

生化学第二

1 構 成 員

	平成11年3月31日現在	平成12年3月31日現在
教授	1人	1人
助教授	1人	1人
助手（うち病院籍）	2人 (0人)	2人 (0人)
大学院学生（うち他講座から）	2人 (0人)	2人 (0人)
研究生	0人	0人
外国人客員研究員	0人	0人
技官	0人	0人
その他（技術補佐員等）	1人	1人
合計	7人	7人

非常勤講師	0人	3人
-------	----	----

2 教官の異動状況

藤田 道也（教授）（～H11.3.31。H11.4.1 停年退官）

三浦 直行（教授）（～H11.3.31秋田大学医学部助教授，H11.4.1以降浜松医科大学教授）

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10年度	平成11年度
原著論文数（うち邦文のもの）	8編 (0編)	4編 (0編)
そのインパクトファクター合計	28.94	13.59
論文形式のプロシーディングズ数	0編	0編
総説数（うち邦文のもの）	3編 (2編)	0編 (編)
そのインパクトファクター合計	1.58	0
著書数（うち邦文のもの）	0編 (編)	0編 (編)
症例報告数（うち邦文のもの）	0編 (編)	0編 (編)
国際学会発表数	0編	2編

(1) 原著論文（当該教室所属の人全部に下線）

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

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 Khatun S, Kanayama N, Sato E, Belayet HM, Kobayashi T, Terao T (1998) Eclamptic plasma stimulates norepinephrine release in cultured sympathetic nerve. *Hypertension* 31: 1343-1349.
- ② Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Sato E, Tokunaga N, Kobayashi T, Terao T (1999) The impact of vasoactive peptides on nitric oxide production in cultured sympathetic neurons. *Neuroscience* 93: 605-609.

インパクトファクターの合計 小計 10年度 [4.25] 11年度 [3.59]

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 Terada K, Aiba N, Yang X-L, Iida M, Nakai M, Miura N, Sugiyama T. (1999) Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B. *FEBS Lett* 448: 53-56.
- ② Furumoto T, Miura N, Akasaka T, Mizutani-Koseki Y, Sudo H, Fukuda K, Maekawa M, Yuasa S, Fu Y, Moriya H, Taniguchi M, Imai K, Dahl E, Balling R, Pavlova M, Gossler A, Koseki H (1999) Notochord dependent expression of MFH-1 and Pax-1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome during the vertebral column development. *Dev Biol* 210: 15-29.
- ③ Masuda Y, Miura N, Suzuki M, Akagawa Y, Kawarada Y, Kawagoe M, Sugiyama T, Shimizu T, Hishikawa Y (1999) The fragment of complement 3a lacking the primary 9 amino acids induces promoting activity on mouse voluntary running. *Tohoku J Exp Med* 189: 21-27.

インパクトファクターの合計 小計 10年度 [0] 11年度 [10.00]

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

- ① Terada K, Nakako T, Yang X-L, Iida M, Aiba N, Minamiya Y, Nakai M, Sakaki T, Miura N, Sugiyama, T (1998) Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J Biol Chem* 273: 1815-1820.
- ② Kawarada Y, Miura N, Sugiyama T (1998) Antibody against single-stranded DNA useful for detecting apoptotic cells recognizes hexadeoxynucleotides with various base sequences. *J Biochem* 123: 492-498.
- ③ Kobayashi S, Iwase H, Kawarada Y, Miura N, Sugiyama T, Iwata H, Hara Y, Omoto Y, Nakamura T (1998) Detection of DNA fragmentation in human breast cancer tissue by an antibody specific to single-stranded DNA. *Breast Cancer* 5: 47-52.
- ④ Yokoi H, Yamama Y, Tsuruo Y, Kawarada Y, Miura N, Sugiyama T, Ishimura K (1998) Leydig cells undergoing apoptosis in the perinatal rat testis. *Acta Histochem Cytochem* 31: 355-361.
- ⑤ Iida M, Terada K, Sambongi Y, Wakabayashi T, Miura N, Koyama K, Futai M, Sugiyama, T (1998) Analysis of functional domain of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 42: 281-285.

- ⑥ Miura N, Kakinuma H, Sato M, Aiba N, Terada K, Sugiyama T (1998) Mouse forkhead (winged helix) gene LUN encode a transactivator that acts in the lung. *Genomics* 50: 346-356.
- ⑦ Schilsky ML, Stockert RJ, Kesner A, Gorla GG, Gagliardi GS, Terada K, Miura N, Czaja MJ (1998) Copper resistant human hepatoma mutant cell lines without metallothionein induction overexpress ATP7B. *Hepatology* 28: 1347-1356.

インパクトファクターの合計 小計 10年度 [24.69] 11年度 [0]

(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
- 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

- ① Terada K, Schilsky ML, Miura N, Sugiyama T (1998) ATP7B (WND) Protein. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1063-1067.
- ② 三浦直行(1998) 転写因子forkheadファミリー. *生化学* 70: 290-296.
- ③ 寺田邦彦,三浦直行,川原田良彦,杉山俊博 (1998) 銅トランスポーターの構造・機能とその遺伝子病. *Mebio* 15: 114-120.

インパクトファクターの合計 小計 10年度 [1.58] 11年度 [0]

(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

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 Iida M, Terada K, Sambongi Y, wakabayashi T, Miura N, Koyam, K, Futai M, Sugiyama, T (1999) Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) by genetic engineering and their expression. Annual meetings of American Society of Biochemistry and Molecular Biology, May, San Francisco.

② Harada S, Sakisaki S, Terada K, Kimura R, Kawaguchi T, Koga H, Taniguchi E, Sasatomi K, Miura N, Suganuma T, Tanikawa K, Sugiyama T (1999) Wilson's disease gene product ATP7B localizes in the late endosomes in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes: participation in biliary copper excretion. The 50th Annual meeting on the American association for the study of the Liver Diseases. November, Dallas.

4 特許等の出願状況

	平成10年度	平成11年度
特許取得数（出願中含む）	0件	0件

[平成10年度]

[平成11年度]

5 医学研究費取得状況

	平成10年度	平成11年度
文部省科学研究費	0件 (万円)	5件 (1860万円)
厚生省科学研究費	0件 (万円)	0件 (万円)
他政府機関による研究助成	0件 (万円)	0件 (万円)
財団助成金	0件 (万円)	3件 (350万円)
受託研究または共同研究	0件 (万円)	0件 (万円)
寄附金その他(民間より)	0件 (万円)	1件 (50万円)

[平成10年度]

- (1) 文部省科学研究費
- (2) 厚生省科学研究費
- (3) 他政府機関による研究助成
- (4) 財団助成金
- (5) 受託研究または共同研究

[平成11年度]

- (1) 文部省科学研究費
 - 三浦直行(代表者) 特定領域研究(A)(2)「フォークヘッドドメイン遺伝子LUNの肺発生, 肺分化, 肺発癌における役割について」300万円(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」350万円(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」610万円(新規)
 - 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」360万円(新規)
 - 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」240万円(新規)
- (2) 厚生省科学研究費
- (3) 他政府機関による研究助成
- (4) 財団助成金
 - 三浦直行(代表者) 武田科学振興財団 医学系研究奨励金「大動脈弓血管を形成する前駆細

胞の分離とその機能の解明」150万円（新規）

三浦直行（代表者） 東京生化学研究会 研究助成金「転写因子MFH-1と先天性大動脈弓奇形：ノックアウトマウスを利用した分子機構・病態の解析」100万円（継続）

三浦直行（代表者） 母子健康協会 小児医学研究助成 「動物モデルマウスを用いた先天性奇形の成因の解析」100万円（新規）

(5) 受託研究または共同研究

6 特定研究などの大型プロジェクトの代表，総括

[平成10年度]

[平成11年度]

7 学会活動

	平成10年度	平成11年度
招待講演回数	0件	1件
国際・国内シンポジウム発表数	0件	2件
学会座長回数	0件	2件
学会開催回数	0件	0件
学会役員等回数	1件	2件

[平成10年度]

(1) 学会における特別講演・招待講演

(2) 国際・国内シンポジウム発表

(3) 座長をした学会名

(4) 主催する学会名

(5) 役職についている学会名とその役職

藤田道也 日本生化学会 評議員

[平成11年度]

(1) 学会における特別講演・招待講演

- ① 三浦直行（1999）肺に特異的な遺伝子群とその機能，第7回肺リモデリング研究会シンポジウム，10月，東京

(2) 国際・国内シンポジウム発表

- ① 三浦直行 (1999) 大動脈弓血管形成とフォークヘッド遺伝子MFH-1, 第72回日本生化学会大会, 10月, 横浜
- ② 三浦直行 (1999) 心臓大動脈形成とフォークヘッド遺伝子MFH-1: ノックアウトマウスを用いた分子機構の解明, 第22回日本分子生物学会年会, 12月, 福岡

(3) 座長をした学会名

- ① 三浦直行 第72回日本生化学会大会シンポジウム, 1999年10月, 横浜
- ② 三浦直行 第22回日本分子生物学会年会ワークショップ, 1999年12月, 福岡

(4) 主催する学会名

(5) 役職についている学会名とその役職

- 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10年度	平成11年度
学術雑誌編集数	1件	0件

[平成10年度]

藤田道也 生体の科学 編集委員

[平成11年度]

9 共同研究の実施状況

	平成10年度	平成11年度
国際共同研究	0件	1件
国内共同研究	0件	3件
学内共同研究	1件	1件

[平成10年度]

(1) 国際共同研究

(2) 国内共同研究

(3) 学内共同研究

寺尾俊彦 (産婦人科) 妊娠中毒症血液中の神経刺激作用に関する研究

[平成11年度]

(1) 国際共同研究

柳沢正史（テキサス大学） 心大動脈血管形成に関する分子機構の解明

(2) 国内共同研究

古関明彦（千葉大学医学部） Pax-1 とMFH-1の発生時における骨格系形成の役割

杉山俊博（秋田大学医学部） ウイルソン病蛋白に関する研究

増田豊（秋田大学医学部） 随意運動に関する研究

(3) 学内共同研究

金山尚裕（産婦人科） 血管作動性ペプチドの神経刺激作用に関する研究

10 産学共同研究

	平成10年度	平成11年度
産学共同研究	0件	0件

〔平成10年度〕

〔平成11年度〕

11 受賞（学会賞等）

〔平成10年度〕

〔平成11年度〕

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 極性細胞におけるエズリン蛋白のリン酸化の生理的意義

エズリンは細胞内裏打ちの蛋白の一つで、アクチンに富む細胞突起に多く存在している。チロシンリン酸化によりエズリンの構造と機能が調節されている。極性細胞であるMDCKに脱リン酸酵素阻害剤であるpervanadateを投与して、細胞内蛋白のチロシン脱リン酸を阻害した。その結果、エズリンのチロシンリン酸化が亢進された。抗エズリン抗体で、エズリンの細胞内局在を観察するとおもしろいことに、エズリンは細胞質から管腔側および基底膜側細胞膜に移動していることが明らかになった。エズリンのチロシンリン酸化により同蛋白の局在が変わることは、細胞形態や機能の変化にエズリンが関与していることを示していると思われる。

（呉一心，上里忠良，藤田道也）

2. 環境ホルモン様物質DEHPの肝臓内小器官分解系に対する効果

環境ホルモン様物質DEHPを動物に投与すると、肝細胞内の小器官、例えばミトコンドリアやパーオキシゾームが増加して肝腫大が起こる。細胞内小器官の分解は主に細胞内のオートファゴゾームという機構で壊されている。この分解の際には、小胞内酸性環境を作るのに空胞ATPase

(V-ATPase) が重要な役割をすることがわかっている。そこで、DEHPがV-ATPase蛋白に影響を与えているという仮説に基づき、DEHP投与後のV-ATPase蛋白の変動をウエスタンブロットで検討してみると、投与後徐々に減少し始め、3週目にはほとんど検出されなくなった。また、DEHP投与を中止するとV-ATPase蛋白が回復してくることも観察した。これらの事実から、DEHPが何らかのメカニズムでV-ATPase遺伝子の転写を抑制し、その結果、細胞内蛋白分解の酸性環境が障害され、小器官の分解が抑制され、ミトコンドリアやパーオキシゾームの細胞内蓄積がおこると推測される。

(王とう, 上里忠良, 三浦直行)

3. 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ヌルマウスにおけるETA遺伝子の発現と、ETAヌルマウスにおける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が判明した。

(三浦直行, 呉一心, 高田橋真帆, 古関明彦¹, 柳沢正史²) ¹千葉大学医学部, ²テキサス大学

4. 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

5. 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LUNのノックアウトマウスを作製した。LUN遺伝子は肺のII型肺胞細胞と細気管支上皮細胞に発現している極めて興味深い遺伝子であり、肺発生、肺分化、肺発癌に重要な役割を果たしていると期待される遺伝子であり、三浦により単離された。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か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。

今後、各臓器における異常と死因について詳細に検討する予定である。

(玉とう, 佐藤英二, 高田橋真帆, 三浦直行)

6. 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、これを兎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。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。ヒト緑内障、甲状腺無形成患者の一部にファミリー遺伝子の突然変異が発見されている。研究内容は分子機構の解明と病気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。

研究の継続性については、藤田道也教授時代の研究テーマは終了しつつあり、新しく教授に就任した三浦直行の主要研究テーマである「器官形成と発癌の分子細胞生物学」に模様替え中である。

15 新聞、雑誌等による報道