

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の上にゲノム編集技術やリポドミクスといった新しい手法も取り入れ、そして、所内外の共同研究を活用しつつ、主に感染宿主細胞側の研究を推進している。感染症対策に資する細胞の改良・開発研究も進展しつつある。本年度の研究・業務の概略を以下に記載する。

プリオンは、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の多量体(凝集体)から成る。従来型ウシ海綿状脳症プリオンを対象とした光架橋反応物の解析から、 PrP^{Sc} 単量体同士の境界面を推定した。C 型肝炎ウイルス(HCV)は肝細胞のみに感染することが知られているが、HCV 感染に必須とされる宿主膜タンパク質クローディン1を欠失させた肝細胞にも感染できるHCV亜株を見だし、HCV 侵入時の細胞因子依存性が変化しうることを示した。一方、B 型肝炎ウイルスゲノムの宿主ゲノムへの挿入を時系列に検討し、感染後30分ですでに挿入が起こっており、経時的に挿入数・箇所が増えていくことを明らかにした。偏性細胞内寄生細菌クラミジアの感染細胞において、小胞体で合成されたセラミドは宿主細胞の発現するセラミド輸送タンパク質 CERT を介して封入体へと運ばれた後、クラミジアゲノムがコードする因子によってスフィンゴミエリンへと変換されていることを示唆した。さらに、クラミジア封入体膜タンパク質 IncD が CERT と会合する機序も原子レベルで明らかにしつつある。

中性スフィンゴ糖脂質 Gb3 は志賀毒素の膜受容体である。糖脂質欠損 HeLa 細胞に糖タンパク質のみ Gb3 様構造を持たせる工夫を施し、糖鎖構造は同じでも脂質型かタンパク型かで志賀毒素結合後の細胞内侵入経路が異なることを明らかにした。一方で、スフィンゴ脂質合成の初発ステップを担うセリン・パルミトイル転移酵素活性を欠損させた HeLa 細胞を特定の無血清培地で継代培養することで、細胞中のスフィンゴ脂質をほぼ完全に欠失可能な状態にすることに成功し

た。

ヒト肝癌組織から樹立された不死化細胞株 HuH-7 細胞およびその由来細胞株は C 型肝炎ウイルスなどのヒト感染性ウイルスの宿主細胞として汎用されている。今回、HuH-7 細胞および Huh7.5.1-8 細胞の全ゲノム配列を決定し、両者間での変異の差を明らかにするとともに、両者に共通する欠失変異がこの細胞系列の同定試験に利用できることを示した。アフリカミドリサル腎臓から樹立された Vero 細胞は広汎なウイルスに対して高感受性を示す有用なウイルス分離株の一つである。世界保健機構がポリオ根絶を目指して策定した行動計画への対応に資するべく、この度、ポリオウイルス非感受性 Vero 細胞株を作出した。一方で、黄熱ウイルスの複製に関わる宿主細胞因子探索等のため黄熱ウイルスサブゲノミックレプリコンを維持する Vero 細胞を樹立し、当該細胞のレプリコン維持安定性を確認した。

培養細胞感染系を用い、ある種のポリフェノール類に重症熱性血小板減少症候群ウイルス感染を阻害する活性があることを見出し、当該化合物は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を明らかにした。一方、我々が昨年度までに開発した CERT 阻害剤の抗ウイルス活性及び抗クラミジア活性を調べたところ、複数のヒト感染性病原体に対する抑制効果が培養細胞レベルで認められた。

業績 調査・研究

I. プリオン、ウイルス等病原体の研究

1. プリオンの生化学的性状についての研究

プリオンは、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の多量体(凝集体)から成る。これまでに PrP^{Sc} 凝集体のモデルが複数提唱されているが、凝集体構造の実体は未だ不明である。構造解明の糸口となる知見を得ることを目的として、光照射によるチロシン、トリプトファン残基の架橋反応に着想を得た研究を進めた。従来型ウシ海綿状脳症プリオン(C-BSE プリオン)を対象とした光架橋反応物の解析から、 PrP^{Sc} の少なくともアミノ基側領域が PrP^{Sc} 単量体同士の境界面に位置すると推測した。[萩原健一]

2. Claudin-1 に依存しない C 型肝炎ウイルスの感染

これまでに、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染は、宿主の CD81、Claudin-1、Occludin が感染に必須の因子であること

が報告されている。培養細胞系に適応させた HCV-JFH1 株より、Claudin-1 欠損肝細胞にも感染できる亜株が存在することを見だし、クローン化後、ゲノム配列の決定を行った。その結果、エンベロープタンパク質に複数の変異を見出した。当該亜株は、CD81、Occludin には依存性を示し、Claudin-1 にのみ依存性を示さないことも確認された。HCV は肝細胞のみに感染することが知られているが、本研究結果から、宿主細胞依存性が変化する可能性があることが示唆された。[深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、花田賢太郎; 深澤秀輔(品質管理部); 脇田隆字(所長); 鈴木哲朗(浜松医大)]

3. B 型肝炎ウイルスゲノムの宿主肝細胞への挿入解析

B 型肝炎ウイルス (HBV) に感染すると、ゲノムの一部が宿主細胞ゲノムに挿入され、それががん化などの病原性に関わると考えられている。HepG2/hNTCP-C4 細胞を用いた HBV 感染系を用いて、HBV ゲノムの宿主ゲノムへの挿入を時系列に検討した結果、感染後 30 分ですでに挿入が起こっており、経時的に挿入数・箇所が増えていくことが明らかとなった。HBV 感染後のきわめて初期から HBV ゲノムが宿主ゲノムに挿入され、蓄積していく可能性が明らかになったことから、病態発現の理解の観点からもより詳細な検討・対策が必要と思われた。[深澤征義、清水芳実; 渡士幸一(ウイルス第二部); 脇田隆字(所長); Ranjit Chauhan, Thomas Michalak (メモリアル大)]

4. クラミジア感染依存的に出現するスフィンゴミエリン合成活性の発見

偏性細胞内寄生細菌であるクラミジア・トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*) は宿主細胞内に封入体を形成し、その中で増殖する。その際、宿主細胞が合成したセラミドは、セラミド輸送タンパク質 CERT が封入体膜にリクルートされることを介して、クラミジアに利用されるようになる。封入体に到着したセラミドは、宿主細胞ゲノムのコードするスフィンゴミエリン合成酵素 SMS1 または SMS2 によってスフィンゴミエリンへと変換されてクラミジアに利用されると考えられていた。しかし、今回、SMS1/SMS2 遺伝子を欠失させた HeLa 細胞においてもクラミジアは正常に感染増殖することを見出した。一方、CERT 遺伝子を欠失させると感染増殖不能となった。さらに、SMS1/SMS2 二重欠失細胞において、クラミジア感染依存的にセラミド→スフィンゴミエリン変換活性が出現することも見出した。これらの結果から、クラミジア感染細胞において、小胞体で合成されたセラミドは CERT を介して封入体へと運ばれ、菌のゲノムがコードする因子によってスフィンゴミエリンへと変換されていることを示唆した。[立田由里子、熊谷圭悟、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎; 安藤秀二(ウイルス第一部)]

5. CERT PH ドメインとクラミジア IncD タンパク質との相互作用

用に関する研究

クラミジア・トラコマティスは CERT を封入体膜に局在化させることによってセラミドを効率よく取り込み、そのセラミドを自らの増殖に利用している。クラミジアが CERT を封入体膜に局在化させるメカニズムの一つに、封入体膜上のクラミジア由来タンパク質 IncD と CERT の PH ドメインとの結合が知られている。我々は IncD と CERT PH ドメインとの結合について解析を続けており、現在、当該結合における CERT PH ドメインの構造的変化を NMR によって解析している。IncD は膜タンパク質であり、NMR 解析は容易でない。我々は可溶性の IncD を創出することで改良を図り、これを用いて CERT PH ドメインの特定の領域にケミカルシフト値の摂動が多発していることを突き止めた。強い摂動が観測されたアミノ酸に変異を入れて、結合に影響が見られるか検討を行なっている。[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)]

II. 感染症に関わる宿主細胞因子の研究

1. 志賀毒素の糖タンパク質性受容体と糖脂質性受容体の相違

志賀毒素の膜受容体は中性スフィンゴ糖脂質の一つであるグロボトリアオシルセラミド Gb3 とされている。ハト由来のガラクトース転移酵素である pA4GalT2 は Gb3 合成酵素 A4GalT のホモログであるが、基質特異性として糖タンパク質上に Gb3 類似構造を生合成する。以前糖脂質欠損 HeLa 細胞に pA4GalT2 を発現させることで、糖タンパク質のみ Gb3 様構造を有する細胞を樹立している。この細胞は十分な志賀毒素結合性を有するものの、糖脂質性受容体 (Gb3) を有する HeLa 細胞と比較し、志賀毒素に対する感受性が低かった。そこで志賀毒素の細胞内輸送を蛍光顕微鏡及び光線-電子線相関顕微鏡法で調べたところ、Gb3 を受容体とする場合には速やかに細胞内に取り込まれ、ゴルジ体へ逆輸送されるのに対し、糖タンパク質性受容体の場合、細胞表面に滞在する割合が高く、また細胞内に取り込まれた後エンドソームにおける蓄積が見られた。[森本貫太、花田賢太郎、山地俊之; 鈴木詔子(新潟大自然); 鈴木佑典(日大理工); 谷田以誠、角田宗一郎、古田陽子、内山安男(順大医)]

2. CRISPR 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と解析

以前 HeLa 細胞及び Vero 細胞亜株 (VeroC1008) 細胞において、レンチウイルス CRISPR ノックアウト (KO) 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を同定している。本年度は、VeroC1008 細胞を用いたスクリーニングで特異的に同定された遺伝子に関してノックアウト細胞を作製した。今後、作用機構の解析を行う予

定である。[山地俊之、佐久間智理、森本貫太、花田賢太郎]

3. 糖鎖生合成に影響を及ぼすイオントランスポーター様タンパク SLC39A9 の解析

以前、腸管出血性大腸菌により産生される *Subtilase cytotoxin* に対する CRISPR KO スクリーニングにおいて、受容体糖鎖の生合成に影響を及ぼす亜鉛トランスポーターファミリーの SLC39A9 を同定している。本年度はこの遺伝子の機能的ホモログが存在するか検討した。SLC39A9 KO 細胞に対して、様々な亜鉛トランスポーターファミリーの cDNA を発現させたところ、SLC39A9 以外は糖鎖不全を回復させることは出来なかった。このことは SLC39A9 が糖鎖生合成において特異的な作用を有することを示唆している。[宇野友里花、花田賢太郎、山地俊之]

4. 病原性抗酸菌の表面糖鎖と免疫細胞の貪食・食胞形成機構の関係を解明するための遺伝子改変細胞樹立

結核菌や病原性を有する非結核性抗酸菌は細胞壁の成分として、病原性抗酸菌特有のマンノース付加リポアラビノマンナン (ManLAM) を有する。ManLAM はマクロファージ等が行う細菌貪食のリガンドとなるだけでなく、食胞成熟を阻害することで持続感染に関与する。この貪食及び食胞成熟の各ステップにおいて、ManLAM に対する宿主因子の関与を明確に区別するため、モデル細胞としたマクロファージ様細胞株 THP-1 において、貪食受容体の一つ CD11b (Mac1) 及び脂質ラフト形成に影響を及ぼすセラミド合成酵素 2 (CERS2) の遺伝子ノックアウト細胞を樹立した。[山地俊之; 岩渕和久、中山仁志 (順大環医研)]

5. 黄熱ウイルス (YFV) サブゲノミックレプリコンを維持する Vero 細胞 (レプリコン細胞) の性状解析

YFV の複製に関わる宿主細胞因子探索等のために樹立した、YFV ワクチン株 (17D-204) 由来レプリコン細胞の性状解析を行った。レプリコン RNA を定量した結果、当該細胞ではレプリコンが持続的に複製されて、継代を経ても維持されていることを確認した。レプリコンの複製はインターフェロン γ 等により抑制されたが、それらの YFV ワクチン株感染系におけるウイルス産生阻害効果と程度が一致していた。このことから、レプリコンの複製はウイルス感染時の複製を反映することが示唆された。[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)]

6. NPC1 ノックアウト細胞の樹立と性状解析

NPC1 分子は、Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) の原因遺伝子の一つとして知られ、生理機能として細胞内コレステロール輸送活性が知られる。一方で、エボラウイルス、マールブルグウイルスの感染には宿主の NPC1 分子が必須であることも知られている。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、NPC1 ノックアウト細胞を各種細胞株から樹立することに成功

した。また、ノックアウト細胞株に NPC1 発現を戻した細胞も樹立した。NPC1 ノックアウト細胞では、NPC 患者由来細胞と同様に、リソソームへの典型的なコレステロール蓄積が見られることも確認された。このコレステロール蓄積は、NPC1 発現により解消された。これら細胞株を用い、シュードタイプエボラウイルスの感染が NPC1 分子依存的に起こることも確認された。[深澤征義、白砂圭崇、鈴木咲帆、鈴木建; 朴ウンシル (獣医科学部); 谷英樹 (富山大); 森川茂 (岡山理科大); 小林哲幸 (お茶大理)]

7. リン酸化を介した CERT 機能抑制機序の研究

小胞体で新規合成されたセラミドはセラミド輸送タンパク質 CERT によりゴルジ体へと輸送され、スフィンゴミエリンに代謝される。CERT の N 末にはホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) 結合能を有するプレクストリン相同 (PH) ドメインがあり、そのすぐ下流に制御性領域であるセリンリピートモチーフ (serine-repeated motif; SRM) が存在する。SRM が多重リン酸化されると、CERT の PI4P 結合活性と、C 末領域の START ドメインの持つ膜間セラミド輸送活性が同時に抑制される。多重リン酸化 SRM 依存性の抑制制御が CERT 分子内の別の部位の変異導入により不全となることを見出し、分子内相互作用により CERT コンフォメーションが大きく変化して PH ドメインと START ドメインがお互いマスクするというモデルが支持された。[後藤麻子、熊谷圭悟、花田賢太郎]

8. CERT が小胞体—ゴルジ体膜接触部位で機能する機序に関する遺伝生化学的研究

CERT が適切に機能するために必要な宿主因子を網羅的に見出すため、スフィンゴミエリン結合性細胞毒ライセニンへの耐性を HeLa 細胞に与えることを指標にしてゲノムワイドスクリーニングを実施し、複数のカテゴリーに分類される候補遺伝子を昨年度までに見出した。今年度は、ゴルジ体上での PI4P 生産に関わる因子に注目して解析を加え、これら因子は CERT が小胞体-ゴルジ体膜接触部位で機能するために重要であることを明らかにした。[水池彩、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎]

9. 高浸透圧ストレスにより誘導される CERT のリン酸化

CERT は自身の FFAT モチーフを介して小胞体膜蛋白質 VAP と相互作用する。その際、CERT の FFAT モチーフ近傍に位置する 315 番目のセリン残基 (S315) がリン酸化されると、VAP との相互作用が増強され、セラミド輸送活性は更に上昇する。今回、CERT の S315 部位のリン酸化が高浸透圧ストレスにより顕著に亢進されること、そして、細胞を等張条件に戻せば S315 リン酸化は経時的に減弱することを見出した。これらの結果は、CERT S315 部位のリン酸化は細胞内で可逆的に制御されていることを示している。[島崎健太郎、熊谷圭悟、花田賢太郎]

10. スフィンゴ脂質欠失細胞の樹立と性状解析

以前に当研究部で作成された、スフィンゴ脂質合成の律速酵素であるセリン・パルミトイル転移酵素 (serine palmitoyltransferase; SPT) のサブユニットを欠損させた HeLa 細胞 (SPTSSA ノックアウト細胞) を用いて、内因性のスフィンゴ脂質を欠失させた細胞の作出を試みた。血清含有培地での培養では、細胞内スフィンゴ脂質量は親株と比べて 3 割程度の減少しか認められなかった。そこで、SPTSSA ノックアウト細胞の無血清条件下での継代培養が可能な条件を探索した結果、特定の無血清培地で継代培養が可能で、また同培地で最低 2 回継代培養を行うことで、細胞中のスフィンゴ脂質をほぼ完全に欠失可能なことを見出した。スフィンゴ脂質欠失細胞に外部から同脂質を添加することで、哺乳動物が持たない構造のスフィンゴ脂質に置きかえた細胞の作出も可能となった。さらに、感染にスフィンゴ脂質を必要とする病原体とスフィンゴ脂質の構造との関わりについての研究を開始した。[酒井祥太、花田賢太郎]

III. 感染症対策に資する培養細胞の研究

1. HuH-7 細胞及び Huh7.5.1-8 細胞の全ゲノム配列決定

HuH-7 細胞は日本人男性の摘出肝癌組織から樹立された不死化細胞株である。HuH-7 細胞に由来して、Huh7.5、Huh7.5.1、Huh7.5.1-8 の細胞亜株が分離されており、これら細胞株は HCV などヒト感染性ウイルスの宿主細胞として感染症研究に汎用されている。HuH-7 細胞および Huh7.5.1-8 細胞の全ゲノム配列を決定し、両者間での indel 変異、1 塩基変異の差を明らかにするとともに、両者に共通する欠失変異がこの細胞系列の同定試験に利用できることを示した。[山地俊之、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎; 川本真輝、遠藤俊徳、里村和浩、長田直樹 (北海道大)]

2. Huh7.5.1-8 細胞のウイルス RNA センサー RIG-I cDNA 配列の解析

Huh7.5、Huh7.5.1 細胞亜株の HCV 高感受性の原因の一つは、RIG-I の T55I 変異による機能不全と報告されている。我々が分離した Huh7.5.1-8 細胞の RIG-I 遺伝子配列を調べたところ、コドン 55 について野生型と変異型の 2 種類のアレルが存在していた。RIG-I cDNA 配列の解析から、当該細胞は T55I 変異を有する全長 mRNA と野生型コドン 55 を有する短い mRNA を発現していることがわかった。後者はスプライズバリエーションで、翻訳産物は ATP 結合領域を持たず、RIG-I としての機能は欠損すると予想された。詳細な解析の結果、HuH-7 細胞系列では 2 つのアレルの一方から全長 mRNA が、他方からスプライズバリエーションが転写されており、Huh7.5.1-8 と Huh7.5.1 は前者に T55I 変異を有すると示唆された。以上の結果から、Huh7.5.1-8 細胞とその親株 Huh7.5.1

細胞は RIG-I の null 変異株であると結論した。[齊藤恭子、深澤征義、山地俊之、花田賢太郎; 長田直樹 (北海道大)]

3. ヒト培養細胞を用いたプリオン病モデルの確立

予防法や治療法が未だ確立されていないヒトプリオン病に特化した解析系の確立を目的とした研究を行った。ヒトのプリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損細胞株を新たに樹立し、遺伝性プリオン病に関連するアミノ酸置換を有する PrP を産生させて解析を行った。その結果、各々の置換体が異なる生化学的性質を有することを見だし、本成果に関する誌上发表を行った。[中村優子、萩原健一、花田賢太郎]

4. プリオンの持続感染が可能な培養細胞の探索

マウスへ馴化させたスクレイピープリオンはマウス神経芽細胞腫由来の N2a 細胞に感染可能であり、プリオンは持続的に増殖する (Butler ら, *J Virol*, **62**: 1558 (1988))。この持続感染細胞 (ScN2a 細胞) はプリオン研究において重要な研究資源となっているが、マウス馴化スクレイピープリオン以外のプリオン株は N2a 細胞で必ずしも持続的に増殖しないことが知られている。このため新たな細胞実験系の開発は意義深く、プリオンの持続感染・増殖を許容する N2a 細胞以外の培養細胞の探索を始めた。[萩原健一]

5. ポリオ根絶グローバル・アクション・プランに資するポリオウイルス非感受性 Vero 細胞株の作製

ポリオ根絶を目指し WHO が策定した行動計画 (Global Action Plan, 3rd edition; GAPIII) への対応を念頭に、Vero 細胞由来のポリオウイルス受容体 (PVR) 欠損細胞株を作出し、ポリオウイルス (PV) 非感受性であることを確認した。アフリカミドリサル腎臓から樹立された Vero 細胞は広汎なウイルスに対して高感受性を示す有用なウイルス分離株の一つである。一方、PV に対する感受性も高く、PV 以外のウイルスの増殖分離作業において意図せず PV を増殖させてしまうリスクを伴う。かつての、あるいは今日の PV 流行地域で採取された検体等を取り扱う際に PVR 欠損 Vero 細胞株を用いることで、PV 保管施設関連での PV 拡散リスクを最小限に抑えることが可能であると期待する。[中村優子、齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎; 染谷健二、竹田誠 (ウイルス第三部)]

IV. 抗病原体作用物質に関する研究

1. Occludin を標的とした抗 C 型肝炎ウイルス侵入阻害剤スクリーニング

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染を強力に阻止できるラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体を樹立し、さらに一価抗体によっても感染を阻害できることからより低分子での感染阻害が可能であること示してきた。また、本抗体を用い、Occludin を標的とした抗 HCV 侵入阻害剤スクリーニング系を樹立してきた。そこで、低分子化合物ライブラリを用い、毒性試験を含め

3 段階のスクリーニングを実施し、HCV 感染阻害能を示す陽性検体を複数得た。[深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、花田賢太郎;近藤昌夫、八木清仁(阪大薬);沢崎達也、高橋宏隆(愛媛大);篠田雄大、染谷友美、白水美香子(理研)]

2. コーヒー含有成分カフェ酸による HCV 感染阻害メカニズムの解析

これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー抽出物カフェ酸に HCV 感染を阻害する活性があることを見出し、その阻害メカニズムの解析から、カフェ酸は主に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でウイルス感染を阻害していることを示してきた。カフェ酸による HCV 感染阻害の分子基盤をさらに解析するために、各種カフェ酸類縁体の抗 HCV 効果を検討した結果、感染阻害には、少なくとも *o*-dihydroxybenzene 構造が重要であることが明らかとなった。[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎;脇田隆字(所長);鈴木哲朗(浜松医大)]

3. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染を阻害する天然化合物の解析

これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー含有成分のカフェ酸に重症熱性血小板減少症候群ウイルス(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV)感染を阻害する活性があることを見出している。そこで、他の天然化合物についても抗 SFTSV 活性を検討した結果、ある種のポリフェノール類に抗 SFTSV 活性が見られることがわかった。SFTSV 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、少なく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でウイルス感染を阻害していることがわかった。[深澤征義、白砂圭崇;小川基彦、下島昌幸、西條政幸(ウイルス第一部)]

4. CERT 阻害剤の抗感染病原体活性評価

CERT に対する選択的な阻害剤として、セラミド類似構造をもった(1*R*,3*S*)-HPA-12 と類似構造を持たない E16A の二種類の低分子化合物を我々は昨年度までに開発している。これら CERT 阻害剤の抗ウイルス活性及び抗クラミジア活性を培養細胞感染実験系において調べた。細胞感染に CERT が必要と考えられている風疹ウイルス(ルシフェラーゼ発現疑似ウイルス)、クラミジア・トラコマティス(Serovar L1 株)に対しては、予想通りに両阻害剤はともに有意の感染増殖抑制能を示した一方で、HCV(ルシフェラーゼ発現レプリコン)の複製抑制は予想に反してあまり認められなかった。日本脳炎ウイルス(中山株)については E16A にのみ抗ウイルス活性が認められた。また、感染増殖において CERT 依存性が認められていないポリオウイルス(疑似ウイルス粒子)は CERT 阻害剤に対しても耐性であった。[齊藤恭子、熊谷圭悟、酒井祥太、花田賢太郎;相崎英樹、有田峰太郎(ウイルス第二部);大

槻紀之、竹田誠(ウイルス第三部);上野雅晴、小林修(東京大学)]

5. CERT 阻害剤の立体異性体による未知のメカニズムを介した抗クラミジア活性の発見

CERT に対する各種阻害剤、および、その立体異性体がクラミジア・トラコマティスの増殖に与える影響について調べた。CERT 阻害剤の抗クラミジア活性の強さは、概ね CERT 阻害活性の強さと相関していたが、興味深いことに、ある化合物の立体異性体は CERT への阻害活性をほとんど示さないにも関わらず、クラミジアの増殖を顕著に抑制することが分かった。当該立体異性体の宿主細胞に対する毒性は、対象とした他の化合物とほとんど変わらず、細胞毒性では説明がつかなかった。現在、当該立体異性体がどのような作用機序でクラミジアの増殖を抑制しているのか検討している。[熊谷圭悟、花田賢太郎;小林修(東京大学)]

V. その他の研究

1. 精神発達遅滞の原因と示唆されている *CERT1* 変異の解析

常染色体ドミナント遺伝性の精神発達遅滞の原因変異の一つに CERT をコードする遺伝子 *CERT1* 上のミスセンス変異が欧米でいくつか報告されており、この変異は CERT SRM の多重リン酸化を介した機能抑制制御の不全を導くと推定されている。この度、重篤な精神発達遅滞を伴う日本人患者から、今まで報告がない *CERT1* 上の変異が見出された。また、スペイン国の患者からも別の変異が見出された。これらの変異が CERT 機能に及ぼす影響を細胞レベルで解析できる実験系を開発した。[田村律人、花田賢太郎;村上博昭、黒澤健司(神奈川県立こども医療センター);Juan Darío Ortigoza-Escobar(スペイン国サンファンデディオ病院)]

2. 上皮細胞における糖鎖・脂質結合タンパク質の遺伝子ノックアウト細胞樹立

(a) AnnexinA1 はカルシウム依存的にリン脂質と結合する Annexin ファミリーの1つである。この AnnexinA1 の上皮細胞における細胞極性に与える影響を解析するため、イヌ腎臓上皮細胞株 MDCK 細胞において、遺伝子のノックアウト細胞を作製した。

(b) ZG16 はヒトの膵臓や肝臓、腸管に高発現している分泌タンパク質であり、マンノースやヘパリン/ヘパラン硫酸と結合する特徴を持つ。近年、大腸がん患者のがん組織において ZG16 の発現が抑制されていることが報告されている。この ZG16p の細胞増殖への影響を解析するため、ヒト結腸癌細胞株 Caco-2 細胞において遺伝子のノックアウト細胞を作製した。[内野美佳子、宇野友里花、山地俊之;相川京子(お茶大理)]

レファレンス業務

I. 伝達性海綿状脳症 (TSE) 検査

TSE 行政検査・確認検査(ウエスタンブロット法)の担当、等
TSE 行政検査・確認検査体制(ウエスタンブロット法)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い、試験成績を厚生労働省 医薬・
生活衛生局 食品監視安全課へ報告した(令和元年10月、
令和2年1月、3月実施)。[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 食品監視安全課 牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議委員[萩原健一]
3. 内閣府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. 農林水産省食料・農業・農村政策審議会臨時委員[中村優子]
5. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員(日本薬局方部会員)[深澤征義]
6. 機器管理運営委員会機器の管理と運用
戸山庁舎の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、3200QTRAPを用いたリポドミクス解析を行う基盤を構築した。本リポ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所横断的な共同研究を開始した。[酒井祥太、花田賢太郎]
7. アウトリーチ
 - (1) 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サイエンスカフェ「細胞」、「プリオン」を行った(2019.9.28)。[萩原健一、酒井祥太、水池彩、島崎健太郎、中村優子、齊藤恭子、山地俊之、深澤征義、花田賢太郎]
 - (2) 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(2019.10.30)。[花田賢太郎;阿戸学(感染制御部);新橋玲子、柿本健作(感染症疫学センター);伊木繁雄(バイオセーフティー管理室)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Shirasago Y, Inamori Y, Suzuki T, Tanida I, Suzuki T, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Fukasawa M.

Inhibition mechanisms of hepatitis C virus infection by caffeic acid and tannic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 42, 770-777, 2019.

- 2) Yumine N, Matsumoto Y, Ohta K, Fukasawa M, Nishio M. Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination. *Virology*, 531, 93-99, 2019.
- 3) Yamaji T, Hanamatsu H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M, Furukawa J, Yahiro K, and Hanada K. A CRISPR screen using subtilase cytotoxin identifies SLC39A9 as a glycan-regulating factor. *iScience*, 15, 407-420, 2019.
- 4) Shimizu Y, Shirasago Y, Suzuki T, Hata T, Kondoh M, Hanada K, Yagi K, Fukasawa M. Characterization of monoclonal antibodies recognizing each extracellular loop domain of occludin. *J. Biochem.*, 166, 297-308, 2019.
- 5) Kumagai K, Hanada K. Structure, functions, and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER-Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett.*, 593, 2366-2377, 2019 (invited review) (K.K. and K.H. are co-correspondence).
- 6) Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine accumulation protects cancer cells under glutamine starvation through downregulation of PCYT2. *Cell Rep.*, 29, 89-103, 2019.
- 7) Chauhan R, Shimizu Y, Watashi K, Wakita T, Fukasawa M, Michalak TI. Retrotransposon elements among initial sites of hepatitis B virus integration into human genome in the HepG2-NTCP cell infection model. *Cancer Genet.*, 235-236, 39-56, 2019.
- 8) Shimizu Y, Yoneda K, Shirasago Y, Suzuki T, Tada M, Ishii-Watabe A, Sugiyama K, Suzuki T, Wakita T, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M. Human-rat chimeric anti-occludin monoclonal antibodies inhibit hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 514, 785-790, 2019.
- 9) Lavie M, Linna L, Moustafa RI, Belouzard S,

- Fukasawa M, Dubuisson J. Role of the cytosolic domain of occludin in trafficking and HCV infection. *Traffic*, 20, 753-773, 2019.
- 10) Hagiwara K, Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Tobiume M, Okemoto-Nakamura Y, Sata T, Horiuchi M, Shibata H, Ono F. Tracking and clarifying differential traits of classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys. *PLoS One*, 14, e0216807, 2019.
- 11) Mikami D, Sakai S*, Yuyama K, Igarashi Y. Isolation of Sphingoid Bases from Starfish *Asterias amurensis* Glucosylceramides and Their Effects on Sphingolipid Production in Cultured Keratinocytes. *J. Oleo. Sci.*, 68, 427-441, 2019.
- 12) Okemoto-Nakamura Y, Tanida I, Yamaji T, Hanada K, Hagiwara K. A *PRNP*-disrupted human neuroblastoma cell line and its stable transformants expressing human prion variants. *BPB Rep.*, 2, 73-79, 2020 (Y.O.-N. and K.H. are co-correspondence).
- 13) Tachida Y, Kumagai K, Sakai S, Ando S, Yamaji T, Hanada K. *Chlamydia trachomatis*-infected human cells convert ceramide to sphingomyelin without sphingomyelin synthases 1 and 2. *FEBS Lett.*, 594, 519-529, 2020 (T.Y. and K.H. are co-correspondence).
- 14) Hanada K. Organelle contacts: sub-organelle zones to facilitate rapid and accurate inter-organelle trafficking of lipids. *Traffic*, 21, 189-196, 2020 (invited commentary).
- 15) Ueno M, Miyoshi N, Hanada K, and Shū Kobayashi. Three-component, one-pot tandem Sonogashira/Suzuki-Miyaura coupling reactions for the synthesis of a library of ceramide-transport protein inhibitors designed *in silico*. *Asian J. Org. Chem.*, 9, 267-273, 2020.
2. 和文発表
- 1) 花田賢太郎, 平林義雄 セラミド研究史概略、「セラミド研究の新展開」、セラミド研究会編集、食品化学新聞社(東京都)、2-21, 2019.
- 2) 山地俊之 哺乳動物のセラミド関連脂質合成、「セラミド研究の新展開」、セラミド研究会編集、食品化学新聞社(東京都)、22-31, 2019.
- 3) 酒井祥太, 大野祐介 スフィンゴ脂質のリピドミクス概略、「セラミド研究の新展開」、セラミド研究会編集、食品化学新聞社(東京都)、99-105, 2019.
- 4) 熊谷圭悟 セラミド輸送タンパク質 CERT の機能制御、「セラミド研究の新展開」、セラミド研究会編集、食品化学新聞社(東京都)、159-163, 2019.
- 5) 花田賢太郎 スフィンゴリン脂質、実験医学別冊「脂質解析ハンドブック」、109-118, 2019.
- 6) 中村浩之、花田賢太郎 蛍光脂質、実験医学別冊「脂質解析ハンドブック」、241-249, 2019.
- 7) 花田賢太郎 (分担) グッドマン・ギルマン薬理書(第13版)第56章:スルホンアミド類、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、キノロン類および尿路感染症治療薬、廣川書店、印刷中
- II. 学会発表
1. 国際学会
- 1) Hanada K. Systematic development of natural ligand-nonmimetic inhibitors to the ceramide transport protein CERT. FEBS special meeting in “Sphingolipid biology in health and disease”, May 6-10, 2019, Cascais, Portugal (Invited speaker).
- 2) Hanada K. Hijacking of the ceramide transport protein CERT by *Chlamydia trachomatis*, an obligatory intracellular bacterium. 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, June 17-21, 2019, Tokyo, Japan (Invited speaker).
- 3) Sakai S, Nakao N, Ueno M, Egawa D, Hanzawa H, Kawasaki S, Kumagai K, Suzuki M, Kobayashi S Hanada K. Natural ligand-nonmimetic inhibitors of the lipid-transfer protein. 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, June 17-21, 2019, Tokyo, Japan.
- 4) Kumagai K, Tachida Y, Sakai S, Yamaji T, Hanada K. *Chlamydia trachomatis* requires host ceramide-transport protein CERT but not sphingomyelin synthases for the infection and proliferation in HeLa cells. 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, June 17-21, 2019, Tokyo, Japan.
- 5) Sugiki T, Kumagai K, Shinya S, Kobayashi N, Egawa D, Fujiwara T, Hanada K, Kojima C. Structural basis for the specific association between the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein IncD and the PH domain of the ceramide transport protein CERT. 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, June 17-21, 2019, Tokyo, Japan.
- 6) Yamaji T, Sekizuka T, Hanamatsu H, Kuroda M, Furukawa J, Yahiro K, Hanada K. Genome-wide

- CRISPR screens identify novel glycan regulators. 25th International Symposium on Glycoconjugates, August 25-31, 2019, Milan, Italy.
- 7) Yamaji T. Application of genome editing technologies to studies on sphingolipid and glycan metabolisms. 1st Japan-Europe Workshop on Glycosphingolipids and Membrane homeostasis, September 2-4, 2019, Strasbourg, France.
- 8) Ohashi H, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M., Kuramochi K, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K. The inhibition of AhR-dependent lipid accumulation pathway impacted the host permissiveness to HCV production and lead to elimination. The 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 5-8, 2019, Seoul, South Korea.
2. 国内学会
- 1) 足立拓弥、笹田奈友子、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、佐々木桂奈江、吉田秀郎 ゴルジ体ストレス応答の新規応答経路であるコレステロール経路の解析、第 71 回日本細胞生物学会大会、2019.6.24-26、神戸。
- 2) 笹田奈友子、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、佐々木桂奈江、吉田秀郎 新規抗がん剤 OSW-1 によるゴルジ体ストレス応答の活性化、第 71 回日本細胞生物学会大会、2019.6.24-26、神戸。
- 3) 杉木俊彦、熊谷圭悟、新家粧子、小林直宏、江川大地、藤原敏道、花田賢太郎、児嶋長次郎 クラミジア菌封入体膜蛋白質 IncD がセラミド輸送蛋白質 CERT の PHドメインと選択的に相互作用する機序の構造生物学的解、第 19 回日本蛋白質科学会年会、2019.6.24-26、神戸。
- 4) 花田賢太郎、熊谷圭悟、杉木俊彦、新家粧子、小林直宏、江川大地、藤原敏道、児嶋長次郎 セラミド輸送タンパク質 CERT と細胞内寄生細菌クラミジア封入体膜タンパク質 IncD との会合機序、第 61 回日本脂質生化学会、2019.7.4-5、札幌。
- 5) 三浦彩音、樺山一哉、三宅秀斗、初村洋紀、真鍋良幸、山地俊之、花田賢太郎、深瀬浩一 糖鎖の細胞膜提示システムの構築とその機能解析、レーザー顕微鏡研究会 第 44 回講演会・シンポジウム、2019.7.4-5、大阪。
- 6) 山地俊之、関塚剛史、花松久寿、黒田誠、古川潤一、八尋錦之助、花田賢太郎、ゲノムワイドスクリーニングによって同定された糖鎖発現制御因子の解析、第 38 回日本糖質学会年会、2019.8.19-21、名古屋。
- 7) 小川基彦、西條政幸、深澤征義 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに抗ウイルス作用を示す天然化合物の探索、第 2 回 SFTS 研究会、2019.9.14、東京。
- 8) 花田賢太郎 セラミド輸送タンパク質 CERT に対する二つのタイプの阻害剤開発、第 92 回日本生化学会大会、2019.9.18-20、横浜。
- 9) 鈴木建、酒井祥太、白砂圭崇、鈴木咲帆、小林哲幸、花田賢太郎、深澤征義 各種ヒト臓器由来 NPC1 ノックアウト細胞株の樹立と主要脂質の解析、第 92 回日本生化学会大会、2019.9.18-20、横浜。
- 10) 森本貫太、鈴木詔子、花田賢太郎、鈴木佑典、山地俊之 P1 糖鎖エピトープを有した糖タンパク質の志賀毒素受容体としての機能解析、第 92 回日本生化学会大会、2019.9.18-20、横浜。
- 11) 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、山地俊之、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 細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析、第 92 回日本生化学会大会、2019.9.18-20、横浜。
- 12) 三浦彩音、樺山一哉、三宅秀斗、初村洋紀、真鍋良幸、山地俊之、花田賢太郎、深瀬浩一 糖鎖の細胞膜提示システムの構築とその機能解析、第 57 回日本生物物理学会年会、2019.9.24-26、宮崎。
- 13) ホッサムゲワイド、青柳東代、有田峰太郎、渡士幸一、鈴木亮介、熊谷圭悟、山地俊之、深澤征義、村松正道、脇田隆宇、相崎英樹、花田賢太郎 C 型肝炎ウイルス複製膜複合体におけるスフィンゴミエリンの必要性、第 12 回セラミド研究会学術集会、2019.10.24-25、札幌。
- 14) 深澤征義 ウイルス感染とタイトジャンクションタンパク質—C 型肝炎ウイルス研究から—、第 3 回新学術領域「オルガネラゾーン」研究会、2019.10.27、東京。
- 15) Ohashi H, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M., Kuramochi K, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K Role of aryl hydrocarbon receptor-dependent lipid production in the maintenance of hepatitis C virus infection and the emergence of drug resistant viruses、第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019.10.29-31、東京。
- 16) Katoh H, Nakatsu Y, Kato F, Yamaji T., Kidokoro M, Takeda M Role of mumps virus V protein in production

- of infectious viral particles、第 67 回日本ウイルス学会
学術集会、2019.10.29-31、東京。
- 17) Nao N, Yamaji T, Sekizuka T, Shirato K, Matsuyama S,
Takeda M Genome-wide CRISPR/Cas9 screen
identifies host factors important for Pneumovirus
replication、第 67 回日本ウイルス学会学術集会、
2019.10.29-31、東京。
- 18) Saito K, Fukasawa M, Suzuki R, Takasaki T, Hanada K
Construction of a yellow fever virus subgenomic
replicon system and characterization of cell lines
harboring the replicon、第 67 回日本ウイルス学会学術
集会、2019.10.29-31、東京。
- 19) 八尋錦之助、大西真、花田賢太郎、山地俊之
CRISPR ライブラリーを用いた Subtilase cytotoxin によ
る致死に耐性を示す細胞の樹立と受容体認識機構の
解明、第 23 回腸管出血性大腸菌研究会、2019.11.14-
15、松山。
- 20) 熊谷圭悟、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、第3回 オルガネラゾーン 研
究会、2019.11.26-27、東京。
- 21) 関塚剛史、佐久間智理、糸川健太郎、花田賢太郎、黒
田誠、山地俊之 ゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニ
ングシステムの in silico 解析 web アプリケーション、第
42 回日本分子生物学会年会、2019.12.3-6、福岡。
- 22) 花田賢太郎 セラミドとの構造類似性のない新規
CERT 阻害剤の開発、第 14 回スフィンゴセラピー研究
会、2020.1.23-25、加賀。
- 23) 酒井祥太、三上大輔、西向めぐみ、湯山耕平、向井克
之、五十嵐靖之 様々な構造の長鎖塩基の吸収・代謝
経路の解析、第 14 回スフィンゴセラピー研究会、
2020.1.23-25、加賀。
- 24) 花田賢太郎 Vero 細胞基材の品質管理に資する基盤
研究、日本 PDA 製薬学会バイオウイルス委員会、
2020.2.1、東京。
- 25) 山地俊之 糖鎖結合性細菌毒素を用いたゲノムワイド
CRISPR スクリーニング、第 93 回日本細菌学会総会、
2020.2.19-21、名古屋。
- 26) 三浦彩音、三宅秀斗、樺山一哉、真鍋良幸、初村 洋
紀、白川明日香、山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一 合
成糖鎖提示システムを利用した細胞膜における糖鎖の
機能解析、日本化学会第 100 回春季年会、2020.3.22-
25、野田 (on site は中止)。
- 27) 小川基彦、西條政幸、深澤征義 重症熱性血小板減
少症候群ウイルスに抗ウイルス作用を示す天然化合物
の探索、日本薬学会第 140 年会、2020.3.25-28、京都
(on site は中止)。