

生化学第一

1 構成員

	平成15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）	2人（0人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0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	8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14年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	11編（0編）
そのインパクトファクターの合計	42.96
(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	0.00
(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	0.00

(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, Oda T, Sugiyama T, Otani S, Kitagawa M, and Ichiyama A: The role of Sp1 and AP-2 in basal and protein kinase A-induced expression of mitochondrial serine: pyruvate aminotransferase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **277**: 39082-39092, 2002.
2. Mizuno T, Ito K, Uchida C, Kitagawa M, Ichiyama A, Miura S, Fujita K and Oda T: Analyses in transfected cells and *in vitro* of a putative peroxisomal targeting signal of rat liver serine: pyruvate aminotransferase. *Histochem. Cell Biol.* **118**: 321-328 2002.
3. Hattori T, Ohoka N, Hayashi H, Onozaki K. : C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Lett* **24**: 33-39 2003.
4. Hattori T, Ohoka N, Inoue Y, Hayashi H, Onozaki K. : C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* **22**, 1273 - 1280 2003.

インパクトファクターの小計 [20.116]

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. Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H and Kitagawa M: High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys. Res. Com.* **303**, 978-984, 2003

インパクトファクターの小計 [2.946]

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. Tsukino H, Kuroda Y, Nakao H, Imai H, Osada Y, Inatomi H, Kitagawa K, Kawamoto T and Katoh T : Genetic polymorphisms of CYP2A6 and CYP2E1 with tobacco smoking is not associated with risk of urothelial cancer. *Environ. Health Prev. Med.* **7**: 129-131, 2002.
2. Katayama K, Dobashi Y, Kitagawa M, Kawai M, Kadoya Y and Kameya T: Cdk4/cyclin D1 kinase, a universal and critical regulator of apoptosis. *Anticancer Res.* **23**: 235-244, 2003.
3. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Fouremen G. L., Morita M. and Kawamoto T. : Bisphenol A levels in human urine. *Environmental Health Perspectives* **111**: 101-104, 2003.
4. Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Matsuno K, Matsumoto A, Yoshida A, Nakayama K, Nakayama K -i and Kawamoto T : Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity. *Pharmacogenetics* **12**: 621-626, 2002.
5. Huang Y, Ito R, Miura S, Yokota S, Oda T and Ito M: Altered antigenic disposition of peroxisomal urate oxidase in PEX5-defective Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **302**: 703-709, 2003.

6. Tahara K, Tsuchimoto D, Tominaga Y, Asoh S, Ohta S, Kitagawa M, Horie H, Kadoya T and Nakabeppu Y : Δ FosB but not FosB induces delayed apoptosis independent of cell proliferation in the Ratla embryo cell line. *Cell Death and Diff.* **10**: 496-507, 2003.

インパクトファクターの小計 [19.897]

(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
- 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
- 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. 北川恭子（分担執筆）看護大事典（2002）医学書院. 総編集：和田 攻，南 裕子，小峰光博

(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

4 特許等の出願状況

	平成14年度
特許取得数（出願中含む）	1件

1. 北川雅敏他 国際特許出願 (PCT/JP02/05354) 「Mdm2により触媒されるRBのポリユビキチン化反応」

5 医学研究費取得状況

	平成14年度
(1) 文部科学省科学研究費	4件 (2,020万円)
(2) 厚生科学研究費	0件 (0万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)
(4) 財団助成金	2件 (300万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (26万円)
(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

北川雅敏（代表者）小田敏明，内田千晴，北川恭子 基盤研究（B）（2）「癌抑制遺伝子産物の分解亢進を介した細胞悪性化の分子機構」1010万円（新規）

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（C）（2）「p27^{Kip1}のコンデンソナルロックアウトによるヒト腫瘍の悪性化の解析」600万円（新規）

北川雅敏（代表者）内田千晴，北川恭子 特定領域研究（A）（2）「RBタンパク質の部位特異的リン酸化と分解を介した標的遺伝子選択的制御機構」240万円（新規）

内田千晴（代表者）若手研究（B）（2）「RBタンパク質の部位特異的リン酸化および分解による標的遺伝子の選択的発現制御機構」170万円（新規）

(4) 財団助成金

北川雅敏（代表者）ノバルティスファーマ研究助成「癌抑制遺伝子の分解亢進を介した細胞悪性化の分子機構の研究」100万円（新規）

北川雅敏（代表者）アストラゼネカ研究助成「Selective control of degradation of tumor suppressor proteins in RB-pathway」200万円（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」26万円 代表者 九州大学生体防御医学研究所教授 中山敬一（継続）

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

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

(1) 国際会議等開催・参加：

4) 一般発表

ポスター発表

Kitagawa M, European Life Scientist Organization Symposium (Nice, France) 2002, June 29- July 3

(2) 国内学会の開催・参加

1) 学会における特別講演・招待講演

北川雅敏 (2002) ユビキチン依存的分解を介したRB癌抑制経路の活性制御機構, 東海遺伝子再生医療研究会, 9月, 名古屋

北川恭子 (2002) Gene Silencing Technique, 第2回Aldh2ノックアウトマウス学会, 11月, 北九州

2) シンポジウム発表

北川雅敏 (2002) RBタンパク質のユビキチンリガーゼの同定, 第61回日本癌学会総会ワークショップ, 10月, 東京

北川雅敏 (2002) RBタンパク質のユビキチン依存的分解の分子機構, 第75回日本生化学会シンポジウム, 10月, 京都

内田千晴 (2002) ユビキチンリガーゼMdm2の新たな標的, 第75回日本生化学会シンポジウム, 10月, 京都

北川雅敏 (2002) ユビキチン依存的分解を介したRB癌抑制経路の活性制御機構, 第25回日本分子生物学会年会ワークショップ, 12月, 横浜

3) 座長をした学会名

北川雅敏 (2002) 第75回日本生化学会シンポジウム「RB経路研究の新展開」10月, 京都

5) 役職についている学会名とその役割

北川雅敏 日本生化学会評議委員

北川雅敏 日本分子生物学会総会組織委員

内田千晴 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

	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4回 Oncogene（英国），Int. J. Cancer（米国），Jpn. J. Cancer Res. / 現Cancer Science（日本）2回

9 共同研究の実施状況

	平成14年度
(1) 国際共同研究	0件
(2) 国内共同研究	8件
(3) 学内共同研究	5件

(2) 国内共同研究

安田秀世（東京大学理学部）RBタンパク質のユビキチン化の解析

中山敬一 中山啓子（九州大学生体防御医学研究所）Skp2の細胞悪性化能の解析

上條岳彦（信州大学医学部）Mdm2に対するARFの阻害活性の生理的意義の解析

内藤幹彦（東京大学分生研）ユビキチン系を介したアポトーシス制御機構の解析

早川磨記男（東京薬科大薬学部）NF- κ Bシグナリングの制御メカニズムの研究

太田智彦（聖マリアンナ医大）ユビキチン化の分子メカニズムの解析

土橋 洋（山梨医大学医学部）細胞分化，細胞死におけるCDKの機能

横田貞記（山梨医大学医学部）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

千田金吾，中村浩淑（内科学第二講座）RB経路の崩壊による細胞癌化機構の研究

山本龍夫，菱田 明（内科学第一講座）TGF- β /Smad系を介した腎炎発症の分子機構の研究

今野弘之，中村 達（外科学第二講座）Skp2を介した癌の悪性度亢進機構の研究

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

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14年度
産学共同研究	0件

11 受賞

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 肺癌におけるCks1発現亢進の研究

細胞周期進行を負に制御するp27タンパク質の分解亢進は種々の臨床癌の予後と相関することが知られている。Cks1はSkp2とともにp27の分解の際にユビキチンリガーゼとして働くSCF^{Skp2}複合体の構成因子であるが、それらの発現量の変動と臨床癌の病理像との関係は未だ報告されていない。今回我々は非小細胞肺癌 (NSCLC) を対象としてCks1の発現を蛋白およびmRNAレベルの解析によって調べ、腺癌で有意な発現上昇を認めた。一方Skp2は扁平上皮癌において発現亢進しており、しかも個々の臨床癌においてp27タンパク質の存在量と逆相関関係にあったが、Cks1の発現レベルにはp27と同様の関係は見出されなかった。これらの結果よりSkp2とCks1それぞれの発現亢進は異なるメカニズムを介してNSCLCの病理像に関与していると考えられた。

(乾 直輝¹, 北川恭子, 三輪清一¹, 服部隆行, 北川雅敏)¹2内

2. Cks1の分解機構の研究

サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質p27のユビキチン化はSCFユビキチンリガーゼによって実行されるが、近年この作用には細胞周期制御因子Cks1が必須の補因子として要求されることが報告された。このことから、Cks1の発現量の亢進と細胞の癌化あるいは癌細胞の悪性度の亢進との相関が推察された。実際我々は、臨床肺癌組織検体においてCks1のmRNA、及びタンパク質の発現量が正常組織に比べ有意に増加していることを見出しており、細胞内Cks1存在量の亢進と細胞癌化の因果関係が示唆されている。今回我々はCks1の分解機構について解析を行った。細胞に異所性に発現させたCks1タンパク質、内因性のCks1タンパク質は共にプロテアソーム阻害薬処理で蓄積することを見いだした。さらに、細胞内、及び*in vitro*でのCks1のユビキチン化が観察された。これらのことから、Cks1は細胞内でユビキチン-プロテアソーム系を介して分解され、量的制御を受けていることが強く示唆された。一方で、Cks1は主にM期で不安定であることを示す知見も得ており、その分解が細胞周期依存的であることを明らかにした。

(服部隆行, 北川恭子, 北川雅敏)

3. 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、ヌードマウスに移植した場合増殖能の亢進が起こることを見いだした。一方でヒト腫瘍細胞のp27のヘテロノックアウト細胞も樹立している。マイクロアレイを用いてこれらの細胞で発現変動する遺伝子を解析し、その結果数種の変動遺伝子を見いだ

した。現在、これらの機能解析を行っており、臨床の癌における病理学的検索と併せて、予後不良のキー遺伝子の同定を目指している。

(北川恭子, 高芸, 太田 学¹, 北川雅敏)¹2外

4. 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で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であるMdm2を過剰発現するとRBタンパク質の分解速度が増加して細胞内存在量が減少することを見いだした。さらに*in vivo*及び*in vitro*でMdm2はRBタンパク質と結合して効率よくユビキチン化することを証明した。この現象はdominant negative Mdm2の導入によって抑制された。さらにMdm2のRB経路に及ぼす作用について検証したところ、Mdm2の導入によりRB経路が抑制されることがわかった。以上の結果より、癌遺伝子産物Mdm2の発現亢進が起こるとp53だけでなくRBタンパク質の分解も促進され、p53とRBという2大癌抑制経路が同時に崩壊して細胞の癌化が効率よく促進することが予想された。

(内田千晴, 三輪清一¹, 北川雅敏)¹2内

5. p27のN末端に結合する分子の解析

我々は以前p27タンパク質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Ser10を見出している。本研究ではその部位に結合する分子p27NBP1-3を酵母Two-hybrid法で同定した。現在その分子の機能を解析中である。

(服部隆行, 磯部智康, 内田千晴, 北川恭子, 北川雅敏)

6. 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

小胞体膜蛋白質の過剰産生, およびその分子間相互作用により非生理的に形成され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 (pSPTm) の過剰発現によってもその形成が誘導されることを我々は見出した。小胞体内腔局在シグナルを付加した蛍光タンパク質をcER形成を検出するレポーター遺伝子として用いたりアルタイムcER検出系を構築し, 他のミトコンドリア移行前駆体の過剰発現によるcER形成の有無を評価した。調べた数種類のミトコンドリア移行前駆体タンパク質はいずれもcER形成を誘導しなかった。また, pSPTmのミトコンドリア移行配列のみを他のタンパク質に付加したキメラタンパク質を過剰発現させてもcER形成は誘導されなかった。これらの結果は, ミトコンドリア移行前駆体であれば何でもcERを誘導するというものではなく, ある特殊な構造を持った蛋白質の過剰発現によってのみ小胞体の特異的な膜構造物の形成が引き起こされることを示している。どのような構造が認識されているのかは現在解析中である。我々が新たに見いだした非小胞体膜蛋白質によるcER, あるいはそれに類似した特異的な小胞体膜構造物の形成

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小胞体による新規の環境維持機能」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

1. 上述のように, RBタンパク質の分解機構を明らかにしたことにより, 国際特許出願 (PCT/JP02/05354) 「Mdm2により触媒されるRBのポリユビキチン化反応」の申請に至った。この特許申請の技術によりRBタンパク質の分解機構を阻害するという新しいメカニズムの制癌剤をスクリーニングすることができる。

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およびその制御に関連するCks1やSkp2等の分子に注目した。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が, 今回我々は世界に先駆けて肺癌でのCks1の高発現を報告した。また, 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Ser10を報告しているが, 最近これを認識する分子も見いだしており, p27の未知の安定性制御機構の解明に繋がると考えている。また, 現在Skp2の高発現やp27の低下に伴い発現が変動する遺伝子を探索しており, p27/Skp2に関係した予後不良の癌形質に形成に関与する遺伝子の同定が期待される。さらにRBタンパク質の分解機構の研究も新しい発がん機構の発見を意味し重要な知見であると考えている。

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。一方で異常タンパク質の細胞内蓄積機構の研究は神経変性疾患に代表されるいわゆる「たまり病」の原因解明の糸口になるかも知れない。

15 新聞, 雑誌等による報道