

課題番号	LS068
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	低分子 RNA 治療を実現するための新規 RNA ウイルスベクタープラットフォームの創製
研究機関・ 部局・職名	京都大学・ウイルス研究所・教授
氏名	朝長啓造

1. 当該年度の研究目的

平成 23 年度は、以下の 3 点に重点を絞り研究開発を進めた。(1)ボルナウイルスベクターの最適化と組換えウイルス産生系の改良、(2)シュードタイプボルナウイルスベクターの作製、(3)ボルナウイルスベクターの複製と副作用の解析。(1)では、これまでに明らかとなった情報を基に、ウイルスの転写活性を制御する変異をボルナウイルスベクターに導入する。(2)では、他ウイルス由来のエンベロープタンパク質を持つシュードタイプボルナウイルス作成を行う。(3)では、生体内での感染動態を明らかにするために、可視化あるいは定量化遺伝子を発現するボルナウイルスベクターを作製する。

2. 研究の実施状況

(1)ボルナウイルスベクターの最適化と組換えウイルス産生系の改良: 組換えウイルスの転写・複製効率を上げるために、転写効率との関連性が示唆されている P 遺伝子のリン酸化部位に点変異を導入した。さらに、ウイルスのポリメラーゼである L 蛋白質にも変異を導入し、変異型組換えウイルスを作製した。その結果、マウス由来細胞を用いたとき、組換えウイルスの産生と複製効率が顕著に上昇した。一方、ヒト由来細胞ではウイルス複製効率に有意な差は認められなかった。

(2)シュードタイプボルナウイルスベクターの作製: 前年度に引き続き他のウイルスのエンベロープタンパク質とのシュードウイルスの回収を行うと同時に、感染性と複製・持続感染効率について検討を行った。前年度に作成したエンベロープ(G)遺伝子を欠損した組換えボルナウイルスが持続感染した Vero 細胞に、狂犬病ウイルスや水泡性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質を発現するプラスミドを導入することで、培養細胞上清中へシュードウイルスの産生を検討した。その結果、水泡性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質を発現させた場合において、培養上清中にシュード組換えボルナウイルスの産生が確認された。しかしながら、その産生量は極めてわずかであり、ボルナウイルスベクターのシュード化は現段階においてきわめて効率が悪いことが明らかとなった。

(3)ボルナウイルスベクターの複製と副作用の確認: 今年度は、組換えボルナウイルスの感染動態の可視化もしくは定量化を目的に、定量マーカーを発現する組換えボルナウイルスの作成を行った。GFP に加え、ルシフェラーゼ遺伝子、CAT 遺伝子、そして Lac Z 遺伝子を P と M 遺伝子間に挿入したウイルスベクターの作成に成功した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M and Tomonaga K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express Borna disease virus phosphoprotein. J. Virol. 85: 4567-4571 (2011) Daito T, Fujino K, Watanabe Y, Ikuta K and Tomonaga K. Analysis of intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein fused with fluorescent markers in living cells. J. Vet. Med. Sci. 73: 1243-1247 (2011) Daito T, Fujino K, Honda T, Matsumoto Y, Watanabe Y and Tomonaga K. A novel Borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. J. Virol. 85: 12170-12178 (2011) (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 3 件</p>	<p>専門家向け 計 3 件 Matsumoto Y., Daito T., Horie M., Fujino K. and Tomonaga K. Chromatin environment-dependent transcriptional activity of Borna disease virus ribonucleoprotein in persistently infected cells. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011. Fujino K., Daito T., Horie M., Matsumoto Y. and Tomonaga K. Generation and characterization of recombinant Borna disease virus lacking both matrix and envelope glycoprotein. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011. Daito T., Fujino K. and Tomonaga K. Localization of Borna disease virus glycoprotein at the nuclear membrane. XV International Congress of Virology. Sapporo Japan. 11-16 September 2011 一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/index.html http://bornavirus.biken.osaka-u.ac.jp/index.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>平成 24 年 2 月 27 日に千葉県立千葉高等学校にて特別授業(50 分 × 5 クラス、各クラス 30-35 人)を行い、最先端・次世代研究の成果とその展望について対話を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	<p>なし</p>

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	45,100,000	0	77,900,000	0
間接経費	36,900,000	13,530,000	0	23,370,000	0
合計	159,900,000	58,630,000	0	101,270,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	45,074,275	0	0	45,074,275	34,148,428	10,925,847	0
間接経費	13,515,000	0	0	13,515,000	3,852,367	9,662,633	0
合計	58,589,275	0	0	58,589,275	38,000,795	20,588,480	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	28,270,715	遺伝子増幅装置、実験試薬、培養細胞試薬
旅費	763,010	成果発表旅費(日本ウイルス学会)など
謝金・人件費等	3,694,265	非常勤教職員人件費
その他	1,420,438	学会誌投稿料、研究サンプル輸送費
直接経費計	34,148,428	
間接経費計	3,852,367	
合計	38,000,795	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
CO2インキュベータ	三洋電機株式会社製 CO2インキュベータ MCO-18AC	1	672,000	672,000	2011/4/28	京都大学
超微量分光光度計	Nanodrop technology社製 超微量分光光度計 NanoDrop 2000 ND-2000	1	1,570,800	1,570,800	2011/8/4	京都大学
ゲル撮影装置	米国UVP社製 ゲル撮影装置 BioDoc-It	1	903,000	903,000	2012/1/24	京都大学
超低温フリーザー	三洋電機株式会社製 超低温フリーザー-85℃ 519L 三相200V MDF-U54V	1	1,890,000	1,890,000	2012/2/14	京都大学
密閉式超音波細胞破砕装置	東湘電機(株)社製 密閉式超音波細胞破砕装置 Bioruptor UCD-300 一式	1	1,491,000	1,491,000	2012/2/17	京都大学
LAS4000mini オプション	GEヘルスケア社製 LAS4000mini オプション 一式	1	1,583,400	1,583,400	2012/2/27	京都大学
多本架冷却遠心機	トミー工業株式会社製 多本架冷却遠心機 AX-310 1式	1	862,155	862,155	2012/3/15	京都大学

微量高速冷却离心机	トミエ工業株式会社製 微量高速冷却离心机 KITMAN-24一式	1	508,725	508,725	2012/3/26	京都大学
-----------	----------------------------------	---	---------	---------	-----------	------