

生化学第二

1 構 成 員

	平成 13 年 3 月 31 日現在	
教授	1 人	
助教授	1 人	
助手（うち病院籍）	2 人	(0 人)
大学院学生（うち他講座から）	1 人	(0 人)
研究生	0 人	
外国人客員研究員	0 人	
技官	0 人	
その他（技術補佐員等）	1 人	
合計	6 人	

2 教官の異動状況

- 三浦 直行（教授）（期間中現職）
 上里 忠良（助教授）（期間中現職）
 佐藤 英二（助手）（期間中現職）
 呉 一心（助手）（期間中現職）

3 研究業績

	平成 12 年度	
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	8 編	(1 編)
そのインパクトファクターの合計	55.48	
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	0 編	
(3) 総説数（うち邦文のもの）	1 編	(1 編)
そのインパクトファクターの合計	0	
(4) 著書数（うち邦文のもの）	1 編	(0 編)
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0 編	(編)
(6) 国際学会発表数	1 編	

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Wu Y-X, Uezato T, Fujita M (2000) Tyrosine phosphorylation and cellular redistribution of ezrin in MDCK cells treated with pervanadate. J Cell Biochem 79: 311-321.

インパクトファクターの小計 [2.81]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

1. 柴田 清, 藤江三千男, 鈴木雅子, 森岡八重子, 鈴木則夫, 佐藤英二. (2000) 熱変性を利用した Propidium Iodide 染色による HL-60 細胞の DNA 量の解析. *Cytometry Research*10 : 27-30.

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen Z-S, Terada K, Furukawa T, Yang, X-L, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S-I (2000) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* 60: 1312-1316.
2. Yang X-L, Matsuura H, Fu Y, Sugiyama T, Miura, N (2000) MFH-1 is required for Bone-Morphogenetic Protein-2-induced osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. *FEBS Letter* 470: 29-34.
3. Harada M, Sakisaka S, Terada K, Kimura R, Kawaguchi T, Koga H, Taniguchi E, Sasatomi K, Miura N, Suganuma T, Fujita H, Furuta K, Tanikawa K, Sugiyama T, Sata M (2000) Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes. *Gastroenterology* 118: 921-928.
4. Eguchi A, Kondoh T, Kosaka H, Suzuki T, Momota H, Masago A, Yoshida T, Taira H, Ishii-Watabe A, Okabe J, Hu J, Miura N, Ueda S, Suzuki Y, Taki T, Hayakawa T, Nakanishi M (2000) Identification and characterization of cell lines with a defect in a post-adsorption stage of Sendai virus-mediated membrane fusion. *J Biol Chem* 275: 17549-17555.
5. Berg D, Weishaupt A, Francis MJ, Miura N, Yang X-L, Goodyer I, Naumann M, Koltzenburg M, Reiners K, Becker G (2000) Changes of copper transporting proteins and ceruloplasmin in the lentiform nuclei in primary adult-onset dystonia. *Ann Neurol* 47: 827-830.
6. Roelofsen H, Wolters H, vanLuyn MJA, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ (2000) Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 119,: 782-793.

インパクトファクターの小計 [52.67]

D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの
- D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

（3）総 説

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 - 1. 三浦直行（2000）形態形成：中胚葉（1） 生体の科学 51: 358-359.
- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの
- D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

（4）著 書

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 - 1. Miura N, Iida K, Kakinuma H, Koseki H, Kato N, Yoshida N, Sugiyama T (2000) Essential role of the forkhead (winged helix) gene MFH-1 in the aortic arch formation. in "Etiology and morphogenesis of congenital heart disease: Twenty years of progress in genetics and developmental biology" (Clark, E.B., Nakazawa, N., and Takao, A. eds.), pp.227-230, Futura Publishing Co., New York.
- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの
- D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

（5）症例報告

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

D. 筆頭著者、共著者とも浜松医科大学に所属していなかったが、当該教室に所属する者が含まれるもの

(6) 国際学会発表

1. Miura N, Kato N, Yanagisawa M, Sugiyama T (2000) MFH-1 and ETA act independently in the aortic arch formation. Keystone Symposia on "Molecular Biology of the Cardiovascular System", January, Snowbird, UT.

4 特許等の出願状況

	平成 12 年度
特許取得数（出願中含む）	0 件

5 医学研究費取得状況

	平成 12 年度
(1) 文部省科学研究費	6 件 (1,900 万円)
(2) 厚生省科学研究費	0 件 (万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0 件 (万円)
(4) 財団助成金	1 件 (400 万円)
(5) 受託研究または共同研究	1 件 (100 万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	2 件 (450 万円)

(1) 文部省科学研究費

- 三浦直行（代表者） 特定領域研究（C）（2）「肺発生，肺分化，肺発癌におけるフォークヘッド遺伝子 LUN の役割」360 万円（新規）
- 三浦直行（代表者） 特定領域研究（C）（2）「ゲノム資源とノックアウトマウスを用いた 22q11.2 症候群の成因の解明」500 万円（新規）
- 三浦直行（代表者） 基盤研究（B）（2）「劇症肝炎抵抗性モデル動物の作製とその解析」270 万円（継続）
- 三浦直行（代表者） 基盤研究（B）（1）「肝癌抵抗性モデル動物の作製とその応用」390 万円（継続）
- 三浦直行（代表者） 基盤研究（B）（2）「大動脈弓・骨格・腎臓形成に関わる MFH-1 遺伝子の分子作用機構の解明」280 万円（継続）
- 上里忠良（代表者） 基盤研究（C）（2）「環境ホルモン DEHP の上皮系細胞内の微小胞形成につい

て」100万円（継続）

(4) 財団助成金

三浦直行（代表者） 旭硝子財団研究助成金「Fox 遺伝子ファミリーの分子進化と個体における役割」400万円（新規）

(5) 受託研究または共同研究

三浦直行（分担者） 循環器病研究委託費「心筋細胞の再生治療に関する研究」「心臓神経堤細胞の再生治療への基礎的研究」100万円（新規）代表者 東京大学大学院医学系研究科講師 小室一成

6 特定研究などの大型プロジェクトの代表、総括

7 学会活動

	平成 12 年度
(1) 特別講演・招待講演回数	0 件
(2) 国際・国内シンポジウム発表数	6 件
(3) 学会座長回数	1 件
(4) 学会開催回数	0 件
(5) 学会役員等回数	2 件

(2) 国際・国内シンポジウム発表

1. Miura N, Kato N, Yanagisawa M, Sugiyama T (2000) MFH-1 and ETA act independently in the aortic arch formation. Keystone Symposia on "Molecular Biology of the Cardiovascular System", January, Snowbird, UT.
2. 三浦直行, 市原利晃, 杉山俊博 (2000) Rb トランスジェニックマウスは化学発癌抵抗性を示す, 第 59 回日本癌学会総会, 10 月, 横浜
3. 杉山俊博, 安井應紀, 寺田邦彦, 三浦直行 (2000) 肝臓幹様細胞の分化能, 第 59 回日本癌学会総会, 10 月, 横浜
4. 二藤彰, 三浦直行, 山下照仁, 野田政樹 (2000) BMP と Noggin による骨格系分化過程の制御, 第 73 回日本生化学大会, 10 月, 横浜
5. 三浦直行 (2000) 大動脈形成とフォークヘッド遺伝子 Foxc2(MFH-1), 第 73 回日本生化学大会, 10 月, 横浜
6. 三浦直行 (2000) C2C12 筋芽細胞の BMP-2 による骨芽細胞への分化に MFH-1 蛋白は必要である, 第 23 回日本分子生物学会年会, 12 月, 神戸

(3) 座長をした学会名

三浦直行 第 73 回日本生化学会大会シンポジウム

(5) 役職についている学会名とその役割

三浦直行 日本生化学会評議員

三浦直行 日本細胞生物学会評議員

8 学術雑誌の編集への貢献

	平成 12 年度
学術雑誌編集数	0 件

9 共同研究の実施状況

	平成 12 年度
(1) 国際共同研究	3 件
(2) 国内共同研究	5 件
(3) 学内共同研究	1 件

(1) 国際共同研究

1. 柳沢正史 (テキサス大学) Foxc2(MFH-1)とエンドセリン受容体 A の相互関係の解明
2. George Becker 博士 (Julius-Maximilians 大学) 原発性異緊張症患者におけるセルロプラスミン蛋白とウイルソン蛋白の変動についての研究
3. Han Roelofsen 博士 (Groningen 大学) ウイルソン病蛋白の銅負荷時の細胞内局在に関する研究

(2) 国内共同研究

1. 秋山伸一 (鹿児島大学医学部) ウイルソン病蛋白の抗ガン剤耐性メカニズムの解明
2. 杉山俊博 (秋田大学医学部) ウイルソン蛋白の局在に関する研究
3. 杉山俊博 (秋田大学医学部) 骨分化におけるフォークヘッド遺伝子 MFH-1 の研究
4. 杉山俊博 (秋田大学医学部) R b トランスジェニックマウスが示す肝癌抵抗性の研究
5. 中西真人 (大阪大学微生物病研究所) センダイウイルス受容体変異株細胞の解析

(3) 学内共同研究

堀田喜裕 (眼科学) 色盲遺伝子の研究

10 産学共同研究

	平成 12 年度
産学共同研究	0 件

11 受賞 (学会賞等)

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 心大動脈形成の分子機構に関する研究

フォークヘッド遺伝子 *Foxc2*(MFH-1)のノックアウトマウスは心大動脈の形成異常を呈することから、MFH-1 遺伝子は心大動脈の発生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、エンドセリン受容体 A (ETA) のノックアウトマウスも似た心大動脈の形成異常を示すことが共同研究者の柳沢博士の研究室で明らかにされた。そこで、心大動脈形成における MFH-1 遺伝子と ETA 遺伝子の上流下流関係を明らかにすることにした。まず、MFH-1 ノックアウトマウスにおける ETA 遺伝子の発現と、ETA ノックアウトマウスにおける MFH-1 遺伝子の発現を *in situ hybridization* 法で検討した結果、MFH-1 遺伝子と ETA 遺伝子はいずれも独立に大動脈血管形成に働いていることが判明した。また、MFH-1/ETA ダブルホモマウスは胎生 11.5 日に心不全で死亡することが明らかになった。

(三浦直行, 王とう, 高田橋真帆, 柳沢正史¹) ¹テキサス大学

2. 骨分化におけるフォークヘッド遺伝子 MFH-1 の役割

MFH-1 ノックアウトマウスが顔面頭蓋骨と脊椎骨の形成異常を示したことから、MFH-1 遺伝子は骨形成にも関わっていることが明らかになってきたので、MFH-1 遺伝子と骨分化の関係について詳しく検討した。筋芽細胞である C2C12 細胞は BMP-2 を培養液に添加すると骨芽細胞へと分化することがわかっている。この骨分化過程における MFH-1 遺伝子の発現をウエスタンブロット法で検討した結果、MFH-1 蛋白は分化前から少量発現しているが、BMP-2 添加直後に増加しその後減少するが高いレベルが保たれることが明らかになった。そこで、内因性の MFH-1 の発現を抑制するために、アンチセンス遺伝子発現ベクターを遺伝子導入した永久株を樹立した。この永久株細胞ではいつも MFH-1 蛋白のレベルが低値に抑えられている。この永久株細胞に BMP-2 を作用させても骨分化マーカーであるアルカリリンフォスファターゼやオステオカルシンの産生は誘導されず、MFH-1 蛋白は骨分化には必須であることが明らかになった。

(楊曉麗¹, 杉山俊博¹, 三浦直行) ¹秋田大学医学部

3. フォークヘッド遺伝子 LUN の発生における役割

新しいフォークヘッド遺伝子 *Foxf2*(LUN)のノックアウトマウスを作製した。詳しい *in situ hybridization* の結果、LUN 遺伝子は肺間質や小腸間質そして上顎下顎周囲に発現している遺伝子であることが明らかになった。ノックアウトマウスの解析により、まずヘテロマウスは特に異常を示さなかった。ヘテロマウスどうしを掛け合わせてホモマウスを作製すると、ホモマウスは生後 1 日までに全部死亡することが判明した。各臓器における異常について検討したところ、口蓋裂が全ホモマウスに観察された。その他の臓器の異常やさまざまな遺伝子発現の検討を行う予定にしている。

(王とう, 高田橋真帆, 三浦直行)

4. Rb トランスジェニックマウスの劇症肝炎、肝癌抵抗性に関する研究

ヒト Rb 遺伝子をラット HNF-1 α の遺伝子プロモーター支配下に置いたコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを 2 系統得た。肝臓の大きさや組織構築はコントロールマウスと差異を認めなかった。劇症肝炎を誘導する抗 Fas 抗体を投与すると、コントロールマウスでは血清 GOT,GPT 値の上

昇や、肝組織像で出血や肝細胞変性像が観察されるのに対して、Rb トランスジェニックマウスでは、GOT, GPT 値の上昇はほとんど見られず、肝組織像でも出血や肝細胞変性像も観察されなかった。また、ジエチルニトロサミン腹腔内注射後フェノバルビタール飲水により肝癌を誘導すると、コントロールマウスでは肝細胞癌と多数の結節が出現するが、Rb トランスジェニックマウスでは肝細胞癌は出現せず、結節数も有意に減少していた。これらの事実は、Rb 蛋白が生体肝臓において抗アポトーシス、抗腫瘍性に働いていることを実証した有意義な研究である。

(市原利晃¹, 杉山俊博¹, 上里忠良, 三浦直行)¹秋田大学医学部

5. H,K-ATPase の部分配列を認識する抗体と交差結合する新しい遺伝子の単離

H, K-ATPase の N 末端側のペプチドを合成し、これを兔に免疫して抗ペプチド抗体を得た。この抗体を用いて、ラット脳細胞抽出液に対してウエスタンブロットしたところ、1 本のバンドが検出された。本来の蛋白は脳では発現しない蛋白であるので、この蛋白は、未知の新しいファミリー遺伝子であると考え、脳 cDNA ライブラリーをこの抗体でイムノスクリーニングしたところ、陽性のクローンを 1 個得た。現在、このクローンの塩基配列を決定し、ラット各組織における発現パターンを検索中である。

(上里忠良, 三浦直行)

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

フォークヘッド遺伝子 MFH-1 の心大血管系形成における分子機構について、詳しく検討を行った結果、転写因子である MFH-1 遺伝子とエンドセリン受容体 A 遺伝子はパラレルに形態形成に働いていることが明らかになったことは注目に値する。それに一致して、ダブルホモマウスがより重篤な症状を示すことが明らかになった。また、MFH-1 が骨形成因子 BMP-2 による骨分化過程に重要な分子として関わっているという発見は骨の分子生物学的見地からも重要である。

さらに、フォークヘッド遺伝子 LUN のノックアウトマウスも作製した。ホモマウスは出生後すぐに死ぬので、生体にとって新しく単離した LUN 遺伝子は必須の機能を果たしていることが期待される。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

フォークヘッド遺伝子ファミリーについて研究しているのは、日本では当教室だけである。外国では、アメリカに数研究室、ヨーロッパに 2 研究室がファミリーの他の遺伝子について研究を行っている。また、これらの研究室どうしでは、ある場合は競争が、ある場合は共同研究がなされているが、当教室はスウェーデンの研究室と共同研究を行っている。フォークヘッド遺伝子ファミリーはいろいろの器官の形成に関わる遺伝子ファミリーで、そのノックアウトマウスは発現している器官の形成異常となる。ヒト先天性リンパ水腫患者の一部に MFH-1 遺伝子の突然変異が発見されたことから、この遺伝子のリンパ血管形成における役割が注目される。当講座の研究内容は器官形成の分子機構の解明と疾患との関連という発展性の高いものであり、国際的にも大きく評価されている。

15 新聞、雑誌等による報道