

10. 細胞化学部

部長 西島正弘

概要

細胞化学部の目的は、「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス等の病原微生物による感染症の発症要因をその宿主細胞の面から解析する方向で研究に取り組んでいる。特に、病原体の感染とその生体防御の様々な局面において重要な役割を担っている宿主細胞膜の機能解明を当部の研究主軸にしている。更に、感染症の分子レベルからの基礎研究の成果に立脚して、疾病の予防、診断、治療のための応用研究も行っている。

当部での主要研究課題としている高等動物細胞の膜構造とその機能解析の遺伝生化学的・細胞生物学的研究は、感染症研究を含む医学・生物学分野での幅広い応用面を有する課題である。本年度も、ホスファチジルセリン(PS)の細胞内輸送機構とシンドビスウィルス増殖における役割、スフィンゴ脂質の代謝と機能、マラリア原虫やクラミジアの細胞内寄生体およびその宿主細胞における脂質代謝、C型肝炎ウイルス感染における膜脂質代謝、マクロファージ活性化と生体防御機構の解明、がん化に伴う細胞膜変化の解明など、幅広い分野で数多くの成果を挙げた。

プリオンに関する研究では、プリオン病の早期診断法の開発や異常プリオン産生の分子機構に関する研究を行った。さらに、平成13年12月からウェスタンブロッティング法による牛海綿状脳症(BSE)の行政検査を担当することになり、平成14年度は40件の確定検査を行った。また、平成12年度から開始された科学技術振興事業団重点研究支援課題「プロテオーム解析(プロテオミクス)による感染症研究」は、当部を主軸に順調に行われた。

西島は、厚生労働省の薬事・食品衛生審議会臨時委員、薬事バイオテクノロジー部会員、医薬品副作用被害救済・研究新興調査機構の技術評価委員会専門委員、基礎研究委員会専門委員、GLP評価委員会委員などの任を果たした。なお、深澤征義主任研究官は4月から米国スローンケテリング研究所へ、川崎清史主任研究官は7月から米国ワシントン大学医学部へそれぞれ2年間の予定で出張に出た。出張地における両氏の益々の研究発展を期待する次第である。

本年度も当研究部の研究に対し、経常研究費に加え、文部科学省、科学技術振興事業団(戦略的基礎研究推進

事業) HS財団などから多くの研究費を頂く榮に浴した。なお、平成9年度から6年間に亘り西島が代表を務めた文部科学省科学技術振興調整費総合研究「生体膜脂質の新しい機能の解析技術と制御技術の開発に関する研究」を数多くの研究成果とともに平成14年をもって終了することができた。ここに感謝の意を表するとともに、今後とも、化学部以来の善き伝統を引き継ぎ、感染症研究所の基礎研究を担う部として、感染症研究の基盤となる独創性の高い研究成果がでるよう最善の努力をしたいと思う。各位のご理解と暖かいご支援をお願いしたい。

以下に本年度の成果を記す。

研究業績

1. 生体膜の代謝・機能の解析とその感染症研究への応用

1. 動物培養細胞の膜変異株等を用いた膜機能の解析

1-1. 動物細胞におけるホスファチジルセリンの代謝及び生物学的役割に関する研究

(1) ホスファチジルセリンの生合成調節機構に関する研究

我々は以前、動物細胞の主要リン脂質の一つであるホスファチジルセリン(PS)の生合成が、PSによるフィードバックコントロールを受けることを見いだした。さらに、このコントロールでは、PSによるPS合成酵素活性のコントロールが重要であることを明らかにした。そこで本年度我々は、PSによるPS合成酵素活性の制御機構を精製酵素を用いて解析することを目的に、同酵素の精製を試みた。酵素の精製は、FLAGとHAペプチドを連結した組み換え型のPS合成酵素2をCHO細胞において発現させ、それらペプチドに対する抗体を用いたアフニティーカラムクロマトグラフィーにより行った。その結果、同酵素をSDS-PAGE上でほぼ単一バンドになるまで活性を保ったまま精製することに成功した。さらに、精製酵素の活性が外因性のPSにより阻害される

ことを明らかにした。従って、PS合成酵素とPSの直接の相互作用が、細胞内のPS量を正常に維持するために重要であることが示唆された。[久下 理、西島正弘]

(2) シンドビスウィルス(SIN)レプリカーゼによる遺伝子発現における宿主細胞膜ホスファチジルセリン(PS)の機能

ア. PS合成変異株におけるSINレプリカーゼによる遺伝子発現の解析

SINレプリカーゼによる遺伝子発現におけるPSの役割を明確にする目的で、レポーターとしてlacZ遺伝子を組み込んだSINレプリコンRNAをCHO細胞のPS合成変異株PSA-3に導入し、レプリカーゼによる転写産物(lacZmRNA)量を解析した。PSA-3細胞はPSを添加して培養すると(PS+細胞)、正常なリン脂質組成を示すが、PS無添加で培養すると(PS-細胞)、PSとホスファチジルエタノールアミン(PE)の含量が低下する。レプリコンRNAを導入したPS+細胞とPS-細胞でlacZ mRNAレベルに差はなかったが、PS-細胞抽出液中のガラクトシダーゼ活性はPS+細胞の酵素活性の約30%に低下していた。PS-細胞の蛋白質合成能は正常レベルであると示唆されていることから、SINレプリカーゼによる遺伝子発現において、RNAの合成後から翻訳までの過程にPS(またはPE)が関与していることが考えられた。[齊藤恭子、久下 理、西島正弘]

イ. mRNAキャッピング酵素nsP1の膜結合におけるPSの関与

SINレプリカーゼを構成するmRNAキャッピング酵素nsP1は脂肪酸修飾されており、膜に強固に結合している。一方、脂肪酸修飾されない変異を導入したnsP1も、膜に弱く結合することから、脂肪酸修飾以外の膜結合機構も存在する。nsP1の膜結合におけるPSの関与を調べる目的で、SINレプリコンRNAをPSA-3株に導入し、膜画分(10万g沈澱)と可溶性画分(10万g上清)へのnsP1の分布を調べた。PS+細胞とPS-細胞において、殆どのnsP1は膜画分に存在しており、顕著な差はみられなかった。しかし脂肪酸修飾を受けない変異を導入したnsP1の場合、PS+細胞では約80%が膜画分に存在していたのに対し、PS-細胞では、膜画分への分布が約60%へと減少した。以上から、nsP1の膜結合にPS(またはPE)が関与することが示唆された。[齊藤恭子、久下 理、西島正弘]

(3) ホスファチジルセリン合成酵素1の活性部位及び調節部位の探索

我々は、哺乳動物細胞におけるホスファチジルセリン(PS)生成成及びその調節過程の分子機構を解明する一環として、PS合成酵素(PSS)1の活性およびその調節に関わるアミノ酸残基の特定を試みた。PSS1は、PSS1と同様に塩基交換反応によりPSを合成し、その活性

が外来性PSにより阻害されるもう一つのPS合成酵素であるPSS2とアミノ酸配列において類似性(約30%の同一性)を示す。そこで、これら2つの酵素に共通する66の極性アミノ酸残基に着目し、それらアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異型PSS1をコードする66種のプラスミドを構築した。得られた各プラスミドをCHO細胞に導入し、それぞれの変異型PSS1を発現させた結果、アラニン置換することによりPS合成調節に異常を生ずるもの、PS合成活性或いは酵素発現量を著しく低下させるものをそれぞれ6残基、13残基見出した。本知見は、今後のPSS1の膜配向性の解析、更には二次元・三次元的構造解析とともに、PSS1の活性発現機構と活性調節機構の解明に極めて重要な知見と考えられる。[大沢智子、久下 理、西島正弘]

1-2. 高等動物細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝と機能に関する研究

(1) セリンパルミトイル転移酵素(SPT)LCB1サブユニットの細胞内局在とトポロジー

スフィンゴ脂質合成の初発ステップを担うSPTは、二つのサブユニット(LCB1およびLCB2)から成る複合体膜酵素である。当研究室では、LCB1の発現が欠損したCHO細胞変異株・LY-B株を分離している。N末もしくはC末にHAエピトープタグを付加したLCB1をLY-B細胞に発現させるとSPT活性が回復した。エピトープを指標にしてLCB1の細胞内局在および膜トポロジーを解析したところ、LCB1は小胞体に局在し、そのN末は小胞体内腔側に、C末は細胞質側に配向していることが明らかとなった。LCB1の膜貫通領域はN末に近い領域に一カ所だけと予測されるので、LCB1はその大部分を細胞質側に向けた小胞体膜タンパク質と結論した。[安田智、西島正弘、花田賢太郎]

(2) LCB1の機能

LCB1発現が欠損したLY-B株では、LCB2発現レベルも低下していることをウエスタンブロット解析によって見出した。LCB1 cDNAをLY-B細胞に導入すると、LCB2発現が野生型レベルに回復した。また、LCB2の過剰発現にはLCB1の共過剰発現が必要であり、過剰生産されたLCB2のほぼ全ての分子は、LCB1と複合体を形成していた。一方、LCB1は、LCB2の共過剰発現がなくとも、単独での過剰発現が可能であった。これらの結果から、LCB2の安定維持にはLCB1との会合が必要であることが明らかとなった。[花田賢太郎、安田 智、西島正弘]

(3) 先天性感覚神経障害1型(HSN1)の原因変異がSPT活性におよぼす影響

常染色体優性遺伝病であるHSN1はLCB1遺伝子の特異的なミスセンス変異を伴うことが報告されたので、こ

の変異が SPT 活性に及ぼす影響を解析した。HSN1 患者由来の細胞では、健常者対照に比べて有意に SPT 活性が低く、スフィンゴ脂質生合成も低下していた。ただし、LCB1,LCB2 タンパク質発現レベルには変化がなかった。また、CHO 細胞に HSN1 型 LCB1 cDNA 発現させると SPT 活性はむしろ抑制された。HSN1 型 LCB1 は、LCB2 と複合体を形成するものの SPT 活性は示さなかった。これらの結果から、HSN1 型変異 LCB1 は、LCB2 と不活性型の複合体を形成し、SPT 活性を優性抑制することが明らかとなった。[花田賢太郎、安田 智、西島正弘：内田良一、Walter Holleran (カリフォルニア大)、Khemissa Bejaoui, Mengfatt Ho, Robert Brown Jr. (デイ神経筋肉研究所)]

(4) 細胞内セラミド輸送欠損変異株の機能的相補遺伝子クローニング

LY-A 株は、セラミドの ATP 依存性小胞体-ゴルジ体間輸送が欠損しているためスフィンゴミエリン (SM) 生合成が低下している CHO 細胞変異株である。HeLa cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターを用いて LY-A 株に導入後、SM 生合成が回復した形質転換株を分離し、回復株からゲノミック PCR によって cDNA を回収した。回収した cDNA を LY-A 細胞に再導入すると SM 生合成は回復した。このようにして、LY-A 株の SM 生合成を回復させる因子(CERT と命名)をコードする遺伝子 cDNA のクローニングに成功した。[花田賢太郎]

(5) LY-A 変異株の原因変異の同定

ヒト由来 CERT cDNA を LY-A 細胞に導入しても、SM 合成酵素活性や ATP 非依存性セラミド輸送の高進は起こらず、ATP 依存性小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送が特異的に回復した。さらに、野生型 CHO 細胞と LY-A 細胞からそれぞれ CERT cDNA をクローニングして比較したところ、LY-A 細胞由来 CERT は、67 番目のグリシンがグルタミン酸に置換(G67E)していることを見出した。LY-A 細胞は、野生型 CERT の導入で機能回復したが、G67E 変異型 CERT では回復しなかった。これらの結果から、当該 CERT 変異が、LY-A 変異細胞におけるセラミド輸送欠損の原因変異であることが明らかとなった。[花田賢太郎、安田 智、西島正弘]

(6) CERT のスプライシング異性体

CERT は、598 アミノ酸からなる親水性タンパク質であり、アミノ末端約 120 アミノ酸領域にプレクストリンホモロジー(PH)ドメインを、カルボキシル末端約 230 アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移(steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START)ドメインを、それらの中間領域(middle region, MR)のドメインと大きく3つのドメインを持っている。また、MRドメインとSTART

ドメインの間に26アミノ酸が挿入されたスプライシング異性体(CERT_L)が存在する。LY-A細胞にCERT_L cDNA を導入すると、CERT cDNAの場合と同様に、機能回復した。この結果は、CERT_Lは、CERTと同じようにセラミド輸送に関わる機能を持っていることを示している。[花田賢太郎]

(7) CERT が触媒するセラミドの脂質膜からの遊離

放射性セラミドを含有するリン脂質多重膜小胞を遠心すると、セラミドはほぼ完全にリン脂質小胞とともに沈殿した。しかし、精製した組換え体 CERT が共存する場合には、リン脂質多重膜小胞は完全に沈殿しながらも、セラミドは膜から遊離して CERT とともに上清み画分に分配するようになった。他の様々な脂質に対する遊離活性を調べたが、セラミド以外の遊離活性は CERT にはなかった。これらの結果から、CERT は特異的にセラミドを膜から遊離させる活性を持つことが明らかになった。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(8) セラミド遊離活性を持つドメインの特定

CERT の持つ3つのドメイン、すなわち、PH, MR, START の各ドメインの欠失組換え体を用いた解析によって、セラミド遊離活性を持つドメインを特定した。セラミド遊離活性は、START ドメインを欠くと完全に消失し、一方、START ドメインのみから成る組換え体でもセラミド遊離活性を示した。よって、CERT のセラミド遊離活性は、START ドメインが持つ活性であることが明らかとなった。[熊谷圭悟、三浦有紀子、花田賢太郎]

(9) CERT が有する PH ドメインの役割

PH ドメインはホスファチジルイノシトール(PI)リン酸化体への結合能を有する。CERT の PH ドメインの結合脂質選択性を調べたところ、PI-4-リン酸(PI4P)を特異的に認識することが明らかとなった。LY-A 細胞由来の G67E 変異 CERT では、この PI4P 結合能が失われていた。PI4P 特異的 PH ドメインはゴルジ体にターゲティングすると考えられている。よって、CERT の PH ドメインはゴルジ体ターゲティングに関わり、G67E 変異で本ターゲティング機能が損なわれると示唆される。[熊谷圭悟、三浦有紀子、花田賢太郎]

(10) セラミド輸送の選択的障害剤

化学合成によって得られた新規化合物・(1R,3R)HPA-12 がセラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を阻害することを昨年度までに示している。本年度は、(1R,3R)HPA-12 の様々な誘導体を合成し、構造活性相関を解析した。その結果、アミドアシル基の長さは C13 が至適であること、二つある水酸基の両方が活性に必須であることなどを明らかにした。[熊谷圭悟、安田智、花田賢太郎：小林修(東大薬学大学院)]

(11) 哺乳動物スフィンゴミエリナーゼ(SMase)が有するスフィンゴシルホスホコリン分解活性

中性pH領域に至適pHのある中性SMase (nSMase)として、哺乳動物ではnSMase1 およびnSMase2 という2種類のタンパク質が遺伝子クローニングされている。界面活性剤非存在下でのアッセイでは、nSMase-1 はリソホスファチジルコリン(LPC)やリソ血小板活性化因子(LPAF)も加水分解することが知られている。しかし、これらnSMaseが、リソ型SMであるスフィンゴシルホスホコリン(SPC)を基質にするか否かは不明であった。ヒト由来nSMase-1 もしくはnSMase-1 cDNAを導入したHEK293細胞から調製した膜画分を酵素源として、また、[コリン-メチル-¹⁴C]SMを脱アシル化して調製した[コリン-メチル-¹⁴C]SPCを基質としてアッセイしたところ、両SMaseともにSPCに対するホスホリパーゼC活性を示した。本活性は、界面活性剤やnSMase阻害剤であるスキホスタチンで阻害された。

[三浦有紀子、後藤恵理子、西島正弘、花田賢太郎]

1-3. エキソソームに関する研究

本研究では、エキソソームの脂質分析およびプロテオーム解析を行い、それらの結果を基盤にエキソソームの形成機構を解明し、エキソソームの抗がんワクチン製造への応用を目指している。昨年度は、B細胞からのエキソソーム分離法を確立し、その脂質分析を行った。本年度はエキソソームのプロテオーム解析を行った。EBウイルスでトランスフォームしたヒトB細胞株COHS-4の培養液を集め、100,000 x g, 60 min 遠心して沈殿を回収し、その後、sucrose density gradientを行ってエキソソームを分離した。なお、培養に用いる血清は、100,000g, 60 minで遠心処理してその沈殿物を除去したものをを用いた。sucrose density gradient後の各フラクションにおけるMHCクラスIIの存在をanti-human HLA-DRで調べたところ、密度 1.2 付近に検出された。¹⁴C-acetateで標識した細胞の培養液から分離したエキソソームもほぼ同様の位置に回収された。また、エキソソームの蛋白質組成は、細胞全体の膜画分の蛋白質組成とは大きく異なっていた。これらの結果から、純度の高いエキソソームが得られたものと考えられる。エキソソーム蛋白質を一次元電気泳動で分離し、CBBで染色されるやく30のバンドについて、MALDI/TOFS質量分析器で解析を行った。PMF法により、現在までに5個の蛋白質を同定した。現在、他の蛋白質の同定をさらに進めているところである。

[西島正弘、佐藤慈子、三浦雅美]

2. 膜応答機能の解析

2-1. エンドトキシンによるマクロファージ活性化機構に関する研究

(1) Orn 含有脂質によるマクロファージの活性化機構に関する研究

アミノ含有脂質である Orn 含有脂質にはマウスマクロファージを活性化して特に IL-1 の産生を誘導する活性がある。本研究では Orn 含有脂質による IL-1 産生の機構について検討した。その結果、ミセル状に会合した Orn 含有脂質でマクロファージを刺激すると IL-1 は産生されるが、単分子状態の Orn 脂質で刺激すると IL-1 が殆ど産生されないことが解った。さらに、TLR-4 と CD14 の変異マクロファージでは IL-1 が産生されないことからマクロファージにおける Orn 含有脂質の認識経路は LPS(リポ多糖)の認識経路と同じである事が判った。以上の結果はマクロファージの TLR-4 を介した脂質の認識は単なるリガンドとレセプターの結合では説明できない機構が存在することを示唆している。[桶本和男、川崎清史、西島正弘]

(2) リポ多糖の毒性に関する研究

Lipid A はリポ多糖(LPS)の活性部位であるが、その構造により生物活性にも違いが認められる。例えば、LPSの部分分解産物 monophosphoryl lipid A (MPL)は LPSと異なり細胞毒性を示さないことが知られている。しかしながら、なぜ lipid A の構造によって生物活性に差が生じるのかは明らかになっていない。ところで caspase-1 のノックアウトマウスは LPS の毒性に対して耐性である。本研究では caspase-1 活性を lipid A および MPL で刺激したマウス腹腔マクロファージ (mpMphs) で比較検討した。その結果、lipid A と異なり MPL は mpMphs の caspase-1 を活性化しなかった。MPL は NF B を活性化する事から、LPS は未知のシグナル伝達経路を介し caspase-1 を活性化して毒性を示すと考えられ現在解析中である。[桶本和男、川崎清史、西島正弘]

II. 生体高分子の生化学的・物理化学的研究

1. C型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) C型肝炎ウイルスコアタンパク質が脂肪滴タンパク質組成および脂肪滴機能に及ぼす影響の解析

C型肝炎ウイルス(HCV)による肝炎では、脂肪蓄積(脂肪肝)が生じる。このとき細胞内には脂肪滴が認められるが、HCV コアタンパク質は小胞体に加えて脂肪滴にも局在することが知られており、コアタンパク質が脂肪滴上で何らかの機能を果たしていることが予想される。そこで培養肝細胞にコアタンパク質を発現させ、脂肪滴タンパク質群の発現プロファイルを質量分析により解析し、新規に得られた以下の知見に着目した。〔1〕脂肪滴上には、小胞輸送における役割が未だ明確にされていない数種の Rab タンパク質が存在する。〔2〕コアタンパク

質発現により、核酸代謝酵素と思われる数種の機能未知タンパク質が脂肪滴上に増加する。これらの現象が脂肪滴の生成と機能に及ぼす影響を解析するため、RNAi法によるRabタンパク質等の発現抑制実験を開始し、検討を進めている。[深澤征義、佐藤慈子、永井有紀、山河芳夫、西島正弘(細胞化学部)鈴木哲朗、宮村達男(ウイルス2部)]

(2) C型肝炎ウイルスのコア蛋白発現による肝細胞のプロスタグランジン合成系への影響について

プロスタグランジン(PG)合成阻害剤である非ステロイド性抗炎症剤が大腸癌等の治療に有効であることが近年明らかになってきた。一方、肝臓癌の大きなリスクファクターとしてC型肝炎ウイルス(HCV)の感染が注目されている。また、HCVのコア蛋白を発現させたトランスジェニックマウスを用いた研究によりこの蛋白の発現が肝臓癌の発生に関わっていることが示唆されている。しかしその詳細な機序については未だ説明されていない。本研究ではHCV感染による肝臓癌の発生にPGが関与している可能性について、コア蛋白を発現する培養肝細胞を用いて解析を進めた。その結果、コア蛋白発現細胞では発癌プロモーターの刺激により通常は誘導されていない誘導型プロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素(PGHS)-2が誘導されること、非誘導型のPGHS-1の抗原量がコア蛋白非発現細胞とは異なることが示唆された。以上からHCVの感染におけるコア蛋白の発現は肝細胞のPG代謝に影響を及ぼすと考えている。HCVの研究に於いてこのウイルスの感染がホストのPG代謝に及ぼす影響を解明することは、今後肝臓癌の予防と治療の方法を確立する上で新たな方向性を開く重要なテーマではないかと思われる。更に検討を進めている。[田中康仁、小甲真央、佐藤慈子、永井有紀、西島正弘；鈴木哲朗、宮村達男(ウイルス2部)]

2. プリオン病に関する研究

(1) プリオン病治療薬としての β -Sheet Breakerペプチドの再検討

異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})は、正常型プリオン蛋白質(PrP^{C})の高次構造が何らかの機構によって変換して生じる。プリオン蛋白質のAla¹¹⁵・Val¹²²に相当する断片(β -Sheet Breakerペプチド)は PrP^{C} から PrP^{Sc} への変換を抑制すると報告されている[C. Soto et al., Lancet, 355, 192 (2000)]が、この抑制効果の真偽については十分な検討が為されていない。今回、 PrP^{Sc} を産生する培養神経細胞(ScN2a)を用いて β -Sheet Breakerペプチドによる PrP^{Sc} への変換抑制効果を追試したところ、抑制効果は認められなかった。そこで、プリオン蛋白質に対する β -Sheet Breakerペプチドの親和性を高めるためにnorbornene基を介して β -Sheet Breakerペプ

チドを重合させた β -Sheet Breakerペプチド・ dendリマーを化学合成した。Dendリマーはモノマー・ペプチドよりも PrP^{C} との解離定数が10倍向上していることが表面プラズモン分析により示されたにもかかわらず、Dendリマーにおいても PrP^{Sc} 変換に対する抑制効果は得られなかった。[萩原健一、有本博一*、大石剛久*、山河芳夫、西島正弘(*名古屋大学大学院・理学研究科)]

(2) 異常型プリオン蛋白質の生成過程についての研究

蛋白質の生合成では、高次構造が正しく折りたたまれる(フォールディング)ことが重要である。近年、小胞体に局在する幾つかの蛋白質が、蛋白質・生合成の初期ステップにおいてフォールディングの校正・制御を行う品質管理の役割を果たしていることが明らかになってきた。正常型プリオン蛋白質(PrP^{C})から異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})への変換は細胞膜上で起こると予想されているが、詳細は解明されていない。小胞体での品質管理が不正確なために、正しくフォールディングされていないプリオン蛋白質が細胞膜に輸送され、細胞膜上で容易に PrP^{Sc} に変換するのではないかという可能性を検討するために、 PrP^{C} を産生する培養神経細胞(N2a)および PrP^{Sc} を産生するScN2a細胞について、小胞体でのフォールディングの校正・制御に関わるCHOP、GRP78の発現・誘導量をツニカマイシンやジチオスレイトール処理による小胞体ストレス負荷時ないし非負荷時において比較した。その結果、2つの細胞種において有意差は認められず、両者の小胞体での品質管理に機能的差異は無いと考えられた。このことから、おそらく PrP^{Sc} の産生は、その生合成の初期ステップ以降に起因していると考えられる。[萩原健一、山河芳夫、西島正弘]

(3) ウシ海綿状脳症病原体(PrP^{BSE})の生体内分布

ウシ海綿状脳症(BSE)に罹患していることが確認された2頭のウシ(ホルスタイン種、雌、平成8年生)について病原体であるプロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク(PrP^{BSE})の組織分布と相対的な含量についてウエスタンブロット法で検討した。その結果、特定危険部位である脳、脊髄など中枢神経系及び回腸遠位部及び、脊髄に接する背根神経節のうち頸神経節、胸(6-7神経節)腰神経節及び前殿神経節に PrP^{BSE} の蓄積を認めたが、肩甲上神経節、脛神経節及び尾神叢では PrP^{BSE} は検出限界以下であった。なお、回腸遠位部における PrP^{BSE} の蓄積はアウエルバッハ神経叢であり、筋肉層には PrP^{BSE} は蓄積していないことが免疫組織染色によりあきらかとなった。一方、各所のリンパ節、脾臓、扁桃その他の実質臓器には PrP^{BSE} の蓄積を認めることは出来なかった。これらの結果からBSEでは異常型プリオンは神経組織に特異的に蓄積し、中枢神経系に加えてリンパ系組織にも異常型プリオンが蓄積するヒツジの海綿状脳症であるスクレーピーと異なる分布を示すことが明らかとなった。[山河

芳夫、萩原健一、納富香子、西島正弘]

(4) 防御型プリオンタンパク質を用いたプリオン病の治療開発に関する研究(1)

ヒトのプリオン遺伝子のコドン219のグルタミン酸がリジンに置換された遺伝子多形(219K)を有する個体はプリオン病に抵抗性を有することが知られている。これは、219Kが正常型プリオンタンパク質(PrP^C)から異常型(PrP^{Sc})への複製反応を触媒すると考えられているシャペロン様物質(プロテインX)と強く結合してその活性を阻害する為であると考えられており、219Kが持つこのような作用はプリオン病の治療薬として有望な因子である。今回、ヒトの219K多形に相当するマウスのリコンビナントタンパク(moPrP218K)がプリオン持続感染株であるScN2a細胞のPrP^{Sc}の産生を抑制するか否かを検討した。その結果、培地に添加したmoPrP218Kが濃度依存的に(1 µg/ml以上)PrP^{Sc}の産生を抑制し、内在蓄積したPrP^{Sc}も除去され減少することが確認され、moPrP218Kがプリオン病の治療に応用する事が出来る可能性が強く示唆された。[岸田日帯*、山河芳夫、萩原健一、金子清俊*、西島正弘(*国立精神・神経センター)]

(5) プリオン蛋白質由来のペプチド断片による異常型プリオン蛋白質の蓄積阻害に関する研究

プリオン病に特異的に認められる異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})は正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の構造変化により生じると考えられており、PrP^{Sc}の蓄積機構を明らかにし、その蓄積を防ぐことがプリオン病の発症予防、治療につながる事が期待される。本年度の研究では、PrP^{Sc}のコア部分(90-231)のアミノ酸配列を模したペプチド断片10種を合成し、それらのペプチドのプリオン持続感染神経芽細胞細胞(ScN2a)のPrP^{Sc}の蓄積に及ぼす影響を検討した。その結果、PrP^Cの第一ヘリックスと第二ヘリックスを結ぶ非構造部分のアミノ酸配列を持つペプチド(P9)がScN2aの細胞内PrP^{Sc}蓄積量を著しく減少させることが判った。本ペプチドのPrP^{Sc}蓄積阻害の機構の詳細について、現在検討中である。[中村優子、萩原健一、山河芳夫、西島正弘]

III. 細胞膜の構造・機能と細胞病態変化の解析

1. 糖輸送タンパク質の発現と細胞膜分布

ヒト子宮がん由来 HeLa 細胞の腫瘍性は未知の癌抑制遺伝子により制御されている。正常ヒト細胞との融合により in vivo 腫瘍性の抑制された HeLa 融合細胞は糖輸送タンパク質 GLUT1 を発現しているのに対し、腫瘍性融合細胞は GLUT3 を共発現していた。腫瘍細胞の増殖、転移における糖輸送タンパク質の役割を検討するため、細胞膜における局在性を検討した結果、これら糖輸送タンパク質は異なる細胞膜ドメインに存在し、GLUT1 は界

面活性剤に難溶性のラフトなどの脂質膜ドメインに存在することが示唆された。そこで、タグ付きベクターに組み込まれた遺伝子を CHO 細胞に強制発現した結果、これらの糖輸送タンパク質はそれぞれ特異的な細胞膜ドメインに分布した。糖輸送タンパク質の細胞膜分布を制御する機能ドメインについてさらに検討中である。[佐京智子、北川隆之]

2. 糖輸送タンパク質ファミリーの細胞膜分布と制御因子

促進拡散型糖輸送タンパク質ファミリーの発現は臓器、細胞に特異的で、上皮細胞では極性分布を示し、局在性と機能制御の密接な関連が推定される。そこで、糖輸送タンパク質の細胞膜分布を制御する機能タンパク質を探索する目的で、ヒト上皮系細胞株 A431 を用いて検討した。その結果、細胞接着性因子の E-カドヘリンが、カテニンと複合体を形成し、GLUT1 とともに界面活性剤難溶性の脂質膜ドメインに分布することが示唆された。これらの分子間相互作用をさらに検討中である。[佐京智子、北川隆之]

IV. 行政検査実績

項目：ウシ海綿状脳症のウエスタンブロット法による確認検査

平成14年度(自平成14年4月至平成15年3月)における検査受付及び結果は以下のとおりである。

検体受付 40 (陰性37、陽性2、判定不能1)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 01) K. Hanada, N. M. Q. Palacpac, P. A. Magistrado, G. Rai, D. Sakata, T. Hara, D. Chakraabarti, T. Horii, M. Nishijima, and T. Mitamura: Plasmodium falciparum Phospholipase C Hydrolyzing Sphingomyelin and Lysocholinephospholipids: A Possible Target for Malaria Chemotherapy. *J. Exp. Med.*, 195, 23-34, 2002
- 02) K. Gomi, K. Kawasaki, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Immunol.*, 168, 2939-2943, 2002
- 03) K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J.

- Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori: A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99, 7669-7674, 2002
- 04) F. Lafont, G. T. van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F. Gisou van der Goot: Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol-sphingolipids raft-mediated CD44-IpaB interaction. **EMBO J.** 21, 4449-4457, 2002
- 05) B. Wispriyono, E.M. Schmelz, H. Pelayo, K. Hanada, and D. Separovic: A role of the de novo sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. **Exp. Cell Res.** 279, 153-165, 2002
- 06) K. Bejaoui, Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R.H. Brown Jr., W.M. Holleran, and K. Hanada: Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant-negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. **J. Clin. Invest.** 110, 1301-1308, 2002
- 07) Y. Kawai, M. Watanabe, M. Matsuura, M. Nishijima, and K. Kawahara: The partially degraded ipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* and ornithine containing lipids derived from some gram-negative bacteria are useful complex lipid adjuvants. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 34, 173-179, 2002
- 08) T. Sakyō, and T. Kitagawa: Differential localization of glucose transporter isoforms in non-polarized mammalian cells: distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. **Biochim. Biophys. Acta**, 1567, 165-175, 2002
- 09) S. Yasuda, M. Nishijima, and K. Hanada: Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, 278, 4176-4183, 2003
- 10) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, and M. Nishijima: Synthesis of lipid A type carboxymethyl derivatives with ether chains instead of ester chains and their LPS-antagonistic activities. **Carbohydr. Res.** 338, 47-54, 2003
- 11) K. Kawasaki, H. Nogawa, and M. Nishijima: Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. **J. Immunol.** 170, 413-420, 2003
- 12) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, and M. Nishijima: Synthesis of lipid A type carboxymethyl derivatives with ether chains instead of ester chains and their LPS-antagonistic activities. **Carbohydr. Res.** 338, 47-54, 2003
- 13) O. Kuge, and M. Nishijima: Biosynthetic regulation and intracellular transport of phosphatidylserine in mammalian cells. **J. Biochem.** (review) in press.
- 14) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular basis for lipopolysaccharide mimetic action of taxol and flavolipin. **J. Endotoxin Res.** in press
- 15) K. Kawasaki and M. Nishijima: Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from cultured mammalian cells. Membrane protein protocols: Expression, purification, and Characterization. Edited by B.S. Selinsky, **Methods in Molecular Biology (Vol 228), Membrane Protein Protocols** Human Press, in press
- 16) K. Hanada and M. Nishijima: Purification of mammalian serine palmitoyltransferase, a hetero-subunit enzyme for sphingolipid biosynthesis by affinity-peptide chromatography Methods in Molecular Biology: Membrane Protein Protocols, Edited by S. Selinsky, **Methods in Molecular Biology (Vol 228), Membrane Protein Protocols** Human Press, in press

2. 和文発表

- 01) 川崎清史, 西島正弘: Toll-like receptor 4 の新しいリガンド: Flavolipin, エンドトキシン研究 5, 45-49, 2002
- 02) 川崎清史, 西島正弘: LPS 及び LPS アゴニストの認識・識別に関わる分子, 別冊・医学のあゆみ「動物界における免疫系の進化」, 医歯薬出版, 52-56, 2002
- 03) 川崎清史: エンドトキシン受容体としての Toll-like receptor 研究, 臨床と微生物 30, 255-259, 2003
- 04) 西島正弘: ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ, タンパク質化学第 4 巻酵素, 廣川書店, 67-71, 2002
- 05) 西島正弘: 新興・再興感染症, 病原微生物学, 東京化学同人, 65-70, 2002
- 06) 萩原健一: 酵素的分析法 (第 4 章 10 節 2 節), 分析試料前処理ハンドブック 中村洋編, 丸善, 2003

II. 学会発表

1. 国際学会

- 01) M. Nishijima: Biochemical study of intracellular transport of phosphatidylserine in CHO cells. Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Symposium on Lipid Traffic and Enzymology in Membrane Assembly. 2002.4.23, New Orleans, USA
- 02) M. Nishijima: Genetic and Biochemical Studies on the Biosynthesis and Functions of Membrane. Phospholipids in Mammalian Cells. 15th International Symposium on Plant Lipids. 2002.5.14, Okazaki
- 03) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular Basis for Lipopolysaccharide Mimetic Action of Taxol and Flavolipin. The 7th conference of the international endotoxin society. 2002.7., Washington, D.C., U.S.A.
- 04) K. Bejaoui, Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R. H. Jr. Brown, W. M. Holleran, and K. Hanada: Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant-negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. 6th Membrane Research Forum, 2002.11.5, Nagoya
- 05) K. Gomi, K. Kawasaki, and M. Nishijima: Toll-like receptor 4-MD2 complex mediates a signal induced by serine-glycine containing lipid (flavolipin) of *Falvobacterium meningosepticum*. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2003.8.24-27, Awaji Island
2. 国内学会
- 01) 川崎清史: カルジオリピン合成系酵素温度感受性変異株における酸化ストレスによる細胞死の解析, 第44回日本脂質生化学会 2002.6.14 (東京)
- 02) 花田賢太郎: スフィンゴ脂質代謝異常と疾患, 平成14年度日本油化学会 生物科学・工学部会セミナー 2002.6.21
- 03) 花田賢太郎: スフィンゴ脂質合成の鍵酵素・セリンパルミトイル転移酵素: 構造と機能および遺伝病, 第112回東京脂質談話会 2002.7 (東京)
- 04) 佐京智子, 北川隆之: 糖輸送タンパク質ファミリー GLUT1の細胞膜分布と細胞骨格の関与, 第75回日本生化学会大会 2002.10.15 (京都)
- 05) 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 鈴木哲朗, 宮村達男, 西島正弘: 脂肪滴のプロテオーム解析, 第75回日本生化学会大会 2002.10.15 (京都)
- 06) 西島正弘, 相良康子, 小嶋英二郎, 川崎清史, 白木洋, 前田義章: HTLV-1 感染受容体における Phosphatidylglycerol の役割, 第75回日本生化学会大会 2002.10.15 (京都)
- 07) 久下 理, 大澤智子, 西島正弘: 動物細胞におけるホスファチジルセリン合成の制御機構, 第75回日本生化学会大会, シンポジウム: 脂質代謝と膜輸送の接点 2002.10.16 (京都)
- 08) 中村優子, 萩原健一, 山河芳夫, 西島正弘, 佐伯圭一, 小野寺節: ウィルス感染時におけるプリオン蛋白質の機能関与, 第75回日本生化学会大会 2002.10.16 (京都)
- 09) 大内史子, 西島正弘, 金子清俊, 山河芳夫: プリオン病のプロテオーム解析, 第75回日本生化学会大会 2002.10.16 (京都)
- 10) 岸田日帯, 逆瀬川裕二, 青戸久美子, 鎌田礼子, 山河芳夫, 西島正弘, 黒岩義之, 八谷如美, 金子清俊: 防御型プリオンタンパク質を用いたプリオン病の治療法開発の培養細胞における検討, 第75回日本生化学会大会 2002.10.16 (京都)
- 11) 田中康仁, 滝澤万紀子, 五十君静信, 天野富美夫: RAW 264.7 マクロファージ細胞における非ステロイド系抗炎症剤による PGHS-2 誘導の促進とプロスタグランジン合成阻害への影響について, 第75回日本生化学会大会 2002.10.16 (京都)
- 12) 花田賢太郎, 安田智, 西島正弘: Bejaoui Khemissa: 遺伝性知覚神経障害 I 型の原因変異がスフィンゴ脂質合成初発酵素・セリンパルミトイル転移酵素に及ぼす優性欠損効果, 第75回日本生化学会大会 2002.10.17 (京都)
- 13) 西島正弘, 中島龍, 今井浩孝, 北島理沙, 川崎清史, 中川靖一: カルジオリピン合成系酵素による酸化ストレスによる細胞死の抑制機構の解析, 第75回日本生化学会大会 2002.10.17 (京都)
- 14) 相良康子, 井上由紀子, 小嶋英二郎, 川崎清史, 西島正弘, 白木洋, 前田義章: HTLV-1 感染受容体における Phosphatidylglycerol の役割: 第2報 Role of Phosphatidylglycerol in Receptor Complex for Cell-to-cell Transmission of HTLV-1, 第75回日本生化学会大会 2002.10.17 (京都)
- 15) 花田賢太郎, 西島正弘: スフィンゴ脂質合成の鍵酵素・セリンパルミトイル転移酵素の遺伝生化学, 公開シンポジウム「ポストゲノム時代をリードするリビドバイオロジー」 2003.1.23 (東京)
- 16) 佐京智子, 北川隆之: Hela 融合細胞 における糖輸送タンパク質ファミリーの発現と細胞膜分布, 第123年会 日本薬学会 2003.3.27 (長崎)