

10. 細胞化学部

部長 花田 賢太郎

概要

当部の目的は、「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、膜脂質の代謝と機能に関する研究、毒素進入に関わる研究、ウイルス感染における細胞機能の研究、オートファジーに関する研究、抗感染症薬を指向した代謝阻害剤の開発研究など、幅広い分野で成果を挙げた。

プリオン病に関する研究では、異常プリオンの細胞内蓄積を抑制する分子の開発や、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解析を行うなど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ている。

また、膜脂質解析や質量分析器を用いた蛋白質解析を通じて、他部との共同研究も積極的に進めている。

人事面では、平成 19 年 4 月 1 日付けで原英之が第一室に任期付研究員として採用され、同年 10 月 1 日付けで熊谷圭悟が第四室研究員として採用された。臨時職員として大内史子、佐藤慈子が在籍し、実験補助に従事した。

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、文部科学省などから援助を受けた。

以下に本年度の業績を記す。

業績

調査・研究

I. プリオン病に関する研究

(1) 近交系マウスへの非定型的 BSE プリオンの伝達
我が国で確認された BSE 罹患ウシのうち 24 例目 (BSE/JP24) は、脳内に蓄積した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的・病理学的特徴が典型 BSE とは異なる (Jpn. J. Infect. Dis., 60,305 (2007))。この非定型 BSE プリオンの性状解析のため、BSE/JP24 の脳ホモジネートを近交系マウス 3 系統へ脳内接種 (C57、SJL、RHH:2006 年秋) し、現在、経過を観察中である。これまでに採材した脳、脾臓、回腸遠位部についてウェスタンブロット (WB) / 免疫組織化学染色法により PrP^{Sc} を検索したところ、非定型 BSE プリオンを接種した個体は接種 500 日以上経過しても PrP^{Sc} の蓄積は認められなかった。一方、典型 BSE のプリオン接種群では、接種後 250 日以降に殆どの個体において PrP^{Sc} の蓄積が検出された。

[萩原健一、山河芳夫、中村優子、大内史子、佐藤由子・佐多徹太郎 (感染病理部)]

(2) ウシ・プリオン蛋白質を発現するトランスジェニックマウス (boTg-マウス) への非定型 BSE プリオンの伝達

BSE/JP24 例において見出された非定型 BSE プリオンの伝達性を検証するため、ウシ・プリオン蛋白質を発現するトランスジェニックマウス (boTg-マウス) への伝達を試みた。その結果、初回接種の boTg-マウスは 199.7 ± 3.4 日の潜伏期間を経て発症した。一方、従来株 (典型) プリオンを接種した同マウスは、潜伏期間が 233.5 ± 13.5 日であった。このことから、BSE/JP24 の非定型プリオン株は、欧州で発見されている非定型 BSE-L 型株と同様に、従来株に比べてウシに対して強い感染性を持つ新規株であると推定される。

[山河芳夫、萩原健一、佐多徹太郎 (感染病理部)、舩甚賢太郎・岩丸祥史・今村守一・岡田洋之・毛利資郎・横山隆 (動物衛生研究所)]

(3) BSE 接種サル脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の変動
脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の検査は、孤発性 CJD (sCJD) の鑑別診断法として重要である。しかし変異型 CJD (vCJD) に対しては、有効ではないと報告されている。これは、sCJD に比して病態の進行が緩徐な vCJD では神経細胞の変性死が長期間にわたって進行するために、14-3-3 蛋白質の濃度変化を捕捉し難いためと考えられる。本研究では、ヒト vCJD のモデルとして BSE プリオンをカニクイザルに接種し (2006 年度年報参照) 経時的に採取した脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白質の変動を WB 法で検討した。その結果、2 頭の 14-3-3 蛋白質は、神経症状を呈する 800 日前後に急速に増加していた。興味深いことに、接種後 500 日 (= 発症の約 1 年前) から極めて微量の 14-3-3 蛋白質が検出された。このことは、14-3-3 蛋白質の検査が vCJD の生前診断に使える可能性を示唆するものである。

[山河芳夫、大内史子、萩原健一、飛梅実・佐多徹太郎 (感染病理部)、小野文子 (予防衛生協会)、寺尾恵治 (医薬基盤研)]

(4) プリオン病の発症過程における脳のプロテオーム変動解析

スクレーピー病原体 (Obihiro I 株) を接種したマウスにおいて、PrP^{Sc} の蓄積に伴って変動する脳内の蛋白質の同定・解析を進め、CRMP-2 の C 末端領域を欠失したアイソフォーム (CRMP-2-ΔC) が増加することを明らかにしてきた。欠失領域は CRMP-2 の神経軸索の伸展活性を調節するリン酸化部位を含む。そこで CRMP-2-ΔC およびリン酸化部位へ変異を導入した CRMP-2 の cDNA を作成し、これらを神経細胞に強制発現させて細胞の形態への影響を検討した。その結果、CRMP-2-ΔC は、リン酸化型 CRMP-2 (不活性型) を模倣した変異体の発現細胞と比較して、非リン酸化型 (活性型) 変異体の発現細胞に認められるような多分岐の神経突起を生じることがわかった。
[大内史子、萩原健一、花田賢太郎、山河芳夫]

(5) プリオンへの感染におけるスフィンゴ糖脂質の役

割の解析

プリオンへの感染におけるスフィンゴ糖脂質の役割を個体レベルにおいて検討するため、ガングリオシド生合成酵素遺伝子のノックアウト・マウス 2 系統に対してスクレーピー病原体 (Obihiro I 株) を脳内または腹腔内に接種し、昨年度から観察を続けた。その結果、野生型マウスがプリオン病の終末期症状を呈するまでの期間 (脳内接種 = 約 180 日、腹腔内接種 = 約 280 日) と比べて、2 系統のノックアウト・マウスは同程度あるいはやや早期に症状を示した。現在、安楽殺に処したマウスから採材した組織の生化学的・病理学的解析を進めている。

[萩原健一、山河芳夫、原英之、花田賢太郎、佐藤由子・佐多徹太郎 (感染病理部)、山下匡 (北大・先端生命科学研究院)]

(6) P9 ペプチドによる PrP^{Sc} 蓄積の阻害活性と構造活性相関

正常型プリオン蛋白質に由来するペプチド P9 (アミノ酸 18 残基) は、プリオンを感染させた神経芽腫細胞 (ScN2a 細胞) での PrP^{Sc} の蓄積を顕著に阻害する。今回、17 種の P9 アナログ・ペプチドを新規合成し、P9 の活性発現に必要な最小鎖長の検索および構造活性相関を検討した。特に興味深い点として、P9 と同一の鎖長・アミノ酸組成を有し、かつ N 末端あるいは C 末端に Lys 残基を有するアナログは、P9 と同等の活性を発揮するという結果を得た。このアナログでは、末端 Lys を Arg に置換すると活性が減弱した。よって、末端の正電荷が活性発現の必要十分条件ではなく、むしろ末端に Lys 残基が必要とされる何らかの物性的・構造的理由があると考えられる。

[中村優子、山河芳夫、萩原健一]

(7) P9 ペプチドの作用機作の解析

P9 がどのような作用機作で ScN2a 細胞で PrP^{Sc} の産生・蓄積を阻害するのかについて解析した。リソソームの蛋白質分解能の指標としてカテプシン D 活性を測定したところ、ScN2a 細胞のカテプシン D 活性の強弱と P9 および P9 アナログ・ペプチドの活性との間には明確な相関は認められなかった。一方、細胞の免疫蛍光染色像から、ペプチドの活性の強弱に応じて、細胞内の PrP^{Sc} 蓄積部位へカテプシン D が集積することが明らかとなった。こ

のことから、P9 はリソソームの蛋白質分解能を活性化させるのではなく、リソソームおよび PrP^{Sc} の主たる蓄積部位である後期エンドソームの分布や両オルガネラ間の輸送に影響を与えて、PrP^{Sc} の分解を促進すると予想された。

[中村優子、山河芳夫、谷田以誠、花田賢太郎、萩原健一、田中恵子(感染病理部)]

(8) PrP^C PrP^{Sc} 構造変換の分子機構に関する研究

PrP^{Sc} は正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の構造変換により生じるが、この変換機構には不明な点が多い。今回、マウス・プリオン蛋白質のオクタペプチド・リピート領域付近の配列(アミノ酸9残基)をニワトリ PrP^C の対応領域の配列で置換すると、このキメラ蛋白質は ScN2a 細胞で強制発現させても proteinase K(PK)抵抗性の PrP^{Sc} へ変換されないことを見出した。この領域は、Wüthrich らによる PrP^C の NMR データでは柔軟な構造と解釈されているが、PrP^{Sc} においては PK 抵抗性の断片として残るといった特徴をもつ。この領域が PrP^C PrP^{Sc} 変換の効率を規定する一領域である可能性が予想され、現在、アミノ酸9残基に変異を導入することにより詳細を解析中である。

[原英之、中村優子、萩原健一]

(9) 固相化法による PrP^{Sc} の高感度検出法の開発

食肉衛生検査所での BSE スクリーニング検査では、国内外で認証済みの検査キットが使われている。これらはサンドイッチ ELISA 法に基づくが、凝集体である PrP^{Sc} は抗原部位が露出し難い。そこで PrP^{Sc} を還元・変性させた後にチオール基を介して固相に固定化し、これを検出する方法を検討した。「チオール基を有する」こと、および「固相化後、不要な配列を切断・除去する」ことにより検出の選択性の向上を図った結果、実験的発症マウス(終末期)の脳ホモジネートに対しては PrP^{Sc} の高感度検出が達成できた。しかし、食肉衛生検査所で摘発された BSE 罹患ウシの脳ホモジネートに対しては、夾雑成分が固相化反応を妨害し、高感度検出に至らなかった。

[萩原健一、山河芳夫]

II. オートファジーに関わる研究

(1) オートファジー評価系とオートファジー分子メカニズム

オートファジーは細胞内免疫システムとして細菌感染・ウイルス感染に関与している。オートファジーを評価するために、蛍光タンパク質に LC3 を結合した融合タンパク質が用いられるが、幾つかの問題点があり、その問題点を解決するために、適切な陰性コントロールを作成した。また、2大タンパク分解系(オートファジー系とユビキチン・プロテアソーム系)におけるオートファジー分子とユビキチン化の関係について研究した。異常型プリオンを含む凝集体を形成する細胞毒性を持つタンパク質におけるオートファジー・リソソーム系の関与について、研究を展開しつつある。

[谷田以誠、山地俊之、花田賢太郎]

(2) シンドビスウイルス感染時における細胞内オートファジーの関与

シンドビスウイルス感染時における細胞内オートファジーの動態を調べている。シンドビスウイルスを CHO 細胞に感染しても誘導性オートファジーはあまり顕著に起こらない。今後の検討が必要である。

[齊藤恭子、谷田以誠、花田賢太郎]

III. 病原体感染における宿主細胞機能に関する研究

1. スフィンゴ糖脂質と細菌毒素に関する研究

(1) 遺伝子トラップ法を用いた志賀毒素耐性変異株のスクリーニング

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、小胞体よりサイトゾルへと透過する。我々はこの志賀毒素の細胞内輸送機構、あるいは受容体である Gb3 の代謝機構解明を目的として、遺伝子トラップ法を利用した志賀毒素耐性株単離のスクリーニングを行った。まず Gb3 を発現させた CHO 細胞を親株とし、UPA Trap 法によりランダムな遺伝子破壊を行った。これら変異株ライブラリーに志賀毒素を処理したところ耐性を示すいくつかのクローンの単離に成功した。そのうちの1つは UDP-Galactose transproter の変異株であり、Gb3 発現量の低下を示した。

[山地俊之、花田賢太郎、西川喜代孝(同志社大院)、石田靖雅(奈良先端科技大院)]

細胞化学部

(2) cDNA 過剰発現系を用いた志賀毒素耐性遺伝子のスクリーニング

(1)と同様の目的で、上記とは逆に cDNA ライブラリーを HeLa 細胞(志賀毒素に感受性)にレトロウイルスを用いて導入することにより、過剰発現によって志賀毒素に耐性を示す遺伝子のスクリーニングを行った。一次スクリーニングで単離された志賀毒素耐性株より挿入遺伝子を同定し、再び HeLa 細胞に導入することで2種類の耐性遺伝子を得ることに成功した。そのうち1つは Gb3 と同じくラクトシルセラミドを基質とするガングリオシド GM3 の合成酵素であり、もう1つは機能未知の遺伝子であった。現在後者の遺伝子に関し、志賀毒素に耐性を示す原因を解析中である。

[山地俊之、花田賢太郎]

2. C 型肝炎ウイルスに関する研究

(1) C 型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する宿主タンパク質ピメンチンの影響

C型肝炎ウイルス(HCV)コアタンパク質はウイルス構造タンパク質としてウイルス産生に必須の分子である。これまでに宿主ピメンチン発現量が HCV コアタンパク質量に影響を与えることで HCV 産生量にも影響を与えることを示してきた。ピメンチンのコアタンパク質発現に対する作用メカニズムとして、今回プロテアソーム依存的なコアタンパク質の分解系が関与していることが明らかとなった。

[深澤征義、笠原優子、花田賢太郎、西島正弘、鈴木哲朗・脇田隆宇(ウイルス2部)、宮村達男(所長)]

(2) C 型肝炎ウイルス産生のスフィンゴミエリン合成酵素阻害剤による阻害

C型肝炎ウイルス(HCV)感染に対する治療薬はインターフェロン(インターフェロン+リバビリン)のみが現在用いられ、効果・副作用の観点から新たな治療薬の開発が求められている。我々は培養細胞を用いた HCV 感染系において、スフィンゴミエリン合成酵素阻害剤が有意に HCV 産生を阻害することを見いだした。

[深澤征義、富重斉生、花田賢太郎、西島正弘、鈴木哲朗・脇田隆宇(ウイルス2部)、宮村達男(所長)、]

(3) C 型肝炎ウイルス(HCV) NS4B 蛋白質誘導発現細胞の構築

HCV の RNA 複製に関与する NS4B 蛋白質は、膜のリアレンジメントを引き起こす蛋白質である。我々は Huh7 細胞を用いて、ドキシサイクリンの有無により HA タグを付加した NS4B 蛋白質の発現を誘導することができる細胞を構築した。今後この細胞を用いて、NS4B 蛋白質に結合する細胞因子を生化学的に探索する予定である。

[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎]

(4) HCV 感染におけるイノシトールリン脂質動態の解析

イノシトールリン脂質群は細胞膜の構成成分であるとともに様々な細胞外刺激や細胞外環境の変化を細胞内へと伝達するシグナル分子として極めて重要な役割を担っている。我々は前年度の研究で、HCV 感染に伴うイノシトールリン脂質群の空間的变化を細胞内蛍光プローブ(イノシトールリン脂質に特異的に結合するタンパク質ドメインを蛍光タンパク質 mVenus と融合したプローブタンパク質)を用いて解析した。今回我々は放射標識法を用いて Huh-7 細胞における HCV 感染に応答したイノシトールリン脂質群の量的変動を解析し、その結果感染後2時間まではイノシトールリン脂質群の変化を検出できないことが明らかとなった。これは昨年度の結果、すなわち HCV 感染初期においてイノシトールリン脂質群の細胞内における空間的变化が認められなかったことと併せて、HCV 感染がその初期応答においてはイノシトールリン脂質群の量的・空間的变化を伴わないことを示している。そこで HCV 感染中期および後期におけるイノシトールリン脂質群の変動を解析するため、より細胞傷害性の低いテトラサイクリン誘導性の低発現型ベクターを用いてイノシトールリン脂質群に対する細胞内蛍光プローブを発現する実験系を新たに開発した。現在、この系を用いて感染応答におけるイノシトールリン脂質動態解析を進めている。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

(5) HCV 複製に関与するイノシトールリン脂質群の解析

イノシトールリン脂質群はそれぞれのイノシトールリン脂質に特異的な脂質キナーゼ・ホスファターゼによっ

てその産生・分解が制御されている。本項では、Huh-7細胞における HCV 産生をモデル実験系として用い、HCV複製時におけるこれらの代謝酵素群の役割を逆遺伝学的手法によって解析した。その結果、INPP4A の発現阻害が細胞内における HCV タンパク質 (NS3、NS5) の産生および HCV ゲノム RNA の産生量を増加させることを見いだした。この結果は HCV の複製過程において INPP4A によって代謝されるイノシトールリン脂質 (群) が重要な役割を担っていることを示している。現在は、前項で新規開発したイノシトールリン脂質プローブを用いて HCV 感染の中期・後期における当該イノシトールリン脂質解析系の開発を試みるとともに、INPP4A およびその代謝産物がどのように HCV 複製に関与するのか、その分子レベルでの作用機序解析を進めている。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

IV. 細胞外環境変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究

(1) 哺乳動物細胞におけるタンパク質合成制御システムの解析

哺乳動物細胞におけるタンパク質合成は、細胞外環境 (栄養素、ホルモン) の変化に応じてその活性が大きく変動する。このタンパク質合成活性の制御にはタンパク質キナーゼ mTOR が重要な役割を担っているが、細胞がどのように細胞外栄養素を感知して mTOR を活性化するのか、その分子機構には不明な点が多い。今回我々は mTOR 活性化に関与する低分子量 G 蛋白質およびその活性化因子群の同定を目的とした RNAi スクリーニングを行い、Ras ファミリーに属する低分子量 G タンパク質 (ここでは Smg と表記) およびその活性化因子 Smg-GEF が細胞外栄養素 (アミノ酸、グルコース) 感知システムの必須因子であることを見いだした。また細胞外栄養素に応答して Smg の活性化が起こること、活性化型 (GTP 結合型) Smg を特異的に阻害する RBD タンパク質の強制発現が mTOR 活性化を抑制することから、細胞外栄養素に応答した mTOR 活性化は Smg の活性化を介して引き起こされることが示唆された。さらに Smg のノックダウンが活性化型 Rheb によって惹起される mTOR 活性化を抑制すること、活性化型 Smg の発現がドミナントネガティブ型 Rheb による mTOR 抑制を解除することから、Smg は Rheb 下流で mTOR 活性化に関与していると考えられた。

現在は Smg の作用機序および Smg 活性化機構の解析を行っている。

[前濱朝彦、田中正彦、花田賢太郎]

V. 細胞内セラミド輸送に関する研究

(1) CERT の脱リン酸化に関する研究

CERT はセラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を司る蛋白質である。CERT は、通常の細胞培養条件下でリン酸化修飾を受けて不活性化されているが、細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理すると脱リン酸化されてセラミド輸送能が活性化される。この脱リン酸化現象にはホスファターゼによる脱リン酸化が関与していることが明らかになった。一方、新規リン酸化の抑制はあまり顕著ではない。更に検討を行い、CERT のリン酸化を制御するメカニズムを解明していく予定である。

[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT をリン酸化するキナーゼ

昨年度までに、スフィンゴミエリン (SM) 合成を負に制御していると示唆されるキナーゼとして Casein kinase I γ 2 (CKI γ 2) を見出した。本年度は、CKI γ 2 を安定導入した CHO 細胞において、野生型 CERT はリン酸化を受けて SM 合成が抑制されるが、CKI の認識コンセンサス配列に変異を持つ CERT ではリン酸化を受けずに SM 合成抑制が解除されることなどを見出した。これらの結果から、CKI γ 2 は CERT のリン酸化を介して SM 合成を制御していることが明らかとなった。

[富重斉生、熊谷圭悟、花田賢太郎、楠田潤 (医薬基盤研)]

(3) 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 ドメインとセラミドとの共結晶の X 線構造解析によって、START ドメインのどのアミノ酸がセラミド分子と相互作用しているのかを明らかにした。セラミドとの水素結合に関わるアミノ酸を他のアミノ酸に置換したところ、START ドメインの膜間セラミド転移活性は減少した。また、三次元構造の表面に位置する特異的なトリプトファン残基をアラニンに置換すると膜間セラミド

転移活性はほぼ完全に失われたことから、このトリプトファン残基は脂質膜との相互作用することを示唆した。
[熊谷圭悟、山地俊之、富重斉生、西島正弘、花田賢太郎、工藤紀雄・加藤龍一・若槻壮市（高エネ研）]

[大内史子、佐藤慈子、山河芳夫、萩原健一、花田賢太郎]

VI. 病原体感染における抗炎症性脂質に関する研究

(1) インフルエンザ感染における抗炎症性脂質の影響

炎症後期に高度不飽和脂肪酸 (n-3 系列脂肪酸) から合成されるレゾルビン等の脂質は炎症を収束させる抗炎症性脂質である。感染症によって誘発される炎症とこれらの抗炎症性脂質の関係を調べるための動物実験を開始した。インフルエンザウイルス H1N1 PR-8 株をマウスに鼻腔内感染させると、肺に激しい炎症を惹起し個体を死に至らしめるが、n-3 脂肪酸欠乏食を与え続けて体内の n-3 脂肪酸が著しく低下した個体は、コントロールの個体に比べて感染に対する抵抗性が若干下がる傾向が確認された。現在、条件の至適化などを行っている。

[熊谷圭悟、花田賢太郎、山本紀一（免疫部）、有田誠（東大院薬）]

VII. 行政検査実績

項目：プリオン行政検査（ウエスタンブロット法による確認検査）

期間：1994年4月1日～平成20年3月31日

検体数：ウシ1件（うち0件陽性）

ヤギ1件 [規格外検体]（うち0件陽性）

VIII. 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 (Voyager-DE STR、AXIMA-QIT) の保守、運用を行った。機器の主たる利用者は、プロテオーム研究に携わる感染研（戸山庁舎・村山庁舎）の研究者であり、利用者に対しては試料の前処理法を含めた機器の操作法の説明・助言を行った。また、機器本体の消耗品の交換、トラブルへの迅速な対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフト・ハードウェアを整備・管理し、利用者にはソフトウェアの操作法について説明を講じた。なお、機器の使用時間（データベース検索のための使用時間を除く）は、約75時間（Voyager-DE STR）および約110時間（AXIMA-QIT）であった。

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Hagiwara, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., and Yamakawa, Y.: Prevention of prion propagation by dehydrocholesterol reductase inhibitors in cultured cells and a therapeutic trial in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 835-838, 2007
- 2) Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sato, Y., Nakamura, Y., Tobiume, M., Shinagawa, M., Sata, T.: Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP^{Sc} in the second atypical bovine encephalopathy case in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60, 305-308, 2007
- 3) Ishii Y., Kondo K., Matsumoto T., Tanaka K., Shinkai-Ouchi F., Hagiwara K., Kanda T.: Thiol-reactive reagents inhibits intracellular trafficking of human papillomavirus type 16 pseudovirions by binding to cysteine residues of major capsid protein L1. *Virology* 4, 110, 2007
- 4) Yokoyama, T., Masujin, K., Yamakawa, Y., Sata, T., Murayama, Y., Shu, Y., Okada, H., Mohri, S., Shinagawa, M.: Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60, 317-320, 2007
- 5) Yamamoto, T., Ushiki, Y., Hara, S., Hall, W. W., Tsukagoshi-Nagai, H., Yokoyama, T., Tagawa, Y., Sata, T., Yamakawa, Y., Kinoshita, N., Tamura, F., Hattori, S., Irie, S.: An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue. *J. Virol. Methods* 149, 316-325, 2008
- 6) Tanida, I., Yamaji, T., Ueno, T., Ishiura, S., Kominami, E., and Hanada, K.: Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy* 4, 131-134, 2008
- 7) Klionsky, DJ., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, DK., Aliev, G., Askew, DS., Baba, M., Baehrecke, EH., Bahr, BA., Ballabio, A., Bamber, BA., Bassham, DC., Bergamini, E., Bi,

細胞化学部

- X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, JS., Bredesen, DE., Brodsky, JL., Brumell, JH., Brunk, UT., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, LS., Choi, A., Chu, CT., Chung, J., Clarke, PG., Clark, RS., Clarke, SG., Clave, C., Cleveland, JL., Codogno, P., Colombo, MI., Coto-Montes, A., Cregg, JM., Cuervo, AM., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, PB., Dennis, PA., Deretic, V., Devenish, RJ., Di Sano, F., Dice, JF., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, CW., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, FC., Droge, W., Dron, M., Dunn, WA Jr., Duszenko, M., Eissa, NT., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, EL., Fesus, L., Finley, KD., Fuentes, JM., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, FB., Gewirtz, DA., Gibson, SB., Gohla, A., Goldberg, AL., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, RA., Haussinger, D., He, YW., Heidenreich, K., Hill, JA., Heuyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, WP., Iwasaki, A., Jaattel, M., Jackson, WT., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, JU., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, DH., Kiel, JA., Kim, HP., Kimchi, A., Kinsella, TJ., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovacs, AL., Kroemer, G., Kuan, CY., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, HY., Lenardo, MJ., Levine, B., Lieberman, A., Lim, KL., Lin, FC., Liou, W., Liu, LF., Lopez-Berestein, G., Lopez-Otin, C., Lu, B., Macleod, KF., Malorni, W., Martinet, W., Matsuoka, K., Mautner, J., Meijer, AJ., Melendez, A., Michels, P., Miotto, G., Mistiaen, WP., Mizushima, N., Mograbi, B., Monastyrska, I., Moore, MN., Moreira, PI., Moriyasu, Y., Motyl, T., Munz, C., Murphy, LO., Naqvi, NI., Neufeld, TP., Nishino, I., Nixon, RA., Noda, T., Nurnberg, B., Ogawa, M., Oleinick, NL., Olsen, LJ., Ozpolat, B., Paglin, S., Palmer, GE., Papassideri, I., Parkes, M., Perlmutter, DH., Perry, G., Piacentini, M., Pinkas-Kramarski, R., Prescott, M., Proikas-Cezanne, T., Raben, N., Rami, A., Reggiori, F., Rohrer, B., Rubinsztein, DC., Ryan, KM., Sadoshima, J., Sakagami, H., Sakai, Y., Sandri, M., Sasakawa, C., Sass, M., Schneider, C., Seglen, PO., Seleverstov, O., Settleman, J., Shacka, JJ., Shapiro, IM., Sibirny, A., Silva-Zacarin, EC., Simon, HU., Simone, C., Simonsen, A., Smith, MA., Spanel-Borowski, K., Srinivas, V., Steeves, M., Stenmark, H., Stromhaug, PE., Subauste, CS., Sugimoto, S., Sulzer, D., Suzuki, T., Swanson, MS., Tabas, I., Takeshita, F., Talbot, NJ., Talloczy, Z., Tanaka, K., Tanaka, K., Tanida, I., Taylor, GS., Taylor, JP., Terman, A., Tettamanti, G., Thompson, CB., Thumm, M., Tolkovsky, AM., Tooze, SA., Truant, R., Tumanovska, LV., Uchiyama, Y., Ueno, T., Uzcategui, NL., van der Klei, I., Vaquero, EC., Vellai, T., Vogel, MW., Wang, HG., Webster, P., Wiley, JW., Xi, Z., Xiao, G., Yahalom, J., Yang, JM., Yap, G., Yin, XM., Yoshimori, T., Yu, L., Yue, Z., Yuzaki, M., Zabirnyk, O., Zheng, X., Zhu, X., and Deter, RL.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151-175, 2008
- 8) Uchio, N., Oma, Y., Toriumi, K., Sasagawa, N., Tanida, I., Fujita, E., Kouroku, Y., Kuroda, R., Momoi, T., and Ishiura, S.: Endoplasmic reticulum stress caused by aggregate-prone proteins containing homopolymeric amino acids. *FEBS J.* 274, 5619-5627. 2007
- 9) Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itoharu, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi Y.: Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3008-3022, 2007
- 10) Shirakura, M., Murakami, K., Ichimura, T., Suzuki, R., Shimoji, T., Fukuda, K., Abe, K., Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Moriishi, K., Matsuura, Y., Wakita, T., Suzuki, T., Howley, P.M., Miyamura, T., and Shoji, I.: The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81, 1174-1185, 2007
- 11) Maehama, T.: PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1624-1627, 2007
- 12) Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Mogi, C., Tomura, H., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Kurose, H., and Okajima, F.: S1P2 receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 963-968, 2007
- 13) Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Kawano, M.: CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 644-653, 2007

- 14) Nagao, K., Takahashi, K., Hanada, K., Kioka, N., Matsuo M., and Ueda, K.: Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient CHO cells. *J. Biol. Chem.* 282, 14868-14874, 2007
- 15) Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., and Hanada, K.: Inter-organelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent co-operativity between the PH and START domains of CERT. *J. Biol. Chem.* 282, 17758-17766, 2007
- 16) Separovic, D., Hanada, K., Maitah, MYA., Nagy, B., Hang, I., Tainsky, MA., Kraniak, JM., Bielawski, J.: Sphingomyelin synthase 1 suppresses ceramide production and apoptosis post-photodamage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 196-202, 2007
- 17) Sano, O., Kobayashi, A., Nagao, K., Kumagai, K., Kioka, N., Hanada, K., Ueda, K., and Matsuo, M.: Sphingomyelin-dependence of cholesterol efflux mediated by ABCG1. *J. Lipid Res.* 48, 2377-2384, 2007
- 18) Haberkant, P., Schmitt, O., Contreras, FX., Thiele, C., Hanada, K., Sprong, H., Reinhard, C., Wieland, FT., and Brügger, B.: Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *J. Lipid Res.* 49, 251-262, 2008
- 19) Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, YA., and Zuo, J.: Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17, 1030-1040, 2007
- 20) Giussani, P., Colleoni, T., Brioschi, L., Bassi, R., Hanada, K., Tettamanti, G., Riboni L., and Viani, P.: Ceramide traffic in C6 glioma cells: Evidence for CERT-dependent and independent transport from ER to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 40-51, 2008
- 21) Kudo, N., Kumagai, K., Tomishige, N., Yamaji, T., Wakatsuki, S., Nishijima, M., Hanada, K., and Kato, R.: Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 488-493, 2008
- 22) Saito, S., Matsui, H., Kawano, M., Kumagai, K., Tomishige, N., Hanada, K., Echigo, S., Tamura, S., and Kobayashi, T.: Protein phosphatase 2C ϵ is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 6584-6593, 2008
- 23) Separovic, D., Semaan, L., Tarca, AL, Maitah, MYA., Hanada, K., Bielawski, J., Villani, M., and Luberto, C.: Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp. Cell Res.* 314, in press
- 24) Charruyer, A., Bell S.M., Kawano, M., Douangpanya, S., Yen, T.Y., Macher, B.A., Kumagai, K., Hanada, K., Holleran, W.M., and Uchida, Y.: Decreased ceramide transport protein, cert, function alters sphingomyelin production following UVB irradiation. *J. Biol. Chem.* in press, 2008
- 25) Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., Hanada, K.: Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* in press, 2008
- 26) Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, MMC., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T.: Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* in press, 2008

2 . 和文発表

- 1) 前濱朝彦、岡原史明、金保安則：あらたな癌抑制遺伝子 PICT-1/GLTSCR2、医学のあゆみ、224, 172-173, 2008

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Ono, F., Terao, K., Tase, N., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Nakamura, Y., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sata, T.: Transmission of BSE to *Cynomolgus* Macaque, a non human primate; Development of clinical symptoms and tissue distribution of PrP^{Sc}. Prion 2007, September 26-28, 2007, Edinburgh, UK
- 2) Hagiwara, K.: Atypical BSE cases in Japan. Taiwan and Japan BSE Prevention and Control Conference, October 29-31, 2007, Tansui, Taiwan
- 3) Tanida, I., Komatsu, M., Iwata, J., Ueno, T., Kominami, E., and Hanada, K.: GABARAP-lipidation during differentiation and Visualization of GABARAP in mice. Keystone Symposium "Autophagy in Health and Disease". 2007.

細胞化学部

4.15-21, Monterey, CA, USA

4) Tanida, I., Haruna, K., Suga, Y., Muramatsu, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Ueno, T., Kominami, E., Ikada, S., and Hanada, K.: Autophagy during keratinization in the normal human epidermis and of the psoriatic epidermis characterized by incomplete keratinization. 47th Annual meeting of the American Society for Cell Biology, 2007.12.1-6, San Francisco, CA, USA

5) Tanida, I.: Autophagy in the normal human epidermis and of the psoriatic epidermis characterized by incomplete keratinization. Gordon Research Conferences "Autophagy in Stress, Development and Disease", 2008.1.6-11, Ventura, CA, USA

6) Fukasawa, M., Nitahara-Kasahara, Y., Shinkai-Ouchi, F., Sato, S., Suzuki, T., Murakami, K., Wakita, T., Hanada, K., Miyamura, T., and Nishijima, M.: Cellular vimentin content affects the protein level of Hepatitis C virus core protein and the activity of Hepatitis C virus production in cultured cells. The 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2007.9.10, Glasgow, UK

7) Hanada, K.: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 48th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2007.9.4-8, Turku, Finland.

8) Hanada, K.: Regulation of nonvesicular trafficking of ceramide in mammalian cells, 2nd Asian Symposium on Plant Lipids, 2007.12.1, Tokyo

9) Tomishige, N., Kumagai, K., Kusuda, J., Nishijima, M., and Hanada, K.: Casein kinase I γ 2 down-regulates CERT-mediated trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin, Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, 2008.2.17-22, Lucca, Italy

2 . 国内学会

1) 大内史子、山河芳夫、萩原健一：プリオン病発症に伴い増加するCMRP-2アイソフォームの神経細胞への影響 2007年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2007.8.25-26、津南、新潟

2) 小野文子、寺尾恵治、田勢直美、冷岡明雄、大山篤史、手塚行雄、和田直己、佐藤由子、飛梅実、中村優子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎：霊長類（カニクイザル）

へのBSEの伝播 (I) 脳内接種による発症とそれに伴う行動解析及びプリオンの生体内分布 2007年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2007.8.25-26、津南、新潟

3) 松浦雄一、石川有紀子、萩原健一、山河芳夫、佐多徹太郎、横山隆、北本哲之、毛利資朗：迅速バイオアッセイ法による国内非定型BSEの感染性検出 2007年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2007.8.25-26、津南、新潟

4) 進藤亮、山河芳夫、佐多徹太郎、横山隆、古岡秀文、堀内基広：日本で発生したBSE由来のPrP^{Sc}の生化学的性状の解析 2007年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2007.8.25-26、津南、新潟

5) 横山隆、舛甚賢太郎、山河芳夫、佐多徹太郎、村山裕一、舒宇静、岡田洋之、毛利資郎、品川森一：我が国で認められた21、23ヶ月齢の牛海綿状脳症(BSE)及び判定保留事例の伝達試験 2007年プリオン研究会（文部科学省「人獣共通感染症研究クラスター」支援事業）2007.8.25-26、津南、新潟

6) 大内史子、山河芳夫、中村優子、花田賢太郎、萩原健一：Proteome analysis reveals quantitative and qualitative changes of CRMP-2 during the progression of prion disease. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜

7) 中村優子、山河芳夫、花田賢太郎、田中恵子、谷田以誠、萩原健一：Synthetic fibril peptides promote clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜

8) 倉橋洋史、高橋愛子、原英之、中村義一：Channel mutations in Hsp104 hexamer distinctively affect thermotolerance and prion-specific propagation. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜

9) 谷田以誠：ヒトATG8結合系遺伝子群の病態プロファイリング、文科省特定領域研究「タンパク質分解」公開シンポジウム“オートファジー：病態に迫る！”、2007.9.22、東京

10) 谷田以誠、上野 隆、木南英紀、花田賢太郎：ユビキ

細胞化学部

- チンはAtg12 モディファイアーをユビキチン化する、
BMB2007(日本生化学会・分子生物学会合同年会)、
2007.12.11-15、横浜、平成19年12月11・15日
- 11)江崎淳二、松元直美、竹田-江崎光江、小松雅明、高橋勝幸、平岡由佳、岩田淳一、藤村努、竹鼻健司、谷田以誠、上野隆、田中啓二、木南英紀:飢餓による動物のオートファジー形成、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 12) 宮崎 敬子、木村尚子、井澤峯子、Lim, K-T、安川 然太、大森勝之、三ツ木元章、山地俊之、橋本康弘、鈴木明身、神奈木玲児: Siglec ligands on epithelial cells: possible regulators of resident macrophage functions during colonic carcinogenesis、第66回日本癌学会学術総会、2007.9.4、横浜
- 13) 伊藤信仁、土田明子、徳田典代、矢木宏和、加藤晃一、三ツ木元章、山地俊之、橋本康弘、Paul Crocker、古川鋼一: Binding analysis of siglec-7 prepared from various animal cell lines、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 14) 中村成夫、笠原優子、深澤征義、森裕美子、高橋恭子、下遠野久美子、増野匡彦: 抗HCV活性を有する新規フラレン誘導体、第26回メディスナルケミストリーシンポジウム、2007.11.28、相模原
- 15) 小林翔、松田大介、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋: ACC1 阻害剤による脂肪滴蓄積阻害活性、日本薬学会第128年会、2008.3.28、横浜
- 16) 前濱朝彦: アミノ酸センシングに関わる分子群、味の素医薬研究所招待講演、2007.5.17、川崎
- 17) 前濱朝彦: アミノ酸応答の分子機構解析、第6回生命科学研究会、2007.7.6 7、千葉
- 18) 森林敦子、田中康仁、片桐千仞、花田賢太郎、小林睦生、冬季に活動するオクロバエの脂質について、第49回日本脂質生化学会、2007.6.5-6、札幌
- 19) 花田賢太郎: 細胞内セラミド輸送の制御機構、第49回日本脂質生化学会、2007.6.5-6、札幌
- 20) 吉村征浩、花田賢太郎、伊東信、ゼブラフィッシュ初期発生におけるセラミド選別輸送装置(CERT)の機能解析、第49回日本脂質生化学会、2007.6.5-6、札幌
- 21) Kentaro Hanada: Regulation of intracellular trafficking of ceramide by phosphorylation of CERT、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 22) Keigo Kumagai, Miyuki Kawano, Fumiko Ouchi, Masahiro Nishijima, and Kentaro Hanada: Inter-organelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent co-operativity between the PH and START domains of CERT、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 23) 工藤紀雄、熊谷圭悟、富重斉生、山地俊之、若槻壮市、西島正弘、花田賢太郎、加藤龍一: セラミド選別輸送タンパク質 CERT START ドメインの結晶構造による脂質認識機構の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 24) 佐野修、小林綾、長尾耕治郎、熊谷圭悟、花田賢太郎、松尾道憲、植田和光: ABCG1 を介したコレステロール排出に対するスフィンゴミエリンの影響、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007.12.11-15、横浜
- 25) 長尾耕治郎、高橋圭、花田賢太郎、木岡紀幸、松尾道憲、植田和光: ABCA1 によるコレステロール排出へのスフィンゴミエリンの影響の解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007.12.11-15、横浜