypasses past T-T cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) efficiently and accurately, inserting two As opposite the lesion. Pol  $\iota$  inserts mainly A opposite 3'-T of T-T (6-4) photoproduct (PP), but does not extend further. While Pol  $\kappa$  does not bypass T-T CPD or (6-4) PP, it is able to insert the correct C opposite BPDE-dG, a main adduct of the activated diol dioxide form of benzo[*a*]pyrene that is supposed to be a potent carcinogen. Furthermore, mouse cells defective for Pol  $\kappa$  exhibited high sensitivity to treatment with benzo[*a*]pyrene<sup>1</sup>. Therefore, we were very much interested in examining how efficiently and accurately BPDE-dG could be bypassed in various MEF (mouse embryonic fibroblast) cells defective for Pol  $\kappa$  or other TLS polymerase. We first tested double-stranded plasmid DNAs

containing a site-specific BPDE-dG adduct, but realized that such a bulky adduct was removed soon after the plasmid was introduced into MEF cells. We thus used a gapped plasmid, in which U instead of T was inserted at multiple positions in the complementary strand, and treated the plasmid DNA with Uracil N-glycosidase and AP endonuclease just before transfection into MEF cells.

The results showed that in the wild-type and Pol  $\kappa$ -deficient MEF cells, bypass of BPDE-dG was extremely miscoding (>90%) with G-to-T transversions<sup>2</sup>. Similar results were obtained with MEF cells deficient for Pol  $\eta$  or Pol  $\iota$ . Furthermore, the bypass efficiencies in those MEF cells were similar, implying that any of the three Y-family polymerases was essential for bypassing the site-specific BPDE-dG adduct. In contrast, the bypass efficiency was severely reduced in MEFs defective for REV1 or REV3. Particularly, all TLS products in REV3-deficient MEF cells were error-free. We interpret these results as indicating that the replicative DNA polymerase (Pol  $\delta$  or Pol  $\varepsilon$ ), which is the enzyme first encountered the BPDE-dG adduct in the gapped template, inserts mostly A before dissociating from the primer terminus, by an activity similar to terminal transferase, and the inserted A is extended by Pol  $\zeta$  (REV3-REV complex) with the help of REV1. When the replicative DNA polymerase dissociates from the primer terminus upon encountering the BPDE-dG adduct, Pol  $\kappa$  has a chance to insert mainly the correct C opposite the lesion and extend further. During bypass of the BPDE-dG adduct in this experiment system, such an error-free bypass is dominant in REV3- or REV1-deficient MEF cells, but it plays a minor role in the wild-type MEF cells.

#### References

1, Ogi et al., Proc. Natl. Aca. Sci, USA, 99: 15548-15553, 2002.

2, Hashimoto et al., submitted for publication.

#### LIST OF PUBLICATIONS

#### DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

- K. Suzuki, J. Akagi, E. Ohashi, M. Yokoi, H. Ohmori and F. Hanaoka : Pol κ contributes to suppression of UV-induced mutagenesis. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 13~17 日、2011
- W. Ito, M. Yokoi, H. Mitani, H. Ohmori and F. Hanaoka : Stalled Pol η at its cognate substrate emerged an alternative TLS pathway via interaction with REV1. 第34回日本分子生物 学会年会、横浜、12月13~17日、2011

#### 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) function of IL-7 receptor (IL-7R) in immune system; (2) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (3) regulation of immune response by IL-7R expression; and (4) distribution and function of IL-7-producing cells in lymphoid organs.

#### The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCRγ locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers: S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The mouse TCRy locus is positively regulated by the transcription factors STAT5 and Runx. While the locus undergoes frequent rearrangements in T lymphocytes, TCRy transcription is repressed in  $\alpha\beta$  T cells. This phenomenon, known as TCRy silencing, depends on pre-TCR-induced thymocyte proliferation. The molecular basis for TCRy silencing, however, is largely unknown. Here, we show that pre-TCR signaling reduces transcription and histone acetylation of the TCRy locus irrespective of V-J rearrangements. We also demonstrate that Runx is recruited to Ey and HsA enhancer elements of the TCRy locus, primarily at the CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative stage, and that Runx binding to these elements decreases at later stages of thymocyte development. Importantly, anti-CD3 Ab treatment decreased IL-7R expression levels, STAT5 phosphorylation, and recruitment of STAT5 and Runx to Ey and HsA elements in RAG2-deficient thymocytes, suggesting that pre-TCR signaling triggers reduced binding of STAT5 and Runx to the enhancer elements. Furthermore, we observed that misexpression of STAT5 or Runx in the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive cell line DPK induces TCRy gene transcription. Finally, we showed that TCRy transcription is induced in  $\alpha\beta$  T cells from Runx3 transgenic mice, suggesting that Runx3 counteracts TCRy silencing in  $\alpha\beta$  T cells in vivo. Our results suggest that pre-TCR signaling indirectly inactivates TCRy enhancers by reducing recruitment of STAT5 and Runx and imply that this effect is an important step for TCRy silencing in  $\alpha\beta$  T cells.

#### 2) STAT5 controls the rearrangement of TCR Jγ gene segments through STAT-binding motifs in the Jγ promoters: K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI, B. LIANG, T. HARA and K. IKUTA

Mouse TCRy locus consists of four clusters, and each cluster contains Vy, Jy and Cy segments. The  $\gamma 1$  cluster has four V $\gamma$  gene segments (V $\gamma 5$ , V $\gamma 2$ , V $\gamma 4$  and V $\gamma 3$ ), and they are preferentially rearranged with Jy1 gene segment within the same cluster. From *in vitro* and *ex vivo* analyses, we previously showed that STAT5 activated by IL-7R binds to STAT motifs in Jy promoters and increases histone acetylation, germline transcription and chromatin accessibility of the Jy gene segments. However, it remains unclear whether the STAT motifs in the Jy promoters play a critical role in the rearrangements of the TCRy locus in vivo. To address this issue, we generated two kinds of Jy1 promoter mutant mice. One carries point mutations in STAT motifs in the Jy1 promoter (Jy1P stat-mut), and the other has a 940-bp deletion of the Jy1 promoter including the STAT motifs ( $\Delta J\gamma 1P$ ). Flow cytometric analysis showed that  $V\gamma 2^+$  and  $V\gamma 5^+$  T cells of the  $\gamma 1$ cluster were severely decreased in thymus and small intestine of these mutant mice.  $V\gamma 3^+$  T cells were also decreased in the skin and in fetal thymus. In contrast,  $V\gamma 1.1^+$  T cells of the  $\gamma 4$  cluster were unchanged in the mutant mice. Importantly, V–J rearrangements of the y1 cluster were drastically reduced in these mutant mice, while the rearrangements of other clusters were unchanged. It is noteworthy that the two mutant mice showed similar reduction in the rearrangements. Furthermore, germline transcription at the Jy1 gene segment was severely reduced in the Jy1P stat-mut mice. These results demonstrate that the STAT motifs in the Jy1 promoter are essential for V-J recombination of the Jy1 gene segment in vivo, and support the idea that STAT motifs control local accessibility of the Jy gene segments by recruiting STAT5.

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

The IL-7R is essential for differentiation and survival of T cells. We previously showed that IL-7R $\alpha$ -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 $\alpha$ -deficient mice have profound detrimental effects on early thymocytes. To address this question, we established IL-7R $\alpha$ -floxed mice and crossed with CD4-Cre transgenic mice. In the thymus, total cell numbers of CD4-Cre IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> mice were similar to control mice. Whereas differentiation of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, 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 IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> thymus. In addition, the development of NKT cells and regulatory T cells were partially impaired in the thymus of CD4-Cre IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> mice. The expression of anti-

apoptotic factor Bcl-2, a major target gene of IL-7 signal, was reduced in CD4 and CD8 T cells, and the development of CD8 T cells was rescued by introduction of a Bcl-2 transgene. In the periphery, although CD4-Cre IL-7R $\alpha^{flox/flox}$  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 required for differentiation of CD8 T cells, NKT cells and regulatory T cells in thymus.

## 4) 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 (TECs) express GFP in the cortex and medulla. A large number of cortical TECs express GFP at high levels, while most medullary TECs express GFP at low levels. Their expression levels decrease gradually with aging. In the lymph node paracortex, fibroblastic reticular cells (FRCs) 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, FRCs 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<sup>+</sup> 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.

## 5) Evidence for the thymic origin of γδ intestinal intraepithelial lymphocytes: S. SHITARA, B. LIANG, T. HARA, K. WAGATSUMA, S. TANI-ICHI and K. IKUTA

Intestinal intraepithelial lymphocytes (IELs) are composed of  $TCR\alpha\beta^+$  and  $TCR\gamma\delta^+$  IELs and play a key role in host mucosal immunity. A fate-mapping experiment showed that  $\alpha\beta$  IELs originate from the thymus. Because  $\gamma\delta$  IELs develop in reduced but substantial numbers in nude mice, the issue on thymic versus extrathymic generation of  $\gamma\delta$  IELs is still a matter of debate. IL-7<sup>-/-</sup> mice totally lack  $\gamma\delta$  T cells in thymus and intestine, suggesting that IL-7 is essential for  $\gamma\delta$  IEL development. To elucidate the origin of  $\gamma\delta$  IELs, we crossed IL-7-floxed mice with FoxN1-Cre transgenic mice to obtain the conditional knockout mice deficient in IL-7 production from thymic epithelial cells. FoxN1-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup> mice showed 20-fold and 100-fold reduced numbers of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells, respectively, in the thymus. In small intestine, cell numbers of both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  IELs were significantly reduced at 4 weeks in FoxN1-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup> mice. The numbers of  $\alpha\beta$  IELs gradually increased to reach the levels of control mice at 12 weeks, while those of  $\gamma\delta$  IELs remained at low levels. Next, we crossed the IL-7-floxed mice with villin-Cre (Vil-Cre) transgenic mice to obtain the conditional knockout mice deficient in IL-7 production from intestinal epithelial cells. Vil-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup> mice showed similar numbers of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  IELs compared with control mice. These results collectively demonstrate that IL-7 produced in the thymus is essential for  $\gamma\delta$  IEL development. Thus, this study presents strong evidence for the thymic origin  $\gamma\delta$  IELs.

6) ELISA kit system for detecting calreticulin: M. UEDA, S. KAGEYAMA<sup>1</sup> and T. YOSHIKI<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Urology, Shiga University of Medicine, <sup>2</sup>Department of Clinical Oncology, Kyoto Pharmaceutical University)

Calreticulin (CRT) is the protein found in human urogenital organs. We have found that CRT exhibited three polypeptide forms; normal spliced form, alternative spliced forms and non-spliced full-length form. The immunoblot analysis of urogenital tissue with PVDF membrane showed that the amount of full-length form of CRT correlates to urogenital cancers (Kageyama et al. Clin Chem 2004). For diagnosis of urogenital cancers, we constructed the assay kit by ELISA method with HRP. We prepared a monoclonal antibody (mAb) against full-length form of CRT reactive in the native and denaturated forms by SDS. The specificity and sensitivity of ELISA system with this mAb and seven other mAbs are under investigation.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION

- Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., and Watanabe, M. Upregulated IL-7Rα expression on colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. J. Immunol., 186:2623-2632, 2011.
- Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S. R., Delahaye, N. F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., Lasarte, J. J., Matsuzaki, G., Ikuta, K., Ryffel, B., Benlagha, K., Tesnière, A., Ibrahim, N., Déchanet-Merville, J., Chaput, N., Smyth, M. J., Kroemer, G., and Zitvogel, L. Contribution of IL-17-producing γδ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. J. Exp. Med., 208:491-503, 2011.

- Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K. The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCRγ locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. Int. Immunol., 23:553-563, 2011.
- 生田宏一、谷一靖江: STAT5 による TCRγ遺伝子座の組換え制御機構、医学のあゆみ、第 237 巻、第13 号、pp1181-1185、2011.
- 生田宏一、原崇裕、谷一靖江:胸腺上皮細胞が産生するサイトカインとT細胞の分化、臨 床免疫・アレルギー科、第56巻、第3号、pp219-224、2011.
- 谷一靖江、生田宏一: αβ T 細胞レセプターとγδ T 細胞レセプターの発現制御機構、臨床 免疫・アレルギー科、第56巻、第3号、pp255-261、2011.
- 生田宏一:エピジェネティクスと免疫疾患、MEDCHEM NEWS、第21巻、第4号、pp24-26、2011.
- Wagatsuma, K., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: STAT motifs in Jγ promoters are essential for Vγ-Jγ rearrangements of Jγ gene segments. The 9th International Student Seminar, Kyoto, March 7-9, 2011.
- 谷一靖江、生田宏一: T 細胞分化の後期における IL-7R の機能、第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011 年 6 月 10 日
- 阿部昌史、谷一靖江、生田宏一: IL-7Rα鎖遺伝子の近位エンハンサーは末梢 T 細胞の IL-7R の発現を制御する、第 21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011 年 6 月 10 日
- 設楽宗一朗、梁冰霏、原崇裕、生田宏一:小腸上皮内γδT細胞は胸腺に由来する、第21 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2011年6月11日
- 生田宏一: Distribution and function of IL-7-expressing cells in lymphoid organs. 岐阜大学医学 研究科大学院セミナー、岐阜、2011 年 9 月 9 日
- 我妻慶祐、谷一靖江、梁冰霏、生田宏一: STAT5 は TCR Jyプロモーターの STAT モチーフを介して Jy遺伝子の組換えを制御する、第84回日本生化学会大会、京都、2011年9月24日
- 谷一靖江、生田宏一: T 細胞分化後期における IL-7 レセプターの役割、第40回日本免疫 学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日
- 設楽宗一朗、梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、生田宏一:腸管上皮内γδT細胞は胸腺に由来する、第40回日本免疫学会学術集会、千葉、2011年11月27日
- 我妻慶祐、谷一靖江、梁冰霏、設楽宗一朗、生田宏一: Jγプロモーターの STAT モチーフ は Jγ遺伝子断片の V-J 組換えに必須である、第40回日本免疫学会学術集会、千葉、 2011年11月27日
- 原崇裕、生田宏一:リンパ管内皮細胞が産生する IL-7 は末梢 T 細胞の組織分布を制御する 第40回日本免疫学会学術集会、千葉、2011年11月28日

梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、設楽宗一朗、谷一靖江、生田宏一: 肝細胞が産生する IL-7 は肝臓でのリンパ球の分化と維持を制御する、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、 2011年11月28日

- 阿部昌史、谷一靖江、生田宏一: IL-7Rα遺伝子エンハンサーは末梢 T 細胞における IL-7 レセプターの発現を制御する、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 28 日
- 阿部昌史、谷一靖江、生田宏一: IL-7Rα遺伝子エンハンサーは末梢 T 細胞における IL-7 レセプターの発現を制御する、平成 23 年度京都大学ウイルス研究所学術交流会、京 都、2011 年 12 月 19 日
- 吉貴達寛、影山達寛、上田正道: 癌の診断と治療において有用な新規ポリペプチド、欧州 分割特許 2169060(ドイツ・フランス・イギリス)、2011 年成立
- 吉貴達寛、影山達寛、上田正道:膀胱尿管逆流症または間質性膀胱炎の検査方法、米国特許 11/181,830、2011 年成立

#### DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

The research projects carried out in this group are studies on  $\alpha$ -arrestin family proteins including thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) also referred as thioredoxin interacting protein (Txnip) or Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1), especially focusing on their important medical and biological aspects such as cancer suppression and the regulation of energy metabolism.

## 1) Thioredoxin binding protein (TBP)-2/Txnip and α-arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus: H. MASUTANI, E. YOSHIHARA and S. MASAKI

Thioredoxin binding protein (TBP)-2/thioredoxin interacting protein (Txnip) is an  $\alpha$ -arrestin protein that has attracted much attention as a multifunctional regulator. TBP-2 expression is downregulated in tumor cells and the level of TBP-2 is correlated with clinical stage of cancer. Mice with mutations or knockout of the TBP-2 gene are much more susceptible to carcinogenesis than wild-type mice, indicating a role for TBP-2 in cancer suppression. Studies have also revealed roles for TBP-2 in metabolic control. Enhancement of TBP-2 expression causes impairment of insulin sensitivity and glucose-induced insulin secretion, and  $\beta$ -cell apoptosis. Since these changes are important characteristics of type 2 diabetes mellitus (T2DM), TBP-2 is an attractive target for the development of drugs against T2DM. TBP-2 regulates transcription of metabolic regulating genes. TBP-2-like inducible membrane protein (TLIMP)/arrestin domain containing 3 (ARRDC3) regulates endocytosis of receptors such as the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. The  $\alpha$ -arrestin family possesses PPXY motifs and may function as an adaptor/scaffold for NEDD family ubiquitin ligases. Elucidation of the molecular mechanisms of  $\alpha$ -arrestin proteins would provide a new pharmacological basis for developing approaches against cancer and T2DM.

#### 2) Deficiency of thioredoxin binding protein (TBP)-2 enhances TGF-β signaling and contributes to TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition: S. MASAKI and H. MASUTANI

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) has regulatory roles in cell growth, differentiation, apoptosis, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of various cancer cells. TGF- $\beta$ -induced EMT is an important step for the progression of carcinoma cells to the invasion state. Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2), also called as Txnip or VDUP1, is downregulated in various types of human cancer and is considered to be a tumor suppressor. However, it remains unclear how TBP-2 is involved in the regulation of the invasion and metastasis of cancer. We demonstrated that TBP-2 interacts with Smad ubiquitin regulatory factor 2 (Smurf2), a regulator of

TGF- $\beta$  signaling. TBP-2 deficiency increased TGF- $\beta$ -induced transcriptional activation and the expression level of TGF- $\beta$  target genes.TBP-2 deficiency also caused sustained Smad2 phosphorylation. Knockdown of TBP-2 resulted in up-regulation of transcriptional factors related to TGF- $\beta$ -mediated induction of EMT and led to accelerate TGF- $\beta$ -induced EMT in A549 and 253J cells. These results show that TBP-2 is a novel regulator of TGF- $\beta$  signaling and EMT, and suggest that TBP-2 is a potential therapeutic target and a prognostic indicator of cancer.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

- Masutani, H., Yoshihara, E., Masaki, S., Chen, Z., and Yodoi, J. Thioredoxin binding protein (TBP)-2/Txnip and α-arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus. J Clin Biochem Nutr Epub 2011.
- 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 25, 440-448, 2011.
- Taketani, Y., Kinugasa, K., Furukawa, S., Nakamura, H., Otsuki, R., Yasuda, H., Fujita, T., Kanzaki, K., Masutani, H., and Yodoi, J. Yeast thioredoxin-enriched extracts for mitigating the allergenicity of foods. Biosci Biotechnol Biochem. 75, 1872-1879, 2011.
- Nishizawa, K., Nishiyama, H., Matsui, Y., Kobayashi, T., Saito, R., Kotani, H., Masutani, H., Oishi, S., Toda, Y., Fujii, N., Yodoi, J., and Ogawa, O. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. Carcinogenesis 32, 1459-1466, 2011.
- Lim, S., Ashida, H., Watanabe, R., Inai, K., Kim, YS., Mukougawa, K., Fukuda, H., Tomizawa, K., Ushiyama, K., Asao, H., Tamoi, M., Masutani, H., Shigeoka, S., Yodoi, J., and Yokota, A. Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. Plant Mol Biol. 76, 335-344, 2011.
- 増谷 弘、吉原栄治、淀井淳司:チオレドキシン・チオレドキシン結合タンパク質2とメタ ボリックストレス. Schneller、79: 22-26, 2011.
- 増谷 弘:チオレドキシン結合蛋白質2とメタボリックストレス.血管医学、12:289-291, 2011.
- 増谷 弘: TBP-2: 糖尿病の悪化に関与するキー分子. 医学のあゆみ、239: 231, 2011.

増谷 弘 : アルファアレスチン分子 Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)/Txnip とメ

タボリック/酸化ストレス、第22回日本眼科酸化ストレス研究会、大阪、7月、2011. 増谷 弘 : アルファアレスチン分子 TBP-2/Txnip による絶食応答・脂肪蓄積制御、第32回 日本肥満学会、淡路、9月、2011.

- 吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、大川克也、正木 聡、淀井淳司、増谷 弘:2 型糖尿病モ デルにおける Thioredoxin binding protein-2の役割、第84回日本生化学会大会、京 都、9月、2011.
- 正木 聡、淀井淳司、増谷 弘: Deficiency of Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) enhances TGF-β signaling and contributes to TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月、2011.

#### DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

 ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin: S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA<sup>1</sup>, T. YAMAMOTO<sup>2</sup>, E. NISHIDA<sup>3</sup> and F. TOYOSHIMA (<sup>1</sup>ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, <sup>2</sup>iCeMS, Kyoto University, <sup>3</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Despite the growing evidence for the regulated spindle orientation in mammals, a systematic approach for identifying the responsible genes in mammalian cells has not been established. We performed a kinase-targeting RNAi screen in HeLa cells and identified ABL1 as a novel regulator of spindle orientation. Knockdown of ABL1 causes the cortical accumulation of LGN, an evolutionarily conserved regulator of spindle orientation, which results in the LGN-dependent spindle rotation and spindle misorientation. In vivo inactivation of ABL1 by a pharmacological inhibitor or by ablation of the *abl1* gene causes spindle misorientation and LGN mislocalization in mouse epidermis. Furthermore, ABL1 directly phosphorylates NuMA, a binding partner of LGN, on tyrosine 1774. This phosphorylation maintains the cortical localization of NuMA during metaphase, and ensures the LGN/NuMA-dependent spindle orientation control. This study provides a novel approach to indentify genes regulating spindle orientation in mammals and uncovers new signaling pathways for this mechanism.

## 2) Roles of cholesterol metabolites in the control of cell division: M. HAMASAKI, S. MATSUMURA and F. TOYOSHIMA

Cholesterol is a precursor of steroid hormones and is required for the maintenance of homeostasis. However, little is known about the function of cholesterol metabolites during mitosis. We found that the RNAi-mediated knockdown of Cyp11a1, which catalyzes the cleavage of cholesterol side chain to produce pregnenolone, induced multipolar spindles in mitotic HeLa cells. Introduction of pregnenolone, but not progesterone or 17-hydrpxy-pregnenolone, into the cells transfected with Cyp11a1 siRNA restored the proper spindle formation in these cells. We further show that the centriole disengagement, which occurs in ana/telophase in normal condition, takes place in prometa/metaphase in the Cyp11a1-depleted cells. This precocious centriole disengagement is again suppressed by the introduction of pregnenolone into these cells. These results demonstrate that pregnenolone is required for the maintenance of centriole engagement.

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

Membrane fusion of early endosomes is a critical step in endocytic trafficking. However in mitosis, an endosomal fusion is known to be inhibited. The mechanisms as well as biological significance of this negative regulation for the endosomal fusion during mitosis are poorly understood. We have found that one of the mitotic regulators plays an essential role in this mechanism.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

- S. Matsumura, M. Hamasaki, T. Yamamoto, M. Ebisuya, M. Sato, E. Nishida and F. Toyoshima: ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. Exciting Biologies Cellular development, "Biology at the interface", Sep. 29 - Oct. 1, 2011, Kobe, Japan (oral, poster)
- S. Iwano, S. Matsumura and F. Toyoshima: Analysis of a nobel spindle orientation regulator. Exciting Biology Series "Cellular Development: Biology at the Interface", Sep.29-Oct.1, 2011, Kobe, Japan (poster)
- M. Hamasaki, S. Matsumura and F. Toyoshima: Cholesterol metabolites pregnenolone is required for centriole engagement. EMBO Conference "Centrosomes and Spindle Pole Bodies", October 2-6, 2011, Barcelona, Spain (Poster)
- S. Matsumura, M. Hamasaki, T. Yamamoto, M. Ebisuya, M. Sato, E. Nishida and F. Toyoshima: Genome-wide survey of kinases identified ABL1 as a novel regulator of spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. EMBO Conference "Centrosomes and Spindle Pole Bodies", October 2-6, 2011, Barcelona, Spain (oral)
- S. Matsumura, M. Hamasaki, T. Yamamoto, M. Ebisuya, M. Sato, E. Nishida and F. Toyoshima: ABL1 regulates spindle orientaion in adherent cells and mammalian skin. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, "Stem Cell Biology", Sep. 20-24, 2011, New York, USA (poster)
- 濱崎真弓、松村繁、豊島文子:コレステロール側鎖切断酵素 CYP11A1 は中心小体のエンゲ ージメントを制御する. 第84回 日本生化学会大会、京都、2011 年9月22日(ロ 頭)

- 松村繁、濱崎真弓、山本拓也、戎家美紀、佐藤みずほ、西田栄介、豊島文子: ABL1 による 細胞分裂軸方向の制御機構. 第 63 回 日本細胞生物学会大会、札幌、2011 年 6 月 27-29 日 (ポスター)
- 濱崎真弓、松村繁、豊島文子:コレステロール代謝産物プレグネノロンは中心体機能を制 御する. 第63回 日本細胞生物学会大会、札幌、2011年6月27-29日(ポスター)
- 井川敬介、福田光則、豊島文子: Polo-like kinase による初期エンドソーム制御機構.第 63回 日本細胞生物学会大会、札幌、2011年6月27-29日(ポスター)
- 岩野さやか、松村繁、豊島文子: A Cdk family protein regulates spindle orientation. 第 63 回 日本細胞生物学会大会、札幌、2011 年 6 月 27-29 日 (ポスター)
- 渡邉美子、豊島文子:細胞分裂軸制御機構における、コレステロールの働き.第63回 日本細胞生物学会大会、札幌、2011年6月27-29日(ポスター)

#### 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 various developmental processes including 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). We previously showed that bHLH proneural genes such as Mash1 and Math3 promote neuronal versus glial fate determination whereas the bHLH genes Hes1 and Hes5 regulate maintenance of neural stem cells by repressing proneural gene expression. Interestingly, in neural stem cells, Hes1 expression oscillates with a period of about 2-3 hours, while Hes1 oscillations drive cyclic expression of the proneural gene Neurogenin2 (Ngn2) and the Notch ligand gene Deltalike1 (Dll1). In contrast, the expression of Ngn2 and Dll1 is sustained (non-oscillatory) in postmitotic differentiating neurons. Our data suggest that depending on the expression mode (oscillatory versus sustained), Ngn2 can lead to two opposite outcomes: Ngn2 maintains neural stem cells when the expression oscillates, whereas it induces neuronal differentiation when the expression is sustained. It seems that Dll1 oscillation is advantageous for keeping a group of cells undifferentiated by mutual activation of Notch signaling, which induces Hes1 expression. We also found that expression of the bHLH gene *Hes7* oscillates in the presomitic mesoderm, and that this oscillation regulates the periodic somite formation. By making and evaluating mathematical modeling, we are now studying how the dynamics of gene expression are controlled in these cells

It has been shown that new neurons are continuously born from neural stem cells in the adult brain, and that this continuous neurogenesis plays an important role in many brain activities. We found that adult neurogenesis is essential for the innately programmed olfactory-dependent behaviors as well as spatial memory. We are now developing new research tools to identify the neural circuit responsible for such behaviors that integrates newly born neurons. We also found that in the absence of Notch signaling, neural stem cells are depleted in the adult brain, suggesting that the Notch pathway is essential for maintenance of adult neural stem cells and for continuation of adult neurogenesis. These results raised the possibility that Notch signaling genes are therapeutic targets to cure many brain disorders by activation of. adult neurogenesis.

## 1) Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock: Y. TAKASHIMA, T. OHTSUKA, A. GONZALEZ, H. MIYACHI and R. KAGEYAMA

Proper timing of gene expression is essential for many biological events, but the molecular

mechanisms that control timing remain largely unclear. It has been suggested that introns contribute to the timing mechanisms of gene expression, but this hypothesis has not been tested with natural genes. One of the best systems for examining the significance of introns is the oscillator network in the somite segmentation clock, because mathematical modeling predicted that oscillating expression depends on negative feedback with a delayed timing. The basic helix-loop-helix repressor gene Hes7 is cyclically expressed in the presomitic mesoderm (PSM) and regulates the somite segmentation. Here, we found that introns lead to an ~19-min delay in the Hes7 gene expression, and mathematical modeling suggested that without such a delay, Hes7 oscillations would be abolished. To test this prediction, we generated mice carrying the Hes7 locus whose introns were removed. In these mice, Hes7 expression did not oscillate but occurred steadily, leading to severe segmentation defects. These results indicate that introns are indeed required for Hes7 oscillations and point to the significance of intronic delays in dynamic gene expression.

#### 2) Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development: T. TATEYA, I. IMAYOSHI, I. TATEYA, J. ITO and R. KAGEYAMA

Notch-mediated lateral inhibition has been reported to regulate auditory hair cell and supporting cell development from common precursors. While the Notch effector genes Hes1, Hes5 and Hey1 are expressed in the developing cochlea, inactivation of either of them causes only mild abnormality, suggesting their functional redundancy. To explore the roles of Hes/Hey genes in cochlear development, we examined compound heterozygous or homozygous mutant mice that lacked Hes1, Hes5 and Hey1 alleles. We found that a reduction in Hes/Hey gene dosage led to graded increase of hair cell formation. However, if at least one allele of Hes1, Hes5 or Hey1 was intact, excessive hair cells were accompanied by overproduction of supporting cells, suggesting that the hair cell increase does not occur at the expense of supporting cells, and that each Hes/Hey gene functions to induce supporting cells. By contrast, when all alleles of Hes1, Hes5 and Hey1 were inactivated, the number of hair cells increased more drastically, whereas that of supporting cells was unchanged compared with control, suggesting that supporting cell formation was balanced by their overproduction and fate conversion into hair cells. The increase of the cell numbers seemed to occur after the prosensory domain formation in the mutants because the proliferation state and the size of the prosensory domain were not affected. Thus, Hes1, Hes5 and Hey1 cooperatively inhibit hair cell formation, and one allele of Hes1, Hes5 or Hey1 is sufficient for supporting cell production probably by lateral inhibition in the sensory epithelium. Strikingly, Hes/Hey mutations lead to disorganized cell alignment and polarity and to hearing loss despite hair cell overproduction. These results suggest that Hes/Hey gene dosage is essential not only for generation of appropriate numbers of hair cells and supporting cells by controlling cell proliferation and lateral inhibition but

also for the hearing ability by regulating the cell alignment and polarity.

## 3) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses: M. SAKAMOTO, I. IMAYOSHI, T. OHTSUKA, M. YAMAGUCHI, K. MORI and R. KAGEYAMA

Although the functional significance of adult neurogenesis in hippocampal-dependent learning and memory has been well documented, the role of such neurogenesis in olfactory activity is rather obscure. To understand the significance of adult neurogenesis in olfactory functions, we genetically born tamoxifen-treated ablated newlv neurons bv using Nestin-CreER(T2);neuron-specific enolase-diphtheria toxin fragment A (NSE-DTA) mice. In these mice, tamoxifen-inducible Cre recombinase allows the NSE (Eno2) gene to drive DTA expression in differentiating neurons, leading to the efficient ablation of newly born neurons in the forebrain. These mutant mice were capable of discriminating odors as competently as control mice. Strikingly, although control and mutant mice frequently showed freezing behaviors to a fox scent, a predator odor, mutant mice approached this odor when they were conditioned to associate the odor with a reward, whereas control mice did not approach the odor. Furthermore, although mutant males and females showed normal social recognition behaviors to other mice of a different sex, mutant males displayed deficits in male-male aggression and male sexual behaviors toward females, whereas mutant females displayed deficits in fertility and nurturing, indicating that sex-specific activities, which are known to depend on olfaction, are impaired. These results suggest that continuous neurogenesis is required for predator avoidance and sex-specific responses that are olfaction dependent and innately programmed.

#### 4) Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis: Y. NIWA, H. SHIMOJO, A. ISOMURA, A. GONZALEZ, H. MIYACHI and R. KAGEYAMA

Somitogenesis is controlled by cyclic genes such as Notch effectors and by the wave front established by morphogens such as Fgf8, but the precise mechanism of how these factors are coordinated remains to be determined. Here, we show that effectors of Notch and Fgf pathways oscillate in different dynamics and that oscillations in Notch signaling generate alternating phase shift, thereby periodically segregating a group of synchronized cells, whereas oscillations in Fgf signaling released these synchronized cells for somitogenesis at the same time. These results suggest that Notch oscillators define the prospective somite region, while Fgf oscillators regulate the pace of segmentation.

#### 5) Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development: T. OHTSUKA, H. SHIMOJO, M. MATSUNAGA, N. WATANABE, K. KOMETANI, N. MINATO and R. KAGEYAMA

During mammalian brain development, neural stem cells transform from neuroepithelial cells to radial glial cells and finally remain as astrocyte-like cells in the postnatal and adult brain. Neuroepithelial cells divide symmetrically and expand the neural stem cell pool; after the onset of neurogenesis, radial glial cells sequentially produce deep layer neurons and then superficial layer neurons by asymmetric, self-renewing divisions during cortical development. Thereafter, gliogenesis supersedes neurogenesis, while a subset of neural stem cells retain their stemness and lurk in the postnatal and adult brain. Thus, neural stem cells undergo alterations in morphology and the capacity to proliferate or give rise to various types of neural cells in a temporally regulated manner. To shed light on the temporal alterations of embryonic neural stem cells, we sorted the green fluorescent protein-positive cells from the dorsolateral telencephalon (neocortical region) of pHes1-d2EGFP transgenic mouse embryos at different developmental stages and performed gene expression profiling. Among dozens of transcription factors differentially expressed by cells in the ventricular zone during the course of development, several of them exhibited the activity to inhibit neuronal differentiation when overexpressed. Furthermore, knockdown of Tcf3 or Klf15 led to accelerated neuronal differentiation of neural stem cells in the developing cortex, and neurospheres originated from Klf15 knockdown cells mostly lacked neurogenic activities and only retained gliogenic activities. These results suggest that Tcf3 and Klf15 play critical roles in the maintenance of neural stem cells at early and late embryonic stages, respectively.

#### 6) Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development: K. IKEDA, R. KAGEYAMA, Y. SUZUKI and K. KAWAKAMI

The rodent olfactory epithelium (OE) is a good model system for studying the principles of stem and progenitor cell biology, because of its capacity for continuous neurogenesis throughout life and relatively well-characterized neuronal lineage. The development of mouse OE is divided into two stages, early and established neurogenesis. In established neurogenesis, which starts at embryonic day (E) 12.5, sustentacular cells and olfactory receptor neurons (ORNs) are produced from apical and basal progenitors, respectively. We previously reported that Six1(-/-) shows a lack of mature ORNs throughout development and disorganization of OE after E12.5. However, the molecular bases for these defects have not been addressed. Here, we show that Six1 is expressed in

both apical and basal progenitors. In Six1(-/-) mice, apical proliferating cells were absent and no morphologically identifiable sustentacular cells were observed. Consistently, the expression of Notch2 and Jagged1 in the apical layer was absent in Six1(-/-) mice. On the other hand, basal proliferating cells were observed in Six1(-/-) animals, but the expression of Ngn1, NeuroD, Notch1, and Jagged2 in the basal layer was absent. The expression of Mash1, the determination gene for ORNs, and Hes genes was enhanced in Six1(-/-) mice. The present findings suggest that Six1 regulates production of functional apical and basal progenitors during OE development, through the regulation of various genes, such as neuronal basic helix-loop-helix (bHLH), neuronal repressor bHLH, and genes involved in the Notch signaling pathway.

#### 7) Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glial differentiation in neural stem cells: A. MATSUMOTO, I. ONOYAMA, T. SUNABORI, R. KAGEYAMA, H. OKANO and K.-I. NAJAYAMA

Control of the growth and differentiation of neural stem cells is fundamental to brain development and is largely dependent on the Notch signaling pathway. The mechanism by which the activity of Notch is regulated during brain development has remained unclear, however. Fbxw7 (also known as Fbw7, SEL-10, hCdc4, or hAgo) is the F-box protein subunit of an Skp1-Cul1-F-box protein (SCF)-type ubiquitin ligase complex that plays a central role in the degradation of Notch family members. We now show that mice with brain-specific deletion of Fbxw7 (Nestin-Cre/Fbxw7(F/F) mice) die shortly after birth with morphological abnormalities of the brain and the absence of suckling behavior. The maintenance of neural stem cells was sustained in association with the accumulation of Notch1 and Notch3, as well as up-regulation of Notch target genes in the mutant mice. Astrogenesis was also enhanced in the mutant mice in vivo, and the differentiation of neural progenitor cells was skewed toward astrocytes rather than neurons in vitro, with the latter effect being reversed by treatment of the cells with a pharmacological inhibitor of the Notch signaling pathway. Our results thus implicate Fbxw7 as a key regulator of the maintenance and differentiation of neural stem cells in the brain.

# 8) Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing γδ T cells: K. SHIBATA, H. YAMADA, T. SATO, T. DEJIMA, M. NAKAMURA, T. IKAWA, H. HARA, S. YAMASAKI, R. KAGEYAMA, Y. IWAKURA, H. KAWAMOTO, H. TOH and Y. YOSHIKAI

Unlike conventional T cells, which are exported from the thymus as naive cells and acquire effector functions upon antigen encounter in the periphery, a subset of  $\gamma\delta$  T cells differentiates into effectors that produce IL-17 within the fetal thymus. We demonstrate here that

intrathymic development of the naturally occurring IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells is independent of STAT3 and partly dependent on ROR $\gamma$ t. Comparative gene-expression analysis identified Hes1, one of the basic helix-loop-helix proteins involved in Notch signaling, as a factor specifically expressed in IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. Hes1 is critically involved in the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells, as evidenced by their severe decrease in the thymi of Hes1-deficient fetal mice. Delta-like 4 (Dll4)-expressing stromal cells support the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells in vitro. In addition, conditional Hes1 ablation in peripheral  $\gamma\delta$  T cells decreases their IL-17 production but not their IFN- $\gamma$  production. These results reveal a unique differentiation pathway of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF GROWTH REGULATION

- Takashima, Y., Ohtsuka, T., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 3300-3305.
- Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Ito, J., and Kageyama, K. (2011) Cooperative functions of *Hes/Hey* genes in auditory hair cell and supporting cell development. Dev. Biol. 352, 329-340.
- Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 8479-8484
- Niwa, Y., Shimojo, H., Isomura, A., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. Genes & Dev. 25, 1115-1120.
- Ohtsuka, T., Shimojo, H., Matsunaga, M., Watanabe, N., Kometani, K., Minato, N., and Kageyama, R. (2011) Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development. Stem Cells 29, 1817-1828.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., and Kageyama, R. (2011) Genetic Methods to Identify and Manipulate Newly born Neurons in the Adult Brain. Front. Neurosci. 5, 64.
- Imayoshi I. and Kageyama, R. (2011) The role of Notch signaling in adult neurogenesis. Mol. Neurobiol. 44, 7-12.
- Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2011) Hes1 oscillations contribute to heterogeneous differentiation responses in embryonic stem cells. Genes 2, 219-228.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2011) Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. Front. Neurog. 5, 78.

- Bae, Y.-H., Park, H.-J., Kim, S.R., Kim, J.Y., Kang, Y. Kim, J.A., Wee, H.-J., Kageyama, R., Jung, J.S., Bae, M.-K., and Bae, S.-K. (2011) Notch1 mediates visfatin-induced FGF-2 upregulation and endothelial angiogenesis. Cardiovasc. Res. 89, 436-445.
- Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H., and Nakayama, K.I. (2011) Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of symmess and neuronal-glial differentiation in neural stem cells. J. Biol. Chem. 286, 13754-13764..
- Shibata, K., Yamada, H., Sato, T., Dejima, S., Nakamura, M., Ikawa, T., Hara, H., Yamasaki, S., Kageyama, R., Iwakura, Y., Kawamoto, H., Toh, H., and Yoshikai, Y. (2011) Notch-Hes1 pathway induces IL-17-producing γδ T cells. Blood 118, 586-593.
- Kageyama, R., Imayoshi, I., and Sakamoto, M. (2011) The role of neurogenesis in olfactory-dependent behaviors. Behav. Brain Res. doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.038.

影山龍一郎:発生を制御する遺伝子発現リズム.細胞工学、30:1256-1261.2011. 坂本雅行、今吉格、影山龍一郎:成体脳ニューロン新生は先天的にプログラムされた匂い 応答に必須である. Aroma Research, 48:37-38.2011.

- Kageyama R.: Functional significance of neurogenesis in the olfactory bulb. Keystone Symposium --- Adult Neurogenesis, Taos, USA, 1 月 9 日- 1 月 14 日, 2011.
- Kageyama, R.: U The role of Notch signling in proliferation and differentiation of adult neural stem cells、 Joint Japan-Australia-New Zealand Symposium --- Building a Functional Brain、 Auckland, New Zealand、1 月 29 日, 2011.
- Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events. The 6<sup>th</sup> bHLH Symposium. Shanghai, China、5月16日-5月17日, 2011.
- Kageyama, R.: Essential roles of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells. 23<sup>rd</sup> Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Athens, Greece, 8 月 28 日-9月1日, 2011.
- Kageyama, R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells. The Company of Biologists Workshops, West Sussex, UK, 9 月 18 日- 9 月 21 日, 2011.
- Kageyama, R.: T The oscillator networks in the somite segmentation clock. The Notch Meeting V, Athens, Greece, 10 月 2 日- 10 月 6 日, 2011.
- Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. Fondation Des Treilles, France, 10 月 24 日- 10 月 28 日, 2011.
- Kageyama, R.: Spatiotemporal regulation of somitogenesis by the oscillator networks of the segmentation clock. Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Denver, USA, 12 月 3 日- 12 月 7 日, 2011.
- Imayoshi I, Kageyama, R.: Keystone Symposium --- Adult Neurogenesis, Taos, USA, 1月9日-1
月14日,2011.

- Sakamoto M, Imayoshi I, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Requirement of continuous neurogenesis in the adult forebrain for gender-specific activities. Keystone Symposium ---- Adult Neurogenesis, Taos, USA, 1 月 9 日- 1 月 14 日, 2011.
- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11 月 12 日-11 月 16 日, 2011.
- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. The 18th East Asia Joint Symposium, Shanghai, China, 12 月 7 日-12 月 10 日, 2011.
- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohthuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. The 9th International Student Seminar, Kyoto, 3 月 7 日-3 月 9 日, 2011.
- SiokLay Tan, Miyuki Nichi, Toshiyuki Ohtsuka, Toshiyuki Matsui, Keiko Takemoto, Asuka Miura-Kamio, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Shinkai, Ryoichiro Kageyama : Roles of ESET in epigenetic regulation of developing cortex. RIKEN CDB Symposium "Epigenetic Landscape in Development and Diseases", 神戸, 3 月 14 日- 3 月 16 日, 2011.
- 楯谷智子. 楯谷一郎, 伊藤壽一, 影山龍一郎:蝸牛有毛細胞・支持細胞の発生における Hes/Hey 遺伝子群の機能. 第112回日本耳鼻咽喉科学会, 京都, 5月 19日, 2011.
- 楯谷智子、今吉格、楯谷一郎、濱口清海、石橋誠、伊藤壽一、影山龍一郎:ヘッジホッグ
   シグナルは蝸牛感覚上皮の発生と維持に必要である.第34回日本神経科学会,横浜,9月14日-9月17日,2011.
- 今吉格、坂本雅行、平野響子、影山龍一郎:成体脳神経幹細胞からの嗅球新生ニューロンの分化制御機構,第34回日本神経科学大会,横浜,9月14日-9月17日,2011.
- Siok Lay Tan、松井 稔幸、 大塚 俊之、眞貝 洋一、影山 龍一郎: Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9 月 14 日- 9 月 17 日, 2011.
- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohthuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. 第34回日本 神経科学大会, 横浜, 9月14日-9月17日, 2011.
- 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8回「生物数学の 理論とその応用」,京都,11月17日,2011.
- 影山龍一郎:神経幹細胞の維持と分化制御、シンポジウム「器官発生の分子機構解明と疾患克服への基盤的理解」,東京,11月22日,2011.
- 影山龍一郎: 成体脳でのニューロン新生の意義と分子機構、第27回 Wako ワークショップ, 東京, 11月22日, 2011.

- 影山龍一郎:分節時計の動作原理、第 18 回日本時間生物学会学術集会,名古屋,11 月 24日-11月 25 日,2011.
- 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18回日本時間生物学会学術集会,名古屋,11月24日-11月25日,2011.
- Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日- 12 月 16 日, 2011.
- 大塚俊之、下條博美、松永充博、渡邊直希、米谷耕平、湊長博、影山龍一郎: Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development. sponses. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日-12 月 16 日, 2011.
- H. Shimojo, Y. Harima, T. Ohtsuka, H. Miyachi and R. Kageyama: The significance of dynamic proneural gene expression in neural development. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月13日-12月16日, 2011.

#### DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

### 1) Comparison of two quantitative assays for xenotropic murine leukemia virus-related virus: E. SATO, R. YOSHIKAWA and T. MIYAZAWA

Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV), a novel gammaretrovirus in humans, was found in patients with prostate cancer (PC) and chronic fatigue syndrome (CFS). However, there has been controversy whether XMRV is directly associated with human diseases. In this study, we developed a LacZ marker rescue assay using human embryonic kidney 293T cells and a focus assay using a feline fibroblastic sarcoma-positive leukemia-negative QN10S cells. XMRV induced prominent foci in QN10S cells and the viral titer determined by the focus assay was as high as that by the LacZ marker rescue assay. Because the focus assay is simple and sensitive, it will be useful for monitoring infectious XMRVs in CFS and PC patients and virological studies for XMRV.

#### 2) Identification of functional receptors for RD-114 virus in dogs: R. YOSHIKAWA, T KOBAYASHI and T MIYAZAWA

The genomes of mammalians species contain enormous copies of endogenous retroviruses (ERVs). In general, many ERVs have lost their infectivity. However, several ERVs have maintained their infectivity. All domestic cats have an infectious ERV, termed RD-114 and several feline cell lines produce infectious RD-114 viruses. Recently, we found that several feline and canine live attenuated vaccines was contaminated with infectious RD-114 viruses (Miyazawa *et al., J. Virol.* (2010); Yoshikawa *et al., Biologicals* (2011)). In this study, we confirmed that the RD-114 virus efficiently infected and proliferated well in canine primary cells as well as canine cell line (a fibroblast cell line derived from canine thymus). In addition, we identified canine ASCT1 and ASCT2, sodium-dependent neutral amino acid transporters, as RD-114 virus receptors. The canine ASCT2 also is a functional receptor for simian retrovirus type 2, a pathogenic simian which induces immunodeficiency in rhesus macaques. Identification of canine receptor for RD-114 virus will help for evaluating the risk of contamination of the virus in vaccines.

3) Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B: Y. NAKAYA, S. HOSHINO, J. YASUDA<sup>1</sup> and T. MIYAZAWA (<sup>1</sup>Department of Emerging Infectious Diseases, Nagasaki University)

Pigs are thought to be the most suitable donor animal for xenotransplantation. However,

pigs harbour potentially hazardous infectious agents, termed porcine endogenous retroviruses (PERVs), in its genome. In this study, we generated a mAb against PERV-B surface (SU) envelope protein (Env), designated KRT1. KRT1 binding was detected by an indirect immunofluorescence assay and flow cytometric analysis on cells infected with PERV-B. KRT1 neutralized PERV-B pseudotype virus and specifically recognized PERV-B SU Env, but not PERV-A SU Env by immunoblotting analysis. The peptide-ELISA revealed that KRT1 recognized a linear peptide sequence (ALEPPHNLPVP) residing in a proline-rich region that is one of the subdomains of SU Env. In conclusion, the KRT1 antibody will serve as a useful tool for the study of PERV-B and, more importantly, it may provide new protective strategies against PERV-B infection in xenotransplantation.

 Identification and characterization of feline UBE1L gene: S. SHIMODE, T.
 MIYAZAWA, T. KOBAYASHI, H. SATO<sup>1</sup> and T. TANABE<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is one of the type I interferon-inducible proteins expressed after bacterial or viral infection. ISG15 has two ubiquitin (UB)-like domains and is capable of conjugating to intracellular proteins (ISGylation). Addition of ISG15 known as ISGylation is an ubiquitin-like posttranslational modification. ISG15 and/or ISGylation play an important role in antiviral activity. Addition of ISG15, known as ISGylation, is an ubiquitin-like posttranslational modification. Coexpression of ISG15 and ubiquitin-activating enzyme E1-like protein (UBE1L) is required to induce ISGylation *in vitro*, but these enzymes of felis have not been described. Previously, we identified feline ISG15 gene and found that the capsid protein of feline immunodeficiency virus was ISGylated *in vitro* by treatment with feline interferon- $\omega$ . In this study, we cloned feline UBE1L (FeUBE1L) gene to further study the mechanism of the antiviral activities induced by ISGylation. Sequencing analysis revealed that active sites of FeUBE1L were highly conserved. These data suggest that FeUBE1L has an enzymatic activity. Further, expression of FeUBE1L was induced in feline cell lines by treatment with feline interferon- $\omega$  and ovine interferon- $\tau$ .

### 5) Analysis of newly identified KoRV-related sequences: S. HOSHINO, T. KOBAYASHI and T. MIYAZAWA (<sup>1</sup>Laboratoy of Primate Model, IVR)

Retroviral sequences are present in mammalian genomes and called endogenous retroviruses (ERVs). ERVs are remnants of ancestral retroviruses, which had invaded into host genomes. Koala retrovirus (KoRV) was isolated from koalas, showing leukemia and

immunodeficiency, and it has been pointed out that KoRV might be related to these diseases. In 2006, Tarlinton *et al.* reported that KoRV had been invading koala genomes in only 200 years. In their report, KoRV was detected in all northern and some western population of koalas in Australia, although it was not detected in the population of Kangaroo island. In Japan, the infection status of KoRV has not been investigated, whereas nine zoos have reared many koalas. To know the infection status of KoRV in koalas kept in Japanese zoos, genomic DNAs were isolated from buffy coat cells and we analyzed them by PCR. We found that all Queensland koalas and four out of 11 Victorian koalas harbored KoRV proviruses. Seven out of 11 Victorian koalas did not have any known KoRV; however, we also found that these KoRV-free koalas harbored a long terminal repeat (LTR) which was similar to that of the KoRV. Then, we cloned and sequenced whole genome containing the 5'- and 3'-LTR, corresponding to KoRV, in KoRV-free koalas by long range PCR. By sequencing analysis, the LTR that we sequenced was nearly identical to the KoRV LTR. We also found that the obtained 5'-gag sequences (1-135 nt) were nearly identical to 5'-KoRV gag sequences (1-135 nt), and the obtained 3'-env sequences partially matched 3'-KoRV env sequence, respectively. Furthermore, we examined the integration site and copy numbers of the newly identified KoRV-related sequence (KRRS) in the koalas and the presence of the virus in other marsupials. Now we are trying to reveal the importance of existence of KRRS in koala genomes.

#### LIST OF PUBLICATIONS DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

- Miyazawa, T., Shojima, T., Yoshikawa, R. and Ohata, T. Isolation of koala retroviruses from koalas in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73, 65-70, 2011.
- 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. 13, 49-57, 2011.
- 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. 155, 268-273, 2011.
- 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. 85, 1237-1245, 2011.
- 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. 73, 491-494, 2011.

- Yoshikawa, R., Sato, E. and Miyazawa, T. Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. Biologicals 39, 33-37, 2011.
- 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. 149, 307-315, 2011.
- Nakaya, Y., Hoshino, S., Yasuda, J. and Miyazawa, T. Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B. J. Gen. Virol. 92, 940-944, 2011.
- Furuta, R. A., Miyazawa, T., Sugiyama, T., Kuratsune, H., Ikeda, Y., Sato, E., Misawa, N., Nakatomi, Y., Sakuma, R., Yasui, K., Yamaguti, K. and Hirayama, F. No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan. Retrovirology 8, 20, 2011.
- Fukuma, A., Abe, M., Morikawa, Y., Miyazawa, T. and Yasuda, J. Cloning and characterization of the antiviral activity of feline Tetherin/BST-2. PLoS One 6, e18247, 2011.
- Shimode, S., Miyazawa, T., Kobayashi, T., Sato, H. and Tanabe, T. Identification and Characterization of Feline UBE1L Gene. J. Vet. Med. Sci. 2011 Sep 28. [Epub ahead of print]
- Sato, E., Yoshikawa, R. and Miyazawa, T. Quantitative Assays for Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus. J. Vet. Med. Sci. 2011 Sep 30. [Epub ahead of print]
- Yoshikawa, R., Sato, E. and Miyazawa, T. Presence of Infectious RD-114 Virus in a Proportion of Canine Parvovirus Isolates. J. Vet. Med. Sci. 2011 Oct 14. [Epub ahead of print]
- Yoshikawa, R., Yasuda, J., Kobayashi, T. and Miyazawa, T. Canine ASCT1 and ASCT2 are functional receptors for RD-114 virus in dogs. J Gen Virol. 2011 Nov 30. [Epub ahead of print]
- Fukuma, A., Abe, M., Urata, S., Yoshikawa, R., Morikawa, Y., Miyazawa, T. and Yasuda, J. Viral and cellular requirements for the budding of Feline Endogenous Retrovirus RD-114. Virol J. 2011 Dec 14;8(1):540. [Epub ahead of print]
- Koshi, K., Suzuki, Y., Nakaya, Y., Imai, K., Takahashi, T., Kizaki, K., Miyazawa, T. and Hashizume, K. Gene Expression of Endogenous Retrovirus-like Transcripts in Bovine Trophoblastic Cell Lines. 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Portland, U.S.A., July 31-August 4, 2011.
- Hoshino, S., Ohata, T., Shojima, T. and Miyazawa, T. Identification of a novel koala endogenous retrovirus. Internaltional Union of Microbiological Societies, Sapporo, September 11-16, 2011.
- Fukuma, A., Morikawa, Y., Miyazawa, T. and Yasuda, J. Establishment of a feline cell line suitable for vaccine manufacturing. Internaltional Union of Microbiological Societies, Sapporo, September 11-16, 2011.
- Nakaya, Y., Koshi, K., Baba, K., Kizaki, K., Nakagawa, S., Hashizume, K. and Miyazawa, T.

Expressional characterization of bovine endogenous retrovirus K envelopes in bovine placenta. The 2nd World Congress on Reproductive Biology, Cairns, Australia, October 9-12, 2011.

- 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:ウシ胎盤形 成過程において機能を発揮する新規内在性レトロウイルス由来遺伝子の同定 第151 回日本獣医学会学術集会、東京、2011年3月30日-4月1日
- 吉川禄助、佐藤英次、下島昌幸、前田健、宮沢孝幸:動物用生物製剤への内在性レトロウ イウルスの迷入とその危険性評価 第151回日本獣医学会学術集会、東京、2011年3 月30日-4月1日
- 星野重樹:コアラレトロウイルス(KoRV)感染阻害因子について SRC2011、山梨、2011 年7月28日-30日
- 福間藍子、森川裕子、宮沢孝幸、安田二朗:ワクチン製造用ネコ培養細胞の樹立 第48回 日本ウイルス学会九州支部総会、北九州、2011 年8月26日-27日
- Bai, H., Sakurai, T., Nakagawa, S., Konno, T., Miyazawa, T., Gojobori, T. and Imakawa, K. Dentification of endogenous retroviruses derived-gene possessing a zinc finger like sequence during bovine peri-attachment period. 第 104 回日本繁殖生物学会、盛岡、2011 年 9 月 15 日-17 日
- 仲屋友喜、越勝男、馬場健司、木崎景一郎、小林剛、今川和彦、橋爪一善、宮沢孝幸:新 規ウシ内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質の胎盤形成過程における役 割 第104回日本繁殖生物学会、盛岡、2011年9月15日-17日
- 下出紗弓、宮沢孝幸、今川和彦、田邊太志、佐藤久聡:ネコ UBEIL 遺伝子の全長クローニ ングならびに各種細胞での I 型インターフェロン応答性 第152 回日本獣医学会学術 集会、堺、2011 年 9 月 19 日-21 日
- 仲屋友喜、小林剛、宮沢孝幸:ウシ内在性レトロウイルス K1 エンベロープタンパクの開 裂に重要な領域の探索 第152回日本獣医学会学術集会、堺、2011年9月19日-21日
- 岡本宗裕、小野文子、藤本浩二、高野淳一郎、濱野正敬、森川茂、永田典代、水谷哲也、 酒井宏治、堀井俊宏、中屋隆明、中村昇太、宮沢孝幸、松井淳:ニホンザル血小板減 少症の原因ウイルスの同定 第152回日本獣医学会学術集会、堺、2011年9月19日-21日
- 吉川禄助、佐藤英次、岡本宗裕、鈴木樹理、吉田友教、宮沢孝幸:ニホンザル血小板減少 症発症ザルからのサルレトロウイルス4型の分離 第152回日本獣医学会学術集会、 堺、2011年9月19日-21日
- 星野重樹、宮沢孝幸:有袋類レトロウイルスを利用した感染抵抗因子の同定と解析 第152 回日本獣医学会学術集会、堺、2011年9月19日-21日
- 宮沢孝幸:哺乳類の胎盤形成における内在性レトロウイルスの進化的役割 日本遺伝学会

第83回大会、京都、2011年9月20日-22日

宮沢孝幸: ウシの胎盤で機能する内在性レトロウイルスの探索と機能評価 第84回日本生 化学会大会、京都、2011年9月21日-24日

星野重樹、宮沢孝幸: コアラレトロウイルスの解析 第17回日本野生動物医学会大会、東京、2011年9月29日-10月2日

吉川禄助、佐藤英次、岡本宗裕、鈴木樹理、吉田友教、宮沢孝幸:血小板減少症ニホンザルとサルレトロウイルス4型との関係性に関する解析 第17回日本野生動物医学会大会、東京、2011年9月29日-10月2日

#### CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

Goal of our research group: What is the molecular mechanism of viral infection and pathogenesis? The subjects are human viruses, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and Epstein-Barr virus (EBV).

### 1) Interaction of HIV Protein and Host Restriction Factor: P. GEE, H. EBINA, K. SATO, N. MISAWA, Y. KANEMURA, N. KASAI and Y. KOYANAGI

The introduction of an SIV or HIV-2 accessory protein, known as viral protein x (VPX), into myeloid cells before the addition of HIV-1 has been shown to target SAMHD1 for ubiquitin-dependent proteasome degradation, resulting in augmented HIV-1 infection. It has been also known that SAMHD1 is a player in host innate immunity. In Aicardi-Goutieres Syndrome (AGS), a rare disease characterized by hereditary encephalopathy, mutations in the SAMHD1 gene have been linked to elevated cytokine responses, most likely due to inefficient clearing of cellular nucleic acids. Both clearance of cellular nucleic acids and the inhibition of HIV-1 are presumed to be dependent on a nucleotidase and/or phosphodiesterase activity, predicted by a conserved HD domain that is responsible for divalent metal ion binding and is highly conserved in homologous enzymes. We successfully cloned, expressed, and purified recombinant SAMHD1 from E. coli and characterized its enzymatic activity in terms of its divalent metal ion preference and substrate usage. We found that SAMHD1 is a metal-dependent enzyme that it is active against a wide range of ribonucleoside 5'-mono-, di-, and triphosphates, indicating that this protein may be an important player in cells to regulate intracellular nucleotide metabolism during AGS and HIV infection.

#### 2) HIV-1 Pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA and Y. KOYANAGI

While human cells express potent antiviral proteins as part of the host defense repertoire, viruses have evolved their own arsenal of proteins to antagonize them. BST2 was identified as an inhibitory cellular protein of HIV-1 replication, which tethers virions to the cell surface to prevent their release *in vitro* culture system. On the other hand, the HIV-1 accessory protein, Vpu, has the ability to downregulate and counteract BST2. Vpu also possesses the ability to downmodulate cellular CD4 molecules expressed on infected cells. However, the role of Vpu in HIV-1 infection *in vivo* remains unclear. We generated NOG-hCD34 mice by transplanting newborn NOD/SCID/IL2R $\gamma^{null}$  mice with human CD34<sup>+</sup> cells and using this model, we found that Vpu contributes to the efficient spread of HIV-1 *in vivo* during the acute phase of infection. The level of viral protein expression, the amount of cell-free virions in vpu-deficient HIV-1-infected mice was

profoundly lower than that in wild-type (WT) HIV-1-infected mice. We provide a novel insight suggesting that Vpu concomitantly downregulates BST2 and CD4 from the surface of infected cells. Our findings suggest that Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 replication *in vivo* by downmodulating BST2 and CD4 in infected cells.

### 3) HIV Integration and Latency: H. EBINA, Y. KANEMURA, Y. SUZUKI, K. URATA and Y. KOYANAGI

HIV-1 possesses a viral protein, integrase (IN), which is necessary for its efficient integration in target cells. However, it has been reported that an IN-defective HIV strain is still capable of integration. We assessed the ability of WT HIV-1 to establish infection in the presence of IN inhibitors. We observed a low, yet clear infection of inhibitor-incubated cells infected with WT HIV which was identical to cells infected with IN-deficient HIV, D64A. Furthermore, the IN-independent integration could be enhanced by the pretreatment of cells with DNA-damaging agents suggesting that integration is mediated by a DNA repair system. Moreover, significantly faster viral replication kinetics with augmented viral DNA integration was observed after infection in irradiated cells treated with IN inhibitor compared to nonirradiated cells. Altogether, our results suggest that HIV DNA has integration potential in the presence of an IN inhibitor and may serve as a virus reservoir.

#### 4) APOBEC1-Mediated Attenuation of Herpes Simplex Virus 1 Indicate That Neurons Have an Antiviral Role during Herpes Simplex Encephalitis: P. GEE, H. EBINA, Y. KANEMURA and Y. KOYANAGI

APOBEC1 (A1) is a cytidine deaminase involved in the regulation of lipids in the small intestine. HSV-1 is a ubiquitous pathogen that is capable of infecting neurons in the brain, causing encephalitis. We show that A1 is induced during encephalitis in neurons of rats infected with HSV-1. In cells stably expressing A1, HSV-1 infection resulted in significantly reduced virus replication compared to that in control cells. Infectivity could be restored to levels comparable to those observed for control cells if A1 expression was silenced by specific A1 short hairpin RNAs. Moreover, cytidine deaminase activity appeared to be essential for this inhibition and led to an impaired accumulation of viral mRNA transcripts and DNA copy numbers. The sequencing of viral gene UL54 DNA, extracted from infected A1-expressing cells, revealed G-to-A and C-to-T transitions, indicating that A1 associates with HSV-1 DNA. Taken together, our results demonstrate a model in which A1 induction during encephalitis in neurons may aid in thwarting HSV-1 infection.

#### LIST OF PUBLICATIONS RESEARCH CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

- Kobayashi T., Ode H., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S.P., Ebina H., Strebel K., Sato H. and Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. J. Virol. 85:932-945, 2011.
- Yokose J., Ishizuka T., Aoki J., Yoshida T., Koyanagi Y. and Yawo H. Lineage analysis of newly-generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus. Neurosci. Res.69:223-233, 2011.
- Yamamoto S.P., Okawa K., Nakano T., Sano K., Ogawa K., Masuda T., Morikawa Y., Koyanagi Y. and Suzuki Y. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. Microbes Infect. 13:339-349, 2011.
- Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Iwakiri D., Matsuoka M., Takahashi R., Kuzushima K., Ito M., Takada K. and Koyanagi Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. Blood, 117:5663-5673, 2011.
- Sato K. and Koyanagi Y. The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. Exp. Biol. Med., 236:977-985, 2011.
- Gee P., Ando Y., Kitayama H., YamamotoS.P., Kanemura Y., Ebina H., Kawaguchi Y. and Koyanagi Y. APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. J. Virol., 85:9726-9736, 2011.
- Watanabe T., Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Hamatake M., Misawa N., Sato K., Ebina H., Koyanagi Y. and Komano J. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 2011 Nov 22.

小柳義夫. HTLV 研究 30 年. ウイルス, 61(2), 175-182, 2011. 佐藤佳,小柳義夫. ヒト化マウスの利用: EB ウイルス関連血球貪食性リンパ球組織球症動 物モデル. 血液内科, 63(6), 627-633, 2011.

- Sato K., Misawa N. and Koyanagi Y. Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection Infectious Disease Research Network, poster #23, London, England, 2011 年 1 月 24 日
- Iwami S., Sato K., Misawa N., Kobayashi T., De Boer R. and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection, London, England, 2011 年 1 月 24 日

- Gee P. and Koyanagi Y. P202 binds to retrovirus preintegration complex and attenuates retrovirus infection when fused with an inflammasome pyrin binding domain. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), poster, Boston, 2011 年 2 月 28 日
- Kobayashi T., Ode H., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S.P., Ebina H., Strebel K., Sato H. and Koyanagi Y. Mutagenesis and Molecular Modeling Studies Reveal Structural Insights into Human Tetherin Recognition by HIV-1 Vpu. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), poster, Boston, 2011 年 2 月 28 日
- Iwami S., Sato K., Misawa N., Kobayashi T., De Boer R. and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling, P-215, Tokyo, 2011 年 3 月 1 日
- 小柳義夫,細胞性 HIV 抑制因子. 第2回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム,京都,2011 年3月5日
- Koyanagi Y. Intracellular anti-HIV factor, International Symposium. Virus, host and diseases. Kyoto 2011 年 3 月 11 日
- 佐藤佳. 生体内 HIV-1 複製における Vpr タンパク質の意義. 第 13 回白馬シンポジウム, oral #9, 札幌, 2011 年 5 月 19 日
- Sato K., Misawa N., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Efficient HIV-1 infection in regulatory CD4<sup>+</sup> lymphocytes during acute phase in humanized mice. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster # 235, New York, USA, 2011 年 5 月 26 日
- Yoshida T., Shingai M., Martin M.A., Kobayashi T., Koyanagi Y. and Strebel K. Discrepancy of the potential of Vpu to interact and counteract BST-2. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster, New York, USA, 2011 年 5 月 26 日
- 佐藤佳,三沢尚子,小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態の解析,第25 回近畿エイズ研究会,京都,2011 年 6 月 18 日
- Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K. and Koyanagi Y. Integrase independent retroviral cDNA integration, which is indefensible with integrase inhibitor. 第6回研究所ネットワーク国際シンホシウム, 東京, 2011年6月9日
- 小柳義夫.小さなウイルスがなぜ病気を起こすのか.第 10 回みちのくウイルス塾,仙台 2011年7月16日
- 小柳義夫、Peter Gee, 川口寧、北山裕子、安藤良徳. APOBEC1 による HSV-1 DNA の editing と抗ウイルス効果. 第 18 回ヘルペス感染症フォーラム (JHIF) 札幌 2011 年 8 月 19 日
- Iwami S., Sato K. and Koyanagi Y. Mathematical modeling and *in vitro* experiments in virology. Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan, Korea, 2011 年 8 月 25 日
- Watanabe T., Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Hamatake M., Sato K., Hirotaka E., Koyanagi Y. and Komanao J, The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI

limits HIV-1 replication. XV International Congress of Virology, VI-PO21-12, 札幌, 2011 年 9 月 13 日

- Sato K., Misawa N., Ito M. and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase *in vivo*. XV International Congress of Virology, VI-PO21-12, 札幌, 2011 年9月13日
- Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K. and Koyanagi Y. HIV-1 cDNA integration and persistent infection by DNA repair system. XV International Congress of Virology, VI-PO21-12, 札幌, 2011 年 9 月 15 日
- 岩見真吾,佐藤佳, Rob de Boer,小柳義夫,細胞ダイナミクスの定量化 動物実験と数理 解析の融合 - . 日本数学会 2011 年度秋季総合分科会,長野,2011 年 10 月 1 日.
- Koyanagi Y. and Sato K. Depletion of regulatory T cells in acute phase may enforce HIV systemic infection. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 熊本, 2011 年 10 月 19 日
- Gee P., Okamoto S., Fukuhara M., Kanemura Y., Ebina H. and Koyanagi Y. Biochemical characterization of the HIV-1 restriction factor SAMHD1. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 熊本, 2011 年 10 月 21 日
- Sato K., Misawa N., Ito M. and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh, USA, 2011 年 10 月 29 日
- Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh, USA, 2011 年 10 月 30 日
- Iwami S., Sato K. and Koyanagi Y. Mathematical modeling of wild type and Vpr -deleted HIV-1 infection *in vitro*. CBI/JSBi (情報計算化学生物学会/日本バイオインフォマティクス学 会合同大会) 2011, 神戸, 2011年11月8日
- Koyanagi Y. Humanized mouse models for HIV-1 and EBV infection. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, 台南, 台湾 2011年11月19日
- Gee P., Ando Y., Kitayama H., Yammaoto S.P., Kanemura Y., Ebina H., Kawaguchi Y. and Koyanagi Y. APOBEC1-mediated editing and attenuation of HSV-1 DNA implicates an antiviral role in neurons during encephalitis. 第 40 回日本免疫学会, WS15-7, 幕張, 2011 年 11 月 27 日
- 佐藤佳,三沢尚子,佐藤賢文,松岡雅雄,伊藤守,小柳義夫.急性感染期のHIV-1 増殖に おける制御性 T 細胞と Vpr の寄与.第25回日本エイズ学会,WS1-006,東京,2011年 12月2日
- 岩見真吾,佐藤佳,小柳義夫,培養細胞実験の数理モデリングを用いたウイルスダイナミ クスにおける Vpr 機能の解明,第25回日本エイズ学会,東京,2011年12月2日. 小柳義夫細胞性ウイルス抑制因子:ヘルペスウイルスとレトロウイルスの共通メカニズム

平成 23 年度北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 「感染、免疫、炎症、発癌」 札幌, 2011 年 12 月 5 日

- Ebina H., Urata K., Kanemura Y. and Koyanagi Y. Construction of labeling method for nucleosome-formed viral DNA. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13 日
- Ebina H., Kanemura Y., Suzuki Y., Urata K., Misawa N. and Koyanagi Y. Integrase-independent HIV-1 infection is augmented under condition of DNA damage and produces a viral reservoir. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 14 日

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

#### 1) Pathogenesis of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) *in vivo*: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO, J.TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, Y. MITOBE, Y. MITAGAMI, M. TANABE 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. In addition, it is clinically known that HTLV-1 induces cellular immunodeficiency in the infected subjects, although its molecular mechanism was obscure. 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, it is suggested that Tax and HBZ play important roles HTLV-1-induced pathogenesis. Whereas Tax expression is frequently silenced in ATL cells, transcription of the HBZ gene is detected in all of the ATL cell lines and primary ATL cases, indicating that HBZ is a critical factor for ATL leukemogenesis. We have established HBZ transgenic mice (HBZ-Tg) that express HBZ gene in CD4+ T-cells. Recently, we reported that HBZ-Tg developed T-cell lymphomas and systemic inflammatory diseases, such as dermatitis and alveolitis. Immunological analyses revealed that the population of regulatory T cells (Tregs) was increased in HBZ-Tg, and T-lymphoma tissues in HBZ-Tg frequently expressed Foxp3, a master molecule of Treg. Interestingly, the suppressive function of Tregs from HBZ-Tg was impaired compared with non-Tg littermates, suggesting that HBZ expression increases dysfunctional Tregs resulting in malignant transformation and inflammatory disorders in vivo. We have also reported that HBZ impairs production of Th1 cytokines inducing cellular immunodeficiency in HBZ-Tg. Those phenotypes of HBZ-Tg, namely, lymphoma development, inflammatory diseases, and immunodeficiency, are very similar to those of HTLV-1 carriers. Our observations imply that HBZ has a crucial role in HTLV-1-associated pathogenesis.

# 2) Molecular functions of HBZ in ATL leukemogenesis: J. YASUNAGA, P. MIYAZATO,T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, A. TANAKA-NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE, M. MIURA, N. SONO, A. KAWATSUKI, Y. MITAGAMI, M. TANABE and M. MATSUOKA.

Tax and HBZ are considered to play the important roles in leukemogenesis of ATL, although the precise mechanism has not been clarified. Interestingly, these two proteins have the opposite functions in various signaling pathways. HBZ specifically suppresses the classical NF-κB

pathway by targeting p65, whereas Tax activates both classical and alternative pathways. Tax is known to suppress TGF-β signaling though inhibition of Smad proteins. Recently, we have reported that HBZ can form a complex with Smad2/3 and p300 to activate the transcription of TGF-β-responsive genes, such as *Foxp3*. On the other hands, HBZ represses the activity of Foxp3 by forming complex with Foxp3 and NFAT; those findings can explain why functionally impaired Tregs are increased in HBZ-Tg. In addition, we reported that HBZ interacts with activating transcription factor 3 (ATF3) and interferes with the activation of p53 by ATF3, suggesting an anti-apoptotic effect of HBZ. Our findings suggest that HBZ complicatedly regulates the cellular signaling pathways together with Tax, and finally leads T-cells to malignant transformation. We also identified other cellular targets of HBZ. We are analyzing their significances in leukemogenesis of HTLV-1-infected cells.

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

Retrovirus synthesizes viral dsDNA by reverse transcription and inserts the DNA into the host genome by integration. Some viruses strongly prefer specific genomic regions for their integration. Mouse leukemia virus (MLV) prefers the regions near transcriptional start sites, CpG islands and DNase hyper sensitive sites for its integration, while the molecular mechanism for this preference is unknown. In this study, we analyzed a large number of the integration sites by massively parallel sequencing, and found that human mutant cells lacking a DNA repair protein NBS1 and NBS1-knockout MEFs showed decreased MLV integration frequency near transcriptional start sites, CpG islands and DNase hyper sensitive sites. NBS1-deficient human cells also showed decreased integration within H3K4me3, H3K9ac and H3K36ac regions, which are histone modifications strongly detected around active promoters. In contrast, the integration frequency increased surrounding regions rich in H4K20me3, which is known to be associated with heterochromatin. Moreover, we demonstrated physical interaction of NBS1 and viral DNA before integration in MLV-infected cells by using ChIP assay. This study indicates that NBS1 is a host factor regulating MLV integration targeting.

### 4) Novel resistance mechanism to HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA.

Enfuvirtide (T-20), an HIV-1 gp41-derived peptide, efficiently inhibits HIV infection by blocking the fusion between viral envelope proteins and the plasma membrane. We have developed several potential second-generation fusion inhibitors (FIs), such as SC34 and SC34EK, which are active against T-20-resistant variants. Resistant HIV-1 to SC34EK contained several mutations in

gp41, and about half of them were located in the C-terminus of gp41, specifically called cytoplasmic tail (CT). This region is believed to be essential for efficient viral infection and replication, while there is no report that FIs selected mutations in this region so far. We observed that mutations in CT conferred resistance to FIs, and impaired viral infection. These results indicate that FI-selected mutations in CT involved in the drug susceptibility by influencing the viral infection steps.

### 5) Development of new small-molecule inhibitors for HIV: K. SHIMURA, H. TOGAMI, and M. MATSUOKA.

Recent anti-retroviral therapy (ART) potently suppresses HIV-1 replication, and improves prognosis of HIV-1 infected individuals. However, long-term antiviral therapies induce drug resistant viruses, and this is a major obstacle of efficient therapies. In order to develop new small-molecule anti-HIV drugs, we screened tens of thousands of compounds and several with anti-HIV activity were identified. Among them, some compounds seem to inhibit HIV replication by a novel mode of action. We are going to identify the mechanism of action and reveal antiviral spectrum.

#### LIST OF PUBLICATIONS CENTER FOR HUMAN RETROVIRUS RESEARCH LABORATORY OF VIRUS CONTROL

- Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. Blood 119(2):434-444, 2011.
- Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type peptide bond isosteres. ACS Med. Chem. Lett 2(6):477-80,2011.
- Izumi K, Watanabe K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Sarafianos SG, Kodama EN. Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effects on T-20. Antivir. Chem. Chemother 22(1):51-5 ,2011.
- Douceron E, Kaidarova Z, Miyazato P, Matsuoka M, Murphy EL, Mahieux R. HTLV-2 APH-2 Expression Is Correlated With Proviral Load but APH-2 Does Not Promote Lymphocytosis. J Infect Dis 2011 Nov 7. [Epub ahead of print]
- Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. Int. J. Hematol 94; 435-442, 2011.
- Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor

enhances TGF-β signaling through p300 coactivator. Blood 118; 1865-1876, 2011.

- Shimizu-Kohno K, Satou Y, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Niino D, Sugita Y, Ishikawa F, Matsuoka M, Ohshima K. Detection of HTLV-1 by means of HBZ gene in situ hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Cancer Sci 102; 1432-1436, 2011.
- Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. Retrovirology 8; 19, 2011.
- Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation *in vivo*. PLoS Pathog 7:e1001274,2011.
- Matsuoka M and Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ, and therapy. Oncogene 30:1379-1389,2011.
- Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. Blood 117: 5663-5673, 2011.
- Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF-κB signaling. J Virol, 85; 6212-6219, 2011.

松岡雅雄: HTLV-1 感染と ATL Bio Clinica vol.26(10) 18-23, 2011

- Nanae Taguchi, Yorifumi Satou, Koichi ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor induces systemic inflammations in vivo: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
- Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka, Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
- Junichiro Yasunaga, Frank C Lin, Xionbin Lu, Kuan-The Jeang. HTLV-1 Tax-induced NF-κB activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
- Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300 coactivator: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
- Paola Miyazato, Yorifumi Satou, Tomoyuki Yamaguchi, Shimon Sakaguchi, Kouichi Ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor-mediated dysfunction of regulatory T cells in vivo: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.

- Junichiro Yasunaga, Frank C. Lin, Xiongbin Lu, Kuan-The Jeang. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-κB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou, China. July 24-26, 2011.
- Masao Matsuoka. Molecular mechanisms of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou, China. July 24-26, 2011.
- Yasuteru Sakurai, Fumiaki Sato, Takeshi Fujiwara, Chizuko Hirano, Gozoh Tsujimoto, Kenshi Komatsu, Masao Matsuoka. A DNA REPAIR PROTEIN NBS1 REGULATES MLV INTEGRATION SITE SELECTION: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro, Japan. September 11-16, 2011.
- Junichiro Yasunaga, Frank C Lin, Xiongbin Lu, Kuan-Teh Jeang. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20 TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-κB PATHWAY: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro, Japan. September 11-16, 2011.
- Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP FACTOR ENHANCES TGF-BETA SIGNALING THROUGH P300 COACTIVATOR: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro, Japan. September 11-16, 2011.
- Paola Miyazato, Yorifumi Satou, Tomoyuki Yamaguchi, Shimon Sakaguchi, Kouichi Ohshima, Masao Matsuoka. IMPAIRED FUNCTION OF REGULATORY T CELLS BY HTLV-1 bZIP FACTOR(HBZ): International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro, Japan. September 11-16, 2011.
- Masao Matsuoka. Molecular mechanisms of pathogenesis by HTLV-1: The XXX Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. Tokyo, Japan. September 15-17, 2011.
- 松岡雅雄: How HTLV-1 causes diseases?: 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3-5 日
- 安永純一朗: Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-κB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
- 松岡雅雄: ヒトT細胞白血病ウイルス1型プロウイルスの意味と意義: 第70回日本癌学会 学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
- 安永純一朗、趙鉄軍、Miyazato Paola、佐藤賢文、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、 2011年10月14-16日
- 松岡雅雄: How human T-cell leukemia virus type 1 causes disease?: 第 12 回熊本エイズセミナ -GCOE Joint International Symposium, 熊本、2011 年 10 月 19-21 日
- Masao Matsuoka. Oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: GDRI France Japan Conference. Montpellier, France. November 22-25, 2011.

- 志村和也、大石真也、藤井信孝、松岡雅雄:HIV-1 膜融合阻害剤に対する新規耐性メカニ ズムの解析:第25回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011年11月30日-12 月2日
- 松岡雅雄: ヒトT細胞白血病ウイルス1型の病原性発現機構: 平成23年度北海道大学遺伝 子病制御研究所共同研究集会、札幌、2011年12月5-6日
- Masao Matsuoka. Molecular pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I: The 18<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Shanghai, China. December 7-9, 2011.
- Kenji Sugata. HTLV-1 bZIP factor induces cell-mediated immunodeficiency by suppressing production of Th1 cytokines. 18th East Asia Joint Symposium. Shanghai, China. December 7-9, 2011.

### 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, S. KUROKI 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 indentify the molecule(s) that regulate H3K9 methylation. We previously showed that coordinated expression of the H3K9 methylatransferase G9a and the H3K9 demethylase Jmjd1a dynamically regulate H3K9 methylation levels during male meiosis in mice (Tachibana et al., 2007). To further elucidate molecular function of Jmjd1a during murine development, we have established *Jmjd1a* knockout (KO) mice (Inagaki et al., 2009). Jmjd1a is dispensable for embryonic development since *Jmjd1a*-KO offspring were delivered normally. Jmjd1a-related protein Jmjd1b can also catalyze H3K9 demethylation. *Jmjd1b*-KO mice were born at sub-Mendelian ratio. 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 until E7.5, suggesting that *Jmjd1a/b* double KO (DKO) mice are embryonic lethal.

To further investigate the function of Jmjd1a/b, we established ES cells in which *Jmjd1a* and *Jmjd1b* were conditionally disrupted by 4-hydroxytamoxifen (OHT) treatment. *Jmjd1a/b* conditional KO ES cells could not grow in the presence of OHT, whereas either *Jmjd1a-* or *Jmjd1b-*KO ES cells grow normally, indicating Jmjd1a and b were redundantly required for ES cell growth. Propidium iodide (PI) staining analysis indicated PI-positive cells were dramatically increased when both *Jmjd1a* and *b* alleles were mutated. These facts indicate cell death is induced in *Jmjd1a/b*-depleted ES cells. Importantly, levels of dimethyl H3K9 (H3K9me2) was drastically increased when both *Jmjd1a* and *Jmjd1b* were mutated. In contrast, levels of H3K9me2 were only slightly elevated when either *Jmjd1a* or *Jmjd1b* was mutated. These facts suggest Jmjd1a and b are redundantly required not only for ES cell survival but also for H3K9 demethylation.

#### 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, *Sry* is a key transcription factor that switches the developmental program into testes in the bipotential fetal gonads (Koopman et al., 1991). However, it is unknown how epigenetic change occurs during the differentiating process from bipotential gonads into the differentiated male/female gonads. To understand epigenetic change in this processes, we established *Ad4BP/SF1-LNGFR* transgenic (TG) mice that express human low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) in gonadal somatic cells. In these mice, LNGFR was successfully expressed specifically in gonadal somatic cells the 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, indicating purification was achieved successfully. Currently we are planning to analyze epigenome structure and gene expression profile of bipotential E11.5 gonads using the purified cells described above.

#### 3) Roles of endogenous retroviruses repressor, ESET, in DNA repair/genome integrity: T.TSUBOTA and Y. SHINKAI

About forty percent of the mammalian genome is derived from retroelements, of which  $\sim 10\%$  are endogenous retroviruses (ERVs). Since these retroelements could potentially cause diseases including cancer, it is critical to suppress their transposon activities. Recently, it has been reported that histone H3-lysine 9 (H3K9) methyltransferase, ESET, is required for the repression of ERVs in the mouse embryonic stem (mES) cells.

When *Eset* is conditionally knockout (*Eset* CKO) in mES cells by hydroxytamoxifen (OHT), the growth is rapidly inhibited. To understand the mechanism of this growth retardation, first the cell cycle analysis was performed and revealed that *Eset* CKO cells show the G1/S and G2/M phase arrest. Additionally, deletion of *Eset* also causes the apoptotic cell death. As expected from these results, the expression level of p53 was increased suggesting a decrease of genomic stability. Indeed, gamma( $\gamma$ )-H2AX level in the mutant was higher than that of WT cells. Deletion of *Eset* also causes the abnormal nuclear structure including micronuclei which is a biomarker of genotoxic stress. From these results, it is strongly suggested that ESET is required for genome stability in the mES cells.

Since one of the retrotransposons, Line-1, has been reported to cause DNA damages, the expression level of Line-1 was investigated and showed that it is clearly reactivated in the *Eset* CKO cells. Therefore, it suggests that at least, in part, derepression of Line-1 likely causes DNA damages. Interestingly, although most of the  $\gamma$ -H2AX foci of WT cells were co-localized with DNA repair protein, 53BP1, which is recruited to damage sites via di-methylation of histone H4-lysine 20 (H4K20), some of the damage foci in the *Eset* CKO cells were not. Therefore, the other possibility

is that *Eset* deletion causes the reduction of 53BP1 recruitment to repair the spontaneous DNA damages, leading to genome destabilization. Currently, the molecular mechanism of this process is investigating.

#### LIST OF PUBLICATIONS EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES LABORATORY OF MOUSE MODEL

- Chang, Y. Sun, L. Kokura, K. Horton, J.R. Fukuda, M. Espejo, A. Izumi, V. Koomen, J.M. Bedford, M.T. Zhang, X. Shinkai, Y. Fang, J. and Cheng, X. MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nature Commun.*, 2011, 2:533.
- Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acid Research*, 2011, 39:6475-6488.
- Karimi, M.M. Goyal, P. Maksakova, I.A. Bilenky, M. Leung, D. Tang, J.X. Shinkai, Y. Mager, D.L. Jones, S. Hirst M. and Lorincz, M.C. DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements and chimaeric transcripts in mouse ES cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 8:676-687.
- Leung D, Dong K, Irina A, Maksakova IA, Goyal P, Appanah R, Lee S, Tachibana M, Shinkai Y, Lehnertz B, Mager DL, Rossi FMV and Lorincz MC. Lysine methyltransferase G9a is required for *de novo* DNA methylation and the establishment but not maintenance of proviral silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011, 108:5718-5723.
- Shinkai Y. and Tachibana M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev.*, 2011, 25:781-788.
- Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters A. H.F.M. Peters, Turner J.M.A. Asano M, and Koseki H. HP1γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development*, 2011, 138: 4207-4217.
- Takahashi, A. Imai, Y. Yamakoshi, K. Kuninaka, S. Ohtani, N. Yoshimoto, S. Hori, S. Tachibana, M. Anderton, E. Takeuchi, T. Shinkai, Y. Peters, G. Saya, H. and Hara, E. DNA damage signalling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C<sup>Cdh1</sup> in senescent cells. *Mol Cell*, 2011, Dec 13. [Epub ahead of print]
- Tsubota, T. and Shinkai, Y.: The role of H3K9 methyltranferase in genome integrity. 27th RBC-NIRS International Symposium. December 9-10, 2011, Kyoto, Japan
- Tachibana M. : Transcriptional regulation by histone methylation and demethylation J The 18th east

asian joint symposium on biological research, December 8-10, 2011, Shanghai, China

- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による 転移因子の抑制機構」2011 年 1 月 21 日、東 京大学農学部,東京
- 眞貝洋一:「Epigenetic Regulation of Biological Processes by Histone Methylation」2011年1月 21日、理化学研究所、和光市
- 眞貝洋一:「ヒストンメチル化酵素 ESET による ES 細胞の機能・分化制御機構」第10回日 本再生医療学会総会シンポジウム、2011年3月2日、東京
- 眞貝洋一:「ヒストンメチル化酵素 ESET による生命機能制御 」2011 年 3 月 18 日、北海道 大学、札幌
- 眞貝洋一:「ヒストンメチル化酵素 ESET による生命機能制御」第11回日本分子生物学会春 季シンポジウム、2011年5月25-26日、金沢
- 眞貝洋一:「私の生命科学研究遍歴」第4回「エピジェネティクスの制御と生命機能」領 域会議、2011 年 6 月 8 日、神戸
- 眞貝洋一、立花誠:「エピジェネティクス制御による生命機能調節」第13回生命科学研究 科シンポジウム、2011年7月25-26日、京都
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による生命機能制御」2011 年 9 月 15 日、東京大学医 科学研究所、東京
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による生命機能制御」2011年11月8日、福島県立医 科大学、福島
- 眞貝洋一:「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」第4回特定領域研究「生殖系列」班会議、2011 年 11 月 17-18 日、大阪
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による生命機能制御」2011 年 11 月 22 日, がん研究所、 東京
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による生命機能制御」ヒト ES/iPS 細胞:産業応用最前線セミナー〜細胞治療と新薬スクリーニング〜、2011 年 12 月 12 日、東京
- 眞貝洋一:「ESET-mediated endogenous retrovirus silencing」第34回日本分子生物学会年会 シンポジウム、2011年12月16日、横浜
- 眞貝洋一:「ヒストンリジンメチル化による生命機能制御」2011 年 12 月 20 日、東京工業 大学大学院生命理工学研究科、横浜
- 立花 誠:「ヒストンのメチル化による細胞系列特異的な転写の抑制機構について」第5回 日本エピジェネティクス研究会年会分子生物学会年会、2011 年 5 月 19-20 日、熊 本
- 立花 誠:「Transcriptional regulation by hoistone methylation and demethylation」第34回日本 分子生物学会年会シンポジウム、2011年12月16日、横浜
- 坪田智明、眞貝洋一:「The analysis of histone methyltransferase ESET in DNA repair/genome integrity」、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜

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

It has been 28 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) T cells monitor N-myristoylation of the nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys: D. MORITA, T. IGARASHI, M. HORIIKE, N. MORI and M. SUGITA

The use of the host cellular machinery is essential for pathogenic viruses to replicate in host cells. HIV and SIV borrow the host-derived N-myristoyl-transferase and its substrate, myristoyl-CoA, for coupling a saturated C(14) fatty acid (myristic acid) to the N-terminal glycine residue of the Nef protein. This biochemical reaction, referred to as N-myristoylation, assists its targeting to the plasma membrane, thereby supporting the immunosuppressive activity proposed for the Nef protein. In this study, we show that the host immunity is equipped with CTLs capable of sensing N-myristoylation of the Nef protein. A rhesus macaque CD8(+) T cell line was established

that specifically recognized N-myristoylated, but not unmodified, peptides of the Nef protein. Furthermore, the population size of N-myristoylated Nef peptide-specific T cells was found to increase significantly in the circulation of SIV-infected monkeys. Thus, these results identify N-myristoylated viral peptides as a novel class of CTL target Ag.

2) Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge: Y. TAKAHARA, S. MATSUOKA, T. KUWANO, T. TSUKAMOTO, H. YAMAMOTO, H. ISHII, T. NAKASONE, A. TAKEDA, M. INOUE, A. IIDA, H. HARA, T. SHU, M. HASEGAWA, H. SAKAWAKI, M. HORIIKE, T. MIURA, T. IGARASHI, T. K. NARUSE, A. KIMURA and T. MATANO

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are crucial for the control of human and simian immunodeficiency virus (HIV and SIV) replication. A promising AIDS vaccine strategy is to induce CTL memory resulting in more effective CTL responses post-viral exposure compared to those in natural HIV infections. We previously developed a CTL-inducing vaccine and showed SIV control in some vaccinated rhesus macaques. These vaccine-based SIV controllers elicited vaccine antigen-specific CTL responses dominantly in the acute phase post-challenge. Here, we examined CTL responses post-challenge in those vaccinated animals that failed to control SIV replication. Unvaccinated rhesus macaques possessing the major histocompatibility complex class I haplotype 90-088-Ij dominantly elicited SIV non-Gag antigen-specific CTL responses after SIV challenge, while those induced with Gag-specific CTL memory by prophylactic vaccination failed to control SIV replication with dominant Gag-specific CTL responses in the acute phase, indicating dominant induction of vaccine antigen-specific CTL responses post-challenge even in non-controllers. Further analysis suggested that prophylactic vaccination results in dominant induction of vaccine antigen-specific CTL responses post-viral exposure but delays SIV non-vaccine antigen-specific CTL responses. These results imply a significant influence of prophylactic vaccination on CTL immunodominance post-viral exposure, providing insights into antigen design in development of a CTL-inducing AIDS vaccine.

#### 3) Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-infected rhesus macaque by phage display: T. KUWATA, Y. KATSUMATA, K. TAKAKI, T. MIURA and T. IGARASHI

The humoral immune response is a mechanism that potently suppresses or prevents viral infections. However, genetic diversity and resistance to antibody-mediated neutralization are serious obstacles in controlling HIV-1 infection. In this study, we isolated monoclonal antibodies

from an SIV-infected macaque by using the phage display method to characterize antibodies in SIV infection. Variable regions of immunoglobulin genes were amplified by rhesus macaque-specific primers and inserted into the phagemid pComb3X, which produced the Fab fragment. Antibodies against SIV proteins were selected by biopanning using an SIV protein-coated 96-well plate. A total of 20 Fab clones obtained included 14 clones directed to gp41, four clones to gp120, and two clones to p27. The anti-gp120 Fab clones completely neutralized the homologous neutralization-sensitive SIVsmH635FC and the genetically divergent SIVmac316, and showed at least 50% inhibition against the neutralization-resistant strain, SIVsmE543-3. Competition ELISA revealed that these anti-gp120 Fab clones recognize the same epitope on gp120 including the V3 loop. Identification of antibodies with potent neutralizing activity will help to elucidate the mechanisms for inducing broadly neutralizing antibodies.

4) Recombination Mediated Changes in Coreceptor Usage Confers an Augmented PATHOGENIC PHENOTYPE IN A NON-HUMAN PRIMATE MODEL OF HIV-1 INDUCED AIDS: Y. NISHIMURA, M. SHINGAI, W. R. LEE, R. SADJADPOUR, O. K. DONAU, R.WILLEY, J. M. BRENCHLEY, R. IYENGAR, A. BUCKLER-WHITE, T. IGARASHI and M. A. MARTIN

Evolution of the env gene in transmitted R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains is the most widely accepted mechanism driving coreceptor switching. In some infected individuals, however, a shift in coreceptor utilization can occur as a result of the reemergence of a cotransmitted, but rapidly controlled, X4 virus. The latter possibility was studied by dually infecting rhesus macaques with X4 and R5 chimeric simian simian/human immunodeficiency viruses (SHIVs) and monitoring the replication status of each virus using specific primer pairs. In one of the infected monkeys, both SHIVs were potently suppressed by week 12 postinoculation, but a burst of viremia at week 51 was accompanied by an unrelenting loss of total CD4+ T cells and the development of clinical disease. PCR analyses of plasma viral RNA indicated an env gene segment containing the V3 region from the inoculated X4 SHIV had been transferred into the genetic background of the input R5 SHIV by intergenomic recombination, creating an X4 virus with novel replicative, serological, and pathogenic properties. These results indicate that the effects of retrovirus recombination in vivo can be functionally profound and may even occur when one of the recombination participants is undetectable in the circulation as cell-free virus.

5) Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques: M. NAKAMURA, Y. TAKAHARA, H. ISHII, H. SAKAWAKI, M.

### HORIIKE, T. MIURA, T. IGARASHI, T. K. NARUSE, A. KIMURA, T. MATANO and S. MATSUOKA

Major histocompatibility complex class I (MHC-I)-restricted CD8(+) cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are crucial for the control of human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) replication. In particular, Gag-specific CTL responses have been shown to exert strong suppressive pressure on HIV/SIV replication. Additionally, association of Vif-specific CTL frequencies with in vitro anti-SIV efficacy has been suggested recently. Host MHC-I genotypes could affect the immunodominance patterns of these potent CTL responses. Here, Gag- and Vif-specific CTL responses during primary SIVmac239 infection were examined in three groups of Burmese rhesus macaques, each group having a different MHC-I haplotype. The first group of four macaques, which possessed the MHC-I haplotype 90-010-Ie, did not show Gag- or Vif-specific CTL responses. However, Nef-specific CTL responses were elicited, suggesting that primary SIV infection does not induce predominant CTL responses specific for Gag/Vif epitopes restricted by 90-010-Ie-derived MHC-I molecules. In contrast, Gag- and Vif-specific CTL responses were induced in the second group of two 89-075-Iw-positive animals and the third group of two 91-010-Is-positive animals. Considering the potential of prophylactic vaccination to affect CTL immunodominance post-viral exposure, these groups of macaques would be useful for evaluation of vaccine antigen-specific CTL efficacy against SIV infection.

#### LIST OF PUBLICATIONS EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES LABORATORY OF PRIMATE MODEL

- Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T.,
  Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike,
  M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T. K., Kimura, A. and Matano, T. Dominant induction
  of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian
  immunodeficiency virus challenge. Biochem. Biophys. Res. Commun. 408, 615-619, 2011.
- Morita, D., Igarashi, T., Horiike, M., Mori, N. and Sugita, M. Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. J. Immunol. 187, 608-612, 2011.
- Boehme, K.W., Ikizler, M., Kobayashi, T. and Dermody, T.S. Reverse genetics for mammalian reovirus. Methods 55, 109-113, 2011.
- Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W.R., Sadjadpour, R., Donau, O.K., Willey, R., Brenchley, J.M., Iyengar, R., Buckler-White, A., Igarashi, T. and Martin, M. A. Recombination-mediated changes in coreceptor usage confer an augmented pathogenic phenotype in a nonhuman

primate model of HIV-1-induced AIDS. J. Virol. 85, 10617-10626, 2011.

- Reiter, D.M., Frierson, J.M., Halvorson, E.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S. and Stehle, T. Crystal structure of reovirus attachment protein sigmal in complex with sialylated oligosaccharides. PLoS Pathog. 7, e1002166, 2011.
- Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. and Matsuoka, S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. Microbiol. Immunol. 55, 768-773, 2011.
- Boehme, K.W., Frierson, J.M., Konopka, J.L., Kobayashi, T. and Dermody, T.S. The reovirus sigma1s protein is a determinant of hematogenous but not neural virus dissemination in mice. J. Virol. 85, 11781-11790, 2011.
- Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T. and Igarashi, T. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-Infected rhesus macaque by phage display. AIDS Res Hum Retroviruses 27, 487-500, 2011.
- Watanabe, T., Shinya, K., Watanabe, S., Imai, M., Hatta, M., Li, C., Wolter, B.F., Neumann, G., Hanson, A., Ozawa, M., Yamada, S., Imai, H., Sakabe, S., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Kiso, M., Ito, M., Fukuyama, S., Kawakami, E., Gorai, T., Simmons, H. A., Schenkman, D., Brunner, K., Capuano, S. V., 3<sup>rd</sup>, Weinfurter, J. T., Nishio, W., Maniwa, Y., Igarashi, T. Makino, A., Travanty, E. A., Wang, J., Kilander, A., Dudman, S. G., Suresh, M., Mason, R. J., Hungnes, O., Friedrich, T. C. and Kawaoka, Y. Avian-type receptor-binding ability can increase influenza virus pathogenicity in macaques. J. Virol. 85, 13195-13203, 2011.
- Iwami, S., Beauchemin, C., Tada, T., Igarashi, T., Miura, T. : Quantification system of viral dynamics in vitro -the dynamics of SHIV on HSC-F-. 8th ESMTB Conference. Poland. June 28-July 2. 2011.
- Iwami, S., Beauchemin, C., Tada, T., Igarashi, T., Miura, T.: Quantifying viral dynamics based on in vitro experiments and mathematical modeling. IUMS. Japan. September 11-16. 2011.
- 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、好井健太朗、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛: 新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築 第152回日本獣 医学会学術集会、大阪、 2011年9月19-21日
- 仲屋友喜、小林剛、宮沢孝幸:ウシ内在性レトロウイルスK1エンベロープタンパクの開裂 に重要な領域の探索 第152回日本獣医学会学術集会、大阪、 2011年9月19-21日
- 加藤文博、日向亮輔、川岸崇裕、大石真也、藤井信孝、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛: 抗デングウイルス活性を有する薬剤の探索 第18回トガ・フラビ・ペスチウイル

ス研究会、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京、2011 年 11 月 11 日

- 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛:ダニ媒介性脳炎ウイル ス IR99 株の感染性 cDNA クローンの構築 第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス 研究会、第 18 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京、2011 年 11 月 11 日 日向亮輔、川岸崇裕、加藤文博、好井健太朗、髙島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛: フラビウイルスにおける宿主 DNA 修復機構を用いた新規リバースジェネティクス
  - 系の開発 第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、第18回トガ・フラビ・ ペスチウイルス研究会、東京、2011年11月11日
- 大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦:中和抵抗性 のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in vitro における立体構造変化誘導剤に よる中和感受性増強効果の評価 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011年 11月30日-12月2日
- 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、 侯野哲朗、松岡沙織:サルエイズモデル感染初期における MHC クラス I ハプロタイ プ別の CTL 反応優位パターンの解析 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011 年11月30日-12月2日
- 張険峰、五十嵐樹彦、松尾和浩、堀端重男、横溝香里、三浦智行、大橋貴、山本直樹、志 田壽利:高病原性 SIV に対する組換え BCG と弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチン の防御効果 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011年11月30日-12月2 日
- 森田大輔、五十嵐樹彦、堀池麻里子、森直樹、杉田昌彦:Nef 蛋白質のミリスチン酸修飾
   をモニターする新たな免疫システム 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、2011
   年11月30日-12月2日

#### **CENTER FOR EMMERGING VIRUS RESEARCH**

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

Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) is a rare yet devastating disorder caused by Epstein-Barr virus (EBV) infection in humans. However, the mechanism of this disease has yet to be elucidated due to a lack of appropriate animal models. Here, we utilized a human CD34<sup>+</sup> cell-transplanted humanized mouse model and reproduced pathological conditions resembling EBV-HLH in humans. By 10 weeks postinfection, two thirds of the infected mice died after exhibiting high and persistent viremia, leukocytosis, IFN- $\gamma$  cytokinenemia, normocytic anemia, and thrombocytopenia. EBV-infected mice also showed systemic organ infiltration by activated CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells and the level of IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> 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.

### 2) Role of cell surface proteases in the outer membrane protein assembly: S. NARITA and Y. AKIYAMA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Viral Oncology, IVR)

The aim of research in this group is to clarify the survival strategy of gram-negative bacteria. Various 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. A characteristic feature of the gram-negative bacteria's cell structure is 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 periplasm and cytoplasm. Because the outer membrane is essential for the growth of gram-negative bacteria, knowledge of the biosynthesis, assembly and quality control systems of the outer membrane components would contribute to development of 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  $\sigma^{E}$  stress response system senses misfolded outer membrane proteins (OMPs) in the periplasmic space and regulates expression of a set of genes that function to cope with envelope stresses. Upon activation of  $\sigma^{E}$ , expression of genes for periplasmic chaperones/proteases and

components of the machineries for OMP and lipopolysaccharide assemblies are up-regulated while those for OMPs are down-regulated, both contributing to reduceing the threat to periplasmic accumulation of misfolded OMPs. Although many genes have been identified as constituents of the  $\sigma^{E}$  regulon, their functions are still not fully understood. We characterized *yfgC*, a  $\sigma^{E}$ -regulated gene encoding a putative periplasmic protease. An *E. coli*  $\Delta yfgC$  mutant showed increased sensitivity to detergents and antibiotics, suggesting that the loss of the *yfgC* function compromises integrity of the outer membrane. Consistently, we found that folding of LptD, an outer membrane protein involved in the transport and assembly of lipopolysaccharide to the cell surface, became defective in this strain. The defective outer membrane function caused by the  $\Delta yfgC$  mutation was further aggravated by additional disruption of genes encoding periplasmic chaperones or subunits of the BAM complex that are required for assembly of outer membrane proteins. These results suggest that YfgC assists proper assembly of outer membrane proteins.

#### LIST OF PUBLICATIONS CENTER FOR EMMERGING VIRUS RESEARCH

#### 1) First Group

- Sato, K., Koyanagi, Y. The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. Exp Biol Med, 236: 977-985, 2011.
- Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., Koyanagi, Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. Blood, 117: 5663-5673, 2011.
- Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., Koyanagi, Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. J. Virol, 85: 932-945, 2011.
- 佐藤佳,小柳義夫. ヒト化マウスの利用: EBウイルス関連血球貪食性リンパ球組織球症動 物モデル.血液内科,63(6),627-633,2011.
- Sato K, Misawa N, and Koyanagi Y. Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice, T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection Infectious Disease Research Network, poster #23, London, England, 2011 年 1 月 24 日
- Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, De Boer R, Koyanagi Y, DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral

infection, London, England, 2011 年 1 月 24 日

- Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, De Boer R, Koyanagi Y, DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, The 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling, P-215, Tokyo, 2011年3月1日
- 佐藤佳. 生体内 HIV-1 複製における Vpr タンパク質の意義, 第13 回白馬シンポジウム, oral #9, 札幌, 2011 年 5 月 19 日
- Sato K, Misawa N, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, and Koyanagi Y. Efficient HIV-1 infection in regulatory CD4<sup>+</sup> lymphocytes during acute phase in humanized mice, Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster # 235, New York, USA, 2011 年 5 月 26 日
- 佐藤佳, 三沢尚子, 小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態の解析, 第 25 回近畿エイズ研究会, 京都, 2011 年 6 月 18 日
- Iwami S, Sato K, Koyanagi Y, Mathematical modeling and *in vitro* experiments in virology, Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan, Korea, 2011年8月 25日.
- Sato K, Misawa N, Ito M, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo, XV International Congress of Virology, VI-PO21-12, 札幌, 2011年9月13日
- 岩見真吾, 佐藤佳, Rob de Boer, 小柳義夫, 細胞ダイナミクスの定量化 動物実験と数理解 析の融合 - , 日本数学会2011年度秋季総合分科会, 長野, 2011年10月1日
- Sato K, Misawa N, Ito M, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo, 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh, USA, 2011 年 10 月 29 日
- Iwami S, Sato K, Koyanagi Y, Mathematical modeling of wild type and Vpr -deleted HIV-1 infection *in vitro*, CBI/JSBi (情報計算化学生物学会/日本バイオインフォマティクス 学会合同大会) 2011,神戸, 2011年11月8日
- 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫. 急性感染期のHIV-1増殖におけ る制御性T細胞とVprの寄与, 第25回日本エイズ学会, WS1-006, 東京, 2011年12月2 日
- 岩見真吾, 佐藤佳, 小柳義夫, 培養細胞実験の数理モデリングを用いたウイルスダイナミ クスにおけるVpr機能の解明, 第25回日本エイズ学会, 東京, 2011年12月2日

#### 2) Second Group

- Narita, S., Tokuda, H. Overexpression of LolCDE allows the deletion of the *Escherichia coli* gene encoding apolipoprotein *N*-acyltransferase. J. Bacteriol., 193: 4832-4830, 2011.
- Narita, S. ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem., 75: 1044-1054, 2011.

垰和之,成田新一郎,徳田元. Rcsリン酸リレー系によるリポ蛋白質特異的シャペロンLolA の発現制御,日本農芸化学会2011年度大会,3C26p07,京都,2011年3月27日

- 成田新一郎. 大腸菌リポ蛋白質の外膜局在化に関わるABCトランスポーターの解析, 2010 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築と増殖制御の研究」, 三 島, 2011年3月31日
- 成田新一郎,秋山芳展.大腸菌表層タンパク質の品質管理に関わる新規プロテアーゼホモ ログの解析,第8回21世紀大腸菌研究会,南木曽,2011年5月19日

#### **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

2009	75 strains	20,337 embryos
2010	101 strains	18,620 embryos
2011	117 strains	25,130 embryos

#### 2) Introduction of mouse strains from outside

	Frozen embryos	Live mice
2009	7 strains	2 strains
2010	4 strains	6 strains
2011	1 strain	3 strains

#### 3) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos	No of transgenic
		injected	pups obtained
2009	94	33,821	190 (0.6%)
2010	90	32,875	124 (0.3%)
2011	81	29,031	227 (0.8%)

#### 4) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos	No of coatcolor
		injected	chimera obtained
2009	52	4,587	242 (5.3%)
2010	106	7,106	394 (5.5%)
2011	107	5,828	324 (5.5%)

#### LIST OF PUBLICATIONS REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM

- Takashima, Y., Ohtsuka, T., González, A., Miyachi, H., Kageyama, R. Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 108, 3300-3305, 2011
- Niwa, Y., Shimojo, H., Isomura, A., González, A., Miyachi, H., Kageyama, R. Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. Genes & Dev. 25, 1115-1120, 2011
- Yamazaki, D., Tabara, Y., Kita, S., Hanada, H., Komazaki,S., Nitou, D., Mishima, A., Nishi, M.,
  Yamamura, H., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Miyachi, H., Yamamoto, S., Miyata, T.,
  Kawano, Y., Kamide, K., Ogihara, T., Hata, A., Umemura, S., Soma, M., Takashashi, N.,
  Imaizumi, Y., Miki, T., Iwamoto. T., Takeshima, H. TRIC-A Channels in Vascular Smooth
  Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. Cell Metabolism.14, 231-241, 2011
## **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.

In an effort to make net life as smooth as possible, we replaced old pop server with Linux platform new ones to save NFS conflicts and improve response time. Next, we created the online room booking system. All IVR-LAN users can check the availability of the seminar rooms or make a booking on WEB page. This year we created a subnet for isolating some computers which were used with experimental equipments and subjected to computer virus infection. The subnet ensured a more secure network for us. User's sample files are saved in a NAS of the subnet, that protected by an anti-virus application, and users who login IVR-LAN could access via router to the NAS only.

However IVR-LAN has adequately equipped, we must have a responsibility for sending/getting data. A few accidents have occurred in this year. IVR-LAN users need to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto university.

In addition to the administration of network, Takemoto began to analyze RNA-Seq and ChIP-Seq coupled with high throughput DNA sequencing to find epigenetic changes which might be controlled during differentiation.

## STAFF CHANGES OF THE INSTITUTE

### Appointments

During the period of January to December 2011, the following new staffs were appointed; Dr. Keizo Tomonaga as a Professor of Department of Viral Oncology, Dr. Yasushi Kawaguchi as a Visiting Associate Professor of Department of Biological Responses, Dr. Momoko Maekawa as an Assistant Professor of Department of Cell Biology, Dr. Tomoyuki Honda as an Assistant Professor of Department of Viral Oncology, Dr. Kazuya Shimura as an Assistant Professor of Center for Human Retrovirus Research, Drs. Kenji Nakahigashi, Yasuhiko Horiguchi, Sho Yamasaki and Yasuhito Tanaka as a Lecturer (part time) of Department of Viral Oncology, Drs. Kazufumi Matsushita and Yutaro Kumagai as a Lecturer (part time) of Department of Genetics and Molecular Biology, Dr. Yoshiyuki Suzuki as a Lecturer (part time) of Department of Cell Biology, Drs. Yoichiro Iwakura, Osamu Takeuchi, Tatsuo Shioda, Yukihiro Nishiyama, Hirofumi Akari, Tsuneo Morishima and Tatsuya Tsurumi as a Lecturer (part time) of Center for Human Retrovirus Research, Drs. Ikuo Wada and Koki Taniguchi as a Lecturer (part time) of Experimental Research Center for Infectious Diseases.

## Departure

Drs. Katsuji Sugie, Toru Kiyono, Yasuhito Tanaka, Yoshiharu Matsuura, Hisashi Arase, Junji Takeda, Hiroaki Takeuchi, Yusuke Yanagi, Takeshi Noda, Kyoko Shinya, Michinori Kohara and Koichi Morita left the Institute. 2011

## THE SCIENTIFIC LECTURES OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

The annual scientific lecture of this Institute was held on July 5, 2011 at the Kyoto University Shirankaikan Yamauchi Hall.

## Program

Opening Remarks: Masao Matsuoka

- 1. Bornavirus: A new development of RNA virus research, Keizo Tomonaga, this Institute
- 2. Measles virus: Towards better understanding of virus-induced membrane fusion and establishement of a new mouse model for measles, Yusuke Yanagi, Kyushu University
- 3. The roles of histone lysine methylation in biological processes, Yoichi Shinkai, this Institute
- 4. The roles of cohisin acetylation; Identification of Hdac8 mutations in Cornelia de Lange syndrome patients, Katsuhiko Shirahige, The University of Tokyo

# SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Eighteen seminars were held at the Institute for Virus Research under the auspices of the Institute in 2011. Nine lectures were from abroad and nine others were from Japan.

February 25	Dr. Masanobu Satake, Tohoku University, Japan. " Involvement of Runx transcription factor in the maintenance of T lymphocytes naivety".
March 8	Dr. Ruth Sperling, The Hebrew University, Israel . " Pre-mRNA splicing - a network of interactions within the pre-mRNA processing machine ".
April 4	Dr. Yoshihisa Yamano, St. Marianna University, School of Medicine, Japan. " Dysregulation of immune system in HAM/TSP ".
May 25	Dr. Kazunari Miyamichi, Stanford University, USA. " Cortical representations of olfactory input by transsynaptic tracing ".
June 1	Dr. Tomoharu Sugiyama, University of Tsukuba, Japan. " mRNA decay in meiosis - A evolutionarily conserved mechanism for differentiation repression?".
June 6	Dr. Yasuyuki Fujita, Hokkaido University, Japan. " Interface between normal and transformed epithelial cells ".
June 14	Dr. Katsura Asano, Kansas State University, USA. "Translation regulation mechanisms by initiation factors eIF4G and eIF3e/Int6".
June 24	Dr. Shigeki Yoshiura, RIKEN, Japan. "Non-cell-autonomous control of the orientation of stem cell polarity and divisions".

June 28	Dr. Masahiro Yamashita, The Aaron Diamond AIDS Research Center, USA "Hiv-1 infection of non-dividing cells".
July 14	Dr. Kosuke Miyauchi, RIKEN, Japan. "Mechanism of HIV entry and a novel eliminating system for HIV-infected cells by activation of CASP3 ".
July 29	Dr. Kenji Nakahigashi, Keio University, Japan, "Systematic phenome analysis of <i>Escherichia coli</i> multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism".
September 7	Dr. John L.R. Rubenstein, University of Carifornia, USA. "Transcriptional control of interneuron development".
September 9	Dr. Carol A. Gross, University of California, USA "Using systems approaches to dissect central bacterial cellular processes".
October 5	Dr. Dong-Yan Jin, The University of Hong Kong, China. "Roles of group I p21-activated kinases and LKB1/SIK1 kinases in Tax-mediated activation of human T cell leukemia virus type 1 long terminal repeats".
October 14	Dr. Yasuhiko Horiguchi, Osaka University Japan. "Attempts to understand how pathogenic bacteria of the genus <i>Bordetella</i> exert specific pathogenicity in specific host".
October 24	Dr. Mineki Saito, University of the Ryukyus, Japan. "Pathogenesis of neurotoxicity by chronic viral infection".
November 16	Dr. Christos Delidakis, University of Crete, Greece. " DSL protein ubiquitylation and signalling in Drosophila".

December 22 Dr. Tomomi Kiyomitsu, Whitehead Institute, USA. " Chromosome and spindle pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation ".

#### 1. First Group

本年度は理学研究科大学院生(D1)として海老瀬広規さんが、理学研究科大学院生(M1)とし て宮崎亮次さん、橋本成祐さんが、医学研究科大学院生(M1)として、大門康志さんが新たに加 わりました。一方、博士研究員の由良隆名誉教授が京都産業大学に移り、10月には海老瀬広規さ んが他大学編入のため研究室を去りました。附属新興ウイルス研究センタの成田新一郎博士とは引 き続き、密接な協力の下に研究を行っています。

#### 膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによるの<sup>E</sup>表層ストレス応答制御機構の解析

単細胞生物である細菌は、外部環境に直に接して いるため、細胞表層が様々なストレスに常に曝され ています。それに対処するための「表層ストレス応 答」は細菌の生存戦略において重要な位置を占めて います。表層ストレス応答は、病原性細菌が、宿主 生物に感染・侵入した際の防御応答に対抗するため の主要な機構の1つでもあり、その解明は医学的見 地からも重要なものといえます。大腸菌では多様な 表層ストレスに対応するための応答経路がこれま



でに5種見つかっており、細胞外のストレスシグナルを膜を超えて細胞内部へ伝達するためにそれ ぞれ独自のシグナル伝達機構を持っています。その中の一つ、o<sup>E</sup>経路表層ストレス応答では、熱 ストレスなどによる異常外膜タンパク質の蓄積を感知し、2つの膜プロテアーゼ DegS と RseP が膜 貫通型 anti-o<sup>E</sup>タンパク質 RseA を連続的に切断することでストレス応答転写因子o<sup>E</sup>を活性化させま す (図1)。二段階目の切断を担う膜内切断プロテアーゼ RseP は、膜内部でペプチド結合の加水分 解を触媒する「膜内切断プロテアーゼ(I-CLiP)」と呼ばれる、新概念のプロテアーゼ の一員に分類 されます。RseP は通常、完全長の RseA は切断できず、DegS によってペリプラズム領域で切断を 受けた RseA の「分解中間体」のみを切断するという、ユニークな制御機構を持っています。私た ちのグループは、この制御に RseP の 2 つの PDZ ドメイン (PDZ-N, PDZ-C) が関わること、特に PDZ-N への何らかのリガンド結合が関与すること を示唆してきましたが、PDZ ドメインの生理的 リガンドはまだ同定されておらず、PDZ ドメインがどのように RseP のプロテアーゼ機能制御に関 わるのかは明らかではありませんでした。そこで私たちは RseP の PDZ ドメインが、その切断基質 認識や、さらにはo<sup>E</sup> の活性化制御にどのような役割を果たしているのかを明らかにす るために解 析を行っています。

最近 Li ら(Li et al., 2009, PNAS)は、結晶構造解析と可溶化条件下での in vitro 実験の結果に基 づき、DegS による切断で生じた「RseA 分解中間体」の C 末端残基 Val148 を、RseP PDZ-C がリガ ンドとして認識することで、RseP による RseA 分解中間体の切断を促進するというモデルを提唱し ました。そこで私たちは、Li らのモデルが in vivo、すなわち生理的条件下でも適用できるかを検討 したところ、以下のような結果を得ました。(1) Li らは、PDZ-N、PDZ-C それぞれの推定リガンド 結合部位の変異 I215A、I304A が in vitro で RseA の切断を完全に阻害すると報告 したが、これらの 変異を持つ RseP や、PDZ-N 或いは PDZ-C のドメイン欠失体は in vivo では野生型 RseP と同様に RseA を切断した。(2) Li らは「RseA 分解中間体」の C 末端残基 Val148 の置換体を用いた in vitro 実験から、RseA 分解中間体の C 末端残基の性質が RseP による切断効率に大きな影響を与えるこ とを示したが、in vivo においては RseA Val148 の 19 種のアミノ酸置換体はすべて 効率よく切断さ れることが分かった。(3) 一方で、これらの Val148 置換体発現株の膜画分を調製し、可溶化した後、 精製 RseP による切断を調べたところ、Li らの報告にほぼ沿った結果が得られた。これらの結果は、 生理的条件下において、PDZ ドメインによる基質 C 末端残基の認識は、RseP による基質切断に主 要な役割を果たしていないことを示唆しています。また、酵素活性部位が膜内部に存在する特殊な プロテアーゼである RseP は、膜構造に組み込まれていない可溶化条件下では生理的条件下とは異 なる性質を示す場合があることも示唆しており、I-CLiPs 研究全般において留意すべき 重要な知見 OM m といえます。

さらに私たちは、(4) RseP PDZ ドメインの生理的重要 性を探るため、染色体 *rseP* 遺伝子上の PDZ-N もしくは PDZ-C 欠失株を作製し、その生育及び外膜タンパク質

(OMP) 過剰発現時の $\sigma^{E}$ 活性化能を調べたが、いずれも 野生株と比べ顕著な差は見られない、という興味深い結 果を得ました。このことは、PDZ ドメイン及びそのリガ ンド結合は従来型の OMP 依存的な $\sigma^{E}$ ストレス応答経路



図2. 予想される新たな の『活性化経路

には重要な役割を持たないことを示唆しており、それ以外の 未知のシグナルによる $\sigma^{E}$ ストレス応 答活性化に関わる可能性が考えられます(図 2)。そこで PDZ へのリガンド結合を介する新たな $\sigma^{E}$ 活性化機構の可能性を探るため、光反応性アミノ酸アナログ pBPA を利用した部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いて PDZ リガンド結合ポケットをターゲットにした 生理的リガンド探索を試みた所、 複数の架橋産物が検出されました。現在は、これらの架橋相手の同定を試みており、未知の $\sigma^{E}$ 活 性化経路の可能性を追求しています(檜作、秋山)。

### II. Second Group

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、川手章史くん、さらに特定助教の 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、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 感染は発がんと関連することが知られていて、特に子宮頚癌では,ほとんどの発症例 でHPV の感染が確認されており,HPV 感染が子宮頚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、川手、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マウス個体での解析

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

Wnt 非存在下、Krtap13 を強制発現させるだけで、Wnt 経路の著しい活性化が生じた。Krtap13 の強 制発現は、β-catenin 蛋白質の蓄積を誘導し、細胞の増殖を促進した。 Krtap13 は、細胞膜上で、 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。

Krtap13 の強制発現による Wnt 経路の活性化が与える影響を、in vivo で解析する為、公汎な組織 での発現が可能な CAG プロモーターとヒト Krtap13 の cDNA の間に lox-polyA-lox 配列を挿入した Trans gene (Tg)を作成した。 この Tg は、Cre の存在下においてのみ recombinant Tg (R-Tg)が生じ、 Krtap13 の発現がなされる。従って、この Tg マウスと組織特異的に Cre を発現する種々の Cre マウ スを交配する事より、Krtap13 を種々の組織で高発現させる事が出来る。Keratin5-Cre マウスとの交 配による皮膚での発現の場合、R-Tgを持つマウスが生まれ、正常に生育した。一方 CAG-Cre マウスとの交配によっては、全く R-Tg を持つマウスは、誕生しなかった。従って、公汎な組織での Krtap13の高発現は、胚死を誘導すると考えられ、現在その詳細を解析している。また albumin-Cre マウスを用いて、肝臓での Krtap13の高発現の効果も解析中である。(柳川) がんウイルス研究部門 細胞制御研究分野

2004年9月に杉田が着任し、学生が着実に成長・自立できる研究指導環境の確立を目標にまさしくゼロから立ち上げてきた研究室は、2011年ようやくその使命を果たし始めた。

まだ海のものとも山のものとも分からなかった研究室の第一期生として、2006年生命科学研究科 修士課程に入学した森田大輔君は、5年の年月を経て、リポペプチドを標的とした新しい免疫経路 を、サルエイズモデルを用いて実証し、学位を取得した。また第二期生として、2007年生命科学研 究科博士後期課程に編入学した小森崇矢君は、モルモット結核モデルを確立するとともに、結核菌 脂質を標的とした新しいタイプの遅延型アレルギー応答を実証し、学位を取得した。ともに、免疫 学の先駆的発見であり、二人の若い研究者の真摯な努力と研究への情熱を心から賞賛したい。二人 は優秀な研究者であるだけでなく豊かな人間性の持ち主であり、彼らがいなければ研究室の発展は なかったであろう。現在森田君は研究室の大黒柱として活躍し、小森君は臨床医を目指して医学部 で学んでいる。

さて、研究室に博士後期課程の学生が居なくなった状況の中で、生命科学研究科 M2 の服部祐季 さんは大車輪の活躍をみせた。小森君が発見した TH1 タイプと遅延型アレルギー応答とは対極をな す TH2 タイプのアレルギー応答を実証し、それを誘起する結核菌脂質を同定した。この応答は結核 菌潜伏感染の鍵となる可能性が高い。M2 進級まもなく論文を発表し、さらに CD1 トランスジェニッ クマウスやサル結核モデルの解析など、研究室の中核プロジェクトにおいて、牽引的役割を果たし た。学振特別研究員 DC1 にも内定し、さらなる成長を期待している。

一方、新しい修士学生三名(石橋理基君、花川奨君、山本侑枝さん)を迎えた。三名ともまだま だ発展途上だが、その分研究者としての伸びしろが大きい点、楽しみである。それぞれ結核慢性感 染の免疫機序の解明、結核休眠菌の新しい実験モデルの確立、がん細胞リポペプチド応答の分子細 胞機構の解明を目指した研究を進めている。教授からの厳しい指摘に対しても、毅然と自己主張で きるようになってきたことは、大きな成長である。

脂質生物学と免疫学を有機的に融合し、結核とエイズをモデルとして「脂質免疫」の全容解明を 目指す研究は、ようやく第一歩を踏み出すことができた。若い研究者の成長を原動力として研究室 が発展してゆける確信めいたものを感じた1年であった。

## Department of Viral Oncology Laboratory of Tumor Biogenesis

今年は、生命科学研究科の修士一回生として大塚冬子、阪口翔太、冬柴宏紀と森川響子の四名、 博士後期課程の一回生として陳建成が入学し、高市剛と濱内珠美は修士課程を修了して、それぞれ エステー(株)と沢井薬品(株)に就職した。当研究室で修士課程→博士後期課程→研究員として 研究を行ってきた黒木俊介がウイルス研の立花准教授のもとで研究を行うこととなり、また、博士 後期課程の単位を取得した伊藤亮は出身地の企業に就職することとなり巣立っていった。また、生 命科学研究科の助教(特命)として研究と学生の指導を行ってきた風間啓敬博士がイーライリリー (株)へ就職し、新たな道へ進んでいった。研究費の経理を初めとする研究室の秘書業務は中橋直 子が執り行い、研究室の円滑な運営が可能となっている。また、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きた髙村綾子が退職し、来年には結婚する予定である。米原は生命科学 研究科の研究科長として3年目となり多忙を極めている。研究室の雰囲気も変わりつつあるが、研 究の発展していくことを期待している。

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。

Fas は自己反応性免疫担当細胞の除去に関与して、自己免疫疾患の発症を阻止すること知られて いたが、Balb/c の遺伝的背景下の Fas KO マウスが非常に高い血中 IgE レベルを伴うアレルギー性 眼瞼炎を発症することを我々は見いだした。福岡あゆみは、この系の解析を兵庫医大の中西憲司研 究室および京都大学生命科学研究科の稲葉カヨ研究室と共同して行い、B 細胞からの IgE 産生を強 く誘導する新しい細胞種を同定し、その機能解析を行っている。そして、森川響子と理学部4回生 の山本那由が新たにこの研究に参加した。

黒木は Fas 誘導アポトーシスに必須である caspase-8 がアポトーシス誘導とは別に RIP キナーゼ が媒介する計画的なネクローシスの誘導阻害 に機能するという国際的に競争の激しい研究領域に おいて、caspase-8 が阻害する新しいネクローシス誘導系を確立し、その分子機構について解析を行 っており、陳建成と阪口翔太がこの研究を基に新たな発展を目指して研究を開始した 。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構築した染田真孝は、caspase-8 の発現抑制を 誘導すると分化誘導に重要な特異的シグナル伝達系が強く増強されるという全く新しい知見を見 いだし研究を発展させている。

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-1α (eEF1A1)の発現低下→caspase に依存しない新しい細胞 死の誘導」という現象を、様々な細胞で誘導する系を確立するために、大塚冬子や末永康裕が研究 を行っている。また、このような死細胞を高感度かつ簡便に蛍光で検出するシステムを立ち上げる ために冬柴宏紀が研究を開始した。

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、松下正浩は FLASH が核内で形成する構造体と Cajal body との関係を明らかにするため、Cajal body の構成因子である coilin と FLASH との発現相関関係 を解析すると同時に、FLASH の機能を阻害する薬剤の探索を行い、着実な成果をあげている。鈴 木輔と前田一樹は、それぞれ FLASH の N 末端領域の機能解析と FLASH が機能する細胞の特異性 に関する研究を行っている。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、その生物学的意義としての転写調節機能について解析を進め ている。

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持つ。B 細胞は抗原 刺激だけを受けると Bim を介したアポトーシスで除去されるが、T 細胞からの CD40 を介するシグ ナルでアポトーシスが抑制されることが知られている。高園園は、CD40 の全刺激を受けた B 細胞 では、CD40 刺激が存在していても抗原刺激で Bim 依存性のアポトーシスが引き起こされることを 発見し、その分子機構を解析すると同時に自己反応性 B 細胞の除去やプラズマ細胞分化との関連を 解析している。

生命科学研究科助教の李慶權は、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、同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、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って いる。生命科学研究科助教(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、横山智子と研究を行っている。

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。最近、ES 細胞集団の中に、未分化性の維持に必須である Nanog 遺 伝子の発現に関し、Nanog 高発現と低発現の2種類の細胞集団が存在すること,更に、これらの細 胞集団の混在が分化能の維持に関与していることを確認した。現在、この分化能の維持に、Wnt シ グナルが関与しているという予備的な結果を踏まえて、その機構について解析している。 ヒトがんウイルス研究分野

### I. First Group

本年は2月に朝長啓造が教授として大阪大学微生物病研究所より着任した。これに伴い、4月に 博士研究員として堀江真行が、そして技術補佐員として嶋田友里恵が参加した。また、大阪大学大 学院より医学研究科特別受け入れ研究学生として大東卓史(D4)、藤野寛(D3)、松本祐介(D3)、 中村祥子(M1)の4名を受け入れた。10月1日には助教として本田知之が東京大学医科学研究所よ り着任した。9月には堀江真行が日本学術振興会海外特別研究員としてドイツ・フライブルグ大学 に留学した。また10月には大東卓史が博士研究員として国立感染症研究所へと転出した。

当研究分野朝長グループでは、マイナス鎖RNAウイルスであるボルナウイルスとインフルエン ザウイルスの研究を中心に行っている。ボルナウイルスでは、病原性ならびに細胞核における持続 感染のメカニズムを明らかにするとともに、我々の研究グループが発見した内在性ボルナウイルス 因子であるEBLNの機能と内在化の意義について解析を行っている。また、ボルナウイルスを用い た新規RNAウイルスベクターの開発を進めている。一方、インフルエンザウイルス研究では、感染 初期における宿主応答を明らかにするための詳細な解析を行っている。

### 1. ボルナウイルスの感染機構と病原性に関する研究

ボルナウイルスは細胞核で持続感染する。これは、RNA ウイルスとしてはきわめて特殊な感染 様式である。我々は、ボルナウイルスがどのようにして細胞核におけるゲノム RNA の持続性を担 保しているのかを明らかにしようとしている。これまでに、宿主染色体の分配機構がこれに関連し ていることがわかってきた。さらに、ウイルスゲノム RNA の転写と宿主のエピジェネティクスと の関連性も示唆されている。ボルナウイルスの持続感染と核内マシナリーとの関連性を解明するこ とは、ウイルス感染現象の多様性を知るだけではなく、ボルナウイルスの病原性の本質を明らかに できると考え研究を進めている。

一方、ボルナウイルスの細胞機能傷害性の解明にも取り組んでいる。特に、ウイルスのリン酸化(P)蛋白質の機能に着目した解析を行っている。これまでに、P蛋白質をグリア細胞で発現させたトランスジェニックマウス(P-Tg)が、発達障害に類似した神経病理学的ならびに行動学的異常が誘導されることを明らかにした。P-Tgはボルナウイルスの病原性を明らかにできるツールとしてだけではなく、発達障害のモデルマウスとしても期待される。

#### 2. 内在性ボルナウイルスの解析

我々は、ヒトをはじめ多くの哺乳動物のゲノムにボルナウイルスの遺伝子断片が内在化してい ることを発見した。また外来性ボルナウイルスのmRNA が宿主のレトロトランスポゾンを利用し て感染細胞のゲノムに組み込まれることを示した。これは、レトロウイルス以外のウイルスが動物 ゲノムに系統的に内在化していることを示した初めての報告であり、RNA ウイルスの進化につい ても大きな示唆を与えるものであった。我々の発見以後、様々なウイルスで脊椎動物ゲノムへの内 在化が明らかとなった。しかしながら、ボルナウイルスの内在化が他のウイルスと異なり特徴的で あった点は、ヒトゲノムに内在化していること、内在化したウイルス遺伝子(Endogenous bornavirus-like nucleoprotein: EBLN)がオープンリーディングフレームを保持していること、mRNA として発現していること、そして蛋白質として宿主因子との相互作用が示唆されてこと であった。 我々は、ボルナウイルスがどのような仕組みで宿主ゲノムに組み込まれるのか、またそれは病原性 と関連するのか、宿主進化との関連性はどうなのか、そしてヒトゲノムに存在する EBLN は何らか の機能を持つのかなど、内在性ボルナウイルスの謎について様々な角度から解析を行っている。

#### 3. ボルナウイルスを用いた新規 RNA ウイルスベクターの開発

上述したように、ボルナウイルスは RNA ウイルスの中で唯一細胞核で持続感染する。この特徴 を利用することで、持続的に蛋白質や低分子 RNA を発現できる全く新しいウイルスベクターの開 発が可能となる。我々はすでに、核内長期発現型のボルナウイルスベクターの作製には成功してお り、現在、国際特許を出願中である。ボルナウイルスは脳神経細胞に強い指向性を持つウイルスで ある。そのため、我々が開発したボルナウイルスベクターは中枢神経系疾患への遺伝子治療に使用 できると期待される。現在は、組換えウイルスの細胞傷害性の低減、回収の効率化、そして標的臓 器・細胞の拡大など応用を目指した研究開発を進めている。

## <u>4. インフルエンザウイルスに関する研究</u>

細胞核で増殖する RNA ウイルスには、ボルナウイルスの他にインフルエンザウイルスがある。 しかしながら、この2種のウイルスでは増殖機構が全く異なっている。インフルエンザウイルスは、 感染後すぐに子孫ウイルスを産生し、爆発的に増殖する。一方、ボルナウイルスは低いレベルの子 孫ウイルス産生を継続させ、非細胞傷害性に持続感染する。その違いの本質は何なのか、また RNA ウイルスによる核内宿主応答のメカニズムはどのようになっているのか、インフルエンザウイルス の増殖機構の解析を通してそれらの謎に迫っている。現在の研究テーマは、インフルエンザウイル ス感染により迅速に誘導される宿主応答の解明 である。これまでに、感染直後から変動を始める miRNA を網羅的に同定し、それらにより制御されている宿主因子を明らかにした。現在、miRNA によって制御されるそれらの因子がどのようにインフルエンザウイルス感染に影響しているのか、 また病原性の誘導にどのような役割を果たしているのかについて詳細な解析を行っている。

### II. Second Group

本年度は、生命科学研究科の赤堀祐一(M1)と堀田祐麻(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、研究補佐員の大庭沙蘭、他の大学院生では、生命科学研 究科の阿部雄一(D2),津川陽司(M2)の2名が在籍しています。

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

### 1. プロスタノイドによる HCV の感染性粒子産生制御

我々は C 型肝炎ウイルス(HCV)の生活環の詳細を明らかにし、その情報をもとに抗 HCV 薬開発 を目指す基礎研究をおこなっている。我々はこれまでに独自に樹立した不死化ヒト肝細胞(HuS-E/2 細胞)を用いて患者由来天然型 HCV の生活環を再現する培養細胞実験系を開発している。この細 胞は通常の平面培養に比べ、立体培養することで効率よく HCV の生活環を再現することが明らか になった。そこで HCV の生活環に関与する細胞側のシステムを明らかにする目的で、平面および 立体培養したHuS-E/2細胞間でマイクロアレイ解析によって遺伝子発現プロファイルを比較するこ とにより、立体培養によって大きく発現が変化する遺伝子の検索をおこない、これら遺伝子発現に よって変化する細胞内シグナル経路を候補として選択した。今回、プロスタグランジン(PG)合成酵 素遺伝子群が立体培養によって大きく発現が変化することを見出した。まず組換え体 HCV 粒子産 生系を用いて PG 合成と HCV の生活環の関連を検討するため、PG 合成反応系であるアラキドン酸 カスケードの初発酵素シクロオキシゲナーゼ(COX)-1 の阻害剤を用いてその組換え体 HCV 粒子産 生系に対する影響を検討した。その結果、COX-1 阻害剤処理は細胞内および培養上清中に産生され る HCV RNA 量には対照群と比較して著しい変化を与えなかったが、培養上清中の組換え体 HCV の感染性を濃度依存的に低下させることがわかった。そこで我々は次に立体培養によって発現が誘 導されるトロンボキサン A2合成酵素(TXAS)遺伝子の産物 TXAS について siRNA による産生阻害や 酵素活性阻害剤を用いて同様の解析をおこなった。その結果、これらの処理によって培養上清中の ウイルス粒子の感染性の低下が認められた。このことから TXAS 活性による TXA 産生が HCV 粒子 の感染性と関連しており、TXAS 阻害剤が抗 HCV 薬剤の候補となることを明らかにした。

<u>2. ヒト肝細胞ではウイルス感染初期にインターフェロン λ3 遺伝子発現が誘導される。</u>

C型肝炎ウイルス(HCV)は様々な段階でI型IFN システムを阻害し細胞への慢性感染を成立させ ると推定されているが、感染したヒト肝細胞においてその細胞の自然免疫機構とどのような相互作 用があるのかについては未だ不明である。そこでまずヒト肝細胞における抗 RNA ウイルス自然免 疫応答機構の解明を目指した。初代培養ヒト肝細胞と HuS-E/2 細胞についてウイルス感染による抗 ウイルス自然免疫関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を RT-PCR 法を用いて解析をおこなった。そ の結果、HuS-E/2 細胞のウイルス感染初期自然免疫応答は初代培養ヒト肝細胞とほぼ同様であるこ とが分かった。そこで HuS-E/2 細胞をヒト肝細胞のモデル細胞として用いて、肝細胞の自然免疫応 答機構の解析をおこなった。特に HCV 感染との関係を解析するため、この HuS-E/2 細胞を用いて、 HCV 感染の検出受容体である RIG-I の発現を低下させた細胞ならびに RIG-I 下流で機能する IPS1 の切断を介してIFNの初期誘導を抑制するHCV NS3/4A タンパク質を恒常的に発現している細胞を 作製した。これらの細胞においてセンダイウイルス感染による自然免疫関連遺伝子発現の変化を解 析した結果、双方の細胞において初代培養肝細胞や HuS-E/2 細胞で認められた IRF7 mRNA の恒常 発現および早期 IFNα1 の発現誘導が同様に認められた。しかし、感染3時間後からの RIG-I、IRF7、 IFNβ、IFNλ3の発現誘導は認められなかった。このことから RIG-I およびその下流のシグナルは肝 細胞の中で IRF7 の恒常発現とは関連がなく、ウイルス感染 3 時間以降の上記遺伝子群の発現誘導 に寄与している可能性が考えられた。またヒト肝細胞ではウイルス感染初期にインターフェロンλ3 遺伝子発現が高く誘導されることが明らかになった。

遺伝子動態調節研究部門 分子遺伝学研究分野

# Department of Genetics and Molecular Biology Laboratory of Molecular Genetics

2011年のメンバーは、藤田尚志(教授)、加藤博己(准教授)、高橋清大(助教)、尾野本浩 司(非常勤職員)、小野口和英(非常勤職員)、山元誠司(ミッション専攻研究員、生存研)、成田 亮(非常勤職員)、呉成旭(生命科学研究科博士課程4年)、影山麻衣子、Yoo Ji-Seung(劉知昇)(生 命科学研究科博士課程3年)、船曳正英(医学研究科博士課程3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2年)、Ng Chen-Seng(呉展昇)(生命 科学研究科博士課程1年)、宮田奈緒、古賀悠里恵(生命科学研究科修士課程2年)、渡邊岳史、Dang Nghiem Vo(生命科学研究科修士課程1年)、Büşra Çoban (トルコ Boğaziçi 大学、8月、交流学生)、 Liu Yinghui(劉迎輝)(復旦大学、9-12月、交流学生)、Steven Fan(University of British Columbia, Canada、 8-10月、インターンシップ)、竹村明澄、森本志保、朝平陽子、平野恵未(技術職員)、森田裕弥(秘 書)であった。

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。

本年度の研究成果のうち原著論文3編について解説する。

1) Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C

Koji Onomoto, Shiho Morimoto, Takahisa Kawaguchi, Hidenori Toyoda, Masami Tanaka, Masahiko Kuroda, Kazuko Uno, Takashi Kumada, Fumihiko Matsuda, Kunitada Shimotohno, Takashi Fujita and Yoshiki Murakami

慢性C型肝炎に対してインターフェロンαとリバビリンの併用療法が行なわれており、ウイルス の消失、完治等の効果が得られている。しかし高価であること、副作用があること、治療抵抗性の 患者がいること等が課題となっている。特に治療抵抗性の患者の予測は重要と考えられる。近年、 IL28B遺伝子の多型がインターフェロン治療抵抗性に強く相関していることが複数の研究室から報 告されたが、その詳細な理由は不明である。この研究では慢性 C型肝炎患者87の治療開始前の肝生 検材料を、インターフェロン関連の237遺伝子を搭載したマイクロアレイを用いて解析した。得ら れた遺伝子発現プロファイルの結果を患者の記録と参照して検討した。5つのインターフェロン誘 導遺伝子すなわちIFI27, IFI 44, ISG15, MX1, OAS1の発現は治療抵抗性の患者において有意に亢進 していた。IL28B遺伝子の治療抵抗性と関連する多型(TGまたはGG型)においても同様の発現パ ターンが得られた。遺伝子発現パターンからの治療効果予測をシミュレーションしたところ、86.1% の確度で予測できることが判明した。治療前のインターフェロン誘導遺伝子発現亢進はインターフ ェロン治療抵抗性と強く相関することが明らかとなった。これによって治療抵抗性を予測すること が可能であると考えられた。

 Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor Ryota Ouda, Koji Onomoto, Kiyohiro Takahasi, Michael R. Edwards, Hiroki Kato, Mitsutoshi Yoneyama and Takashi Fujita

哺乳類細胞ではウイルス感染はパターン認識受容体である Toll-like receptorやRIG-I-like receptor (RLR)によって感知され、その結果、I型インターフェロン遺伝子が活性化される。I型インターフェ ロンは細胞表面上の受容体に作用して多くの抗ウイルス蛋白質を誘導し、その結果ウイルスの増殖 が阻害される。本研究ではウイルス感染やインターフェロン処理によって誘導されるマイクロRNA (miRNA)の抗ウイルス活性への関与について解析した。まず、RLR刺激の結果誘導されるmiRNA をマイクロアレイによって探索した。その結果、複数のmiRNAが誘導されることが判明した。その うちの1つ、miR-23bはウイルス感染あるいはインターフェロン処理によって発現が増加する事が 判明した。miR-23bの標的遺伝子を予測プログラムによって調べたところ、 very low density lipoprotein receptor (VLDLR)およびLDLR-related protein 5 (LRP5)を標的としていることが示唆され、 実際にmiR-23bを細胞に導入した細胞ではVLDLRおよびLRP5の蛋白質レベルでの発現が抑制され ていた。ライノウイルス1B (RV1B)はlow density lipoprotein receptor (LDLR)を感染のための受容体 として利用する事が知られている。miR-23bを導入した細胞ではRV1Bの増殖が特異的に抑制されて いた。また、anti-miRNA-23b を導入すると逆にRV1Bの増殖が促進された。次にVLDLR、LRP5の どちらがRV1Bの増殖抑制に関与しているかを調べる目的でそれぞれに特異的な siRNAによってノ ックダウンを行ったところ、VLDLRのノックダウンによってのみRV1Bの増殖が抑制される事が判 明した。ウイルス受容体を介さないウイルス増殖を検討するために感染性 RV1BのRNAを導入する 事によってウイルス増殖を行わせ、miR-23bの影響を調べたところ、増殖は変化しない事が判明し た。すなわちmiR-23bはウイルス感染やインターフェロン処理の結果発現が増加し、 VLDLRの発現 を減少する事でそれを感染受容体としている RV1Bの侵入を抑制する事が判明した。以上より miR-23bは抗ウイルス応答機構の一つとしてウイルス特異的な防御反応を制御しているものと 考え られた。

3) 55 Amino acid linker between helicase and carboxyl terminal domains of RIG-I functions as a critical repression domain and determines inter-domain conformation

Maiko Kageyama, Kiyohiro Takahasi, Ryo Narita, Reiko Hirai, Mitsutoshi Yoneyama, Hiroki Kato and Takashi Fujita

ウイルス感染が起きると細胞内で増殖するウイルス RNA は DExD/Hbox RNA ヘリカーゼである RIG-Iによって非自己 RNA として認識される。この認識の結果シグナル伝達が誘導され、I型イン ターフェロン遺伝子、一連の抗ウイルス蛋白質をコードする遺伝子群が活性化され、ウイルス増殖 の阻害、獲得免疫応答の誘導がおきる。RIG-IのN末端側に存在する caspase activation and recruitment domain (CARD)はそれを強制発現するだけでインターフェロン遺伝子の活性化が誘導されるが、全 長の RIG-I ではウイルス感染などの刺激が無ければ活性化は起きない。この事は全長の RIG-I では CARD の活性が抑制されている事を示唆している。これまでの研究ではアミノ酸 735-925 の領域が repression domain (RD) として同定されていた。本研究ではさらに詳細な検討を行い、アミノ酸 747-801 が最小の RD である事を突き止めた。このアミノ酸55個からなる領域はヘリカーゼドメ インとC末端側ドメイン(二重鎖 RNAの認識に関与)をつなぐリンカー領域である。リンカー領 域の種間の保存より特に強く保存されているアミノ酸配列2カ所に注目してアラニン置換体を作 製したところ、このアミノ酸置換のみで全長 RIG-I の恒常活性が上昇する事が判明した。野生型の RIG-I は二重鎖 RNA 依存 ATPase 活性を示すが、恒常活性を示すアラニン置換体は ATPase 活性を 示さなかった。この事は ATPase 活性は恐らく立体構造を開く事に強く関与しているが、 CARD が 露出してしまえばその活性はシグナル伝達には必要ではない事を強く示唆している。次にアラニン 置換体が立体構造を実際に変化させているかについて、トリプシン限定分解を行った。野生型 RIG-I は明確な消化抵抗性の断片(CARD とヘリカーゼドメインを含む)を生じたが、アラニン置換体で はそれを経る事なくほぼ完全に消化された。この事は RIG-I は通常閉じた構造を取っておりその形 成にはリンカー領域の構造が重要である事を示している。以上の結果は RIG-I の活性制御における リンカー領域の重要性を明確に示しているものである。

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、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、 平野、加藤)
- 4) RLR と自己免疫疾患の解析(船曳、尾野本、加藤)
- 5) 木酢液の抗ウイルス活性(山元、加藤)
- 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、加藤)
- 8) 抗ウイルス応答におけるミトコンドリアの機能(高松、小野口、加藤)
- 9) 抗ウイルス応答における新規因子の研究(Yoo、成田、加藤)
- 10) 抗ウイルス応答の生細胞での可視化(Ng、成田、Yoo)
- 11) 5' ppp 構造に結合する蛋白質の探索(古賀、成田、加藤)
- 12) 原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析(渡邊、加藤)
- 13) ウイルスヌクレオキャプシドと抗ウイルス応答の解析(呉)

共同研究(敬称略)

- 小池 智((財)東京都医学総合研究所・ウイルス感染プロジェクト)「ピコルナウイルス感染に 応答した自然免疫誘導機構の解析」
- 松宮 朋穂(弘前大学・大学院医学研究科)「宿主細胞内でのウイルスタンパク合成における細胞 内ウイルスセンサー・RIG-Iの役割の解明」
- 竹安邦夫(生命科学研究科)「原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析」
- 藤原敬宏(iCeMS)「抗ウイルス応答の可視化」
- 三森経世(医学研究科)「RLR と自己免疫疾患の解析」
- 井上麻紀(理研バイオリソースセンター)腎炎発症マウスの解析
- 田中靖人(名市大・医学研究科)「IFN λ遺伝子と抗HCV活性の解析」
- 渡辺隆司(生存研)「木酢液の抗ウイルス活性」



遺伝子動態調節研究部門 情報高分子化学研究分野

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。

2011年には、3月に2名が博士取得し、そのうち1名が就職、1名が学振PDに移行した。また、 博士課程大学院生は、2名が単位取得退学後教務補佐員となり、1名が就職、1名が異動した。そ の結果、大野研究室には、教授、秘書、2名の助教、1名の博士研究員、2名の教務補佐員、3名 の博士後期課程大学院生、2名の修士課程大学院生が在籍することとなった。なお、2名の教務補 佐員のうち1名は、9月に博士取得し就職した。

I. RNPの核細胞質間の輸送

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

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

以上のような RNA の選択的分配制御は遺伝子発現に非常に重要であるが不明な点が多い。このような RNA の選別は RNA 上のどのような目印を識別して行われるのか、またその識別を行うタンパク質因子群はどのようなものなのか?本研究は、関連したいくつかのの点に焦点を絞り、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 エレメントの探索

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エレメント)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。2011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2つ同定した。これらの候 補因子のひとつ hnRNP C タンパク質が本当に RNA の長さを図る因子であることを明らかにしつつあ る。次年度に論文発表の予定である。

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 とそれと相互作用するもうひとつの因子が、U snRNA 核外輸送に関与する新規因子であることを明らかにしつつある。この結果は次年度以降に論 文発表する予定である。

#### 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 らに周到な機構によって 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、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 を別途探索した結果、U2AF の他に RNA ヘリカーゼ様因子であり RNA 核外輸送因子でもある UAP56 が mRNA 前駆体の核内保持にも関与することが明らかになり、これらの結果を論文発表した。

#### 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。また、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ことを確認しつつある。さらに、この阻害効果の分子機構を明ら かにしつつあり、これらの結果は次年度以降に論文発表する予定である。

#### 6. 核内構造体の構築原理の解明

真核細胞の核は、多数のドメインや構造体を持つ複雑な細胞小器官である。核内構造体には、リ ボソーム生合成の場である核小体、スプライシング因子などを貯蔵する核スペックル、核スペック ルの近傍にあり複数の RNA 結合タンパク質を含むパラスペックル、小分子 RNA の生合成の場である カハル体、ストレス処理により誘導される核ストレス体などが知られているが、いずれも膜に囲ま れておらず、各構造体に固有の RNA やタンパク質が集積している。これらの核内構造体の構築に RNA と RNA 結合タンパク質が重要な役割を担っている場合も少なくない。これらの核内構造体の構築が どのように起こるのかは明らかでない。構築の共通原理があるのかないのか、あるとすればどのよ うなものか、などを理解したいと考えている。

#### 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。

### 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、CDC48 複合体、プロテアソーム、エキソソーム、Xrn1 などの関与が必要であることも明らかになり、翻訳 の過程でリボソーム粒子の異常と認定された後、40S サブユニットが解離し、異常 60S 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 成分が両末端から 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。これらの結果は次年度に論文発表する予定である。また、25S rRNA の PTC 以外の様々 な変異体や 18S rRNA の変異体を用いて遺伝学的スクリーニングを行っており、リボソーム粒子の 品質管理の全体像を理解しようとしている。 遺伝子動態調節研究部門 遺伝子情報解析研究分野

当グループに技術補佐員として3年間近く勤めていた森下和茂は京都工業繊維大学の4回生となり、そこで卒業研究を行いつつ、引き続きこちらでの実験も継続して行った。

DNA 損傷のバイパス(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。それらの DNA ポリメラーゼは従来 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)と区別するために、Y-ファ ミリーとして分類することを提唱したが、その分類は現在では広く使われている。ヒトでは Y-ファ ミリーの酵素として Polη, Pol<sub>4</sub>, Pol<sub>5</sub>および REV1 の4 種類が存在し、構造的にはそれらとは異な る Polなどが TLS に関わると考えられている。Y-ファミリーに属する Polη, Pol<sub>4</sub>, Pol<sub>5</sub>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、Pol5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、REV3 は Polδ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、 Pol5は 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などに Pol5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。REV1 の場合は基質として dCTP しか利用できず、またその ような酵素活性よりも他の TLS ポリメラーゼと相互作用するという機能の方が細胞内における TLS に重要であると考えられている。

現在では、DNA 損傷箇所での複製型 DNA ポリメラーゼから TLS ポリメラーゼへのスイッチがどの ようにして起こるについての解析が重要になっている。取り分け、それぞれの TLS ポリメラーゼは 異なる種類の DNA 損傷のバイパスに関わるのであれば、個々の NDA 損傷に応じて適切な TLS ポリメ ラーゼが最終的にはリクルートされることが必要になる。しかし、 DNA 損傷の種類は多種多様であ り、進行停止状態に陥った複製フォークからそれぞれの損傷を識別して異なるシグナルを出される とは考えにくい。TLS ポリメラーゼを含む多くの DNA ポリメラーゼと相互作用する PCNA が損傷を受 けた細胞では RAD6-RAD18 複合体によってモノユビキチン化されること、そして Y-ファミリーに属 する四つのDNAポリメラーゼが1~2コピーのユビキチン結合ドメインを持つことが明らかにされ、 進行停止状態に陥った複製フォーク中のモノユビキチン化された PCNA が TLS ポリメラーゼを呼び 込むのであろうと考えられるようになった。しかし、一般的にユビキチン結合ドメインとユビキチ ンの結合はかなり弱く、実際 TLS ポリメラーゼの PCNA 結合モチーフ配列 (PIP-box)と未修飾 PCNA との結合に比べると結合乖離定数では二桁ほどの違いがある。従って、どの TLS ポリメラーゼが損 傷部位にリクルートされやすいかは、PCNA との親和性が第一の要因であると考えられる。もし、リ クルートされた TLS ポリメラーゼが効率良くバイパスできない時には別の TLS ポリメラーゼと取り 替えられ、その際にどの TLS ポリメラーゼとも相互作用する REV1 が重要な役割をしているのだろ うと考えられる。

Pol κは当グループが cDNA をクローニングし、次にその産物が in vitro で DNA ポリメラーゼ活性

を示すことからそのように命名した TLS ポリメラーゼである。 我々のグループと内外の共同研究者 とともに、Polκは in vitro TLS 反応では BPDE-dG の向かい側に相補的な C を挿入してバイパスし、 またその酵素を欠損したマウスの ES 細胞および MEF 細胞はベンゾピレンに対して感受性を示すこ とを報告した。従って、次のステップとして、 BPDE-dG を二本鎖 DNA の特定の位置に持たせて、そ れが Polκや他の TLS Pol を欠損した MEF 細胞でどのようにしてバイパスされるかという実験を行う ことは、長年の念願であった。しかしながら, New York 州立大学の森谷らのグループとの共同研究 によると、そのような実験によっては野性型及び Pol κ 欠損 MEF 細胞において BPDE-dG はほぼ同じよ うな効率でバイパスされ、その向か側にはAが挿入されたものが圧倒的であるという予想外の結果 が得られた。しかしながら、このようなプラスミドを用いた実験が細胞内における染色体上の損傷 のバイパスを忠実に反映したものであるかどうかについては疑問が残る。このような実験において は環状二本鎖 DNA に挿入した BPDE-dG は細胞にトランスフェクトするとすぐに DNA 修復機構、特に ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構によって除去され、損傷を持たない相補鎖を鋳型にした DNA 合 成が起こることが分かった。そこで、相補鎖にはTの代わりにUを数カ所で挿入して、トランスフ ェクションする直前に Uracil N-glycosidase (UNG)酵素で U を取り除き、次にそうして生じた AP サイトの 3'側で DNA 鎖を切断する AP endonuclease によってニックを入れて、BPDE-dGの反対側に ギャップを持たせるという手段を利用せざるを得なくなった。そのために、 MEF 細胞に導入された プラスミド DNA では先ずギャップを埋めるという反応が起こり、その過程で BPDE-dG のバイパスが 起こるという反応を見ていることになる。このようなギャップを埋める際の TLS 反応ではなく、本 来の染色体 DNA 中に複製型 DNA ポリメラーゼが DNA 損傷に遭遇した際の TLS 反応を再現するような 実験系を作ることが重要である。我々のグループはNER反応に重要な Xpa を欠損したマウスと Pol κ を欠損したマウスとを交配させて、Xpaと Polκとの両方を欠損した MEF 細胞を作成していたのでは あるが、残念ながらそのような MEF 細胞のストックは死滅していたので、そのような実験に供する ことはできなかった。

Polnを欠損したヒト色素性乾皮症バリアントの患者は紫外線に当たると皮膚ガンを発症しやすい。 Polnを欠損した MEF は紫外線感受性を示し、Polnノックアウトマウスは紫外線照射により皮膚ガン が生じることが花岡らのグループにより報告されている。 Polkは in vitro では紫外線照射によっ て生じる cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) や(6-4) photoproduct をバイパスすることはできな いが、Polkを欠損した MEF は紫外線感受性を示す。その感受性は Poln欠損 MEF よりも明らかに弱 い。このような in vitro と in vivo の結果の違いは不明であるが、Polkノックアウトマウスが紫 外線照射やその他の処理によってガンが生じるかどうかは依然として興味ある実験である。当グル ープは筆者 (大森)の2012年の3月末での定年退職により消滅するので、こちらで作成した Polk ノックアウトマウスはすでに花岡グループに譲渡してあり、紫外線照射による発ガン実験などがな されることになっている。

最後に、この小さなグループを支えたくれた過去の構成メンバーの全員と共同研究者の方々に対 して心からの感謝の意を表して結びとしたい。 生体応答学研究部門 生体防御研究分野

今年は4月に阿部昌史が生命科学研究科博士課程に進学した。したがって、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、IL-7 レセプター(IL-7R)の免疫系における機能、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-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) 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 TCRγ遺伝子座を サイレンシングする

マウス TCRγ遺伝子座は $\alpha\beta$  T 細胞において転写が抑制されており、TCRγサイレンシングと呼ば 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 Eyと HsA と結合して TCRγ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 Ey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、TCRγ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マウスでも、 $\alpha\beta$  T 細胞において TCRγ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 Eyと HsA への 結合を抑制し、TCRy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)

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

マウス TCRγ遺伝子座は、それぞれ Vγ、Jγ、Cγ遺伝子断片とエンハンサーを持つγ1~γ4 の4つ のクラスターからなる。これまでに、STAT5 が Jγ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、Jγ1 プロモーターの STAT モチーフ変異マウス(Jγ1P-Stat-mut)と Jγ1 プロモー ター欠失マウス (ΔJγ1P) 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 γ1 クラスターの Vγ2 や Vγ5 を発現するγ8 T 細胞が 著しく減少した。また、皮膚上皮内に局在する Vγ3<sup>+</sup> T 細胞も減少した。一方、γ4 クラスターの Vγ1.1<sup>+</sup> 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 γ1 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、 Jγ1 プロモーターへの STAT5 の結合が生体内における Jγ1 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、谷一靖江、梁冰霏、原崇裕、生田宏一) (3) T細胞分化の後期における IL-7R の機能

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 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 a-floxed マウスを作製し、Cre 組換え酵素を胸腺 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>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 IL-7R a<sup>flox/flox</sup> 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。 また、NKT 細胞、制御性 T 細胞の数も減少していた。さらに、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞における Bcl-2 の発現が低下しており、Bcl-2 トランスジーンを発現することで CD8 T 細胞の分化が回復し た。一方、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 が胸腺における CD8 T 細胞、NKT 細胞、制御性 T 細胞の分化に必要なことが明らかとなった。(谷一靖江、阿部昌史、原崇裕、生 田宏一)

(4) 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)

(5)小腸上皮内γδT細胞は胸腺に由来する

小腸上皮内リンパ球(IEL) は $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞からなる。 $\alpha\beta$  IEL の起源については fate mapping の実験から胸腺に由来することが明らかにされているが、 $\gamma\delta$  IEL については詳しいことが 不明である。一方、IL-7 KO マウスで $\gamma\delta$  IEL が完全に欠失することから、 $\gamma\delta$  IEL の分化に IL-7 が 必須であることが報告されている。そこで、我々は胸腺または腸管で特異的に IL-7 を欠損した IL-7 コンディショナル KO マウスを使い、 $\gamma\delta$  IEL の起源を解析した。IL-7-floxed マウスと、胸腺 上皮細胞で Cre を発現する FoxN1-Cre マウス、腸管上皮細胞で Cre を発現する Villin-Cre (Vil-Cre) マウスをそれぞれ交配した。FoxN1-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup>マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞が激減 していた。このマウスの小腸では $\alpha\beta$  IEL が減少傾向を示すもののかなり残っていたが、 $\gamma\delta$  IEL は ごくわずかしか存在しなかった。一方、Vil-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup>マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞 に変化はなかった。このマウスの小腸では $\alpha\beta$  IEL にほとんど変化がなく、また $\gamma\delta$  IEL も 30%程度 減少しているもののかなりの数が残っていた。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生 する IL-7 が γδ IEL の分化に必須であることが明らかとなり、大部分の γδ IEL が胸腺に由来することが示唆された。(設楽宗一郎、梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、谷一靖江、生田宏一)

(6) 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

カルレティキュリン(CRT)は尿路系の組織で発現されている蛋白質である。我々は以前に、 CRT は3つのタイプ、1)通常にスプライスされた正常タイプ 2)正常とは異なったスプライ スによる異常タイプ 3)スプライスされていない全長タイプ、が存在することを見出した。膀 胱癌組織中の CRT を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の全長タイプの CRT が見られた。尿路系癌の早期診断を目的として、酵素抗体法を用いた測 定キットの作成を試みている。今回全長 CRT に反応するモノクローナル抗体を調整し、正常 CRT と反応する2種新規抗体と既存の5種抗体を組み合わせた検出キットの特異性と感度を検討中で ある。(上田正道) 生体応答学研究部門 生体防御研究分野

今年は4月に阿部昌史が生命科学研究科博士課程に進学した。したがって、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、IL-7 レセプター(IL-7R)の免疫系における機能、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-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) 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 TCRγ遺伝子座を サイレンシングする

マウス TCRγ遺伝子座は $\alpha\beta$  T 細胞において転写が抑制されており、TCRγサイレンシングと呼ば 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 Eyと HsA と結合して TCRγ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 Ey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、TCRγ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マウスでも、 $\alpha\beta$  T 細胞において TCRγ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 Eyと HsA への 結合を抑制し、TCRy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)

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

マウス TCRγ遺伝子座は、それぞれ Vγ、Jγ、Cγ遺伝子断片とエンハンサーを持つγ1~γ4 の4つ のクラスターからなる。これまでに、STAT5 が Jγ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、Jγ1 プロモーターの STAT モチーフ変異マウス(Jγ1P-Stat-mut)と Jγ1 プロモー ター欠失マウス (ΔJγ1P) 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 γ1 クラスターの Vγ2 や Vγ5 を発現するγ8 T 細胞が 著しく減少した。また、皮膚上皮内に局在する Vγ3<sup>+</sup> T 細胞も減少した。一方、γ4 クラスターの Vγ1.1<sup>+</sup> 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 γ1 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、 Jγ1 プロモーターへの STAT5 の結合が生体内における Jγ1 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、谷一靖江、梁冰霏、原崇裕、生田宏一) (3) T細胞分化の後期における IL-7R の機能

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 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 a-floxed マウスを作製し、Cre 組換え酵素を胸腺 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>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 IL-7R a<sup>flox/flox</sup> 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。 また、NKT 細胞、制御性 T 細胞の数も減少していた。さらに、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞における Bcl-2 の発現が低下しており、Bcl-2 トランスジーンを発現することで CD8 T 細胞の分化が回復し た。一方、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 が胸腺における CD8 T 細胞、NKT 細胞、制御性 T 細胞の分化に必要なことが明らかとなった。(谷一靖江、阿部昌史、原崇裕、生 田宏一)

(4) 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)

(5)小腸上皮内γδT細胞は胸腺に由来する

小腸上皮内リンパ球(IEL) は $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞からなる。 $\alpha\beta$  IEL の起源については fate mapping の実験から胸腺に由来することが明らかにされているが、 $\gamma\delta$  IEL については詳しいことが 不明である。一方、IL-7 KO マウスで $\gamma\delta$  IEL が完全に欠失することから、 $\gamma\delta$  IEL の分化に IL-7 が 必須であることが報告されている。そこで、我々は胸腺または腸管で特異的に IL-7 を欠損した IL-7 コンディショナル KO マウスを使い、 $\gamma\delta$  IEL の起源を解析した。IL-7-floxed マウスと、胸腺 上皮細胞で Cre を発現する FoxN1-Cre マウス、腸管上皮細胞で Cre を発現する Villin-Cre (Vil-Cre) マウスをそれぞれ交配した。FoxN1-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup> マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞が激減 していた。このマウスの小腸では $\alpha\beta$  IEL が減少傾向を示すもののかなり残っていたが、 $\gamma\delta$  IEL は ごくわずかしか存在しなかった。一方、Vil-Cre IL-7<sup>flox/flox</sup> マウスでは、胸腺の $\alpha\beta$  T 細胞と $\gamma\delta$  T 細胞 に変化はなかった。このマウスの小腸では $\alpha\beta$  IEL にほとんど変化がなく、また $\gamma\delta$  IEL も 30%程度 減少しているもののかなりの数が残っていた。以上の結果から、胸腺上皮細胞が産生 する IL-7 が γδ IEL の分化に必須であることが明らかとなり、大部分の γδ IEL が胸腺に由来することが示唆された。(設楽宗一郎、梁冰霏、原崇裕、我妻慶祐、谷一靖江、生田宏一)

(6) 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

カルレティキュリン(CRT)は尿路系の組織で発現されている蛋白質である。我々は以前に、 CRT は3つのタイプ、1)通常にスプライスされた正常タイプ 2)正常とは異なったスプライ スによる異常タイプ 3)スプライスされていない全長タイプ、が存在することを見出した。膀 胱癌組織中の CRT を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の全長タイプの CRT が見られた。尿路系癌の早期診断を目的として、酵素抗体法を用いた測 定キットの作成を試みている。今回全長 CRT に反応するモノクローナル抗体を調整し、正常 CRT と反応する2種新規抗体と既存の5種抗体を組み合わせた検出キットの特異性と感度を検討中で ある。(上田正道) 生体応答学研究部門 感染防御研究分野

# Department of Biological Responses Laboratory of Infection and Prevention

2011年は吉原栄治研究員が米国ソーク研究所に留学した。現在、感染防御分野では増谷 弘准教授、医学研究科大学院生正木 聡(D4)の他、共同研究者として前田道之、松尾禎之、西條美佐の各博士が参加して研究を行っている。

感染防御分野では、α arrestin ファミリーに属する thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)/Txnip 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。

当研究室で同定した TBP-2 は Txnip とも呼ばれ、α arrestin ファミリーに属する蛋白質であり、多 彩な機能を持つ。これまで、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た。さらに、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-/-欠損により筋肉でのインスリン感受性亢進と膵臓 β 細胞からのグルコース刺激性のインス リン分泌亢進により、高血糖が顕著に改善することを明らかにしており、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る。今年度は、TBP-2 が TGF-βシグナルを制御している ことを明らかにした。また、京都大学医学研究科泌尿器科との共同研究により膀胱癌モデルでは、 癌の悪性度が増えるのに伴って、TBP-2 の発現が減少しており、TBP-2 欠損マウスでは、癌の悪性 度が増加すること示した。TBP-2 の発現が適正に制御されていることが生体の恒常性維持に重要で あると考えられ、現在、肥満、糖尿病、癌に対する対策のため、TBP-2 の詳細な分子機構の解析を 行い、また新たな治療薬開発を目指したアッセイ系の開発を行っている。一方、TBP-2 は免疫・炎 症制御にも重要である。岡山大学医学部小児科との共同研究により、インフルエンザウイルス感染 症における TBP-2 や thioredoxin についての解析を行っている。

# Department of Cell Biology Laboratory of Subcellular Biogenesis

本年は3月に前川桃子さんが助教に着任し、総勢8人になりました。当分野では、細胞分裂軸の 方向を決めるメカニズムと組織構築、細胞運命の決定機構、細胞分裂と代謝の連携、増殖と膜輸送 の関連について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で見られ、組織構築や非 対称分裂、器官形成などで重要な役割を果たしている。我々は、ヒト培養細胞の HeLa 細胞におい て、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。更に、この系を利用してキナーゼ対するゲノムワイドな RNAi スクリーニングを行い、哺乳 類における新規分裂軸制御因子の探索を行った。その結果、Src ファミリーチロシンキナーゼであ る ABL1 を同定した。ノックアウトマウスの解析から、ABL1 は HeLa 細胞だけでなくマウス胎児 の皮膚基底細胞の分裂軸も制御することを見出した。ABL1 は進化的に保存された分裂軸制御因子 である LGN-NuMA 複合体に対して二つの作用を及ぼすことを見出した。一つは LGN の細胞表層へ の局在であり、二つ目は NuMA を直接リン酸化し膜へのアンカリングを保証している。マウス皮 膚基底細胞でも同様の働きを行うことが示された。この結果は、松村が日本細胞生物学会と Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, "Stem Cell Biology" (Sep. 20-24, 2011, New York, USA)でポスター発 表、CDB 国際学会 Exciting Biologies Cellular development, "Biology at the interface" (Sep.29-Oct.1, 2011, Kobe, Japan)で口頭発表、豊島が EMBO Conference "Centrosomes and Spindle Pole Bodies" (October 2-6, 2011, Barcelona, Spain)で口頭発表した。また、スクリーニングでは新規分裂軸制御因子として Cdk ファミリーの一つも同定された。この分子の機能解析について、岩野が日本細胞生物学会と CDB 国際学会でポスター発表した。

(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。解 析の結果、コレステロール代謝産物の一つが分裂期において中心体の制御に重要な役割を果たすこ とを見出した。この結果は、濱崎が日本細胞生物学会と EMBO Conference "Centrosomes and Spindle Pole Bodies" (October 2-6, 2011, Barcelona, Spain)でポスター発表、日本生化学会で口頭発表した。ま
た、コレステロールは細胞分裂軸の制御にも必要であることを見出し、渡辺が日本細胞生物学会でポスター発表した。

(3) 分裂期における膜融合阻害機構

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。 しかし分裂期においては、初期エンドソームは膜融合の阻害や、細胞膜へのリサイクリング経路の 遮断などによりその機能が積極的に抑制されていることが知られている。この分子メカニズムと生 理機能についてはよく分かっていない。我々は分裂期制御因子によって膜融合が阻害されることを 見出し、さらに、このメカニズムはこれまでに報告されている Vps35 を介した抑制機構とは別の新 しい分子機構であることを見出した。この結果は、井川が日本細胞生物学会でポスター発表した。 細胞生物学部門 増殖制御学分野

### Department of Cell Biology Laboratory of Growth Regulation

当研究室には、平成23年2月からZahra Hassaniが、4月から生命科学研究科修士課程1年の平 野響子と西美幸、および理学部4年の前田勇樹が、夏には脳外科から医学研究科博士課程1年の安 藤充重が新たに加わった。また、6月には秘書の玉尾麻衣子が去り、後任に山内沙樹が来た。

影山は、1月は米国・タオス(キーストン・シンポジウム)とニュージーランド・オークランド、
5月は中国・上海、8月はギリシア・アテネ(国際神経化学会)、9月は英国・ウェストサセックス、
10月はギリシアとフランス、12月は米国・デンバー(細胞生物学会)で招待講演を行った。今吉格と坂本雅行は1月に米国・タオスのキーストン・シンポジウムで、さらに坂本雅行は11月に北米神経科学会で発表を行った。その他、教室員の多くが、神経科学会(横浜)や分子生物学会年会(横浜)等の学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生・分化の分子機構を明らかにするというもので、塩基性領 域- ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ因子 (bHLH 因子) に注目して解析を行っている。 bHLH 因子 Hes1 や Hes7 は 2 時間周期の生物時計として機能することがわかっており、その分子機 構や役割についても解析を進めている。また、成体脳では絶えず新たなニューロンが産生されてい るが、その分子機構や意義も探っている。

本年は、以下に記すように、神経分化や体節形成過程の制御機構を明らかにするとともに、成体 脳におけるニューロン新生の意義に関して重要な研究成果をあげることができた(下図)。



図:成体脳ニューロン新生。(左図)マウス頭部の断面。鼻腔内に嗅上皮と鋤鼻器の2種類の嗅覚 器官がある。嗅上皮で感知された匂い情報は主嗅球へ、鋤鼻器で感知された匂い情報は副嗅球へ伝 わる。成体脳新生ニューロンのうち側脳室・上衣下帯で生まれたものは、前側に遊走して主嗅球と 副嗅球に組み込まれる。(右図)ニューロン新生を阻害した母親マウスから産まれた仔の胃の中に は、ほとんど母乳が見られなかった。成体脳ニューロン新生が阻害された母親マウスは、子育てを 放棄していた。

(1)分節時計の遺伝子発現振動にはイントロンによる発現のタイミングの遅れが必須

多くの生命現象において正しいタイミングで遺伝子発現が起こることが必須であるが、その分子 機構はよくわかっていない。遺伝子発現のタイミングを計るのにイントロンが重要な役割を担うこ とが示唆されてきたが、この仮説は実際の遺伝子ではまだ試されていなかった。数理モデルの解析 から、分節時計遺伝子は十分に遅いタイミングでネガティブフィードバックが働くと発現が振動す ると提唱されてきた。このことから、分節時計遺伝子を使って、遺伝子発現のタイミングに果たす イントロンの重要性を探った。分節時計遺伝子 Hes7 の発現は、未分節中胚葉において振動する。 Hes7 遺伝子には3個のイントロンが存在するが、このイントロン・スプライシングによって約 19 分の遅れが生じることがわかった。数理モデルの解析から 19 分早いタイミングでネガティブフィ ードバックが働くと発現が振動しなくなると予想されたので、イントロンを欠損した Hes7 遺伝子 をもつ変異マウスを作製した。その結果、Hes7 の発現は振動しなくなり、定常になった。そのため、 体節が激しく癒合した。これらの結果から、イントロン・スプライシングを介して十分に遅いタイ ミングでネガティブフィードバックが働くことが発現振動に重要であることが示された。 (高嶋良 樹)

(2) 蝸牛有毛細胞・支持細胞の発生における Hes/Hey 遺伝子群の協調的作用

蝸牛有毛細胞・支持細胞は共通の前駆細胞から発生し、その分化は Notch シグナル伝達系の側方 抑制によって制御されていることが報告されている。Notchシグナル伝達系の下流因子である Hes1、 Hes5、Hey1は、発生過程の蝸牛上皮に発現がみられるが、いずれかの遺伝子欠損マウスの感覚上皮 では異常が見られないか弱い異常がみられるのみであり、これらの Hes/Hey 遺伝子群は機能的に重 複していることが示唆される。本研究では蝸牛有毛細胞・支持細胞の発生における Hes/Hey 遺伝子 群の機能を知るために、蝸牛における Hes/Hey 遺伝子群の多重遺伝子欠損マウスを作製し解析を行 なった。その結果、遺伝子の欠損数が多いほど有毛細胞数は過剰であるが、Hes1、Hes5、Hey1のう ち少なくとも一つがヘテロ欠損であれば、過剰な有毛細胞に伴って過剰な支持細胞が生じていた。 このことは、支持細胞になるべき細胞が過剰な有毛細胞に転じたのではなく 、それぞれの Hes/Hey 遺伝子が支持細胞を誘導する機能があることを示唆している。一方、Hes1、Hes5、Hey1の全ての遺 伝子が失われると、有毛細胞数は顕著に増加するが、支持細胞数は正常対照群と変わりなかった。 このことは、過剰な支持細胞の誘導と、支持細胞になるべき細胞の有毛細胞への分化転換が同程度 に起こったことを示唆している。このような細胞数増加は、感覚上皮予定領域の範囲と細胞増殖に 変化が見られなかったために、感覚上皮予定領域の形成後に起こったと考えられる。このように、 Hes/Hey 遺伝子群は協調的に有毛細胞への分化を抑制し、そのいずれかの少なくとも1アレルがあ れば支持細胞を分化させることができ、それはおそらく感覚上皮内の側方抑制によると考えられる。 さらに、Hes/Hey 遺伝子群欠損マウスでは、感覚上皮細胞列と細胞極性は不整となり、有毛細胞数

が増加するにもかかわらず難聴を呈した。これらの結果は、Hes/Hey 遺伝子群は細胞増殖と側方抑 制を制御して適正な有毛細胞・支持細胞数を産み出すために必要であるのみならず、感覚上皮細胞 列・細胞極性の制御により聴覚にも重要であることが示唆された。(楯谷智子)

(3) 成体脳ニューロン新生は先天的にプログラムされた匂い応答に必須

海馬における成体脳新生ニューロンの研究が数多くなされており、学習や記憶など、高次脳機能 との関わりが証明されている。ところが嗅球に組み込まれる新生ニューロンの生理的意義について はよくわかっていない。嗅覚機能における成体脳ニューロン新生の生理的意義について明らかにす るために、ニューロン新生を阻害した遺伝子改変マウス(Nestin-CreERT2;NSE-stop-DTA)の解析 をおこなった。ニューロン新生を阻害しても、単純な匂いの嗅ぎ分けには異常は見られなかった。 ところが、野生型マウスもニューロン新生を阻害したマウスも、天敵臭であるキツネの臭いに対し て忌避反応を示したが、天敵臭と報酬の関連学習をおこなった際、野生型マウスは天敵臭に対して 忌避反応を示し、報酬に近づかないのに対し、ニューロン新生を阻害したマウスは天敵臭に対して 忌避反応を示さず報酬に近づいた。さらに、成体脳ニューロン新生を阻害したオスマウスでは攻撃 行動や交尾行動、メスマウスでは妊娠の継続や子育てなど、嗅覚依存的な性特異的行動に異常が見 られた。以上の結果より、成体脳ニューロン新生は、天敵臭に対する応答や性特異的行動など、先 天的にプログラムされた匂い応答に必須であることが明らかとなった。(坂本雅行)

(4) Notch シグナルと Fgf シグナルの異なる発現振動が体節形成の時空間的周期性を制御

体節形成は、Notch シグナルのような振動遺伝子や Fgf8 のようなモルフォゲンによって形成さ れるウェーブフロントによって制御される。しかし、振動遺伝子とモルフォゲンのウェーブフロ ントがどのように統合されているのか、その詳細については不明である。我々は、 Notch シグナ ルと Fgf シグナルの機能分子の発現がどちらも振動するが、その動態が異なることを見出した。 Notch シグナルの機能分子の発現振動によって一群の細胞が同期化し、 Fgf シグナルの機能分子 の発現振動によって一斉に分化抑制が解除された。これらの結果から、 Notch シグナル分子の発 現振動によって次に体節になる領域が決定され、 Fgf シグナル分子の発現振動によって体節形成 のタイミングが制御されることが明らかになった。(丹羽康貴)

(5) 神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリングと神経分化制御因子の同定

哺乳動物の脳の発生過程において、神経幹細胞は神経上皮細胞から放射状グリアへと形態を変化 させ、生後及び成体脳においてはアストロサイト様の形態を取り幹細胞としてとどまる。大脳皮質 形成期において、神経上皮細胞はまず対称分裂により幹細胞プールを殖やし、その後ニューロン分 化が始まると、放射状グリアが自己複製を伴う非対称分裂により、皮質深層ニューロン及び皮質浅 層ニューロンを順次産生する。その後グリア細胞の産生がニューロン産生に取って代わるが、一部 の神経幹細胞は幹細胞としての性質を維持したまま生後及び成体脳に潜在する。こうして神経幹細 胞は形態を変化させながら、増殖能及び多様な神経系細胞への分化能を経時的に変化させている。 こうした胎生期神経幹細胞の経時的性質変化を解明するため、異なる胎生期における pHes1-d2EGFP トランスジェニックマウスの終脳背外側部から GFP 陽性細胞を回収し、遺伝子発現プロファイリン グを行った。脳室周囲帯の細胞において発生過程を通じて発現変動が認められた数十種類の転写因 子の中で、いくつかの転写因子が強制発現により神経分化抑制活性を示した。更に Tcf3 及び K1f15 のノックダウンにより皮質発生期の神経幹細胞のニューロンへの分化が促進され、 K1f15 をノック ダウンした細胞から形成された neurosphere の大部分はニューロンへの分化能を喪失しグリア細胞 への分化能のみを保持していた。これらの結果から、Tcf3 及び K1f15 はそれぞれ皮質発生期の早期 及び後期において神経幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。 (大塚俊之)

#### 2011年4月撮影



信号伝達学

2011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、技術補佐員の正玄裕子さん、そして私の総勢6 名でスタートした。4月には医学研究科大学院博士課程に下出紗弓さんが入学し、また霊長類モデ ル研究領域から小林剛助教が加わった。8月1日には佐藤君が京都大学霊長類研究所の助教として 転出した。9月には仲屋君が修業年限を半年間短縮して博士(医学)の学位を取得し、ポスドクと なった。

ウイルス研究所本館の耐震補強工事に伴い、2010年6月から再生医科学研究所(京都大学病院南 西病棟)に仮住まいしていたが、2011年2月にウイルス研究所本館5階のもとの場所に引っ越した。

2011年は研究室の論文(すなわち宮沢が責任著者の論文)として、英文原著論文12報を発表す ることができた。また他研究機関との共同研究で3報発表した。3月には大学院生の仲屋君と吉川 君が日本獣医学会大会長賞を受賞した。例年は獣医学会学術集会での口頭発表(プレナリーセッシ ョン)により、大会長賞受賞者10名から4名が日本獣医学会奨励賞として選ばれるのであるが、3 月11日の東北地方太平洋沖地震の影響で、東京農工大学で開催される第151回日本獣医学会学術 集会が開催中止となり、奨励賞の選考は行われなかった。獣医学奨励賞の受賞を目標に頑張ってき ただけに少々残念であった。しかし仲屋君は、9月にオーストラリアのケアンズで開催された World Congress on Reproductive Biology において、ウシ内在性レトロウイルスの研究により2011 Centre for Reproduction and Genomics Student Poster Award を受賞した。また吉川君は、2012年3月 に開催される第153回日本獣医学会大会長賞の受賞が内定した。2011年はRD-114ウイルスを研究 対象として受賞したが、今回はサルレトロウイルス4型を研究対象としての連続受賞である。2012 年はより質の高い論文を世に出すことを誓いたい。

我々の 2011 年の研究テーマは以下の通りである。1) ウシ胎盤形成時に発現するウシ内在性レ トロウイルスの機能解析、2) 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、3) 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、4) 霊長類研究所で発 生したニホンザル血小板減少症の病因解明、5) 慢性疲労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、6) 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。

#### 1) ウシ内在性レトロウイルス K の胎盤形成過程における意義

内在性レトロウイルス(ERV)は祖先の生殖細胞に感染した外来性レトロウイルスに由来する配 列である。多くの ERV は変異や欠失によりそのコーディング配列を失っているが、一部の ERV のそ れは完全なまま保存され、タンパク産生能を有している。ヒトやマウスはERV 由来のタンパクを生存のために利用していることが知られているが、ウシをはじめとする偶蹄類においては未解明な点が多い。近年、我々は完全長のエンベロープ遺伝子(*env*)が保存された BERV-K1 および BERV-K2 という2種類のウシ ERV を同定し、特に BERV-K1 *env* の胎盤における発現レベルが非常に高いことを見出した(Baba *et al.*, *J. Virol.* (2011))。レトロウイルスのエンベロープタンパク(Env) は膜融合能を有しており、発現細胞は細胞融合能を示すことが知られている。ウシ胎盤には二核細胞(BNC)と三核細胞(TNC)が存在し、BNC が子宮内膜細胞と融合したものが TNC であると考えられている。我々は、BERV-K1 ならびに BERV-K2 の Env が TNC の形成に関わっているのではないか、という仮説を立てて実験を行った。

ウシ胎盤において in situ ハイブリダイゼーションを行ったところ、以前の結果と同様に、 BERV-K2 envの発現は確認できなかったが、BERV-K1 envの栄養膜細胞特異的な発現が確認できた。 さらに、抗 BERV-K1 Env 抗体を用いた免疫組織化学を行ったところ、 BERV-K1 Env が BNC 特異的に 発現していることが明らかとなった。両 Env を COS-7 細胞に強制発現させ、ウシ子宮内膜細胞への 融合活性を測定したところ、BERV-K1 Env のみが高い活性を示した。ゲノムデータベースを検索し たところ、BERV-K1 はウシ FAT2 のイントロン 18 に挿入されていることが明らかとなった。 FAT2 は カドヘリンスーパーファミリー遺伝子で、多くの動物で保存されている。そこで、様々なウシ科動 物における BERV-K1 の有無を調べるために、ホルスタイン (B. taurus)、バリ牛 (B. javanicus)、 スイギュウ (B. bubalis)、ヒツジ (O. aries)、ヤギ (C. hircus) のゲノム DNA を抽出し、FAT2 のエ キソン 18 と 19 を挟む PCR を行ったところ、B. taurus、B. javanicus、B. bubalis が BERV-K1 を有し ていたのに対し、*0. aries と C. hircus* には見られなかった。3 種すべての BERV-K1 は完全長のコー ディング配列として envのみを有しており、それらすべての Env はウシ子宮内膜細胞に対して高い 融合活性を示した。このことは、 B. bubalis の胎盤においても TNC が見られること、 O. aries と C. hircus ではそれとは異なる形態をとることと一致する。また、BERV-K1の挿入時期は、少なくと も B. taurus と B. bubalis が分枝する前、すなわち約 1400 万年以前であると推測される。さらに解 析を進めたところ、RT-PCR によってウシ FAT2の発現は胎盤に限られていることが明らかとなった。 このことから、BERV-K1 は、胎盤で特異的に発現する FAT2 遺伝子座に組込まれた結果、胎盤特異的 な発現機構を獲得したのではないかと考えられる。

以上のことから、BERV-K1 が TNC の形成に関わっていることが強く示唆された。

#### 2) 感染性ネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス)のイヌへの感受性

レトロウイルスはその伝播方式によって外来性レトロウイルスと内在性レトロウイルス (ERV) に分けられる。外来性レトロウイルスはウイルス粒子を介して個体から個体へ水平伝播するが、ERV は太古の昔に蔓延した外来性レトロウイルスが生殖細胞に感染し宿主に定着したレトロウイルス であり、宿主のゲノムとして親から子へと垂直伝播する。多くの ERV は変異や欠失によってその感染性を失っているが、一部の ERV は感染性を保有している。そのような感染性を有した ERV は新たな種に感染し、病気を引き起こす可能性がある。実際、ギボンザルに白血病を引きこすギボン白血病ウイルスはげっ歯類の ERV 由来とされている。

すべてのネコ属は感染性の ERV 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 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 ウイルスが迷入する危険があると考えられてきた。 以前、我々はいくつかのネコ及びイヌ用弱毒生ワクチン中に感染性の RD-114 ウイルスが混入して いることを報告した(Miyazawa et al., J. Virol. (2010); Yoshikawa et al., Biologicals (2011))。 今回、我々は RD-114 ウイルスがイヌ株化細胞及び初代培養細胞に効率よく感染し、増殖すること を明らかにした。また、RD-114 ウイルスがイヌ由来の細胞に感染する際の受容体が中性アミノ酸ト ランスポーターである ASCT1 及び ASCT2 であることを同定した。さらに、イヌの ASCT2 はアカゲザ ルなどに免疫不全を引き起こすサルレトロウイルス 2 型(SRV-2)の機能的な受容体であり、RD-114 ウイルスと SRV-2 の免疫抑制部位が まったく同じアミノ酸配列 であることを明らかにした (Yoshikawa et al., J. Gen. Virol. (in press))。これらのことから、イヌにおいて RD-114 ウイ ルスが感染し増殖した場合、免疫不全等の疾病を引き起こす可能性があると考えられる。今後は、 イヌ個体に RD-114 ウイルスを実験感染し、標的組織やウイルスの増殖性を明らかにする必要があ ると考えられた。

## <u>3) ブタ内在性レトロウイルスサブグループ B のエンベロープ表面タンパクに対する中和抗体の作</u> 製とエピトープ探索

ブタからヒトへの異種間臓器移植は、臓器提供者の不足を解消するための最も有効な手段の一つ である。しかしながら、すべてのブタがブタ内在性レトロウイルス(PERV)をゲノム中に有し、そ のうち PERV サブグループA(PERV-A)およびB(PERV-B)がヒトの細胞へ感染する可能性があるた め、異種間臓器移植は停滞を余儀なくされている。本研究では PERV-Bのエンベロープ(Env)表面 タンパク(SU)に対するモノクローナル抗体(KRT1)を作製し、中和活性の有無とそのエピトープ 探索を行った。KRT1の特異性を確かめるため、バキュロウイルスを用いて発現させた PERV-A およ び PERV-B SUを用いてイムノブロットを行ったところ、KRT1は PERV-B SUのみを認識することが明 らかとなった。さらに、KRT1の PERV-B に対する中和能を確かめるため、PERV-B Env を有する LacZ シュードタイプウイルスを用いた中和試験を行ったところ、KRT1によってその感染価は有意に低下 した。PERV-B SUの連続断片化ペプチドを用いた ELISAにより KRT1のエピトープマッピングを行っ たところ、KRT1のエピトープは PERV-B SUのプロリンリッチドメインに特異的なアミノ酸配列、 ALEPPHNLPVPであることが明らかになった。以上より、KRT1は異種間臓器移植に伴う PERV-B の感

#### <u>4) コアラレトロウイルス (KoRV)の解析</u>

哺乳類のゲノム中には過去に感染したレトロウイルス由来の配列が痕跡として存在しており、こ れらは内在性レトロウイルス(ERV)と呼ばれる。ERVの中には現在も蛋白として発現するものがあ り、一部の ERV 由来蛋白は宿主の生存や生殖に有利に働いている。 コアラレトロウイルス (KoRV) は宿主ゲノムへの内在化が進行中のユニークなウイルスで、レトロウイルスの内在化機序と宿主に 与える影響について解析するモデルになると考えられる。本研究室ではこれまでに、日本の動物園 で飼育されているコアラの KoRV 感染状況を調査し、感染が広がっている状況を報告してきた。そ のなかで、KoRV には感染性 KoRV と非感染性 KoRV が存在することが判明した。そこで、両方の KoRV をクローニングし、ウイルス学的な解析を行うことで、レトロウイルスの内在化機序と宿主に与え る影響を詳細に調べることにした。感染状況調査とウイルス分離試験の結果から感染性 KoRV 保有 個体を絞り込み、その個体のゲノムから PCR を用いて遺伝子配列上 intact な KoRV をクローニング し、その感染性を感染実験によって評価した。感染実験は、クローニングした KoRV をトランスフ ェクションにより HEK293T 細胞に導入・作製したウイルスを使用し、増殖させた。ウイルス力価は、 LacZ 遺伝子が組み込まれた HEK293T 細胞に増殖したウイルス液を添加しシュードウイルスを作製 し、そのシュードウイルスの感染価を測定する LacZ marker rescue assay で評価した。その結果、 KoRV はウイルス添加時からゆっくりと増殖し、約 20 日かけて増殖はプラトーに達する事がわかっ た。その際のウイルス力価は 10<sup>6</sup> FFU / ml 程度と野生型と同程度の高い値を示した。一方、非感染 性 KoRV も同様の方法で絞り込み、クローニングした。その配列を詳細に解析した結果、gag 遺伝子 と pol 遺伝子の途中でそれぞれフレームシフトが起こっており、それに伴う終止コドンの挿入が見 られた。さらにサザンブロッティングによる解析から、この非感染性 KoRV は他臓器で検出され、 それらはすべて同じ挿入部位であることが分かった。また、この個体と親子関係のある個体で同様 の結果が得られ、親子関係のない個体では挿入部位が異なっていた事から、非感染性 KoRV は最近 内在化が完了したことが判明した。今後は、得られた感染性 KoRV と非感染性 KoRV の関係性を詳細 に調べ、レトロウイルスの内在化機序と宿主に与える影響をさらに解析していく予定である。

#### <u>5)新規ヒトガンマレトロウイルス(XMRV)を検出するフォーカスアッセイの開発</u>

前立腺癌と慢性疲労症候群において XMRV の感染が関与している可能性が 議論されている。我々は、 XMRV がネコ由来 S+L・細胞である QN10S 細胞に効率よく感染し、フォーカスを誘導することを見い だした。この現象を利用して、感染性の XMRV を高感度かつ簡便に定量するフォーカスアッセイを確 立した。このアッセイは XMRV の定量のみならず、ウイルス分離試験にも利用できると考えられ る。 今後、前立腺癌患者や抗 XMRV 抗体陽性者からのウイルス分離を試みる予定である。

# Center for Human Retrovirus Research Laboratory of Viral Pathogenesis

平成 23 年 3 月に山元誠司が生命科学研究科博士課程を修了・学位を取得し、ウイルス研究所分 子遺伝学分野の研究員として、小林朋子が医学研究科博士課程を修了・学位を取得し、動物衛生研 究所の研究員として、渡部匡史が医学研究科博士課程を修了し、4 月より新潟市民病院薬剤師とし てそれぞれ就職した。4 月より医学研究科修士課程に河西菜摘が入学した。医学部マイコースプロ グラムとして岡本清二(医学部4回生)が研究に参加した。

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

生体にウイルスが感染して病原性を発揮する過程において、生体そのものにはこれら外来病原体 の感染を抑止する分子群が備わっていることが近年の免疫不全ウイルス1型(HIV-1)研究からわか ってきた。このウイルス抑止に関わる宿主因子の探索研究を行っている。そのひとつの例として、 サル免疫不全ウイルス(SIV)やHIV-2のアクセサリ蛋白質である VPX を HIV-1の感染前に骨髄系細 胞に導入すると SAMHD1 分子がユビキチンプロテアソーム依存性に破壊され、HIV-1 感染が増加 することが、今年に報告された。一方、この SAMHD1 は自然免疫機構にも関与することが知られ ている。例えば、Aicardi-Goutieres Syndrome (AGS)という遺伝性脳組織障害疾患では、samhd1の遺 伝子変異の結果、サイトカインの異常産生が誘導されることが知られている。この疾患では、細胞 内 DNA の排除不全が考えられている。これら両者の機能に関わるのは、5'nucleotidase あるいは phosphodiesterase 活性が重要であると考えられている。この酵素活性は、HD ドメインが担っており、 その活性はメタルイオン依存性である。我々は、この SAMHD1 の組換え蛋白質を合成し、その酵 素学的解析を行った。その結果、その基質としては、1,2ならびに3リン酸ヌクレオチドがなり、 さらにこの酵素の基質特異性は deoxyGTP に親和性が高いという報告と異なる結果を得た。本研究 により、ウイルス感染の抑止メカニズムの多様性が明らかにされ、これをもとにした治療戦略の確 (投稿準備中)。(Peter Gee、蝦名博貴、佐藤佳、三沢尚子、金村優香、河西菜 立が期待される。 摘、小柳義夫)

#### <u>2. HIV-1 病原性の解析</u>

HIV 増殖による感染拡大メカニズムの解明のために、ヒト CD34 陽性造血幹細胞移植ヒト化マウス (NOG-hCD34) を使ってウイルス感染個体内におけるアクササリ遺伝子 Vpu の要求性を解析した。Vpu 欠損ウイルスでは感染後 7 日以内の血漿ウイルス RNA 陽性率が野生株のそれに比して明

らかに低下していた。また、Vpuを有する HIV-1 では、 p24 陽性のウイルス感染細胞表面上の CD4 とともに BST2 の発現が低下していた。それに比べて、 Vpu 欠損ウイルスでは、その発現低下は減弱化していた。これらの結果から、感染個体内では急性期において Vpu 依存的に CD4 と BST2 の発現抑制が起き、効率的なウイルスの細胞外への放出が引き起こされ、これらが急性期における効率的なウイルス感染の成立に寄与することがわかった(論文投稿中)。(佐藤佳、三沢尚子、小柳義夫)本研究は、伊藤守博士(実中研)との共同研究である。

#### <u>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</u>

レトロウイルスは逆転写酵素により産出された cDNAを、自己のintegrase (IN) により染色体へ組 込むライフサイクルを具える細胞寄生体である。一方、細胞内には放射線などにより染色体 DNAが 破損時に、それをすみやかに修復するシステムが具わっており、パピローマウイルスや HBVを含む 核内DNAの染色体への組込み反応にも介在することは知られている。これまでに我々は、 INが介在 しないHIV cDNAの組込み機序の存在を示唆する結果を得た。 IN活性欠損変異ウイルスは、野生株ウ イルスの 0.1-0.2%の頻度で細胞染色体に組込まれた。そして、この IN非依存性組込みは、 Raltegravirのような臨床応用されている IN阻害剤の存在下における 野生株ウイルス感染でも確認 された。また、培養細胞にDNA損傷刺激を誘導により IN非依存性組込みの効率が最大10倍増加し たことから、IN非依存性組込みは細胞の DNA修復機構を介した組込み反応である事が示唆された。 さらに、複製可能な野生株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、 IN阻害剤除去後は明らかに効率的な感染 性ウイルス粒子の複製が観察された。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、そのプロウイルス保持細胞は ウイルス産生細胞となる危険性が示唆された(論文投稿中)。(蝦名博貴、鈴木康嗣、金村優香、小 柳義夫)

#### 4. 神経細胞の APOBEC1 はそのediting活性 によりHSV-1 脳炎において抗ウイルス作用を発揮する

APOBEC1(A1)は脂質代謝において重要な役割を担う apoB100 の mRNA の特定部位を小腸細胞で editing する cytidine deaminase であり、生理活性制御分子である。ところで、最近、単純ヘルペスウ イルスである HSV-1 脳炎ラットモデルにおいて、A1 がウイルス感染脳神経細胞に発現誘導され、 脳炎進行に抑制的に働いている可能性を示唆する結果を得た。そして、A1 発現細胞では deaminase 依存的に感染性ウイルス数は優位に低下すること、この作用はその特異的 shRNA の導入により解 除されること、さらに HSV-1 DNA の G→A あるいは C→T 塩基置換により non-synonymous 変異が 有意に起きていた。そして、その後の実験により A1 は HSV-1 DNA を標的にすることがわかった。 これは、HSV-1 感受性を規定する内因性分子が、神経細胞に発現誘導されることを示す結果である ともに、細胞性因子である cytidine deaminase の抗ウイルス作用をヘルペスウイルスにおいてはじめ て報告する例である (J. Virol., 85:9726-9736, 2011)。その後の解析からその抑制の作用点は、下図の ように初期転写と DNA 複製過程の2点とわかっている(Peter Gee, 蝦名博貴、金村優香、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。



<u>1. マウスモデルを用いた HTLV-1 bZIP factor (HBZ) による病原性発現機構の解析</u>

HTLV-1 はヒトで病原性が証明された最初のレトロウイルスである。HTLV-1 は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-1 関連脊髄症等の炎症性疾患を引き起こす。また HTLV-1 感染者は、しばしば細胞性免疫不全を合併する。HTLV-1の pX 領域には、tax、rex、p30、p12、p13、 HBZなどの調節遺伝子や修飾遺伝子がコードされている。その中で tax と HBZは HTLV-I の病原性に 重要な役割を果たしていると考えられている。Tax の発現が ATL 細胞において高率に抑制されてい る一方で、HBZ は全ての ATL 細胞で発現していることから、HBZ が ATL の発がん過程に必須の分子 であると示唆される。 我々は CD4 陽性 T 細胞に特異的に HBZ を発現するトランスジェニックマウス (HBZ-Tg)を作製し、その形質を解析中である。HBZ-Tg は皮膚炎や肺胞炎等の炎症性疾患、および T 細胞性リンパ腫を高頻度に発症することが判明し、その腫瘍細胞は制御性 T 細胞(regulatory T-cells: Tregs)のマスタージーンである foxp3を発現することが判明した。興味深いことに HBZ-Tg 由来の Treg はその制御性機能が障害されており、HBZ は機能的に異常な Treg の数を増やすことで 腫瘍や炎症性疾患を誘導している可能性が示唆される。また、HBZ が Th1 サイトカインの産生を抑 制することにより、HBZ-Tg に細胞性免疫不全を惹起することを見出した。HBZ-Tg に認められるこ れらの表現型、すなわち T 細胞性リンパ腫や炎症性疾患の発症、免疫不全の合併は HTLV-1 キャリ アの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を示して いる。

#### 2. HBZ の分子機能の解析と ATL 発がん機序における意義の検討

HBZ と Tax は ATL の発がんに重要な役割を果たしていると考えられる。これまでの解析で HBZ と Tax は様々なシグナル経路で拮抗する活性を有することが明らかとなってきた。 Tax は NF- $\kappa$ B 経路 を強力に活性化するが、HBZ は p65 の活性を阻害することにより NF- $\kappa$ B の古典的経路を特異的に抑制する。また、Tax は Smad 蛋白を標的として TGF- $\beta$ のシグナル経路を抑制することが知られていた が、HBZ は Smad2/3 および p300 と複合体を形成し、*Foxp3*等の TGF- $\beta$ 反応性遺伝子の転写を活性化 する。一方で HBZ は Foxp3 蛋白および NFAT と複合体を形成し、Foxp3 の転写活性を抑制することも 判明した。これらの所見は HBZ-Tg において細胞抑制機能が減弱した Treg が増加している分子機序 と考えられる。また、我々は HBZ が宿主 bZIP 蛋白である activating transcription factor 3 (ATF3) と結合することで、ATF3 による p53 の活性化を阻害することも見出し、アポトーシスに抵抗性に働く可能性も示唆された。 これまでの解析結果から、HBZ が Tax と共に宿主細胞のシグナル経路を複 雑に攪乱し、最終的に発がんに導くと考えられる。これら以外にも HBZ と結合する宿主因子を複数 同定しており、発がんにおける意義について解析中である。

3. 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。一

部のウイルスはある特定の領域を組み込み部位として強く好むことが知られている。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 ヒト細胞、及び NBS1 ノックアウトマウス由来の MEF 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 見出した。NBS1 欠損ヒト 細胞では、活性化しているプロモーター付近に局在するヒストン修飾である H3K4me3 や H3K9ac、 H3K36ac 周辺への組み込み効率の低下も認められ、逆にヘテロクロマチン領域に多く認められる 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示された。 以上のことから、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。

#### 4. HIV-1 融合阻害薬に対する新規耐性化機序の解明

現在臨床で使用されている HIV-1 膜融合阻害薬である T-20 (Enfuvirtide) は、HIV-1 と標的細胞 間の膜融合反応を妨げることで優れた抗 HIV-1 活性を示す。しかしながら、長期使用による T-20 耐性ウイルスの出現は効果的な治療を妨げる大きな要因である。我々はこれまでに、SC34 や SC34EK といった T-20 耐性 HIV-1 にも効果を示す次世代融合阻害薬の開発を行い、また耐性化機構の解析 を行ってきた。その結果、SC34 や SC34EK は、gp41 コード領域に多数の変異を誘導し、それらの蓄 積が耐性化に寄与していること明らかにした。興味深いことに、SC34EK により誘導された変異の約 半数は、gp41 の C 末端側に位置する cytoplasmic tail (CT) 領域に集中していた。この領域は HIV-1 の感染・複製に重要な役割を果たしていることが知られているが、これまでに融合阻害薬によりこ の領域に変異が誘導された報告はなく、耐性への具体的な機序は不明である。そこで、申請者は、 この領域内の変異が膜融合阻害薬感受性に与える影響を解析した結果、 CT 内の変異のみで、T-20 に約 3 倍の耐性を付与することや、gp41 heptad repeat の変異を組み込むことで、SC34EK に約 3 倍の耐性を付与すること、CT 内の変異は、エンベロープタンパクの機能不全を引き起こすこと、な どの知見を得ている。以上の結果から、CT 変異は膜融合反応を含めた HIV 細胞侵入過程に影響を及 ぼすことで、膜融合阻害薬の耐性に関与し ていることが示唆された。

#### 5. 低分子化合物を基盤とした抗 HIV 化合療法剤の開発

現在臨床で使用されている抗 HIV 薬は、複雑な化学構造を有する化合物が多く、比較的高価な製造原価や投与方法の制限など、改善しなければならない点が多数存在する。そこで、我々は本学薬学研究科などと共同で、新規な低分子抗 HIV 薬の開発を目的として、これまでに行った数万種類以上に及ぶ低分子化合物のスクリーニングから、抗 HIV 活性を有する数種類の新規化合物を同定した。これらの中には、既存の抗 HIV-1 薬が標的とする、吸着・融合反応、逆転写反応、インテグラーゼ反応以外を阻害していると考えられる化合物も含まれる。現在、同定された化合物を出発材料とした高活性誘導体の作製・評価、抗ウイルススペクトラム解析、および作用機序の同定を進めている。

感染症モデル研究センター ゲノム改変マウス研究領域

2011年、当研究室では新たなメンバーとして4月1日より教務補佐員として登倉美紀世さん、4 月15日よりポスドクとして加藤雅紀さん、9月1日より教務補助員として黒木俊介さんを迎えた。 一方、3月末で技術補佐員の秋灝さんが退職した。さらに、4月より(独)理化学研究所基幹研究 所に眞貝細胞記憶研究室が設立され、9月末を持って教務補佐員の福田幹子さんと大学院生の村松 大輔君が基幹研に移動した。結果、研究室はスタッフ3名、大学院生4名、ポスドク1名、教務補 佐員3名、事務補佐員1名の12名の構成となった(2011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、Jmid1a、Jmid1b 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(Inagaki et al., 2009)。Jmjd1a-KO マウスはメン デルの法則に従って生まれ、大人のマウスになることも可能であった。Jmidlaのホモローグである Jmjd1b も H3K9 の脱メチル化を触媒可能である。Jmjd1a と Jmjd1b は、RNA でもタンパク質のレベ 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、両分子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。Jmjd1b-KO マウスを樹立してその致死性を解析した結果、 出生することできることが分かった。次に、 Jmjd1a 及び Jmjd1b の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。さらに遡って解析した結果、 mjd1a/b-DKO 胚は受精後 7.5 日よりも前に死 滅していることが分かった。以上の結果から、Jmjd1aとbの機能は重複しており、その機能は発生 に必須であることを示した。

より詳細に Jmjd1a,b の機能を調べるため、4-ハイドロキシタモキシフェン(OHT)存在下で Jmjd1a,b が欠損するような ES 細胞を樹立した。この細胞を OHT 存在下で培養した結果、細胞は増 殖しなくなった。Propidium iodide(PI)染色の結果、PI 陽性細胞が *Jmjd1a,b* 両欠損細胞で大幅に増加 していたことから、この細胞の増殖低下の原因は細胞死の誘導が原因と考えられた。対照的に、 *Jmjd1a* もしくは *Jmjd1b* の単独欠損では細胞死は誘導されなかった。さらに、 *Jmjd1a,b* 両欠損細胞 ではジメチル H3K9 の大幅な増加が認められた。また、細胞死と同様に、 *Jmjd1a* もしくは *Jmjd1b* の単独欠損ではジメチル H3K9 の増加は微々たるものであった。以上の結果は Jmjd1a と Jmjd1b の 機能の重複をさらに裏付けた(立花、黒木、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、そしてその結果遺伝的多様性を獲得するために必須 の過程と言える。哺乳類では未分化性腺おいて 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。性決定とその後の性の維持にエピジェネティック因子がどのように関わっているの かいまだに不明である。そのため、「哺乳類の性分化過程におけるエピゲノム変化を明らかする」 ことを目標とした研究を進めている。まずは性分化に必須の機能を有する生殖腺体細胞の精製系を 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) マウスを樹立した。LNGFR の発現には、生殖腺体細胞特異的遺伝子 Ad4BP/Sf1 のプ ロモーターを用いた。予想通り、得られた TG マウスでは LNGFR は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。現在この TG マウスを使って、E11.5 未分化性腺から性腺体細胞を精製し、そのエピゲノム解析と遺伝子発現 の解析を行っている(立花)

3. 内在性レトロウイルス抑制因子 ESET の DNA 修復/ゲノム安定性における機能解析

哺乳動物のゲノムの約40%はレトロトランスポゾンを由来としており、~10%は内在性レトロウ イルスである。これらのレトロ因子はゲノム上を転移することによって遺伝子変異を引き起こし、 癌を含む様々な疾患の要因となることが明らかになってきており、細胞内ではその転移活性を抑制 することが重要であると考えられている。最近、マウス胚性幹(ES)細胞において、内在性レトロ ウイルスの抑制にヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)のメチル化酵素、ESET が必用であるこ とが示された。

マウス ES 細胞で *Eset* を条件的にノックアウトした場合、細胞増殖速度が顕著に低下する。この 増殖低下のメカニズムを明らかにする為にまず細胞周期を解析したところ、*Eset* 欠損細胞では G1/S 期および G2/M 期で遅延が見られた。また、一部の細胞においてアポトーシスが引き起こされてい た。そこで p53 蛋白質の発現レベルを調べたところ、欠損細胞では 3~4 倍に上昇していた。さら に、DNA 損傷マーカーである gamma-H2AX の量や、微小核などの異常な核構造を持つ細胞の割合 が増加していた。以上のことから、マウス ES 細胞において ESET はゲノムの安定性に重要な役割 を果たすことが強く示唆される。

以前より、レトロトランスポゾンの一つである Line-1 は DNA 損傷を誘発することが知られていた。そこで Eset 欠損細胞における Line-1 の発現レベルを解析したところ、明らかな再活性化が認められた。そのため、Eset の欠損によって引き起こされるゲノム不安定化の一因として Line-1 の脱抑制が考えられる。興味深いことに、野生型細胞で自然発生している DNA 損傷部位のほとんどには DNA 修復因子である 53BP1 がリクルートされていたが、Eset 欠損細胞ではその割合が低下していた。このことから、別の可能性として、欠損細胞 では自然発生した DNA 損傷が効率的に修復されずに蓄積することによってゲノムの不安定化を引き起こすことが考えられる。 53BP1 は、ヒストン H4 の 20 番目のリジン (H4K20) のジメチル化を認識することにより DNA 損傷部位への結合を促進することが報告されている。そのため、エピジェネティックな観点も含めて、現在 ESET がどのように 53BP1 のリクルートに関与しているかについて解析を進めている (坪田、眞貝)。

附属感染症モデル研究センターExperimental Research Center for Infectious Diseases霊長類モデル研究領域Laboratory of Primate Model

2011年3月に日向亮輔、藤田泰久、仲宗根咲子が本学人間・環境学研究科修士課程を、大附寛幸 が本学医学研究科医科学専攻修士課程を修了した。藤田泰久は、アストラゼネカ株式会社に就職し た。4月には、日向亮輔、仲宗根咲子が本学人間・環境学研究科博士課程に、大附寛幸、加藤文博 が本学医学研究科医科学専攻博士課程に入学した。

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。2011年の研究の進 展は、以下のとおりである。

#### 1. SIV 感染サル体内で N-ミリスチン酸化 Nef タンパクを監視する T細胞が存在する

病原ウイルスは、宿主細胞に存在する細胞機構を利用しなければ複製出来ない。HIV および SIV は宿主が持つ N-myristoyl-transferase およびその基質である myristoyl-CoA を借りて C<sub>14</sub>飽和脂 肪酸(ミリスチン酸)をウイルスタンパク Nef の N 末端のグリシン残基に結合する。 N-myristoylation と呼ばれるこの生化学反応により Nef は形質膜への指向性を獲得し、このタンパ クの機能として提唱されている免疫抑制活性を発揮する。本研究で、宿主免疫機構は N-ミリスチン 酸化 Nef を感知する細胞傷害性 T 細胞を備えている事を明らかにした。N-ミリスチン酸化 Nef ペプ チドは認識するが、非修飾ペプチドは認識しないアカゲザル由来 CD8 陽性 T 細胞株を樹立した。更 に、末梢血中の N-ミリスチン酸化 Nef ペプチド特異的 T 細胞が SIV 感染によって増加する事が観察 された。以上の結果より、N-ミリスチン酸化ウイルスペプチドは新しいクラスの CTL 標的抗原とし て同定された。

#### 2. SIV 攻撃接種後に起こるワクチン抗原特異的細胞傷害性 T細胞反応の優勢な誘導

細胞傷害性 T 細胞(CTL)反応は HIV および SIV の制御に極めて重要である。有望視されているエ イズワクチン戦略には、ウイルス曝露後に実際の HIV-1 感染と比較してより効果的な CTL 反応を惹 起出来る CTL メモリーの誘導が挙げられる。我々は以前に CTL 誘導型ワクチンを作製し、ワクチン 免疫サルの一部が SIV 複製を制御した事を報告した。これらワクチン接種により SIV を制御した個 体は、専ら攻撃接種直後の急性期にワクチン抗原特異的な CTL 反応を起こした。今回我々は、この ワクチン免疫群においてウイルス 複製を制御しなかった個体の攻撃接種後 CTL 反応を解析した。非 免疫群で、90-088-Ij のクラス I 主要組織適合性抗原を持つ個体は SIV 攻撃接種後に専ら非 Gag 抗 原特異的 CTL 反応を起こした。一方、同一の主要組織適合性抗原を持ち、感染防御ワクチンにより Gag 特異的 CTL メモリーが誘導された個体は、感染急性期に優勢な Gag 特異的 CTL 反応によって SIV 複製を制御しなかった。この事はワクチン抗原特異的な CTL 反応が、非制御個体においても攻撃接 種後に優勢に誘導される事を示唆している。更に解析を進めた結果、感染防御ワクチンの接種によ り、ウイルス攻撃接種後にワクチン抗原特異的な CTL 反応が優勢に起こる事、しかし、 SIV に対す る非ワクチン抗原特異的な CTL 反応は遅延する事が示唆された。これらの結果は、ウイルス曝露後 に起こる CTL 免疫優性に関して感染防御ワクチン接種が有意な影響を及ぼす事を示唆しており、 CTL 誘導型エイズワクチンの開発における抗原のデザインの手がかりとなる。

#### 3. ファージディスプレイ法による SIV 感染サルからの強力な中和単クローン抗体の分離

本来、液性免疫反応はウイルス感染を強力に抑制、または阻止しうる 宿主機構である。しかし、 液性免疫による HIV-1 感染の制御においては、ウイルスの遺伝的多様性および抗体媒介性のウイル ス感染性中和に対する抵抗性が深刻な障害となっている。本研究で我々は SIV 感染によって誘導さ れる抗体の性状解析を目的として、ファージディスプレイ法を用いて1 頭の SIV 感染サルから単ク ローン抗体を分離した。免疫グロブリン遺伝子の可変域をアカゲザル特異的プライマーにより増幅 し、pComb3X ファージミドにクローン化し、Fab 分節を発現させた。この中から SIV タンパクに対 する抗体を、SIV タンパクを固相化した 96 穴培養プレートを用いたバイオパンニング法により選択 した。総計 20 の Fab クローンが得られたが、その内の 14 クローンは gp41、4 クローンは gp120、2 クローンは p27 に対するものであった。抗 gp120 Fab クローンは cn b クローンを産生したサルが 感染していた中和抗体感受性 SIVsmH635FC および遺伝的に離れた SIVmac316 を完全に中和し、中和 抗体抵抗性の SIVsmE543-3 に対して少なくとも 50%のウイルス感染性中和効果を示した。競合 ELISA により、これら抗 gp120 抗体は V3 ループを含む gp120 上の同一の抗原決定基を認識する事が明ら かとなった。本研究で同定された強力な中和活性を持つ抗体は、広範な中和活性を持つ抗体を誘導 するための機構の解明の手がかりとなる。

#### 4. 非ヒト霊長類エイズモデルで見られた組換えを介した共受容体利用能の変化による病原性の増大

新たに感染した CCR5 指向性 HIV-1 株における env 遺伝子の進化はウイルスの共受容体利用能の 転換を進める機構として非常に良く受け入れられている。しかし、感染者の中には共受容体利用能 の転換が共に感染したものの迅速に制御された CXCR4 指向性ウイルスの再興の結果として起こりう る例もある。後者の可能性をアカゲザルに CXCR4 指向性および CCR5 指向性 SHIV を共接種し、各々 のウイルスに特異的なプライマーペアを用いてウイルス複製の状態を追跡して研究した。感染サル の1頭では、感染 12 週後までに両ウイルスとも強力に複製が抑制されたが、接種51週後に血中 ウイルス量が急増し、それに伴って血中総 CD4 陽性 T 細胞の枯渇と臨床的病態が発現した。血漿中 ウイルス RNA の PCR 解析により、ウイルスゲノム間組換えによって CXCR4 指向性ウイルス由来の V3 領域を含む env 遺伝子分節がもう一方の CCR5 ウイルスゲノムの相当部位と組換えられ、新規の複 製能、血清学的性状および病原性を持つ CXCR4 指向性ウイルスが生み出された事が明らかとなった。 これらの結果から、生体内でのレトロウイルス組換え現象は機能的に重要な意味を持ち、組換え元 ウイルスの一方が血中にウイルス粒子として検出されない様な状況でも起こりうる事を示唆して いる。

#### 5. ビルマ産アカゲザルの SIV 初感染期におけるクラス I 主要組織適合性抗原拘束性細胞傷害性 T 細胞応答

クラス I 主要組織適合性抗原拘束性 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)反応は HIV および SIV 複製 の制御において非常に重要である。中でも Gag 特異的 CTL 反応は HIV/SIV の複製抑制圧力を及ぼす 事が知られている。加えて、最近、 Vif 特異的 CTL 頻度と試験管内における抗 SIV 効果の関連も示 唆されている。宿主のクラス I 遺伝子型が、これらの強力な CTL 反応の免疫優性パターンに影響を 与える事が考えられる。本研究で各々異なるクラス I ハプロタイプを持つ 3 群のビルマ産アカゲザ ルの SIVmac239 初感染期における Gag および Vif 特異的 CTL 反応を解析した。90-010-Ie ハプロタ イプを持つ第1 群 (4 頭) では Gag 特異的、Vif 特異的 CTL 反応のどちらも観察されなかった。こ れに対して、89-075-Iw ハプロタイプを持つ第2 群 (2 頭) および 91-010-Is ハプロタイプを持つ 第3 群 (2 頭) では Gag 特異的、Vif 特異的 CTL 反応の両方が観察された。感染防御ワクチンが、 潜在的にウイルス曝露後の CTL 免疫優性に影響を与える事を考慮すると、これら 3 群のサルは SIV 感染に対するワクチン抗原特異的 CTL の効果を評価する上で有用と考えられる。 1) EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症モデル動物の確立

Epsterin-Barrウイルス(EBV)は、ヒトに宿主を限定するガンマヘルペスウイルスであり、世界 中の成人の90%が感染していると言われている。通常、小児期におけるEBV初感染は基本的に無症 候であり、病原性を発現することはほとんどない。一方、思春期後のEBV初感染は、リンパ球増加 症および末梢血CD8陽性T細胞の異常活性化・増殖を主徴とする伝染性単核球症(infectious mononucleosis; IM)に特徴づけられるが、基本的にIMは自然治癒するself-limitingな疾患である。し かしながら、このウイルスは稀に、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、ホジキン病などの重篤 な疾患と深く関連することが知られている。さらに、EBVの感染によって引き起こされる致死性疾 患のひとつとして、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis; EBV-HLH)が挙げられる。

EBVはヒト特異的に感染するウイルスであり、マウスをはじめとした実験モデルに頻用される小 動物はEBVに非感受性である。そのため、ヒトを特異的に宿主とするウイルスの感染実験動物モデ ルの構築はきわめて困難であった。EBVやヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのヒト特異的病原体 の感染に起因する病態を再現するために、我々はこれまで、ヒト造血幹細胞移植によりヒト造血能 を賦与したマウス"ヒト化マウス(humanized mouse) "を作製し、実験系を確立し、その解析を行っ てきた。ヒト化マウスは、移植された造血幹細胞からさまざまなヒト白血球が分化し、ヒト生体内 とほぼ同等の造血環境を1年以上維持することができる。ヒト化マウス実験系を用いることにより、 これまで、EBV感染によるB細胞腫のマウスモデルが確立・報告されている。しかしながら、 EBV-HLHの病態を再現するモデルはいまだに報告されていなかった。

我々は、ヒト化マウスモデルを用いることにより、EBV-HLHの小動物モデルの作成に成功した。 本モデルでは、(1) 肝脾腫大;(2) CD8陽性T細胞の増殖・活性化と組織への浸潤;(3) 高IFN-γ血症;(4) 正球性正色素性貧血;(5) 血小板減少症;(6) 組織球の増殖・活性化;(7) 骨髄、脾臓、肝臓における 活発な血球貪食像、の7点に代表される、EBV-HLH患者で見られる特徴をすべて再現することがで きた。本モデルは、これまで有効な治療法のなかった EBV-HLHの病態進行を抑制するための新規 薬剤の評価系に役立つことが期待される。さらには、これまで不明であった EBV-HLH発症の詳細 な分子メカニズムの解明にも繋がると考えられる。

(佐藤佳、三沢尚子、小柳義夫)

2)大腸菌細胞表層の品質管理に関わるプロテアーゼホモログの機能解析 選択的透過性を備えた透過障壁としての外膜の機能を維持するために、グラム陰性細菌には外膜 構成因子の状態をモニターしてストレスに応答する品質管理機構が備わっている。熱ショックなど 種々のストレスによって外膜タンパク質のミスフォールディングが誘発されると、そのシグナルが 細胞質に伝達されて  $\sigma^{E}$ が活性化され、様々なストレス応答遺伝子の転写が誘導される。これまで に  $\sigma^{E}$ によって発現制御を受ける遺伝子は多数同定されているが、個々 の遺伝子産物の機能につい ては明らかになっていない点も多い。 $\sigma^{E}$ ストレス応答の生理的役割を理解するために、我々は大腸 菌において  $\sigma^{E}$ によって転写が誘導される遺伝子の中からペリプラズムのメタロプロテアーゼをコ ードすると推定される yfgC に注目し、機能解析を行っている。yfgC 遺伝子の欠失株では、界面活 性剤や抗生物質に対する感受性が増すほか、リポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD のフォ ールディングに異常が見られた。これらの表現型は、LptD のアッセンブリーに関わるリポタンパ ク質 LptE を過剰発現すると抑制された。さらに、yfgC 遺伝子の欠失は外膜タンパク質の輸送に関 わるペリプラズムシャペロンや、膜挿入因子をコードする遺伝子の変異と組み合わせることで合成 表現型を示した。これらの結果から、YfgC は外膜タンパク質の正常なアセンブリーや品質管理に 働くことで、外膜の機能維持に寄与していると考えられる。

(成田新一郎、秋山芳展<sup>1</sup>)(<sup>1</sup>がんウイルス研究部門)

#### Reproductive engineering team

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

2009 年	75 系統	20,337 個
2010年	101 系統	18,620 個
2011 年	117 系統	25,130 個

#### 2) 外部機関からのマウス導入

	凍結胚	生体
2009 年	7系統	2系統
2010年	4 系統	6系統
2011 年	1 系統	3 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
2009年	97	33, 821	190(0.6%)
2010年	90	32, 857	124(0.3%)
2011 年	81	29,031	227(0.8%)

#### 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
2009 年	52	4, 587	242 (5.3%)
2010年	106	7,106	394(5.5%)
2011 年	107	5,848	324 (5.5%)

ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム

#### Computer Network of Institute for Virus Research

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。

今年度は昨年度より問題となっていた受信サーバの過負荷を解消すべく、受信サーバーのリプレ イスを行った。今後順次認証送信サーバー、メーリングリストサーバー等を更新してゆく。また、 スムーズな研究活動を支援するため、セミナー室などのWEB予約システムを構築し、事務及び研 究グループごとにオンライン予約できるようにした。このようなWEB上で提供する所内サービス に加えて、複数の部屋に分散している共同利用実験・測定機器をひとつのサブネットとし、データ を集約できるNASを設置した。共同利用機器の解析用パソコンは、不特定ユーザーの使用・アン チウイルスソフトと専用ソフトの競合など、これまで非常に管理が難しかったが、今後はアンチウ イルス機能をもったNASの利用によりトラブルが激減する事が期待される。

ハードウェアの管理やOS・ソフトウエ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、全ユーザーの情報リテ ラシーの向上が望まれる。

なお、研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は今年度から次世代シーケンサーのデータ解析を 行っている。ヒト及びマウスのディープ・シークエンスデータを用いて RNA-Seq 及び ChIP-Seq に よる網羅的解析を行い、エピジェネティックな転写制御の研究等に関わっている。

# 平成23年度外部資金獲得状況

#### 科学研究書補助会 .

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	2011年度交付金額	補助金総額	研究課題名	採択年度
		厚労省科研費	酒井 博幸	4,000	8, 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
		特定領域研究	秋山 芳展	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 凄	基盤研究(B)	森博幸	4, 300	14, 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
	伝子	萌芽研究	森博幸	1,600	3,000	SRP経路を介した膜局在化による熱ショック転写因子シグマ32の分解機構	平成23年度
		基盤研究(C)	酒井 博幸	2,000	4,000	新規抗ウイルス剤開発を目指したHPV過形成誘導機構の解明	平成23年度
		基盤研究(C)	柳川 伸一	1,170	3, 260	新規LRP6結合蛋白質Krtap13によるWnt経路活性化の生理的意義の解明	平成22年度
		厚労省科研費 地球規模保 健課題推進研究事業	杉田 昌彦	350	350	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23年度
が		厚労省科研費 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, 300	6,900	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23年度
んウィ		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
イルス	細胞	特定領域研究	杉田 昌彦	4, 900	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
研究部	御	挑戦的萌芽研究	杉田 昌彦	1,900	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
門		基盤研究(C)	松永 勇	1,700	4, 100	環境常在マイコバクテリアによるTh2バイアス誘導の分子機構	平成23年度
		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
		特別研究員奨励費	川上 慶	700	1, 400	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22年度
	発 が ん ん	基盤研究(B)	米原 伸	4, 500	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
		厚労省科研費(脇田班)	土方 誠	4,000	7, 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
	е ト	厚労省科研費(松浦班)	土方 誠	2, 500	5, 500	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
	がん	厚労省科研費(茶山班)	土方 誠	2,000	2,000	創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制 御に関する研究	平成23年度
		厚労省科研費(HS脇田班)	土方 誠	1,500	3, 500	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
	分 子 造	基盤研究(A)	藤田 尚志	23, 700	38, 100	ウイルスによるRNAファクトリーの形成誘導と自然免疫応答	平成23年度
	伝学	厚労省科研費(肝炎)	藤田 尚志	4,000	12, 000	ウイルス肝炎感染における自然免疫の解析と新たな治療標的の探索に関する研究	平成23年度
遺		新学術領域研究	大野 睦人	27, 300	115, 960	核と細胞質間のRNA分配制御	平成20年度
公子動		新学術領域研究	大野 睦人	650	2, 730	RNAプログラム研究の総合的推進	平成20年度
態調節	情 報	新学術領域研究	北畠 真	4, 550	16, 440	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
研究	高 分 子	若手研究(B)	谷口 一郎	2, 210	3, 900	HIV-1のRevタンパク質によるウイルスRNA核外輸送複合体のリモデリング	平成23年度
門	, 化 学	特別研究員奨励費	坂田 知子	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
		特別研究員奨励費	藤井 耕太郎	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22年度
		特別研究員奨励費	竹岩 俊彦	700	1, 300	高等真核生物におけるmRNA前駆体の核内保持機構の解明	平成23年度
生体	生体	基盤研究(C)	生田 宏一	1,430	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
応答	御学	若手研究(B)	谷一 靖江	1, 170	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
字研究	感染	新学術領域研究(公募研 究)	増谷 弘	2,600	5, 200	アルファアレスチンによる絶食応答・脂肪蓄積制御	平成23年度
部 門	(5) 御 学	基盤研究(B)	増谷 弘	400	400	チオレドキシン及び補体阻害ペプチドを基盤とした糖尿病に対する次世代細胞療法の創成	平成23 年度
	形構 成造 学	若手研究(B)	松村繁	2,100	3, 300	皮膚形成におけるCa2+制御とc-Ab1による分裂軸の配向制御	平成23年度
細胞		基盤研究(A)	影山 龍一郎	10, 500	36, 400	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
生物	⊢	新学術領域研究	影山 龍一郎	15, 500	89, 400	幹細胞多樣性形成機構	平成22年度
子研究	殖制	新学術領域研究 分担者用	影山 龍一郎	200	200	神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築	平成22年度
部門	御学	基盤研究(C)	大塚 俊之	1,600	4,000	脳形態形成時における層特異性・領域特異性制御機構の解明	平成23年度
		若手研究(A)	小林 妙子	6, 300	19, 700	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	挑戦的萌芽研究	松田 孝彦	1,000	1,000	機能的神経回路を同定するための新技術の開発	平成23年度
細胞	殖 制 御	特別研究員奨励費	楯谷 智子	800	2, 700	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
生物	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
子研究	信	基盤研究(B)	宮沢 孝幸	4, 810	15, 210	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
部門	号伝達	挑戦的萌芽研究	宮沢 孝幸	1, 170	2, 170	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
	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
		基盤研究(B)	小柳 義夫	4, 550	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
	ワイル	挑戦的萌芽研究	小柳 義夫	1,170	3, 640	抗HIV新規restriction factor の検索	平成23年度
	ス 病 能	若手研究(B)	蝦名博貴	1,820	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
		特別研究員奨励費	ジー ピーター	700	1,400	HIV感染に対するDNAセンサー分子の役割	平成23年度
		厚労省科研費(第3次対が ん総合戦略研究事業)	松岡 雅雄	10, 440	34, 000	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群へのアプローチ	平成21年度
е ト		厚労省科研費(創薬基盤 推進研究事業)	松岡 雅雄	13, 000	36, 400	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
ト ロ		厚労省科研費(エイズ対 策研究事業)	松岡雅雄	4,000	4,000	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
ワイルス		厚労省科研費(がん臨床 研究事業)	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の確立およびそのHTLV-1抑制 メカニズムの解明に関する研究	平成22年度
研究施	ウイル	厚労省科研費(第3次対が ん総合戦略研究事業)	安永 純一朗	3, 500	3, 500	ヒトATL及びHBZトランスジェニックATL発症マウスを用いた比較ゲノム解析によ るATL発症機構の解析	平成23年度
設	ス 制 御	基盤研究(B)	松岡雅雄	4, 100	5, 330	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
		新学術領域研究	松岡雅雄	20, 300	20, 300	感染・炎症が加速する発がんスパイラルとその遮断に向けた制がんベクトル変換	平成22年度
		新学術領域研究	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
		基盤研究(C)	安永 純一朗	4,000	5, 200	HTLV-1発がん機序における脱ユビキチン化酵素USP20・USP33の役割	平成23年度
		研究活動スタート支援	志村 和也	1, 300	1,690	新たなHIV融合阻害薬耐性化メカニズムの解明と臨床的意義の検討	平成23年度
		特別研究員奨励費	趙鉄軍	900	900	ヒトT細胞白血病ウイルス1型による発がん機構の解明と標的治療法開発	平成22年度
	ゲノム	特定領域研究	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
	改変マ	基盤研究(B)	眞貝 洋一	7,100	15, 900	ヒト内在性レトロウイルス発現制御機構の解明	平成23年度
	ウス	若手研究(A)	坪田 智明	1,800	3, 500	DNA損傷修復におけるユークロマチン領域のクロマチン制御機構の解析	平成23年度
咸		厚労省科研費(創薬基盤推 進研究事業)	五十嵐 樹彦	6, 500	28,000	HIV-1エンベローブ蛋白(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
染症		厚生労働科研費 政策創 薬総合研究事業	五十嵐 樹彦	2,000	22, 000	増殖型ベクターrBCGとワクシニアm8Δ免疫の霊長類における評価	平成21年度
デル		基盤研究(B)	五十嵐 樹彦	8, 320	17, 720	HIV感染症の病態形成におけるマクロファージの意義の解明	平成23年度
研 究 セ	霊長	特定領域研究	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
ンター	類 モ デ	挑戦的萌芽研究	五十嵐 樹彦	600	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22年度
	î.	挑戦的萌芽研究	三浦 智行	2, 210	3, 770	相同組換え現象を利用した簡便で有用な新規組換えウイルス作成システムの確立	平成23年度
		基盤研究(B)	三浦 智行	4,940	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
		厚労省科研費 エイズ対策 研究事業・森一泰	三浦 智行	1,000	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
		基盤研究(C)	小林 剛	1,600	1,820	デング熱・出血熱における次世代ワクチン開発戦略	平成23年度
新	興ウイルス	若手研究(B)	成田 新一郎	1, 300	3, 900	細菌リポ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
研	究センター	若手研究(B)	佐藤 佳	2, 730	4, 420	HIV-1感染急性期におけるVprと制御性T細胞の機能解析	平成23年度
マウス	作製支援チーム	挑戦的萌芽研究	宮地 均	200	4, 500	繊維芽細胞から造血幹細胞へのリプログラミング技法	平成23年度
	 合 計	74 件	45 名	318, 820	974, 560		

2. 受託研	究費					単位:千円
部門名	分野・領域名	機関名	J	氏名	研究課題	2011年度研究費
がんウイルス	生体発がん	科学技術振興機構(A-STEP探索タ イプ)	米原(	申	がん細胞特異的に細胞周期進行を阻害するが ん分子標的治療薬の探索	1,950
研究部門	ヒトがんウイルス	日本学術振興会 最先端・次世 代研究開発支援プログラム	朝長 ஈ	啓造	低分子RNA治療を実現するための新規RNAウイ ルスベクタープラットフォームの創製	58, 630
	構造形成学	日本学術振興会 最先端・次世 代研究開発支援プログラム	豊島	文子	細胞分裂軸の新たな制御機構の解析と皮膚の 形成・恒常性維持における役割	55, 320
		科学技術振興機構	影山 育	龍一郎	短周期遺伝子発現リズムの動作原理	50,000
		科学技術振興機構	影山 育	龍一郎	成体脳の神経幹細胞	3, 500
増殖制御学       細胞生物学       研究部門       信号伝達学	増殖制御学	科学技術振興機構	松田 🦻	孝彦	成体網膜におけるニューロン新生・新規回路 形成の可視化と制御	12, 600
		科学技術振興機構	今吉 柞	洛	成体脳ニューロン新生の機能的意義	14,000
		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, 300
	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究	300
		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	小林 岡	到	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	23, 973
ヒトレトロ	ウイルス病態	科学技術振興機構	小柳 義	扶	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-	2,600
ウイルス 研究施設	ウイルス制御	日本学術振興会(二国間交流事 業共同研究)	松岡 羽	唯雄	ヒトT細胞白血病ウイルス1型の新規ウイルス 抗原に対する免疫応答解析とワクチン開発	2, 500
		新エネルギー 産業技術総合開発 機構	眞貝 洋	-	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	4, 500
感染症モデル	ゲノム改変マウス	新エネルギー 産業技術総合開発 機構	眞貝 洋		ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発/ヒト 幹細胞の実用化に向けた評価基盤技術の開発	24,000
研究センター		日本学術振興会 最先端・次世 代研究開発支援プログラム	立花 言	诚	哺乳類の性特異的なエピゲノム構造とその維 持機構の解明	60, 840
	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—	4,000
新興ウイバ	レス研究センター	武田科学振興財団	成田 新	<del>一</del> 郎	細菌表層タンパク質の品質管理に関わる新規 ペリプラズムプロテアーゼの解析	3,000
	計	17 件	14	1 名		326, 013

### 民間との共同研究

3. 民間と	の共同研究				単位:千円
部門名	分野・領域名	機関名	氏名	研究課題	研究費
遺伝子動態調 節研究部門	八寸連仁兴	三菱レイヨン	藤田 尚志	自然免疫関連遺伝子アレイの開発	0
遺伝子動態調 節研究部門	分于退伍子	Biolegend, Inc.	藤田 尚志	RNAウイルスセンサー蛋白分子に対するモノク ローナル抗体の開発	0
	計	2 件	1 名		0

### 4. 奨学寄付金の受け入れ

計	72, 700, 000
株式会社 ヤクルト	
株式会社 医学生物学研究所	
公益財団法人 住友財団	
財団法人 コスメトロジー研究振興財団	
財団法人 清水免疫学振興財団	
公益財団法人 財団法人 倉田記念日立科学技術財団	
財団法人 発酵研究所	
公益財団法人 第一三共生命科学研究新興財団	
財団法人 藤原記念財団	
公益財団法人 内藤記念科学振興財団	
公益財団法人 武田科学振興財団	

単位:円

■構 成 員	Į					
所 長			松	畄	雅	雄
副 所 長			小	柳	義	夫
	協	議		3		
ウイルフログロに対ける	(社)		<u></u>	۲ ГГ		伷
ウイルス研究所教授	(DT)		不影	が	韹	→印
ウイルス研究所教授			叔	田	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	_
ウイルス研究所教授			眞	貝	洋	
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	一嵐	樹	彦
ウイルス研究所教授			豊	島	文	子
ウイルス研究所教授			朝	長	啓	造
	研	究	音	羽		
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	Щ	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	Ш	伸	<b>—</b>
細胞制御研究分	野					
教 授・京大医博			杉	田	昌	彦
准教 授・大阪市大阪	宝博		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	爭			
教 授(併)・京大	理博		米	原		伸
助 教・京大理博			村	上		昭
ヒトがんウイル	ス研	空人	之戰			
と 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1	~	/⊔/	朝	昏	啓	诰
准 教 授・信士医博			+	大方	ΥLI	誠
助 教・阪大医博			本	),7	知	7
<b>唐仁乙</b> 新能	矿态	र्ट्रात म	, IEI			_
<b>夏</b> 山 了 野 愿 丽 即 分子 遺 伝 学 研 究	ッ九 分野	ЦАН	1			
教 授・早大理博	~ ~ ~ 1		藤	田	尚	志
准教授・阪大医博			加	藤	博	己
情報高分子化学	研究	分明	择	•		
		/ *	-			

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	П	<u> </u>	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	<u> </u>
助 教・京大理博	上	田	Æ	道
助 教・京大理博	竹	本	経緯	韋子
助 教・阪大保健博	谷		靖	江
助 教・京大生命博	原		崇	裕
技術職員	小	中	さく	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	畄	義	裕
准教授 (客)・東大獣医博	Ш	П		寧
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
助 教・京大生命博	前	)	桃	子
增殖制御学研究分野				
教 授・京大医博	影	山	龍	一郎
准 教 授・京大医博	大	塚	俊	之
特定准教授・京大生命博	今	吉		格
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・阪大医博 (兼)	小	林		剮
情報制御学研究分野				
教 授・(客)	利	根丿	[]	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	畄	雅	雄
講 師・熊大医博	安	永	純-	一朗
助 教・京大医博	佐	藤	賢	文

助教・京大医博	志	村	和	也
技術職員(臨床検査技師)	田	逄	順	÷
ウイルス免疫研究領域	i.			
教授(客)東大医博	滝	П	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	 ⇒ I\
准教授・東大農博	<u>V</u>	化	£П	誠
特定助教・会良先端へ休博	坪	田	省	明
<b>抆</b> //时中的一个小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小小	呂	끤		12
霊長類モデル研究領域	ζ			
センター長・教授・阪大医	博 九	上風	樹	彦
准教授・東大農博	二 小	油	督	行
助 教・阪天医専 甘油融昌	小	你	库	啊」 主
[文]州••[4] [[法]]] [[1]]	國	励佞	庾	天
1又附載員	1 <u>7</u>	场		反
附属新興ウイルス研究	セン	ター	• 	
センター長・教 授・京大医	専小	柳	義	天生
特定助教・京大医博	任	滕	立口	住
将正明教・京大理専	成任	田伝	利 <sup>-</sup> 士	ー <sub>尽</sub> り 75
村庄明叙・永八王叩時	Υ <u>Γ</u>	坏	X	)]
非常鲜	勤講自	帀		
非常勤	<b>勤講的</b> 中	而 東	憲	治
非常算	<b>勤講</b> 的 中 堀	<b>师</b> 東口	憲安	治彦
非常貧	<b>勤講的</b> 中 堀 山	<b>币</b> 東口崎	憲安	治彦晶
非常算	<b>勤講</b> 中堀 山田	<b>币</b> 東口崎中	憲 安靖	治彦晶人
非常鲜	<b>勤講</b> 中堀山田松	<b>市</b> 東口崎中下	憲 安 靖 一	治彦晶人史
非常貧	助 中堀山田松熊:	<b>市</b> 東口崎中下谷·	憲安 靖一雄	治彦晶人史郎
非常鲜	<b>勤</b> 中堀山田松熊鈴山	市 東口崎中下谷木。	憲安 靖一雄善漢	治彦晶人史郎幸望
非常貧	<b>勤</b> 中堀山田松熊鈴岩は	市 東口崎中下谷木倉中	憲安 靖一雄善洋	治彦晶人史郎幸郎四
非常貧	<b>勤</b> 中堀山田松熊鈴岩竹塩	市 東口崎中下谷木倉内田	憲安 靖一雄善洋 達	治彦晶人史郎幸郎理雄
非常貧	<b>勤</b> 群 中堀山田松熊鈴岩竹塩西	〒 東口崎中下谷木倉内田山	憲安 靖一雄善洋 達幸	治彦晶人史郎幸郎理雄塵
非常貧	为 中堀山田松熊鈴岩竹塩西明	〒 東口崎中下谷木倉内田山甲	憲安 靖一雄善洋 達幸安	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文
非常鲜	为 中堀山田松熊鈴岩竹塩西明森	〒 東口崎中下谷木倉内田山里鳥	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄
非常貧	为 中堀山田松熊鈴岩竹塩西明森鶴	〒 東口崎中下谷木倉内田山里島見	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也
非常鲜	<b>勤</b> 講 中堀山田松熊鈴岩竹塩西明森鶴和	〒 東口崎中下谷木倉内田山里島見田	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達郁	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也夫
非常貧	为 中堀山田松熊鈴岩竹塩西明森鶴和谷	<b>币</b> 東口崎中下谷木倉内田山里島見田口	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達郁孝	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也夫喜
非常	为	〒 東口崎中下谷木倉内田山里島見田口 銘	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達郁孝	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也夫喜
非常的	助	币 東口崎中下谷木倉内田山里島見田口 郭	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達郁孝 む	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也夫喜
非常的 事務長 声明職員 (約354日以)	为为,	而 東口崎中下谷木倉内田山里島見田口 郭 む	憲安 靖一雄善洋 達幸宏恒達郁孝 和絞	治彦晶人史郎幸郎理雄廣文雄也夫喜 己之

専門職員	(財務担当)	松	下		聡
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
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	藤	井	耕力	、郎
細胞生物学(増殖制御学)	Ait	or G	onza	lez
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(増殖制御学)	楯	谷	智	子
細胞生物学(増殖制御学)	松	田	孝	彦
細胞生物学(信号伝達学)	星	野	重	樹
細胞生物学(信号伝達学)	仲	屋	友	喜
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御	)趙		鉄	軍
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	加	藤	雅	紀
感染症モデル(霊長類モデル)	岩	美	真	吾

# 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	裕約	己子	
がんウイルス(がん遺伝子)	宮	崎	亮	次	
がんウイルス(がん遺伝子)	橋	本	成	祐	
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					
がんウイルス(がん遺伝子)	大	門	康	志	
がんウイルス(がん遺伝子)	Ш	手	章	史	
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	藤	野		寛	
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	松	本	祐	介	
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	中	村	祥	子	
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)	Æ	木		聡	
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)	下	出	紗	弓	
ヒトレトロウイルス(ウイルス病態)	Pet	er	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(ウイルス病態)	河	西	菜	摘	細胞生物学(構造形成学)	井	Л	敬	介
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	田	中		梓	細胞生物学(構造形成学)	岩	野	さや	うか
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	田	П	奈	マ絵	細胞生物学(構造形成学)	渡	邉	美	子
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	菅	田	謙	治	細胞生物学(増殖制御学)	坂	本	雅	行
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	馬		広	勇	細胞生物学(増殖制御学)	播	磨	有利	<b></b>
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	$\equiv$	浦	未	知	細胞生物学(増殖制御学)	西		美	幸
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	戸	上	博	昭	細胞生物学(増殖制御学)	平.	野	響	子
ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	Л	月	章	弘	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(ウイルス制御)	三田	上	侑	生	ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	水戸	部	悠	_
感染症モデル(霊長類モデル)	大	附	寛	幸	ヒトレトロウイルス(ウイルス制御)	袁		直	希
感染症モデル(霊長類モデル)	Л	岸	崇	裕	感染症モデル(ゲノム改変マウス)	楊		嘉	銘
感染症モデル(霊長類モデル)	安	井	美	加	感染症モデル(ゲノム改変マウス)	出	П	勝	彰
感染症モデル(霊長類モデル)	渡	部	祐	司	感染症モデル(ゲノム改変マウス)	山	П	祐大	、朗
感染症モデル(霊長類モデル)	石	田	裕	樹	感染症モデル(ゲノム改変マウス)	井	上	真您	<u></u> 条子
感染症モデル(霊長類モデル)	大	上		恵					
感染症モデル(霊長類モデル)	加	藤	文	博					
人間,理時受研究到十受院	<del>.</del>								
八间· <b>垛</b> 塊于叭九杆八于网 如时开始学(信号/二读学)	it. ±	[[]	禄	旪					
和心土初子(后方仏)上子) 成沈庁エデル(雲트新エデル)		向	本	助					
感染症モノル(霊氏頬モノル)	口 旧	洲	が	邗					
応来症でノバ(霊氏頬モノバ) 威沈症モデル(霊長粨モデル)	仙会	北	呼	二					
	11.21	ЧЦ	1)X	1					
生命科学研究科大学院生			۰.	_					
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	德	哉					
がんウイルス(細胞制御)	服	部	祐	李					
がんウイルス(細胞制御)	石	橋	理	基					
がんウイルス(細胞制御)	花	)		奖					
がんウイルス(細胞制御)	Щ	本	侑	枝					
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	阿	部	雄						
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	津		陽	司					
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	赤	堀	祐						
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	堀	田	祐	麻					
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	Щ	麻衣	文子					
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)	高	松	詩種	理					
遺伝子動態調節(分子遺伝)	Ng	Cher	n Sei	ng					
遺伝子動態調節(分子遺伝)	古了	賀悠	5里	恵					
遺伝子動態調節(分子遺伝)	宮	田	奈	緒					
遺伝子動態調節(分子遺伝)	渡	邊	岳	史					
遺伝子動態調節(分子遺伝)	Vo I	)ang	Ngh	iem					
生体応答学(生体防御)	冏	部	昌	史					
生体応答学(生体防御)	設	楽	宗-	一朗					
細胞生物学(構造形成学)	濱	崎	真	弓					