**組織的な若手研究者海外派遣事業　出張報告書**

人間総合科学研究科 医学医療系 感染生物学

小松 哲郎

行先：Microbiologie Fondamental et Pathogénicité, University of Bordeaux SEGALEN

期間：平成24年5月8日〜平成25年1月23日

目的：アデノウイルスゲノムに対する細胞性抗ウイルス機構の研究

　組織的な若手研究者海外派遣事業において、フランスのUniversity of Bordeaux SEGALENの感染生物学研究ユニットMicrobiologie Fondamental et Pathogénicitéに所属するHarald Wodrich博士の研究室でアデノウイルスに関する研究を行った。

　細胞には内在性免疫（intrinsic immunity）と呼ばれる抗ウイルス機構が存在しており、近年の研究から核内構造の1つであるPMLボディが重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。PMLボディに局在することが知られているクロマチン制御因子であるDaxxは、そのクロマチンリモデリング活性によりDNAウイルスのゲノム上に抑制的なクロマチン構造を形成することで抗ウイルス作用に寄与していると考えられている。しかし、Daxxがどのように外来性の（ウイルスの）DNAを特異的に認識し、負に制御しているかは明らかとされていない。Wodrich博士らのグループはDNAウイルスの1つであるアデノウイルスに対してもDaxxが抑制的に機能することを明らかにしている。また、自分自身もアデノウイルスのクロマチン構造制御の研究を継続して行ってきたことから、Wodrich博士の研究室においてDaxxによる抗ウイルス作用の詳細な機構について解析を行うこととした。

　まず、感染細胞内においてDaxxがどのようにアデノウイルスを認識し得るかをリアルタイムで解析するため、蛍光標識ウイルスおよび蛍光タンパク質融合Daxxを用いたライブセルイメージング法の確立を試みた。タンパク質を蛍光色素で標識するキットを精製ウイルスに使用することで、ウイルス粒子を不活性化することなく蛍光色素で標識した。この標識ウイルスをGFPあるいはmRFPと融合させたDaxxを発現させたU2OS細胞に感染させspinning disk共焦点顕微鏡で観察することで、生きた細胞におけるウイルスおよびDaxxの挙動を確認することができた。この系をもとに、感染後の時間経過に伴うウイルスおよびDaxxの挙動の変化について解析を行う予定である。また、Daxxによる抗ウイルス作用をより定量的に解析するため、Daxxの発現をノックダウンした細胞を確立することとした。DaxxのmRNAをターゲットにしたshRNAを発現するレンチウイルスベクターを作成しH1299細胞に感染させることで、効率的にDaxxの発現が抑制されることが確認された。今後は、Daxxのノックダウンによるウイルスの遺伝子発現やクロマチン構造への影響をRT-qPCR法、ChIP法などによって解析していく予定である。

　University of Bordeaux SEGALENのイメージング解析に特化したプラットフォームであるBIC（Bordeaux Imaging Center、http://www.bic.u-bordeaux2.fr/index.php/）には上記のような生細胞を高解像度で解析することができるspinning disk共焦点顕微鏡など様々な高解像度顕微鏡が配備されており、世界でもトップレベルのイメージング解析が可能となっている。これらの機器は講習を受けることで使用することが可能であった。同様に、レンチウイルスベクターの作成を委託できるプラットフォームなどが多数あり、これらを活用することで効率的に研究を進めることができた。また、感染生物学研究ユニットであるMicrobiologie Fondamental et Pathogénicitéにはフランス以外の国からの研究者も多数所属しており、様々な交流の機会を得ることができた。よって、国際経験という点においても非常に有意義な滞在となった。