

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ポドミクスといった新しい手法も取り入れ、所内外の共同研究を活用しつつ、主に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。

本年度は、2019 年末に中国で発生して瞬く間にパンデミックとなった SARS-CoV-2 による新型肺炎 COVID-19 の対応に世界中が明け暮れた一年であった。この未曾有のパンデミックを収める切り札として特に期待されているのが mRNA 型ワクチンという新機軸のワクチンである。mRNA 自体は生体中で不安定な物質であるが、本ワクチンでは SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質をコードした mRNA を脂質ナノ粒子に抱かせることで安定化させ、かつ、細胞に取り込まれて発現しやすくなるように工夫されている。当研究部は長らく脂質関連の生化学的研究を行っていたこともあり、コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)の国家検定担当に本年度の途中から指定され、このワクチンの承認前検査のとりまとめも行った。

プリオンは、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の多量体(凝集体)から成る。非定型 H 型ウシ海綿状脳症プリオン(H-BSE プリオン)に罹患したウシの脳乳剤をヒト・モデルとしてのカンクイザルへ脳内接種あるいは経口投与後約 4 年間の観察期間を経て解析した結果、脳の各部位の異常型プリオン蛋白質は検出限界以下だった。H-BSE プリオンのカンクイザルへの伝播効率は、従来型 BSE (C-BSE) プリオンや非定型 L-BSE プリオンよりも低いと考えられる。また、異常型プリオンの持続感染が可能な培養細胞候補を見出した。一方で、偏性細胞内寄生細菌クラミジア・トラコマティスの封入体膜タンパク質 IncD と宿主セラミド輸送タンパク質 CERT との結合機序についても解析を進めた。また、スフィンゴ脂質生合成の初発酵素であるセリン・パルミトイル転移酵素活性を欠いた

HeLa 細胞変異株を無血清培地で培養する実験系を構築し、クラミジアなど病原体の宿主スフィンゴ脂質依存性を解析した。

ゲノム編集技術を活用した宿主細胞ゲノムワイドな遺伝子探索から志賀毒素などの感受性に必要な宿主遺伝子の同定と解析を昨年度までに進め、この方向性の研究は本年度も幅を広げつつ推進した。コレラ菌が生産する新たな病原性因子として注目されている cholix 毒素は真核生物伸長因子 eEF2 を ADP リボシル化してタンパク質翻訳を阻害する。本年度は、cholix 毒素の感受性に必要な宿主遺伝子候補を網羅的に見出した。一方で、CERT が小胞体—ゴルジ体膜接触部位で働くのに必要な遺伝子群の同定などにも成功した。また、特定の標的遺伝子に注目した解析から、種々の病原体の細胞感染における糖鎖、脂質輸送などの重要性も明らかにした。

アフリカミドリザル由来の Vero 細胞はワクチン生産用の細胞基材として汎用されている。我々はこれまでに、完全長で変異のないサル内在性レトロウイルス配列が Vero 細胞ゲノムに存在することを見出しており、本年度はその性状解析を行った。一方で、抗ウイルス化合物探索や宿主細胞の体細胞遺伝学的な解析に活用すべく樹立した、黄熱ウイルスワクチン株 (17D-204) 由来サブゲノミックレプリコンの複製が持続的に起こる Vero 細胞の性状解析も行った。

抗ヒト Occludin モノクローナル抗体を樹立し、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染を強力に阻止できることを培養細胞感染系、動物感染実験系で示してきた。本年度は、持続感染モデルにおける本抗体の効果を検討した。また、重症血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の細胞感染をコーヒー含有成分カフェ酸が阻害することについて構造活性相関解析を行い、カフェ酸の *o*-dihydroxybenzene 構造が重要であることを明らかにした。また、緑茶由来のいくつかのカテキン類、フラボノール類にも抗 SFTSV 活性があることを見出した。さらに、これらの化合物はウイルス粒子自体に作用して粒子構造を変化させ、その感染性を減弱させることを示唆した。

無染色・非侵襲的条件下での病原体感染細胞高解像度解析システムを構築する目的で、病原体観察に適したパーツ類を組み込んだセミオーダーメイドのアポダイズド位相差顕微鏡を細胞化学部 BSL2 実験室に設置した。さらに、Vero 細胞等の観察を通して顕微鏡本体および解析ソフトウェア等

の最適化を行った。

令和3年3月末をもって、部長の花田賢太郎と第一室長の萩原健一は定年退任となる。しばらくは続くであろう SARS CoV-2 mRNA ワクチンの国家検定業務への対応を最優先としながらも、4月以降も新部長のもとで可能な範囲で部員それぞれの研究活動も継続し、発展させてほしいと願っている。

業績

調査・研究

I. プリオン、ウイルス等病原体の研究

1. H 型 BSE プリオンに関する研究

非定型 H 型ウシ海綿状脳症プリオン(H-BSE プリオン)がウシからヒトへ伝播する可能性を推測するために、感染病理部および他機関との共同により、H-BSE プリオンに罹患したウシの脳乳剤をヒト・モデルとしてのカニクイザルへ脳内接種あるいは経口投与した。約4年間の観察期間を経たカニクイザルの各1個体を安楽殺に処し、プリオンの増殖・蓄積の有無を調べたところ、脳の各部位の異常型プリオン蛋白質は検出限界以下だった(細胞化学部はウエスタンブロット法による分析を担当)。プリオン病を疑う顕著な症状は、観察期間中に認められなかった。H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は、従来型 BSE(C-BSE)プリオンや非定型 L-BSE プリオンよりも明らかに低いと考えられた。[萩原健一; 飛梅実、佐藤由子(感染病理部); 大藤圭子、中野望(予防衛生協会); 柴田宏昭、小野文子(岡山理科大)]

2. CERT PH ドメインとクラミジア IncD タンパク質との相互作用に関する研究

クラミジア・トラコマティスは宿主細胞内に封入体と呼ばれる寄生胞を形成し、その内部で増殖する。クラミジア・トラコマティスの増殖には宿主由来するセラミドが必要であり、そのセラミドは封入体膜に局在化させられた宿主細胞のセラミド輸送タンパク質 CERT によって輸送されている。CERT の局在化は CERT PH ドメインとクラミジアの IncD タンパク質との結合によって誘導される。我々は NMR 解析を用いて、IncD の共存によってケミカルシフト値の摂動が生ずる CERT PH ドメイン上のアミノ酸を突き止めていた。摂動の大きさを元に上位3つのアミノ酸を選び出し、CERT の PH ドメインと類似性の高い OSBP の PH ドメインの相当するアミノ酸に置換した所、IncD との結合が有意に損なわれた。しかしながら、それらのアミノ酸をアラニンに置換した時には結合が損なわれなかった。CERT PH ドメインと IncD との結合を構造学的に説明するのは容易でないと予想され、現在、結合に関与する位置とアミノ酸の種類について、更なる絞り込みを進めている。[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)]

II. 感染症に関わる宿主細胞因子の研究

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と解析

以前 HeLa 細胞及び Vero 細胞亜株(Vero C1008、別名 Vero E6)細胞において、レンチウイルス CRISPR ノックアウト(KO)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を同定している。本年度は、Vero C1008 細胞を用いたスクリーニングで特異的に同定された遺伝子 *SYS1* に関して、Vero C1008 KO 細胞を用いて作用機構の解析を行った。*SYS1* の欠損によって、志賀毒素受容体である糖脂質 Gb3 を含め、糖鎖生成に不全が見られた。ゴルジ体の形状変化が見られたことより、ゴルジ体周辺での輸送不全により糖鎖生成が影響していると考えられた[山地俊之、森本貫太、花田賢太郎]

2. Cholix 毒素に関する宿主因子探索のためのゲノムワイドスクリーニング

コレラ菌(*Vibrio cholerae*)のうち血清型 O1 及び O139 はコレラ毒素を産生するが、近年 Non-O1/O139 のコレラ菌が慢性肝疾患を有する患者に重篤な敗血症を引き起こすことが明らかとなった。その新たな病原性因子として真核生物の伸長因子2(eEF2)のADPリボシル化を触媒する cholix 毒素が同定された。本研究では CRISPR ゲノムワイドスクリーニングにより、遺伝子破壊で cholix 毒素による細胞死に耐性を示す因子の探索を行った。その結果 cholix 毒素に関与する複数の宿主遺伝子候補の同定に成功した。[山地俊之; 八尋錦之助(千葉大)]

3. 病原性抗酸菌の表面糖鎖と免疫細胞の貪食・食胞形成機構の関係を解明するための遺伝子改変細胞樹立と解析

結核菌や病原性を有する非結核性抗酸菌は細胞壁の成分として、病原性抗酸菌特有のマンノース付加リポアラビノマンナン(ManLAM)を有する。マクロファージ様細胞株 THP-1 において、貪食受容体の1つ CD11b(Mac1)の遺伝子ノックアウト細胞を樹立し、貪食能への影響を解析した。その結果少なくともマクロファージ様に分化させた THP-1 において、CD11b が ManLAM 依存的な貪食における主要な受容体であることを明らかにした。[山地俊之; 岩淵和久、中山仁志(順天堂大)]

4. ノロウイルス感染を目指した培養細胞における血液型糖鎖抗原発現細胞の樹立

ノロウイルスは様々な遺伝子型が存在するが、多くの型は腸管上皮細胞に発現している ABO 式及びルイス式血液型糖鎖抗原に結合することが知られている。また疫学調査及びボランティア感染実験により血液型糖鎖発現

と感染率に相関のあることが報告されている。ただし、これら血液型糖鎖抗原が実際受容体として機能するかについては未だ解明されていない。この疑問を解明するため、汎用の培養細胞に種々の糖転移酵素を過剰発現、あるいは遺伝子破壊することで、様々なタイプの血液型糖鎖抗原発現細胞の作製を開始した。[山地俊之;染谷雄一(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維持する Vero 細胞の性状解析

YFV (17D-204) 由来サブゲノミックレプリコンの複製が持続的に起こる Vero 細胞 (レプリコン細胞) 2 種の性状解析を行った。レプリコン細胞における持続的複製は一過的な複製に比べて、インターフェロン等の複製阻害薬物の感受性が低下していた。そこで、当該細胞からレプリコン cDNA を調製し、次世代シーケンズ解析を行って変異の有無を調べた。その結果、検出されたバリエーションは 1 種の細胞の 1 箇所のみで、その他の低頻度のバリエーションも含め、2 種の細胞に共通する変異はなかった。従って、レプリコンの薬剤感受性の低下は、それ自体の変異によるものではないと示唆された。[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. サル内在性レトロウイルスの性状解析

アフリカミドリザル由来の Vero 細胞はワクチン基材として汎用される細胞である。我々はこれまでに、完全長で変異のないサル内在性レトロウイルス (SERV) 配列が Vero 細胞ゲノムに存在することを見出し、その性状解析を行った。SERV の一つをクローニングし、HEK293FT 細胞に導入したところ、細胞内外に SERV 転写産物が検出された。この結果から SERV 配列が転写能・粒子産生能を持つ可能性が考えられた。[齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎;佐久間智理(細菌第一部)]

7. NPC1 KO 細胞の脂質解析

これまでに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、NPC1 KO 細胞を各種細胞株から樹立することに成功している。NPC1 分子はエボラウイルス、マールブルグウイルスの感染に必須の宿主因子であることが知られているが、生理的機能としては、細胞内のコレステロール輸送に関与し、脂質膜環境の恒常性維持に寄与している。親細胞、ノックアウト細胞、NPC1 cDNA 戻し細胞を用いて、主要リン脂質、主要スフィンゴ脂質をマスマスペクトロメトリー法で解析した。その結果、NPC1 KO 細胞におけるコレステロールやスフィンゴミエリンの蓄積が見られたが、スフィンゴ糖脂質については、細胞によって蓄積のパターンが異なることがわかった。[鈴木建、酒井祥太、白砂圭崇、深澤征義]

8. リン酸化を介した CERT 機能抑制機序の研究

小胞体で新規合成されたセラミドはセラミド輸送タンパク質 CERT によりゴルジ体へと輸送され、スフィンゴミエリンに代謝される。CERT の N 末には phosphatidylinositol 4-monophosphate (PI4P) 結合能を有する pleckstrin homology (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-repeat 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 末領域の START ドメインの持つ膜間セラミド輸送活性が同時に抑制される。多重リン酸化 SRM 依存性の抑制制御が CERT 分子内のコイルドコイル様領域 (CCR) への変異導入により不全となることを見出し、分子内相互作用により CERT コンフォメーションが大きく変化して PH ドメインと START ドメインがお互いマスクするというモデルが支持された。また、CCR 領域への変異導入が、CERT オリゴマー体を不安定化することを見出した。[後藤麻子、熊谷圭悟、花田賢太郎]

9. CERT 機能の抑制制御に関わるカゼインキナーゼ1 γ の研究

SRM の多重リン酸化を担うキナーゼであるカゼインキナーゼ1 γ の細胞内局在制御の仕組みを解析し、本キナーゼの細胞内コンパートメント化が CERT のリン酸化依存的な活性制御に重要であることを示した。[後藤麻子、水池彩、山地俊之、花田賢太郎]

10. CERT 機能場である小胞体—ゴルジ体膜接触ゾーン形成に関する研究

CERT が適切に機能するために必要な因子を網羅的に見出すため、スフィンゴミエリン結合性細胞毒ライセニンへの耐性を HeLa 細胞に与えることを指標にしてゲノムワイドスクリーニングを実施し、複数のカテゴリーに分類される候補遺伝子を昨年度までに得ていた。今年度は、ゴルジ体上での PI4P 生産に関わる3つの因子 PI4KB, ACBD3, C10orf76 に注目し、これら因子をコードする遺伝子 KO 細胞を用いた解析を進めた。PI4KB が生産する PI4P は CERT のゴルジ体結合に必須であることを明らかにした。そして、超解像顕微鏡観察などから、ACBD3, C10orf76 はゴルジ体の中で異なる領域に局在して、それぞれ当該領域に PI4KB をリクルートすることを明らかにした。[水池彩、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎;加藤薫(産業技術総合研究所)]

11. 高浸透圧ストレスにより誘導される CERT のリン酸化

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。その際、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、セラミド輸送機能は更に上昇する。今回、CERT の S315 部位のリン酸化が高浸透圧ストレスにより顕著に亢進すると、VAP との相互作用がリン酸化依

存的に増強することを見出した。さらに、proximity ligation assay により細胞内における CERT-VAP 間相互作用形成領域を解析し、高浸透圧ストレス誘導時には CERT は VAP との結合を介して小胞体全域に係留されていること、を明らかにした。[島崎健太郎、熊谷圭悟、花田賢太郎]

12. スフィンゴ脂質欠失細胞の樹立と性状解析

以前に当研究部で作成された、スフィンゴ脂質合成の律速酵素であるセリン・パルミトイル転移酵素 (serine palmitoyltransferase; SPT) のサブユニットを欠損させた HeLa 細胞 (SPTSSA KO 細胞) を用いて、内因性のスフィンゴ脂質を欠失させた細胞を作出した。当部ではこれまでに感染時に宿主細胞のスフィンゴ脂質を利用する病原体を見出しており、その中でクラミジア・トラコマティスの感染実験を本スフィンゴ脂質欠失細胞を用いて行った。血清含有条件では、親株および SPT 欠損細胞どちらにおいても感染増殖した。この結果は、血清由来のスフィンゴ脂質を用いて宿主細胞がスフィンゴ脂質を合成することから、予想通りの結果であった。一方、無血清培地で培養し無血清培地で感染実験を行ったところ、親株と比べて SPT 欠損細胞では明らかにクラミジアの感染増殖が抑制されていた。しかしながら、SPT KO 細胞に感染させたクラミジアは親株由来と同程度の二次感染能を示した。CERT 遺伝子を欠失させると感染増殖不能になることから、CERT はクラミジアの感染増殖に必須であると考えられるが、クラミジアは CERT のセラミド輸送能とは他の機能を利用している可能性が推察された。[酒井祥太、熊谷圭悟、花田賢太郎]

III. 感染症対策に資する培養細胞の研究

1. プリオンの持続感染が可能な培養細胞の探索

マウス神経芽細胞腫に由来する N2a 細胞は、マウスへ馴化したスクレイピー・プリオンが持続感染できる有用な細胞である (Butler ら、*J Virol*, **62**: 1558 (1988))。しかし、N2a 細胞に持続感染できるプリオン株の種類は限られており、例えば BSE プリオンの持続感染はこれまで成功していない。特に、カンクイザルに馴化した BSE プリオンは霊長類のプリオン株として貴重な研究資源であるが、持続感染できる培養細胞はこれまでに知られていない。今回、各種の細胞株を探索した結果、カンクイザルのプリオン蛋白質遺伝子を導入したヒト神経芽細胞腫由来の細胞においてサル馴化 C-BSE プリオンの持続感染・増殖が可能であることを見出した。[萩原健一]

2. ポリオ根絶グローバル・アクション・プランに資するポリオウイルス非感受性 Vero 細胞株の作製

ポリオ根絶を目指し WHO が策定した行動計画 (Global Action Plan, 3rd edition; GAPIII) への対応を念頭に、ポリオウイルス受容体 (PVR) を欠損させた Vero 細胞由来の新規細

胞株を樹立した。すでにポリオウイルス (PV) 非感受性であることを確認していたが、アフリカミドリサル腎臓から樹立された Vero 細胞は広汎なウイルスに対して高感受性を示すことが知られており、PVR 欠損 Vero 細胞についてもウイルス高感受性を維持していることが期待された。そこで、風疹ウイルス、麻疹ウイルスおよび日本脳炎ウイルスに対する感染実験を行い、いずれのウイルスに対しても親株 Vero 細胞と同等の高感受性を示すことを確認した。かつての、あるいは今日の PV 流行地域で採取された検体等を取り扱う際、PVR 欠損 Vero 細胞株を用いることにより PV を意図せず増殖させてしまうリスクを回避し、PV 保管施設関連での PV 拡散リスクを最小限に抑えることが可能である。以上の成果は誌上発表した。[中村優子、齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎; 染谷健二、竹田誠 (ウイルス第三部)]

IV. 抗病原体作用物質に関する研究

1. C 型肝炎ウイルス持続感染モデルによる抗 Occludin 抗体の効果

抗ヒト Occludin モノクローナル抗体を樹立し、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染を強力に阻止できることを培養細胞感染系、動物実験系で示してきた。今回は、持続感染モデルにおける抗 Occludin 抗体の効果を検討した。その結果、培養細胞感染系において、抗 Occludin 抗体の持続的処理により、コントロール抗体に比べ有意に HCV 量が低下することがわかった。さらに、ヒト肝キメラマウスを用いた HCV 持続感染系においても、血中ウイルス量が抗 Occludin 抗体投与により有意に低下することもわかった。これらのことから、HCV 持続感染状態においてもウイルス受容体をブロックすることで、ウイルス量を低下させることができることが示された。すなわち、持続感染の維持には侵入過程を含めたウイルスライフサイクルが回ることが重要であることが強く示唆された。[深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、鈴木建; 近藤昌夫、八木清仁 (阪大薬)]

2. 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 (SFTSV) 感染阻害メカニズムの解析

これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー抽出物カフェ酸に重症血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) 感染を阻害する活性があることを見出し、その阻害メカニズムの解析から、カフェ酸は主に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を示してきた。カフェ酸処理ウイルス粒子の電子顕微鏡観察より、ウイルスのスパイク構造が有意に乱れていることが観察され、このことが感染能を失う一つの原因になっていることが考えられた。カフェ酸による SFTSV 感染阻害の分子基盤をさらに解析するために、各種カフェ酸類縁体の抗 SFTSV 効果を検討した

結果、感染阻害には、少なくとも *o*-dihydroxybenzene 構造が重要であることが明らかとなった。[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎;小川基彦、下島昌幸、西條政幸(ウイルス第一部);谷田以誠、角田宗一郎、内山安男(順天堂大医)]

3. 緑茶由来フラボノイド類の重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)に対する抗ウイルス活性

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重症血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染を阻害する活性があることを見出している。そこで、他の天然化合物についても抗 SFTSV 活性を検討した結果、緑茶由来のいくつかのカテキン類、フラボノール類が抗 SFTSV 活性を示すことがわかった。特に、エピガロカテキンガレートとエピガロカテキンが強い感染阻害活性を示した。これらは、少なくとも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。SFTSV 感染阻害の分子基盤をさらに解析するために、各種類緑体の抗 SFTSV 効果を検討した結果、感染阻害には、少なくとも 1,2,3-trihydroxybenzene 構造が重要であることが明らかとなった。[深澤征義;小川基彦、下島昌幸、西條政幸(ウイルス第一部)]

4. CERT 阻害剤の立体異性体による未知のメカニズムを介した抗クラミジア活性の発見

我々が開発した CERT に対する各種阻害剤、および、その立体異性体がクラミジア・トラコマチスの増殖に与える影響について調べたところ、これらの化合物の抗クラミジア活性は概ね CERT 阻害活性の強さと相関していたが、興味深いことに、ある化合物の立体異性体は CERT への阻害活性をほとんど示さないにも関わらず、クラミジアの増殖を顕著に抑制することが分かった。検討を行った結果、この化合物がクラミジアの特定の酵素反応を抑制していることが判明した。当該化合物およびその立体異性体による酵素反応の抑制は抗クラミジア活性とよく相関しており、これらの化合物はこの酵素を阻害することによって抗クラミジア活性を発揮していると考えられた。[熊谷圭悟、花田賢太郎;小林修(東京大学)]

V. その他の研究

1. 精神発達遅滞の原因と示唆されている *CERT1* 変異の解析

常染色体ドミナント遺伝性の精神発達遅滞の原因変異の一つに CERT をコードする遺伝子 *CERT1* 上のミスセンス変異が日欧米で報告されており、この変異は CERT SRM の多重リン酸化を介した機能抑制制御の不全を導くと推定されている。この度、スペイン国の精神発達遅滞患者の全エクソーム解析により *CERT1* 上の新規変異が見出されたが、この変異は健常な親にも存在することから原因変異でないことが分

かった。当該変異や他の既知変異が CERT の性状に及ぼす影響を比較したところ、精神発達遅滞の原因変異の場合は CERT SRM 領域以外での変異でも機能抑制不全という共通する事象を導くことを見出した。[田村律人、酒井祥太、後藤麻子、水池彩、花田賢太郎;Juan Darío Ortigoza-Escobar(スペイン国サンファンデディオ病院)]

2. アポダイズド位相差顕微鏡による無染色生細胞イメージングの至適化

無染色・非侵襲的条件下での病原体感染細胞高解像度解析システムを構築する目的で、病原体観察に適したパーツ類を組み込んだセミオーダーメイドのアポダイズド位相差顕微鏡を細胞化学部 BSL2 実験室に設置した。さらに、Vero 細胞等の観察を通して顕微鏡本体および解析ソフトウェア等の至適化を行った。[中村優子、島崎健太郎、齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎;加藤薫(産総研)]

3. アポダイズド位相差像におけるオルガネラの同定

アポダイズド位相差顕微鏡システムを用いて HeLa 細胞の無染色生細胞観察を行ったところ、従来の位相差顕微鏡よりも格段に高い解像度で種々の細胞内オルガネラを観察できた。また経時的な観察から、オルガネラの動態を詳細に捉えることもできた。オルガネラ蛍光標識ベクターを利用して主要なオルガネラを同定し、個々のオルガネラ位相差像の特徴付けを行った。[島崎健太郎、中村優子、齊藤恭子、花田賢太郎;加藤薫(産総研)]

4. 感染早期判別系構築のための AI 学習教師画像の取得

産総研の AI 技術を活用し、イメージングにより早期にウイルス検出・定量を可能とする系を構築することを目的に、コロナウイルス OC43 株、黄熱ウイルス 17D 株、日本脳炎ウイルスのブランク形成過程の画像を取得した。AI 学習の教師画像とするために、これらのデータを産総研に提供した。[齊藤恭子、中村優子、花田賢太郎;加藤薫、光山統泰(産総研)]

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)を通年維持した。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 食品監視安全課へ報告した(令和2年10月、令和3年3月実施)。[萩原健一、中村優子]

サーベイランス業務

I. 新型コロナウイルスの PCR 行政検査および地方自治体への新型コロナウイルスの PCR 検査技術対応

所内の新型コロナウイルスの PCR 行政検査対応チームの一員として、PCR 行政検査を行うとともに、地方自治体の PCR 検査に対する技術支援等も行った。[齊藤恭子、深澤征義]

品質管理に関する業務

I. 新型コロナウイルスワクチンに対する承認前検査と検定検査

1. ファイザー社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン (SARS-CoV-2) の承認前検査

新型コロナウイルス感染症に対して米国・ファイザー社とドイツ国・ビオンテック社が共同開発した mRNA 型ワクチンの日本での製造販売承認申請が日本ファイザー株式会社からされたことに伴い、製剤担当部として、他部との連携を図り、承認前検査のとりまとめを行った。[深澤征義、萩原健一、齊藤恭子、中村優子、山地俊之、熊谷圭悟、酒井祥太、花田賢太郎；白戸憲也、松山州徳、竹田誠(ウイルス第三部)；楠英樹、谷生道一、浜口功(ウイルス第三部)；佐々木裕子、見理剛、柴山恵吾(細菌第二部)；寺原和孝、高橋宜聖(免疫部)；石井孝司(品質保証・管理部)]

2. 武田薬品工業社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン (SARS-CoV-2) の承認前検査

新型コロナウイルス感染症に対して米国・モデルナ社が開発した mRNA 型ワクチンの日本での製造販売承認申請が武田薬品工業株式会社からされたことに伴い、製剤担当部として、他部との連携を図り、承認前検査のとりまとめを行った。[山地俊之、中村優子、酒井祥太、熊谷圭悟、深澤征義、萩原健一、花田賢太郎；白戸憲也、松山州徳、竹田誠(ウイルス第三部)；楠英樹、谷生道一、浜口功(ウイルス第三部)；佐々木裕子、見理剛、柴山恵吾(細菌第二部)；寺原和孝、高橋宜聖(免疫部)；石井孝司(品質保証・管理部)]

3. ファイザー社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン (SARS-CoV-2) の国家検定

令和 3 年 2 月 14 日付けで日本での製造販売承認がされたファイザー社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン (SARS-CoV-2) の国家検定として製造・試験記録等要約書 (Summary Lot Protocol; SLP) 審査をした。[深澤征義、萩原健一、齊藤恭子、中村優子、山地俊之、熊谷圭悟、酒井祥太、花田賢太郎]

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 食品監視安全課 牛海綿

状脳症の検査に係る専門家会議委員[萩原健一]

3. 内閣府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. 農林水産省食料・農業・農村政策審議会臨時委員[中村優子]

5. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員(日本薬局方部会員)[深澤征義]

6. 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所横断的な共同研究を開始した。[酒井祥太、花田賢太郎]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) [Saito K](#), [Fukasawa M](#), [Shirasago Y](#), Suzuki R, Osada N, [Yamaji T](#), Wakita T, Konishi E, [Hanada K](#). Comparative characterization of flavivirus production in two cell lines: Human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 and African green monkey kidney-derived Vero. *Plos One*, 15, e0232274, 2020.
- 2) Kawamoto M, [Yamaji T](#), [Saito K](#), [Shirasago Y](#), Satomura K, Endo T, [Fukasawa M](#), [Hanada K](#), Osada N. Identification of characteristic genomic markers in human hepatoma Huh7 and Huh7.5.1-8 cell lines. *Front. Genet.*, 11, Article 546106, 2020. (K.H. and N.O. are co-correspondence)
- 3) Gewaid H, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, [Sakai S](#), [Kumagai K](#), [Yamaji T](#), [Fukasawa M](#), Kato F, Hishiki T, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, [Hanada K](#), Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Sphingomyelin is essential for the structure and function of the viral RNA replication factories, double-membrane vesicles. *J. Virol.*, 94, e01080-20, 2020.
- 4) Ogawa M, Shimojima M, Saijo M, [Fukasawa M](#). Several catechins and flavonols from green tea inhibit severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in vitro. *J. Infect. Chemother.*, 27, 32-39, 2021.
- 5) [Shimizu Y](#), Shinoda T, [Shirasago Y](#), Kondoh M, Shinya N, [Hanada K](#), Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Kimura-Someya T, Shirouzu M, [Fukasawa M](#). Occludin-binding

- single-chain variable fragment and antigen-binding fragment antibodies prevent hepatitis C virus infection. FEBS Lett., 595, 220-229, 2021.
- 6) Ogawa M, Shirasago Y, Tanida I, Kakuta S, Uchiyama Y, Shimojima M, Hanada K, Saijo M, Fukasawa M. Structural basis of antiviral activity of caffeic acid against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. J. Infect. Chemother., 27, 397-400, 2021.
- 7) Morimoto K, Suzuki N, Tanida I, Kakuta S, Furuta Y, Uchiyama Y, Hanada K, Suzuki Y, Yamaji T. Blood group P1 antigen-bearing glycoproteins are functional but less efficient receptors of Shiga toxin than conventional glycolipid-based receptors. J. Biol. Chem., 295, 9490-9501, 2020.
- 8) Murakami H, Tamura N, Enomoto Y, Shimasaki K, Kurosawa K, and Hanada K. Intellectual disability-associated gain-of-function mutations in *CERT1* that encodes the ceramide transport protein CERT. PLoS ONE, 15, e0243980, 2020. (H.M. and N.T. are co-first authors. K.K. and K.H. are co-correspondence)
- 9) Rizzo R, Russo D, Kurokawa K, Sahu P, Lombardi B, Supino D, Zhukovsky M, Vocat A, Pothukuchi P, Kunnathully V, Capolupo L, Boncompain G, Vitagliano C, Marino FZ, Aquino G, Montariello D, Henklein P, Mandrich L, Botii G, Clausen H, Mandel U, Yamaji T, Hanada K, Budillon A, Perez F, Parashuraman S, Hannun YA, Nakano A, Corda D, D'Angelo G and Luini A. Golgi maturation-dependent glycoenzyme recycling controls glycosphingolipid biosynthesis and cell growth via GOLPH3. EMBO J., 40, e107238, 2021.
- 10) Goto A, Mizuike A, and Hanada K. Sphingolipid metabolism occurring at the ER-Golgi contact zone and its impact on membrane trafficking, CONTACT, 3,1-13, 2020. (invited review article) (A.G. and A.M. are co-first authors)
- 11) Yamaji T. Preparation of Fluorescent Recombinant Shiga Toxin B-Subunit and its Application to Flow Cytometry. Methods Mol. Biol., 2132, 463-474, 2020.
- 12) Farabi K, Manabe Y, Ichikawa H, Miyake S, Tsutsui M, Kabayama K, Yamaji T, Tanaka K, Hung S-C, Fukase K. Concise and reliable syntheses of glycodendrimers via self-activating click chemistry: robust strategy for mimicking multivalent glycan-pathogen interactions. J. Org. Chem., 85, 16014-16023, 2020.
- 13) Akiyama H, Ide M, Yamaji T, Mizutanii Y, Niimi Y, Mutoh T, Kamiguchi H, Hirabayashi Y. Galabiosylceramide is present in human cerebrospinal fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 536, 73-79, 2021.
- 14) Okemoto-Nakamura Y, Someya K, Yamaji T, Saito K, Takeda M, Hanada K. Poliovirus-nonsusceptible Vero cell line for the World Health Organization global action plan. Sci. Rep. 11, Article 6746, 2021. (Y.O.-N. and K.S. are co-first authors)
- 15) Mikami D, Sakai S, Nishimukai M, Yuyama K, Mukai K, Igarashi Y. Structure-dependent absorption of atypical sphingoid long-chain bases from digestive tract into lymph. Lipids Health Dis., 20(1), 24, 2021.
- 16) Furukawa JI, Hanamatsu H, Yokota I, Hirayama M, Ando T, Kobayashi H, Ohnishi S, Miura N, Okada K, Sakai S, Yuyama K, Igarashi Y, Ito M, Shinohara Y, Sakamoto N. Comprehensive Glycomic Approach Reveals Novel Low-Molecular-Weight Blood Group-Specific Glycans in Serum and Cerebrospinal Fluid. J Proteome Res., 7;20(5), 2812-2822, 2021.
- 17) Sakai S, Makino A, Nishi A, Ichikawa T, Yamashita T, Taniguchi M, Tokudome Y, Hirabayashi Y, Akiyama M, Crumrine D, Uchida Y, Elias PM, Tsuchida T, Hamanaka S. Pathogenic and Compensatory Mechanisms in Epidermis of Sphingomyelin Synthase 2-Deficient Mice. Skin Pharmacol Physiol., 29, 1-7, 2021.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Sugiki T, Kumagai K, Shinya S, Kobayashi N, Fujiwara T, Hanada K, Kojima C. Molecular basis for specific interaction between the PH domain of the human ceramide transfer protein CERT and the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein IncD, 2020 World Conference on Protein Science, Sapporo, 2020.7.6-10.
- 2) Monaco-Brown M, Cerone J, Ogbamikael S, Yager E, Yamaji T, Barroso M, Hanada K, Konan K. Modulation of Zika virus replication via glucosylceramide 1 synthase and glycosphingolipids, Eastern Society for Pediatric Research Annual Meeting ESPR2021, 2021.3.9-12, Virtual Meeting.

2. 国内学会

- 1) 清水 芳実, 篠田 雄大, 白砂 圭崇, 近藤 昌夫, 新屋 直子, 花田 賢太郎, 八木 清仁, 鈴木 哲朗, 脇田 隆 宇, 染谷 友美, 白水 美香子, 深澤 征義 C型肝炎ウイルス侵入を阻害する抗 OCLN 低分子抗体の創出, 第 93 回日本生化学会大会, 2020.9.14-16、オンライン.
- 2) 深澤征義 ウイルスの侵入過程を標的とした抗ウイルス戦略, 第 64 回日本薬学会関東支部大会, 2020.9.19、オンライン.
- 3) 小川基彦, 下島 昌幸, 西條政幸, 深澤征義 緑茶由来フラボノイド類の重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する抗ウイルス活性, 日本薬学会第 141 年会, 2021.3.26-29、オンライン.
- 4) 村江真奈, 小林明日香, 祝部真澄, 斎藤顕宜, 宮崎 智, 深澤征義, 野口耕司 新型コロナウイルスのスパイク蛋白質変異体の機能評価, 日本薬学会第 141 年会, 2021.3.26-29、オンライン.
- 5) 花田賢太郎 Overview, シンポジウム「バイオロジクスにおけるウイルス安全性確保の新潮流」, 第 141 回日本薬学会, 2021.3.26-29、オンライン.
- 6) 齊藤恭子, 花田賢太郎 Vero 細胞ゲノムに存在するサル内在性レトロウイルスの性状解析, シンポジウム「バイオロジクスにおけるウイルス安全性確保の新潮流」, 第 141 回日本薬学会, 2021.3.26-29、オンライン.
- 7) 中尾直樹, 上野雅晴, 酒井祥太, 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 非天然骨格を有する CERT 阻害剤の SBDD 研究, 第 141 回日本薬学会, 2021.3.26-29、オンライン.
- 8) 花田賢太郎 オルガネラ間脂質輸送の研究: 遺伝学と生化学と細胞生物学との幸せなコラボレーション, 第 72 回日本細胞生物学会, シンポジウム「細胞内物質輸送システム: 温故知新」, 2020.6.9-11、紙上開催.
- 9) 中村 (桶本) 優子, 染谷健二, 齊藤恭子, 山地俊之, 竹田誠, 花田賢太郎 感染症対策へのゲノム編集技術の応用 —CRISPR/Cas9 システムによる新規の細胞株の創出—, 第 69 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 67 回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会, 2020.10.21-23、オンライン.
- 10) 水池彩, 酒井祥太, 山地俊之, 花田賢太郎 小胞体-ゴルジ体連携ゾーンにおける CERT の機能制御に関する因子の探索, 第 62 回日本脂質生化学会, 2020.5.14-15、紙上開催.
- 11) 島崎健太郎, 熊谷圭悟, 花田賢太郎 高浸透圧ストレスにより誘導されるセラミド輸送タンパク質 CERT のリン酸化およびその責任キナーゼに関する解析, 第 62 回日本脂質生化学会, 2020.5.14-15、紙上開催.
- 12) 田村律人, 村上博昭, 黒澤健司, 花田賢太郎 精神発達遅滞との関連が示唆されるセラミド輸送タンパク質遺伝子 *CERT1* 上のミスセンス変異の解析, 第 62 回日本脂質生化学会, 2020.5.14-15、紙上開催.
- 13) 相崎英樹, 青柳東代, 若江亨祥, 有田峰太郎, 渡士 幸一, 鈴木亮介, 熊谷圭悟, 山地俊之, 深澤征義, 村松正道, 脇田隆宇, 花田賢太郎 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 62 回日本脂質生化学会, 2020.5.14-15、紙上開催.
- 14) 田村律人, 村上博昭, 黒澤健司, 花田賢太郎 精神発達遅滞との関連が示唆されるセラミド輸送タンパク質遺伝子 *CERT1* 上のドミナント遺伝性変異の解析, 第 93 回日本生化学会, 2020.9.14-16、オンライン.
- 15) 熊谷圭悟 偏性細胞内寄生細菌クラミジア・トラコマティスによる宿主セラミドの獲得機構, 第 93 回日本生化学会, 2020.9.14-16、オンライン.
- 16) 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 新家粧子, 小林直宏, 藤原敏道, 花田賢太郎, 児嶋長次郎 ヒト脂質輸送蛋白質 CERT がクラミジア封入体の膜蛋白質 IncD にハイジャックされる分子機序の溶液 NMR 解析, 第 59 回 NMR 討論会, 高崎市, 2020.11.18-20.
- 17) 村上博昭, 田村律人, 榎本友美, 黒澤健司, 花田賢太郎 セラミド輸送タンパク質 CERT のセリンリピードモチーフにおける機能獲得型変異は精神発達遅滞の原因となる, 第 65 回日本人類遺伝学会, 2020.11.18-21、オンライン.
- 18) 小西一弘, 里村和浩, 遠藤俊徳, 花田賢太郎, 長田直樹: 全ゲノム配列を用いた Vero 細胞系列の系統, 第 22 回日本進化学会, 2020.9.6-8、オンライン.
- 19) 森本貫太, 鈴木詔子, 谷田以誠, 角田宗一郎, 古田陽子, 内山安男, 花田賢太郎, 鈴木佑典, 山地俊之 P1 糖鎖エピトープを有する糖タンパク質の志賀毒素受容体としての機能解析, 第 39 回日本糖質学会年会, 2020.11.21、オンライン.
- 20) 花房慶, 中山仁志, 山地俊之, 岩渕和久, ヒトマクロファージの免疫応答における極長鎖脂肪酸鎖を含むスフィンゴ脂質の役割, 第 39 回日本糖質学会年会, 2020.11.21、紙上開催.
- 21) 熊谷圭悟, 花田賢太郎 CERT 阻害剤 HPA-12 の立体異性体が示す抗クラミジア活性とその作用機序,

第 13 回セラミド研究会学術集会, 2020.11.27、オンライン.

- 22) 秋山央子、井出三津子、山地俊之、植田晃広、新美芳樹、武藤多津郎、上口裕之、平林義雄, ヒト脳脊髄液にはガラビオシルセラミド (Gb2) が存在する, 第 62 回日本脂質生化学会, 2020.5.14-15、紙上開催.
- 23) 山地俊之, 志賀毒素の効率的な輸送に受容体糖脂質の脂質部位は重要である, 令和 2 年度 PRIME 会議 2020/11/18,19, オンライン.
- 24) 山地俊之, ゲノム編集法を用いた生体膜脂質や糖鎖の代謝及び感染症研究, 東京医科歯科大学大学院特別セミナー, 2021,1,18, オンライン.
- 25) 山地俊之, Application of genome editing technologies to studies on sphingolipid biology, シンポジウム「Sphingolipid biology and therapy」第 141 回日本薬学会, 2021.3.26-29、オンライン.