

## 第四回ウイルス学キャンプ in 湯河原プログラム

6月6日

12:30～ 受付・ポスター貼付け・スライド受付

13:45 開会 開会挨拶 永田恭介

13:50 Session 1 座長 増田道明

- 蛍光相関分光法を利用した *in vivo* タンパク質相互作用解析  
金城政孝（北海道大学電子科学研究所・超分子分光研究分野）

14:30 休憩

14:40 Session 2 座長 小池智

- C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関連する宿主因子  
森石恆司（大阪大学・微生物病研究所・分子ウイルス分野）
- in vivo* と *in vitro* における HCV 複製  
脇田隆字（国立感染症研究所・ウイルス2部）

16:05 休憩

16:15 Session 3 一般口頭発表 座長 発表者が交互に行う

- HIV-2 と TRIM5 alpha  
中山英美（大阪大学・微生物病研究所ウイルス感染制御分野）
- メンブランチラフィッキング変換による HIV 感染阻止  
芳田剛（京都大学ウイルス研究所感染病態研究領域）
- マレック病ウイルス腫瘍タンパク質 Meq および Meq ヴァリアントの発現・性状解析  
岡田 幸（北海道大学 大学院獣医学研究科）

○ヒートショック蛋白質Hsc70はインフルエンザウイルスRNPの核外輸送に関与するのか？

渡辺 健 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)

○酵母内におけるインフルエンザウイルスゲノム複製系を用いた宿主因子の同定と機能解析

内藤 忠相 (筑波大学・人間総合科学研究科)

○インフルエンザウイルス複製に関わる新規宿主細胞因子 IREF-2 の機能解析

杉山 賢司 (筑波大学・人間総合科学研究科)

17:45 ポスター発表

19:30～21:30 夕食

夜 集中討論

注意：24:00から翌朝5:00までは入浴不可能

6月7日

7:00～9:00 朝食

9:30 集合・鍵返却

9:45 Session 4 座長 小柳義夫

○抑制化免疫レセプターを介した単純ヘルペスウイルス侵入機構  
荒瀬尚 (大阪大学微生物病研究所・免疫化学分野)

○カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの発がん分子機構  
藤室雅弘 (北海道大学薬学部・大学院薬学研究科・生化学分野)

総合討論

12:00前 閉会 閉会挨拶 柳雄介

## 招待講演

### ○蛍光相関分光法を利用した *in vivo* タンパク質相互作用解析

金城政孝（北海道大学電子科学研究所・超分子分光研究分野）

蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy）は高感度な単一分子検出法のひとつであり、細胞内の任意の一点での、蛍光分子の数とその分子の動き易さ（拡散速度）を測定することが可能である。分子の動き易さは、分子の大きさと相互作用の強さに関連する。従って、分子サイズが変化しなければ、分子の動き易さから分子間相互作用を推定することができる。講演ではFCSを用いて、細胞質や細胞核内の微環境の解析と蛋白質相互作用の解析について報告する。またいくつかの新しいFCS関連測定についても報告する予定。

### ○C型肝炎ウイルスの増殖と病原性に関連する宿主因子

森石恆司（大阪大学・微生物病研究所・分子ウイルス分野）

C型肝炎ウイルス（HCV）は、感染すると高率に慢性化し、脂肪化・線維化に移行し、肝硬変・肝癌へと至る。小実験動物による感染実験が確立されていないことなどの理由から、HCVによる感染・病原性発現メカニズムには多くの謎が残されている。近年、HCVの感染機構に関して、多くのことが分かりつつある。我々のグループが最近報告しているHCVの病原性および複製に関与する宿主蛋白質の作用機構について述べたい。

### ○*in vivo* と *in vitro* における HCV 複製

脇田隆宇（国立感染症研究所・ウイルス2部）

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は多くの場合持続感染化して、慢性肝炎を引き起こし、肝硬変から肝臓癌に至る。このHCV持続感染化機構はよく分かっていない。HCVのウイルス培養は我々がクローニングしたJFH-1株を用いて初めて可能となった。JFH-1株によるウイルス培養系により、HCVの古典的なウイルス学的研究が可能となり、HCVの生活環に関する様々な知見が明らかになりつつある。しかし、JFH-1株はHCV感染症では稀な劇症肝炎患者から分離された。未だに慢性肝炎患者から分離されたウイルス株ではウイルス培養ができない。一方、JFH-1株は劇症肝炎患者から分離されたにもかかわらず、チンパンジーにおける感染実験では病原性が低いことが示唆されている。培養細胞におけるHCVの複製能と生体での複製および病原性の関係について考察したい。

### ○抑制化免疫レセプターを介した単純ヘルペスウイルス侵入機構

荒瀬尚（大阪大学・微生物病研究所・免疫化学分野）

免疫細胞は自己抗原を認識する種々の抑制化レセプターを発現し、免疫細胞の自己応答性を抑えている。ところが、ウイルスの中には抑制化レセプターのリガンドを獲得し、ウイルス感染細胞に対する免疫応答を抑制しているものが存在する。興味深いことに、単純ヘルペスウイルスでは、ウイルスのエンベロープ分子自体が抑制化レセプター-PILRのリガンドになっていることが明らかになった。さらに、PILR発現細胞はHSV1感染に感受性になり、PILR発現細胞に対する感染は抗PILR抗体で特異的に阻害されることが明らかになった。そこで、PILR等の抑制化レセプターのウイルス感染における新たな機能を紹介する。

## ○カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの発がん分子機構

藤室 雅弘 (北海道大学・薬学研究院・生化学)

カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV)は健常者に感染すると、エピゾーム DNA として核内で維持され、潜伏感染する。しかし、感染者の免疫不全時に、KSHV はカポジ肉腫を引き起こす。KSHV が発現するウイルス蛋白質は宿主の翻訳後修飾系(ユビキチン化やSUMO化)を模倣・操作し、 $\beta$ -カテニンやp53の正常な分解制御を破綻させる。より好ましい環境構築のため、KSHV は宿主の翻訳後修飾系を乗っ取り、細胞増殖や抗アポトーシスの活性化能を獲得する。

## 一般演題

### ○ HIV-2 と TRIM5 alpha

中山英美 (大阪大学・微生物病研究所ウイルス感染制御分野)

HIV-1 の宿主域は狭くサル細胞での増殖が進まないことが知られていたが2004年アカゲザルのTRIM5alphaがHIV-1の感染を初期過程において阻害すること、ヒトのTRIM5alphaはHIV-1の感染を阻害できないことが報告された。われわれは、TRIM5alphaのSPRYドメインが種特異性を決定する領域であることを報告した。今回、われわれはHIV-2はサル個体への感染性がウイルス株間で異なることに着目し、HIV-2のカプシドタンパクの1アミノ酸の変異によりカニクイサルTRIM5alphaによる感染抑制効果が劇的に変化することを見いだした。

### ○メンブランチラフィッキング変換による HIV 感染阻止

芳田剛 (京都大学ウイルス研究所感染病態研究領域)

HIVのコレセプターであるCXCR4のトラフィッキングを変換することにより、HIV-1の感染が抑制できる事実を見出した。テトラスパニタンパク質であるCD63とその変異体導入細胞においては、CXCR4の細胞質膜上における発現が明らかに減少/消失することが示された。さらに、この現象はCXCR4に特異的にみられること、CXCR4におけるターゲット配列がC末端6アミノ酸であること、内在性のCD63が潜在的にCXCR4の細胞膜上発現を負に制御していることを明らかにした。そして、この制御過程がトランスゴルジネットワークから放出されたCXCR4含有の輸送小胞と細胞膜との融合過程であることを見出した。

### ○マレック病ウイルス腫瘍タンパク質 Meq および Meq ヴァリアントの発現・性状解析

岡田 幸 (北海道大学 大学院獣医学研究科)

マレック病ウイルス(MDV)がコードする腫瘍タンパク質 Meq は転写因子として MDV による T 細胞の形質転換に関与している。腫瘍細胞株あるいは MDV 弱毒株は Meq の転写活性化領域に 60 アミノ酸の挿入を含む L-Meq を発現しているが、L-Meq の形質転換への関与は明らかでない。またこれらの MDV 感染細胞内では Meq あるいは L-Meq のスプライス産物と考えられる  $\Delta$ Meq が発現している。本研究では Meq との比較を主とした L-Meq の性状解析と、 $\Delta$ Meq の negative regulator としての機能についての検討を行っている。

### ○ヒートショック蛋白質 Hsc70 はインフルエンザウイルス RNP の核外輸送に関与するのか?

渡辺 健 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)

【目的】我々はインフルエンザウイルスの粒子形成・増殖に必須なマトリックス蛋白質(M1)に結合する宿主因子として、MALDI-TOFMSによりHsc70を同定した。(Watanabe K et al. FEBS Lett. 2006) Hsc70はHsp70ファミリーに属し通常構成的に核・細胞質に発現している。本研究ではHsc70のインフルエンザウイルス増殖への関与を調べた。

【結果・考察】MDCKまたはHeLa細胞にウイルスを感染、抗M1抗体またはHsc70抗体での免疫沈降により相互作用を確認した。また、精製粒子よりグリセロール密度勾配遠心によりRNP複合体を単離したところ、RNP画分にもHsc70が含まれていた。精製蛋白質を用いたファーウエスタンブロットティングにより、M1のC末半分がHsc70との結合に関与していることが示唆された。また、感染細胞でHsc70は核へ局在し、Hsc70SiRNA導入によりウイルス増殖は抑制された。Hsc70には核外移行シグナル(NES)が存在していることが近年報告されており、Hsc70自体がCRM1依存的に核外輸送されていると考えられる。これまではvRNPはNS2によって核外輸送されると考えられてきた

が、我々はNS2の他にもHsc70がM1を介してvRNPと複合体を形成し、CRM1依存的にvRNPの核外輸送を担う因子の一つであると考え現在実証を進めている。

#### ○酵母内におけるインフルエンザウイルスゲノム複製系を用いた宿主因子の同定と機能解析 内藤 忠相（筑波大学・人間総合科学研究科）

ウイルスの増殖にはウイルス性因子に加えて、様々な宿主因子の関与によって支えられている。これらの宿主因子を同定することは、ウイルス増殖機構の理解のみならずウイルスの制御を考える上でも重要である。我々は、インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写に関与する宿主因子を網羅的に同定することを目的とし、遺伝学的な解析基盤の整っている酵母を用いたインフルエンザウイルスゲノムの複製・転写系を確立した。現在、ウイルスゲノムの転写・複製に関与する宿主因子の候補をいくつか同定しており、培養細胞および試験管内再構成によって詳細に解析を行なっているところである。

#### ○インフルエンザウイルス複製に関わる新規宿主細胞因子 IREF-2 の機能解析 杉山 賢司（筑波大学・人間総合科学研究科）

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルスに属するマイナス鎖 RNA ウイルスであり、その転写および複製は、自身の遺伝子にコードされる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼにより触媒される。しかし、現在までに試験管内での複製反応の再構成が成功しておらず、その詳しいメカニズムは依然として不明である。本研究では、試験管内複製反応が宿主細胞抽出液に依存性を示すことから、生化学的相補試験系を利用してウイルス複製関連因子の探索を行った。非感染細胞の核抽出液を調整し、カラムによる分画を行った。得られた画分を試験管内ウイルス RNA 合成系に加えることで、複製反応を検定した。その結果、ある粗画分の添加により鋳型 cRNA に依存した RNA が認められた。この RNA 産物の極性および 5' 末端構造を調べたところ、5' 末端に三リン酸を有する vRNA であり、この新生 RNA は鋳型 cRNA から de novo で合成された複製反応産物であることが確かめられた。この粗精製画分に含まれるウイルス複製に必須な新規宿主因子を IREF-2 (Influenza virus REplication Factor-2) と命名した。現在、IREF-2 の精製・同定を進めており、IREF-2 の機能ならびにウイルス複製反応機構の詳細について解析を進めているところである。