

## 10. 細胞化学部

部長 花田 賢太郎

### 概要

細胞化学部の設置目的は、「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、プリオン等病原体の感染増殖に関わる宿主細胞の分子や機能を生化学、細胞生物学、遺伝学を中心とした手法を用いて解明し、感染症対策に資する知見や材料を世の中に提供している。また、伝達性海綿状脳症(TSE)検査に関する調査・研究も行っている。

生化学、細胞生物学および体細胞遺伝学という基盤は維持しながらも、進展著しいゲノム編集技術やリポドミクスを取り入れて、所内外の共同研究を活用しつつ感染宿主細胞側の研究を推進している。最近手掛け始めた感染症対策に資する細胞の改良・開発研究も着実に進展しつつある。本年度の研究・業務の概略を以下に記載する。

ウシ海綿状脳症(BSE)プリオンがウシから他種動物へ伝播すると、プリオンの病原性が変化するという報告がある。非定型 L-BSE プリオンがヒトへ伝播・感染する際にも同様の現象が起きるか否かという点は、ヒト・プリオン病にかかわる重要なポイントである。これまでに L-BSE プリオンをウシからカンクイザル(ヒト・モデル)へ伝播させ、初代伝播では病原性は変化しないことを示した。今回、ヒトからヒトへの2次感染を想定し、カンクイザルで2代継代したL-BSEプリオンの病原性を調べるための研究に着手した。一方で、プロテアーゼ K 消化によって異常型プリオン蛋白質の N 末端部を除去しても、従来型 C-および非定型 L-BSE プリオンのマウスに対する固有の病原性が保たれることを見出した。この結果、C-/L-BSE プリオンの物質的性状と病原体特性の関係を探索する上で、物質的解析の妨害となる夾雑物を予め除去した実験・解析系が構築可能となった。

アフリカミドリサル(AGM)腎臓から樹立された Vero 細胞は、I 型インターフェロン遺伝子クラスターを欠失しているため多種類のウイルスに対して感受性が高く、ウイルス学の研究だけでなく、新興・再興感染症における病原体の分離やワクチン生産においても汎用されている。三つの Vero 細胞亜株のゲノム配列および AGM ゲノムドラフト配列間の比較解析から、Vero 細胞ゲノムに 84 箇所の変異を有するレトロウイルス(SERV)挿入位置を見つけ、そのうちの 83 箇所は三細胞亜株間で一致していることを昨年度までに明らかにしており、本年度は

それら SERV 配列の中でユニークな PCR プライマーが設計可能であった 12 か所の SERV をそれぞれ増幅して配列を決定した。2 か所の SERV 配列はレトロウイルスとして見かけ上無傷で全長の配列を有していた。ワクチン生産の細胞基材として使用される Vero 細胞の品質管理に関して、SERV の解析結果をもとにした考察を行った。

当部で樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体により、ヒト肝キメラマウスの C 型肝炎ウイルス(HCV)感染が完全に阻止できることを昨年度報告した。今回さらに、HCV 持続感染ヒト肝キメラマウスに対する影響を検討したところ、抗 Occludin 抗体により、血中 HCV 量が低下することがわかった。このことから、HCV の持続感染状態の維持には、Occludin を介した HCV の侵入過程が重要であることが示唆された。これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー抽出物および含有成分に HCV 感染を阻害する活性があることを見出している。本年度は、カフェ酸に加えタンニン酸も強く HCV 感染を阻害することが明らかとなった。

志賀毒素はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。一方、Subtilase cytotoxin (SubAB) はシアロ糖鎖を受容体として細胞内に侵入し、細胞死を引き起こす。レンチウイルス CRISPR single-guide RNA (sgRNA) ライブラリを用いたスクリーニングにより、遺伝子破壊で志賀毒素もしくは SubAB に耐性を示す遺伝子群を同定し、これら遺伝子群のいくつかをさらに詳細に解析した。

偏性細胞内寄生細菌である *Chlamydia trachomatis* は増殖する際に宿主細胞由来のセラミドを必要とする。セラミドの取り込みは *C. trachomatis* 由来の IncD 蛋白質が宿主セラミド輸送蛋白質 CERT と結合し、CERT の膜間セラミド輸送機能をハイジャックすることで成立する。本年度は、IncD が CERT と結合するためには、IncD の様々な領域が協調的に作用することが必要であることを明らかにした。哺乳動物ゲノムは 2 種類のスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1/SMS2) をコードしている。予想に反して、SMS1/SMS2 遺伝子二重破壊 HeLa 細胞は親株と同程度の *Chlamydia* 感染能を示した。さらなる解析の結果、宿主由来のセラミドは *Chlamydia* の遺伝子産物によりスフィンゴミエリンに変換され得ることが示唆された。

VAP-A 及び B はオルガネラ膜間における脂質輸送において重要な機能を果たしており、またいくつかの病原体の宿主細胞内増殖に必要であることも示唆されている。VAP-A/B 遺伝子の二重破壊は増殖に影響を及ぼすことが予想されるので、それでも解析が出来るよう、CRISPR ノックアウト技術と Tet off 発現システムを組み合わせた誘導型ノックアウト細胞を樹立した。

ヒト肝癌由来 Huh7.5.1-8 細胞は、Vero 細胞と比べて、日本脳炎ウイルスの感染初期から培養上清の感染力価が高く、細胞死がより早期に起こることを昨年度までに見出している。本年度は、Huh7.5.1-8 細胞培養上清の高感染力価は、Vero 細胞よりも多くの感染性ウイルス粒子が放出されているためであることや、Huh7.5.1-8 細胞は黄熱ウイルスワクチン株に対しても高いウイルス産生能を持つことを見出した。

我々は以前、CERT の天然リガンドであるセラミドに構造が類似した低分子化合物 HPA-12 を CERT 阻害剤として開発していたが、この度、セラミドとの構造類似性のない新規 CERT 阻害剤を産官学連携により開発した。

質量分析器を活用した網羅的脂質解析システムを立ち上げ、部内で作製した各種脂質代謝関連遺伝子欠失変異細胞の解析だけでなく、所内横断的な貢献も開始した。

人事面では、酒井祥太博士が北海道大学大学院先端生命科学研究所から当部の招聘型主任研究官として平成 29 年 4 月 1 日付けで着任した。

## 業績

### 調査・研究

#### I. プリオン病に関する研究

##### 1. ヒト培養細胞を用いたプリオン病モデルの確立

これまでに、プリオン遺伝子 (*PRNP*) 欠損細胞株をもとに多型や変異を有するプリオン蛋白質 (PrP) を産生する系を確立した。本系を用いて産生させた多型や変異を有する PrP は、ウェスタンブロッティング解析においてそれぞれ特有の泳動像を示すことから、個々の PrP の性状の違いを反映していることが示唆された。これらの性状の違いが何に起因するのか詳細は不明であるが、内在性 PrP の干渉を受けずに多型や変異による PrP の性状の差異を見いだす解析に本系が有用であると考えられる。[中村優子、萩原健一、花田賢太郎]

##### 2. カニクイザルへ伝播後のウシ海綿状脳症 (BSE) プリオンに関する研究

BSE プリオンがウシから他種動物へ伝播すると、プリオンの病原性が変化するという報告がある。非定型 L-BSE プリオンがヒトへ伝播・感染する際にも同様の現象が起きるか否かという点は、ヒト・プリオン病にかかわる重要なポイントである。これまでに L-BSE プリオンをウシからカニクイザル (ヒト・モデル)

へ伝播させ、初代伝播では病原性は変化しないことを示した。今回、ヒトからヒトへの 2 次感染を想定し、カニクイザルで 2 代継代した L-BSE プリオンの病原性を調べるための研究 (マウスのバイオアッセイ) に着手し、進行中である。[萩原健一; 佐藤由子、飛梅実 (感染病理部); 小野文子 (千葉科学大); 柴田宏昭 (自治医大)]

##### 3. プリオンの化学的性状と病原体特性についての研究

プロテアーゼ K 消化によって異常型プリオン蛋白質の N 末端部を除去しても、従来型 C- および非定型 L-BSE プリオンのマウスに対する固有の病原性が保たれることがわかった。この結果、C-/L-BSE プリオンの物質的性状と病原体特性の関係を探索する上で、解析の妨害となる夾雑物をプロテアーゼ K 消化によって予め除去した実験系が構築可能となった。このような実験系による研究を始めた。[萩原健一; 小野文子 (千葉科学大); 柴田宏昭 (自治医大)]

##### 4. L-BSE プリオンのヒトへの経口感染のリスク評価等を目的とした研究

非定型 L-BSE プリオンは、ヒト・モデルとしてのカニクイザルへ脳内接種すると高効率で感染・伝播する。脳内接種による高い感染効率を鑑み、ヒトが L-BSE プリオンを経口摂取した場合のリスク評価・病態解析を目的として、カニクイザルへ L-BSE プリオンを経口投与し、経過観察を続けてきた。本年度に実験を終え、現在、実験で得た試料の解析を進めている。[萩原健一; 柴田宏昭 (自治医大); 大藤圭子、岡林佐知 (予防衛生協会); 小野文子 (千葉科学大)]

## II. 肝炎ウイルスに関する研究

#### 1. ヒトキメラ型抗 Occludin モノクローナル抗体による C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染阻止

これまでに、樹立したラット抗 Occludin モノクローナル抗体が、HCV 感染を阻止できる知見を得ている。そこで、drugability のさらなる向上を目指して、ラット抗 Occludin モノクローナル抗体のヒトキメラ化を行った。ヒトキメラ型抗 Occludin モノクローナル抗体は、ラット抗体と同様に HCV 感染を強く阻害した。[深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、花田賢太郎; 脇田隆字 (ウイルス第二部); 鈴木哲朗 (浜松医大); 近藤昌夫、八木清仁 (阪大薬)]

#### 2. 抗ヒト Occludin モノクローナル抗体による *in vivo* HCV 感染への影響

樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体により、ヒトキメラマウスの HCV 感染が完全に阻止できることを昨年度報告した。今回さらに、HCV 持続感染ヒトキメラマウスに対する影響を検討したところ、抗 Occludin 抗体により、血中 HCV 量が低下することがわかった。このことから、HCV の持続感染状態の維持には、Occludin を介した HCV の侵入過

程が重要であること示唆された。以上の結果から、Occludin を標的とした抗 HCV 戦略の有効性がさらに示された。[深澤 征義、清水芳実、花田賢太郎;近藤昌夫、八木清仁(阪大 薬)]

### 3. コーヒー含有成分による HCV 感染阻害とそのメカニズムの解析

これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー抽出物および含有成分に HCV 感染を阻害する活性があることを見出している。さらに広範な検討の結果、カフェ酸に加えタンニン酸も強く HCV 感染を阻害することが明らかとなった。これら化合物が HCV 感染のどのステップを阻害しているのかを検討した結果、両化合物ともウイルス粒子自体に作用し、その感染性を失活させることがわかった。さらに、タンニン酸はウイルスゲノム複製およびウイルス粒子分泌過程も阻害することが明らかとなった。コーヒーの摂取と肝がんの発症率は逆相関することが知られている。肝がんの主要な原因である HCV 感染自体に対しても、コーヒー含有成分が阻害効果を示すことから、その関連が注目される。[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎;谷田以誠(順天堂大);脇田隆字(ウイルス第二部);鈴木哲朗(浜松医大)]

### 4. B 型肝炎ウイルス(HBV)感染培養細胞系を用いた解析

HBV 感染細胞系を用いて、特に脂質関連代謝系に注目してさらに検討を進めている。新たに、ミスチン酸による HBV 産生亢進、 $\gamma$ -リノレン酸による HBV 産生抑制が見出された。GPR40 アゴニストである Medica16 により HBV 産生抑制が見られたことから、高度不飽和脂肪酸による HBV 産生阻害は、GPR40 を介する可能性も考えられた。また、微生物由来 ACAT2 特異的阻害剤により、HBV 産生阻害傾向が見られることもわかった。[深澤征義、鈴木咲帆、花田賢太郎;小林哲幸(お茶大);渡土幸一、脇田隆字(ウイルス第二部);田中靖人(名市大)]

## III. 感染症に関わる宿主細胞因子の遺伝学的研究

### 1. CRISPR single-guide RNA (sgRNA)ライブラリを用いた志賀毒素関連因子探索のためのゲノムワイドスクリーニング

志賀毒素(ペロ毒素)はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。以前レンチウイルス CRISPR sgRNA ライブラリを用いたスクリーニングにより、遺伝子破壊で志賀毒素に耐性を示す遺伝子群を同定している。本年度はこれらのうち2種類の遺伝子に関して、以前作製したノックアウト細胞を用いて、さらなる解析を行った。*in vitro* で Gb3 生合成活性を親株と比較したところ、片方のノックアウト細胞では酵素活性の低下が見られたが、もう一方では見られず、両遺伝子産物の作用点は異なることが示唆された。またこれらの遺伝子のホモログに関しても、その一

部で Gb3 生合成への影響が見られたことより、ファミリーの間で保存された機能であることが示唆された。[山地俊之、花田賢太郎;関塚剛史、黒田誠(病原体ゲノム解析研究センター)]

### 2. CRISPR sgRNA ライブラリを用いた Subtilase cytotoxin 関連因子探索のためのゲノムワイドスクリーニング

志賀毒素の他に腸管出血性大腸菌により産生される毒素として Subtilase cytotoxin(SubAB)が知られている。SubAB はシアロ糖鎖を受容体として細胞内に侵入し、細胞死を引き起こす。以前この細胞死に対し上記の CRISPR sgRNA ライブラリを用いて、遺伝子破壊で同毒素に耐性を示す遺伝子群を同定している。本年度はそのうち 3 種類の遺伝子に関して、作製したノックアウト細胞を用いてさらなる解析を行った。その結果1つのノックアウト細胞株において、糖蛋白質の糖鎖構造が顕著に変化していることを明らかにした。このことから、この遺伝子産物は糖鎖の生合成に関与していることが示唆された。[山地俊之、花田賢太郎;関塚剛史、黒田誠(病原体ゲノム解析研究センター);八尋錦之助(千葉大・医);花松久寿、古川潤一(北海道大・医)]

### 3. スフィンゴミエリン合成酵素 SMS1/2 遺伝子の二重破壊細胞株の樹立とクラミジア菌感染への影響

セラミド輸送蛋白質 CERT は哺乳動物細胞においてスフィンゴミエリン合成に必要なセラミドを供給する。一方、偏性細胞内寄生細菌である *Chlamydia trachomatis* は宿主細胞内での増殖の際、CERTによるセラミド供給を必要とする。このことから *Chlamydia* の増殖にスフィンゴミエリンの生合成も必要であることが推測された。そこで哺乳動物において2種類存在するスフィンゴミエリン合成酵素(SMS) 1及び2の二重破壊株を HeLa 細胞にて作製し、*Chlamydia* 感染に対する影響を調べた。ところが予想に反して SMS 二重破壊株は親株と同程度の *Chlamydia* 感染を示した。また *Chlamydia* 自身がスフィンゴミエリンを生合成していることが示唆された。[立田由里子、山地俊之、熊谷圭悟、酒井祥太、花田賢太郎]

### 4. VAP-A 及び B 遺伝子の誘導型二重破壊株の作製

VAP-A 及び B はオルガネラ膜間における脂質輸送において重要な機能を果たしており、また HCV において複製に必要であることがこれまで示唆されている。VAP-A/B の様々な病原体感染に対する影響を検討するため、ノックアウト細胞の樹立を試みた。VAP-A/B 遺伝子の二重破壊は増殖に影響を及ぼすことが予想されるので、それでも解析が出来るよう、CRISPR ノックアウト技術と Tet off 発現システムを組み合わせた誘導型ノックアウト細胞を樹立した。今後病原体感染研究へと応用する予定である。[立田由里子、山地俊之、花田賢太郎]

## 5. 日本脳炎ウイルス(JEV)感染に関わる宿主因子のゲノムワイドスクリーニング

遺伝子のノックアウトまたは過剰発現により JEV に耐性を示す宿主因子を同定するために、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウト系および CRISPR/Cas9 システムの変法である遺伝子発現活性化系を用いて、ウイルス感染による細胞死を指標としたゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、2つの実験系においてそれぞれ複数の候補遺伝子を同定することができた。今後、これらの JEV に耐性を示す候補遺伝子群についてノックアウト細胞および過剰発現細胞を作製し、JEV への耐性を評価する予定である。[佐久間智理、山地俊之、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎; 関塚剛史、黒田誠(病原体ゲノム解析研究センター); 鈴木亮介(ウイルス第二部)]

## 6. 黄熱ウイルス(YFV)サブゲノミックレプリコンの作製

YFV のゲノム複製に関わる宿主因子のスクリーニングに用いるため、YFV ワクチン株(17D-204)のサブゲノミックレプリコンプラスミドを構築した。当該プラスミドを鋳型として合成したサブゲノミック RNA を培養細胞に導入し、レプリコン RNA の複製が起こることを確認した。[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎; 鈴木亮介(ウイルス第二部); 高崎智彦(神奈川県衛生研究所)]

## IV. スフィンゴ脂質に関する研究

### 1. リン酸化による CERT と VAP の相互作用制御

セラミド輸送蛋白質 CERT は小胞体膜からゴルジ体膜へセラミドを輸送する脂質輸送蛋白質である。CERT の 315 番目のセリン残基(CERT S315)がリン酸化されると、CERT と小胞体膜蛋白質 VAP との相互作用が増強され、セラミド輸送活性が上昇する。しかし、そのリン酸化シグナルの実体については全く分かっていない。他の脂質輸送蛋白質のリン酸化に関する文献情報から、スフィンゴ脂質の代謝調節に関係する mTOR が CERT S315 のリン酸化を担っている可能性が高いと判断された。しかし、mTOR の阻害剤を用いて検討したところ、CERT S315 のリン酸化が抑制されなかったことから、mTOR の関与は否定された。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

### 2. NMR 解析と細胞生物学的手法を用いた CERT の制御機構の解明

CERT にはセリンリピートモチーフ (serine-repeated motif; SRM) と呼ばれる活性調節領域が存在する。この領域が多重リン酸化されると、CERT のプレクストリン相同 (PH) ドメインに由来する PI4P 結合活性と、C 末領域に由来する膜間セラミド輸送活性が同時に抑制される。我々は、PH ドメインと擬似的リン酸化 SRM

(PH-SRM(10E)) から成る欠損変異体を用いて NMR 解析を行い、SRM(10E)と PH ドメインが相互作用することを明らかにした。また、この PH-SRM(10E)変異体では PI4P 結合活性が低下し、細胞内における局在が変化することを明らかにした。リン酸化された SRM が直接 PH ドメインと相互作用して当該ドメインの活性を抑制し、ゴルジ体から解離するというモデルを提唱した。[江川大地、熊谷圭悟、花田賢太郎; 杉木俊彦、藤原敏道(阪大); 児嶋長次郎(横浜国大); 竹内恒(産総研); 嶋田一夫(東大); 高橋栄夫(横浜市大)]

### 3. CERT と IncD の相互作用に関する研究

偏性細胞内寄生細菌である *Chlamydia trachomatis* は増殖する際に宿主細胞由来のセラミドを必要とする。セラミドの取り込みは *C. trachomatis* 封入体膜上の IncD 蛋白質が CERT と結合し、CERT が封入体膜にリクルートされることで成立する。我々は、IncD が CERT と結合するためには、IncD の様々な領域が協調的に作用することが必要であることを明らかにした。[熊谷圭悟、花田賢太郎; 安藤秀二(ウイルス第一部); Cheryl Elwell, Joanne Engel(米国 UCSF)]

### 4. 新規 CERT 阻害剤開発:シード化合物の発見

我々は CERT 阻害剤として低分子化合物 HPA-12 をすでに開発している。HPA-12 は、CERT 分子中のセラミド結合ドメインである START ドメインに結合することで CERT 機能を阻害する。しかし、HPA-12 はセラミドに構造が類似しているため、セラミドをリガンドとする CERT 以外の因子にも影響する可能性が危惧された。そこで、セラミドとの構造類似性がない CERT 阻害剤の開発に産官学連携で取り組んだ。すでに知られている CERT START ドメインとセラミドとの共結晶構造を参考にして、約 300 万種類の既存化合物をコンピュータ上でドッキング・シュミレーション探索した結果、セラミドと同様な水素結合ネットワークを START ドメインと形成すると予測されながらも、セラミドとの構造類似性のないシード化合物 SC1 を得た。SC1 と CERT START ドメインとの解離定数  $K_d$  を表面プラズモン共鳴法 (SPR) により測定し、 $K_d \sim 10 \mu\text{M}$  と低い親和性ではあるが、結合性を確認できた。[花田賢太郎; 小林修(東大); 中尾直樹、鈴木誠、川崎祥平、半沢宏之(第一三共 RD ノバーレ)]

### 5. 新規 CERT 阻害剤開発:シード化合物からの展開

SC1 と CERT START ドメインとの共結晶を得て、その X 線回折像の解析をしたところ、水素結合ネットワーク形成はドッキング・シュミレーション予測の通りであったが CERT START ドメインの疎水性ポケットには空間が

残されていることがわかった。SC1 から様々な誘導体をデザインするにあたり、SC1 内の比較的複雑な構造のパートを単純化するために、いくつかの SC1 類似体を化学合成して検討し、目的に沿う誘導体シリーズを導いた。これら誘導体シリーズから、CERT START ドメインとの解離定数が  $1 \mu\text{M}$  以下の新規化合物を複数得ることに成功した。[花田賢太郎；上野雅晴、小林修（東大）；鈴木誠、中尾直樹、川崎祥平、半沢宏之（第一三共 RD ノバーレ）]

#### 6. 新規 CERT 阻害剤開発:細胞レベルでの効果

CERT START ドメインとの解離定数が  $1 \mu\text{M}$  以下の新規化合物に関して、細胞レベルでの CERT 阻害活性を評価する目的で放射性セリンを用いたスフィンゴミエリン代謝標識解析を行った。その結果、これら化合物を培地に  $1 \mu\text{M}$  添加すれば HeLa 細胞中の CERT 活性が有意に阻害されることが明らかとなった。[江川大地、酒井祥太、熊谷圭悟、花田賢太郎]

### V. 感染症対策に資する培養細胞の研究

#### 1. Vero 細胞ゲノムにおけるサル内在レトロウイルス(SERV)の配列決定

三つの Vero 細胞亜株(JCRB0111, ATCC CCL-81, Vero 76)のゲノム配列およびアフリカミドリザル(AGM)ゲノムドラフト配列との間の比較解析から、Vero 細胞ゲノムに 84 箇所、SERV 挿入位置を見つけ、そのうちの 83 箇所は三細胞亜株間で一致していることを昨年度までに明らかにしており、本年度はそれら SERV 配列の中でユニークな PCR プライマーが設計可能であった 12 か所の SERV をそれぞれ増幅して配列を決定した。2 か所の SERV 配列はレトロウイルスとして見かけ上無傷で全長の配列を有していた。[佐久間智理、山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；池田昌輝、長田直樹（北大）；笠井文生（医薬健康研）]

#### 2. Vero 細胞ゲノムに見出されたレトロウイルス様配列の分子系統樹解析

Vero 細胞ゲノム中に見出された無傷で全長のレトロウイルス様配列と他の非ヒト霊長類の SERV の配列および感染性サルレトロウイルスの配列との間で分子系統樹解析を行ったところ、Vero 細胞ゲノムに見出された配列は、旧世界サルの SERV に近い位置にあり、感染性サルレトロウイルスとは別の Clade にマップされた。この結果から、Vero 細胞ゲノム中に見出されたレトロウイルス様配列は、当該細胞樹立の以前にすでにゲノム中に内在していた SERV に由来すると結論された。

[佐久間智理、山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；池田昌輝、長田直

樹（北大）]

#### 3. Vero 細胞の品質管理上の考察

ワクチン生産の細胞基材として使用される Vero 細胞の品質管理に関し、上述した SERV の解析結果をもとにいくつかの考察を行った。まず、Vero 細胞の SERV は通常の培養や継代をする限りにおいてレトロトランスポジションを起こさないことが強く示唆され、このことは細胞の品質安定性の見地から望ましい性状と考察された。一方、SERV から感染性粒子を得た実験例はまだないものの、Vero 細胞ゲノムの SERV の一部はレトロウイルスとして見かけ上無傷で全長の配列を有することから、ワクチン製剤中に SERV 由来の感染性因子のないことを今後も製造過程で確認する必要性を考察した。[佐久間智理、齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；池田昌輝、長田直樹（北大）；笠井文生（医薬健康研）]

#### 4. Huh7.5.1-8 細胞と Vero 細胞におけるフラビウイルス産生の比較解析

HCV 高感受性を指標に分離されたヒト肝癌由来 Huh7.5.1-8 細胞は、Vero 細胞(JCRB9013 株)と比べて、JEV(Nakayama 株)の感染初期から培養上清の感染力価が高く、細胞死がより早期に起こることを見出している。感染細胞培養上清中のゲノム RNA を定量し、ゲノム 1 コピー当たりの感染力価を求めたところ、両細胞間で大きな差はなかった。したがって、Huh7.5.1-8 細胞培養上清の高力価は、Vero 細胞よりも多くの感染性ウイルス粒子が放出されているためと考えられた。また JEV のみならず、YFV ワクチン株(17D-204)の感染時にも、Huh7.5.1-8 細胞は Vero 細胞よりも高いウイルス産生能と早期の細胞死を示した。このような Huh7.5.1-8 細胞の特徴は、新たなフラビウイルスの検出・分離や、ブランクアッセイの改良に有用と考えられる。[齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎；鈴木亮介、脇田隆宇(ウイルス第二部)；小西英二(前阪大微研)]

### VI. 病原体感染時におけるリピドーム変化に関する研究

#### 1. ポリオウイルス感染におけるリピドーム変化の解析

ポリオウイルス感染における宿主細胞の脂質分子種の量的変化をリピドミクス解析により調べた。宿主細胞には、ヒト胎児横紋筋肉腫(RD)細胞および HeLa 細胞を、ウイルス感染にはポリオ疑似ウイルス(PV1pv)を用いた。RD 細胞、HeLa 細胞どちらにおいても、PV1pv 感染 7 時間後に、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール(PI)、コレステロール量が有意に増加することを見出した。特に、PI の増加量は他の脂質に比べて顕著であった。ポリオウイルスの複製に PI-4-モノリン酸(PI4P)が重要であることがこれまでに数多く報告されているが、PI4P の前駆体である PI の関与について

は全く知見がなかったため、今後ポリオウイルス感染におけるPIの役割について評価する予定である。[酒井祥太、花田賢太郎;有田峰太郎(ウイルス第二部)]

## レファレンス業務

### I. 伝達性海綿状脳症(TSE)検査

#### 1. TSE スクリーニング検査に関する外部精度管理試験の実施

TSE スクリーニング検査を行っている国内の検査機関に対して、厚生労働省 医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部 監視安全課からの依頼により、健常マウスおよびスクレイパー感染マウスの脳乳剤を標準検体とした精度管理試験を実施してきた。平成28年度実施分の試験結果に基づいて、一部の検査機関に対しての再試験等の指示が監視安全課からあり、監視安全課ならびに検査機関と調整しつつ、平成29年度に再試験を行った。試験結果等を監視安全課へ報告した。本事業は平成24年度から毎年実施しており、これを以て事業を完了した。[萩原健一、中村優子、花田賢太郎;飛梅実、片野晴隆、長谷川秀樹(感染病理部)]

#### 2. TSE 行政検査・確認検査(ウエスタンブロット法)の担当

TSE 行政検査・確認検査体制を通年維持した。また、試薬等の品質と検査手技の管理を目的として、過去の BSE 陽性ウシおよび陰性ウシを模擬検体とする内部精度管理試験を行った(平成29年9月、平成30年2月実施)。ならびに、検査感度の標準品であるスクレイパープリオン感染マウス脳(北大検査担当と共通の標準品)を更新し、異常型プリオン蛋白質の含量が従前の標準品と合致することを確認した(平成29年8月)。以上の試験データ一式を厚生労働省 医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部 監視安全課へ報告した。[萩原健一、中村優子]

## その他

1. (独)医薬品医療機器総合機構 GLP 専門協議の専門委員[花田賢太郎]

2. 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議委員[萩原健一]

3. 食品安全委員会プリオン専門調査会 専門委員[中村優子]

#### 4. 機器管理運営委員会機器の管理と運用

戸山庁舎の MALDI-飛行時間型質量分析機 (AXIMA-QIT) およびトリプル四重極リニアイオントラップ型質量分析機 (3200QTRAP) の保守・運用を行い、また、適切な節電対策を講じた。また、機器のトラブルへの対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフトを管理した。3200QTRAP を用いたリピドミクス解析を行う基盤を構築した。

本リピドミクス手法を用いて、ウイルス第二部第二室、細菌第一部第三室、同第六室、寄生動物部第一室等と部横断的な共同研究を開始した。[萩原健一、酒井祥太、花田賢太郎]

#### 5. アウトリーチ

(1) 新学術領域研究「細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読」キックオフシンポジウム (2017. 10. 5、東京) にて小胞体膜連携ゾーンを介した脂質輸送に関して講演した。[花田賢太郎; 下嶋美恵 (東工大); 加藤薫 (産総研)]

(2) 大学生及び大学院生を主な対象に「哺乳動物細胞における膜脂質のオルガネラ間選別輸送」の講演をした (東京工業大学・生命理工学フロンティア第四・オープンセミナー、2017. 12. 22)。[花田賢太郎]

(3) 薬学部一年生を対象にした早期体験実習として座学研修「感染予防医薬：ワクチン」と施設見学を行った (2017. 11. 22)。[花田賢太郎; 阿戸学 (感染制御部); 多屋馨子 (感染症疫学センター); 棚林清 (バイオセーフティー管理室)]

(4) 国立感染症研究所戸山庁舎一般公開において、一般入場客を対象とした遺伝子ツアー等を行った (2017. 9. 30)。[佐久間智理、江川大地、立田由里子、鈴木咲帆、酒井祥太、齊藤恭子]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1) Hanada K: Ceramide transport from the endoplasmic reticulum to the *trans* Golgi region at organelle membrane contact sites. *in* "Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Diseases" (Eds., Mitsuo Tagaya & Thomas Simmen), Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, 997, 69-81, 2017

2) Hanada K, Sugiki T: *In vitro* assay to extract specific lipid types from phospholipid membranes using lipid-transfer proteins: a lesson from the ceramide transport protein CERT, *in* "Lipidomics" (Ed., Paul Wood), Series: Neuromethods, Springer, 125, 81-98, 2017

3) Hashimoto Y, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M: Claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies to treat hepatitis and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1397, 5-16, 2017

- 4) Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M: Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion*, 11, 113-127, 2017
- 5) Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, Kiyotake R, Doi R, Iwai S, Omahdi Z, Yamaji T, Miyamoto T, Bamba T, Yamasaki S: Intracellular metabolite  $\beta$ -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, E3285-E3294, 2017
- 6) Tóth E A, Oszvald Á, Péter M, Balogh G, Osteikoetxea-Molnár A, Bozó T, Szabó-Meleg E, Nyitrai M, Derényi I, Yamaji T, Hanada K, László Vigh, Matkó J: Nanotubes connecting B lymphocytes: High impact of differentiation-dependent lipid composition on their growth and mechanics. *Biochim Biophys Acta*, 1862, 991-1000, 2017
- 7) Takigawa M, Iida M, Nagase S, Suzuki H, Watari A, Tada M, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kunisawa J, Kondoh M: Creation of a Claudin-2 Binder and Its Tight Junction-Modulating Activity in a Human Intestinal Model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 363, 444-451, 2017
- 8) Makino A, Abe M, Ishitsuka R, Murate M, Kishimoto T, Sakai S, Hullin-Matsuda F, Shimada Y, Inaba T, Miyatake H, Tanaka H, Kurahashi A, Pack CG, Kasai RS, Kubo S, Schieber NL, Dohmae N, Tochio N, Hagiwara K, Sasaki Y, Aida Y, Fujimori F, Kigawa T, Nishibori K, Parton RG, Kusumi A, Sako Y, Anderlueh G, Yamashita M, Kobayashi T, Greimel P, Kobayashi T: A novel sphingomyelin /cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J.*, 31(4), 1301-1322, 2017
- 9) Sanaki T, Kasai-Yamamoto E, Yoshioka T, Sakai S, Yuyama K, Fujiwara T, Numata Y, Igarashi Y: Direct Involvement of Arachidonic Acid in the Development of Ear Edema via TRPV3. *J. Oleo. Sci.*, 66(6), 591-599, 2017
- 10) Otsuki N, Sakata M, Saito K, Okamoto K, Mori Y, Hanada K, Takeda M: Both sphingomyelin and cholesterol in the host cell membrane are essential for *Rubella virus* entry. *J. Virol.*, 92, e01130-17, 2018 (K.H. and M.T. are co-correspondence. This article was selected as Spotlight of the issue).
- 11) Shimasaki K, Watanabe-Takahashi M, Umeda M, Funamoto S, Saito Y, Noguchi N, Kumagai K, Hanada K, Tsukahara F, Maru Y, Shibata N, Naito M, Nishikawa K: Pleckstrin homology domain of p210 BCR-ABL interacts with cardiolipin to regulate its mitochondrial translocation and subsequent mitophagy. *Genes Cells*, 23, 22-34, 2018
- 12) Sakuma C, Sekizuka T, Kuroda M, Kasai F, Saito K, Ikeda M, Yamaji T, Osada N, Hanada K: Novel endogenous simian retroviral integrations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate. *Sci. Rep.*, 8, 644, 2018 (C.S. and T.S. are co-first authors. N.O. and K.H. are co-correspondence)
- 13) Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukusih S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, Yamamoto M, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M : Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1 mediated K63-linked ubiquitination. *Cell. Microbiol.*, e12846, 2018
- 14) Shimizu Y, Shirasago Y, Kondoh M, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Fukasawa M: Monoclonal antibodies against occludin completely prevented hepatitis C virus infection in a mouse model, *J. Virol.*, in press
- 15) Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, Shimojima M, Saijo M, Fukasawa M: Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *J. Infect. Chemother.*, in press

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Kumagai K, Elwell C A, Ando S, Engel J N, Hanada K: Both the N- and C-terminal regions of IncD are required for the interaction with the PH domain of the host ceramide transport protein CERT, 8<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Chlamydia Basic Research Society, April 7-10, 2017, Charlotte, USA
- 2) Sakai S, Makino A, Nishi A, Ichikawa T, Yamashita T, Tokudome Y, Crumrine D, Uchida Y, Elias P, Tsuchida T,

- Hamanaka S: Ichthyotic-like skin abnormality occurs in neonatal SMS2- deficient mice, 76th Society for Investigative Dermatology annual meeting, April 26-29, 2017, Portland, USA
- 3) Gewaid H E, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, Aly H, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Wakita T, Aizaki H : Sphingomyelin participates in the formation of hepatitis C virus membrane replication vesicles, American Society for Virology Meeting 2017, June 24-28, 2017, Wisconsin, USA
- 4) Otsuki N, Sakata M, Saito K, Mori Y, Okamoto K, Hanada K, Takeda M: Cellular sphingomyelin plays an essential role in infection of rubella virus, IUMS 2017, The International Union of Microbiological Societies, July 17-21, 2017, Singapore
- 5) Gewaid H E, Aoyagi H, Kao Y T, Zheng X, Puig-Basagoiti F, Watashi K, Arita M, Suzuki R, Aly H, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Wakita T, Aizaki H: Sphingomyelin participates in the formation of Hepatitis C virus membrane replication vesicles, The 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 25-28, 2017, Massachusetts, USA
- 6) Suzuki R, Yato K, Tosaka T, Hmwe S-S, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Fukasawa M, Matsuura Y, Wakita T: Structural proteins of hepatitis C virus Genotype 3a S310 strain permit claudin-1-independent entry, The 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 25-28, 2017, Massachusetts, USA
- 7) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Wakita T, Watashi K: Hepatic aryl hydrocarbon receptor-mediated lipid droplets production regulates the assembly efficacy of hepatitis C virus, The 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 25-28, 2017, Massachusetts, USA
- 8) Fukasawa M, Shimizu Y, Yoneda K, Shirasago Y, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M: Characterization and modification of anti-occludin monoclonal antibodies that can prevent HCV infection, The 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, September 25-28, 2017, Massachusetts, USA
- 9) Yamaji T: Genome-wide CRISPR screening for identifying genes involved in glycolipid metabolism, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, February 11-16, 2018, Galveston, USA
- 10) Mikami D, Sakai S, Nishimukai M, Yuyama K, Igarashi Y: Sphingoid long chain bases: Their structural diversity, absorption, and functions for skin improvement, 7th International Singapore Lipid Symposium (ISLS7), March 7-9, 2018, Singapore
- 11) Sakuma C, Sekizuka T, Kuroda M, Kasai F, Saito K, Ikeda M, Yamaji T, Osada N, Hanada K: Endogenous simian retrovirus variations in Vero cells: implications for quality control of a human vaccine cell substrate, 4th International Symposium of Medicinal Sciences, March 25-28, 2018, Kanazawa, Japan (Invited Poster Presenters)
2. 国内学会
- 1) 白砂圭崇、清水芳実、近藤昌夫、八木清仁、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、深澤征義: インタクトな Occludin の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体の樹立と性状解析、第 69 回日本細胞生物学大会、2017.6.13-15、仙台
- 2) 大槻紀之、坂田真史、齊藤恭子、森嘉生、岡本貴世子、花田賢太郎、竹田誠: 細胞膜上のスフィンゴミエリンは風疹ウイルスの感染に不可欠である、第 59 回日本脂質生化学会、2017.6.15-16、京都
- 3) 白砂圭崇、谷田以誠、鈴木咲帆、稲森陽子、小林哲幸、花田賢太郎、深澤征義: コーヒー含有成分の肝炎ウイルス感染への影響の解析、第 59 回日本脂質生化学会、2017.6.15-16、京都
- 4) 山地俊之、立田由里子、佐久間智理、関塚剛史、黒田誠、花田賢太郎: CRISPR ライブラリーを用いた志賀毒素の細胞障害作用に対するゲノムワイドスクリーニング、第 59 回日本脂質生化学会、2017.6.15-16、京都
- 5) 花田賢太郎: CERT 研究における今までの総括と今後の展望、第 12 回スフィンゴセラピー研究会、2017.7.14-16、石川県羽咋郡
- 6) 竹田誠、大槻紀之、坂田真史、齊藤恭子、岡本貴世子、森嘉生、花田賢太郎: 風疹ウイルスの感染メカニズムと細胞膜脂質の役割、第 49 回日本小児感染症学会、2017.10.21-22、金沢

- 7) 白砂圭崇、稲森陽子、脇田隆宇、鈴木哲朗、花田賢太郎、深澤征義:HCV感染に対するコーヒー抽出成分の阻害効果、第65回日本ウイルス学会、2017.10.24-26、大阪
- 8) 大橋啓史、中嶋翔、金ソレイ、深澤征義、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、大谷直子、脇田隆宇、渡士幸一:Novel Crosstalk of Xenobiotic Response with Lipid Biosynthesis Pathway regulates the Host Permissiveness to the Hepatitis C Virus Production. 第65回日本ウイルス学会、2017.10.24-26、大阪
- 9) 杉木俊彦、江川大地、熊谷圭悟、児嶋長次郎、藤原敏道、竹内恒、嶋田一夫、花田賢太郎、高橋栄夫:セラミド輸送蛋白質 CERT のリン酸化による機能制御の構造生物学的解析: CERT-Golgi 体の結合が CERT のリン酸化によって抑制されるメカニズムの溶液 NMR 法による解明、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 10) 江川大地、富重斉生、山地俊之、熊谷圭悟、花田賢太郎:セラミド輸送タンパク質 CERT におけるリン酸化を介した機能抑制制御に必要な正電荷リピートを持つ coiled-coil モチーフ、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 11) 熊谷圭悟、Elwell C A、安藤秀二、Engel J N、花田賢太郎:クラミジアのエフェクタータンパク質 IncD と宿主細胞由来のセラミド輸送タンパク質 CERT の PHドメインとの結合には IncD の N 末領域と C 末領域が必要である、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 12) 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、脇田隆宇、小西英二、花田賢太郎:ヒト肝癌由来 Huh7.5.1-8 細胞とアフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞における日本脳炎ウイルス産生の比較解析、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 13) 山地俊之、関塚剛史、佐久間智理、立田由里子、黒田誠、花田賢太郎:CRISPR ライブラリーを用いた糖脂質生合成に影響を及ぼす因子の探索、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 14) 野田和彦、鈴木佑典、香取正人、宮本佳菜子、佐藤あかり、山地俊之、榎泰典:脂質組成変化に伴うグロビン発現制御機構の解明、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 15) 島崎健太郎、高橋美帆、梅田真郷、舟聡、斎藤芳郎、野口範子、熊谷圭悟、花田賢太郎、丸義朗、柴田識人、内藤幹彦、西川喜代孝:P210 型 BCR-ABL PHドメインのリガンド特性およびその病理的意義の解明、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 16) 深澤征義、清水芳実、米田宏平、白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、八木清仁、近藤昌夫:抗 C 型肝炎ウイルス活性を有する抗 Occludin モノクローナル抗体の性状解析と改変、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 17) 酒井祥太、牧野麻美、西明仁、市川毅、山下匡、徳留嘉寛、Debra Crumrine、内田良一、Peter Elias、土田哲也、濱中すみ子:スフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2)ノックアウトマウスにおける魚鱗癬様の皮膚症状の解析、生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017、2017.12.6-9、神戸
- 18) 花田賢太郎:小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送を司る CERT の解析とその阻害剤開発、日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢
- 19) 深澤征義:HCV 侵入過程の基礎研究から感染防御・予防・治療の応用研究へ、日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢
- 20) 白砂圭崇、稲森陽子、谷田以誠、鈴木哲朗、花田賢太郎、深澤征義:カフェ酸とタンニン酸の C 型肝炎ウイルス感染阻害メカニズムの解析、日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢