

生化学第一

1 構成員

	平成17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	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16年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	8編（0編）
そのインパクトファクターの合計	64.34
(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）	4編（4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

(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, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda T, Sugimura H, Kamijo T,

Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M : Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. EMBO J. 24 : 160-169, 2005.

2. Ohashi N, Yamamoto T, Uchida C, Togawa A, Fukasawa H, Fujigaki Y, Suzuki S, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, Hayashi H, Hishida A, Kitagawa M : Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- β . FEBS Letters 579 : 2557-2563, 2005.

インパクトファクターの小計 [14.07]

- 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. 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 : Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in mice obstructive nephropathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(23) : 8687-8692, 2004.

インパクトファクターの小計 [10.27]

- 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. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima Y A, Miyake S, Matsumoto M, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S-i, Natsume T, Nakayama K-i : Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into Mitosis. Dev. Cell 6 : 661-672, 2004.
2. Naito M, Katayama R, Ishioka T, Suga A, Takubo K, Nanjyo M, Hashimoto C, Taira M, Takada S, Takada R, Kitagawa M, Matsuzawa S-i, Reed J C, Tsuruo T : Cellular FLIP inhibits β -catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. Mol. Cell. Biol. 24 : 8418-8427, 2004.
3. Hayakawa M, Kitagawa H, Miyazawa K, Kitagawa M, Kikugawa K : The FWD1/ β -TrCP-mediated degradation pathway establishes a turning off switch of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. Genes to Cells 10 : 241-251, 2005.
4. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H : TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. EMBO J. 2005 24 (6) : 1243-55.
5. Takaki T, Fukasawa K, Suzuki-Takahashi I, Semba K, Kitagawa M, Taya, Y, Hirai H : Preferences for phosphorylation sites in the retinoblastoma protein of D-Type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 in vitro. J. Biochem. 137 : 381-386, 2005.

インパクトファクターの小計 [40.00]

(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 : p53・RBファミリーのユビキチン依存性代謝機構 医学のあゆみ 211, 43-48, 2004
2. 北川雅敏 : 多様な生命現象の分子基盤としての細胞周期制御機構 実験医学 22, 1782-1786,

2004

3. 内田千晴, 北川雅敏: 細胞周期制御分子の分解機構とがん化 実験医学 22, 1800-1807, 2004
4. 北川雅敏: 細胞周期制御分子の分解とがん 分子細胞治療 3, 3-11, 2004
インパクトファクターの小計 [0.00]

(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: 「2 大癌抑制経路-RB経路とp53経路」, 細胞周期イラストマップ 中山敬一編
羊土社 162-169, 2005.

4 特許等の出願状況

	平成16年度
特許取得数 (出願中含む)	2件

1. 北川雅敏, 高芸, 北川恭子: 癌の転移性及び浸潤能の検査方法 (出願済み)
2. 北川雅敏, 高芸, 北川恭子: 癌治療用組成物 (出願済み)

5 医学研究費取得状況

	平成16年度
(1) 文部科学省科学研究費	4件 (2,070万円)
(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

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」 1,020万円 (新規)

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 (2) 「p27^{Kip1}の発現量低下を伴う予後不良の癌の分子標的の同定」 680万円 (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 (2) 「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」 260万円 (新規)

北川恭子 (代表者), 北川雅敏 基盤研究 (C) 「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」 110万円 (継続)

(2) 厚生科学研究費

北川雅敏 (分担者), 第3次対がん総合戦略研究事業 「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	0件
(2) シンポジウム発表数	0件	0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	1件
(6) 一般演題発表数	0件	

(2) 国内学会の開催・参加

4) 座長をした学会名

北川雅敏 第63回日本癌学会学術総会

(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7回 Cancer Research (米国), Oncogene 2回 (英国), Cancer Detection and Prevention (米国), Journal of Biochemistry 2回 (日本), Cancer Science (日本)

9 共同研究の実施状況

	平成16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

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) 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 (山梨大学医学部) 細胞分化, 細胞死におけるCDKの機能

林 秀敏 (名古屋市立大薬医学部) TGF-β によるSmurf の制御

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

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¹, 中村達 (外科学第二講座, ¹ 光学医療診療部) p27-Skp2経路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16年度
産学共同研究	1件

安田秀世 (日本製粉) Mdm2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のエ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エ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, Mdm2の siRNA導入によるノックダウンによってもRBタンパク質の蓄積が確認された。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, Mdm2の細胞癌化能にRBとの結合が必須なことも判明した。さらに肺癌検体の病理学的解析によりMdm2が高発現している癌ではRBタンパク質の発現量が低下していることが証明された (Uchida *et al.* *EMBO J.* 2005)。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

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。本研究ではヒト大腸癌細胞株HCT116に p27のユビキチンリガーゼSkp2を過剰発現させ 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欠乏モデル細胞を作製した。これらのモデル細胞と親株の間で発現が変動する遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。その結果数種の変動遺伝子を見いだした。このうちPPAG4は細胞の浸潤能を亢進させる機能を持っており、現在さらなる解析を行っており、臨床の癌における病理学的検索と併せて、転移など予後不良の形質の形成に関与するキー遺伝子であるか判定する。

(北川恭子, 高芸, 平松良浩¹, 北川雅敏)¹²外

3. 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KNBP1-3を酵母Two-hybrid 法で同定した。そのうちKNBP1はRINGフィンガー構造を持ち、p27を in vitro および in vivo で効率よくユビキチン化した。さらにKNBP1のノックダウンにより p27タンパク質が安定化することがわかった。以上より、KNBP1は p27のユビキチンリガーゼであることが強く示唆された。一方で、KNBP1結合タンパク質数種を酵母Two-hybrid 法で同定し、機能解析を行っている。また、KNBP2についてもその機能を探索している。

(服部隆行, 磯部智康, 菊池寛利¹, 安倍健滋, 北川雅敏)¹²外

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

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) などの小胞体膜酵素を過剰発現させると培養細胞内に特異膜構造物 (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。我々は小胞体膜酵素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。免疫電顕の解析によると、この膜構造物は小胞体膜由来であり、ここには高密度に発現産物とユビキチンのシグナルが検出された。ユビキチン化と特異膜構造物形成との関係を明らかにするために、まず、過剰発現された産物が直接ユビキチン化されているかどうかを解析した。COS-1細胞に過剰発現させたいタンパク質の cDNA クローンとユビキチン発現クローンを導入し、細胞抽出物のウェスタンブロット解析によりポリユビキチンのスメアーの検出を試みた。その結果、過剰発現されたALDHではポリユビキチン化を示すスメアーが検出された。一方、cER形成誘導能のない、ALDHのER移行シグナル (C末35アミノ酸) を欠く変異体ALDH (ALDHdC) ではスメアーはほとんど検出されなかった。一方、cERを誘導するミトコンドリア移行型SPTm 前駆体、および cER誘導能のないペルオキシソーム移行型SPT (SPTp) はいずれも明瞭なポリユビキチンのスメアーを示さなかった。ALDHで見られたと同様のポリユビキチンのスメアーは他のいくつかの小胞体膜酵素の過剰発現産物においても検出された。これらのポリユビキチン化される蛋白質の過剰発現と cER形成誘導能との関連を現在、解析中である。検出されたポリユビキチン化シグナルの強さはいずれの蛋白質においてもプロテアソーム阻害剤の有無で変化しなかったため、これらの蛋白質のユビキチン化は分解に直接共役

しているものではないと考えられた。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を念頭に置いて解析を進めている。

（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. 新たな発がんメカニズムの提唱

重要な癌抑制遺伝子産物RBタンパク質はリン酸化によって活性制御されているが，我々はユビキチン-プロテアソーム系を介した分解によっても量的な制御を受けていることを見出した。さらにRBのユビキチンリガーゼが p53のそれと同じMdm2であることを証明し，EMBO Journal に発表した（Uchida *et al.* *EMBO J.* 2005）。Mdm2の高発現によりRBと p53の二つの癌抑制遺伝子産物の分解が起こり癌化の方向に向かうことが示唆され，新たな発がんメカニズムの発見と考えている。Mdm2によるRBのユビキチン化を阻害する薬剤は新たな作用機序の制がん剤となると考えられる。

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。我々は癌抑制遺伝子産物など種々の重要なタンパク質の分解機構および凝集の分子機構とその生理的意義を明らかにして，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の候補としてPPAG4を同定した。本年度この分子を分子標的した癌の診断法及び治療法を提案して特許申請を行った。また p27の新たなユビキチンリガーゼKNBP1を同定した。この分子も新たな癌の分子標的となる可能性が高くさらに検討を重ねている。一方で，我々はRBタンパク質の分解機構を明らかにしたが，こ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，予後不良な癌の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。