

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

## 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩	…… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江	…… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広	…… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子	…… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦	…… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利	…… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄	…… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗	…… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英	…… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓	…… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ	…… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子	…… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一	…… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士	…… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子	…… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒	…… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文	…… 576

## 脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用

所属 国立感染症研究所 細胞化学部

研究者 花田 賢太郎

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 真菌スフィンゴ脂質合成酵素の阻害剤探索系を用いて3万以上のサンプルの探索を進め、候補化合物を取得した。セラミド輸送タンパク質 CERT の制御メカニズムのいくつかを明らかにした。酵母におけるリン脂質の細胞内輸送に関する遺伝子候補を同定した。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 西島 正弘  
齊藤 恭子
- (2) 明治製菓(株)医薬総合研究所 星子 繁
- (3) 九州大学大学院理学研究院 久下 理

### A. 研究目的

病原微生物による感染において、宿主細胞の生体膜は病原体の細胞内侵入や増殖など種々の過程で重要な役割を果たしている。本研究では、宿主細胞膜の主要構成成分である膜脂質の生合成と機能発現機構に関する研究を遺伝生化学的手法を用いて展開し、その成果を基盤に、細菌、真菌、ウイルス等の病原微生物感染成立における宿主膜脂質の役割を解明する。さらに、宿主細胞と病原微生物との間の脂質代謝経路の違いを見出し、病原微生物の脂質代謝を特異的に阻害する物質を微生物代謝産物等に求め、新規抗微生物薬開発のためのリード化合物を発見することを統括的目的としている。

### B. 研究方法

#### B-1-1) イノシトールホスホリルセラミド(IPC)合成酵素調製

*C. albicans* 菌体の破碎抽出液からマイクロソーム画分として回収し、このマイクロソーム画分を酵素溶液として使用した。

#### B-1-2) IPC 合成酵素活性の検出

20 $\mu$ l の反応液(20mM Tris-HCl (pH 7.0)、20mM KCl、0.25% sodium colate、1.85kBq [4,5-<sup>3</sup>H] *N*-Acetyl-D-erythro-dihydrosphingosine、1.75 $\mu$ g ミクロソーム画分)で 1.5 hr 室温にて酵素反応を行なった後、3 $\mu$ l の反応液を TLC 板にスポットして展開

を行った。BAS1800 II システムを用いて放射活性を測定し、酵素反応により生成した反応物の放射活性を指標として酵素活性を検出した。

#### B-1-3) スクリーニング方法

スクリーニングサンプルを分注した 96 穴プレートもしくは 384 穴プレート内で酵素反応を行った。96 チャンネルの分注ヘッドを有した自動分注器で 3 $\mu$ L の反応液を TLC 板上にスポットした。乾燥後、同じ分注器で同じスポット上に 10 $\mu$ L の展開溶媒を 3 回分注することで同心円状に反応液を展開、乾燥した TLC 板はイメージング解析し、中心に残存した反応生成物の放射活性を測定し、それを指標に酵素阻害活性を検出した。

#### B-1-4) 抗真菌活性 (MIC) 測定方法

抗真菌活性は日本医真菌学会抗真菌剤感受性試験法を一部改変して行い、80%以上の生育阻害を示す最小濃度を MIC とした。

#### B-2-1) セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性検出法

大腸菌に発現させた組換え体 CERT およびその変異体の精製、および、それら精製タンパク質を用いたセラミドの膜間転移反応の無細胞系における検出およびセミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性検出法は、感染症研究所グループがすでに論文発表している方法に準じた。

B-2-2) HeLa 細胞に発現させた CERT の精製および脱リン酸化処理 HA-epitope を付加したヒト野生型 CERT(HA-hCERT WT)もしくはその変異体を HeLa 細胞中で発現させ、その細胞破碎液から HA-epitope 親和性クロマトグラフィー法によって HA-hCERT を精製した。場合によっては、細胞破碎液をラムダファージタン

パク質脱リン酸化酵素( $\lambda$ PPase)で処理するステップを加えることで、脱リン酸化型 HA-hCERT を精製した。

#### B-2-3) CERTリン酸化部位の決定

HeLa 細胞から精製した HA-hCERT WT をトリプシン分解し、そこから分離したリン酸化ペプチド断片を MALDI/TOF 質量解析に供して、リン酸化を受けている部位を決定した。

#### B-3-1) 酵母二重変異株、三重変異株の構築

PSD1 と任意の遺伝子との二重変異株、および CRD1、PSD2 と任意の遺伝子との三重変異株の作成と解析は、OKY7001 (MAT $\alpha$ , can1 $\Delta$ ::STEpr-sp\_his5, lyp1 $\Delta$ , his3 $\Delta$ , leu2 $\Delta$ , ura3 $\Delta$ , met15 $\Delta$ , psd1 $\Delta$ ::URA3), あるいは OKY7006 (MAT $\alpha$ , can1 $\Delta$ ::STEpr-sp\_his5, lyp1 $\Delta$ , his3 $\Delta$ , leu2 $\Delta$ , ura3 $\Delta$ , met15 $\Delta$ , crd1 $\Delta$ ::URA3, psd2 $\Delta$ ::natR) と酵母ノックアウトライブラリーの各酵母 (MATa leu2 $\Delta$ 0 his3 $\Delta$ 1 ura3 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 xxx $\Delta$ ::kanR) を用い、SGA 法により行った。

(倫理面への配慮) 本研究は、主として微生物と動物培養細胞を用いて行うものであり、これらの研究では特に倫理面で問題になることはない。なお、DNA 組換え実験については指針に従って実験を行い、実験は全て P2 レベルの実験室で行った。

### C. 研究結果

#### C-1-1) 真菌脂質合成阻害剤探索法の構築:

イノシトールホスホセラミド(IPC)関連脂質は、真菌類などには存在するが哺乳動物細胞には存在しない脂質群である。IPC 合成酵素は、真菌の生育に必須の遺伝子産物であり、その阻害剤は新たな抗真菌剤候補として注目される。

当初 96 穴プレートを使用した IPC 合成酵素活性アッセイ系を構築し、この系を利用して IPC 合成酵素阻害剤の半自動化探索していた。更なる探索の効率化を目指し、384 穴プレートを使用したアッセイ系の構築に成功した。96 穴プレートと比較し 4 倍の高密度であるため、分注作業、ロボットによる移送時間が短縮され、また、放射性廃棄物の削減も可能にした。

#### C-1-2) 微生物培養液からの活性化物質のスクリーニング

微生物培養液より約 20,000 サンプルの 1 次スクリーニングを実施し、その結果いくつかの既知物質がヒット物質として選択された。しかしながら、これらの化合物は IPC 合成酵素阻害活性が弱いことや他のスクリーニング系でもヒットすることから、選択性の点で問題があると考えられるためこれ以上の検

討は中止した。

#### C-1-3) 低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

次に低分子の化合物ライブラリーの 11,200 化合物を用いてスクリーニングを実施した。

下に示す 4 項目を設定し、スクリーニングを行った。

- ① 抗真菌活性
- ② IPC 合成酵素阻害活性
- ③ IPC 合成酵素阻害活性濃度依存性
- ④ 細胞障害性

化合物ライブラリー 11,200 サンプルの抗真菌活性 (*C. albicans*, *A. fumigatus*) のスクリーニングにより抗真菌活性の見られた 586 化合物サンプルのフォーカストライブラリーを用いて、IPC 合成酵素阻害物質のスクリーニングを行ったところ、27 化合物が見出された。次にこのヒットした 27 化合物について再現性を兼ねた濃度依存性試験、K562 細胞による細胞障害性試験を行った。

再現性が見られ、細胞障害性の低い 12 サンプルについてはさらに、抗真菌活性(MIC)試験、LC-MS による化合物の純度確認等を行った。

最終的に、IPC 合成酵素阻害活性 ( $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ ) を有し、細胞障害性が低く ( $\geq 70\%$  cell viability)、抗真菌活性 (*C. albicans* または *A. fumigatus*) を有する 6 化合物が得られた。

#### C-2-1) CERT の基質特性

人工膜を用いた膜間脂質転移アッセイによって CERT の基質認識選択性を詳細に解析した。その結果、CERT は、(1)セラミドの 4 つの立体化学異性体のうち、天然型の D-erythro-セラミドのみを認識し、(2)スフィンゴシン、スフィンゴミエリン、コレステロールなどの他の脂質は認識できない。ただし、ジアシルグリセロールはわずかに認識する一方、(3)ジヒドロ型およびファイト型セラミドは認識し、また、様々なアミド鎖長のセラミドも認識することが明らかとなった。

また、CERT とセラミド基質の結合比は、1 対 1 であることも明らかにした。さらに、我々が以前開発したセラミド輸送阻害剤・HPA12 は、CERT のアンタゴニストであることも示した。

#### C-2-2) CERT の FFAT モチーフや PH ドメインに依存した小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性

小胞体膜タンパク質 (VAP) と相互作用するタンパク質群に保存されたペプチドモチーフ (FFAT モチーフと命名されている) が CERT 中間領域に存在する。CERT はその FFAT モチーフに依存して VAP と相互作用

用することが共免疫沈降実験から明らかとなった。

CERT の FFAT モチーフや PI4P 結合 PH ドメインの欠損が小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性に与える影響を調べる目的で、小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送再構成実験を行った。その結果、FFAT モチーフや PH ドメインの変異体は野生型 CERT に比べて低い小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性しか示さなかった。

### C-2-3) CERT のリン酸化とそれによる機能制御

哺乳動物細胞に発現させた CERT はリン酸化を受けていること、および、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いた解析から、セリンおよびスレオニンのリン酸化を受けていることが示唆された。そこで、HeLa 細胞から精製した HA-hCERT WT をトリプシン分解し、そこから分離したリン酸化ペプチド断片を MALDI/TOF 質量解析に供したところ、CERT の特定の領域に複数のリン酸化が起こっていることが明らかとなった。この領域はセリンの3アミノ酸ごとの繰り返し配列に加えてスレオニンも複数存在する。この領域を serine repeat モチーフ・SR モチーフと命名した。SR モチーフは19アミノ酸の配列の中で 7-9 個のリン酸化を受けていた。

さらに、SR モチーフ非リン酸化型の CERT 変異体 (CERT S132A) および恒常的リン酸化擬似変異体 (CERT 10E) を作成した。HeLa 細胞に野生型、S132A、10E をそれぞれの CERT を発現させ、精製し、精製 CERT の活性を小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性再構成実験系を用いて調べた。その結果、SR モチーフ非リン酸化型である S132A 変異体ももっとも高い活性を示し、一方、恒常的リン酸化擬似体である 10E 変異体はほとんど活性を示さなかった。野生型は中間的な活性であったが、タンパク質脱リン酸化酵素で処理すると S132A 変異体と同等のレベルまで活性上昇した。

### C-3-1) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

酵母の主要リン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) は、ホスファチジルセリン (PS) 脱炭酸経路と CDP-エタノールアミン (Etn) 経路で合成される。PS 脱炭酸経路による PE 合成は、Etn が培地に存在しない場合 PE 生合成の主経路となるが、PS 合成酵素 (Pss1p) が小胞体に存在し、PS 脱炭酸酵素 1 と 2 (Psd1p と Psd2p) がそれぞれミトコンドリアとゴルジ体に存在することから、この経路による PE 合成には、新規に合成された PS が小胞体からミトコンドリアあるいはゴルジ体に輸送される必要がある。

さらに、ミトコンドリアに特異的に存在するリン脂質であるカルジオリピン (CL) は、ミトコンドリア

においてホスファチジン酸 (PA) からいくつかの段階を経て CL 合成酵素 (Crd1p) により合成されるが、PA が小胞体あるいは脂質顆粒で合成されるため、CL の合成には PA が合成された場所からミトコンドリアに輸送される必要がある。一方ごく最近、Psd1p と Crd1p の遺伝子をそれぞれ破壊しても酵母は生育可能であるが、両者を破壊した二重変異株は生存できず、この二重変異が致死性となることが報告された。この原因はおそらく、PE と CL がミトコンドリアにおいてある点で同じ機能を有しており、いずれかの存在がミトコンドリアの機能発現に必須であるからと考えられる。そこで我々は、PSD1 遺伝子が欠損した変異株において CL 生合成に必須な PA のミトコンドリアへの輸送に関与する遺伝子がさらに欠損した場合、あるいは CRD1 と PSD2 遺伝子が欠損した変異株においてミトコンドリア PE レベルの維持に必須な PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送に関与する遺伝子がさらに欠損した場合、それら遺伝子欠損が致死性となることを想定し、PSD1 欠損あるいは CRD1 と PSD2 二重欠損の遺伝的背景においてその欠損が致死性あるいは増殖損傷となる遺伝子を同定することを試みた。このような遺伝子は、PS もしくは PA のミトコンドリアへの輸送、あるいは PE もしくは CL 生合成に関与することが期待できる。これまでに、非必須遺伝子約 4800 個が個別に破壊 (kanR 遺伝子に置換) されている酵母ノックアウトライブラリーを用い、PSD1 遺伝子との二重変異株約 4800 株、および CRD1 遺伝子、PSD2 遺伝子との三重変異株約 4800 株を網羅的に構築し、その増殖を調べた。その結果、PSD1 との二重変異により細胞増殖に著しい損傷を与え、リン脂質の輸送に関与する可能性のある遺伝子 20 個を同定した。さらに CRD1、PSD2 との三重変異により細胞増殖に著しい損傷を与え、リン脂質の輸送に関与する可能性のある遺伝子 28 個も同定した。これらの遺伝子の中には、PS 輸送あるいは PA 輸送に関与する新たな遺伝子が含まれる可能性が大いにあり、それら遺伝子が欠損した酵母の性状解析をすすめている。

先に述べた検索の結果、PSD1 遺伝子との二重変異により細胞増殖が著しく遅くなる遺伝子として同定された遺伝子 (PLT1 と命名) は、リン脂質の代謝、あるいは細胞内輸送に関与し、ミトコンドリア膜の形成・維持に機能する可能性が示された。

### C-4-1) 宿主細胞ホスファチジルセリン (PS) がシンドビスウィルスレプリカーゼ依存性遺伝子発現におよぼす影響

シンドビスウィルス (SIN) レプリカーゼ依存性遺

伝子発現系において、レポーター遺伝子産物の生産量は、宿主細胞の PS レベルが低下すると対照レベルの約 50%に低下したが、レポーター遺伝子 mRNA 量は変化がなかった。従って、レプリカーゼによる遺伝子発現において PS が関与しているのは、RNA が合成されてから翻訳されるまでの過程であると考えられた。

## D. 考察

### D-1) IPC 合成酵素の阻害剤スクリーニング

スフィンゴ脂質は真菌の生育に重要な役割を担っており、その生合成系は動物細胞と真菌で異なっていることから抗真菌薬の標的として注目されている。スフィンゴ脂質生合成系の中でも IPC 合成酵素は真菌の生育に必須であることから、抗真菌薬の標的として魅力的である。

新たな酵素阻害物質を求め、本酵素活性の半ハイスループット化系を構築し、微生物培養液及び化合物ライブラリーをスクリーニング源としたスクリーニングを実施した。その結果、新たに幾つかの阻害物質を発見し、また高次評価を実施している。

IPC 合成酵素阻害と抗真菌活性を併せ持ち、細胞障害性が少ない物質が複数見出されている。これらの化合物が有する抗真菌活性が、IPC 合成酵素阻害に基づくものかどうかの確認や、哺乳動物が有するスフィンゴミエリン合成酵素との選択性についての検討は、今後の課題として残っており、新たな抗真菌物質となりうるかどうかについては更なる検討が必要である。

### D-2) CERT 機能の制御

セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送再構成系を用いた解析から、CERT の FFAT モチーフや PH ドメインは効率的な小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送機能に重要であることが明らかとなった。哺乳動物細胞に発現させた CERT は、多重リン酸化を受けていることを見出し、その部位を決定した。その結果、CERT の特定の領域 (SR モチーフ) に複数のリン酸化が起こっており、CERT の機能は SR モチーフのリン酸化で負に制御されていることが明らかとなった。

### D-3) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

リン脂質輸送に関与する遺伝子の同定を目的とし、PSD1 との二重変異株および CRD1、PSD2 との三重変異株をそれぞれ約 4800 株構築し、その増殖を調べた。その結果、単独変異では正常に増殖するものの、そ

の変異が PSD1 変異と合成増殖損傷となる遺伝子、並びに CRD1 PSD2 二重変異と合成増殖損傷となる遺伝子を計 48 個同定した。これら遺伝子は、リン脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子の候補である。

PSD1 と遺伝学的相互作用を示した PLT1 遺伝子に関しては、これまでの解析結果から、同遺伝子がリン脂質の代謝、あるいは細胞内輸送に関与し、ミトコンドリア膜の形成・維持に機能する可能性が強く示唆された。

## E. 結論

### E-1) IPC 合成酵素の阻害剤スクリーニング

真菌スフィンゴ脂質合成系を標的とした新規抗真菌薬の探索を目的とし、イノシトールホスホリルセラミド (IPC) 合成酵素阻害化合物スクリーニング系により、微生物培養液及び化合物ライブラリーをスクリーニング源としてスクリーニングを実施した。現在までにいくつかの酵素阻害物質を得ているが、高次評価の結果、有望な新規抗真菌薬のリード化合物となりうるかは更なる検討が必要である。

### E-2) CERT 機能の制御

CERT の FFAT モチーフや PH ドメインは CERT 介する小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送機能に重要である。また、ゴルジ体にターゲットしている CERT はその近傍にある小胞体上の VAP-A と FFAT モチーフ依存的に相互作用しうることを示唆された。さらに、哺乳動物細胞に発現させた CERT は、多重リン酸化を受けていることを見出し、その部位を決定した。その結果、CERT の特定の領域 (SR モチーフ) に複数のリン酸化が起こっていることが明らかとなった。さらに、CERT の機能は SR モチーフのリン酸化で負に制御されていることを明らかにした。

### E-3) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

リン脂質輸送に関与する遺伝子の同定を目的とし、PSD1 との二重変異株および CRD1、PSD2 との三重変異株をそれぞれ約 4800 株構築し、その増殖を調べた。その結果、単独変異では正常に増殖するものの、その変異が PSD1 変異と合成増殖損傷となる遺伝子、並びに CRD1 PSD2 二重変異と合成増殖損傷となる遺伝子を多数同定することに成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) K. Kumagai, S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi, and K. Hanada: CERT mediates

intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J. Biol. Chem.* **280**, 6488-6495 (2005)

2) T. Ohsawa, M. Nishijima, and O. Kuge: Functional analysis of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 1 through systematic alanine mutagenesis. *Biochem. J.* **381**, 853-859 (2004)

3) K. Hanada: Sphingolipids in infectious diseases (an invited review). *Jpn. J. Infect. Dis.* **58**, 131-148 (2005)

4) K. Okemoto, K. Kawasaki, K. Hanada, Masami Miura, and M. Nishijima: A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. *J. Immunol.*, **176**, 1203-1208 (2006)

5) K. Hanada: Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide. *Mol. Cell. Biochem.* **286**, 23-31 (2006)

6) M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada: Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* **281**, 30279-30288 (2006)

7) K. Saito, M. Nishijima, and O. Kuge: Phosphatidylserine is involved in gene expression from Sindbis virus subgenomic promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 878-885 (2006).

8) K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige, and M. Kawano: CERT and intracellular trafficking of ceramide (an invited review). *Biochim. Biophys. Acta* in press

## 2. 学会発表

1) 熊谷圭悟、西島正弘、花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT の基質特異性、第 77 回日本生化学会大会 2004 年 10 月、横浜。

2) 友廣志穂、北田 栄、久下 理: ホスファチジルセリンによるホスファチジルセリン合成酵素 2 の活性制御、第 77 回日本生化学会大会 2004 年 10 月、横浜。

3) K. Hanada: An emerging model for lipid trafficking: non-vesicular transfer of ceramide from the endoplasmic reticulum to the

Golgi apparatus at membrane contact sites, The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Protein Science Society Satellite Symposium, Membrane Dynamics and Cell Regulation, June 29, 2005, Fukuoka, Japan

4) 花田賢太郎: CERT の FFAT モチーフは効率的な小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送に必要なものである、第 78 回日本生化学会大会、平成 17 年 10 月 21 日、神戸。

5) 河野美幸、熊谷圭悟、西島正弘、花田賢太郎: ER-Golgi 間セラミド輸送タンパク質 CERT に存在する FFAT モチーフの役割、第 78 回日本生化学会大会、平成 17 年 10 月 20 日、神戸。

6) 花田賢太郎: 膜輸送の新パラダイム: 分子引き抜き転移機構による脂質セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送、第 28 回日本分子生物学会年会、平成 17 年 12 月 10 日、福岡。

7) K. Hanada: Discussion leader's comments for the session of sphingolipid biophysics, Gordon Research Conference on Glycolipids and Sphingolipid Biology, January 8, 2006, Ventura, CA, USA.

8) 花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT の基質認識メカニズム、第 1 回スフィンゴ・セラピー研究会、平成 18 年 5 月 27 日、鳥取。

9) 花田賢太郎: 細胞内脂質輸送を担うナノマシーン、シンポジウム: 膜輸送ナノマシンの構造・機能とその制御、平成 18 年 8 月 7 日、大阪。

10) 花田賢太郎: 脂質セラミドの細胞内選別輸送とその制御、京都大学大学院医学研究科セミナー、平成 18 年 9 月 8 日、京都。

11) 友廣志穂、北田 栄、久下 理: ホスファチジルセリンによるホスファチジルセリン合成酵素 2 の活性制御、日本生化学会九州支部例会 2006 年 05 月、福岡。

12) 須崎 潮、友廣志穂、川口彩子、久下 理: ホスファチジルセリン合成酵素 1 の生体膜への挿入様式の解析、日本生化学会九州支部例会、2006 年 05 月福岡。

13) K. Kumagai, M. Kawano, F. Ohuchi, M. Nishijima, K. Hanada: Regulation of ER-to-Golgi trafficking of ceramide by phosphorylation of CERT and its molecular mechanism, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20,

2006, Kyoto, Japan.

14) M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada: Interaction between CERT and VAP at the ER is required for efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan.

15) N. Tomishige, K. Kumagai, J. Kusuda, M. Nishijima, K. Hanada: A Ser/Thr kinase capable of down-regulating the synthesis of sphingomyelin by phosphorylation of the ceramide transfer protein CERT, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 20, 2006, Kyoto, Japan.

16) K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 22, 2006, Kyoto, Japan.

17) K. Hanada: Regulation of intracellular trafficking of ceramide, FEBS special meeting, New concepts in lipidology: from lipidomics to disease, October 22-25, 2006, Noordwijkerhout, The Netherlands

18) A. Kawaguchi, S. Tomohiro, S. Kitada, O. Kuge: Characterization of partially purified phosphatidylserine synthase 1, 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress, June 2006 Kyoto

19) K. Saito, M. Nishijima, O. Kuge: Phosphatidylserine deficiency impairs Sindbis virus subgenomic promoter-driven gene expression, 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress, June 2006 Kyoto

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

---

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31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