

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ビ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、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。

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。L 型 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、さらにヒトからヒトへの水平感染を想定して、カニクイザルで2継代させた。初代伝播後ならびに2継代後のプリオンの病原性をマウスによるバイオアッセイで調べた結果、このヒト・モデルにおいては初代および2継代後も L 型から C 型は派生しないことがわかった。

当部で樹立した複数のラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体により、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染が阻止できることを昨年度までに明らかにしている。今回、一部の抗体由来の、Fab フラグメントおよび single chain Fv (scFv) 抗体により、HCV 感染を有意に阻害できることがわかった。一方で、Occludin を標的とした抗 HCV 侵入阻害剤スクリーニング系を構築した。

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。昨年度までに LAPT4A や TM95F2 の欠失変異は志賀毒素耐性を生じ、また、亜鉛トランスポーターファミリー SLC39A9 の欠失により SubAB 耐性が生じることを明らかにしていた。今回、LAPT4A や TM95F2 は Gb3 合成酵素の局在や活性の制御に関与していることを

明らかにした。さらに、SLC39A9 の欠失により C1GalT1 が低下し、O 型糖鎖の変化をもたらすことも明らかにした。

偏性細胞内寄生細菌 *Chlamydia trachomatis* がヒト細胞内で増殖する際、封入体膜タンパク質 IncD が宿主細胞のセラミド輸送蛋白質 CERT と結合して、CERT を封入体膜にリクルートする。IncD は中央部にヘアピン型膜貫通領域を持ち、N 末領域および C 末領域を宿主細胞の細胞質に露出させている。我々は、IncD は CERT との結合に N 末領域と C 末領域の両方を必要とすること、ヘアピン型膜貫通領域が自己会合能を有することを明らかにした。

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、複数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た。この情報は、HuH-7 系統細胞の品質管理やゲノム編集による細胞改変を行う上で重要な基盤情報となる。また、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も行った。黄熱ウイルス (YFV) サブゲノミックレプリコンを持続的に維持する細胞の分離に成功した。

我々が開発した新規 CERT 阻害剤は、従来の CERT 阻害剤と同等の活性を示し、さらに、細胞培養条件下での安定性において従来型よりも優れていることを見出した。

昨年度立ち上げた網羅的脂質解析システムは本年度も順調に活用された。部内で作製した各種脂質代謝関連遺伝子欠失変異細胞も所内外で貢献した。

業績

調査・研究

I. プリオン病に関する研究

1. 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の動物種へ伝播すると、プリオンの特性が変化することがある。非定型 L 型 BSE プリオンがヒトへ伝播した例はこれまで知られていないが、もし L 型 BSE プリオンがヒトへ伝播したら、L 型 から従来型 (C 型) BSE プリオンが派生・増殖するだろうか？ この疑問に答えるべく、L 型 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、さらにヒトからヒトへの二次感染を想定して、カニクイザル

で2継代させた。初代伝播後ならびに2継代後のプリオンの病原性をマウスによるバイオアッセイで調べた結果、このヒト・モデルにおいては初代および2継代後も L 型から C 型は派生しないことがわかった。[萩原健一、中村優子;佐藤由子、飛梅実(感染病理部);小野文子(岡山理科大);柴田宏昭(自治医大)]

2. プリオンの化学的性状と病原体特性についての研究

プリオンを構成する異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})のアミロイド様の多量体(凝集体)構造については、これまで幾つかのモデルが提唱されているが、実体は依然として不明である。凝集体構造解析の手がかりとなる生化学的知見を得ることを目的として、光ラジカル反応に基づくプリオン凝集体の架橋実験に着手した。[萩原健一]

3. 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

ヒト・モデルとしてのカニクイザルへ非定型 L-BSE プリオンを脳内接種すると、効率良く感染・伝播する。そこで、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、観察期間満了後の脳・神経組織の解析を行った。脳内接種実験の約 300 倍量の L-BSE プリオンを経口投与したが、経口投与ザルは観察期間中に明らかな神経症状を呈することなく、安楽死後の脳・脊髄の PrP^{Sc} の蓄積はウエスタンブロット分析の検出限界以下だった。[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(岡山理科大)]

4. ヒト培養細胞を用いたプリオン病モデルの確立

プリオン病は感染性かつ致死性の神経変性疾患であるが、プリオン病の発症機構については明らかではなく、また、予防法や治療法は未だ確立されていない。治療法の開発を困難にしている要因の一つにヒトプリオン病に特化した解析系が確立していないことがあげられ、プリオン病患者由来の組織をもとに病原体プリオンについての解析がより効率的に行える解析系を新たに開発する研究に着手した(ヒトを対象とする医学研究倫理審査申請承認済み)。本研究によりプリオンの性質をより正しく理解し、プリオン病に対する薬剤等の有効な治療法の開発に貢献することを目指す。[中村優子、萩原健一、花田賢太郎]

II. 肝炎ウイルスに関する研究

1. 一価および一本鎖抗 Occludin 抗体による C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染阻害

これまでに、複数の樹立したラット抗 Occludin モノクローナル抗体およびヒトラットキメラ型抗 Occludin モノクローナル抗体により、HCV 感染を阻止できる事を示してきている。

Druggability の向上を目指して本年度は、抗体の小型化を

試みた。一部の抗体由来の、Fab フラグメントおよび single chain Fv(scFv) 抗体により、HCV 感染を有意に阻害できることがわかった。一価の抗体でも感染を阻害できたことから、さらなる低分子でも阻害できる可能性が示唆された。

[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. Occludin を標的とした抗 HCV 侵入阻害剤スクリーニング系の構築

樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体により、HCV 感染を強力に阻止できる事が示され、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が示唆されてきた。そこで、Occludin を標的とした抗 HCV 侵入阻害剤をスクリーニングできる系の構築を試みた。HRP 標識した抗 Occludin 抗体を作製し、Occludin 発現細胞を用いることで、細胞表面 Occludin と抗 Occludin 抗体の結合を特異的に検出する Cell ELISA 系を構築した。本アッセイ系を用いることで、効率的に Occludin 結合分子(Occludin-Occludin 抗体結合を競合阻害する化合物)をスクリーニング可能であり、新規抗 HCV 侵入阻害剤候補が得られるかも知れない。

[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)]

3. 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、引き続き、各種阻害剤の検討を進めている。微生物由来コレステロール代謝阻害剤のいくつかは、HBV 産生阻害傾向が見られることがわかった。一部の薬剤について検討した結果、ウイルスの複製が起こる以前の、侵入過程を阻害していることが明らかとなってきている。本来知られている脂質代謝阻害活性とは異なるメカニズムで作用していることが示唆され興味深い。

[深澤征義、鈴木咲帆、花田賢太郎;小林哲幸(お茶大理);渡士幸一、脇田隆字(ウイルス第二部);田中靖人(名古屋市大)]

III. 感染症に関わる宿主細胞因子の遺伝学的研究

1. CRISPR 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

以前レンチウイルス CRISPR 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として、受容体 Gb3 の生合成に影響を及ぼす LAPT4A および TM9SF2 を同定している。本年度は LAPT4A が Gb3 合成酵素と相互作用することを明らかにした。また TM9SF2 欠損が Gb3 生合成酵素の細胞内分布に影響を及ぼすこと、C 末端の3アミノ酸が Gb3 生合成に影響することを明らかにした。

[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 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

以前腸管出血性大腸菌により産生される毒素、Subtilase cytotoxin (SubAB) に対して、上記の CRISPR 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。本年度はそのうち亜鉛トランスポーターファミリーの SLC39A9 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。昨年度受容体となる糖タンパク質糖鎖の変化を確認しているが、そのうち O 型糖鎖の変化はキー酵素である C1GalT1 を低下させることにより引き起こされることを明らかにした。また SLC39A9 のうち糖鎖合成に影響を及ぼすアミノ酸を同定した。[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. Gb3 様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

ハト由来の Gal 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事が明らかとなっている。本研究ではゲノム編集法を用いて、糖脂質を欠失させた HeLa 細胞を作製し、この細胞に 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た。この細胞を用いた解析により、Gb3 様糖鎖含有糖タンパク質は志賀毒素の受容体となることを明らかにした。[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)]

4. 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

以前遺伝子のノックアウト及び過剰発現により JEV に耐性を示す宿主因子を同定するために、2種類の CRISPR ライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。本年度はスクリーニングで同定された遺伝子3種類に関して、遺伝子ノックアウト細胞株及び過剰発現細胞株を作製し、これら細胞が JEV の感染及び細胞死に対して耐性を示すことを確認した。[佐久間智理、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、山地俊之; 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)]

5. 黄熱ウイルス(YFV) サブゲノミックレプリコンを持続的に維持する細胞の分離

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、昨年度までに YFV ワクチン株(17D-204)のサブゲノミックレプリコンを作製した。今年度は当該レプリコンが持続的に維持されている Vero 細胞(レプリコン細胞)を分離した。

今後は、レプリコン細胞を基に CRISPR/Cas9 による宿主因子のスクリーニング系を構築する予定である。[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. コーヒー含有成分カフェ酸による重症血小板減少症候群ウイルス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、コーヒー含有成分のカフェ酸に HCV 感染を阻害する活性があることを見出している。そこで、他のウイルスの効果についても検討した結果、重症血小板減少症候群ウイルス(SFTSV) 感染も阻害することを見出した。カフェ酸が 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、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)]

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 は自身の FFAT モチーフを介して小胞体膜蛋白質 VAP と相互作用することによりセラミド輸送の効率を上げている。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。しかし、そのリン酸化シグナルの実体については分かっていない。我々はある種のストレスによって S315 のリン酸化が亢進することを見出していたが、そのストレスは細胞にアポトーシスを誘導することも知られていた。本年度の研究結果から、アポトーシスそのものが S315 のリン酸化要因ではないことを明らかにした。[島崎健太郎、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 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 SRM からなる領域(PH-SRM)を抜き出して NMR 解析を行い、PH-SRM に擬似的リン酸化を導入した PH-SRM(10E)では、PHドメインと SRM(10E)領域との間に相互作用が起きることを見出した。PH-SRM(10E)の PI4P 結合活性は低下し、細胞内局在も変化した。我々はリン酸化された 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、これらの知

見を論文にまとめた。[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 との結合に必要な IncD 側の要件に関する研究

偏性細胞内寄生細菌である *Chlamydia trachomatis* は細胞内で増殖する際に、宿主細胞由来のセラミド分子、および、宿主細胞の CERT を必要とする。CERT はクラミジアの封入体膜に局在化することで、クラミジアへのセラミド供給を促進している。CERT の封入体膜への局在化メカニズムの一つは、封入体膜上のクラミジア由来タンパク質 IncD が CERT と結合し、CERT を封入体膜にリクルートすることである。IncD は中央部にヘアピン型膜貫通領域を持ち、N 末領域および C 末領域を宿主細胞の細胞質に露出させている。我々は、IncD は CERT との結合に N 末領域と C 末領域の両方を必要とすること、ヘアピン型膜貫通領域が自己会合能を有す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)；Cherilyn Elwell, Joanne Engel(米国 UCSF)]

4. 新規 CERT 阻害剤開発：高活性物質への展開

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み、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・シミュレーション探索してリード化合物 SC1 を昨年度までに得た。そして、CERT のセラミド結合ドメイン START と候補化合物との共結晶解析からさらに親和性の高い化合物をデザインし、それを実際に化学合成した。その化合物の CERT START に対する親和性を定量的に調べ、よりよい化合物の場合は共結晶解析をするという一連の作業を繰り返し、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 E16 に至った。ラセミ体である E16 を光学分割すると、片方の光学異性体 E16A により高い親和性があった。[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)]

5. 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リ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。さらに質量分析を用いて、新規阻害剤の培地中および細胞内における安定性を調べた。新規阻害剤と既存の CERT 阻害剤 HPA-12 は、それぞれ培地のみおよび細胞培養上清において 72 時間まで同様の変動を示した。一方、それぞれの阻害剤の細胞内に存在する量は、HPA-12 に比べて新規阻害剤が約 2 倍多かった。さらに、HPA-12 は細胞内で経時的に減少したのに対して、新規阻害剤は 72 時間後まで高値を保っていた。以上の結果から、新たに開発した阻

害剤は既存の HPA-12 よりも安定性や阻害効果の持続性の高い CERT 阻害剤であることが明らかとなり、これらの研究成果については論文にまとめた。[酒井祥太、江川大地、熊谷圭悟、花田賢太郎]

6. CERT 機能関連因子を見出すためのゲノムワイドスクリーニング

ライセニン阻害剤は細胞膜上のスフィンゴリエリンに特異的に結合し、膜孔を形成する毒素であり、ライセニン耐性となった CHO 細胞を相補する cDNA として CERT は発見された。CERT を適切に働かせるために必要な因子群を網羅的に同定することを目的とし、欠失によりライセニン耐性を示す遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを HeLa 細胞において行った。その結果、スフィンゴ脂質合成、膜輸送、転写制御、翻訳制御、シグナリングに関わる因子などが同定された。それらの中から、CERT が小胞体-ゴルジ体間の膜近接領域 (メンブレンコンタクトサイト) で機能することへの関与が期待される複数の遺伝子を選択し、それらの欠失細胞株を作製した。これら欠失変異細胞株はライセニン耐性を示し、スフィンゴリエリン合成が低下していることを確認した。[水池彩、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎]

V. 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 系統細胞の全ゲノム配列は、この細胞株の品質管理やゲノム編集による細胞改変を行う上で重要な基盤情報となる。そこで、HuH-7 細胞および Huh7.5.1-8 細胞の全ゲノム配列を決定すべく、これら細胞ゲノム DNA から構築したエンドペアーライブラリーに由来するショートリードをイルミナ HiSeq X でシーケリングし、得られたそれぞれ約 18 億個のショートリード配列をヒトゲノム参照配列 GRCh38 に BWA MEM アルゴリズムを用いてマップした。[山地俊之、深澤征義、花田賢太郎；川本真輝、長田直樹(北海道大)]

2. 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。細胞内と培養上清のウイルス RNA 量を経時的に比較した結果、Huh7.5.1-8 細胞は Vero 細胞よりも複製速度が速いことがわかった。また感染初期では、Huh7.5.1-8 細胞のウイルス放出

効率が Vero 細胞よりも高いこともわかった。このような性質が、Huh7.5.1-8 細胞の JEV 高産生の原因と考えられた。[齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎; 鈴木亮介、脇田隆字(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ポ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ポドーム変化の解析

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質的变化をリポドミクス解析により調べた。ウイルス感染にはポリオ疑似ウイルス(PV1pv)を用い、宿主細胞として RD 細胞と HeLa 細胞を用いた系により、PV1pv 感染 7 時間後に宿主細胞の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、特に PI の増加量は他の脂質に比べて顕著であることを見出している。さらに、安定同位体標識したイノシトールを用いたリポドミクス解析によって、PV1pv 感染による PI 量の増加は *de novo* 合成経路を介したものであることを明らかにした。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

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)を毎年維持した。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 生活衛生・食品監視安全課へ報告した(平成30年10月、平成31年3月実施)。[萩原健一、中村優子]

また、国内の TSE 検査にかかる、同課からの技術的質問について回答した。[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)]

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

と部横断的な共同研究を開始した。[酒井祥太、花田賢太郎]

5. 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(2018.9.29)。[佐久間智理、水池彩、江川大地、鈴木咲帆、酒井祥太、熊谷圭悟、中村優子、齊藤恭子、山地俊之、深澤征義、萩原健一、花田賢太郎; 飛梅実(感染病理部)]

(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(2018.10.3)。[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(バイオセーフティ管理室)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) 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.*, 92, e02258-17, 2018 (selected by the editors of the *Journal of Virology* for inclusion in "Spotlight")
- 2) Sugiki T, Egawa D, Kumagai K, Kojima C, Fujiwara T, Takeuchi K, Shimada I, Hanada K, Takahashi H: Phosphoinositide binding by the PH domain in ceramide transfer protein (CERT) is inhibited by hyperphosphorylation of an adjacent serine-repeat motif. *J. Biol. Chem.*, 293(28), 11206-11217, 2018 (T.S. and D.E. are co-first authors. K.H. and H.T. are co-correspondence)
- 3) Ikeda M, Satomura K, Sekizuka T, Hanada K, Endo T, Osada N: Comprehensive phylogenomic analysis reveals a novel cluster of simian endogenous retroviral sequences in Colobinae monkeys. *Am. J. Primatol.*, 80(7), e22882, 2018
- 4) Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukusihi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, Yamamoto M, Inoue JJ, 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.*, 20(8),

- e12846, 2018
- 5) 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.*, 24(8), 597-601, 2018
 - 6) Hanamatsu H, Mitsutake S, Sakai S, Okazaki T, Watanabe K, Igarashi Y, Yuyama K: Multiple roles of Sms2 in white and brown adipose tissues from diet-induced obese mice. *J. Metabolic Syndrome*, 7(2), 2018
 - 7) Esaki S, Nagasawa T, Tanaka H, Tominaga A, Mikami D, Usuki S, Hamajima H, Hanamatsu H, Sakai S, Hama Y, Igarashi Y, Kitagaki H, Mitsutake S: The fungal 9-methylsphingadienine is a novel ligand for both PPAR γ and GPR120. *J. Food Biochem.*, 42(5), e12624, 2018
 - 8) Murakami Y, Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Ojiro K, Chu P s, Tanik N, Saito Y, Teratani T, Koda Y, Suzuki T, Saito K, Fukasawa M, Ikeda M, Kato N, Kanai T, Saito H: Dual effects of the Nrf2 inhibitor for inhibition of hepatitis C virus and hepatic cancer cells. *BMC Cancer*, 18:680, 2018
 - 9) Hanada K: Lipid-transfer proteins rectify inter-organelle flux and accurately deliver lipids at membrane contact sites (Invited review). *J. Lipid Res.*, 59, 1341-1366, 2018
 - 10) Saito K, Otsuki N, Takeda M, Hanada K: Liposome flotation assay for studying interactions between Rubella virus particles and lipid membranes. *Bio-Protocol*, 8(16), e2983, 2018
 - 11) Shirasago Y, Fukazawa H, Aizaki H, Suzuki S, Suzuki T, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Abe R, Fukasawa M: Thermostable hepatitis C virus JFH1-derived variant isolated by adaptation to Huh7.5.1 cells. *J. Gen. Virol.*, 99(10), 1407-1417, 2018
 - 12) Ohashi H, Nishioka K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K: The aryl hydrocarbon receptor-cytochrome P450 1A1 pathway controls lipid accumulation and enhances the permissiveness for hepatitis C virus assembly. *J. Biol. Chem.*, 293(51), 19559-19571, 2018
 - 13) Kumagai K, Elwell C A, Andoh S, Engel J E, Hanada K: Both the N- and C- terminal regions of the Chlamydial inclusion protein D (IncD) are required for interaction with the pleckstrin homology domain of the ceramide transport protein CERT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 505(4), 1070-1076, 2018 (K.K. and K.H. are co-correspondence)
 - 14) Yamaji T, Sekizuka T, Tachida Y, Sakuma C, Morimoto K, Kuroda M, Hanada K: A CRISPR screen identifies LAPT4A and TM9SF proteins as Glycolipid-Regulating Factors. *iScience*, 11, 409-424, 2019
 - 15) Nakao N, Ueno M, Sakai S, Egawa D, Hanzawa H, Kawasaki S, Kumagai K, Suzuki M, Kobayashi S, Hanada K: Natural ligand-nonmimetic inhibitors to the lipid transfer protein CERT. *Comms. Chem.*, 2, Article no 20, 2019 (N.N., M.U., and S.S. are co-first authors. S.K. and K.H. are co-correspondence)
 - 16) Yumine N, Matsumoto Y, Ohta K, Fukasawa M, Nishio M: Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination. *Virology*, in press
 - 17) 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.*, in press (a Highlighted paper selected by Editor-in-Chief)
- ## 2. 和文発表
- 1) 水池彩, 花田賢太郎: 小胞体連携ゾーンを介した脂質輸送機構、*生体の科学*, 69,541-545、2018
 - 2) 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)、印刷中
 - 3) 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)、印刷中
 - 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)、印刷中
 - 5) 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)、印刷中
 - 6) 中村優子: ウシ海面状脳症 (BSE) 問題とその後、日本医師会雑誌、147(6), 1220, 2018
 - 7) 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、*薬学雑誌*, 139(1), 89-95、2019

- 8) 花田賢太郎: スフィンゴリン脂質、実験医学別冊「正しく基礎を固める脂質解析」、印刷中
- 9) 中村浩之, 花田賢太郎: 蛍光脂質、実験医学別冊「正しく基礎を固める脂質解析」、印刷中
- 10) 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、トリメプリム-スルファミトキサゾール、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) Chauhan R, Shimizu Y, Watashi K, Wakita T, Fukasawa M, Michalak TL: Retrotransposon elements are among initial sites of hepatitis B virus integration into human genome, 16th ISVHLD Global Hepatitis Summit, June 14-17, 2018, Toronto, Canada.
- 2) Kawamoto M, Endo T, Fukasawa M, Hanada K, Osada N: Search for the factors related to HCV replication in the HuH-7 cell line lineages, SMBE2018, July 11, 2018, Yokohama, Japan (Poster).
- 3) Otsuki N, Sakata M, Saito K, Hanada K, Takeda M, Mori Y: Current situation of rubella in Japan / Entry mechanism of rubella virus, The 15th Taiwan-Japan symposium on communicable diseases and prevention, and collaborative project reports, September 3-4, 2018, Taipei, Taiwan.
- 4) Hanada K: Establishment of natural ligand-mimetic and nonmimetic inhibitors to the ceramide transport protein CERT, 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium, September 12-14, 2018, Sapporo, Japan (Invited speaker).
- 5) Puig-Basagoiti F, Fukasawa M, Aoyagi H, Zheng X, Suzuki R, Watashi K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H: Antiviral activity of phospholipase A2 group V (PLA2G5) against HCV, The 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 8-11, 2018, Dublin, Ireland.
- 6) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Kuramochi K, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K: Aryl hydrocarbon receptor-cytochrome p450 1a1 pathway regulates hepatic lipid biosynthesis to maximize hepatitis C virus production, The 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 8-11, 2018, Dublin, Ireland.
- 7) Lavie M, Linna L, Fukasawa M, Jean Dubuisson J: Role of the cytosolic domain of occludin in trafficking and

HCV infection, The 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 8-11, 2018, Dublin, Ireland.

- 8) Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T: PLA2G4C induced by HCV infection leads to stabilization and accumulation of lipid droplets, The 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, October 8-11, 2018, Dublin, Ireland.
- 9) Hanada K: Nonvesicular comings and goings of lipids in the Golgi, FEBS 2018 Advanced Course “The 2018 Golgi meeting: Membrane trafficking in cell organization and homeostasis”, October 15-19, 2018, Sorrento, Italy (Invited speaker).
- 10) 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, 9th CBRs, March 18-21, 2019, Seattle, USA.

2. 国内学会

- 1) 江川大地、杉木俊彦、熊谷圭悟、児嶋長次郎、藤原敏道、竹内恒、嶋田一夫、高橋栄夫、花田賢太郎: リン酸化によるセラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメイン機能抑制機序、第 60 回日本脂質生化学会、2018.5.31-6.1、八王子
- 2) 立田由里子、熊谷圭悟、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎: *Chlamydia trachomatis* は細胞内寄生に宿主のスフィンゴミエリン生合成を必要としない、第 60 回日本脂質生化学会、2018.5.31-6.1、八王子
- 3) 相崎英樹、ホッサムゲワイド、青柳東代、Zheng Xin、Francesc Puig-Basagoiti、渡士幸一、鈴木亮介、熊谷圭悟、山地俊之、深澤征義、酒巻有里子、花田賢太郎、村松正道、脇田隆宇: スフィンゴ脂質の C 型肝炎ウイルス複製における役割の解析、第 28 回抗ウイルス療法学会学術集会、2018.6.7-9、札幌
- 4) 新家粧子、熊谷圭悟、杉木俊彦、小林直宏、藤原敏道、花田賢太郎、児嶋長次郎: セラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメインとクラミジア菌寄生胞 IncD 蛋白質の会合機序の構造生物学的解明、第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018.6.26-28、新潟
- 5) Kawamoto M, Endo T, Fukasawa M, Hanada K, Osada N: Search for the factors related to HCV replication in the HuH-7 cell line lineages, SMBE2018, 2018.7.11, Yokohama
- 6) 小川基彦、白砂圭崇、安藤秀二、下島昌幸、西條政

- 幸、深澤征義: コーヒー由来天然化合物・カフェ酸の重症血小板減少症候群ウイルスに対する感染阻止効果、第1回 SFTS 研究会、2018.9.8-9、東京
- 7) 深澤征義: HCV 侵入機構とその感染予防・治療への応用、第62回日本薬学会関東支部大会、2018.9.16、東京
- 8) 池田昌輝、里村和浩、関塚剛史、花田賢太郎、遠藤俊徳、長田直樹: 旧世界ザルゲノムに存在する内在性サルレトロウイルス(SERV)配列の探索と分子系統解析、日本遺伝学会第90回大会、2018.9.19-21(9/21)、奈良
- 9) 熊谷圭悟、立田由里子、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎: 宿主細胞のスフィンゴミエリン合成酵素は *Chlamydia trachomatis* の細胞内寄生に必須ではない、第36回日本クラミジア研究会学術集会、2018.9.22、札幌
- 10) 酒井祥太、中尾直樹、上野雅晴、江川大地、半沢宏之、川崎祥平、熊谷圭悟、鈴木誠、小林修、花田賢太郎: 天然リガンドと構造類似性のない脂質輸送タンパク質 CERT の新規阻害剤、第91回日本生化学会大会、2018.9.24-26、京都
- 11) 白砂圭崇、稲森陽子、谷田以誠、脇田隆字、鈴木哲朗、鈴木建、花田賢太郎、深澤征義: カフェ酸によるC型肝炎ウイルス感染阻害メカニズムの解析、第91回日本生化学会大会、2018.9.24-26、京都
- 12) 立田由里子、熊谷圭悟、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎: *Chlamydia trachomatis* は細胞内寄生に宿主のスフィンゴミエリン合成を必要としない、第11回セラミド研究会、2018.10.26-27、東京
- 13) 小川基彦、白砂圭崇、安藤秀二、下島昌幸、西條政幸、深澤征義: コーヒー由来天然化合物・カフェ酸の重症血小板減少症候群ウイルスに対する感染阻止効果、第66回日本ウイルス学会学術集会、2018.10.28-30、京都
- 14) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K: C型肝炎ウイルス感染による芳香族炭化水素受容体依存的な脂質蓄積の分子機構解析、第66回日本ウイルス学会学術集会、2018.10.28-30、京都
- 15) 山地俊之: 遺伝子編集法を用いた宿主細胞因子の探索及び糖鎖生合成研究への応用、第16回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2018.11.26、東京
- 16) 山地俊之: ゲノム編集法を用いた糖鎖・脂質代謝関連因子の探索、第2回オルガネラゾーン研究会、2018.12.18、東京
- 17) 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、脇田隆字、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の比較解析、日本薬学会第139年会、2019.3.20-23、千葉
- 18) 小川基彦、白砂圭崇、安藤秀二、下島昌幸、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対するカフェ酸の感染阻害効果、日本薬学会第139年会、2019.3.20-23、千葉
- 19) 鈴木建、清水芳実、白砂圭崇、米田宏平、多田稔、石井明子、八木清仁、近藤昌夫、深澤征義: C型肝炎ウイルス感染阻害活性を有する occludin 抗体の druggability 向上に向けた検討、日本薬学会第139年会、2019.3.20-23、千葉