

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

鈴木 康夫

(静岡県立大学薬学部 教授)

「ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用」

1. 研究実施の概要

本研究は、糖鎖生物学、糖鎖遺伝子、ウイルス学、糖鎖の有機化学合成、糖鎖の構造解析などの専門家が一丸となって、「創薬を指向する糖鎖ウイルス学」分野を創生する目的で、「ウイルス感染」、「糖鎖機能」、「創薬」をキーワードとして発足した。現在もこれに変わりはない。本研究では、変異しやすく地球規模の感染者を出しているウイルス（インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス＝HIV）、熱帯熱性ウイルス（デングウイルス）、幼児・高齢者に感受性の高いウイルス（パラインフルエンザウイルス）を取り上げている。平成16年度では、これまでの研究を継続発展させ、感染の場（宿主細胞への受容・侵入、宿主細胞からの出芽、宿主間伝播、病原性発現など）における糖鎖の新しい役割を解明し、数種の新しいウイルス感染阻止分子を開発した。すなわち、1) 1918年スペイン風邪インフルエンザウイルスの再生とその受容体認識特異性の解明 (*Nature*, 431, 703-707, 2004)、2) インフルエンザウイルスの糖鎖を介する宿主間伝播、抗原性変異、病原性発現、世界流行発生機構の解明、3) インフルエンザウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬、4) パラインフルエンザウイルスの「糖鎖ウイルス学」と創薬、5) デングウイルス感染における糖鎖の役割の解明と創薬、6) CD57/HNK-1糖鎖の構造と機能、ウイルス感染における役割、7) 独自に開発した多次元HPLCマップのデータベース (*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 52, 284-288, 2004) を利用したインフルエンザウイルスおよび宿主細胞糖鎖の迅速解析、8) ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製 (*J. Polymer Sci., Part A.* 42, 4598-4606 (2004); *Lett. Org. Chem.*, 2, 136-138 (2005); *Carbohydr. Res.*, 339, 1597-1602 (2004))、9) 糖鎖機能によるHIV感染の制御、10) 糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御、などを軸とした研究を展開してきた。今後さらに、本研究を発展させ、創薬への実現をはかる。

代表者・鈴木康夫は、日本薬学会第124年会シンポジウム（大阪）を企画、実行；Interlec 21(Shonan Village, Kanagawa) の国際組織委員、5th Japan-China International Congress of Virology (Osaka) の日本側実行委員；Sialobiology 2004 (St. Andrews, Scotland) の国際組織委員；First China-Japan Bilateral Symposium on Avian Influenza (Beijing, China) の日本側実行委員等を務めた。さらに、本研究に関連

して、平成16年度日本薬学会賞 「ウイルス感染における糖鎖薬学的研究」 日本薬学会（2004年3月28日）； 平成16年度中日文化賞 「インフルエンザウイルスの研究と創薬への応用」 中日新聞社（2004年5月28日）を受賞した。

2. 研究実施内容

研究目的、方法：「糖鎖機能」、「ウイルス感染」、「創薬」を融合した21世紀における新科学領域を開拓・確立する。そのために、ウイルスの宿主間伝播、抗原変異、病原性発現、流行、進化と糖鎖、ウイルスの宿主細胞受容体への吸着・侵入、増殖、細胞内交通、ウイルス構成分子のパッケージング、出芽など、感染過程における糖鎖、感染宿主細胞の応答と糖鎖、様々な角度から研究を進めた。ウイルス学、糖鎖生物学の手法に加えて、新たなリバーシジェネティクス手法による人工変異ウイルス粒子の創製、新規糖鎖プローブの創製、新しい糖鎖分子認識解析法の開発、糖鎖合成遺伝子群解析などを駆使した。

結論：1) 1918年スペイン風邪インフルエンザウイルスの再生とその受容体認識特異性の解明 (*Nature*, 431, 703-707, 2004)：1918年スペイン風邪により死亡したヒト肺から得られた高病原性インフルエンザウイルス遺伝子から、リバーシジェネティクス技術により、活性ウイルス粒子の再生に成功した（カナダP4施設使用）。さらに、トリを起源とするスペイン風邪ウイルスがヒト-ヒト間で伝播出来るシアロ糖鎖受容体認識特異性（Neu5Ac2-6Galを認識）に変異していたことを初めて解明した。本知見は今後の抗インフルエンザ薬開発にとって極めて重要である。

2) インフルエンザウイルスの糖鎖を介する宿主間伝播、抗原性変異、病原性発現、世界流行発生機構の解明：2-1) 中国のウズラから分離された新型インフルエンザウイルス（H9N2、ヒトにも感染）の受容体認識特異性が、トリウイルスの特異性と異なりヒトウイルスと同じ特異性を持つことを見出し、受容体認識特異性を規定するヘマグルチニン分子内アミノ酸の同定に成功した。この知見は、現在アジアで流行している高病原性トリインフルエンザウイルス（H5N1）のヒトへの伝播機構を解明する上で重要な手がかりを与えるものである。2-2) ヒトB型インフルエンザウイルスは、発育鶏卵培養により、HA1の197位のアミノ酸の変異に伴い糖鎖が消失し、抗原性を変化させることを発見 (*J. Med. Virol.* 74, 336-343, 2004)。2-3) 1968年に出現したホンコンかぜ（H3N2型）ウイルスのNA遺伝子は、1971年以降のヒトH3N2型インフルエンザウイルスへ受け継がれていないことを発見 (*FEBS LETT.* 557, 228-232, 2004)。2-4) 遺伝子操作系によりNAスパイクがもつシアリダーゼ活性のlow-pH安定性のみを変異させた人工ウイルスの性状解析から、NAスパイクはウイルス侵入初期過程で機能しており、シアリダーゼ活性のlow-pH安定性は、ウイルスの増殖性を著しく増大させることを見出した（論文投稿中）。3) インフルエンザウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬：3-1) 発育鶏卵しょう尿膜から3種類の受容体結合性糖脂質（①、トリインフルエンザに対する主要レセプター分子；②、トリ・ヒトインフルエンザウイルスに対する共通レセプター分子；③、ヒトインフルエンザウイルスに対する主要レセプター分子）を単離、①の糖鎖構造を解明した。この分子を含む脂質二重膜を

再構成した生体膜環境を再現、トリ、ヒトインフルエンザウイルスとの結合親和性をリアルタイムで測定する方法論を確立。これにより、①のトリインフルエンザウイルスに対する親和性が既報のどの糖鎖分子よりもはるかに高いことを発見。本システムは、ヒトへ直接感染したトリインフルエンザウイルスのヒトからヒトへの感染を予測する測定キット開発への応用が期待される。3-2) インフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入過程にp38MAPKカスケードが関与すること、3-3) DNAマイクロアレー法による解析から、糖鎖合成遺伝子群 (ST6 GalNAcII、B4GalT7)、および誘導遺伝子群 (Syndecan-4) がインフルエンザウイルス感染特異的に誘導されること、ST6GalNAc II mRNAの転写が感染依存的に増加することを確認した。同時に、インフルエンザウイルスの感染を阻害する14員環マクロライド抗生物質 (クラリスロマイシン) および化学合成糖鎖「硫酸化グルコサミン (*Bioorg. & Medicinal Chem.*, 12, 1367-1375, 2004) (特許出願済み)、シアロ糖鎖担持 dendrimer」他の分子を見出した。4) パラインフルエンザウイルスの「糖鎖ウイルス学」と創薬: ウイルスシアリダーゼ阻害活性を指標に新規合成法を開発 (*Carbohydr. Res.* 339, 1367-1372, 2004)、13種類のシアル酸誘導体の有効性を評価した結果、これまでより強力な3誘導体を発見。また、最近報告されたHN糖蛋白質のX線結晶解析データとこれらシアル酸誘導体の結合親和性とシアリダーゼ阻害活性を比較した結果、本法が新阻害剤創製に極めて有効であることを見出した (特許出願済み)。5) デングウイルス感染における糖鎖の役割の解明と創薬: 5-1) ウイルス感受性の細胞 (ヒト赤芽球細胞、カ由来腸管細胞) からデングウイルス結合性糖鎖分子の単離・同定 (スフィンゴ糖脂質、パラグロボシドと同定) に成功。昆虫細胞のスフィンゴ糖脂質は未報告の新規構造を有していた (特許出願申請済み)。さらに、デングウイルススパイク糖タンパク質組換え体の発現、大量調製を行い、組換え体タンパク質の大量調製系を確立した。5-2) パラグロボシドのオリゴ糖クラスターを発現する dendrimer を開発、その特定の型に感染阻害作用を見出した (埼玉大学工学部・照沼大陽教授との共同研究、特許出願済み)。本ウイルスに感受性の実験動物は無い。マウスに感染可能な日本脳炎ウイルスの遺伝子に本ウイルス遺伝子を挿入したキメラウイルスはマウスに感染可能となった。これにより、本ウイルス感染阻害剤の動物個体レベル評価試験が可能になった。6) CD57/HNK-1糖鎖の構造と機能、ウイルス感染における役割: CD57/HNK-1糖鎖の非硫酸化体が近位尿細管内腔側に発現していること、その主要なキャリアタンパク質はメプリンとCD13であることを発見、さらに、CD57/HNK-1糖鎖合成に関与するグルクロン酸転移酵素遺伝子 (*Glycobiology* 15(2): 203-210, 2005) 欠損マウスの作製を行った。7) 独自に開発した多次元HPLCマップのデータベース (*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 52, 284-288, 2004) を利用したインフルエンザウイルスおよび宿主細胞糖鎖の迅速解析: 発育鶏卵由来およびMDCK細胞由来のインフルエンザウイルスA/Memphis/1/71 (H3N2) のスパイクタンパク質の糖鎖分析を行った結果、ウイルスの糖鎖構造は宿主に依存すること、ウイルススパイク糖鎖構造の違いが宿主へのレセプター結合親和性の差に寄与している可能性を見いだした。8) ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製 (*J. Polymer Sci., Part A.* 42,

4598-4606 (2004); *Lett. Org. Chem.*, 2, 136-138 (2005); *Carbohydr. Res.*, 339, 1597-1602 (2004)) : 6 硫酸化N-アセチルガラクトサミン誘導体とそのクラスターモデルを作成した結果、これまでのN-アセチルグルコサミン誘導体に比べて約100倍高い抗インフルエンザ効果を見出した。さらに、6位にグアニジル基を導入したグルコース誘導体を設計してウイルスと細胞を用いた生物評価を行った。その結果、強いインフルエンザウイルスの感染阻害活性が、アルギニンを導入した糖誘導体に確認された。これらは、既存の抗インフルエンザ薬とは異なった新規構造を持ち、持つ新規医薬品や生物機能材料として有望である。今後、実用化試験を進める。9) 糖鎖機能によるHIV感染の制御 : 9-1) HIV (後天性ヒト免疫不全ウイルス-1) およびHTLV-I (成人T細胞白血病ウイルス-I) に対して感受性を規定する細胞側因子は、ウイルス感染を制御する上で極めて重要な意味を持つ。そこで、この因子の同定を行った結果、プロテオグリカンのコアタンパク質syndecan 1とsyndecan 2が検出された。現在この遺伝子のHIV-1およびHTLV-I感染における意義の解析を行っている。多くの遺伝子産物のなかから特別なクローンを選びだす、我々の系は、技術的には確かなものであると判定できるので、HIV-1に抵抗性と感受性の細胞を用い、同様な実験を行う予定である。さらに、C型肝炎ウイルスの糖鎖受容体検索のためのpseudovirusの作成に成功した (*Microbes Infect.* 7, 29-40 (2005))。9-2) 外膜タンパクに多数存在する糖鎖の一部を欠失したエイズウイルスは弱毒化し、生ワクチンとして機能することを発見。糖鎖欠失エイズウイルスの弱毒化のメカニズムを解析し、有効で安全なワクチン開発の基盤を構築するため、サルエイズ発症モデルを用いて糖鎖欠失ウイルスの性状ならびに宿主応答の解析を行っている (*J. Exp. Med.*, 199, 1709-1718, 2004 ; *Vaccines*, 22, 3510-3521 (2004))。平成16年度では、サルエイズ発症モデルを用い、Env表面タンパク (SU) に付加している22個のN-結合型糖鎖のうち5個を欠損した変異株 ($\Delta 5G$) の弱毒化機構、糖鎖欠失による免疫原性向上の有無、 $\Delta 5G$ のウイルス学的性状の解析を行った。その結果、Envコンポーネントワクチンにおいては野生株の糖鎖の存在が必要であること、 $\Delta 5G$ ウイルスは、マクロファージ指向性、CD4非依存性を示すこと、この性状の変化は $\Delta 5G$ の5つの糖鎖欠失のうち、V1/V2領域の糖鎖欠失が最も重要であることなどが明らかとなった。以上から、糖鎖欠失 $\Delta 5G$ は、親株とは異なる組織または細胞に感染する可能性が示唆され、このことが宿主における感染防御免疫誘導や維持へのダメージを低減し、 $\Delta 5G$ 感染制御を導いていると考えられた。この結果に基づき、 $\Delta 5G$ のサルにおける初期感染細胞の同定、感染組織における宿主応答の解析を現在行っている。10) 糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御 : 昨年につき、デングウイルス感染動物モデルの開発を行った。その結果、昨年度のデングウイルス4型感染可能マウスの成功につき、2, 3型についてもデングウイルスのPrM-Eタンパク質遺伝子を日本脳炎ウイルス遺伝子の骨組みに挿入したキメラウイルス作成に成功した (*Microbiol. Immunol.*, 49, 285-294 (2005))。これらの人工デングウイルスはマウス脳内へ接種した場合、マウスは脳炎を発症し、死亡した (*J. General Virol.*, 85, 2503-2513 (2004))。末梢からの感染ではいずれのキメラウイルスも野生型のデングウイルスと同じく発症、死亡ともに認めな

った。しかしキメラウイルスを2次感染させた場合、ヒトの2次感染と同じく高いレベルの特異的抗体産生を認めた。上記から、我々が開発したキメラウイルスは、今まで不可能であったデングウイルス阻害剤の動物レベルでの評価系開発を可能とするもので、実用化を進める。

以上、本研究は、ウイルス感染における糖鎖の役割を先駆的に解明しつつあり、創薬へと繋げ得る有効な糖鎖化合物の創生、実験基盤の構築も達成しつつある。このような研究は、ウイルス感染症の克服、ウイルス学、糖鎖生物学、薬学などの融合した21世紀の新しいサイエンスの開拓に資するものと確信しつつ、研究を進めている。

3. 研究実施体制

(1) 鈴木・ウイルス感染グライコミクスグループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 康夫（静岡県立大学・薬学部・薬学科、教授）
- ② 研究項目：ウイルス感染における機能グライコミクスの推進

(2) 岡・糖鎖関連遺伝子改変グループ

- ① 研究分担グループ長：岡 昌吾（京都大学・大学院・薬学研究科、助教授）
- ② 研究項目：CD57/HNK-1糖鎖関連遺伝子改変によるウイルス感染防御機構の解析とウイルス感染における糖鎖遺伝子群の解析

(3) 加藤・構造解析グループ

- ① 研究分担グループ長：加藤 晃一（名古屋市立大学・院・薬学研究科、教授）
- ② 研究項目：糖鎖とウイルスタンパク質の三次元構造、両者の相互作用様式の解析、およびウイルス、宿主が発現している糖鎖構造の迅速決定

(4) 小林・ナノ糖鎖クラスターグループ

- ① 研究分担グループ長：小林 一清（名古屋大学・院・工学研究科、教授）
- ② 研究項目：ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製

(5) 星野/森・HIV感染における糖鎖機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長：星野 洪郎（群馬大学・医学部、教授）
森 一泰（国立感染症研・エイズ研究センター）
- ② 研究項目：糖鎖機能解析によるHIV感染の制御

(6) 森田・糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御

- ① 研究分担グループ長：森田 公一（長崎大学・熱帯医学研究所・病原体解析部門・分子構造解析分野、教授）
- ② 研究項目：糖鎖機能解析によるデングウイルス感染の制御

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Darwin Kobasa, Ayato Takada, Kyoko Shinya, Peter Halfman, Masato Hatta, Steven Theriault, Hiroshi Suzuki, Hidekazu Nishimura, Keiko Mitamura, Norio Sugaya, Taichi Usui, Takeomi Murata, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Heinz Feldman, Yoshihiro Kawaoka: Enhanced pathogenicity of influenza A viruses possessing the haemagglutinin of the 1918 pandemic.
Nature, 431, 703-707 (2004)
- Kazuya I.P.J. Hidari, Eisaku Tsujii, Jun Hiroi, Eriko Mano, Akihiko Miyatake, Daisei Miyamoto, Takashi Suzuki and Yasuo Suzuki: *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Effects of Disodium Cromoglycate on Influenza Virus Infection.
Biological Pharmaceutical Bulletin 27(6) 825-830 (2004)
- Mitoma, J., Furuya, S., Shimizu, M., Shinoda, Y., Yoshida, K., Azuma, N., Tanaka, H., Suzuki, Y., Hirabayashi, Y.: Mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene: genomic organization, chromosomal localization, and promoter analysis.
Gene, 334, 15-22 (2004)
- Shimizu, M., Furuya, S., Shinoda, Y., Mitoma, J., Okamura, T., Miyoshi, I., Kasai, N., Hirabayashi, Y., Suzuki, Y.: Functional analysis of mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase (*phgdh*) gene promoter in developing brain
J. Neuroscience Res., 78, 632-657 (2004)
- Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Takehiko Saito, Chao-Tan Guo, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki: Evolutional analysis of influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity.
FEBS LETT. 557, 228-232 (2004)
- Keiji Sasaki, Yoshihiro Nishida, Mikie Kambara, Hirotaka Uzawa, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kazukiyo Kobayashi: Design of *N*-acetyl-6-sulfo-D-glucosaminide-based inhibitors of influenza virus sialidase.
Bioorg. & Medicinal Chem., 12, 1367-1375 (2004)
- Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Takashi Suzuki, Reiko Ito, Toshinori Saito, Hiroyuki Saito, Shinichi Takao, Keiji Sahara, Takato Odagiri, Takeomi Murata, Taichi Usui, Yasuo Suzuki, Masato Tashiro : Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation.
J. Med. Virol. 74, 336-343, (2004)
- Kiyoshi Ikeda, Satoru Kitani, Kazuki Sato, Takashi Suzuki, Chika Hosokawa,

Yasuo Suzuki, Kiyoshi Tanaka, and Masayuki Sato: 2 β ,3 β -Difluorosialic acid derivatives structurally modified at the C-4 position: synthesis and biological evaluation as inhibitors of human parainfluenza virus type 1.

Carbohydr. Res. 339, 1367-1372, (2004)

- Daisuke Ogawa, Kenichi Shikata, Koichi Honke, Shinichi Sato, Mitsuhiro Matsuda, Ryo Nagase, Atsuhito Tone, Shinichi Okada, Hitomi Usui, Jun Wada, Masayuki Miyasaka, Hiroto Kawashima, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Naoyuki Taniguchi, Yukie Hirahara, Keiko Tadano-Aritomi, Ineo Ishizuka, Thomas F. Tedder, Hirofumi Makino: Cerebroside sulfotransferase deficiency ameliorates L-selectin-dependent monocyte infiltration in the kidney after ureteral obstruction.

J. Biol. Chem. 279(3), 2085-2090, (2004)

- S. Kakuda, Y. Sato, Y. Tonoyama, S. Oka, and T. Kawasaki: Different acceptor specificities of two glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate.

Glycobiology 15(2): 203-210 (2005)

- Hirokazu Yagi, Noriko Takahashi, Yoshiki Yamaguchi, and Koichi Kato: Temperature-dependent isologous Fab-Fab interaction that mediates cryocrystallization of a monoclonal immunoglobulin G.

Molecular Immunology, 41, 1211-1215 (2004)

- Koichi Kato, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, Mamiko Nishimura, Shin-ichi Iwamoto, Sadanori Sekiya, and Koichi Tanaka: Discrimination of isomeric fragment ions observed in tandem mass spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labeling.

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 52, 284-288 (2004)

- K. Sasaki, Y. Nishida, M. Kanbara, H. Uzawa, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki and K. Kobayashi: Design of *N*-Acetyl-6-sulfo-beta-D-glucosaminide-based Inhibitors of Influenza Virus Sialidase.

Bioorg. Med. Chem., 12, 1367-1375 (2004)

- Y. Nishida, A. Mizuno, H. Kato, A. Yashiro, T. Ohtake, K. Kobayashi: Stereo- and Biochemical profiles of the 5-6 and 6-6-Junction Isomers of α -D-mannopyranosyl [60]Fullerenes.

Chem. Biodiv. 1, 1452-1464 (2004)

- H. Uzawa, Y. Nishida, K. Sasaki, T. nagatsuka, H. Hiramatsu, K. Kobayashi: Sulfatase-catalyzed assembly of regioselectively *O*-sulfated *p*-nitrophenyl α -D-gluco- and α -D-mannopyranosides.

Carbohydr. Res., 339, 1597-1602 (2004)

- Y. Miura, N. Wada, Y. Nishida, H. Mori, K. Kobayashi: Chemoenzymatic Synthesis of Glycoconjugate Polymers Starting from Non-reducing Disaccharides. *J. Polymer Sci., Part A.* 42, 4598-4606 (2004).
- M. Suzuki, Y. Ohguro, Y. Nishida, M. Miyamoto, K. Kobayashi: Design of Photo-reactive Fluorescent Glycosyl Donor for Fabrication of Carbohydrate-based Functional Materials. *Lett. Org. Chem.*, 2, 136-138 (2005)
- K. Tamura, A. Oue, A. Tanaka, N. Shimizu, H. Takagi, N. Kato, A. Morikawa, and H. Hoshino: Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.* 7, 29-40 (2005)
- A. Shimizu, N. Shimizu, A. Tanaka, A. Jinno-Oue, BB. Roy, M. Shinagawa, O. Ishikawa, and H. Hoshino : Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. *J. Gen. Virol.*, 85, 2397-2406 (2004)
- F. Villinger, R. Miller, K. Mori, AE. Mayne, P. Bostik, JB. Sundstrom, C. Sugimoto, AA. Ansari: IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccines*, 22, 3510-3521 (2004)
- T. Matano, M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C. Sugimoto, K. Mori/ A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y: Cytotoxic T Lymphocyte based Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication in a Preclinical AIDS Vaccine Trial. *J Exp Med.*, 199, 1709-1718, 2004.
- WH. Lun, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, K. Mori, T. Sata, Y. Nagai, T. Matano: Loss of virus-specific CD4+ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. *J. gen. Virol.*, 85, 1955-1963 (2004)
- AA. Ansari, AE. Mayne, N. Onlamoon, K. Pattanapanyasat, K. Mori, F. Villinger: Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. *Immunol Res*, 29, 1-18 (2004)
- T. Takasaka, JJ. Miranda, C. Sugimoto, R. Paraguison, HY. Zheng, T. Kitamura Y. Yogo: Genotypes of JC virus in Southeast Asia and the western Pacific:

implications for human migrations from Asia to the Pacific.

ANTHROPOLOGICAL SCIENCE, 112, 53-59 (2004)

- HY. Zheng, P. Zhao, H. Suganami, Y. Ohasi, H. Ikegaya, JC. Kim, C. Sugimoto, T. Takasaka, T. Kitamura, Y. Yogo. Regional distribution of two related Northeast Asian genotypes of JC virus, CY-a and -b: implications for the dispersal of Northeast Asians.

Microbes Infect. 6, 596-603 (2004)

- Y. Yogo, C. Sugimoto, HY. Zheng, H. Ikegaya, T. Takasaka, C. Kitamura: JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations.

Rev Med Virol. 14:179-91 (2004)

- Edward Gitau Matumbi Mathenge, Maria del Carmen Parquet, Yasutomo Funakoshi, Seiji Houhara, Pooi Fong Wong, Akitoyo Ichinose, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita. Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice.

Journal of General Virology, 85, 2503-2513 (2004)

- Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells.

Microbiol. Immunol., 49, 285-294 (2005)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：国内特許 5 件（CREST研究期間累積件数：14件）