

病因病態医学講座/ゲノム科学・微生物学分野

1. 領域構成教職員・在職期間

教授	定 清直	平成18年10月～
准教授	千原 一泰	平成22年1月～(平成24年1月～現職)
講師(学内)	竹内 健司	平成 3年4月～(平成24年2月～現職)
特命助教	山内 翔太	平成25年12月～平成28年9月

2. 研究概要

研究概要

病原微生物感染に対する宿主因子についての研究

病原性を有する微生物は、細胞内の様々な宿主因子と相互作用することが知られている。当研究室では、細胞内チロシンキナーゼが真菌・結核菌やウイルス感染の宿主因子として作用することを明らかにしてきた。結核菌や結核菌の受容体であるC型レクチンを介するマスト細胞の自然免疫応答には、チロシンキナーゼSykが関与することを報告した。C型レクチンの機能は、樹状細胞やマクロファージで多数の報告があるが、マスト細胞での役割は初めてであり、Sykを介するTh2サイトカインの産生や脱顆粒反応への関与を明らかにした。またチロシンキナーゼAblのshRNAによるノックダウンやAbl特異的阻害薬イマチニブ(慢性骨髄性白血病の原因遺伝子Bcr-Ablの分子標的治療薬)により、HCVのウイルス粒子形成過程が阻害できることを報告した。チロシンキナーゼがHCVなどRNAウイルスの生活環に影響を与えるという報告例は、エボラウイルスのタンパク質VP40のチロシンリン酸化等、ごくわずかに留まっており、HCVについては初の報告である。さらにゲノム編集(CRISPR/Cas9システム)によりSTAT1⁻⁶とIRF9欠損細胞を作成し、STAT1がインターフェロン γ によるHCVの複製抑制に不可欠であることを解明した。このように当研究室では様々な病原体に対する新しい宿主因子やその関連分子の役割について研究を進めている。

1) 病原菌・宿主相互作用: 病原菌に対する免疫応答に関わる宿主因子の研究

非受容体型チロシンキナーゼSykは、B細胞やマスト細胞、マクロファージなどにおける免疫受容体シグナル伝達に必須の分子として知られている。我々は、Sykによりチロシンリン酸化を受けるアダプター蛋白質3BP2の機能に着目して研究を行っており、これまでに3BP2がB細胞やマスト細胞の活性化を担うことを明らかにしてきた。近年、別の研究グループにより3BP2がマクロファージの貪食に関わることが報告されたが、その調節メカニズムは不明である。そこで我々は貪食能を持つミエロイド系細胞株を用いて、3BP2による貪食の調節メカニズムについて研究を開始した。すでにCRISPR/Cas9システムを用いて3BP2、Fc ϵ RI γ 、Hck、AblおよびSykの遺伝子を欠損させた細胞株を樹立しており、これらの遺伝子欠損が貪食能とIgG受容体を介する遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか解析を進めている(論文投稿準備中)。

一方、前年度に引き続きマスト細胞株RBL-2H3細胞におけるMincleの機能解析を進めてきた。その結果、MincleがFc ϵ RI γ を介してSykを活性化し、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応を促進することを明らかにした。また、MincleがSykの活性化を介してPLC γ 2やERK、NFATの活性化を調節する事を明らかにした。さらに、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、Sykに依存して発現が誘導される遺伝子を同定した。その結果、マスト細胞においてMincleがIL-3、IL-4、IL-13、IL-31などのサイトカインを誘導することが明らかとなった。また、Mincleがマスト細胞の脱顆粒を誘導することが明らかとなり、遊離したヒスタミンがサイトカインと協調して炎症反応を調節する可能性を見出した(Scientific Reports誌に論文受理)。(第一研究室)

2) ウイルス・宿主相互作用: C型肝炎ウイルスの増殖に関わる宿主因子の研究

ウイルス性疾患の病態を理解するには起因ウイルスの増殖機構とこれに関わる宿主因子、感染免疫応答を明らかにする必要がある。

I型、III型インターフェロン(IFN)はウイルス感染に対する自然免疫応答において中心的な役割を担っている。肝細胞はどちらのIFNにも応答可能で、応答した肝細胞ではC型肝炎ウイルスの増殖が抑制される。これまでの知見によると、両IFNの細胞内シグナル伝達機構は同じであり、STAT1を含む蛋白質複合体が両IFN刺激の主要なシグナル伝達因子且つ転写活性化因子であると考えられている。このことを再検討する目的で、我々は、CRISPR/Cas9システムを利用してSTAT1遺伝子欠損肝細胞株を樹立し、両IFNのシグナル伝達の様子を観察した。その結果、肝細胞にはSTAT1に依存しないI型IFNのシグナル伝達機構があり、実際、この機構によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制が見られること、その一方で、III型IFNのシグナル伝達と抗ウイルス作用にはSTAT1が必須であることを明らかにした(Sci. Rep., 2016)。この違いは肝臓における抗ウイルス応答の中で両IFNが果たす役割の違いを反映しているのではないかと考えている。このような研究を通じ、ウイルス性疾患の病態解明や治療法開発に繋げていければと考えている。(第二研究室)

キーワード

生化学, ウイルス学, シグナル伝達, Syk, C型レクチン, C型肝炎ウイルス, 自然免疫, ゲノム編集

業績年の進捗状況

- RBL-2H3細胞を用いて、CRISPR/Cas9法によりSykおよびPLC γ 2の遺伝子破壊を行った。得られたKO細胞を使い、MincleがSykおよびPLC γ 2を介してERKのリン酸化を誘導すること、Sykに依存したNFATの転写活性化と核移行を誘導することを明らかにした(論文投稿中)。
- 貪食能をもつU937細胞において、CRISPR/Cas9法により3BP2KO細胞を作成し、3BP2がFc ϵ RI γ を介する貪食やケモカインの産生に関わることや、Sykによる3BP2のリン酸化がこれらの機能に重要であることを見出した(論文投稿準備中)。
- 肝細胞にはSTAT1に依存しないI型IFNのシグナル伝達機構があり、実際、この機構によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制が見られること、その一方で、III型IFNのシグナル伝達と抗ウイルス作用にはSTAT1が必須であることを明らかにした(Sci. Rep. 誌に論文発表)。
- 金沢医科大学の村松教授、旭川医科大学の谷口教授と共同で、神経系におけるアセチルコリンの薬理学的動態についての共同研究を行った(J. Neurochem. 誌に論文発表)。

特色等

マイクロアレイやリアルタイムPCRを使った遺伝子発現調節の解析、レポータープラスミドを使った転写調節の解析、ELISAによるサイトカイン産生の解析等により、細胞レベルで起こる様々な生命現象を数値化して研究を進めている。また、最近開発されたゲノム編集技術を使い、細胞株で標的遺伝子をノックアウトする実験系を構築した。作製したノックアウト細胞株を解析に加えることで、確度の高い結果が得られている。(第一研究室)

細胞遺伝学的研究では遺伝子欠損細胞株を用いることにより当該遺伝子の機能を明らかにする。従来、マウスでは遺伝子ノックアウト(KO)マウスに由来する細胞を用いて研究を行ってきたが、ヒトの場合、一般的に利用できる遺伝子KO技術のないことが研究の足枷となっていた。これに対し、近年、CRISPR/Cas9システムを利用した遺伝子KO技術が開発され、ヒト由来細胞株の遺伝子KOに用いられるようになってきた。本研究室では、この新しい技術を導入することによって、ヒト肝細胞株でしか増殖できないC型肝炎ウイルスの研究を進展させることができた。(第二研究室)

本学の理念との関係

我々の研究は第三期中期計画における「②-1 医学部・同附属病院では、地域の直面する少子高齢化や過疎化に対応するため、がん、発達障害や認知症、アレルギー・免疫疾患等の様々な疾患の克服を目指した先進的研究とともに、新たな医療技術の開発や地域医療の向上を目指した研究を推進し、学術誌への英語論文掲載数や研究成果の具体件数等を第2期中期目標期間よりも増加させる。特に、がん、脳、アレルギー・免疫の分野では、第2期中期目標期間より20%以上増加させる。」に該当する。当研究室の「病原微生物感染に対する宿主因子についての研究」は広義のアレルギー・免疫の分野に該当する。

3. 研究実績

区分	編数	
	2016年分	インパクトファクター(うち原著のみ)
和文原著論文	0	—
英文論文	ファーストオーサー	5.228 (5.228)
	コエディティングオーサー	5.228 (5.228)
	その他	3.842 (3.842)
	合計	9.07 (9.07)

- (A) 著書・論文等
- (1) 英文：著書等
- a. 著書
- b. 著書（分担執筆）
- c. 編集・編集・監修
- (2) 英文：論文等
- a. 原著論文（審査有）
- 1622001** S. Yamauchi, K. Takeuchi, K. Chihara, C. Honjoh, Y. Kato, H. Yoshiki, H. Hotta, K. Sada: STAT1 is essential for the inhibition of hepatitis C virus replication by interferon- λ but not by interferon- α ., Sci Rep, 6, 38336, 20161208, DOI: 10.1038/srep38336, #5. 228
- 1622002** I. Muramatsu, H. Yoshiki, J. Uwada, T. Masuoka, K. Sada, T. Taniguchi, M. Nishio: Pharmacological evidence of specific acetylcholine transport in rat cerebral cortex and other brain regions., J Neurochem, 139(4), 566-575, 201611, DOI: 10.1111/jnc.13843, #3. 842
- b. 原著論文（審査無）
- c. 原著論文（総説）
- d. その他研究等実績（報告書を含む）
- e. 国際会議論文
- (3) 和文：著書等
- a. 著書
- b. 著書（分担執筆）
- c. 編集・編集・監修
- (4) 和文：論文等
- a. 原著論文（審査有）
- b. 原著論文（審査無）
- c. 総説
- d. その他研究等実績（報告書を含む）
- e. 国際会議論文
- (B) 学会発表等
- (1) 国際学会
- a. 招待・特別講演等
- b. シンポジスト・パネリスト等
- c. 一般講演（口演）
- d. 一般講演（ポスター）
- e. 一般講演
- f. その他
- (2) 国内学会（全国レベル）
- a. 招待・特別講演等
- b. シンポジスト・パネリスト等
- 1622003** 定 清直, 内海 孝子, 堀田 博: インドネシアにおける医学生教育 福井大学での取り組みについて, 第90回日本感染症学会総会・学術講演会, 感染症と教育, 仙台市, 20160415, 感染症学雑誌, 90, 154, 20160320
- c. 一般講演（口演）
- d. 一般講演（ポスター）
- 1622004** 加藤 雄士, 千原 一泰, 本定 千知, 吉木 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 藤枝 重治, 定 清直: 貪食細胞によるアダプター蛋白質3BP2の機能解析, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜市, 20161130
- e. 一般講演
- f. その他
- (3) 国内学会（地方レベル）
- a. 招待・特別講演等
- b. シンポジスト・パネリスト等
- c. 一般講演（口演）
- 1622005** 加藤 雄士, 千原 一泰, 吉木 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 藤枝 重治, 定 清直: 貪食細胞におけるアダプター蛋白質3BP2の機能解析, 日本生化学会北陸支部第34回大会, 金沢, 20160528
- d. 一般講演（ポスター）
- e. 一般講演
- f. その他
- (4) その他の研究会・集会
- a. 招待・特別講演等
- b. シンポジスト・パネリスト等
- c. 一般講演（口演）
- d. 一般講演（ポスター）
- e. 一般講演
- f. その他
- 1622006** 定 清直, 竹内 健司, 山内 翔太, 千原 一泰: センダイウイルス変異核蛋白質を利用したウイルスゲノム複製機構の解析, 平成28年度北陸腸内細菌研究会, 金沢市, 20160709

業績一覧

(C) 特許等

区分	内容（発明の名称）	発明者又は考案者
----	-----------	----------

(D) その他業績

4. グラント取得

(A) 科研費・研究助成金等

区分	プロジェクト名	研究課題名	代表者名	分担者名	期間（年度）	金額（配分額）
大学連携リーグ連携研究推進事業	県内大学等連携研究推進事業	魚類の2次リンパ器官の形成機構の解明	定 清直	竹内 健司, 宮台 俊明, 小高 智之	2016	230000
区分	研究種目	課題名	代表者名	分担者名	期間（年度）	金額（配分額）
文部科学省科学研究費補助金	若手研究（B）	ウイルスタンパク質のチロシンリン酸化に着目したC型肝炎ウイルス増殖機構の解析	山内 翔太		2016	2080000
学内競争的資金	ライフセンター 学内共同研究等	CRISPR/Cas9 システムを用いた肝細胞インターフェロン応答の解析	竹内 健司		2016	500000

(B) 奨学寄附金

受入件数	1
受入金額	400000

5. その他の研究関連活動

(A) 学会開催等

区分	主催・共催の別	学会名	開催日	開催地
----	---------	-----	-----	-----

(B) 学会の実績

学会の名称	役職	氏名
日本生化学会	評議員	定 清直
日本感染症学会	評議員	定 清直
日本ウイルス学会	一般会員	定 清直
日本分子生物学会	一般会員	定 清直
米国免疫学会	一般会員	定 清直
日本細胞生物学会	一般会員	千原 一泰
日本分子生物学会	一般会員	千原 一泰
日本生化学会	一般会員	千原 一泰
日本分子生物学会	一般会員	竹内 健司
日本ウイルス学会	一般会員	竹内 健司