

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用

所 属 国立感染症研究所 細胞化学部
研究者 西島 正弘

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 北川隆之、久下 理、花田賢太郎、斎藤恭子、川崎清史、深澤征義
- (2) 三共(株)創薬化学研究所 汐崎正生
- (3) 山口大学医学部 岡 芳知

要旨

1) 膜脂質の遺伝生化学的研究：i) S100B タンパク質が、PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送に関与することを明らかにした。ii) シンドビスウィルスの RNA 合成に宿主細胞の PS (又は PE) が重要であることを示唆する結果を得た。iii) スフィンゴ脂質生合成の第一段階を司る酵素・セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) は、L-セリンとパルミトイル CoA を縮合して 3-ケトジヒドロスフィンゴシン (KDS) を生成する反応を触媒する。今回、精製 SPT を用いた解析から、D-セリンが予想外にも SPT 反応を阻害することを見いだした。2) エンドトキシンの情報伝達機構とその制御化合物の創成：i) TLR4・MD-2 複合体の LPS アゴニスト・タキソールに対する認識に MD-2 がかわること、特に MD-2 中の 22 番目のグルタミンが重要であることを明らかにした。ii) 脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドの化学合成と生物活性：脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドを化学合成し、これらがヒトマクロファージに対して強い LPS アンタゴニスト活性を示すことが確認された。3) 動物細胞の糖輸送制御機構：PDK1 はインスリン刺激により Akt1 の T308 を急速にリン酸化し Akt1 活性を高めるとともに、phosphatase を活性化し、T308 の脱リン酸化にも関与する。また、acyl CoA dehydrogenase (ACD) が GLUT4 小胞に存在する IRAP の di-leucine motif に結合して、GLUT4 小胞を細胞内に留め置く役割をしていることを見出した。

1. 研究目的

生体膜の様々な機能発現に際し、生体膜脂質の示す重要な役割が、近年、急速に明らかにされ、生体膜脂質研究は、ライフサイエンスの中心課題として大いに注目されている。しかし、遺伝子や蛋白質などに比較すると膜脂質機能の分子レベルでの研究は未だ解決すべき問題点が多く、この研究分野の更なる発展が求められている。本研究では、動物細胞の脂質代謝異常変異株の樹立などによる生体膜脂質の新しい機能の探索とその機能発現の分子機構の解析、並びにエンドトキシンとインスリンの作用発現における膜脂質代謝の解析を行い、脂質の代謝等が係わる感染症、エンドトキシン疾患や糖尿病などの病因解明と予防・治療法の基盤を確立することを目的とする。

2. 研究方法

シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割：シンドビスウィルスの RNA 合成に関わる 4 つのウイルス蛋白質 nsp1-4 を PSA-3 細胞、及びその親株である CHO-K1 細胞に一過性に発現させ、PS を除いた培地で培養した時と、PS を加えた培地で培養した時で RNA 合成活性を比較した。RNA 合成活性は nsp1-4 蛋白質特異的なプロモーター下流に β -gal 遺伝子を配置したレポーター遺伝子を nsp1-4 遺伝子と共に細胞に導入し、発現した β ガラクトシダーゼの酵素活性で検出した。

SPT の精製：FLAG peptide および His 6 配列を付加した LCB1 蛋白を発現した CHO 細胞の膜面分から可溶化した蛋白を、FLAG アフィニティカラムおよび Ni-NTA カラムを用いて分画し、SPT の精製を行った。

エンドトキシン受容体の異物認識機構の解明：マウス TLR4 を発現させた HEK293 細胞 (293/mTLR4) を作成して、さらに MD-2、及び変異型 MD-2 を導入して LPS および LPS アゴニスト・タキソールに対する導入細胞の応答性を解析することにより、異物認識に関わる MD-2 上の領域を決定した。

脂肪酸鎖が4本の新しいリピドA型ダイサッカライドの化学合成：

1) 化合物 (6) の合成：グルコサミン誘導体 (1) と(R)-3-(benzyloxy)tetradecanoic acid をDCCを縮合剤としてエステルとアミドにし、アノマー位の二重結合を四酸化オスミウムでN-methylmorpholineを酸化補助剤としてジオールとする。更に四酢酸鉛でアルデヒドとした後、NaClO₂でカルボン酸とする。このカルボン酸をジフェニルジアゾメタンでベンズヒドリルエステルとして保護する。最後にカンファースルホン酸で保護基であるアセトナイドを脱保護し、化合物 (2) を得た。一方、窒素をTrocで保護したグルコサミン (3) を3-(dodecanoyloxy)tetradecanoic acid をDCCを縮合剤としてエステルにし、カンファースルホン酸で保護基であるアセトナイドを脱保護する。この化合物の6位水酸基をt-butyltrimethylsilyl基で選択的に保護してから4位水酸基をジフェニル燐酸エステルとする。その後先に保護した6位シリル基を3N塩酸で脱保護しメアバイン試薬でメチルエーテルとした後、1位アノマー位のアリル基の2重結合ををイリジウム触媒で異性化した後、水-ピリジン-ヨウ素で切断し化合物 (4) を得た。この化合物 (4) をトリクロロアセトニトリルでDBUを塩基としてイミデートとし先の化合物 (2) とTMSOTfを触媒としてダイサッカライド化合物 (5) を得た。窒素の保護基であるTrocを亜鉛-酢酸で脱保護し無水酢酸にてアセチル化する。水酸基の保護基であるベンジル基とエステルの保護基であるベンズヒドリル基を水酸化パラジウムを触媒として加水素分解し、最後に白金を触媒として加水素分解で燐酸の保護基であるフェニル基を除くことにより目的化合物 (6) が得られた。

2) 化合物 (9) の合成：グルコサミン誘導体であるアジド体 (7) の水酸基を(R)-3-dodecyloxy-1-mesyloxytetradecaneとNaHを塩基として反応させエーテルとし、1位アノマー位のアリル基の2重結合ををイリジウム触媒で異性化した後、水-ピリジン-ヨウ素で切断し化合物を得、この化合物をトリクロロアセトニトリルでDBUを塩基としてイミデートとしてから、TMSCNでアノマー位にa-CN化する。この化合物のアジド基をトリフェニルホスフィン-アンモニア水でアミンとした後に2,2-difluorotetradecanoic acidをDCCを縮合剤としてアミドにし、アノマー位のニトリル基を塩酸-ジオキササン-水で加水分解しカルボン酸を得る。この反応では保護基であるアセトナイドも切断されジオールとなっている。このカルボン酸をジフェニルジアゾメタンでベンズヒドリルエステルとして保護された化合物 (8) が得られた。ジオール (8) の6位水酸基をt-butyltrimethylsilyl基で選択的に保護してから4位水酸基を(PhO)₂P(O)ClでDMAPを塩基としてジフェニル燐酸エステルとする。その後先に保護した6位シリル基を4N塩酸で脱保護し、エステルの保護基であるベンズヒドリル基をパラジウム炭素を触媒として加水素分解し、最後に白金を触媒として加水素分解で燐酸の保護基であるフェニル基を除くことにより目的とする化合物 (9) を得た。

動物細胞の糖輸送制御機構：PDK1の野性型(wt), およびK111A変異体(kinase dead:kd)をアデノウイルスベクターによる遺伝子導入系を用いてCHO-IR細胞に発現させ、Akt1のT308とS473のリン酸化および脱リン酸化における役割について、酵素活性および、PDK1のリン酸化を特異抗体を用いて経時的に観察した。また、GLUT4小胞のIRAPのN末端部位に結合する蛋白のクローニングも試みた。

他の方法は紙数の関係で省略し、原著を参照のこと。

3. 研究成果

1) 膜脂質機能の遺伝生化学的および分子生物学的研究

i) ホスファチジルセリン (PS) の細胞内輸送機構に関する研究

PSは小胞体で生合成され、その多くがミトコンドリア内膜に輸送されミトコンドリア内膜酵素であるPS脱炭酸酵素によりホスファチジルエタノールアミンへと変換されるが、現在、このPSのミトコンドリアへの輸送機構はほとんど理解されていない。今回我々は、セミインタクト細胞を用い、この輸送に依存したPSの脱炭酸を促進するタンパク質因子を牛脳より精製した。精製タンパク質の内部アミノ酸配列を決定したところ、その配列はS100Bタンパク質のアミノ酸配列の一部に一致した。また大腸菌で発現、精製した組み換え型S100Bタンパク質は、セミインタクト細胞において輸送に依存したPS脱炭酸を著しく促進した。これらの結果とS100Bタンパク質がPS脱炭酸酵素活性を有しないことから、S100Bタンパク質がPSのミトコンドリアへの輸送に関与することが示された。CHO-K1細胞株からPSのミトコンドリア外膜から内膜への輸送に損傷を有している変異株を分離することに成功し、この変異株の解析から、PSのミトコンドリア外膜から内膜への輸送にはPSに非常に特異的な輸送装置が関与していることが明らかにされた。また、セミインタクト細胞を用い、PSの小胞体からミトコンドリアへの輸送に細胞質タ

ンパク質が関与しているか否かを検討した。その結果、この輸送を促進するタンパク性の因子が複数、細胞質に存在することが判明した。さらにその因子の一つを精製することにも成功した。

ii) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

我々はこれまでにチャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) 細胞から膜リン脂質の 1 種であるホスファチジルセリン (PS) の合成を欠損する変異株を分離し、PS がホスファチジルコリンを PS に変換する PS 合成酵素 (PSS) 1 とホスファチジルエタノールアミン (PE) を PS に変換する PSS2 により合成されることを明らかにしている。PSS1 を欠損する変異株 PSA-3 は、PS を添加した培地では正常なリン脂質組成を示すが、PS を添加していない培地で培養すると、PS 並びに PS を前駆体として合成される PE 含量の低下を示す。この性質を利用して、これまでにアルファウィルスの 1 種であるシンドビスウィルスの増殖における宿主膜リン脂質の役割が調べられた。PSA-3 株にシンドビスウィルス感染させ、PS を添加していない培地で培養すると、娘ウィルス産生の低下、並びにウィルス RNA 合成の低下が認められたことから、同ウィルスの増殖に宿主細胞膜の PS または PE (あるいは両方) が重要であることが示唆された。今年度はシンドビスウィルスの増殖過程の中でも RNA 合成に着目し PSA-3 株を利用して同ウィルスの RNA 合成における PS (又は PE) の重要性を解析した。その結果、PS を除いた培地で培養した時 PSA-3 株の RNA 合成活性は、PS を加えた培地で培養した PSA-3 株の同活性の約 1/3 に低下することを見出した。一方、CHO-K1 細胞では、培地の PS の有無によって発現した RNA 合成活性に変化はなかった。

iii) スフィンゴシン生合成の生化学的解析

スフィンゴ脂質生合成の第一段階を司る酵素・セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) は、L-セリンとパルミトイル CoA を縮合して 3-ケトジヒドロスフィンゴシン (KDS) を生成する反応を触媒する。我々は、昨年度までに SPT の精製に成功した。今回、精製 SPT を用いた解析から、D-セリンが予想外にも SPT 反応を阻害することを見いだした。L-[3H]-セリンを基質とする SPT 反応アッセイ系において、各種セリン誘導体、L-アラニン、L-スレオニン、D-アラニン、D-スレオニンは本反応を阻害しなかった。しかしながら D-セリンは、非放射性 L-セリンと同程度の K_i 値で阻害効果を示した。その阻害形式は、L-セリンに対する競合阻害の様式であった。また、精製 SPT を L-セリンおよび [14C]-パルミトイル CoA とインキュベートした場合は、予想通り放射性 KDS が生産されるが、D-セリンと放射性パルミトイル CoA の組み合わせでは放射性 KDS は生産されなかった。

2) エンドトキシンの情報伝達機構とその制御化合物の創成

i) エンドトキシン受容体の異物認識機構の解明

293/mTLR4 は LPS 及び LPS アゴニスト・タキソールに対して不応答性だが、さらにマウス MD-2 を発現させることにより両刺激に対して応答性を獲得した。一方ヒト MD-2 を発現させた場合には LPS に対しては応答性を獲得するが、タキソールに対しては応答しなかった。このことから、タキソールを異物として認識するためにはマウス MD-2 が重要な働きをしていることがわかった。さらに、ヒト/マウスキメラ MD-2、変異型マウス MD-2 を作成し 293/mTLR4 に導入してタキソールに対する細胞の応答性を解析した結果、特に MD-2 中の 22 番目のグルタミンが重要であることがわかった。

ii) 脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドの化学合成と生物活性

Carboxymethyl-6-O-[2-acetamido-2-deoxy-3-[(R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl]-6-O-methyl-4-O-phosphono]-b-D-glucopyranosyl]-2-deoxy-3-[(R)-3-hydroxytetradecanamido]-2-O-[(R)-3-hydroxy-tetradecanoyl]-a-D-glucopyranoside (6) と 2,6-anhydro-3-deoxy-3-(2,2-difluorotetradecanamido)-4-O-[(R)-3-dodecyloxytetradecyl]-D-glycero-D-ido-heptonic acid (9) を合成することが出来た。また、これらがヒトマクロファージに対して強い LPS アンタゴニスト活性を示すことが確認された。

3) 動物細胞の糖輸送制御機構

インスリン刺激後 1 分で Akt1 の T308 はリン酸化されたが、5 分後にはほぼ完全に脱リン酸化された。PDK1 (Wt) の過剰発現によりインスリンによる T308 のリン酸化が増大したが、これも速やかに脱リン酸化された。一方、PDK1 (Kd) の過剰発現ではインスリンによる T308 のリン酸化が持続し、15 分後でもリン酸化状態が保たれていた。すなわち、不活性型の PDK1(Kd) の過剰発現により脱リン酸化が抑制されるものと考えられた。この T308 の脱リン酸化は、カリクリン A (protein phosphatase1, 2A の阻害剤) によっても阻害された。しかし、インスリンによる Akt1 の S473 のリン酸化レベルは、いずれの PDK1

(wt, Kd) 過剰発現で影響を受けなかった。GLUT4 小胞に存在する IRAP の N 末端近くの di-leucine motif に結合するタンパク質として、acyl CoA dehydrogenase (ACD) を見出した。また HeLa 細胞株に発現する GLUT1 と GLUT3 は、異なる膜ドメインに存在することが示唆された。

4. 考 察

1) 膜脂質機能の遺伝生化学的および分子生物学的研究

i) ホスファチジルセリン (PS) の細胞内輸送機構に関する研究

PS の小胞体からミトコンドリア内膜への輸送機構は現在ほとんど理解されておらず、この輸送にどのような生体内高分子が関与しているのかは全く不明であった。本研究では、PS の小胞体からミトコンドリア内膜への輸送を促進する細胞質タンパク質の精製に世界に先駆けて成功し、さらに同タンパク質が S100B であることを明らかにした。この研究成果は、細胞内 PS 輸送の分子機構の解明に大いに貢献するものと考えられる。

ii) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

シンドビスウィルスの RNA 合成に宿主細胞の PS (又は PE) が重要であることが示唆された。今回は PSA-3 株を利用して解析を行ったが、我々は同株に加えて PSS1 と PSS2 の欠損変異株 PSB-2 を有している。PSB-2 株は実験的に PS 含量を特異的に減少させることができるので、今後同株を利用して今年度と同様の実験を行い、シンドビスウィルスの RNA 合成への PS の関与を明確にしたい。また最近、シンドビスウィルスの近縁種の nsp1 が PS と結合するとの報告があったことから、nsp1 の機能における PS の重要性を解析する予定である。

iii) スフィンゴシン生合成の生化学的解析

今年度の結果から、D-セリンは SPT の活性中心にあるピリドキサルリン酸基に L-セリンと同様に結合できるものの、パルミトイル CoA との縮合には至らないと考えられる。脳などでは D-セリンが L-セリンに匹敵する濃度で存在することが知られており、そのような組織では細胞内 D-セリンがスフィンゴ脂質生合成に影響を与えている可能性を示した。

2) エンドトキシンの情報伝達機構とその制御化合物の創成

i) エンドトキシン受容体の異物認識機構の解明

TLR4・MD-2 複合体中の異物認識に MD-2 が関わることを示し、さらに MD-2 上の認識に関わるアミノ酸を世界ではじめて決定した。このアプローチにより、今後 LPS など様々な異物に対する認識に必要なアミノ酸を決定できると考えられる。

ii) 脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドの化学合成と生物活性

化合物 6 と 9 のヒトマクロファージ U937 細胞に対する TNF α 生成を抑える効果は 0.05 mM 濃度でそれぞれ 92% および 65% を示した。従って二糖体は単糖体より LPS-アンタゴニスト活性は強いかもしれない。しかし昨年報告した化合物 7-O-[2-acetoamido-2-deoxy-6-O-methyl-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-(dodecanoyloxy)tetradecanoyl]-b-D-glucopyranosyl]-2,6-anhydro-3-deoxy-3-[(R)-3-(hydroxy)tetradecanamido]-4-O-[(R)-3-(hydroxy)tetradecanoyl]-D-glycero-D-ido-heptonic acid と比較するとこれらの化合物の活性は弱かった。脂肪酸鎖が 4 本のリピド A 型ダイサッカライドはヒトマクロファージに対して強い LPS アンタゴニスト活性を示すことが確認されたことから更にその周辺の化合物を合成し自己免疫疾患、敗血症等に有効な治療薬の開発に望みが出てきたと考えられる。

3) 動物細胞の糖輸送制御機構

CHO-IR 細胞で、Akt1 の T308 はインスリン刺激により急速にリン酸化され、その後速やかに脱リン酸化される。PDK1 の過剰発現により Akt1 の T308 のリン酸化は増強され、以前の報告にも合致する。我々は同時に、PDK1 がその後の速やかな T308 の脱リン酸化にも関与することを示し、PP2A が PDK1 の下流にあって、この脱リン酸化に関与すると考えられた。すなわち、PDK1 は kinase ではあるが、その活性化は同時に phosphatase を活性化している。なお、PDK1 の酵素活性は S473 のリン酸化と平行した。また、IRAP と acyl CoA dehydrogenase (ACD) との結合が GLUT4 小胞を細胞内に留め置くために重要な役割を果たしていること、ならびに糖輸送タンパク質はアイソフォームにより細胞膜局在性が異なる可能性などが示唆された。

5. 結 論

1) 膜脂質機能の遺伝生化学的および分子生物学的研究

i) ホスファチジルセリン (PS) の細胞内輸送機構に関する研究

S100B タンパク質が、PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送に関与することを明らかにした。

ii) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

シンドビスウィルスの RNA 合成に宿主細胞の PS (又は PE) が重要であることを示唆する結果を得た。

iii) スフィンゴシン合成の生化学的解析

スフィンゴ脂質合成の第一段階を司る酵素・セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) は、L-セリンとパルミトイル CoA を縮合して 3-ケトジヒドロスフィンゴシン (KDS) を生成する反応を触媒する。今回、精製 SPT を用いた解析から、D-セリンが予想外にも SPT 反応を阻害することを見出した。

2) エンドトキシンの情報伝達機構とその制御化合物の創成

i) エンドトキシン受容体の異物認識機構の解明

TLR4・MD-2 複合体の LPS アゴニスト・タキソールに対する認識に MD-2 がかわること、特に MD-2 中の 22 番目のグルタミンが重要であることがわかった。

ii) 脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドの化学合成と生物活性

脂肪酸鎖が 4 本の新しいリピド A 型ダイサッカライドを化学合成し、これらがヒトマクロファージに対して強い LPS アンタゴニスト活性を示すことが確認された。

3) 動物細胞の糖輸送制御機構

PK1 はインスリン刺激により Akt1 の T308 を急速にリン酸化し Akt1 活性を高めるとともに、phosphatase を活性化し、T308 の脱リン酸化にも関与する。また、acyl CoA dehydrogenase (ACD) が GLUT4 小胞に存在する IRAP の di-leucine motif に結合して、GLUT4 小胞を細胞内に留め置く役割をしていることを見出した。

6. 研究発表

01. Synthesis and biological activities of lipid A-type pyranocarboxylic acid derivatives.

T. Mochizuki, Y. Iwano, M. Shiozaki, S. Kurakata, S. Kanai, and M. Nishijima
Carbohydrate Research, 324, 225-230, (2000)

02. Neutral sphingomyelinase activity dependent on Mg²⁺ and anionic phospholipid in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

K. Hanada, T. Mitamura, M. Fukasawa, P. A. Magistrado, T. Horii, and M. Nishijima
Biochem. J., 346, 671-677, (2000)

03. Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells: A novel evaluation system using an SPT-defective mammalian cell mutant.

K. Hanada, M. Nishijima, T. Fujita, and S. Kobayashi
Biochem. Pharmacol., 59, 1211-1216, (2000)

04. D-Serine inhibits serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the initial step of sphingolipid biosynthesis.

K. Hanada, T. Hara, and M. Nishijima
FEBS Lett., 474, 63-65, (2000)

05. Ornithine-containing lipids stimulate CD14-dependent TNF- α production from murine macrophage-like J774.1 and RAW264.7 cells.

Y. Kawai, N. Takasuka, K. Inoue, K. Akagawa, M. Nishijima
FEMS Immunol. Med. Microbiol., 28, 197-203, (2000)

06. Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle *Plasmodium falciparum*.

T. Mitamura, K. Hanada, E. P. Ko-Mitamura, M. Nishijima, and T. Horii
Parasitology International, 49, 219-229, (2000)

07. Selection of Mammalian Cell Mutants in Sphingolipid Biosynthesis.

K. Hanada, and M. Nishijima . SPHINGOLIPID METABOLISM AND CELL SIGNALING, Part 2, Edited by Y. A. Hannun and Alfred H. Merrill, Jr.

METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 312, 304-317, (2000)

08. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria.
M. Lutter, M. Fang, X. Luo, M. Nishijima, X. Xie, X. Wang
Nat. Cell Biol., 2, 754-761, (2000)
09. Reconstitution of ATP-and Cytosol-dependent Transport of *de Novo* Synthesized Ceramide to the Site of Sphingomyelin Synthesis in Semi- Intact Cells.
T. Funakoshi, S. Yasuda, M. Fukasawa, M. Nishijima, and K. Hanada
J. Biol. Chem., 275, 29938-29945, (2000)
10. Lipid A-type pyranocarboxylic acid derivatives, their synthesis and their biological activities.
T. Mochizuki, Y. Iwano, M Shiozaki, S. Kurakata, S. Kanai, and M. Nishijima
Tetrahedron, 56, 7691-7703, (2000)
11. Reduction of Sphingomyelin Level without Accumulation of Ceramide in Chinese Hamster Ovary Cells Affects Detergent-resistant Membrane Domains and Enhances Cellular Cholesterol Efflux to Methyl- β -cyclodextrin.
M. Fukasawa, M. Nishijima, H. Itabe, T. Takano, and K. Hanada
J. Biol. Chem., 275, 34028-34034, (2000)
12. Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*
C. van Ooij, L. Kalman, S. van Ijzendoorn, M. Nishijima, K. Hanada, K. Mostov, and J. N. Engel
Cellular Microbiology, 2, 627-637, (2000)
13. Gln-22 of mouse MD-2 is essential for species-specific lipopolysaccharide-mimetic action of Taxol
K. Kawasaki, K. Gomi, and M. Nishijima
J. Immunol. (Cutting Edge), 166, 11-14, (2000)
14. Characterization of Cell Surface Determinants for Baculovirus Infection.
H. Tani, M. Nishijima, H. Ushijima, T. Miyamura, and Y. Matsuura
Virology, 279, 343-353, (2001)
15. Purification of Phosphatidylglycerophosphate Synthase from Chinese Hamster Ovary Cells.
K. Kawasaki, O. Kuge, Y. Yamakawa, and M. Nishijima
Biochem. J., 354, 9-15, (2001)
16. Gin-22 of mouse MD-2 is essential for species-specific lipopolysaccharide mimetic action of Taxol.
K. Kawasaki, K. Gomi, and M. Nishijima.
J. Immunol., 166, 11-14, (2001)
17. A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes.
T. Serikawa, N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Tanaka and T. Kitagawa
Biochim. Biophys. Acta 1467, 419-430, (2000)
18. Genetic analysis of Japanese patients with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Nucleotide-binding fold-2 mutation impairs cooperative binding of adenine nucleotides to sulfonylurea receptor 1.
Tanizawa Y, Matsuda K, Matsuo M, Ohta Y, Ochi N, Adachi M, Koga M, Mizuno S, Kakjita M, Tanaka Y, Tachibana K, Inoue H, Furukawa S, Amachi T, Ueda K and Oka Y.
Diabetes, 49, 114-120, (2000)
19. The N-terminal 34 residues of the 55 kDa regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase interact with tubulin.
nukai K, Funaki M, Nawano M, Katagiri H, Ogihara T, Anai M, Onishi Y, Sakoda H, Ono H, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. **Biochem. J.**, 346, 483-489, (2000)
20. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2 -terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF κ B activation.
Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitsev Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y, Franger GR, Henson P, Johnson GL. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97, 7272-7, (2000)
21. Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain.
Ariyoshi K, Nosaka T, Yamada K, Onishi M, Oka Y, Miyajima A, Kitamura T
J. Biol. Chem., 275, 24407-13, (2000)
22. p110beta is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity.

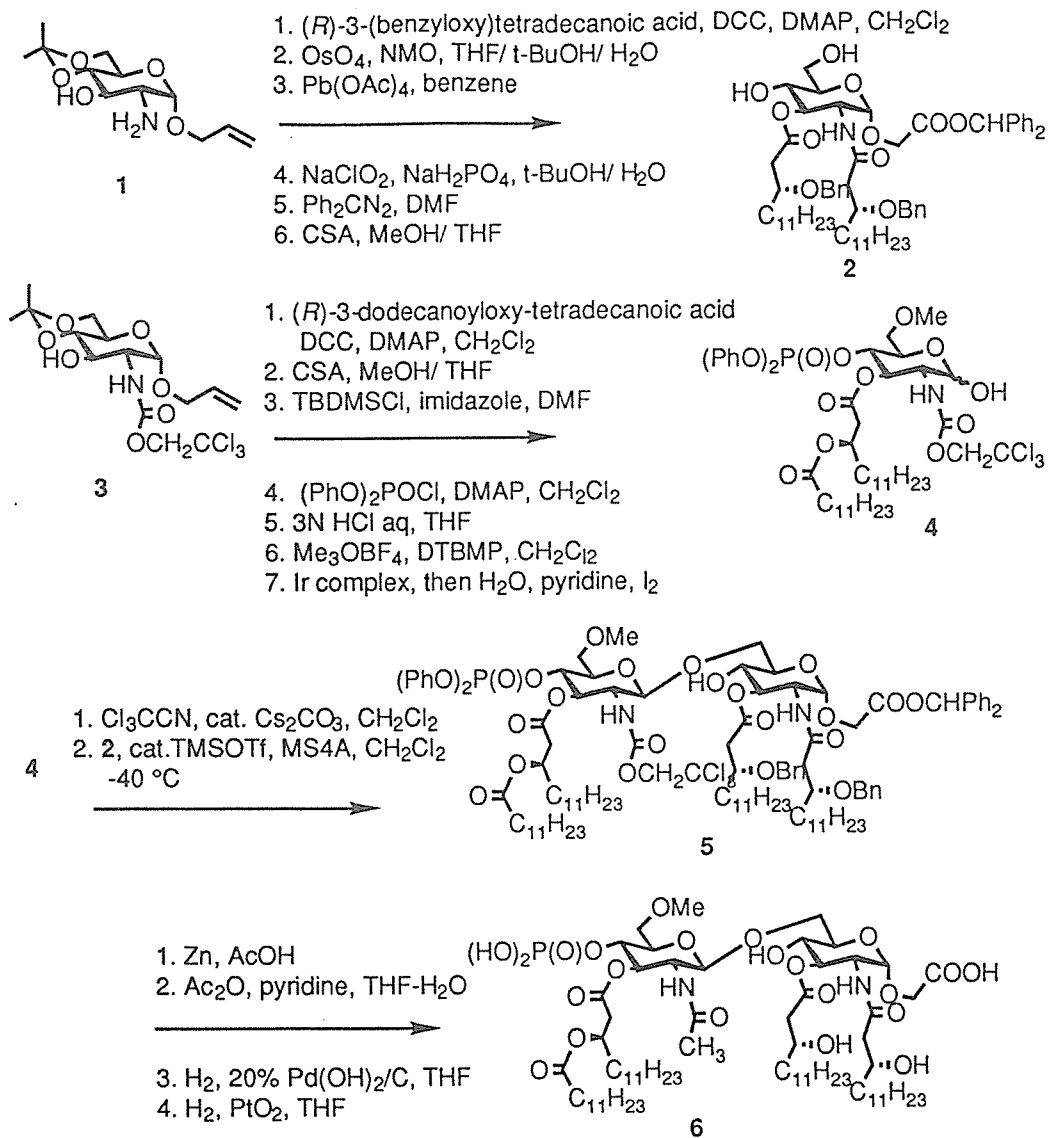
- Asano T, Kanda A, Katagiri H, Nawano M, Ogihara T, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Hooshmand-Rad R, Heldin CH, Oka Y, Funaki M.
J. Biol. Chem., 275, 17671-17676, (2000)
23. Autophosphorylation of type I phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity.
 Itoh T, Ishihara H, Shibasaki Y, Oka Y, Takenawa T. **J. Biol. Chem.**, 19389-94, (2000)
24. Decitabine(5-Aza-2'-deoxycytidine)decreased DNA methylation and expression of MDR-1 gene in K562/ADM cells.
 Ando T, Nishimura M, Oka Y. **Leukemia** 14, 1915-20, (2000)
25. Functional analysis of a mutant sulfonylurea receptor, SUR1-R1420C, that is responsible for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.
 Matsuo M, Trapp S, Tanizawa Y, Kioka N, Amachi T, Oka Y, Ashcroft FM, Ueda K.
J. Biol. Chem., 275, 41184-91, (2000)
26. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction.
 Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. **Diabetes** 49, 1700-8, (2000)
27. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain.
 Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y.
Hum Mol Genet 10, 477-484, (2001)
28. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klothe mutant mouse, a novel animal model for human aging.
 Utsugi T, Ohno T, Ohyama Y, Uchiyama T, Saito Y, Matsumura Y, Aizawa H, Itoh H, Kurabayashi M, Kawazu S, Tomono S, Oka Y, Suga T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R.
Metabolism., 49, 1118-23, (2000)
29. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, an Akt1 kinase, is involved in dephosphorylation of Thr308 of Akt1 in Chinese hamster ovary cells.
 Yamada T, Katagiri H, Asano T, Inukai K, Tsuru M, Kodama T, Kikuchi M, Oka Y.
J. Biol. Chem., 276, 5339-45, (2001)

7. 知的所有権の取得状況

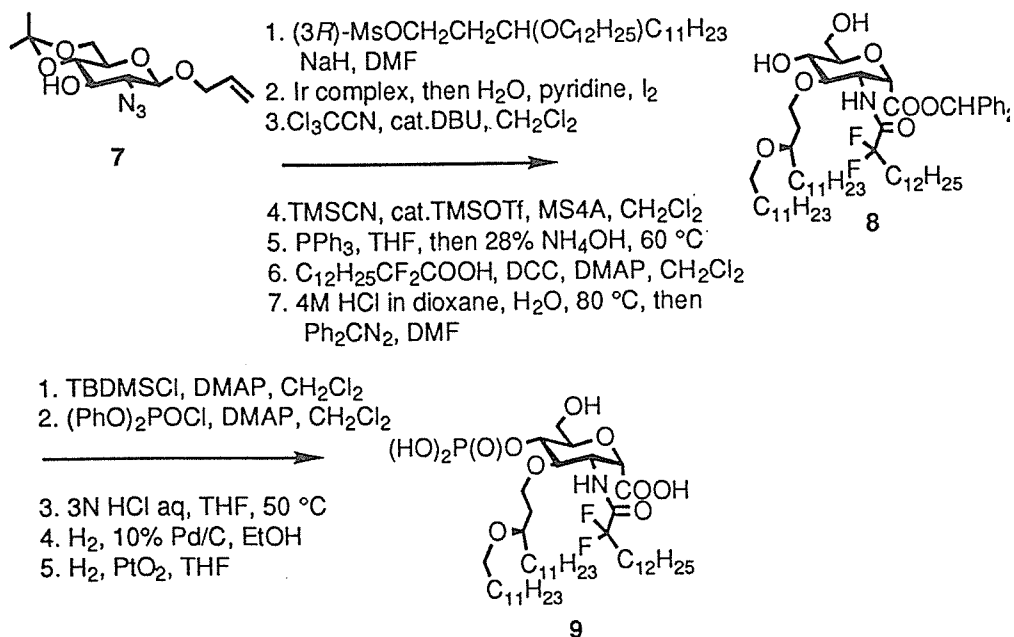
1) 特許取得

出願：平 1 1 - 3 3 4 5 8 3 (発明者：中村毅、汐崎正生、西島正弘)

Scheme 1.



Scheme 2.



平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社