

生化学第一

1 構成員

	平成 14 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（ 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）	0 人（ 人）
研究生	0 人
外国人客員研究員	1 人
技官（教務職員を含む）	0 人
その他（技術補佐員等）	1 人
合 計	7 人

2 教官の異動状況

- 北川 雅敏（教授）（期間中現職）
 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）（期間中現職）

3 研究業績

数字は小数 2 位まで。

	平成 13 年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	6 編（0 編）
そのインパクトファクターの合計	27.28
(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（1 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
(6) 国際学会発表数	0 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. Sugiyama, T., Uchida, C., Oda, T., Kitagawa, M., Hayashi, H. and Ichiyama, A.: Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein in regulation of the rat serine : pyruvate/alanine : glyoxylate aminotransferase gene expression. *FEBS Let.* 508 : 16-22, 2001.

インパクトファクターの小計 [3.44]

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. Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M. and Yasuda, H. (2001) Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat Axam, which is an Axin-binding protein promoting b-catenin degradation. *J. Biol. Chem.* 276 : 39060-39066.
2. Kitagawa, K., Kunugita, N., Kitagawa, M. and Kawamoto, T. (2001) CYP2A6*6, a novel polymorphism in Cytochrome P450 2A6, has a single amino acid substitution (R128Q) that inactivates enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 276 : 17830-17835.
3. Katayama, K., Dobashi Y., Kitagawa, M., Kamekura, S., Kawai, M., Kadoya Y., and Kameya T. (2001) Overexpression of Cdk4/Cyclin D1 induces apoptosis in PC12 cells in the presence of trophic support. *FEBS Let.* 509 : 382-388.
4. Takemura, M., Yamamoto, T., Kitagawa, M., Taya Y., Akiyama, T., Asahara, H., Linn S., Suzuki, S., Tamai, K. and Yoshida, S. (2001) Stimulation of DNA polymerase α activity by cdk2-phosphorylated Rb Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 : 984-990, 2001.
5. Yokota, S., Oda, T. and Fahimi, H.D. (2001) The role of 15-lipoxygenase in disruption of the peroxisomal membrane and in programmed degradation of peroxisomes in normal rat liver. *J. Histochem. Cytochem.*, 49 : 613-621.

インパクトファクターの小計 [23.84]

(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

(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. 北川雅敏 (2001) β -カテニンの分解と癌「タンパク質分解の最前線2001」実験医学増刊 19 : 83-89

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

(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. ユビキチン-プロテアソームシステム「新女性医学体系：41巻 婦人科腫瘍の分子・細胞生物学 p143-153」中山書店

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

(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

(6) 国際学会発表

4 特許等の出願状況

	平成 13 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 13 年度
(1) 文部科学省科学研究費	5 件 (1,700 万円)
(2) 厚生科学研究費	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	4 件 (395 万円)
(5) 受託研究または共同研究	1 件 (50 万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	1 件 (50 万円)

(1) 文部科学省科学研究費

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」 630 万円 (継続)

北川雅敏 (代表者) 特定領域研究 (C) (2) 「p27Kip1 のコンデシヨナルノックアウトによるヒト腫瘍の悪性化の解析」 350 万円 (新規)

北川雅敏 (代表者) 特定領域研究 (A) (2) 「RB タンパク質の部位特異的リン酸化を介した標的遺伝子選択的制御機構」 240 万円 (新規)

北川恭子 (代表者) 特定領域研究 (C) (2) 「癌関連細胞周期調節遺伝子のソマティックノックアウト細胞の作成とその解析」 380 万円 (新規)

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」 100 万円 (継続)

(4) 財団助成金

北川雅敏 (代表者) テルモ科学振興財団一般研究助成 「タンパク質分解システムの医療への応用」 100 万円 (新規)

北川雅敏 (代表者) 武田科学振興財団医学系研究奨励金 「p27 ノックアウトヒト細胞を用いた予後不良の癌形質形成の分子メカニズムの解析とその応用」 150 万円 (新規)

北川雅敏 (代表者) 持田記念医学薬学振興財団研究助成金 「標的結合型プロテアーゼを用いた血中 IL6 および TNF α の除去」 100 万円 (新規)

北川雅敏 (代表者) 静岡総合研究機構学術教育研究推進事業費補助金 「予後不良の癌の診断治療を目指した癌関連蛋白質の分解機構の研究」 45 万円 (新規)

(5) 受託研究または共同研究

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」 50 万円 代表者 九州大学生体防御医学研究所教授 中山敬一

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 13 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	0 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	3 件

(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

2. 内田千晴 日本生化学会中部支部会幹事
3. 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

	平成 13 年度
学術雑誌編集数	0 件

9 共同研究の実施状況

	平成 13 年度
(1) 国際共同研究	0 件
(2) 国内共同研究	1 件
(3) 学内共同研究	5 件

(2) 国内共同研究

1. 横田貞記（山梨医科大学医学部）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

1. 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
2. 千田金吾，中村浩淑（内科学第二講座）RB 経路の崩壊による肺癌発生機構の研究
3. 山本龍夫，菱田明（内科学第一講座）腎炎発症の分子メカニズムの研究
4. 今野弘之，中村達（外科学第二講座）Skp2 を介した消化器癌の悪性度亢進機構の研究
5. 井原勇人（生理学第二講座） β -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

10 産学共同研究

	平成 13 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. CDK 阻害蛋白質 p27 の分解機構の研究

p27 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。よって p27 の分解機構を解明することは非常に重要である。我々はこれまでの研究により p27 が複数の分解機構で量的調節されていることを見出し，その分子機構を引き続き解析している。p27 は SCF^{Skp2} 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。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 の蓄積がみられ、個体レベルで SCF^{Skp2} ユビキチンリガーゼが p27 の分解に関与していることが証明された。Skp2^{-/-}MEF で p27 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 切断酵素の同定を行っている。p27 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 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 は分解速度が低下すること、G0/G1 期に多く S 期に少ないことを報告した。そこで Ser10 のリン酸化を認識する分子を探索したところ、その候補が得られ、現在機能解析中である。

(服部隆行, 北川恭子, 内田千晴, 北川雅敏)

2. 予後不良の癌形質形成の分子機構の研究

ヒトの癌において p16, RB の欠失や変異, サイクリンの過剰発現, CDK4/6 の過剰発現や制御変異などが高頻度に報告されているが p27 の遺伝子異常はほとんど見られない。その代わり予後不良の大腸癌, 乳癌, 肺癌, 胃癌等において p27 タンパク質の分解亢進が高い頻度で起こっていることが我々を含めた複数のグループから報告されている。しかしながら臨床病理学的な解析に留まり, p27 タンパク質の分解亢進により予後不良化が実際に起きるか? そしてそれはどんなメカニズムかは全く報告がない。本研究では悪性度の低いヒト癌細胞株に p27 タンパク質の分解亢進を起こさせる, あるいは p27 遺伝子を細胞レベルでノックアウトすることにより p27 欠乏細胞を作製し, それらに悪性度の増進が見られるかを評価することで両者の因果関係を証明する。我々は Skp2 高発現細胞を樹立し p27 が減少していることを確認した。さらに, マイクロアレイを用いて発現変動する遺伝子を解析した。その結果数種の変動遺伝子を見いだした。今後, これらの機能解析を行い, 臨床の癌における病理学的検索と併せて, p27 低下に伴う予後不良のキー遺伝子を同定する。一方でヒト腫瘍細胞の p27 をコンディショナルノックアウトするアプローチも進行中である。現在 p27 の分解が亢進していない大腸癌細胞 HT116 にターゲティングベクターを導入し, 相同組み換え体を PCR でスクリーニングしている。ノックアウト細胞取得後は, *in vitro* および *in vivo* 系での転移浸潤能, 血管遊走能などの癌形質を解析する。さらにマイクロアレイ解析を行い p27 の欠失で発現が変動する遺伝子を検索する。臨床の癌検体のマイクロアレイによる比較では検体間のバックグラウンドに違いがあるため予後不良の癌形質に関与する遺伝子を同定することは困難である。一方で, 本研究ではバックグラウンドが同一なためにそれが可能になり, 候補遺伝子を絞り込んだ後, 将来的には臨床の癌検体を用いて検証する。

(北川恭子, 高芸, 北川雅敏)

3. RB タンパク質の分解機構の研究

癌細胞の無限増殖能は細胞周期制御機構の破綻によるところが大きい。特に癌抑制遺伝子産物である RB タンパク質と p53 が中心となる RB 経路および p53 経路の異常がほとんどの細胞癌化に寄与するといっても過言でない。しかしながら RB 経路に関しては依然として不明の部分が多い。RB タンパク質は E2F をはじめ, 多くの転写因子や分化調節因子と結合し, それらの標的遺

伝子の発現を制御していると考えられている。RB タンパク質は基本的に正常細胞分裂だけでなく分化時や老化においても多くの遺伝子を緻密にかつ個別に制御しているがその分子機構は全く不明である。これまで RB 遺伝子の点突然変異、欠失および転写領域のメチル化による発現抑制が報告されてきた。一方、我々は RB タンパク質の分解を促進するユビキチンリガーゼの候補を見つけた。今後は機能解析をさらに詳細に行い、細胞癌化における機能を検討する。

(内田千晴, 北川雅敏)

4. 蛋白質過剰産生ストレスに対する細胞応答の研究

これまで小胞体膜蛋白質の過剰産生により形成される非生理的な構造物と考えられてきたクリスタロイド小胞体 (cER) が、小胞体膜酵素以外の蛋白質、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前駆体の過剰発現によってもその形成が誘導されることを見出した。また、可溶性蛋白質の分子内に疎水性アミノ酸のストレッチを挿入した変異蛋白質の過剰発現によっても小胞体膜が近接した小管状の特異膜構造物が誘導されることを見出した。これらの結果は、小胞体の膜成分ではないある種の蛋白質の過剰発現が小胞体の特異的な膜構造物の形成という細胞応答を引き起こすことを示している。我々が用いた cER, あるいはそれに類似した特異膜構造の形成を引き起こす蛋白質は高次構造が変性して、しかも細胞内で速やかに分解されていることが示唆されている。したがって、我々が新たに見いだした非膜蛋白質による cER, あるいはそれに類似した特異的な小胞体膜構造物の誘導現象は「細胞内の蛋白質の質、量を一定のレベルに保つための新規の小胞体機能」の存在を示唆しているものと考えている。

(小田敏明, 横田貞記¹, 北川雅敏)¹ 山梨医大

13 この期間中の特筆すべき業績, 新技術の開発

14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

タンパク質の分解機構の異常やそれに関連しておこるタンパク質の凝集は、癌や神経疾患をはじめ、多くの疾病の原因となっていることがわかってきた。我々はタンパク質の分解機構および凝集の分子機構を明らかにして、これらの疾病に対する診断治療に繋げようと考えている。

近年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。我々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れに対する新しい診断および治療の分子標的の同定を目指している。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 に注目した。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 の分解亢進が起こっていることが報告されている。現在 p27 の低下に伴い発現が変動する遺伝子を探索している。分解メカニズムに関して我々は、p27 の二種類の分解機構があることを *in vitro* 系で証明し、さらに Skp2 ノックアウトマウスによる個体レベルで確認している。一方で p27 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、最近これを認識する分子も見いだしている。このように我々は p27 に関する基礎研究では世界レベルにある。RB タンパク質の分解機構の解析も新しい発がん機構の発見に繋がると考えている。

これらの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、ここで見つかった Key-regulator を分子標的として新たな診断法の開発や治療への応用が期待でき、社会的意義も大きいと考えている。

15 新聞、雑誌等による報道

1. 内田千晴：「細胞応答としての遺伝子発現」シリーズー生命科学の最先端. 静岡新聞 平成 13 年 4 月 7 日夕刊 p10
2. 北川雅敏：「癌細胞が増えるしくみーブレーキの崩壊とアクセルの暴走ー」シリーズー生命科学の最先端. 静岡新聞 平成 13 年 4 月 14 日夕刊 p10