

## 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、オートファジーに関する研究、志賀毒素の受容体の発現制御に関する研究、細胞内脂質輸送に関する研究、細胞外遊離アミノ酸濃度変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究などで成果を挙げた。

培養細胞系でのC型肝炎ウイルス(HCV)感染において、オートファジーがHCV粒子のアセンブリまたは放出に関与することを示唆した。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がHCV産生を阻害することを見出した。Huh7.5.1細胞に対する感染価が従来のHCV JFH1株に比べて100倍程度高い亜型を見出し、その適応変異部位を明らかにした。

プリオン病に関する研究では、非定型ウシ海綿状脳症プリオン(L-type BSEプリオン)は従来型BSEプリオンとは異なり近交系マウスへの伝播が困難であるが、サルへの伝播・感染においてはL-type BSEプリオンのほうがむしろ早期の病態進行を示すことを明らかにした。また、マウスPrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup>変換に対するドミナント・ネガティブ効果を有するPrP<sup>C</sup>変異体を見いだした。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、薬事・食品衛生審議会臨時委員、また、(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) 近交系マウスへのウシ海綿状脳症(BSE)の伝達  
従来型C-type BSE(ウシJP6;1996年生とJP12;1999年生に由来)および非定型L-type BSE(JP24由来)プリオンについて、近交系マウスへの伝播実験を行った。3代伝播を経たC-type BSEプリオンは終末期が一定に収束し、マウス馴化株としてほぼ確立できたと考えられた。マウス馴化後の潜伏期、病理、PrP<sup>Sc</sup>の生化学的性状には誕生年コフォート間の差は認められなかった。一方、L-type BSEプリオンの初代伝播は、長期観察後も感染成立は確認できず、2代目に'blind passage'したマウスも接種後約1年経過したが感染・発症の兆候は無い。[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) 非定型L-type BSEの霊長類への伝播

L-type BSE(JP24由来)のヒトへのリスクを検討するため、当該ウシの脳乳剤をカニクイザルに脳内接種し、潜伏期間、発症経過などを従来型C-type BSEと比較した。その結果、2匹の接種サルは1.6、1.7年で行動異常や神経症状を呈し、0.4年の病期を経て起立不能となった。これはC-type BSEの潜伏期(2.3、2.3、3.7年)や病期(0.6、0.8、1.2年)に比べて顕著に短く、脳内接種法で比較するかぎりL-type BSEはC-type BSEより強毒性であることを示している。2匹のサルの(神経)症状として、驚愕反応は顕著では無く、末期の激しいミオクロームスが特徴的に観察された。[山河芳夫、萩原健一;小野史子(予防衛生協会);柴田宏昭・寺尾恵司(基盤研);黒澤明日香・佐藤由子・飛梅実・佐多徹太郎(感染病理

部]

(3) カニクイザルに伝播した非定型 L-type BSE プリオン  
の分布と病理解析

カニクイザルに伝播した L-type BSE プリオン (JP24  
由来) の特徴をウェスタンブロット法 (WB) および免疫  
組織化学法 (IHC) を用いて解析した。WB 解析では PrP<sup>Sc</sup>  
は中枢神経に局在し、その糖鎖型は JP24 の PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖  
型と酷似していた。IHC では、大脳および脳幹部におい  
て PrP<sup>Sc</sup> が拡散シナプス型の沈着を示し、小脳ではプラ  
ークあるいは顆粒状の沈着が顕著であった。プリオン病  
に特徴的な空胞変性は大脳から小脳まで広範囲に分布し  
たが、C-type BSE に感染した霊長類の大脳に特徴的に認  
められる花弁状沈着は L-type BSE 感染サルでは見られな  
かった。[山河芳夫、萩原健一；小野史子 (予防衛生協会)；  
柴田宏昭・寺尾恵司 (基盤研)；黒澤明日香・佐藤由子・  
飛梅実・佐多徹太郎 (感染病理部)]

(4) C末端欠失型 CRMP-2 の細胞内分布について

スクレーピー・プリオン (Obihiro I 株) に感染したマ  
ウスの脳内プロテオーム解析から、CRMP-2 の C 末端欠失型  
(CRMP-2-ΔC) が PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に伴い増加することを示し  
てきた。脳の発生過程ではある種の短鎖型 CRMP-2 が核内  
移行するという報告があるため、今回、CRMP-2-ΔC の C 末  
端欠失が細胞内局在に及ぼす影響について神経芽細胞腫  
(ScN2a) を用いて検討した。この細胞では内在性  
CRMP-2-ΔC は存在量が少なく、検出が困難である。そこ  
で CRMP-2-ΔC をプラスミドにより発現させたところ、内  
在性 CRMP-2 と同様に細胞質画分に検出され、C 末端欠失が  
CRMP-2-ΔC の細胞内局在を変化させる可能性は低いと考  
えられた。[大内史子、萩原健一、山河芳夫、原英之]

(5) PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup> 構造変換を抑制するプリオンタンパ  
ク質ドメインの解析

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<sup>Sc</sup> に変換されない。そこで、この 9 残基をそ  
れぞれアラニンに置換した moPrP 変異体を作製したとこ  
ろ、それ自身が PK 抵抗性の PrP<sup>Sc</sup> に変換されないだけ  
でなく、PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup> 変換に対するドミナント・ネガテ  
ィブ効果も有する 4 つの変異体を見いだした。これらの  
4 つの変異体の変異ドメインが、PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup> の変換過  
程にどのような役割を担っているのかについて、現在検  
討を加えている。[原英之、中村優子、萩原健一]

(6) 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

ガングリオシド生合成酵素遺伝子のノックアウト (KO)  
マウス 2 系統に対して Obihiro I 株を腹腔内接種し、複

合ガングリオシドの欠損がプリオン病の病態に与える影  
響を検討した。その結果、野生型マウスと比較して  
GM2/GD2 KO マウスでは終末期までの経日期間が顕著に縮  
まり、また終末期での小脳顆粒細胞層の空胞化が目立っ  
た。しかし、PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖型、脳の沈着部位には野生型  
マウスとの間に差は認められなかった [萩原健一、原英  
之、山河芳夫、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)]

(7) ガラクトシルセラミド欠損マウスでのプリオン病  
の病態解析

プリオン感染個体においては病原体プリオンが軸索・  
シナプスを經由してニューロン間を伝播すると考えられ  
ている。そこで、ミエリン・軸索形成に異常があるガラク  
トシルセラミド合成酵素ノックアウト (KO) マウスに  
Obihiro I 株を脳内接種し、軸索形成が健全な野生型マウ  
スとの比較を行った。その結果、KO マウスでは、野生型  
およびヘテロ型接合型マウスとは異なり、感染中期にお  
いて脳内の PrP<sup>Sc</sup> の蓄積がほとんど検出されなかった。ま  
たヘテロ型マウスが感染末期に至るまでの経過は、野生  
型よりも約 20 日長いことも明らかとなった。現在、その  
詳細を解析中である。[原英之、萩原健一、山河芳夫、大  
内史子、花田賢太郎]

(8) 血液のプロテオーム解析のための技術検討

血漿バイオマーカー探索のためのプロテオーム解析技  
術の検討を行い、抗体カラムによる常在タンパク質の一  
括除去や液相等電点電気泳動 (IEF) による粗分画が有効  
であることを示してきた。今年度は粗分画した試料中の  
タンパク質を LC-MS で同定するにあたり、直接 LC-MS で  
分析する方法と再電気泳動で高度分離後に in-gel 酵素  
消化を行った試料を用いる GeIC-MS 法を比較・検討した。  
その結果、いずれの方法でも血液中に 1 ng/μl 程度含ま  
れるタンパク質を同定できたが、病態依存的に血中に漏  
出すると考えられるタンパク質群 (~10 fg/μl) の解析  
には機器の高感度化と試料のさらなる濃縮が必要であっ  
た。[大内史子、萩原健一、山河芳夫]

(9) PrP<sup>Sc</sup> の細胞間伝播に関与する宿主因子の探索

共培養条件下において ScN2a 細胞から N2a 細胞への  
PrP<sup>Sc</sup> 細胞間伝播を検出するアッセイ系を用いて、伝播  
に関与する宿主因子の探索を行った。その結果、ARF フ  
ァミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質の構成的  
活性化型変異体の発現が PrP<sup>Sc</sup> 細胞間伝播を抑制するこ  
とを新たに見いだした。現在は、この宿主因子の PrP<sup>Sc</sup>  
細胞間伝播における作用機序の解析を行っている。[田中  
正彦、前濱朝彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎]

## II. 感染症とオートファジーに関わる研究

### (1) C型肝炎ウイルス(HCV)粒子産生におけるオートファジーの関与

HCV (JFH1 株)感染・粒子産生におけるオートファジーの関与について、オートファゴソーム膜形成に関わる鍵酵素 Atg7 および PI3 キナーゼ複合体のサブユニット Beclin1 に注目して解析をおこない、オートファジーは HCV 粒子のアセンブリあるいは放出に関与していることを示唆した。オートファジーを誘導する制御因子が HCV 産生に影響するかどうかを解析している。[谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇 (ウイルス第2部)、花田賢太郎]

### (2) クロロキン処理によるオートファジーの HCV 複製の影響

クロロキンは細胞内酸性コンパートメントの酸性化を阻害することで、オートファジーによる分解を阻害する。HCV サブジェノミックレプリコン細胞にクロロキン処理をしたところ、HCV レプリコンの発現レベルが低下した。また、オートファジー関連因子 *ATG7*、*ATG5*、*LC3* のノックダウンをおこなったところ、同様に HCV レプリコンの発現量が低下していた。[水井智和・山科俊平・上野隆・木南英紀・渡辺純夫 (順天堂大学) ; 谷田以誠]

## III. C型肝炎ウイルスに関する研究

### (1) C型肝炎ウイルスに非感染性の Huh7. 5. 1 細胞変異株の分離と性状解析

HCV に感染できない宿主肝細胞変異株の分離を昨年度に引き続き行った。昨年度の検討から、我々のスクリーニング系では CD81 欠損株が高頻度に分離されることがわかっていたので、それを避けるために、CD81 を過剰発現下でスクリーニングを行うなどの工夫を行った。複数の HCV 非感染株が樹立され、そのうちの一つはタイトジャンクション分子の細胞内局在に異常が見られた。タイトジャンクション形成と HCV 感染との関連が強く示唆され、さらに解析を進めている。

[深澤征義、白砂圭崇、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2部)]

### (2) HCV の細胞間感染における Claudin1 の重要性

昨年度までの研究により、ヒト肝細胞株 Huh7. 5. 1 細胞より CD81 欠損株、Claudin1 欠損株を分離し、HCV に全く感染しないことを示した。今回、これらの細胞変異株を用い、HCV 感染した野生株との共培養を行い細胞-細胞間の感染性を調べたところ、CD81 欠損株では感染が見られたが Claudin1 欠損株では感染が見られなかった。以上より、Claudin1 は細胞-細胞間感染にも必須の因子であることが示された。[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2部)]

### (3) 高感染性 HCV-JFH1 亜株の分離

C型肝炎ウイルス(HCV)-JFH1 株由来の野生型ウイルスゲノム RNA を Huh7. 5. 1 細胞に導入することで野生型 HCV-JFH1 ウイルス粒子を作成し、これを非感染 Huh7. 5. 1 細胞に感染後、その培養上清を繰り返し Huh7. 5. 1 細胞に感染させた。この過程で、ウイルス感染能が 100 倍以上上昇した HCV-JFH1 亜株が分離された。ゲノム配列を調べた結果、2ヶ所に変異が見られた。コア蛋白質部分の K74T 変異、及び E2 部分の I414T 変異であった。このウイルス亜株は、蛋白質レベルでもウイルス感染の検出が容易であり、様々なウイルス感染実験に有用である。[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎 ; 村上裕子・深澤秀輔 (生物活性物質部)、鈴木哲朗・脇田隆宇 (ウイルス第2部)]

### (4) Squalene synthase を標的とした C型肝炎ウイルス産生阻害

我々は、コレステロール生合成系において squalene synthase (SQS) に着目し、その阻害剤、YM-53601 を用いて HCV の増殖過程におけるコレステロール生合成系の重要性について解析を行った。HCV (JFH1 株)をヒト肝癌由来 Huh7. 5. 1 細胞に感染させた後、無血清培地で YM-53601 を添加したところ、ウイルス RNA の合成、ウイルス蛋白質の産生、培地へのウイルス粒子の放出が阻害された ( $IC_{50}$ :  $\sim 0.5 \mu M$ )。YM-53601 の抗 HCV 効果は、コレステロールに富む低密度リポ蛋白質を感染細胞の培地に添加すると消失した。また、siRNA の導入により感染細胞の SQS 発現量を低下させると、同様の HCV 増殖阻害が認められた。以上の結果から、コレステロール生合成系が、培養細胞における HCV の増殖に重要であることが示唆された。恐らく、細胞内コレステロール (あるいはその代謝物) の量が HCV 産生に影響を与えているものと考えられた。また、SQS 阻害剤は抗 HCV 薬の候補になり得る可能性が考えられた。[齊藤恭子、花田賢太郎、深澤征義 ; 鈴木哲朗・相崎英樹・脇田隆宇 (ウイルス第2部) ; 西島正弘 (医薬品食品衛生研) ]

### (5) C型肝炎ウイルス NS4B 蛋白質安定発現細胞の作製

HCV の NS4B 蛋白質は、ウイルスの 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。これまでのドキシサイクリン発現誘導系では NS4B 蛋白質の Huh7 細胞における発現が低く、細胞内での分布を確認できなかった。そこで、新たに NS4B 蛋白質の安定発現 Huh7 細胞

を作製したところ、十分な発現が得られ、web 様構造を確認できた。今後、この細胞を用いて同蛋白質に結合する細胞因子を生化学的に探索する。[齊藤恭子、深澤征義、大内史子、花田賢太郎]

#### (6) HCV 産生に PPAR $\gamma$ アゴニストが与える影響

PPAR $\gamma$  は多彩な機能をもつ転写因子であるが、その機能の一つに脂質代謝に関連する遺伝子群を制御することが挙げられる。HCV の産生において脂質代謝が重要な役割を果たしていることから、HCV と PPAR $\gamma$  の関連について検討した。Huh7.5.1 細胞を PPAR $\gamma$  アゴニストで処理したところ、HCV (JFH1) の増殖が抑制された。しかしながら、HCV の増殖を抑制する濃度では当該薬剤による細胞毒性が起きており、PPAR $\gamma$  アゴニストは HCV に対する抗ウイルス薬としては期待できないことが明らかになった。[熊谷圭悟、深澤征義、花田賢太郎]

### IV. スフィンゴ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。以前、志賀毒素による細胞死に対し耐性を示す遺伝子として、GRINA truncate form (GRINA-C) 及びこのホモログを同定しており、これらの過剰発現により志賀毒素受容体である糖脂質 Gb3 の低下を引き起こすこと、また Gb3 合成酵素の mRNA の低下は見られず、その作用点は転写以降であることをこれまで報告してきた。本年度さらにその詳細な作用機構解明を行ったところ、Gb3 合成酵素の蛋白レベルでの発現量が GRINA-C の発現により低下すること、その発現量はリソソーム酵素の阻害剤で元に戻ることを明らかにした。このことは GRINA-C の発現が Gb3 合成酵素の分解を促進していることを意味しており、糖転移酵素に関して mRNA 量に依らない新たな発現制御機構の可能性が示唆された。[山地俊之、花田賢太郎；西川喜代孝（同志社大・生命医学）]

#### (2) レンチウイルス shRNA ライブラリーによる志賀毒素関連因子の探索

上記の発現クローニング法、及び以前報告した遺伝子トラップ法に加え、今回新たにレンチウイルスによる shRNA ライブラリーを用いて、志賀毒素関連因子の探索を行った。レンチウイルス shRNA ライブラリーを HeLa 細胞に導入した後、志賀毒素に対し耐性を示す細胞群を回収し、挿入されているヘアピン配列のシーケンスを行ったところ、その中に志賀毒素受容体 Gb3 の生合成に必須なグルコシルセラミド合成酵素の配列が含まれていた。このことはスクリーニング系が機能していることを

示しており、志賀毒素のみならず他の病原体に対しても関連因子を同定するツールとして期待される。[山地俊之、花田賢太郎]

#### (3) セラミド輸送蛋白質 CERT のリン酸化状態の制御機構

細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理すると、セラミド輸送蛋白質 CERT の SR モチーフが脱リン酸化されて、CERT は活性化される。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、詳細についてはよく分かっていない。本年度は、SR モチーフとは異なるリン酸化サイトを同定し、更に、そのサイトのリン酸化が SR モチーフのリン酸化状態に影響を及ぼしていることを明らかにした。CERT のリン酸化状態は幾つかのリン酸化サイトが相互に影響を及ぼし合いながら制御されていると考えられる。[熊谷圭悟、富重斉生、花田賢太郎]

### 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応答して三量体型 GTP 結合タンパク質を介したホスホリパーゼ C の活性化および細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起こること、また細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が mTOR 活性化に必要であることを見いだした。現在は、GTP 結合タンパク質と共役していることが考えられる受容体の探索および Ca<sup>2+</sup>の作用機序の解明を行っている。

[前濱朝彦、花田賢太郎]

### VI. 行政検査

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）を行っているが、本年度は依頼がなかった。

### VII. 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 47 時間（Voyager-DE STR）および約 51 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]

## その他

(1) 感染研パンデミック検査関連ワーキンググループによる新型インフルエンザ A/H1N1 パンデミック対応 [前濱朝彦]

(2) 感染研パンデミック疫学関連ワーキンググループによる新型インフルエンザ A/H1N1 パンデミック対応 [谷田以誠]

(3) Interview-From Special Topics. *Science Watch*, Thomson Reuters, October, 2009.

トムソン・ロイター社の Essential Science Indicator という指標においてオートファジー研究で TOP10 にランクされたため、*Science Watch* 誌(Web Journal)でインタビューを受けた。

[谷田以誠]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Fukuda S., Iwamaru Y., Imamura M., Masujin K., Shimizu Y., Matsuura Y., Shu Y., Kurachi M., Kasai K., Murayama Y., Onoe S., Hagiwara K., Sata T., Mohri S., Yokoyama T., Okada H.: Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol.* 53, 704-707, 2009
- 2) Sato H., Kusumoto-Matsuo R., Ishii Y., Mori S., Nakahara T., Shinkai-Ouchi F., Kawana K., Fujii T., Taketani Y., Kanda T., Kukimoto I.: Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 525-530, 2009
- 3) Ogawa M., Shinkai-Ouchi F., Matsutani M., Uchiyama T., Hagiwara K., Hanada K., Kurane I., Kishimoto T.: Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 239-240, 2009
- 4) Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T.: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* 83, 5137-5147, 2009

- 5) Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., Hanada, K.: Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 5, 937-945, 2009
- 6) Kasai, M., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Seki, S., Ikeda, T., Mizuochi, T.: Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J. Immunol.* 183, 7278-7285, 2009
- 7) Mizui, T., Yamashina, S., Tanida, I., Takei, Y., Ueno, T., Sakamoto, N., Ikejima, K., Kitamura, T., Enomoto, N., Sakai, T., Kominami, E., Watanabe, S.: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol.* 45, 195-203, 2010
- 8) Fukasawa, M.: Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 355-359, 2010
- 9) Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Mogi, C., Kimura, T., Kurose, H., Tomura, H., and Okajima, F.: Role of Rap1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid-induced migration by isoproterenol in glioma cells. *Mol. Biol. Cell* 20, 5156-5165, 2009
- 10) Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Yamaji, T.: CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 684-691, 2009.
- 11) Momin, A. A., Park, H., Allegood, J. C., Leipelt, M., Kelly, S. L., Merrill, A. H. Jr., and Hanada, K.: Characterization of mutant serine palmitoyltransferase 1 in LY-B cells. *Lipids* 44, 725-732, 2009
- 12) Separovic, D., Kelekar, A., Nayak, A. K., Tarca, A.L., Hanada, K., Pierce, J. S., Bielawski, J.: Increased ceramide accumulation correlates with downregulation of the autophagy protein ATG-7 in MCF-7 cells sensitized to photodamage. *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 101-105, 2010
- 13) Nakamura, H., Wakita, S., Sunagami, A., Tamura, Y., Hanada, K., and Murayama, T.: Modulation of the activity of cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha) by cellular sphingolipids and inhibition of cPLA2alpha by sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 51, 720-728, 2010
- 14) Kudo, N., Kumagai, K., Matsubara, R., Kobayashi, S., Hanada, K., Wakatsuki, S., Kato, R.: Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer. *J. Mol. Biol.* 396, 245-251, 2010
- 15) Mitsuki, M., Nara, K., Yamaji, T., Enomoto, A., Kanno, M., Yamaguchi, Y., Yamada, A., Waguri, S., and Hashimoto,

Y.: Siglec-7 mediates nonapoptotic cell death independently of its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in monocytic cell line U937. *Glycobiology*. 20, 395-402, 2010

16) Sugiki, T., Takahashi, H., Nagasu, M., Hanada, K., and Shimada, I.: Real-time assay method of lipid extraction activity. *Anal. Biochem.* In press

## 2. 和文発表

1) 萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎：ヒト・プリオン病-感染症としての変遷と新たな課題. ウイルス 59,

155-166, 2009

2) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナル、細胞工学、28, 760-764, 2009

3) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナル-mTOR 活性化の分子機構一、アミノ酸研究、3, 5-14, 2009

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

1) Tanida, I.: Autophagy Basics -molecular mechanisms, functions, and dynamics International Conference on Autophagy and Cell Death, 2009. 7. 4. Tokyo, Japan.

2) Tanida, I.: Autophagy in Naive Hepatitis C Virus Production, 5th International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.

3) Ueno, T., Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Fujimura, T., Tanida, I., Furuya, N., Kominami, E.: Essential role of liver autophagy in maintaining blood glucose and plasma amino acids. 5<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.

4) Tanida, I., Koike, M., Tada, N., Iwata, J., Ueno, T., Uchiyama, Y., Kominami, E., Hanada, K.: Visualization of GABARAP in mice. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Cell Biology, 2009.12.8. San Diego, U.S.A.

5) Aizaki, H., Yamamoto, M., Goto, K., Fukasawa, M., Hanada, K., Sato, S., Takahashi, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. :The role of the host membrane in the infectious HCV particle formation, 2009.9.9, Awaji, Japan,

6) Fukasawa, M., Shirasago, Y., Hanada, K., Suzuki, T., Wakita, T., Nishijima, M.: Isolation of Huh7.5.1 cell mutants resistant to hepatitis C virus infection, 16h International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2009.10.3-7, Nice, France,

7) Aizaki, H., Yamamoto, M., Goto, K., Fukasawa, M., Hanada, K., Sato, S., Takahashi, N., Matsuura, Y., Miyamura,

T., Wakita, T., Suzuki, T.: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, 16h International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.10.3-7

8) Hanada, K.: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 4<sup>th</sup> International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), 2009, 5. 25-28, Tokyo, Japan

### 2. 国内学会

1) 小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫：病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の2次元電気泳動による比較・解析 第一報、第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、2009. 11、東京

2) 原英之、中村優子、萩原健一：Molecular mechanism for conformational change of PrP in prion infectivity. 日本分子生物学会 第32回年会、2009. 12. 9-12、横浜

3) 小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫：病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の2次元電気泳動による比較・解析、第83回日本細菌学会総会、2010. 3. 27-29、横浜

4) 高木美幸、浅沼克彦、谷田以誠、児玉史子、浅尾りん、高原久嗣、多田昇弘、小松雅明、上野隆、木南英紀、富野康日己：ポドサイトにおける GABARAP の役割の検討、日本腎臓学会学術総会、2009. 6. 3、横浜

5) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、上野隆、木南英紀、花田賢太郎：オートファジー関連遺伝子のノックダウンは HCV 粒子産生を抑制する。第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 23、神戸

6) 谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎：オートファジーは HCV 粒子産生に関与している。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009. 10. 25、東京

7) 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤 征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田 隆字、鈴木哲朗：HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009. 10. 27、東京

8) 深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎、鈴木哲朗、脇田 隆字、西島正弘：C型肝炎ウイルスに感染しないHuh7細胞株の分離と性状解析、第82回日本生化学会大会大会、2009. 10. 24、神戸

9) 齊藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義：Squalene synthaseを標的としたC型肝炎ウイルス産生阻害、第82回日本生化学会大会、

2009.10.24、神戸

10) 田丸友裕、森裕美子、笠原優子、深澤征義、下遠野久美子、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦：HCV-RNA ポリメラーゼ阻害活性を有するスルホンアミド型フラウレン誘導体、創薬懇話会 2009、2009.12.10、岐阜

11) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、花田賢太郎、西島正弘、深澤征義：C型肝炎ウイルス JFH1 株変異体におけるウイルス産生の上昇、日本薬学会第 130 年会、2010.3.30、岡山

12) 前濱朝彦：細胞外環境の変化に応答した mTOR 活性調節機構の解析、第 8 回生命科学研究会、2009.6.26-27、神戸

13) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナル mTOR 活性化の分子機構一、日本アミノ酸学会第 3 回夏のシンポジウム、2009.7.19、筑紫野

14) 田中正彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎、仁科博史、前濱朝彦：共培養系を用いた高効率な PrP<sup>Sc</sup> 伝播実験系の確立、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

15) 西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、鈴木聡：PTEN 結合分子 PICT1 の T 細胞分化における機能解析、第 71 回日本血液学会総会、2009.10.23-25、京都

16) 前濱朝彦：細胞外環境の変化に応答した mTORC1 活性調節機構の解析、第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2009.11.13-14、熊本

17) 前濱朝彦：mTORC1 活性化の分子機構一アミノ酸感知シグナル一、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12、横浜

18) 山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎：志賀毒素耐性遺伝子の単離 第 29 回日本糖質学会年会、2009.9.9-11、高山

19) 山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎：志賀毒素耐性遺伝子の単離、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

20) 富重斉生、熊谷圭悟、楠田潤、西島正弘、花田賢太郎：CKIgamma2 はセラミド輸送タンパク質を不活性化することでスフィンゴリエリン合成を負に制御する、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

21) 工藤紀雄、熊谷圭悟、松原亮介、小林修、花田賢太郎、若槻壮市、加藤龍一：脂質セラミド選別輸送タンパク質 CERT START ドメインと阻害剤 HPA の複合体の X 線結晶解析による脂質輸送機構の解明、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

22) 花田賢太郎、熊谷圭悟、富重斉生：スフィンゴリエリ

ン合成におけるセラミド輸送をカゼインキナーゼ I ガンマ 2 は負に制御する、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸