

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、プリオン等の病原体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)の生合成機構とシンドビスウイ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)の行政検査を担当し、平成16年度は28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、引き続き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、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の救済・審査・安全業務運営評議会 審査・安全業務委員会委員、GLP評価委員会委員などの任を果たした。なお、北川隆之室長は平成17年3月31日

付で退職し、岩手医科大学共同研究部門薬学研究センター教授に就任した。同氏の益々の研究発展と活躍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栄に浴した。以下に本年度の研究成果を記す。

業績

調査・研究

・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とDDX1分子の相互作用

C型肝炎ウイルス(HCV)コアタンパク質発現培養肝細胞を用い、脂肪滴構成タンパク質の網羅的解析から、ATPase/RNAヘリカーゼであるDDX1分子の局在が特徴的に見られた。さらなる解析より、HCVコアタンパク質とDDX1分子は複合体を形成し、その結合にHCVコアタンパク質N末端の5アミノ酸が重要であることが明らかとなった。さらに、DDX1のATPase活性は、HCVコアタンパク質の存在下で顕著に増加することが明らかとなった。

[深澤征義、佐藤慈子、大澤智子、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が培養肝細胞の脂質分子組成に及ぼす効果について

C型肝炎ウイルスのコア蛋白発現により肝脂肪化から肝癌発症へとつながる脂質代謝変動が示唆されている。本研究ではコア蛋白を発現するHuh7培養肝細胞の脂質分子組成をマスマスペクトロメトリーを用いて解析し、コア蛋白の発現により多価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルエタノールアミン分子種が有意に減少することを

見い出した。コア蛋白の発現が肝脂質代謝の調節に重要な影響を与えていると思われる。機序解明に向け更に詳細な検討をおこなっている。

[田中康仁、矢部邦章、加藤健吾、佐藤慈子、深澤征義、西島正弘、鈴木哲朗、宮村達男（ウイルス2部）：田口 良（東京大学医学部メタボローム）]

2. プリオン病に関する研究

（1）プリオン病の発症過程におけるマウス脳のプロテオーム変動

マウス順化スクレーピー病原体（帯広1株）を接種したマウス脳を用いて異常型プリオンタンパク質（PrP^{sc}）の蓄積と相関して変動するタンパク質を経時的、網羅的に解析しつつある。既に、脳での PrP^{sc} の増加が顕著となる100日目以降で“Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)の増加や vacuolar ATPase の A-subunitの減少などを明らかにして来た(平成13年度年報)。本年度は更に解析を進めた結果、異常型プリオンタンパクの増加に伴って抗酸化ストレスタンパク質群の顕著な増加が認められ、PrP^{sc} の蓄積が何らかの酸化ストレスを細胞に与えていることが推定された。また、神経軸索の伸展に関わると考えられている CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2) のアイソマーが PrP^{sc} の増加に比例して増加していることなどが判った。

[大内史子、萩原健一、中村優子、山河芳夫]

（2）BSE 異常型プリオンの生体内分布（II）

ウシ海綿状脳症(BSE)に罹患している事が新たに確認された3頭のウシについて、病原体である異常型プリオンタンパク質 (PrP^{BSE}) の生体内分布をウエスタンブロット法で検索した。前回の調査されたウシでは中枢神経系・神経節及び、自然感染例の BSE 例ではそれまでに感染性が無いとされている回腸遠位部で PrP^{BSE} が検出されていた。今回、調べた感染牛ではそれらの部位に加えて一部の末梢神経（腰神経、大腿神経）にも PrP^{BSE} が検出された。検出された PrP^{BSE} の量は中枢神経系の1/1000程度と微量ではあるが、食肉からの末梢神経の除去は事実上不可能である事を考えると正確な BSE 検査により感染したウシを食物連鎖から完全に排除することが重要であると思われる。

[山河芳夫、萩原健一、中村優子、樋口好美*、佐多徹太郎*]* 感染病理部

（3）コレステロール生合成阻害剤による異常型プリオン蛋白質産生の抑制についての研究

PrP^{sc} に感染しているマウス神経芽腫細胞 neuro 2a (ScN2a 細胞)を用いた研究から、コレステロール生合成経路の後期過程をつかさどる 24-デヒドロコレステロール還元酵素の阻害剤である U18666A が PrP^C から PrP^{sc} への変換を抑制することを見いだした。ED₅₀ はおよそ 25nM であり、この値は、抗プリオン薬として治験が試みられているキナクリンの ED₅₀ 値の 1/20~1/40 に相当する。U18666A で処理した ScN2a 細胞では、総コレステロール量の有意な低下は無く、また、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の mRNA 量の変動も認められなかった。一方、24-デヒドロコレステロール還元酵素の阻害によって蓄積が予想されるデスモステロールを培地に添加すると PrP^{sc} の産生が抑制された。このことから、U18666A の PrP^{sc} の変換抑制の機構は中間体であるデスモステロール等の(一過性の)増量を介している可能性が考えられた。U18666A は、中枢神経系のコレステロール生合成研究においてラット等の実験動物へ投与された過去の事例がある。今後、作用機作の検討を培養細胞レベルにおいて継続するとともに、個体レベルでの抗プリオン薬としての効果を検討する。

[萩原健一、中村優子、西島正弘、山河芳夫]

（4）プリオン病の発症に及ぼすプリオンタンパク質由来のペプチド (P9FD) の影響

PrP^{sc} に持続感染しているマウス神経芽腫細胞 (ScN2a) においてプリオンタンパク質由来のペプチド P9FD の添加により PrP^{sc} の蓄積が強く阻害されることを明らかにしてきた(平成14、15年度)。本年度は、P9FD の抗プリオン薬として有効性を検討することを目的として、PrP^{sc} 感染マウスに P9FD を脳内接種し、発症、死亡するまでの期間を比較して P9FD の延命効果について検討した。結果、P9FD 非投与群では 168 ± 4 日でプリオン病を発症、死亡したのに対し、PrP^{sc} 接種後 60 日目に P9FD を投与した群では 174 ± 5 日、また、PrP^{sc} 接種

後 120 日目に P9FD を投与した群では 181 ± 5 日であり、わずかながら生存日数の延長がみられた。今後、P9FD による PrP^{sc} 分解の促進機構を明らかにすることにより、より効果的なプリオン病発症遅延効果が得られると期待される。

[中村優子、萩原健一、西島正弘、山河芳夫]

・エンドトキシンに関する研究

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

グラム陰性菌細胞壁由来のリポポリサッカライド (LPS) はしばしば致死的なエンドトキシンショックを引き起こすが、免疫反応を様々に誘導し賦活化することもまた知られている。ところで、LPS の活性部位である lipid A の部分加水分解産物 monophosphoryl lipid A (MPL) は LPS と異なり細胞毒性が弱いこと、LPS によるエンドトキシンショックを抑制することなどが知られている。しかしながら、その分子メカニズムは未だ不明である。Caspase-1 はこのエンドトキシンショックに関与していることから、我々は MPL 刺激と Caspase-1 活性の関係に着目し、マウスマクロファージの caspase-1 は lipid A により活性化され MPL では活性化されない事をあきらかにしてきた。さらに caspase-1 の活性化に必須と報告されている caspase-11 遺伝子は lipid A と MPL のどちらの刺激でも活性化する事を明らかにしてきた。MPL は TLR-4 を介した MyD88/NF- κ B 経路を活性化する一方で LPS とは異なり caspase-1 の活性化に関わる未知の経路を活性化しないことが示唆された。以上の現象が種特異的な現象かどうかを検証する目的で、本年度に於いて我々はマクロファージに分化させた人由来 THP-1 細胞を利用した。その結果、マウスマクロファージと同様に MPL 刺激では caspase-1 の活性化による IL-1 β の産生は認められなかった。本研究では LPS と同一のレセプター (TLR-4) を介しながら、MPL が人とマウスどちらのマクロファージに対して異なる活性化パターンを示す事を明らかにした。本研究の結果は炎症性疾患の発症機構の解明に寄与することが期待される。

[桶本和男、川崎清史、西島正弘]

2. リピド A 修飾と Toll-like receptor 認識に関する研究

サルモネラ菌などのグラム陰性病原細菌は宿主組織内で生存するためにリポ多糖などの表層成分の修飾を行いリモデリングすることが知られている。PmrC はホスホエタノールアミン転移酵素であり、リポ多糖リピド A 部位のリン酸基のホスホエタノールアミン修飾を行う。本修飾と Toll-like receptor 認識との関りを解明するために、PmrC を大腸菌に強制発現させて修飾型リポ多糖を産生させて、ホスホエタノールアミン型リピド A を精製した。TLR4 発現細胞株を精製リピド A で刺激して NF- κ B 活性化を測定したところ、非修飾型と修飾型では活性化の差は認められなかった。従って、ホスホエタノールアミン修飾によって宿主細胞による細菌認識は調節されないことが示唆された。

[川崎清史、西島正弘]

・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

哺乳動物細胞のホスファチジルセリン (PS) 合成酵素 (PSS) には PSS1 及び PSS2 の二種類が知られている。これら酵素が異なる既存リン脂質を基質とすることが明らかになっているが、基質特異性へのアシル鎖の関与を含め、合成される PS の分子種の異同についての知見は得られていない。そこで、これら酵素のどちらか一方のみ或いは双方を発現した CHO 細胞 PS のアシル鎖の相違について、質量分析法により解析を行った。その結果、いずれの細胞においても同様な分子プロファイルを示し、顕著な差は認められなかった。したがって、二種の酵素により合成される PS 分子種には顕著な違いがないか、或いは、合成された後リモデリング等により同様なプロファイルを示すものと考えられた。

[大沢智子、齊藤恭子、西島正弘；久下 理 (九州大学大学院理学研究院)；田口 良 (東京大学大学院医学研究科)]

(2) シンドビスウィルス (SINV) の遺伝子発現におけ

る宿主細胞膜ホスファチジルセリン (PS) の関与

SINV の遺伝子発現における PS の関与を詳細に調べるため、ウィルス構造遺伝子を lacZ 遺伝子に置換した SINV レプリコン RNA を CHO 細胞 PS 合成変異株に導入し、 β -ガラクトシダーゼ産生量と同蛋白質をコードするサブゲノミック RNA 量、及び SINV レプリカーゼ量の時間変化を解析した。RNA 導入 15 時間後、低 PS 含量の細胞では β -ガラクトシダーゼ発現量が PS 含量正常細胞の半分に低下したが、サブゲノミック RNA 量、及びレプリコン RNA から翻訳されるレプリカーゼ量にそのような低下は見られなかった。従って PS 含量の低下により、サブゲノミック RNA の翻訳が特異的に阻害されることが示唆された。サブゲノミック RNA が翻訳されるために必要な構造変化、あるいはリボソームへの輸送の過程に、PS が関与することが考えられた。

[齊藤恭子、西島正弘；久下 理 (九州大学大学院理学研究院)]

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) CERT によるセラミド膜間転移の分子種選択性

主要膜リン脂質の一つであるスフィンゴミエリン (SM) の生合成では、小胞体で合成されたセラミドがゴルジ体に移行して SM へと変換される。我々は、細胞内セラミド選別輸送の欠損 CHO 細胞変異株を分離し、その欠損遺伝子を同定する手法を通じて、セラミド選別輸送を担う特異的因子 CERT を発見し、CERT にはセラミドを小胞体から引き抜き、ゴルジ体へと渡す機能があることを昨年度までに明らかにした。

本年度は、人工膜を用いた膜間脂質転移アッセイによって CERT の基質選択性を詳細に解析した。その結果、CERT は、(1)セラミドの 4 つの立体化学異性体のうち、天然型の D-erythro-セラミドのみを認識し、(2)スフィンゴシン、SM、コレステロールなどの他の脂質は認識できない。ただし、ジアシルグリセロールはわずかに認識する、(3)ジヒドロ型およびファイト型セラミドは認識し、また、様々なアミド鎖長のセラミドも認識することが明らかとなった。

[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT のセラミド結合比

短鎖の蛍光性セラミド類似体を基質として用いることで、CERT とセラミド基質との結合パラメーターを解析することを可能にした。そして、その解析結果から、CERT は、C5-DMB-セラミドを 1:1 の結合比で結合し、その見かけの解離定数は約 200 nM であることが明らかとなった。なお、細菌表層リポ多糖 (LPS) の構造の一部がセラミドに類似していることが他の研究グループから示唆されているが、CERT と蛍光性 LPS との有意な結合は観察できなかった。

[熊谷圭悟、桶本和男、西島正弘、花田賢太郎]

(3) CERT のアンタゴニスト

我々は以前、セラミド輸送の選択的な阻害剤・(1R,3R)-HPA12 を開発していた。CERT 遺伝子に欠損をもつ CHO 細胞変異株で残存するセラミド-SM 変換が (1R,3R)-HPA12 処理によってさらに減少することはないが、この変異株に CERT cDNA 導入して回復したセラミド-SM 変換は、(1R,3R)-HPA12 によって回復前レベルにまで阻害された。さらに、人工膜を用いた膜間脂質転移測定系において、(1R,3R)-HPA12 は、CERT が触媒するセラミド転移を濃度依存的に阻害し、一方、HPA12 立体異性体などの対照実験では阻害は見られなかった。これらの結果から、(1R,3R)-HPA12 は CERT のアンタゴニストであると結論した。

[熊谷圭悟、安田智、花田賢太郎；小林修 (東京大学薬学部)]

(4) CERT に存在する FFAT モチーフの役割

小胞体膜蛋白質の VAP と相互作用するペプチド配列モチーフが海外の研究グループによって示された。FFAT モチーフと名付けられたこの配列は、CERT 蛋白質の中央領域にも存在する。エピトープ付加した VAP および CERT を発現した細胞のジギトニン可溶化試料において、VAP は CERT と共免疫沈降され、それは CERT の FFAT モチーフの存在に依存した。また、生細胞中における CERT の小胞体-ゴルジ体セラミド輸送機能が、FFAT モチーフの変異によって損なわれた。これらの結果は、FFAT モチーフに依存した CERT と VAP の相互作用は、効率的な小胞体-ゴルジ体セラミド輸送に

重要であることを示唆している。

[河野美幸、花田賢太郎]

(5) 光増感処理細胞における新合成セラミドの蓄積

光増感剤を用いた光動力学療法(PDT)処理によってアポトース死を起こしている細胞では、新合成されたセラミドが蓄積する。PDT 処理によって、スフィンゴミエリン合成酵素活性が減少し、新合成セラミドからスフィンゴミエリンへの変換が強く阻害されていた。一方、セラミド新合成の高進、セラミド分解の阻害、スフィンゴミエリン分解の高進は認められなかった。スフィンゴ脂質合成阻害剤処理によってセラミド新合成を阻害すると PDT 処理依存性のアポトースが抑制された。よって、PDT 処理によってセラミドから複合スフィンゴ脂質への変換が阻害されたためにセラミドが蓄積し、それがアポトース細胞死を起こす一因となっていると結論した。

[花田賢太郎; Vladislav Dolgachev, M. Sharjeel Farooqui, Olga I. Kulaeva, Michael Tainsky, Biserka Nagy, Duska Separovic(ユージン・アップルバウム薬学衛生科学大学)]

(6) 星状細胞の酸化ストレス感受性のセラミドによる高進

星状細胞において、過酸化水素処理によるアポトース死感受性がセラミド処理によって高まることを見出した。星状細胞をカンナビノイドに短期曝した場合、CB1 受容体依存性に細胞内のセラミドレベルが上昇して細胞死を誘発することが知られているが、数日間の長期処理をした場合は、セラミドレベル上昇はもはや起こらず、また、セラミドによる酸化ストレス感受性高進もなくなることを見出した。

[花田賢太郎; Arkaitz Carracedo, María Diez, Manuel Guzman, and Guillermo Velasco (コンプルテンス大学); Math J.H. Geelen (ユトレヒト大学)]

(7) スフィンゴ脂質減少がコレシストキニン受容体に及ぼす影響

コレシストキニン(CCK)は、食餌栄養吸収の制御などに関与している消化管ペプチドホルモンであり、その受容体 CCKR は、G 蛋白質共役型受容体のひとつである。

CCKR 発現細胞におけるコレステロールのレベルが減じると、CCKR の細胞内輸送には影響を与えずに、CCK の結合やシグナル伝達が減少した。一方、スフィンゴ脂質のレベルが減少すると、CCK の結合やシグナル伝達は正常であるが受容体の細胞内への取り込みが阻害された。CCKR の機能と動態はこれら 2 種類の膜脂質によって別々に制御されていることを示唆した。

[花田賢太郎; Kaleeckal G. Harikumar, Vishwajeet Puri, Raman Deep Singh, Richard E. Pagano, and Laurence J. Miller (メイヨークリニック)]

(8) ジフテリア毒素の細胞膜移動のスフィンゴ脂質による制御

膜受容体に結合したジフテリア毒素は酸性条件下でコンフォメーションを変えて宿主細胞の膜を越えて細胞質に侵入する。細胞のスフィンゴ脂質含有量が減少するとジフテリア毒素への感受性が高まることを見出し、この感受性の増加は、毒素の膜を横切る移動過程が促進されるためであると示唆した。

[花田賢太郎; Bjørn Spilsgberg, Kirsten Sandvig (ノルウェー放射線病院)]

1-3. 脂肪滴形成欠損変異株の性状解析

脂肪滴はほぼ全ての細胞に認められるオルガネラで、エネルギー産生・膜脂質代謝などに関わっていると考えられているがその形成過程については不明な点が多い。我々は CHO 細胞より脂肪滴形成の欠損した細胞を分離しその性状解析を行った結果、変異株では脂肪酸合成の初発酵素アセチル CoA カルボキシラーゼ活性に欠損を有していることが明らかとなった。

[深澤征義、西島正弘]

2. 抗感染症薬を指向した脂質代謝阻害剤の研究

(1) 真菌イノシトールホスホセラミド合成酵素の阻害剤探索法

イノシトールホスホセラミド(IPC)関連脂質は、真菌類などには存在するが哺乳動物細胞には存在しない脂質群である。IPC 合成を司る酵素・IPCS は、真菌の生育に必須の遺伝子産物であり、その阻害剤は新たな抗真菌剤候補として注目されるが、ハイスループット化に適した

IPCS 活性アッセイ法の報告はなかった。我々は、放射性短鎖セラミド・ $[^3\text{H}]\text{C}_2$ -ジヒドロセラミドを基質として酵素反応を行い、96 チャンネル分注ヘッドの自動分注器を用いて、酵素反応液を同心円状に TLC 展開することで未反応の反応基質と反応生成物を分離し、酵素活性を 96 穴フォーマットで検出できるスクリーニング系を構築した。これにより比較的多量の検体をスクリーニングにかけることが可能となった。

[花田賢太郎、西島正弘；田端祐二、南達哉、大山真、大澤福市、星子繁（明治製菓）]

(2) IPCS 阻害剤候補物質の評価系の構築

哺乳動物由来のスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)遺伝子が同定され、少なくとも 2 種類の遺伝子産物(SMS-1, SMS-2)がそれぞれにホスファチジルコリン(PC)からホスホコリンをセラミドに転移して SM を合成する反応を触媒する活性を持つことが示された。そこで、IPCS 阻害剤候補の特異性を予備的に評価する実験系として、IPCS/SMS 同時検出系を構築した。ヒト由来 SMS-1 または SMS-2 を出芽酵母で発現させ、細胞破碎液を酵素源、蛍光標識セラミド類似体 C_6 -NBD-セラミドを基質とすることで、IPCS と SMS の活性を簡便に同時検出可能となり、この系は IPCS 阻害剤候補の特異性評価に実際に利用できた。

[富重斉生、花田賢太郎]

・細胞膜の構造・機能と細胞病態変化の分子解析

(1) 動物細胞の表面には 10 数種類の糖輸送タンパク質 (GLUT)ファミリーが存在し、促進拡散型の糖輸送を仲介する。これらは 12 回膜貫通型の糖タンパク質であるが、輸送特性や組織発現には特異性があり、生理的な役割や機能調節機構はそれぞれ異なると考えられる。また、がん、糖尿病などのヒト疾患にも関与することが示唆されているが、病態分子機構は未だ不明な点が多い。我々は、腫瘍性のヒト由来細胞株に発現する GLUT1 と GLUT3 が異なる細胞膜ドメインに分布することを最近明らかにした。GLUT1 は界面活性剤に難溶性のラフト膜ドメインに分布し、細胞骨格系の F-アクチンと共分布した。ラフト膜分布の分子制御機構について更に検討した結果、GLUT1 のアミノ酸配列中に制御シグナルが存

在するを見いだした。最近、GLUT1 はヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1)の新規受容体であることが判明し、GLUT1 の膜分布機構の解析は感染症治療薬の新たな分子標的探索においても有用と思われる。

長い間、皆様より頂いたご支援、ご協力に深く感謝します。

[北川隆之、池田有美、佐京智子]

(2) Far Eastern Blotting を用いた MALDI-QIT-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometry)による脂質分子種一斉分析法の開発

微量試料の脂質分子種分析を簡便迅速に行うため、MALDI-QIT-TOF-MS に Far Eastern Blotting (脂質プロットング)を応用した。薄層クロマトグラフィー (TLC)により分離した脂質を PVDF 膜に転写し、試料プレートに接着後マトリックス液をのせ、ポジティブモード MS 測定を行った。TLC による分離に従ってホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、トリグリセリドの各分子種に由来するシグナルを検出した。今後レーザーを当てる位置の自動的スキャンとデータ取込の自動化された装置の開発が期待されるが、この方法による脂質分子種簡便分析の可能性を示す事ができたと考えている。

[田中康仁、矢部邦章、西島正弘；田口 良（東京大学医学部メタボローム）]

(3) MALDI-QIT-TOF-MS による脂質分子種の定量的分析法の確立

MALDI-QIT-TOF-MS により脂質の各分子種を定量する方法を検討した。分子種の違いと測定条件の違いにより、各分子種のイオン化効率は著しく異なる。また脂質極性基部分の異なるものが混在する場合、イオン化されにくいものは殆ど検出できない。このため分析に先立ち各脂質を極性基に従い分画し、DHBA マトリックスによりポジティブイオンモード分析を行った。合成モデル脂質分子とジミリスチルホスファチジルエタノールアミン等の規準脂質分子とのシグナル強度の比率を求めることにより同一脂質分子種であれば一定範囲内で定量性

を示した。またこの方法では異なる脂質分子種間の存在比は求まらない事が確認された。

[田中康仁、矢部邦章、西島正弘]

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

期間：平成16年4月1日～平成17年3月31日

検体数：28検体うち陽性3検体

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 01) V. Dolgachev, M. Sharjeel Farooqui, O. I. Kulaeva, M. Tainsky, B. Nagy, K. Hanada, and D. Separovic: De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. *J. Biol. Chem.*, 279, 23238-23249, 2004
- 02) A. Carracedo, M.J.H. Geelen, M. Diez, K. Hanada, M. Guzmán, and G. Velasco: Ceramide sensitizes astrocytes to oxidative stress: protective role of cannabinoids. *Biochem. J.*, 380, 435-440, 2004
- 03) Y. Tanaka, M. Takizawa, S. Igimi, and F. Amano: Enhanced release of prostaglandin D₂ during re-incubation of RAW 264.7 macrophage-like cells after treatment of both lipopolysaccharide and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 985-991, 2004
- 04) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 279, 20044-20048, 2004
- 07) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Deacylation and palmitoylation of lipid A by *Salmonella* outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.*, 10, 439-444, 2004
- 08) A. Volchuk, M. Ravazzola, A. Perrelet, W. S. Eng, M. De Liberto, O. Varlamov, M. Fukasawa, T. Engel, T. H. Söllner, J. E. Rothman, and L. Orci: Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the

- Golgi stack. *Mol. Biol. Cell*, 15, 1506-1518, 2004
- 09) M. Fukasawa, O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Söllner, and J. E. Rothman: Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4815-4820, 2004
- 10) Y. Kondo, J. Hamada, C. Kobayashi, R. Nakamura, Y. Suzuki, R. Kimata, T. Nishimura, T. Kitagawa, N. Imura and S. Hara: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in renal and bladder cancer cells increases tumorigenic potency. *J. Urology*, 173, 1762-1766, 2005
- 11) Y. Inoue, Y. Yamakawa, A. Sakudo, T. Kinumi, Y. Nakamura, Y. Matsumoto, K. Saeki, T. Kamiyama, T. Onodera, M. Nishijima: Infection route-independent accumulation of splenic abnormal prion protein. *Jpn J Infect Dis.*, 58(2), 78-82, 2005
- 12) H. Furuoka, A. Yabuzoe, M. Horiuchi, Y. Tagawa, T. Yokoyama, Y. Yamakawa, M. Shinagawa and T. Sata: Effective antigen-retrieval for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion protein in animals. *Acta NeuroPathol.*, 109, 263-271, 2005
- 13) K. G. Harikumar, V. Puri, R. D. Singh, K. Hanada, R. E. Pagano, and L. J. Miller: Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *J. Biol. Chem.*, 280, 2176-2185, 2005
- 14) K. Kumagai, S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi, and K. Hanada: CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.*, 280, 6488-6495, 2005
- 15) B. Spilsberg, K. Hanada, and K. Sandvig: Diphtheria toxin translocation across cellular membranes is regulated by sphingolipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 465-473, 2005
- 16) H. Kishida, Y. Sakasegawa, K. Watanabe, Y. Yamakawa, M. Nishijima, Y. Kuroiwa, N. S. Hachiya, and K. Kaneko: Non-glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication in vitro. *J. Protein Folding Disord.*, 11, 14-20, 2004

- 17) T. Ohsawa, M. Nishijima, and O. Kuge: Functional analysis of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 1 through systematic alanine mutagenesis. *Biochem. J.*, 381, 853-859, 2004
- 18) Q. Lao, O. Kuge, T. Fukamachi, T. Kakegawa, H. Saito, M. Nishijima, and H. Kobayashi: An I κ B- β COOH Terminal Region Protein Is Essential for the Proliferation of CHO Cells Under Acidic Stress. *J. Cell. Physiol.*, 203, 186-192, 2005
- 19) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.*, in press
- 20) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Purification and characterization of deacylated and/or palmitoylated lipid A species unique to *Salmonella typhimurium*. *J. Endotoxin Res.*, in press
- 21) Q. Lao, T. Fukamachi, H. Saito, O. Kuge, M. Nishijima, and H. Kobayashi: Requirement of an I κ B- β COOH terminal region protein for acidic-adaptation in CHO cells. *J. Cell. Physiol.*, in press
2. 和文発表
- 1) 花田賢太郎: 膜脂質セラミドを輸送する分子装置: CERTの発見, *実験医学*, 22, 966-969, 2004
- 2) 花田賢太郎: セラミドの細胞内選別輸送を担う分子装置・CERT, *生化学*, 76, 562-570, 2004
- 3) 花田賢太郎: 解明され始めた脂質の細胞内選別輸送メカニズム, *ファルマシア*, 40, 640-644, 2004
- 4) 花田賢太郎: セラミドの細胞内選別輸送, 「脂質生物学がわかる」(清水孝雄・編), 羊土社, 東京, 132-136, 2004
- 5) 萩原健一, 山河芳夫: 非定型 BSE プリオン, *感染・炎症・免疫*, 34(3), 44-46, 2004
- 6) 花田賢太郎, 西島正弘: ホ乳動物細胞におけるリン脂質合成研究の新展開: 制御と輸送, *実験医学*, 23, 828-834, 2005
- 7) 川崎清史, 西島正弘: アラニンスキヤニングによる MD-2 の機能解析, *エンドトキシン研究*, 7, 123-128, 2004
- 8) 西島正弘: 脂質の分類と分離・精製技術の基礎, 「脂質生物学がわかる」(清水孝雄・編), 羊土社, 東京, 28-34, 2004
- II. 学会発表
1. 国際学会
- 01) K. Hanada: Nonvesicular ER-to-Golgi trafficking of ceramide by CERT having a PI4P-recognising PH domain, The 3rd Japanese Biochemical society Biofrontier Symposium, New Aspect of Phospholipid Biology 2004, 2004.5.12, Kamakura, Japan
- 02) K. Hanada: Molecular machinery for intracellular trafficking of ceramide, American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2004 Annual Meeting, 2004.6.15, Boston, USA
- 03) K. Hanada: Pickup and delivery of ceramide by CERT, Sapporo Sphingolipid Symposium, 2004.7.22, Sapporo, Japan
- 04) K. Hanada: Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide in mammalian cells, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, 2004.7.26, Hyogo, Japan
- 05) K. Hanada: Discovery of the molecular machinery CERT for ER-to-Golgi trafficking of ceramide, 5th International Conference on Lipid Binding Proteins, 2004.9.28, Zao, Japan
- 06) K. Hanada: Molecular machinery for intracellular trafficking of ceramide, The 8th Membrane Forum, 2004.11.24, Nagoya, Japan
- 07) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Lipid A deacylation by PagL: regulation of TLR4 signaling, 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, 2004.11, Kyoto Japan
- 08) K. Okemoto, K. Kawasaki, and M. Nishijima: Dephosphorylation of lipid A selectively reduces its activity to induce IL-1 β production, 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, 2004.11.15-18, Kyoto, Japan
- 09) Y. Yamakawa, K. Hagiwara, K. Nohtomi, Y. Nakamura, Y. Higuchi, Y. Sato, T. Sata, and Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: BSE inspection in Japan and finding of atypical PK-resistant prion protein (PrPRES) in an apparently healthy 23-month-old-holstein steer in Japan: First International

Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion “ Prion 2004” 2004.5.24-28, Paris

10) M. Fukasawa, S. Sato, Y. Yamakawa, T. Natsume, T. Suzuki, I. Shoji, H. Aizaki, T. Miyamura, and M. Nishijima: Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing hepatoma cell lines, 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2004.10.5, Heidelberg, Germany

11) M. Shirakura, I. Shoji, T. Ichimura, R. Suzuki, T. Suzuki, Y. Sugiyama, T. Shimoji, K. Murakami, S. Sato, M. Fukasawa, Y. Yamakawa, M. Nishijima, and T. Miyamura: Proteomic analysis of Hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry, 11th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses, 2004.10.5, Heidelberg, Germany

2. 国内学会

01) 花田賢太郎: 脂質セラミドの細胞内選別輸送を担う分子装置, 日本膜学会第 26 年会, 2004.5.20 (東京)

02) 花田賢太郎: 膜脂質の合成と細胞内選別輸送, 九州大学生体防御医学研究所セミナー, 2004.5.28 (福岡)

03) 山河芳夫: BSE 検査の現状, 特別課程食肉検査コース, 2004.6.18, 国立保健医療科学院

04) 花田賢太郎: 解明され始めた脂質セラミドの細胞内選別輸送メカニズム, 第 13 回内毒素研究会, 2004.6.26 (東京)

05) 花田賢太郎: 代謝は輸送を必要としている: セラミド選別輸送装置の発見, 第 2 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2004.8.25 (東京)

06) 北川隆之: 動物細胞の糖輸送タンパク質: 構造、機能、発現変化と細胞内局在性, 第 3 回 HTLV/ATL シンポジウム, 文部科学省「がん」特定領域研究班, 東京大学医科学研究所, 2004.9 (東京)

07) 北川隆之, 佐京智子, 池田有美: 動物細胞糖輸送タンパク質の発現と細胞膜分布, 第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2004.10 (東京)

08) 花田賢太郎: Molecular machinery for intracellular trafficking of the lipid ceramide (脂質セラミドの細胞内選別輸送を担う分子装置), 第 77 回日本生化学会大会, 2004.10.14 (横浜)

09) 熊谷圭悟, 西島正弘, 花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT の基質特異性, 第 77 回日本生化学会大会, 2004.10.15 (横浜)

10) 萩原健一, 中村優子, 日下芳友, 納富香子, 大内史子, 西島正弘, 山河芳夫: Neuroblastoma N2a cells stably expressing MHM2-tagged prion protein (PrP) for the analysis of the conformational conversion of PrP, 第 77 回日本生化学会大会, 2004.10.15 (横浜)

11) 深澤征義, O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Sollner, J. E. Rothman: Localization and Activity of the SNARE Ykt6 Determined by its Regulatory Domain and Palmitoylation (SNARE Ykt6 分子の細胞内局在と活性の制御について), 第 77 回日本生化学会大会, 2004.10.15 (横浜)

12) 天野富美夫, 唐橋久恵, 品川雅子, 田中康仁: LPS とシクロヘキシミドで誘導されるマクロファージのアポトーシスにおけるアラキドン酸遊離の解析, 第 77 回日本生化学会大会, 2004.10.16 (横浜)

13) 花田賢太郎: 細胞内セラミド輸送メカニズムの解明を目指して, 京都大学ウイルス研究所コロキウム「膜輸送研究の新展開」, 2005.2.14 (京都)

14) 佐々木裕子, 川上隆雄, 大内史子, 山河芳夫, 佐々木次雄: プロテオミクス解析を用いた Mycoplasma penetrans の抗原蛋白ならびに膜蛋白の解析, 微生物ゲノム研究のフロンティア, 2005.3.5-6 (かずさ)

15) 西島正弘: 感染症のプロテオーム解析 プリオンと C 型肝炎ウイルス, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「プロテオミクス: 創薬へのアプローチ」, 2005.3.15 (大阪)

16) 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 夏目徹, 鈴木哲朗, 勝二郁夫, 相崎英樹, 鈴木亮介, 宮村達男, 西島正弘: プロテオミクスの手法を用いた C 型肝炎ウイルスの病原性に関する宿主因子の探索, 日本薬学会第 125 年会, 2005.3.29 (東京)

17) 齊藤恭子, 西島正弘, 久下理 (細胞化学部、九大院理): シンドビスウィルス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の関与, 日本薬学会第 125 年会, 2005.3.30 (東京)

18) 川崎清史: サルモネラ菌リポ多糖の脱アシル化制御, 日本薬学会 125 年会, 2005.3.30 (東京)

19) 手島玲子, 天野富美夫, 田中康仁, 澤田純一: 肥満

細胞への各種不飽和脂肪酸の脱顆粒, カルシウム応答に
ついて, 日本薬学会第 125 年会, 2005. 3. 30 (東京)