

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の生合成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、クラミジアにおける脂質代謝、C型肝炎ウイルス感染における膜脂質代謝、エンドトキシンの構造と機能に関する研究、抗感染症薬を指向した脂質代謝阻害剤の開発研究など、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プロテオーム解析の手法等を用いて行い、着実に成果を挙げた。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17年度は5件の検査を行い、非定型型のBSEを一件検出した。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」を無事に終了させた。

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。また、科学技術振興事業団(戦略的基礎研究推進事業)「さきがけ研究—代謝と機能制御」の研究総括を担当することになった。

本年度も当研究部の研究に対し、経常研究費に加え、厚生労働省、文部科学省、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

・プリオン病に関する研究

(1) 非定型の BSE プリオン(佐世保例)の生体内分布

平成17年度(H18.3.31)までに、我が国では24頭のBSE感染牛が厚生労働省の全頭検査(2001年から実施)及び農産省の死亡牛検査(2003年から実施)により摘発されている。殆どは乳用のホルスタイン種であるが、24例目(佐世保例)の陽性牛は肉用の黒毛和種(169ヶ月齢、雌、起立障害)である事に加えてプリオンの糖鎖型が通常の牛異常型プリオンタンパク質が示す4/2B型と異なる非定型プリオンであることから注目を集めた。本研究ではウェスタンブロット法によりプリオンの分布に付いて検討した。扁桃、リンパ節、筋肉(肋間筋)及び副腎等からはプリオンは検出されず、従来型と同様に末梢の組織、臓器には蓄積しないと考えられる。プリオンは脳の前頭葉から頭頂葉にかけて広く分布するが後頭葉での蓄積は極めて少なかった。小脳にも中程度の蓄積を認めるが、食肉検査で使用される延髄の門部に多量の蓄積が認められた。今回の試料では視床を含む基底核部分が採材されておらず、脳におけるプリオンの完全な分布様式を示す事は出来なかったが、得られたデータから今回の非定型プリオンの分布は従来型とほぼ同様と考えられ、現行の危険部位の定義及び、検査方法で対処できるものと思われる。

[山河芳夫、中村優子、萩原健一]

(2) 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(PrP^{Sc})の産生抑制

PrP^{Sc}を持続的に産生するマウス神経芽腫細胞(ScN2a細胞)を用いた研究から、昨年度はPrP^{Sc}の産生が24-DHC還元酵素の阻害剤(U18666A)により抑制されることを

示した。本年度は、7-dehydrocholesterol (7-DHC)還元酵素の阻害剤 (AY-9944) が、PrP^{Sc} の産生を抑えること新たに見出した。AY-9944 の作用機作は、酵素阻害によるコレステロール合成の直接的阻害に加え、蓄積した7-DHCがステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の遺伝子転写をフィードバック抑制する相乗効果によって、コレステロール量が減少するためと考えられた。一方、U18666Aでは、AY-9944の場合と同様の機作によるコレステロール量の減少も関与するものの、むしろデスモステロールの蓄積による細胞膜の物性変化が主たる作用機作であると推測された。両薬物は、中枢神経系のステロール代謝研究においてラット等へ投与された報告がある。これらの既報に記された投与量に基づき、プリオン感染マウスにU18666AおよびAY-9944を投与して抗プリオン薬としての効果を検討したが、薬物非投与のコントロール群と比較してプリオン病発症の遅延は認められなかった。

[萩原健一、中村優子、大内史子、西島正弘、山河芳夫]

(3) 選択性に優れた異常型プリオン蛋白質の高感度分析法の開発

現行のBSE一次検査において用いられているサンドイッチELISAは、可溶性の生体分子(ホルモンなど)を対象としたELISA法の方法論を踏襲している。しかし異常型プリオン蛋白質を測定対象とする場合、不溶性試料ゆえの測定系の不均一性やアミロイド様凝集体ゆえに適切な抗原部位の露出が困難であるという問題点が存在する。一次検査での疑陽性率をさらに低減させ、かつ陽性試料を高感度に検出するためには、これらの問題点の克服が重要であると考え、異常型プリオン蛋白質に由来するペプチド断片を均一系(可溶性系)において測定する方法の開発に着手した。初期検討の結果、異常型プリオン蛋白質のプロテイナーゼK抵抗性の消化断片を完全に変性させた後に、そのシステイン残基のチオール基を介して固相に共有結合させ、適切なエピトープをもつ抗体により検出するという方法が、検出の選択性向上に有用であると期待できた。しかし同時に、固相化効率の向上などの改善すべき点が明らかとなり、今後の条件検討が必要である。

[萩原健一]

(4) 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パー病原体(帯広1株)を接種したマウス脳を用いて、異常型プリオン蛋白質の蓄積と相関して変動するタンパク質を経時的・網羅的に解析して

きた。昨年までにPrP^{Sc}の蓄積が顕著になる100日目以降でGlial fibrillary acidic proteinや抗酸化ストレスタンパク質群の増加および液胞性ATPaseの膜表在サブユニットの減少を明らかにしてきた。本年度は増加の認められた神経軸索の伸展に關与するCollapsin response mediator protein-2について解析し、C末端の活性調節部位を含む領域の欠損したアイソフォームが増加していることを明らかにした。

[大内史子、萩原健一、中村優子、山河芳夫、西島正弘]

(5) プリオン蛋白質に結合するタンパク質の検索

プリオンタンパク質(PrP)の機能を知る事を目的として、PrPと相互作用をするタンパク質の同定を試みた。タグ(Myc、TEVプロテアーゼ認識配列、FLAG)を付加したPrP(MEF-PrP)をマウス神経芽細胞(N2a細胞)に発現させ、タグ部分に対する抗体を用いる免疫沈降法でプリオンタンパクを含む複合体を精製した。複合体に含まれるタンパク質を質量分析で解析した結果、HSP70、actin、neurabin 2、drebrin、peripherin等のタンパク質が同定された。これらのうち、actinとperiferinは細胞骨格構成タンパクであり、neurabin 2とdrebrinはF-actinと結合してシナプスの機能に關与することが知られている。さらに、免疫蛍光抗体法により、PrPがF-actinと共局在することも確認された。これらの結果から、PrPの機能として細胞骨格との相互作用によるシグナル伝達系の調節及び神経細胞の形態と機能の保持に關与する可能性などが考えられた。

[中村優子、萩原健一、大内史子、西島正弘、山河芳夫]

(6) ニューロンへ分化誘導させた培養細胞におけるPrP分子間の相互作用

マウス神経芽腫細胞(N2a細胞)を血清除去およびジブチリルサイクリックAMP(dbcAMP)添加により刺激すると、ニューロン様に分化して軸索が伸長することが知られている。3F4抗体エピトープ配列をもつPrP(MHM2-PrP)を安定発現するN2a細胞をMEF-PrPを安定発現するN2a細胞と共培養し、血清除去およびdbcAMP添加により分化誘導をかけた後、MEFタグによる免疫沈降を行なった。その結果、MEF-PrPと共にMHM2-PrPあるいは内在性PrPが共沈殿した。一方、未分化のN2a細胞においては、このような共沈は認められなかった。この結果から、分化したN2a細胞においては、発現しているPrP分子間同士の相互作用の親和性が強まると考えられる。

[中村優子、萩原健一、西島正弘、山河芳夫]

(7) プリオン病バイオマーカー探索を目指した血液の

プロテオーム解析

プリオン病における血液中バイオマーカーを探索するため、予備的解析を開始した。病態に依存して組織から血液に侵出する微量なタンパク質を探索しようとする場合、血清中に多量に存在する古典的血清タンパク質が妨害すると予想される。LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法でタンパク質同定する際に、血液試料からイムノアフィニティーカラムによって古典的血清タンパクを事前に除去すると、比較的微量な血清タンパク質が検出しやすくなることを見出した。実際の病態タンパク質の検出にはさらなる検討が必要である。定量比較するために安定同位体を用いる標識法である Isotope-coded affinity tag 法について、標準タンパク質を用いて検討した。2種類の標識試薬によりそれぞれ標識した試料を混合して分析したところ、混合比 1:5 から 5:1 の範囲で適応可能であった。

[大内史子、山河芳夫]

・脂肪滴とC型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) 細胞内脂肪滴形成におけるアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 の重要性

脂肪滴は全ての細胞に認められる球状オルガネラで、エネルギー産生・膜脂質代謝等に重要な役割を果たすと考えられており、脂肪蓄積を伴う様々な病態にも関与することが知られている。しかし、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株を分離し、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を明らかにしてきた。今回、この変異株にアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 を発現させると脂肪滴形成が回復することから、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 が細胞内脂肪滴形成に重要であることが示された。

[深澤征義、西島正弘]

(2) C型肝炎ウイルスコアタンパク質と DDX1、DDX3 分子の共局在と相互作用

HCV コアタンパク質を発現する各種肝培養細胞株 (HepG2、Huh7 由来) を用い、脂肪滴構成タンパク質の網羅的解析を行った結果、ATPase/RNA ヘリカーゼである DDX1・DDX3 分子の局在が特徴的に見られた。HCV 全長レプリコン発現肝培養細胞の脂肪滴においても DDX1・DDX3 分子の局在が特徴的に見られた。HCV コアタンパク質と DDX1・DDX3 分子が直接複合体を形成することもわかり、HCV 感染時に脂肪滴上でこれら分子複合体が何らかの機能を果たしていることが示唆された。

[佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、鈴木哲朗、

勝二郁夫、鈴木亮介、宮村達男 (ウイルス 2 部)]

(3) C型肝炎ウイルスコアタンパク質発現による中間径フィラメントタンパク質の変動

HCV コアタンパク質は細胞内で脂肪滴以外に一部核にも局在し、何らかの病原性機能を発現していると考えられている。この過程に関与する宿主分子を検索する目的で、コアタンパク質発現肝培養細胞の細胞核濃縮画分 (界面活性剤不溶性画分) タンパク質像を比較解析した。その結果、細胞核と共に分画されてくる細胞骨格蛋白質のうち中間径フィラメント蛋白質群が最も顕著に変動 (上昇あるいは低下) していることが予想外に明らかになった。中間径フィラメント蛋白質と脂肪滴は相互作用することも知られておりその関連も注目される。

[笠原優子、深澤征義、大内史子、山河芳夫、西島正弘、鈴木哲朗、宮村達男 (ウイルス 2 部)]

(4) HCV のコア蛋白発現が脂肪酸修飾した培養肝細胞の脂質分子組成に及ぼす影響の解析

HCV のコア蛋白発現が培養肝細胞の脂質組成に影響を及ぼす事が示唆されている。Huh7 培養肝細胞を各種脂肪酸存在下に培養するとその脂肪酸の種類により細胞の各脂質分子種が修飾を受けることを MALDI-QIT-TOF-MS により確認した。また、これらの細胞のうちステアリン酸修飾したコア蛋白発現細胞ではコントロール細胞に比べてホスファチジルエタノールアミンのステアリン酸を含む分子種の増加が観察された。一方、脂肪酸修飾によりコア蛋白の発現量は変動しなかった。これらの結果からコア蛋白発現が肝細胞のステアリン酸の合成系や代謝調節機構に影響を与えている可能性が示唆された。更に解析を進めている。

[田中康仁、小野佑仁、矢部邦章、深澤征義、佐藤慈子、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)]

・エンドトキシンに関する研究

(1) サルモネラ菌抗菌ペプチド感受性のリポポリサッカライド(LPS)脱アシル化による制御

抗菌ペプチドは脊椎動物、無脊椎動物、そして一部の細菌にまで幅広く生物界に存在し、動物では重要な生体防御因子と位置づけられる。抗菌ペプチドに共通した性質は陽性アミノ酸に富むことと疎水性領域を有することである。LPS リピド A リン酸基の修飾欠損サルモネラ菌株は表層電荷をマイナスからプラスへと変換できないために抗菌ペプチド・ポリミキシンに感受性が高い。一方、リン酸基修飾欠損株ではリピド A 脱アシル化が高頻度でみられたがその意義は不明であった。そこでリン酸基修

飾欠損株を親株としてリポド A 脱アシル化酵素 PagL の欠損株を作成し、ポリミキシン感受性への影響を解析した。PagL 欠損株は親株よりもポリミキシン感受性が高かった。従って、脱アシル化はポリミキシン感受性を制御していることがわかった。

[川崎清史、知名光太郎、西島正弘]

(2) エンドトキシンの毒性に関する研究

グラム陰性菌細胞壁由来 LPS はしばしば致命的なエンドトキシンショックを引き起こすが、免疫反応を様々な誘導し賦活化することもまた知られている。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。我々は、lipid A はマウスマクロファージの caspase-1 を活性化するが、MPL は LPS と同一のレセプター (TLR-4) を介しながらも活性化しない事などを明らかにした。

[桶本和男、川崎清史、花田賢太郎、西島正弘]

・ シンドビスウィルス (SINV) に関する研究

(1) SINV の遺伝子発現におけるホスファチジルセリン (PS) の関与

我々は以前、CHO 細胞 PS 合成変異株と SINV レプリコンを用い、SINV サブゲノムの転写後から翻訳までの過程に、PS が関与することを示唆した。感染時の遺伝子発現における PS の関与を解析する目的で、同変異株に SINV を感染させたところ、細胞の PS 含量の低下により、転写されたサブゲノム量の低下と、同様な翻訳産物量の低下が観察された。この結果は、転写、又は転写前過程への PS の関与を示唆するものであり、レプリコン系で示した転写後過程への関与については、更なる検討が必要である。

[齊藤恭子、西島正弘：久下理 (九大理院)]

・ スフィンゴ脂質に関する研究

1. 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) 小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送をつかさどる蛋白質 CERT のリン酸化部位

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、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すでに明らかにしている。本年度は、哺乳

動物細胞中で発現している CERT はリン酸化を受けていることを見出し、精製 CERT をトリプシン分解したペプチド断片の質量分析解析などから、リン酸化を受けている部位を決定した。

[熊谷圭悟、大内史子、花田賢太郎]

(2) CERT 機能における FFAT モチーフの役割

CERT はその FFAT モチーフに依存して小胞体膜蛋白質 VAP と相互作用することを昨年度までに見出している。本年度は、CERT の人工膜間セラミド転移活性は FFAT モチーフ変異によって損なわれないが、セミンタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送再構成系におけるセラミド輸送活性は FFAT モチーフ変異によって阻害されることを見出した。よって、FFAT モチーフ依存性 VAP 相互作用は、CERT を効率よく小胞体に会合させるために重要であると示唆された。

[河野美幸、熊谷圭悟、花田賢太郎]

(3) 過剰生産するとライセニン耐性を CHO 細胞に賦与するヒト由来 cDNA の探索

ライセニンは SM 結合性の細胞溶解毒素である。レトロウイルスベクター上に構築されたヒト cDNA ライブラリーを導入した CHO 細胞をライセニン処理し、ライセニン耐性を示す 5 つの細胞株を取得した。分離したライセニン耐性株におけるスフィンゴ脂質代謝の変化を評価するために、 $[^{14}\text{C}]$ -セリンで代謝標識実験を行った。その結果、ライセニン耐性株 5 株全てが親株に比べて SM 合成量の低下を示した。

[花田賢太郎]

(4) 過剰生産すると SM 生産を阻害するキナーゼの発見

上記ライセニン耐性株に導入されているヒト cDNA を PCR 法で増幅後、回収し、シーケンシングに供した。その結果、タンパク質キナーゼ (タンパク質キナーゼ X と仮に命名する) をコードする cDNA を取得した。キナーゼ X cDNA を CHO 細胞に安定導入すると、導入細胞は、SM 合成量が低下するとともにライセニン耐性を獲得した。当該キナーゼは、SM 合成に関わるタンパク質のリン酸化を通じて、SM 合成を負に制御していると示唆される。今後、本キナーゼをさらに解析する予定である。

[富重斉生、花田賢太郎、楠田潤 (基盤研)]

(5) CERT のセラミド転移ドメインの結晶構造

CERT の膜間セラミド転移活性は、その C 末端領域約 250 アミノ酸が形成する START ドメインが担っている。この START ドメインの結晶化に成功した。さらに、いくつかの異なるセラミド分子種との共結晶の作成にも成

功した。今後、これら結晶のX線構造解析によって、CERTのセラミド認識メカニズムが原子レベルで解明されていくと期待できる。

[花田賢太郎、熊谷圭悟、西島正弘、工藤紀雄、加藤龍一、若槻壮市(高エネ研)]

(6) 光増感作用処理後のアポトーシス死におけるMnSODの役割

光増感剤を用いた光力学治療(PDT)のよって引き起こされる酸化ストレスは、アポトーシス細胞死をもたらす。マンガンスーパーオキシダーゼ(MnSOD)を過剰生産させるとPDTによる細胞死が減少し、一方、MnSOD遺伝子欠損細胞では、細胞死やセラミド蓄積が増加することを見出した。これらの結果は、PDT発生するスーパーオキシダーゼが細胞死に関わっていることを示唆している。

[花田賢太郎: Vladislav Dolgachev, Larry W. Oberley, Ting-Ting Huang, Janice M. Kraniak, Michael A. Tainsky, and Duska Separovic (ユージン・アップルバウム薬学衛生科学大学)]

2. クラミジア封入空胞におけるジアシルグリセロールの蓄積

タンパク質リン酸化酵素Cデルタ(PKCδ)のC1ドメインと蛍光タンパク質との融合タンパク質をジアシルグリセロールの検出プローブとして用いたところ、クラミジア封入空胞に顕著なジアシルグリセロール蓄積が観察された。全長のPKCδ自身もクラミジア封入空胞に集まることも見出した。通常、PKCδはミトコンドリアや核において前アポトーシス効果を発揮していると考えられている。よって、ジアシルグリセロール蓄積しているクラミジア封入空胞上にPKCδを奪うことで、クラミジア菌は宿主細胞のアポトーシス死を阻害しているのかもしれない。

[花田賢太郎: Shirley M. L. Tse, David Mason, Roberto J. Botelho, Basil Chiu, Mary Reyland, Robert D. Inman, and Sergio Grinstein (トロント大学)]

3. 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系

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る。昨年度までにIPCS活性の半自動化アッセイ法を開発した。本年度は、探索の効率化を目指し、384穴プレートを使用したアッセイ系の構築を実施した。96穴プレートと比較し4倍の高密度であるた

め、分注作業、ロボットによる移送時間の短縮が期待でき、また、放射性廃棄物の削減にも成功した。

[花田賢太郎; 田端祐二、山本憲太郎、星子繁(明治製菓)]

(2) IPCS阻害剤探索と候補化合物の予備解析

上記アッセイ法を用いてIPCS阻害剤のスクリーニングを開始し、合成化学物質ライブラリーを中心に約1万化合物のスクリーニングを行った。一次スクリーニングにおいて、複数のヒット化合物があったものの、阻害活性が強いものはまだ得られていない。放線菌培養プロセスに対するスクリーニングも含めたさらなるスクリーニングを行う予定である。

[富重斉生、西島正弘、花田賢太郎; 田端祐二、山本憲太郎、大山真、大澤福市、星子繁(明治製菓)]

VI. 脂質分析法に関する研究

(1) MALDI-QIT-TOF-MSによる主要リン脂質とトリグリセリドの簡便な網羅的分子種分析法の開発

MALDI-QIT-TOF-MSを用いて微量試料中の主要リン脂質とトリグリセリド(TG)の簡便で網羅的な分子種分析法を開発した。脂質抽出後直ちにDHBAマトリックスを用いたポジティブモード測定によりホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、TGの、またp-ニトロアニリンマトリックスを用いたネガティブモード測定によりホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールの各分子種を計2回の測定で分析できた。各分子種はMS-MS分析により確認した。この方法は精密ではないが短時間で主要脂質分子種の大要がわかるので多くの一次検査等に应用可能と考えられ、改良を進めている。

[田中康仁、西島正弘; 田口 良(東京大学医学部メタボローム)]

(2) MALDI-QIT-TOF-MSによるプロスタグランジンE₂定量法の確立と水溶液中での安定性について

0.2μg プロスタグランジン(PG)E₁を内部標準に用いてDHBAマトリックスによるMALDI-QIT-TOF-MSのポジティブモードLow 50+レンジ測定によるPGE₂定量法を確立した。PGE₂、PGE₁はNa付加体として各々m/z=375、377に検出された。シグナルエリア比は少なくともPGE₂濃度0-2μg間で直線的であり定量的測定が可能であった。Na付加体から18マス低い分解物PGAのNa付加体等も少量検出されたがPGE₂分析に影響を与えなかった。2mM PGE₂は中性水溶液中において予想外に安定で室温2日間の保存でもおよそ80%がPGE₂として検出された。

[田中康仁]

VII. 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：17年4月1日～平成18年3月31日

検体数：5件うち一件陽性（非定型型）

発表業績一覧

. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) N. Iwata, Y. Sato, Y. Higuchi, K. Nohtomi, N. Nagata, H. Hasegawa, M. Tobiume, Y. Nakamura, K. Hagiwara, H. Furuoka, M. Horiuchi, Y. Yamakawa and T. Sata: Distribution of PrPSc in the Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy Slaughtered at Abattoirs in Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.*, 59, 100-107, 2006
- 2) K. Furuya, N. Kawahara, Y. Yamakawa, H. Kishida, N. S. Hachiya, M. Nishijima, T. Kirino, K. Kaneko: Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neuroscience Letters*, 402, 222-226, 2006
- 3) Y. Hirota, M. Segawa, F. S. Ouchi, Y. Yamakawa, K. Furukawa, K. Takeyasu and T. Horikome: Dissociation of emerlin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerlin in a *Xenopus* egg cell-free system. *J. Biol. Chem.*, 280, 39925-39933, 2005
- 4) S. Sato, M. Fukasawa, Y. Yamakawa, T. Natsume, T. Suzuki, I. Shoji, H. Aizaki, T. Miyamura, and M. Nishijima: Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J. Biochem.*, in press.
- 5) M. Fukasawa, Y. Tanaka, S. Sato, Y. Ono, Y. Nitahara-Kasahara, T. Suzuki, T. Miyamura, K. Hanada, and M. Nishijima: Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
- 6) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.*, 187, 2448-2457, 2005
- 7) 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.*, 11, 57-61, 2005
- 8) R. K. Ernst, K. N. Adams, S. M. Moskowicz, G. M. Kraig, K. Kawasaki, C. M. Stead, M. S. Trent, and S. I. Miller: The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* 188, 191-201, 2006
- 9) K. Okemoto, K. Kawasaki, K. Hanada, M. Miura, and M. Nishijima: A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. *J. Immunol.*, 176, 1203-1208, 2006
- 10) M. Kobayashi, S. Saitoh, N. Tanimura, K. Takahashi, K. Kawasaki, M. Nishijima, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake: Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* in press.
- 11) K. Saito, M. Nishijima, O. Kuge: Phosphatidylserine is involved in gene expression from Sindbis virus subgenomic promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 12) Y. Inoue, Y. Yamakawa, A. Sakudo, T. Kinumi, Y. Nakamura, Y. Matsumoto, K. Saeki, T. Kamiyama, T. Onodera, and M. Nishijima: Infection Route-Independent Accumulation of Splenic Abnormal Prion Protein. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 78-82, 2005
- 13) Q. Lao, T. Fukamachi, H. Saito, O. Kuge, M. Nishijima, and H. Kobayashi: Requirement of an I \square B- \square COOH terminal region protein for acidic-adaptation in CHO cells. *J. Cell. Physiol.* 207, 238-43, 2006
- 14) S. M. L. Tse, D. Mason, R. J. Botelho, B. Chiu, M. Reyland, K. Hanada, R. D. Inman, and S. Grinstein: Accumulation of diacylglycerol in the Chlamydia inclusion vacuole. Possible role in the inhibition of host cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 25210-25215, 2005
- 15) V. Dolgachev, L. W. Oberley, T.-T. Huang, J. M. Kraniak, M. A. Tainsky, K. Hanada, and D. Separovic: A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 411-417, 2005.
- 16) K. Hanada: Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide (an invited review). *Mol. Cell. Biochem.*, in press.
- 17) S. Wang, Ma'In Y. A. Maitah, K. Hanada, D. Kessel, and

- D. Separovic: Ceramide response post-photodamage is absent after treatment with HA14-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 18) Z.-J. Cheng, R. D. Singh, D. K. Sharma, E. L. Holicky, K. Hanada, D. L. Marks, and R. E. Pagano: Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol. Biol. Cell.*, in press.
- 19) S. Grimmer, B. Spilberg, K. Hanada, and K. Sandvig: Depletion of sphingolipids facilitates endosome to Golgi transport of ricin. *Traffic*, in press.
- 20) M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada: Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAP-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* in press.
2. 和文発表
- 1) 萩原健一、山河芳夫: 異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})と感染性, *医学のあゆみ*, 215, 877-890, 2005
- 2) 花田賢太郎: 膜輸送の新パラダイム: 分子引き抜き転移機構による脂質セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送, *日本細菌学会雑誌*, 60, 531-537, 2005
- Hepatitis C virus core protein, 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2005.10.3, Montreal, Canada
- 5) M. Shirakura, I. Shoji, T. Ichimura, R. Suzuki, T. Suzuki, K. Fukuda, T. Shimoji, K. Murakami, S. Sato, M. Fukasawa, Y. Yamakawa, M. Nishijima, and T. Miyamura: Identification of E6AP as an E3 ubiquitin ligase for HCV core protein, 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2005.10.3, Montreal, Canada
- 6) K. Kawasaki, R. K. Ernst, M. Nishijima, and S. I. Miller: Rremodeling of bacterial outer membrane and innate immune responses, The 18th Naito conference on Innate Immunity in Medicine and Biology II
- 7) K. Hanada: Molecular extraction and transfer mechanism of CERT-mediated trafficking of ceramide, Colloquium and Master Class of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Lipids Moving Center Stage, October 8, 2005, Amsterdam, Netherlands
- 8) K. Hanada: Discussion leader's comments for the session of sphingolipid biophysics, Gordon Research Conference on Glycolipids and Sphingolipid Biology, January 8, 2006, Ventura, CA, USA

学会発表

1. 国際学会

- 1) M. Nishijima: A genetic approach to the intracellular trafficking of ceramide in mammalian cells: mechanisms of CERT (ceramide trafficking protein) function. *Experimental Biology 2005*, 2005.3.31-4.5, San Diego, CA, USA
- 2) K. Hanada: An emerging model for lipid trafficking: non-vesicular transfer of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus at membrane contact sites, The 5th Annual Meeting of Japanese Protein Science Society Satellite Symposium, Membrane Dynamics and Cell Regulation, June 29, 2005, Fukuoka, Japan
- 3) M. Nishijima: Non-Vesicular Intracellular Trafficking of Ceramide by CERT. Gordon Research Conference – Molecular and Cellular Biology of Lipids, 2005.7.24-29, Waterville Valley, NH, USA
- 4) M. Fukasawa, S. Sato, T. Ohsawa, Y. Yamakawa, T. Suzuki, I. Shoji, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Miyamura, and M. Nishijima: Interaction of DEAD box protein 1 with

2. 国内学会

- 1) 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, 第78回日本細菌学会総会, 2005.4.4, 東京
- 2) 佐々木裕子、新開・大内 史子、川上隆雄、見理 剛、堀野敦子、山河芳夫、佐々木次雄 : *Mycoplasma penetrans* のプロテオミクス, 第32回日本マイコプラズマ学会 2005.5.27-28, 久留米
- 3) 花田賢太郎: 細胞内セラミドの細胞内選別輸送, 第82回日本生理学会大会, 2005.5.29, 仙台
- 4) 深澤征義、西島正弘: アセチル CoA カルボキシラーゼ活性欠損 CHO細胞変異株の分離、第47回日本脂質生化学会, 2005.6.3, 金沢
- 5) 天野富美夫、梅崎梨紗、保田立二、田中康仁: PGE₂ リボソームによるマクロファージ活性化調節機構の研究、第47回日本脂質生化学会、2005.6.3, 金沢
- 6) 花田賢太郎: 脂質セラミドのオルガネラ間選別輸送を仲介する蛋白質 CERT, 第5回日本蛋白質科学会年会 2005.6.30, 福岡

- 7) 岩田奈織子、佐藤由子、樋口好美、飛梅実、長田典代、長谷川秀樹、中村優子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎：国内 BSE 牛 3 例の体内分布，2005 年プリオン研究会，2005.8.26，天童
- 8) 岡地潔、横山雄市、古岡秀文、堀内基弘、品川森一、山河芳夫、佐多徹太郎：
- 9) 国内発生 19 頭目 BSE の脳に関する免疫組織化学的研究，2005 年プリオン研究会，2005.8.26，天童
- 10) 山河芳夫：BSE 検査の現状，特別課程食肉検査コース，2005.7.8，国立保健医療科学院
- 11) 川崎清史：病原細菌の宿主適応と宿主のパターン認識，第 6 回日本比較 3 学会合同シンポジウム，2005.8，東京
- 12) 熊谷圭悟、河野美幸、大内史子、西島正弘、花田賢太郎：セラミド輸送タンパク質 CERT に見出された多重リン酸化領域，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.20，神戸
- 13) 河野美幸、熊谷圭悟、西島正弘、花田賢太郎：ER-Golgi 間セラミド輸送タンパク質 CERT に存在する FFAT モチーフの役割，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.20，神戸
- 14) 吉村征浩、熊谷圭悟、花田賢太郎、伊東信：ゼブラフィッシュ初期発生系を用いたセラミド輸送装置 CERT の機能解析，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.20，神戸
- 15) 花田賢太郎：CERT の FFAT モチーフは効率的な小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送に必要である，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.21，神戸
- 16) 田中康仁、矢部邦章、加藤健吾、佐藤慈子、深澤征義、鈴木哲朗、宮村達男、田口良、西島正弘：C 型肝炎ウイルスのコア蛋白発現が Huh7 細胞の脂質プロファイルに及ぼす効果，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.21，神戸
- 17) 萩原健一、中村優子、大内史子、西島正弘、山河芳夫：Conversion of PrPC to PrPSc is prevented by inhibition of dehydrocholesterol reductases; the enzymes of the final steps in the cholesterol synthesis. 第 78 回日本生化学会大会，2005.10.22，神戸
- 18) 佐藤慈子、深澤征義、大澤智子、山河芳夫、鈴木哲朗、勝二郁夫、鈴木亮介、宮村達男、西島正弘：HCV コアタンパク質発現細胞の脂肪滴における DEAD box protein 1 の局在，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.22，神戸
- 19) 川崎清史、サム・ミラー：リポド A 脱アシル化酵素 PagL の潜伏化に外膜アミノアラビノース修飾が関与する，第 78 回日本生化学会，2005.10，神戸
- 20) 工藤紀雄、熊谷圭悟、若槻壮市、西島正弘、花田賢太郎、加藤龍一：セラミド輸送を行う CERT START ドメインの X 線結晶構造解析，第 78 回日本生化学会大会，2005.10.22，神戸
- 21) 白倉雅之、勝二郁夫、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、村上恭子、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男：C 型肝炎ウイルス Core 蛋白の E6AP 依存性分解，第 53 回日本ウイルス学会学術集会，2005.11.22，横浜
- 22) 桶本和男、川崎清史、花田賢太郎、西島正弘：A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1, 第 28 回日本分子生物学会年会，2005.12，福岡
- 23) 工藤紀雄、熊谷圭悟、若槻壮市、西島正弘、花田賢太郎、加藤龍一：Specificity and flexibility of ceramide recognition by CERT START domain, 第 28 回日本分子生物学会年会，2005.12.8，福岡
- 24) 花田賢太郎：膜輸送の新パラダイム：分子引き抜き転移機構による脂質セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送，第 28 回日本分子生物学会年会，2005.12.10，福岡
- 25) 佐々木裕子、大内・新開史子、山河芳夫、川上隆雄、荒川宜親：マイコプラズマとヒトの抗原 mimicry についてのプロテオミクス解析の試み，第 8 回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」2006.3.3-4，かずさアカデミアパーク，木更津
- 26) 佐々木裕子、見理 剛、堀野敦子、荒川宜親、佐々木次雄、大内-新開史子、山河芳夫、川上隆雄：2D-HPLC LC-MS による *Mycoplasma penetrans* のリポ蛋白発現、pyruvate 代謝の解析，日本細菌学会，2006.3.29-31，金沢
- 27) 川崎清史：感染サルモネラ菌の外膜リモデリングと宿主応答，日本薬学会 126 年会，2006.3，仙台
- 28) 深澤征義、西島正弘：細胞内脂肪滴形成が欠損した高等動物細胞変異株の分離，日本薬学会第

126年会, 2006.3.28, 仙台