

CHRONOLOGICAL TABLE

1956 April	Institute for Virus Research, Kyoto University, was founded with two departments (Pathology and Biophysics).
1956 April	Scientific Lectures for the Public were presented commemorating the opening of the Institute (the successive Memorial Lecture Series have been presented annually hereafter).
1957 April	Department of Biochemistry and Department of Serology and Immunology were established.
1958 April	Department of Prevention and Therapeutics was established.
1958 December	"Advances in Virology", Vol. 1 (in Japanese) was published as collection of the Memorial Lectures (the successive volumes were published annually hereafter until 1960).
1958 December	"Annual Report of the Institute for Virus Research", Vol. 1, was published (the successive volumes have been published annually hereafter).
1959 July	Virus Diagnosis Center was established.
1961 October	The 1st Symposium of the Institute for Virus Research was held under the auspices of the Institute with the nationwide participants. The proceedings of the Symposium were published as the first issue of the new series of "Advances in Virology" in Japanese (the successive Symposia have been held and their proceedings published annually hereafter).
1962 April	Department of Tumor Virus was established.
1962 October	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Medicine, and students of the School were first admitted to the Institute.
1962 December	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Science, and students of the School were first admitted to the Institute.
1964 April	Virus Diagnosis Center was renamed Virological Diagnosis Center.
1965 September	Construction of the new building for the Institute commenced.
1967 March	Construction of the new building was completed.
1968 April	Department of Genetics was established.
1974 April	Department of Molecular and Cellular Virology was established.
1977 April	Department of Neurological Virus Disease was established as such that Visiting Staff be appointed.
1978 April	Animal Laboratory for Experimental Virus Infection was established.
1981 March	Construction of extension of the main building was completed. Thus the main building now constitutes five floors with a basement occupying the aggregate area of 5,410 m ² . The major part (ca. 481 m ²) of the extended area serves for researches involving radioisotope labelling and in vitro DNA recombination experiments

requiring the P3 facilities.

1986 May	The memorial events for the 30th anniversary of foundation of this Institute were held on May 16-17.
1986 November	Professor Yorio Hinuma was honoured as "Person of Cultural Merits (Bunkakorosha)"
1987 May	Department of Biophysics and Department of Tumor Virology were reorganized to form Department of Viral Oncology which consists of 4 Laboratories.
1988 April	Virological Diagnosis Center was reorganized to become Research Center for Immunodeficiency Virus which consists of Laboratory for AIDS Immunology and Laboratory of Viral Pathogenesis.
1989 April	Department of Biochemistry and Department of Genetics were reorganized to form Department of Genetics and Molecular Biology which consists of 3 Laboratories.
1990 March	Construction of a new building was partly completed.
1990 April	Department of Pathology and Department of Molecular and Cellular Virology were reorganized to form Department of Cell Biology which consists of 3 Laboratories, while Department of Serology and Immunology, Department of Prevention and Therapeutics and Department of Neurological Virus Disease were reorganized to form Department of Biological Responses which consists of 2 laboratories and one for visiting staff.
1992 April	Laboratory of Regulatory Information was established within the Department of Cell Biology to host a visiting professor as well as a research group.
1993 December	Construction of the new building which accommodates three laboratories from this Institute as well as some from the Medical School and the Center for Molecular Biology and Genetics of the University was completed.
1994 October	Construction of a new animal facility with some laboratories was completed.
1998 April	One staff member was appointed academic staff of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and students of the school were first admitted to the Institute.
1998 April	Research Center for Immunodeficiency Virus was reorganized to become Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome.
1998 April	Laboratory of Virus Control in Research Center for Immunodeficiency Virus was established as such that Visiting Staff be appointed.
1999 April	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Biostudies, and students of the school were first admitted to the Institute.
2002 April	The Experimental Research Center for Infected Animals was abolished and the Experimental Research Center for Infectious Diseases was Established instead.
2005 April	Research Center for Emerging Virus was established.

ORGANIZATION AND STAFF

(as of December, 2005)

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

Director Kunitada Shimotohno, D.Pharm.

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)

Department of Viral Oncology

Laboratory of Gene Analysis

Associate Professor Hiroyuki Sakai, D.Med.Sc. (1996)

Assistant Professor Shin-ichi Yanagawa, D.Agr. (1986)

Laboratory of Cell Regulation

Professor Masahiko Sugita, D.Med.Sc. (2004)

Associate Professor Yota Murakami, D.Sc. (1993)

Assistant Professor Isamu Matsunaga, D.Med.Sc. (2004)

Laboratory of Tumor Biogenesis

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

Laboratory of Human Tumor Viruses

Professor Kunitada Shimotohno, D.Pharm. (1996)

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

Assistant Professor Koichi Watashi, D.Pharm. (2003)

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

Professor Takashi Fujita, D.Sc. (2005)

Laboratory of Biochemistry

Professor Mutsuhito Ohno, D.Sc. (2001)

Assistant Professor Naoyuki Kataoka, D.Sc. (2002)

Makoto Kitabatake, D.Sc. (2004)

Laboratory of Genetic Information Analysis

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

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

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

Lecturer Kazushige Maki, D.V.M., PhD (2003)

Assistant Professor Masamichi Ueda, D.Sc. (1978)

Laboratory of Infection and Prevention

Professor Junji Yodoi, M.D., D.Med.Sc. (1973-1974, 1989)

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

Assistant Professor Keiko Takemoto, D.Sc. (1992)

Norihiko Kondo, D.Med.Sc. (2004)

Bioresponse Regulation Laboratory

Visiting Professor Tsukasa Seya, D.Med. PhD. (2005)

Department of Cell Biology

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Professor	Koreaki Ito, D.Sc. (1971)
Associate Professor	Yoshinori Akiyama, D.Sc. (1988)
Assistant Professor	Hiroyuki Mori, D.Sc. (1996)

Laboratory of Growth Regulation

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

Laboratory of Signal Transduction

Assistant Professor	Akira Murakami, D.Sc. (1979)
---------------------	------------------------------

Laboratory of Regulatory Information

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

Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

Head Professor	Yoshio Koyanagi, M.D.,D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Yoshiharu Miura, M.D.,D.Med.Sc. (2004)

Laboratory of Virus Immunology

Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
Assistant Professor	Eiichi Kodama, M.D., D.Med.Sc. (1999)
	Jun-ichirou Yasunaga, M.D., D.Med.Sc. (2003)

Laboratory of Virus Control

Visiting Professor	Naoki Yamamoto, M.D.,D.Med. (2005)
Visiting Associate Professor	Takao Masuda, D.Med. (2005)

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

Head,Professor	Yoichi Shinkai, D.Med.Sc. (1998)
Associate Professor	Makoto Tachibana, D.Agr. (1998)

Laboratory of Primate Model

Professor	Masanori Hayami, D.V.M., D.Agr. (1988)
Associate Professor	Tomoyuki Miura, D.V.M., D.Agr. (1988)
Assistant Professor	Eiji Ido, D.Sc. (1991)
	Kentaro Ibuki, D.V.M., D.Med.Sc. (1995)

Center for Emerging Virus Research

Head Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
----------------	--

Laboratory of Viral Pathogenesis

Associate Professor of Special Education and Research

Takayuki Miyazawa , D.V.M.,D.Vet.Med.Sc. (2005)

Lecturers (part time)

Hidemi Takahashi
Yoshiaki Ito
Masayuki Yamamoto
Akira Mitsui
Masakazu Kita

Library

Committee Chairman	Koichi Ikuta (2004)
--------------------	---------------------

Administration Office

Chief Officer	Takaji Kanda (2005)
General Affairs	Ryuko Tougou (2003)
Finance	Masao Terada (2003)

Research Fellows

Hidetsugu Kohzaki
Katsuya Kominami
Takayuki Murata
Yoshiki Murakami
Hitoshi Takahashi
Saori Kitao
Kaoru Masuyama
Kensuke Ninomiya
Eiji Ohashi
Makiko Narita
Akiko Abe
Noriko Kato
Masahiro Takenaka
Toru Yoshida
Yoshiyuki Matsuo
Shin-ichi Oka
Yasuya Inomata
Md.Kaimul Ahsan
Wenrui Liu
Kenji Inaba
Ryosuke Ohsawa
Mika Yoshida
Yorifumi Satou
Liu Bing
Zhao Tiejun
Hisashi Akiyama

Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Genet. Info. Analy.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)

Graduate Students

Graduate School of Science

Hiroyoshi Moriyama
Ichiro Taniguchi
Hiroyuki Fuke
Rei Yoshimoto
Shintaro Akiyama
Hisashi Kiryu
Chihiro Hatai
Atsumi Miyata
Mc Closkey Asako
Tomo Hanafusa
Keijiro Kamei
Akiko Murakami
Tomoya Tsukazaki
Yoh-hei Takahashi
Hiroki Muto
Kayo Koide
Saki Maegawa
Gen Kobayashi

Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Genet. Info. Analy.)
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Genet. Info. Analy.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellul. Biogenesis.)

Graduate School of Medicine

Satoshi Yoshida
Hiroyasu Nakamura
Keiichirou Arimoto
Kaku Gotoh

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.)

Masaaki Kiyomi	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Dutta Khokon Kumar	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Terumasa Toraya	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Shizue Tani-ichi	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Kenji Nakata	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Dongmei Wang	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Aoi Son	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Tomijiro Hara	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Aiguo Tan	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Ryoichi Sakata	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Akiko Ishii	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Hiroshi Kokubu	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Yoshito Masamizu	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Hiromi Shimojo	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Aya Kita	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Taro Ueo	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Masashi Kitagawa	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Hiroko Kitayama	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis.)
Takeshi Yoshida	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis.)
Yasuhiko Shinoda	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis.)
Jun Fan	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Paola Miyazato	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Ken Takai	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Kazuya Shimura	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Maki Miyazaki	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Kazuki Izumi	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Kentaro Kaneyasu	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Kazutoshi Inaba	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)

Graduate School of Pharmaceutical Sciences

Michiyo Koyanagi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Hiroyasu Kaneko	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Osamu Isono	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Daisuke Inoue	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Hironori Kanbe	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)

Graduate School of Human and Environmental Studies

Reii Horiuchi	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Naoki Saito	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Misa Ishimatsu	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Makiko Motoshara	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Yoshinori Fukazawa	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)
Kenta Matsuda	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model.)

Graduate School of Biostudies

Kenta Sasaki	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Naoko Kajitani	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Ayano Satsuka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Norio Tezuka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Hiroaki Kato	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Mika Yokoyama	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Kohei Doke	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Kazuo Okamoto	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Shiho Nakagiri	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Hirokazu Nakatumi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Iku Sasaki	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)

Mai Suganuma	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Yohei Kobayashi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Shunsuke Kuroki	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Ryosuke Yoshioka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Takahiro Minematsu	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Mina Kikuchi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Sachi Akiyama	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Masatoshi Ohgushi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Akinori Takata	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Suzuka Takahashi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Kiichi Tanaka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Yoshitaka Minamida	Dept. Viral Oncol. (Lab. Tumor Biogenesis.)
Yusuke Miyanari	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Takayuki Hishiki	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Hiroaki Amemiya	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Hideyuki Konishi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses.)
Shinya Ogawa	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Hirofumi Shibata	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Takao Takemori	Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)
Michika Mochizuki	Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)
Shigeki Yoshiura	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Itaru Imayoshi	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Yoshiki Takashima	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Beak Joung -hee	Dept. Cell Biol. (Lab Growth Regul.)
Yoshinori Andou	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis.)
Kei Sato	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis.)
Makoto Shirakawa	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Keiko Kajiwara	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Atsushi Kawamoto	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Mariko Ueno	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Ayako Sakakibara	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Yasuteru Sakurai	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)
Koichi Akiyama	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Hideharu Hashimoto	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Yasuko Matsumura	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Jun Ueda	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Keiji Okamoto	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Hiroki Miyashita	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Toshiyuki Matsui	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Tae Komai	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)
Marie Murakami	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model.)

構 成 員

所 長 下遠野 邦 忠

協 議 員

ウイルス研究所教授	伊 藤 維 昭
ウイルス研究所教授	速 水 正 憲
ウイルス研究所教授	淀 井 淳 司
ウイルス研究所教授 (併)	米 原 伸
ウイルス研究所教授	下遠野 邦 忠
ウイルス研究所教授	影 山 龍一郎
ウイルス研究所教授	松 岡 雅 雄
ウイルス研究所教授	大 野 睦 人
ウイルス研究所教授	生 田 宏 一
ウイルス研究所教授	眞 貝 洋 一
ウイルス研究所教授	小 柳 義 夫
ウイルス研究所教授	杉 田 昌 彦
ウイルス研究所教授	藤 田 尚 志

研 究 部

がんウイルス研究 (大) 部門 がん遺伝子研究分野

助 教 授・京大医博	酒 井 博 幸
助 手・京大農博	柳 川 伸 一

細胞制御研究分野

教 授・京大医博	杉 田 昌 彦
助 教 授・京大理博	村 上 洋 太
助 手・大阪市大医博	松 永 勇

生体発がん機構研究分野

教授 (併)・京大理博	米 原 伸
-------------	-------

ヒトがんウイルス研究分野

教 授・北大薬博	下遠野 邦 忠
助 教 授・信大医博	土 方 誠
助 手・京大薬博	渡 士 幸 一

遺伝子動態調節研究 (大) 部門 分子遺伝学研究分野

教 授・早稲田大理博	藤 田 尚 志
------------	---------

情報高分子化学研究分野

教 授・京大理博	大 野 睦 人
----------	---------

助 手・京大理博	片 岡 直 行
助 手・京大理博	北 畠 真

遺伝子情報解析研究分野

助 教 授・阪大理博	大 森 治 夫
------------	---------

生体応答学研究 (大) 部門

生体防御研究分野

教 授・京大医博	生 田 宏 一
講 師・東大医博	眞 木 一 茂
助 手・京大理博	上 田 正 道
技術職員	北 野 さつき

感染防御研究分野

教 授・京大医博	淀 井 淳 司
助 教 授・京大医博	増 谷 弘
助 手・京大理博	竹 本 経緯子
助 手・京大医博	近 藤 則 彦
技術職員	相 楽 真太郎

応答調節研究分野

教 授 (客)・北大医博	瀬 谷 司
--------------	-------

細胞生物学研究 (大) 部門

構造形成学研究分野

教 授・京大理博	伊 藤 維 昭
助 教 授・京大理博	秋 山 芳 展
助 手・阪大理博	森 博 幸

増殖制御学研究分野

教 授・京大医博	影 山 龍一郎
助 教 授・京大医博	大 塚 俊 之
助 手・京大理博	小 林 妙 子

信号伝達学研究分野

助 手・京大理博	村 上 昭
----------	-------

情報制御研究分野

教 授 (客)	利根川 進
---------	-------

附属エイズ研究施設

感染病態研究領域

施 設 長・教授・京大医博	小 柳 義 夫
助 手・東京医歯大医博	三 浦 義 治

感染免疫研究領域

教 授・熊大医博	松 岡 雅 雄
助 手・福島県立医大医博	児 玉 栄 一
助 手・熊大医博	安 永 純一朗
技術職員	谷 口 裕 子

感染制御研究領域

教 授(客)・熊大医博	山 本 直 樹
助 教 授(客)・熊大医博	増 田 貴 夫

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

センター長・教授・順天堂大医博	眞 貝 洋 一
助 教 授・東大農博	立 花 誠

霊長類モデル研究領域

教 授・東大農博	速 水 正 憲
助 教 授・東大農博	三 浦 智 行
助 手・東大理博	井 戸 栄 治
助 手・京大医博	伊 吹 謙太郎

附属新興ウイルス感染症研究センター

センター長・教 授・熊大医博	松 岡 雅 雄
病態解析チーム・特別教育研究助教授・東大獣医博	宮 沢 孝 幸

非常勤講師

高 橋 秀 実
伊 藤 嘉 明
山 本 雅 之
三 井 彰
喜 多 正 和

事 務 部

事 務 長	神 田 孝 二
総務掛 掛 長	東 郷 龍 子
主 任	瀬 尾 眞規子
主 任	野 田 敬 子
会計掛 掛 長	寺 田 雅 夫
主 任	織 田 秀 夫
主 任	増 谷 桂 子
事務職員	鯨 坂 久美子

研 究 員

がんウイルス(細胞制御)	神 崎 秀 嗣
がんウイルス(生体発がん機構)	小 南 勝 也

がんウイルス(ヒトがんウイルス)	村 田 貴 之
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	村 上 善 基
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	高 橋 仁
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	北 尾 紗 織
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	増 山 郁
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	二 宮 賢 介
遺伝子動態調節(遺伝子情報解析)	大 橋 英 治
生体応答学(感染防御)	成 田 牧 子
生体応答学(感染防御)	阿 部 明 子
生体応答学(感染防御)	加 藤 紀 子
生体応答学(感染防御)	竹 中 真 弘
生体応答学(感染防御)	吉 田 徹
生体応答学(感染防御)	松 尾 禎 之
生体応答学(感染防御)	岡 新 一
生体応答学(感染防御)	猪 俣 泰 也
生体応答学(感染防御)	Md. Kaimul Ahsan
生体応答学(感染防御)	劉 文 瑞
細胞生物学(構造形成学)	稲 葉 謙 次
細胞生物学(増殖制御学)	大 澤 亮 介
エイズ(感染免疫)	吉 田 美 香
エイズ(感染免疫)	佐 藤 賢 文
エイズ(感染免疫)	劉 冰
エイズ(感染免疫)	趙 鉄 軍
感染症モデル(霊長類モデル)	秋 山 尚 志

大 学 院 生

理学研究科大学院生

がんウイルス(生体発がん機構)	森 山 博 由
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	谷 口 一 郎
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	福 家 浩 之
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	芳 本 玲
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	秋 山 慎太郎
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	霧 生 尚 志
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	畑 井 千 裕
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	宮 田 淳 美
遺伝子動態調節(情報高分子化学)	Mc Closkey 亜沙子
遺伝子動態調節(遺伝子情報解析)	花 房 朋
遺伝子動態調節(遺伝子情報解析)	亀 井 恵二郎
細胞生物学(構造形成学)	村 上 亜希子
細胞生物学(構造形成学)	塚 崎 智 也
細胞生物学(構造形成学)	高 橋 洋 平
細胞生物学(構造形成学)	武 藤 洋 樹
細胞生物学(構造形成学)	小 出 佳 代
細胞生物学(構造形成学)	前 河 早 希
細胞生物学(構造形成学)	小 林 元

医学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)	吉田智志
がんウイルス(がん遺伝子)	中村博保
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	有元啓一郎
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	後藤 覚
生体応答学(生体防御)	清見正章
生体応答学(生体防御)	Dutta Khokon Kumar
生体応答学(生体防御)	虎屋輝正
生体応答学(生体防御)	谷一靖江
生体応答学(生体防御)	中田賢治
生体応答学(感染防御)	王冬梅
生体応答学(感染防御)	孫安生
生体応答学(感染防御)	原富次郎
生体応答学(感染防御)	譚愛国
細胞生物学(増殖制御学)	阪田良一
細胞生物学(増殖制御学)	石井章子
細胞生物学(増殖制御学)	国分寛司
細胞生物学(増殖制御学)	正水芳人
細胞生物学(増殖制御学)	下條博美
細胞生物学(増殖制御学)	喜田亜矢
細胞生物学(増殖制御学)	上尾太郎
細胞生物学(増殖制御学)	北川雅史
エイズ(感染病態)	北山裕子
エイズ(感染病態)	芳田 剛
エイズ(感染病態)	篠田康彦
エイズ(感染免疫)	Jun Fan
エイズ(感染免疫)	Paola Miyazato
エイズ(感染免疫)	高井 健
エイズ(感染免疫)	志村和也
エイズ(感染免疫)	宮崎真紀
エイズ(感染免疫)	泉和樹
感染症モデル(霊長類モデル)	兼安健太郎
感染症モデル(霊長類モデル)	稲葉一寿

薬学研究科大学院生

がんウイルス(ヒトがんウイルス)	小柳三千代
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	金子央賢
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	磯野 修
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	井上大輔
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	神戸宏憲

人間・環境学研究科大学院生

感染症モデル(霊長類モデル)	堀内 励生
感染症モデル(霊長類モデル)	斎藤尚紀
感染症モデル(霊長類モデル)	石松美砂
感染症モデル(霊長類モデル)	元原麻貴子

感染症モデル(霊長類モデル)

感染症モデル(霊長類モデル)

深澤嘉伯
松田健太

生命科学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)	佐々木 健太
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)	佐塚文乃
がんウイルス(がん遺伝子)	手塚紀夫
がんウイルス(細胞制御)	加藤太陽
がんウイルス(細胞制御)	横山美佳
がんウイルス(細胞制御)	道家康平
がんウイルス(生体発がん機構)	岡本一男
がんウイルス(生体発がん機構)	中桐志保
がんウイルス(生体発がん機構)	中津海洋一
がんウイルス(生体発がん機構)	佐々木 郁
がんウイルス(生体発がん機構)	菅沼 舞
がんウイルス(生体発がん機構)	小林洋平
がんウイルス(生体発がん機構)	黒木俊介
がんウイルス(生体発がん機構)	吉岡亮介
がんウイルス(生体発がん機構)	峰松孝博
がんウイルス(生体発がん機構)	菊池弥奈
がんウイルス(生体発がん機構)	秋山 幸
がんウイルス(生体発がん機構)	大串雅俊
がんウイルス(生体発がん機構)	高田顕徳
がんウイルス(生体発がん機構)	高橋涼香
がんウイルス(生体発がん機構)	田中喜一
がんウイルス(生体発がん機構)	南田佳孝
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	宮成悠介
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	日紫喜隆行
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	雨宮大晃
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	小西秀幸
生体応答学(生体防御)	小川伸哉
生体応答学(生体防御)	柴田寛文
生体応答学(生体防御)	竹森享男
生体応答学(感染防御)	望月芳香
細胞生物学(増殖制御学)	吉浦茂樹
細胞生物学(増殖制御学)	今吉 格
細胞生物学(増殖制御学)	高嶋良樹
細胞生物学(増殖制御学)	Baek Joung-hee
エイズ(感染病態)	安藤良徳
エイズ(感染病態)	佐藤 佳
エイズ(感染免疫)	白川 一
エイズ(感染免疫)	梶原慶子
エイズ(感染免疫)	川本敦司
エイズ(感染免疫)	上野真理子
エイズ(感染免疫)	榊原綾子

エイズ(感染免疫)	櫻	井	康	晃
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	秋	山	康	一
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	橋	本	秀	春
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	松	村	泰	子
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	上	田		潤
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	岡	本	啓	治
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	宮	下	広	樹
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	松	井	稔	幸
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	駒	井		妙
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	村	上	万里	絵

STAFF CHANGES OF THE INSTITUTE

Appointments

During the period of January to December 2005, the following new staffs were appointed; Dr. Takashi Fujita as a Professor of Department of Genetics and Molecular Biology, Dr. Tsukasa Seya as a Visiting Professor of Department of Biological Responses, Dr. Naoki Yamamoto as a Visiting Professor of Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome Research, Dr. Makoto Tachibana as an Associate Professor of Experimental Research Center for Infectious Diseases, Dr. Takayuki Miyazawa as an Associate Professor of special education and Research of Center for Emerging Virus Research, Dr. Takao Masuda as a Visiting Associate Professor of Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome Research, Dr. Isamu Matsunaga as an Assistant Professor of Department of Viral Oncology and Dr. Taeko Kobayashi as an Assistant Professor of Department of Cell Biology.

Departure

Dr. Katsuya Shigesada and Dr. Shoichi Hasegawa retired from the Institute in March. Dr. Kosei Ito moved to Singaporean National Molecule Cell Biology Institute, Dr. Yasuo Ariumi moved to Center for AIDS Research, Kumamoto University, Dr. Shuichi Yamada moved to Akita University, Drs. Hiroaki Mitsuya, and Masakazu Kita left the Institute.

THE SCIENTIFIC LECTURE MEETING OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

The annual scientific lecture of this Institute was held on November 25, 2005 at the Inamori Hall of Kyoto University Faculty of Medicine.

Program

Opening Remarks: Kunitada Shimotohno

1. The risk of cross-species viral infections in xenotransplantation. Takayuki Miyazawa, School of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.
2. The highly pathogenic avian influenza viruses and zoonoses. Hiroshi Kida, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University.
3. Regulation of antiviral innate immune responses by RIG-I RNA family of helicases. Takashi Fujita, this Institute.
4. Regulation of Toll-like receptor signaling and interferon responses by IRF family of transcription factors. Tadatsugu Taniguchi, Graduate School of Medicine, University of Tokyo.

THE 22TH COLLOQUIUM OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

The 22th Colloquium of the Institute for the Virus Research is scheduled on February 14 and 15, 2005 at the Inamori Hall of Kyoto University Faculty of Medicine. The subject for the discussion is " New advances of the research on membrane traffic ".

Program

Opening Remarks: Koichi Ikuta

1. Regulation of membrane traffic by Ubiquitin. Kazuhisa Nakayama, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.
2. Autophagy ~The Roles in molecular mechanisms and diseases~. Tamotsu Yoshimori, National Institute of Genetics.
3. Novel mechanism of membrane dynamics suppressing the infection of HIV. Yoshio Koyanagi, this Institute.
4. Polarized Transport of the receptor regulating planar polarity of epithelium. Yuko Shimada, Graduate School of Biostudies, Kyoto University.
5. New world of ArfGAP study. Koichi Miura, Osaka Bioscience Institute
6. Role of membrane sphingomyelin in Fas clustering and aggregation of lipid rafts. Hisanori Umehara, Department of Biophysics, Kanazawa Medical University.
7. Lipid raft and the TRX/TBP-2 system. Norihiko Kondoh, this Institute.
8. Mechanism of intracellular trafficking of ceramide. Kentaro Hanada, National Institute of Infectious Diseases.
9. Adaptor protein complexes that mediate vesicular transport and their role in multicellular organisms. Hiroshi Ohno, Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN.
10. Cellular prion protein: Intracellular trafficking and mitochondria-mediated neuronal apoptosis. Kiyotoshi Kaneko, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry.
11. Pathological conditions induced by impaired vesicular transport between the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. Tomohiko Aoe, Chiba University Graduate School of Medicine.
12. Structure, function and regulation of protein translocase. Hiroyuki Mori, this Institute.
13. Structural study of the Exocyst complex, a tethering factor for exocytosis. Shuya Fukai, Tokyo Institute of Technology.

Closing Remarks: Koichi Ikuta

SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Forty-eight seminars were held at the Institute for Virus Research under auspices of the Institute in 2005. Twenty-four lecture were from abroad and Twenty-four others were from Japan.

- | | |
|-------------|--|
| January 17 | Dr. Takashi Fujita, The Tokyo Metrolitan Institute of Medical Science (RINSHOKEN) , Japan . “The RNA helicase RIG-I family regulates antiviral innate immunit”. |
| January 18 | Dr. Raphael Kopan, Washington University , U.S.A. “Does presenilin contribute to development more than Notch proteolysis?: Lessons from the skin and the somite”. |
| January 21 | Dr. Tsuyoshi Igura, Hiroshima Universit y Japan. “Dynamics of histone H2AX complexes in DNA repair processes”. |
| January 28 | Dr. Yuji Sugita, The University of Tokyo , Japan. “Molecular dynamics of Ca ²⁺ pump”. |
| February 7 | Dr. Tatsuo Fukagawa, National Institute of Genetics , Japan. “Molecular mechanism of centromere assembly and heterochromation formation in higher vertebrate”. |
| February 9 | Dr. Yoshiko Takahashi, Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN , Japan. “Spatial Network and cell dynamism in organogenesis”. |
| February 15 | Dr. Hitoshi Sawa, Laboratory for Cell Fate Decision RIKEN , Japan. “Genetic Network regulating asymmetric cell division”. |
| February 24 | Dr. Taeko Kobayashi, Kyoto University , Japan. “The cellular mechanisms involved in proteins' life-the disulfide bond formation system and the misfolded protein degradation via p97/VCP”. |
| March 10 | Dr. Yasushi Sako, Osaka University , Japan. “Analysis of the information processing network in the cell by single molecular mesurement”. |
| March 16 | Dr. Christian Gaidon, CNRS , France. “Roles and regulations of the p53 family: implication for cancer and neurodegenerative diseases”. |
| March 17 | Dr. Hiromi Hirata, University of Michigan , U.S.A. “Behavior and its abnormality of early zebrafish embryos: electrophysiological and genetic analysis”. |
| March 24 | Dr. Freda Miller, University of Toronto , Canada. “Building a nervous system: novel stem cell sources and signals”. |
| March 24 | Dr. David Kaplan, University of Toronto , Canada. “Signaling pathways regulating neuronal survival, apoptosis, and growth”. |
| April 21 | Dr. Kazunari Ushida, Kyoto Prefectural University , Japan. “Environment of the intestines and physiological response of intestinal tissues” |

- March 27 Dr. Francois CLAVEL, Bichat Hospital, France. "HIV evolution in treated patients: not a straight road".
- May 24 Dr. Noriko Gotoh, University of Tokyo , Japan. "Signaling through docking protein FRS2a is critical for early mouse: embryogenesis and for eye and neural development".
- May 26 Dr. Hiroshi Tsuda, Baylor College of Medicine , U.S.A. "A cross-species approach to untangle the problems of polyglutamine diseases".
- June 1 Dr. Tsuyoshi Akagi, Osaka Bioscience Institute , Japan. "Analysis of molecular carcinogenesis using normal human cells".
- June 6 Dr. Kazuhiko Takahashi, Hokkaido Pharmaceutical University , Japan. "Structure and function of plasma protein that contains essential trace element, selenium".
- June 14 Dr. Junichi Sakuragi, Osaka University , Japan. "Possible role of retroviral genome dimerization".
- June 16 Dr. Kenji Hiromatsu, University of Miyazaki , Japan. "Host defense against viral infection mediated by primitive T cell subsets".
- June 17 Dr. Takayuki Miyazawa, Obihiro University of Agriculture Veterinary Medicine , Japan. "Cell tropism of animal-derived retroviruses".
- June 17 Dr. Yoshinobu Takakura, Kyoto University , Japan. "Cancer therapy using a novel plasmid DNA delivery technique".
- June 20 Dr. Elke Deuerling, Center for Molecular Biology and University of Heidelberg , Germany. "Molecular chaperones at work: getting newly synthesized proteins into shape".
- June 20 Dr. Helen pickersgill, The Netherlands Cancer Institute ,Netherlands. "The edge of the genome: A drosophila map of gene activity at the nuclear lamina".
- June 22 Dr. Bert van den Berg, University of Massachusetts Medical School , U.S.A. "X-ray crystal structure of the SecY protein translocation channel".
- June 27 Dr. Yasumasa Iwatani, Laboratory of Molecular Genetics, NICHD, NIH , U.S.A. "Anti-viral effect of APOBEC3G on HIV infection".
- June 28 Dr. Makoto Tachibana, Kyoto University , Japan. "Regulatory mechanism of histone methylation by G9a/GLP complex".
- July 20 Dr. Daniel Otzen, Institute of Life Science, Aalborg Universitet , Denmark. "Folding of membrane proteins".
- July 25 Dr. Gideon Dreyfuss, University of Pennsylvania School of Medicine , U.S.A. "The survival of motor neurons protein: A molecular machine that assembles RNA-protein complexes".
- August 2 Dr. Knud H. Nierhaus, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Germany. "The E site story: New aspects of protein synthesis"

- September 30 Dr. Masato Nakanishi, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology , Japan. “Development of novel Sendai virus vectors for human gene therapy”
- October 17 Dr. Youich Suzuki, National Institutes of Health, U.S.A. “Role of nuclear lamina proteins for formation of retrovirus preintegration complex”
- October 19 Dr. Yasuo Ariumi, Kumamoto University , Japan. “Cross talk of human retroviruses and host nuclear factors”.
- October 19 Dr. Eiji Ido, Kyoto University , Japan. “Development of novel SHIVs having a wide region of HIV-1: their possibility and significance in AIDS researches”
- October 24 Dr. Yehudit Bergman, The Hebrew University, Jerusalem. “Immunoglobulin allelic exclusion”
- October 27 Dr. Hajime Mori, Kyoto Institute of Technology , Japan. “Expression and fix of proteins using a cypovirus vector and its application”.
- October 28 Dr. Davis Ng, National University of Singapore Singapore. “Quality control of protein folding in the secretory pathway”.
- November 4 Dr. Tsukasa Seya, Hokkaido University , Japan. “Pattern recognition receptors for microbes and tropism of infection”.
- November 9 Dr. James Douglas Engel, University of Michigan Medical School , U.S.A. “Genetic epistasis and regulatory hierarchies in the functional genomics era”.
- November 22 Dr. James E. Schwob, Tufts University School of Medicine , U.S.A. “The cellular and molecular regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium”.
- November 29 Dr. Susan Zolla-Pazner, New York University School of Medicine and New York Veterans Affairs Medical Center, U.S.A. “Structure/function relationships relevant to the V3 loop of HIV-1 gp120”.
- November 29 Dr. Jerome A. Zack, David Geffen School of Medicine at UCLA, U.S.A . “Modeling HIV Latency ”.
- December 6 Dr. David Wilkinson, National Institute for Medical Research , U.K. “Neurogenesis and boundary formation in hindbrain segmentation ”.
- December 6 Dr. Meiko Kawamura, Niigata University , Japan. “Regulation of glutamic acid transporter expression by interleukin 1: investigation of the roles of glia in neuroinflammation”.
- December 6 Dr. Tomokatsu Ikawa, University of California , U.S.A. “Roles of E2A in early lymphocyte development”.
- December 21 Dr. Fumio Amano, Osaka University of Pharmaceutical Sciences , Japan. “Analysis and application of lipopolysaccharide (LPS) resistant mutant cell line LPS1916 established from macrophage cell line J774.1”.
- December 22 Dr. Tapas K Kundu, Jawaharlal Nehru Centre, India. “Histone modifying enzymes: As new target for therapy”.

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF GENE ANALYSIS

1) Identification of Novel Physiological Functions of Human Papillomavirus E7: K. SASAKI, S. YOSHIDA, N. KAJITANI, A. SATSUKA, H. NAKAMURA and H. SAKAI

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses which replicate and induce hyperplasia in epithelial cells, both mucosal and cutaneous. HPVs are classified into 'low-risk' types (such as HPV-6 and -11) which cause benign warts and 'high-risk' types (such as HPV-16 and -18) which are associated with malignant tumors, especially cervical carcinomas.

The E7 protein of high-risk HPVs is considered to be one of the oncoproteins encoded by the viruses and has been reported to interact with a number of cellular proteins, including Rb-family proteins (pRb, p107 and p130). These interactions have been suggested to play roles in HPV-mediated cellular transformation or in the viral life cycle.

We carried out a yeast two-hybrid screen and identified MADD (MAP-kinase activating death-domain containing protein) and TRIP (TRAF-interacting protein) as additional binding partners of HPV-18 E7 and HPV-11 E7, respectively. They interacted with both E7s in vitro binding assay. They were previously reported to be involved in TNF signaling, which is one of the cytokine signalings important for the regulation of immune and/or inflammatory responses. We then examined the effects of E7 on TNF signaling and found that E7 promoted TNF-alpha-mediated apoptosis and suppressed TNF-alpha-induced ERK/MAPK and NF-kappa B activation in normal human fibroblasts. We are now investigating the detailed mechanism and physiological roles of those E7's effects.

ref: Nishimura, A. et al., *Microbes Infect.* (in press, 2006)

2) Modulation of HPV-infected Cell Proliferation and Invasion by oncogenic Ras Protein: S. YOSHIDA, K. SASAKI, A. SATSUKA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA and H. SAKAI

The Ras proto-oncoprotein is activated in approximately 30% human cancers, and also activated in about 10% cervical cancer. Oncogenic Ras can transform established rodent cell lines but fails to transform primary cells. Transformation of primary cells also requires the cooperation of genes such dominant-defective forms of p53, adenoviral E1A, SV40 large T antigen, which facilitate the immortalization of cells. The expression of Ras in normal fibroblasts results in a G1 arrest that is correlated with an increased expression of p16^{INK4a} and p21^{CIP1/WAF}. The arrest is almost the same as the replicative cellular senescence. Ras is related to the cancer metastasis. Ras induces

matrix metalloproteases, which degrade cell matrix and are activated in aggressive cancer. Ras also activates rac and rho, upregulating cell motility. HPVs are small DNA viruses that require unscheduled S-phase entry in terminally differentiated epithelial keratinocytes for viral genome amplification. The HPV E7 protein binds and degrades pRb, inducing cell cycle progression through the G1-S transition. E7 abolishes G1 arrest induced by DNA damage, epithelial differentiation. E6 protein binds and degrades, cooperating with the ubiquitin ligase E6AP, cell cycle regulator p53.

First, we are investigating how Ras protein regulates cell proliferation and metastasis in the E6 or E7 (or E6/E7) expressed cells. We introduced Ha-ras protein overexpression on in HPV oncoproteins expressed cell lines. The established cell lines are analyzed in regard to the cell growth potential and the regulators for cell cycle checkpoints. We found that E7 expressed keratinocytes escape ras-induced senescence. It was indicated that pRb degradation was important for ras-induced senescence in keratinocytes. Second, we analyzed the effect of ras on the skin formation of HPV oncogenes expressed keratinocytes using the (organotypic) raft culture system. We found that E7 and Ha-ras expressed epidermis invaded basal layer. This invasion results from MMP2 and MT1-MMP induced by Ha-ras and MMP9 induced by E7. This invasion was suppressed by MEK inhibitor and MAPK inhibitor. It is indicated that HPV-infected cell acquires metastasis by ras activation through MAPK pathway.

ref: Ueno, T. et al., *Oncogene* (in press, 2006)

3) Molecular mechanisms of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells: H. NAKAMURA, A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, K. SASAKI and H. SAKAI

Human immunodeficiency virus type 1 is a causative agent for human AIDS. HIV-1 infection induces drastic decrease of CD4-positive T cell, which is considered one of major determinants for AIDS. Although the infection of HIV-1 directly causes the cell death, bystander apoptotic cell death is induced, resulting in the massive loss of CD4-positive T cells in the infected individuals. To clarify the bases of AIDS pathogenesis, it is essential to understand the biological mechanisms of the bystander cell death.

In order to investigate the molecular bases of the bystander cell death induced by HIV-1 infected cells, we have developed a novel assay system by which it is possible to analyze a effect of a single infected cell on the adjacent cells. By using the assay system, the key viral and/or cellular factors involved in the bystander cell death will be elucidated.

4) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4 or E5: N. KAJITANI, A. SATSUKA, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI 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 expression of E4 occurs in the upper layers of the epithelium, coordinating with the onset of virus genome amplification. E4 can induce the collapse of the cytokeratin filament networks, and it has been proposed that disruption of the keratin networks could facilitate viral egress. It is also known that E4 induce the modification of cell cycle. E5 is a highly hydrophobic membrane-bound protein, and influences signal transduction pathways. In addition to the major oncoproteins E6 and E7, E5 possesses weak oncogenic properties. But, it is not understood well about details of E4 and E5. We consider that E4 or E5 is associated with the activities involved in HPV specific lifecycle and with the transformation of the cells, so try to investigate novel functions of E4 or E5.

ref: Nakahara, T. et al., *J. Virol.* **76**: 10914-20, 2002; Nakahara T., et al., *J. Virol.* **79**: 13150-65, 2005

5) Mechanism of HPV life cycle: A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI and H. SAKAI

The tumorigenesis induced by human papillomavirus (HPV) infection is one of the models for multistage cancer development. However, the molecular mechanism has not been fully understood. Furthermore the details of the regulatory mechanisms for the HPV replication and gene expression in differentiating epithelium remains unclear, even by using an organotypic culture system (raft culture) that is used as a system capable of reproducing the differentiation dependent replication cycle of HPV.

In order to examine the molecular mechanism underlying the HPV replication and the cancer development, we construct the high risk and low risk HPV plasmid with high expression ability, and then analyze the viral replication and its effects on the host cells.

6) Regulation of canonical Wnt signaling pathway by Grb10, an adaptor protein for receptor tyrosine kinases----a likely mediator for interaction between Wnt signaling and growth factor-mediated signaling: N. TEZUKA, and S. YANAGAWA.

The canonical Wnt signaling pathway is highly conserved throughout the animal kingdom and controls a number of developmental processes. In addition, numerous mutations in components of the Wnt pathway, such as *apc*, *axin*, *b-catenin*, are oncogenic. The Grb10 protein (growth factor receptor-bound protein 10), on the other hand, is a cellular adapter protein, which can bind to numerous receptor (and non-receptor) tyrosine kinases, as well as several intracellular proteins. Grb10 has distinctive structural features including src-homology 2 (SH2)-, pleckstrin-homology

(PH)-, and RA-like-domains. Like other adapters, Grb10 have been shown to mediate the coupling of various cell surface receptors with specific downstream signaling pathways.

With yeast two hybrid screen using mouse Dvl2 (mouse homologue of *Drosophila Dishevelled*, major positive regulator of Wnt/wingless signaling pathway) as a bait, we have identified the Grb10 as a novel interacting protein of Dvl2. Indeed, interaction of Dvl2 and Grb10 was confirmed by co-immunoprecipitation experiments in tissue culture cells. Tcf-dependent luciferase reporter assay (specific assay for canonical Wnt pathway) in HEK293T cells revealed that overexpression of Grb10 protein severely suppresses Wnt3a-, LRP6 (low-density lipoprotein receptor related protein 6, a co- receptor for Wnt)-, and Dvl2- induced elevation of luciferase activities. In contrast, Tcf reporter activity induce by b-catenin was not affected by Grb10 expression, suggesting that Grb 10 functions upstream of b-catenin. Further more, the binding of Grb10 with LRP6 was found, indicating a molecular mechanisms underlining how Grb10 inhibit Wnt signaling. Upon stimulation with growth factors (such as insulin EGF, HGF etc), recruitment of Grb10 to intracellular domain of receptor tyrosine kinases are well documented. Thus we are exploring interaction between Wnt signaling and growth factor-mediated signaling through Grb10 adaptor protein.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology

Laboratory of Gene Analysis

柳川伸一，手塚紀夫：アダプター蛋白 Grb10 による Canonical Wnt シグナル伝達経路の制御．第 28 回日本分子生物学会年会，福岡，2005．

佐々木健太，吉田智志，中村博保，梶谷直子，佐塚文乃，酒井博幸：HPV 制御遺伝子の TNF α シグナル経路への影響に関する解析．第 53 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2005．

吉田智志，佐々木健太，上野孝治，酒井博幸：HPV 感染による多段階発がんモデルの検証．第 64 回日本癌学会学術総会，札幌，2005

吉田智志，佐々木健太，上野孝治，梶谷直子，佐塚文乃，中村博保，酒井博幸：HPV 感染細胞における過形成誘導及び浸潤能獲得のメカニズムの解析．第 53 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2005

はじめに現在の研究室の構成を記載しておきます。スタッフは酒井・柳川の二人で、大学院生としては以前より研究室に在籍している佐々木君（生命 D2）、吉田君（医科学 D1）に加え、新しく中村君（医科学 D1）、梶谷さん（生命 M1）、佐塚さん（生命 M1）、手塚君（生命 M1）が参加することになりました。そこに技術補佐員として田畑さん、熊谷さん（ともに保健学科 2 回生）が加わっています。昨年度、生命 D3 だった上野君は、現在名市大で研究生として活躍しています。全体としては学生が増え、ずいぶん賑やかになりました。

本年度の大きな変化としては学生が増えたことの他に、研究室の引っ越しがありました。これまでは分子棟の 2 階に研究室があったのですが、現在は本館の 2 階に移動しています。昔からある古い機器やよく分からない試薬があり、研究室全員で大変な思いをしましたが、幸い他の多くの人の助力もあり、無事完了することが出来ました。今は新しい環境にも慣れ、各自いつも通りに実験に取り組んでいます。

（１）ヒトパピローマウイルス（HPV）感染による悪性腫瘍形成機構の解明

HPV は皮膚や粘膜などの上皮組織の基底細胞に感染し、感染部位に疣贅やコンジローマなどの腫瘍を誘発する病原因子である。感染した場合でも不顕性感染となる場合が多く、誘発された腫瘍も自然治癒する 경우가ほとんどであるが、まれに悪性腫瘍に進展することが知られている。特に子宮頸癌では、ほとんどの発症例で HPV の感染が確認され、HPV 感染は子宮頸癌発症の主要なリスクファクターであると考えられている。その他に、上咽頭がんや舌がんなどの HNSCC (head & neck squamous cell carcinoma) 発症への関与も注目されており、HPV はヒトを標的とした代表的な発がんウイルスの一つである。

HPV 感染による悪性腫瘍形成には、ウイルスのコードする E6 と E7 という二つの transforming gene が重要な役割を果たしている。それには主に、これらの遺伝子産物が細胞の主要ながん抑制遺伝子産物である p53 と pRb を不活化する機能が関与している。p53 と pRb は、いずれも細胞周期チェック機構に関与しており、DNA 損傷や過剰な増殖刺激、ストレスなどに応じて、細胞分裂を停止させ適切な細胞内環境の回復に機能し、若しくは細胞死を誘導することで異常細胞を除去する機構に関与している。E6 と E7 によりこれらのがん抑制機構が失われていることで、HPV 感染細胞は染色体異常の蓄積や、過剰な増殖刺激に対して寛容になり、その結果、変異を持った細胞が多く感染部位に蓄積し、その中から悪性形質を獲得した細胞が出現するものと考えられる。

感染初期に見られる良性腫瘍形成は、感染細胞数の増加を誘導し、ウイルス複製に有利に働いているが、同時に悪性形質の獲得にも重要な働きを持つ。我々は HPV の制御遺伝子を発現させたヒト角化細胞 (keratinocyte) で皮膚モデル培養系 (organotypic raft culture) を組立て、過形成誘導に関わる責任因子を検索した。その結果、E7 に強い活性が認められ、

またその機能には pRb の不活化が主に関与していることを示した。しかし、pRb 以外のポケットタンパクである p130 の発現抑制も上皮過形成の誘導にかかわっていることが明らかとなった。

HPV 感染細胞は悪性化するまでに 10 年以上の長い期間を要することが多い。この間に宿主遺伝子の変異が蓄積し、悪性形質を獲得すると考えられるが、主な責任遺伝子は同定されていない。我々はがん細胞で多く変異が認められる ras に注目し、ras 経路の活性化による悪性形質の獲得に関して検討した。通常の角化細胞で ras 経路を活性化すると premature senescence が誘導され、細胞増殖が停止する。この senescence は E7 による pRb 経路の不活化により回避することが可能であった。E7 と活性化 Ras を発現する皮膚モデル培養系では、上皮細胞の浸潤が確認できた。この浸潤能の獲得には MAPK 経路を介した MMP の活性化が関与している可能性が示された。

HPV 感染による細胞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る。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おり、通常の組織培養では HPV の生活環を再現できないために、その制御機構はほとんど分かっていない。我々は E6 や E7 以外の制御遺伝子、特に E4 と E5 に注目し、それらの生物活性の同定を薦めている。E4 に関しては、細胞周期調節に関与することを報告しているが、その分子機構は不明である。これらの機能を調べる上で、HPV の生活環を再現することが重要であり、我々は既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を確認している。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る。

(2) HIV-1 の病原性発現機構の解析

HIV-1 はヒトのエイズの主要な病原因子である。HIV-1 はレトロウイルスの仲間であるが、そのプロトタイプといえる MuLV (マウス白血病ウイルス) に比べると、多くの制御遺伝子を余分にコードしている。これらの遺伝子と宿主側因子の相互作用が、HIV-1 の標的細胞の規定や潜伏化、病原性などに関与していると考えられる。

現在は HIV-1 感染細胞による細胞死誘導機構の解明を進めている。特に、感染細胞周辺の CD4 陽性細胞が apoptosis 誘導によって細胞死する、Bystander cell death と呼ばれる細胞障害機構に関して、そのウイルス側の要因を明らかにすると同時に、そこに関与する宿主側因子の同定を目指した研究を行っている。ウイルス側の要因としては、Env, Nef, Vpr, Tat などが考えられており、そのなかで Vpr と Nef に関して検討を加えている。Nef に関しては当研究室で Vpu との機能的な関連が示されているので、Vpu に関しても、その機能発現メカニズムを解析している。

(3) 受容体型チロシンキナーゼのアダプター蛋白 Grb10 による Canonical Wnt シグナル伝達経路の制御

Wnt シグナル伝達経路は、動物の発生や形態形成あるいは癌化の過程において、重要な

役割を果たしている。柳川は、主に Canonical Wnt 経路の解析を行い、Casein kinase Ia が b-catenin/Arm をリン酸化し、その分解を促進している事 (EMBO J. 2002, Mol. Cell. Biol., 2004)などを明らかにしてきた。 本年は、Wnt 経路の構成員 Dvl2 を Bait とした Yeast two hybrid screen を行い、Dvl2 結合蛋白として新たに Growth factor receptor bound protein 10 (Grb10) 蛋白を同定した。Grb10 蛋白は、受容体型チロシンキナーゼ (Insulin, IGF-1, EGF, FGF, HGF の受容体など)に結合するアダプター分子であり、Pro-rich region, Ras-associated-like domain, 蛋白の膜局在を促進する Pleckstrin homology (PH) domain,そしてホスホチロシンに結合する SH2 domain など特徴的な機能ドメインを持つ。しかし Insulin や IGF-1 による細胞増殖シグナルの負の制御因子である事を除けば、Grb10 の機能は不明な点が多く、それ故 Grb10 は、謎のアダプター分子と呼ばれている。今回この Grb10 が Canonical Wnt 経路を強く抑制する事を初めて明らかにした。すなわち Wnt3a, Dvl2 あるいは Wnt の co-receptor LRP6 の強制発現により誘導された TCF 依存性の転写の活性は、Grb10により強く阻害されるが、一方、恒常的活性化型の b-catenin による TCF 依存性の転写活性化は Grb10 による影響を全く受けなかった。従って Grb10 の作用点は、明らかに b-catenin より上流であった。また Grb10 による Wnt 経路の抑制には、その SH2 domain が必要であること、そしてさらに Grb10 は LRP6 とも結合する事も見出した。現在 Grb10 を介して Wnt 経路と他の分化増殖因子のシグナル伝達経路とが、クロストークしている可能性につき詳細に解析している。



(前列左より) 酒井, 佐々木, 梶谷, 佐塚, (上段) 手塚, 柳川, 中村, 吉田

DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF CELL REGULATION

I. Sugita group

Full attention of the recently set up Sugita's laboratory has been directed to a novel lineage of antigen-presenting molecules, CD1. 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 cell biological and immunological approaches, this group wishes to establish a molecular and cellular basis for CD1-dependent immunity and determine how CD1 has been evolved to function critically in host defense. An important extension of this study is a challenge for developing a new type of lipid-based vaccines against cancer and microbial infection.

I-1) Development of appropriate animal models for CD1 study: I. MATSUNAGA, T. SHIINA* and M. SUGITA (*Tokai University)

Mice and rats are useful animals for many immunological studies, including those of MHC functions, but important exceptions exist. These animals have deleted genes for group 1 CD1 family, and thus, lack the CD1 system that is comparable to that in humans. Given the importance of appropriate small animal models in *in vivo* analysis of CD1-mediated immune responses, we have developed two distinct, but complementary, animal models; namely, guinea pigs and CD1-transgenic mice. We have found that guinea pigs have evolved the CD1 system equivalent to that in humans, and are capable of mounting the CD1-restricted T-cell response upon mycobacterial infection. Further, we have established methods for isolating CD1-positive dendritic cells from the guinea pig bone marrow. Using these as antigen-presenting cells, we are successfully obtaining guinea pig CD1-restricted T cells lines recognizing specific lipid antigens.

As an alternative animal model, we have tried to establish human CD1 transgenic mice in which CD1-dependent immunity is reconstituted. This year, we isolated the human genomic gene for CD1c and established CD1c transgenic mice. Strikingly, CD1c molecules in these mice appear to be expressed selectively in dendritic cells and a fraction of activated macrophages, as in humans. We are now attempting to knockout MHC genes in these transgenic mice to separately evaluate CD1 and MHC functions.

I-2) CD1-Dependent Immunity against *Mycobacterium avium* complex (MAC) and HIV-1: I. MATSUNAGA, A. OCHI and M. SUGITA

After moving to the Institute for Virus Research, the Sugita's laboratory has set out to study

CD1-dependent immunity against *Mycobacterium avium* complex (MAC). Infection with MAC is clinically important because of its resistance to treatment with antibiotics, and often critical in prognosis of AIDS patients. We established methods for purifying the natural form of glycopeptidolipid (GPL), a unique lipid component expressed in the cell wall of MAC, and detected the IgG antibody response directed against the sugar moiety of the compound in guinea pigs infected with MAC. Using this model, cellular and molecular mechanisms for the CD1-dependent humoral immunity are being studied.

Virus infected cells and cancer cells produce a wide array of unusual glycolipids and lipopeptides that could be monitored by CD1-restricted T cells. In this aspect, we have just set up studies, specifically addressing how CD1 functions against HIV-1 infection and lung cancer.

I-3) Identification of a mite-derived lipid as a novel allergen for contact dermatitis: T. SASAI*, N. MORI*, I. MATSUNAGA and M. SUGITA (*Division of Applied Life Science, Kyoto University)

It is now clear that CD1 critically functions in host defense, but undesirable immune responses to lipids may result in tissue damage and autoimmunity. We found that monoterpene, α -acaridial, derived from astigmatid mite *Tyrophagus putrescentiae* induced allergic contact dermatitis, characterized by dermal vasodilation, infiltration of T lymphocytes and proliferation of keratinocytes. Studies using human peripheral blood T cells suggested that the specific response to α -acaridial occurred independently of NKT cells and $\gamma\delta$ T cells.

II. Murakami group

Murakami's group is interested in the regulation of higher order chromatin structure and its role in various chromosome functions. Currently this group mainly focuses on the dynamic organization of heterochromatin that is important constituent of chromosome using fission yeast as a model organism. In addition, we analyze the regulation of DNA replication from a point of view of chromatin structure.

II-1) RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly: H KATO, D. B. GOTO*, R. A. MARTIENSSEN*, T. URANO, K. FURUKAWA**, Y. MURAKAMI** (*Cold Spring Harbor Lab., USA, **Nagoya Univ.)

Heterochromatin is a transcriptionally inert higher-order chromatin structure that contributes to global transcriptional repression and genome integrity. In *Schizosaccharomyces pombe*, the RNA interference (RNAi) machinery converts pericentromeric non-coding RNAs into small interfering RNAs (siRNAs) and is required for the assembly of pericentromeric heterochromatin. Here we

describe a mutation in the second largest subunit of RNA polymerase II (RNAPII). Both wild-type and mutant RNAPII localized to the pericentromere. However, the mutation resulted in the loss of heterochromatic histone modifications, in the dislocalization of RITS (RNA-induced transcriptional silencing) complex and RDRC (RNA-directed RNA polymerase complex), and in the accumulation of pericentromeric non-coding RNAs, accompanied by the loss of siRNAs. This phenotype resembles mutants in RNAi and suggests that RNAPII couples pericentromeric transcription with siRNA processing and heterochromatin assembly.

II-2) Functional Studies of Chromatin Assembly Factors in Fission Yeast: K. DOHKE, S.I.S. GREWAL*, K. TANAKA, S. KATAYAMA***, T. URANO****, Y. MURAKAMI** (*National Institutes of Health, USA., **Shimane Univ., ***Saga Univ., ****Nagoya Univ.)

Higher order structure of chromatin plays an essential role in various nuclear processes. Once established, the higher order structure need to be maintained through cell division. The molecular mechanism for the maintenance of the chromatin structure is not well understood yet. Chromatin assembly factor-1 (CAF-1) is three subunits (p150, p60, and p48) complex and loads histone H3-H4 complex onto newly synthesized DNA through interaction with a replication factor, PCNA in vitro.

We identified fission yeast genes (*pcf1*, *pcf2*, *pcf3*) showing significant homology to CAF-1 p150, p60 and p48 subunits. We found that Pcf1, Pcf2 and Pcf3 form a complex that interacts with PCNA like human CAF1. We also showed that *pcf1*, 2 and 3 are required for maintenance of heterochromatin rather than establishment. It is known that human CAF-1 p-150 interacts directly heterochromatin protein HP1. In pombe, we found that fission yeast CAF-1 interacts heterochromatin protein Swi6 in S phase specifically.

Disruption CAF-1, however, does not affect cell growth significantly, indicating that other chromatin assembly factor(s) exist. Asf1 (anti-silencing function 1) is thought to be a histone chaperon working cooperatively with CAF-1. We analyzed the function of fission yeast Asf1 at heterochromatin and relationship with CAF-1 using temperature sensitive mutant, since *asf1* is an essential gene in fission yeast. Our results suggested that CAF-1 and ASF1 function independently to maintain heterochromatin. These data suggested that fission yeast CAF-1 and ASF1 does participate in "the exact inheritance of heterochromatin structure".

II-3) Chromodomain protein Swi6 recruits the histone deacetylase Clr3 to regulate gene silencing by pericentromeric heterochromatin: H. NAKAGAWA, M. HATTA, K. DOHKE, M. YOKOYAMA and Y. MURAKAMI

Transcriptionally silent heterochromatin is characterized by deacetylated histones. Histone H3 is deacetylated at Lys 9 and Lys 14 (H3-K9 and H3-K14), and methylated on Lys 9 (H3-K9), which is bound by a chromo-domain protein HP1. It is still unclear how histone tail modifications are orchestrated, and what the role of HP1 is in the formation of silent chromatin. It was thought that in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, deacetylation of H3-K14 by the histone deacetylase (HDAC) Clr3 was required for efficient methylation of H3-K9 by the histone methyltransferase Clr4, at pericentromeric heterochromatin. However, we found that neither Clr3 nor H3-K14 deacetylation was absolutely required for methylation of H3-K9 or the subsequent binding of the fission yeast HP1 homologue, Swi6. Instead, Swi6 was required for recruitment of Clr3, to deacetylate H3-K14, and both Swi6 and Clr3 were required for deacetylation of histone H4-K12. Since gene silencing was partially disrupted in the absence of Clr3, we propose that one of the roles of HP1/Swi6 in transcriptional gene silencing, is enhancement of histone tail deacetylation by recruiting HDACs such as Clr3.

II-4) Analysis of a Novel Gene that May Involved in Repair of Double Stranded DNA Break during DNA Replication: M. YOKOYAMA, H. INOUE*, C. ISHII* and Y. MURAKAMI (*Saitama Univ.)

Neurospora crassa mus-7 mutant is sensitive to killing by MMS but not sensitive to UV radiation, suggesting that the gene product is involved in DNA double-strand breaks repair pathway. We cloned the *N. crassa* gene and sequenced the DNA. We found a gene in *Schizosaccharomyces pombe* showing significant similarity to *N. crassa mus-7* and named the gene *mus7*. We disrupted the gene. Like *N. crassa mus-7* mutants, the *S. pombe mus7* mutants are sensitive to MMS but not sensitive to UV radiation. Earlier study reported that there is a similar protein in *Saccharomyces cerevisiae* in respect of the amino acid sequence and the phenotype of the mutants. We have been analyzing the function of the gene using *S. pombe mus7* mutants. Our current results indicates that Mus7 may be involved in repair of double stranded DNA break during DNA replication, therefore we are finding out the relationship between *mus7* and known repair genes working during DNA replication.

II-5) Regulation of the loading of *Drosophila* ORC1 (DmORC1) onto the chromosomal DNA replication origin for gene amplification: H. KOHZAKI and Y. MURAKAMI

A large body of evidence shows transcription factors affect DNA replication. We previously indicated that transcription factors regulate the origin activity by recruiting initiator proteins onto replication origins using polyomavirus and yeast system. We assume that this phenomenon is one of

many mechanisms leading to chromosomal abnormality including gene amplification, translocation, which are commonly observed in cancer cells. We wish to know whether DNA binding proto-oncogene products can regulate the chromosomal DNA replication in higher eukaryote. But chromosomal origins of higher eukaryotic cells are not still characterized in detail. *Drosophila* (Dm) chorion gene amplification is a good model system, because the gene amplification is strictly regulated during development and utilizes similar set of proteins to normal chromosomal replication, such as origin recognition complex (ORC). The replication origin for the amplification contains two essential elements *ACE3* and *ori-beta* where DmOrc2 binds. Interestingly, transcription factors, such as E2F and Myb, regulate this amplification.

We first analyzed the behavior of DmORC1, because unlike DmORC2, the level of DmORC1 is modulated during cell cycle and its concentration regulates origin utilization during development. We indicated that DmOrc1-GFP formed foci in the follicle cell nucleus, which probably represents the amplifying loci. ChIP assay using Dm Egg chamber indicated that DmOrc1 bound to *ACE3* and *Ori-beta*. Considering the regulatory role of DmORC1, we speculate that loading of DmORC1 is a major regulatory step for the gene amplification. We hypothesize that the transcription factors regulate the loading of DmORC1, because we found a transcription factor controls the loading of ORC to the replication origin in yeast. In addition, overexpression of DmORC1 induced abnormal DNA replication like overexpression of Cdc18/CDC6 in fission yeast. This may represent the functional exchangeability between ORC1 and CDC6. We are now trying to determine the function of these proteins at the chorion gene in *Drosophila*.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology
Laboratory of Cell Regulation

I. Sugita group

- Enomoto Y, Sugita M, Matsunaga I, Naka T, Sato A, Kawashima T, Shimizu K, Takahashi H, Norose Y, Yano I. Temperature-dependent biosynthesis of glucose monomycolate and its recognition by CD1-restricted T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337: 452-456, 2005.
- Roura-Mir C, Wang L, Cheng T-Y, Matsunaga I, Dascher CC, Peng SL, Fenton MJ, Kirschning C, Moody DB. Mycobacterium tuberculosis regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J. Immunol.* 175: 1758-1766, 2005.
- 杉田昌彦：結核菌脂質を認識する新しい免疫システム 呼吸 24 巻 97-98 2005
- 杉田昌彦：結核免疫の新しい考え方・結核菌脂質に対する免疫応答・ 総合臨床 54 巻 621-622 2005

- 杉田昌彦：CD1：結核菌脂質に応答する新しい感染防御システム 免疫と疾患（前篇）・自然・獲得免疫と疾患・ 519-528 2005
- 杉田昌彦：CD1：結核菌感染防御を担う新しい免疫システム 感染症を制御する 87-97 2005
- 杉田昌彦：結核菌脂質に応答する新しい免疫システム 日本医事新報 第 4253 号 25-27 2005
-

Sugita M.: “CD1: A new paradigm for infection control and vaccine development”
International Workshop on Animal Genome Analysis 2005, Tokyo, Japan, Nov. 9, 2005

Sugita M.: “T-lymphocyte recognition of lipid antigens presented by CD1 molecules”
The 12th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Shao Xing, China, Nov. 20-23, 2005

杉田昌彦：「樹状細胞の新しい機能：CD1 分子による脂質抗原提示」 第 16 回日本樹状細胞研究会 特別講演（福岡） 2005 年 7 月 13-15 日

杉田昌彦：「CD1：糖脂質抗原をターゲットにした新しい免疫システム」 第 64 回日本癌学会学術総会 シンポジウム（札幌） 2004 年 9 月 14-16 日

II. Murakami group

Kato, H., Goto, D. B., Martienssen, R. A., Urano, T., Furukawa, K. and Murakami, Y. RNA polymerase II is required for siRNA generation and peri-centromeric heterochromatin formation in fission yeast. *Science* 309, 467-469, 2005

Kohzaki, H. and Murakami Y. Transcription factors and DNA replication origin selection. *Bioessays*, 27, 1107-1116, 2005

加藤太陽、村上洋：RNA ポリメラーゼ と RNAi 依存的ヘテロクロマチン 実験医学 23 巻, 2469-2471 2005

Murakami, Y. RNA polymerase II is required for RNAi-dependent pericentromeric heterochromatin formation. International symposium on “DECODE systems for Biological Responses” Tokyo, Japan Sept. 29, 2005

Murakami, Y. Role of RNA polymerase II in RNAi-dependent heterochromatin formation in fission yeast” International Symposium on “DNA replication and Cell Cycle”, Tokyo, Japan, Oct 10-11, 2005

神崎秀嗣、山口政光：ショウジョウバエ ORC1 (DmORC1) は遺伝子増幅のための染色体複製開始点へ loading する。 第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月。

村上洋太：分裂酵母 RNA ポリメラーゼ はセントロメアヘテロクロマチン形成に必要な siRNA の合成に関与する。 第 78 回日本生化学会大会 シンポジウム 神戸 2005 年 10

月

神崎秀嗣、Maki Asano、山口政光、村上洋太：Drosophila ORC1(DmORC1)は卵形成時に起こるgene amplificationに必須な染色体DNA複製開始点にloadingする。 第78回 日本生化学大会, 神戸、2005年10月

神崎秀嗣：クロマチン免疫沈降用レジンおよびこれを利用したクロマチン免疫沈降法 京大HIOフェア～京都大学の知の活用～（主催：京都大学国際イノベーション機構）
2005年11月9日

村上洋太、加藤太陽：クロマチン制御におけるRNAi第二回クロマチン・フロンティアーズ・ジャパン、京都、2005年11月

神崎 秀嗣、浅野 摩樹、山口 政光、村上 洋太：ショウジョウバエORC1(DmORC1)は遺伝子増幅のための染色体複製開始点へloadingする。第28回 日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

加藤太陽、後藤デレック、Robert Martienssen, 浦野健、古川鋼一、村上洋太 RNAポリメラーゼIIとヘテロクロマチン 第28回 日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

I. 杉田グループ

2004 年 9 月に杉田が着任し、同年 12 月には助手の松永が着任した。CD1・脂質免疫応答の研究を担う新しい研究室のセットアップはまさしくゼロからのスタートであったが、所内外多方面からの協力を得て、ようやく機能的な研究室としての体裁を整えた一年であった。無菌培養室や生化学実験室、さらにモルモットや CD1 トランスジェニックマウスを用いた抗酸菌感染動物実験室の整備も完了し、徐々に成果を挙げつつある。LC や MS システムが手元にないのはまことに不便であるが、学外共同研究者の理解を得て、菌体やがん細胞からの脂質の精製および構造解析もようやく進められるようになってきた。大学院生を受け入れる態勢も整い、2006 年 4 月から、生命科学研究科と医学研究科より数名の大学院生が新たに参加する予定である。

そのようなセットアップ途上の研究室に 2005 年 7 月より加わった京大総合人間学部 4 回生の越智昭仁君は、松永助手のマンツーマンの指導を受け、短期間のうちに *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染モルモットの解析基盤を確立した。そして、MAC 特異的な複合糖脂質である glycopeptidolipid (GPL) を、何ら人工修飾を受けていない天然型として単離精製することに成功し、それを用いて GPL に対する獲得免疫の存在を実証するとともに、その免疫認識エピトープを同定した。このモデルシステムは、今後の CD1 依存性生体防御機構の成立基盤の解析において極めて有用である。

また、CD1 が宿主防御に重要な役割を果たしている反面、脂質に対する過剰あるいは不適切な免疫応答は、アレルギーや自己免疫疾患の発症に繋がるであろうとの視点から、接触皮膚炎やギランバレー症候群の研究を展開し、成果を挙げた。とりわけ、農学研究科森助教授研究室より当研究室にやってきた笹井俊雄君（修士 2 年）は、ダニ由来脂質である α -acaridial を精製し、この物質が接触皮膚炎のアレルゲンとして機能することを実証した。現在、この α -acaridial に対する免疫応答に関わる細胞の同定とその活性化制御法の確立を進めている。

当研究室が目指す、免疫学・細胞生物学・脂質生化学の融合とそれを基盤にした新しい研究領域の開拓ならびに医学への応用は、まだその緒に就いたばかりではあるが、オリジナリティーの高い研究成果が少しずつ得られつつある印象である。

II. 村上グループ

2005 年春に生命科学研究科修士課程を終えた上田は進路を変えて記者として新聞社に、同じく八田は医学研究科の博士課程へとそれぞれ巣立っていった。2 人の新天地での活躍

を祈っている。新しいメンバーは加わることなく、残った総勢 5 名の小世帯でそれぞれの課題に取り組んできた。

そんな中この一年の最大の収穫は大学院生の加藤太陽の研究成果が Science 誌に掲載されたことであろう。加藤は博士後期課程入学後自ら発案したヘテロクロマチン形成に関わる新規変異株のスクリーニングに取り組んできた。よりよいスクリーニング方法の模索や変異株単離後の原因遺伝子のクローニングなど、多くの壁に突き当たりながら、3 年以上にわたり、ねばり強く解析を進めてきた。その結果、セントロメアヘテロクロマチンが特異的に崩壊する変異株のひとつが RNA ポリメラーゼ II のコアサブユニットに変異を持つことを見つけた。この変異は通常の転写にはほとんど影響を与えない。セントロメアヘテロクロマチンは RNAi システムに依存して形成されることが最近わかり、注目を集めているが、加藤の単離した RNA ポリメラーゼの変異株では RNAi システムがうまく機能していないことが判明した。この結果は RNAi システムさらにヘテロクロマチン形成に RNA ポリメラーゼが深く関わることを示した重要な知見であり注目を集めている。さらに、この知見は最近話題の non-coding RNA の機能を考える上でも重要な示唆を与えるだろう。この加藤の成果は改めて、正攻法の遺伝学的アプローチの強みと、研究を進める上でのねばり強さの重要性を教えてくれた。今後、この成果をさらに発展させていきたい。

他のメンバーの研究も着実に進行しつつある。道家はクロマチン構造の維持に重要なヒストンシャペロンの CAF1, ASF1 の解析を続けており、これらの因子がヘテロクロマチンの維持においてそれぞれ独立に機能していることを明らかにしてきた。クロマチン構造の維持機構はまだほとんど未解明であり、道家はその分子機構に迫ろうとしている。また、研究のかたわら、学生を中心としたウイルス研究学会の責任者として奔走し、見事交流会を成功に導いた。研究との両立に悩んだこともあったようだが、この経験は今後生かされるはずである。横山は学部生時代に自分自身が見つけたアカパンカビの DNA 修復関連遺伝子の分裂酵母ホモログの解析を続けてきた。今までの解析結果はこの遺伝子産物が S 期の DNA 損傷の修復に重要な機能を果たすことを示している。特に組み換え修復経路とチェックポイント経路に関連している可能性が強く、ゲノムの安定維持の観点から興味を持たれる。道家、横山ともに博士課程の最終学年を迎えるのでそれぞれ、成果を論文にまとめようと額に汗を流して頑張っている（はず）である。

ポストドクターの神崎は転写因子と染色体複製制御の関連について地道に研究を重ねてきており、その成果をレビューにまとめ発表した。現在は特にゲノムの安定性と複製の関連観点からショウジョウバエの遺伝子増幅システムに興味をもち、その制御機構、特に転写因子による制御に着目して解析を進めている。ショウジョウバエは我々のグループでは初めてのシステムであり、神崎は京都工芸繊維大学の山口研究室、京都大学生命科学研究科の上村研究室さらにノースカロライナ大学の浅野真樹博士の助力を受け、精力的に解析を進めており、興味深い結果が得られつつある。

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 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) Viral FLIP Enhances Wnt Signaling Downstream of Stabilized β -Catenin, Leading to Control of Cell Growth: S. NAKAGIRI, A. MURAKAMI, S. TAKADA, T. AKIYAMA, and S. YONEHARA

Death receptor mediated apoptosis is potently inhibited by viral FLIP (FLICE/caspase-8 inhibitory protein), which is composed of two tandemly repeated death effector domains (DEDs), through reduced activation of procaspase-8. We previously showed that transgenic mice expressing equine herpesvirus 2-encoded viral FLIP E8 in thymocytes exhibit thymic atrophy arising from a reduction of thymocyte number. Transgenic mice with stabilized β -catenin in thymocytes were reported to demonstrate a similar phenotype to that in our E8 transgenic mice. We then analyzed whether E8 acts in the Wnt signaling pathway. E8 was clearly shown to enhance Wnt/ β -catenin signaling in a variety of cell lines. E8 strikingly augmented Wnt3a signaling, as shown both in a luciferase assay for T-cell factor/ β -catenin and through induction of endogenous cyclin D1. The effect of E8 was independent of its direct binding activity with DED-containing signaling molecules, including caspase-8 and FADD, in death receptor-mediated apoptosis. Although a cellular homologue of viral FLIP, long form of cellular FLIP (c-FLIP_L), was reported to enhance stabilization of β -catenin in only 293T cells, E8 enhanced Wnt signaling downstream of stabilized β -catenin in a variety of cell lines. Consequently, co-expression of E8 and c-FLIP_L synergistically increased Wnt signaling in 293T cells. Moreover, E8-mediated stimulation of Wnt signaling induced dramatic growth retardation in untransformed cell lines but not in transformed cell lines. Thus, viral FLIP E8 not only inhibits death receptor-mediated apoptosis but also enhances Wnt signaling pathways that are closely related to those of both ontogenesis and oncogenesis

2) Transforming Growth Factor β -Dependent Sequential Activation of Smad, Bim, and Caspase-9 Mediates Physiological Apoptosis in Gastric Epithelial Cells: M. OHGUSHI, S. KUROKI, H. FUKAMACHI, L.A. O'REILLY, K. KUIDA, A. STRASSER, and S. YONEHARA

Transforming growth factor β (TGF- β) has been implicated in the maintenance of homeostasis in various organs, including the gastric epithelium. In particular, TGF- β -induced signaling was shown to be required for the differentiation-associated physiological apoptosis of gastric epithelial cells, but its mechanism has not been well understood. In this study, the molecular mechanism of TGF- β -induced apoptosis was analyzed in a human gastric epithelial cell line, SNU16, as an *in vitro* model. We examined the effects of overexpressed Smad7 (an inhibitory Smad), Bcl-x_L (an inhibitory molecule to mitochondria-mediated apoptosis), and viral FLIP E8 (an inhibitory molecule to death receptor-mediated apoptosis). Expression of Smad 7, and Bcl-x_L, but not viral FLIP, was shown to prevent TGF- β -induced apoptosis, indicating an exclusive requirement of the activation of Smad signaling pathway and mitochondrial dysfunction followed by activation of caspase-9. In addition, treatment with TGF- β induced binding of Bim, a proapoptotic Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only protein, to Bcl-x_L, which is dependent on the activation of Smad, and reduction in the expression of Bim by RNA interference decreased the sensitivity to TGF- β -induced apoptosis. Moreover, we found abnormalities in the gastric epithelium of both Bim and caspase-9 knockout mice; these abnormalities were associated with a defect of physiological apoptosis in gastric epithelial cells. These results indicate for the first time that TGF- β is involved in the physiological loss of gastric epithelial cells by activating apoptosis mediated by Smad, Bim, and caspase-9.

3) Human T-cell Leukemia Virus Type I Oncoprotein Tax Inhibits Fas-Mediated Apoptosis by Inducing Cellular FLIP through Activation of NF- κ B: K. OKAMOTO, J. FIJISAWA, M. RETH, and S. YONEHARA

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) is an etiologic agent of adult T-cell leukemia and induces autoimmune disease. HTLV-1 was shown to be involved in several autoimmune diseases, and the virus-encoded regulatory protein Tax is known to play a central role in cellular transformation and immortalization during viral infection. Previous analyses of tax transgenic mice suggested that protection of peripheral T-cells from Fas-mediated apoptosis by virus-encoded oncoprotein Tax was relevant to the onset of HTLV-I-induced diseases including autoimmune disease. Here, we show the high level expression of cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein (c-FLIP) in Tax-expressing HTLV-I-infected T-cells. The silencing of c-FLIP expression by a lentivirus-based RNA interference system rendered Tax-positive HTLV-I-infected T-cells sensitive to Fas-mediated apoptosis. Exogenously expressed Tax by using a conditional Cre-loxP-mediated

inducible system also inhibited Fas-mediated apoptosis by up-regulating c-FLIP expression in HTLV-I-negative T-cells. Tax mutant d3 which cannot activate CREB/ATF1, while another M22 mutant which cannot activate NF- κ B did not, suppressed Fas-mediated apoptosis by inducing c-FLIP expression. Furthermore, expression of the dominant negative mutant of either NF- κ B or I κ B α canceled not only c-FLIP expression but also inhibitory activity against Fas-mediated apoptosis by Tax. Inactivation of NFAT, however, did not decrease the expression of c-FLIP in HTLV-I-infected T-cells. Taken together, Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by up-regulating c-FLIP expression in HTLV-I-infected cells, and NF- κ B activity plays an essential role in the up-regulation of c-FLIP.

4) Critical Function of CXC Chemokine Ligand 16 (SR-PSOX) for NKT Cells to Accumulate in The Liver and to Produce Th1 Cytokines: T. SHIMAOKA, K. SEINO, N. KUME, M. MINAMI, T. KITA, M. TANIGUCHI, K. MATUSHIMA, and S. YONEHARA

Chemokines play an important role in leukocyte development, trafficking, and tissue-selective homing. Our isolated transmembrane chemokine SR-PSOX/CXC chemokine ligand (CXCL) 16 is a chemokine expressed on macrophages and DCs, while its receptor CXC chemokine receptor (CXCR) 6 expresses on T and natural killer T (NKT) cells. SR-PSOX/CXCL16 has been shown to mediate chemotaxis and adhesion of CXCR6-expressing cells such as NKT and activated Th1 cells. is a chemokine expressed on macrophages and DCs, while its receptor expresses on T and natural killer T cells. We generated SR-PSOX-CXCL16-deficient mice and examined the role of this chemokine in vivo. The mutant mice showed a selective reduction in the number of liver NKT cells through impaired homing to the liver where SR-PSOX was expressed in CD11c⁺CD1d⁺ dendritic cells. In addition, liver NKT cells were more immature in the mutant mice than wild-type mice. In this context, concanavalin A-induced hepatitis, which development was reported to be dependent on liver NKT cells, was dramatically impaired in the mutant mice. Moreover, administration of α -galactosylceramide (α GalCer), which is a specific ligand to NKT cells, showed that α GalCer-induced production of IFN- γ and IL-4 was attenuated severely and moderately, respectively, in the mutant mice. To validate a hypothesis that SR-PSOX/CXCL16 functions as a costimulatory factor for liver NKT cells to produce IFN- γ , NKT cells, isolated from the liver of wild-type mice, were cultured with isolated CD11c-positive antigen presenting cells (APCs) from the liver of SR-PSOX-deficient and wild-type mice in the presence of α GalCer. NKT cells, derived from wild-type mice, showed impaired production of IFN- γ , but not IL-4, after their culture with the liver APCs from mutant mice and α GalCer. SR-PSOX/CXCL16 plays an important role in not only the homing of liver NKT cells but also the promotion of a Th1-inclined immune response by supporting IFN- γ production by NKT cells.

5) Partial Correction of Abnormal Cardiac Development in Caspase-8-Deficient Mice by Cardiomyocyte Expression of p35. N. YAJIMA, S. YAMADA, T. MORISAKI, S. TOYOKUNI, S. YONEHARA and K. SAKAMAKI

Baculovirus p35 protein protects cells from apoptotic cell death by inhibiting caspase activation. We have established transgenic mouse lines specifically expressing p35 in cardiomyocytes, and primary cardiomyocytes isolated from these mice exhibit resistance to staurosporine-induced apoptosis. In a previous study, we observed defects in heart formation associated with abdominal hemorrhage and cardiomyocyte cell death in caspase-8-deficient animals. In order to better understand the etiology of the cardiac defects and embryonic lethality in caspase-8-deficient mice, we crossed these mice with the p 35 transgenic animals. Although the newly generated mice still died in utero and exhibited some cardiac defects, cardiomyocyte apoptosis was suppressed and ventricular trabeculation was restored. Thus, cardiomyocyte expression of p 35 prevented cell death induced by staurosporine or caspase-8 deficiency. Additionally, our data suggest that caspase-8 plays multiple roles in cardiac development.

6) An Activation Cascade of *Wnt3*, *T (Brachyury)* and *Fgf8* Expression in Mesoderm Induction of Mouse ES Cells: A. MURAKAMI

T (Brachyury), a sequence specific transcription activator, has long been believed to play an important role in mesoderm formation during gastrulation of mouse embryos. Fgf and Wnt signaling pathways were also shown to be essential for the mesoderm induction. In the ES cells differentiated through the embryoid body formation, up-regulation of *T (Brachyury)* expression initiated immediately after the induction of differentiation and ceased by day 6 with a peak at day 4. A similar expression pattern was observed for *Fgf8* and *Wnt3* among Fgf and Wnt family, respectively. Introduction of Wnt3 signal into R1 cells resulted in up-regulation of the *T (Brachyury)* expression. Also, repression of *Wnt3* by RNA interference led to suppression of *T (Brachyury)* expression. Thus, Wnt3 signaling pathway is likely to regulate the expression of *T (Brachyury)*. On the other hand, forced expression of T (Brachyury) activated *Fgf8* expression. Therefore, there seems to be a cascade among Wnt3, T and Fgf8, in which Wnt3 signal activates T expression and, then, the T activates Fgf8 expression.

LIST OF PUBLICATIONS

**Department of Viral Oncology
Laboratory of Tumor Biogenesis**

- Nakagiri S, Murakami A, Takada S, Akiyama T, and Yonehara S. Viral FLIP enhances Wnt signaling downstream of stabilized beta-catenin, leading to control of cell growth. *Mol Cell Biol*, 25: 9249-9258, 2005.
- Ohgushi M, Kuroki S, Fukamachi H, O'Reilly LA, Kuida K, Strasser A, and Yonehara S. Transforming growth factor β -dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 25: 10017-10028, 2005.
- Watanabe K, Okamoto K, and Yonehara S. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. *Cell Death Differ*, 12, 10-18, 2005.
- Yajima N, Yamada S, Morisaki T, Toyokuni S, Yonehara S, and Sakamaki K. Partial correction of abnormal cardiac development in caspase-8-deficient mice by cardiomyocyte expression of p35. *Transgenic Res*. 14:593-604, 2005.
- Kuninaka S, Nomura M, Hirota T, Iida S, Hara T, Honda S, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Marumoto T, Koja K, Yonehara S, and Saya H. The tumor suppressor WARTS activates the Omi / HtrA2-dependent pathway of cell death. *Oncogene*, 24: 5287-5298, 2005.
- Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, and Miyasaka N. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 52: 3004-3014, 2005.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, and Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 175: 2851-2858, 2005.
- Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, Harada M, Watarai H, Wakao H, Ohkohchi N, Yonehara S, Taniguchi M, and Seino K. Cutting edge: Critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol*, 175: 2051-2055, 2005.
- Inaba H, Shimada K, Zhou YW, Ido M, Buck S, Yonehara S, Kaplan J, and Komada Y. Acquisition of Fas resistance by Fas receptor mutation in a childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia cell line, MML-1. *Int J Oncol*, 27: 573-579, 2005.
- Zhuge X, Murayama T, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, and Kita T. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 331: 1295-1300, 2005.
- Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, and Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, 77: 777-786, 2005.
- 米原 伸： 1 枚の写真館 「それは細胞が死んでいるのか？」、細胞工学 Vol.24, No.1, p13, 秀樹社、2005
-

Shin Yonehara. “Death receptor-mediated apoptosis and its signaling molecules” Kyoto University-NUS International Symposium “Regulation of cell fate and cell function”, Singapore, January 27-29, 2005.

Masatoshi Ohgushi, Shunsuke Kuroki, Hiroshi Fukamachi and Shin Yonehara. “”

米原 伸：「Fas誘導細胞死シグナル分子の多様な生理機能」臨床研30周年記念シンポジウム「新しい生命科学の潮流ー臨床研OBを招いてー」、東京都、1月21日、2005

Shunsuke Kuroki and Shin Yonehara. “Double knockout mice of caspase-8 and -9 exhibit complete inhibition of caspase activation but significant elimination of cells during embryogenesis” The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

Iku Sasaki and Shin Yonehara. “Potent enhancement of the neuronal differentiation of PC12 cells by expression of the death receptor Fas” The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

Yohei Kobayashi and Shin Yonehara. “Failure of chromosome condensation in metaphase induces a novel type of cell death through down-regulating the expression of eukaryotic translation elongation factor 1 alpha” The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya, June 16, 2005.

米原 伸：「細胞死から見た生命」生命科学研究科シンポジウム、京都市、7月1日、2005.

米原 伸：「Fas/FADD/FLIPと細胞の増殖・分化」平成17年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、10月17日、2005.

小林洋平、米原 伸：「M期染色体凝縮の異常によってeEF1A1/EF-1 の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される」平成17年 生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎市、10月17日、2005.

小林洋平、米原 伸：「M期染色体凝縮の異常によってeEF1A1/EF-1 の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される」第28回日本分子生物学会、福岡市、12月8日、2005.

中桐志保、村上昭、高田慎治、秋山徹、米原 伸：「 ν -FLIP/E8はWntシグナルを β -catenin 安定化の下流で増強し、それによって細胞増殖を制御する」第28回日本分子生物学会、福岡市、12月9日、2005.

村上昭、Clive Dickson：「マウスES細胞の分化に伴うWnt3シグナルによるBrachyury及びFgf8の発現の活性化」第28回日本分子生物学会、福岡市、12月9日、2005.

今年は、理学研究科修士課程から学振特別研究員までの 8 年間当研究室で研究を行ってきた島岡猛士が東京大学医学研究科の博士研究員（現在は特任助手）として巣立っていった。そして、生命科学研究科修士過程を修了した掃部理央は、ソフトバンク株式会社に就職した。また、博士後期課程二回生の佐々木郁は法律家への転身を決意し、東京大学の法科大学院に入学した。一方、生命科学研究科の修士一回生として桐山真理亜、高田顕徳、高橋涼香、田中喜一、南田佳孝の五名が入学し、修士二回生の黒木俊介が博士後期課程に進学した。秘書として研究室に参加して二年目の中橋直子は、姉御肌的な性格（女子学生にはネエサンと呼ばれている）で大学院学生の姉として、また友人として研究室で存在感を示し続けながら、秘書としての業務を取り仕切っている。また、今年度から米原が 21 世紀 COE プログラムの拠点リーダーとなったので、21 世紀 COE プログラムが生命科学研究科とウイルス研の若手研究者へ提供する英語講座の業務に従事している高村綾子も当研究室に居場所を移し、日々研究室を和ませてくれている。新しい大学院生も多く入学し、米原研も徐々に新しい時代に入りつつあると感じられるが、大学院生とともに成長していく研究室でありたいと願っている。

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 を中心に、主として細胞死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。

大学院生の岡本はレンチウイルスベクターを研究室に導入すると同時に、Cre-loxP システムとレンチウイルスベクターを組み合わせた究極の遺伝子発現誘導システム（発現の漏れ出た細胞を除去するシステムを備えている）を作製した。そして、がん遺伝子 Tax の発現誘導系を用いた解析を行い、Tax の発現のみで NF- κ B の活性化を介して c-FLIP の発現が増強し、これによって Fas 誘導アポトーシスに耐性となることを証明した。

大学院生の大串は、TGF- β が胃上皮細胞に誘導するアポトーシスが Bim の活性化 ミトコンドリア caspase-9 の経路で誘導されることを示していたが、今年度は TGF- β がアポトーシスを誘導しない B 細胞株を用いて、TGF- β が Bim を活性化するアポトーシス誘導シグナル（Samd が支配）と同時に、アポトーシスを阻害するシグナル（JNK が支配）を導入することを明らかにし、その分子機構の解明を目指している。

大学院生の中桐は、Fas を介するアポトーシスを阻害するウイルス由来 FLIP E8 が Wnt シグナルを カテニン蓄積の下流で増強することを見いだしていたが、E8 の発現誘導系を構築することにより、その生化学的解析を可能とした。そして、E8 に会合するタンパク質を共免疫沈降 SDS-PAGE LC-MS/MS 解析（生命科学研究科石川研との共同研究）によって三種類同定し、E8 による Wnt シグナル増強の分子機構の解析を開始している。

小林は「染色体凝集不全 二核細胞の出現 caspase に依存しない新しい細胞死の誘

導」というシステムを、CREB の過剰な活性化、コンデンシンサブユニットの発現低下誘導、DNA トポイソメラーゼ II の活性阻害という異なった方法で構築することに成功し、新しい細胞死誘導のメカニズムを解析している。そして、これらの新しい細胞死はハウスキーピング遺伝子の代表とされる EF-1 (eEF1A1) の発現低下を伴い、CREB 活性化が誘導する細胞死には EF-1 発現低下が必要不可欠であることを示している。

一方、アポトーシスに必要な不可欠の caspase カスケード (開始 caspase である caspase-8 と 9 が実行 caspase である caspase-3 や 7 を切断して活性するカスケード) に関する研究も行っている。中津海は、実行 caspase を RNAi 法でノックダウンすることにより、caspase-3 と 7 の機能の異同を解析し、アポトーシスと呼ばれる表現系には caspase-3 が必要不可欠であるが、caspase-7 のみでも細胞死 (アポトーシスの定義からは外れる) は誘導できることを示している。また、caspase-3 と 7 の両方をノックダウンした時の効果も解析している。黒木は、caspase-8 と 9 のダブルノックアウトマウスの解析と、caspase-9 ノックアウトマウスの遺伝的背景の違いによる表現系の解析を行い、caspase に依存しない発生途中の神経細胞死はマウスの遺伝的背景によって大きく異なることを見いだしている。吉岡は、ヒト T 細胞において caspase-8、caspase-8 に類似の構造を有する caspase-10 (マウスには存在しない) と caspase-8 の活性化に必須とされるアダプター分子 FADD を RNAi 法でノックダウンし、IL-2 産生や NF- κ B の活性化等の異常を含むアポトーシスの誘導とは直接関わらない興味深い表現系を認め、解析を行っている。

大学院生の菊池は、助手の李と、李がアポトーシス実行時に活性化すると同定したプロテインキナーゼ MST1 と MST2 の機能解析を RNAi 法を用いて行っており、MST1 と 2 の発現を抑制すると、細胞周期の進行が G1 期で抑制されることを見だし、さらなる解析を行っている。また、菅沼はインターフェロンの下流で生産されて機能する 2'-5' オリゴアデニル酸の分解酵素の機能を、細胞増殖や細胞死誘導の観点から解析を行っている。

あたらしい修士一回生の研究も簡単に紹介する。我々が Fas シグナルとの関連で見いだした巨大分子 FLASH について、桐山が RNAi 法による細胞レベルでのノックダウンを実行し、非常に興味深い表現系を見いだしている。また、南田は FLASH のプロモーター変異マウスは誕生せず E8.5 にさかのぼっても存在しないことを見だし、FLASH のコンディショナルノックアウトマウスの作製にとりかかっている。高橋は岡本の構築した発現誘導系をさらに優れたものにするための改変を実行すると同時に、Fas と Bim が免疫系での細胞死にどのように関わるかを明らかにする実験系の構築を行っている。高田は、Fas 誘導アポトーシスを Bcl-xL が抑制できる細胞と抑制できない細胞の存在する原因を分子レベルで解明すべく取り組みを始めている。田中は、ヒト神経芽腫由来 SK-N-SH 細胞に Fas を発現させることにより、通常では神経突起伸長を誘導できないレチノイン酸処理によって神経突起の伸長が誘導される系を構築して解析を勧めている。

助教授の酒巻は、Fas・FADD・caspase-8 について様々なモデル生物を用いた解析を試みている。小南と酒巻は Fas を刺激した後の caspase-8 や caspase-3 の活性化を可視化して蛍光顕微鏡下に観察する方法を FLET 法を応用して開発し、caspase-3 と caspase-8 の活

性化を同時に観察することに成功し、解析を続けている。

村上は、マウスの胚発生初期、特に原腸陥入期において、中胚葉が誘導される機構の解明を試みている。胚性幹細胞（ES細胞）の分化を誘導する系を用いて、中胚葉マーカーとして用いられている T (Brachyury) の発現を制御する機構を解析している。特に、FGF 及び Wnt を介したシグナル伝達系の相互の役割に焦点を絞っている。



DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES

Hepatitis C Virus (HCV) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) are causative agents for the development of hepatocellular carcinoma and human T-cell leukemia, respectively. This laboratory aims to clarify the molecular mechanisms of the development of these diseases. In particular, we focused our works to clarify virus-encoded proteins on regulation of cell proliferation. Research work has been extended to analyze the mechanism of virus replication, which may contribute to develop anti-virus agents. In addition to researches related to virus carcinogenesis, we also extended our interests to clarify the roles of post-translational modification on regulation of the protein function.

1) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase

Viruses depend on host-derived factors for their efficient genome replication. Cellular mechanisms utilized for the replication of hepatitis C virus (HCV), a major causative agent of hepatocellular carcinoma, have remained unclear. Here, we demonstrate that a cellular peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin B (CyPB), is critical for the efficient replication of the HCV genome. CyPB interacted with the HCV RNA polymerase, NS5B to directly stimulate its RNA binding activity. Both the RNAi-mediated reduction of endogenous CyPB expression and the induced loss of NS5B binding to CyPB decreased the levels of HCV replication. Thus, CyPB functions as a stimulatory regulator of NS5B in HCV replication machinery. This regulation mechanism for viral replication identifies CyPB as a novel target for anti-viral therapeutic strategies.

2) Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta

Hepatitis C virus (HCV) is one of the major causative agents of liver diseases, such as liver inflammation, fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Using an efficient HCV subgenomic replicon system, we demonstrate that transforming growth factor-beta (TGF-beta) suppresses viral RNA replication and protein expression from the HCV replicon. We further show that the anti-viral effect of this cytokine is associated with cellular growth arrest in a manner dependent on Smad signaling, not mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling. These results suggest a novel insight into the mechanisms of liver diseases caused by HCV.

3) Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059

Translation initiation of hepatitis C virus (HCV) occurs in an internal ribosome entry site (IRES)-dependent manner. We found that HCV IRES-dependent protein synthesis is enhanced by PD98059, an inhibitor of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, while cellular cap-dependent translation was relatively unaffected by the compound. Treatment of cells with PD98059 allowed for robust HCV replication following cellular incubation with HCV-positive serum. Though the molecular mechanism underlying IRES enhancement remains elusive, PD98059 is a potent accelerator of HCV RNA replication.

4) Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors

Hepatitis C virus (HCV) replicon-harboring cell lines possessing interferon (IFN)-resistant phenotypes have recently been established. These were divided into two classes: partially IFN resistant and highly IFN resistant. Here, the viral and cellular factors contributing to the IFN resistance of HCV replicon-harboring cells were evaluated. The results revealed that cellular factors rather than viral factors contributed to a highly IFN-resistant phenotype. The possibility of genetic abnormality of the factors involved in IFN signalling was investigated. As a result, nonsense mutations and deletions in type I IFN receptor genes (IFNAR1 and IFNAR2c) were found in replicon-harboring cells showing a highly IFN-resistant phenotype, but rarely appeared in cells showing a partially IFN-resistant phenotype. Furthermore, similar genetic alterations were also found in IFN-resistant phenotype, replicon-harboring cell lines obtained additionally by IFN-beta treatment. Moreover, it was shown that ectopic expression of wild-type IFNAR1 in IFN-resistant phenotype, replicon-harboring cells possessing the IFNAR1 mutant restored type I IFN signalling.

5) Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region

Increasing evidence has shown that the stem-loop (SL) structures in the NS5B coding region of hepatitis C virus (HCV) function as cis-replicating elements that are indispensable for viral replication. We have investigated whether small RNA molecules analogous to the SL structures could inhibit HCV replication. Reporter assays showed that both in vitro transcribed and pol III-directed transcripts corresponding to 5BSL3.1 and 5BSL3.2 efficiently inhibited HCV replicon-encoded luciferase expression. Mutagenesis studies revealed that mutation in 5BSL3.2 which debilitated its binding to NS5B also abolished the ability of 5BSL3.2 RNA to inhibit HCV replication, suggesting that SL RNA inhibits HCV by sequestering the replication complex.

Further, adenoviral-mediated expression of the SL RNAs potentially blocked the replication of HCV replicon in Huh-7 cells. Importantly, SL RNAs derived from HCV 2a, an evolutionarily distant genotype, were also shown to suppress the replication of HCV 1b replicon in spite of the genetic heterogeneity between the SL elements of the two viruses, implying the potential of SL RNA-based approach to inhibit a wide range of HCV isolates. These results suggest that SL RNA decoys may prove to be useful in the treatment of hepatitis C, which may be advantageous over other sequence-specific gene therapy modalities (such as antisense RNA and siRNA) in preventing the escape of genetic variants.

6) High-throughput screening of low molecular weight NS3-NS4A protease inhibitors using a fluorescence resonance energy transfer substrate

Hepatitis C virus (HCV) NS3-NS4A protease is an attractive target for anti-HCV agents because of its important role in replication. An optimized fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate for NS3-NS4A protease, based on the sequence of the NS5A-5B cleavage site, was designed and synthesized. High-throughput screening of in-house compound libraries was performed using a FRET substrate FS10 (MOCaCDKIVPC-SMSYK-Dnp) and MBP-NS3-NS4A fusion protein. Several hit compounds were found, including YZ-9577 (2-oxido-1,2,5-oxadiazole-3,4-diyl) bis (phenylmethanone) with potent inhibitory activity (IC₅₀=1.6 µM) and good selectivity against other human serine proteases.

7) Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression

We describe here a novel targeting gene therapy strategy to direct gene expression responsive to hepatitis C virus (HCV). The goal was approached by engineering a construct containing the antisense sequence of the transgene and internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus flanked by 5'- and 3'-end sequences of HCV cDNA that contain cis-acting replication elements. Thus, expression of the transgene is only promoted when the minus-strand RNA has been synthesized by the functional replication machinery present in infected cells. Reporter assay and strand-specific reverse transcription-PCR showed selective transgene expression in Huh-7 cells harboring an autonomously replicating HCV subgenome but remaining silent in uninfected cells. Furthermore, using the cytosine deaminase suicide gene as a transgene coupled with recombinant adenovirus delivery, we demonstrated that cytosine deaminase was specifically expressed in replicon cells, resulting in marked chemosensitization of replicon cells to the cytotoxic effects of flucytosine. This new targeting strategy could be extended to other single-stranded RNA viruses encoding the unique RNA-dependent RNA polymerase that has no parallel in mammalian cells.

8) Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture

Hepatitis C virus (HCV) genomic sequences are known to vary widely among HCV strains, but to date there have been few reports on the genetic variations and dynamics of HCV in an experimental system of HCV replication. In this study, a genetic analysis of HCV replicons obtained in long-term culture of two HCV replicon cells (50-1 and 1B-2R1), which were established from two HCV strains, 1B-1 and 1B-2, respectively, was performed. One person cultured 50-1 cells for 18 months, and two people independently cultured 50-1 cells for 12 months. 1B-2R1 cells were also cultured for 12 months. The whole nucleotide sequences of the three independent replicon RNA clones obtained at several time points were determined. It was observed that genetic mutations in both replicons accumulated in a time-dependent manner, and that the mutation rates of both replicons were approximately 3.0×10^{-3} base substitutions/site/year. The genetic diversity of both replicons was also enlarged in a time-dependent manner. The colony formation assay by transfection of total RNAs isolated from both replicon cells at different time points into naive HuH-7 cells revealed that the genetic mutations accumulating with time in both replicons apparently improved colony formation efficiency. Taken together, these results suggest that the HCV replicon system is useful for the analysis of evolutionary dynamics and variations of HCV. Using this replicon cell culture system, it was demonstrated further that neither ribavirin nor its derivative mizoribine accelerated the mutation rate or the increase in the genetic diversity of HCV replicon.

9) Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line

Recently, HCV subgenomic RNA that replicates in vitro in a certain cell line have been elucidated. Since the 5' end of the genome of positive strand RNA viruses is often modified with a cap structure or a covalently linked protein, we have assessed structural feature of the HCV genome obtained from Huh7 cells in which HCV subgenomic RNA has been shown to efficiently self-replicate. METHODS: HCV subgenomic RNA was obtained from the Huh7 and was analyzed for its 5' end. Phosphorylation of the genomic RNA by polynucleotide kinase was observed only after treatment with phosphatase. The labeling efficiency of the genome with polynucleotide kinase was not enhanced by treatment with pyrophosphatase. It is suggested that the 5' end of HCV genomic RNA obtained from HCV replicon cells is not modified except phosphorylation. Furthermore, analysis of the 5' end of the HCV RNA obtained from the HCV subgenome self-replicating cells revealed the presence of two types of subgenomic RNA that contained either guanylate or adenylate at the 5' end. This result indicates that the 5' end of the subgenome in Huh7 cells is redundant and there is no significant evolutionary advantage between

the two genomes.

10) Identification of a novel p300-specific-associationg protein, PRS(phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit 1)

CBP [CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein] and p300 play critical roles in transcriptional co-activation, cell differentiation, proliferation and apoptosis. Multiple transcription factors associate with CBP/p300. With the exception of the SYT oncoprotein, no proteins have been identified that specifically associate with p300, but not CBP. In the present study, we isolated a novel p300-associated protein for which no interaction with CBP was observed by GST (glutathione S-transferase) pull-down assay using Jurkat cell lysates metabolically labelled with [35S]methionine. This protein bound the KIX (kinase-inducible) domain of p300. Following resolution by two-dimensional acrylamide gel electrophoresis, we identified the KIX-domain-bound protein by MS analysis as PRS1 (phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit 1), a protein essential for nucleoside biosynthesis. This is the first report to demonstrate the existence of a p300 KIX-domain-specific-interacting protein that does not interact with CBP. Thus p300 may play a role in the regulation of DNA synthesis through interactions with PRS1.

11) Centrosomal P4.1-associated Protein Is a New Member of Transcriptional Coativators for Nuclear Factor-kB

Nuclear Factor kB (NF-kB) is a transcriptional factor important for various cellular events such as inflammation, immune response, cell proliferation and apoptosis. In this study, we performed a yeast two hybrid screening, using the N-terminal domain of the p65 subunit (RelA) of NF-kB as a bait and isolated Centrosomal P4.1-associated protein (CPAP) as a candidate for RelA-associating partner. GST pull down assay and co-immunoprecipitation experiment followed by western blot also showed association of CPAP with RelA. When overexpressed, CPAP enhanced NF-kB-dependent transcription induced by tumor necrosis factor alpha (TNF-a). Reduction in the protein level of endogenous CPAP by RNA interference resulted in the decreased activation of NF-kB by TNFa. After the treatment with TNFa, the part of CPAP was observed to accumulate in the nucleus, although CPAP was found primarily in the cytoplasm without any stimulation. Moreover, CPAP was observed in the complex recruited on transcriptional promoter region containing NF-kB binding motif. One hybrid assay showed that CPAP has a potential to activate the gene expression when tethered to the transcriptional promoter. These data suggested that CPAP functions as a coactivator of the NF-kB mediated transcription. Since the physiological interaction between CPAP and coactivator CBP/p300 was also seen and synergistical activation of

NF- κ B mediated transcription was achieved by these proteins, CPAP dependent transcriptional activation is likely to include CBP/p300.

12) BCL-3 as a negative regulator of transcription from the HTLV-1 LTR

The Tax encoded by Human T-cell leukemia Virus type-1 (HTLV-1) activates transcription from the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) that contains cyclic AMP responsive element on its promoter through association with cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB). Recently, transducers of regulated CREB activity (TORCs) were identified as a family of CREB co-activators that bind to CREB and enhance CRE-mediated transcription.

We found previously that TORC3, one of TORC family proteins, dramatically enhanced Tax-mediated transcription from the LTR. For this activation, formation of the ternary complex composed of Tax, CREB and TORC3 seems to play an important role. To further clarify the regulatory mechanism of transcription from the LTR, we searched for a cellular factor(s) interacting with TORC3 by a yeast two-hybrid screening system using the N-terminal region of the TORC3 as a bait and identified B-cell chronic lymphatic leukemia protein 3 (BCL-3) as an interacting protein with TORC3. This interaction was confirmed by glutathione S-transferase pull-down assay as well as co-immunoprecipitation experiments followed by Western blot. The ankyrin repeat domain of BCL-3 was shown to interact with TORC3. By using a luciferase assay system, we found that BCL-3 inhibited transcription from the HTLV-1 LTR by TORC3. Furthermore, knockdown of endogenous BCL-3 by RNA interference resulted in enhanced activation of transcription from the HTLV-1 LTR. Co-immunoprecipitation experiments showed association of BCL-3 with HDAC1 and HDAC3. Moreover, treatment with trichostatin A, a potent inhibitor of HDACs, partially reversed this inhibitory effect of BCL-3. These results suggest that BCL-3 functions as a repressor of transcription from the HTLV-1 LTR by recruiting HDAC1 and/or HDAC3. Since we observed that Tax enhanced BCL-3 expression, transcription from the LTR is regulated by positive and negative feedback mechanisms.

13) HTLV-1 HBZ targets c-Jun for proteasomal degradation via ubiquitin-independent pathway

Disruption of transcriptional control of cellular genes by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) is thought to be associated with the development of adult T-cell leukemia (ATL). We have previously reported that a novel viral protein named HTLV-1 bZIP factor (HBZ) suppresses AP-1 activity by two distinct mechanisms. HBZ not only impairs DNA-binding activity of c-Jun, a member of AP-1 family, but also promotes its proteasomal degradation. We further investigated the mechanism by which HBZ destabilizes c-Jun. Most of the proteasomal substrates are targeted for

degradation by the conjugation of polyubiquitin chains. Interestingly, the ubiquitination level of c-Jun was remarkably decreased in the presence of HBZ. HBZ promoted turnover of c-Jun lacking the Δ domain that is essential for its efficient ubiquitination. Furthermore, HBZ promoted degradation of c-Jun in the cells that have a temperature-sensitive E1 ubiquitin-activating enzyme. These results suggest that HBZ targets c-Jun for proteasomal degradation via ubiquitin-independent pathway. The experiments using HBZ deletion mutants revealed that the N-terminal region of HBZ is essential for the destabilization of c-Jun. We think that HBZ recruits c-Jun to the proteasome that directly binds to the N-terminal region of HBZ, resulting in the degradation of c-Jun.

14) Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR

Epigenetic regulation of gene expression is critical in the maintenance of cellular homeostasis. Dysregulation of normal epigenetic transcription occurs in abnormal physiological conditions, such as those seen in cancer cells and cells infected with parasites, making the mechanism underlying abnormal epigenetic transcription of great interest. Gene expression of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is regulated by a viral transcriptional stimulator, Tax. We herein report a novel mechanism of transcription from the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) that is regulated by Tax. In this study, we determined that Tax is able to activate transcription from the LTR, even when it was heavily methylated. In addition, the methyl-CpG-binding domain 2 (MBD2) protein played an important role in Tax-mediated transcriptional activation. We demonstrated the importance of a physical interaction between Tax and MBD2 in enhancing the transcriptional activity of Tax against the methylated LTR. Furthermore, we identified the formation of a protein complex composed of MBD2 and Tax bound to the methylated LTR. We propose a new model of epigenetic regulation by MBD2 acting in concert with a virally encoded transactivator, Tax. Our observation provides insight into the epigenetic regulation of gene expression and the diverse mechanisms of transcriptional regulation using methylated promoters.

15) p21WAF1 modulates NF-kappaB signaling and induces anti-apoptotic protein Bcl-2 in Tax-expressing rat fibroblast

Of the cell cycle-associated genes regulated by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) Tax, cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21WAF1 is upregulated in HTLV-1-infected cells. Previously, we reported that p21WAF1 stimulated Tax-dependent NF-kappaB activation which influences a variety of cellular processes, including proliferation, differentiation, and apoptosis. In HTLV-1-infected cells, Tax is primarily involved in the constitutive activation of NF-kappaB

signaling. Here, we demonstrate that p21WAF1 affects Tax-dependent NF-kappaB signaling by inducing p100/52, an NF-kappaB-related protein. W4, a Tax-transformed rat fibroblast cell line, exhibits the constitutive activation of NF-kappaB signaling, potentially mediated by overexpression of RelB. Ectopic expression of p21WAF1 in W4 cells, which lack endogenous expression due to methylation of the p21WAF1 promoter, induces the expression of p100/52. Bcl-2 expression was also upregulated by ectopic p21WAF1 in this cell line, suggesting that p21WAF1 plays an important role in the regulation of apoptosis by modulating NF-kappaB signaling in Tax-expressing rat fibroblasts. We also address the expression of NF-kappaB-related proteins in HTLV-1-infected cells.

16) HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein

Disruption of transcriptional control of cellular genes by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) is thought to be associated, at least in part, with the development of adult T-cell leukemia. It has been reported that activating protein-1 (AP-1) is dysregulated by HTLV-1 infection. HTLV-1-encoded Tax elevates AP-1 activity through the induction of AP-1 family member gene expression, including c-Jun, JunD, c-Fos, and Fra-1. However, the precise mechanism by which HTLV-1 regulates AP-1 activity remains to be addressed. Recently, a novel viral protein named HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, has been shown to interact with c-Jun and repress c-Jun-mediated transcription by abrogating its DNA-binding activity. In the course of investigating HBZ function, we found that HBZ reduced the steady-state levels of c-Jun, and the levels were restored by treatment with a proteasome inhibitor. Together, this indicates that HBZ promotes c-Jun degradation through a proteasome-dependent pathway. Furthermore, HBZ deletion mutants revealed that both the N-terminal and leucine-zipper region of HBZ were required for the elimination of c-Jun. These results suggest dual effects of HBZ on the suppression of AP-1 activity by inhibiting c-Jun function, which may contribute to the dysregulation of cell proliferation.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Viral Oncology

Laboratory of Human Tumor Viruses

Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., Shimotohno, K.
Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell.* 19(1), 111-122. 2005

- Koyanagi M., Hijikata M., Watashi K., Masui O., Shimotohno K. Centrosomal P4.1-associated Protein Is a New Member of Transcriptional Coactivators for Nuclear Factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 280(13), 12430-12437, 2005
- Murata T, Ohshima T, Yamaji M, Hosaka M, Miyanari Y, Hijikata M, Shimotohno K. Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF- β . *Virology*. 331(2), 407-417. 2005
- Murata T, Hijikata M, Shimotohno K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology*. 340(1), 105-115. 2005
- Takahashi H, Yamaji M, Hosaka M, Kishine H, Hijikata M, Shimotohno K. Analysis of the 5' end structure of HCV subgenomic RNA replicated in a Huh7 cell line. *Intervirology*. 48 (2-3), 104-110. 2005
- Matsumoto J., Ohshima T, Isono O., Shimotohno K. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene*. 24(6), 1001-1010. 2005
- Ego T., Tanaka Y, Shimotohno K. Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene*. 24(11), 1914-1923. 2005
- Akita K., Kawata S., Shimotohno K. P21(WAF1) modulates NF- κ B signaling and induces anti-apoptotic protein Bcl-2 in Tax-expressing rat fibroblast. *Virology*. 332(1), 249-257. 2005
- Abe K., Ikeda M., Dansako H., Naka K., Shimotohno K., Kato N. CDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells. *Virus Res.* 107(1), 73-81. 2005
- Zhang J., Yamada O., Sakamoto T., Yoshida H., Araki H., Murata T., Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region. *Virology*, 342(2), 6-285, 2005
- Kaida A., Ariumi Y., Baba K., Matsubae M., Takao T., Shimotohno K. Identification of a novel p300-specific-associating protein, PRS1 (phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit 1). *Biochem. J.*, 391, 239-247, 2005
- Naka K., Takemoto K., Abe K., Dansako H., Ikeda M., Shimotohno K., Kato N. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.*, 86, 2787-2792, 2005
- Zhang J., Yamada O., Sakamoto T., Yoshida H., Araki H., Shimotohno K. Exploiting cis-acting replication elements to direct hepatitis C virus-dependent transgene expression. *J. Virol.*, 79(10), 5923-5932, 2005
- Kato N., Nakamura T., Dansako H., Namba K., Abe K., Nozaki A., Naka K., Ikeda M., Shimotohno K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.*, 86, 645-656, 2005

Obata Y., Yamamoto K., Miyazaki M., Shimotohno K., Kohno S., Matsuyama. T. Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. J. Biol. Chem. 280(18), 18355-18360, 2005

渡士幸一、下遠野邦忠 抗HCV剤候補探索の現状とそれを用いたHCV複製機構の解析、ウイルス、55(1)、105-110、2005

渡士幸一、下遠野邦忠 HCV増殖のメカニズムとその抑制、C型肝炎ウイルスと生体肝移植、20-23、2005

Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., Shimotohno, K. Association of cyclophilin B with NS5B regulates HCV genome replication., 12th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. October, 2005, Montreal, Canada

Murata T., Hijikata M., Shimotohno K.. Enhancement of IRES-mediated translation and replication of HCV by PD98059. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2005, Montreal, Canada

Koyanagi M., Hijikata M., Watashi K., Masui O., Shimotohno K. Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for Nuclear factor-kappaB. Kyoto-University-NUS International Symposium, 2005, Singapore

渡士幸一、下遠野邦忠：シクロスポリンのC型肝炎ウイルス複製抑制作用．第15回抗ウイルス化学療法研究会、平成17年5月、屋久島

渡士幸一：Anti-HCV activity of Ciclosporin、学術国際シンポジウム・免疫の進化．平成17年8月、東京

渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：宿主細胞におけるC型肝炎ウイルスの動態．第64回日本癌学会学術集会、平成17年9月、札幌

村上善基、下遠野邦忠：肝細胞癌とその周辺部組織におけるmiRNA発現の解析．第64回日本癌学会学術集会、平成17年9月、札幌（ランチョンセミナー）

渡士幸一：C型肝炎ウイルス増殖機構の解明と増殖抑制に重要なこと．第41回日本移植学会総会、平成17年10月、新潟

渡士幸一、石井直人、土方誠、井上大輔、村田貴之、宮成悠介、下遠野邦忠：シクロスポリンを用いたC型肝炎ウイルス複製制御機構の解析．第53回日本ウイルス学会学術集会、平成17年11月、横浜

磯野修、大島隆幸、松本潤、下遠野邦忠：HTLV-1 HBZ蛋白質によるプロテアソーム依存的なc-Jun分解促進機構．第28回日本分子生物学会年会、平成17年12月、福岡

日紫喜隆行、大島隆幸、下遠野邦忠：BCL-3によるHTLV-1 LTRからの転写制御機構の解析

第28回日本分子生物学会年会、平成17年12月、福岡

平成17年度に本研究分野に参加した人は以下の通りである。博士研究員としては村田貴之、高橋 仁、村上善基の三名、大学院学生として、医学研究科大学院3年生の Hussein Ali、同1年生の有元啓一郎、後藤 覚、薬学研究科大学院博士課程3年生の小柳三千代、同2年生の金子央賢、同1年生の磯野 修、同修士課程2年生の井上大輔、神戸宏憲、生命科学研究科大学院同博士課程3年生の宮成悠介、日紫喜隆行、同修士課程2年生の雨宮大晃、同1年生の小西秀幸。実験補助員として梅原典子、ほかに京都大学医学部保健学科学生にきてもらった。職員3名(下遠野邦忠、土方 誠、渡士幸一)と非常勤職員の湯汲まどかと山本佳奈が秘書として研究室の運営を行っている。

研究テーマは、ヒトT細胞白血病ウイルスとC型肝炎ウイルスのウイルス学的な側面からの研究、および感染細胞の増殖変化の分子機構の解析に焦点を当て、分子レベルでの解明を目指している。今年度の研究内容と成果は以下の通りである。

(1) C型肝炎ウイルスに関する研究

一般的にウイルスは宿主由来因子を利用し、自身のゲノム複製を効率化する。しかしながら肝細胞がんの主な原因であるC型肝炎ウイルス(HCV)がどのような宿主メカニズムを利用するのかは不明のままである。今回われわれは宿主 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase である cyclophilin B (CyPB)が、効率よく HCV ゲノムが複製するのに重要であることを証明した。CyPB は HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B と相互作用し、その RNA 結合活性を直接亢進させた。RNAi 法による内在性 CyPB の低下、あるいは NS5B を CyPB と結合しなくさせることによって、HCV 複製レベルが低下した。このように HCV 複製マシナリーにおいて、CyPB は NS5B の促進的な制御因子として働いている。このようなウイルス複製制御メカニズムは CyPB が抗ウイルス治療戦略の新しい標的となることを示している。

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝炎、繊維化、肝硬変、肝臓などの主要な原因となる病原体である。我々は、transforming growth factor-beta (TGF-beta)が HCV レプリコンのウイルス RNA 複製及びウイルスタンパク合成を抑制することを見出した。この抑制は主に、TGF-beta が Smad のシグナルを介して、細胞増殖を抑制することによりもたらされるものであることが示唆された。これらの知見は HCV によって引き起こされる病態のメカニズムの解明に役立つものと考えられる。

C型肝炎ウイルス(HCV)のタンパク翻訳は internal ribosome entry site (IRES)を介しておこなわれる。我々は extracellular signal-regulated kinase (ERK)阻害剤である PD98059 が HCV IRES 依存性タンパク翻訳を増強することを見つけた。患者血清を用いた感染実験において、PD98059 により、HCV RNA 複製も増強することが観察された。以上から、HCV RNA 複製を促進する試薬として PD98059 が使用できることが示唆された。

近年、培養細胞内で複製する HCV サブゲノム RNA の存在が明らかとなった。プラス鎖

RNA ウイルスの 5'末端は Cap 構造の付加や様々なタンパク質の共有結合などの修飾が施されているが、我々は HCV サブゲノム RNA が効率良く自律複製している Huh7 細胞（レプリコン細胞）内の HCV ゲノムの 5'末端構造の特徴について検討を行った。Huh7 細胞内の HCV サブゲノム RNA 5'末端について解析を行った。polynucleotide kinase による HCV ゲノムの 5'末端へのリン酸化標識は、phosphatase による脱リン酸化処理を行った後にのみ示された。Polynucleotide kinase によるリン酸化標識は、pyrophosphatase 処理を行っても増強されることはなかった。HCV レプリコン細胞内の HCV ゲノム RNA 5'末端はリン酸化以外の修飾は存在しないことが示唆された。さらに、レプリコン細胞内の HCV ゲノム RNA 5'末端解析から、その 5'末端がグアニル酸またはアデニル酸から成る二種類の HCV ゲノム RNA が存在することが示された。このことから Huh7 細胞内のサブゲノムの 5'末端は重複しており、この二つのゲノムの間では進化的に優性な差はないということが示された。

（２）転写因子に関する研究

NF- κ B は、免疫、炎症反応、細胞増殖など様々な生理活性に関連する重要な転写因子である。今回、我々は NF- κ B の転写制御機構の詳細を明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法により NF- κ B の 1 つのサブユニットである p65(RelA)の N 末端領域と相互作用する細胞性因子のスクリーニングをおこなった。その結果、Centrosoma P4.1-associated protein (CPAP)が候補物質の一つとして得られた。CPAP は中心体に存在するタンパク質 centrosomal P4.1 と相互作用するタンパク質として単離されたものであるが、一方、STAT5 と相互作用して STAT5 を介した転写に促進的に働くことが既に報告されている。まず、我々は RelA と CPAP とのタンパク質間の相互作用を GST-pull down assay と免疫沈降法により確認した。CPAP の強制発現により TNF α 刺激に応じた NF- κ B の転写活性が上昇したこと、また、内在性の CPAP のタンパク質レベルを RNAi によって減少させることにより NF- κ B の転写活性が減少したことから、CPAP は NF- κ B による転写活性化の促進に機能することが示唆された。CPAP は主に細胞質に存在することが既に報告されているが、MCF-7 細胞においては、TNF α 刺激により、CPAP の細胞内局在が細胞質から核へと移行する現象が観察された。さらに、DNA/タンパク質複合体免疫沈降法により、CPAP は TNF α 刺激下で RelA と共に NF- κ B の標的プロモーターにリクルートされていることが示唆された。また、One hybrid アッセイにより、CPAP は転写プロモーターの近傍に存在する時に転写を促進する活性をもつことがわかった。これらの結果は、CPAP が RelA と相互作用し、NF- κ B による転写活性化を促進するコアクチベータとして働いていることを示すものである。さらに CPAP は CBP/p300 と相互作用し、この両者が NF- κ B による転写活性化の上昇に相乗的に作用することが示された。このことから CPAP のもつ転写を促進する機能に CBP/p300 が関与していることが予想される。

（３）ヒト T 細胞白血病ウイルスに関する研究

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(Human T-cell Leukemia Virus type1:HTLV-1)の LTR からの

転写活性化には、自身のゲノム上にコードされる転写活性化因子 Tax と宿主細胞内の転写因子 cyclic-AMP response element binding protein (CREB)との相互作用が重要である。近年、CREBの転写コアクチベーターとして Transducer of regulated CREB (TORC) が見いだされ、CREBによる転写を正に制御することが明らかにされた。

我々は昨年、TORC3はTaxとともにLTRからの転写を相乗的に増強することを報告した。そこで今回TORC3を介したHTLV-1 LTRからの転写活性化機構の詳細を解析する為に、TORC3をbaitにyeast two-hybrid法を用いて新規相互作用因子を探索した。その結果、B-cell chronic lymphatic leukemia protein3(BCL-3)を同定した。GST pull-down assay、免疫沈降法により解析した結果、BCL-3はTORC3のN末端側に存在するcoiled-coil domainを含む領域を介して結合する事が示された。レポーターアッセイにより、BCL-3はTORC3によるLTRからの転写を負に制御した。さらに、siRNAにより内在性のBCL-3の発現量を低下させると、LTRからの転写は優位に亢進した。また、免疫沈降法により解析したところ、BCL-3とHDAC1,3との相互作用が示された。さらにHDACs阻害剤であるトリコスタチンAを処理するとBCL-3による転写抑制が軽減された。以上の結果はHTLV-1 LTRからの転写制御にBCL-3はHDAC1,3をリクルートすることによって抑制的に作用している可能性を示唆する。

成人T細胞白血病(ATL)の発症には、ウイルス蛋白質による宿主の転写制御機構の破綻が重要であるとされる。我々は、HTLV-1 プロウイルスゲノムの相補鎖にコードされるHBZ (HTLV-1 bZIP factor)がAP-1 ファミリー転写因子の一つであるc-Junと直接相互作用し、c-JunのDNA結合能を阻害するのに加え、プロテアソームによる分解を促進するという二重の抑制作用を持つことを報告してきた。今回我々は、HBZによるc-Junの分解促進機構についてさらに解析を行った。一般的に転写因子はポリユビキチン化を介してプロテアソームによる分解を受けることでその産生量が制御されているが、興味深いことに、HBZによりc-Junのユビキチン化は顕著に抑制された。すなわちHBZによるc-Junの分解促進がユビキチン非依存的な機構により調節されている可能性が示唆されたため、この点についてさらに検討を行った。HBZは、ユビキチン化に必須とされる d 領域を欠失したc-Jun変異体に対しても分解促進作用を示した。またユビキチン活性化酵素E1 が温度感受性を示す細胞を用いて、ユビキチン化反応が阻害される条件下における解析でもHBZによりc-Junの分解が促進されたことから、HBZがユビキチン非依存的にプロテアソームを介したc-Junの分解を促進していることが示された。またこの分解促進作用にはHBZのN末端領域 60 アミノ酸が必須であった。この分解促進機構として、HBZがN末端領域で直接プロテアソームと結合し、c-Junをプロテアソームにリクルートしているという仮説をたてて現在解析を進めている。

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- 1) Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2 in Antiviral Innate Immunity: M.YONEYAMA, M.KIKUCHI, K.MATSUMOTO, T.IMAIZUMI, M.MIYAGISHI, K.TAIRA, E.FOY, Y-M.LOO, M.GALE JR., S.AKIRA, A.KATO and T.FUJITA**

The cellular protein retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) senses intracellular viral infection and triggers a signal for innate antiviral responses including the production of type I IFN. RIG-I contains a domain that belongs to a DExD/H-box helicase family and exhibits an N-terminal caspase recruitment domain (CARD) homology. There are three genes encoding RIG-I-related proteins in human and mouse genomes. Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5), which consists of CARD and a helicase domain, functions as a positive regulator, similarly to RIG-I. Both proteins sense viral RNA with a helicase domain and transmit a signal downstream by CARD; thus, these proteins share overlapping functions. Another protein, LGP2, lacks the CARD homology and functions as a negative regulator by interfering with the recognition of viral RNA by RIG-I and MDA5. The nonstructural protein 3/4A protein of hepatitis C virus blocks the signaling by RIG-I and MDA5; however, the V protein of the Sendai virus selectively abrogates the MDA5 function. These results highlight ingenious mechanisms for initiating antiviral innate immune responses and the action of virus-encoded inhibitors.

- 2) Functional analyses of RIG-I RNA helicase: R. HIRAI, M. YONEYAMA and T. FUJITA**

To characterize RIG-I as a helicase enzyme, we produced recombinant RIG-I protein (rRIG-I) using Baculo virus vector and insect cells and purified to homogeneity. rRIG-I protein was tested for its binding ability to double stranded (ds) RNA, ATPase activity and unwinding activity of dsRNA (helicase activity). Our results demonstrate for the first time that RIG-I exhibits ATPase and helicase activities both dependent on dsRNA. We also generated a panel of anti RIG-I monoclonal antibodies using rRIG-I as antigen. The antibodies recognize epitopes present various parts of RIG-I molecule, thus are useful probe for structure-functional studies of RIG-I.

- 3) Regulation of RIG-I gene expression by IFN: K. NAKAMURA, M. YONEYAMA and T. FUJITA**

RIG-I gene is highly inducible by IFN treatment, however its molecular mechanism is poorly understood. We determined mRNA start site of RIG-I gene by primer extension and S1 mapping analyzes. Then we cloned genomic fragment encompassing start site and 5' non-coding region of RIG-I mRNA to analyze its transcriptional activity using reporter gene. The fragment confers IFN-dependent activation of the reporter gene and we identified several interferon stimulation response elements (ISRE) within the cloned fragment. We are introducing point mutations at the candidate ISRE to delineate cis-regulatory elements.

4) Regulation of interferon lambda genes: K. ONOGUCHI, M. YONEYAMA, S. AKIRA, T. TANIGUCHI, and T. FUJITA

Viral infection triggers innate immune responses such as production of interferon (IFN) and other proinflammatory cytokines. A novel cytokine IFN- λ (IFN- λ 1, IFN- λ 2, and IFN- λ 3), which is distantly related to type I IFN, is induced by viral infection and show antiviral activities. However, IFN- λ expression mechanisms are not well understood.

We investigated the involvement of several signaling regulators known to play key roles in virus-induced activation of type I IFN (α and β) genes. Transcription factor IRF-3 is ubiquitously expressed as its inactive form and upon viral infection, IRF-3 is converted to active form through phosphorylation of specific serine residues by the regulatory kinases TBK-1 and IKK-i. Cells defective either IRF-3 or TBK-1 exhibited impaired expression of IFN- λ 2 gene in response to Newcastle disease virus (NDV). Recently identified CARD-containing helicase family, RIG-I and MDA5, act as sensing molecules for replicating viral RNA in cells and trigger signals to result in the activation of IRF-3. We examined the role of these helicases by gain and loss of function experiments. The results strongly suggest the involvement of RIG-I and MDA5 in the activation of IFN- λ 1 and IFN- λ 2 genes in NDV-infected human cells. These results show that irrespective of distinct evolutionary origin, IFN- λ genes share regulatory mechanisms with type I IFN genes.

5) Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling: E. FOY, K.LI, R.SUMPTER JR. , Y-M.,LOO, C. L. JOHNSON, C.WANG, P.FISH, M.YONEYAMA, T.FUJITA , and M.GALE JR.

Hepatitis C virus (HCV) is a major human pathogen that infects 170 million people. A hallmark of HCV is its ability to establish persistent infections reflecting the evasion of host immunity and interference with alpha/beta-IFN innate immune defenses. We demonstrate that disruption of retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) signaling by the viral NS3/4A protease contributes to the ability of HCV to control innate antiviral defenses. RIG-I was essential for virus or HCV RNA-induced signaling to the IFN-beta promoter in human hepatoma cells. This signaling

was disrupted by the protease activity of NS3/4A, which ablates RIG-I signaling of downstream IFN regulatory factor 3 and NF-kappaB activation, attenuating expression of host antiviral defense genes and interrupting an IFN amplification loop that otherwise suppresses HCV replication. Treatment of cells with an active site inhibitor of the NS3/4A protease relieved this suppression and restored intracellular antiviral defenses. Thus, NS3/4A control of RIG-I supports HCV persistence by preventing IFN regulatory factor 3 and NF-kappaB activation. Our results demonstrate that these processes are amenable to restoration through pharmacologic inhibition of viral protease function.

6) Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response: H.KATO, S.SATO, M.YONEYAMA, M.YAMAMOTO, S.UEMATSU, K.MATSUI, T.TSUJIMURA, K.TAKEDA, T.FUJITA, O.TAKEUCHI and S.AKIRA

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in antiviral response by recognizing viral components. Recently, a RNA helicase, RIG-I, was also suggested to recognize viral double-stranded RNA. However, how these molecules contribute to viral recognition in vivo is poorly understood. We show by gene targeting that RIG-I is essential for induction of type I interferons (IFNs) after infection with RNA viruses in fibroblasts and conventional dendritic cells (DCs). RIG-I induces type I IFNs by activating IRF3 via IkappaB kinase-related kinases. In contrast, plasmacytoid DCs, which produce large amounts of IFN-alpha, use the TLR system rather than RIG-I for viral detection. Taken together, RIG-I and the TLR system exert antiviral responses in a cell type-specific manner.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics And Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

- Saito, T., Yamamoto M., Miyagishi, M., Taira, K., Nakanishi, M., Fujita, T., Akira, S., Yamamoto, N. and Yamaoka, S. A20 is a negative regulator of interferon regulatory factor 3 signaling. *J. Immunol.*, 174: 1507-1512, 2005
- Sumpter Jr., R., Loo, Y-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. and Gale Jr., M. A cellular RNA helicase, RIG-I, determines permissiveness to hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.*, 79: 2689-2699, 2005
- Foy, E., Li, K., Sumpter Jr., R., Loo, Y-M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P., Yoneyama, M., Fujita, T., and Gale Jr., M. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of RIG-I signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2986-2991, 2005
- Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., Fujita, T., Hiscott, J. and

- Meurers, E.F. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C expression and restoration of signaling by IKKe. *J. Virol.*, 79: 3969-3978, 2005
- Ida-Hosonuma, M., Iwasaki, T., Yoshikawa, T., Nagata, N., Sato, Y., Sata, T., Yoneyama, M., Fujita, T., Taya, C., Yonekawa H. and Koike, S. The type I interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virol.*, 79: 4460-4469, 2005
- Taima, K., Takanashi, S., Okumura, K., Imaizumi, T., Kumagai, M., Ishikawa, A., Yoshida, H., Satoh, K. and Fujita, T. Double-stranded RNA stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in beas-2b bronchial epithelial cells. *Exp. Lung Res.*, 31: 361-375, 2005
- Imaizumi, T., Kumagai, M., Taima, K., Fujita, T., Yoshida, H., Satoh, K. Involvement of RIG-I in IFN-g/STAT1 signaling pathway in BEAS-2B cells. *Eur. Resp. J.*, 25: 1077-1083, 2005
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity*, 23: 19-28, 2005
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Yoneyahara, S., Kato A. and Fujita, T. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.*, 175: 2851-2858, 2005
- 米山光俊、藤田尚志：細胞内ウイルス認識に関与する RIG-I ヘリカーゼファミリー。 実験医学, 23: 1519-1524, 羊土社, 2005
- 小野口和英、藤田尚志：細胞内受容体によるウイルス感染の認識機構。 実験医学増刊, 23: 2673-80, 羊土社, 2005
- 尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：RNA ヘリカーゼ RIG-I によるインターフェロン系の制御。 実験医学増刊, 23: 3061-3066, 羊土社, 2005
- 米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染に応答した自然免疫誘導のメカニズム。 Annual Review 免疫 2006, 182-189, 中外医学社, 2005
- 渡辺信昌、藤田尚志：ウイルス感染を検知する細胞内受容体 RIG-I。 Molecular Medicine 臨時増刊号・免疫 2006, 42: 212-221, 中山書店, 2005

-
- Yoneyama, M. and Fujita, T. The CARD-containing DExD/H box RNA helicase, RIG-I, plays an essential role in innate antiviral responses. Keystone symposium “Innate Immunity”, 2005.1.10, Steamboat Springs, Colorado USA
- 藤田尚志：抗ウイルス自然免疫機構を制御する新規RNAヘリカーゼRIG-I ファミリー。 ウイルス研究所セミナー, 2005.1.17, 京都
- 藤田尚志：ウイルス感染のセンサーRIG-Iと抗ウイルス自然免疫。 第8回肝臓分子生物学研究会, 2005.1.18, 京都

- 藤田尚志：抗ウイルス自然免疫機構を制御する新規RNAヘリカーゼRIG-I ファミリー. 第14回東京免疫フォーラム, 2005.5.10, 東京
- 藤田尚志：ウイルス感染のセンサーRIG-Iとその臨床応用の可能性. 国際BIOエキスポ, 2005.5.20, 東京
- 藤田尚志：抗ウイルス自然免疫機構と細胞生理制御. 第73回東京医科大学免疫アレルギー研究会（特別講演）, 2005.5.23, 東京
- Ida-Hosonuma M., Iwasaki T., Yoshikawa T., Nagata N., Sato Y., Sata T., Yoneyama M., Fujita T., Taya C., Yonekawa H. and Koike S. Type I interferon response is an important determinant of poliovirus tissue tropism. The XIIIth Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, 2005.5.27, Lunteren Netherlands
- 米山光俊、菊池美香、松本夏苗、今泉忠淳、宮岸 真、多比良和誠、Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., 米原伸、加藤篤、審良静男、藤田尚志：ウイルス感染に応答したIFN遺伝子発現誘導に關与するRNAヘリカーゼファミリー. 第70回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（ワークショップ）, 2005.7.20, 京都
- 小野口和英、米山光俊、審良静男、谷口維紹、藤田尚志：Interferon-lambda is regulated by IRF-3 and TBK-1. 第70回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2005.7.20, 京都
- Yoshikawa T., Ida-Hosonuma M., Iwasaki T., Nagata N., Sato Y., Sata T., Yoneyama M., Fujita T., Taya C., Yonekawa H. and Koike S. Role of type I interferon in tissue and cell tropism of poliovirus. The XIIIth International Congress of Virology, 2005.7.26, San Francisco California USA
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T. Induction of IFN Gene Expression by Virus Infection: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Invited Speaker), 2005.9.7, Awaji, Hyogo Japan
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T. Induction of IFN Gene Expression by Virus Infection: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2. The 2005 International Symposium on DECODE System for Biological Responses, 2005.9.29, Tokyo
- 米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染に応答したIFN遺伝子発現誘導に關与するRIG-Iヘリカーゼファミリー. 第78回日本生化学会大会, 2005.10.19, 神戸
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T. Induction of IFN Gene Expression by Virus Infection: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2. The 2005 Annual Meeting of International Society for Interferon and Cytokine

research (Symposium), 2005.10.22, Shanghai China

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T. Induction of IFN Gene Expression by Virus Infection: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2. The 18th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology (II) (Invited Speaker), 2005.10.27, Shonan Village Center, Kanagawa Japan

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y-M., Gale Jr., M., Akira, S., Kato A. and Fujita, T. Induction of IFN Gene Expression by Virus Infection: Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicase RIG-I, MDA5 and LGP2. International Cytokine Society Conference 2005 (Symposium), 2005.10.29, Seoul Korea

米山光俊、菊池美香、松本夏苗、今泉忠淳、宮岸 真、多比良和誠、Eileen Foy Yueh-Ming Loo、Michael Gale, Jr.、審良静男、米原 伸、加藤 篤、藤田尚志：ウイルス感染に応答した自然免疫誘導に関与する RNA ヘリカーゼファミリー．第 28 回日本分子生物学会年会（ワークショップ），2005.12.9，福岡

小池 智、吉河智城、細沼美樹、岩崎琢也、藤田尚志、米山光俊：ポリオウイルスの感染特異性を支配する宿主因子．第 28 回日本分子生物学会年会（ワークショップ），2005.12.9，福岡

長年の研究成果にもかかわらず、新興ウイルスの出現などによりウイルス感染症は現在もなお大きな社会問題になっている。ウイルス感染に対する生体防御は、主として我々の免疫系によって行なわれる。免疫は、感染の初期に発動して感染を抑制する自然免疫と、その後に誘導されてくる獲得免疫からなるが、このうち自然免疫は、感染に対する特異性は低いものの、感染初期の速やかなウイルス排除、さらに獲得免疫に調節という意味において、我々の生体防御において非常に重要な役割を果たしている。従って、そのメカニズムの解明は、ウイルス感染症対策に必要不可欠である。また自然免疫機構は、細胞の異常な増殖（癌化）を抑制する働きのあることも古くから知られている。この抗ウイルス自然免疫において中心的な役割を果たしているのが、I 型インターフェロン系である。インターフェロンは、ウイルス感染に応答して一過的に発現誘導されるサイトカインであり、その作用によって細胞内に強力な抗ウイルス活性、細胞増殖抑制作用がもたらされる。また、T 細胞などによる獲得免疫の調節においても重要な機能を持つことが知られている。我々はインターフェロンの発現制御機構の解析を通じて、ウイルス感染を細胞内で感知し、自然免疫反応を開始するための重要な蛋白質である retinoic acid inducible gene (RIG)-I を発見し、報告した。その後の解析から、RIG-I が抗ウイルス作用のスイッチ分子として重要な機能を持つことが明らかになってきている。本研究では、RIG-I を中心にした自然免疫誘導機構についての基礎的な研究を行い、その仕組みを明らかにすると共に、さらにそれを応用して、従来の抗ウイルス製剤、抗癌剤とは全く異なった着想による革新的な薬剤の開発を目指した解析を行う。

本年度は、第一に、抗ウイルス活性の誘導における分子メカニズムの解析を行った。第二に、RIG-I のノックアウトマウス並びに RIG-I を人為的に機能させることが出来るマウスを開発し、自然免疫の活性化による抗ウイルス、抗癌作用の動物個体レベルでの研究を目指した解析を行った。これらの成果は自然免疫機構の活性化の診断、さらには効果判定、副作用の検討等の重要な情報として製剤開発に重要である。第三に、自然免疫活性化によるウイルス増殖や細胞増殖の抑制の仕組みについての解析を行った。第四に、遺伝子工学により大量に RIG-I 蛋白質を調製し、RIG-I の活性化を *in vitro* で検出する方法を確立した。この実験系を用いて、RIG-I によるウイルスの検知機構を明らかにすると共に、各種薬剤の大規模スクリーニングを行い、抗ウイルス製剤、抗癌剤の基礎となる化合物を得ることが可能になる。以下に本年度の研究成果についてその詳細を示す。

1. RIG-I とそのファミリー分子の機能解析

RIG-I は N 末に caspase recruitment domain (CARD) を二回繰り返してもつ RNA ヘリカーゼ分子である。これまでの解析から、ウイルス感染後にウイルスの複製によって細胞内に蓄積する二重鎖 RNA (dsRNA) を、RIG-I のヘリカーゼドメインで検知し、ヘリカーゼの ATPase 活性を介した分子内構造変化によって、CARD を介してインターフェロン遺伝子など

の誘導シグナルを伝達することを明らかにしてきた。しかし、哺乳類細胞にはさらに二つ RIG-I と高い相同性を示すヘリカーゼ分子が存在する。ひとつは、RIG-I と同様に二つの CARD をもつ MDA5 であり、もう一つは CARD を持たないヘリカーゼ LGP2 である (図 1)。本年度は、これら RIG-I ファミリー分子群についての機能解析を行った。まず始めに、MDA5 のシグナル伝達能について、培養細胞を用いた機能解析を行った。その結果、MDA5 は RIG-I とほとんど同様のシ

グナル伝達機能を持つことが明らかになった。従って、細胞内には二つのウイルスセンサー分子が存在することになる。次に、RIG-I と MDA5 の関係を明らかにするために、それぞれの発現を RNA

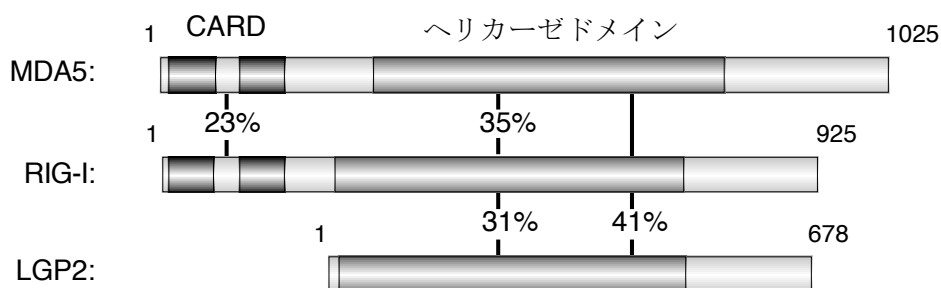


図 1 RIG-Iファミリー分子

interference (RNAi) の手法によって抑制する実験を行ったところ、ウイルス感染によるシグナルが共に部分的に抑制されたことから、両者が独立して同一のシグナルを伝達していることが示唆された。しかし、RIG-I と MDA5 の発現様式の違いや、認識するウイルス dsRNA の違いによって使い分けが行われている可能性もあり、今後より詳細な機能解析が必要であると考えている。一方、LGP2 は、細胞に発現させるとウイルス感染に応答したシグナルが強く抑制された。従って、LGP2 は負の調節因子として RIG-I/MDA5 シグナルの抑制に関与していることが示唆された。ここで重要なことは、これら RIG-I ファミリーの遺伝子はいずれも IFN シグナルでその発現が誘導される、いわゆる IFN 誘導遺伝子 (ISG) である点である。すなわち、ひとたび IFN 産生が起きると、これらの分子の発現が強く誘導され、RIG-I/MDA5 によるシグナルが増強されると共に、LGP の負的作用によって IFN シグナルの一過性が調節されていることが予想された。ヒト RIG-I 遺伝子については、その発現に関与するゲノム領域の解析を行い、IFN による発現誘導に必須なプロモーター/エンハンサー領域の同定を行っている。

一方、多くのウイルスは宿主細胞の自然免疫系を抑制する機能をもつ独自のタンパク質を発現することが知られている。マイナス鎖 ssRNA ウイルスであるパラミクソウイルス科に属するウイルス群 (麻疹ウイルス、センダイウイルスなど) は、その非構造タンパク質である V タンパクが MDA5 に直接結合することによって、MDA5 を介したシグナルを特異的に抑制することが示されている。V タンパクの RIG-I シグナルに対する影響を検討したところ、RIG-I には全く影響を与えなかったことから、細胞は二つの独立したシグナル分子を持つことでパラミクソウイルスの感染に対抗していることが示唆された。それとは対照的に、プラス鎖 ssRNA ウイルスである C 型肝炎ウイルスの非構造タンパク質 Nonstructural

protein (NS) 3/4A プロテアーゼは、RIG-I/MDA5 両者によるシグナルを抑制することで、自らの増殖を有利にしていることが明らかになった。この場合、RIG-I/MDA5 の下流のアダプター分子である IPS-1 が限定分解され、シグナルが抑制されることがわかってきている。このような RIG-I/MDA5 シグナルの抑制機構は、今後様々なウイルスについて報告されてくることが予想される。一方で、我々の自然免疫系は、IFN によって誘導される種々の ISG の作用によってウイルスの増殖を強力に抑制することから、ウイルス感染細胞では、IFN 系によるウイルス増殖の抑制とウイルスタンパクによる自然免疫の抑制が常に競合しており、そのバランスがどちらにシフトするかによって、ウイルス感染症の悪化と治癒が大きな影響を受けることが想像できる (図 2)。

2. RIG-I ノックアウトマウスの作製と解析

大阪大学微生物

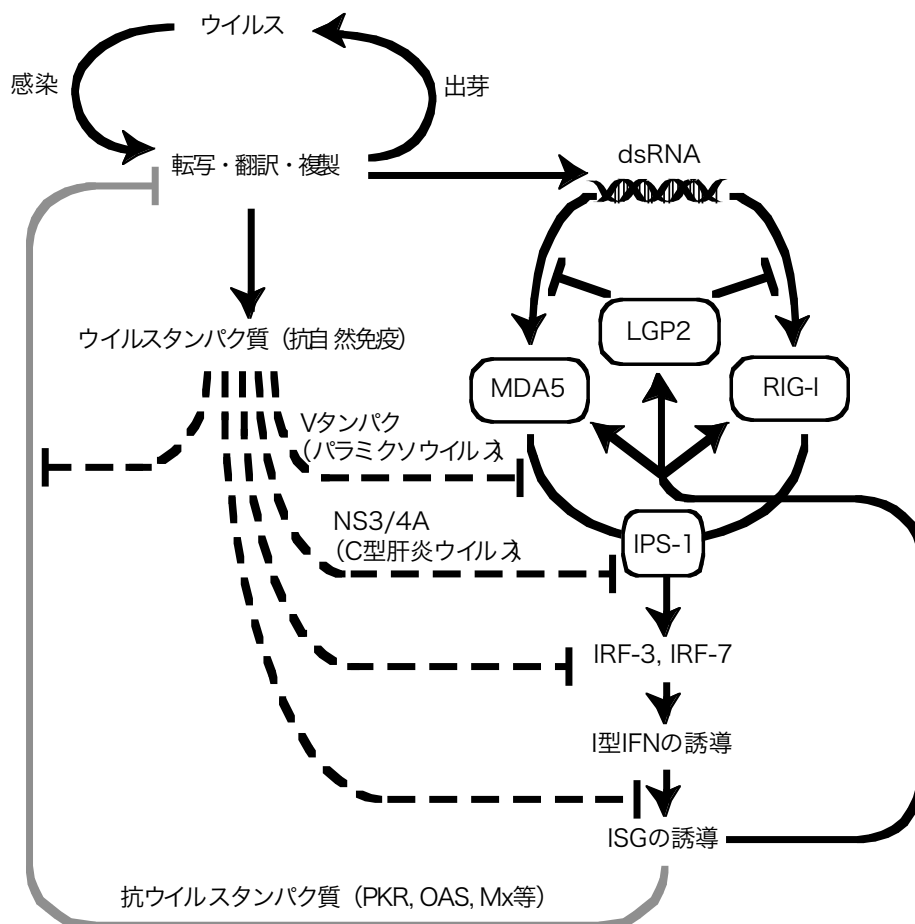


図 2 ウイルス増殖と自然免疫

研究所・審良静男教授のグループとの共同研究で、RIG-I 遺伝子のノックアウトマウスの作製と解析を行った。RIG-I ノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞では、ウイルス感染による IFN の発現が強く抑制されていたことから、これまでに培養細胞で明らかにしてきた RIG-I の機能が動物個体レベルでも実証された。一方、免疫担当細胞である樹状細胞 (DC) は、これまで Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる細胞外受容体により感染を検知し、IFN などを産生することで獲得免疫の調節に関与することが知られていた。しかし、DC のうち conventional DC (cDC) と呼ばれる細胞群における IFN 産生も RIG-I ノックアウトマウスにおいて著しく抑制されていたことから、免疫系細胞においても RIG-I が重要な機能を担っていることが明らかになった。しかし、強力な IFN 産生細胞として知られる形質細胞様 DC (pDC) においてはむしろ RIG-I シグナルではなく、TLR シグナルが重要であることも明らか

になったことから、二つの異なったウイルス認識機構が、細胞種の違いによって異なって機能していることがわかってきた。今後は、同様にMDA5、LGP2についてもノックアウトマウスを通じた機能解析を行うことにより、RIG-I ファミリーの生体内での機能解析を進めてゆきたい。

3. RIG-I シグナルを人為的に誘導する実験系の開発

RIG-I シグナルはウイルス感染によって誘導されることから、上記したようにウイルス由来のタンパク質の影響を大きく受ける。従って、RIG-I シグナルを正確に理解するためには、ウイルス感染なしにシグナルを誘導できる実験系が必要であると考えた。本年度は、それを目指した実験系の確立を目指した検討を行ってきた。未発表であるためその詳細な内容については控えさせていただくが、これまでの解析から、人工的にRIG-I シグナルを細胞などに導入する実験系確立に成功している。この実験系用いRIG-I シグナルの動物個体レベルでの生理的な意義をさらに詳細に解析するために、トランスジェニックマウスの作製を進行中である。本研究は、疾患モデル開発センターの多屋長治研究員、設楽浩志研究員、石井里絵研究員、マイクロアレイ室の石川雄一郎研究員（現がん生活習慣病等PT）の支援を受けて行っている。

4. RIG-I を介したシグナルによる細胞増殖抑制機構の解析

ウイルス感染によるシグナルは、感染細胞の増殖抑制や細胞死を誘導することが知られているが、その分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。本年度は、上記した人工的なRIG-I シグナル導入実験系を用い、細胞機能への影響について解析を行った。種々の培養細胞において、RIG-I シグナルを人為的に導入した際の、既知の細胞周期制御、細胞死誘導などに関連する分子の挙動について詳細に解析を進行中である。

5. RIG-I の *in vitro* での活性化検出系の開発

RIG-I は dsRNA と結合して活性化されるが、その分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。RIG-I による核酸の認識とその活性化機構を検討するため、*in vitro* でのRIG-I 活性化検出システムの確立を目指した解析を行った。その結果、バキュロウイルスの系で大量に発現させたRIG-I タンパク質を部分精製し、そのATPase活性を測定することにより、RIG-I の活性化を検出できることが明らかになった。これまでの解析から、実際に *in vitro* の実験系においても、dsRNA 特異的にRIG-I が活性化されること、その時、RIG-I はdsRNA に直接結合していることなどが明らかになっている。今後、さらにRIG-I 活性化を誘導する核酸構造とその分子メカニズムを明らかにすると共に、将来的にRIG-I シグナル活性化をターゲットとした抗ウイルス、抗腫瘍作用を持つ新規薬剤の開発を目指した大規模スクリーニングへと進行させてゆきたいと考えている。

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

In the eukaryotic cells, two types of separation have taken place. First, the genes are separated by introns into multiple exon pieces that should be joined together. Second, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule.

1) Identity elements in mRNA export: K. MASUYAMA, I. TANIGUCHI, H. FUKUE and R. IWANO

Different RNA species are exported from the nucleus by distinct mechanisms. Among the different RNA species, major splicesomal U snRNA precursors and mRNAs share some similarities. They are both transcribed by RNA polymerase II, and both initially acquire m7G-cap structure. In addition, in both cases, there are no conserved internal RNA sequences required for nuclear export. Despite these similarities, export of these two RNAs is mediated by different factors. U snRNAs are exported by cooperation of CBC, PHAX, CRM1 and RanGTP, whereas export of mRNAs does not require these factors but depends upon the REF and TAP proteins. Thus there must be distinguishing features of U snRNAs and mRNAs that are recognised by these cellular factors. In this research project, we perform a systematic search for identity elements used in export of mRNAs. To do this, we transplant one by one the features of mRNAs into U1snRNA, and look for elements of mRNA that makes the U1 RNA behave like an mRNA in nuclear export process. We previously found that an mRNA-type intron is such an identity element. We also searched for splicing-independent identity elements and found that RNA length is an important determinant of RNA export pathway (K. MASUYAMA). We are searching for the factors that may recognize the RNA length in RNA export process (I. TANIGUCHI).

Thus identity elements used to distinguish different RNAs have been searched in terms of the properties embedded in the RNA molecules themselves. The concept of RNA identity elements however could be broader than our thoughts so far. We have speculated that export pathway of an RNA might be influenced by which class of RNA polymerase (I, II or III) has been used to transcribe the RNA. In order to test this hypothesis, we prepared a number of artificial gene sets in which promoters were exchanged, so that certain class of RNA, e.g. UsnRNA, is transcribed by each of the three classes of RNA polymerases, and these gene sets were microinjected into the nucleus of *Xenopus laevis* oocytes. (H. FUKUE and R. IWANO).

2) A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates RNA export from the nucleus: S. KITAO

The trafficking of major spliceosomal U snRNAs between the nucleus and cytoplasm is indispensable for their maturation in metazoa. PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export) is the key regulator of U snRNA export complex assembly. PHAX is phosphorylated in the nucleus and exported as a component of the U snRNA export complex to the cytoplasm, where it is dephosphorylated. PHAX phosphorylation is essential for export complex assembly whereas its dephosphorylation causes export complex disassembly. Thus PHAX is subject to a compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation cycle that contributes to the directionality of U snRNA transport. This is reminiscent of the RanGTP/GDP cycle during the nucleocytoplasmic trafficking, e.g. the export receptors can interact with cargoes only in the nucleus in the presence of RanGTP and release them in the cytoplasm upon GTP hydrolysis. It is very likely that the activity of PHAX is needed in broader context of biological process. In fact, PHAX has recently been reported to be involved in the intra-nuclear transport of a subset of small nucleolar RNAs. In spite of such importance, neither the essential phosphorylation sites of PHAX nor the kinase/phosphatase that contribute to the compartmentalized system have been clarified. Such knowledge should help to understand the biogenesis of cellular RNA molecules in general. We are in the process of obtaining the results in this direction.

3) Analysis of intron-degradation pathway: R. YOSHIMOTO and N. KATAOKA

In higher eukaryotes, most genes in the nucleus have introns. Genes are first transcribed as pre-mRNAs and become mRNAs by removal of introns. In human, more than 95% region of the pre-mRNAs are the introns that are removed by splicing as a lariat form. Excised introns remain in the nucleus and are subject to degradation after the debranching reaction. Without this degradation process, lariat-form introns will accumulate in the nucleus and remain bound to splicing factors. The intron accumulation prevents splicing factors from the recycling for another round of splicing reaction and may also cause a shortage of the nucleotides that are to be supplied from the degraded introns. Therefore, the intron degradation is thought to be a crucial process for higher eukaryotic cells. However, relatively little is known about this process and only a few factors were identified.

The goal of our research is to elucidate the molecular mechanism of the intron degradation and recycling of splicing factors by isolating intron-degradation complexes. As a candidate to isolate the complexes, we chose two factors that have been suggested to be involved in the intron degradation process. These are hDBR1, a debranching enzyme, which mediates debranching reaction of the lariat introns and hPrp43, an RNA helicase-like protein. The RNA-protein complexes containing

Flag-tagged hDBR1 or hPRP43 will be isolated and analyzed.

4) RNA metabolism in M-phase: H. KIRIU and M. KITABATAKE

In eukaryotes, mRNAs are transcribed from the genome as pre-mRNAs, which usually contain non-protein coding introns. The pre-mRNAs are then processed (5' capping, 3' poly (A) tailing, intron splicing, etc.) in the nucleus to produce mature mRNAs. Only fully processed mature mRNAs are recognized by the nucleocytoplasmic transport machinery and actively transported to the cytoplasm. In the classical view, the protein synthesis occurs in the cytoplasm exclusively. Therefore, the site of translation and the site of mRNA production (transcription and mRNA processing) are physically separated by the nuclear envelope. However, this separation is lost in M-phase when the nuclear envelope is broken down. We are interested in what happens to the nuclear and cytoplasmic RNAs when the nucleus and cytoplasm are mingled in M-phase.

5) Novel RNA quality control mechanisms: A. MIYATA and M. KITABATAKE

How the eukaryotic cells deal with non-functional RNA molecules that have been either mutated or damaged? We are searching for novel RNA quality control mechanisms in both mammalian and yeast cells.

6) mRNA transport in the neurite: K. NINOMIYA and N. KATAOKA

Some specific mRNAs are transported in the neurite, and locally translated in the synapsus. We are studying this process from the point of view that the EJC components should be involved.

7) New functions of RNA binding proteins: S. AKIYAMA, C. HATAI and N. KATAOKA

To elucidate novel cellular functions of PHAX, a UsnRNA export factor and Y14/Magoh heterodimer, cEJC components, we are screening interacting proteins with these factors by the yeast two-hybrid system.

8) Comprehensive expression analysis of human small RNA molecules: A. MCCLOSKEY and M. KITABATAKE

More than 300 miRNAs have been identified in human. We are undertaking a comprehensive

expression analysis of human small RNAs in order to identify the candidates that may regulate cell growth and cell cycle. We also expect that we might be able to identify novel small functional RNAs other than miRNA.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Biochemistry

- Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R., Sasakawa, C.(2005)
Shigella effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF(35) to modulate host immune responses. Biochemical and Biophysical Research Communications. 333(2):531-539.
- Nameki, D., Kodama, E., Ikeuchi, M., Mabuchi, N., Otaka, A., Tamamura, H., Ohno, M., Fujii, N., and Matsuoka, M. (2005)
Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. J. Virol. 79, 764-770.
- Ninomiya, K., Ishimoto, T., Taguchi, T. (2005)
Subcellular localization of PMES-2 proteins regulated by their two cytoskeleton-associated domains. Cell Mol Neurobiol. Aug; 25(5):899-911.
- 片岡直行：mRNA スプライシング - 遺伝子発現の中核過程 - 実験医学 23:1890-1895 (2005)
-

Masuyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M. : RNA length defines RNA export pathway. KYOTO UNIVERSITY-NUS INTERNATIONAL SYMPOSIUM Regulation of cell fate and cell function, Singapore, January 27-29, 2005

大野睦人：RNA 核外輸送の多様性とその制御機構．千里ライフサイエンスシンポジウム「RNA 機能研究の最先端」大阪、2005 年 2 月 15 日

秋山 慎太郎、片岡 直行、大野 睦人：mRNA 核外輸送因子 Aly/REF と UsnRNA 核外輸送因子 PHAX との相互作用．特定領域研究「RNA 情報網」第 3 回サテライトミーティング、三重、2005 年 5 月 9-11 日

Fuke, H., Ohno, M. : Effect of Transcription in the Discrimination of Different RNA Species. 10th Annual Meeting of the RNA Society, Banff, Canada, May 24-29, 2005

大野睦人：RNA 核外輸送における多様性と制御．大阪大学フロンティアバイオサイエンスコロキウム生命機能研究科 第 12 回研究交流会、大阪、2005 年 7 月 13 日

Masuyama, K., Taniguchi, I. and Ohno, M. : RNA length defines RNA export pathway. Shirokane International Symposium, Tokyo, Japan, July 22-23, 2005

Kataoka, N., and Ohno, M. : Analysis of hDBR1 protein that is involved in the post-splicing intron

turnover. Eukaryotic mRNA Processing. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, August 24-28, 2005

片岡直行：mRNA プロセッシングと輸送．インビトロジェン シンポジウム 第2回「バイオサイエンスの最先端」神奈川、2005年9月1-3日

大野睦人：Identity elements in mRNA export．国際シンポジウム「細胞核機能の分子スイッチ Ran と細胞周期」兵庫、2005年10月2日

大野睦人：RNA 核外輸送における RNA・たんぱく質複合体のリモデリング．2005 年たんぱく質関連領域合同シンポジウム、大阪、2005年11月15日

Kataoka, N：Analyses of the factors that are involved in the post-splicing recycling pathways. 12th East Asia Symposium-From Molecules to Cells, Shao Xing, China, November 20-23, 2005

福家浩之、大野睦人：3'末端形成は mRNA としての目印を RNA 上に付加する．第28回日本分子生物学会、福岡、2005年12月8日

福家浩之、大野睦人：3'末端形成は mRNA としての目印を RNA 上に付加する．第2回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2005年12月16日

真核細胞では原核細胞と比較して二種類の分断化が昂進している。細胞は核膜により細胞核と細胞質という二つの区画に分断化され、遺伝子はイントロンによって分断化されている。高分子化学研究分野の大野睦人教授の研究室では、以上のような真核生物固有の細胞構造や遺伝子構造に起因する遺伝子発現の分子機構を RNA をキーワードとして研究している。

大野研究室には、2人の助手（片岡・北畠）、3人の博士研究員（増山・北尾・二宮）、3人の博士後期課程大学院生（福家・谷口 D2、芳本 D1）、5人の修士課程大学院生（秋山・霧生・畑井・宮田 M2、マクロースキー M1）、1人の4回生（岩野）が在籍する。

1）核外輸送における mRNA の ID エLEMENTの探索（増山・谷口・福家・岩野）

真核細胞の核内では様々な種類の RNA 種が合成され、その多くは細胞質へと核外輸送される。核外輸送される主要な RNA には、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA)、ウリジンに富む核内低分子 RNA (U snRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA) などが挙げられるが、これらの RNA はそれぞれの RNA 種に固有の輸送因子群によって核内で結合された後、細胞質へと輸送される。興味深い事に、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（細胞質における RNA の輸送・局在化、翻訳、RNA の安定性、など）をも規定することが明らかになってきた。つまり、異なる種類の RNA 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。我々は、特に mRNA に焦点を絞り、核内で mRNA が mRNA として識別される特徴（mRNA の ID エLEMENT）の全貌を解明し、さらにそれらの ID エLEMENTを識別するトランス因子群を明らかにすることを目指している。

現在までに、1. RNA がイントロンを持ちそれがスプライシングにより除去される事、あるいは、2. 強固な二次構造を取らない約 300 塩基長以上の RNA 領域を持っている事、の2つの特徴が mRNA の ID として機能する事を明らかにしてきた（Ohno et al., *Molecular Cell*, 2002; Masuyama et al., *Genes Dev.*, 2004）。

上の2の結果は、細胞の中の何らかのたんぱく質因子が、核外輸送の際に RNA の長さを感じ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（谷口）。

核外輸送における RNA のアイデンティティーを決定しているのは、RNA 側の特徴だけ

ではないかも知れない。プロモーター配列が転写される RNA の ID に影響するか否かという問題は興味深い。プロモーター配列は、RNA がどのタイプの RNA ポリメラーゼによって転写されるかを規定し、さらに場合によっては、転写された RNA 上に結合するタンパク質因子をも規定する。mRNA や UsnRNA や rRNA など様々な RNA 遺伝子間で、プロモーター領域をスワップしたようなキメラ遺伝子を作成し、上記の系を用いて、異なるプロモーターから転写された RNA の ID が変化するかどうかを解析している（福家・岩野）。

さらに mRNA の他の ID エlementを探索している。mRNA の特徴となっているような配列を UsnRNA に移植し、RNA 微量注入法を用いて検定する。ポリ A 配列、ESE、IRES などを検定している（増山）。

2) コンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システム（北尾）

高等真核生物において、mRNA スプライシングの主要因子である一群の核内低分子 RNA（UsnRNA、U1、U2、U4、U5 などの総称）は、核内で合成された後まず細胞質に輸送される。大野らの以前の研究により、この核外輸送において（少なくとも）5 種類の蛋白質因子が UsnRNA と共に核外輸送複合体（export complex）を形成し核膜孔を通過することが分かっている。これらの中でも PHAX（phosphorylated adaptor for RNA export）と名付けられた RNA 結合タンパク質はリン酸化による活性制御を受け、RNA 核外輸送複合体の形成に中心的な役割を果たす事が分かっている。PHAX は核内でリン酸化され、export complex の一部として細胞質に移動し、そこで脱リン酸化を受ける。PHAX のリン酸化は export complex の形成に必須であるのに対して、その脱リン酸化は export complex の解体を引き起こす。つまり、PHAX はコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化のサイクルを繰り返し、そのことが、RNA の核外輸送の方向性を規定しているのである。この結果は新たな問題を生じることになった。まず、PHAX の重要なリン酸化部位はどこか？また、そのリン酸化がいかにして PHAX の活性を制御するのか？さらに、このようなコンパートメント特異的なリン酸化・脱リン酸化システムを構築・維持するためには、核に局在化するリン酸化酵素（キナーゼ）と細胞質に局在化する脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）の存在が仮定されるが、それらの分子の実体は何か？本研究では、これらの疑問を明らかにしてゆきたい。

3) イントロンの代謝機構の解明（芳本・片岡）

ヒトの場合、mRNA 初期転写物のうち実に 95 パーセント以上はスプライシングによりイントロンとして切り出される。切り出されたイントロンは核内に留まり、スプライシング因子が除かれた後、ラリアット構造が解消され（debranching）分解されると考えられて

いる。この過程が機能しない場合、ラリアット型イントロンがスプライシング因子を結合したまま核内に蓄積するので、スプライシング因子や、イントロン分解により再利用されるはずのヌクレオチドが、不足するなどの問題が起こると考えられる。このようにイントロンの代謝機構は高等真核生物にとって重要な過程であるが、ほとんど解析されていない。

我々はスプライシング反応後に生じるイントロン・スプライシング因子複合体を解析し、核内で起こるイントロンの代謝機構を分子レベルで解析したいと考えている。そのために、イントロンの debranching に関わる hDBR1 と RNA ヘリカーゼ様因子 hPrp43 を選んだ。タグを付けたこれらのたんぱく質を培養細胞で発現させ、これらのたんぱく質が標的とするイントロン・スプライシング因子複合体の単離・同定を試みている。また、イントロン配列自体に RNA のタグを付け、イントロン・スプライシング因子複合体を直接単離する事も試みている。

4) 細胞分裂期における RNA 動態 (霧生・北畠)

真核生物の遺伝子発現において、mRNA はまず染色体からイントロンを含んだ前駆体 (pre-mRNA) として転写され、核の中でプロセシング (5'キャップ構造の付加、3'ポリ A 構造の付加、イントロンの除去) を受けた後に、能動輸送によって核外へと輸送され、蛋白質合成の鋳型となる。古典的な実験によれば蛋白質合成の場は細胞質に限局されており、mRNA プロセシングが行われる核内と蛋白質合成が行われる細胞質は、核膜によって物理的に分画されていると考えられている。しかしながら、高等動物細胞の分裂前中期においては核膜は崩壊し、核内構造物と細胞質が混じり合う。真核細胞が原核細胞的になるこの時期に RNA に何が起こるかを総合的に解析する。

5) 新規 RNA 品質管理機構の探索 (宮田・北畠)

真核細胞は突然変異や傷害によって機能を持たなくなった RNA 分子をどう処理するのだろうか? まず、手始めに rRNA に着目し、哺乳類培養細胞と出芽酵母を材料に、分子遺伝学と生化学の手法を用いて新規な RNA 品質管理機構を探ろうとしている。

6) 神経細胞における mRNA の神経突起中の輸送機構 (二宮・片岡)

特定の mRNA は神経突起中を輸送されシナプス等で局所的に翻訳される事が分かっているが、その分子機構は不明な点が多い。我々は、この過程における EJC 構成成分の関与という視点から、この現象を研究している。

7) RNA 結合タンパク質の新規細胞機能 (秋山・畑井・片岡)

UsnRNA 核外輸送因子 PHAX (秋山) や EJC 構成成分 Y14・Magoh ヘテロ二量体 (畑井) と相互作用する因子を酵母 2・ハイブリッド法でスクリーニングすることにより、これらの因子の新規な細胞機能についての手掛かりを得る。さらに、相互作用因子に欠失や点突然変異を導入し、相互作用への影響を解析する。

8) ヒト低分子 RNA の発現解析 (マクロスキー・北畠)

現在までに約 300 種類のヒト miRNA が同定されているが、それらの発現パターンを網羅的に解析することにより細胞増殖制御に関わる可能性のあるものを洗い出す。また、miRNA 以外の新規機能性低分子 RNA の同定も試みる。

DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

1) Interactions of hREV1 with three Y-family DNA polymerases: E. OHASHI, T. HANAFUSA, K. KAMEI, H. OHMORI

Mammalian cells have multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis (TLS), which include the four Y-family DNA polymerases (Pol η , Pol ι , Pol κ and hREV1) and some others such as Pol ζ (belonging to B-family) and Pol θ (belonging to A-family). Pol η , Pol ι and Pol κ were shown to interact with PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), a sliding clamp to increase the processivity of many DNA polymerases including Pol δ , one of the replicative DNA polymerases. Most of PCNA interacting proteins possess so-called PIP-box, the consensus sequence of which is represented by Q-x-x-(I, L, M)-x-x-F-F (x is any kind of amino acid). In fact, Pol η and Pol κ have a sequence similar to the consensus sequence at the extreme C-terminus. Recently, we and other groups have shown that Pol κ , Pol ι and Pol η interact with a C-terminal region of hREV1. This finding suggests that hREV1 plays a central role in the TLS events *in vivo*. In contrast to that PCNA binding site has a consensus sequence as described above, no obvious consensus sequence was found among the three DNA polymerases for hREV1 binding.

In order to obtain a closer insight into the question of how the three DNA polymerases interact with hREV1, we localized the hREV1-binding region of Pol κ using yeast 2-hybrid (Y2H) assay. Our results revealed that only 16 amino acids ranging from 560 to 575 of Pol κ are sufficient for hREV1-interaction. Furthermore, by alanine scanning mutagenesis, we showed that both of the two phenylalanine residues at 567 and 568 are indispensable for the interaction. The two consecutive phenylalanine (FF) residues are found to be important for the hREV1-interaction also in the cases of Pol η and Pol ι , thus suggesting that hREV1-interaction occurs by a common mechanism among the three DNA polymerases. A 17-mer peptide containing the hREV1-binding region of Pol κ (the above 16 amino acids plus the N-terminal cysteine residue) competitively inhibited *in vitro* binding between hREV1 and Pol κ , while a similar peptide containing AA instead of the FF motif did not. Moreover, it turned out that the FF motif and a structure (probably β -strand structure) directed by the following several amino acids are important for hREV1 binding. This is in a sharp contrast to that for PCNA binding, some conserved residues exist at the N-terminal side of FF in the PIP-box.

Next, we examined whether or not the hREV1-interaction might be essential for the *in vivo* Pol κ function, taking advantage of the fact that Pol κ -deficient mouse embryonic fibroblast (MEF)

cells show a moderate UV-sensitivity. We observed the recovery of the UV resistance by transiently expressing GFP-Pol κ in the Pol κ -deficient MEF cells, but not when we transiently expressed GFP alone or a mutant GFP-Pol κ carrying the FF567-578AA substitution that disrupts the hREV1-interaction. Thus, our results indicate that the interaction with REV1 is essential for *in vivo* Pol κ function, although the exact biological meaning of the interaction remains to be clarified.

2) Interaction between hREV1 and hREV7, the non-catalytic subunit of Pol ζ : T. HANAFUSA, E. OHASHI, Y. MURAKUMO¹, Y. MASUDA², and H. OHMORI (¹Nagoya University, ²Hiroshima University)

Pol ζ , one of multiple DNA polymerases involved in translesion synthesis, is composed of two subunits; the hREV3 catalytic subunit and the hREV7 accessory subunit of unknown function. The hREV3 catalytic subunit has a strong similarity in the primary sequence to Pol δ , a replicative DNA polymerase, but it lacks an intrinsic 3'-5' exonuclease activity and is therefore devoid of proof-reading function. While other TLS polymerases belonging to Y-family are able to insert a base opposite a damaged template base, Pol ζ is unable to do so in most species of DNA lesions and is believed to function as an extender when Y-family enzymes cannot continue DNA synthesis further after the insertion reaction. The accessory subunit hREV7 exhibits a significant homology to hMAD2 (=hMAD2A) that is involved in the spindle checkpoint (MAD stands for Mitotic Arrest Defective), so that hREV7 is alternatively called hMAD2B (also referred to as hMAD2L2 or hMAD2 \square). In fact, *Xenopus laevis* REV7 was shown to specifically bind and interact with Cdh1-APC (Anaphase Promoting Complex), paralleling the effect of MAD2 on Cdc20. Thus, it seems that hREV7 plays a critical role in linking translesion synthesis to cell cycle regulation. Moreover, hREV7 was shown to interact with a C-terminal region of hREV1 (approximately 100 amino acid residues). Recently, we and other groups have reported that the same C-terminal region of hREV1 interacts also with Pol κ , Pol ι and Pol η .

To investigate how hREV1 interacts with many other proteins, we examined the structural requirements of hREV1 for the binding to hREV7 or Pol κ . The results obtained with yeast two-hybrid assay indicated that deletions from the C-terminus of hREV1 caused different effects on the binding to hREV7 or Pol κ . Deletion of the two amino acid residues from the hREV1 C-terminus almost completely abolished the hREV7-binding activity, while deletion of the 8 residues from the C-terminus did not significantly affect the activity to bind to Pol κ . The hREV1-binding sites in Pol η , Pol ι and Pol κ share FF motif in common; however, FF is not found in the entire hREV7 sequence. We examined various synthetic peptides derived from the

hREV1-binding sites of Pol κ , Pol ι and Pol η for the hREV1-binding by surface plasmon resonance. Our results indicated that the peptide containing the hREV1-binding sequence of Pol κ has a higher affinity than those containing a similar sequence of Pol η or Pol ι . We are planning to further investigate the interactions of the C-terminal region of hREV1 with hREV7 and hPol κ by multiple approaches including structural analyses of the complexes.

3) The comparison of the interaction between Y-family DNA polymerases and PCNA: K. KAMEI, E. OHASHI, T. HANAFUSA and H. OHMORI.

Human cells have multiple TLS enzymes including the four Y-family Pols (Pol κ , Pol η , Pol ι , and hREV1). There seems a high degree of specificity in their lesion-bypass properties despite overall similarities in the basic structures among the Y-family polymerases. Some of TLS enzymes are able to bypass a particular lesion whereas others are efficient only at the inserting step of lesion bypass. Such functional divergence means that cells have a special mechanism by which Y-family polymerases are properly recruited to a lesion site. Recently, it has been shown that PCNA, which is known to tether various DNA polymerases to the primer-template terminus of growing DNA chain, undergoes post-translational modifications when DNA is damaged. Importantly, mono-ubiquitination of PCNA by the Rad6 (E2, Ubiquitin Conjugation Enzyme)-Rad18 (E3, Ubiquitin Ligase) complex was shown to be required for Pol η to exert its function. Indeed, Pol η and Pol ι were recently shown to interact with Ubiquitin, and Pol κ and hREV1 were suggested to contain similar Ubiquitin-binding motif(s). Furthermore, Rad18 was shown to directly interact with Pol η .

In this study, we first examined interactions of Pol κ , Pol η , and Pol ι with PCNA, Ubiquitin and Rad18 by yeast two-hybrid assay. While Pol η and Pol ι showed similar activities to interact with all the three proteins, Pol κ showed a weak interaction with PCNA but no detectable level of interaction with Ubiquitin or Rad18. Then, to study the interaction of PCNA with Pol κ , Pol η , and Pol ι in a quantitative way, we adopted surface plasmon resonance (SPR) method to measure the dissociation constants (K_d) between PCNA and peptides containing the PCNA-binding sequence (PIP-Box) from each of the three Pols. While Pol ι has the PCNA binding sequence at an inside region (420-KKGLIDYY-427 in the total 715 residues), Pol η and Pol κ have the PIP-box sequence at the extreme C-terminus; 702-QTLESFFKPLTH-713 (the PIP-box sequence is underlined; 713 is the last residue) for Pol η and 862-KHTLDIFFK-870 (870 is the last residue) for Pol κ . The K_d values thus obtained indicated that Pol ι has the strongest affinity to PCNA (Pol ι , 677 nM; Pol η , 2.21

□M; Polk, not detected). Our further analysis revealed that the sequence present at the C-terminal side of the PIP-box sequences significantly influences the PCNA-binding affinity. The Polk peptide containing the additional four amino acids (PLTH) at the C-terminus showed a K_d value (4.94 □M), which is comparable to that of Polη peptide, and the Polη peptide lacking the C-terminal four amino acids (thereby mimicking the Polk peptide) exhibited no detectable PCNA-binding activity. Because the PCNA-binding sequence was shown to be critical for nuclear focus formation of Polι in DNA-damaged cells, we examined how such alterations at the C-terminus in Polk and Polη could affect nuclear focus formation in cells. GFP-Polk(+PLTH) showed a significant level of focus formation and co-localization with PCNA under no-stressed conditions, similarly as GFP-Polη did. In contrast, neither GFP-Polk nor GFP-Polη(-PLTH) showed very low levels of focus formation in non-damaged cells. These results seem to explain why Polη is more preferentially recruited to the replication machinery with or without DNA damages than Polk.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics and Molecular Biology

Laboratory of Genetic Information Analysis

- Shimizu T, Azuma T, Ishiguro M, Kanjo N, Yamada S, Ohmori H.: Normal immunoglobulin gene somatic hypermutation in *Polk-Polι* double-deficient mice. *Immunol Lett.* 9: 259-264, 2005.
- Bi X, Slater DM, Ohmori H, Vaziri C.: DNA Polymerase κ is specifically required for recovery from the benzo[*a*]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* 280: 22343-22355, 2005.
- Jaloszyński P, Ohashi E, Ohmori H, Nishimura S.: Error-prone and inefficient replication across 8-hydroxyguanine (8-oxoguanine) in human and mouse *ras* gene fragments by DNA polymerase κ. *Genes Cells.* 10: 543-550, 2005.

-
- Ohashi, E., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohmori, H.: Interactions between hREV1 and three Y-family DNA polymerases. The 5th 3R symposium, 兵庫、11月13 ~ 17日、2005
- Ohashi, E., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohmori, H.: Interactions between hREV1 and three Y-family DNA polymerases. The 22nd Radiation Biology Center International symposium, 京都、11月21 ~ 22日、2005

Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Murakumo, Y., Ohmori, H.: Interactions of three Y-family DNA polymerases with hREV1 and PCNA. The 22nd Radiation Biology Center International symposium, 京都、11月21～22日、2005

大橋英治、花房朋、亀井恵二郎、大森治夫：Y-ファミリーDNAポリメラーゼのREV1との相互作用に関わるモチーフ配列、第28回日本分子生物学会、福岡、12月7～10日、2005

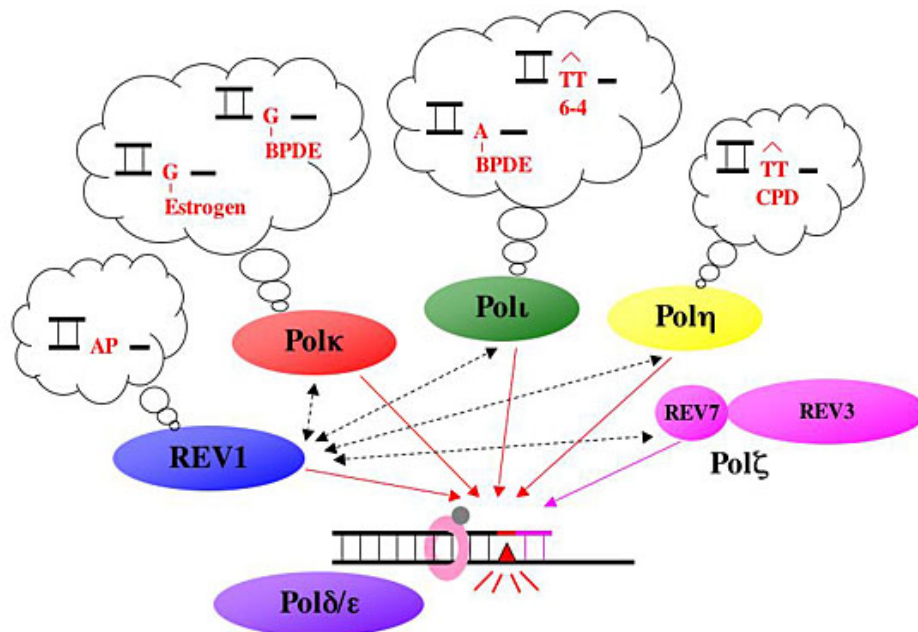
花房朋、大橋英治、村雲芳樹、大森治夫：損傷乗り越え合成に関わるhREV1のhREV7, hPolkとの相互作用の解析、第28回日本分子生物学会、福岡、12月7～10日、2005

楊サンサン、近藤雄二、赤木純一、大橋英治、大森治夫、益谷央豪、花岡文雄：ヒトDNAポリメラーゼ η はリボヌクレオチドを重合する活性を持っている、第28回日本分子生物学会、福岡、12月7～10日、2005

DNA ポリメラーゼ (Pol) は DNA の複製、修復、組換え等の生体内の様々な反応に関わる酵素であり、ほ乳類においては少なくとも 16 種類存在することが知られている。染色体 DNA の複製に関わる DNA ポリメラーゼである Pol δ や Pol ϵ は 3'-5' exonuclease による校正機能を持っていて他の DNA ポリメラーゼと比べて非常に正確な複製を行うばかりでなく、高い合成持続性(processivity)を有する。多くの DNA ポリメラーゼの合成持続性を増大させる因子として PCNA が知られている。PCNA は DNA を囲む形でトライマーを形成し、DNA ポリメラーゼと結合してその合成持続性を高める。Pol δ や Pol ϵ が DNA 損傷部位で停止すると、PCNA は Rad6 および Rad18 タンパク質によりモノユビキチン化される。最近では、このモノユビキチン化された PCNA や Rad18 などが損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼのリクルートに関わると考えられている。そのような損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼには Y ファミリーに属する DNA ポリメラーゼ (Pol η , Pol ι , Pol κ , REV1) や REV3、REV7 タンパク質をそれぞれ触媒、非触媒サブユニットとして持つ Pol ζ などが存在する。これらの損傷バイパス型の酵素は異なる種類の損傷のバイパス、あるいはバイパス合成の異なるステップに関わると考えられている。例えば、Pol η は紫外線照射によって生じる主な損傷の一つであるシクロブタン型チミンダイマー (CPD-TT) を向い側にアデニンを挿入して効率良くバイパスする。この酵素が生体内でも重要な働きを果たしていることは、この酵素を欠損した色素性乾皮症バリエーション型の患者が日光に曝されると高頻度で皮膚ガンを生ずることからも明らかである。また、Pol κ は CPD-TT を乗り越えることはできないが、肺ガンの原因物質の一つであるベンゾ[a]ピレンがグアニンの N2 の位置に付加した損傷 (dG-N2-BPDE) を正確に乗り越えることができる。一方、Pol η は in vitro ではこの損傷の向い側に正しい塩基であるシトシンよりも高い頻度でアデニンやグアニンなど誤った塩基を挿入する。このように損傷によって対処すべき DNA ポリメラーゼが異なっているので、細胞は適切な DNA ポリメラーゼを選別するメカニズムを備えている可能性がある (下図参照)。

Pol η , Pol ι , Pol κ はいずれも PCNA に結合することは報告されていたが、最近我々は PCNA との結合は Pol η や Pol ι に比べて Pol κ の場合には弱いことを酵母ツーハイブリッド法により見いだした。多くの PCNA 結合タンパク質には PIP (PCNA interacting protein)-box と呼ばれるアミノ酸配列が存在し、そのコンセンサス配列は Q-x-x-(I,L,M)-x-x-F-F などと表記される。我々は合成ペプチドを用いた生化学的手法や蛍光タンパク質の細胞内局在を観察す

るという細胞生物学的な手法により、Polk の PCNA への結合の弱さが PIP-box 自体がコンセンサス配列から離れているからではなく、むしろ PIP-box に続く C 端側にアミノ酸が 1 つしかないことが原因であることを示した。このことは Polk が常に PCNA と結合しているのではなく、特殊な条件下でのみ PCNA と結合して役割を果たしうることを示唆した。実際、ボストン大学の Vaziri 博士らとの共同研究により、ベンゾ[a]ピレンの活性化された物質 BDPE で細胞を処理すると、PCNA のモノユビキチン化が起こり、それに PCNA が強く結合することが明らかになった(Bi *et al.*, Mol. Cell. Biol., in press)。



興味深いことに Polη、Polt、Polk は全て、REV1 と結合する。また REV1 はこれら以外に REV7 と結合することが知られている。これらの REV1 結合タンパク質には PCNA 結合タンパク質のように共通のモチーフが存在するのであろうか？我々はこの問いに答えるべく、Polk の REV1 との結合領域を検討し、16 アミノ酸のレベルにまで限定した。さらにこの領域をアラニンスキャニング法により、2 つの連続したフェニルアラニン(FF)が重要であることを明らかにした。また Polη、Polt の REV1 との結合にも FF という配列が重要であることを示した。Polk は C 末端にも FF という配列を持つが、こちらは PCNA との結合に関与しているが、REV1 との結合には関与しない。FF という共通の配列を持ちながら一方は PCNA との結合に使用し、もう一方は REV1 との結合に使用する。このような違いは一体何によって決定づけられているのであろうか？我々の更なる解析により REV1 との結合には FF とその C 末端側の何らかの構造が重要であることが示唆された。これは PCNA の場合と明らかに異なる。なぜなら PCNA との結合の場合には Q-x-x-(I,L,M)-x-x-F-F という

コンセンサス配列から伺えるように N 末端側の配列が重要であるからである。このように FF という共通の配列が REV1 および PCNA との結合に使われるが、その周辺の配列や構造の違いが異なるタンパク質との結合を可能にしているのである。

さて前述の通り、REV1 は REV7 とも結合する。しかしながら 3 つの Y ファミリー DNA ポリメラーゼとは異なり、REV7 は FF という配列を持たない。最近我々は REV1 がこれらと相互作用する領域を詳細に解析し、Y ファミリー DNA ポリメラーゼとの結合領域と REV7 との結合領域では共通領域は存在するが必ずしも一致しないことを見いだした。これらのことから REV1 と REV7 の結合様式は REV1 と Y ファミリー DNA ポリメラーゼとのそれとは異なることが伺える。

以上のように損傷バイパスは様々なタンパク質が関与し、様々な相互作用の上に成り立っている。我々のグループではそれらの相互作用の強さについて生化学的な手法を用いて精力的に調べているが、一方で多数のタンパク質の作用機序や相互作用の生物学的意義など解明すべき課題も残されている。損傷バイパスは通常の DNA 複製に比べ高い突然変異率を伴うリスクを常に抱えている。現在、癌の治療に使用されている化学物質の中には DNA に損傷を生じるものも存在する。そのような物質の投与とともに損傷バイパスを上手にコントロールすることが可能になればより安全で効果的な治療法の開発に繋がるのではないかと考えられる。

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 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) molecular mechanism of lineage decision of immune cells from hematopoietic stem cells; (2) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by chromatin structural changes; (3) regulation of immune response by controlling cytokine receptor expression.

1) Accessibility Control of the V γ Region by Stat5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA

The IL-7 receptor (IL-7R) plays an essential role in $\gamma\delta$ T cell development by inducing V-J recombination in the T cell antigen receptor (TCR) γ locus. Previously, we have shown that Stat5 activated by the IL-7R recruits transcriptional coactivators to J γ germline promoter, and controls the accessibility of the TCR γ locus by histone acetylation. These data strongly suggest that Stat5 pathway in IL-7R signaling controls the accessibility of J γ chromatin. In contrast, little is known about the accessibility control of V γ region. To elucidate the role of Stat5 in the control of V γ region, we analyzed the germline transcription and histone modifications in a cytokine-dependent hematopoietic progenitor line, Ba/F3. The TCR γ locus contains three control elements, J γ germline promoter, 3' enhancer (E γ), and HsA, all of which have conserved Stat binding motifs. The V γ region is comprised of V γ 5, HsA, V γ 2, V γ 4, and V γ 3, in this order. The level of histone acetylation was high at V γ 5 and HsA, but low at other sites, with cytokine stimulation. The Ba/F3 transfectant with constitutively-active Stat5 cDNA showed a similar pattern of histone acetylation even without cytokine as Ba/F3 cells, suggesting that Stat5 can induce the histone acetylation at V γ 5 and HsA in Ba/F3 cells. Similarly, the germline transcription was induced at high levels in V γ 5 and HsA. Stat5 binding was detected at HsA, but not at V γ 5, by ChIP assay. However, Stat5 and HsA did not enhance the transcriptional activity of the V γ 5 promoter. These results suggested that Stat5 controls the chromatin of V γ 5 and HsA by unknown mechanisms and that it may play a role in differential control of V γ accessibility.

2) The IL-7 Receptor Controls the Accessibility of the TCR γ Locus by Stat5-Independent Mechanism: K. MAKI, T. TAKEMORI, S. HAYASHI, K. IKUTA

The IL-7 receptor (IL-7R) plays an essential role in $\gamma\delta$ T cell development by inducing V-J recombination in the TCR γ locus. Previously, we have shown that Stat5 pathway in IL-7R signaling regulates V-J recombination in the TCR γ locus. A tyrosine residue in IL-7R α chain has been implicated in recruitment and activation of Stat5. To determine whether Stat5 activation is indispensable for $\gamma\delta$ T cell development, we introduced the IL-7R mutant with tyrosine to phenylalanine mutation (IL-7R FFFF) into T precursors from IL-7R $\alpha^{-/-}$ mice, and let them differentiate into T cells by hanging-drop fetal thymic organ culture. Surprisingly, $\gamma\delta$ T cell development in IL-7R $\alpha^{-/-}$ mouse was partially rescued by introducing IL-7R FFFF mutant. This result prompted us to examine the molecular mechanism responsible for V γ J γ recombination in the absence of Stat5 activation. An IL-7-dependent cell line, preBR1, induces J γ -C γ germline transcripts in the presence of IL-7. Therefore, we generated hIL-4R/mIL-7R chimeric receptors in which the extracellular domain of mouse IL-7R α had been replaced by that of human IL-4R, and then introduced it into preBR1. While hIL-4R/mIL-7R WT induced germline transcription equivalent to mIL-7R, hIL-4R/mIL-7R FFFF induced the 50-fold reduced level of germline transcripts compared to hIL-4R/mIL-7R WT. These results suggest that the accessibility of TCR γ locus is controlled not only by Stat5, but also by Stat5-independent mechanism. IL-7R also activates the src family protein tyrosine kinases (PTKs), Fyn, Lyn and Lck. To determine whether PTK is involved in IL-7R-induced J γ -C γ germline transcription, we first checked the effect of a PTK inhibitor, PP2. With increasing concentration of PP2, hIL-4R/mIL-7R FFFF-expressing preBR1 showed a dose-dependent decrease of germline transcripts. This observation suggests that PTK plays an important role in IL-7R-mediated J γ -C γ germline transcription. PTKs have been suggested to activate one signaling pathway, including protein kinase C (PKC), Ras, and MAP kinase. To examine the role of this signaling pathway in the induction of the germline transcription, we treated hIL-4R/mIL-7R FFFF-expressing preBR1 with either Staurosporine (PKC inhibitor), U0126 (MEK inhibitor) or H89 (Msk1 inhibitor). Treatment with these inhibitors significantly decreased the germline transcription in hIL-4R/mIL-7R FFFF-expressing preBR1. Thus, our findings suggest that the PTK-PKC-MAPK cascade regulates the accessibility of the TCR γ locus in concert with Stat5.

3) Regulation of IL-7 Receptor Expression during T Cell Development: H. SHIBATA and K. IKUTA

Expression of the IL-7R is specifically down-regulated at two developmental stages; CD4⁸⁺ thymocytes at which positive and negative selections take place, and activated T cells which clonally expand after antigen stimulation. Because the cell fate at those stages should be determined solely by the specificity and affinity of TCR, it is considered that the IL-7R, which may transmits undesirable growth or survival signals, should be turned off. We previously found that the down-

regulation of the IL-7R is triggered by TCR signal and that it is controlled by the level of IL-7R α chain transcripts. To elucidate the role of IL-7R down-regulation during T cell development, we analyzed the mechanism of IL-7R α down-regulation by TCR signal. Mouse splenic T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody with or without the inhibitors for transcription, *de novo* protein synthesis, and TCR signal molecules. The expression of IL-7R α was analyzed at several time points by flow cytometry and real time RT-PCR. First, we analyzed the time course of IL-7R α down-regulation. Surface expression of IL-7R α was down-regulated at 16 hr after TCR stimulation. TCR stimulation rapidly decreased the level of IL-7R α mRNA, and completely shut off at 16hr. These results indicated that the down-regulation of IL-7R α by TCR signal is regulated at the transcriptional level. Next, we checked whether TCR signal induces the down-regulation directly or indirectly. The down-regulation was observed in the presence of actinomycin D or cycloheximide, suggesting that neither mRNA degradation nor *de novo* protein synthesis is required. A highly specific inhibitor of ERK and JNK, U0126 and SP600125, respectively, blocked the down-regulation of IL-7R α at the mRNA level. These inhibitors behaved in a dose-dependent manner. This result indicated that the ERK and JNK signals pathway play a principal role in the down-regulation of IL-7R α by TCR signal. We are currently trying to identify the transcriptional factor, which induces IL-7R α down-regulation.

4) Role of Stat5 in Positive Selection of Thymocytes: S. OGAWA and K. IKUTA

The IL-7R plays several critical roles in lymphocyte development by promoting proliferation and by inducing V(D)J recombination in the TCR and Ig loci. The IL-7R has also been suggested to be involved in positive selection of CD8 T cells from CD4⁺8⁺ double-positive thymocytes. To identify the molecular mechanism controlling the positive selection, we characterized the role of Stat5. A double-positive thymocyte line, DPK, differentiated into CD4 T cells by TCR stimulation. In contrast, DPK cells, transfected with constitutively-active Stat5, differentiated into CD8 T cells after IL-7 stimulation. Furthermore, the differentiation into CD4 T cells was completely blocked by active Stat5 even after TCR stimulation. To test whether Stat5 induces the positive selection in vivo, we introduced the active Stat5 into T precursors from IL-7R^{-/-} fetal liver by retrovirus and induced them to differentiate into T cells by fetal thymic organ culture. We observed that the active Stat5 induces strong CD8 T cell differentiation from IL-7R^{-/-} T cell precursors. Therefore, our study suggested a potential role of Stat5 in the positive selection of CD8 T cells. We are currently analyzing the target genes of Stat5 by microarray analysis.

5) Production of the Novel Protein, Laeverin, Which Was Restrictedly Expressed in Human Extravillous Trophoblasts: M. UEDA

Human extravillous trophoblasts (EVTs) invade the maternal deciduas. We have raised a murine monoclonal antibody that specifically reacts with human EVT, and have identified the antigenic molecule to be the novel protein named laeverin, molecular mass of which was 160 kDa. This protein contained a peptidase M1 motif, a transmembrane domain, and a zinc-binding active site. Its amino acid sequence is also homologous with aminopeptidase N. We produced a large amount of laeverin from cells infected by His tag-laeverin containing recombinant baculovirus. We will try to investigate the characteristics of laeverin, and to quantify the laeverin in human blood of early pregnancy.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Biological Responses

Laboratory of Biological Protection

- Ye, S. K., Kim, T. J., Won, S. S., Yoon, T. J., Park, T. K., Yoo, Y. C., Kim, Y. N., Lee, H. C., Ikuta, K., Chung, M. H., and Lee, K. H. (2005). Transcriptional regulation of the mouse interleukin-2 receptor β chain gene by Ets and Egr-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:1094-1101.
- Lee, H. C., Shibata, H., Ogawa, S., Maki, K., and Ikuta, K. (2005). Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor α promoter by glucocorticoid receptor. *J. Immunol.*, 174:7800-7806.
- Fujiwara, H., Higuchi, T., Sato, Y., Nishioka, Y., Zeng, B. X., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Ueda, M., Maeda, M. (2005). Regulation of extravillous trophoblasts function by membrane-bound peptidases. *Biochimica Biophysica Acta* 1751; 26-32.
- 生田宏一：自然免疫におけるリンパ球抗原受容体遺伝子の制御、自然免疫 第2巻 第7章 156-173 (Innate Immunity 研究会出版、編集者：Innate Immunity 研究会)、2005.

-
- Ogawa, S., Shibata, H., Lee, H. C., Maki, K., and Ikuta, K.: Regulation of IL-7 receptor expression during T cell development. The 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto, April 8, 2005.
- Shibata, H., Lee, H. C., Maki, K., and Ikuta, K.: Regulation of IL-7 receptor expression by T cell receptor signal. The 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto, April 8, 2005.
- Lee, H. C., Shibata, H., Ogawa, S., Maki, K., and Ikuta, K.: Role of IL-7 receptor during lymphocyte development. The 2nd RCAI Workshop "Epigenetic Regulation during Immune System Development", Yokohama, April 15, 2005.
- Maki, K., Lee, H. C., Shibata, H., Ogawa, S., and Ikuta, K.: Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor α promoter by glucocorticoid receptor. The 12th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research, Shao Xing, China, November 22, 2005.

- 小川伸哉、真木一茂、生田宏一：CD8 T 細胞の分化における STAT5 の機能. 免疫コロキウム、有馬、2 月 21 日、2005.
- 李海天、柴田寛文、小川伸哉、真木一茂、生田宏一：リンパ系前駆細胞の生成過程における IL-7 レセプターの機能. 第三回幹細胞シンポジウム、淡路、4 月 23 日、2005.
- 生田宏一：インターロイキン 7 レセプターによるリンパ球抗原受容体遺伝子の組換えの制御機構、神戸大学医学研究科大学院講義、神戸、6 月 14 日、2005.
- 生田宏一：免疫系の多様性獲得機構—エピジェネティクスでどこまでわかったのか、第 45 回 生化学若い研究者の会 夏の学校、シンポジウム、京都、8 月 20 日、2005.
- 生田宏一、谷一靖江：IL-7 レセプターと Stat5 による T 細胞抗原受容体 γ 鎖遺伝子座の制御、第 28 回 日本分子生物学会年会 ワークショップ、福岡、12 月 8 日、2005.
- 仲宗根力、山本夏男、仲松正司、金城武士、比嘉太、石川博通、O'BRIEN Rebecca L, 生田宏一、藤田次郎、川上和義：肺炎球菌気道感染初期防御における $\gamma\delta$ T 細胞の役割、第 35 回日本免疫学会学術集会 ワークショップ、横浜、12 月 13 日、2005.
- 真木一茂、生田宏一：IL-7R シグナルによる MAP キナーゼを介した TCR γ 遺伝子座の V-J 組換え制御機構の解析、第 35 回日本免疫学会学術集会 ワークショップ、横浜、12 月 14 日、2005.
- 谷一靖江、李海天、生田宏一：STAT5 による TCR γ 鎖 V 領域の組換え誘導機構、第 35 回日本免疫学会学術集会、横浜、12 月 14 日、2005.
- 谷一靖江、生田宏一：TCR γ locus の組換えにおける転写因子 STAT5 の関与、第 2 回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、12 月 16 日、2005.

今年は 2004 年 3 月に、長谷川捷一助手が定年で退職した。また、4 月に、医学研究科博士課程大学院生として中田賢治が加わった。また、3 月から 8 月にかけて医学部 4 回生の松本健が自主研究生として参加した。また、12 月からは、農学部 4 回生の戸田嗣人が自主研究生として参加した。このような推移で、生体防御研究分野は現在、教授 1 名、講師 1 名、助手 1 名、大学院生 6 名、学部生 1 名、技術職員 1 名、教務補佐員 1 名、秘書 1 名の総勢 13 名となっている。このように、大学院生が増加することで研究・教育のレベルがさらに増し、研究室の雰囲気がおおいに活性化した 1 年であり、今後も研究面で大きく発展することを期待している。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の細胞系列決定と初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン 7 レセプター(IL-7R)を切り口に、転写制御やクロマチン構造変換など、エピジェネティクスの観点から解析している。

(1) Stat5 による V 領域クロマチンの制御

インターロイキン 7 (IL-7)はリンパ球の生存、維持に重要なサイトカインである。IL-7 レセプターのノックアウトマウスでは、 $\gamma\delta$ T 細胞が完全に消失することから、IL-7R からのシグナルは $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必須である。我々の研究室では、過去に、IL-7R の下流で働く転写因子 Stat5 が、T 細胞抗原受容体(TCR) γ 遺伝子座の J γ のプロモーターに結合し、ヒストンアセチル化酵素をリクルートする結果、ヒストンアセチル化と germline 転写が起こり、組換えが誘導されることを示した。一方、TCR γ の V γ 領域の組換えがどのような機序で誘導されているのかについては、未だ十分解析されていない。そこで、その下流で Stat5 が活性化されることを利用して、IL-3 依存性 pro-B 細胞株 Ba/F3 を用いて、TCR γ 遺伝子座の Stat5 依存性を調べた。まず、サイトカイン非刺激時においては、3'エンハンサー (E γ) 領域でヒストンアセチル化レベルが中程度におこっており、それ以外の領域では低かった。サイトカイン刺激により、J γ や E γ のみならず、V γ 5 やその下流に存在する制御領域 HsA においても、高レベルのヒストンアセチル化と germline 転写が誘導された。一方、活性型 Stat5 を導入した Ba/F3 細胞では、サイトカイン非刺激の状態において、刺激時と同様のヒストンアセチル化が誘導されていた。以上の結果から、V γ 領域の中でも V γ 5 遺伝子と HsA 領域のクロマチンが、Stat5 によって制御されていることが示された。次に、このクロマチン制御の分子機構を解析した。まず、V γ 5 プロモーターに存在する非典型的 Stat モチーフに、Stat5 が直接結合するかどうかを EMSA 法と ChIP 法にて調べたが、結合は見られなかった。一方、HsA 領域に存在する典型的モチーフに、Stat5 が結合するかどうかを ChIP 法にて調べると、サイトカイン刺激依存的に結合が認められた。そこで、HsA が V γ 5 プロモーターに対して、エンハンサーとして働くかどうかをレポータ

一法にて検討したが、その活性は検出されなかった。さらに、組換えへの関与は不明であるが、TCR γ 領域全体にわたって、non-coding RNA が転写されており、Stat5 依存性に発現上昇することも明らかになった。以上の結果から、詳しいメカニズムは不明であるが、Stat5 が V γ 5 遺伝子と HsA 領域のクロマチンを開くことが明らかとなり、Stat5 が選択的な V γ 遺伝子の組換えを誘導する可能性が示唆された。（谷一靖江、生田宏一）

（２）Stat5 非依存的な機構によるTCR γ 遺伝子座の制御

IL-7R は $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必須であり、下流シグナルにおいて Stat5 の活性化が TCR γ 遺伝子座における V-J 組換えを誘導する。IL-7R は Stat5 のみならず、MAP キナーゼや Src ファミリーキナーゼといった様々なシグナル伝達分子を活性化するが、それらの機能は明らかになっていない。そこで Stat5 の活性化に必要と考えられている IL-7R α 鎖細胞質内領域のすべてのチロシン残基をフェニールアラニンに置換した変異 IL-7R α 鎖（IL-7R α FFFF）を作製し、IL-7R シグナルにおける Stat5 以外のシグナル分子の機能を解析した。まず、IL-7R α 鎖欠損マウスの T 前駆細胞に IL-7R α FFFF を導入し、胎仔胸腺器官培養法にて T 細胞に分化させたところ、IL-7R α 欠損マウスでは完全に欠失する $\gamma\delta$ T 細胞の分化が部分的に回復した。この結果から、Stat5 以外の IL-7R シグナル伝達分子が TCR γ 遺伝子座における V-J 組換えを誘導しうることが明らかとなった。そこで Stat5 以外の IL-7R シグナル機構を詳細に解析するために、まず IL-7 依存性リンパ球細胞株 preBR1 にキメラ受容体 hIL-4R/mIL-7R FFFF を導入し、hIL-4 刺激によって J γ germline 転写を誘導する系を樹立した。次に J γ germline 転写を誘導する IL-7R シグナルの伝達機構について、様々なシグナル伝達分子の特異的阻害剤を用いて解析したところ、Src ファミリーキナーゼ阻害剤 PP2, PKC 阻害剤 Staurosporine、MEK 阻害剤 U0126、さらには Msk1 阻害剤 H89 によって J γ germline 転写が著しく低下することが明らかになった。また、IL-7R α FFFF を IL-7R α 鎖欠損マウスの T 前駆細胞に導入後、MEK 阻害剤 U0126 存在下で OP9-delta like 1 ストローマ細胞と共培養したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化が阻害されることが明らかとなった。以上の結果から、IL-7R は Stat5 のみならず、Src ファミリー、PKC、MAP キナーゼを介するシグナル伝達経路によって、TCR γ 遺伝子座における V-J 組換えを制御している可能性が示唆された。（真木一茂、竹森享男、林聡子、生田宏一）

（３）T細胞におけるIL-7レセプターの発現制御機構

T細胞はその分化過程において、２つの段階でIL-7Rの発現を一時的に低下させる。第一は胸腺で正と負の選択がおこるCD4⁺ CD8⁺段階で、第二は末梢で抗原特異的なクローン増幅がおこる活性化T細胞の段階である。いずれもTCRの親和性のみで細胞の反応性が決まる段階であり、余計な生存・増殖シグナルを入れる可能性のあるIL-7Rを積極的にシャットオフしていると考えられる。そこで、IL-7Rの発現制御機構を解析した。まず、T細胞の分化過程におけるIL-7R α 鎖の発現を解析すると、胸腺の未熟T細胞と末梢の活性化T細胞の２つの段階で特異的に発現が低下していた。次に、各段階のIL-7R α 鎖mRNAを解析

したところ、これらの分化段階で顕著に低下していた。以上の結果から、IL-7R α 鎖の発現が転写レベルで制御されることが明らかとなった。次に、TCRシグナルが直接IL-7R α 鎖の転写を抑制するかどうかを明らかにするために、タンパク質合成阻害剤や転写阻害剤を加えて解析した。その結果、新規のタンパク質合成やmRNAの分解が、IL-7R α 鎖の転写抑制には必要ないことが明らかとなった。さらに、TCRのいかなる下流シグナルが関与しているのか、さまざまな阻害剤を加えて解析した。その結果、ERKとJNKの阻害剤であるU0126 やSP600125 がIL-7R α 鎖の転写抑制を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、ERKとJNKが、TCRシグナルによるIL-7R α 鎖の転写抑制において重要な働きをしていることが示唆された。（柴田寛文、生田宏一）

（４）CD8 T細胞の分化における Stat5 の機能

IL-7Rは、リンパ球前駆細胞の増殖・分化や成熟T細胞の維持（ホメオスターシス）を介して免疫系の形成と維持に重要な働きをしている。 $\alpha\beta$ T細胞は胸腺内のCD4⁺ CD8⁺ double positive (DP)段階で正の選択を受け、CD4 T細胞とCD8 T細胞へ分岐する。この正の選択にはTCRシグナルが必須であるが、それ以外にCD8 T細胞への分化にはIL-7Rシグナルも必要であることが報告されている。そこで我々は、この分化に必要なIL-7Rの下流シグナルを明らかにするため、Stat5 に着目し解析をおこなった。まず、TCR刺激によりCD4 T細胞にのみ分化するDP細胞株 DPKを用いた。DPK細胞に活性型Stat5 を導入し、IL-7 で刺激すると、CD8 T細胞が出現した。さらに、この細胞においてTCR刺激をおこなった結果、CD4 T細胞への分化がわずかに抑制された。これらの結果から、Stat5 は単独でCD8 T細胞への分化誘導能があるのみならず、CD4 T細胞への分化を積極的に抑制することが明らかとなった。次に、正常T細胞の正の選択におけるStat5 の機能を解析した。IL-7R α 鎖ノックアウトマウスの胎児肝臓からT前駆細胞を単離し、レトロウイルスベクターにより活性型Stat5 を導入し、胎児胸腺器官培養にてT細胞に分化させた。その結果、 $\gamma\delta$ T細胞とともに $\alpha\beta$ T細胞の分化が部分的に回復したが、CD4 T細胞は認められず、CD8 T細胞のみが分化した。以上の結果から、Stat5 がCD8 T細胞への分化におけるIL-7Rの主要な下流シグナル分子であり、CD8 T細胞への分化誘導のみならず、CD4 T細胞への分化を積極的に抑制することが明らかとなった。現在、Stat5 の標的遺伝子をDNAマイクロアレイにて解析している。（小川伸哉、生田宏一）

（５）ヒト extravillous trophoblast による新規タンパク質 laeverin の発現

組織特異的に発現されているタンパク質を検索してその機能をあきらかにすることは、多様に分化した組織の実態を明らかにする上で不可欠である。ヒト体外外胚葉由来のextravillous trophoblasts は decidua 細胞間に浸潤し、子宮内で母体血管と相互作用をおこなうようになる。この時、extravillous trophoblasts は、癌のように無限に浸潤が続くのではなくて、未知の機序によって一定の所で浸潤を停止する。我々は既に extravillous trophoblasts に特異的に反応するモノクローナル抗体を作成している。抗原蛋白は分子量 160 kDa で、

分子内に peptidase M1 motif と zinc-binding active site を有する新しい膜蛋白であることを明らかにし、laeverin と名付けた。この蛋白は aminopeptidase N とホモロジーがあることも分かっている。His tag を 5' 末端に付けた laeverin 遺伝子全長をバキュロウイルスに組み込み、昆虫細胞に感染させて、laeverin 蛋白を産生させた。精製した laeverin を用いて、この新しい蛋白の性質を明らかにすると共に、妊娠初期母体の血中 laeverin 濃度を測定するシステムを構築することを計画している。（上田正道）

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES
LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION

1) Investigation of novel thioredoxin inducers: H. MASUTANI, M. TANITO, Y. YAMAGUCHI, R. OTSUKI, A. ABE-BIZEN, M. TAKENAKA, and J. YODOI

We previously showed that heme induces thioredoxin (TRX) gene through antioxidant responsive element (ARE), regulated by Nrf2. Hemin induced the stabilization of Nrf2 and induced activation of p38 MAP kinase. We showed that sulforaphane is a potent TRX inducer and sulforaphane treatment suppresses hydrogen peroxide-induced damage of cells and photo oxidative damage of retinal pigment epithelial cells. Based on the mechanism of TRX gene activation, we are now screening TRX inducers under consortium of Research and Development Program for New Bio-Industry Initiatives. We revealed that extracts from some crucifers plants, containing isothiocyanates, have a potent TRX inducing activity in vitro and in vivo and cytoprotective activities. We also detected potent TRX-inducing activities and cytoprotective activities in extracts from two different kinds of plants that do not contain isothiocyanates. To identify novel TRX-inducing substances, we are now purifying and analyzing constituents of the extracts. Since TRX plays an important protective roles against oxidative stress-associated diseases, TRX inducers seems to be beneficial for therapeutic approaches against these diseases.

2) Lipid rafts-mediated rapid uptake of cysteine-modified human thioredoxin (TRX)-1: apoptosis induction through the inhibition of endogenous TRX: N. KONDO, M. MOCHIZUKI, A. SON, H. NAKAMURA, and J. YODOI

Thioredoxin-1 (TRX) plays important roles in cellular signaling by controlling the redox state of cysteine residues in target proteins. Although the redox-sensitive release and internalization of TRX by T lymphocytes has been described, the detailed mechanism of its internalization remains unclear. To detailed investigate the mechanism, we utilized a modified TRX (TRX-C35S) as a tool. TRX-C35S was rapidly internalized in HTLV-I-transformed T cells, as well as activated T cells stimulated by engagement of CD3. This internalization of TRX-C35S was inhibited by wild-type TRX and was dependent on lipid rafts in the plasma membrane. Moreover, the internalized recombinant TRX-C35S inhibited the reducing activity of endogenous TRX enhancing apoptosis induced by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) via the reactive oxygen species-mediated pathway. These results suggested TRX-C35S can be utilized as the inhibitor of endogenous TRX and for clinical application as an enhancer of anti-cancer agents against TRX-overexpressing leukemic or cancer cells.

3) Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)-like inducible membrane protein (TLIMP) is a novel Vitamin D3 and PPAR- γ ligand target protein that regulates PPAR- γ signaling: S. OKA, H. MASUTANI, W. LIU, H. HORITA, D. WANG, S. KIZAKA-KONDOH and J. YODOI

Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2), which is identical to Vitamin D3 (VD3) up-regulated protein 1 (VDUP1), plays a crucial role in the integration of glucose and lipid metabolism. There are three highly homologous genes of TBP-2/VDUP1 in humans, but their functions remain unclear. Here, we characterized a TBP-2 homologue, TLIMP (TBP-2 like inducible membrane protein). In contrast to TBP-2, TLIMP displayed no significant binding affinity for thioredoxin. TLIMP exhibited an inner membrane-associated pattern of distribution, and also co-localized with transferrin and low density lipoprotein, indicating endosome- and lysosome-associated functions. VD3 and ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), an important regulator of energy metabolism and cell growth inhibition, induced the expression of TLIMP as well as TBP-2. Overexpression of TLIMP suppressed both anchorage-dependent and -independent cell growth and PPAR- γ ligand-inducible gene activation. These results suggest that TLIMP, a novel VD3- or PPAR- γ ligand-inducible membrane-associated protein, plays a regulatory role in cell proliferation and PPAR- γ activation.

4) Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome: S. OKA, W. LIU, H. MASUTANI, H. HIRATA, Y. SHINKAI, S. YAMADA, T. YOSHIDA, H. NAKAMURA and J. YODOI

Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) is a negative regulator of thioredoxin, and has multiple regulatory functions in cellular redox, growth, differentiation, apoptosis and aging. To investigate the function of TBP-2 in vivo, we generated mice with targeted inactivation of TBP-2 (TBP-2^{-/-} mice). Here, we show that TBP-2 expression is markedly up-regulated during fasting in wild type mice, while TBP-2^{-/-} mice were predisposed to death with bleeding tendency, and hepatic and renal dysfunction as a result of 48 hours fasting. The fasting-induced death was rescued by supplementation of glucose but not by that of oleic acid, suggesting that inability of fatty acid utilization plays an important role in the anomaly of TBP-2^{-/-} mice. In these mice, plasma free fatty acids levels are higher, whereas glucose levels are lower than those of wild type mice. Compared to wild type mice, TBP-2^{-/-} mice showed increased levels of plasma ketone bodies, pyruvate and lactate, indicating that Krebs cycle-mediated fatty acid utilization is impaired. Since the fatal impairment of fatty acid utilization is a characteristically metabolic feature of Reye (-like) syndrome, TBP-2^{-/-} mouse may represent a novel model for investigating the pathophysiology of

these disorders.

5) Characterization of a human transmembrane thioredoxin-related protein: Functional properties of a membrane-bound oxidoreductase in the endoplasmic reticulum: Y. MATSUO, H. MASUTANI and J. YODOI

The formation of disulfide bonds in the endoplasmic reticulum (ER) is critical for the correct folding and assembly of newly synthesized proteins. The ER contains a number of oxidoreductases with thioredoxin-like domains that are responsible for the formation and rearrangement of disulfide bonds. Transmembrane thioredoxin-related protein (TMX) is one of membrane bound oxidoreductases with the thioredoxin fold in the ER. TMX has a cleavable signal peptide at the N-terminus, followed by a single thioredoxin-like domain with a CPAC active-site sequence, and a transmembrane domain. Topological studies revealed that the thioredoxin-like domain of TMX is present in the ER lumen, where it can catalyze dithiol-disulfide exchange reactions. To investigate the mechanism of TMX action in the ER, we searched for proteins interacting with TMX. Using an immunoprecipitation technique, we showed that TMX associates with some membrane proteins in the ER, including calnexin and MHC class I heavy chain, suggesting that it may function as a redox regulator especially for membrane proteins synthesized in the ER.

6) Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2: MK. AHSAN, H. MASUTANI, Y. YAMAGUCHI, Y.-C. KIM, K. NOSAKA, M. MATSUOKA, Y. NISHINAKA, M. MAEDA, and J. YODOI

The transition from interleukin-2 (IL-2)-dependent to IL-2-independent growth is considered one of the key steps in the transformation of human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)-infected T cells. The expression of thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2) is lost during the transition of HTLV-I-infected T-cell lines. Here, we analysed the mechanism of loss of TBP-2 expression and the role of TBP-2 in IL-2-dependent growth in the *in vitro* model to investigate multistep transformation of HTLV-I. CpGs in the *TBP-2* gene are methylated in IL-2-independent but not in IL-2-dependent cells. Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and a histone deacetylase inhibitor augmented histone acetylation and TBP-2 expression, suggesting that loss of TBP-2 expression is due to DNA methylation and histone deacetylation. In IL-2-dependent cells, a basal level of TBP-2 expression was maintained by IL-2 associated with cellular growth, whereas TBP-2 expression was upregulated on deprivation of IL-2 associated with growth suppression. Overexpression of TBP-2 in IL-2-independent cells suppressed the growth and partially restored responsiveness to IL-2. Knockdown of TBP-2 caused the IL-2-dependent cells to show partial

growth without IL-2. These results suggested that epigenetic silencing of the *TBP-2* gene results in a loss of responsiveness to IL-2, contributing to uncontrolled IL-2-independent growth in HTLV-I-infected T-cell lines.

7) Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells: D. WANG, H. MASUTANI, S. OKA, T. TANAKA, Y. YAMAGUCHI-IWAI, H. NAKAMURA and J. YODOI

Mitochondria play a central role in the initiation of apoptosis which is regulated by various factors such as ATP synthesis, reactive oxygen species, redox status, and outer membrane permeabilization. Disruption of chicken thioredoxin 2 (Trx2), a mitochondrial redox-regulating protein, results in apoptosis in DT40 cells. To investigate the mechanism of this apoptosis, we prepared transfectants expressing control (DT40-TRX2^{-/-}), human thioredoxin 2 (TRX2) (DT40-hTRX2) or redox-inactive TRX2 (DT40-hTRX2CS) in conditional Trx2-deficient DT40 cells containing a tetracycline-repressible Trx2 gene. Production of ATP was not significantly changed by down-regulation of Trx2 expression. The generation of reactive oxygen species was enhanced by the down-regulation of Trx2 expression in DT40-TRX2^{-/-}. Unexpectedly, the change was blocked in both DT40-hTRX2 and DT40-hTRX2CS cells. The down-regulation of Trx2 expression caused the release of cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF) on day 3, and apoptosis on day 5. These changes were also suppressed in both DT40-hTRX2 and DT40-hTRX2CS cells, suggesting that TRX2 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by redox-active site cysteine-independent mechanisms. The down-regulation of Trx2 expression caused a decrease in the protein level of Bcl-xL on day 3, whereas the protein level of Bcl-2 did not change until day 4 and the mRNA level of Bcl-xL was unchanged. The decrease in Bcl-xL was not blocked by a caspase 3 inhibitor but blocked in both DT40-hTRX2 and DT40-hTRX2CS. These findings indicate a link between the redox active site cysteine-independent action of TRX2 and the level of Bcl-xL in the regulation of apoptosis.

8) Thioredoxin attenuates indomethacin-induced gastric mucosal injury: A. TAN, H. NAKAMURA, M. TANITO, Y-W. KWON, H. MATSUI, M. NARITA, MK. AHSAN and J. YODOI

Thioredoxin (TRX) is a redox-active protein with anti-oxidative stress and anti-apoptotic effects. TRX transgenic (TG) mice are more resistant to various oxidative stress-induced disorders. When we compared TRX TG mice and control mice treated with indomethacin, TRX TG mice were more resistant to indomethacin-induced gastric ulcer. Next, we used rat gastric epithelial RGM-1 cells to dissect the molecular mechanisms of the protective roles of TRX against indomethacin-induced

gastric cell injury. The expression of TRX in RGM-1 cells was depleted by indomethacin treatment. In contrast, when RGM-1 cells were pretreated with human recombinant TRX before indomethacin treatment, TRX clearly attenuated the cytotoxicity induced by indomethacin. In addition, TRX was shown to inhibit the decrease of phosphorylated Akt (p-Akt) induced by indomethacin. Collectively, these results indicate that TRX is involved in the protection against indomethacin-induced gastric injury at least partly by the inhibition of the indomethacin-induced downregulation of anti-apoptotic Akt signaling and may have a good potential for clinical application.

9) **Recombinant Human Thioredoxin Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Bronchoalveolar Neutrophil Infiltration in Rat: S. UEDA, T NAKAMURA, A. YAMADA, A. TERATANI, S. FURUKAWA, Y HOSHINO, M. NARITA, J. YODOI and H. NAKAMURA**

Human thioredoxin (TRX) is a multifunctional redox-active protein. We previously reported that the intraperitoneal administration of recombinant human TRX (rhTRX) attenuates inflammatory cytokine or bleomycin induced lung injury in mice. In this study, the effect of rhTRX injected intravenously after lipopolysaccharide (LPS) injection was analyzed in rats. Rats were injected with LPS and followed by treatment with rhTRX. Although the bolus injection exerted no protective effect, continuous intravenous administration of rhTRX significantly suppressed % number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid. Histological examination also showed that rhTRX decreased neutrophil infiltration in the lung tissues. Administered rhTRX was mainly excreted into the urine and the tissue accumulation of rhTRX in the lung was marginal. LPS-induced oxidative stress in the lung was slight in this model. These results demonstrated that continuous intravenous administration of rhTRX ameliorates LPS-induced bronchoalveolar neutrophil infiltration by the anti-chemotactic effect.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Biological Responses

Laboratory of Infection and Prevention

Ahsan MK, Masutani H, Yamaguchi Y, Kim YC, Nosaka K, Matsuoka M, Nishinaka Y, Maeda M and Yodoi J. Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2. *Oncogene*. Nov 28, 2005.

Ahsan MK, Nakamura H, Tanito M, Yamada K, Utsumi H and Yodoi J. Thioredoxin-1 suppresses lung injury and apoptosis induced by diesel exhaust particles (DEP) by scavenging reactive oxygen species and by inhibiting DEP-induced downregulation of Akt. *Free Radic Biol Med*.

39(12):1549-59, 2005.

- Dutta KK, Nishinaka Y, Masutani H, Akatsuka S, Aung TT, Shirase T, Lee WH, Yamada Y, Hiai H, Yodoi J and Toyokuni S. Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Lab Invest.* 85(6):798-807, 2005.
- Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T and Ichijo H. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* 12(1):19-24, 2005.
- Kawasaki K, Nishio A, Nakamura H, Uchida K, Fukui T, Ohana M, Yoshizawa H, Ohashi S, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Nakase H, Toyokuni S, Liu W, Yodoi J, Okazaki K and Chiba T. Helicobacter felis-induced gastritis was suppressed in mice overexpressing thioredoxin-1. *Lab Invest.* 85(9):1104-17, 2005.
- Kim SJ, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Nakamura H, Yodoi J, Kato K and Noguchi S. High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 11(23):8425-30, 2005.
- Lynn S, Huang EJ, Elchuri S, Naeemuddin M, Nishinaka Y, Yodoi J, Ferriero DM, Epstein CJ and Huang TT. Selective neuronal vulnerability and inadequate stress response in superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* 38(6):817-28, 2005.
- Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Fukui T, Watanabe N, Nakase H, Yodoi J, Okazaki K and Chiba T. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Dec 1, 2005.
- Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Uyama N, Kwon YW, Kawada N, Yamaoka Y and Yodoi J. Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J Hepatol.* 42(1):117-23, 2005.
- Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J and Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med.* 38(9):1231-42, 2005.
- Tanito M, Kwon YW, Kondo N, Bai J, Masutani H, Nakamura H, Fujii J, Ohira A and Yodoi J. Cytoprotective effects of geranylgeranylacetone against retinal photooxidative damage. *J Neurosci.* 25(9):2396-404, 2005.
- Tanito M, Masutani H, Kim YC, Nishikawa M, Ohira A and Yodoi J. Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(3):979-87, 2005.
- Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, Shukunami K, Nishijima K, Kotsuji F, Hata A, Kasuga K, Sekine K, Nakamura H, Yodoi J and Mayumi M. Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk. *Free Radic Res.* 39(3):291-7, 2005.
- Ahsan MK, Utsumi H, Yodoi J, Nakamura H. Redox regulation of diesel exhaust particles-induced

- acute lung injury by thioredoxin-1. In "Natural antioxidants and micronutrients" edited by Baolu Zhao, Gengtao Liu, Lester Packer, Monduzzi Editore, Italy, pp 57-59, 2005
- Masutani H, Ueda S and Yodoi J. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:991-8, 2005.
- Nakamura T, Nakamura H, Hoshino T, Ueda S, Wada H and Yodoi J. Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. *Antioxid Redox Signal.* 7(1-2):60-71, 2005.
- Ueda S, Nakamura H, Nakamura T and Yodoi J. Redox regulation of inflammatory tissue damage by thioredoxin. In "Oxidative stress, inflammation and health" edited by Surh Y-J and Packer L, Marcel Dekker, pp41-60, 2005.
- Yoshida T, Nakamura H, Masutani H and Yodoi J. The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann N Y Acad Sci.* 1055:1-12, 2005.
- 中村 肇、奥山裕照、鳶原康行、淀井淳司：酸化ストレス防御蛋白チオレドキシンによるマウス thioacetamide 肝障害抑制 酸化ストレスと肝疾患（第1輯）127-131, 2005
- 原 富次郎、成田牧子、村田一夫；チオレドキシンによるレドックス制御を基盤技術とする創薬・診断薬開発 細胞 37；30 - 34, 2005
- 淀井淳司、中村 肇：チオレドキシンと酸化ストレス応答 酸化ストレスと肝疾患（第1輯）53-57, 2005
- 淀井淳司、松尾禎之 編集：レドックス-ストレス防御の医学 2005
-

- Bai J, Nakamura H, Momoi T, Kitao Y, Ogawa S, Yodoi J. Thioredoxin-1 prevents mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Inomata Y, Nakamura H, Tanito M, Teratani A, Kawaji T, Kondo N, Yodoi J, Tanihara H. Thioredoxin Modulates NMDA-induced Neurotoxicity in Rat Retina. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Kim Y-C, Ahsan MK, Yamaguchi Y, Matsuo Y, Yodoi J, Masutani H. Histone H3 phosphorylation via p38 MAPK pathway regulates antioxidant responsive element activation. JST-ERATO Yamamoto Environmental Response Project International Symposium: Molecular Mechanism of Environmental Response to Food and Oxygen, Tsukuba, Japan, March 10-12, 2005.
- Kondo N. Redox-sensitive transport of Thioredoxin-1. Oxygen Club of California(OCC), Oxidants and Antioxidants in Biology, Alba, Italy, September 7-10, 2005.
- Kondo N, Nakamura H, Bizen-Abe A, Yodoi J. Lipid rafts-mediated internalization of human thioredoxin-1. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11,

2005

- Liu W, Keisuke Shioji K, Oka S, Nakamura H, Yodoi J. Thioredoxin presents an important role linking oxidative stress and autoimmune diseases. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Masutani H, Ahsan MK, Oka S, Yodoi J. Thioredoxin binding proteins: Role for cancer protection. The 3rd Meeting of the International Redox Network, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005.
- Masutani H, Ahsan MK, Oka S, Yoshida T, Yodoi J. Thioredoxin binding proteins: Role for cancer protection. Oxidants and Antioxidants in Biology ,Annual Meeting of the Oxygen Club of California, Alba, Italy, September 7-10, 2005.
- Masutani H, Kwon Y, Mochizuki M, Kondo N, Nishitoh H, Ichijo H, Takahashi R, Suzuki Y. Omi/HtrA2 regulates p53- and p38 MAPK-dependent apoptosis induced by DNA-damaging reagent through ASK1 activation. Keystone Symposia, Cellular Senescence and Cell Death, Colorado, USA, March 3-9, 2005
- Masutani H, Wang D, Oka S, Yodoi J. Redox regulation by thioredoxin and TBP-2. Third joint meeting of the society for free radical research Australasia and Japan, Gold coast, Australia, December 2-5, 2005.
- Matsuo Y, Masutani H, Kondoh S, Yodoi J. Characterization of a human transmembrane thioredoxin-related protein - functional properties of a membrane-bound oxidoreductase in the endoplasmic reticulum. The 3rd meeting of International Redox Network, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Nakamura T, Hoshino Y, Yamada A, Teratani A, Furukawa S, Ono A, Yodoi J, Nakamura H. Recombinant human thioredoxin attenuates bleomycin-induced neutrophil recruitment in the airway. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Nakamura H, Ueda S, Nakamura T, Yodoi J. Redox regulation of acute lung injury by recombinant human thioredoxin in rat. 2nd SFRR Asia, Shanghai, China, June 24-29, 2005
- Nakamura H, Yamada A, Teratani A, Furukawa S, Ueda S, Hoshino Y, Nakamura T, Yodoi J. Suppression of Bronchoalveolar Neutrophil Infiltration by Recombinant Human Thioredoxin: A Preclinical study for Translational Research. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, Yamada S, Yoshida T, Nakamura H, Yodoi J. Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005
- Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, Yamada S, Yoshida T, Nakamura H, Yodoi J. Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. The 12th East Asia Joint Symposium on

Biomedical Research - From Molecules to Cells, Shaoxing, China, November 20-23, 2005

Sato A, Hoshino Y, Hara T, Muro S, Narita M, Nakamura H, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin ameliorates cigarette smoke-induced lung injury in mice. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005

Tan A, Nakamura H, Tanito M, Kwon YW, Matsui H, Narita M, Ahsan MK, Yodoi J. Thioredoxin attenuates indomethacin-induced gastric mucosal injury. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005

Wang D, Masutani H, Oka S, Tanaka T, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Yodoi J. Redox-independent control of mitochondrial apoptosis and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005

Yodoi J. Redox regulation of lipid rafts-mediated transport and the TRX/TBP-2 system. The 12th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research-From Molecules to Cells, Shao Xing, China, November 10-23, 2005

Yodoi J, Kondo N, Masutani H, Nakamura H. Thioredoxin/TRX-dependent redox regulation of inflammatory process. The Annual Meeting of Korean Society of Pharmaceutical Sciences, Seoul, Korea, November 27-29, 2005

Yodoi J, Kondo N, Yoshida T, Nakamura H, Masutani H. Redox Regulation of cell signaling via lipid rafts by Thioredoxin and Thioredoxin binding protein-2 (TBP2)/VDUP-1 system. IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Sao Paulo, Brazil, June 29-July 2, 2005

Yodoi J, Kondo N, Yoshida T. Redox regulation of lipid rafts-mediated transport and clinical application by TRX/TBP2 system. The Annual Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research, Shanghai, China, October 20-24, 2005

Yodoi J, Kondo N, Yoshida T, Nakamura H, Masutani H. Regulation of cellular redoxsignaling and growth by thioredoxin and thioredoxin binding protein-2. Sixth International Conference of the Society for Free Radical Research–Africa, Tétouan, Morocco, September 26-29, 2005

Yodoi J. Leukemogenesis by HTLV: Overview. The XXII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Heidelberg, Germany, July 2-5, 2005

Yodoi J. Role of lipid rafts in TRX-dependent redox regulation of activated T cells. 13th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, Hungary, September 7-11, 2005

Yodoi J. Thioredoxin and Thioredoxin Inducers for Food and Medicine. 1st Verona International Joint Meeting on Foods, Phytotherapeutic Compounds and Health, Verona, Italy, September

23-24, 2005

Yoshida T, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. Thioredoxin binding protein-2 transgenic mice - Implications of aging phenomena *in vivo*. International Redox Network Kyoto 2005, Kyoto, Japan, November 9-11, 2005

Ahsan MK, 山口佳美、前田道之、松岡雅雄、淀井淳司、増谷弘 : HTLV-I 感染細胞と ATL 患者末梢リンパ球での TBP-2 遺伝子のメチル化解析 第 64 回 日本癌学会学術総会 2005 年 9 月 14 日 16 日 札幌
猪俣泰也、中村肇、谷戸正樹、川路隆博、淀井淳司、谷原秀信 : NMDA 誘発網膜障害モデルにおけるチオレドキシンの神経保護効果 第 16 回日本緑内障学会 2005 年 9 月 16 日 18 日 熊本

上田修吾、近藤則彦、淀井淳司、中村肇 : レドックス制御蛋白質ヒトチオレドキシンによる固形腫瘍増殖と抗癌剤感受性に及ぼす効果 第 64 回日本癌学会 2005 年 9 月 14・16 日 札幌

岡新一、劉文瑞、増谷弘、平田晋三、眞貝洋一、山田秀一、吉田徹、中村肇、淀井淳司 : チオレドキシン結合タンパク質 (TBP-2) は絶食時の肝機能維持に必須の役割を果たす新たな糖・脂質代謝制御因子である 第 2 回 酸化ストレスと肝研究会 2005 年 10 月 29, 30 日 福岡

岡新一、劉文瑞、増谷弘、平田晋三、眞貝洋一、山田秀一、吉田徹、中村肇、淀井淳司 : チオレドキシン結合タンパク質 (TBP-2) は絶食時の生命維持に必須の役割を果たす新たな糖・脂質代謝制御因子である 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日 10 日 福岡

近藤則彦、阿部 (備前) 明子、中村肇、淀井淳司 : リピッドラフト内に局在するチオレドキシンによる TCR シグナル制御 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 13 - 15 日 横浜

佐藤篤靖、星野勇馬、原富次郎、成田牧子、室繁郎、中村肇、三嶋理晃、淀井淳司 : 肺障害に対するレドックス制御による治療有効性の検討 喫煙モデルマウスを用いて 第 8 回伊豆レスピロロジーフォーラム 2005 年 8 月 20 日 伊東

孫安生、石井保之、近藤則彦、岡新一、吉田徹、中村肇、増谷弘、淀井淳司 : Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) による樹状細胞の機能制御 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 13 - 15 日 横浜

Tan A, Oka S, Mochizuki M, Masutani H, Yodoi J : Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)-like protein associated with spliceosome (TLAS) is a novel growth repressor and colocalizes with a splicing factor SC35. 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日 10 日 福岡

中村隆之、上田修吾、寺谷明恵、山田 明、松居奈央、古川鈴代、成田牧子、淀井淳司、中村 肇 : 遺伝子組み換えヒトチオレドキシン蛋白によるエンドトキシン誘発性ラット急性肺障害改善効果 第 8 回京都免疫ワークショップ 2005 年 2 月 12 日 大阪

中村隆之、星野勇馬、淀井淳司、中村肇 : 好中球遊走阻害によるチオレドキシンの急性肺障害抑制効果 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 13 - 15 日 横浜

中村肇、上田修吾、中村隆之、淀井淳司 : チオレドキシンによるサイトプロテクションと探索医療 第 23 回サイトプロテクション研究会 2005 年 2 月 4 日 京都

原 富次郎、近藤則彦、孫安生、中村肇、淀井淳司 : チオレドキシンによる喫煙の炎症応答反応制御機構の解析 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 13 - 15 日 横浜

増谷弘、岡新一、Ahsan MK、王冬梅、淀井淳司 : Thioredoxin および Thioredoxin binding protein-2 によるレドックスシグナリング調節 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 - 10 日 福岡

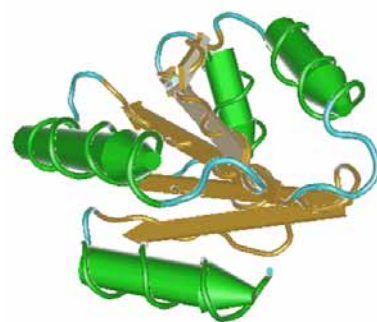
- 松尾禎之、増谷弘、近藤科江、淀井淳司：小胞体膜タンパク質 TMX の機能解析 タンパク質間相互作用の検出とその分子機構 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 - 10 日 福岡
- 望月芳香、権容源、松尾禎之、増谷弘、淀井淳司：レドックス制御タンパク質チオレドキシンによる細胞周期の解析 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日 10 日 福岡
- 吉田徹、岡新一、猪俣泰也、増谷弘、中村肇、淀井淳司：Thioredoxin binding protein-2 高発現マウスにおける白色脂肪組織の減少とエネルギー代謝の変動 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日 10 日 福岡
- 淀井淳司：レドックス制御反応 第 3 回 京都大学基礎物理学研究所研究会 2005 年 7 月 7 - 9 日 京都
- 淀井淳司：レドックス制御機構の役割 第 3 回 西日本メディエーター研究会 2005 年 7 月 23 日 大阪
- 淀井淳司：アレルギーにおけるレドックス制御の役割 第 42 回 日本小児アレルギー学会 11 月 18 - 19 日 福井
- 淀井淳司：免疫と酸化ストレス-レドックス・ストレス制御の医学- 第 2 回 SRL Update Forum 2005 年 11 月 26 日 東京
- 淀井淳司、豊国伸哉、糟野健司：ストレスと腎障害:レドックス制御蛋白チオレドキシンを中心に 第 35 回 日本腎臓学会西部学術大会 2005 年 10 月 1 日 長崎
- 劉文瑞、中村肇、岡新一、淀井淳司：チオレドキシンによるヒト樹状細胞の分化及び機能制御 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 13 - 15 日 横浜

2005 年は、日本学術振興会外国人特別研究員であった Kwon Yong-Won が 4 月より University of California at San Francisco (UCSF) に留学した。Liu Wenrui が医学研究科博士課程を修了、学位を取得し、日本学術振興会外国人特別研究員として採用された。11 月には当研究室がホストとして芝蘭会館において国際シンポジウム International Redox Network (IRN) 会議を開催し、分野をリードする国内外の研究者と研究交流を行った。現在、感染防御分野では、教授・助教授・助手以外に研究員 4 名、大学院生 6 名、受託研究員 3 名、技術職員 3 名、秘書 2 名の総勢 21 名となっている。毎年行われる研究室対抗ソフトボール大会において、小柳研究室と合同で参加し悲願の優勝を勝ち取った。このように研究だけでなく、レクリエーションにおいてもスタッフと研究員、大学院生が交流を深めており、今年も研究室の雰囲気活性化が 1 年であった。

感染防御分野では、1980 年代に成人 T 細胞白血病患者から樹立した細胞株から単離したチオレドキシン (Thioredoxin; TRX)、およびその family 分子・関連分子を中心とした酸化・還元 (レドックス) 制御機構について研究を行っている。特に、酸化ストレスと深く関係があるウイルス感染症、発癌、老化、動脈硬化などを含めた病態疾患においても *in vitro*、*in vivo* の両面から解析を行っている。

チオレドキシン (TRX)・TRX family 分子とレドックス制御

活性酸素・紫外線・放射線・金属・化学物質などによる活性酸素産生を引き起こす刺激が、酸化ストレスの原因として考えられ、このような酸化ストレスは、組織や細胞に障害をもたらす。生体はこれらに対し、グルタチオン (glutathione (GSH))・チオレドキシン (thioredoxin (TRX)) とその関連酵素群による防御機構を有しており、生体生存において必須の役割を果たしている。特に、HTLV-I 感染細胞の産生する ATL 由来因子 (ADF) は、遺伝子解析の結果ヒト TRX であり、その活性部位のふたつのシステイン残基を用い酸化型タンパクを還元化するタンパクであることが知られている。近年までに、TRX とよく似た活性部位 (-Cys-Xxx-Xxx-Cys-) をもつ蛋白が次々と同定され、これらはチオレドキシンスーパーファミリーを形成していることが明らかとなってきた。現在我々は、酸化ストレスが起因とされる病態疾患モデルを用いて TRX の役割について基礎的研究、そしてその応用研究を行っている。さらに、チオレドキシンファミリーであるミトコンドリアに特異的に発現している TRX2 および、小胞体に特異的に発現している TMX の機能についても解析を行い、チオレドキシンおよびそのファミリー分子によ



3D structure of TRX

るネットワーク機構についても解析を行っている。

TRX 結合タンパク (Thioredoxin binding protein-2)

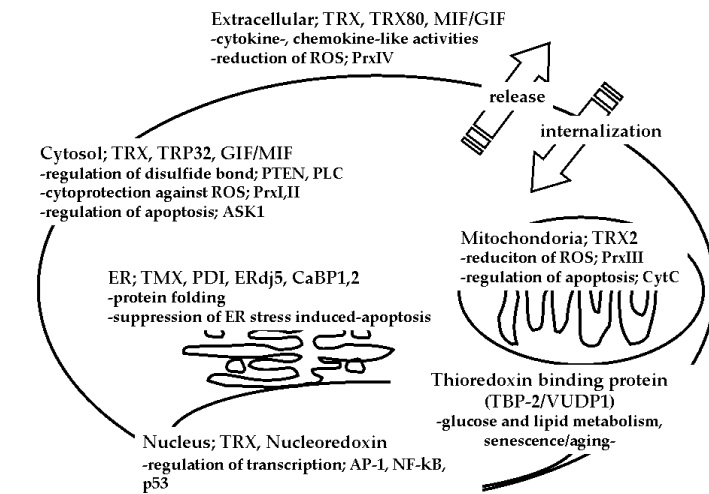
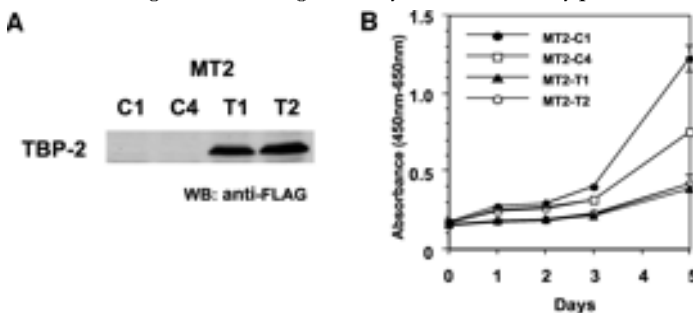
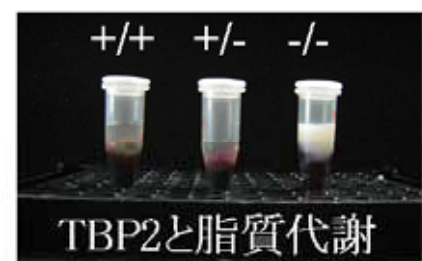


Figure 1. Redox regulation by TRX and its family proteins



タミンド処理で増加し、これに伴いTRXの発現量および還元活性は著減した。このことから、活性化型ビタミンDの作用にTBP-2/VDUP-1とTRXの相互作用は重要な役割を果たしていることが考えられる。現在、このTRX結合蛋白の生体機能について、*in vitro* 及び *in vivo* の系を用いた多面的な解析を行っている。ウイルス感染症との関連解析では、HTLV-I細胞株でDNAメチル化とヒストンアセチル化によりその発現が消失している。こうした知見によりTBP-2のHTLV-Iなどのウイルス感染症や発癌の診断・治療への応用が考えられる。また、TBP-2結合蛋白の同定、TBP-2のプロモーター解析などを合わせて行っており、TBP-2のもつ分子機能の役割について解明しつつある。TBP-2の遺伝子改変マウスについては、ノックアウト(KO)マウス及びトランスジェニック(TG)マウスの作製を完了している。KOマウスでは、糖質や脂質代謝の異常を明らかにし、Reye症候群のモデル系になりうることを報告した。またTGマウスでは、個体への老化現象との関連性について現在解析を行っている。



酵母 two hybrid system を用いて TBP-2 を同定した。この TBP-2 はヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 において活性化型ビタミン D により誘導される vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) として報告されていた遺伝子と同一であることが明らかとなった。TRX と TBP-2/VDUP1 は *in vitro* および *in vivo* における安定な複合体形成をすることが示された。TBP-2/VDUP1 は、還元型 TRX のみと結合し、TRX の還元活性を抑制する。また、TBP-2 の大量発現により TRX の発現の減少が認められ、TRX の内因性の modulator 分子として働いている可能性が示唆された。HL-60 細胞で TBP-2/VDUP1 発現量は活性化型ビ

TRX を用いた臨床応用への開発

TRXトランスジェニックマウスは種々の酸化ストレスに抵抗性を示すほか、対照マウスより長寿傾向を示す。さらに TRX トランスジェニックマウスはインフルエンザウイルス感染、リステリア感染やブレオマイシン・高サイトカイン血症、急性肝炎による障害に抵抗性を示す所見が得られつつある。

また、網膜への光障害のモデル実験系においても、TRX あるいはその誘導物質は、顕著な保護作用を持つことを明らかにした。

このように TRX は酸化ストレスによる種々の病態を制御できる可能性があると考え、われわれは遺伝子組み換えヒト TRX を医薬品として開発するための基礎検討を行っている。具体的には、遺伝子組み換えヒト TRX 投与により、動物モデルにおいて、lipopolysaccharide (LPS) 誘導性肺傷害の抑制や、炎症部位への白血球の浸潤抑制効果を認めており、京都大学医学部附属病院探索医療センターにおいて急性呼吸促迫症候群・急性肺障害を対象とした医師主導治験の準備を進めている。また、チオレドキシン誘導食品およびチオレドキシン含有食品の開発研究もおこなっている(生研センター：生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業)。

今後、TRX および TRX ファミリー分子のレドックス分子機構を解明することは、多くの疾患の予防・治療に役立つと考えられる。

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS

The research projects carried out in this laboratory are concerned with post-translational events in the expression of genetic information. Specifically, intracellular processes of protein folding, protein translocation across and integration into the membrane, and protein localization to the cell surfaces, as well as proteolytic control of proteins are investigated by combined molecular genetic, biochemical and structural approaches.

Newly synthesized non-cytoplasmic proteins must traverse the membrane. Instead of directly moving through the lipid bilayer, they utilize proteinaceous components of the membrane. Genetic and biochemical studies of the *E. coli* system revealed that several integral membrane proteins participate in this reaction. Among them, SecY, SecE and SecG are the principal components, which constitute a channel-like pathway for the trans-bilayer movement of polypeptides. The driving force for translocation is provided by the SecA translocation ATPase as well as by the proton-motive force across the membrane. Our research is aimed at understanding how SecY interacts with other integral and peripheral membrane components, as well as with the translocating polypeptide, thereby facilitating its transit. Recent focuses have been on the architecture of the translocation channel within the membrane and its dynamic interaction with the protein-driving SecA ATPase. In order to gain molecular insights that are relevant to the intracellular functioning, we are taking genetic, biochemical and structural biology approaches. Our studies also include additional aspects of intracellular protein dynamics such as processes of membrane protein integration and proteolytic control of membrane proteins. Nascent protein interactions with the ribosomal internal components, found in SecM (secretion monitor) is also being exploited. Finally, we are investigating into the cellular system that supports correct disulfide bond formation of cell surface proteins.

- 1) **Purification, Crystallization and X-Ray Diffraction Analysis of SecDF, a Translocon-Associated Membrane Protein, from *Thermus thermophilus*:** T. TSUKAZAKI, H. MORI, S. FUKAI¹, T. NUMATA¹, A. PEREDERINA², H. ADACHI³, H. MATSUMURA³, K. TAKANO³, S. MURAKAMI³, T. INOUE³, Y. MORI³, T. SASAKI³, D.G. VASSYLYEV², O. NUREKI¹ and K. ITO (¹Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, ²Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama, ³SOSHO Inc. and Osaka University)

Thermus thermophilus has a multi-path membrane protein, TSecDF, as a single chain homolog of *E. coli* SecD and SecF, which form a translocon-associated complex required for efficient

preprotein translocation and membrane protein integration. We have succeeded in cloning, expression in *E. coli*, purification and crystallization of TSecDF. Overproduced TSecDF was solubilized with dodecylmaltoside, chromatographically purified and crystallized by vapor diffusion in the presence of polyethylene glycol 400. The crystals yielded a maximum resolution of 4.2 Å, upon X-ray irradiation, revealing a space group of $P4_32_12$. We then attempted to improve the diffraction quality of the crystals by combinations of micro-stirring, laser light irradiation, and dehydration, which led to eventual acquisition of complete data sets of 3.7 Å resolution. We also prepared crystals of selenomethionine-labeled TSecDF and obtained preliminary electron density map of TSecDF by single-wavelength anomalous diffraction analysis.

2) Crosslinking Attempts to Identify SecY-SecDF Interfaces: G. KOBAYASHI, H. MORI and K. ITO

To complement our attempts to determine the X-ray structure of SecDF (see above), we are undertaking site-specific crosslinking studies (using *E. coli*) to reveal contact sites between SecDF and the SecYEG translocon. SecY variants having single cysteines at the periplasmic regions are being used to identify proteins at crosslinkable distances to these residues, with an expectation that the large periplasmic domains of SecDF might be interacting with SecY on this side of the membrane.

3) Use of *In Vivo* Site-Specific Crosslinking to Study Dynamic SecY-SecA Interactions: H. MORI and K. ITO

SecYEG translocon and SecA ATPase play principal roles in protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. However, molecular details of the SecA-SecY interaction remain poorly understood. While site-specific cross-linking provides a powerful means to study protein interactions, its application to a dynamic process, such as the SecA actions on SecYEG, will require an *in vivo* experimental system. In this study, we carried out site-specific *in vivo* cross-linking using engineered SecYs, in which non-natural photo-reactive amino acid (*p*-benzoylphenylalanine, pBPA) was incorporated at a designed amber codon (1). Altogether 55 SecY variants with pBPA introduced into cytoplasmic regions were subjected to ultraviolet-induced crosslinking. SecA-SecY cross-linked products were observed evidently, when the analogue was incorporated at specific positions in the 2nd, 4th, 5th and 6th cytoplasmic regions. The residues identified as SecA neighbors are located at tips of the cytoplasmic protrusions in the three dimensional structural model of SecY. SecA cross-linking efficiency of SecY mutants possessing

pBPA in the 6th cytoplasmic region was enhanced significantly when cells were treated with NaN_3 , which is known to arrest the ATPase cycle of SecA. This stimulatory effect was canceled by *cis*-placement of some *secY* mutations that compromise the SecA function. These results suggest that SecA interacts with SecY in at least two functionally different modes, static and dynamic. The most C-terminal cytoplasmic region may be involved in the transient and translocation-coupled binding, whereas C4 and C5 loops may offer constitutive binding sites.

(1) Chin J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. and Schultz, P. G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11020-11024

4) SecY Alterations that Impair Folding of LacY: S. NAGAMORI¹, N. SHIMOHATA², H. MORI, Y. AKIYAMA H. R. KABACK¹ AND K. ITO (¹Dept. Physiol., Microbiol. Immunol. Mol. Genet., Mol. Biol. Inst., Univ. Calif., Los Angeles, CA, U.S.A. ²Department of Molecular Cell Biology, Graduate School of Medicine, Osaka City University)

The SecYEG translocon in bacteria is used both for secretory protein export and for membrane protein integration. As reported last year some *secY* mutations not only retard integration of model membrane proteins but also up-regulate the Cpx/ σ E stress response pathways. We reason that abnormal states of membrane proteins are generated in these *secY* mutant cells. In support of this notion, *in vitro* translation, membrane integration and folding of LacY, one of the best characterized multi-path membrane proteins, revealed that the mutant membrane vesicles allowed insertion of LacY but not its subsequent folding into the normal conformation that was recognizable by conformation-specific antibodies. These results demonstrate that the normal SecY function is required for the folding of membrane proteins after their insertion into the translocon.

5) Mechanism of the SecM-Mediated Ribosomal Stall: H. MUTO, H. NAKATOGAWA¹ and K. ITO (¹National Institute of Basic Biology)

The "arrest sequence" of SecM, F150XXXXWIXXXXGIRAGP166, interacts with components of the ribosomal exit tunnel, thereby interfering with translation elongation. We studied the SecM-mediated elongation arrest *in vitro* using purified translation components. While a simplest scenario would be that elongation is arrested beyond Pro166, the last arrest-essential amino acid, and that the Pro166 codon is positioned at the P-site of the ribosomal peptidyl transferase center, our toeprint analyses revealed that the ribosome actually stalls when the Pro166 codon is positioned at the A-site. Northern hybridization identification of the polypeptide-bound tRNA and mass determination showed that the last amino acid of the arrested peptidyl-tRNA is

Gly165, which is only inefficiently transferred to Pro166. Also, puromycin does not effectively release the arrested peptidyl-tRNA under the conditions of A-site occupancy by Pro166-tRNA. These results reveal that *secM*-encoded Pro166-tRNA functions as a non-polypeptide element in fulfilling SecM's role as a secretion-monitor.

6) Biochemical Characterization of the GlpG Rhomboid Protease of *E. coli*: S. MAEGAWA, K. ITO and Y. AKIYAMA

We purified GlpG, an *E. coli* membrane-integrated protein belonging to the rhomboid family, as well as Bla-LacYTM2-MBP, a model substrate protein that we found last year to be cleaved in GlpG-dependent manners in vivo. We were thus able to demonstrate that GlpG indeed has a protease activity to cleave this membrane protein substrate. The essentiality of the conserved Ser and His residues suggests that it is a serine protease. The cleavage was shown to occur between Ser and Asp in a region of high local hydrophilicity, which seems to be located in a juxtamembrane rather than an intramembrane position. Nevertheless, in vivo susceptibility of several variant forms of Bla-LacYTM2-MBP suggests that GlpG recognizes features of the transmembrane regions of substrates.

7) Is the Protease Active Site of RseP Embedded in the Membrane Lipids?: K. KOIDE, K. ITO and Y. AKIYAMA

RseP belongs to the Site-2 protease family of RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. It introduces the second of the two successive cleavages into the middle of the transmembrane sequence of RseA, the substrate protein crucial for regulation of cellular extracytoplasmic stress response (1). However, neither molecular mechanism of the proteolysis nor the environment of the catalysis has been elucidated. We constructed a series of RseP derivatives having single cysteine substitutions at various positions around the active site motifs (HEXXH and LDG motifs), and examined the modifiability of each cysteine with membrane-impermeable sulfhydryl-specific reagents in the presence or absence of a chao-tropic reagent and/or a detergent. Our results suggest that the active site motifs are neither completely embedded in the membrane nor totally exposed to the aqueous phase; probably, they reside in a folded micro-environment at the interface of the lipid bilayer and the cytosol.

(1) Akiyama, Y., Kanehara, K. and Ito, K. (2004) *EMBO J.* **23**, 4434-4442

8) The *Escherichia coli* Plasma Membrane Contains Two PHB (Prohibitin Homology) Domain Protein Complexes of Contrasting Orientations: S. CHIBA*, K. ITO and Y. AKIYAMA (*presently University of California, San Diego, USA)

Two membrane proteases, FtsH and HtpX, are jointly essential for the *E. coli* cell viability, presumably through their abilities to degrade abnormal membrane proteins. To search for additional cellular factors involved in membrane protein quality control, we isolated multi-copy suppressors that alleviated the growth defect of the *ftsH/htpX* dual disruption mutant. One of them was *ybbK*, which is renamed *qmcA*, encoding a membrane-bound prohibitin homology (PHB) domain family protein. Multi-copy suppression was also observed with *hflK-hflC*, encoding another set of PHB domain membrane proteins, which had been known to form a complex (HflKC) and to interact with FtsH. Whereas the Δ *ftsH sfhC21* (a viability defect suppressor for Δ *ftsH*) strain exhibited temperature-sensitivity in the presence of cAMP, additional disruption of both *qmcA* and *hflK-hflC* exaggerated the growth defect. Pull-down and sedimentation experiments showed that QmcA, like HflKC, forms an oligomer and interacts with FtsH. Protease accessibility assays revealed that QmcA, unlike periplasmically exposed HflKC, possesses a cytoplasmically disposed large C-terminal domain, thus assuming the type I (N_{OUT}-C_{IN}) orientation. It is interesting that the *E. coli* plasma membrane contains PHB domains on both periplasmic and cytoplasmic sides.

9) Roles of Quinones in DsbB Revealed from Reactivities of Quinone-Free DsbB: K. INABA, Y.-h. TAKAHASHI and K. ITO

DsbB, a quinone-containing plasma membrane protein of *E. coli*, has two pairs of cysteines essential for its function to oxidize DsbA, the disulfide donor to client proteins. As stated last year, even quinone-free DsbB can oxidize ~40% of DsbA in a 1:1 stoichiometric reaction, in which DsbB is converted into hemi-oxidized forms. We characterized these DsbB species by mass spectroscopy as having either pair (Cys41-Cys44 or Cys104-Cys130) of cysteines. Additionally, we found that a minor fraction of quinone-free DsbB forms a stable DsbB-DsbA disulfide complex. Thus, despite the fact that intrinsic redox potentials of the active-site DsbB cysteines are lower than that of DsbA (1, 2), the DsbB-DsbA system is designed in such a way that their specific interaction enables limited "forward direction" redox reactions via two parallel pathways (2). Quinones take part subsequently to complete the two modes of reactions: (i) quinone oxidizes the Cys41 and

Cys44 pair of cysteines in the rapidly equilibrating hemi-oxidized DsbB species (predominating and rapid pathway) and (ii) quinone resolves the intermediate disulfide-bond (minor and slow pathway). In either pathway, the end products are oxidized forms of both DsbA and DsbB, indicative of a net gain of one disulfide bond. DsbB can then function again provided that oxidized quinones are available.

(1) Inaba, K. and Ito, K. (2002) *EMBO. J.* **21**, 2646-2654

(2) Inaba, K., Takahashi, Y.-h., and Ito, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 33035-33044

10) Role of the Short Cytosolic Loop of DsbB: Y.-H. TAKAHASHI, K. INABA and K. ITO

In contrast to its periplasmic regions, the cytosolic residues of DsbB have not been studied in any detail. We introduced insertion and substitution mutations into the short (~6 residue) central cytosolic loop. The purified mutant proteins proved to have two of the four essential cysteines reduced and to exhibit the spectroscopic transition of bound ubiquinone constitutively. One of them was shown to have a rearranged Cys41-Cys130 disulfide that would unpair Cys44. Although this covalent structure of DsbB is reminiscent of the DsbB-DsbA intermediate, in which unpaired Cys44 induces the ubiquinone transition, it is inactive because of the premature disulfide rearrangement without involving DsbA. In addition, ubiquinone-mediated *in vitro* oxidation of the reduced DsbB loop mutant was aborted at a half-oxidized state. Thus, the cytosolic loop of DsbB is important to coordinate the active-site residues and ubiquinone and to allow their proper reaction cycles.

11) Thiolate-Quinone Charge Transfer and Adduct Complexes Play Critical Roles in *de novo* Disulfide Bond Formation by DsbB: K. INABA, Y.-h. TAKAHASHI, S. HAYASHI¹ and K. ITO (¹Graduate School of Science, Kyoto University)

It is not exactly understood how a protein disulfide bond is created *de novo*. DsbB is one of enzymes that create a new disulfide bond. DsbB is associated with a cofactor, either ubiquinone or menaquinone, as a source of an oxidizing equivalent. The DsbB-bound quinone undergoes transition to a pink (λ_{max} , ~500 nm; ubiquinone) or violet (λ_{max} , ~550 nm, menaquinone)-colored state during the course of the DsbB enzymatic reaction (1, 2). We found that not only the thiolate form of Cys44 previously suggested but also Arg48 in the α -helical arrangement is essential for the quinone transition. Quantum chemical simulations indicate that proper positioning of thiolate anion and ubiquinone in conjunction with positively charged guanidinium moiety of arginine

allows the formation of a thiolate-ubiquinone charge transfer complex with absorption peaks around 500 nm as well as a cysteinyl-quinone covalent adduct. We propose that the charge transfer state leads to the transition state adduct that accepts a nucleophilic attack from another cysteine to generate a disulfide bond *de novo* (3). Similar mechanism is conceivable for a class of eukaryotic dithiol oxidases having a FAD cofactor.

1) Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Fujieda, N., Kano, K., Miyoshi, H. and Ito, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 6761-6768

2) Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 47057-47065

3) Inaba, K., Takahashi, Y.-h., Ito, K. and Hayashi, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 287-292

12) Structural Biology of the DsbA-DsbB-Ubiquinone Disulfide Bond Introducing System of *E. coli*: K. INABA, S. MURAKAMI¹, E. YAMASHITA², A. NAKAGAWA², M. SUZUKI² and K. ITO (¹Institute of Scientific and Industrial Research and ²Institute of Protein Research, Osaka University)

Our continued attempts to determine the three-dimensional structure of the DsbA-DsbB-ubiquinone ternary complex by X-ray crystallography has finally come to the final stage. The best crystal, belonging to a space group of P4₂2₁2 with unit cell parameters of a = b = 165.7 Å, c = 66.0 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, diffracted the Spring-8 BL44XU beamline to give a complete data set with ~3.5 Å resolution. We were also successful in preparing crystals of selenomethionine-labeled complex and in collecting their diffraction data for phase determination. Resulting electron density maps have revealed a four helix-bundle structure of DsbB. Further structural refinements are underway.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Cell Biology

Laboratory of Subcellular Biogenesis

Nakatogawa, H., Murakami, A., Mori, H. and Ito, K. (2005) SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. *Genes Dev.* **19**, 436-444

Shimohata, N., Akiyama, Y. and Ito, K. (2005) Peculiar properties of DsbA in its export across the *E. coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **187**, 3997-4004

Ito, K. (2005) Ribosome-based protein folding systems are structurally divergent but functionally universal across biological kingdoms. *Mol. Microbiol.* **57**, 313-317

Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 211-231

- Sakoh, M., Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease of *E. coli*. J. Biol. Chem. 280, 33305-33310
- Maegawa, S., Ito, K. and Akiyama, Y. (2005) Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. Biochemistry 41, 13543-13552
- Inaba, K., Takahashi, Y.-h. and Ito, K. (2005) Reactivities of quinone-free DsbB from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 280, 33035-33044
- 酒向真智子、秋山芳展 (2005) 大腸菌の膜タンパク質分解。実験医学 23 増刊「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也 編) 2358-2362
- 稲葉謙次、伊藤維昭 (2005) タンパク質ジスルフィド結合導入のための細胞支援システム。実験医学 23 増刊「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏、遠藤斗志也 編) 2260-2265
- 稲葉謙次、伊藤維昭 (2005) Oxidative protein foldingにかかわる細胞因子。別冊・医学のあゆみ「レドックスーストレス防御の医学」(淀井淳司、松尾禎之 編) pp. 67-71
- 稲葉謙次(2005) Redox statusの検出／SH基修飾剤。別冊・医学のあゆみ「レドックスーストレス防御の医学」(淀井淳司、松尾禎之 編) p. 164
-

- Akiyama, Y., Kanehara, K., Maegawa, S., Koide, K. and Ito, K.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles. April 20-23, Berlin, Germany, 2005
- Akiyama, Y.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. The 12th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research - From Molecules to Cells. Abstract p. 64-65. 11. 20-23, Shao Xing, China, 2005
- Ito, K., Shimohata, N., Mori, H., Kanehara, K. and Akiyama, Y.: Stress response devices in the *E. coli* plasma membrane and their ability to sense abnormality of integral membrane proteins. IUMS 2005. XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Symposium "Envelope Stress". Abstracts p. 214-215. July 23-28, San Francisco, California, USA, 2005
- Mori, H. and Ito, K.: The long α -helix of SecA is important for the coupling of ATP hydrolysis with protein translocation Gordon Research Conferences "Protein transport across cell membranes". June 15-17, New Hampshire, USA, 2005
- Takahashi, Y.-h., Inaba, K., Hayashi, S. and Ito, K.: A ubiquinone-thiolate charge transfer complex formed on DsbB, a membrane protein that drives DsbA-dependent oxidative protein folding. FEBS/EMBO Advanced Lecture Course "Cellular and Molecular Biology of Membranes", June 20-July 1, Cargèse, Corsica, France, 2005
- Saikawa, N., Suzuki, H., Akiyama, Y., Ito, K. and Kimura, Y.: The three-dimensional structure of FtsH oligomer from *E. coli* by cryo-staining electron microscopy. The Sixth International

Conference on AAA Proteins. September 14-18, Graz, Austria, 2005

Ito, K., Mori, H., Nakatogawa, H., Akiyama, Y. and Shimohata, N.: Regulation and route-selection in SecA-SecYEG protein translocase. The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology Symposium "Protein Threading through Tunnels and Pores". Cell Struct. Funct. 30, Suppl. P. 9. June 15-17, Saitama, Japan, 2005

Ito, K.: Regulation of the SecA-SecYEG protein translocation system at different levels. International Symposium "Membrane Dynamics and Cell Regulation". 6.29, Fukuoka, Japan, 2005

Ito, K., Shimohata, N., Nakatogawa, H., Murakami, A., Muto, H., Akiyama, Y. Tsukazaki, T. and Mori, H.: Coordinated functions of SecA-SecYEG protein translocation system. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Akiyama, Y., Kanehara, K., Maegawa, S., Koide, K. and Ito, K.: Regulatory and reaction mechanisms of *E. coli* RIP (regulated intramembrane proteolysis) proteases. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Inaba, K., Takahashi, Y.-h. and Ito, K.: Biochemical, biophysical and structural understanding of the DsbB-quinone oxidative system that creates disulfide bond to be relayed by DsbA to *E. coli* proteins. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Mori, H., Shimokawa, N. and Ito, K.: Site-specific crosslinking studies of in vivo SecY-SecA interactions. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Tsukazaki, T., Mori, H., Peredrerina, A., Vassilyev, D. G., Fukai, S., Nureki, O. and Ito, K.: Structural analysis of *Thermus thermophilus* protein translocation complexes. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Takahashi, Y.-h., Inaba, K. and Ito, K.: Role of the cytosolic loop of DsbB in catalytic turnover of the ubiquinone-DsbB complex. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

Maegawa, S., Ito, K. and Aikyama, Y.: Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *E. coli* cytoplasmic membrane. International Symposium on Life of Proteins. Maturation, Translocation and Quality Control in the Cell. 10.30-11.3, Awajisima, Hyogo, Japan, 2005

中戸川仁、村上亜希子、武藤洋樹、森博幸、伊藤維昭: SecM による SecA の翻訳と機能の調節. 第 5 回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「タンパク質の一生: タンパク質の合成とその調節」予稿集 p.4. 6.30, 福岡, 2005

才川直哉、鈴木博文、木村能章、秋山芳展、伊藤維昭: 大腸菌 FtsH の電子顕微鏡解析. 第 5 回日

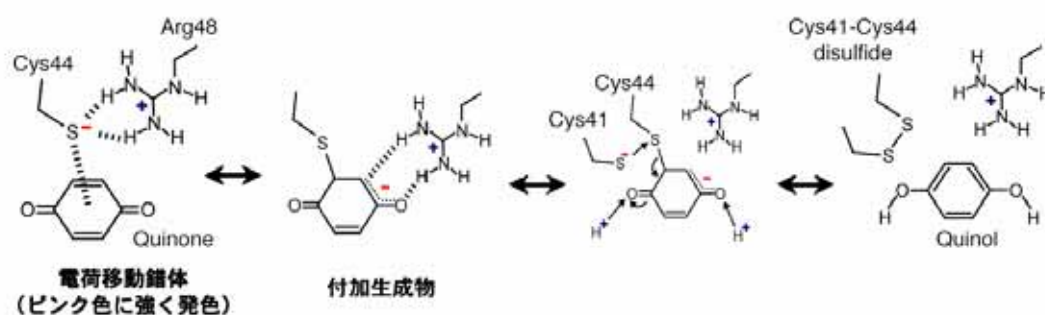
- 本蛋白質科学会年会. 予稿集 p. 104. 6.30-7.2, 福岡, 2005
- 秋山芳展、金原和江、小出佳代、伊藤維昭: 表層ストレス応答に関わる大腸菌膜プロテアーゼ RseP (YaeL) の活性制御機構. 第 28 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管理」 要旨集 p. 24. 12.7-10, 福岡, 2005
- 稲葉謙次、高橋洋平、林重彦、伊藤維昭: 蛋白質ジスルフィド結合導入メカニズムにおける共通原理. 第 28 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管理」 要旨集 p. 24. 12.7-10, 福岡, 2005
- 伊藤維昭、森博幸、下畑宣行、秋山芳展: 膜蛋白質の形成におけるトランスロコンの機能と機能不全感知システム. 第 28 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「タンパク質と脂質のオーケストレーションによる膜の形成」 要旨集 p. 112. 12.7-10, 福岡, 2005
- 武藤洋樹、中戸川仁、伊藤維昭: SecM における翻訳アレストの作用点. 第 28 回日本分子生物学会年会. 要旨集 p. 458. 12.7-10, 福岡, 2005
- 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章: 電子顕微鏡による大腸菌膜プロテアーゼ FtsH の構造解析. 第 28 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞機能のキープレイヤー AAA+タンパク質の世界」 要旨集 p. 45. 12.7-10, 福岡, 2005
- 稲葉謙次: 細胞内ジスルフィド結合導入システムの分子科学. 第 32 回生体分子科学討論会 特別講演. 6.24, 神戸, 2005
- 稲葉謙次: 酸化的な蛋白質フォールディングとそれを補助する細胞システム. 蛋白研セミナー「蛋白質の昼と夜ー フォールディングとミスフォールディング」 5.26-27, 大阪, 2005
- 才川直哉、鈴木博文、秋山芳展、伊藤維昭、木村能章: 電子顕微鏡による大腸菌 FtsH プロテアーゼの構造解析. 日本生物物理学会第 43 回年会. 生物物理 45, SUPPLEMENT 1, S236. 11.23-25, 札幌, 2005
- 村上亜希子、中戸川仁、武藤洋樹、森博幸、伊藤維昭: SecM による SecA の翻訳と機能の調節. 21 世紀大腸菌研究会 「モデル生物大腸菌の統合的理解にむけて」 予稿集 p.22. 6/23-24, 三重県志摩市, 2005
- 前河早希、伊藤維昭、秋山芳展: 大腸菌の Rhomboid ファミリープロテアーゼ GlpG の機能. 21 世紀大腸菌研究会 「モデル生物大腸菌の統合的理解にむけて」 予稿集 p.19. 6/23-24, 三重県志摩市, 2005
- 前河早希: 大腸菌の Rhomboid ファミリー膜プロテアーゼ GlpG の機能. 第 2 回京都大学ウイルス研究所学術交流会. 要旨集 p. 16. 12.16, 2005
- 森 博幸: タンパク質膜透過装置の構造、機能、調節について. 京都大学ウイルス研究所コロキウム「膜輸送研究の新展開」 2.14-15, 京都, 2005
- 伊藤維昭: 膜: 生命の両輪の片方. シンポジウム「モデル生物・大腸菌の歩みー10年後を見据えてー」 3.28, 三島, 2005
- 伊藤維昭: タンパク質の細胞内ダイナミズムの原理と制御装置. 2005 年度 "たんぱく質関連領域" 合同シンポジウム. 要旨集 p. 67-70, 11.15-16, 千里ライフサイエンスセンター, 2005

当分野では、遺伝子産物が機能的構造体をして細胞構造を形づくる過程を研究しています。タンパク質の細胞内での折りたたみ、分泌、膜組み込み、局在化、および分解などをとりあげて、このような過程が的確に起こるために細胞に備えられている仕組みを解析しています。以下、2005年における研究の中からいくつかをとりあげ、担当者に説明してもらいます。

タンパク質が持つジスルフィド結合は、細胞においてどのような基本化学原理によって創り出されるのだろうか？

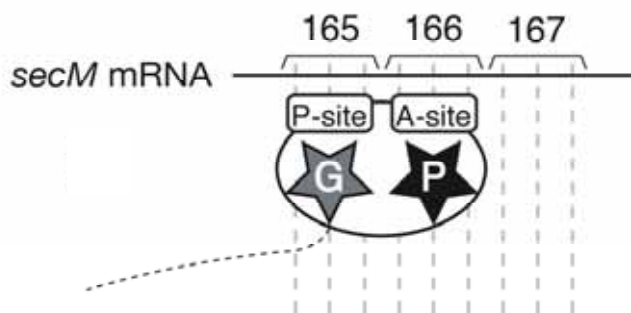
細胞には、フォールディング途上の蛋白質に効率よくジスルフィド結合を導入するための機構が存在し、大腸菌ではDsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムが働いています。膜蛋白質DsbBは、ユビキノンの強い酸化力を巧妙な仕掛けによりジスルフィド結合に変換します。創生されたジスルフィドはDsbAを介して多くの基質蛋白質に受け渡されます。我々は、DsbBのシステイン残基の一つCys⁴⁴がキノンと電荷移動錯体、次いで付加生成物を過渡的に形成することによって、DsbB分子内にジスルフィド結合が形成されることを、実験と理論を統合して示しました。この過程ではCys⁴⁴と共に、ヘリックス上でその近傍に存在する進化的に保存されたArg⁴⁸の正電荷が必須の役割を果たすことも明らかになりました。

興味深いことに、このような低分子酸化還元キャリアーに依存したジスルフィド結合創生のスキームは、真核細胞においてはFADに依存した機構として存在するようです。つまり、FAD結合型のジスルフィド酸化還元酵素中では、システイン残基とFADとの間で電荷移動錯体および付加生成物が形成され、その際、近傍に存在するNADP⁺などの正電荷が重要な役割を担っているらしいのです。真核細胞と原核細胞におけるジスルフィド結合創生システムは、異なる分子を利用しつつも、その基本となる化学機構の重要さのゆえに、基本原理を共有すべく収束進化を遂げたものと思われる。我々が突き止めることができた反応機構の合理性を感じずにはいられません。（稲葉謙次、高橋洋平）



SecMの翻訳アレスト配列の最後に存在するプロリンはリボソームのAサイトでポリペプチドに取り込まれることなく機能する

SecMは翻訳途上においてSec分泌装置によって引っ張られない限りその翻訳を完結できません。これはそのアレスト配列 F¹⁵⁰XXXXWIXXXGIRAGP¹⁶⁶ がリボソームの脱出トンネルと相互作用する結果と考えられています。今回in vitro翻訳系を用いて、*secM* mRNA上におけるリボソームの停止位置を決定し、またアレスト状態の

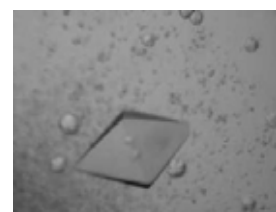


polypeptidyl-tRNAを分析したところ、(i) リボソームはアレストに必須なPro166のコードンがAサイトに位置した状態で停止すること、(ii) Gly165とPro166間のペプチド結合は形成されていないこと、(iii) アレスト状態の翻訳複合体はピューロマイシンの作用を受けないことがわかりました。SecMは、又しても遺伝情報に関する想定外の現象を提出しました。すなわち、*secM* mRNA上に遺伝情報として書き込まれているPro166コードンは、「ポリペプチドの一部としてのプロリンをコードしている」以外に、「リボソーム活性中心で、組み込まれることなく伸長抑制に寄与するProlyl-tRNAをコードしている」ことにその生物学的使命の重要な部分があることになります。(武藤洋樹)

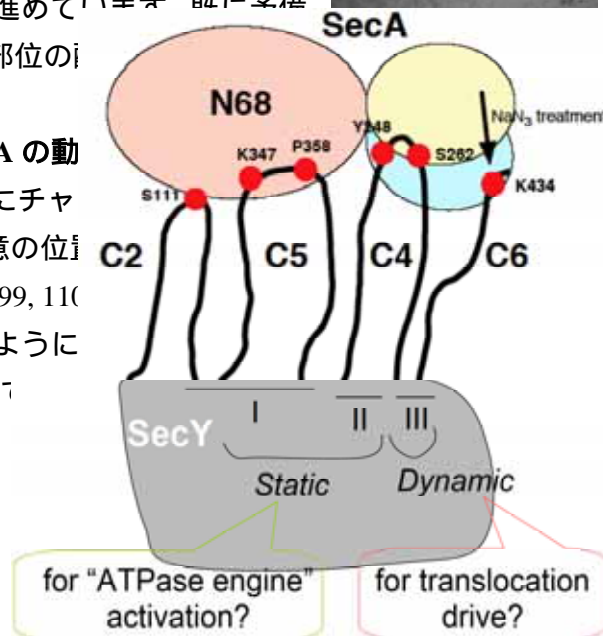
タンパク質膜透過・組込み装置の研究

タンパク質の膜を越えた輸送や膜への挿入は、進化的に保存された SecY/Sec61 複合体（トランスロコン）を介して行われます。大腸菌など原核細胞では、SecA ATPase が SecYEG チャンネルを介するタンパク質の動きを駆動します。トランスロコンはさらに SecDF や YidC などの因子と相互作用し、膜タンパク質の組込みにも働きます。

高度好熱菌 SecDF の構造解析：私たちは、高度好熱菌 Sec 複合体の構造決定を、東工大濡木研究室およびアラバマ大 Vassilyev 研究室と共同研究により進めています。2005 年度は SecYE と共に働く膜タンパク質 TSecDF の結晶化とX線構造解析で大きな進展がありました。TSecDF の精製と結晶化の方法を確立し、長さ約 0.2 mm の 8 面体結晶を得ました。結晶の Micro-stirring technique, Laser irradiation technique, Dehydration などによる改善の結果、放射光（Spring8 BL41）回折データセットを 3.7 分解能で収集しました。Se-Met 型 TSecDF 結晶化と回折データの取得にも成功し、単一波長異常分散法による位相決定、構造モデリングを進めています。部分的な TSecDF の電子密度マップを得ており、膜貫通部位の位置がわかっています。(塚崎智也)



In vivo 架橋実験によるトランスロコンと SecA の動態：アラニンアナログ (pBPA) をサプレッサー型 tRNA にチャを利用して、amber コドンに対応する蛋白質中の任意の位置に導入し、X線構造解析によって報告されています (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11000-11005)。クロスリンクによって、SecYEG と SecA の場合のようにタンパク質間の位置関係を、その変化も含めて追求する。

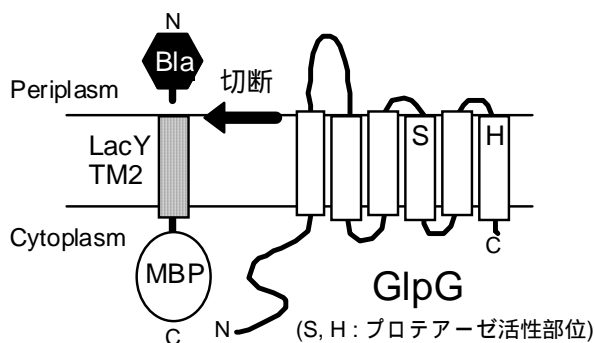


領域の種々の部位に pBPA を持つ SecY を発現させ、紫外線照射によって架橋されるタンパク質を系統的にサーチしました。SecY の立体構造モデル上、細胞質側の突出した位置に pBPA を持ついくつかの変異体において特異的な SecA との架橋が観察されました。SecY の C 末端領域 (C6) での SecA との架橋は、SecA 機能サイクルを途中で停止させる阻害剤により大きく昂進させられること、その昂進は SecA 活性化能を損なうような同一分子上の SecY アミノ酸置換によって失われることから、膜透過に共役した相互作用を反映したものと考えられます。他の結果も併せて、SecY は複数の様式で SecA と結合し、その ATPase の活性化や膜透過の駆動に関わる構造変化を支えているものと考えられます。同様のアプローチを用いて、SecY のペリプラズム側における SecDF などとの相互作用についても調べています。(森 博幸、小林 元)

SecY機能は膜タンパク質の正しいフォールディングに必要とされる：SecYEGトランスロコンは分泌タンパク質が膜を越えて反対側に運ばれるためにも、膜タンパク質が膜の脂質層に組み込まれるためにも機能します。我々はある種のSecY変異によって異常な膜タンパク質が形成されることを、それらの変異によって「膜ストレス」応答が惹起されることから提唱しています。このことを直接証明するため、膜内在性タンパク質として最も詳しく解明が進んでいるLacY(ラクトース輸送体)の研究を推進しているRon Kabackのグループの永森博士と共同研究を行いました。LacYのin vitro翻訳・膜組込み反応において、変異型SecYは膜への挿入自体は許すが、正しい構造形成(立体構造を認識するモノクローン抗体に対する反応性の獲得)を許さないことが示され、上記の考えが正しいことがわかりました。トランスロコンは膜タンパク質を「受け入れる」のみではなく、SecDFやYidCなどの因子と共同して「正しく脂質二重層に送り出す」ためにも働いていることになります。

膜プロテアーゼの分子機構と制御

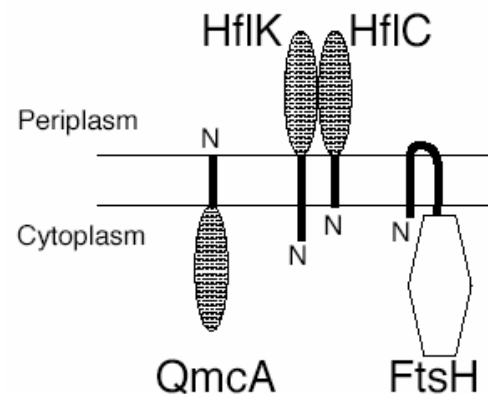
“RIP プロテアーゼ”の作用機構：私たちは、あらゆる生物で見られる膜内部におけるタンパク質切断(RIP)に関わるプロテアーゼについて、大腸菌を用いた研究を展開しています。大腸菌には二つのRIPプロテアーゼRseP(Site-2プロテアーゼファミリー)とGlpG(Rhomboidファミリー)が存在します。この種のプロテアーゼが本当に膜の脂質層に埋もれた領域でポリペプチド鎖の切断を行うのかどうかという根本的な疑問にたいする明確な答えは従来示されていません。RsePの活性部位近傍にCys残基を系統的に導入しそれらの膜不透過性修飾試薬に対する反応性を調べています。脂質環境とタンパク環境を区別する手段として、界面活性剤とChaotropic変性剤の効果を調べました。RsePの活性部位付近の反応性は可溶性領域に比べると遙かに低いですが、変性剤存在下で上昇し、変性剤と界面活性剤の同時存在によってさらに増大しました。これらの領域は完全に露出しているわけでも脂質層に埋もれているわけでもなく、膜内或いは境界付近でのタンパク質主体の折り畳み構造の内部に存在するものと考えられます。GlpGに関しては、そのプロテアーゼ活性を精製標品を用いて証明しました。これは、



私たちがモデル基質として Bla-LacYTM2-MBP 融合タンパク質を構築することができたため可能になったものです。私たちはその切断部位を同定し、GlpG がこの基質を膜貫通部位の内部ではなく、ペリプラズムに露出し始める部位の親水性残基間で切断することを明らかにしました。しかし、この切断は GlpG が膜貫通部位を認識することによって起こることも見いだし、現在、GlpG の基質認識機構を詳しく調べています。(小出佳代、前河早希、秋山芳展)

膜タンパク質の品質管理プロテアーゼに関連する複数のプロヒビチンドメインタンパク質が大腸菌の細胞質膜の両側に存在する：私たちは、異常な膜タンパク質を分解・除去することによる膜タンパク質の「品質管理」に、大腸菌では二つの膜プロテアーゼ FtsH と HtpX が重要な役割を持っていることを示してきました。FtsH と HtpX の二重欠失株は条件致死となります。そのマルチコピーサプレッサーとして、FtsH の制御因子として従来知られていた *hflKC* 以外に *qmcA* 遺伝子が機能し得ることを見いだしました。HflKC も QmcA もプロヒビチンホモロジー (PHB) ドメインを持つ膜タンパク質です。興味深いことに、QmcA は HflKC とは逆にそのプロヒビチンドメインを含む大部分を細胞質側に配向していることがわかりました。

真核生物ではミトコンドリア膜でプロヒビチンが膜タンパクに対するシャペロンとして機能するとの報告があります。QmcA や HflKC も膜シャペロン機能を持つのかもかもしれません。ミトコンドリアには内膜の両側に露出する 2 種類の AAA プロテアーゼ (FtsH ホモログ) が存在します。ペリプラズム側に ATP が存在せず、細胞質配向の AAA プロテアーゼ (FtsH) のみを持つ大腸菌が 2 種類のプロヒビチンホモログを膜の両側に持っていることは示唆に富む知見であると考えています。(千葉志信、秋山芳展)



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 mammalian neural development. We are characterizing their functions by misexpressing the genes with retrovirus and electroporation (gain-of-function study) and by generating knock-out mice (loss-of-function study). During neural development, the following steps occur sequentially: (1) maintenance of neural stem cells, (2) neurogenesis and (3) gliogenesis. Our results indicate that all three steps are regulated by bHLH genes. However, bHLH genes alone are not sufficient but homeodomain genes are additionally required for neuronal subtype specification. We are also interested in biological clocks that regulate embryogenesis. We have recently found that the bHLH genes *Hes1* and *Hes7* display oscillatory gene expression with two-hour periodicity and regulate the timing of the developmental processes.

1) *Mash1* and *Math3* are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors: R. OHSAWA, T. OHTSUKA, and R. KAGEYAMA

Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors are known to play important roles in neuronal determination and differentiation. However, their exact roles in neural development still remain to be determined because of the functional redundancy. Here, we examined the roles of neural bHLH genes, *Mash1* and *Math3*, in development of trigeminal and facial branchiomotor neurons, which derive from rhombomere 2 to 4. In *Math3*-null mutant mice, facial branchiomotor neurons are misspecified, and both trigeminal and facial branchiomotor neurons adopt abnormal migratory pathway. In *Mash1;Math3* double-mutant mice, trigeminal and facial branchiomotor neurons are severely reduced in number partly because of increased apoptosis. In addition, neurons with migratory defects are intermingled over the midline from either side of the neural tube. Furthermore, oligodendrocyte progenitors of rhombomere 4 are reduced in number. In the absence of *Mash1* and *Math3*, expression of Notch signaling components is severely downregulated in rhombomere 4, and neural progenitors are not properly maintained, which may lead to intermingling of neurons and decrease of oligodendrocyte progenitors. These results indicate that *Mash1* and *Math3* not only promote branchiomotor neuron development but also regulate the subsequent oligodendrocyte development and the cytoarchitecture by maintaining neural progenitors through Notch signaling.

2) Visualization of embryonic neural stem cells using *Hes* promoters in transgenic mice: T. OHTSUKA, I. IMAYOSHI, H. SHIMOJO, E. NISHI, R. KAGEYAMA and S.K.

MCCONNELL

In the central nervous system, neural stem cells proliferate in the ventricular zone (VZ) and sequentially give rise to both neurons and glial cells in a temporally and spatially regulated manner, suggesting that stem cells may differ from one another in different brain regions and at different developmental stages. For the purpose of marking and purifying neural stem cells to ascertain whether such differences exist, we generated transgenic mice using promoters from *Hes* genes (pHes1 or pHes5) to drive expression of destabilized enhanced green fluorescent protein. In the developing brains of these transgenic mice, GFP expression was restricted to undifferentiated cells in the VZ, which could asymmetrically produce a Numb-positive neuronal daughter and a GFP-positive progenitor cell in clonal culture, indicating that they retain the capacity to self-renew. Our results suggest that pHes-EGFP transgenic mice can be used to explore similarities and differences among neural stem cells during development.

3) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cell: Y. MASAMIZU, T. OHTSUKA, Y. TAKASHIMA, H. NAGAHARA, Y. TAKENAKA, K. YOSHIKAWA, H. OKAMURA, and R. KAGEYAMA

Notch signaling components such as the bHLH gene *Hes1* are cyclically expressed by negative feedback in the presomitic mesoderm (PSM) and constitute the somite segmentation clock. Because *Hes1* oscillation occurs in many cell types, this clock may regulate the timing in many biological systems. While the *Hes1* oscillator is stable in the PSM, it damps rapidly in other cells, suggesting that the oscillators in the former and the latter could be intrinsically different. Here, we have established the real-time bioluminescence imaging system of *Hes1* expression and found that, although the *Hes1* oscillation is robust and stable in the PSM, it is unstable in the individual dissociated PSM cells, as in fibroblasts. Thus, the *Hes1* oscillators in the individual PSM cells and fibroblasts are intrinsically similar, and these results, together with mathematical simulation, suggest that the cell-cell communication is essential not only for synchronization but also for stabilization of cellular oscillators.

4) *Hes1* directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27^{Kip1}: K. MURATA, M. HATTORI, N. HIRAI, Y. SHINOZUKA, H. HIRATA, R. KAGEYAMA, T. SAKAI, and N. MINATO

A transcriptional regulator, *Hes1*, plays crucial roles in the control of differentiation and proliferation of neuronal, endocrine, and T-lymphocyte progenitors during development. Mechanisms for the regulation of cell proliferation by *Hes1*, however, remain to be verified. In

embryonic carcinoma cells, endogenous Hes1 expression was repressed by retinoic acid in concord with enhanced p27(Kip1) expression and cell cycle arrest. Conversely, conditional expression of a moderate but not maximal level of Hes1 in HeLa cells by a tetracycline-inducible system resulted in reduced p27(Kip1) expression, which was attributed to decreased basal transcript rather than enhanced proteasomal degradation, with concomitant increases in the growth rate and saturation density. Hes1 induction repressed the promoter activity of a 5' flanking basal enhancer region of p27(Kip1) gene in a manner dependent on Hes1 expression levels, and this was mediated by its binding to class C sites in the promoter region. Finally, hypoplastic fetal thymi, as well as livers and brains of Hes1-deficient mice, showed significantly increased p27(Kip1) transcripts compared with those of control littermates. These results have suggested that Hes1 directly contributes to the promotion of progenitor cell proliferation through transcriptional repression of a cyclin-dependent kinase inhibitor, p27(Kip1).

5) Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain: B. VERNAY, M. KOCH, F. VACCARINO, A. SIMEONE, R.KAGEYAMA, and S.-L. ANG

The transcription factor Otx2 is required to determine mesencephalic versus metencephalic (cerebellum/pons) territory during embryogenesis. This function of Otx2 primarily involves positioning and maintaining the mid-hindbrain organizer at the border between midbrain and anterior hindbrain. Otx2 expression is maintained long after this organizer is established. We therefore generated conditional mutants of Otx2 using the Cre/loxP system to study later roles during rostral brain development. For inactivation of Otx2 in neuronal progenitor cells, we crossed Otx2(flox/flox) animals with Nestin-Cre transgenic animals. In Nestin-Cre/+; Otx2(flox/flox) embryos, Otx2 activity was lost from the ventral midbrain starting at embryonic day 10.5 (E10.5). In these mutant embryos, the mid-hindbrain organizer was properly positioned at E12.5, although Otx2 is absent from the midbrain. Hence, the Nestin-Cre/+; Otx2(flox/flox) animals represent a novel mouse model for studying the role of Otx2 in the midbrain, independently of abnormal development of the mid-hindbrain organizer. Our data demonstrate that Otx2 controls the development of several neuronal populations in the midbrain by regulating progenitor identity and neurogenesis. Dorsal midbrain progenitors ectopically expressed Math1 and generate an ectopic cerebellar-like structure. Similarly, Nkx2.2 ectopic expression ventrally into tegmentum progenitors is responsible for the formation of serotonergic neurons and hypoplasia of the red nucleus in the midbrain. In addition, we discovered a novel role for Otx2 in regulating neurogenesis of dopaminergic neurons. Altogether, these results demonstrate that Otx2 is required from E10.5 onward to regulate neuronal subtype identity and neurogenesis in the midbrain.

6) C/EBP phosphorylation biases multipotent cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo: A. PAQUIN, F. BARAB'E-HEIDER, R. KAGEYAMA, and F.D. MILLER

The intracellular mechanisms that bias mammalian neural precursors to generate neurons versus glial cells are not well understood. We demonstrated previously that the growth factor-regulated mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and its downstream target, the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcription factors, are essential for neurogenesis in cultured cortical precursor cells (Menard et al., 2002). Here, we examined a role for this pathway during cortical cell fate determination in vivo using in utero electroporation of the embryonic cortex. These studies demonstrate that inhibition of the activity of either MEK or the C/EBPs inhibits the genesis of neurons in vivo. Moreover, the MEK pathway mediates phosphorylation of C/EBPbeta in cortical precursors, and expression of a C/EBPbeta construct in which the MEK pathway phosphorylation sites are mutated inhibits neurogenesis. Conversely, expression of a C/EBPbeta construct, in which the same sites are mutated to glutamate and therefore are "constitutively" phosphorylated, enhances neurogenesis in the early embryonic cortex. A subpopulation of precursors in which C/EBP activity is inhibited are maintained as cycling precursors in the ventricular/subventricular zone of the cortex until early in postnatal life, when they have an enhanced propensity to generate astrocytes, presumably in response to gliogenic signals in the neonatal environment. Thus, activation of an MEK-C/EBP pathway in cortical precursors in vivo biases them to become neurons and against becoming astrocytes, thereby acting as a growth factor-regulated switch.

7) Prethymic T cell development defined by the expression of Paired Immunoglobulin-like Receptors: K. MASUDA, H. KUBAGAWA, T. IKAWA, C.-C. CHEN, K. KAKUNAGA, M. HATTORI, R. KAGEYAMA, M.D. COOPER, N. MINATO, Y. KATSURA, and H. KAWAMOTO

T cells are produced in the thymus from progenitors of extrathymic origin. As no specific markers are available, the developmental pathway of progenitors preceding thymic colonization remains unclear. Here we show that progenitors in murine fetal liver and blood, which are capable of giving rise to T cells, NK cells and dendritic cells, but not B cells, can be isolated by their surface expression of paired immunoglobulin-like receptors (PIR). PIR expression is maintained until the earliest intrathymic stage, then downregulated before the onset of CD25 expression. Unlike intrathymic progenitors, generation of prethymic PIR(+) progenitors does not require Hes1-mediated Notch signaling. These findings disclose a prethymic stage of T-cell development programmed for immigration of the thymus, which is genetically separable from intrathymic

stages.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Cell Biology

Laboratory of Growth Regulation

- Ohsawa, R., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2005) *Mash1* and *Math3* are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. **J. Neurosci.** **25**, 5857-5865.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J., and Ohsawa, R. (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. **Exp. Cell Res.** **306**, 343-348.
- Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T. (2005) *Hes1*-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **328**, 348-352.
- Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T., and Minato, N. (2005) *Hes1* directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27^{Kip1}. **Mol. Cell. Biol.** **25**, 4262-4271.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Simeone, A., Kageyama, R., and Ang, S.-L. (2005) *Otx2* regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. **J. Neurosci.** **25**, 4856-4867.
- Akagi, T., Akita, J., Haruta, M., Suzuki, T., Honda, Y., Inoue, T., Yoshiura, S., Kageyama, R., Yatsu, T., Yamada, M. and Takahashi, M. (2005) Iris-derived cells from adult rodents and primates adopt photoreceptor-specific phenotypes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** **46**, 3411-3419.
- Paquin, A., Barnabé-Heider, F., Kageyama, R., and Miller, F.D. (2005) C/EBP phosphorylation biases multipotent cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. **J. Neurosci.** **25**, 10747-10758.
- Masuda, K., Kubagawa, H., Ikawa, T., Chen, C.-C., Kakugawa, K., Hattori, M., Kageyama, R., Cooper, M.D., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2005) Prethymic T cell development defined by the expression of Paired Immunoglobulin-like Receptors. **EMBO J.** **24**, 4052-4060.
- 影山龍一郎：発生をコントロールする生物時計．医学のあゆみ、216: 215-218. 2005.
- 影山龍一郎：生物の体づくりとリズム．科学、75: 1409-1414. 2005.
- 別所康全、影山龍一郎：体節形成を支配する生物時計のメカニズム．細胞工学、24: 499-503. 2005.
- 畠山淳、影山龍一郎：bHLH 型転写因子 *Hes* による神経幹細胞の維持とその意義．神経研究の進歩、49: 4-12. 2005.

Kageyama, R.: Molecular mechanism of the somite segmentation clock. Kyoto

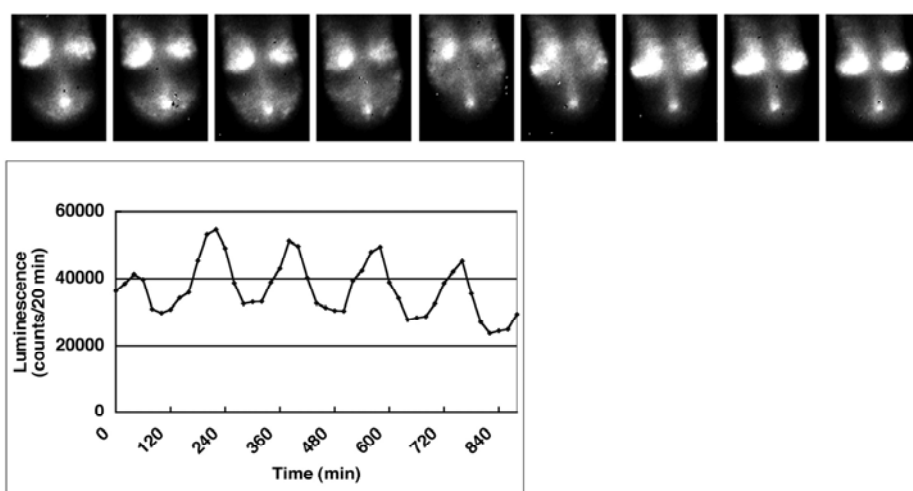
- University-National University of Singapore International Symposium. Singapore, 2005.
- Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in neural development. 3rd International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Rome, Italy, 2005.
- Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in neural development. Cortical Development. Santorini, Greece, 2005.
- Kageyama, R.: Real-time imaging of Hes1/Hes7 oscillations. Segmentation Meeting. San Francisco, USA, 2005.
- Kageyama, R.: Molecular dissection of Hes1/Hes7 oscillations. Animal Segmentation. Tourtour, France, 2005.
- Kageyama, R.: Regulation of embryogenesis by a two-hour cycle biological clock. JBS International Symposium. Kusatsu, 2005.
- Ohsawa, R., Takashima, Y., Tomita, K., Guillemot, F. and Kageyama, R.: Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. Kyoto University-National University of Singapore International Symposium. Singapore, 2005.
- Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: *Hes* genes are required for maintenance for the organizer centers in the CNS development. 3rd International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Rome, 2005.
- Ohsawa, R., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. 3rd International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Rome, 2005.
- Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: *Hes* genes are required for maintenance for the organizer centers in the CNS development. Cortical Development. Santorini, Greece, 2005.
- Ohsawa, R., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. Cortical Development. Santorini, Greece, 2005.
- Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Kageyama, R., and McConnell : Visualization of embryonic neural stem cells using *Hes* promoters in transgenic mice. 15th International Congress of Developmental Biology, Sydney, Australia, 2005.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. : *Hes* genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. 15th International Congress of Developmental Biology, Sydney, Australia, 2005.
- 影山龍一郎：2時間を刻む生物時計の意義を探る。第1回ゲノムネットワークプロジェクト公開シンポジウム、東京、2005。

- 影山龍一郎： Real-time imaging of Hes1/Hes7 oscillations. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005.
- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H. and Kageyama, R. : Dynamics of the Hes1 oscillation in individual cells and the presomitic mesoderm.第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005.
- Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T. and Kageyama, R : Persistent Hes1 expression regulates boundary formation in the developing central nervous system. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005.
- 小林妙子、萬野篤、垣塚彰：凝集タンパク質の分解過程における VCP/p97 の関与。第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.

当研究室には、平成 17 年 4 月から助手の小林妙子と研究補助員の立岩友香里が、9 月から医学研究科博士課程 1 年の上尾太郎（消化器内科）と北川雅史（脳神経外科）が新たに加わった。一方、医学研究科の畠山淳は、学位取得後、ポスドクとして熊本大学に移った。また、生命科学研究科の大澤亮介は、学位取得後、ポスドクとして残った。

1 月には、影山と大澤はシンガポールで開催された第 5 回京都大学国際シンポジウム(シンガポール大学との共催)に参加し、発表・討論を行った。5 月には、影山、大澤、Baek は、ローマで開かれた bHLH ミーティングとエーゲ海・サントリーニ島（ギリシア）で開かれた Cortical Development のミーティングに参加し、発表・討論を行った。いずれも風光明媚な場所で、学会の合間に観光を堪能した。また、9 月には大塚俊之と畠山淳はシドニーで開かれた国際発生生物学会に参加し、発表・討論を行った。10 月には日本生化学会大会（神戸）に多くの教室員が参加した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生過程を転写因子のレベルで明らかにするというもので、方法としては主としてレトロウイルスやエレクトロポレーションによる強制発現実験とノックアウトマウスを用いた機能喪失実験を行っている。転写因子の中でも塩基性領域・ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ因子(bHLH 因子)に注目しており、抑制性 bHLH 因子 Hes および促進性 bHLH 因子 Math, Mash, NeuroD, Neurogeninなどを解析している。また、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きたが、その分子機構や役割については不明の点が多い。特に、Hes1 に関しては不明の点が多く、今後探っていく予定である。



図：未分節中胚葉における Hes1 の発現を可視化した。Hes1 の発現は安定にオシレーションしている。

(1) *Mash1* と *Math3* は鰓運動性ニューロンの発生および神経前駆細胞の維持に必要

塩基性・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子はニューロンの決定および分化に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、それらの神経発生における厳密な役割は機能代償により、いまだ明らかにされていない点が多い。今回、ロンボメア 2~4 から生ずる三叉神経鰓運動性ニューロン及び顔面神経鰓運動性ニューロンの発生における神経系特異的 bHLH 遺伝子 *Mash1* と *Math3* の役割について解析を行った。*Math3* 欠損マウスでは、顔面神経鰓運動性ニューロンが正常な性質を獲得していなかった。そして、三叉神経鰓運動性ニューロン及び顔面神経鰓運動性ニューロンの両方が、ニューロンの遊走過程において異常な経路をとっていた。*Mash1*;*Math3* 二重欠損マウスでは三叉神経鰓運動性ニューロン及び顔面神経鰓運動性ニューロンが著しく減少しており、それはある程度は細胞死によるものであった。さらに、遊走異常を示したニューロンは神経管の両側から、正中線をこえて癒合し、混ざりあっていた。また、ロンボメア 4 からのオリゴデンドロサイトの前駆細胞が減少していた。*Mash1* と *Math3* が欠損すると Notch シグナル因子の発現がロンボメア 4 において著しく減少し、神経前駆細胞が正常に維持されなくなっていた。このことが神経管の癒合およびオリゴデンドロサイトの前駆細胞の減少につながっているのかもしれない。これらの結果は、*Mash1* と *Math3* が鰓運動性ニューロンの発生を促進しているだけでなく、Notch シグナルを介して神経前駆細胞を維持する事により、その後にかかるオリゴデンドロサイトの発生及び神経管の構造維持も制御していることを示している。(生命科学研究科・大澤亮介)

(2) *Hes* プロモーターを利用した胎仔神経幹細胞の可視化

発生途中の中樞神経系では、脳室周囲層に存在する神経幹細胞は、増殖しつつ、異なった種類のニューロンとグリア細胞を順番に産生する。このことから、神経幹細胞は時間とともにその性質を変えていると考えられているが、詳細についてはよくわかっていない。今回、神経幹細胞の同定を容易にするために、*Hes1* あるいは *Hes5* プロモーターから不安定化 EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの胎仔の脳では、EGFP の発現は脳室周囲層に存在する未分化細胞に局限して見られた。また、この EGFP 陽性細胞を分散培養したところ、*Numb* 陽性細胞と *Numb* 陰性細胞とに非対称分裂した。*Numb* 陽性細胞はニューロンに分化し、*Numb* 陰性細胞は *Hes* の発現を維持したままで未分化であった。以上の結果から、*Hes1* あるいは *Hes5* プロモーターを用いて可視化した細胞は、大部分が神経幹細胞であることが示された。今後、この可視化システムを用いて、神経幹細胞の遺伝子発現動態を解析する予定である。(医学研究科・大塚俊之)

(3) 分節時計のリアルタイム・イメージング

bHLH 因子 *Hes1* のような Notch シグナル分子は、未分節中胚葉においてネガティブフィードバックを介して周期的な発現変動 (オシレーション) を示し、分節時計を構成している。また、*Hes1* オシレーションはその他の細胞でも幅広くみられ、多くの細胞で生物

時計として機能すると考えられている。しかし、未分節中胚葉における Hes1 オシレーションは安定に持続するのに対して、その他の細胞では Hes1 オシレーションは持続せず、すぐに定常状態になる。このことから、未分節中胚葉の Hes1 オシレーターはその他の細胞の Hes1 オシレーターとは異なった機序で発現変動することが示唆されている。今回、Hes1 プロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものをレポーターとして用いることによって、Hes1 の発現をリアルタイムで可視化することに成功した。その結果、Hes1 は未分節中胚葉では安定なオシレーションを示すが、分散培養した未分節中胚葉の個々の細胞では不安定なオシレーションしか示さなかった。この不安定なオシレーションは、線維芽細胞のそれとよく似ていた。このことから、未分節中胚葉の個々の細胞は他の細胞と同じような不安定な Hes1 オシレーターしか持っていないことが明らかとなり、安定なオシレーションには細胞間相互作用が重要なことが示唆された。また、数理モデルを用いることによって、不安定なオシレーター同士を相互作用させて安定なオシレーターをつくることがシミュレーションできた。(医学研究科・正水芳人)

CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME RESEARCH LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

Human immunodeficiency virus (HIV) is a causative infectious agent for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). After the discovery of HIV, it has been well known that “retroviruses cause some human diseases”. Therefore, we now realize the importance of retrovirus research. The isolation of human retroviruses was the 5th major discovery and provided paradigm shift on the history of Retrovirology. The 1st~4th major discoveries are as follows; (1) the isolation of a pathogenic retrovirus, (2) the development of the focus assay for oncogenic retrovirus, (3) the discovery of reverse transcriptase, (4) the derivation of retroviral oncogene from cellular genomes. It is clear that these discoveries provided strong advances not only on Virology itself but also general Cell Biology. Many information on Molecular Biology has been obtained from these retrovirus researches. Therefore, we believe that our efforts will contribute to Medical as well as Life Sciences.

1) Replication of Viral Genome: J. AOKI, T. YOSHIDA, H. KITAYAMA, Y. SHINODA, K. SATO, Y. MIURA, Y. KOYANAGI

Virus infects cell and replicates. Without the cells virus cannot survive. Viral genome move from virion-producing cell to adjacent naïve cells. This is a most significant characteristic of virus. The mechanism of this infection event is a primary theme. The event of genome movement is not restricted in cell to cell infection. Inside cells, viral genomes or/and viral proteins move. Virus uses cellular trafficking machinery. However, we don't know yet how many cellular factors virus requires for its replication. To understand the mechanism of viral replication we are trying to isolate genes directly associated HIV-1 replication. Some inhibitory genes have been successfully isolated so far. Using cell biological methods based upon imaging technique the molecular events have been investigated. We wish to learn the mechanism.

2) Mechanism of HIV Pathogenesis: Y. MIURA, H. KITAYAMA, H. Y. ANDO, H. OKADA, N. MISAWA, Y. KOYANAGI

HIV causes immunodeficiency as well as neurodegeneration in humans. The mechanism of these diseases remains unclear. We have been analyzing how the diseases occur using in vitro-cell culture models and in vivo-animal models. In HIV encephalopathy, neurons are mainly destructed, but the influence to undifferentiated cells is unknown. We analyze its pathogenesis using above systems, and found undifferentiated cells in central nervous system are affected in functions, and fall into a differentiation disturbance to neurons. Now we are analyzing the details more. In

addition, we are searching the host origin neuroprotective factors in the pathogenesis of neurodestructive HIV encephalopathy. Many candidate genes probably coding neuroprotecting factors are identified and the research is now progressing.

3) Mechanism of Herpes Virus Neuropathogenesis: Y. MIURA, H. KITAYAMA, A. ANDO, Y. KOYANAGI

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) invades central nervous system and induces lethal encephalitis. We developed a rat model of HSV-1 encephalitis by using a neurovirulent HSV-1. The development of the encephalitis is dependent upon the infancy of the animal. We examined the mRNA profile in a recovery process from encephalitis and newly identified some molecules participating in the recovery step. Furthermore, the infection efficiency in the undifferentiated cells was extremely higher than in the terminal differentiated neurons. In addition, the undifferentiated cells appeared to be showing resistance to cytotoxicity by HSV infection and we are analyzing the associated factors.

4) Development of Lentivirus Vector System for Gene Therapy and Gene Discovery: J. AOKI, T. YOSHIDA, K. SATO, Y. SHINODA, Y. KOYANAGI

Virus transmits the gene into cells. It has been trying to take advantage of this viral nature for gene therapy in human disease. HIV-based virus (lentivirus) vector has further promising properties to infect non-dividing cell and integrate in chromosome DNA, especially in human hematopoietic and neuronal cells. Purpose of this project is improvement of the vector system for practical use as well as discovery of gene functions. We recently developed a functional screening system using lentivirus vector.

List of Publications

Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome

Laboratory of Viral Pathogenesis

Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y and Mitsuya H. Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/ GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087–2096, 2005.

Miura Y and Koyanagi Y. Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.

- Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y and Okamura K. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
- Ohkura S, Yamashita M, Ishida T, Babu PG, Koyanagi Y, Yamamoto N, Miura T and Hayami M. Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
- Baba S, Takahashi K, Noguchi S, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N and Kawai G. Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimmers. *J. Biochem.*, 138:583-592, 2005.
- Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y and Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
- 小柳義夫：HIV 感染を制御する細胞性因子 実験医学 23 巻 2566-2573 2005 .
- 小柳義夫：HIV 感染増殖とその宿主細胞性因子の概略：細胞への侵入者の軌跡 ウイルス 55 巻 251-258 2005 .
- 三浦義治、小柳義夫：HIV encephalopathy 臨床神経学 45巻 887-889 2005 .
-

- Yoshida T, Hieda K, Kawano Y, Aoki J, Misawa N, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y, A truncated form of CD63-deletion mutant blocks X4-HIV-1 entry through dislocalization of CXCR4. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005 .*
- Aoki J, Koyanagi Y. Suppression of HIV-1 release through CD63-overexpressed plasma membrane. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005 .*
- Miura Y, Aoki J, Kitayama H, Okada H, Sano K, kawaguchi Y, Koyonagi Y. Persistent and productive replication of herpes simplex virus type 1 in neural stem cells. 30th International Herpesvirus Workshpo, Turku, Finland, 2005 .
- Miura Y, Aoki J, Kitayama H, Okada H, Sano K, kawaguchi Y, Koyonagi Y. preferential infection of herpes simplex virus type 1 in neural stem cells. 12th International conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, 2005 .
- 三浦義治、小柳義夫：HIV encephalopathy . 第 4 6 回日本神経学会総会、鹿児島、2005
- 三浦義治、北山裕子、三沢尚子、岡田広司、青木淳、小柳義夫：実験小動物を用いたエイズ脳症の研究 . 第 1 9 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、2005
- 三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川口寧、小柳義夫：神経幹細胞における単純ヘルペスウイルス感染動態の解析 . 第 2 0 回ヘルペスウイルス研究会、名古屋、2005
- 三浦義治、北山裕子、小柳義夫：HIV 感染マクロファージによる中枢神経系未分化細胞群の障害 . 第 1 0 回日本感染症学会、東京、2005
- 三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川口寧、小柳義夫：神経幹細胞は単純ヘルペス

ウイルス 1 型感染細胞として重要である．第 10 回日本感染症学会、東京、2005
三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川口寧、小柳義夫：神経幹細胞は単純ヘルペス
ウイルス 1 型感染細胞として重要である．第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
三浦義治、北山裕子、小柳義夫：HIV 脳症における中枢神経系未分化細胞群関与の検討．
第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005
北山裕子、三浦義治、小柳義夫：ラット脳海馬スライス培養系を用いたエイズ脳症の病態
解析．第 19 回近畿エイズ研究会学術集会、京都、2005
北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫：中枢神経系組織内において抗 HSV 効果を発揮
する宿主因子の網羅的解析．第 20 回ヘルペスウイルス研究会、名古屋、2005
北山裕子、三浦義治、小柳義夫：HIV 感染マクロファージによる中枢神経系未分化細胞
群への障害．第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫：中枢神経組織内における抗 HSV 因子の探索．
第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
北山裕子、三浦義治、安藤良徳、小柳義夫：HIV 感染マクロファージによる神経細胞の軸
索伸張障害メカニズムの解析．第 2 回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、2005
青木淳、小柳義夫：CXCR4 を標的とした siRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた悪
性腫瘍の遺伝子治療．第 64 回日本癌学会、札幌、2005
青木淳、佐藤佳、佐野浩一、大黒恵理子、小柳義夫：CD63 過剰発現による HIV-1 粒子の
感染性抑制．第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
青木淳、佐藤佳、大黒恵理子、佐野浩一、小柳義夫：テトラスパニン分子による HIV-1 粒
子の感染性抑制．第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005
芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫：抗 HIV 因子の単離：CXCR4
細胞膜移行阻害分子の同定．第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫：特定の細胞膜表面分子に対
する細胞膜移行阻止因子の単離：CXCR4 発現阻止因子．第 28 回日本分子生物学会、
福岡、2005
篠田康彦、稗田訓子、小柳義夫：薬剤誘導性発現レンチウイルスベクターの開発．第 53
回日本ウイルス学会、横浜、2005
安藤良徳、芳田剛、小柳義夫：生細胞における CXCR4 分子のイメージング解析．第 53 回
日本ウイルス学会、横浜、2005
佐藤佳、青木淳、北山裕子、小柳義夫：がん細胞転移抑制性レンチウイルスベクターの開
発．第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005
三浦義治、北山裕子、小柳義夫：HIV 脳症における中枢神経系未分化細胞群関与の検討．
第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005
星野重樹、志村まり、田口崇、小柳義夫、石坂幸人：HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス
再産生における Vpr の機能．第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005

平成 17 年 4 月に本学医学研究科博士課程に芳田剛が、本学生命科学研究科修士課程に安藤良徳と佐藤佳が入学した。研究室が本館 5 階西から新館 2 階東へ移動した。

われわれの取り組んでいるエイズの原因ウイルスである HIV の発見により、「レトロウイルスは人の病気の大きな要因である」とその重要性が認知された。この発見は、レトロウイルス研究の歴史の中で 5 番目の大きなものである。それ以前の大きな発見は、1) 発癌ウイルスの分離、2) ウイルスを試験管内で定量できるフォーカスアッセイの確立、3) 逆転写酵素の発見、4) 細胞内発癌遺伝子の発見である。いずれにもノーベル賞が与えられている。これらレトロウイルスの解明から、生命現象の理解に必ずつながっている。すなわち多くの生物学一般に関する我々の知識という宝が得られた。そこで我々の研究はヒトを救う医学研究が生命そのものを理解する研究へ直結すると考える。

以下のテーマについて研究を遂行している。

(1) ウイルスの複製メカニズムの解明：ウイルスは細胞から細胞へと感染する。すなわち、その遺伝子を細胞から細胞へ移動させる。この現象はどのようになっているのか明らかにする。遺伝子の移動は細胞外だけではない。細胞内において感染早期に核内へ、あるいは転写後は核外へ、目的に応じて移行する。これは細胞内の分子運搬系そのものである。しかし、ひとつのウイルスが増殖を完了するのに何種類の細胞因子が必要かも、未だに不明である。このなぞを解明するために HIV-1 複製に関係する遺伝子を分離し、そのメカニズムを明らかにする。すでに数種類のウイルス複製の抑制的に働く分子を同定している。その中で 4 回膜貫通ドメインを有するテトラスパニン分子について、ウイルス学的アプローチに限らず、イメージ技術などの細胞生物学手法を使ってどのような分子的現象が起きているか理解したい。(図 1 は HIV のライフサイクルである)。(青木淳、芳田剛、佐藤佳、北山裕子、篠田康彦、三浦義治、小柳義夫)

(2) HIV 病原性の解明：HIV はヒトを免疫不全あるいは脳症に陥れる。そのなかでも HIV 脳症は非常に難解な疾患であり、現在も詳細な解明はなされていない。そこで我々は、このウイルス感染の免疫担当細胞ならびに中枢神経に対する影響をそれぞれの培養系(図 2 はラット海馬スライス培養である)あるいは、ヒトの細胞を移植したマウスを解析し、以下の 2 つの観点から研究を進めている。まず HIV 脳症では神経細胞を中心に破壊がおこることが知られているが、未分化細胞群への影響はほとんど知られていない。前記実験系の解析の結果、神経前駆細胞は強い機能障害を受けて神経細胞への分化障害に陥っていることが明らかになり、さらにその詳細な解析を行っている。また一方、HIV 脳症の病態の中では、組織破壊的に働く因子だけでなく、細胞保護作用を持った宿主由来因子が関与す

る可能性を見出し、前述の実験系の解析から HIV 感染病態における細胞保護因子遺伝子群が多数同定され、これらの解析を進めている。(三浦義治、北山裕子、安藤良徳、三沢尚子、岡田広司、小柳義夫)

(3) 単純ヘルペス脳炎における宿主因子の解明：単純ヘルペスウイルス 1 型は、中枢神経系において主に神経細胞に感染しながら組織破壊を引き起こすことで知られている。そこで神経伝播性を持った単純ヘルペスウイルス 1 型を用いて、単純ヘルペス脳炎モデル動物を作製し、感染動態を解析した。その結果、脳炎の発症には動物個体の幼若性が重要であることが判明し、さらに脳炎からの回復過程で組織修復およびウイルス伝播抑制効果を発揮していると考えられる宿主遺伝子群が同定され、その解析を進めている。また、培養系細胞を用いた解析から、従来報告されている神経細胞に比べて、幼若なグリア系細胞や未分化細胞群におけるウイルスの感染効率が極めて高く、さらに HSV 感染による細胞障害性に耐性を示す細胞群が存在することから、そこで発現している遺伝子群について解析を進めている。(三浦義治、北山裕子、安藤良徳、岡田広司、小柳義夫)

(4) ウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発とこのベクターを用いた遺伝子探索法の開発：ウイルスは細胞から細胞へ遺伝子を受け渡す。この機能を治療目的に応用する方法を開発する。ウイルスベクターとして HIV を改良したレンチウイルスベクターは増殖しない細胞にも感染することより、有望視しており、動物モデルを用いて開発を進めている。さらに、このレンチベクターを用いた細胞遺伝子の探索法の開発を行っている。(青木淳、芳田剛、佐藤佳、篠田康彦、小柳義夫)

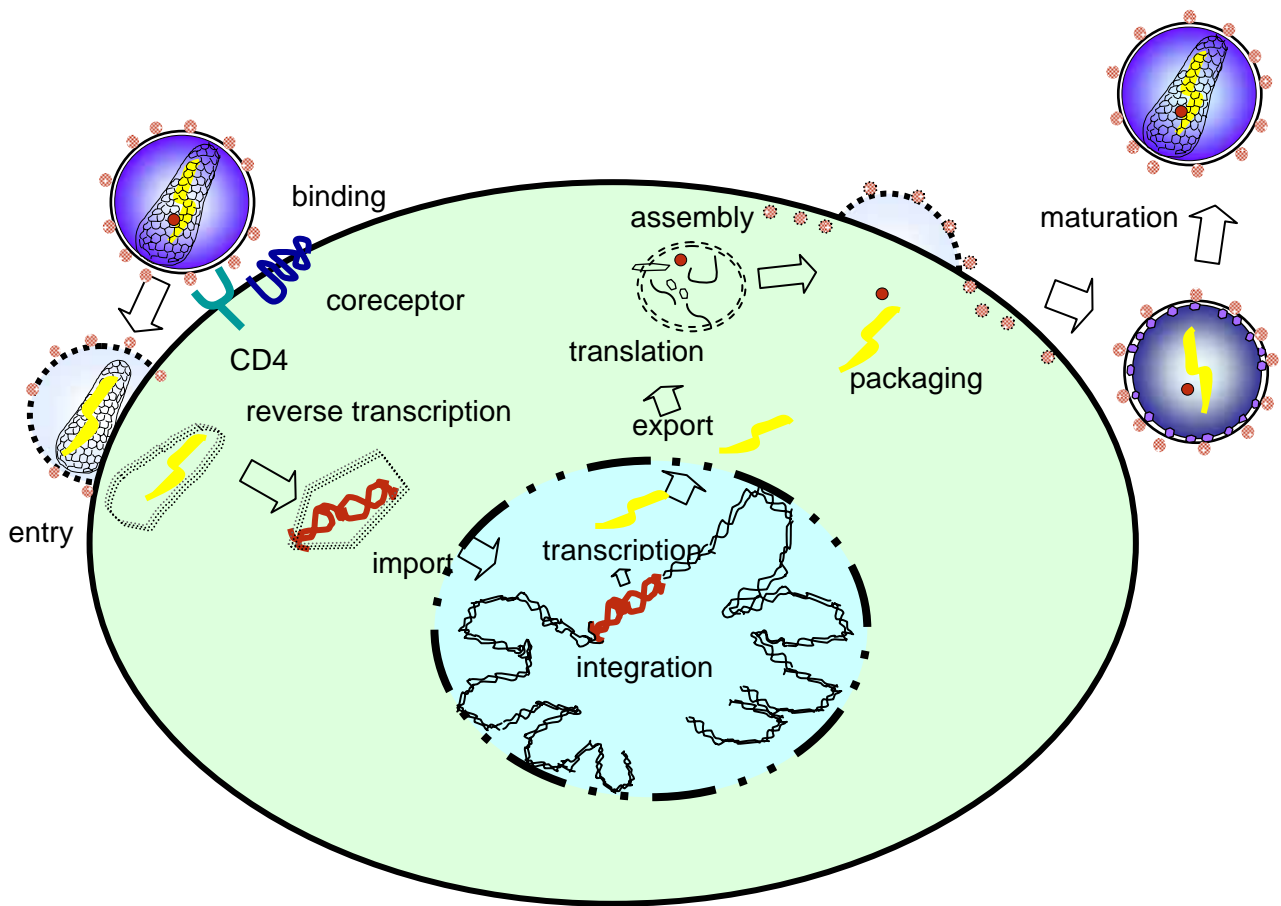


図1 . HIV のライフサイクル。

図2. 神経組織をそのまま維持するラット脳海馬スライス培養法により神経障害性因子を探索
3D structure of hippocampus was reconstituted in rat slice culture and applied for screening of virus-induced neurotoxic factors.



スライス培養された海馬組織

錐体細胞層 (NeuN染色)

Pyramidal cell layer (Red: NeuN+ cells)

**CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME RESEARCH
LABORATORY OF VIRUS IMMUNOLOGY**

1) Molecular Mechanisms of Leukemogenesis in Adult T-cell Leukemia (ATL): J. YASUNAGA, M. YOSHIDA, Y. SATOU, K. TAKAI, T. ZHAO and M. MATSUOKA.

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) increases the number of infected cells through the activity of accessory genes, which are encoded by the pX region located between *env* and the 3'-long terminal repeat (LTR). These genes include *tax*, *rex*, *p30*, *p12*, *p13* and *HTLV-I bZIP factor* (*HBZ*). Among them, *tax* is thought to play a central role in transformation of infected cells, however, it is a major target of cytotoxic T-lymphocytes. The *HBZ* gene, which is encoded by the minus strand of HTLV-I, contains a basic leucine zipper domain. It has been reported that HBZ suppresses Tax-mediated activation of viral transcription through 5'-LTR, and that modulates transcriptional activities of AP-1. Our previous studies showed that 3'-LTR is intact and unmethylated in all ATL cells, and HTLV-I infected cell lines. We found novel splicing of *HBZ* gene by 5'-RACE. *HBZ* gene was transcribed in all of the ATL cell lines and primary ATL cells, while *tax* gene transcription was frequently silenced. These findings suggest that HBZ might be a critical factor for leukemogenesis. We observed that suppression of *HBZ* gene transcription by short interfering RNA inhibited proliferation of ATL cells. Interestingly, analyses of T-cell lines transfected with mutated *HBZ* genes showed that *HBZ* promotes T-cell proliferation in its RNA form. We are now investigating the mechanisms how *HBZ* gene promotes proliferation of ATL cells, and its role in the leukemogenesis.

2) *In vivo* HTLV-I infection using NOD/SCID common gamma chain knock-out mouse: P. MIYAZATO, Y. TANIGUCHI, J. YASUNAGA and M. MATSUOKA.

We are studying the primary infection of HTLV-I in NOD-SCID common gamma chain knock-out (NOG) mice model. At first, we inoculate human peripheral blood mononuclear cells into NOG mice. Then, mitomycin C treated MT-2 cells are inoculated two days later. HTLV-I infection was confirmed by PCR and provirus load was determined by real-time PCR. HTLV-I infection increases the number of CD4 positive memory T-cells, and their proliferation was polyclonal. Although nucleoside reverse transcriptase inhibitors could block the primary infection when they are administered just after inoculation. The phenotypes observed in NOG mice are similar to that in HTLV-I carriers, indicating that this model should be useful to analyze the early stage of HTLV-I infection *in vivo*.

3) The mechanisms for generating defective HTLV-I provirus lacking 5'-LTR: M. MIYAZAKI, Y. TANIGUCHI, J. YASUNAGA and M. MATSUOKA.

We identified HTLV-I provirus without 5'-LTR in fresh ATL cells and designated it as type 2 defective provirus. However, the mechanism for generating type 2 defective provirus remains unknown. To clarify it, we determined the sequences surrounding integration sites of type 2 defective provirus. Among 11 cases with type 2-defective provirus, 7 cases retained 6-bp duplication of sequence adjacent to 3'-LTR and 5' end of provirus, which indicated that this defective provirus was formed before the integration. In the remaining 4 cases, we did not find such duplication, suggesting that this defective provirus was generated after the integration. Quantitative analyses of the frequency of type 2-defective provirus was estimated to be under 5% in carriers, which was much less than that among ATL cases (27%). Thus, this study shows that defective provirus lacking 5'-LTR is generated both before and after the integration, and cells harboring type 2 defective provirus are selected during the leukemogenesis.

4) Identification of aberrantly methylated genes in chronic lymphocytic leukemia cells: J. FAN and M. MATSUOKA.

It is well known that the dysregulation of DNA methylation is implicated in the tumorigenesis of various types of cancer. We focused on the epigenetic changes in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. Using methylated CpG island amplification/representational difference analysis (MCA/RDA) method, we identified 5 hypermethylated and 27 hypomethylated regions compared with normal B-cells. In addition, we found aberrantly expressed genes surrounding the hypomethylated regions. We are now analyzing their function in the leukemogenesis of B-CLL.

5) Mechanism of HIV Fusion to the Host Cells: M. UENO, E. KODAMA, K. KAJIWARA, K. SHIMURA, Y. SAKAGAMI, and M. MATSUOKA.

An HIV envelope protein, gp41, is involved in the fusion between viral and cellular membrane. The N- and C-terminal peptides (*e.g.*, N34 and C34, respectively) from gp41 two α -helical domains (N- and C-HR, respectively) have been shown to inhibit HIV infection. T-20 (enfuvirtide or Fuzeon), one of C-HR peptides, efficiently inhibits HIV replication and is approved in the United States and Europe. Recently, resistant variants for T-20 were reported. Sequence analyses of gp41 coding region revealed that these variants contained amino acid substitutions in the N-HR region, amino acid position 36 to 45. Primary mutations that conferred T-20 resistance were observed at Valine position 38 (V38) and N43. However, replication of HIV-1 containing such substitutions was heavily impaired. Interestingly, these variants also contained a silent mutation at L44, TTG to CTG.

It is unlikely that L44-CTG involved in T-20 resistance. L44-CTG is located in the Rev responding element (RRE), important HIV-1 RNA structure for transportation of HIV-1 genome from nucleus to cytosol. Therefore, we examined whether L44 silent mutation involves in HIV-1 replication. In RRE secondary structure, L44-CTG seemed to compensate RRE structure impaired by the primary mutation, N43K. Competitive HIV-1 replication assay revealed that L44-CTG mutation indeed improved HIV-1 replication impaired by N43K. L44-CTG also improved HIV-1 replication containing N43D. These results indicate that HIV has to maintain functions of both gp41 and RRE to acquire resistance to fusion inhibitors.

6) Establishment of a Screening System for HIV Fusion Inhibitors: A. SAKAKIBARA, E. KODAMA, K. IZUMI, and M. MATSUOKA.

An HIV fusion inhibitor, T-20 is one of effective agents in HIV-1 chemotherapy. However, there are several limitations in the T-20 containing therapy, *e.g.*, subcutaneous administration and high cost. Development of small molecule fusion inhibitors is necessary. Assay systems using HIV-1 and target cells (virus-cell infection assays) require at least 2 days to obtain the results and do not usually provide the information regarding mechanism of action. Therefore, we have developed a new assay system to screen compounds that have inhibitory effects on HIV-1 fusion with an enzyme linked immuno-solvent assay (ELISA). Briefly, we constructed *E. coli* expression vectors to generate proteins of gp41 N- and C-HR regions as fusion proteins with maltose binding protein (MBP) and glutathione S-transferase (GST), respectively. These fusion proteins were expressed in *E. coli* and purified with affinity column chromatographies. GST-C-HR and MBP-N-HR were used as a coating protein and a binding protein, respectively. Binding of MBP-N-HR to GST-C-HR was detected by alkaline phosphatase conjugated anti-MBP antibody. Various fusion inhibitory peptides except for T-20 showed anti-fusion activity in our ELISA system like in virus-cell infection assays. At present, we identified several small molecule fusion inhibitors using our system. Moreover, we optimized binding of peptides that contained whole helical regions, mutations and deletions. This would be useful for analysis of binding sites of small compounds. We plan to design and synthesize potent fusion inhibitors. Note: This project is co-operated with Prof. N. Fujii, Kyoto University Faculty of Pharmaceutical Science and Prof. T. Chiba, Akita National College of Technology.

7) 4'-Ethynyl Nucleosides for Drug Resistant HIV-1: A. KAWAMOTO, E. KODAMA, and M. MATSUOKA.

Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) such as azidothymidine (AZT) still play an important role in the highly active anti-retroviral therapy (HAART) for HIV-infected patients. At present, over 10 NRTIs are clinically approved in Japan. However, eradication of HIV has not been

achieved yet and long-term therapy allows emergence of drug resistant HIV. Thus, development of new NRTIs active against resistant variants is still required. We have identified the new class of HIV reverse transcriptase inhibitor, 4'-ethynyl- 2'-deoxyadenosine (4'-E-dA), which efficiently inhibited all drug resistant variants tested. 4'-E modification confers inhibitory effect on 3'-substituted NRTIs resistant variants. To increase inhibitory effect on HIV replication and reduce the cytotoxicity, we further modified 4'-E nucleosides and examined their activities. At present we found that a fluoro-substitution at 2-adenine (2F-4'-E-dA) dramatically enhanced anti-HIV activity. The substitution also conferred resistance to adenosine deaminase which enzyme catalyzes adenosine to inosine. Interestingly, 2F-4'-E-dA primarily phosphorylated by cellular deoxycytidine kinase (dCK). Since level of dCK expression is similar both in resting and activated lymphocytes, 2F-4'-E-dA might be effective against both dividing and resting cells. Thus, 2F-4'-E-dA holds unique properties for anti-HIV chemotherapy as NRTIs.

LIST OF PUBLICATIONS

Research Center For Aquired Immunodeficiency Syndorome

Laboratory of Virus Immunology

- Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J-I, Maeda M, Mueller N, Okayama A, Matsuoka M. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* 2:64, 2005.
- Doi, K, Wu X, Taniguchi Y, Yasunaga J-I, Satou Y, Okayama A, Nosaka K, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood* 106:1048-1053, 2005.
- Fan J, Kodama E-I, Koh Y, Nakao M, Matsuoka M. Halogenated thymidine analogs restore the expression of silenced genes without demethylation. *Cancer Res* 65:6927-6933, 2005.
- Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*, 2:27, 2005.
- Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. *Cancer Res* 65: 4467-4470, 2005.
- Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations conferring resistance to HIV-1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev responsive element functions. *J Virol* 79:764-770, 2005.
- Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Shintani M, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 2: synthesis and structure-activity relationships of 2-cyano and 2-hydroxy thiazolidenebenzenesulfonamide derivatives. *Bioorg*

Med Chem. 13: 949-961, 2005.

Taylor, G.P., Matsuoka, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene* 24: 6047-6057, 2005.

松岡雅雄：HTLV-I 感染と発癌 医学のあゆみ 212 巻 307-312 2005.

松岡雅雄：HTLV-I の発癌性 臨床と微生物 32 巻 3 号 247-253 2005.

松岡雅雄：HTLV-I 感染による発がん機構 分子細胞治療 4 巻 5 号 380-385 2005.

高井健、松岡雅雄：HTLV-I と HIV の重複感染 日本医事新報 4251 号 98-99 2005.

松岡雅雄：レトロウイルスと感染病態 微生物感染学 南山堂 249-265 2005.

Kodama E, Masuda N, Orita M, Yamamoto O, Fujii M, Kageyama S, Ohta M, Hatta T, Inoue H, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, and Matsuoka M. HIV-1 Acquires Resistance to New NNRTI, Thiazol Derivatives, through Steric Hindrance with Multiple Mutations. 12th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, MA, Feb 22-25, 2005.

Matsuoka M. Molecular mechanism of leukemogenesis in human T-cell leukemia virus type I induced adult T-cell leukemia. Kyoto University-NUS international symposium, Singapore. Jan 25-30, 2005.

Matsuoka M. Molecular mechanism of leukemogenesis from HTLV-I infection to onset of ATL. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Satou Y, Wu X, Doi K, Yasunaga J-I, Taniguchi Y and Matsuoka M. Different Preference of HTLV-I Provirus Integration between Carrier State and ATL. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Matsuoka M. Identification and characterization of the promoter region for *HBZ* gene. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Miyazaki M, Matsuoka M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y. Mechanism generating defective HTLV-I provirus. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Kodama E, Mabuchi N, Otake A, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M. Mutations Conferring Resistance to HIV-1 Fusion Inhibitors are Restricted by gp41 and Rev Responsive Element Functions. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Kobe, Japan. July 1-5, 2005.

Fan J, Asou N, Matsuoka M. Methylation Profile of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. The American Society of Hematology 47th Annual Meeting and Exposition. Atlanta, Georgia. Dec 10-13, 2005.

- 松岡雅雄：シンポジウム「HTLV-I 感染から ATL 発症への分子機構」：第 45 回日本リンパ網内系学会総会、福岡、2005 年 7 月 13-15 日
- 松岡雅雄：シンポジウム「ヒト T 細胞白血病ウイルスの生き残り戦略」：第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 14-16 日
- 松岡雅雄、Fan Jun：シンポジウム「エピジェネティクスを標的とした薬剤探索」：第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 14-16 日
- 高井健、坂本修一、榮達智、安永純一郎、小松賢志、松岡雅雄：NBSI 発現のスプライシングによる調節：第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 14-16 日
- Miyazato Paola、安永純一郎、小柳義夫、満屋裕明、松岡雅雄：免疫不全マウスを用いた HTLV-I 初期感染モデルの確立：第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 14-16 日
- Fan Jun、麻生範雄、松岡雅雄：慢性 B リンパ性白血病における DNA メチル化の網羅的解析：第 67 回日本血液学会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- 宮崎真紀、松岡雅雄、谷口裕子、安永純一郎：5'側 LTR 欠損型プロウイルスの生成機序と発がん機構：第 67 回日本血液学会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- Miyazato Paola、安永純一郎、谷口裕子、小柳義夫、満屋裕明、松岡雅雄：Study of early events in HTLV-I infection in NOG mice with primarily infected-cells：第 67 回日本血液学会、横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- 白川一、松岡雅雄：レトロウイルスの組み込みにおける DNA 二重鎖切断修復酵素の役割：第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月 20-22 日
- 上野真理子、梶原慶子、志村和也、児玉栄一、松岡雅雄：融合阻害剤 T-20 (Fuzeon) に対する耐性 HIV の解析：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
- 梶原慶子、児玉栄一、松岡雅雄：MTT 法を用いた CXCR4 および CCR5 トロピック HIV-1 に対する薬剤感受性試験法：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
- 児玉栄一、梶原慶子、大高章、藤井信孝、松岡雅雄：水溶性 C34 誘導体の抗 HIV 効果：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日
- 川本敦司、児玉栄一、大類洋、満屋裕明、松岡雅雄：核酸系逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-halo-deoxyadenosine 誘導体の耐性 HIV 複製阻害活性の検討：第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、2005 年 12 月 1-3 日

(1) ATL 細胞における白血病化機構の解明

HTLV-I はエンベロープ遺伝子と 3'-LTR との間に pX 領域という特徴的な配列を有しており、*tax*、*rex*、*p30*、*p12*、*p13*、*HBZ* などの修飾遺伝子がコードされている。その中で Tax は HTLV-I 感染細胞の不死化に中心的な役割を果たしていると考えられているが、その反面で細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的分子でもある。HBZ は HTLV-I のアンチセンス鎖にコードされ、その機能としてウイルス遺伝子の転写抑制および転写因子 AP-1 との相互作用が知られている。我々は ATL 細胞において Tax の発現はしばしば抑制されているのに対し HBZ mRNA は全ての細胞で発現していることを見出した。siRNA を用いて ATL 細胞株にて HBZ をノックダウンしたところ、その増殖は抑制されることを明らかにした。このことは ATL の発症には Tax よりもむしろ HBZ が重要である可能性を示唆している。さらに HBZ 変異体を用いた解析から HBZ の増殖促進作用は蛋白としてではなく RNA として機能していることが明らかとなった。現在その作用機序の詳細について解析を進めている。Tax および HBZ は ATL の発がんに必要な役割を果たしていると考えられる。これらのトランスジェニックマウスを作成し、現在その表現型を解析している。

(2) NOD/SICD common gamma chain ノックアウトマウスを使った HTLV-I 感染系の確立

HTLV-I 感染は遊離ウイルスではなく感染細胞と非感染細胞の接触を介した感染による。生体内における HTLV-I 感染系を確立するために NOD/SICD common gamma chain ノックアウト (NOG) マウスを用いた。NOG マウスにヒト末梢血単核球を接種し 3 日後にマイトマイシン C で処理した MT-2 を接種した。HTLV-I 感染が確認されプロウイルス量は経過と共に増加した。感染により CD4 陽性メモリー T リンパ球の増加が認められ、HTLV-I キャリアで認められるのと同様の所見であった。感染は逆転写酵素阻害剤で抑制された。NOG マウスを使った感染系で認められた感染細胞の解析結果はキャリアにおけるものと相似であり、この NOG マウスを使った *in vivo* 感染系が HTLV-I の初期感染過程を解析する上で有力なツールになることを示している。

(3) 5'-LTR 欠損型 HTLV-I プロウイルス組込み機序の解析

ATL 細胞では、しばしば 5'-LTR を欠損した HTLV-I プロウイルス (2 型欠損ウイルス) を有するものが存在する。我々はこの 2 型欠損ウイルスを持つ ATL 細胞 11 例の組込み部位を解析し、7 例においてプロウイルスの 5'側と 3'-LTR の両断端に宿主ゲノム由来である 6 bp の反復配列が存在していることを見出した。この所見より、この欠損型ウイルスは宿主ゲノムへの組込み前に形成されたことが明らかとなった。一方、残りの 4 例にはこのような反復配列は認められず組込み後に欠損が生じたと予想され、宿主ゲノムにも短い欠損が存在した。このように欠損型ウイルスは組込み前、組込み後のいずれにも生じることが

示された。2 型欠損ウイルスの定量的解析により無症候性キャリアでは 2 型欠損ウイルスを有している感染細胞は全感染細胞の 5% 未満であることが判明し、ATL 症例の 27% が 2 型欠損ウイルスを保持していることと比較すると 2 型欠損ウイルスを有する感染細胞が発がんの過程で選択されている可能性が示された。

(4) 慢性リンパ性白血病における異常メチル化遺伝子の探索

DNA の異常メチル化と様々な悪性腫瘍の発がん機序との関係が知られている。我々は B 細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) におけるエピジェネティックな異常に注目し解析を進めている。今までに Methylated CpG island amplification (MCA)/representational difference assay (RDA) 法を用いて正常 B 細胞と比較し B-CLL 細胞で特異的に高メチル化、または低メチル化されている DNA 断片をそれぞれ 5 領域、27 領域単離し、現在このメチル化で発現異常の起こる遺伝子の同定とその腫瘍化機構における意義に関して解析を行っている。

(5) gp41 の機能解析

HIV は gp120 によって標的細胞に吸着したのち gp41 を介して融合・侵入するが、その詳細な機序は未だ不明な点が多い。gp41 の細胞外ドメインには、N-および C-末端側に N-heptad repeat (N-HR) と C-HR という α -helix 構造が 2 つ存在するが、興味深いことにこれらの HR 部位のペプチドは HIV の細胞内侵入を阻害する。特に C-HR 由来のペプチド T-20 (一般名; enfuvirtide、商品名; Fuzeon) は、米国とヨーロッパで臨床応用されている。我々は現在 T-20 や C34 の誘導体に対する耐性機序の解明を行っている。C34 耐性ウイルスと同様に T-20 耐性変異も N-HR 部位に導入され、これらはもちろん gp41 のアミノ酸変異をもたらすが、同じ RNA 領域には gp41 以外に Rev responsive element (RRE) という RNA 構造がコードされており、HIV ゲノムの核輸送に非常に重要な役割を果たしている。T-20 耐性変異は同時に RRE 構造にも影響を及ぼすため、この構造変化を補正する必要があると考えられた。我々は T-20 治療を受け耐性変異である N43K 変異が導入された臨床分離 HIV 株の塩基配列の検索から興味深いことに L44 は野生株の大多数は TTG でコードされるが、T-20 耐性変異 N43K が導入された HIV 株は silent mutation である CTG でコードされていることを見出した。この変異は N43K 変異で不安定化した RRE の 2 次構造を安定化させていた。これらのことから C34 だけでなく T-20 においても耐性変異はタンパクである gp41 と RNA 構造である RRE の 2 つの機能を維持しながら導入されることが明らかとなり、HIV は fusion 阻害剤に対して容易には耐性化できないと予想される。

(6) HIV-細胞融合阻害剤スクリーニング法の確立

T-20 は多剤耐性 HIV に感染している患者においても強い抗 HIV を示すが、問題点も多い。例えば、経口投与ができないことやその治療費が高いことなどである。そのため、経口投与ができる小分子化合物の開発が期待されている。また、従来の細胞と HIV を用いたアッセイ法では少なくとも 2 日以上かかり、通常その作用機序は別な方法で検討しなければな

らない。我々は迅速に fusion のみを阻害する薬剤をスクリーニングするために ELISA を応用した。具体的には N-と C-HR をそれぞれ maltose binding protein (MBP) と glutathione S-transferase (GST) との融合タンパクとして大腸菌で作製し、それらの結合を抗 MBP 抗体によって検出する。この方法によって過去に報告のある fusion 阻害ペプチドを測定したところ T-20 を除いてその活性を検出する事が可能であった。また、この方法によって活性は低いものの抗 fusion 活性を有する小分子化合物を同定した。今後これらの structure-activity relation からより有効な化合物の同定を行う予定である。この研究は京都大学薬学部、藤井信孝教授および秋田工業高等専門学校、千葉卓男教授との共同研究で行っている。

(7) 4'-エチニルヌクレオシドの薬剤耐性 HIV に対する効果

逆転写酵素阻害剤である AZT (zidovudine) が初めて臨床応用されてから既に 20 年近くが経過し、10 剤以上の逆転写酵素阻害剤が使用可能になったが未だに完全な耐性 HIV の制圧には至っていない。2004 年から薬剤耐性 HIV にも有効である PMPA (tenofovir) が本邦でも認可されたが、長期に亘る治療は PMPA に対する耐性 HIV を誘導すると予想される。そのため、PMPA のように従来の耐性 HIV に対して十分な抗 HIV 活性を保持できる薬剤の開発が必要である。我々は以前より 4'-ethynyl 修飾した核酸誘導体が強い抗多剤耐性 HIV 活性があることを見出している。しかし、この 4'-ethynyl 誘導体の 3'-OH は修飾されていないため、宿主細胞の DNA 合成酵素によって取り込まれ、細胞毒性を低濃度で示すため臨床応用が難しい。一方この 3'-OH を修飾するとその活性が低下するため、塩基部分を修飾した誘導体の効果を検討した。その中でもアデニンの 2 位を修飾したもの (4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine; 4'E-2FdA) に強い抗 HIV 活性があった。この誘導体は adenosine 誘導体を分解する adenosine deaminase の影響をほとんど受けず、細胞内で安定であると考えられた。さらに活性化に必要なリン酸化反応は adenosine kinase のみならず deoxycytidine kinase によっても触媒されることが明らかとなった。これらの結果は 4'E-2FdA が in vivo で HIV が感染しうる種々の細胞種においても効果を示すことを示唆する。

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) Biochemical and Genetic Analysis of Euchromatic Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases: M. TACHIBANA, J. UEDA, M. FUKUDA and Y. SHINKAI

a. Biochemical and Genetic analysis of a G9a/GLP histone methyltransferase complex.

Histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation is a crucial epigenetic mark for transcriptional silencing. Targeted deletion of *G9a* loci leads drastic loss of euchromatic H3K9 dimethylation, suggesting that G9a is a dominant H3K9 methyltransferase in mammal. However, there is one G9a-related protein, named GLP/Eu-HMTase, in mammal. Our genetic and biochemical analysis indicated that G9a and GLP form a tight complex in many cell types in mouse and human and the complex formation is essential for exerting enzymatic activity *in vivo* (Tachibana et al. 2005). To assess the enzymatic character of G9a/GLP more detail, we introduced amino acid point mutations of a catalytic SET-domain of G9a or GLP, which domain is also essential for G9a/GLP heterodimerization. The resultant mutant of G9a or GLP molecule was re-introduced into *G9a* or *GLP*-KO ES cells respectively and analyzed *in vivo* H3K9 methylation status. These serial rescue experiments indicated that G9a catalytic activity is responsible for *in vivo* H3K9 methylation, while the activity of GLP is dispensable. (M. TACHIBANA)

b. Genetic analysis of G9a for germ cell development

Genetic study described above had also shown that G9a or GLP is essential for proper embryogenesis, that is, each mutant embryo dies around E9.5. To address the potential roles of G9a HMTase in the post-term animals, we have established mice carrying the floxed *G9a*-allele (*G9a^F*), which can be deleted by the Cre-recombinase treatment. Then, we crossed *G9a^{F/F}* mice with TNAP-Cre mice which express Cre-recombinase in a germ cell specific manner. Male of germ cell specific *G9a*-KO mice were infertile, accompanied with the absence of mature sperm. Female of those were also mostly sterile. Although one of such females (1/3) was fertile, the numbers of offspring was severely reduced compared to WT-mice. Our current data show that G9a-HMTase plays crucial roles for both of male and female germ cell development. (M. TACHIBANA)

c. Functions of novel G9a/GLP associating zinc-finger molecule, Wiz

We identified another G9a associating molecule named Wiz (Widely-interspaced zinc finger motifs) which contains six zinc-finger motifs. Like G9a and GLP, Wiz is a nuclear protein and ubiquitously expressed in mouse tissues. Wiz can interact with G9a and GLP independently but Wiz association is more stable in the G9a/GLP heteromeric complexes. Interestingly, *Wiz siRNA* knocks down not only Wiz but also G9a. We have reported that GLP-deficiency also induces reduction of G9a contents. These data suggest that G9a is protected from degradation in the Wiz/G9a/GLP triple-complexes and Wiz may contribute to dominate the G9a/GLP heterodimer formation. Furthermore, amino-acid sequence analysis predicts that Wiz possesses two potential CtBP binding sites, and we find CtBP binding to Wiz and the association of CtBP with the Wiz/G9a/GLP triple-complexes. These data indicate that Wiz not only contributes to the G9a's stability but also links the G9a/GLP heteromeric complex to the CtBP co-repressor machineries. (J. UEDA)

d. Functions of novel G9a binding zinc-finger molecule, Znf462

In addition to Wiz, we have identified another G9a binding zinc-finger molecule named Znf462 by the G9a-complex analysis. We detected the Znf462 association with the G9a/GLP complex in human and mouse cell lines. Using various truncated G9a molecules, we mapped the Znf462 binding region in G9a. When we introduced the G9a truncated molecule without a Znf462 potential binding-domain (G9adelta418-449) into the G9a-deficient ES cells, G9adelta418-449 still formed a complex with GLP and Wiz. However, G9adelta418-449 very poorly rescued H3K9 methylation and suppressed one of G9a target genes, *Mage-a*. These data suggest that Znf462 is a key molecule for the G9a recruitment to the G9a-target chromatin loci. (M. FUKUDA AND Y. SHINKAI)

2) Functional Analysis of Mouse Telomere Binding Protein, TRF1: K. OKAMOTO, T. IWANO and Y. SHINKAI

Telomeres are comprised of telomeric DNA sequences and associated-binding molecules. Their structure functions to protect the ends of linear chromosomes and ensure chromosomal stability. One of the mammalian telomere binding factors, TRF1, localizes telomeres by binding to double-stranded telomeric DNA arrays. Since the over-expression of wild-type and dominant-negative TRF1 induces progressive telomere shortening and elongation in human cells, respectively, a proposed major role of TRF1 was that of a negative regulator of telomere length. However, we have described another crucial function of TRF1 on telomeres. In conditional mouse *TRF1* null mutant ES cells, mTRF1 deletion induced growth defect and chromosomal instability. Although no clear telomere shortening or elongation was observed in short-term cultured *TRF1*-deficient ES cells, abnormal telomere signals were observed and TRF1-interacting

telomere-binding factor, TIN2, lost telomeric association. Furthermore, another double-stranded telomeric DNA binding factor, TRF2, also showed decreased telomeric association. Importantly, end-to-end fusions with detectable telomere signals at fusion points accumulated in *TRF1*-deficient ES cells (Iwano et al. 2004). To address how TRF1 integrates into these telomere functions, we examined roles of TIN2 and TRF2 on the *TRF1*-deficient phenotypes. When we introduced chicken TRF1 (chTRF1) into the *TRF1*-deficient ES cells, we detected chTRF1 binding to telomeres but no chTRF1-mTIN2 association. None of *TRF1*-deficient phenotypes was rescued by ckTRF1. We also introduced a chicken and mouse TRF1 fusion molecule containing a chicken TRF1 dimerization domain and a mouse Myb telomere-binding domain (cmTRF1), but cmTRF1 again could not rescue any *TRF1*-deficient phenotypes. However, if TIN2-cmTRF1 fusion molecules were introduced, the *TRF1*-deficient phenotypes of growth defect and accumulation of γ H2AX and reduction of TRF2 on telomeres were recovered. Interestingly, over-production of TRF2 also rescued these *TRF1*-deficient phenotypes, but endogenous TIN2 accumulation on telomeres was absent in this case. Recent studies showed that TIN2 can bind to not only TRF1 but also TRF2. Therefore, our new findings suggested that TRF1 can stabilize the TRF2-telomere association through TIN2 recruitment to telomeres and the TRF1/TIN2-mediated TRF2 loading to telomeres is crucial for the telomere-end protection. However, neither of mTIN2-chTRF1 fusion molecules nor over-production TRF2 rescued abnormal telomere signals observed in the *TRF1*-deficient ES cells. This data also suggests that TRF2-independent TRF1 telomere function could exist. (K. OKAMOTO AND T. IWANO)

3) Function of linker histone H1 in DNA repair: H. HASHIMOTO and Y. SHINKAI

Linker histone H1 has been thought to play a central role in the packaging of chromatin into higher-order structures. In higher eukaryote, multiple H1 subtypes exist. There are six and eight H1 subtypes in chicken and mice respectively. Previous studies in those species showed that each H1 subtypes were mostly dispensable and deletion of any one of them had no clear effect on cell growth or mice development. However, more recent studies described that some H1 subtypes possess unique function(s).

To elucidate the role of linker histone H1 in DNA double strand break (DSB) repair, we examined genotoxic sensitivities of each H1 subtype mutants in chicken B cell line, DT40. Although any single or multiple H1 subtype mutants showed UV or IR sensitivities, only H1R deficient (H1R^{-/-}) DT40 cells were more sensitive to the DNA-damaging agents, Vp-16 and methyl methanesulphonate (MMS). Furthermore, H1R^{-/-} DT40 cells showed accumulation of spontaneous RAD51 foci, genomic instability and reduced gene targeting frequencies. These results suggest that linker histone H1-mediated chromatin dynamics is involved in some homologous recombination repair pathway(s). Interestingly, the spontaneous RAD51 and genomic instability phenotypes in H1R^{-/-} DT40 cells were rescued successfully with not only chicken H1R

but also specific mouse H1 subtype. This data further suggest that subtype specific H1 function on DNA repair is maintained in higher vertebrates.

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Mouse Model

- Tachibana, M. Ueda, J. Fukuda, M. Takeda, N. Ohta, T. Iwanari, H. Sakihama, T. Kodama, T. Hamakubo, T. & Shinkai, Y. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Gene Dev.* 2005, 19:815-826.
- Kurahashi, T. Nomura, T. Kanei-Ishii, C. Shinkai, Y. and Ishii, S. The Wnt-NLK signaling pathway inhibits A-Myb activity by inhibiting the association with coactivator CBP and methylating Histone H3. *Mol Biol Cell.* 2005, 16:4705-4713.
- Kanatsu-Shinohara, M. Ogonuki, N., Iwano, T., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., Miki, H., Takehashi, M., Toyokuni, S., Shinkai, Y., Oshimura, M., Ishino, F., Ogura, A. and Shinohara, T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*, 2005, 132:4155-4163.
- Oka, S. Masutani, H. Liu, W. Kwon, Y.W. Hirata, H. Shinkai, Y. Yamada, S. Nishinaka, Y. Nakamura, H. and Yodoi, J. Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *The FASEB Journal*, 2005, Oct 27; [Epub ahead of print].

-
- Shinkai, Y.: Histone methylation and epigenetic gene regulation. April 15, 2005. The 2nd RCAI Workshop. "Epigenetic regulation during immune system development", Yokohama, Japan.
- Shinkai, Y.: Histone methylation and epigenetic gene regulation. November 7-10, 2005. International Symposium on Genome-wide epigenetics 2005. Tokyo, Japan.
- Shinkai, Y.: Histone methylation and epigenetic gene regulation. December 7-10, 2005. The 28th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan.
- Tachibana, M. Ueda, J. and Shinkai, Y.: Histone methylation and epigenetic gene regulation. January 27-29, 2005. The 5th Kyoto University International Symposium "Regulation of cell fate and cell function", Singapore.
- Tachibana, M. Nozaki, M. and Shinkai, Y.: Essential role of G9a HMTase for germ cell development. November 16-18, 2005. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells, Kyoto, Japan

立花誠：G9a/GLP 複合体による *in vivo* ヒストンメチル化制御．奈良先端大学 COE 学術セミナー、生駒、2005 年 5 月

岡本啓治、岩野智彦、立花誠、眞貝洋一：テロメア構造維持におけるマウス TRF1 の役割．第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005．

秋山康一、岩野智彦、立花誠、眞貝洋一：テロメラーゼ非依存的テロメア維持の遺伝学的解析．第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005．

橋本秀春、園田英一郎、高見恭成、中山健男、武田俊一、眞貝洋一：Linker Histone H1 is involved in Homologous Recombination repair pathway .第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005．

上田潤、立花誠、井倉毅、眞貝洋一：ヒストンメチル化酵素 G9a, GLP 両方共に結合する新規転写抑制因子 Wiz の機能解析 .第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005．

2005年度、当研究室では新たなメンバーとして4名の大学院生（大学院生命科学研究科修士課程1年）駒井妙、松井稔幸、宮下広樹、村上万里絵を迎え入れた。一方、5年間当研究室に在籍していた岩野智彦が2005年3月に大学院生命科学研究科を修了・Ph.D.を取得し、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターのポスドクとなった。その結果、研究室はスタッフ2名、大学院9名、技術補佐員1名の総勢12名からなる所帯となった。

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」「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) 哺乳類ヒストンリジンメチル化酵素 G9a の機能解析

ア．G9a/GLP ヒストンメチル化酵素複合体の生化学的、遺伝学的解析

ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化修飾は、転写の抑制とリンクした重要なエピジェネティックマークの 1 つである。遺伝学的、生化学的な解析によって、哺乳類の G9a というタンパク質が生体内で H3K9 のメチル化酵素として重要な機能を担っていることを明らかにしてきた。すなわち、*G9a* 遺伝子破壊マウス細胞においてジメチル H3K9 が殆どなくなることから、生体内では G9a がドミナントな H3K9 メチル化酵素であることが示唆されている。しかし反面、哺乳類には G9a とそのドメイン構造がよく似た分子、GLP が存在する。*In vitro* の活性測定系では GLP は G9a 同様に H3K9 のメチル化活性を示す。我々は、*in vivo* での GLP の機能を解析すべく *GLP* 遺伝子破壊マウスを作成し解析を行い、さらに生化学的な解析と合わせ、G9a は常に GLP とヘテロ二量体として存在し、その二量体構造が酵素活性の発揮に必須であることを突き止めた (Tachibana et al. 2005)。

現在、G9a 及び GLP の活性触媒部位にアミノ酸置換を施した変異遺伝子をそれぞれの遺伝子破壊細胞に再導入し、G9a/GLP ヘテロ二量体の生体内活性のモニタリングを行っている。その結果、メチル化活性の無い G9a を導入した細胞では生体内 H3K9 メチル化レベルは回復しないのに対して、不活性化 GLP 導入株ではメチル化レベルが回復することが分った。この事実は、生体内で G9a/GLP 二量体がヒストンメチル化酵素として機能するには G9a の活性が重要であることを意味している。(立花、眞貝)

イ．生殖細胞の分化に G9a が果たす機能の解析

G9a 及び GLP はその遺伝子破壊マウスが胎生致死 (E9.5 付近) であることから、様々な組織や器官の発生と G9a/GLP との関わりはいまだ未知のままである。我々は *G9a* 遺伝子が Cre 組み換え酵素によってのみ欠損するマウスを作成した。次に生殖細胞特異的に Cre を発現

するマウスとの交配によって、生殖細胞特異的G9a欠損マウス(Germ cell conditional KO, GcKOマウス)を樹立した。GcKOマウス雄8匹を自然交配したところ、すべての個体が不妊であった。以上のことは雄の生殖細胞の発生にG9aが必須であることを示した。さらに3ヶ月令のGcKOマウスの精巣切片では、成熟した精子が全く検出できなかった。特に減数分裂以降の細胞が全く認められないことから、減数分裂による半数体化のプロセスにG9aが関わっていることが強く示唆された。一方、GcKOマウス雌を複数の野生型の雄と交配したところ、80%の個体が不妊であった。ごく一部の妊娠可能なマウスにおいても、生まれてくる仔の数は1回の平均でおよそ3匹程度と少なく、出産回数も生涯で1-3回程度であった。以上のことから、雌の生殖細胞の発生・分化にもG9aは重要な機能を有することが示唆された。(立花、眞貝)

ウ．G9a/GLP と結合するジンクフィンガータンパク質 Wiz の機能解析

G9a 複合体の解析から、zinc-finger ドメインを6つ持つ Wiz という分子がヒト及びマウスの G9a/GLP 複合体に含まれていることを見出した。一過性発現の実験より、Wiz は G9a あるいは GLP の SET ドメインと結合することが示された。さらに、G9a 欠損或は GLP 欠損マウス ES 細胞を用いた解析から、Wiz は G9a/GLP ヘテロ複合体に最も安定に会合すること、ダイマー形成が出来ない G9a, GLP には結合しないことから、Wiz は SET ドメインのダイマー形成により形成される構造を認識して G9a, GLP と会合すること、特に G9a/GLP ダイマーにより形成される構造に最も親和性が高いこと、その結果 G9a/GLP ヘテロ複合体を選択的に蓄積できることが推察された。*Wiz siRNA* による Wiz のノックダウンが G9a を(転写後に)ノックダウンすることからも、Wiz が G9a/GLP ヘテロ複合体形成の安定化に重要な役割を持つことが支持された。

さらに、Wiz は転写抑制共役因子 CtBP と物理的に会合できるモチーフを持っていること、実際に G9a/GLP/Wiz 複合体に CtBP の一部が結合していることがヒト、マウスの細胞株で示された。この結果より、Wiz は G9a/GLP 複合体の安定化因子としてだけ機能しているのではなく、G9a/GLP ヒストンメチル化酵素と CtBP 転写抑制複合体をつなぎ合わせる会合因子としても働いていることが推察された。(上田、立花、眞貝)

エ．G9a と会合するジンクフィンガータンパク質 Znf462 の機能解析

G9a の複合体解析から、さらに新たな G9a 結合ジンクフィンガータンパク質 Znf462 が同定された。この分子も Wiz と同様に、ヒト、マウスの細胞において G9a/GLP 複合体中に存在することが確認された。さらに、G9a と Znf462 の会合ドメインを検討したところ、G9a の Ring-like ドメインが G9a-Znf462 の会合に重要であることが示された。そこで、G9a の Ring-like ドメインを欠いた G9a(G9a Δ 418-449)を G9a 欠損 ES 細胞に導入したところ、G9a Δ 418-449 は wild-type の G9a と遜色なく GLP, Wiz との複合体を形成することが確認されたが、H3K9 のメチル化はほとんど回復せず、G9a の標的候補遺伝子の1つ *Mage-a* の発現も余り抑制されなかった。以上の結果より、Znf462 は G9a の標的クロ

マチンへのターゲティングに重要な役割を果たしていることが示唆された。(福田、上田、立花、眞貝)

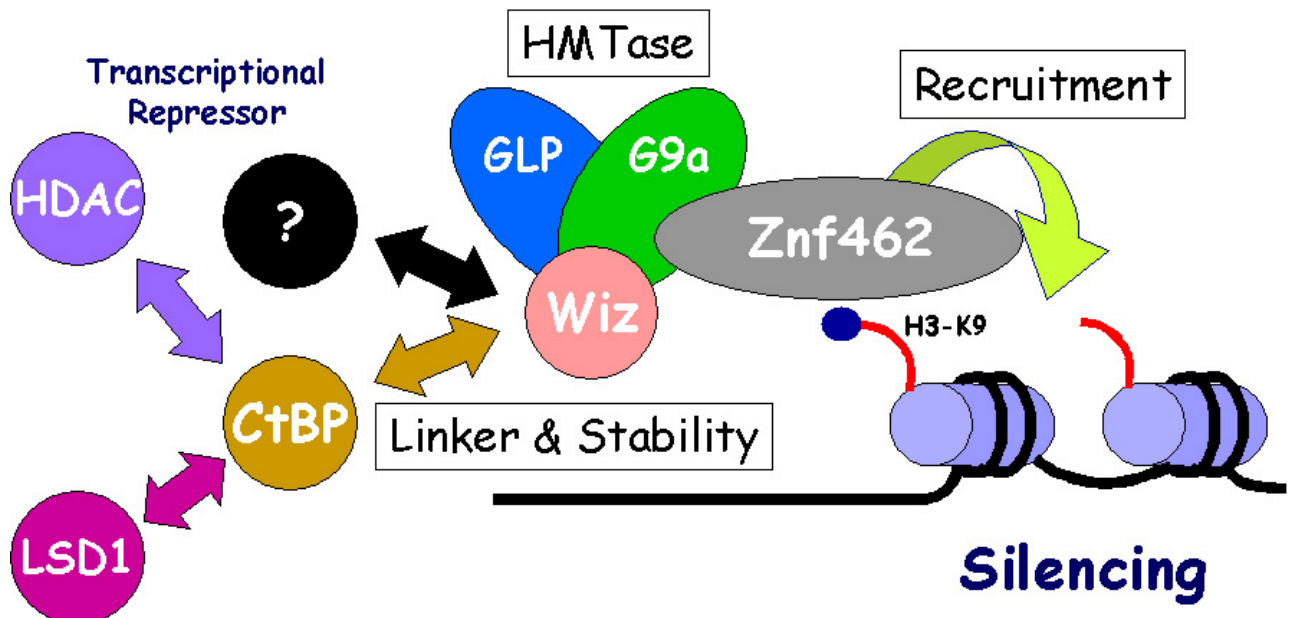


図1. Potential function(s) of the G9a/GLP complex

2) 哺乳類における機能的テロメア高次構造の実体の解明

ア．マウステロメア結合タンパク質 TRF1 の機能解析

染色体末端構造テロメアは真核細胞染色体が安定に存在するために重要な役割を果たしている。TRF1 タンパク質は、テロメア DNA-タンパク質高次構造を構成する哺乳類テロメア結合タンパク質の一つで、野生型 TRF1 タンパク質を過剰発現させたヒト細胞のテロメア長が短くなり、一方ドミナントネガティブ型 TRF1 を発現させたヒト細胞のテロメア長は伸長することから、テロメア長の負の制御に関わる分子と考えられていた。しかし、我々は、TRF1 の機能をより厳密に調べる目的で、4-hydroxytamoxifen (OHT) 依存的に *mTRF1* をロックアウトできる ES 細胞を樹立し、OHT 処理した *mTRF1* ロックアウト細胞において細胞増殖やテロメアの解析を行った結果、*mTRF1* ロックアウト細胞では細胞増殖の遅延、テロメア構造の異常が確認され、さらに分裂を重ねると染色体末端同士の融合が高頻度で観察されることを見出した。また、TRF1 に結合してテロメア局在を果たす TIN2 タンパク質の局在が TRF1 欠損によって消失した。それだけでなく、TRF1 とは独立にテロメア結合するタンパク質 TRF2 のテロメア局在が TRF1 の局在と間接的に影響していることも示された。これらのことから、TRF1 はこれまで考えられてきたようなテロメア長の調節機能以外にも、テロメア高次構造の維持や細胞増殖に関しても重要な役割を持つことが示された (Iwano

et al. 2004)。さらに観察を進めると、TRF1 欠損細胞の分裂期での染色体末端において DNA 損傷部位特異的に検出されるヒストン H2AX のリン酸化(γ H2AX)が強く検出された。この結果により、TRF1 欠損によって導かれるテロメア構造の変化が DNA 損傷反応経路によって認識されていることが予想された。

これらの mTRF1 欠損細胞の表現型が TRF1 のどのような機能欠損によって誘導されたのかを明らかにする目的で、以下の実験を行なった。ニワトリの *TRF1* (*chTRF1*)遺伝子をクローニングし、*mTRF1* 欠損細胞に導入した。その結果、chTRF1 はテロメア局在は示すものの、mTIN2 とは結合しないこと、mTRF1 欠損細胞の表現型を全く相補しなかった。さらに、chTRF1 と mTRF1 のキメラ分子(cmTRF1)(N 末から dimerization ドメインまでが chTRF1)を *mTRF1* 欠損細胞に発現させたところ、chTRF1 と同様の結果を得、*mTRF1* 欠損細胞の表現型は全く相補されなかった。そこで、mTIN2-cmTRF1 キメラ分子を *mTRF1* 欠損細胞に発現させたところ、細胞増殖抑制の回避、TRF2 のテロメア局在の回復、 γ H2AX のテロメア蓄積の消失が観察された。興味あることに、mTRF1 欠損細胞に TRF2 を過剰発現させても、細胞増殖能の回復と γ H2AX のテロメア蓄積の消失が観察された。以上の結果より、*mTRF1* 欠損細胞で観察される表現型のうち、細胞増殖の低下と γ H2AX のテロメア蓄積は、mTRF1 欠損により誘導される TRF2 のテロメア局在低下によって誘導されていることが示唆された。つまり、TRF1 の機能的テロメア構造維持における役割の 1 つは、TIN2 をテロメア領域にリクルートすることで TRF2 のテロメア局在を安定化させること、その結果テロメア末端保護が保証されるというものであることが考えられた。しかし、mTIN2-cmTRF1 キメラ分子或は TRF2 の過剰発現によっては、*mTRF1* 欠損細胞で観察される異常なテロメアシグナルを消失させることはなかった。このことから、TRF1 の機能には、少なくとも TRF2 に依存したものと TRF2 に依存しないものがあることが示唆された。(岡本、岩野、真貝)

3) DNA損傷時におけるリンカーヒストンの機能解析

リンカーヒストンH1はクロマチンの高次構造変換に重要な役割を持つことが示唆されている。高等脊椎動物においては複数のH1サブタイプが存在しているが、これまでの解析では、H1はお互いに重複した機能を持っており、一つのサブタイプを欠損させても表現型が現れないことから、個々のH1サブタイプに特異的な機能が存在するのかは不明な点が多い。我々はDNA損傷修復時におけるH1サブタイプの機能を明らかにするためにニワトリDT40細胞株を用いた遺伝学的解析を試みている。その結果、6種類存在するサブタイプのうち1種類(H1R)の欠損株においてMMSおよびVP-16高感受性を観察し、さらにエピスタシス解析により、MMS、VP-16などの薬剤感受性はRad54依存的相同組換え修復の異常によるものであることが推測された。またH1R欠損細胞株においてはゲノムが不安定であり、ゲノムの不安定性はニワトリH1RのみならずマウスH1の特定のサブタイプにおいても回復させることが判明した。このことから、高等真核生物において、染色体の安定性に寄与する特異的H1サブタイプが種を超えて保存されている可能性が示唆された。(橋本・真貝)

EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES
LABORATORY OF PRIMATE MODEL

The long-standing research objective of this laboratory headed by Prof. M. Hayamai is to understand the molecular basis of pathogenesis by human retroviruses, HTLV and HIV, and to explore the ways to the cure and prevention of the diseases caused by these viruses. The following three main projects are currently under way 1) Phylogenetic analysis of HTLV and HIV and their related simian virus STLV and SIV. This project includes studies on the origin, evolution and mutation of the member of the whole primate retrovirus family. 2) AIDS animal model using monkeys and SIV/HIV chimeric viruses(SHIV). Currently we are focusing to elucidate the early virological and immunological events that occur in various tissues of macaques intraretally inoculated with a pathogenic SHIV strain. In addition, some chemical and reagents are tested in vivo for their anti-viral efficacies using SHIV- or SIV-infected monkeys housed in a P3-level animal facility in this animal model project. 3) Development of AIDS vaccines by use of either live-attenuated viruses or semi-live attenuated viruses that can produce non-infectious viral particles.

1) **Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus : Miyake A, Ibuki K, Suzuki H, Horiuchi R, Saito N, Motohara M, Hayami M, Miura T.**

Children infected with human immunodeficiency virus type 1 often have higher viral loads and progress to acquired immunodeficiency syndrome more rapidly than adults. In our previous study of simian-human immunodeficiency virus (SHIV)-infected adult monkeys, immature CD4CD8 double-positive T cells in the thymus and jejunum decreased faster than mature CD4 single-positive T cells. We examined the effect of virus replication on immature T cells from the same SHIV-inoculated newborn monkeys having more immature T cells than adults. The infectious viruses were more abundantly detected in the thymus than in other tissues at both 13 and 26 days post-infection (dpi). However, mature CD4(+) T cells in the thymus declined after 13 dpi and immature CD3(-) CD4 single-positive T cells remained at 26 dpi. These results suggested that many immature CD4(+) T cells in the thymus of newborns support the production of infectious viruses even after the depletion of mature CD4(+) T cells.

2) **Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection : Shimizu Y, Miyazaki Y, Ibuki K, Suzuki H, Kaneyasu K, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T.**

TNF- α has been implicated in the pathogenesis of, and the immune response against, HIV-1 infection. To clarify the roles of TNF- α against HIV-1-related virus infection in an SHIV-macaque model, we genetically engineered an SHIV to express the TNF- α gene (SHIV-TNF) and characterized the virus's

properties in vivo. After the acute viremic stage, the plasma viral loads declined earlier in the SHIV-TNF-inoculated monkeys than in the parental SHIV (SHIV-NI)-inoculated monkeys. SHIV-TNF induced cell death in the lymph nodes without depletion of circulating CD4(+) T cells. SHIV-TNF provided some immunity in monkeys by increasing the production of the chemokine RANTES and by inducing an antigen-specific proliferation of lymphocytes. The monkeys immunized with SHIV-TNF were partly protected against a pathogenic SHIV (SHIV-C2/1) challenge. These findings suggest that TNF-alpha contributes to the induction of an effective immune response against HIV-1 rather than to the progression of disease at the early stage of infection.

3) Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN-gamma administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys : Kaneyasu K, Kita M, Ohkura S, Yamamoto T, Ibuki K, Enose Y, Sato A, Kodama M, Miura T, Hayami M.

We previously reported that a nef-deleted SHIV (SHIV-NI) is nonpathogenic and gave macaques protection from challenge infection with pathogenic SHIV-C2/1. To investigate whether IFN-gamma augments the immune response induced by this vaccination, we examined the antiviral and adjuvant effect of recombinant human IFN-gamma (rIFN-gamma) in vaccinated and unvaccinated monkeys. Nine monkeys were vaccinated with nef-deleted nonpathogenic SHIV-NI. Four of them were administered with rIFN-gamma and the other five monkeys were administered with placebo. After the challenge with pathogenic SHIV-C2/1, CD4(+) T-cell counts were maintained similarly in monkeys of both groups, while those of the unvaccinated monkeys decreased dramatically at 2 weeks after challenge. However, the peaks of plasma viral load were reduced to 100-fold in SHIV-NI vaccinated monkeys combined with rIFN-gamma compared with those in SHIV-NI vaccinated monkeys without rIFN-gamma. The peaks of plasma viral load were inversely correlated with the number of SIV Gag-specific IFN-gamma-producing cells. In SHIV-NI-vaccinated monkeys with rIFN-gamma, the number of SIV Gag-specific IFN-gamma-producing cells of PBMCs increased 2-fold compared with those in SHIV-NI-vaccinated monkeys without rIFN-gamma, and the NK activity and MIP-1alpha production of PBMCs were also enhanced. Thus, vaccination of SHIV-NI in combination with rIFN-gamma was more effective in modulating the antiviral immune system into a Th1 type response than SHIV-NI vaccination alone. These results suggest that IFN-gamma augmented the anti-viral effect by enhancing innate immunity and shifting the immune response to Th1.

4) Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques : Suzuki H, Motohara M, Miyake A, Ibuki K, Fukazawa Y, Inaba K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Hayami M, Miura T.

We intrarectally infected newborn macaques with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus (SHIV) that induced rapid and profound CD4 (+) T cell depletion, and examined the early effects of this SHIV

on the thymus. After intrarectal infection, viral loads were much higher in the thymus than in other lymphoid tissues in newborns. In contrast, no clear difference was seen in the viral loads of different tissues in adults. Histological and immunohistochemical observations showed severe thymic involution. Depletion of CD4 (+) thymocytes began in the medulla at 2 weeks post infection and spread over the whole thymus. After in vivo infection, the CD2 (+) subpopulation, which represents a relatively later stage of T cell progenitors, was selectively reduced and development of thymocytes from CD3 (-) CD4 (-) CD8 (-) cells to CD4 (+) CD8 (+) cells was impaired. These results suggest that profound and irreversible loss of CD4 (+) cells that are observed in the peripheral blood of SHIV-infected monkeys are due to destruction of the thymus and impaired thymopoiesis as a result of SHIV infection in the thymus.

5) A novel simian immunodeficiency virus from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in the Democratic Republic of Congo : Takemura T, Ekwilanga M, Bikandou B, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Ohkura S, Harada H, Takehisa J, Ichimura H, Parra HJ, Nende M, Mubwo E, Sepole M, Hayami M, Miura T.

In order to understand primate lentivirus evolution, characterization of additional simian immunodeficiency virus (SIV) strains is essential. An SIV from a black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) originating from the Democratic Republic of Congo was analysed phylogenetically. The monkey had cross-reactive antibodies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2. The viral pol region sequence was amplified by nested PCR and sequence analysis confirmed that it was related to known SIV sequences. This is the first report to characterize genetically an SIV from the monkey genus *Lophocebus*. Phylogenetic analysis of the pol region revealed that this novel SIV, designated SIVbkm, fell into the SIVsyk and SIVgsn virus group, containing viruses isolated from the genus *Cercopithecus*, and suggests that cross-species transmission has occurred between species of the genera *Lophocebus* and *Cercopithecus*.

6) Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A : Ohkura S, Yamashita M, Ishida T, Babu PG, Koyanagi Y, Yamamoto N, Miura T, Hayami M.

Seven isolates of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) were taken in southern India and phylogenetically analyzed to gain new insights into the origin and dissemination of HTLV-1 in the subcontinent. The new Indian HTLV-1s were found to be members of subgroup A (Transcontinental subgroup) of the Cosmopolitan group. They formed three different clusters (South African/Caribbean, Middle Eastern, and East Asian clusters). These results demonstrate that Indian HTLV-1s are genetically heterogeneous and include the most divergent strain of subgroup A. On the basis of these results, we speculate that subgroup A HTLV-1s may have been present for thousands of years in India.

LIST OF PUBLICATIONS

Experimental Research Center for Infectious Diseases

Laboratory of Primate Model

- Ohkura,S.,Yamashita,M.,Ishida,T.,Babu,P.G.,Koyanagi,Y.,Yamamoto,N., Miura,T., Hayami,M.: Phylogenetic Heterogeneity of New HTLV Type 1 Isolates from Southern India in Subgroup A. AIDS & Human Retro.21(4):325-330,2005
- Takemura,T., Ekwilanga,M., Bikandou,B., Ido,E., Yamaguchi-kabata,Y., Ohkura,S., Harada,H., Takehisa,J., Ichimura,H., Parra,Henri-Jopseph., Nende,M., Mubwo,E., Sepole,M., Hayami,M., Miura,T.: A novel SIV from black mangabey(*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. J.Gen.Virol. 86:1967-1971,2005
- Miyake,A., Ibuki,K., Suzuki,H., Horiuchi,R., Saito,N., Motohara,M., Hayami,M., Miura,T.: Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus. J. Med. Primat. 34:294-302,2005
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Fujiwara, K., Sugauchi, F., Mbanya, D., Zekeng, L., Ndembu, N., Ngansop, C., Miura, T., Ido, E., Hayami, M., Ichimura, H., Kaputue, L., Mizokami, M. : A New Subtype(Subgenotype) Ac(A3) of Hepatitis B Virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. J.Gen.Virol. 86:2047-2056,2005
- Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., Haga, T. : Induction of immune response, in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF- α gene at an early stage of infection. Virology, 20;343(2):151-61, 2005
- Suzuki, H., Motohara, M., Miyake, A., Ibuki, K., Fukazawa, Y., Inaba, K., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Hayami, M., Miura, T. : Intrathymic Effect of Acute Pathogenic SHIV Infection on T-Lineage Cells in Newborn Macaques. Microbiol.Immunol., 49(7):667-679, 2005
- Takahashi, M., Ido, E., Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H. : Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection between CD4+ and CD4+8+ T cells. Archives of Virology., 150:1517-1528, 2005
- Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H. : Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates . Tissue Antigen , 66:674-682, 2005
- Kaneyasu, K., Kita, M., Ohkura, S., Yamamoto, T., Ibuki, K., Enose, Y., Sato, A., Kodama, M., Miura, T., Hayami, M. : Protective Efficacy of Nonpathogenic Nef-Deleted SHIV Vaccination Combined with Recombinant IFN- Administration against a Pathogenic SHIV Challenge in Rhesus Monkeys . Microbiol. Immunol., 49(12),1083-1094, 2005

Hayami,M.: The origin and evolution of HIV and possibility of getting live-attenuated anti-AIDS vaccine,

German-Japanese Symposium on Emerging and Reemerging viruses, May 14-17,2005, Toyama

Akiyama,H., Ido,E., Miura,T., Hayami,M.: Construction and characterization of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus(SHIV) having the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of HIV-1 genome and its monkey-cell-adapted mutants. The XXII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, July 2-5,2005, Heidelberg, Germany

Haga,T., Shimizu,Y., Okoba,M., Goto,Y., Miura,T., Hayami,M.: Construction and "in vitro" properties of chimeric simian and human immunodeficiency viruses having human TNF-alpha and RANTES genes.Keystone Symposium, July 23-28,2005,Sanfrancisco

Haga, T., Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Suzuki, H., Goto, Y., Miura,T., Hyami,M.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene early stage of infection.Keystone Symposium, July 23-8,2005,Sanfrancisco

Ishimatsu, M., Ido, E., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M. : Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived protease gene and its infection to macaque monkeys: a useful tool for in vivo efficacy tests towards HIV protease inhibitors. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T. : Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in monkeys in comparison to low pathogenic SHIV infection. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Fukazawa, Y., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M. : The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H. : Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, September 21-24, 2005, Oregon

Hayami, M.: Trial of developing a live-attenuated vaccine and a full genome DNA vaccine using simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV),Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim,November 16-17, 2005,Hanoi, Vietnam

Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W.,Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M. : DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles, Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim,November 16-17, 2005,Hanoi, Vietnam

清水祐也、宮崎恭行、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛 : TNF- 遺伝子挿入 SHIV 感染アカゲサルにおける効果的な免疫応答 . 第 23 回九州実験動物研究総会、2005 年 11

月 19 日～20 日、佐賀

稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、三宅在子、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV の経粘膜・経静脈感染アカゲザルの感染病態および腸病変の比較解析．第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

石松美沙、井戸栄治、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ (PR) 遺伝子を組み込んだ SHIV-pr 感染アカゲザルにおける PR 阻害剤投与実験とその遺伝子変異解析．第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼ及び 3' 側遺伝子をもつ SHIV のサル細胞馴化機序の解析．第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚志、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：SHIV 感染サル検体を用いた感染初期および後期におけるプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析．第 53 回日本ウイルス学会、2005 年 11 月 20 日～22 日、横浜

三宅在子、石田尚臣、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：SHIV 感染サル検体を用いたプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析．第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月 7 日～10 日、福岡

井戸栄治、石松美沙、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子が HIV-1 由来の SHIV-rti のサル感染実験．第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

深澤嘉伯、三宅在子、伊吹謙太郎、鈴木元、堀内励生、斉藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、姫野愛、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲：強毒、弱毒 SHIV 粘膜感染初期の全身臓器におけるウイルス動態の解析．第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

兼安健太郎、伊吹謙太郎、大倉定之、姫野愛、喜多正和、山本俊郎、佐藤彰彦、三浦智行、速水正憲：nef 欠損弱毒 SHIV のワクチン効果に対する rIFN- γ 投与の増強効果．第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、深澤嘉伯、稲葉一寿、鈴木元、増田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：強毒・弱毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析．第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

高橋秀実、高橋めぐみ、斉藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲：サル CD4⁺T 細胞と CD4⁺CD8⁺T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異．第 19 回日本エイズ学会、2005 年 12 月 1 日～3 日、熊本

当研究室の主要研究課題はヒトのレトロウイルス（HTLV と HIV）の病原性を分子レベル・培養細胞レベル・個体レベル、特にサルを用いて明らかにして、それらのウイルスによって引き起こされる疾患の治療と予防の方策を探索することを目的としている。それにあたって以下の3つの研究課題が進行中である。1）HTLV と HIV、それらの類似サルウイルスである STLV と SIV の分子疫学と分子系統解析。すなわち、これらの霊長類全体のレトロウイルス群の起源、進化、伝播様式を明らかにする。2）SIV と HIV のキメラウイルス（SHIV）を用いたサルのエイズモデル系を作成し、HIV の病原性を個体レベルで明きからにするとともに、開発された新規薬剤の治験を行う。これにあたっては、我が国最大級の P3 サル感染実験施設を用いている。3）HIV のワクチン開発。特に非病原性 SHIV を用いた弱毒生ワクチンとそれをベースにした DNA ワクチン開発の為の基礎研究を行っている。

1）HTLV-1/STLV-1 と HIV/SIV の分子系統解析と分子疫学

- 1．HTLV-1/STLV-1：今迄に、世界各地への海外調査で得られたヒトとサルの検体の解析により、アフリカの HTLV-1 は STLV-1 由来であり、現在の HTLV-1 の世界分布は人類の移動と密接に関連していることを示してきた。今年度はインドの HTLV-1 を解析した結果、多様性に富み、エピセンターの一つと考えられた(Ohkura et al.)。
- 2．HIV/SIV：今迄に、アフリカ各地、特に中央アフリカの海外調査で得られた HIV と SIV の解析により、HIV はサル類由来であり、極めて多様性が高く、新たな HIV 新種が出現しつつあることを示してきた。今年度はコンゴ民主共和国のブラックマンガベを新たに分離、解析したところ、サイクスザルのものと同じ群に属することから、属間感染があったことが示された（Takemura et al.）。

2）SHIV を用いたサルモデル系の開発と病原性の解析

- 1．HIV-1 領域を拡大した SHIV の作成
今迄に HIV-1 の 3' 半分をもった SHIV が作成され、現在、世界中で使用されているが、新たに 3' 半分に加えて逆転写酵素とインテグラーゼが HIV-1 由来のサルに感染する SHIV を作成し、サルに感染することを示した。これは現在、最も HIV-1 に近く、サルに感染する SHIV である。現在、そのサル細胞継代による順化過程の変異を解析中である（Akiyama et al、井戸他）。
- 2．HIV-1 プロテアーゼ遺伝子をもった SHIV のサル感染とプロテアーゼ阻害剤投与の効果
今迄に HIV-1 プロテアーゼ遺伝子をもつ SHIV を作成し、サルに感染することを示してきた。その過程でサルを用いた in vivo 継代によりサルにおける増殖性が高まり、持続感染したことから、プロテアーゼ阻害剤を投与したところその増殖が抑制された。現在、その順化機序と耐性ウイルスの出現機序について解析中である（石松、井戸他）。
- 3．経粘膜感染初期の全身臓器におけるウイルスの動態

ヒトでは解析不能な経粘膜感染初期の体内臓器におけるウイルス量と CD4 細胞の動態を検索した結果、高病原性 SHIV は速やかに全身に拡散するのに対して低病原性 SHIV は順次、拡散することが明らかになった (Miyake et al、深澤他)。

4. 経直腸粘膜感染初期における全身リンパ系臓器の細胞群の解析

経直腸粘膜感染により、強病原性 SHIV は速やかに胸腺の CD4 細胞と未成熟な CD4,8 両細胞を著減させた。腸管においても同様であったが、低病原性 SHIV では一過性で軽微であった (伊吹、稲葉他)。

5. 胸腺 T 細胞の分化障害

高病原性 SHIV 感染ザルの感染初期に、CD4 細胞の減少のみならず未成熟な CD4,8 両陽性細胞の減少がみられたので、マウスの胎児胸腺培養系を用いて *ex vivo* で検索したところ、CD3,4,8 共陰性細胞から CD4,8 両陽性細胞への分化障害がみられた。一方、低病原性 SHIV では分化障害がみられなかった。現在、その分化障害機序の解析を進めている (Suzuki et al、元原他)。

3) エイズワクチン開発の基礎研究

1. TNF- α 、RANTES 遺伝子を組み込んだ *nef* 欠損 SHIV のワクチン効果

今迄に非病原性 SHIV からさらに病原性に関与する *nef* を欠損させた SHIV が、強病原性 SHIV の攻撃接種に対して、強い防御効果があることを示してきた。そこでより強い免疫誘導を得る為に、TNF- α 、RANTES を各々、*nef* 欠損部位に挿入した SHIV を作成したところ、いずれも強病原性 SHIV の攻撃に対して強い抗ウイルス効果を示した (Shimizu et al、Haga et al)。

2. INF- γ 投与による弱毒生ワクチンの防御効果の増強

先に INF- γ 遺伝子を組み込んだ SHIV がより強い防御効果を示したことから、免疫ザルへの INF- γ 投与による防御効果を調べたところ、細胞性免疫がより強く誘導されて、より強い防御効果がみられた。一方、非免疫ザルへの INF- γ 投与による抗ウイルス効果はみられなかった (Kaneyasu et al)。

3. 非感染性粒子を産生する非病原性 SHIV フルプラスミドを用いた DNA ワクチンの開発

今迄に SHIV gag の zinc finger に変異を入れることによりパッケージング能を欠いた為に、非感染性の空粒子を産生するプラスミド DNA を作成し、その防御効果を示してきた。さらに安全性を確保する為に発症に関連するとされる *nef* を欠損させ、その部位に免疫誘導能を高める為に IL-2 遺伝子を組み込んだフルプラスミドを作成したところ、より強い免疫が誘導され、より強い防御効果が示された。現在、より強い経粘膜感染防御効果を得る為に座薬を用いる実験を行っている (Horiuchi, Ido et al)。

今年度は上記、研究活動に加えて、下記の研究集会を当研究室が主催した。

1. 「霊長類レトロウイルスフォーラム」2005 年 6 月 24 日～25 日、平安会館、参加者約 60 名
2. 「サルを用いた感染症研究の現状と今後」2005 年 9 月 16 日～17 日、ザ・パレス サイドホテル、参加者約 75 名

**CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH
LABOLATORY OF VIRAL PATHOGENESIS**

1) Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses: R. WATANABE, T. MIYAZAWA and Y. MATSUURA

To examine the binding properties of the envelope glycoproteins of porcine endogenous retrovirus subgroups A and B (PERV-A and PERV-B), we produced two forms of soluble envelope proteins, termed Env-ST and Env-SU, using a baculovirus expression system. Env-ST and Env-SU encompass one-third of the N-terminal and the entire surface unit (SU) of the envelope protein, respectively. Using these proteins, binding assays were performed in various mammalian cell lines. The binding properties of the Env-STs that contain the putative receptor binding domain (RBD) did not correlate with the susceptibility to the pseudotype viruses having PERV envelopes, whereas those of the Env-SUs correlated fairly well. These results suggested that the Env-SUs but not Env-STs interacted with their receptors in various cell lines. Interestingly, PERV-A Env-SU did not bind to a mink cell line (Mv1-Lu cells) that is highly susceptible to the PERV-A pseudotype virus. In addition, PERV-B Env-SU did not interfere with the PERV-B pseudotype virus on Mv1-Lu cells. These results suggest the existence of a cognate receptor-independent entry pathway as demonstrated in an immunodeficiency-inducing variant of feline leukemia virus FeLV.

2) Junctional adhesion molecule-1 is a functional receptor for feline calicivirus: A. MAKINO, M. SHIMOJIMA, T. MIYAZAWA, K. KATO, Y. TOHYA and H. AKASHI

The life cycles of caliciviruses are not fully understood, because most of the viruses cannot propagate in tissue culture cells. We studied the mechanism of calicivirus entry into cells, employing feline calicivirus (FCV) that is one of the cultivable viruses. By retrovirus-mediated expression cloning method, feline junctional adhesion molecule-1 (JAM-1), an immunoglobulin (Ig)-like protein which composes tight junction, was identified as a cellular binding molecule of FCV F4 strain, a prototype strain in Japan. Feline JAM-1 expression in non-permissive cells led to bindings and infections by F4 and all other strains tested. Anti-feline JAM-1 antibody blocked the binding of FCV to permissive CRFK cells and strongly suppressed cytopathic effect (CPE) and progeny production by FCV infection in the cells. Some strains of FCV, such as F4 and F25 strains, have ability to replicate in Vero cells. We found that regardless of replication ability, FCV bound to Vero and 293T cells via simian and human JAM-1, respectively. Anti-human JAM-1 antibody inhibited bindings, CPE and progeny production by F4 and F25 in Vero cells. In addition, feline JAM-1 expression permitted FCV infection in 293T cells. Taken together our results demonstrate that feline JAM-1 is a functional receptor for FCV, simian JAM-1 also functions as a receptor for

some strains of FCV, and the strict interaction between FCV and JAM-1 molecules may be a determinant of the viral tropism. This is the first report concerning a functional receptor for the viruses in the family *Caliciviridae*. There are some viruses, as well as FCV, that use Ig-like proteins of tight junction for host cell entry, therefore targeting such proteins might be advantages for some viruses to invade mucosal membranes and replicate efficiently in vivo.

3) Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). S. NAKAMITSU, T. MIYAZAWA, M. HORIUCHI, S. ONOE, Y. OHODA, H. KITAGAWA and N. ISHIGURO

To assess relationships between nucleotide polymorphisms of the prion protein (PRNP) gene and susceptibility to bovine spongiform encephalopathy (BSE), we investigated polymorphisms in the open reading frame (ORF) and 2 upper regions of the PRNP gene from 2 Japanese cattle breeds: 863 healthy Holstein cattle, 6 BSE-affected Holstein cattle, and 186 healthy Japanese Black (JB) cattle. In the ORF, we found single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at nucleotide positions 234 and 576 and found 5 or 6 copies of the octapeptide repeat, but we did not find any amino acid substitutions. In the upper region, we examined 2 sites of insertion/deletion (indel) polymorphisms: a 23-bp indel in the upper region of exon 1, and a 12-bp indel in the putative promoter region of intron 1. A previous report suggests that the 23-bp indel polymorphism is associated with susceptibility to BSE, but we did not find a difference in allele frequency between healthy and BSE-affected Holstein cattle. There were differences in allele frequency between healthy Holstein and JB cattle at the 23- and 12-bp indels and at the SNPs at nucleotide positions 234 and 576, but there was no difference in allele frequency of the octapeptide repeat. We identified a unique PRNP gene lacking a 288-bp segment (96 amino acids) in DNA samples stocked in our laboratory, but this deletion was not found in any of the 1049 cattle examined in the present study. The present results provide data about variations and distribution of the bovine PRNP gene.

LIST OF PUBLICATIONS

Center for Emerging Virus Research

Laboratory of Viral Pathogenesis

- Hazama, K., Miyagawa, S., Yamamoto, A., Kubo, T., Miyazawa, T., Tomonaga, K., Watanabe, R., Okumura, M., Matsuda, H., and Shirakura, R. 2005. The Effect of Expression of Complement Regulatory Protein on Pig Endothelial Cells to Pig Endogenous Retrovirus (PERV) lyses by human sera. *Transplant Proc.* 37: 503-505.
- Nagashima, N., Hisasue, M., Nishigaki, K., Miyazawa, T., Kano, R., and Hasegawa, A. 2005. In vitro selective suppression of feline myeloid colony formation is attributable to molecularly

cloned strain of feline leukemia virus with unique long terminal repeat. *Res. Vet. Sci.* 78: 151-154.

Phung, T. T. Hang, Tohya, Y., Miyazawa, T., and Akashi, H. 2005. Characterization of Env antigenicity of feline foamy virus (FeFV) using FeFV-infected cat sera and a monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* 106: 201-207.

Miyagawa, S., Nakatsu, S., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Hazama, K., Yamada, J., Tomonaga, K., Miyazawa, T., and Shirakura, R. 2005. Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J. Biochem.* 137: 503-508.

Watanabe, R., Miyazawa, T., and Matsuura, Y. 2005. Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. *Microbes Infect.* 7: 658-665.

Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M., and Ishiguro, N. 2005. Bacterial survey of feces from feral pigions in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 951-953.

宮沢孝幸 (2005 年) ブタ内在性レトロウイルスと異種移植 移植 40(5): 432-435.

宮沢孝幸 (2005 年) レンチウイルスの受容体 膜 30: 73-77.

宮沢孝幸 (2005 年) レンチウイルスの進化とレセプター特異性 ウイルス 55: 27-34.

【学会発表等】

Shimajima, M., Nishimura, Y., Miyazawa, T., Tohya, Y., Akashi, H. CD56 expression and feline immunodeficiency virus replication in MYA-1 cells. International Congress of Veterinary Virology, Comparative and Emerging Virus Infections of Dogs and Cats. (University of Liverpool, Wirral, England) (20-22 June 2005)

宮沢孝幸 AIDS 関連レンチウイルス宿主域決定機構と細胞内抵抗性因子 第 29 回阿蘇シンポジウム (2005 年 7 月 29 日)

Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Yamamoto, A., Fumimoto, Y., Gao, C., Miyazawa, T., and Shirakura, R. Remodeling PERV envelope N-glycans downregulate their transmission to human cells. 8th International Xenotransplantation Association Congress 2005 (Goteborg, Sweden) (10-14 September, 2005)

庄嶋貴之、福井大祐、宮沢孝幸 血清中 FeLIX 活性の評価 第 140 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島) (2005 年 9 月 30 日)

野田誠一郎、中村一哉、中村理加、宮沢孝幸 Gag-Rnase 融合蛋白によるブタ内在性レトロウイルスの感染制御 第 140 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島) (2005 年 9 月 30 日)

中村一哉、小泉響、中村理加、李元雨 豚内在性レトロウイルス持続感染細胞におけるウイルス再活性化 第 140 回日本獣医学会学術集会 (鹿児島) (2005 年 9 月 30 日)

附属新興ウイルス感染症研究センターは2005年4月に発足し、3つの研究チーム（複製基盤解析、病態解明、宿主要因解析）からなっている。病態解明チームは、2005年12月に宮沢孝幸が帯広畜産大学畜産学部獣医学科応用獣医学講座より特別教育研究所教授として着任し、スタートした。2006年1月には研究補助員として田中理加子加わった。研究室の改装ならびに研究機材の移動・購入を行い、現在、4月から研究を本格的に開始すべくセットアップを行っているところである。ウイルス研の諸先生の協力のもとで大学院生を募集し、2006年4月からは、帯広畜産大学畜産学部獣医学科から医学研究科大学院生（博士課程）として庄嶋貴之が、佐賀大学農学部生物生産学科から人間・環境学研究科大学院生（修士課程）として石川恵美子が、当研究チームに参加することになっている。また、2006年度の早い時期にポスドクが1名加わる予定である。

現在の研究テーマとしては以下の2つをメインにしている。1）異種移植、特に豚から人への異種間細胞移植ならびに異種間臓器移植の実現を目指し、その際に問題になるウイルス感染症（豚内在性レトロウイルス）のモニタリング系の確立と制御を行う。2）動物由来レトロウイルスの感染増殖機構を解明する。

1）豚内在性レトロウイルスのモニタリング系の確立と制御

人および類人猿と旧世界ザルでは、進化の過程で約3,000万年前に糖鎖を合成する酵素の一つである-1,3ガラクトース転移酵素（-1,3GT）の遺伝子が不活化された。そのため、人は-Gal抗原をもたず、外来抗原として認識し、自然界に存在する-Gal抗原の暴露により、抗-Gal抗体が大量に誘導されている。この抗体は他の動物由来のエンベロープウイルスの感染防御に役に立っている。他の動物の細胞で増殖したエンベロープウイルスは、エンベロープに-Gal抗原をもち、人がこのウイルスに暴露されたとしても、抗-Gal抗体と補体により速やかにウイルスが中和され、感染は成立しにくいのである。

現在、臓器移植のための臓器不足の解消や、新しい細胞移植治療法の開発に向けて、豚の臓器や細胞を異種間移植する方法が研究されている。豚の細胞は-Gal抗原を大量に発現しているため、人の抗-Gal抗体と補体を介する超急性拒絶反応が起こるが、これを抑えるために補体制御遺伝子や糖転移酵素遺伝子を導入したブタ、さらには-1,3GTそのものをノックアウトしたブタなどが開発されている。しかしそのような手法は、抗-Gal抗体を介したウイルスに対する自然抵抗性を減弱させてしまう。そのため、これらの遺伝子改変ブタからのウイルスが患者に感染し、さらには人社会に広まる危険性がある。

人に感染する可能性があるブタのウイルスのうち、最大の問題は豚内在性レトロウイルス（porcine endogenous retrovirus：PERV）である。内在性レトロウイルスは生まれつきすべての体細胞のゲノムに存在するため、豚から取り除くことは現時点では不可能である。1996年にヒトの細胞に感染するPERVが2種類（PERV-A、PERV-B）発見された（AとBはそれ

それぞれ異なる受容体を認識する)。PERVはヒトの細胞で増殖はするが、一般にその増殖力は弱い。しかし、わずかな変異により人に馴化したウイルスが生じたり、人の内在性レトロウイルスと組換わることで、より増殖性の高いウイルスが出現する可能性もある。豚を用いた異種間臓器移植の実用化にはPERV制御と感染動物モデル作出が必要不可欠の課題となっている。

PERVは豚では病原性をもたないが、突然変異や組換えにより、病原性を発現する可能性がある。そして、その感染は移植患者だけではなく、社会全体にも広がることも危惧される。そこで、交配によりPERVが産生されないブタの系を確立したり、ノックアウト技術によりPERVゲノムを破壊したり、トランスジェニック技術によるPERV産生抑制法などの取り組みが必要である。今後2年以内に異種間移植に関わる豚内在性レトロウイルス(PERV)のモニタリングの系を確立するとともに、遺伝子改変豚からのPERVの産生を制御する方法を確立したい。

2) 動物由来レトロウイルスの感染増殖機構の解明

非霊長類動物由来のレトロウイルス(レンチウイルス属、ガンマレトロウイルス属、スプーマウイルス属)のエントリーレセプターと細胞内宿主因子の解明を行っている。

レンチウイルス属に分類されるウイルスには、霊長類レンチウイルス、有蹄類レンチウイルスおよびネコ免疫不全ウイルス(FIV)がある。霊長類レンチウイルスは、CD4 分子をプライマリーレセプターに、CXCR4 などのケモカインレセプターをコレセプターに使用している。近年、FIVのレセプター分子がクローニングされ、プライマリーレセプターにCD134 分子を、コレセプターにCXCR4 分子を使用することがわかった。CD134 は、活性化CD4 陽性細胞に発現する副刺激分子であり、FIVはHIVの標的細胞とほぼ同様の細胞に感染し、免疫不全を誘導することがわかった。またFIVの野外分離株は、ヒトCXCR4 を使用できたが、ヒトCD134 は使用できず、FIVの宿主特異性をレセプターレベルで規定しているのは、プライマリーレセプターであることがわかった。さらに、FIVの一部の実験室株は、CXCR4 のみを介してCD134 非依存的にヒト細胞に感染することが可能であった。霊長類レンチウイルスも一部の株はCD4 非依存的にケモカインレセプターのみを介して感染することから、自然界では宿主の壁を飛び越えて感染する場合、プライマリーレセプター非依存の変異株が主役である可能性が考えられる。FIVに遺伝的に近縁なウイルスは、ライオンやピューマにも存在しており、それぞれFIV_{Ple}、FIV_{Pco}と命名されている(家ネコのFIVはこれと区別するためにFIV_{Fca}とも呼ばれる)。FIV_{Fca}のメインレセプターとしてCD134 がクローニングされた当初、FIV_{Ple}やFIV_{Pco}のプライマリーレセプターもCD134 であると予想されたが、その後の研究によりこれらのメインレセプターは、CD134 でない可能性が高いことがわかった。FIV_{Ple}やFIV_{Pco}のレセプターや宿主抵抗性因子を解析することにより、霊長類由来レンチウイルスの研究だけではみえてこなかった宿主特異性決定機構やAIDSの病原性発現機構の解明につながると我々は考えている。また、これら宿主特異性決定機構を解析する過程で、様々な特徴をもった新規レトロウイルスベクターが開発できると考えられ

る。

現在、人に感染しているガンマレトロウイルスは知られていないが、異種間臓器移植で問題になっている PERV は、ガンマレトロウイルス属に分類される。近年、マウス白血病ウイルスの感染メカニズムに関して、cognate レセプター非依存性の感染経路があることが報告された。さらに、感染後速やかに（数ヶ月以内）ネコに AIDS を誘導するネコ白血病ウイルスの変異体が存在する。この変異体（FeLV-T と命名されている）の感染には、内在性レトロウイルスの truncate した形のエンベロープ蛋白（FeLIX 蛋白と呼ばれている）が必要であり、cognate レセプター非依存性であることがわかった。PERV の感染においても、ギボンザル白血病ウイルスのエンベロープ蛋白により、cognate レセプター非依存的に感染することが報告されている。今後は、この cognate レセプター非依存的な感染メカニズムを解明するとともに、体内で発現している内在性レトロウイルスの蛋白が外来性レトロウイルスの感染・増殖に及ぼす影響を調べていきたいと思っている。

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

ウイルス研究所は、京都大学学内ネットワークのードメインとして独自の LAN を持つ。現在、この管理は淀井教授、伊藤教授、真木講師、竹本助手、相楽技官を含むネットワーク委員会によって管理されている。また、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のサービス提供に伴い、附属ゲノムセンターの清水教授にも運営のお手伝いをいただいている。その結果、パソコンの接続台数約500、登録ユーザー数約400という規模になっているが、それは生物学・医学研究におけるコンピュータネットワークの必要性、そして、ウイルス研究所におけるコンピュータネットワーク管理・運営が不可欠であることを如実に反映するものと考えられる。

現在のシステムは、ファイルサーバー・メールサーバー・WEBサーバー・ネームサーバーなど複数のSUNワークステーションより成り立っており、高速性・機能性・安全性各面で安定したサービスの提供を心がけている。ストリーミング配信サーバーも近年導入され、遠隔会議や遠隔講義などの情報の発信も可能となった。今後は研究者同士の情報交換や研究支援に限らず、研究所の知的情報資産を広く社会に還元していくメディアとしての役割も担っていかなければならないだろう。

いまやネットワークサービスを保証する上で情報の管理が大変重要になっており、個人情報に言及するまでもなく、資産としての情報の価値がますます大きくなっていく社会に我々は立っている。京都大学全学情報セキュリティ委員会の発足に伴い、当研究所においても情報セキュリティポリシー実施手順書が今年度設定されたが、安全性の高いネットワーク運営のためには、ハードウェアの管理や脆弱性の点検に加え、ネットワークに対する不正アクセスや著作権物の不正入手などを冒さないユーザーのモラル教育など、我々管理グループだけでなくユーザー全体の意識向上が望まれる。