

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)の細胞内輸送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15年度は11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、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、また、平成15年度の日本薬学会賞を受賞した。なお、久下理室長は平成15年4月1日付けで九州大学に出向し、同大学大学院理学研究院化学部門生体情報化学研究室教授に就任した。同氏の益々の研究発展と活躍を期待する次第である。また、平成15年10月に中村優子氏が細胞化学部第一室研究員として採用され、プリオンの検査・研究等に従事することになった。

本年度も当研究部の研究に対し、経常研究費に加え、

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。

研究業績

I. 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(HCV)のコアタンパク質が細胞内で形成する複合体の分離とその構成タンパクの同定
C型肝炎ウイルスのコアタンパクと細胞内で相互作用する宿主細胞のタンパク質を同定することを目的として、コアタンパクのN-末端に複合型タグ(Myc-TEV-Flag:MEFtag)を付した融合タンパクをHEK293細胞に発現させ、細胞の1% TX-100可溶性画分からそれぞれのタグに対する抗体を用いた免疫沈降法でコアタンパクを含むタンパク質複合体を精製した。精製した複合体には、従来からコアタンパクと相互作用があると報告されているDEAD box Protein 3(RNA-helicase)及びKi-nuclear autoantigen(Proteasome Activator PA28)を含め10種のタンパクが電気泳動で認められ、全て、ダイレクトナノフローLC-MS-MS法で同定した。タンパク質の染色結果を考え併せると、コアタンパクは細胞内でこれらのタンパク質と比較的安定な複合体を形成していることが強く示唆された。[山河芳夫 佐藤慈子 深澤征義 西島正弘(細胞化学部)、勝二郁夫、鈴木哲郎(ウイルス第2部)、市村徹(東京都立大学大学院理学研究科化学専攻)]

(2) C型肝炎ウイルスのコア蛋白発現による肝細胞の脂質分子種組成への影響について

C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白発現トランスジェニックマウスで肝脂肪化と肝癌発症が示唆されている。しかし詳細な機序は解明されていない。本研究はコア蛋白発現が肝細胞脂質分子種組成に及ぼす影響をガス chromatographyとマスペクトロメトリーにより解析し、HCV感染による肝脂肪化機構の解明を目的とした。コア

蛋白発現トランスジェニックマウスの脂質プロファイリングを行い、多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質分子種組成に顕著な変動を見出した。コア蛋白発現が肝脂質代謝調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。メカニズム解明に向け更にコア蛋白発現培養肝細胞も用いて詳細に解析中である。[田中康仁、加藤健吾、佐藤慈子、永井有紀、西島正弘；鈴木哲朗、宮村達男（ウィルス二部）；北條俊章、田口 良（東京大学医学部メタボローム）；森屋恭爾（東京大学医学部感染制御）；小池和彦（東京大学医学部感染症内科）]

2. プリオン病に関する研究

(1) ウシ・プリオンタンパク発現トランスジェニック (Tg) マウスにおける異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の増殖

ウシ海綿状脳症 (BSE) の高感度バイオアッセイ系を開発することを目的として、ウシ・プリオンタンパクを発現するTgマウスを獣医科学部および感染病理部と共同で開発しつつある。現在までに、PrP遺伝子の導入部位の異なる3系統 (#39, #91, #94) のTgマウスを作出しているが、本年度はプリオンタンパクの発現量が多く、また個体数を揃えることが出来た#39系統にBSE病原体 (和歌山例、5%脳乳剤2.5ul) を接種して脳、脾臓などへのPrP^{Sc}の蓄積の経時変化をウエスタンブロット法で調べ実験動物としての有効性を評価した。その結果、#39TgマウスにおいてPrP^{Sc}は接種後100日前後に脾臓で最初に検出され、免疫組織化学的方法でFDC (follicular dendritic cell) に蓄積していることが確認された。一方、PrP^{Sc}の蓄積が脳で確認されたのはTgホモのマウスでは接種後175日後であり、その時点で神経失調を思わせる震えが認められた。接種後200日で瀕死となった為にすべて殺処分としたが、マウスの脳におけるPrP^{Sc}の蓄積は少なく、海綿状変性もおこっていなかった。従って、これらのマウスが伝達性海綿状脳症を発症して致死に至ったか否かは不明である。Tgヘミ (ヘテロ) のマウスでは接種後256日程度でPrP^{Sc}の蓄積が脳で認められる様になるが、300日を超えた時点でも未だ神経失調を示唆する臨床症状は認められていない、さらに経過を観察中である。[山河芳夫、納富香子、萩原健一、中村優子 (細胞化学部)、松田潤一郎 (獣医科学部)、佐藤由子、樋口好美、佐多徹太郎 (感染病理部)]

(2) 硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスの作成

汚染硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物を作成することを目的として、コラーゲン膜に病原体 (プリオン病発症マウスの脳ホモゲネート) を染み込ませたものを汚染硬膜の代用として用いて病原体の脳表からの間接接種を試みた。その結果 (1) 病原体を脳 (室) 内に直接接種したものに比べて約20日の遅れをもって全て

のマウスが発症、死亡した。これらのマウス脳には異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の蓄積がウエスタンブロット法あるいは免疫染色法により確認された。(2) マウス脳の見積状態及びPrP^{Sc}が強く免疫染色される部位はPrP^{Sc}を接触させた脳表面と、同側の視床および反対側の小脳である。これらのことから、PrP^{Sc}の侵入経路は脳表からの経神経線維性による伝播の可能性が高く、本法により発症せしめたマウスはヒト汚染硬膜移植後プリオン病の発症モデル動物となりうると考えられた。[山河芳夫、西島正弘 (細胞化学部)、古屋一英、川原信隆 (東京大学 医学部)、金子清俊 (国立精神・神経センター 疾病研究第七部)]

(3) 硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスに及ぼす防御型プリオンタンパク (recPrP^{218K}) の発症遅延効果

硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスに防御型プリオンタンパク質 (リコンビナントプリオン 218K: recPrP^{218K}) を体内埋め込み型の浸透圧ポンプで脳室内に連続投与して、その治療/発症遅延効果について検討した。その結果、非治療群 (n=11) で病原体接種後117±7.7日で50%のマウスが死亡したが、接種後30日目に治療を開始した群 (n=7) では129.4±12日で50%のマウスが死亡し、これら二群の間ではrecPrP^{218K}の延命効果に関して有意差が認められた。一方、病原体接種後60日で治療を開始した群 (n=9) では121±12.8日で50%のマウスが死亡し、非治療群と比べて、recPrP^{218K}の効果は認められなかった。[山河芳夫、西島正弘 (細胞化学部)、古屋一英、川原信隆 (東京大学 医学部)、金子清俊 (国立精神・神経センター 疾病研究第七部)]

(4) プリオン蛋白質由来のペプチドによる異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積阻害機構の解析

プリオン蛋白質由来のペプチドP9FDを用い、プリオン病発症に深く関与すると予想される、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の蓄積阻害について解析を行った。約20アミノ酸残基よりなるP9FDの添加により、培養細胞中のプロテイナーゼK抵抗性のPrP^{Sc}量の減少が、12時間後より認められた。また、内在性のプロテアーゼによると思われるPrP^{Sc}の蓄積量の減少も認められた。しかし、アセチル化したP9FDやP9FDの部分配列を有するペプチドではこの阻害効果は確認されなかった。以上より、P9FDが一定の立体構造を有することがPrP^{Sc}の蓄積阻害には必要であることが示唆された。一方、P9FDを添加した培養細胞では分子量が65,25,15kDaの蛋白質の細胞内含有量の上昇が認められ、これらの蛋白質の詳細な性状について、さらなる検討を現在行っている。[中村優子、大内史子、萩原健一、西島正弘、山河芳夫]

(5) BSE罹患ウシのPRNPの塩基配列分析

ウシ・プリオン蛋白質遺伝子 (PRNP) のプリオン蛋白質

質コード領域上の DNA 塩基配列の多型を解析するための分析プロトコルを確立した。条件検討の結果、ウシ組織から調製したゲノム DNA に対して、プライマー A (5'-TGCTGGCATTCTACATTTATCAAGTTA-3') および B (5'-AAGCGCCAAGGGTATTAGCATAC-3') を用いた PCR によりプリオン蛋白質コード領域全長を含む 2 本鎖 DNA を調製し、次にこの 2 本鎖 DNA を鋳型としてプライマー A および B を用いた非対称 PCR により 1 本鎖 DNA を得た後に、常法による DNA シークエンサーによる塩基配列分析を実施するという方法が最も迅速・良好な方法であると結論した。健常ウシと従来型 BSE 罹患ウシおよび非定型 BSE 罹患ウシの PRNP の塩基配列を本法を用いて比較・解析した。その結果、分析した検体の幾つかにおいて Gln⁷⁸ あるいは Asn¹⁹² のコドンの第 3 塩基にサイレント変異の多型が認められたが、アミノ酸の置換を生じさせる DNA 変異は無かった。また、上記のサイレント変異と BSE 発症との間にも明確な因果は認められなかった。[萩原健一、納富香子、西島正弘、山河芳夫]

(6) MHM2-正常型プリオン蛋白質を発現する神経芽細胞腫 N2a 細胞を用いたプリオン蛋白質の構造変換機構の解析

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と考えられているが、その変換機構の詳細は解明されていない。そこでプリオンの伝播・感染の初期過程を解析するモデル系の開発を目的として、マウス神経芽細胞腫 N2a 細胞へ遺伝子導入を行うことにより、MHM2-タグを有するマウス・正常型プリオン蛋白質を恒常的に発現する細胞を作出した。この細胞を異常型プリオン蛋白質を持続産生する ScN2a 細胞と共培養するか、あるいは ScN2a 細胞から調製した膜画分を培地に添加すると、正常型の MHM2-プリオン蛋白質が proteinase K 消化に対して抵抗性を示す異常型へと変換することを示した。この場合、ScN2a 細胞との共培養によっても膜画分の添加によっても、異常型 MHM2-プリオン蛋白質の蓄積がウエスタンブロット法により検出可能な量に達するまでには、約 10 日間の培養期間を要した。今後、本系を応用したプリオン伝播の初期過程の解析を行なう。[萩原健一、中村優子、納富香子、西島正弘、山河芳夫]

II. 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。本研究では LPS の毒性与免疫活性化の経路を区別して考え、MPL 刺激と LPS の毒性発現に関与することが知られている caspase-1 の活性に着目した。その結果、マウスマクロファージの caspase-1 は lipid A により活性化されたが、MPL では活性化されなかった。ところが、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が認められた。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る。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。Caspase-1 は様々な炎症性疾患にも関与していることから、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. サルモネラ菌リポド A 修飾の免疫応答における意義に関する研究

(1) リポド 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を含むその表面構成成分の再構成を行う。これまでにサルモネラ菌外膜構成成分リポ多糖の膜アンカー部位リポド A の脂肪酸の付加・脱離が起こることが知られていた。本研究ではこの現象の宿主免疫応答との関わりを解析する目的で脂肪酸の付加・脱離が起きているリポド A 種を分離精製し、リポド A 受容体である Toll-like receptor 4 を発現させた細胞株に対する NF- κ B 活性化能を解析した。その結果、脂肪酸の付加及び脱離がともにリポド A の NF- κ B 活性化能を低下させることがわかった。このことから、サルモネラ菌のリポド A 修飾は宿主免疫系から逃れるために機能していると推察された。[川崎清史、Sam Miller (ワシントン大学)]

(2) リポド A 修飾の制御に関する研究

サルモネラ菌のリポド A 修飾酵素は感染環境を模倣すると考えられている低マグネシウム培地培養下で発現誘導される。脱アシル化酵素 PagL も低マグネシウム培地培養下で発現誘導されるが、不思議なことにリポド A の脱アシル化はこの培養条件下では認められない。一方、別のリポド A 修飾であるアミノアラビノース付加が起こらない変異株では、低マグネシウム培地培養下でリポド A の脱アシル化が認められた。このことから、リポド A 修飾は相互に関連しあっており、アミノアラビノース付

加が脱アシル化を抑制することがわかった。この制御がサルモネラ菌の病原性とどのように関わっているのか解明することが今後の課題である。[川崎清史、Sam Miller (ワシントン大学)]

Ⅲ. 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、哺乳動物細胞におけるホスファチジルセリン (PS) 生合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重要なアミノ酸残基を明らかにした。PSS1 の PS 合成活性は通常、外来性 PS により著しく阻害されるが、この制御に少なくとも 6 アミノ酸残基が関与していた。また、単独のアラニン置換により、PS 合成活性がほとんど失われるアミノ酸は少なくとも 13 残基あった。このうち 1 残基は基質特異性に関わり、5 残基はこの蛋白の発現或いは安定性に影響を及ぼした。同定したアミノ酸残基の分布より、この酵素の活性中心と調節部位は独立して存在するものと考えられた。[大沢智子、久下理、西島正弘 (九州大学大学院理学研究院)]

(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) の役割

ア. SIN レプリカーゼによる遺伝子発現における PS の関与

我々はこれまでに、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に、宿主の PS またはホスファチジルエタノールアミン (PE) が関与することを見いだしている。PS の関与をより明確にする目的で、PE 含量を正常に保ったまま、PS 含量だけを減少させることができる PSB-2 株を用いて、SIN レプリカーゼ依存の遺伝子発現に対する PS 含量低下の影響を調べた。その結果、PS 含量が低下する条件で同遺伝子発現が低下することを見だし、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に PS が関与することが明らかになった。また、レプリカーゼの転写産物のレベルは PS 含量が低下する条件で低下しないことから、遺伝子発現の低下は転写以降、翻訳までのいずれかの過程が阻害されているためと考えられた。[齊藤恭子、西島正弘、久下理]

イ. mRNA キャッピング酵素 nsP1 の膜結合における PS の関与

SIN の mRNA キャッピング酵素 nsP1 は膜結合蛋白質で、PS に結合すると予想されるアミノ酸配列を有している。nsP1 の膜結合における PS の関与を調べる目的で、PSB-2 細胞に nsP1 を発現させたところ、正常なリン脂質組成を示す条件と PS 含量が低下する条件のいずれにおいても、nsP1 は膜に結合していた。nsP1 は脂肪酸修飾を受けるが、その修飾を阻害する変異を nsP1 に導入しても、PS 含量が低下する条件の nsP1 の膜結合は変化がなかった。従って、nsP1 の膜結合に PS が関与する証拠は得られなかった。[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 によるセラミドの膜間転移

CERT は、細胞内セラミド輸送欠損 CHO 細胞変異株 (LY-A 株) を相補する cDNA がコードする 68 kDa の親水性タンパク質である。天然型セラミドは疎水性が極めて高く、自律的に脂質膜の間を転移することはない。セラミドの膜間転移を人工リン脂質膜を用いた無細胞検出系で調べたところ、精製組換え体 CERT はセラミド転移を劇的に促進した。また、その活性は、CERT のカルボキシル末端約 210 アミノ酸領域から成る START ドメインが担うことを明らかにした。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT の START ドメインが認識する脂質特異性

CERT の START ドメインによって膜から引き抜かれ、他の膜へ転移される脂質の選択性を無細胞検出系で解析した。CERT は、スフィンゴシンやスフィンゴミエリンは全く認識しなかった。また、CERT 以外で START ドメインを持つタンパク質に対する特異的基質と報告されているコレステロールまたはホスファチジルコリンも CERT は認識しなかった。セラミドと構造的に近いジアシルグリセロールに対する活性はセラミドに対する活性の 5% 程度であった。したがって、CERT はセラミド選択的な膜間転移活性を持つと考えられる。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(3) CERT による小胞体からのセラミド引き抜き

CERT が小胞体と相互作用して、そこからセラミドを引き抜くことができることを以下のように示した。生化学的に分離した小胞体膜において、内在するセラミド合成酵素活性を利用して放射性セラミドを生産させ、次に、この放射性セラミド含有小胞体膜を精製組換え体 CERT とともにインキュベートするとセラミドが膜から遊離した。対照実験の一つとして、疎水性物質を非特異的に結合することが知られているアルブミンを用いたが、アルブミンではセラミドは遊離しなかった。よって、CERT は小胞体からセラミドを効率よく遊離させる特異的活性

を有すると結論した。[河野美幸、花田賢太郎]

(4) CERT の細胞内分布

CERT は、そのアミノ末端領域にプレクストリン相同 (PH)ドメインを持っている。PH ドメインはリン酸化イノシトール結合ドメインとして知られおり、特にホスファチジルイノシトール 4 リン酸(PI4P)特異的な PH ドメインは、PI4P が局在するゴルジ体へのターゲット機能を発揮する。CERTのPHドメインはPI4P特異的であるが、セラミド輸送欠損株・LY-A 株の CERT は、PH ドメイン中にアミノ酸置換 (G67E 変異) が起こっており、PI4P 結合能が失われている。CERT と緑蛍光タンパク質 (GFP)との融合タンパク質の細胞内分布を蛍光顕微鏡レベルで解析したところ、CERT-GFP は細胞質全体に分布しつつも、ゴルジ体領域に顕著に濃縮していた。一方、G67E 変異型 CERT-GFP では、ゴルジ体への会合が損なわれていた。これらの結果から、CERT はその PI4P 結合性 PH ドメインに依存してゴルジ体に会合することが明らかとなった。[花田賢太郎]

(5) 垂無傷細胞を用いたセラミド小胞体-ゴルジ体間輸送の解析

細胞膜に小孔を開けた垂無傷細胞において、セラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を再現することが可能である。この再構成系を用いて解析したところ、LY-A 株由来の細胞質に野生型の精製 CERT を添加することで輸送活性が正常レベルに回復した。興味深いことに、人工脂質膜を用いたアッセイの場合、PH ドメイン欠失 CERT や G67E 変異 CERT も野生型 CERT と同様のセラミド転移活性を示すのだが、垂無傷細胞を用いた再構成系においては、これら変異体は回復能を示さなかった。細胞の中のように様々なオルガネラ膜が混在している状態において CERT がゴルジ体へ効率よく到達するには、PI4P 認識 PH ドメインの存在が必要なのであろう。再構成系においての CERT 依存性セラミド輸送は ATP を除くと阻害された。一方、Sar1 (小胞体からゴルジ体への膜小胞輸送に必須の因子の一つ) の優性欠損型を添加しても CERT 依存性セラミド輸送は全く阻害されなかった。[熊谷圭悟、安田智、花田賢太郎]

(6) 細胞内セラミド選別輸送モデル

昨年度の成果および上述した本年度の成果を総合して、CERT は ATP 依存性のセラミド小胞体-ゴルジ体輸送を仲介する分子であると我々は結論した。そして、脂質セラミドの輸送は非輸送小胞機構で仲介されていると結論し、CERT が特異的にセラミドを小胞体膜から引き抜いた後、ゴルジ体膜に選択的に到達して受け渡すというモデルを提唱した。これら一連の研究成果は、膜リン脂質合成に関わる特異的な脂質選別輸送装置を分子レベルで同定した最初の例であり、我々が提唱するセラミド輸

送モデルは、他の脂質についてもその選別輸送メカニズムを考えるうえでの土台になるとと思われる。[花田賢太郎、熊谷圭悟、安田智、三浦有紀子、河野美幸、深澤征義、西島正弘]

(7) 中性スフィンゴミエリナーゼの基質特異性

中性 pH 領域に至適 pH のあるスフィンゴミエリナーゼ (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。リソ型スフィンゴミエリンすなわちスフィンゴシルホスホコリン (SPC)に対するホスホリパーゼ C 活性測定法を開発し、哺乳動物、マラリア原虫および細菌由来の nSMase は SPC ホスホリパーゼ C 活性をも有することを明らかにした。これら nSMase は、リソホスファチジルコリンやリソ血小板活性化因子も加水分解するがそのジアシル体は分解できないことを併せ考え、nSMase 酵素の基質となるには脂質基質の C2 位は水素結合供与グループでなければならないと示唆した。[三浦有紀子、後藤恵理子、西島正弘、花田賢太郎]

(8) 光増感作用におけるスフィンゴ脂質新合成と活性酸素種生産

光増感作用で起こる細胞死にはスフィンゴ脂質新合成が必要であることをわれわれは以前示していた。光増感作用で起こる細胞死には活性酸素種 (ROS) 生産も必要であるが、ROS 生産にはスフィンゴ脂質新合成は必要なかった。よって、細胞死シグナル経路においてスフィンゴ脂質新合成の関わるステップは ROS 生産の下流であることが示唆された。[花田賢太郎: Vladislav Dolgachev、Biserka Nagy、Bonita Taffe、Duska Separovic (ユーージン・アップルバウム薬学衛生科学大学)]

(9) 細胞内スフィンゴ脂質によるアミロイド前駆体切断の調節

アルツハイマー病脳変のプラークに蓄積するアミロイドペプタペプチドは、アミロイド前駆体 (APP) のペプタおよびガンマ部位での切断によって生ずる。細胞内スフィンゴ脂質が減少すると APP のアルファ部位での切断が顕著に上昇し、可溶性の sAPP42 の分泌が高進することを見出した。スフィンゴ脂質減少細胞では、MAPK/ERK 活性が上昇しており、MAPK/ERK 阻害剤処理すると sAPP42 の変化も阻害された。よって、スフィンゴ脂質減少は、MAPK/ERK 経路の活性化を介して sAPP42 分泌を上昇させると結論した。[花田賢太郎: 澤村直哉、Mihee Ko、Wenxin Yu、Kun Zou、Toshiharu Suzuki、Jian-Sheng Gong、柳澤勝彦、道川誠 (長寿研): 鈴木利治 (北大)]

1-3. SNARE 分子 Ykt6 の細胞内局在・膜融合活性発現の分子基盤

SNARE 分子群は生体膜融合過程において、膜相互の特異的認識・融合の起動に関わる鍵分子である。その一つ Ykt6 は蛋白性膜貫通領域を持たず、局在も大部分細胞質でごく一部膜に存在する。変異体解析等から、細胞質内では Ykt6 は C 末で farnesyl 化されているが N 末領域が覆うことで可溶化できると考えられた。膜結合型はさらに palmitoyl 化も受け、構造変化・膜結合力を獲得し、膜融合能を示すこともわかった。以上から、C 末脂質修飾・N 末領域により Ykt6 は細胞内局在及び膜融合活性が調節されていることが強く示唆された。[深澤征義、James E. Rothman (米国・Sloan-Kettering 研究所)]

IV. 細胞膜の構造・機能と細胞病態変化の解析

(1) ヒトがん細胞における糖輸送タンパク質ファミリーの発現とラフト膜分布

動物細胞の表面には 10 数種の糖輸送タンパク質 (GLUT) が存在し、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。我々は、腫瘍性の Hela 融合細胞に発現する GLUT1 と GLUT3 が異なる細胞膜ドメインに分布することを、非イオン性界面活性剤の可溶化分画、ならびに共焦点コンフォーカル顕微鏡観察により明らかにした。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-actin と共分布した。これらの膜分布の分子制御機構について更に検討中である。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であろう。[佐京智子、北川隆之]

(2) 肺炎クラミジアの in vitro 感染評価系の確立と阻害薬検索への応用

肺炎起因菌である肺炎クラミジア (C.p) は動脈硬化発症の危険因子として注目され、感染・増殖とラフト膜の関連が示唆されている。我々は C.p の in vitro 培養法：標準株 HEp-2 細胞に感染した C.p の封入体を FITC 試薬によって特異的に蛍光染色する方法を確立し、抗クラミジア化合物の評価系を構築した。ついで本評価系を適用した新規 in vitro スクリーニング系の確立を目的として、カベオリン含量の異なるヒト HeLa 融合細胞系において C.p の感染・増殖性を検討した結果、カベオリン含量の高い細胞株では C.p の封入体量が標準株 HEp-2 細胞の約 2 倍多く、カベオリン含量の低い細胞株では約 1/4 に低下した。両細胞の C.p の増殖様式に着目しながら、評価系と化合物のスクリーニングを開始した。[難波憲司 (第一製薬)、北川隆之]

V. 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 15 年度 (自平成 15 年 4 月 1 日至平成 16 年 3 月 31) 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 11 (陰性 8、陽性 3)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 01) O. Kuge, and M. Nishijima: Biosynthetic regulation and intracellular transport of phosphatidylserine in mammalian cells. *J. Biochem.* 133, 397-403, 2003
- 02) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular basis for lipopolysaccharide mimetic action of TaxolTM and flavolipin. *J. Endotoxin Res.*, 9, 301-309, 2003
- 03) K. Kawasaki and M. Nishijima: Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from cultured mammalian cells. in Membrane Protein Protocols: Expression, purification, and Characterization, (ed. by B. S. Selinsky), *Methods in Molecular Biology*, vol. 228, pp.175-186, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 04) K. Hanada and M. Nishijima: Purification of mammalian serine palmitoyltransferase, a hetero-subunit enzyme for sphingolipid biosynthesis, by affinity-peptide chromatography. in *Membrane Protein Protocols*, (ed. by B. S. Selinsky), *Methods in Molecular Biology*, vol. 228, pp.163-174, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 05) K. Hanada: Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1632, 16-30, 2003
- 06) M. Nakamura, Y. Mori, K. Okuyama, K. Tanikawa, S. Yasuda, K. Hanada, and S. Kobayashi: Chemistry and biology of khafrefungin. Large-scale synthesis, design, and structure-activity relationship of khafrefungin, an antifungal agent. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1, 3362-3376, 2003
- 07) V. Dolgachev, B. Nagy, B. Taffe, K. Hanada, and D. Separovic: Reactive oxygen species generation is independent of de novo sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. *Experimental Cell Research*, 288, 425-436, 2003

- 08) Y. Nakamura, R. Matsubara, H. Kitagawa, S. Kobayashi, K. Kumagai, S. Yasuda, and K. Hanada: Stereoselective synthesis and structure-activity relationship of novel ceramide trafficking inhibitors. (1*R*,3*R*)-*N*-(3-Hydroxy-1 hydroxymethyl-3-phenylpropyl)dodecanamide and its analogues. **J. Med. Chem.**, 46, 3688-3695, 2003
- 09) Y. Yamakawa, K. Hagiwara, K. Notomi, Y. Nakamura, M. Nishijima, Y. Higuchi, Y. Sato, T. Sata, and the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Atypical proteinase K-resistant prion protein(PrP^{res}) observed in an apparently healthy 23-month-old holstein steer. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 56, 221-222, 2003
- 10) K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, and M. Nishijima: Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. **Nature**, 426, 803-809, 2003
- 11) O. Kuge, K. Hasegawa, T. Ohsawa, K. Saito, and M. Nishijima: Purification and characterization of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 2. **J. Biol. Chem.**, 278, 42692-42698, 2003
- 12) T. Oishi, K. Hagiwara, T. Kiumi, Y. Yamakawa, M. Nishijima, K. Nakamura, and H. Arimoto: Effects of b-Sheet Breaker Peptides Polymers on Scrapie-infected Mouse Neuroblastoma Cells and Their Affinities to Prion Protein Fragment PrP(81-145). **Org. Biomol. Chem.**, 1, 2626-2629, 2003
- 13) A. Masumi, Y. Yamakawa, H. Fukazawa, K. Ozato, and K. Komuro: Interferon Regulatory Factor 2 Regulates Cell Growth through Its Acetylation. **J. Biol. Chem.**, 278, 25401-25407, 2003
- 14) Y. Nakamura, A. Sakudo, K. Saeki, T. Kaneko, Y. Matsumoto, A. Toniolo, S. Itohara, and T. Onodera: Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells. **J Gen Virol.**, 84, 3495-502, 2003
- 15) A. Sakudo, D. C. Lee, K. Saeki, Y. Nakamura, K. Inoue, Y. Matsumoto, S Itohara, and T. Onodera: Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 308, 660-7, 2003
- 16) N. Sawamura, K. Lee, W. Yu, K. Zou, K. Hanada, T. Suzuki, J.-S. Gong, K. Yanagisawa, and M. Michikawa: Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. **J. Biol. Chem.**, 279, 11984-11991, 2004
- 17) Y. Miura, E. Gotoh, F. Nara, M. Nishijima, and K. Hanada: Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. **FEBS Letters**, 557, 288-292, 2004
- 18) K. Hagiwara, A. Wada, M. Katadae, M. Ito, Y. Ohya, P.J. Casey, and Y. Fukada: Analysis of the Molecular Interaction of the Farnesyl Moiety of Transducin through Use of a Photoreactive Farnesyl Analogue. **Biochemistry**, 43, 300-309, 2004
- 19) 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**, in press
- 20) 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**, in press
- 21) M. Fukasawa, O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Sollner, 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.**, in press
- 22) V. Dolgachev, M. S. 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.**, in press
- 23) 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.**, (Epub ahead of print)

2. 和文発表

- 01) 平林義雄, 花田賢太郎: 概説: スフィンゴ脂質合成とその膜輸送, 蛋白質 核酸 酵素, 47, 400-402, 2002
- 02) 花田賢太郎, 平林義雄: スフィンゴ脂質の生合成, 蛋白質 核酸 酵素, 47, 403-408, 2002
- 03) 花田賢太郎: 膜脂質合成の欠損した培養細胞変異株-膜脂質ドメイン研究のキーツール, 蛋白質 核酸 酵素, 47, 425-430, 2002
- 04) 西島正弘: 国立感染症研究所に生きる, 生化学, 75,

267, 2003

- 05) 萩原健一: 狂牛病とプリオン, 化学と薬学の教室 (廣川書店), 148, 16-19, 2003
- 06) 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
- 07) 西島正弘: 生体膜脂質の細胞内輸送の分子機構-セラミド輸送蛋白質(CERT)の発見-, 学術月報, 57, 252-256, 2004
- 08) 花田賢太郎: 膜脂質セラミドを輸送する分子装置 CERT, 細胞工学, 23, 332-333, 2004
- 09) 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, 印刷中

II. 学会発表

1. 国際学会

- 01) 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
- 02) M. Nishijima, K. Kawasaki, and H. Nogawa: Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and Taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis, The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2003.8.24-27, Awaji Island

2. 国内学会

- 01) 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の発現と細胞膜分布, 第 123 年回がん分子標的治療研究会総会, 2003.6 (東京)
- 02) 萩原健一, 納富香子, 大内史子, 中村優子, 山河芳夫: プリオン病-古くて新しい疾病の克服に求められているもの, 第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2003.8.4 (富士吉田)
- 03) 花田賢太郎: セラミド選別輸送分子装置, 公開シンポジウム「マイクロドメインの機能と病態」, 2003.10 (東京)
- 04) 萩原健一: プリオン病の克服に向けて- 病理の多様性と治療の現状, 日本薬学会関東支部会, 2003.10.4 (東京)
- 05) 佐京智子, 石館光三, 北川隆之: Studies on

distribution of mammalian glucose transporter GLUT1 to a raft-like detergent resistant membrane in human epithelial carcinoma cells, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10 (横浜)

- 06) 中村優子, 萩原健一, 大内史子, 納富香子, 西島正弘, 山河芳夫: A Synthetic Peptide Fragment from Prion Protein Inhibits the Accumulation of Proteinase K-resistant Prion Protein, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.16 (横浜)
- 07) 山河芳夫, 萩原健一, 西島正弘, 納富香子, 佐多徹太郎: Tissue Distribution of Protease Resistant Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy(BSE) using Western Blotting Assay, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.17 (横浜)
- 08) 大沢智子, 西島正弘, 久下理: Alanine mutagenesis of phosphatidylserine synthase (PSS) 1 revealed 21 amino acid residues crucial for its activity or regulation, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.17 (横浜)
- 09) Kazuo Okemoto, Kiyoshi Kawasaki, and Masahiro Nishijima: Distinctive cytokine induction pattern via TLR-4 between macrophages stimulated by ornithine-containing lipid and LPS, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.18 (横浜)
- 10) 花田賢太郎, 三浦有紀子, 後藤恵理子, 奈良太, 西島正弘: Recognition of sphingosylphosphocholine, lyso-sphingomyelin, by neutral sphingomyelinases(中性スフィンゴミエリン加水分解酵素によるスフィンゴシルホスホコリン、リソスフィンゴミエリンの認識), 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10 (横浜)
- 11) Yasuhito Tanaka, Kengo Kato, Shigeko Sato, Yuki Nagai, Ryo Taguchi, and Masahiro Nishijima: Effect of the expression of hepatitis C virus core protein on the lipid profile of liver in mice, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10 (横浜)
- 12) 川崎清史, 西島正弘: アラニンスキャンニングによる MD-2 の機能解析, 第 9 回日本エンドトキシン研究会, 2003.11 (盛岡)
- 13) 花田賢太郎: セラミド選別輸送分子装置, 高エネルギー加速器研究機構 P F セミナー, 2003.11 (つくば市)
- 14) 桶本和男, 川崎清史, 西島正弘: Monophosphoryl lipid A によるマクロファージからの IL-1 産生誘導機構の解析, 第 33 回日本免疫学会総会, 2003.12.8 (福岡)
- 15) 桶本和男, 川崎清史, 西島正弘: LPS の部分分解産物 monophosphoryl lipid A は NF B を活性化するが caspase-1 を活性化しない, 第 2 回感染症若手研究者沖縄フォーラム, 2004.2.13 (那覇)

- 16) 山河芳夫: BSE 検査をめぐる問題, 国際シンポジウム「動物のプリオン病の診断と疫学」, 2004.2.21 (東京)
- 17) 山河芳夫: PrP^{BSE}の生体内分布と非定形BSEプリオンの検出, 神奈川県食肉衛生協会技術研修会, 2004.2.25 (平塚)
- 18) 西島正弘: 体細胞変異株を用いた膜リン脂質の生合成と機能に関する研究, 第 124 回日本薬学会, 2004.3.29 (大阪)