

生化学第一

1 構成員

	平成18年3月31日現在
教授	1人
助教授	1人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助手（うち病院籍）	2人（0人）
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	1人
大学院学生（うち他講座から）	9人（5人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	0人
その他（技術補佐員等）	2人
合 計	16人

2 教員の異動状況

- 北川 雅敏（教授）（H12. 10. 1～現職）
 小田 敏明（助教授）（H3. 8. 1～現職）
 内田 千晴（助手）（H2. 4. 1～現職）
 北川 恭子（助手）（H13. 3. 1～現職）

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成17年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	7編（0編）
そのインパクトファクターの合計	28.38
(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）	0編（0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（0編）
そのインパクトファクターの合計	0

(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. Uchida, C., Miwa, S., Isobe, T., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Yasuda, H. and Kitagawa, M.:

Effect of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. *FEBS Letters* 580:1753-1758, 2006.

2. Isobe, T., Uchida, C., Hattori, T., Kitagawa, K., Oda, T. and Kitagawa, M.: Ubiquitin-dependent degradation of adenovirus E1A protein is inhibited by BS69. *Biochem Biophys Res Commun.* 339 : 367-374, 2006.
3. Miwa, S., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Sugimura, H., Yasuda, H., Nakamura, H. Chida K. and Kitagawa, M.: Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 340 : 54-61, 2006.
4. Gao, Y., Kitagawa, K., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T. and Kitagawa, M.: Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor. *H. J. Med. Sci.* 81: 101-105, 2006.

インパクトファクターの小計 [9.41]

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. Kikuchi, H., Yamashita, K., Kawabata, T., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Sugimura, H. and Konno, H.: Immunohistochemical and genetic features of gastric and the metastatic liver GISTs, sequential analyses. *Cancer Sci.* 97, 127-132, 2006.
2. Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *Kidney Int.* 69 : 1733-1740, 2006.

インパクトファクターの小計 [8.74]

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. Chen, Z., Foster, M. W., Zhang, J., Mao, L., Rockman, H. A., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K-i, Hess, D. T. and Stamler, J. S. : An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 102:12159-12164, 2005

インパクトファクターの小計 [10.23]

(4) 著 書

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. Isse T., Oyama T., Matsuno LK., Kitagawa K., Ogawa M., Kinaga T., Suzuki-Narai R., Yamaguchi T., Uchiyama I and Kawamoto T. Acetaldehyde elimination changes in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase 2 activity. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism-12*: 33-41

4 特許等の出願状況

	平成17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17年度
(1) 文部科学省科学研究費	9件 (2,910万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 (500万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)
(4) 財団助成金	0件 (0万円)
(5) 受託研究または共同研究	0件 (0万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	0件 (0万円)

(1) 文部科学省科学研究費

1. 北川雅敏（代表者）小田敏明，内田千晴，北川恭子 基盤研究（B）「ユビキチンシステムを介したRB癌抑制経路の制御と新規癌化機構の検証」530万円（継続）
2. 北川雅敏（代表者）内田千晴，北川恭子，小田敏明 特定領域研究「RBファミリータンパク質のリン酸化と分解を介した細胞周期制御機構」190万円（継続）
3. 北川雅敏（代表者）北川恭子，内田千晴，小田敏明 特定領域研究「p53標的遺伝子Pirh2の新たなユビキチン化標的分子とがん化との関連」830万円（新規）
4. 北川雅敏（代表者）内田千晴，北川恭子，小田敏明，服部隆行 萌芽研究「個体レベルでの細胞周期のリアルタイムイメージングの試み」200万円（新規）
5. 小田敏明（代表者）北川雅敏，内田千晴 特定領域研究「タンパク質の誤局在，過剰産生ストレスに対する膜構造変化を伴う細胞応答」290万円（新規）
6. 小田敏明（代表者）北川雅敏，内田千晴 基盤研究（C）「過剰産生タンパク質のユビキチン化と誘導性小胞体膜構造物による囲い込み」240万円（新規）
7. 内田千晴（代表者）基盤研究C（新規）『新規ユビキチンリガーゼによるCDK阻害蛋白質p27^{kip1}の分解と癌化との関連』180万円（新規）
8. 北川恭子（代表者）北川雅敏 基盤研究（C）「新しい癌の分子標的としてのp27発現量低下応答遺伝子の解析」260万円（新規）
9. 服部隆行（代表者）若手研究（B）「CDK阻害タンパク質p27kip1の新規ユビキチンリガーゼの細胞癌化への関与」190万円（新規）

(2) 厚生科学研究費

北川雅敏（分担者）第3次対がん総合戦略事業「細胞周期関連蛋白質の分解制御機構に関する研究」500万円 代表者 国立がんセンター研究所 田矢洋一

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	0件	1件
(2) シンポジウム発表数	0件	3件
(3) 学会座長回数	0件	2件
(4) 学会開催回数	0件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	1件
(6) 一般演題発表数	2件	

(1) 国際学会等開催・参加

5) 一般発表

ポスター発表

1. Abe, K., Hattori, T., Isobe, T., Kikuchi, H., Uchida, C., Kitagawa, K., Oda, T., and Kitagawa, M.: Regulation of protein secretion via SRb ubiquitination by a ubiquitin ligase. International Symposium on “Life of Proteins”. Oct. 30-Nov. 3, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center (Japan)
2. Oda, T., Hattori, T., Kitagawa, K., Uchida, C., Yokota, S., and Kitagawa, M.: Induction of novel endoplasmic reticulum membrane structure by the overproduction and mislocalization of proteins. International Symposium on “Life of Proteins”. Oct. 30-Nov. 3, 2005, Awaji Yumebutai International Conference Center (Japan)

(2) 国内学会の開催・参加

2) 学会における特別講演・招待講演

北川雅敏 日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会 特別講演「細胞周期，ユビキチンをキーワードとした癌研究の新展開」2006年3月，浜松

3) シンポジウム発表

北川雅敏 第64回日本癌学会総会「CDK阻害タンパク質p27^{Kip1}の新たな分解機構」2005年9月 札幌

北川雅敏，高 芸，北川恭子 第28回日本分子生物学会総会「p27^{Kip1}の発現量低下に伴う癌の予後不良化の分子メカニズム」2005年12月 福岡

服部隆行，磯部智康，安倍健滋，菊池寛利，内田千晴，小田敏明，北川恭子，北川雅敏 第28回日本分子生物学会総会「CDK阻害蛋白質p27^{Kip1}の新たなユビキチンリガーゼ」2005年12月 福岡

4) 座長をした学会名

北川雅敏，畠山鎮次 第64回日本癌学会総会 シンポジウム「がんとユビキチンプロテアソーム系」2005年9月 札幌

北川雅敏，嘉村 巧 第28回日本分子生物学会総会 ワークショップ「細胞周期調節因子の

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

北川雅敏 日本生化学会評議委員

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリース数は除く）	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリース

北川雅敏 計5回 Oncogene 2回（英国），Cancer Science（日本），Journal of Biochemistry 2回（日本）

9 共同研究の実施状況

	平成17年度
(1) 国際共同研究	0件
(2) 国内共同研究	5件
(3) 学内共同研究	4件

(2) 国内共同研究

中山敬一（九大），中山啓子（東北大） Skp2/p27経路を介した細胞悪性化機構

上條岳彦（信州大） Mdm2の細胞がん化能の解析

林 秀敏（名市大） TGF- β -Smad系におけるユビキチンシステムの関与

太田智彦（聖マリアンナ医大） BRCA1を介した乳がん発症機構と応用

横田貞記（山梨大学医学部） 蛋白質過剰産生ストレスによる細胞内膜構造の変化に関する研究

(3) 学内共同研究

山本龍夫，菱田明（内科学第一） TGF- β -Smad系を介した腎炎発症の分子機構

今野弘之（外科学第二） Skp2/p27経路を介した消化器腫瘍形成機構の研究

千田金吾，中村浩淑（内科学第二） RB経路の崩壊による細胞癌化機構の研究

宮嶋裕明（内科学第一） C末欠損型変異セルロプラスミンの細胞内移行と細胞応答

10 産学共同研究

	平成17年度
産学共同研究	1件

1. 安田秀世（日本製粉） Mdm2/MdmXの機能とその制御機構の解析

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. RBタンパク質の分解機構の研究

RB経路は細胞周期のG1期からS期への進行を抑制的に制御している癌抑制経路である。臨床の

癌ではこのRB経路の構成因子であるRB遺伝子の欠失や変異，p16遺伝子の変異やメチル化による抑制，サイクリンやCDKの過剰発現などが高い頻度で起こっている。一方で予後不良の癌におけるp27タンパク質の分解亢進も注目されている。我々はRBタンパク質の分解が亢進した場合も細胞癌化に繋がると考え、RBタンパク質の分解メカニズムを解析した。その結果、p53のユビキチンリガーゼMdm2がRBタンパク質をユビキチン化し、プロテアソーム依存的分解に導くことを発見した。そしてRBタンパク質はp53非依存性にMdm2によって分解されること、ヒト肺癌組織においてRBタンパク質とMdm2の発現が逆相関することを明らかにした (Miwa et. al. *BBRC* 2006)。過剰発現等によりMdm2活性が著しく亢進した培養癌細胞およびヒト肺癌組織においては、RBタンパク質とp53両方の分解が促進され、細胞形質の悪性化が進むと考えられた。さらに我々は、Mdm2と協調してp53のユビキチン化促進とp53不活化を起こすMdmXが、RBタンパク質のユビキチン化と分解を抑制することを見いだした。しかもp53のユビキチン化の促進能を失った変異MdmXも、RBタンパク質のユビキチン化を抑制した。すなわち、MdmXはp53とRBタンパク質のユビキチン化を異なった作用機序で制御しており、p53の安定性に影響を与えずにRBタンパク質のみを安定化できるポテンシャルを持つと考えられた (Uchida et. al. *FEBS letters* 2006)。

(内田千晴，三輪清一¹，北川雅敏)²内

2. アデノウイルス癌遺伝子産物の分解とその制御因子BS69の機能の研究

アデノウイルスE1A (Early Region 1A) 遺伝子はアデノウイルス感染細胞で最初に発現する遺伝子で、ウイルスの増殖に必須であり、細胞の不死化やトランスフォーメーション、アポトーシスなどを誘導する。アデノウイルス感染細胞において、E1Aタンパク質は速やかに分解され、その半減期は数時間以内であるとされている。我々は、シクロヘキシミド処理後の追跡実験により、哺乳動物細胞におけるE1Aタンパク質の生物学的半減期が数時間以内であることを確認した。また、この分解がプロテアソーム阻害剤で抑制されることが示された。さらに、ユビキチンの共発現実験により、E1Aタンパク質のユビキチン化によるラダーが検出され、哺乳動物細胞内でE1Aタンパク質がユビキチン化修飾を受けることが示された。一方、E1Aと相互作用をもつ細胞内因子の1つとして、BS69タンパク質が知られている。免疫沈降法により両者の相互作用を検討した結果、BS69は、C末端のMYNDドメインを介してE1Aと結合することがわかった。また、哺乳動物細胞への共発現実験によりBS69がE1Aのユビキチン化に与える影響を検討した結果、BS69はMYNDドメイン依存的にE1Aのユビキチン化を抑制することが判明した。さらにBS69を共発現させることにより、E1Aタンパク質の哺乳動物細胞内での分解の遅延が見られた。

これらのことから、哺乳動物細胞内において、E1Aタンパク質の少なくとも一部は、ユビキチン-プロテアソーム系を介した分解を受けており、宿主細胞内因子であるBS69タンパク質はE1Aのユビキチン化を阻害することにより、その生物学的半減期を延長させると考えられた (Isobe et. al. *BBRC* 2006)。

(磯部智康，北川雅敏)

3. CDK阻害蛋白質p27の分解機構の研究

CDK阻害蛋白質p27はG1サイクリン-CDK複合体の活性を阻害することで、細胞周期のG1期か

らS期への進行を負に制御している。p27の転写量は細胞周期を通して一定であり、その量的制御は主にユビキチン-プロテアソームシステムを介したタンパク分解によってなされている。これまでの研究で、p27のS期ユビキチンリガーゼとしてSCF-Skp2及びG0/G1期のユビキチンリガーゼとしてKPC1/2複合体が報告されており、p27の量的制御メカニズムが複数存在することが注目されている。最近我々はp27のN末端をbaitとした酵母two-hybrid法により、新規p27結合因子群KNBPs (Kip1 N-terminal Binding Proteins) を単離した。これら因子のうちKNBP1は分子内にユビキチンリガーゼの活性中心であるRING finger domain構造を有し、ユビキチンリガーゼ活性を示した。KNBP1は哺乳動物細胞内でもp27と結合し、両者は核内で局在を共にした。さらに、哺乳動物細胞にKNBP1とp27を共発現させた時、KNBP1はp27のユビキチン化を著明に増強することがわかった。リコンビナントタンパクを用いた*in vitro*再構成系においてもKNBP1はintactなRING finger domain依存的にp27をユビキチン化した。また、RNA干渉法により内因性のKNBP1の発現を抑制すると、Skp2非依存的にp27の蓄積がみられた。同調細胞を用いた実験ではKNBP1はSkp2に先立ちG1期に発現することが明らかになった上、KNBP1をノックダウンするとG1/S移行期におけるp27の安定化が認められた。以上の結果より、KNBP1はp27の第3のユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。またG1/S移行期におけるp27の核内での分解にKNBP1が関与していることが強く示唆された。

(服部隆行, 磯部智康, 北川雅敏)

4. 蛋白質過剰産生ストレスに対する細胞内膜構造変化を伴う細胞応答の研究

小胞体膜酵素であるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) を培養細胞内に過剰発現させると特異膜構造物 (クリスタロイド小胞体, cER) の形成が誘導されることが知られている。我々はこれまで報告のある小胞体膜酵素数種以外にもミトコンドリア移行型セリン：ピルビン酸アミノ転移酵素 (SPTm) 前駆体の過剰発現で同様の膜構造物が形成誘導されることを見いだした。蛍光免疫染色により、産物の発現量、細胞内分布、cER形成の有無、について相互の関係を定量的に解析したところ、cERを誘導していない細胞では、産物は本来の局在場所 (ALDHでは小胞体膜、SPTmではミトコンドリア) のみに局在していた。ところが、cERが誘導されている細胞では、産物が細胞全体 (本来の局在場所、誘導されたcER、細胞質) に発現しており、その量もcERが誘導されていない細胞に比べ、格段に多かった。これらの結果は細胞にはタンパク質の「質」「量」「存在場所」を検知するシステムが存在し、そのバランスが適正でないときは特殊な小胞体が誘導され、その是正に働くのではないかと考えられた。小胞体による特異膜構造物形成は細胞質におけるある種の (例えば、細胞にとって不都合な) タンパク質の認識・隔離機構である可能性が高いと現在考えている。

(小田敏明, 横田貞記¹, 北川雅敏) ¹山梨大

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. 癌抑制遺伝子産物RBの量的制御機構の異常を介した発がん機構に関する新知見

上述したように、2大癌抑制遺伝子産物であるRBタンパク質とp53がMdm2という同一のユビキチンリガーゼによってユビキチン-プロテアソームシステムを介して量的制御されていることを

見いだした。Mdm2は癌遺伝子としてRBタンパク質とp53という2大癌抑制遺伝子産物を分解に導き、細胞がん化に寄与していることが我々に知見から明らかになった。我々はこれに関連した発見として①RBタンパク質の分解とその亢進による細胞悪性化はp53に非依存的であること、②Mdm2類似蛋白であるMdmXは両者の分解を相反的に調節している、という興味深い知見を見いだした。一連の本研究成果は、RBタンパク質の量的制御の異常がRB経路の攪乱を誘導して細胞をがん化に導く、という新たな癌機構の提唱となると考えている。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

1. ユビキチン-プロテアソームシステムは特異的で積極的なタンパク質分解機構である。このシステムは増殖、分化など細胞内の様々な生理機能を緻密に制御しており、このメカニズムの発見者3人に対し2004-5年度にノーベル賞が与えられたことからその重要性、注目度の高さが伺える。我々はこのユビキチン-プロテアソームシステムに加え、細胞周期、がんをキーワードに先端的研究を実行してきた。そして上述の様にRBタンパク質、p27などの癌抑制遺伝子産物の分解のメカニズムを明らかにし、その分解の異常亢進が癌や細胞悪性化に繋がることを示してきた。この成果は新たながんの分子標的を見いだしたことに他ならず、診断や治療への展開も視野に入れて研究している。