

10. 細胞化学部

部長 花田 賢太郎

概要

細胞化学部の設置目的は、「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス、プリオン等病原体の感染増殖に関わる宿主細胞の分子や機能を生化学、細胞生物学、遺伝学を中心とした手法を用いて解明し、感染症対策に資する知見や材料を世の中に提供している。また、伝達性海綿状脳症(TSE)検査に関する調査・研究も行っている。

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

プリオン病研究においては、昨年度までに作製したプリオン遺伝子(*PRNP*)欠失ヒト神経芽腫培養細胞株を用い、多型や変異を有するプリオン蛋白質(PrP)を一過性に産生させる系および安定的に産生させる系の双方を確立した。本系を用いることにより、内在性 PrP の干渉を受けずに多型や変異の影響を解析することが可能となった。一方で、C-およびL-BSE プリオンをウシからカンクイザル(ヒト・モデル)へ伝播させ、サルへの伝播前後のプリオンの病原性を検討するというような長期に渡る研究も継続実施した。また、行政支援の活動として、本邦の BSE スクリーニング検査キットが、非定型 BSE 罹患ウシに対しても有効であることを明らかにした。さらに、TSE 行政検査の全国的な精度管理を行うために、試験標準品の調製と配送および試験結果の取りまとめと解析を行い、厚労本省へ報告した。

ヒト肝臓癌由来 Huh7.5.1-8 細胞の Occludin 欠失変異細胞株を用いた解析から、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染に Occludin が必須であることを昨年度までに示していた。本年度は、Occludin が HCV の Cell-to-cell 感染にも必須であることを明らかにし、さらに、昨年度までに樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体の Cell-to-cell 感染阻害効果を検討して、第1細胞外ドメインを認識する抗体、第2細胞外ドメインを認識する抗体の双方が当該感染を阻止できることを見出した。樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体の中で、性状の異なる 2 つの抗体を用い、ヒト肝キメラマウス

の HCV 感染系を用いて、抗体の影響を検討した。その結果、両抗体によって、完全に HCV の感染を阻止できることが明らかとなった。抗体処理によりマウスは毒性を示さず、ヒト肝臓細胞への悪影響もないことを示唆した。

偏性細胞内寄生性であるクラミジア菌の封入体膜タンパク質 IncD は、宿主細胞の発現するセラミド輸送蛋白質 CERT と結合して宿主細胞の合成するセラミドを封入体膜へと運ばせている。IncD のアミノ酸配列において各種クラミジア菌間で保存されている残基をアラニンに置換した変異体 IncD と CERT との結合解析から、CERT との結合に重要な残基を複数同定した。一方で、前年度に行ったヒト・パピロウイルス(HPV) 16-P670 プロモータの制御に関わる宿主因子探索の一次スクリーニングで陽性となった 68 クローンに関して、PCR を用いて遺伝子の同定を行った。

ゲノム編集技術を含む新しい遺伝学的手法を当部では積極的に取り入れている。志賀毒素(ペロ毒素)はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。破壊されると志賀毒素に耐性を示す遺伝子群をヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞においてヒト遺伝子網羅型レンチウイルス CRISPR single-guide RNA (sgRNA) ライブラリを用いて探索し、複数の候補遺伝子を昨年度までに同定していた。本年度はそのうちいくつかの遺伝子に関して、個々にノックアウト細胞を樹立し、志賀毒素耐性となることを確認した。アフリカミドリサル(AGM)腎臓由来の Vero 細胞は多くの種類のウイルスに感受性が高く、感染症研究に汎用されている。そこで、サル由来の Vero C1008 細胞に対しても上記ヒト CRISPR sgRNA ライブラリを用いて志賀毒素感受性に関わる遺伝子探索を行ったところ、HeLa 細胞と比較すると効率は落ちるものの、Gb3 生合成に必要な既知遺伝子群がほぼ網羅的に検出された。よって、使用したヒト CRISPR sgRNA ライブラリは Vero 細胞のゲノムワイド探索にも適用可能であると考えられた。

感染症対策に資する培養細胞の改良・開発研究も順調に進展しつつある。現存する中で最も継代数の少ないと思われる Vero 細胞シード(JCRB0111)のゲノム配列を決定し、I型インターフェロン遺伝子クラスターが完全欠失していること、当該細胞ゲノムにはサル D 型レトロウイルス(SRV)と相同性のある配列が数多く存在することを我々はすでに報告している。

本年度は、Vero JCRB0111 細胞を DNA メチルトランスフェラーゼの阻害剤である 5-Azacytidine によって処理すると SRV 様配列の転写発現が顕著に亢進することを RNA-seq 解析から見出した。さらに、JCRB0111 亜株とは継代歴が異なる ATCC CCL-81 および Vero 76 亜株の全ゲノム配列をも決定し、三つの Vero 細胞亜株(JCRB0111, ATCC CCL-81, Vero 76)のゲノム配列および AGM ゲノムドラフト配列との間の比較解析から、Vero 細胞ゲノムに 84 箇所の内蔵性 SRV 挿入位置を発見した。そして、84 箇所中の 83 箇所は三細胞亜株間で一致していること、26 箇所は参照 AGM ゲノム配列中にも存在することを見出した。これらの情報は、ワクチン細胞基材としての Vero 細胞に内在する SRV の特性や挙動を調べるうえで重要な基盤情報となる。

Vero 細胞及び Huh7.5.1-8 細胞は自然免疫に関する遺伝子の欠損や変異によりウイルス感受性が高いため高い。これらの細胞に対し、(i)ウイルス感受性やウイルス産生能のさらなる増加、(ii)ウイルス応答シグナルにおけるインターフェロン非依存経路の解明、(iii)ゲノムワイドスクリーニングの親株としての使用、を目指して、I 型インターフェロン受容体をはじめとする代表的な自然免疫系遺伝子をゲノム編集法によって欠失させた変異細胞株を複数樹立した。

人事面では、前濱朝彦第四室長が、平成 28 年 9 月 30 日付けで退職し、神戸大学大学院医学研究科に転出した。前濱博士が異動先でも御活躍することを部員一同祈念している。

業績

調査・研究

I. プリオン病に関する研究

(1) ヒト培養細胞を用いたプリオン病モデルの確立

ヒト・プリオン病には遺伝性、獲得性、孤発性などの複数の原因による発症タイプが存在するが、いずれにおいてもその発症メカニズムは不明であり、有効な治療法は未だ確立されていない。これらの課題を克服する手段の一つとして、プリオン遺伝子 (*PRNP*) 欠損細胞株を用い、多型や変異を有するプリオン蛋白質 (PrP) を一過性に産生させる系および安定的に産生させる系の双方を確立した。本系を用いることにより、内在性 PrP の干渉を受けずに多型や変異の影響を解析することが可能となり、遺伝性プリオン病の発症メカニズムの解明促進、薬剤スクリーニング系の改良などが期待される。現在、これらの細胞を用いた変異や多型を有する PrP の性状解析を継続中である。[中村優子、萩原健一、花田賢太郎]

(2) カニクイザルへ伝播後の BSE プリオンに関する研究

ウシ海綿状脳症 (BSE) プリオンがウシからヒツジなどの異種動物へ伝播すると、BSE プリオンの病原性が変化するという

報告がある。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こるかという点は、ヒト・プリオン病の疫学考察などにおける重要なポイントと考えられた。そこで、C-および L-BSE プリオンをウシからカニクイザル (ヒト・モデル) へ伝播させ、サルへの伝播前後のプリオンの病原性を近交系マウスを用いるバイオアッセイにより調べた。このアッセイに依れば、ヒト・モデルへの伝播による病原性の変化は認められなかった。[萩原健一; 佐藤由子、飛梅実 (感染病理部); 小野文子 (千葉科学大); 柴田宏昭 (医薬健栄研、自治医大)]

(3) BSE 迅速 ELISA キットの有効性の評価試験

本邦の BSE スクリーニング検査で用いられている検査キットが、C-BSE 罹患ウシのみならず非定型 L-BSE 罹患ウシおよび非定型 H-BSE 罹患ウシ (H-BSE の国内農場での発生例は無い) に対しても有効であることを、(独)動物衛生研究所との共同研究により示した。研究成果を専門誌に投稿した (in press)。[萩原健一; 飛梅実 (感染病理部); 岩丸祥史、多田田奈保子、横山隆 (動衛研)]

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

これまでの共同研究により、非定型 L-BSE プリオンは、ヒト・モデルとしてのカニクイザルへ脳内接種すると高い効率で感染・伝播することがわかっている。脳内接種による高い伝播効率を踏まえ、ヒトがもしも L-BSE プリオンを経口摂取した場合の感染リスクを評価する目的で、カニクイザルへの L-BSE プリオンの経口投与実験を進めている。経過を追跡中である。[萩原健一; 柴田宏昭 (医薬健栄研、自治医大); 大藤圭子、岡林佐知 (予防衛生協会); 小野文子 (千葉科学大)]

II. 肝炎ウイルスに関する研究

(1) C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染における Occludin 分子の役割の解析

我々は、HCV 感染における Cell-free 感染および Cell-to-cell 感染を検出する実験系を確立している。またこれまでに、CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集技術により、ヒト肝培養細胞より Occludin ノックアウト細胞も樹立している。これらの細胞を用いて解析した結果、Occludin 分子が、Cell-free 感染だけでなく、Cell-to-cell 感染にも必須であることが明らかとなった。このことから、抗 HCV 創薬標的としてより魅力的な標的であることが強く示唆された。

[深澤征義、白砂圭崇、清水芳実、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) 樹立した抗 Occludin モノクローナル抗体は HCV の Cell-to-cell 感染も阻止できる

これまでに、樹立した抗 Occludin モノクローナル抗体が、

HCV の Cell-free 感染を阻止できる知見を得ている。そこで、もう一つの感染モードである Cell-to-cell 感染について、レポーター分子を導入した変異細胞株を用いることで、高感度に検出できる実験系をまず確立した。この系を用いて、我々が樹立した複数のラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体の効果を検討した結果、第1細胞外ドメインを認識する抗体、第2細胞外ドメインを認識する抗体の双方が、Cell-to-cell 感染も阻止できることがわかった。

[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)]

(3)抗ヒト Occludin モノクローナル抗体による in vivo HCV 感染阻止

樹立したラット抗ヒト Occludin モノクローナル抗体の中で、性状の異なる2つの抗体を用い、ヒト肝キメラマウスの HCV 感染系を用いて、抗体の影響を検討した。その結果、両抗体によって、完全に HCV の感染を阻止できることが明らかとなった。抗体処理によりマウスは毒性を示さず、血中 ALT・AST 値、血中ヒトアルブミン値にも有意な変化が見られなかったことから、ヒト肝臓への悪影響もないと考えられた。これらの結果から、Occludin を標的とした抗 HCV 戦略の有効性が示された。

[深澤征義、清水芳実、花田賢太郎;近藤昌夫、八木清仁(阪大薬)]

(4)B型肝炎ウイルス(HBV)感染培養細胞系を用いた解析

HBV 感染細胞系を用いて、特に脂質関連代謝系に注目して検討を進めている。これまでに、高度不飽和脂肪酸により HBV 産生が抑制される傾向があることを見出してきた。そこで、各種脂質関連化合物の中で、脂肪酸に着目してさらに HBV 感染への影響を検討した。その結果、一価不飽和脂肪酸ではほとんど影響が見られず、飽和脂肪酸では逆に HBV 産生が亢進する傾向が見られた。

[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

志賀毒素(ペロ毒素)はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。昨年度レンチウイルス 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群を同定している。本年度はそのうちいくつかの遺伝子に関して、個々にノックアウト細胞を樹立し、志賀毒素に対して耐性となるこ

とを確認した。またこれらの糖脂質組成を解析したところ、受容体 Gb3 の発現低下が認められ、それらの表現系は cDNA を発現させることで回復した。[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

志賀毒素の他に腸管出血性大腸菌により産生される毒素として Subtilase cytotoxin(SubAB)が知られている。SubAB はシアロ糖鎖を受容体として細胞内に侵入し、細胞死を引き起こす。昨年度この細胞死に対し上記の CRISPR ライブラリを用いて、遺伝子破壊で志賀毒素に耐性を示す遺伝子群を同定している。本年度はそのうち糖鎖生合成酵素を含む複数の遺伝子に関してノックアウト細胞及び cDNA による回復株を樹立した。いずれのノックアウト細胞においても、毒素に対する耐性及び回復株による感受性回復が見られた。[山地俊之、立田由里子、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)]

(3)アフリカミドリザル由来 Vero 細胞に対する CRISPR ライブラリの適用

Vero 細胞は、アフリカミドリサル(AGM)腎臓由来の連続継代培養細胞株であり、多くの種類のウイルスや細菌性毒素への感受性が高い。そのため、感染症研究に汎用されている。サル由来の Vero 細胞に対して、上記のヒト CRISPR ライブラリを適用出来るか調べるため、志賀毒素感受性 Vero C1008 細胞を親株に上記(1)と同様のゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、HeLa 細胞と比較すると濃縮率は落ちるものの、予想された受容体 Gb3 の生合成に必須な遺伝子群が検出された。このことは病原体の受容体同定等を目的として、Vero 細胞を用いたゲノムワイドスクリーニングによる探索が可能であることを示唆している。

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

(4)様々な脂質輸送タンパク遺伝子のノックアウト細胞の樹立

生体膜の脂質組成は、病原体の細胞への感染に大きく影響する。細胞内における脂質分布の heterogeneity は、生合成酵素の分布だけでなく、タンパク質輸送と異なる複雑な脂質輸送に依存している。脂質分布・組成が病原体感染に与える影響について調べるため、これまで知られている脂質転移タンパクを中心に HeLa 細胞において複数のノックアウト細胞株を樹立した。また機能的に redundant な遺伝子に関しては、二重破壊株の樹立を行った。今後病原体に対する感受性が変化するか検討する予定である。

[立田由里子、山地俊之、花田賢太郎]

IV. スフィンゴ脂質に関する研究

(1) CERT と VAP の相互作用の制御に関する研究

セラミド輸送タンパク質 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タンパク質である。CERT は 315 番目のセリン残基 (CERT S315) がリン酸化されることにより小胞体膜との親和性が増大し、結果として CERT によるセラミド輸送が促進される。CERT S315 のリン酸化は CERT の活性制御を理解する上で重要な現象であるが、リン酸化を担うキナーゼはまだ分かっていない。我々はこれまでに、CERT S315 のリン酸化状態がある種のストレス条件下で亢進することを見出していた。平成 28 年度はキナーゼ阻害剤と組み合わせることで、CERT S315 を通常状態でリン酸化するキナーゼと、当該ストレスに応答してリン酸化するキナーゼは異なる性質を持つことを明らかにした。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CERT の PH ドメインと SR モチーフの相互作用に関する研究

CERT にはセリンリピート (SR) モチーフと呼ばれる活性調節領域が存在する。この領域が多重リン酸化されると、CERT の N 末領域に存在するプレクストリンホモロジー (PH) ドメインに由来する PI4P 結合活性と、C 末領域に由来する膜間セラミド輸送活性が同時に抑制されることを我々は報告していた。今回我々は、PH ドメインと擬似的リン酸化 SR モチーフ (SR10E) から成る欠損変異体を用いて NMR 解析を行い、SR10E と PH ドメイン間の相互作用について検討した。また、これら変異体における PI4P 結合活性をリボソーム共沈アッセイによって確認した。[江川大地、熊谷圭悟、山地俊之、花田賢太郎; 杉木俊彦 (阪大); 児嶋長次郎 (横浜国立大)]

(3) CERS2 遺伝子ノックアウト細胞株の解析

遺伝子編集法を用いて樹立したセラミド合成酵素 2 (CERS2) 遺伝子変異株を用いて、脂肪酸の基質特異性が異なる他のセラミド合成酵素 (CERS1, 3-6) の転写量を親株と比較したが、特に大きな変化は見られなかった。一方この細胞にグルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素 (UGCG) を過剰発現させると、GlcCer の量のみならず、脂肪酸組成の割合も変化した。このことは UGCG の量及び細胞内分布が GlcCer の質に影響することを示している。[山地俊之、立田由里子、花田賢太郎]

(4) CERT と IncD の相互作用に関する研究

偏性細胞内寄生細菌である *Chlamydia trachomatis* は増殖する際に宿主細胞由来のセラミドを必要とする。セラミドの取り込みは *C. trachomatis* 由来の IncD タンパク質が CERT と結合し、CERT の膜間セラミド輸送機能をハ

イジャックすることで成立する。平成 28 年度は、IncD のアミノ酸配列において各種クラミジア間でよく保存されている残基に着目して解析を行った。保存された残基をアラニンに置換した変異体 IncD と CERT との結合解析を行ったところ、CERT との結合に重要な残基が数カ所あることが明らかになった。[熊谷圭悟、花田賢太郎; 安藤秀二 (ウイルス第一部); Cheryl Elwell, Joanne Engel (米国 UCSF)]

V. 感染症対策に資する培養細胞の研究

(1) Vero JCRB0111 細胞における内在性レトロウイルスの転写発現

アフリカミドリサル (AGM) 腎臓由来の連続継代培養細胞株である Vero 細胞は、感染症の研究調査において広く利用されているだけでなく、ウイルスワクチン生産細胞としても汎用されている。我々は、現存する中で最も継代数の少ないと思われる Vero 細胞シード (JCRB0111) のゲノム配列を決定し、I 型インターフェロン遺伝子クラスターが完全欠失していること、当該細胞ゲノムにはサル D 型レトロウイルス (SRV) と相同性のある配列が数多く存在することなどをすでに報告している。今回、Vero JCRB0111 細胞を DNA メチルトランスフェラーゼの阻害剤である 5-Azacytidine によって処理すると SRV 様配列の転写発現が顕著に亢進することを RNA-seq 解析から見出した。[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) Vero ATCC CCL-81 および Vero 76 亜株の全ゲノム配列決定

Vero 細胞ゲノムに存在するサル内在レトロウイルス (SERV) の挿入位置や配列などに細胞亜株間で差異があるのかを検討するために、Vero 細胞 JCRB0111 亜株とは継代歴が異なる ATCC CCL-81 および Vero 76 亜株を American Type Culture Collection から取り寄せて、これらの全ゲノム配列を決定した。ゲノムサンプルからペアエンドライブラリを作製して次世代シーケンサで読んだショートリード配列を公開 AGM ゲノムドラフト配列に張り付けてアセンブリを行った。[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); 池田昌輝、長田直樹 (北大); 小原有弘、平山知子、笠井文生 (医薬健康研)]

(3) Vero 細胞ゲノムにおける SERV 挿入箇所解析

三つの Vero 細胞亜株 (JCRB0111, ATCC CCL-81, Vero 76) のゲノム配列および AGM ゲノムドラフト配列との間の比較解析から、Vero 細胞ゲノムに 84 箇所の SERV 挿入位置が見つかり、そのうちの 83 箇所は三細胞亜株間で一致していた。また、これら 84 箇所の SERV 挿入位置のうち、26 箇所は参照 AGM ゲノム配列中にも存在していた。また、84 の SERV 挿入

箇所のなかで SLV27b と名付けた一箇所だけは Vero 76 と参照 AGM のゲノムには存在するが Vero JCRB0111 と ATCC CCL-81 のゲノムには存在しないというパターンを示した。このパターンは、三つの Vero 細胞亜株の中で Vero 76 が最も遅く樹立された亜株であることと一見矛盾したが、Vero 細胞系列の樹立歴の中で起こった SVL27b を含む染色体のリアレンジメントと細胞のクローナル選択の結果であろうことがゲノムコピー数解析から示唆された。[佐久間智理、山地俊之、花田賢太郎；関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム解析研究センター）；池田昌輝、長田直樹（北大）；小原有弘、平山知子、笠井文生（医薬健栄研）]

(4) Vero 細胞亜株間での日本脳炎ウイルス(JEV)産生能の比較

全ゲノム配列の比較解析を行った3種の Vero 細胞亜株 (JCRB0111, ATCC CCL-81, Vero 76) について、ウイルス感受性に差異があるかどうかを、フラビウイルスの一つである JEV (Nakayama 株) を用いて調べた。その結果、JEV の産生とプラーク形成に大きな差はないことを確認した。[齊藤恭子、山地俊之、深澤征義、花田賢太郎；鈴木亮介（ウイルス第二部）；小原有弘（医薬健栄研）]

(5) Huh7.5.1-8 細胞と Vero 細胞における JEV 産生の比較解析

C 型肝炎ウイルス(HCV)高感受性を指標に分離されたヒト肝癌由来 Huh7.5.1-8 細胞の他のフラビウイルスに対する感受性を調べる目的で、同細胞と Vero 細胞 (JCRB9013 株) との間で JEV (Nakayama 株) 産生能を比較した。Huh7.5.1-8 細胞は Vero 細胞よりも感染初期にウイルス産生が高い傾向が見られたが、それは細胞密度が高い場合に顕著であった。また、Huh7.5.1-8 細胞は、Vero 細胞よりも感染後早期に細胞死が観察された。さらに、Huh.7.5.1-8 細胞では、Vero 細胞よりも早期に大きな JEV のプラークが形成された。このプラーク形成能の差は両細胞におけるウイルス産生能、細胞変性効果の差を反映したものと考えられた。このような Huh7.5.1-8 細胞の特徴は、新たなフラビウイルスの検出・分離や、プラークアッセイの改良に有用である可能性があると考えられた。[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）]

(6) 自然免疫遺伝子のノックアウト細胞株作成

Vero 細胞及び Huh7.5.1-8 細胞は自然免疫に関する遺伝子の欠損や変異によりウイルス感受性が高いため高い。これらの細胞に対し、(i)ウイルス感受性やウイルス産生能のさらなる増加、(ii)ウイルス応答シグナルにおけるインターフェロン非依存経路の解明、(iii)ゲノムワイドスクリーニングの親株としての使用、を目指して、I 型インターフェロン受容体をはじめとする複数の自然免疫系遺伝子ノックアウト株の樹立を行

った。[佐久間智理、山地俊之、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎]

(7) HPV16 ウイルス増殖に関わる宿主因子の探索

前年度に行った HPV16-P670 プロモータの制御に関わる宿主因子探索の一次スクリーニングで陽性となった 68 クローンに関して、PCR を用いて遺伝子の同定を行った。その結果、MT2A、ATP5J2、TCEB2 の 3 遺伝子を同定することに成功した。HPV16-P670-luc を用いた二次スクリーニングによる検証の準備を進めた。また、HPV16 エピソームの維持に関わる宿主因子探索の一次スクリーニングで陽性となった 7 遺伝子に関して、shRNA を用いた二次スクリーニングに向けた準備を行った。[前濱朝彦、花田賢太郎；終元巖（病原体ゲノム解析研究センター）]

VI. 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) がん制御因子 PICT1 による核小体ストレス感知機構の解明

PICT1 による p53 制御の引き金となる PICT1 の分解過程を明らかにするため、細胞内で PICT1 の安定化に寄与している分子の同定を試みた。データマイニング等によって得られた PICT1 結合因子 (134 遺伝子) のノックダウンを行い、PICT1 の発現量に変化をもたらす 11 遺伝子を同定した。これらの候補因子と PICT1 との結合、またこれらの候補因子による PICT1 の安定性制御を評価するアッセイ系の構築を行った。[前濱朝彦、花田賢太郎；鈴木聡（九州大）]

レファレンス業務

I. 伝達性海綿状脳症(TSE)検査

(1) TSE スクリーニング検査に関する外部精度管理試験の実施

TSE スクリーニング検査を実施している国内の検査機関に対して、厚生労働省 医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部 監視安全課からの依頼により、健常マウスおよびスクレイプ感染マウスの脳乳剤を標準検体とした精度管理試験を実施した(平成28年11月～平成29年3月。20 機関について実施)。統計解析した試験結果を監視安全課へ報告した。本事業は平成24年度から毎年実施しており、本年度を以て事業を完了した。[萩原健一、中村優子、花田賢太郎；飛梅実、片野晴隆、長谷川秀樹（感染病理部）]

(2) TSE 行政検査・確認検査(ウェスタンブロット法)の担当、検査実施要領改正に合わせた検体輸送要領の変更

TSE 行政検査・確認検査体制を通年維持し、また、試薬等の品質と検査手技の管理を目的として、BSE 陽性ウシおよび陰性ウシの標準試料を模擬検体とする内部精度管理試験を

行った(平成28年9月、平成29年3月実施)。試験データを厚生労働省 医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部 監視安全課へ報告した。また、食肉衛生検査所等での伝達性海綿状脳症検査実施要領の平成29年度改正(予定)に合わせ、検体輸送要領について監視安全課と検討して一部変更を行い、生活衛生・食品安全部 監視安全課より自治体等へ通知した。[萩原健一、中村優子;片野晴隆、飛梅実、佐藤由子(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 MALDI-飛行時間型質量分析機 (AXIMA-QIT) およびトリプル四重極リニアイオントラップ型質量分析機 (3200QTRAP) の保守・運用を行い、また、適切な節電対策を講じた。また、機器のトラブルへの対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフトを管理した。[萩原健一、齊藤恭子、花田賢太郎]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表
 - 1) Oh H, Shin J, Ato M, Ma X, Williams D, Han K, Yang Kim J, Kang HG, Jung K, Hanada K, Ochiai M, Hug PV, Park S, Ahn C: Meeting report: The first meeting of the national control laboratories for vaccines and biologicals in the Western pacific in 2016, *Osong Public Health Res. Perspect.*, 8, 91-103, 2017
 - 2) Hanada K, Sugiki T: *In vitro* assay to extract specific lipid types from phospholipid membranes using lipid-transfer proteins: a lesson from the ceramide transport protein CERT. *in* "Lipidomics" (Ed., Paul Wood), Series: *Neuromethods*, Vol.125, pp81-98, Springer, 2017
 - 3) Shirasago Y, Shimizu Y, Tanida I, Suzuki T, Suzuki R, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M: Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 839-848, 2016
 - 4) Hashimoto Y, Tada M, Iida M, Nagase S, Hata T, Watari A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kondoh M: Generation and characterization of a human-mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 91-95, 2016
 - 5) Hashimoto Y, Kawahigashi Y, Hata T, Li X, Watari A, Tada M, Ishii-Watabe A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M: Efficacy and safety evaluation of claudin-4-targeted antitumor therapy using a human and mouse cross-reactive monoclonal antibody. *Pharmacol. Res. Perspect.*, 4, e00266, 2016
 - 6) Yamaji T, Horie A, Tachida Y, Sakuma C, Suzuki Y, Kushi Y, Hanada K: Role of intracellular lipid logistics in the preferential usage of very long chain-ceramides in glucosylceramide. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, E1761, 2016
 - 7) Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A: Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *J. Biochem*, 161, 237-244, 2017
 - 8) Hanada K: Ceramide transport from the endoplasmic reticulum to the *trans* Golgi region at organelle membrane contact sites. *in* "Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Diseases" (Eds., Mitsuo Tagaya & Thomas Simmen), Series: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol.997, Springer, in press
 - 9) Hashimoto Y, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M: Proof of concept for claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press
 - 10) Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M: Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion*, in press
 - 11) Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, Kiyotake R, Doi R, Iwai S, Omahdi Z, Yamaji T, Miyamoto T, Bamba T, Yamasaki S: Intracellular metabolite β -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, in press
2. 和文発表
 - 1) 後藤裕樹、西尾美希、加藤雅子、前濱朝彦、鈴木聡: 機械的刺激による Hippo-YAP/TAZ 経路の活性化、生理作用、腫瘍進展メカニズムと意義、*生体の科学*、67、127-131、2016

- 2) 齊藤恭子、深澤征義: 宿主細胞コレステロール生合成系を標的とした C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス戦略、生化学、88, 411-415, 2016

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Hagiwara K, Sato Y, Yamakawa Y, Hara H, Shibata H, Ono F: Interspecies transmission of atypical L-BSE prion to non-human primates (cynomolgus macaques) alleviates PrP^{Sc} glycoform profile of cattle L-BSE trait, but preserves incompetent transmissibility to inbred mice, Prion 2016, 2016.5.10-13, Tokyo, Japan
- 2) Kabayama K, Miyake S, Manabe Y, Yamaji T, Hanada K, Fukase K: Functional evaluation of membrane glycolipids using synthetic glycans, 1st Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium, 2016.5.11-13, Jeju island, South Korea
- 3) Shirasago Y, Shimizu Y, Tanida I, Suzuki T, Suzuki R, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M: Occludin-knockout human hepatic cells are non-permissive to hepatitis C virus infection, RNA2016, 2016.6.28-7.2, Kyoto, Japan
- 4) Hanada K: Vero cells: Determination of the genome landscape and its application to QC, Workshop of Western Pacific National Control Laboratories for Vaccines and Blood Products, 2016.9.1-2, Seoul, Korea
- 5) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M: Monoclonal antibodies against the extracellular domains of occludin block hepatitis C virus infection in human liver chimeric mice, The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016.10.11-15, Kyoto, Japan
- 6) Gewaid EH, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Aly H, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Wakita T, Aizaki H: Sphingomyelin is a component in the membranous replication factories, The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016.10.11-15, Kyoto, Japan
- 7) Ito M, Fukasawa M, Kohara M, Suzuki T: PLA2G4C is involved in HCV induced lipid droplet accumulation, The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016.10.11-15, Kyoto, Japan
- 8) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Wakita T, Watashi K: Role of lipid droplets in the emergence of drug resistant virus against direct acting antivirals, The 23th

International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016.10.11-15, Kyoto, Japan

- 9) Yamaji T, Sekizuka T, Yahiro K, Tachida Y, Sakuma C, Kuroda M, Hanada K: Application of genome editing technologies for studies on sphingolipid and glycan metabolisms, EMBO Workshop “Glycosylation in the Golgi complex”, 2016.10.24-28, Vico Equense, Italy

2. 国内学会

- 1) 白砂圭崇、谷田以誠、鈴木咲帆、稲森陽子、小林哲幸、深澤征義: カフェ酸による C 型肝炎ウイルス感染阻害、日本薬学会第 137 年会、2016.3.25-27、横浜
- 2) 飛梅実、萩原健一、小野文子、佐藤由子、柴田宏昭: マカクを用いた BSE 由来プリオンの実験的継代、第 105 回日本病理学会総会、2016.5.12-14、仙台
- 3) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、八木清仁、近藤昌夫: 宿主侵入因子を標的とした抗 HCV 戦略～Claudin-1, Occludin 結合プローブの有用性、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016.5.13-15、名古屋
- 4) ホッサムゲワイド、青柳東代、渡士幸一、鈴木亮介、熊谷圭悟、山地俊之、深澤征義、坂巻有里子、市野瀬志津子、花田賢太郎、脇田隆宇、相崎英樹: 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 58 回日本脂質生化学会、2016.6. 9-10、秋田
- 5) 花田賢太郎、熊谷圭悟、山地俊之: 小胞体膜接触局域とオルガネラ間脂質輸送: セラミド輸送からの考察、第 68 回日本細胞生物学会大会第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会合同大会、2016.6.15-17、京都
- 6) 白砂圭崇、清水芳実、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎、深澤征義: 抗 Claudin-1 抗体を用いた Claudin-1 細胞内動態の解析、第 68 回日本細胞生物学会大会第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会合同大会、2016.6.15-17、京都
- 7) 三宅秀斗、樺山一哉、真鍋良幸、陳思宇、山地俊之、花田賢太郎、深瀬浩一: 細胞表面における糖鎖機能解明を指向した合成糖鎖の細胞膜提示システムの開発、第 68 回日本細胞生物学会大会第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会合同大会、2016.6.15-17、京都
- 8) 熊谷圭悟、山地俊之、花田賢太郎: 偏性細胞内寄生クラミジア菌の感染増殖における宿主細胞セラミド輸送タンパク質 CERT の役割、第 58 回脂質生化学会、2016.6.15-17、秋田
- 9) 樺山一哉、三宅秀斗、真鍋良幸、山地俊之、花田賢太郎、深瀬浩一: 合成糖鎖の細胞膜提示システムによる糖脂質

- 機能の解明、第 58 回脂質生化学会、2016.6.15-17、秋田
- 10) 鈴木佑典、田村恭祐、野田和彦、須賀理衣、長谷川拓馬、山地俊之、櫛泰典:膜脂質組成による慢性骨髄性白血病細胞株 K562 の γ グロビン発現制御、第 58 回脂質生化学会、2016.6.15-17、秋田
- 11) 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:NMR 解析から見出されたセラミド輸送タンパク質 CERT の PH ドメインが隣接する部位のリン酸化によって機能抑制される機序の一端、第 11 回スフィンゴセラピー研究会、2016.7.14-16、加賀
- 12) 山地俊之、関塚剛史、八尋錦之助、鈴木佑典、櫛泰典、黒田誠、花田賢太郎:ゲノム編集技術を用いたスフィンゴ脂質・糖鎖の代謝研究、第 35 回日本糖質学会年会、2016.9.1-3、高知
- 13) 三宅秀斗、初村洋紀、樺山一哉、真鍋良幸、山地俊之、花田賢太郎、深瀬浩一:HaloTag テクノロジーによる生細胞への糖鎖提示とそれを用いた機能解析、第 35 回日本糖質学会年会、2016.9.1-3、高知
- 14) 花田賢太郎:哺乳動物細胞における小胞体接触局域を介したセラミド輸送の分子機序とその制御、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25-27、仙台
- 15) 深澤征義、白砂圭崇、清水芳実、谷田以誠、近藤昌夫、八木清仁、鈴木哲朗、鈴木亮介、杉山和夫、脇田隆字、花田賢太郎、C 型肝炎ウイルス感染における Occludin 分子の重要性~Occludin ノックアウトヒト肝培養細胞を用いた検討、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25-27、仙台
- 16) 白砂圭崇、清水芳実、近藤昌夫、八木清仁、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、深澤征義:動物モデルにおける抗 OCLN 抗体の HCV 感染に対する阻害効果、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016.10.23-25、札幌
- 17) 伊藤昌彦、深澤征義、小原道法、鈴木哲朗:C 型肝炎ウイルス感染による脂肪滴蓄積への PLA2G4C の関与、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016.10.23-25、札幌
- 18) 大橋啓史、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、深澤征義、紙透伸治、菅原二三男、大谷直子、脇田隆字、渡士幸一:肝細胞内 aryl hydrocarbon receptor による C 型肝炎ウイルス粒子構築制御機構の阻害が DAAs 耐性の出現を低下させる、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016.10.23-25、札幌
- 19) 飛梅実、佐藤由子、萩原健一、柴田宏昭、小野文子、長谷川秀樹:C および LBSE 由来プリオンのマカクにおける病理学的解析、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016.10.23-25、札幌
- 20) 山地俊之、花田賢太郎:スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンとの間で異なるセラミド分子種嗜好性にはセラミドの細胞内ロジスティックスが関与している、第 9 回セラミド研究会学術集会、2016.10.27-28、東京
- 21) 杉木俊彦、熊谷圭悟、江川大地、児嶋長次郎、藤原敏道、竹内 恒、嶋田一夫、花田賢太郎、高橋栄夫:セラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメイン-Golgi 体間結合が CERT のリン酸化によって抑制される構造基盤:溶液 NMR 法による解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.11.30-12.2、横浜
- 22) 花田賢太郎:カルタヘナ法と関わる組換え生物生ワクチン ワクチン分科会趣旨説明、バイオロジクスフォーラム第 14 回学術集会、2017.1.12、東京
- 23) 花田賢太郎:小胞体膜接触場を介したオルガネラ間脂質輸送とその制御、理研シンポジウム「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」、2017.1.20、埼玉
- 24) 山地俊之:ゲノム編集技術を用いたスフィンゴ脂質・糖鎖の代謝研究、順天堂大学第 53 回環境医学研究所・第 44 回研究推進委員会合同セミナー、2017.1.23、浦安