

# 生化学第一

## 1 構成員

	平成22年3月31日現在	
教授	1人	
准教授	1人	
講師（うち病院籍）	0人	（ 0人）
助教（うち病院籍）	2人	（ 0人）
助手（うち病院籍）	0人	（ 0人）
特任教員（特任教授，特任准教授，特任助教を含む）	0人	
医員	0人	
研修医	0人	
特任研究員	0人	
大学院学生（うち他講座から）	1人	（ 0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）	4人	
合 計	9人	

## 2 教員の異動状況

北川 雅敏（教授）（H12. 10. 1～現職）

小田 敏明（准教授）（H3. 8. 1～19. 3. 31 助教；准教授19. 4. 1～22. 3. 31退職）

北川 恭子（助教）（H13. 3. 31～19. 3. 31 助手；H19. 4. 1～現職）

神武洋二郎（助教）（H20. 9. 1～現職）

## 3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成21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	21.36	
(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	（ 0編）
そのインパクトファクターの合計	3.47	
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0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	0.00	

(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. Kitagawa K, Hiramatsu Y, Uchida C, Isobe T, Hattori T, Oda T, Shibata K, Nakamura S, Kikuchi A, Kitagawa M: Fbw7 promotes ubiquitin-dependent degradation of c-Myb: involvement of GSK3-mediated phosphorylation of Thr-572 in mouse c-Myb. **Oncogene** 28, 2393-405, 2009.
2. Isobe T, Hattori T, Kitagawa K, Uchida C, Kotake Y, Kosugi I, Oda T, Kitagawa M: Adenovirus E1A inhibits SCFF<sup>bw7</sup> ubiquitin ligase. **J. Biol. Chem.** 284, 27766-79, 2009.

インパクトファクターの小計 [12.74]

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. Misaki T, Yamamoto T, Suzuki S, Fukasawa H, Togawa A, Ohashi N, Suzuki H, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A: Decrease in TRADD resulted from ubiquitin-dependent degradation in the obstructive renal injury in rats. **Am J Pathol** 175, 74-83, 2009.

インパクトファクターの小計 [ 5.70]

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. Jamal M, Ameno K, Miki T, Wang W, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H: Cholinergic alterations following alcohol exposure in the frontal cortex of Aldh2-deficient mice models. **Brain Res.** 1295, 37-43, 2009.
2. Yu HS, Oyama T, Isse T, Kitagawa K, Ogawa M., Pham TTP, Kawamoto T: Characteristics of aldehyde dehydrogenase 2 (*Aldh2*) knockout mice. **Toxicol. Mechanisms and Methods** 19, 535-40, 2009.
3. Ameno K, Wang W, Jamal M, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H: Ethanol metabolism in ALDH2 knockout mice - Blood acetate levels **Legal Med.** 11, 413-5, 2009.

インパクトファクターの小計 [2.92]

(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. Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M: Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. **Cancer Sci.** 100, 1374-81, 2009.

インパクトファクターの小計 [3.47]

#### 4 特許等の出願状況

	平成21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21年度
(1) 文部科学省科学研究費	5件 (2444.7万円)
(2) 厚生労働科学研究費	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	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), 渡邊信元 特定領域研究「ユビキチンシステムによる細胞周期制御」1680万円 (継続)
2. 北川恭子 (代表者), 北川雅敏 基盤研究 (C) 「p27の新規分解実行因子Pirh2の発現亢進と癌進展が相関するメカニズムの解析」150万円 (新規)
3. 北川恭子 (代表者) 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」290万円 (継続)
4. 神武洋二郎 (代表者) 特定領域研究「ポリコームタンパクによる精子幹細胞制御機構の全容解明」320万円 (新規)
5. 土橋 洋 (代表者) 北川雅敏 (分担者) 基盤研究 (C) 「癌遺伝子の異常によるシグナル伝達系の特異的活性化の解析と多分子標的療法への展開」分担金4.7万円 (本年度総額110万円) (継続)

#### 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	3件
(4) 学会開催回数	0件	1件
(5) 学会役員等回数	0件	2件
(6) 一般演題発表数	1件	

##### (1) 国際学会等開催・参加

##### 5) 一般発表

##### ポスター発表

Kitagawa M and Isobe T, Adenovirus E1A suppresses function of tumor suppressor E3 ligase SCF-Fbw7, The 4<sup>th</sup> International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. Nov 29- Dec 3 Okinawa

(2)国内学会の開催・参加

1)主催した学会名

北川雅敏 第32回日本分子生物学会 組織委員

3)シンポジウム発表

神武洋二郎, 北川雅敏 「The epigenetic regulation of p16 tumor suppressor gene by Polycomb/MLL complex」第32回日本分子生物学会 ワークショップ「細胞周期とクロマチン制御」 2009年12月11日, 横浜

神武洋二郎 「癌抑制遺伝子p16 のヒストンメチル化を介した転写制御機構」第22回NM-GCOE セミナー 2010年1月27日, 仙台

4)座長をした学会名

北川雅敏 第32回日本分子生物学会 ワークショップ「細胞周期とクロマチン制御」2009年12月11日, 横浜

神武洋二郎 第8回 核ダイナミクス研究会 一般口演「核内反応の分子機構Ⅱ」2009年6月18日, 伊豆

神武洋二郎 日本農芸化学会2010年度大会 一般口演「遺伝子・タンパク質(発現制御)」2010年3月28日, 東京

(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 日本生化学会代議員

日本癌学会評議委員

## 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

Masatoshi Kitagawa: Oncogene (England) 2回, Biochemie (France) 1回, J Biochem. (Japan) 2回, Cell Biochem. Biophys. (USA) 1回3回

## 9 共同研究の実施状況

	平成21年度
(1)国際共同研究	1件
(2)国内共同研究	3件
(3)学内共同研究	3件

(1)国際共同研究

Yue Xiong (North Carolina Univ.) The epigenetic regulation of p16 tumor suppressor gene by Polycomb/MLL complex

## (2) 国内共同研究

竹内 隆 (鳥取大) Jmjの機能解析

中山敬一 (九大), 中山啓子 (東北大) Skp2/p27経路を介した疾患発症機構の解析

土橋洋 (自治医科大学) 癌遺伝子の異常の病理学的解析

## (3) 学内共同研究

山本龍夫、菱田 明 (1内) TGF- $\beta$ -Smad系を介した腎炎発症の分子機構

橋本賢二 (口外) 口腔癌におけるPirh2/p27系の関与

中村悟己 (3内) 血液細胞の分化, 癌化メカニズムの解析

## 10 産学共同研究

	平成21年度
産学共同研究	0件

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

### 1. 癌遺伝子産物c-Mybのユビキチン依存性分解機構の解析

血球系細胞の増殖・分化に重要な転写因子の一つであるc-Mybは、正常な分化終期を迎えるには細胞内から消失する必要がある。血液癌ではc-Myb発現の亢進例が認められており、c-Myb蛋白質量の調節機構が異常をきたすことが発癌の一因となっている可能性がある。これまでに多種の蛋白質が、その分解機構の破綻によって癌の発生や悪性化に関与していることが明らかにされていることから、詳細が不明だったユビキチン-プロテアソームシステムによるc-Myb蛋白質分解のメカニズムの解明を目指した。E3リガーゼの同定では、まずc-Mybのアミノ酸配列情報より複数の候補を挙げた。c-Mybユビキチン化亢進能および蛋白質分解速度促進能を指標にした検討の結果、Fbw7をc-Mybの分解実行因子として同定した。部分欠損またはアミノ酸置換型の変異c-Mybを用いたユビキチン化レベルやタンパク分解速度の検討では、既知のFbw7の分解基質が保持するコンセンサス配列が、c-MybにおいてもFbw7による分解に必要であることがわかった。さらにその配列はGSK3によってリン酸化されることも重要であることが、合成ペプチドを用いたリン酸化修飾実験、および細胞内GSK3のノックダウンや阻害剤処理による抑制実験より明らかとなった。またこの分解機構は、血球系細胞内でc-Mybの量的調節とともに、c-Myb下流シグナルのレベル調節をも担っていることが、Fbw7のノックダウン実験より証明された (Kitagawa K et al. Oncogene 2009)。今回血球系細胞においてc-Mybの分解実行因子として機能することが確認されたFbw7は、血液癌において機能欠損を伴う遺伝子変異が高頻度に発生していることが報告されている。よってFbw7を介したc-Myb分解機構の破綻によるc-Myb蛋白質蓄積が、細胞の分化異常を引き起こし、血液癌の発症原因になっている可能性が示唆された。

(北川恭子, 北川雅敏)

### 2. 癌抑制ユビキチンリガーゼFbw7の制御因子の同定

上記のようにFbw7はSCF-Fbw7を形成として主に癌遺伝子産物を標的としてユビキチン化を実

行する癌抑制ユビキチンリガーゼである。我々はアデノウイルスの癌遺伝子産物E1AがSCF-Fbw7と結合することを見出した。E1Aはユビキチン依存分解を受けることを我々は過去に発表しているが (Isobe T et al, BBRC 2006)、E1AはSCF-Fbw7によってはユビキチン化されなかった。ところが興味深いことにE1AはSCF-Fbw7と結合し、そのユビキチンリガーゼ活性を阻害することがわかった。E1Aの発現によりSCF-Fbw7の標的であるc-Mybやc-Myc, c-Jun等の安定化が見られた。一方でユビキチン依存分解を受けるがSCF-Fbw7の標的でないCyclin Eやp27等はE1A発現の影響を受けなかった。E1AタンパクはRBタンパク質と結合しその癌抑制活性を阻害することが古くから知られていたが、それだけでなく癌抑制ユビキチンリガーゼであるSCF-Fbw7の機能を阻害し、癌遺伝子産物を安定化してウイルスの増殖に都合の良い環境を作り出していることが強く示唆された (Isobe T et al, J Biol Chem 2009)。

(磯部智康, 北川雅敏)

### 3. 癌抑制遺伝子p16の転写制御機構の解析

細胞周期を負に制御するCDKインヒビターp16は、数多くの癌組織において高頻度に遺伝子欠損や転写抑制されていることが報告されており(ヒト癌の約40-50%で不活化)、癌抑制において重要な遺伝子であると考えられている。p16は非常に安定性の高いタンパクであり、その発現制御は主に転写レベルで行われている。継代の若い正常線維芽細胞においてp16転写は抑制されているが、培養継代を重ねるにつれ転写活性化され、pRB経路を介した不可逆的な細胞周期停止(細胞老化)を引き起こす。また、Rasの活性化変異等による癌化シグナルによってp16転写は活性化し、一過性に過増殖した細胞を早期細胞老化へと誘導する。このように、p16は細胞老化や発癌ストレスに対する防御において重要な役割を担っているにも関わらず、その転写制御機構に関してはあまり明らかとなっていなかった。

我々はp16転写抑制機構として、クロマチンサイレンシングに関与するポリコーム複合体が直接p16遺伝子座に結合し、ヒストンH3K27のメチル化を介して転写を抑制していることを見出した。ポリコーム複合体の構成因子、BMI1及びヒストンメチル化酵素EZH2をノックダウンした細胞はp16転写が活性化し、早期老化の表現形を示した。さらに我々はp16転写活性化機構として、ヒストンメチル化酵素MLLが直接p16遺伝子座に結合し、ヒストンH3K4のメチル化を介して転写を活性化していることを見出した。また、活性型Ras変異体の過剰発現によるp16転写活性化に、MLLが必要であることが分かった (Kotake Y et al, Cancer Res 2009)。また、現在INK4遺伝子座の発現制御に関与するノンコーディングRNAについて探索し、解析を行なっている。

(神武洋二郎, Yue Xiong1, 北川雅敏) <sup>1</sup>ノースキャロライナ大

## 13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

本年度は癌抑制ユビキチンリガーゼであるSCF-Fbw7の新たな標的c-Mybと阻害タンパク質E1Aの発見で、大きな成果を上げた。血液系の癌化に関与する癌遺伝子産物c-MybがGSK3によってリン酸化されSCF-Fbw7によってユビキチン化されプロテアソームで分解されることを発見した (Kitagawa K et al, Oncogene 2009)。Fbw7はSCF-Fbw7を形成として主に癌遺伝子産物を標的としてユビキチン化を実行する癌抑制ユビキチンリガーゼである。Fbw7の欠失や機能低下が起こる

とc-Mybやc-Myc等の癌遺伝子産物が安定化し、血液細胞を癌化の方向に細胞を導くことが予想された。一方で我々はこの癌抑制ユビキチンリガーゼSCF-Fbw7の活性を阻害する分子としてアデノウイルス癌遺伝子産物E1Aタンパク質を見出した。E1Aタンパク質はRBタンパク質と結合しその癌抑制活性を阻害することが古くから知られていたが、それだけでなく癌抑制ユビキチンリガーゼであるSCF-Fbw7の機能をE1Aは阻害し、癌遺伝子産物を安定化してウイルス複製に有利な増殖ステージに宿主をキープしていることが強く示唆された (Isobe T et al, J Biol Chem 2009)。

#### 14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

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、ユビキチンリガーゼの異常と癌や種々の疾患との関連も深い。このシステムの発見者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、癌、腎障害をキーワードに先端的研究を実行してきた。特にp27、RBタンパク質、Tob1などの癌関連遺伝子産物の分解のメカニズムを明らかにした (Hattori T et al, Cancer Res 2007, Uchida C et al, EMBO J 2005, Hiramatsu et al, Cancer Res 2007)。そしてそれらのタンパク質の分解の異常亢進が発癌や細胞の悪性癌形質獲得に繋がる可能性を示してきた (Gao Y et al, Cancer Res 2006, Shimada M et al, Cancer Sci 2009)。特に本年度は癌抑制ユビキチンリガーゼであるSCF-Fbw7の新たな標的と阻害タンパク質の発見で、大きな成果を上げた。上記のように血液系の癌化に関与する癌遺伝子産物c-MybがGSK3によってリン酸化されSCF-Fbw7によってユビキチン化されプロテアソームで分解されることを発見した (Kitagawa K et al, Oncogene 2009)。また、このSCF-Fbw7の活性を阻害する分子としてE1Aタンパク質を見出し、アデノウイルスの形質転換能や増殖に寄与することが判明した (Isobe T et al, J Biol Chem 2009)。Fbw7の欠失が報告されていることからSCF-Fbw7活性を指標に癌の発症予測や診断が出来る可能性が考えられる。さらにはFbw7の欠失癌に対してはそれを補填する遺伝子治療も有効であると考えている。我々は近年頭頸部腫瘍におけるPirh2とp27の関係を解析し、Pirh2がヒトの癌においてp27の発現量の制御に関与し、癌の増殖や予後に影響を及ぼしていることを初めて示した (Shimada M et al, Cancer Sci 2009)。Pirh2は予後診断マーカーとして期待でき、予後不良の癌に対する新たな分子標的としてPirh2阻害剤が有用であることが示唆された。一方で別のユビキチンリガーゼであるSCF-Skp2が腎障害の進行に必要であることをSkp2ノックアウトマウスで腎障害が抑制されることから発見した (Suzuki S et al, Am J Pathol 2007)。この結果はSCF-Skp2阻害剤が腎障害治療薬になることを示唆している。さらに最近我々は多くの癌で以上が報告されている重要な癌抑制遺伝子p16, p15, ARFを含むINK4遺伝子座の発現制御機構について解析し新知見を得ている (Kotake Y et al, Cancer Res 2009)。以上のように我々は細胞周期制御因子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の分解や転写制御に焦点を当て、これらの発現量制御メカニズムを明らかにすることを目指している。これらの研究成果は癌や腎障害の新たな分子標的を提示し、それを標的とした診断や治療法の開発に繋がると期待される。