

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

補助事業課題名： (日本語) 病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明と創薬への応用
(英語) Elucidation of the mechanism of the hijacking of host lipids by pathogens
and its application to pharmaceutical development

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 細胞化学部 部長 花田賢太郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Biochemistry &
Cell Biology, Director, Kentaro HANADA

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

感染症は人類の大きな脅威であるが、ウイルス感染症の多くには有効な治療薬がない。ヒトに重篤な感染症を引き起こす複数の病原体は、宿主細胞内での脂質輸送を担う脂質輸送タンパク質 (lipid transport protein; LTP) をハイジャックすることにより、宿主の脂質を優先的に利用していることが、我々の最近の研究から浮かび上がってきた。そこで本研究開発では、病原体が宿主細胞の脂質を利用する分子メカニズムを解明するとともに、その利用過程を阻害する薬剤を開発することを目指した。平成 27 年 12 月に開始した本研究課題は、必要な機器の購入を済ませて、28 年度から本格的に始動し、有田峰太郎主任研究官 (国立感染症研究所 ウイルス第二部第二室) ら、竹田誠部長 (国立感染症研究所 ウイルス第三部) ら、及び児嶋長次郎准教授 (大阪大学 蛋白質研究所) らのグループとともに以下の成果を挙げた。

本課題内容の二つの柱の一つである「病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明」に関しては、**【1】** 宿主細胞のセラミド輸送タンパク質 CERT の PH ドメインに偏性細胞内寄生細菌クラミジアの封入体膜タンパク質 IncD が結合するには、IncD の N 末、C 末の両方が必要であることを見出した。**【2】** HCV の感染や複製が可能なヒト肝臓由来 Huh7.5.1-8 細胞において、スフィンゴミエリン (SM) 合成の場にセラミドを運ぶ CERT を欠損させた変異細胞をゲノム編集法にて作製し、SM が HCV 複製に必須なことを確認した。**【3】** リポソームを用いたフローテーションアッセイにより風疹ウイルス粒子は SM/コ

レステロールにより構成されるリポソームに結合する事を明らかにし、細胞膜上の SM およびコレステロールより構成されるラフト様構造が風疹ウイルスの細胞への接着因子または受容体であることを示した。【4】 Vero 細胞は、アフリカミドリザル腎臓から樹立された不死化細胞であり、多様なウイルスや細菌性毒素に高い感受性を持つことから、微生物学研究に汎用されている。ヒト CRISPR single-guide RNA library がサル由来の Vero 細胞に適用出来るか検証し、ゲノムワイドな探索であっても一定程度は適応可能という証拠を得た。さらに、三種の Vero 細胞亜株 (JCRB0111, ATCC CCL81, Vero 76) 間のゲノム構造比較により、Vero 細胞ゲノム上に存在する内在性レトロウイルスの特性を解析した。本課題のもう一つの柱である「病原体による宿主脂質ハイジャック機序の創薬への応用」に関しては、【5】本研究ユニット外との連携によって開発中の新規 CERT 阻害剤候補化合物に関して、既存の阻害剤 HPA-12 とは全く異なる構造を持つ候補化合物を見出した。【6】昨年度に引き続き、これまでに同定された抗ポリオウイルス化合物の中から、OSBP 阻害剤を同定した。【7】ウイルス感染前に、スフィンゴ脂質合成の初発段階を担う酵素・セリンパルミトイル転移酵素の阻害剤や CERT の阻害剤で細胞を処理すると風疹ウイルス感染が抑制されること、一方で両薬剤とも風疹ウイルスのゲノム複製には影響を与えないことを明らかにした。【8】LTP 関連分子と脂質リガンド等との相互作用を物理化学的に評価する手法の改良・開発に着手し、等温滴定型熱量計を用いたナノディスク検出系では非特異的相互作用の影響を受けないことを発見した。また、脂質との定量的な相互作用を検討するために脂質ナノディスクの試料調製法を確立することにも成功し、CERT PH ドメインの安定同位体標識体との NMR 相互作用実験に適用することができた。

英文

Although infectious diseases represent a major threat to humans, the repertoire of anti-viral therapeutic drugs available currently remains very limited. Recent studies, including our own, demonstrated that various intracellular pathogens hijack the lipid transport proteins (LTPs) of host cells in order to use host lipids for their own proliferation. Thus, in this research and development project, we aim to elucidate the molecular mechanisms by which a pathogen utilizes the lipids of host cells for its own proliferation, and to develop an inhibitor of this lipid-utilizing process. In collaboration with the research groups of Dr. Minetaro ARITA (Natl Inst of Infect Dis, Dept of Virology II), Dr. Makoto TAKEDA (Natl Inst of Infect Dis, Dept of Virology III), and Dr. Chojiro Kojima (Osaka Univ, Protein Inst), we obtained the following results for FY2016. 【1】 Co-precipitation experiments revealed that the N- and C-terminal regions of the chlamydial inclusion membrane protein IncD were required for the interaction of IncD with the PH domain of the ceramide transport protein CERT of host cells. 【2】 A CERT-disrupted mutant cell line of human hepatocarcinoma-derived Huh7.5.1-8 cells was constructed to confirm that sphingomyelin is essential for the replication of HCV. 【3】 A co-floation assay with liposomes revealed that rubella virus particles directly bind to sphingomyelin/cholesterol lipid membranes. 【4】 The Vero cell lineage, which was established from the kidney of an African green monkey, is a permanent cell line that is susceptible to various viruses. We previously elucidated the whole genome sequence of a Vero cell line, and found that its genome sequence was ~95% identical to the human genome. We herein confirmed that the human CRISPR single-guide RNA library is applicable to genome-wide screening with Vero cells. We also compared the genome landscapes of three Vero cell sublines (JCRB0111, ATCC CCL81, and Vero 76). 【5】 A novel type of CERT inhibitor was discovered in collaboration with research groups outside this AMED-CREST unit. 【6】 Previously unrecognized OSBP inhibitors were identified among compounds exhibiting anti-poliovirus activity. 【7】 When cells were treated with an inhibitor of serine palmitoyltransferase, which catalyzes the first step of sphingolipid synthesis, or

an inhibitor of CERT, the infection of cells by rubella virus was suppressed. In contrast, treatments with these drugs did not affect the replication of the rubella virus genome. 【8】 We found a lipid nanodisc system using isothermal calorimetry that prevents or minimizes non-specific interaction-derived signals, and showed that the system is suitable for assessing the physicochemical interactions of LTP with lipid ligands.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

1. Hanada K. Ceramide transport from the endoplasmic reticulum to the *trans* Golgi region at organelle membrane contact sites, in "Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Diseases" (Eds., Mitsuo Tagaya & Thomas Simmen), Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.997, Springer, in press.
2. Hanada K., Sugiki T. *In vitro* assay to extract specific lipid types from phospholipid membranes using lipid-transfer proteins: a lesson from the ceramide transport protein CERT, in "Lipidomics" (Ed., Paul Wood), Series: Neuromethods, Vol.125, Springer, in press.
3. Yamaji T, Horie A, Tachida Y, Sakuma C, Suzuki Y, Kushi Y, Hanada K. Role of intracellular lipid logistics in the preferential usage of very long chain-ceramides in glucosylceramide, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1761.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 小胞体膜接触場を介したオルガネラ間脂質輸送とその制御, 口頭, 花田賢太郎, 理研シンポジウム「小胞体糖修飾の統合的ケミカルバイオロジー」, 2017/1/20, 国内.
2. セラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメイン-Golgi 体間結合が CERT のリン酸化によって抑制される構造基盤: 溶液 NMR 法による解析, ポスター発表, 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 江川大地, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 竹内 恒, 嶋田一夫, 花田賢太郎, 高橋栄夫, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
3. スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンとの間で異なるセラミド分子種嗜好性にはセラミドの細胞内ロジスティクスが関与している, 口頭, 山地俊之, 花田賢太郎, 第 9 回セラミド研究会学術集会, 2016/10/27, 国内.
4. 哺乳動物細胞における小胞体接触局域を介したセラミド輸送の分子機序とその制御, 口頭, 花田賢太郎, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内.
5. NMR 解析から見出されたセラミド輸送タンパク質 CERT の PH ドメインが隣接する部位のリン酸化によって機能抑制される機序の一端, 口頭, 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 竹内恒, 嶋田一夫, 高橋栄夫, 花田賢太郎, 第 11 回スフィンゴテラピー研究会, 2016/7/15, 国内.
6. 小胞体膜接触局域とオルガネラ間脂質輸送: セラミド輸送からの考察, 口頭, 花田賢太郎, 熊谷圭悟, 山地俊之, 第 68 回日本細胞生物学大会, 2016/6/17, 国内.

7. 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, 口頭, ホッサムゲワイド, 青柳東代, 渡士幸一, 鈴木亮介, 熊谷圭悟, 山地俊之, 深澤征義, 酒巻有里子, 市野瀬志津子, 花田賢太郎, 脇田隆宇, 相崎英樹, 第58回日本脂質生化学会, 2016/6/9, 国内.
8. 偏性細胞内寄生クラミジア菌の感染増殖における宿主細胞セラミド輸送タンパク質 CERT の役割, 口頭, 熊谷圭悟, 山地俊之, 花田賢太郎, 第58回日本脂質生化学会, 2016/6/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明と創薬への応用, 花田賢太郎, 国立感染症研究所細胞研究部ホームページ (URL: <http://www.niid.go.jp/niid/ja/hepatitis-c-m/816-biochem/6626-2016-07-25-06-40-23.html>) .
2. 本 CREST 研究課題の目標や研究概略を研究部紹介中に説明, 花田賢太郎, 国立感染症研究所研究発表会, 2016/5/21, 口頭, 国内.

(4) 特許出願

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 補助事業課題名： (日本語) 病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明と創薬への応用
(英語) Elucidation of the mechanism of the hijacking of host lipids by pathogens and its application to pharmaceutical development
- 補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 細胞化学部 部長 花田賢太郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Biochemistry & Cell Biology, Director, Kentaro HANADA
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 腸管ウイルスならびに肝炎ウイルスにおける宿主脂質の機能解明と応用
分担課題名： (英語) Analysis of the function of host lipid in the infection of enterovirus and hepatitis virus and its application
- 補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第二部第二室 主任研究官 有田 峰太郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology II, Senior research scientist, Minetaro ARITA

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- 補助事業代表者： 国立感染症研究所・細胞化学部・花田 賢太郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Arita M. Poliovirus studies during the endgame of the polio eradication program. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2017, 70, 1-6.
2. Kong L, Fujimoto A, Nakamura M, Aoyagi H, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Arita M., Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication compartment by interacting with NS4B. J Virol. 2016, 90(6), 3093-3111.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ポリオ根絶最終段階で求められるポリオウイルス研究とその応用, 口頭, 有田 峰太郎, 第 26 回感染研シンポジウム, 2016/5/23, 国内.
2. 宿主因子を標的とするポリオウイルス複製阻害剤の探索, 口頭, 有田 峰太郎, 第 89 回日本生化学大会シンポジウム「アカデミア発創薬探索研究」, 2016/9/25, 国内.
3. 宿主因子を標的とする抗エンテロウイルス化合物の探索およびウイルス複製/宿主細胞への影響の解析, 口頭, 有田 峰太郎, 日本薬学会第 137 回年会シンポジウム「抗ウイルス感染症研究のフロンティア」～ウイルスと宿主の攻防～, 2017/3/26, 国内.
4. Sphingomyelin is a component in the membranous replication factories, 口頭, Gewaid HE, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Aly H, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Wakita T, Aizaki H, 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2016/10/12, 国内.
5. 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, 口頭, ホッサムゲワイド, 青柳東代, 渡士幸一, 鈴木亮介, 熊谷圭悟, 山地俊之, 深澤征義, 酒巻有里子, 市野瀬志津子, 花田賢太郎, 脇田隆字, 相崎英樹, 第 58 回日本脂質生化学学会, 2016/6/9, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 肝炎ウイルス検査のすすめ, 相崎英樹, 脇田隆字, 暮らしの豆知識、国民生活センター, 2016/8/15, 国内
2. 肝炎ウイルスについて, 相崎英樹他, 知って肝炎&感染研一般公開, 2016/10/1, 国内.

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 補助事業課題名： (日本語) 病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明と創薬への応用
(英語) Elucidation of the mechanism of the hijacking of host lipids by pathogens and its application to pharmaceutical development
- 補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 細胞化学部 部長 花田賢太郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Biochemistry & Cell Biology
Director, Kantaro Hanada
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 風疹ウイルスならびに呼吸器系ウイルス感染増殖における宿主脂質の機能解明と応用
分担課題名： (英語) Analysis of roles of host lipids in rubella virus and respiratory virus infection and propagation
- 補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長 竹田誠
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology III,
Director, Makoto Takeda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立感染症研究所・細胞化学部・花田賢太郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (AMED-CREST) “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 病原体による宿主脂質ハイジャック機序の解明と創薬への応用
(英語) Elucidation of the mechanism of the hijacking of host lipids by pathogens and its application to pharmaceutical development

研究開発担当者 (日本語) 国立感染症研究所 細胞化学部 部長 花田賢太郎
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Biochemistry & Cell Biology, Director, Kentaro HANADA

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) タンパク質-脂質間の物理的相互作用解析手法の改良・開発とLTPへの適用
開発課題名： (英語) Development of the biophysical method for protein-lipid interactions and its application to LTP proteins

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学 蛋白質研究所 准教授 児嶋長次郎
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University, Institute for Protein Research, Associate Professor, Chojiro KOJIMA

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 国立感染症研究所・細胞化学部・花田 賢太郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌1件）

1. Yokochi M, Kobayashi N, Ulrich EL, Kinjo AR, Iwata T, Ioannidis YE, Livny M, Markley JL, Nakamura H, Kojima C, Fujiwara T. Publication of nuclear magnetic resonance experimental data with semantic web technology and the application thereof to biomedical research of proteins. J. Biomed. Semant., 2016, 7, 16.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. pH-dependent paramagnetic NMR technique utilized for protein structure determination, 口頭, 児嶋長次郎, The 4th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications”, 2016/6/21, 国内.
2. NMR 解析から見出されたセラミド輸送タンパク質 CERT の PH ドメインが隣接する部位のリン酸化によって機能抑制される機序の一端, 口頭, 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 竹内恒, 嶋田一夫, 高橋栄夫, 花田賢太郎, 第 11 回スフィンゴセラピー研究会, 2016/7/15, 国内.
3. Paramagnetic NMR Techniques Developed for High-Resolution Protein Structure Determination, 口頭, 児嶋長次郎, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/24, 国内.
4. タンパク質の常磁性標識による NMR 構造解析, 口頭, 児嶋長次郎, 第 55 回電子スピンサイエンス学会年会, 2016/11/11, 国内.
5. セラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメイン-Golgi 体間結合が CERT のリン酸化によって抑制される構造基盤: 溶液 NMR 法による解析, ポスター, 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 江川大地, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 竹内恒, 嶋田一夫, 花田賢太郎, 高橋栄夫, 第 39 回日本分子生物学会, 2016/12/2, 国内.
6. Latest protein NMR techniques and its application to partially unfolded/aggregated proteins, 口頭, 児嶋長次郎, IPR Seminar / RIKEN Symposium / MEXT Kakenhi Nascent Chain Biology “New Frontiers in Protein Misfolding and Aggregation”, 2017/1/21, 国内.
7. NMR structural analysis of unstable / partially unfolded / aggregated proteins, 口頭, 児嶋長次郎, 7th Asia Pacific NMR Symposium and the 23rd Annual Meeting of the National Magnetic Resonance Society of India, 2017/2/17, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 阪大蛋白研 950 メガヘルツ核磁気共鳴装置の一般公開, 杉木俊彦, いちょう祭, 2016/5/1, 国内

(4) 特許出願