

2Cp12

招待講演

Overexpression of newcastle disease virus (NDV) V protein specifically enhances NDV production kinetics by disrupting cellular innate immune responses in chicken embryo fibroblastsJuno JANG¹, Sung-Hwan HONG¹, ○Ik-Hwan KIM¹
(¹Dept. Biotechnol., Korea Univ., Korea)

Newcastle disease virus (NDV) is not only one of the most economically important pathogen of poultry but also has a potential as anti-cancer virotherapy. The role of NDV V protein in virus production kinetics was investigated using DF-1 cell based production system. The presence of an anti-interferon alpha antibody resulted in enhanced NDV production kinetics in a dose-dependent manner in the early phase of NDV infection by blocking binding of NDV-induced interferon to its receptor. To examine whether overexpression of NDV V protein affects blocking host cellular interferon signaling efficiently, stable cell lines expressing either lentogenic or velogenic NDV V protein well known as an interferon antagonist were established. The overexpression of either lentogenic or velogenic V protein enhanced NDV production kinetics, but had no effect on Japanese encephalitis virus (JEV) production. The maximum titers of NDV produced in NDV V-expressing cell lines were 2-fold higher than that of control cells. NDV V protein functions as an interferon antagonist by inhibiting the NDV-induced increase in type-I interferons rather than by incorporating itself into virus particles as a structural protein or degrading Stat proteins. The interferon signals in NDV V-expressing cell lines were weakened by decreased activation or expression of the dsRNA-activated enzymes, PKR and OAS. These interferon antagonist activities enhance rapid virus replication and spread in the early phase of viral infection and will be useful in improving the production of viral vaccine strains.

Overexpression of newcastle disease virus (NDV) V protein specifically enhances NDV production kinetics by disrupting cellular innate immune responses in chicken embryo fibroblastsJuno JANG¹, Sung-Hwan HONG¹, ○Ik-Hwan KIM¹
(¹Dept. Biotechnol., Korea Univ., Korea)**Key words** newcastle disease virus (NDV), vaccine production, interferon (IFN)-antagonist, V protein

2Cp14

DNAのビーズディスプレイ法を用いたDNA-酵母転写因子相互作用検出システム○王 ハン輝, 児島 孝明, 中野 秀雄
(名大院・生命農・生命技術)

[背景・目的]

当研究室では、水／油相エマルジョン内でビーズ固定化プライマーを用いて行う一分子PCR (W/OエマルジョンPCR) により、DNAライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術を開発した。本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の転写因子であるGal4を取り上げ、スクリーニング系の確立と共に、Gal4が認識するDNA配列の網羅的な解析を目的としている。Gal4は、Gal1、Gal2、Gal7、Gal10などガラクトース代謝関連遺伝子の発現を制御する。

[方法・結果]

まず、Gal4結合DNAスクリーニング系の確立のため、Gal4の結合能を有するポジティブDNA及び結合能を有さないネガティブDNAを用いて1:100モデルDNAライブラリーを作製した。このライブラリーを鋳型としたエマルジョンPCRにより、ライブラリー一分子由来のDNAをマイクロビーズ上に増幅、固定化した。得られたビーズライブラリーに対し、無細胞タンパク質合成により作製したHis タグー Gal4 タンパク質及び蛍光標識した抗 His タグ抗体を加えた。この時、転写因子の認識するDNAが固定化されたビーズ上では、ビーズ-DNA-蛍光標識抗体の複合体が形成され、これらの蛍光を有する複合体はFluorescent cell-activated cell sorter (FACS) を用いて迅速に選択される。得られたDNAを解析した結果、Gal4結合DNAの優先的濃縮が確認された。

Detection of DNA-protein interactions using a bead display system of DNA○Panhui Wang, Takaaki Kojima, Hideo Nakano
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)**Key words** Emulsion PCR, Flow cytometry, Gal4, *Saccharomyces cerevisiae*

2Cp15

ダンベル型ナノサークルRNAによるRNA干渉法○阿部 洋¹, 阿部 奈保子¹, 鳥田 美和子^{1,2}, 常田 聡²,
伊藤 嘉浩¹
(¹理研・基幹研, ²早稲田・先進理工・生命)

RNA干渉は、配列特異的な遺伝子発現抑制効果から、理想的な医薬品開発技術として期待され、日米欧で開発競争が展開されている。現在、開発・利用されているRNA干渉技術は、ウイルスやプラスミド由来のベクターと、化学合成した二本鎖RNAを用いる方法に大別される。前者のベクターは、主に基礎生物学実験に用いられているが、医薬品として応用する場合は、その安全性に問題がある。そのため、医薬品開発には、後者の化学合成した二本鎖RNAが用いられている。通常、医薬品は生体内に投与されると血液中を移動し、患部の細胞に到達する。しかしながら、天然RNA分子を用いた場合、その生体内安定性が著しく低いために、患部の細胞に到達するまでにRNAが分解されてしまい、RNA干渉効果が持続しないことが大きな問題となる。そこで、これまで安定性を高めるための方法として、非天然型RNAが開発されてきた。例えば、2'-フルオロRNA、や2'-O-メチルRNAなどがあげられる。しかし、安定性が高まる反面、RNA干渉効果が低下することが問題となる。さらに、非天然核酸が生体に与える毒性も未知であり、その医薬品としての応用には困難が予想される。そこで、我々はRNAを安定化するため、新規ダンベル型ナノサークルRNAを考案した。末端のないダンベル型RNAは、生体内で主要な分解酵素エキソヌクレアーゼの基質にならないため、高い安定性を持つ。一方、細胞内導入されると酵素ダイサーにより切断を受け二本鎖RNAを生じ、RNA干渉を引き起こすことが明らかとなった。

Dumbbell-shaped nanocircular RNA for RNA interference○Hiroshi Abe¹, Naoko Abe¹, Miwako Uda^{1,2}, Satoshi Tsuneda²,
Yoshihiro Ito¹
(¹RIKEN Advanced Science Institute, ²Dept. Life Sci. Med. Bio-Sci, Waseda Univ.)**Key words** RNA interference, nanocircle, nanobio