

# 生化学第一

## 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	(1 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 構成員の異動状況

北川 雅敏（教授）（～H.12.9.30 九州大学生体防御医学研究所助教授. H12.10.1～現職）

小田 敏明（助教授）（期間中現職）

内田 千晴（助手）（期間中現職）

北川 恭子（助手）（～H.13.2.28 産業医科大学医学部助手. H13.3.1～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）	14 編	(0 編)
そのインパクトファクターの合計	108.533	
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	5 編	
(3) 総説数（うち邦文のもの）	2 編	(2 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）	3 編	(3 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	8 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. Oda T, Uchida C, Miura S (2000) Mitochondrial targeting signal-induced conformational change and repression of the peroxisomal targeting signal of the precursor for rat liver serine:pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase. J. Biochem 127 : 665 – 671.
2. Xue H-H, Zhao D-M, Suda T, Uchida C, Oda T, Chida K, Ichiyama A, Nakamura H

(2000) Store Depletion by Caffeine/Ryanodine Activates Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in Nonexcitable A549 Cells. *J Biochem* 128 : 329-336.

インパクトファクターの小計 [ 4.382 ]

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. Zhao D-M, Xue H-H, Chida K, Suda T, Oki Y, Kanai M, Uchida C, Ichiyama A, Nakamura H (2000) Effect of erythromycin on ATP-induced intracellular calcium response in A549 cells. *Am J Physiol* 278, L726-L736.

インパクトファクターの小計 [ 3.228 ]

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. Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H, Tsuji S. (2000) Expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases interact with hTAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genetics* 26, 29-36.
2. Yokota S, Kamijo K, Oda T (2000) Aggregate formation and degradation of overexpressed wild type and mutant urate oxidase proteins. Quality control of organelle-destined proteins by the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol* 114 : 433-446

インパクトファクターの小計 [ 33.060 ]

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. Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, Moroo I, Morio H, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Saito Y, Hirai A (2000) Geranylgeranyl-pyrophosphate(GGPP), an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by HMG-CoA reductase inhibition. *J Neurosci* 20 : 2852-2859.
2. Dobashi Y, Shoji M, Kitagawa M, Noguchi T, Kameya T (2000) Simultaneous suppression of Cdc2/Cdk2 activity is necessary and sufficient for neuronal differentiation of PC12. *J Biol Chem* 275: 12572-12580.
3. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima Y.A, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K-i, Hatakeyama S (2000) Targeted disruption of Skp2 result in accumulation of Cyclin E and p27<sup>Kip1</sup>, polyploidy, and centrosome overduplication. *EMBO J* 19(9) : 2069-2081.
4. Ishimi Y, Komamura Y, You Z, Omori A, Kitagawa M (2000) Inhibition of Mcm4,6,7

- helicase activity by phosphorylation with cyclin A-Cdk2. J Biol Chem 275 : 16235-16241.
- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K.-i (2000) Phosphorylation at Ser10 a major phosphorylation site of p27<sup>Kip1</sup>, increases its protein stability. J Biol Chem 275 : 25146-25154.
  - Yamanaka A, Hatakeyama S, Kominami K.-i, Kitagawa M, Matsumoto M, Nakayama K.-i (2000) Cell-cycle dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase promoting complex/cyclosome. Mol Biol Cell 11 : 2821-2831.
  - Tsukiyama T, Ishida N., Shirane M, Minamishima YA, Hatakeyama S, Kitagawa M, Nakayama K, Nakayama K.-i (2001) Down-regulation of p27<sup>Kip1</sup> expression is required for development and function of T cells. J Immunol 66 : 304-312.
  - Katoh T, Boissy R, Nagata N, Kitagawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T, Bell D A (2000) Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. Int J Cancer 85 : 46-49.
  - Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, Nakayama K, Nakayama K.-i (2000) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidization of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. FEBS Lett 476 : 306-311.

インパクトファクターの小計

[ 67.863 ]

## (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

- Oda T, Mizuno T, Itoh K, Funai T, Ichiyama A, Miura S (2000) Peroxisomal and mitochondrial targeting of serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase in rat liver. Cell Biochem Biophys 32 : 277-281.
- Ichiyama A, Oda T, Maeda-Nakai E (2000) Primary hyperoxaluria type 1 in Japan. Cell Biochem. Biophys., 32 : 171-176.
- Ichiyama A, Xue H-H, Oda T, Uchida C, Sugiyama T, Maeda-Nakai E, Sato K, Nagai E, Watanabe S, Takayama T (2000) Oxalate synthesis in mammals: properties and subcellular distribution of serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase in the liver. Mol. Urol 4 : 333-340.
- 市山新 セリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸トランスアミナーゼ(SPT/AGT)の性質および細胞内局在から見た尿酸生成 日本尿路結石症研究会第10回学術集会記録集 111-124

### 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）

- 高山達也, 藤田公生, 永井恵理奈, 渡辺晋也, 佐藤詣子, 市山新, 藤江三千男 ヒドロキシ

- 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
  - 1. 松本雅志, 北川雅敏 (2000) ユビキチン-プロテアソームによるシグナル伝達分子の量的制御機構 シグナル伝達がわかる 羊土社 110-116
- 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. 北川雅敏 (2000) RB 経路による細胞周期の制御機構 実験医学増刊 細胞周期研究のフロンティア 18: 27-32

### (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. 市山新 酵素 上代淑人監訳 ハーパー・生化学 原著 25 版 丸善 80-132
  - 2. 市山新 酵素活性の測定法 基礎生化学実験法 第 3 巻タンパク質 II 東京化学同人 3-14
- 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. 北川雅敏 (2000) タンパク質分解システムと細胞周期の制御機構 わかる細胞周期と癌 田矢洋一編 羊土社 68-77

## (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. Kawamoto T, Katoh T, Todoroki H, Kunugita N, Kitagawa K, Matsuno K, Yang M (2000) Habitual and genetic factors that affect urinary background level of 1-hydroxypyrene, American Industrial Hygiene Conference and Exposition, Orlando
2. Kitagawa K, Kunugita N, Todoroki H, Kawamoto T (2000) Possible role of acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 in methoxyacetaldehyde metabolism, International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Yokohama
3. Kawamoto T, Kunugita N, Kitagawa K, Katoh T, Yang M (2000) Effect of CYP2E1 polymorphism on urinary cotinine level after smoking, American Industrial Hygiene Conference and Exposition, Yokohama
4. Kawamoto T, Kitagawa K, Kunugita N, Katoh T, Yang M (2000) Biological monitoring of cigarette smoking and genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes, International Congress on Occupational Health, Singapore
5. Kawamoto T, Kitagawa K, Matsumoto A, Kanagawa Y, Arashidani K, Kunugita N, Matsuno K, Yang M (2001) Urinary 1-pyrenol and 2-naphthol concentration after exposure to kerosene heaters, 40th Annual Meeting of Society of Toxicology, San Francisco
6. Kitagawa K, Foureman G I, Kawamoto T (2001) Aldehyde dehydrogenase(ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde, 40th Annual Meeting of Society of Toxicology, San Francisco
7. Uchida C, Sugiyama T, Oda T (2000) Characterization of elements mediating regulation of basal and cAMP-induced expression of the serine:pyruvate aminotransferase (SPT) gene. 40th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco
8. Yokota S, Oda T, Fahimi H D (2000) The role of 15-lipoxygenase in disruption of peroxisome-membrane and in programmed degradation of peroxisomes in normal rat liver. 11th International Congress on Histochemistry and Cytochemistry. York, UK

#### 4 特許等の出願状況

	平成 12 年度
特許取得数（出願中含む）	1 件

1. 発明者名：小田敏明

発明の名称：フレーム調整リンカー

PCT 出願番号：PCT/JP99/07393 国際出願年月日：1999 年 12 月 28 日

#### 5 医学研究費取得状況

	平成 12 年度	
(1) 文部省科学研究費	4 件	(1,480 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	1 件	( 250 万円)
(4) 財団助成金	1 件	( 50 万円)
(5) 受託研究または共同研究	0 件	( 万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	0 件	( 万円)

(1) 文部省科学研究費

1. 北川雅敏(代表者) 基盤研究(B)(2) 「ユビキチンリガーゼを利用した癌遺伝子産物の分解促進による癌治療」790 万円（新規）
2. 北川雅敏(代表者) 特定領域研究(C)(2) 「分解耐性型 p27<sup>Kip1</sup> の分子デザインと癌治療への応用」510 万円（新規）
3. 北川恭子 (代表者) 奨励研究(A) 「チトクロム P450(CYP)2A6 遺伝子多型が喫煙者の健康に及ぼす影響」110 万円（新規）
4. 内田千晴 (代表者) 奨励研究(A) 「二重のプロモーターに支配されるセリンアミノ転移酵素遺伝子の転写開始機構」70 万円（継続）

(3) 他政府機関による研究助成

1. 北川雅敏 (分担者) 戦略的基礎研究推進事業「脳を守る」 科学技術振興事業団「神経細胞における増殖制御機構の解明」(分担額 250 万円) 研究代表者 中山敬一（九州大学生体防御医学研究所）

(4) 財団助成金

1. 小田敏明 (代表者) 平成 1 2 年度財団法人静岡総合研究機構学術教育研究推進事業費 補助金（一般研究助成）「蛋白質過剰発現ストレスに対する細胞応答」50 万円

#### 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	1 件
(2) 国際・国内シンポジウム発表数	2 件
(3) 学会座長回数	0 件
(4) 学会開催回数	0 件
(5) 学会役員等回数	1 件

### (1) 学会における特別講演・招待講演

1. 北川 恭子 (2000) The significance of the homozygous CYP2A6 deletion on nicotine metabolism: A new genotyping method of CYP2A6 using a single PCR-RFLP 第 18 回産業医科大学学会総会 (記念講演)

### (2) 国際・国内シンポジウム発表

1. 北川雅敏, 中山敬一 (2000) CDK 阻害タンパク質 p27<sup>Kip1</sup> のリン酸化と分解の制御機構, 第 59 回日本癌学会ミニシンポジウム「細胞周期の制御」
2. 中山敬一, 畠山鎮次, 北川雅敏, 小南欽一郎, 中山啓子(2000)サイクリンEおよび p27<sup>Kip1</sup> のユビキチン化因子のノックアウトマウスによる機能解析 第 73 回日本生化学会シンポジウム「蛋白質分解制御による細胞分裂周期の調節」

### (5) 役職についている学会名とその役割

1. 小田敏明 日本生化学会中部支部会幹事

## 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	1 件
(2) 国内共同研究	5 件
(3) 学内共同研究	3 件

### (1) 国際共同研究

1. Fahimi, H.D. (Department of Anatomy and Cell Biology, University of Heidelberg) 「膜崩壊によるプログラムされたペルオキシソーム分解における 15-リポキシゲナーゼの役割に関する研究」

### (2) 国内共同研究

1. 中山敬一 (九州大学生体防御医学研究所) p27<sup>Kip1</sup> の分解機構の解析

2. 林秀敏 (名古屋市立大学薬学部) Smad3 のユビキチン化機構の解析
3. 辻 省次 (新潟大学医学部) ポリグルタミン病発症と基本転写因子 TAF<sub>II</sub>130 機能との関連について
4. 横田貞記 (山梨医科大学医学部) : 1) セリン : ピルビン酸 / アラニン : グリオキシル酸アミノ転移酵素の細胞内局在の機構についての研究, 2) 変性蛋白質産生ストレスによる細胞構造の変化に関する研究
5. 三浦恵 (横浜市立大学医学部) : セリン : ピルビン酸 / アラニン : グリオキシル酸アミノ転移酵素のペルオキシソームへの移行機構の研究

### (3) 学内共同研究

1. 井原勇人 (生理学第二講座)  $\beta$ -catenin-Wnt シグナル伝達系の脂肪細胞分化誘導能の分子メカニズムに関する研究
2. 佐々木茂和, 中村浩淑 (内科学第二講座) ホルモンによるサイクリン D1 の転写抑制機構の研究
3. 宮嶋裕明 (内科学第一講座), 馬場聡 (病理学第二講座) : 蛋白質の変異や凝集により生じる遺伝子疾患の発症機序の解析

## 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)

北川恭子 (2000) The significance of the homozygous CYP2A6 deletion on nicotine metabolism: A new genotyping method of CYP2A6 using a single PCR-RFLP 第 18 回産業医科大学学会, 学会長賞

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

### 1. CDK 阻害蛋白質 p27<sup>Kip1</sup> の分解機構の研究

p27<sup>Kip1</sup> の分解は細胞周期の S 期への進行に深く関与し, 大腸癌, 肺癌, 乳癌, 胃癌などの予後の悪さと分解の亢進が相関している。我々は p27<sup>Kip1</sup> の分解で二つの機構を見い出し, その分子機構を解析している。p27<sup>Kip1</sup> は SCF<sup>Skp2</sup> ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されて, プロテアソームで分解されるのが第一のメカニズムである。Skp2 ノックアウトマウスを作成して解析したところ, 身体の矮小化, 肝臓, 腎臓, 肺胞細胞の多倍数化が観察された。細胞レベルでは p27<sup>Kip1</sup> の蓄積がみられ, 個体レベルで SCF<sup>Skp2</sup> ユビキチンリガーゼが p27<sup>Kip1</sup> の分解に関与していることが証明された (*EMBO J* 2000)。Skp2<sup>-/-</sup>MEF で p27<sup>Kip1</sup> は確かに蓄積しているが, 分解速度が低下しているだけで, 特異的部位での限定分解活性は残存していた。我々はその切断部位を決定し, 現在は p27<sup>Kip1</sup> 切断酵素の同定を行っている。p27<sup>Kip1</sup> 切断酵素活性はヒトの肺癌検体においても検出されたことから, 癌の悪性化への関与が興味深く, 今後の課題である。一方で p27<sup>Kip1</sup> のリン酸化部位の解析の結果,



Ser10 が高頻度にリン酸化されていること、Ser10 リン酸化型 p27<sup>Kip1</sup> は分解速度が低下すること、G0/G1 期に多く S 期に少ないことを見出した。このことから、G1/S 期の p27<sup>Kip1</sup> の分解は Ser10 の脱リン酸化と Thr187 のリン酸化によって制御されていることが示唆された(*J Biol Chem* 2000)。我々は抗リン酸化 Ser10 と Thr187 の抗体を作成し、シグナル伝達を含めた p27<sup>Kip1</sup> のリン酸化に関してのさらなる解析を行っている。

(北川雅敏, 石田典子<sup>1</sup>, 畠山鎮次<sup>1</sup>, 中山啓子<sup>1</sup>, 中山敬一<sup>1</sup>)<sup>1</sup>九州大学生体防御医学研究所

## 2. 予後不良の癌形質形成の分子機構の研究

今後の癌研究において最も重要な問題の一つは予後不良の癌形成の原因究明とその治療への応用である。我々を含めたいくつかのグループから、予後不良の大腸癌、乳癌、肺癌、胃癌において CDK 阻害タンパク質 p27<sup>Kip1</sup> の分解亢進が起こっていることが報告されている。しかし現在のところ臨床病理学的解析に留まり、悪性度と p27<sup>Kip1</sup> の分解亢進との因果関係は解明されていない。本研究では以下の事項に関して分子生物学的解析を行い、予後不良の癌形質形成の分子機構の解明と治療への応用を目指している。

- a. p27<sup>Kip1</sup> コンディショナルノックアウトヒト培養細胞の作成
- b. p27<sup>Kip1</sup> のユビキチン化促進分子高発現細胞の作成
- c. 上記細胞および臨床癌検体において発現が変動した遺伝子のプロテオームおよびトランスクリプトーム解析

(北川雅敏, 北川恭子)

## 3. ラット肝セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素の遺伝子発現メカニズムについての研究

ラット肝セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素 (SPT) の発現は、転写レベルでの制御が SPT 遺伝子産物の細胞内局在を決定する点に大きな特徴がある。ミトコンドリア局在型 SPT は、この遺伝子のエクソン 1 上にある 2 カ所の転写開始部位のうちの上流側からの転写産物に由来しており、この転写活性は定常状態では非常に低いが、細胞内 cAMP 濃度の上昇によって protein kinase A (PKA) 依存性に著しい誘導を受ける。一方、下流側転写開始部位からは恒常的にペルオキシソーム局在型 SPT の mRNA が合成され、これは cAMP/PKA の影響をほとんど受けない。このようにラット肝 SPT 遺伝子は、異なるメカニズムで制御する二つのプロモーターを備えていると考えられる。そこで上流または下流の転写を支配するプロモーター領域および転写制御因子の検索を進めた。下流側プロモーターについては、転写開始部位を含む約 20bp の領域内に存在する 3 カ所の C/EBP 結合部位を介して、C/EBP $\alpha$  および C/EBP $\beta$  が転写活性化に寄与することがわかった。C/EBP 結合部位と一部重なる抑制性のシスエレメントの存在も示唆されたが、これに結合する転写因子は未同定である。上流側転写転写開始には Sp1 と AP-2 が正の制御因子として同定された。AP-2 は転写開始部位と重なる領域に結合し、PKA 活性非依存的に上流プロモーター活性を増強した。Sp1 は転写コアクチベーター CBP と協調的に働いて、basal 活性と PKA 誘導性活性を共に増強することが示された。

(内田千晴, 杉山壮, 小田敏明, 北川雅敏, 市山新)

#### 4. ポリグルタミン病発症と基本転写因子 TAF<sub>II</sub>130 機能との関連についての研究

ポリグルタミン病は常染色体優性遺伝性の神経変性疾患で、ハンチントン病をはじめとして、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症 1 型、その他少なくとも 8 疾患が知られている。これらの疾患はポリグルタミン鎖をコードしている CAG リピートが異常に伸長することが発症原因となっている。従来、伸長ポリグルタミン鎖は細胞内に蓄積して凝集体や核内封入体を形成し、これが細胞に対して毒性作用を示してアポトーシスを引き起こすことが病態機序と考えられてきた。しかし、最近、核内封入体の存在自体が毒性に作用するというよりは、伸長ポリグルタミン鎖を有する変異蛋白質が核に移行して、核の機能障害をおこすのではないかという考えが有力になっている。そこで、核内転写因子とポリグルタミン鎖との相互作用について検討を行ったところ、基本転写因子の構成分子のひとつである TATA-binding protein-associated factor (TAF<sub>II</sub>130) に伸長ポリグルタミン鎖が結合し、CREB (cAMP-responsive element-binding protein) 依存性の転写を強く阻害することが明らかとなった (Nature Genetics 2000)。CREB 依存性の転写活性化は、神経細胞の生存、可塑性などに重要な役割を果たしていることから、CREB 依存性の転写活性化の抑制が神経細胞の機能障害の一原因となっていると推定される。

(内田千晴, 辻 省次<sup>1</sup> 他)<sup>1</sup>新潟大学医学部

#### 5. セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素(SPT/AGT)の細胞内オルガネラ局在化機構についての研究

ラット肝セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素 (SPT) は単一の遺伝子より 2 種の mRNA, 2 種の翻訳産物が合成され、N 末に余分のアミノ酸配列(ミトコンドリア移行配列, MTS)を持つ方はミトコンドリアへと選択的に運ばれ、持たない方は C 末付近のペルオキシソーム移行配列 (PTS) によりペルオキシソームへと運ばれることを明らかにした。また、C 末 3 アミノ酸を中心とする Ps 移行配列領域を特定し、その機能発揮には特に C 末付近の高次構造の維持が必要であることを示した。この C 末領域は Coiled-Coil の構造が強く示唆されており、SPT の二量体構造と PTS 機能との密接な関連が想像された。Mt 移行配列の存在が Mt SPT 前駆体の高次構造変化、特に C 末領域での構造変化をもたらし、それにより Ps 移行配列の機能が抑制され、結果的に Mt SPT 前駆体は両移行配列を持つにもかかわらず MTS の機能のみ発揮され選択的に Mt へと輸送されることが推察された。

(小田敏明, 三浦恵<sup>1</sup>, 横田貞記<sup>2</sup>, 市山新)<sup>1</sup>横浜市大, <sup>2</sup>山梨医大

#### 6. 変性蛋白質がもたらすストレスによる細胞構造の変化に関する研究

ミトコンドリア (Mt) SPT 前駆体を培養細胞中で過剰発現させたとき小胞体膜由来の特異的な膜構造物が形成され、その中に Mt SPT が濃縮されていることを見出した。SPT 以外の酵素でも Mt 移行配列を持ったキメラ酵素で同様な特異的膜構造物が出現し、産物の隔離、分解が起こっていることを示唆する結果を得た。Mt 移行配列 を持った蛋白質は変性状態にあると言われているので、正常蛋白質を変性させると予想される「疎水性アミノ酸、ロイシンの 10 連続残基」を導入した変異蛋白質でも解析を行った所、同様の細胞内変化を観察した。我々の見出した特異的な小胞体膜構造物は、変性蛋白質のような細胞毒性を示すと思われる蛋白質を隔離、分解する機能、すなわち細胞内の環境維持機能を担っているのではないかと推量している。

(小田敏明, 市山新, 上条桂樹<sup>1</sup>, 横田貞記<sup>2</sup>)<sup>1</sup>信州大学, <sup>2</sup>山梨医大

## 7. 蛋白質の変異や凝集により生じる遺伝子疾患の発症機序に関する研究

本研究プロジェクトは本学で扱っている 4 つの遺伝子疾患（高尿酸血症 I 型，無セルロプラスミン血症，Hermansky-Pudlak 症候群，アミロイドーシス）について，原因蛋白質の凝集に着目してそれらの共通の発症機構を探ろうという試みである。4 つの系で基礎的情報量に差がある現段階では同じ実験系での解析の開始は少し無理がある状況であるが，徐々に情報量を同じレベルまで持っていく，蛋白質の過剰発現による細胞応答の解析を行いたいと考えている。

(小田敏明<sup>1</sup>，宮嶋裕明<sup>2</sup>，馬場聡<sup>3</sup>)<sup>1</sup>生化学第 1，<sup>2</sup>内科学第一，<sup>3</sup>病理学第二

## 13 この期間中の特筆すべき業績，新技術の開発

「フレーム調整リンカー」を開発し，国内および国際特許を出願した。(小田敏明)

## 14 研究の独創性，国際性，継続性，応用性

### 1. 予後不良の癌の診断治療への応用を目指した CDK 阻害蛋白質 p27<sup>Kip1</sup> の分解機構の研究

癌の早期診断や外科手術の進歩により，生存率は確実に上昇しているが，一方で予後不良の癌に対する治療は未解決であり，その研究は癌研究の最重要課題である。本研究は予後不良の癌の形成機構を分子生物学的に解明することによってその治療を目指す，独創的な研究である。本研究では予後不良因子として細胞周期制御因子である p27<sup>Kip1</sup> に焦点を絞った。我々を含めたいくつかのグループから，予後不良の大腸癌，乳癌，肺癌，胃癌において CDK 阻害タンパク質 p27<sup>Kip1</sup> の分解亢進が起こっていることが報告されている (*Am J Pathol* 1998)。さらに我々は，p27<sup>Kip1</sup> の二種類の分解機構があることを *in vitro* 系および Skp2 ノックアウトマウスを作成して見出している (*J Biol Chem.* 1999, *EMBO J* 2000)。また p27<sup>Kip1</sup> のリン酸化部位の解析からリン酸化によって分解が阻害される部位を見出しており (*J Biol Chem* 2000)，p27<sup>Kip1</sup> に関する基礎研究では世界的に先んじている。本研究の成果は細胞の悪性化のメカニズムの解明という学術的意義だけでなく，予後不良の癌の診断治療に繋がるのが期待でき，社会的意義も大きい。

### 2. セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素に関する研究

本研究は，本学生化学第一講座が世界に先駆けてラット酵素 cDNA のクローニングに成功し，その後発展させてきた独自の研究課題である。これまで国内外の関連した研究者からの依頼に応じて SPT cDNA, SPT 抗体の供給を行ってきた。最近ではその転写制御機構を解明した。さらにミトコンドリア SPT 前駆体の過剰発現で細胞内膜構造が大きく変化する現象を見つけ，過剰発現蛋白質による新規の細胞応答機構の解析へと研究の範囲が広がりつつある。

## 15 新聞，雑誌等による報道

小田敏明：「オルガネラの機能と成り立ち」シリーズ -- 生命科学の最先端. 静岡新聞 平成 13 年 3 月 3 日夕刊 10