

10. 細胞化学部

部長 花田 賢太郎

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としている。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、志賀毒素の細胞感受性に関わる研究、志賀毒素とその受容体との相互作用に関する研究、オートファジーに関する研究、細胞内脂質輸送に関する研究、インフルエンザ感染と抗炎症性脂質に関する研究など、幅広い分野で成果を挙げた。

培養細胞系でのC型肝炎ウイルス感染において、高度不飽和脂肪酸酸化物のいくつかがウイルス生産を阻害し、また、コレステロール合成に関わるスクワレン合成酵素の阻害剤もウイルス産生を阻害することを見出した。

プリオン病に関する研究では、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からCRMP-2のC末端領域を欠失したアイソフォームが異常型プリオンPrP^{Sc}の蓄積に伴って増加することを明らかにし、それは翻訳後のタンパク質分解により生じることを示唆した。また、近交系マウスへの非定型ウシ海綿状脳症(BSE)プリオン接種実験から非定型ウシPrP^{Sc}は定型PrP^{Sc}に比べてマウスへの感染力が低いことを明らかにした。なお当部では、平成13年12月からウェスタンブロッティング法によるBSEの行政検査を担当している。

また、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。

花田は、(独)医薬品医療機器総合機構が行う医薬品GLP査察および医療機器GLP査察に対する評価委員の任もはたした。

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ウシ海綿状脳症(BSE)プリオンの伝達

従来型および非定型BSEプリオン(*Jpn. J. Infect. Dis.*, **60**, 305 (2007))の近交系マウス(C57、SjL、RIII)への感染実験を行った。初代伝播の結果、従来型BSEプリオン接種群は、接種後260-730日目に脳などにおいてPrP^{Sc}が検出されたが、非定型接種群では長期観察後もPrP^{Sc}は検出できなかった。従来型BSEプリオンの2代目伝播では、潜伏期の短縮・収束が進み、プリオン株のマウスへの馴化が認められた。一方、非定型接種群の脳ホモジネートを2代目に'blind passage'したが、現在のところPrP^{Sc}は検出されていない。このように、非定型BSEプリオンは従来型と明らかに異なる。

[萩原健一、山河芳夫、原 英之、大内史子; 佐藤由子、佐多徹太郎(感染病理部)]

(2) ヒト変異型CJD(vCJD)の霊長類モデルの研究; カニクイザルへのBSEの伝播に関する研究

BSE罹患ウシ(BSE/JP6)の脳乳剤をカニクイザルに脳内接種(3頭)した。その結果、2頭が約28ヶ月、1頭が50ヶ月後に驚愕、過敏などの神経症状を呈し、3-6ヶ月の臨床期を経て起立不能となった(安楽殺)。いずれの個体にもBSEプリオンのPrP^{Sc}糖鎖型の特徴(=4型糖鎖)を示すPrP^{Sc}が脳、脊髄に多量に認められ、座骨神経や正中神経などの末梢神経にも微量のPrP^{Sc}が検出された。脳の免疫組織化学所見では、PrP^{Sc}の一部がvCJDに特徴的な花弁状プラークとして蓄積していた。しかし、vCJD患者でPrP^{Sc}陽性となる脾臓、盲腸、扁桃およびリンパ節にはPrP^{Sc}は認められず、この差異は感染ルート(脳内接種と経口感染)の違いによる可能性がある。

[山河芳夫、萩原健一; 佐藤由子、下ノ原望、飛梅実、佐多徹太郎(感染病理部); 小野文子(予防衛生協会);

寺尾恵司、柴田宏昭（基盤研 霊長類センター）]

（3）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

スクレーパー病原体 (Obihiro I 株) を接種したマウスの脳内プロテオーム解析を進め、CRMP-2 のC末端領域を欠失したアイソフォーム (CRMP-2- Δ C) が PrP^{Sc} の蓄積に伴って増加することを明らかにしてきた。今回、ノザンプロット分析を行った結果、CRMP-2- Δ C は遺伝子転写レベルでの alternative splicing ではなく翻訳後のタンパク質分解により生じると考えられる結果を得た。さらに、CRMP-2- Δ C、リン酸化型 CRMP-2 (不活性型)、非リン酸化型 CRMP-2 (活性型) を神経細胞 (初代培養) にそれぞれ強制発現させて比較したところ、CRMP-2- Δ C は非リン酸化型 CRMP-2 と同様に多分岐の神経突起を生じさせた。

[大内史子、萩原健一、山河芳夫]

（4）PrP^C→PrP^{Sc} 構造変換に関与する部位の探索

マウス・プリオンタンパク質 (moPrP) のオクタペプチドリピート近傍 (アミノ酸9残基) をニワトリ・PrP の対応配列で置換したキメラ PrP は、プリオン持続感染細胞 ScN2a に強制発現させても Proteinase K (PK) 抵抗性の PrP^{Sc} に変換されない。そこで、この9残基を置換した18種類の moPrP 変異体を作製し、PrP^{Sc} への変換に必要なアミノ酸を探索した。その結果、1残基の置換により PK 抵抗性が完全に消失することはなかったが、変換に重要な最小鎖長 (3残基) を同定した。この3残基を含む領域は PrP^{Sc} の構造中で PrP 分子間の相互作用に関わることが以前より示唆されており、興味深い。この領域に存在する荷電アミノ酸の静電的相互作用が構造変換に関与している可能性が考えられ、現在、その詳細を解析中である。

[原英之、中村優子、萩原健一]

（5）プリオンへの感染におけるガングリオシドの役割の解析

複合ガングリオシドの欠損がプリオン病の病態に如何なる影響を与えるかという点を検討するため、ガングリオシド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パー病原体 (Obihiro I 株) を脳内また

は腹腔内に接種し、観察を続けた。その結果、野生型マウスの潜伏期間と比較して、2系統のノックアウト・マウスでの潜伏期は同程度あるいはやや短期であることがわかった。GM2/GD2 合成酵素ノックアウトマウスでは、終末期の小脳顆粒細胞層の空胞化が目立った。

[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）ミエリン糖脂質の欠損マウスでのプリオン病の病態解析

ミエリンはガラクトシルセラミド (GalCer) などの糖脂質に富み、遺伝子改変により GalCer を欠くマウスはミエリン-軸索間の相互作用の異常をきたすことが知られている。プリオン感染動物では神経細胞から神経細胞へ軸索を經由して病原体が伝わり感染細胞が増大すると考えられているが、この過程でのミエリンの関与については不明な点が多い。そこでこの疑問に対するヒントを得るべく、GalCer合成酵素ノックアウト・マウスにスクレーパー病原体 (Obihiro I株) を接種し、現在、経過を観察中である。

[原英之、萩原健一、山河芳夫、大内史子、花田賢太郎]

（7）血液のプロテオーム解析のためのタンパク質の簡便な分画法と定量法の検討

アルブミンや免疫グロブリンなど血液に多量に常在するタンパク質群は、血液のプロテオーム解析の妨げとなる。本年度は、複数の抗体を充填した multi-affinity column (Proteome Lab: Beckmann) による常在タンパク質の除去と液相等電点電気泳動 (zoom IEF Fractionator) を組み合わせた血清タンパク質の簡便な分画方法を検討した。また、ペプチド C-末端 O¹⁸ 導入試薬 (Proteome Profiler O Enzymatic Labeling Kit: SIGMA) を用いるタンパク質の半定量法についても検討した。その結果、これらの方法は血清のプロテオーム解析に有効であることがわかった。

[大内史子、萩原健一、山河芳夫]

（8）異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の細胞間伝播におけるイノシトールリン脂質の役割の解明

イノシトールリン脂質群は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。我々はイノシトールリン脂質群の変動が PrP^{Sc} の細胞間伝播に及ぼす影響を解析する目的で、今年度は共培養系を用いて PrP^{Sc} を効率的に伝播する *in vitro* 実験系を開発した。本実験系では PrP^{Sc} 持続感染株 ScN2a 細胞から N2a 細胞への PrP^{Sc} 伝播が 7 日で検出可能である。現在はイノシトールリン脂質代謝酵素群を中心として様々なエフェクター分子群の発現・阻害を分子生物学的手法によって行い、これらが PrP^{Sc} 伝播に与える影響を検討している。

[田中正彦、前濱朝彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎]

II. オートファジーに関わる研究

(1) ヒトケラチノサイト形成におけるオートファジー因子 LC3-II の変化

ヒトにおいて、正常な表皮形成は感染症を含む様々な外界因子にたいする第 1 次生体防御に必須である。そこで、ヒト培養ケラチノサイトを用いて、ケラチノサイト成熟におけるオートファジー因子 LC3 の修飾について調べた。その結果、ケラチノサイトが成熟し、脱核していく過程で、LC3-II が著しく上昇している事が明らかになった。ヒト正常上皮組織と、乾癬患者上皮組織について、抗 LC3 抗体を用いた免疫染色をおこなうと、正常皮膚では顆粒層に LC3 が陽性となり、乾癬患者皮膚では、LC3 の量が著しく減少していた。

[春名邦隆、須賀康 (順天堂大院医)；谷田以誠、花田賢太郎]

(2) 新規カテプシン L 阻害剤のオートファジーにおける役割

カテプシンはリソソームにあるプロテアーゼであり、カテプシン B, D, L がリソソーム内タンパク分解をこなう。オートファジー誘導時にも最終段階でのタンパク分解にはこれらカテプシンが関与している。これまでカテプシン L に特異的な阻害剤がなく、カテプシン L によるオートファジーによるタンパク分解の寄与は不明であった。新規カテプシン L 阻害剤、CAA0225、を用いて、オートファジーのマーカータンパク質の分解に関与していることを示した。

[高橋 勝幸、上野 隆、木南英紀 (順天堂大院医)；谷田以誠]

(3) 腫瘍抑制因子 PTEN とオートファジーの解析

PTEN は腫瘍抑制因子であり、肝臓特異的 PTEN ノックアウトマウスは脂肪肝になり、最終的には腫瘍形成が促進される。HCV による脂肪滴の重要性、および C 型肝炎

炎による腫瘍形成機序を考えると PTEN 欠損による脂肪滴形成促進の機序を解明することは非常に意義深い。PTEN の下流には mTor キナーゼ、オートファジーが関与していることから、今回 PTEN ノックアウトによるオートファジー制御の破綻について解析した。その結果、PTEN 欠失肝細胞においてはオートファジーがおこらず、興味深いことに、オートファジーマーカーの LC3-II の脂質化は起こっていた。

[上野 隆、渡辺純夫、木南英紀 (順天堂大院医)；小松雅明 (臨床研)；谷田以誠]

I I I. 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) 志賀毒素耐性遺伝子に関する研究

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。前年度は HeLa 細胞を親株として志賀毒素に耐性を示す遺伝子のスクリーニングを行い、2 種類の耐性遺伝子を得ることに成功している。そのうち 1 つは複数回膜貫通タンパクの C 末端側をコードしており、今年度はさらにこの遺伝子の作用機構解明を進めた。この遺伝子は哺乳動物細胞においてホモログがいくつか存在し(ファミリーを形成)、それぞれ全長と C 末端をそれぞれ発現させたところ、いくつかの遺伝子あるいはその C 末端において Gb3 の合成低下とそれに伴う志賀毒素に対する耐性を示した。また Gb3 合成酵素の mRNA の低下は見られなかったことより、この作用点は転写以降であることが示唆された。

[山地俊之、花田賢太郎；西川喜代孝 (同志社大・生命医科学)]

(2) 局在プラズモン共鳴法による糖鎖と毒素の相互作用解析

局在プラズモン共鳴法 (localized surface plasmon resonance; LSPR) を用いた糖鎖と毒素との結合反応検出のモデル系としてグロボトリアオシルセラミド (Gb3) 型糖鎖と志賀毒素 B サブユニット (SLT-B) を用いて検証を行った。様々な条件を検討後、LSPR 解析で得られた Gb3 型糖鎖と SLT-B との Kd 値は、Biacore SPR 解析から得られた Kd 値と同じオーダーであった。よって、LSPR デバイスは糖鎖と毒素の相互作用を解析するのに有用と考えられる。

[今井智子、山地俊之、花田賢太郎；岩城正昭 (細菌第二部)]

2. C型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) HCV 粒子産生におけるオートファジーの関与

HCV 感染・粒子産生におけるオートファジーの関与について、解析をおこなった。HCV 感染後、オートファジーに必須の遺伝子、Atg7 および Beclin1、を RNAi 法でノックダウンしたところ、細胞外に放出された HCV 粒子の量が有意に減少していた。このときに、細胞内の HCV mRNA、NS5A、NS3、core 蛋白質の量、および細胞の生存率はノックダウン細胞とコントロール細胞で差がなかった。また、アルブミンの分泌にも影響がなかった。このことから、オートファジーは HCV 粒子のアセンブリあるいは産生に関与していることが示唆された。

[谷田以誠、深澤征義、花田賢太郎；脇田隆宇（ウイルス第二部）]

(2) HCV 感染細胞の脂肪滴へのオートファジー因子 LC3 の局在性について

オートファジーの際に、オートファゴソームに局在する LC3-II (LC3-リン脂質結合体) は、近年、脂肪滴にも局在することが報告された。HCV 感染した Huh-7 細胞においては脂肪滴形成がおこり、脂肪滴は HCV 粒子の感染性に関与する。オートファジー活性の減少が HCV 粒子産生を低下させることから、HCV 感染による脂肪滴に LC3-II が局在するかどうかを調べた。その結果、HCV 感染により LC3-II の形成は促進されるが、細胞内 LC3-II が脂肪滴、HCV core、NS5A いずれとも共局在しなかった。部分的な共局在の可能性があるので今後の検討を要する。

[谷田以誠、深澤征義、花田賢太郎；脇田隆宇（ウイルス第二部）]

(3) HCV に耐性を有する Huh7.5.1 由来細胞株の分離

HCV に高感染性を示す Huh7.5.1 細胞を親株として、HCV に感染しない宿主細胞変異株の分離を試みた。スクリーニングには、HCV (JFH1 株) の宿主細胞に対する細胞障害能を利用した。複数の株が樹立され、CD81 欠損株、claudin1 欠損株が含まれていることがわかった。また、欠損分子が未知のものも存在している。これら分離された HCV 非感染細胞株を詳細に解析することで、細胞内での HCV ライフサイクルに重要な新規宿主因子・メカニズムが明らかにされるものと考えている。

[深澤征義、花田賢太郎；西島正弘(医薬品食品衛生研)；鈴木哲朗、脇田隆宇（ウイルス第二部）]

(4) HCV 産生の高度不飽和脂肪酸酸化物による阻害

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、各種高度不飽和脂肪酸代謝物の効果を検討した結果、8,15-diHETE、11,12-EpETE 等が有意に HCV 産生を阻害することを見いだした。

[深澤征義、花田賢太郎；西島正弘(医薬品食品衛生研)；鈴木哲朗、脇田隆宇（ウイルス第二部）；有田誠(東大・薬)]

(5) スクワレン合成酵素を標的とした HCV 産生阻害

我々は、HCV の増殖過程におけるコレステロール生合成経路の重要性についての手がかりを得る目的で、コレステロール生合成系を担うスクワレン合成酵素 (SQS) の阻害剤が HCV の増殖に及ぼす効果を解析した。その結果、SQS 阻害剤が培養細胞における HCV の産生を有意に阻害することを見出した。SQS 阻害剤がどの HCV 増殖過程を阻害するのかについて、解析を進めている。[齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎；鈴木哲朗、相崎英樹、脇田隆宇（ウイルス第二部）；西島正弘（医薬品食品衛生研）]

(6) HCV NS4B 蛋白質発現誘導細胞の構築

HCV の NS4B 蛋白質は、ウイルス RNA 複製の場と考えられている membranous web という膜構造を誘導する蛋白質である。我々は、NS4B 蛋白質が membranous web を誘導する機構についての手がかりを得るために、同蛋白質に結合する細胞因子の同定を目指している。ドキシサイクリン発現誘導ベクターを用いて、HA タグを付加した NS4B 蛋白質(HA-NS4B)の cDNA を Huh7 細胞に導入した。発現が誘導された蛋白質を抗 HA 抗体により免疫沈降して質量分析を行い、HA-NS4B 蛋白質であることを確認した。今後、同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、大内史子、花田賢太郎]

I V. 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) mTOR 活性化制御機構の解明

細胞は外環境の変化、特に栄養素状態を感知して、変

化に応答した細胞機能の調節を行っている。mTOR は細胞の栄養素感知において重要な役割を担うキナーゼであるが、その活性制御機構には不明な点が多い。今回我々は遊離アミノ酸に反応した mTOR 活性化に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇およびカルモジュリンの存在が必須であることを見いだした。また、 Mn^{2+} および Zn^{2+} が細胞外栄養素に依存せずに mTOR を活性化すること、この mTOR 活性化がカルモジュリンに依存することを新たに見いだした。現在は、細胞外栄養素に反応した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の分子機構の解析および Ca^{2+} による mTOR 活性制御機構の解析を行っている。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

V. 細胞内セラミド輸送に関する研究

(1) CERT のリン酸化制御

セラミド輸送蛋白質 CERT は、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る。この現象はスフィンゴミエリン量を回復させるためのフィードバック機構であると理解されているが、その詳細については不明な点が多い。スフィンゴミエリナーゼ処理時に CERT の各種変異体のリン酸化状態を調べたところ、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) への結合能を欠いた G67E 変異体で、脱リン酸化が起こりにくくなっていることが判明した。また、この時、細胞内の PI4P の量は変動していなかった。CERT が脱リン酸化されるためには PI4P への結合能が必要であることが明らかとなった。

[熊谷圭悟、花田賢太郎]

(2) CKI γ 2 による CERT のリン酸化

小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送を担う蛋白質 CERT が、CKI γ 2 高発現 CHO 細胞では多重リン酸化状態になる。CKI はプライミングリン酸化を受けたセリン・スレオニン残基または酸性アミノ酸クラスターの 3 アミノ酸下流のセリン・スレオニン残基をリン酸化する。哺乳動物細胞で発現させ免疫沈降法で精製した CKI γ 2 およびプライミングリン酸化が起こると考えられるセリンをアスパラギン酸 3 つに置き換えた変異体 CERT を大腸菌で発現させ精製したものを ATP 存在下に保温すると CERT が効率よくリン酸化された。よって、CERT は CKI γ 2 の基質であると考えられた。

[富重斉生、花田賢太郎]

(3) CKI γ 2 のノックダウンと CERT のリン酸化

HeLa S3 細胞において、RNA 干渉法により内在性の

CKI γ 2 mRNA レベルを低下させると CERT の多重リン酸化型が低リン酸化型へと移行した。CKI γ 2 の他のアイソフォームである CKI γ 1 および CKI γ 3 のノックダウンでは CERT のリン酸化状態にほとんど変化がなかった。これらの結果から、CKI γ 2 は少なくとも HeLa 細胞において CERT の機能を負に制御する多重リン酸化に関わることが明らかとなった。

[富重斉生、花田賢太郎]

VI. インフルエンザ感染と抗炎症性脂質に関する研究

(1) n-3 脂肪酸がインフルエンザ感染に与える影響

炎症後期に n-3 系脂肪酸から合成される炎症性脂質メデイエーターには抗炎症的に作用する分子が多いことが知られている。線虫の fat-1 遺伝子を組み込んだトランスジェニック (TG) マウスは体内で n-3 脂肪酸が著しく増加するが、この TG マウスをインフルエンザウイルスに感染させ、通常マウスとの違いを解析した。通常マウスは感染 10 日目前後で回復を始めるが、TG マウスは回復することなく死亡した。過剰量の n-3 脂肪酸がインフルエンザウイルスの除去を妨げると推測された。

[熊谷圭悟、花田賢太郎；山本紀一(免疫部)；有田誠(東大・薬)]

VI I. 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： 平成 20 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日

検体数： ウシ 1 件 4 検体 (うち 0 検体陽性)

VI I I. 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 132 時間 (Voyager-DE STR) および約 144 時間 (AXIMA-QIT) であった。

[大内史子、山河芳夫、萩原健一、花田賢太郎]

発表業績一覧

I . 誌上发表

1 . 欧文発表

- 1) Okemoto-Nakamura, Y., Yamakawa, Y., Hanada, K., Tanaka, K., Miura, M., Tanida, I., Nishijima, M., Hagiwara, K.: A synthetic fibril peptide promotes clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation. *Microbiol. Immunol.* 52, 357-365, 2008
- 2) Masujin, K., Shu, Y., Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Sata, T., Matsuura, Y., Iwamaru, Y., Imamura, M., Okada, H., Mohri, S., Yokoyama, T.: Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2, 123-128, 2008
- 3) Katadae, M., Hagiwara, K., Wada, A., Ito, M., Umeda, M., Casey, P. J., Fukada, Y.: Interacting targets of the farnesyl of transducin γ -subunit. *Biochemistry* 47, 8424-8433, 2008
- 4) Takahashi, K., Ueno, T., Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Murata, M., Kominami, E.: Characterization of CAA0225, a novel inhibitor specific for cathepsin L, as a probe for autophagic proteolysis. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 475-479, 2009
- 5) Haruna, K., Suga, Y., Muramatsu, S., Taneda, K., Mizuno, Y., Ikeda, S., Ueno, T., Kominami, E., Tanida, I., Hanada, K.: Differentiation-specific expression and localization of an autophagosomal marker protein (LC3) in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 52, 213-215, 2008
- 6) Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E.: LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* 445, 77-88, 2008
- 7) Ueno, T., Sato, W., Horie, Y., Komatsu, M., Tanida, I., Yoshida, M., Ohshima, S., Mak, T.W., Watanabe, S., Kominami, E.: Loss of Pten, a tumor suppressor, causes the strong inhibition of autophagy without affecting LC3 lipidation. *Autophagy* 4, 692-700, 2008.
- 8) Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., and Hanada, K.: Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* 60, 511-518, 2008
- 9) Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T,

Nishijima M.: Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383, 319-327, 2009

- 10) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T.: Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 82, 5715-5724, 2008
- 11) Maehama, T., Tanaka, M., Nishina, H., Murakami, M., Kanaho, Y., and Hanada, K.: RalA functions as an indispensable signal mediator for the nutrient-sensing system. *J. Biol. Chem.* 283, 35053-35059, 2008
- 12) Tsuda, K., Furuta, N., Inaba, H., Kawai, S., Hanada, K., Yoshimori T., and Amano, A.: Functional analysis of $\alpha 5\beta 1$ integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. *Cell Struct. Funct.* 33, 123-132, 2008
- 13) Okemoto, K., Hanada, K., Nishijima, M., and Kawasaki, K.: The preparation of a lipidic endotoxin affects its biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1852-1954, 2008
- 14) Tomishige, N., Kumagai, K., Kusuda, J., Nishijima, M., and Hanada, K.: Casein kinase I $\gamma 2$ down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin. *Mol. Biol. Cell* 20, 348-357, 2009
- 15) Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Yamaji, T.: CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* in press

I I . 学会発表

1 . 国際学会

- 1) Ogawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Matsutani, M., Uchiyama, T., Hagiwara, K., Hanada, K., Kurane, I., and Kishimoto, T.: Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. 5th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, 2008.5.18-20, Marseille, France
- 2) Masujin, K., Shu, Y., Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Sata T., Matsuura, Y., Iwamaru, Y., Imamura, M., Kurachi, M., Shimizu, Y., Kasai, K., Okada, H., Mohri, S., Yokoyama, T.: Biological and biochemical characterization of L-type BSE prion detected in Japanese beef cattle. *Prion* 2008,

2008.10.8-10, Madrid, Spain

3) Furuoka, H., Horiuchi, M., Yamakawa, Y., Sata, T.:
Cerebellar pathology in guinea pig infected with bovine
spongiform encephalopathy. Prion 2008, 2008.10.8-10,
Madrid, Spain

4) Tanida, I., Yamasaki, M., Komatsu, M., Ueno, T.,
Kominami, E., Hanada, K.: New functional domain in an
autophagy-related E1-like enzyme, Atg7. 48th Annual
meeting of the American Society for Cell Biology, 2008.
12.13-19, San Francisco, CA, USA

5) Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y,
Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, and Nishijima M,
Mashino T: Anti-HCV activity of novel Fullerene Derivatives,
The 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and
Related Viruses, 2008.10.7, San Antonio, USA

6) Maehama, T.: Identification of a Ras-family GTPase as an
indispensable signal mediator for nutrient sensing and
mTORC1 activation, 8th International Conference on Protein
Phosphatases, 2008.11.12-14, Maebashi

2. 国内学会

1) 小川基彦、大内史子、内山恒夫、松谷峰之介、萩原健
一、花田賢太郎、倉根一郎、岸本寿男：Oreointia
tsutsugamushi発現蛋白質の網羅的同定、第15回リケッチ
ア研究会、2008. 11. 1-2、岐阜

2) 小川基彦、大内史子、内山恒夫、松谷峰之介、萩原健
一、花田賢太郎、倉根一郎、岸本寿男：Oreointia
tsutsugamushi発現蛋白質の網羅的同定、第56回日本ウイ
ルス学会、2008. 10. 26-28、岡山

3) 谷田以誠、山崎学、小松雅明、上野隆、木南英紀、花
田賢太郎：Novel essential domain of mammalian Atg7, an
E1-like enzyme, for autophagy. 第31回日本分子生物学
学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、
2008. 12. 9-12、神戸

4) 谷田以誠、山崎学、小松雅明、上野隆、木南英紀、花
田賢太郎：Amino-terminal domain in Atg7, an
autophagy-related E1-like enzyme essential for two
Atg-conjugations. The 15th Takeda Science Foundation
Symposium on Bioscience, 2008.12.2-3、東京

5) Ito, S., Ito, N., Tsuchida, A., Tokuda, N., Yagi, H., Kato, K.,
Mitsuki, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Crocker, P.R., and
Furukawa K. : Binding specificity of siglec-7 prepared from

various animal cell lines、第31回日本分子生物学学会年
会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 9-12、
神戸

6) 前濱朝彦: mTOR の制御に關与する新たな G タンパク
質の同定、第7回生命科学研究会、2008.5.29-30、大分

7) 前濱朝彦: 細胞の栄養素感知システムに關わるGサイ
クル制御因子、Gタンパク質特定領域・膜輸送複合体特
定領域合同若手ワークショップ2009、2009.1.29-31、神
戸

9) 花田賢太郎: セラミドの細胞内選別輸送、第19回フォ
ーラム・イン・ドージン、2008. 11. 28、熊本

10) 花田賢太郎: 脂質セラミドの細胞内選別輸送、順天
堂大学大学院・第25回環境医学研究所・第16回研究推進
委員会合同セミナー、2009. 3. 6、浦安