

200500451A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトがんで高頻度に変異の見られるがん関連遺伝子の発がんにおける  
意義の解明とその臨床応用に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田矢 洋一

平成18（2006）年 4月

## 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I. 総括研究報告   |          |
| ヒトがんで高頻度に変異の見られる<br>がん関連遺伝子の発がんにおける意義<br>の解明とその臨床応用に関する研究<br>田矢 洋一    | -----1   |
| II. 分担研究報告  |          |
| 1. 細胞周期を制御する癌抑制蛋白質<br>の生理機能の解析とそのがん治療へ<br>の応用<br>田矢 洋一                | ----- 5  |
| 2. p53標的遺伝子類の解析とその<br>がん治療への応用<br>荒川 博文                               | ----- 8  |
| 3. ヒストンアセチル化酵素MOZ<br>及びPMLによるp53の機能制御<br>北林 一生                        | ----- 11 |
| 4. p16 <sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節機構<br>とCdk4-サイクリンDの活性<br>制御機構<br>原 英二 | ----- 12 |
| 5. 細胞周期関連蛋白質の分解制御機構<br>北川 雅敏  | ----- 13 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表   | ----- 14 |

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

ヒトがんで高頻度に変異の見られるがん関連遺伝子の発がんにおける  
意義の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 田矢 洋一 国立がんセンター研究所放射線研究部・部長

研究要旨： RB経路については、細胞がDNAダメージを受けるとRB蛋白質上のすべてのリン酸化部位は脱リン酸化されるというのがこれまでの常識であったが、Ser612だけは例外的にリン酸化が高まり、それがE2F-1とRB蛋白質の結合を促進することを見いだした。そして、Ser612-kinaseはChk1とChk2であると同定した。また、マウスの生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性として検出できるトランスジェニックマウスの作成に成功した。p53経路については、白血病で見られる染色体転座に関与するヒストンアセチル化酵素MOZ のノックアウトマウスを作製し、MOZ欠損胎児性繊維芽細胞を単離して増殖能、及びDNA傷害に対する感受性について調べたところ、MOZ欠損細胞はDNA傷害に対する感受性が高いことが示された。また、新規p53標的遺伝子としてSEMA3F遺伝子の機能解析を行った。SEMA3F遺伝子は分泌蛋白質で、ヌードマウスに移植した肺がん細胞株の増殖を著しく抑制した。この効果は、腫瘍形成の際の腫瘍血管新生の抑制作用を介したものであることが明らかとなった。一方、エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたが、クラスリンの軽鎖とp53とがクラスリンの重鎖のC末端領域への結合で競合することを明らかにした。

分担研究者

1. 田矢 洋一 国立がんセンター研究所  
放射線研究部・部長
2. 荒川 博文 国立がんセンター研究所  
生物物理学部・部長
3. 北林 一生 国立がんセンター研究所  
分子腫瘍学部・部長
4. 原 英二 徳島大学  
ゲノム機能研究センター・教授
5. 北川 雅敏 浜松医科大学  
医学部生化学第一講座・教授

A. 研究目的

非常に多くのヒトがんにおいて、p53とRB蛋白質を中心とした細胞周期、チェックポイント関連蛋白質に変異が起きていることがわかってきた。したがって、これらの蛋白質の生理機能を集中的に解析することによって、多くのヒトがんに共通した発がん機構を明らかにでき、新しいがん治療法開発への応用の道も開けると期待できる。本研究はそれを目指し

た。

B. 研究方法

- 1) RB蛋白質のリン酸化  
細胞にDNAダメージを与え、リン酸化部位特異的な抗体でRB蛋白質のリン酸化状態を解析した。
- 2) Mdmxのリン酸化  
Mdmxに14-3-3蛋白質が結合することを見つけており、MdmxのSer367のリン酸化がその結合に関与するらしいと推定したので、リン酸化されたSer367の周辺を特異的に認識する抗体を作製して解析を進めた。
- 3) クラスリンによるp53の生理機能の制御  
クラスリンの軽鎖(CLC)とp53とがクラスリンの重鎖(CHC)のC末端領域への結合で競合することを見つけていたので、クラスリン重鎖のさまざまな領域の欠変異体をreticulocyte lysateを用いてin vitro translationすることによって<sup>35</sup>S-Metラベルし、これらをGST-p53あるいはGST-CLCとのpull down assayにかけて競合部位の詳細なマッピングを

行った。

#### 4) MOZとp53

MOZのノックアウトマウスを作製し、MOZ欠損胎児性繊維芽細胞MEFにおけるDNA傷害に対する感受性を調べることにより、p53を介した細胞周期やアポトーシスの制御におけるMOZの役割について検討した。

#### 5) 新規p53標的遺伝子SEMA3Fの機能解析

プラスミドの発現ベクターを構築し、コロニーフォーメーションアッセイによって、細胞増殖抑制作用の有無を調べる。また、同時にアデウイルスベクターを構築し、一過性の発現系における細胞増殖への影響を調べる。FACSやTUNEL assayを行うことで、細胞増殖抑制作用がアポトーシスや細胞死によるものか、細胞周期停止によるものか等を調べて行く。安定発現細胞株を樹立し、腫瘍増殖への影響を調べる。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法にて、ヌードマウスに作製した皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を評価してゆく。

#### 6) 生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現動態

p16およびp21遺伝子の転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組み換えDNA断片を作成する。このDNAをマウスの受精卵に注射し、トランスジェニックマウスを作製する。

(倫理面への配慮)

1) 国立がんセンターの実験において用いる癌細胞株は世界的にも広く実験室で用いられている細胞であり、特定の患者検体を用いたものではない。また、ヌードマウスを用いた実験は、国立がんセンター動物実験倫理委員会の実験指針に従って行われた。

2) 徳島大学と浜松医大での臨床サンプルの使用にあたっては、それぞれの大学の倫理委員会の承認を得た後にインフォームドコンセントを経て行った。また、データの発表に関してはサンプルの提供者が特定出来ないように配慮した。

### C. 研究結果

以下の様な結果が得られた。

#### 1) RB蛋白質のリン酸化

DNAダメージを細胞に与えると、E2F種のうちE2F1のみがRB蛋白質と強く結合するようになることを見出した。この時、RB蛋白質のSer612のリン酸化がこの複合体形成を促進することも発見した。しかも、このリン酸化はChk1とChk2によってなされることも明らかにした。

#### 2) Mdmxのリン酸化

MdmxのSer367のリン酸化が14-3-3との結合に不

可欠であり、このリン酸化がMdmxによるp53抑制能を減弱させる事が明らかとなった。

#### 3) クラスリンによるp53の生理機能の制御

クラスリンの軽鎖上のクラスリン重鎖への結合に使われる領域とp53のSer46周辺の配列との間には有意な相同性があることも見いだした。そして、CHCはp300ヒストンアセチラーゼとp53との複合体形成を促進することによってp53依存性転写活性化能とアポトーシス誘導能を高めることもわかった。

#### 4) MOZとp53

野生型マウス胎児性繊維芽細胞ではアドリアマイシン処理後にG1期での細胞周期の停止が見られたが、MOZ欠損細胞では細胞周期の停止が殆ど見られず、野生型に比べてアポトーシスを起こす細胞が顕著に増加していた。

#### 5) 新規p53標的遺伝子SEMA3Fの機能解析

SEMA3F遺伝子は分泌蛋白質で、ヌードマウスに移植した肺がん細胞株の増殖を著しく抑制した。この効果は、腫瘍形成の際の腫瘍血管新生の抑制作用を介したものであることが明らかとなった。

#### 6) 生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現動態

マウスの生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性として検出できるトランスジェニックマウスの作製に成功した。

### D. 考察

#### 1) RB蛋白質のリン酸化

RB蛋白質のSer612のリン酸化がE2F1との複合体形成を促進することは全く予想していなかった新発見であり、しかも、そこをリン酸化する酵素がChk1と2であることを明らかにしたことは重要であり、RB蛋白質に関する全く新しい研究を切り開くと期待される。

#### 2) Mdmxのリン酸化

p53の分解におけるMdmxとMdm2の関係をさらに解明する必要がある。

#### 3) クラスリンによるp53の生理機能の制御

エンドサイトーシスとp53というこれまで全く関係ないと思われていた分野をつなぐ新しい研究分野が開かれると期待される。

#### 4) MOZとp53

MOZを欠失したマウス胎児性繊維芽細胞ではp21の発現誘導が見られないことにより細胞周期の停止が起こらないと考えられる。

#### 5) 新規p53標的遺伝子SEMA3Fの機能解析

p53による腫瘍血管新生抑制は古くから重要な腫瘍抑制機能と考えられていたが、その機能のメディエーターの一つがSEMA3Fであることを明らかとした。

今後はSEMA3Fによる腫瘍血管新生抑制機序を明らかとして行くことで、腫瘍血管新生を標的とした新しい治療法の開発が期待される。

6) 生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現動態  
p16とp21遺伝子発現可視化マウスを用いることでこれまで不明であったp16とp21遺伝子の生体内での機能を解明できる可能性が考えられる。

#### E. 結論

RB蛋白質のSer612のリン酸化、および、クラスリンとp53の結合はいずれも誰も予想していなかった新発見であり、今後、新しい研究分野を切り開くことになると思われる。MOZはDNA障害時のp53に依存したp21の発現誘導及び細胞周期の停止に必須である。生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現動態を解明出来る可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.: Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & Dev.*, in press.
2. Okamoto, K., Kashima, K., Pereg, Y., Ishida, M., Yamazaki, S., Nota, A., Teunisse, A., Migliorini, D., Kitabayashi, I., Marine, J-C., Prives, C., Shiloh, Y., Jochemsen, A.G., and Taya, Y.: DNA damage-Induced phosphorylation of MdmX at Serine-367 activates p53 by targeting MdmX for Mdm2-dependent degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9608-9620 (2005)
3. Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., Snyder, S.H. and Sawa, A.: p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, 4, 29-41 (2005).
4. Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M. and Saya H.: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280, 19166-19176 (2005).
5. Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Laviam P. and Levrero M.: A role of p73 in mitotic exit. *J. Biol. Chem.*, 280, 30354-30360 (2005).
6. Takai, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H.: Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 *in vitro*. *J. Biochem.*, 137, 381-386 (2005).
7. Ohkubo, S., Tanaka T., Taya, Y., Kitazato, K., Prives, C.: Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, in press
8. Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I.: MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.*, in press
9. Kishimoto M, Kohno T, Okudela K, Otsuka A, Sasaki H, Tanabe C, Sakiyama T, Hirama C, Kitabayashi I, Minna JD, Takenoshita S, Yokota J: Mutations and Deletions of the CBP Gene in Human Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11, 512-519, 2005.
10. Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, 105, 292-300, 2005.
11. Arakawa H.: p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ*, 12: 1057-1065, 2005
12. Nakamura Y, Futamura M, Kamino H, Yoshida K, Nakamura Y, Arakawa H.: Identification of p53-46F as a super p53 with an enhanced ability to induce p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* (in press)
13. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. & Hara, E.: Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell Biol.*, (2005) 167, 553-560.

14. Laman, H., Funes, J., Ye, H., Henderson, S., Galinanes-Garcia, L., Hara, E., Knowles, P., McDonald, N. & Boshoff, C.: Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclinD/cdk6. *EMBO J.*, (2005) 24, 3104-3116.
15. Han, J., Tsukada, Y., Hara, E., Kitamura, N. & Tanaka, T.: Hepatocyt growth factor induces redistribution of p21Cip1 and p27Kip1 through Erk-dependent p16 INK4a upregulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, (2005) 280, 31548-31556
16. Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Hara, E., Tenen, D.G., Hozumi, N. & Oikawa, T.: Site-specific DNA methylation by a complex of PU.1. and Dnmt3a/b. *Oncogene*, in press.
17. Uchida, C., Miwa, S., Isobe, T., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Yasuda, H. and Kitagawa, M.: Effect of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. *FEBS Letters* 580: 1753-1758, 2006
18. Isobe, T., Uchida, C., Hattori, T., Kitagawa, K., Oda, T. and Kitagawa, M.: Ubiquitin-dependent degradation of adenovirus E1A protein is inhibited by BS69. *Biochem Biophys Res Commun.* 339: 367-374, 2006.
19. Miwa, S., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Sugimura, H., Yasuda, H., Nakamura, H., Chida K. and Kitagawa, M.: Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 340: 54-61, 2006.
20. Kikuchi, H., Yamashita, K., Kawabata, T., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Sugimura, H. and Konno, H.: Immunohistochemical and genetic features of gastric and the metastatic liver GISTs, sequential analyses. *Cancer Sci.* 97, 127-132, 2006.
21. Ohashi, N., Yamamoto, T., Uchida, C., Togawa, A., Fukasawa, H., Fujigaki, Y., Suzuki, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Hayashi, H., Hishida, A. and Kitagawa, M.: Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- $\beta$ . *FEBS Letters* 579: 2557-2563, 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得  
無し
  2. 実用新案登録  
無し
  3. その他  
無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

細胞周期を制御する癌抑制蛋白質の生理機能の解析とそのがん治療への応用

分担研究者 田矢 洋一 国立がんセンター研究所放射線研究部・部長

研究要旨： エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたが、クラスリンの軽鎖とp53とがクラスリンの重鎖のC末端領域への結合で競合することを明らかにした。

#### A. 研究目的

RB蛋白質はCdk4-サイクリンDとCdk2-サイクリンEによる2段階のリン酸化を受けるが、その意義を明らかにする。一方、p53においても、そのリン酸化の生理的意義や結合蛋白質の機能の研究を進める。特に、エンドサイトーシスに際して膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が、核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見していたのでその解析を進める。

#### B. 研究方法

細胞にDNAダメージを与え、リン酸化部位特異的な抗体でRB蛋白質のリン酸化状態を解析した。一方では、Mdmxに14-3-3蛋白質が結合することを見つけており、MdmxのSer367のリン酸化がその結合に関与するらしいと推定したので、リン酸化されたSer367の周辺を特異的に認識する抗体を作製して解析を進めた。また、クラスリンの軽鎖(CLC)とp53とがクラスリンの重鎖(CHC)のC末端領域への結合で競合することを見つけていたので、クラスリン重鎖のさまざまな領域の欠失変異体をreticulocyte lysateを用いてin vitro translationすることによって<sup>35</sup>S-Metラベルし、これらをGST-p53あるいはGST-CLCとのpull down assayにかけて競合部位の詳細なマッピングを行った。

#### C. 研究結果

DNAダメージを細胞に与えると、E2F種のうちE2F1のみがRB蛋白質と強く結合するようになることを見出した。この時、RB蛋白質のSer612のリン酸化がこの複合体形成を促進することも発見した。しかも、このリン酸化はChk1とChk2によってなされることも明

らかにした。Mdmxについては、Ser367のリン酸化が14-3-3との結合に不可欠であり、このリン酸化がMdmxによるp53抑制能を減弱させる事が明らかとなった。クラスリンの軽鎖上のクラスリン重鎖への結合に使われる領域とp53のSer46周辺の配列との間には有意な相同性があることも見いだした。そして、CHCはp300ヒストンアセチラーゼとp53との複合体形成を促進することによってp53依存性転写活性化能とアポトーシス誘導能を高めることもわかった。

#### D. 考察

RB蛋白質のSer612のリン酸化がE2F1との複合体形成を促進することは全く予想していなかった新発見であり、しかも、そこをリン酸化する酵素がChk1と2であることを明らかにしたことは重要であり、RB蛋白質に関する全く新しい研究を切り開くと期待される。

p53の分解におけるMdmxとMdm2の関係をさらに解明する必要がある。

クラスリンとp53については、エンドサイトーシスとp53というこれまで全く関係ないと思われていた分野をつなぐ新しい研究分野が開かれると期待される。

#### E. 結論

RB蛋白質のSer612のリン酸化、および、クラスリンとp53の結合はいずれも誰も予想していなかった新発見であり、今後、新しい研究分野を切り開くことになると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.: Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & Dev.*, in press.
2. Okamoto, K., Kashima, K., Pereg, Y., Ishida, M., Yamazaki, S., Nota, A. Teunisse, A., Migliorini, D., Kitabayashi, I., Marine, J-C., Prives, C., Shiloh, Y., Jochemsen, A.G., and Taya, Y.: DNA damage-Induced phosphorylation of MdmX at Serine-367 activates p53 by targeting MdmX for Mdm2-dependent degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9608-9620 (2005)
3. Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., Snyder, S.H. and Sawa, A.: p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, 4, 29-41 (2005).
4. Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M. and Saya H.: Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 280, 19166-19176 (2005).
5. Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., Taya, Y., Laviam P. and Levrero M.: A role of p73 in mitotic exit. *J. Biol. Chem.*, 280, 30354-30360 (2005).
6. Takai, T., Fukazawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and Hirai, H.: Preferences in phosphorylation sites in the retinoblastoma protein between D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 *in vitro*. *J. Biochem.*, 137, 381-386 (2005).
7. Ohkubo, S., Tanaka T., Taya, Y., Kitazato, K., Prives, C.: Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, in press

2. 学会発表

1. Yoichi Taya: p53 and clathrin heavy chain mutually regulate their functions. 国際ワークショップ "Cell Regulation in Division and Arrest" 沖縄科学技術研究基盤整備機構の沖縄大学院大学先行的研究事業のG0細胞ユニットの代表研究者である柳田充弘・京都大学特任教授の主催 沖縄県うるま市 2006年3月8日
2. Yoichi Taya: p53 and clathrin heavy chain regulate mutual functions in nucleus and cytoplasm. 北海道大学大学院理学研究科主催の国際シンポジウム "Regulation of Protein Function through Post-translational Modifications: New Technologies and Application to Biomedical Systems" 札幌市 2006年3月16日
3. 田矢洋一: クラスリンによるp53の生理機能の制御. 日本分子生物学会 第5回春季シンポジウム 新潟市 2006年5月16日
4. 江成政人、田矢洋一: クラスリンによる p53 の転写調節制御. 第 64 回 日本癌学会学術総会シンポジウム 札幌市 2005 年 9 月 16 日
5. 川瀬竜也、大木理恵子、太田 力、市川 仁、田矢洋一: p53 標的遺伝子の同定による p53N 末端ドメインのリン酸化修飾の生理的意義の解明. 第 64 回 日本癌学会学術総会、札幌市 2005 年 9 月 14 日
6. 大森一二、江成政人、田矢洋一: p53 による転写におけるクラスリン重鎖の重要性. 第 64 回 日本癌学会学術総会、札幌市 2005 年 9 月 14 日
7. 大木理恵子、川瀬竜也、太田 力、市川 仁、田矢洋一: 内在的に発現する選択的翻訳産物である mini p53 (p53/47) により転写誘導される遺伝子の同定と機能解析. 第 64 回日本癌学会学術総会、札幌市 2005 年 9 月 15 日
8. 井上靖道、田矢洋一: DNA 傷害時における特定部位のリン酸化による pRB の活性制御 第 64 回 日本癌学会学術総会、札幌市 2005 年 9 月 16 日
9. 加島 健史、岡本 康司、後藤 由季子、田矢 洋一: 14-3-3 結合と p53 活性化を誘導する Mdmx-Ser367 kinase の解析. 第 28 回日本分子生物学会 福岡 2005 年 12 月 9 日
10. 川瀬竜也、大木理恵子、太田 力、市川 仁、田矢洋一: p53 転写活性化ドメイン内のリン酸化修飾依存的に誘導される新規 p53 標的遺伝子の同定、および機能解析 第 28 回日本分子生物学会 福岡 2005 年 12 月 8 日



11. 岡本康司, 加島健史, Yaron Pereg, 石田三智子, 山崎智美, 野田亜由美, Amina Teunisse, Dominico Migliorini, 北林一生, Jean-Christophe Marine, Carol Prives, Yosef Shiloh, Aart Jochemsen, 田矢 洋一: DNA 傷害により誘導される Mdmx セリン 367 のリン酸化は、Mdm2 依存的な Mdmx の分解を促進する事により、p53 を活性化する. 第 28 回日本分子生物学会 福岡 2005 年 12 月 7 日
12. 井上靖道、田矢洋一: DNA 傷害時における pRB の Ser612 のリン酸化は E2F-1-pRB 複合体形成を促進する. 第 28 回日本分子生物学会 福岡 2005 年 12 月
13. 大木理恵子、佐藤渉、田矢洋一: 新規 shRNA ライブラリーの構築とライブラリーを用いた転写因子としての p53 の機能制御に関わる因子のスクリーニング. 第 28 回日本分子生物学会年会 福岡 2005 年 12 月 9 日

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

p53 標的遺伝子類の解析とそのがん治療への応用

分担研究者 荒川 博文 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨

がん抑制遺伝子 p53 の生理機能の全貌解明とそのがん治療への応用のために新規 p53 標的遺伝子の機能解析とその抗腫瘍効果の評価を行った。新規 p53 標的遺伝子として SEMA3F 遺伝子と BLNK 遺伝子の機能を解析した。前者は腫瘍血管新生抑制作用を介した抗腫瘍効果を有すること、後者はカスパー非依存性細胞死を誘導する事実を見出した。また、活性型 p53 と考えられる p53-46F 遺伝子の腫瘍への導入が、顕著な抗腫瘍効果を示すことを証明した。SEMA3F の血管新生抑制作用、BLNK の細胞死誘導作用、活性型 p53-46F の遺伝子導入はがん治療への応用が期待される。

A. 研究目的

がん化のメカニズムは未だ十分には解明されておらず、一旦発症した個体における疾患としてのがんについての対策も改善されるべき点がかなり多い状況である。p53 については既に遺伝子治療が臨床応用されているが未だそのがん抑制機序の全貌は明らかとなっておらず、その標的遺伝子の機能解析は、p53 の機能解明を格段に前進させるだけでなく、さらには既存のがん治療法を改善し、また、それを応用した新しいがん治療法を開発しようと予想される。

B. 研究方法

アデノウイルスに組み込んだ p53-46F 遺伝子の導入により顕著なアポトーシスが誘導される肝がん細胞株 (HepG2) において、p53 及び p53-46F 依存性の発現誘導を示す遺伝子群について個々の遺伝子の機能解析を行う。また、p53 によって発現制御される神経軸索誘導関連遺伝子について、個々の遺伝子の抗腫瘍作用の有無とそのメカニズムを明らかとする。

機能解析はまず、プラスミドの発現ベクターを構築し、コロニーフォーメーションアッセイによって、細胞増殖抑制作用の有無を調べる。また、同時にアデノウイルスベ

クターを構築し、一過性の発現系における細胞増殖への影響を調べる。FACS や TUNEL assay を行うことで、細胞増殖抑制作用がアポトーシスや細胞死によるものか、細胞周期停止によるものか等を調べて行く。安定発現細胞株を樹立し、腫瘍増殖への影響を調べる。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法にて、ヌードマウスに作成した皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を評価してゆく。興味深い分子については抗体を作成し、細胞生化学的解析を進めて行く。siRNA やノックアウトマウスなどの機能抑制実験を進める。

(倫理面への配慮)

研究を行うにあたっての倫理面への問題性はない。

C. 研究結果

本年度は、新規 p53 標的遺伝子として SEMA3F 遺伝子と BLNK 遺伝子の機能解析を行った。前者の SEMA3F 遺伝子は分泌蛋白質で、ヌードマウスに移植した肺がん細胞株の増殖を著しく抑制した。この効果は、腫瘍形成の際の腫瘍血管新生の抑制作用を介したものであることが明らかとなった。

一方、後者の BLNK 遺伝子は、SH2 ドメインを有するリンカー蛋白質で、白血病にお

おけるがん抑制遺伝子として報告されていたがその機能は不明であった。我々は BLNK がカスパー非依存性の細胞死を誘導する事実を見出した。

活性型 p53-46F 遺伝子導入が、肺癌細胞株に対して顕著な抗腫瘍効果を示すことを *in vivo* で証明した。この効果は正常型 p53 の遺伝子導入よりも効果的であることを見出した。また、この作用が、p53-46F による、セリン 15 のリン酸化の上昇、標的遺伝子の転写活性化能の上昇、p21/WAF1 蛋白質の減少によって引き起こされる機序を明らかとした。

#### D. 考察

本年度の研究から、p53 によるがん抑制機能の中で、最も重要とされる腫瘍血管新生抑制と細胞死制御について新しい知見を得ることが出来た。

SEMA3F は分泌蛋白質であり、腫瘍形成の初期段階における腫瘍血管新生を抑制することで腫瘍増殖を顕著に抑制することが明らかとなった。p53 による腫瘍血管新生抑制は古くから重要な腫瘍抑制機能と考えられていたが、その機能のメディエーターの一つが SEMA3F であることを明らかとした。今後は SEMA3F による腫瘍血管新生抑制機序を明らかとして行くことで、腫瘍血管新生を標的とした新しい治療法の開発が期待される。

BLNK がカスパー非依存性の細胞死を誘導する事実を明らかとした。p53 依存性アポトーシスはカスパー依存性の細胞死であると考えられていたが、p53 が BLNK の発現誘導を介して、カスパー非依存性細胞死に関与する可能性が示唆された。ある種のがんではカスパー抑制物質による細胞死の抑制が、抗癌剤や放射線に対する耐性獲得に重要であることが報告されており、カスパーを介さない細胞死は、これら耐性がんの治療を考える上で重要である。BLNK および p53 によるカスパー非依存性細胞死のメカニズムを明らかとすることで、細胞死を基盤とした新しいがん治療法の開発が期待される。

活性型 p53-46F が、抗癌剤や放射線などを必要としない質的活性化状態にあり、増強した転写活性化能を介して、または、p21/WAF1 蛋白質の積極的な量的抑制によって、p53 依存性細胞死を促進する事実を明らかとした。この知見は、これまでの正常型 p53 遺伝子導入による遺伝子治療においては、むしろ活性型 p53-46F を用いることで、治療効果を格段に改善しうる可能性があることを示唆した。また、適切なベクターあるいはデリバリーシステムとの組み合わせによって、進行癌に対する強力な治療法となりうる可能性が示唆された。また、p53-46F による p21/WAF1 蛋白質減少のメカニズムの解明とその臨床応用は、これまでの抗癌剤や放射線によるがん治療を格段に改善しうると考えられる。

#### E. 結論

がんにおけるその重要性から、p53 に関する研究とその成果は膨大であるが、それにもかかわらず、そのがん抑制機序の全貌は未だ不明のままである。p53 の生理機能の全貌解明のためには、個々の p53 標的遺伝子の機能の理解が不可欠であると考えられる。それによってこれまでのがん治療を格段に改善しうる新しい治療法の開発が可能になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照のこと。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Arakawa H. p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ*, 12: 1057-1065, 2005

2. Nakamura Y, Futamura M, Kamino H, Yoshida K, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of p53-46F as a super p53 with an enhanced ability to induce p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* (in press)

## 2. 学会発表

1. 荒川博文 第64回日本癌学会学術総会シンポジウム S32 p53 研究の現在・未来 演題「転写因子 p53 とがん治療」

2. 二村学、加美野宏樹、増田佳子、中村康之、喜多村憲章、大西志保、宮本祐士、清野透、荒川博文 第64回日本癌学会学術総会ワークショップ W4-2 p53 関連遺伝子(1) 演題「p53 のがん抑制機能における semaphorin 3F の役割」

3. 中村康之、二村学、中村祐輔、荒川博文 第64回日本癌学会学術総会ワークショップ W4-2 p53 関連遺伝子(1) 演題「アポトーシス誘導型変異体 p53-46F の腫瘍抑制機序について」

4. 加美野宏樹、二村学、増田佳子、大西志保、宮本祐士、中村康之、市川仁、太田力、大木操、清野透、荒川博文 第64回日本癌学会学術総会ポスター pp124 p53 関連遺伝子(1) 演題「アポトーシス誘導型変異体 p53-46F の標的遺伝子としてのがん抑制遺伝子 BLNK の同定」

5. 増田佳子、二村学、加美野宏樹、中村康之、市川仁、太田力、大木操、清野透、江上寛、荒川博文 第64回日本癌学会学術総会ポスター pp124 p53 関連遺伝子(1) 演題「p53 標的遺伝子としての難聴遺伝子 DFNA5 の同定」

6. 喜多村憲章、二村学、中村康之、荒川博文 第64回日本癌学会学術総会ポスター pp209 アポトーシス・不死化(3) 演題「細胞死における netrin-1 の役割について」

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

ヒストンアセチル化酵素MOZ及びPMLによるp53の機能制御に関する研究

分担研究者 北林 一生 国立がんセンター研究所分子腫瘍学部

研究要旨 MOZ欠損胎仔性繊維芽細胞では、DNA傷害による細胞周期の停止が見られず、アポトーシスが促進された。このとき、p21の発現上昇が低下し、Baxの発現が上昇していた。

A. 研究目的

ヒストンアセチル化酵素MOZ及びPMLは急性白血病における染色体転座に関与する。本研究は、がん抑制因子p53の機能制御におけるMOZ及びPMLの役割を調べ、白血病発症の分子メカニズムを明らかにすることにより、新たな白血病治療法開発のための基礎とすることを目的とする。

B. 研究方法

MOZのノックアウトマウスを作成し、MOZ欠損胎児性繊維芽細胞MEFにおけるDNA傷害に対する感受性を調べることにより、p53を介した細胞周期やアポトーシスの制御におけるMOZの役割について検討した。また、MOZ欠損細胞におけるp21やBaxなどp53の制御する遺伝子の発現の変化について調べた。

C. 研究結果

野生型マウス胎児性繊維芽細胞ではアドリアマイシン処理後にG1期での細胞周期の停止が見られたが、MOZ欠損細胞では細胞周期の停止が殆ど見られず、野生型に比べてアポトーシスを起こす細胞が顕著に増加していた。p53の下流遺伝子を調べたところ、MOZ欠損細胞では細胞周期の停止に関わるp21の発現上昇が見られず、アポトーシスに関わるBaxの発現がアドリアマイシン処理後早期から上昇していた。

D. 考察

MOZを欠失したマウス胎児性繊維芽細胞ではp21の発現誘導が見られないことにより

細胞周期の停止が起こらないと考えられる。一方でBaxの発現は早期から誘導されることからDNA傷害に対する感受性が増大していると考えられる。

E. 結論

MOZはDNA障害時のp53に依存したp21の発現誘導及び細胞周期の停止に必須である。また、Baxの発現を抑制してアポトーシスを抑制する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.*, in press

Enari M, Ohmori, K, Kitabayashi I, Taya Y Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes & Dev.*, in press

Kishimoto M, Kohno T, Okudela K, Otsuka A, Sasaki H, Tanabe C, Sakiyama T, Hiramata C, Kitabayashi I, Minna JD, Takenoshita S, Yokota J Mutations and Deletions of the CBP Gene in Human Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **11**, 512-519, 2005.

Nguyen LA, Pandolfi PP, Aikawa Y, Tagata Y, Ohki M, Kitabayashi I. Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood*, **105**, 292-300, 2005.

## 厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

## （分担）研究報告書

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節機構と Cdk4・サイクリン D の活性制御機構に関する研究

（分担）研究者 原 英二 徳島大学・教授

研究要旨：サイクリン D-CDK4 キナーゼの活性化因子である p34<sup>SEI-1</sup> 蛋白の機能を解明するために p34<sup>SEI-1</sup> 蛋白と結合する蛋白を検索したところ、PP2A 複合体を同定した。また、生体内における p16 および p21 遺伝子の発現動態の解明を可能にする p16 遺伝子および p21 遺伝子の発現可視化マウスの作成に成功した。

## A. 研究目的

発がんの分子メカニズムを明らかにし、発がんの鍵を握る分子を標的とした特異性の高い抗癌剤開発を可能にする基礎的データを得ることを目的としている。

## B. 研究方法

1). Flag-tagを附加したp34<sup>SEI-1</sup>蛋白を発現させ、抗Flag抗体と共沈殿した複合体を質量分析計する。  
2). p16およびp21遺伝子の転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組み換えDNA断片を作成する。このDNAをマウスの受精卵に注射し、トランスジェニックマウスを作成する。

（倫理面への配慮）

本研究では、徳島大学動物実験指針に従い、麻酔を用いることでマウスの苦痛を最大限抑えた。また、既にライン化されている提供者不明のヒト細胞株を用いることで人権擁護上の配慮や研究方法による研究対象者に対する不利益や危険性を排除した。

## C. 研究結果

1) p34<sup>SEI-1</sup>蛋白は細胞内において活性を持つPP2A複合体と結合していることを見出した。  
2) マウスの生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性として検出できるトランスジェニックマウスの作成に成功した。

## D. 考察

細胞内においてp34<sup>SEI-1</sup>蛋白の多くはPP2A複合体と結合していることから、p34<sup>SEI-1</sup>蛋白はPP2Aを介してサイクリンD-CDK4キナーゼの活性を制御している可能性が考えられる。

また、p16とp21遺伝子発現可視化マウスを用いることでこれまで不明であったp16とp21遺伝子の生体内での機能を解明できる可能性が考えられる。

## E. 結論

本研究より、p34<sup>SEI-1</sup>蛋白の作用機序解明の糸口を見つけることが出来た。また、生体内におけるp16およびp21遺伝子の発現動態を解明出来る可能性が示された。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

Laman, H. *et al.*, EMBO J., (2005) 24, 3104-3116.

Han, J. *et al.*, J. Biol. Chem. (2005) 280, 31548-31556.

Suzuki, M. *et al.*, Oncogene, (2005) in press

## 2. 学会発表

原 英二 細胞老化の不可逆性：RB/p53-非依存的細胞周期停止機構の解明。日本分子生物学会 2005年12月7日（福岡）  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

## 1. 特許取得

無し

## 2. 実用新案登録

無し

## 3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

細胞周期関連蛋白質の分解制御機構に関する研究

分担研究者 北川 雅敏 浜松医科大学・医学部・教授

研究要旨 RB蛋白質はp53非依存的にMdm2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、MdmXはRB蛋白質のMdm2によるユビキチン化を抑制的に制御していることを見いだした。

A. 研究目的

本年度の研究では癌遺伝子産物Mdm2による癌抑制遺伝子産物pRBの分解機構の詳細に解析し、p53およびMdmXの関与について解析することを目的とする。

B. 研究方法

免疫共沈法によりpRBとMdm2、さらにp53およびMdmXをU2OS等の培養細胞に発現させ、ユビキチン化アッセイで解析する。一方でサイクロヘキシミドを用いてpRBの分解速度の解析を行う。

C. 研究結果

昨年度までに、Mdm2によりpRBがユビキチン依存的分解を受けることを見いだした。今年度は下記の成果を得た。

①Mdm2蛋白質上のpRBの結合領域はp53と異なり、両方の領域がMdm2の形質転換能に必要なことがわかった。またp53非存在下でもMdm2依存的なpRBのユビキチン化がおり、Mdm2によるpRBのユビキチン化はp53に非依存的であった。

②MdmXの共発現によりMdm2依存的なpRBのユビキチン化が阻害された。このことはpRBとMdm2結合に対してはMdmXはMdm2と競合することによることが判明した。また、MdmXのノックダウンによりpRBの発現が抑制され、p53は逆に蓄積した。

D. 考察

Mdm2が高発現しているヒトの癌ではp53のstatusに関わらずRBの分解が亢進され、RB癌抑制経路の攪乱が起こるこ

とが示唆された。一方で、MdmXはp53のMdm2依存的分解を加速するが、pRBのMdm2依存的分解に対しては逆に抑制的に機能する。

E. 結論

ユビキチンリガーゼMdm2はp53非依存的なpRBの分解因子であり、新たな細胞悪性化機構との一つであることが示唆された。

G. 研究発表（論文発表）

- 1 Uchida, C., Miwa, S., Isobe, T., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Yasuda, H. and Kitagawa, M.: Effect of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB. *FEBS Letters* 580: 1753-1758, 2006
- 2 Isobe, T., Uchida, C., Hattori, T., Kitagawa, K., Oda, T. and Kitagawa, M.: Ubiquitin-dependent degradation of adenovirus E1A protein is inhibited by BS69. *Biochem Biophys Res Commun.* 339: 367-374, 2006.
- 3 Miwa, S., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Sugimura, H., Yasuda, H., Nakamura, H. Chida K. and Kitagawa, M.: Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 340: 54-61, 2006.
- 4 Kikuchi, H., Yamashita, K., Kawabata, T., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Sugimura, H. and Konno, H.: Immunohistochemical and genetic features of gastric and the metastatic liver GISTs, sequential analyses. *Cancer Sci.* 97, 127-132, 2006.
- 5 Ohashi, N., Yamamoto, T., Uchida, C., Togawa, A., Fukasawa, H., Fujigaki, Y., Suzuki, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Hayashi, H., Hishida, A. and Kitagawa, M.: Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- $\beta$ . *FEBS Letters* 579: 2557-2563, 2005.
- 6 Takaki, T., Fukasawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., Taya, Y. and 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.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名   | 発表誌名                    | 巻号  | ページ         | 出版年  |
|---|---|-------------------------|-----|-------------|------|
| Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. and <u>Taya, Y.</u>  | Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription.   | <i>Genes &amp; Dev.</i> | 20  | in press    | 2006 |
| Okamoto, K., Kashima, K., Pereg, Y., Ishida, M., Yamazaki, S., Nota, A., Teunisse, A., Migliorini, D., Kitabayashi, I., Marine, J-C., Prives, C., Shiloh, Y., Jochemsen, A. G., and <u>Taya, Y.</u> | DNA damage-Induced phosphorylation of MdmX at Serine-367 activates p53 by targeting MdmX for Mdm2-dependent degradation.        | <i>Mol. Cell. Biol.</i> | 25  | 9608-9620   | 2005 |
| Bae, B.I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., <u>Taya, Y.</u> , Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., Snyder, S.H. and Sawa, A.  | p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease.   | <i>Neuron</i>           | 4   | 29-41       | 2005 |
| Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., <u>Taya, Y.</u> , Nakao, M. and Saya, H.   | Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria.                  | <i>J. Biol. Chem.</i>   | 280 | 19166-19176 | 2005 |
| Merlo, P., Fulco, M., Costanzo, A., Mangiacasale, R., Strano, S., Blandino, G., <u>Taya, Y.</u> , Laviam P. and Levrero M.  | A role of p73 in mitotic exit.  | <i>J. Biol. Chem.</i>   | 280 | 30354-30360 | 2005 |
| Takaki, T., Fukasawa, K., Suzuki-Takahashi, I., Semba, K., Kitagawa, M., <u>Taya, Y.</u> , and Hirai, H.  | Preferences for phosphorylation sites in the retinoblastoma protein of D-Type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6 in vitro. | <i>J. Biochem.</i>      | 137 | 381-386     | 2005 |



|  |  |                                       |        |             |      |
|--|--|---------------------------------------|--------|-------------|------|
| Ohkubo, S.,<br>Tanaka, T.,<br><u>Taya, Y.</u> , Kitazato,<br>K. and Prives, C.   | Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription.  | <i>J. Biol. Chem.</i>                 |        | in press    | 2006 |
| <u>Arakawa, H.</u>   | p53, apoptosis and axon-guidance molecules.  | <i>Cell Death and Differentiation</i> | 12 (8) | 1057-1065   | 2005 |
| Nakamura, Y.,<br>Futamura, M.,<br>Kamino, H.,<br>Yoshida, K.,<br>Nakamura, Y., and<br><u>Arakawa, H.</u>   | Identification of p53-46F as a super p53 with an enhanced ability to induce p53-dependent apoptosis.   | <i>Cancer Science</i>                 |        | in press    | 2006 |
| Katsumoto, T.,<br>Aikawa, Y.,<br>Iwama, A., Ueda,<br>S., Ichikawa, H.,<br>Ochiya, T. and<br><u>Kitabayashi, I.</u>   | MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells.  | <i>Genes &amp; Dev.</i>               |        | in press    | 2006 |
| Kishimoto, M.,<br>Kohno, T.,<br>Okudela, K.,<br>Otsuka, A., Sasaki,<br>H., Tanabe, C.,<br>Sakiyama, T.,<br>Hirama, C.,<br><u>Kitabayashi, I.</u> ,<br>Minna, J.D.,<br>Takenoshita, S.,<br>and Yokota, J. | Mutations and Deletions of the CBP Gene in Human Lung Cancer.  | <i>Clinical Cancer Research</i>       | 11     | 512-519     | 2005 |
| Nguyen, L.A.,<br>Pandolfi, P.P.,<br>Aikawa, Y., Tagata,<br>Y., Ohki, M. and<br><u>Kitabayashi, I.</u>  | Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML.  | <i>Blood</i>                          | 105    | 292-300     | 2005 |
| Laman, H., Funes,<br>J., Ye, H.,<br>Henderson, S.,<br>Galinanes-Garcia,<br>L., <u>Hara, E.</u> ,<br>Knowles, P.,<br>McDonald, N., and<br>Boshoff, C.   | Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6.   | <i>EMBO J.</i>                        | 24     | 3104-3116   | 2005 |
| Han, J., Tsukada,<br>Y., <u>Hara, E.</u> ,<br>Kitamura, N.<br>and Tanaka, T.   | Hepatocyte growth factor induces redistribution of p21Cip1 and p27Kip1 through Erk-dependent p16 INK4a upregulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells. | <i>J. Biol. Chem.</i>                 | 280    | 31548-31556 | 2005 |

|   |  |                                   |        |           |      |
|---|--|-----------------------------------|--------|-----------|------|
| Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., <u>Hara, E.</u> , Tenen, D.G., Hozumi, N. and Oikawa, T.   | Site-specific DNA methylation by a complex of PU.1. and Dnmt3a/b.  | <i>Oncogene</i>                   |        | in press  | 2006 |
| Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones N. and <u>Hara, E.</u>  | Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. | <i>J. Cell Biol.</i>              | 168(4) | 553-560   | 2005 |
| Uchida, C., Miwa, S., Isobe, T., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Yasuda, H. and <u>Kitagawa, M.</u>   | Effect of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB.   | <i>FEBS Letters</i>               | 580    | 1753-1758 | 2006 |
| Isobe, T., Uchida, C., Hattori, T., Kitagawa, K., Oda, T. and <u>Kitagawa, M.</u>   | Ubiquitin-dependent degradation of adenovirus E1A protein is inhibited by BS69.  | <i>Biochem Biophys Res Commun</i> | 339    | 367-374   | 2006 |
| Miwa, S., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Oda, T., Sugimura, H., Yasuda, H., Nakamura, H., Chida K., and <u>Kitagawa, M.</u>   | Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner.                                  | <i>Biochem Biophys Res Commun</i> | 340    | 54-61     | 2006 |
| Kikuchi, H., Yamashita, K., Kawabata, T., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Kitagawa, K., <u>Kitagawa, M.</u> , Sugimura, H. and Konno, H | Immunohistochemical and genetic features of gastric and the metastatic liver GISTs, sequential analyses.                     | <i>Cancer Sci.</i>                | 97     | 127-132   | 2006 |

|   |  |                     |     |           |      |
|---|--|---------------------|-----|-----------|------|
| Ohashi, N.,<br>Yamamoto, T.,<br>Uchida, C.,<br>Togawa, A.,<br>Fukasawa, H.,<br>Fujigaki, Y.,<br>Suzuki, S.,<br>Kitagawa, K.,<br>Hattori, T., Oda,<br>T., Hayashi, H.,<br>Hishida, A. and<br><u>Kitagawa, M.</u> | Transcriptional induction<br>of Smurf2 ubiquitin ligase<br>by TGF- $\beta$ . | <i>FEBS Letters</i> | 579 | 2557-2563 | 2005 |
|---|--|---------------------|-----|-----------|------|