

# 生化学第一

## 1 構成員

	平成16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）	10人（5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）	2人
合 計	17人

## 2 教官の異動状況

- 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15年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	10編（0編）
そのインパクトファクターの合計	53.57
(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）	3編（2編）
そのインパクトファクターの合計	3.06
(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

### (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. Hattori T, Kitagawa K, Uchida C, Oda T, Kitagawa M: Cks1 is degraded via the ubiquitin-

proteasome pathway in a cell cycle-dependent manner. *Genes to Cells* 8 : 889-896, 2003.

インパクトファクターの小計 [4.34]

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. Togawa A, Yamamoto T, Suzuki S, Fukasawa H, Ohashi N, Fujigaki Y, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A : Ubiquitin-dependent degradation of Smad2 is increased in the glomeruli of rats with anti-thymocyte serum nephritis. *Am J Pathol* 163, 1645-1652, 2003.
2. Natsume H, Sasaki S, Kitagawa M, Kashiwabara Y, Matsushita A, Nakano K, Nishiyama K, Nagayama K, Misawa H, Masuda H, Nakamura H :  $\beta$ -Catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter is negatively regulated by thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 309 : 408-413, 2003.
3. Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida C, Aoki M, Hosono M, Kitagawa M, Hishida, A : Treatment with anti-TGF- $\beta$  antibody ameliorates progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- $\beta$  signaling. *Kidney Int* 65 : 63-74, 2004.

インパクトファクターの小計 [14.70]

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. Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M, Kikugawa K : Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 22 : 3356-3366, 2003.
2. Imaki H, Nakayama K, Delehoussee S, Handa H, Kitagawa M, Kamura T, Nakayama KI : Cell Cycle-dependent Regulation of the Skp2 Promoter by GA-binding Protein. *Cancer Res* 63 (15) : 4607-4613, 2003.
3. Kimura M, Uchida C, Takano Y, Kitagawa M, Okano Y : Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 316 (3) : 930-6, 2004.
4. Inoue Y, Kitagawa M, Onozaki K, Hayashi H : Contribution of the constitutive and inducible degradation of Smad3 by the ubiquitin-proteasome pathway to transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Interferon & Cytokine Research*, 24 : 43-54, 2004
5. Matsumoto M, Yada M, Hatakeyama S, Ishimoto H, Tanimura T, Tsuji S, Kakizuka A, Kitagawa M, Nakayama KI : Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* 23 : 659-669, 2004.
6. Kawamoto T, Isse T, Kunugita N, Yang M, Kitagawa K, Suenaga R, Matsumoto A, Oyama T : Effects of genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes on smoking and drinking. *J UOEH* 25 S (1) : 97-106, 2003.

インパクトファクターの小計 [34.53]

## (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「がん抑制遺伝子産物p53とRBファミリーの分解制御機構」現代医療 36：147-153, 2004  
インパクトファクターの小計 [0.00]
- 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. Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, Suzuki R, Kinaga T, Yashima Y, Ozaki S, Isse T, Kim YD, Kim H, Kawamoto T. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. *Front Biosci* 9：1967-1976, 2004.
  - 2. 川本俊弘, 北川恭子, 一瀬豊日, 松本明子, 山口哲右, 鈴木理恵, 小川真規, 木長健, 松野康二, 樺田尚樹, 小山倫浩：「アルデヒド脱水素酵素2(Aldh2) ノックアウトマウスの医学研究への応用」日本アルコール精神医学雑誌 10, 3-10, 2003  
インパクトファクターの小計 [3.06]

## (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. 北川雅敏「細胞周期メカニズムの解明に向けて」ポストゲノムの分子生物学 村上康文編 化学同人社 95-106, 2003.
- 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

## 4 特許等の出願状況

	平成15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15年度
(1) 文部科学省科学研究費	6件 (2,050万円)
(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	3件 ( 575万円)
(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

北川雅敏（代表者）, 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」500万円（継続）

北川雅敏（代表者）, 特定領域研究（2）「p27<sup>Kip1</sup>の発現量低下を伴う予後不良の癌における悪性形質の形成機構」610万円（新規）

北川雅敏（代表者）, 特定領域研究（2）「RBタンパク質の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（継続）

北川恭子（代表者）, 基盤研究（C）(2) 「予後不良の癌克服を目指した癌形質悪性化の新規誘導因子の同定と解析」240万円（新規）

内田千晴（代表者） 特定領域研究（2）「蛋白質安定化機能を持つ新規p27<sup>Kip1</sup>結合因子の癌化抑制への関与」300万円（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」160万円（継続）

### (4) 財団助成金

北川雅敏 上原記念生命科学財団研究助成「癌抑制遺伝子産物の分解機構」500万円（新規）

北川恭子 静岡県総合研究機構学術教育研究推進事業補助金「癌悪性化関連遺伝子PPAG4の解析および予後診断マーカーとしての有用性の検討」50万円（新規）

## 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	0件
(2) シンポジウム発表数	0件	2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	2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

Fukasawa H, Yamamoto Y, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida Y, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A : Decrease in inhibitory Smad7 resulted from enhanced ubiquitin-dependent degradation is involved in renal fibrosis in mice unilateral ureteral obstruction kidneys. American society of Nephrology Renal Week 2003 11/14 San Diego USA

Togawa, A Yamamoto T, Suzuki H, Fukasawa H, Ohashi N, Fujigaki Y, Yonemura K, Kitagawa M, Hishida A : Increased Expression of Smurf2 in the Tubulointerstitial Lesions in IgA Nephropathy. American society of Nephrology Renal Week 2003 11/14 San Diego USA

### (2) 国内学会の開催・参加

#### 3) シンポジウム発表

Masatoshi Kitagawa : Ubiquitin-dependent degradation of tumor suppressor gene products in human cancers. 第76回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質分解システムの破綻と疾患」2003 10月 (横浜)

北川雅敏 ユビキチンシステムによる細胞周期制御因子の量的制御と癌 第26回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞周期研究の新展開 発生から癌化まで」2003 12月 (神戸)

#### 4) 座長をした学会名

北川雅敏 第76回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質分解システムの破綻と疾患」(オーガナイザー) 2003 10月 (横浜)

北川雅敏 第26回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞周期研究の新展開 発生から癌

化まで」(オーガナイザー) 2003 12月 (神戸)

(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

北川雅敏 日本分子生物学会総会組織委員

## 8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数 (レフリー数は除く)	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

北川雅敏 計5回 Cancer Research (米国), Oncogene (英国), Genes to Cells (日本), Cancer Science (日本) 2回,

## 9 共同研究の実施状況

	平成15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, 日本製粉) 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) NFκBおよびFGD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 (山梨医科大学医学部) 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

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, 田中達郎<sup>1</sup>, 中村達 (外科学第二講座, <sup>1</sup>光学医療診療部) 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15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. 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。さらにMdm2のノックアウトマウス由来の線維芽細胞でRBタンパク質の蓄積が見られ、SiRNA導入によってもRBタンパク質の蓄積が確認された。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<sup>1</sup>, 北川雅敏)<sup>1,2</sup>内

### 2. Cks1の発現と分解機構の研究

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。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。Cks1はSkp2とともにp27<sup>Kip1</sup>の分解の際にユビキチンリガーゼとして働くSCF<sup>Skp2</sup>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。最近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。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。さらに我々は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, 乾直輝<sup>1</sup>, 三輪清一<sup>1</sup>, 北川雅敏) <sup>1</sup>2内

### 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, 平松良浩<sup>1</sup>, 太田学<sup>1</sup>, 北川雅敏) <sup>1</sup>2外

### 4. 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。そのうちp27NBP1はユビキチンリガーゼであることがわかり, p27NBP1の結合蛋白質数種を酵母Two-hybrid法で同定した。それらがp27NBP1の基質であるか, 上流の制御因子であるかなどを現在解析中である。

(服部隆行, 磯部智康, 内田千晴, 北川恭子, 菊池寛利<sup>1</sup>, 北川雅敏) <sup>1</sup>2外

### 5. 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

細胞内の膜系の中でもっとも広い面積を占める小胞体は多様な機能を持っている事が知られている。最近特に注目されているのが細胞内の環境を認識して適性に維持する「環境管理機能」である。たとえば小胞体内腔に送り込まれた分泌タンパク質の高次構造が適正であるかどうかを認識し, 適正でない場合はそれを補正するような種々の細胞応答が引き起こされることが知られている。一方, 細胞内である種のタンパク質(たとえば小胞体膜タンパク質であるアルデヒド脱水素酵素)が過剰発現された場合には, 特殊な構造を持った小胞体(クリスタロイド小胞体, cER)が短時間で形成されることがこれまで知られていた。この現象は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ると考えられてきたが, 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。またその特殊な膜構造物にはユビキチンのシグナルが高濃度に分布していた。アルデヒド脱水素酵素の場合は直接この酵素がユビキチン化されている証拠を得ている。しかし、プロテアソーム阻害剤の共存下、非共存下で産物の量に差がないので分解のシグナルとなっているとは言い難い。あるタンパク質の過剰発現、特殊な小胞体膜構造の形成、ユビキチン化がどのような関係にあり、どのような細胞機能を示しているのかを現在解析中である。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<sup>1</sup>, 北川雅敏) <sup>1</sup>山梨大

### 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