

第二回ウイルス学キャンプ in 湯河原プログラム

6月24日

12:30～13:30 集合、受付

13:30 開会

13:40 講演

アデノウイルスベクターはどこまで改変が可能か？

三谷幸之介（埼玉医大・ゲノム医学研究センター）

フィロウイルスの細胞への侵入機構

高田礼人（東京大学医科学研究所感染・免疫部門 ウイルス感染分野/北海道大学 人
獣共通感染症リサーチセンター）

強毒病原体の出現と宿主の集団構造

佐々木 颯（九州大学大学院理学研究院数理生物学）

16:00頃 自己紹介

16:40頃 講演

○ 細胞質膜におけるCD63の過剰発現はHIVの複製を阻害する

青木淳，小柳義夫（京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設感染病態研究領域）

○ ウシコロナウイルス（BCV）の腸上皮での増殖と細胞分化の関係

井上雄喜（東北大学医学部医学系研究科病理病態学講座免疫学分野）

○ 抗 HIV 作用のある APOBEC3G の生化学的特性と抗ウイルス機構のメカニズム

岩谷靖雅（NIH）

○ ウイルス感染におけるユビキチン結合酵素（E2）の挙動解析

滝澤真理（東京大学大学院総合文化研究科）

18:00 夕食

19:30頃 講演

- 初期抗原刺激においてIL-4を産生する内在性メモリー様CD4⁺T細胞の生理学的意義
田中伸弥^{1,2}・久保允人¹ (理研RCAI¹、東理大・生命研²)
- 麻疹ウイルスワクチン株細胞馴化の機構
田原舞乃 (九州大学ウイルス学教室)
- 新規ピコルナウイルスであるアイチウイルスゲノム5'末端の機能解析
長嶋茂雄 (藤田保健衛生大学大学院医学研究科、ウイルス・寄生虫学専攻)
- 宿主酸性タンパク質Template Activating Factor-Iによるアデノウイルスクロマチンの構造変換機構の解析
春木宏仁 (筑波大学・感染生物)
- SR蛋白質を標的とした抗ウイルス剤の開発
福原武志 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

21:10頃 集中討論

6月25日

9:30 講演

- 遺伝子操作手法を用いた麻疹ウイルスの複製と病原性解析
竹田誠 (九州大学大学院医学研究院ウイルス学)
- ヘルペスウイルスー最近世間の話題にあまりのぼらないけど、とても重要なウイルス群
なんだな、これがー
川口寧 (名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学)
- 植物ウイルスの宿主域決定因子に関する解析
渡辺雄一郎 (東京大学大学院総合文化研究科)

12:00

○アデノウイルスベクターはどこまで改変が可能か？

三谷幸之介（埼玉医大・ゲノム医学研究センター）

私達は、アデノウイルスからウイルス遺伝子を完全に除き、ヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖が可能なベクターを作製し、さらに、このベクターから種々のハイブリッドベクターを開発した。これらの研究から得た教訓について、考察したい。

○フィロウイルスの細胞への侵入機構

高田 礼人（東京大学医科学研究所感染・免疫部門 ウイルス感染分野/北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター）

フィロウイルスは表面糖蛋白質GPを介して宿主細胞レセプターへ吸着し、感染を開始する。しかし、GPの主要なレセプターと考えられる宿主細胞分子は不明のままである。フィロウイルスの細胞への侵入機構について概説する。

○強毒病原体の出現と宿主の集団構造

佐々木 顕（九州大学大学院理学研究院数理生物学）

病原体の進化に関する理論的な研究においては、感染と回復等の疫学パラメータ間トレードオフのもとでの病原体の基本増殖率最大化が基本原理としてされてきた。しかし従来の理論では無視されていた宿主の空間構造、感染の局所ネットワーク構造等を考慮すると、病原体の毒性進化のダイナミクスは大きく変わり、強毒病原体の出現と伝播に関して新しい知見が得られる（Boots, Sasaki and Hudson, Science 2004）。毒性進化学の最前線や、ワクチン由来株の強毒復帰を考慮したポリオ根絶計画などについて紹介する。

○遺伝子操作手法を用いた麻疹ウイルスの複製と病原性解析

竹田 誠（九州大学大学院医学研究院ウイルス学）

われわれは麻疹ウイルスの遺伝子操作法の開発とその改良に取り組んできた。いまや、麻疹ウイルスは最も容易に工学できるモノネガウイルスである。本法を用いた麻疹ウイルス研究の最前線を紹介する。

○ヘルペスウイルスー最近世間の話題にあまりのぼらないけど、とても重要なウイルス群なんだな、これがー

川口 寧（名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学）

我々の研究グループはヘルペスウイルスに関する分子生物学的研究を行っている。本キャンプでは、我々が報告してきた知見がどの様に見出されてきたかといった点、つまり、普通の講演では決して触れることのない研究の裏話を中心に紹介する。

○植物ウイルスの宿主域決定因子に関する解析

渡辺雄一郎（東京大学大学院総合文化研究科）

タバコモザイクウイルスには多くの種がある。宿主域はどのようにして決定されるのだろうか。解析していくと、実験を始める前に予想していたことと異なる結果が出てくることに何度か遭遇した。そこから新しい考え方、発見に行きついたことについて紹介をさせていただこうとおもう。

一般演題

○細胞質膜における CD63 の過剰発現は HIV の複製を阻害する

青木淳 小柳義夫 (京都大学ウイルス研究所
エイズ研究施設感染病態研究領域)

HIV のウイルス粒子は多くの細胞では細胞質膜より細胞外へ放出されるが、マクロファージにおいては、late endosome marker である CD63 分子が集積した細胞内小器官に出芽することが明らかになってきた。しかし CD63 分子の機能は HIV との関係はもちろん、生理的な役割もほとんどわかっていない。そこで我々は CD63 分子そのものの HIV 複製における機能を明らかにすべく実験を行った。

内在性の CD63 の発現を siRNA 法により抑制後、HIV 発現プラスミド (pNL4-3) をトランスフェクションし上清中のウイルス感染価を測定した。CD63 ノックダウン細胞から産生される HIV の感染性は有意に低下していた。次に pNL4-3 と野生型 CD63 (CD63wt)、または、ライゾームターゲットモチーフ欠損変異体 (CD63 dL) 発現プラスミドをコトランスフェクションし、上清中のウイルス感染価を測定した。CD63wt または CD63dL の共発現により HIV の感染性が著しく低下していた。また、培養上清中に放出される p24 量、放出されるウイルス粒子量も低下していた。このとき細胞内における Gag 蛋白の発現量の増減は観察されなかった。次に、レンチウイルスベクターを用いて CD63wt、または CD63 dL を強制発現させた細胞においても抑制効果は再現された。これら CD63wt、CD63 dL 発現レンチウイルスベクターを導入した 293T 細胞に GFP-fused Gag 発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、細胞質膜に CD63 分子が集積し、そして、その領域に Gag 蛋白質が有意に集積し、共局在していることが明らかになった。これらの結果から CD63 は HIV の複製に必要なが、過剰な発現は逆にその粒子放出を著しく阻害する、すなわち至適量の CD63 の存在が HIV の複製に重要であることが示唆された。

○ウシコロナウイルス (BCV) の腸上皮での増殖と細胞分化の関係

井上雄喜 (東北大学医学部医学系研究科病理病態学講座免疫学分野)

BCV は SARS ウイルスと同属のコロナウイルスであり、幼・成獣下痢症の主要な病原ウイルスである。BCV は腸上皮細胞において増殖することが知られているものの、いかなる分化段階の腸上皮において増殖するか明らかではなく、詳細な増殖機構の解明も未だ不十分であった。そこで我々は、ヒト結腸由来 Caco-2 細胞から高分化型腸上皮細胞株 CA 1 および低分化型細胞株 CA 2 の樹立を行い、

これら 2 種類の細胞株における BCV の増殖性の差異を、吸着、侵入から出芽に至るウイルスのライフサイクルの各段階に注目し検討した。その結果、CA1 においては CA2 に比し BCV が明らかに高効率に増殖しており、その原因として高分化細胞におけるウイルス RNA 合成が亢進していることが判明した。現在、高分化型細胞特異的に発現している RNA 合成促進性の宿主因子の分離同定を試みている。

○抗 HIV 作用のある APOBEC3G の生化学的特性と抗ウイルス機構のメカニズム

岩谷靖雅 (NIH, NICHD)

APOBEC3G は AID や APOBEC1 と同族の Cytidine Deaminase (RNA-editing enzyme) で、2つの Zinc Finger Domain をもつ。Vif を欠損した HIV をはじめ多くのレトロウイルスやレトロポゾンの複製だけでなく、HBV の複製をも阻害する。この領域で最も関心がもたれていることは、1) APOBEC3G のウイルス抑制メカニズム、2) Vif の、APOBEC3G による抗ウイルス作用の不活化、3) APOBEC3G の本来の生物学的役割、である。特に、1) の命題を解明するために、APOBEC3G タンパクを精製し、生化学的、分子生物学的な特性を明らかにし、抗ウイルスメカニズムを調べた。その結果をお話しします。

○ウイルス感染におけるユビキチン結合酵素 (E2) の挙動解析

滝澤真理 (東京大学大学院総合文化研究科)

細胞内のタンパク質分解において中心的な役割を果たしているのがエネルギー依存性のタンパク質分解システムであるユビキチン・プロテアソーム系である。ユビキチン・プロテアソーム系は様々な高次機能の制御や環境ストレスに応答した恒常性の維持に必要である。植物のウイルスに対する防御反応においても役割をもつことが示唆されてきた。すでに *Nicotiana benthamiana* においてウイルス感染や傷害ストレス、ジャスモン酸、サリチル酸、エチレンの前駆体である ACC などの処理によりユビキチン活性化酵素 (E1) の蓄積が増加することを示した。今回 *Arabidopsis thaliana* においても解析を行い、TMV-Cg 感染により E1 の mRNA の蓄積が増加することが確認された。また TMV-Cg が感染したときに mRNA の蓄積が変化する E2 を数種類特定した。

○宿主酸性タンパク質 Template Activating Factor-1 によるアデノウイルスクロマチンの

構造変換機構の解析

春木宏仁 (筑波大学・感染生物)

ウイルス粒子中のアデノウイルスゲノム DNAはウイルス由来の後期遺伝子産物である塩基性コアタンパク質により凝縮されたコア構造を形成している。なかでも非常にアルギニンにとんだコアタンパク質VIIはゲノムDNAの凝縮に主要な役割を果たしている。細胞に感染すると、タンパク質VIIと複合体を形成したウイルスDNAは核に移行し、初期遺伝子の転写の鋳型として機能すると信じられている。我々の研究室ではウイルスDNA-タンパク質VII複合体を鋳型とした試験管内ウイルスDNA複製系により複製促進活性を持つ主要な因子として宿主由来の酸性たんぱく質Template Activating Factor (TAF) -IをHeLa細胞抽出液から精製し同定した。生化学的解析によりTAF-IはウイルスDNA-タンパク質VII複合体に相互作用し、DNA-タンパク質VII-TAF-Iからなる化学量論的な複合体を形成すること、それによりウイルスDNAをよりnuclease感受性な構造に変換することを明らかにした。感染初期の細胞においてTAF-Iはタンパク質VIIおよびウイルスDNA全体に相互作用することを明らかにした。感染細胞内におけるTAF-Iの機能を明らかにするために、dominant negative体およびRNAiを用いたTAF-I活性の抑制によるアデノウイルスの感染に及ぼす影響について調べた。その結果、TAF-Iの活性抑制により初期遺伝子の発現時期が遅れることが明らかとなった。以上の結果からTAF-IはアデノウイルスのDNA-タンパク質VII複合体と相互作用し、ウイルス初期遺伝子産物の蓄積を促進することが強く示唆された。

○麻疹ウイルスワクチン株細胞馴化の機構

田原舞乃 (九州大学ウイルス学教室)

麻疹ウイルスワクチン株は、動物種、細胞種を越え多くの細胞に馴化した驚くべきウイルスである。ゲノム全領域わたり詳細な解析を行うために、19種の組換えウイルスを用意した。その結果、麻疹ウイルスワクチン株の細胞馴化の機構が明らかになった。

○初期抗原刺激において IL-4 を産生する内在性メモリー様 CD4⁺T 細胞の生理学的意義

田中 伸弥^{1,2}・久保 允人¹ (理研 RCAI¹、東理大・生命研²)

IL-4 遺伝子の発現には、Th2 分化にともなって起こるクロマチンリモデリングが深く関係していることが示唆されており、このエピジェネティックに構造変化を起こす領域が、実際どのように転写制御に関与しているのかは興味深い課題である。我々は IL-4 と KIF3 遺伝子座の間にあり、哺乳類で良く保存されている領域 Conserved Non-coding Sequence (CNS)-2 に着目し、CNS-2 によって制

御される IL-4 転写制御について GFP をレポーター遺伝子としたトランスジェニック (Tg) マウスを用いて検討した。

CNS-2 GFP Tg マウスの脾臓細胞を解析したところ、脾臓内に常時 30%の割合で存在する内在性のメモリー様 CD44^{hi}CD62L^{lo} CD4⁺T 細胞の 20%において

恒常的 GFP の発現が見られた。この細胞集団は、無刺激条件下において定量性 PCR にて検出可能なレベルの IL-4 mRNA を発現していたが、IL-4 蛋白の産生には TCR 刺激が必要であった。このメモリー様 CD4⁺T 細胞は TCR 刺激に伴い機能型 Th2 細胞と同程度の IL-4 を産生する能力を有していた。この細胞は、脾臓だけでなくリンパ節、血中など幅広く分布しており、気道過敏反応が起こっている炎症部位に積極的に集積する傾向が認められた。CNS-2 GFP Tg マウスの脾臓細胞より、この GFP 陽性細胞を欠損させると二次刺激応答において Th2 サイトカインの産生がほぼ消失した。以上のことから、IL-4 を産生する内在性メモリー様 CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4⁺T 細胞において、CNS-2 は即時的 IL-4 産生に寄与し、獲得免疫初期において Th2 分化環境を形成するのに必須の役割を果たしていた。

○新規ピコルナウイルスであるアイチウイルスゲノム 5' 末端の機能解析

長嶋 茂雄 (藤田保健衛生大学大学院 医学研究科 ウイルス・寄生虫学専攻)

我々はこれまでにアイチウイルスのゲノム 5' 末端に形成される 3つのステム-ループ構造 (SL-A, SL-B, SL-C) およびシュードノット構造が RNA 複製に重要であることを明らかにしてきた。今回は、無細胞ウイルス複製系を利用して、ゲノム 5' 末端の塩基配列や高次構造が+鎖と-鎖のどちらの合成に関与しているかを調査した。また、ゲノム 5' 末端とウイルスタンパク質の相互作用について解析を行った。

ゲノム 5' 末端に致死変異を有するウイルス RNA について、無細胞ウイルス複製系を用いて、細胞抽出液中での RNA 合成能を調査した結果、ステム部分の塩基対形成を妨げた変異体では-鎖 RNA の合成が阻害されていた。一方、SL-A の下部ステムの両側 6塩基を互いに入れ換えた変異体では、-鎖 RNA は効率良く合成されたが、+鎖 RNA の合成は検出されなかった。ゲノム 5' 末端とウイルスタンパク質 3AB、3ABC との相互作用を調べた結果、3ABC との間で特異的な相互作用が認められた。-鎖 RNA の合成を阻害する、SL-B のステム部分の塩基対形成を妨げる変異を導入したプローブを用いたところ、3ABC との結合能が低下した。

以上の結果は、アイチウイルスのゲノム 5' 末端には、+鎖と-鎖の両方の合成に必要な element が存在することを示している。また、ゲノム 5' 末端と 3ABC からなる複合体の形成

が RNA の複製に関与している可能性が示唆された。現在は、その他のウイルスタンパク質や宿主タンパク質が、ゲノム 5' 末端との結合能を有しているか調査している。

○SR 蛋白質を標的とした抗ウイルス剤の開発

福原武志 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

SR 蛋白質とは mRNA splicing 反応を活性化する蛋白質として単離された経緯をもつ RNA 結合蛋白質である。これらの蛋白質の特徴として、Ser と Arg からなる RS ドメインが存在し、この Ser がリン酸化を受ける事が知られている。そのリン酸化の意味は、スプライシング複合体を構成する蛋白質の離合集散シグナルであると推定されている。我々は RS ドメインをリン酸化するキナーゼに注目して研究を進め、この阻害剤開発を行った。現在までに、この阻害剤を用いた抗ウイルス作用を見出しているので、紹介したい。