

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24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24年度は、以下3点の研究開発を重点的に進めることを目的とした。(1)シールドタイプ組換えボルナウイルスの開発。(2)低分子 RNA を発現するボルナウイルスベクターの基盤技術の開発。(3)ボルナウイルスの持続感染と病原性の解明。(1)においては、他ウイルス由来のエンベロープタンパク質を持つシールドタイプボルナウイルス作成を行うことを目的とした。(2)では、低分子 RNA、特にマイクロ RNA(miRNA)を持続的かつ効率よく発現するボルナウイルスベクターの開発を行うとともに、発現させる miRNA の検討を行った。(3)では、ボルナウイルスの感染特性の解明から、ベクターとしての有効性の確立と病原性の理解を目的とした解析を行った。

2. 研究の実施状況

(1)シールドタイプ組換えボルナウイルスの開発: 昨年度の報告で、培養上清中への組換えボルナウイルスの産生量が少なく、ウイルスの産生効率の改善が必要であったとした。そこで、平成24年度は、推進計画に基づいて組換えウイルスを産生する細胞の改良を試みた。shRNA ライブラリあるいはラット脳由来 cDNA を導入した細胞より、ウイルス産生効率が顕著に上昇した細胞株を数株樹立した。また、これら細胞株におけるウイルス産生効率に関与すると思われる責任遺伝子の同定を行った。現在、ボルナウイルスの複製や粒子産生効率へ影響を明らかにすべく、同定された責任遺伝子の解析を詳細に進めている。

(2)低分子 RNA を発現するボルナウイルスベクターの基盤技術の開発: 昨年度の推進計画に基づいて、ボルナウイルスベクターに低分子 RNA 配列を簡便に挿入できるコンストラクトの構築を行った。制限酵素を利用して、単独の組換え作業で任意の低分子 RNA 配列をカセットとしてベクターに挿入可能なシステムを完成した。また、ベクターに挿入する miRNA 配列についても検討を行った。アミロイドベータ前駆体などの神経疾患関連分子に対する miRNA に加え、ウイルス感染症、特にインフルエンザウイルスの増殖に関与する miRNA を独自に同定して、ボルナウイルスベクターから発現させる候補として解析を行っている。

(3)ボルナウイルスの持続感染と病原性の解明: ボルナウイルスが低分子 RNA を持続的かつ安定に発現できるウイルス学的特性を有することを、ボルナウイルスの持続感染機構の解明を行うことで証明し報告した(Matsumoto et al., Cell Host & Microbe 2012)。さらに、ボルナウイルスの病原性と複製に関与すると考えられる遺伝子領域について、由来の異なる様々なボルナウイルスを比較することで、宿主への適応と進化的意義について明らかにした(Fujino et al., PLoS One 2012)。

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                  Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase J, Yoshimori T, Schwemmler M and <b>Tomonaga K.</b> Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. <i>Cell Host Microbe</i> 11:492-503 (2012)                  Horie M, Ueda K, Ueda A, Honda T and <b>Tomonaga K.</b> Detection of avian bornavirus 5 RNA in <i>Eclectus roratus</i> with feather picking disorder. <i>Microbiol. Immunol.</i> 56:346-349 (2012)                  Fujino K, Horie M, Honda T, Nakamura S, Matsumoto Y, Francischetti I. M. B and <b>Tomonaga K.</b> Evolutionarily conserved interaction between the phosphoproteins and X proteins of bornaviruses from different vertebrate species. <i>PLoS One</i> 7:e51161 (2012)  <a href="http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0051161">http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0051161</a>                  (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 6 件</p>	<p>専門家向け 計 6 件  <b>Tomonaga K.</b> Bornavirus: the development of a new paradigm for RNA virus research. Department of Molecular Medicine Seminar, MAYO clinic. Rochester, MN USA. 26 July 2012                  Matsumoto Y., Fujino K., Horie M., Nakamura S., Honda T., Schwemmler M., <b>Tomonaga K.:</b> American Society for Virology 31th Annual Meeting. University of Wisconsin-Madison. Wisconsin, USA. 21-25 July 2012  <b>Tomonaga K.</b> Studies on bornavirus: towards opening a new avenue in RNA virus research. Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France. 7 December 2012  <b>Tomonaga K.:</b> Analysis of possible functions and evolutionary roles of endogenous bornavirus elements in human genome. International Bornavirus Meeting in Freiburg 2012. Department of Virology, University of Freiburg. 8-10 December 2012                  Honda T and <b>Tomonaga K.:</b> vSPOT: an interaction platform of viral RNP and host factors in the nucleus. International Bornavirus Meeting in Freiburg 2012. Department of Virology, University of Freiburg. 8-10 December 2012                  Fujino K and <b>Tomonaga K.:</b> Inhibition of BDV replication by a revived endogenous element in ground squirrel genome. International Bornavirus Meeting in Freiburg 2012. Department of Virology, University of Freiburg. 8-10 December 2012                  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><a href="http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/index.html">http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/index.html</a>  <a href="https://www.facebook.com/TomonagaLab">https://www.facebook.com/TomonagaLab</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>群馬県立高崎高等学校(9月5日)と同・前橋高等学校(11月8日)生徒に対して本研究の紹介を含めた授業をウイルス研究所で行い、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。                  参加者数: 計 60 名                  また、平成 25 年 3 月 14 日: 東京農工大学での開催したボルナウイルス研究会(公開シンポジウム)において研究発表を行った。                  対象者: 大学研究者・臨床従事者                  参加者数: 30 名</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載計0件	
その他	なし

4. その他特記事項

ボルナウイルスベクターの利用と共同開発を目的とした国際共同研究を開始した。

共同研究先：ドイツ・Freiburg University (Dr. Martin Schwemmler)、アメリカ・MAYO Clinic (Dr. Yasuhiro Ikeda) さらに、現在、アメリカ・Duke Universityとも共同研究に向けて議論を進めている。

## 実施状況報告書(平成24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	38,500,000	39,400,000	0
間接経費	36,900,000	13,530,000	11,550,000	11,820,000	0
合計	159,900,000	58,630,000	50,050,000	51,220,000	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	10,925,847	38,500,000	0	49,425,847	40,750,911	8,674,936	0
間接経費	9,662,633	11,550,000	0	21,212,633	327,132	20,885,501	0
合計	20,588,480	50,050,000	0	70,638,480	41,078,043	29,560,437	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	30,519,193	実験試薬、培養細胞試薬など
旅費	3,543,547	成果発表旅費(日本ウイルス学会)など
謝金・人件費等	4,454,205	非常勤教職員人件費、博士研究員(特定有期)人件費
その他	2,233,966	学会参加費、英文論文校閲費、研究細胞解析委託費等
直接経費計	40,750,911	
間接経費計	327,132	
合計	41,078,043	

## 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
細胞培養装置	ワケンビーテック株式会社 低温型自動O2/CO2細胞培 養装置9200EX	1	718,200	718,200	2012/5/31	京都大学
バイオハザード対策用キャビ ネット	パナソニックヘルスケア株式 会社製 バイオハザード対策 キャビネットMHE-S1300A2- PJ	2	1,218,000	2,436,000	2012/8/7	京都大学
CO2インキュベーター	パナソニックヘルスケア株式 会社製 CO2インキュベ ーター 170L MCO-18AC -PJ	2	639,450	1,278,900	2012/8/31	京都大学
バイオシェーカー	タイテック株式会社製 バイ オシェーカー(旋回/往復切 換 BR-43FL・MR)	1	856,800	856,800	2012/9/25	京都大学
微量高速遠心機	トミー工業株式会社製 微量 高速遠心機KITMAN-24	1	508,725	508,725	2012/12/10	京都大学
小型冷却遠心機	日立工機株式会社製 微量 高速/小型冷却遠心機 CF16RXII	1	661,500	661,500	2012/12/19	京都大学
リアルタイムPCR装置	QIAGEN Rotor GeneQplex,HRM,PC prioPLUS	1	3,936,870	3,936,870	2013/2/6	京都大学