

# 新規機能 RNA 分子の検索とその応用に関する検討

平成14年度～平成16年度私立大学学術研究高度化推進事業  
(ハイテク・リサーチ・センター) 研究成果報告書

平成17年5月

学校法人 千葉工業大学

大学名 千葉工業大学

研究組織名 ハイテク・リサーチ・センター

研究代表者 河合 剛 太

(千葉工業大学大学院 工学研究科

生命環境科学専攻)

## はじめに

本研究プロジェクトは、生命現象の様々な局面における RNA の重要性に着目し、新たな機能 RNA を発見し、その構造と機能を解析することをその手法の開発と共に試み、さらに応用についても検討することをめざして立案された。本プロジェクト発足後の RNA 研究の進展の速さは、その予想をはるかに上回っており、RNA が遺伝情報制御の重要な要素となっていることはいまや疑う余地がない事実として認知されるに至っている。特に、全ゲノム DNA 量に対する non-coding DNA 量の割合と生物の複雑さとの間に見られる見事な相関は、non-coding RNA の重要性を際立たせている。すなわち、ゲノム情報のネットワークにおいて、RNA が担当している部分はタンパク質の担当する部分に匹敵するほどに大きい可能性もあり、その解明はヒトゲノム機能全体の解明のためにも極めて重要となっている。

本プロジェクトでは、新規機能 RNA 研究の最前線で活躍する多くの若い研究者と連携しながら、千葉工業大学ハイテク・リサーチ・センターにおいて研究を推進した。特に、プロジェクトにおいて導入した PC クラスタを活用し、RNA の二次構造あるいは立体構造の解析に関する新しい手法の開発において多くの成果をあげた。また、その応用への検討については、機能性 RNA の遺伝子治療への応用というかたちで成果をあげることができた。

本報告書において詳細に記載されているように、研究プロジェクトとして多くの成果をあげているが、それに劣らず重要なことは、本プロジェクトの期間を通して、国内の多くの RNA 研究者およびこの分野の研究を支援する企業との緊密な情報交換を積極的に行ってきたことである。新規機能 RNA 研究におけるこのような体制づくりが、今後の研究分野の発展に大きく寄与することができれば、まさに望外の喜びである。

平成 17 年 5 月

河合 剛太

## 1. 研究組織および設備

### <研究プロジェクトのメンバー>

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
河合剛太	工学部・教授	ゲノム情報からの新規 RNA 分子の発見と立体構造解析・研究総括	ゲノム情報に基づく新規 RNA 分子の検索および立体構造解析
高久 洋	工学部・教授	新規 RNA 分子の遺伝子医薬品への応用	単離された RNA 分子の配列解析, およびその応用可能性の検討
滝口泰之	工学部・助教授	細菌からの新規 RNA の検索	細菌からの新規 RNA 分子あるいは RNA 機能の検索
黒崎直子	工学部・講師	新規 RNA 分子のクローニングおよび機能解析	新規 RNA 分子の遺伝子クローニングあるいは遺伝子解析等

### <博士研究員および専門研究員>

黄 元姣 専門研究員 平成 14 年 6 月 1 日～平成 16 年 3 月 31 日  
高須昭嗣 博士研究員 平成 14 年 7 月 1 日～平成 14 年 9 月 30 日  
村上美和 専門研究員 平成 14 年 10 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日  
羽生勇一郎 専門研究員 平成 15 年 4 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日

### <研究施設・設備等>

研究は、主として 8 号館ハイテク・リサーチ・センターにおいて推進された。設備としては、本プロジェクトにおいて導入した PC クラスタシステム, ジャーファーマンターに加えて, DNA シーケンサーや質量分析計, 600MHz NMR 分光計, CCD 型 X 線回折計などさまざまな機器を活用した。

## 2. 研究概要

### 研究プロジェクトの目的・意義および計画の概要

ゲノム情報からの RNA 遺伝子候補の検索および立体構造の視点からの機能解析を進めるとともに、それだけに頼らず、さまざまな細菌から未知の RNA 分子を検索することを含めて、新規 RNA 分子の検索を行い、その機能および構造を明らかにすることをめざした。このような研究によって、新しい機能や立体構造モチーフあるいは分子認識能をもつ RNA 分子を発見できれば、RNA 研究の新しい展開に寄与することができるばかりでなく、当該メンバーがこれまでに研究を進めてきた治療薬としての RNA 分子に関する研究への応用が期待できる。また、新しい RNA の立体構造モチーフの発見は、機能分子としての RNA のレパートリーを広げ、また、新規な分子認識能を獲得することができれば、RNA の新たな応用に発展する可能性が考えられる。

本研究プロジェクトにおいては、学内において「RNA」分子の将来性にいち早く着目し、これまでに RNA の構造生物学に関する研究あるいはアンチセンス核酸に関する研究を積極的に推進してきたメンバー（河合，高久，黒崎）を中心に、新しい機能をもつ細菌の検索を行ってきた滝口を加えて研究組織を構成した。したがって、本研究では、これまでの研究をさらに発展させること、あるいは著しい飛躍をめざした。

本研究プロジェクトによって千葉工業大学においてこれまでに展開されている RNA に関する研究をさらに加速することは、大学の活性化と 21 世紀への飛躍のために寄与するものと考えた。また、期待される成果は、薬学や機能性新素材としての応用を含め、新産業の創出の可能性を秘めている。

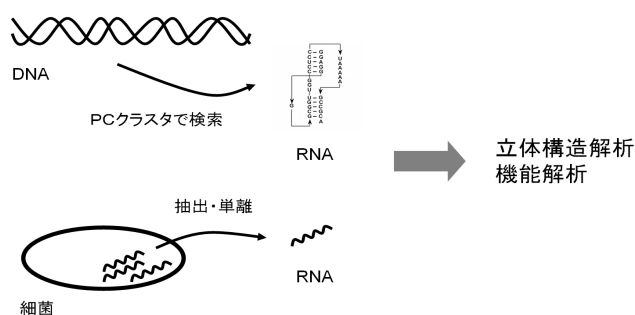


図 プロジェクトのイメージ

<キーワード>

non-coding RNA, ゲノム, 細菌, 二次構造予測, 立体構造解析, NMR, 遺伝子治療

<優れた成果があがった点>

近年, 高等動物のゲノムには極めて多くの RNA 遺伝子が存在していることが明らかになってきている. したがって, 十分に正確な二次構造予測システムが必要不可欠となっている. そこで, 高分子の折りたたみに関するエントロピーの効果을正しく評価する新しいシステムを開発した. これによって, これまでのシステムでは正しく予測できなかった既知の多くの RNA 分子について正確な予測が可能となった. 現在, このシステムについてはすでに Web での公開を行っており, 国内外の極めて多くの研究者の研究の遂行に寄与するものと確信している. また, このシステムによる二次構造予測によって, 190 残基からなる BS190 RNA の二次構造を予測し, それに基づいて部分構造変異体をデザインした. これによって, NMR 法による構造解析が可能な大きさのモデル RNA 分子を構築し, 実際に解析に用いている.

<問題点>

細菌からの新規 RNA 分子の発見については, 当初の計画に対して, 予定通り進んだとはいえない状況である. この理由の一つは, 抽出した RNA の特定方法の開発が遅れたことである. これについては, 現在, 弘前大学の牛田博士のグループと共同で, 二次元電気泳動法による RNA の分離と位置情報を保持した質量分析法を組み合わせたシステムの開発を進めている. この手法が可能になれば, 細胞内に微量に存在する新規機能 RNA の同定のハイスループット化が可能となると期待している.

#### <研究期間終了後の展望>

本プロジェクトにおいて、ゲノム情報からの新規機能 RNA の発見のためのツールおよびその構造と機能の解析手法について確立することができたと考えている。したがって、これらの設備・装置あるいは知識を活用して、さまざまなゲノム情報を対象に具体的な解析を推進していくことを計画している。また、上述のように細胞からの微量な新規機能 RNA の検出手法も開発中であり、この完成にも力を注ぐ予定である。

#### <研究成果の副次的効果>

ヒトゲノムの 98%が機能 RNA の遺伝子をコードしていることが明らかとなっており、本プロジェクトの期間において、分子生物学における RNA に対する考え方が大きく変わった。本プロジェクトは、このような重要な期間において、国内をリードする極めて重要な役割を果たした。本プロジェクトが中心となって「新しい RNA/RNP を見つける会」のミーティングを開催し、平成 15 年 12 月の日本分子生物学会大会において開催したシンポジウムでは満員の会場において熱気あふれる議論が展開された。今後、この研究グループから RNA に関する新しい分野が発信され、さらに実用化あるいは企業化される可能性も十分にあると考えている。

## 新規 RNA 分子発見のための RNA 二次構造予測システムの検討

河合剛太

近年、急激にデータ量が増加しているゲノム配列データベースを活用して、新しい RNA 遺伝子を発見するために、本年度はまず RNA 二次構造予測システムについて検討を行った。このようなシステムとしては、Zuker らによって開発された MFOLD システムが広く用いられている。一方、国立感染症研究所の Dawson 博士（現 千葉工大）らによって開発されつつあった新しいシステム vsfold は、二次構造形成におけるエントロピーの効果をより正確に評価して二次構造の予測を行っている。そこで、構造未知の枯草菌由来 RNA 分子 (BS190) について、それぞれのシステムで二次構造予測を行い比較検討したところ、大きく異なる結果が得られた (図)。この予測結果に基づいて、部分構造に対応する NMR 測定用試料をデザインし、実際に二次構造を解析することによって、どちらが水溶液中の二次構造をより正確に予測しているかについて検討したところ、vsfold によって予測された二次構造が正しいことが示唆された。一方、筑波大学の中村博士のグループによる生化学的実験によっても、vsfold が高精度で正しい二次構造を予測したことがわかった。cross-linking エントロピーの理論に基づく vsfold の二次構造予測は、tRNA のクローバーリーフ型二次構造を正確に予測し、またグループ I インترونについてもほぼ実験結果と同等な二次構造を予測することに成功しており、今回の結果と合わせて、非常に有効であることが示された。現在、vsfold は千葉工業大学ハイテク・リサーチ・センターにおいて Dawson 博士による開発が継続されており、最新バージョン (vsfold4) が web 上で利用可能となっている。

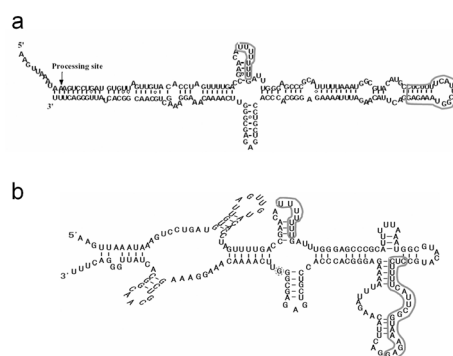


図 BS190 RNA の二次構造モデル  
a) MFOLD による予測, b) vsfold による予測. 枠内は mRNA と相補的な配列

(<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/vsfold4/>)

vsfold による二次構造予測は極めて正確で有効であるが、解析可能な鎖長の制限などから、ゲノムレベルでの解析には向いていない。実際、ひとつの生物のゲノム情報は膨大であり、その配列全体について二次構造予測を行うことは、困難である。そこで、二次構造予測をする部位を絞り込むためのプログラムの作成を試みた。この方法としてタンパク質翻訳領域 (ORF) を除くことが考えられるが、しかし、mRNA の高次構造形成がその翻訳の制御に関係していることもあるため、すべてを排除することはできない。そこで、GC 含量の変動や相補的配列の存在量など、計算が容易なパラメータを利用することを検討し、実際に visual basic でのプログラムを作成して、SARS 原因ウイルスゲノム RNA の解析に応用したところ、安定な二次構造を形成する新しい部位を見いだした。今後は、このような膨大な情報からの絞り込みと、絞り込んだ配列の二次構造予測を組み合わせることによって、新規機能 RNA を見いだすシステムの開発を進めていく予定である。



## 細菌からの新規 RNA の検索と同定手法の開発

河合剛太

滝口泰之

ゲノム解析と相補するものとして、細胞から実際に RNA 分子を抽出し、解析することも本研究の重要な課題である。そこでまず、抽出した RNA 分子を微量で迅速に同定する手法の開発をめざし、電気泳動による分離と MALDI-TOF-MS 法による分子量測定を組み合わせた手法の開発を試みている。

MS 法によるタンパク質あるいはペプチドの同定手法は、peptide-MS-fingerprint (PME) 法として確立されている。基本的な PME 法においては、二次元電気泳動で分離したスポットを抽出し、プロテアーゼ分解して MS 分析を行うことによって、いくつかの断片の末端アミノ酸配列を決定し、データベース検索を行うことによってそのタンパク質あるいはペプチドを同定する。この手法を RNA に応用し、RNA-MS-fingerprint (RME) 法を開発することを試みている。このために、弘前大学の牛田博士のグループと共同で二次元電気泳動法による RNA 試料の分離および微量 RNA の RNase による in gel 消化についての検討を行っている。また、MALDI-TOF-MS による RNA の配列分析についての検討も行っているが、これと並行して、RNase による消化物に含まれる RNA 断片の鎖長を MALDI-TOF-MS によって分析し、得られた鎖長存在比（パターン）とゲノム配列から予測されるパターンを比較することによって、候補遺伝子を検索するプログラムの開発も試みている。

一方、身近に存在しているが、免疫力の低下しているような場合には日和見感染を引き起こす緑膿菌を取り上げ、それに含まれる RNA 分子種の解析を試みている。これまでに、ファーメンターによる菌体の大量培養を行い、細胞から実際に RNA 分子を抽出して、解析を進めているところである。今後は、RME の手法を緑膿菌から抽出した RNA の分析に応用する予定である。

## RNA 立体構造分類システムの開発

河合剛太

生体高分子の機能を理解するためには、その立体構造を知ることが必要である。立体構造解析の手法としては、X線結晶解析法や NMR 法が広く用いられているが、RNA 分子に関しては、必ずしもそれらの手法が確立されているとはいえない。これは、RNA 分子が比較的柔軟な分子であり、構造的な揺らぎが大きいことと関係している。このために、結晶化しにくく、また NMR 法による立体構造計算も収束しにくいことが多い。実際に、RNA 分子の NMR 法による解析においてバルジアウト残基などが存在する場合に、その部分において構造計算が収束せず、その結果として、従来法では構造が決定できないということが少なからず起こる。しかし、このような場合にも実際には、部分的に計算が収束しており、収束したセグメント間の相対位置が揺らいでいるという状況が起きていると考えられ、そのような状態を把握することは、むしろその RNA の構造上の性格を理解することにつながる可能性がある。そこで、NMR 法による構造計算の結果として得られるような一群の立体構造をその構造上の特徴に基づいて分類するプログラム CSNA (Classification System for Nucleic Acid structure determination) を開発した。この開発には博士研究員の高須が中心的な役割を果たした。CSNA では、水素結合および塩基間スタッキングのパターンを比較することによって、立体構造の類似性を評価し、グループ化を行っている(図1)。まず、

それぞれの構造に存在する水素結合および塩基間スタッキングをすべて検出し、それらが一致するものを一つの sub-group として分類する (first step grouping)。つぎに、それぞれの sub-group が持つ構造要素の出現頻度を計算し、その合計値をそのグループと frequency score とする。つぎに、

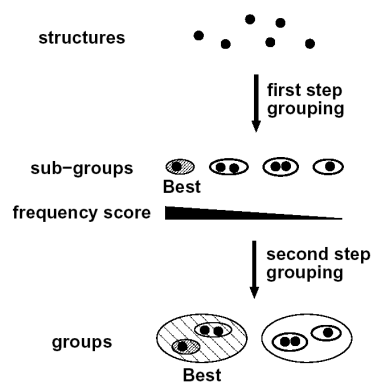


図1 CSNA による立体構造の分類

もっとも frequency score の高い sub-group を選び, その構造に近いものを best group として分類する. 以下, 順次分類を行い, 構造全体を順位のついた group に分類する (second step grouping).

CSNA を実際に RNA の構造計算の結果に適用したところ, 従来のエネルギーの低い構造を選択する場合に比べて, より収束度の高い構造グループを選び出すことができた. このように CSNA は予想以上の分類能力があることが示された. また, CSNA による解析によって, ほとんど収束してないと思われたバルジアウト部分においても部分的収束構造が存在することが見いだされた (図 2).



図2 CSNA によって見いだされた部分的収束構造 (ステレオ図)

さらに, CSNA を分子動力学計算(MD)の結果の解析に応用することを試みた. RNA のテトラループは, そのループに近接する塩基対 (closing basepair) の種類によって構造の安定性が異なることが知られている. このメカニズムを明らかにすることをめざし, closing basepair が GC であるものおよび CG であるものについて, MD シミュレーションを行った. 得られた trajectory に含まれる大量の構造を CSNA によって分類したところ, それぞれのループ構造で特徴的な構造グループを見いだすことができ, その比較から, closing basepair が GC である場合には, ループの 3'側の残基とその次の C 残基とのスタッキングが消失している構造グループが存在し, この構造が安定性の低さと関係していることが示唆された. このように, CSNA は MD の解析にも有用であることが示された.

## 機能 RNA 分子の立体構造解析

本プロジェクトでは、様々な生命現象に関与する機能 RNA 分子について、その立体構造解析を行った。ここでは、LINE RNA, HIV-1 DIS および SRP RNA の解析結果について報告する。

### LINE RNA

LINE と SINE は転写可能な因子であり、RNA 中間体を経て移動する。これらの因子は初めに RNA に転写され、RNA は complimentary DNA (cDNA) に逆転写され、cDNA は新しい位置で宿主ゲノムに組み込まれる。この“copy and paste”メカニズムはレトロトランスポジションと呼ばれ、LINE と SINE の数は、レトロトランスポジションにより増加する。一組の LINE と SINE に共通に存在する保存された 3'末端配列は、レトロトランスポジション活性に必須であり、この 3'末端配列が LINE にコードされている逆転写酵素によって認識されることが重要であると考えられている。そこで、ウナギ LINE の 3'末端に由来する 17 残基 RNA の立体構造を NMR 法によって決定した(図 1)。その結果、この 17 残基 RNA の GGAUA ループ部分は、4 番目の U 残基 (図 1 緑) が溶媒に露出し、3 番目と 5 番目の A 残基 (図 1 赤) がスタッキングしている特徴的な構造を形成しており、2 番目の G 残基と 3 番目の A 残基の間で鋭いターンを形成していた。東京工業大学岡田典弘教授のグループによる培養細胞を用いたレトロトランスポジション活性の測定との比較から、LINE の逆転写酵素は、特徴的な GGANA ループ構造の 5'側を認識していることが示唆された。

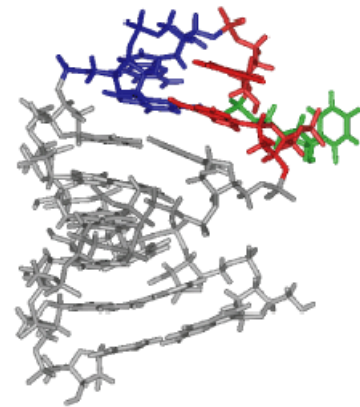


図 1 LINE 3'末端 RNA の立体構造

## HIV-1 ゲノム RNA の二量体化開始部位 DIS

HIV-1 ゲノム RNA はウイルス粒子中で二量体を形成しており、この二量体形成の過程として kissing-loop モデルが提案されている。すなわち、ステム・ループ構造を形成する二量体化開始部位 (dimerization initiation site, DIS) が、まず自己相補的配列を持つループどうしで自発的に結合して二量体化し (kissing-dimer), ヌクレオキャプシド蛋白質によりその分子内ステムが分子間ステムに置き換わることで、DIS がより安定な線状二本鎖構造 (duplex-dimer) へ移行すると考えられている。また、ゲノム RNA 二量体の安定化がウイルス粒子の成熟化と並行して起きているとの知見もある。したがって、DIS は HIV-1 のライフサイクルにおいて重要な機能する RNA である。私たちは、この二段階で進むゲノム RNA 二量体化のメカニズムを解明するために、DIS に由来する 39 残基の RNA (DIS39) をデザインし、それが上述の二段階二量体化を再現できることを実験的に確認した上で、DIS39 の二種類の二量体のそれぞれについて NMR 法によって立体構造を決定した。その際、安定同位体標識を利用した NMR 法によって明確に分子内と分子間の塩基対を区別して解析した。二種類の二量体の NMR スペクトルを比較した結果、部分的にはまったく同一であることがわかり、その知見に基づいて、各部分に分割してそれぞれの立体構造を決定し、最後にそれらを組み合わせることによって、DIS39 の二種類の二量体の立体構造を決定した (図 2)。その結果、二種類の二量体の構造は自己相補的なループの近傍に存在するバルジアウトの A 残基およびその周辺のみが異なっており、それ以外は、塩基対に分子内か分子間の違いはあるものの、構造はほぼ同じであった。現在は、得られた立体構造に基づいて、DIS の構造変化の過程について分子動力学法などによる解析を進めている。

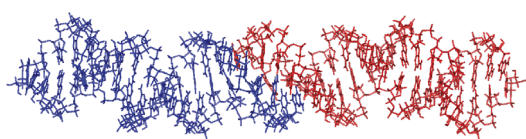


図 2 a kissing dimer

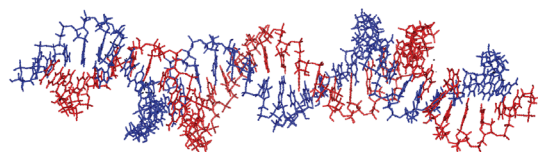


図 2 b duplex dimer

## SRP RNA の helix 6

シグナル認識粒子 (SRP)は、RNA とタンパク質から構成されている。ヒト SRP の assembly において、SRP RNA の helix 6 と SRP19 タンパク質の結合が SRP54 タンパク質と SRP RNA の結合に必要であることがわかっている。すでに、ヒト SRP RNA の helix 6 の立体構造を明らかにしており、その構造に基づいて SRP19 タンパク質が helix 6 の GGAG テトラループの立体構造を認識していると考えている。さらに、GGAG ループの構造は GGAA ループの構造 (GNRA モチーフ)とよく似ており、GNRR モチーフという構造モチーフを提唱した。そこで、helix 6 と SRP19 タンパク質の相互作用について、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*)とヒトで比較することによって、詳細な相互作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、*P. furiosus* の helix 6 に由来する 12 残基の RNA (pfHE6) をデザインし、NMR 法によってその立体構造を決定した (図 3)。その結果、pfHE6 のループ (GAAG) においても、GNRR テトラループ構造が形成されていることがわかった。また、pfHE6 では、ループを閉じている塩基対 (closing base pair) が U-G 塩基対であるが、ヒトの場合 (G-C 塩基対) と同様にループの塩基と closing base pair がスタッキングし、GNRR モチーフが保たれていることが示唆された。なお、このループの塩基と closing base pair のスタッキングの程度の違いが、ヘアピン構造の熱安定性に影響していることも示唆された。

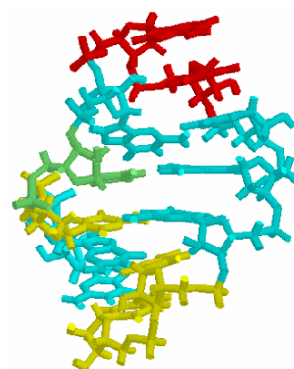


図 3 pfHE6 の立体構造

## 小分子 RNA の機能開拓

高久 洋

近年小分子 RNA として RNA interference (RNAi) や non-coding RNA である micro RNA (miRNA) のように発生や分化に関わる RNA がつぎつぎと報告されている。一方、リボザイムの様に基質に結合し、その基質 RNA を配列特異的に切断し、その RNA 遺伝子の機能をロックアウトするような小分子 RNA も見つかっている。

我々は、tRNA 3'エンドリボヌクレアーゼ(tRNase Z or 3' tRNase; EC 3.1.26.11)は pre-tRNA の 3'末端をプロセッシングするのに欠かせない酵素であることに着目し、small-guide RNA (sgRNA)をデザインすることで、相手側の基質 RNA の 3'末端をプロセッシングさせることを検討した。またこれらの小分子 RNA は核酸医薬品として、難治性疾患の治療に応用することができることから、AIDS の遺伝子治療へ応用も評価した。

tRNase ZL (長鎖) は *in vitro* で small-guide RNA (sgRNA)により部位特異的に標的 RNA を切断することが可能である。我々は一過性発現系において COS 細胞で 4 つの sgRNA 発現プラスミドの HIV-1 遺伝子発現抑制能の評価を行った。そのうち 3 つの sgRNA は HIV-1 遺伝子発現抑制効果を示した。特に gag 蛋白質開始領域をデザインした sgRNA-gag は他の部位を標的にした sgRNA よりも高い抗 HIV 活性を示した。作用機序としては sgRNA が標的となる mRNA に結合し tRNA 様構造を形成し、この構造にの T-stem 構造を tRNase ZL が認識することで、標的 RNA の切断を行っていることを HIV-1 mRNA レベルの解析により示した。また、T-stem 構造が tRNase ZL による標的 RNA の切断にたいし重要な構造であることも見いだした。さらに、sgRNA が一時的に核に局在していることは、tRNase ZL と sgRNA が核内で複合体をつくり切断を行っていると考えられる。

最後に我々は、sgRNA-gag と  $\psi$ site を発現する 2 つのレトロウイルスベクターを構築し、HIV-1 感染 Jurkat T 細胞において長期において HIV-1 遺伝子発現抑制

能について試験した。その結果 sgRNA-gag は HIV-1 感染 T 細胞において 18 日にわたりほとんど完全に HIV-1 遺伝子発現を抑制した。これらの評価により、今回デザインし構築を行った sgRNA 発現ベクターは細胞内で HIV-1 標的遺伝子の特異的に認識し発現抑制を誘導することが可能であることを確認した。さらに、レンチウイルスベクターに組み込むことでアンチジーン of 長期間発現が可能であり、長期にわたり HIV-1 発現抑制がされることが示された (*Nucleic Acids Res.* 2005, **33**, 235-243.)。

また、以前我々の研究室 (*Bioorg Med Chem Lett.* 2004, **19**, 4941-4944) から最も短い extra guide sequence (EGS) が標的となる mRNA に結合し tRNA 様構造を形成し、この構造を RNase P が認識することで、標的 RNA の切断を行っていることを HIV-1 mRNA レベルの解析により示した。本研究の二つ目の目的である RNase P 誘導型及び tRNase Z 誘導型 sgRNA 発現ベクターで、抗 HIV-1 効果の見られた二種の sgRNA を一つのベクターで同時発現させることで抗 HIV-1 剤としての EGS 相乗効果を検討した。まず、HIV-1 の tat mRNA を標的とした RNase P 誘導型 sgRNA および、vif mRNA を標的とした tRNase Z 誘導型 sgRNA をそれぞれ RNA polymerase III 系の U6 プロモーターを持つベクターに組み込んだ (U6-sgRNA-tat, U6-sgRNA-vif) ならびに両者を標的とした sgRNA 発現ベクター (U6-sgRNA-vif-tat) の構築を行った。これら sgRNA 発現ベクターの抗ウイルス活性は、COS 細胞へ pNL4-3 と共に導入し、3 日間培養後、培養上清中における p24 量を測定することによって検討した。また sgRNA による標的 mRNA の切断活性は COS 細胞より total-RNA を回収し、RT-PCR 法にて tat mRNA および、vif mRNA の切断を確認した。作成した sgRNA 発現ベクターのうち、二種の sgRNA を同時発現するベクター (U6-gRNA-vif-tat) がもっとも強く HIV-1 の産生抑制効果を示し、ウイルス一過性発現の系において 90% 以上の p24 タンパク質量の発現を抑制した。また RT-PCR 法にて標的遺伝子の切断を確認した結果、U6-sgRNA-vif-tat ベクター導入細胞において tat mRNA および vif mRNA 両者に切断が認められた。このことから RNase P と tRNase Z が認識できる sgRNA を連続して発現するように設計することにより、それぞれ単独に発現させるものよりさらに高い抗 HIV-1



効果を得られることが示唆された。

以上の結果より我々は RNA 遺伝子の機能をノックアウトするような小分子 RNA の開拓に成功した。

## 機能性 RNA の遺伝子治療への応用

黒崎 直子

機能性 RNA を用いた遺伝子機能の解明や特定遺伝子の発現制御法は、主にアンチセンス法やリボザイムなどが用いられていたが、最近では RNA の干渉作用を利用した RNAi(RNA interference)法を用いて特定の遺伝子発現を制御し、その機能を解明する研究が盛んに行われている。RNAi は、二本鎖 RNA(dsRNA)によって、配列特異的に mRNA が切断され、その結果遺伝子の発現が制御される現象であり、生物共通の核酸レベルの防御システムであることが報告されている。RNAi においては、dsRNA が Dicer の作用によりプロセッシングされ siRNA(short interfering RNA)が形成され、siRNA がガイド RNA として標的遺伝子配列を切断することにより、遺伝子の発現が抑制される。しかし、dsRNA が Toll-like receptor3(TLR3)を介して認識され、配列特異な遺伝子の発現だけでなく、TLR3 により I 型インターフェロンの発現が誘導され、配列非特異的に RNA を分解する 2' -5' -オリゴアデニレートシンターゼを誘導することが報告され、また dsRNA 依存的プロテインキナーゼ(PKR)が siRNA により活性化されインターフェロン ( $\alpha, \beta$ ) の発現誘導と細胞障害を起こすことも報告されている。つまり、医薬品として RNAi を利用して遺伝子治療を行う場合、現行の RNAi 法においては、dsRNA によるインターフェロン反応を引き起こされること、さらに細胞障害を起こす懸念がある。また、dsRNA を実験用試薬として用いる場合、非特異的な発現抑制のため、用いた dsRNA の効果を正確に評価できないという問題点がある。

そこで本研究では、インターフェロンの発現を誘導せず、配列特異的に遺伝子の発現を抑制する dsRNA を開発した。本研究で作成した dsRNA は、エイズの原因ウイルスである HIV-1 に特異的で塩基配列の保存性が高い HIV-1 Dimerization Initiation Site (DIS)を標的とした。また、dsRNA は、全体の構造はループ構造を有する short hairpin RNA(shRNA)とした。shRNA は、ヒト由来の細胞

に HIV-1 遺伝子とともに導入し、ウイルスの発現抑制効果について検討した。その結果、shRNA はウイルス RNA の分解、ならびにウイルス蛋白質の発現も抑制することを確認した。dsRNA は、センス鎖の 5'末端に一個または複数の G からなるオーバーハングを設けることにより、shRNA がインターフェロンの発現を誘導せず、非特異的な RNA 分解や細胞障害を引き起こさないことを見出した。さらに、dsRNA は細胞障害性を誘導しないことも確認しており、従来の dsRNA の作用である PKR の活性化を誘導しないことが示唆された。

よって、本研究において開発した dsRNA は、特異的に標的遺伝子の発現を制御することができるだけでなく、従来の dsRNA にみられた副作用である細胞障害性もないことから、疾患の原因遺伝子が明らかである場合の遺伝子治療として応用することができると期待される。

## 4. 研究発表

河合剛太－発表論文

1. Solution Structure of an RNA fragment with the P7/P9.0 region and the 3'-terminal guanosine of the Tetrahymena group I intron, Kitamura, A., Muto, Y., Watanabe, S., Kim, I., Ito, T., Nishiya, Y., Sakamoto, K., Ohtsuki, T., Kawai, G., Watanabe, K., Hosono, K., Takaku, H., Katoh, E., Yamazaki, T., Inoue T. and Yokoyama, S., *RNA* **8**, 440-451 (2002)
2. Redox-coupled Conformational Alternations in Cytochrome  $c_3$  from *D. vulgaris* Miyazaki F on the Basis of its Reduced Solution Structure., Harada E., Fukuoka Y., Ohmura T., Fukunishi A., Kawai G., Fujiwara T., Akutsu H., *J. Mol. Biol.* **319**, 767-778 (2002)
3. Analysis of Relative Positions of Ribonucleotide Bases in a Crystal Structure of Ribosome, Takasu, A., Watanabe, K. and Kawai, G., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **21** 449-462 (2002)
4. Solution structure of a SRP19 binding domain in human SRP RNA, Sakamoto, T., Morita, S., Tabata, K., Nakamura, K. and Kawai, G., *J. Biochem.*, **132**, 177-182 (2002)
5. Classification of RNA Structures Based on Hydrogen Bond and Base-Base Stacking Patterns: Application for NMR structures, Takasu, A., Watanabe, K. and Kawai, G., *J. Biochem.* **132**, 211-215 (2002)
6. Binding of ribosome recycling factor (RRF) to ribosomes - Comparison with tRNA, Hirokawa, G., Kiel, M. C., Muto, A., Kawai, G., Igarashi, K., Kaji, H., and Kaji, A., *J. Biol. Chem.* **277**, 35847-35852 (2002)
7. Polyamines Enhance Synthesis of the RNA polymerase  $\sigma^{38}$  Subunit by Suppression of an Amber Termination Codon in the Open Reading Frame, Yoshida, E., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A., and Igarashi, K., *J. Biol. Chem.* **277**, 37139-37146 (2002)
8. Solution structure of a tmRNA-binding protein, SmpB, from *Thermus thermophilus*, Someya, T., Nameki, N., Hosoi, H., Suzuki, S., Hatanaka, H., Fujii, M., Terada, T., Shirouzu, M., Inoue, Y., Shibata, T., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. and Kawai, G., *FEBS lett.* **535**, 94-100 (2003)
9. Conformational properties of 2',5' linked Rp- and Sp-phosphorothioate oligoadenylates studied by circular dichroism and NMR, Shimizu, M., Kawai, G., Okutsu, T., Shinozuka, K., and Sawai, H., *Biopolymers* **72**, 48-58 (2003)
10. RNA LEGO: Magnesium-dependent formation of specific RNA assemblies through kissing interactions, Horiya, S., Li, X., Kawai, G., Saito, R., Katoh, A., Kobayashi, K. and Harada, K.,

*Chem. & Biol.* **10**, 645-654 (2003)

11. NMR study on the Photo-responsive DNA Tethering an Azobenzene. Assignment of the Absolute Configuration of Two Diastereomers and Structure Determination of their Duplexes in the trans-Form, Liang, X., Asanuma, H., Kashida, H., Takasu, A., Sakamoto, T., Kawai, G. and Komiyama, M., *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16408-16415 (2003)
12. Role of the Zinc Fingers of HIV-1 Nucleocapsid Protein for Maturation of Genomic RNA, Baba, S., Takahashi, K., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., Gorelick, R. J. and Kawai, G., *J. Biochem.* **134**, 637 - 639 (2003)
13. NMR 法による RNA の立体構造解析における残余双極子相互作用の効果, 馬場清喜, 清宮恭子, 木村友美, 富士原和也, 染谷龍彦, 坂本泰一, 河合剛太, *分光研究* **53**, 171-176 (2004)
14. Analysis of local convergence in NMR structure calculation for RNA by a classification system for nucleic acid structure, CSNA, Someya, T., Sakamoto, T., Takasu, A. and Kawai, G., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **23**, 691-700 (2004).
15. Solution structure of an RNA stem-loop derived from the 3' conserved region of eel LINE UnaL2, Baba, S., Kajikawa, M., Okada, N. and Kawai, G., *RNA* **10**, 1380-1387 (2004)
16. NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A, Sakamoto, T., Oguro, A., Kawai, G., Ohtsu, T. and Nakamura, Y., *Nucleic Acids Res.* **33**, 745-754 (2005)

#### 河合剛太－総説等

1. 高橋健一, 河合剛太, HIV-1 ゲノム RNA の二段階二量体化, *生体の化学* 5 3 巻 2 号 131-135 (2002)
2. 河合剛太, 920 MHz 超高磁場 NMR, *分光研究* 52, 241-242 (2003)
3. 河合剛太, NMR 分光法 原理から応用まで, (日本分光学会 測定法シリーズ 41) 2003 年 1 月 学会出版センター 全 269 頁 pp91-120
4. 河合剛太, RNA がわかる (わかる実験医学シリーズ) 2003 年 6 月, 羊土社 全 140 頁 pp83-91
5. 河合剛太, RNA の構造ゲノム科学, *ゲノム医学* 4, 425-428 (2004)
6. 河合剛太, タンパク質工学の基礎 第 4 章 タンパク質の高次構造の決定法, 東京化学同人 (2004)

## 河合剛太－国際会議

1. Role of two domains of HIV-1 NCp7 for maturation of genomic RNA, Baba, S., Takahashi, K., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., Gorelick, R., J. and Kawai, G., The New Frontier of RNA Science (RNA 2003 Kyoto), Nov. 24-27, Kyoto, Japan
2. Effects of the Tetrakis(3-Aminopropyl)Ammonium on the Conformation of tRNA, Inomata, E., Nomura, Y., Terui, Y., Oshima, T. and Kawai, G., 2004 INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYAMINES, Nov. 28 - Dec. 2, 2004, Chiba, Japan
3. NMR analyses of interaction between polyamines and RNA, Kawai, G., Kashiwagi, K. and Igarashi, K., 2004 INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYAMINES, Nov. 28 - Dec. 2, 2004, Chiba, Japan (Kawai, oral presentation)

## 河合剛太－国内学会

1. 吉田 円, 柏木敬子, 河合剛太, 石浜 明, 五十嵐一衛, ポリアミンによる RNA ポリメラーゼ sigma-38 サブユニットの合成促進機序, 第4回 日本 RNA 学会年会 2002年7月, つくば
2. 高須昭嗣, 渡辺公綱, 河合剛太, リボソーム大サブユニット結晶構造に含まれる核酸塩基の相対位置の解析, 第4回 日本 RNA 学会年会 2002年7月, つくば
3. 藤井倫子・行木信一・白倉裕美・姫野倭太・武藤あきら・河合剛太, 大腸菌 tmRNA における *trans-translation* に必須なシェードノット PK1 の立体構造, 第75回 日本生化学会大会 2002年10月, 京都
4. 田端一敏・岡田潔・坂本泰一・中村幸治・金井昭夫・河合剛太, 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* SRP RNA と SRP19 の複合体のモデリング, 第75回 日本生化学会大会 2002年10月, 京都
5. 若井幹雄・染谷龍彦・高久洋・河合剛太, インフルエンザ NS1 タンパク質と2重鎖 RNA の複合体のモデリング, 第75回 日本生化学会大会 2002年10月, 京都
6. Hiroya, S., Li, X., Kawai, G., Saito, R., Katoh, A., Kobayashi, K. and Harada, K., RNA LEGO: Magnesium-dependent assembly of RNA building blocks through loop-loop interactions, 第28回 核酸化学シンポジウム 2002年11月, 京都
7. Baba, S., Takasu, A., Watanabe, K. and Kawai, G., Application of the RNA structure classification system, CSNA, to NMR structure determination, 第30回 核酸化学シンポジ

ウム 2003 年 9 月, (札幌)

8. 河合剛太, HIV-1 ゲノム RNA 二量体化開始部位の立体構造および NCp7 との相互作用, 第 17 回 日本エイズ学会学術集会シンポジウム 2003 年 11 月, 神戸
9. 河合剛太, 村上美和, 中村幸治, 枯草菌において発見された新規 non-coding RNA 分子の構造と機能, 第 26 回 日本分子生物学会年会シンポジウム 2003 年 12 月, 神戸
10. Wayne DAWSON, 二村泰弘, 山本健二, 河合剛太, RNA の二次構造予測, デザインおよびフォールディングダイナミクスへの新しいアプローチ, 日本 RNA 学会年会 2004 年 8 月, 熊本
11. 馬場清喜, 高橋健一, 野口聡子, 小柳義夫, 山本直樹, 高久洋, 河合剛太, HIV-1 ゲノム RNA 二量体化開始部位の立体構造, 日本 RNA 学会年会 2004 年 8 月, 熊本
12. 嶋矢崇宏, 岡田潔, 橋谷悠司, 坂本泰一, 河合剛太, GGAG テトラループの安定性に与える最近接塩基対の影響, 日本生化学会大会 2004 年 10 月, 横浜
13. 坂本泰一, 染谷龍彦, 馬場清喜, 野口聡子, 清宮恭子, 木村友美, 富士原和也, 河合剛太, NMR 法による RNA の立体構造解析における残余双極子相互作用の効果, 第 43 回 NMR 討論会 2004 年 11 月, 東京
14. 三瓶巖一, 石井健, 矢内久陽, 馬場清喜, 真岡伸子, 中川紀子, 金川真由美, 河合剛太, 高度好熱菌 PurD タンパク質の結晶構造解析, 日本結晶学会年会 2004 年 11 月
15. 河合宏哉, 岡田潔, 坂本泰一, 金井昭夫, 河合剛太, 超好熱性古細菌由来 FAU-1 タンパク質と RNA との相互作用の解析, 日本分子生物学会年会 2004 年 12 月, 神戸
16. 高橋真梨, 岡田潔, 坂本泰一, 中村幸治, 金井昭夫, 河合剛太, 超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の SRP RNA の helix 6 の立体構造解析, 日本分子生物学会年会 2004 年 12 月, 神戸
17. 野村祐介, 増田貴夫, 河合剛太, 1 形のみを形成する HIV-1 インテグレース Zn フィンガードメイン変異体の構造解析, 日本分子生物学会年会 2004 年 12 月, 神戸

高久洋, 黒崎直子一発表論文

- 1) Suzuki J., Miyano-Kurosaki N., Kuwasaki T., Takeuchi H., Kawai G., and Takaku H. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 activity in vitro by a new self-stabilized oligonucleotide with guanosine-thymidine quadruplex motifs. *J. Virol.*, 76, 3015-3022 (2002).
- 2) Nadkarni A., Sakaguchi T., Takaku H., Gorakshaker A., Phanasgaonkar S., Colah R., Mohanty D., and Kiyama R. A Novel  $\beta^0$ -Thalassemia Mutation at Codon 55(-A) and a Rare 17-bp Deletion at Codons 126-131 in the Indian Population. *Hemoglobin*, 26, 41-47 (2002).
- 3) Hamazaki H., Abe T., Yamakawa H., Yokota T., Shigeta S., and Takaku H. Inhibition of Influenza Virus Replication in MDCK Cells by Circular Dumbbell RNA/DNA Chimeras with Closed Alkyl Loop Structures. *Helvetica Chimica Acta*, 85, 2183-2194 (2002).
- 4) Inagawa T., Nakashima H., Karwowski B., Guga P., Stec W.J., Takeuchi H., and Takaku H. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS Lett.*, 528, 48-52 (2002).
- 5) Park W.-S., Miyano-Kurosaki N., Hayafune M., Nakajima E., Matsuzaki T., Shimada F., and Takaku H. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Res.*, 30, 4830-4835 (2002).
- 6) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Nagawa T., Matsumoto N., Takeuchi H., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication by an HIV-1 dependent ribozyme expression vector with the Cre/loxP (ON/OFF) system. *Antiviral Chem. Chemother.*, 13, 273-281 (2002).
- 7) Kusunoki A., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. A novel single-stranded DNA enzyme expression system using HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 301, 535-539 (2003).
- 8) Kuwasaki T., Hatta M., Takeuchi H., and Takaku H. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 replication in vitro by self-stabilized oligonucleotide with 2'-O-methyl-guanosine-uridine quadruplex motifs. *J. Antimicrobial Chemother.*, 51, 813-819 (2003).
- 9) Ichiyama K., Yokoyama-Kumakura S., Tanaka Y., Tanaka R., Hirose K., Bannai K., Edamatsu T., Yanaka M., Niitani Y., Miyano-Kurosaki N., Takaku H., Koyanagi Y., and Yamamoto N. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4185-4190 (2003).
- 10) Park W.-S., Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Specific HIV-1 *env* gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Therapy*, 10, 2046-2050 (2003).
- 11) Abe T., Takahashi H., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., and Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J. Immunol.*, 171, 1133-1139 (2003).
- 12) Takahashi H., Hamazaki H., Hayashi M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. A new modified



- DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett.*, **560**, 69-74 (2004).
- 13) Miyano-Kurosaki N., Barnor J.S., Takeuchi H., Owada T., Nakashima H., Yamamoto N., Matsuzaki T., Shimada F., and Takaku H. In vitro and in vivo transport and delivery of phosphorothioate oligonucleotides with cationic liposomes. *Antiviral Chem.Chemother.*, **15**, 93-100 (2004).
  - 14) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Sakamoto A., Ishikawa K., Inagaki Y., Yamamoto N., Osei-Kwasi M., Ofori-Adjei D., and Takaku H. Intracellular expression of antisense RNA transcripts complementary to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) *vif* gene inhibits viral replication in infected T-lymphoblastoid cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **320**, 544-550 (2004).
  - 15) Barnor J.S., Endo Y., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Yamamoto H., and Takaku H. Effective inhibition of HIV-1 replication in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease P. *Bioorg. & Medicinal Chem. Lett.*, **14**, 4941-4944 (2004).
  - 16) Kitajima M., Miyano-Kurosaki N., Abe T., and Takaku H. Murine Dendritic cells are activated by baculovirus *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus in vivo*. *Immunol.*, 385-389 (2004).
  - 17) Abe T., Hemmi H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., and Matsuura Y. Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus. *J.Virol.*, **79**, 2847-2858 (2005).
  - 18) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Endo Y., Yukita M., Ohira S., Takaku H., Nashimoto M., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 235-243 (2005).
  - 19) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Abumi Y., Ishikawa K., Yamamoto N., and Takaku H. Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy tar and *vif* siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, in press (2005).
  - 20) Hamazaki H., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno H., and Takaku H. Inhibition of HCV replication in HCV replicon cells by siRNAs. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, in press (2005).
  - 21) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.-S., and Takaku H. Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, in press (2005).
  - 22) Hayashi M., Satou E., Ueki R., Yano M., Miyano-Kurosaki N., Fujii M., and Takaku H. Resistance to influenza A virus infection by antigen-conjugated CpG oligonucleotides, a novel antigen-specific immunomodulator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **329**, 231-237 (2005).

高久洋, 黒崎直子—総説等

1. Abe T., Hatta T., Miyano-Kurosaki N., Habu Y., Shigeta S., and Takaku H. Antisense oligonucleotide based therapy for influenza. *Recent Advances in Influenza Virus Research*. Ed. Yasue Y. *Research Signpost, India*, p.99-118 (2002).
2. Park W.-S., Abe T., Hamazaki H., Yamakawa H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Antiviral activity of circular dumbbell RNA/DNA chimeras with closed loop structures in cultured cells. *Recent Research Developments in Nucleosides & Nucleotides*. *Transworld Research Network, India*, p.17-31 (2003).
3. 黒崎直子, 朴偉成, 高久洋 : RNAi による HIV 感染阻害. *Bio ベンチャー 羊土社* 3, p50-51 (2003.3-4).
4. Takaku H. Gene silencing of HIV-1 by RNA interference. *Antiviral Chem. Chemother., (Review)* 15, 57-65 (2004).
5. Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Gene silencing of virus replication by RNA interference. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Erdmann V.A., Brosius J., and Barciszewski H.J. *Springer, Berlin, Germany*, in press (2005).

#### 高久洋－招待講演

##### 国際学会

- 1) Specific silencing of HIV-1 infection in human T cells by RNA interference: Wee-Sung Park, Naoko Miyano-Kurosaki, Masaaki Hayafune, and Hiroshi Takaku. (Workshop on Therapeutic oligonucleotides in drug development. June.13-14, 2003 Berlin, Germany)
- 2) Combinatorial effect of decoy RNA and RNAi-mediated specific inhibition of HIV-1 replication. Barnor, J. S., Abumi, Y., Yamaguchi, K., Miyano-Kurosaki, N. and Takaku, H. (日韓科学協力事業セミナー 2004.11 鹿児島)

##### 国内学会

- 1) CpG-oligonucleotide の免疫誘導 (インフルエンザ), (第 13 回アンチセンスシンポジウム 2003.12.1-2 大阪)
- 2) 遺伝子発現抑制法によるウイルス病の治療, (千葉県ガンセンター 2004.7 千葉)
- 3) 高久洋 : アンチセンス核酸医薬品の現状, (第 50 回日本ウイルス学会 2002.10 札幌)

#### 高久洋, 黒崎直子－国際学会

- 1) Kurosaki N, Park WS, Hayafune M, Takaku H: Suppression of HIV-1 gene expression by double-stranded RNA-mediated interference. 12th International Congress of Virology, Paris, France, (2002.7)
- 2) Kusunoki A., Fuse T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. A novel construction of a single-stranded DNA expression vector which contain DNA enzyme sequenced against HIV-1. XV International Round Table (Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids) Leuven, Belgium (2002, 9)
- 3) Habu Y., Nagawa T., Matsumoto N., Takeuchi H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. : INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BY CRE/LOXP MEDIATED RIBOZYME EXPRESSION VECTOR. XVth International Round Table, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Leuven, Belgium (2002.9)
- 4) Miyano-Kurosaki N., Park W.-S., Hayafune M., and Takaku H. : Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. 12th International Congress of Virology, 7/27-8/1,2002, Paris France (2003.7-8)
- 5) Nagawa T., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Suppression of HIV-1 Replication by an HIV-1 Dependent Anti-gene Expression Vector with the Cre-loxP System. 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Savanna, GA, USA (2003.4-5)
- 6) Kaneko H., Abe T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Typ 1(HIV-1) by Ribozyme Expression Baculovirus Vector. 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Savanna, GA, USA (2003.4-5)
- 7) Takaku H., Park W.-S., Miyano-Kurosaki N., and Hayafune M. Specific silencing of HIV-1 env gene using small interfering RNAs in mammalian cells. 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Savanna, GA, USA (2003.4-5)
- 8) Hayashi M., Kuwahara M., Ogata M., Miyano-Kurosaki N., Abe T., Ueki R., Yano M., Fujii M., Hartmann G., and Takaku H. Resistance to infection with influenza virus A by antigen-conjugated CpG oligonucleotides as a novel antigen specific immunomodulator. 第30回国際核酸化学シンポジウム 札幌 (2003.9)
- 9) Banor J.S., Miyano-Kurosaki N., Yamaguchi K., Sakamoto A., Ishikawa K., Inagaki Y., Yamamoto N., Osei-Kwashi M., and Takaku H. Intracellular Expression of Antisense RNA Transcripts Complementary to the Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) *Vif* Gene Inhibits Viral Replication in Infected T-Lymphoblastoid cells. International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, Maryland, USA (2003.9-10)
- 11) Baba S., Takahashi K. Koyanagi Y., Yamamoto N., Takaku H., Grelik R.J., and Kawai G. Role of two domains of HIV-1 NCp7 for maturation of genomic RNA. The New Frontier of RNA Science, Kyoto, Japan (2003.11)

- 12) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Abumi Y., Ishikawa K., Inagaki Y., Yamamoto Y., Osei-Kwasi M., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication using a single transcriptional unit that expresses decoy and siRNAs in transfected cells. The New Frontier of RNA Science, Kyoto, Japan (2003.11)
- 13) Habu Y., Nagawa T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus typel with a HIV-1 dependent ribozyme expretion system. The New Frontier of RNA Science, Kyoto, Japan (2003.11)
- 14) Miyano-Kurosaki N., Kitano M., Ikeda M., Endo M., Yukita M., Ohira S., Nashimoto M., and Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication using tRNA 3' associating small guide RNA with retroviral vector. The New Frontier of RNA Science, Kyoto, Japan (2003.11)
- 15) Takaku., Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Ishikawa K., Yamamoto N., Osei-Kwasi M. Inhibition of HIV-1 Replication Using a Single Transcription al Unit that Expresses Dcoy and siRNAs in Mammalian Cells. The International Society for Antiviral Research, Tucson, AZ, USA (2004.5)
- 16) Habu Y., Nagawa T., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus type 1 via Hiv-1-dependent anti-gene expression system. The International Society for Antiviral Research, Tucson, AZ, USA (2004.5)
- 17) Kitajima M., M-Kurosaki N., Abe T., and Takaku H. Characteristics of NK T cells induced by injection of baculovirus *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) in mice. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada (2004.7)
- 18) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Abumi Y., Shiina H., Ishikawa K., Yamamoto N., Osei-Kwasi M., Ofori-Adjei D., and Takaku H. Lentiviral-mediated delivery of HIV-1 in decoy TRA-siRNA molecule that separates to dummy and silent HIV-1 in the transduced cells. XVI International Society for Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Minneapolis, Minesota, USA (2004.9)
- 19) Hamazaki H., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., Takaku H. Inhibition of HCV replication in HCV replicon cells by signal. XVI International Society for Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Minneapolis, Minesota, USA (2004.9)
- 20) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., and Takaku H. Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. XVI International Society for Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Minneapolis, Minesota, USA (2004.9)
- 21) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Ikeda M., Mizoguchi Y., and Takaku H. Combinatorial Effect of RNaseP and 3'tRNase-Associated EGSs Specific Inhibition of HIV-1 Replication in Mammalian cells. 2004 International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, Maryland, USA (2004.10-11)

高久洋, 黒崎直子—国内学会

- 1) 林三恵子, 佐藤江美, 阿部隆之, 上木亮治, 矢野真由佳, 黒崎直子, 藤井政幸, 高久洋 : Antigen-Conjugated CpG oligodeoxynucleotides による免疫誘導能と新規アジュバントとしての可能性の検討. 第 75 回日本生化学会大会 京都 (2002.10)
- 2) 浜崎博行, 阿部隆之, 高久洋 : アルキルループを含むダンベル型 RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドのインフルエンザの感染抑制. 第 75 回日本生化学会大会 京都 (2002.10)
- 3) 楠秋子, 布施隆行, 黒崎直子, 高久洋 : HIV-1 特異的に発現する新規 DNA enzyme の構築. 第 50 回日本ウイルス学会 札幌 (2002.10)
- 4) 黒崎直子, 朴偉成, 早船正哲, 松崎哲夫, 嶋田文之, 高久洋 : RNAi による HIV-1 遺伝子発現の制御, 第 50 回本ウイルス学会, 札幌 (2002.10)
- 5) 阿部隆之, 北川善紀, 辺見弘明, 森石恆司, 高久洋, 審良静男, 松浦善治 : バキュロウイルスエンベロープ蛋白質による自然免疫誘導機構の解析. 第 50 回日本ウイルス学会 札幌 (2002.10)
- 6) Miyano-Kurosaki N., Park W.-S., Hayafune M., Nakajima E., and Takaku H. : Specific silencing of HIV-1 infection in human T-cells by RNA interference. 第 12 回アンチセンスシンポジウム, 大阪 (2002.11)
- 7) 羽生勇一郎, 名川隆志, 松本則彦, 武内寛明, 黒崎直子, 高久洋 : Cre/loxP システムによる HIV-1 感染依存的発現ベクターによる HIV-1 遺伝子発現抑制. 第 12 回アンチセンスシンポジウム, 大阪 (2002.11)
- 8) 林三恵子, 阿部隆之, 上木亮治, 矢野真由佳, 黒崎直子, 藤井政幸, 高久洋 : Antigen-Conjugated CpG oligodeoxynucleotides の免疫誘導能と新規アジュバントとしての可能性の検討. 第 12 回アンチセンスシンポジウム 大阪 (2002.11)
- 9) 金子央賢, 阿部隆之, 黒崎直子, 高久洋 : リボザイム発現バキュロウイルスベクターによる HIV-1 抑制効果. 第 12 回アンチセンスシンポジウム, 大阪 (2002. 11)
- 10) Barnor J.S., 黒崎直子, 山口和也, 小林浩樹, 石川晃一, Osei-Kwasi M., Ampofo W.K. Ofori-Adjei D., 稲垣好雄, 山本直樹, 高久洋 : アンチセンス RNA 発現ベクターによる HIV-1 遺伝子の発現抑制. 第 29 回核酸化学シンポジウム 京都 (2002.11)
- 11) 幸田真和, 北野実智子, 黒崎直子, 武内寛明, 梨本正之, 高久洋 : 3'-エンドリボヌクレアーゼ(3'-tRNase)による標的 RNA の切断は高い抗 HIV-1 活性を示す. 第 29 回核酸化学

シンポジウム 京都 (2002.11)

- 12) 名川隆志, 羽生勇一郎, 松本則彦, 武内寛明, 黒崎直子, 高久洋: HIV-1 感染による遺伝子発現 ON 制御系をもつ Cre/loxP ベクターの開発. 第 29 回核酸化学シンポジウム 京都 (2002.11)
- 13) 名川隆志, 羽生勇一郎, 松本則彦, 武内寛明, 黒崎直子, 高久洋: 5'LTR を用いた Cre/loxP system による HIV-1 感染特異的遺伝子発現ベクターの評価. 第 16 回日本エイズ学会 名古屋 (2002.11)
- 14) Park W.-S., 黒崎直子, 早船正哲, 松崎哲夫, 嶋田文之, 高久洋: Double-Strand RNA による HIV-1 増殖の抑制. 第 16 回日本エイズ学会 名古屋(2002.11)
- 15) 北島雅之, 阿部隆之, 黒崎直子, 高久洋: バキュロウイルス接種に伴うマウス肝組織由来 NKT 細胞の活性評価. 第 32 回日本免疫学会 東京 (2002.12)
- 16) 林三恵子, 阿部隆之, 尾形美和, 村岡美穂, 上木亮治, 矢野真由佳, 黒崎直子, 藤井政幸, 高久洋: Antigen-Conjugated CpG oligodeoxynucleotides の免疫誘導能と新規アジュバントとしての可能性の検討. 第 32 回日本免疫学会 東京 (2002.12)
- 17) 三堀麻理子, 布施隆行, 田村裕, 黒崎直子, 高久洋: アンチセンス RNA による HIV-1 遺伝子の発現抑制. 第 25 回日本分子生物学会年会 横浜 (2002.12)
- 18) 早船正哲, Park W.-S., 黒崎直子, 高久洋: siRNA による HIV-1 遺伝子発現の制御. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会 津田沼 (2003.1)
- 19) 林三恵子, 黒崎直子, 阿部隆之, 上木亮治, 矢野真由佳, 藤井政幸, Hartmann G., 高久洋: Antigen-Conjugated CpG oligodeoxynucleotides の免疫誘導能と新規アジュバントとしての可能性の検討. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会 津田沼 (2003.1)
- 20) 浜崎博行, 高橋 仁, 黒崎直子, 下遠野邦忠, 高久 洋: IRES 領域を標的とした RNAi による HCV 遺伝子発現制御. 第 51 回日本ウイルス学会 京都(2003.10)
- 21) 羽生勇一郎, 名川隆志, 黒崎直子, 高久 洋: Cre/loxP を用いた HIV-1 感染特異的遺伝子発現ベクターの抗 HIV-1. 第 51 回日本ウイルス学会 京都(2003.10)
- 22) Barnor Jacob, 黒崎直子, 鏡 雄亮, 石川晃一, 稲垣好雄, 山本直樹, Osei-Kwasi Mubarak, 高久 洋: Inhibition of HIV-1 Replication using a Single Transcription Unit that Expresses Decoy and siRNAs in Cells. 第 51 回日本ウイルス学会 京都 (2003.10)
- 23) 早船正哲, 黒崎直子, 朴 偉成, 高久 洋: SiRNA 発現ベクターの構築とその抗 HIV 活性. 第 51 回日本ウイルス学会 京都 (2003.10)
- 24) 金子央賢, 阿部隆之, 玉井信成, 黒崎直子, 高久 洋: バキュロウイルスベクターによる哺乳動物細胞への遺伝子導入および感染症への治療効果. 第 51 回日本ウイルス学会

京都 (2003.10)

- 25) 名川隆志, 羽生勇一郎, 黒崎直子, 高久 洋: 5'LTR 及び Cre/loxP system を用いた HIV-1 感染特異的な持続発現ベクターの開発. 第 17 回日本エイズ学会 神戸 (2003.11)
- 26) 金子央賢, 阿部隆之, 玉井信成, 黒崎直子, 高久 洋: バキュロウイルスベクターによる哺乳動物細胞への遺伝子導入および感染症への治療効. 第 17 回日本エイズ学会 神戸 (2003.11)
- 27) 池田雅宏, 溝口泰之, 黒崎直子, 高久 洋: リボヌクレアーゼ誘導型 RNA によるウイルス遺伝子の切断と発現制御. 第 17 回日本エイズ学会 神戸(2003.11)
- 28) 加藤真由実, 西辻裕紀, 三好浩之, 稲垣好雄, 山本直樹, 黒崎直子, 高久 洋: デコイ RNA 法を用いたエイズに対する遺伝子治療法の開発. 第 17 回日本エイズ学会 神戸 (2003.11)
- 29) 名川隆志, 羽生勇一郎, 西部好美, 黒崎直子, 高久 洋: Cre/loxP system を用いた HIV-1 感染特異的遺伝子発現による抗ウイルス効果. 第 13 回アンチセンスシンポジウム 大阪 (2003.11)
- 30) 池田雅宏, 溝口泰之, 黒崎直子, 高久 洋: リボヌクレアーゼ誘導型 RNA による HIV-1 発現制御. 池田雅宏, 溝口泰之, 黒崎直子, 高久 洋: 第 13 回アンチセンスシンポジウム 大阪 (2003.12)
- 31) 早船正哲, 黒崎直子, 朴 偉成, 高久 洋: siRNA 発現ベクターによる HIV-1 遺伝子発現の抑制. 第 13 回アンチセンスシンポジウム 大阪 (2003.11)
- 32) 山口和也, 黒崎直子, 米田和弘, Jacob Samson Barnor, 高久 洋: HIV-1 Dimerization Initiation Site を標的としたホスホロチオエート型アンチセンス DNA によるウイルス複製阻害. 第 13 回アンチセンスシンポジウム 大阪 (2003.12)
- 33) 坂本 淳, 黒崎直子, 山口和也, 石井 遼, 高久 洋: IFN- $\gamma$  持続発現ベクターによる抗ウイルス効果の検討. 第 33 回日本免疫学会総会 福岡 (2003.12)
- 34) 北島雅之, 高久 洋, 黒崎直子: 昆虫病原生バクテリオファグを用いたがんマウスモデルにおける抗腫瘍免疫誘導評価. 第 33 回日本免疫学会総会 福岡(2003.12)
- 35) 深井建志, 張 学忠, 黒崎直子, 高久 洋: 弱毒株インフルエンザウイルスによる腫瘍移転抑制効果の検討. 第 26 回日本分子生物学会 神戸 (2003.12)
- 36) 金子央賢, 阿部隆之, 玉井信成, 黒崎直子, 高久 洋: siRNA 発現バキュロウイルスベクターによる HCV コアタンパク質の核移行阻害効果. 第 26 回日本分子生物学会 神戸 (2003.12)
- 37) 黒崎直子, 坂本 淳, 石井 遼, 山口和也, 黒崎久仁彦, 高久 洋: インターフェロン

- $\gamma$ による HIV-1 感染防御. 第26回日本分子生物学会 神戸(2003.12)
- 38) 瀬廻木卓, 羽生勇一郎, 加藤恵次郎, 横田雄児, 黒崎直子, 高久洋: 逆型配列 sgRNA による HIV-1 阻害効果に重要な塩基配列の同定. 第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004.5)
- 39) 早船正哲, 黒崎直子, 朴偉成, 高久洋: HIV-1 *env* 遺伝子を標的とした siRNA. 発現ベクターによる発現制御. 第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004.5)
- 40) 玉井信成, 金子央賢, 狩生ひとみ, 高田はづき, 西部好美, 鈴木等, 松田雄太, 黒崎直子, 朴偉成, 高久洋: siRNA による HCV コアタンパク質の核移行阻害効果. 第14回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004.5)
- 41) 池田雅弘, 溝口泰之, 黒崎直子, 羽生勇一郎, 河野拓也, 高久洋: リボヌクレアーゼ誘導型 RNA による HIV-1 発現抑制. 第6回日本 RNA 学会 熊本 (2004.8)
- 42) 馬場清喜, 高橋健一, 野口聡子, 小柳義夫, 山本直樹, 高久洋, 河合剛太: HIV-1 ゲノム RNA 二量体化開始部位の立体構造. 第6回日本 RNA 学会 熊本 (2004.8)
- 43) 黒崎直子, 高久洋, 黒崎久仁彦, 遠藤任彦, 友田あき夫: フェノキサジン化合物のメラノーマに対する抗腫瘍効果. 第63回日本癌学会学術総会 福岡 (2004.9)
- 44) 浜崎博行, 宇治野真之, 安部絵美, 黒崎直子, 下遠野邦忠, 高久洋: RNAi expression mediated inhibition of HCV replication. 第31回核酸化学シンポジウム 東京 (2004.11)
- 45) 津山陽一, 北島雅之, 黒崎直子, 高久洋: Anti-tumor effects of naked plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. 第31回核酸化学シンポジウム 東京 (2004.11)
- 46) 浜崎博行, 宇治野真之, 安部絵美, 黒崎直子, 下遠野邦忠, 高久洋: siRNA による HCV 遺伝子発現制御の検討. 第52回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 47) 桑原誠, 深井建志, 牧田大, 後藤奈津子, 橋本香保子, 黒崎直子, 高久洋: 弱毒株インフルエンザウイルスによる肺転移癌の抑制効果. 第52回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 48) 北島雅之, 黒崎直子, 高久洋: 昆虫病原性バキュロウイルス接種によるがんモデルマウスを用いた抗腫瘍免疫応答の解析. 第52回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 49) 阿部隆之, 森石恆司, 高久洋, 田村慎一, 松浦善治: バキュロウイルスによる Toll-like receptor 非依存的な IFN 誘導機構. 第52回日本ウイルス学会 横浜 (2004.11)
- 50) 庄司豊隆, 北島雅之, 黒崎直子, 橋本香保子, 中山俊憲, 高久洋: バキュロウイルスによる IFN- $\gamma$  産生細胞の解析. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)
- 51) 西部好美, 金子央賢, 橋本香保子, 黒崎直子, 高久洋: バキュロウイルス感染免疫応答による肝繊維化治療. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)



- 52) 橋本香保子, パンデラキスコニ, 下田美智子, 佐藤美樹, 新田あゆみ, 中山俊憲, 高久洋: マウス lymphoid 系樹状細胞株における発現する免疫機能制御因子の同定に関する研究. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)
- 53) 津山陽一, 北島雅之, 黒崎直子, 高久洋: Naked plasmid DNA Hydrodynamics-based procedure による抗腫瘍免疫の評価. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)
- 54) 桑原誠, 深井建志, 牧田大, 後藤奈津子, 橋本香保子, 黒崎直子, 高久洋: インフルエンザウイルスによる悪性黒色腫メラノーマの肺転移抑制作用. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)
- 55) 北島雅之, 黒崎直子, 中山俊憲, 高久洋: 昆虫病原性バキュロウイルスを用いたがんモデルマウスにおける抗腫瘍免疫誘導評価. 日本免疫学会総会第34巻 札幌 (2004.12)
- 56) 池田雅弘, 溝口泰之, 黒崎直子, 羽生勇一郎, 河野拓也, 高久洋暁, 梨本正之, 高久洋: リボヌクレアーゼ誘導型 RNA による HIV-1 発現抑制. 第14回アンチセンスシンポジウム 横浜 (2004.12)
- 57) 山口和也, 黒崎直子, 大成亜季, 米田和弘, 権代拓麻, 高久洋: Phage polymerase より合成された shRNA の HIV-1 抑制効果およびインターフェロン誘導能の解析. 第14回アンチセンスシンポジウム 横浜 (2004.12)
- 58) 山口和也, 黒崎直子, 大成亜季, 米田和弘, 権代拓麻, 高久洋: HIV-1 DIS 領域を標的とした shRNA によるウイルス複製阻害効果. 第18回日本エイズ学会 静岡 (2004.12)
- 59) 早船正哲, 黒崎直子, 朴偉成, 山本知佳, 高久洋: siRNA 発現ベクターの導入による HIV-1 *env* 遺伝子の発現制御. 第18回日本エイズ学会 静岡 (2004.12)
- 60) Barnor J.S., Kurosaki N., Abumi Y., Shiina H., Yamaguchi K., Ishikawa K., Yamamoto N., Osei-Kwasi M., Ofori-Adjei D., Takaku H. Enhanced inhibition efficacy on HIV-1 replication by decoy TAR and vif siRNAs expressed as a single RNA molecule in lentiviral-transduced cells. 第18回日本エイズ学会 静岡 (2004.12)
- 61) 沖野啓一郎, 北島雅之, 山本周作, 齋藤俊久, 黒崎直子, 橋本香保子, 高久洋: バキュロウイルス感染マクロファージの免疫応答解析. 第27回日本分子生物学会 神戸 (2004.12)
- 62) 羽生勇一郎, 高波華恵, 山口和也, Barnor J.S., 黒崎直子, 高久洋: HIV-1 vif shRNA および hu-APOBEC3G の共発現による HIV-1 感染阻害. 第27回日本分子生物学会 神戸 (2004.12)
- 63) 鈴木等, 金子央賢, 阿部隆之, 玉井信成, 黒崎直子, 松浦善治, 高久洋: バキュロウイルスベクターによる哺乳動物細胞への遺伝子導入およびエイズ治療への応用. 第27回日本分子生物学会 神戸 (2004.12)

## 滝口泰之 一 発表論文

- 1) 滝口泰之, 山本美緒, 山口達明: 好熱性細菌 *Bacillus sp.* AK-1 株によるキトサンの低分子化, キチン・キトサン研究 **9**, 11-16 (2003)
- 2) 滝口泰之, 椎名亜弥子, 山口達明: D-グルコサミンから D-グルコサミン酸への微生物変換, 日本農芸化学会誌 **77**, 576-578 (2003)

## 滝口泰之 一 総説等

- 1) 小林崇良, 滝口泰之, 山口達明: *Klebsiella pneumoniae* が生産した多糖類の単離と構造解析, 千葉工業大学研究報告 (理工編) **51**, 93-97 (2004)

## 滝口泰之 一 学会発表

- 1) 呉 暁聞, 樋口綾子, 滝口泰之, 山口達明: 超臨界二酸化炭素による中国プロポリスからの有効成分の抽出, 化学工学年会研究発表講演要旨集 (2003.2)
- 2) 小林崇良, 浅川大介, 矢沢勇樹, 滝口泰之, 山口達明: 生物窒素固定における微生物産生多糖の凝集に及ぼす金属イオンの添加効果, 植物微生物研究会研究交流会講演要旨集 (2003.12)
- 3) 滝口泰之, 平塚高司, 矢沢勇樹, 小林崇良, 山口達明: 微生物産生多糖を利用したイネへの窒素供給, 植物微生物研究会研究交流会講演要旨集 (2003.12)
- 4) 杉山雄一, 滝口泰之, 山口達明: 窒素固定菌を用いた広漠地における新農法, 日本化学会講演予講集 (2004.03)
- 5) 小川晶央, 小林崇良, 滝口泰之, 山口達明: メチルー $\alpha$ -1, 3 グルカンの抗腫瘍活性, 日本農芸化学会大会講演要旨集 (2004.3)
- 6) 平塚高司, 小林崇良, 梶田由香, 滝口泰之, 山口達明: 複合微生物系による窒素固定菌の性能向上, 日本農芸化学会大会講演要旨集 (2004.3)
- 7) 小林崇良, 浅川大介, 滝口泰之, 山口達明: 金属イオン添加の微生物産生多糖による窒素固定能と生物育成への効果, 日本農芸化学会大会講演要旨集 (2004.3)
- 8) 久保泰一, 飯塚豊子, 滝口泰之, 山口達明: キトサンの抗菌作用機構の検討, 日本防菌防黴学会年次大会要旨集 (2004.5)

- 9) 久保泰一, 滝口泰之, 山口達明 : 好熱性細菌 *Bacillus sp.*AK-1 株を用いたキトサンの低分子化 (Ⅱ) -培養系内におけるキトサンの分解能向上-, キチン・キトサン研究 **10**, 182-183 (2004.7)
- 10) 飯塚豊子, 滝口泰之, 山口達明 : 細菌に対するキトサンの抗菌作用機構、キチン・キトサン研究 **10**, 184-185 (2004.7)
- 11) 野本恵美子, 滝口泰之, 山口達明 : 芽胞形成細菌に対するキトサンの抗菌性、キチン・キトサン研究 **10**, 186-187 (2004.7)