

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 田矢 洋一

平成19（2007）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 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 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 の生理機能の解析とそのがん治療へ の応用 田矢 洋一	----- 5
2. p53標的遺伝子類の解析とその がん治療への応用 荒川 博文	----- 7
3. ヒストンアセチル化酵素MOZ 及びPMLによるp53の機能制御 北林 一生	----- 10
4. p16 ^{INK4a} 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 原 英二	----- 11
5. 細胞周期関連蛋白質の分解制御機構 北川 雅敏	----- 12
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13

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： p53及びAML1複合体に含まれる因子の安定性を調べるとHIPK2及びp300がプロテアソーム依存的にFbx3により分解され、PMLはこれらの分解を阻害した。故に、PMLはHIPK2やp300のプロテアソーム依存的な分解を阻害して複合体を安定化することにより転写を促進すると考えられる。新規p53標的遺伝子として同定された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。また、p53が細胞膜周辺でエンドサイトーシスや細胞運動を制御しているということも全く予想されていなかったことを発見したが、これはがん転移を防ぐ方法の開発に応用できるのではないかと期待できる。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。一方、生体内におけるp16^{INK4a}及びp21^{Waf1}遺伝子の発現動態をリアルタイムに解析出来るインビボ・イメージングシステムの構築に成功した。

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) PMLとp53

FALGタグを付けたPMLを発現させたK562細胞からPMLタンパク質複合体を精製し、PMLと結合して作用する因子を質量分析を用いて同定した。

2) 新規p53標的遺伝子としてSEMA3F遺伝子とNRP2遺伝子

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た。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を調べた。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た。

3) 細胞膜周辺でのp53の新機能

細胞膜周辺でのp53を蛍光顕微鏡や免疫電子顕微

鏡で観察した。

4) RB蛋白質

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。さらにその際のE2F-1とRB蛋白質との結合を解析した。

5) p16^{INK4a}及びp21^{Waf1}

マウスの生体内におけるp16遺伝子及びp21^{Waf1}の発現をバイオミネッセンスにより可視化した。そして、パピローマができる時期を解析した。

(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) PMLとp53

p53及びAML1複合体に含まれる因子の安定性を調べるとHIPK2及びp300がプロテアソーム依存的にFbx3により分解され、PMLはこれらの分解を阻害した。

2) 新規p53標的遺伝子としてSEMA3F遺伝子とNRP2遺伝子

新規p53標的遺伝子としてSEMA3F遺伝子とNRP2遺伝子及びDFNA5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。p53をノックダウンした大腸がんをヌードマウスに移植したところ、コントロールに比べ、腫瘍の増大と血管新生の増加を認めた。この腫瘍におけるSEMA3F NRP2の発現レベルを調べたところ、p53ノックダウン細胞株から発生した腫瘍で、発現の低下を認めた。この腫瘍にアデノウイルスを用いてSEMA3Fを導入したところ、腫瘍増殖の抑制と血管新生抑制を認めた。さらに、p53ノックダウン腫瘍で、SEMA3Fの機能的レセプターであるNRP2の発現低下を認め、NRP2もまたp53によってその発現が制御されるp53標的遺伝子であることを証明した。SEMA3FとNRP2の結合は細胞増殖を抑制することを証明した。

3) 細胞膜周辺でのp53の新機能

EGFを加えるとp53は細胞膜付近のアクチンファイバー周辺に集まることや、p53をノックダウンするとアクチンファイバーのメッシュ状構造が形成され

なくなることも見いだした。さらにp53をノックダウンすると細胞運動が亢進し、そこに正常なp53を戻してやると再び細胞運動が抑制されることもわかった。

4)

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。

5) p16^{INK4a}及びp21^{Waf1}

生体内におけるp16^{INK4a}及びp21^{Waf1}遺伝子の発現動態をリアルタイムに解析出来るインビボ・イメージングシステムの構築に成功した。

D. 考察

1) PMLと p53

PMLはHIPK2やp300のプロテアソーム依存的な分解を阻害して複合体を安定化することにより転写を促進すると考えられる。

2) 新規p53標的遺伝子としてSEMA3F遺伝子とNRP2遺伝子

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。また、p53ノックダウン腫瘍の解析から、p53による腫瘍血管新生抑制の重要なメディエーターの一つがSEMA3Fであることを明らかとなった。さらにSEMA3FのレセプターであるNRP2もp53の標的遺伝子であることを証明し、p53がSEMA3F-NRP2経路を、リガンドとレセプターの両方を制御することで、腫瘍血管抑制や細胞増殖抑制をオートクリンやパラクリンの様式で制御する可能性を示したことで、SEMA3F-NRP2経路の応用による腫瘍血管新生、および細胞増殖を標的とした新しい治療法の開発が期待される。

3) 細胞膜周辺でのp53の新機能

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。また、p53が細胞運動を抑制しているということは、p53が変異して失活すると癌細胞の浸潤や転移が起き易くなることをも示唆しており、今後そういう方向へ研究が発展することも期待される。

4) RB蛋白質

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

5) p16^{INK4a}及びp21^{Waf1}

インビボ・イメージングシステムを用いることにより生体内における発癌防御反応の解析が可能となり、発癌メカニズムの解析のみならず、抗癌剤のスクリーニング等にも活用されることが期待される。

E. 結論

RB蛋白質がサイクリン依存性キナーゼ以外の酵素でリン酸化され、しかもこれが細胞増殖時ではなくてDNAダメージの際に起きるということは誰も予想していなかった新発見である。p53が細胞膜周辺でエンドサイトーシスや細胞運動を制御しているということも全く予想されていなかった新発見である。これはがん転移を防ぐ方法の開発に応用できるのではないかと期待できる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue, Y., Kitagawa, M. and Taya, Y.: Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.*, 26, 2083-2093 (2007)
1. Ohki, R., Kawase, T., Ohta, T., Ichikawa, H. and Taya, Y.: Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci.*, 98, 189-200 (2007)
2. M. Enari, K. Ohmori, I. Kitabayashi and Y. Taya.: Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev.*, 20, 1087-1099 (2006).
3. Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek and Y. Shiloh.: Chromatin relaxation in response to DNA double strand breaks: a novel ATM- and KAP-1-dependent pathway. *Nature Cell Biol.*, 8, 870-876 (2006).
4. S. Ohkubo, T. Tanaka, Y. Taya, K. Kitazato and C. Prives.: Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription. *J. Biol Chem.*, 281, 16943-16950 (2006).
6. Y. Pereg, S. Lam, A. Teunisse, S. Biton, Meulmeester, L. Mittelman, D. Delia, K. Okamoto, Y. Taya, Y. Shiloh and A. Jochemsen.: Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylation of Hdmx in response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, 26, 6819-6831 (2006).
7. Okamoto, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.: KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 216-222 (2006)
8. 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*, 97: 633-641, 2006
9. Masuda Y, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Ohnishi S, Miyamoto Y, Ichikawa H, Ohta T, Ohki M, Kiyono T, Egami H, Baba H and Arakawa H. : The potential role of DFNA5a hearing impairment gene in p53-mediated cellular response to DNA damage. *J Hum Genet*, 51: 652-664, 2006
10. Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y and Arakawa H.: Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res*, 67: 1451-1460, 2007
11. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N., Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I.: Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J.*, 25, 3955-65, 2006.
12. 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.*, 20, 1321-30, 2006.
13. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I., Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi, S. Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1. *Nature*, in press
14. Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H. and Hara, E.: Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}/Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biology* 8, 1291-1297 (2006)
15. Zannetti, C., Mondini, M., De Andrea, M., Caposio, P., Hara, E., Peters, G., Gribaudo, G., Gariglio, M. and Landolfo, S.: The expression of p16 (INK4a) tumor suppressor is up-regulated by human cytomegalovirus infection and required for optimal viral replication. *Virology* 349, 79-86 (2006)
16. Murao, K., Kubo, Y., Ohtani, N., Hara, E. and Arase, S.: Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *British Journal of Dermatology* 155, 999-1005 (2006)
17. Gao, Y., Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Kikuchi, H., Isobe, T., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Tanaka, T., Konno, H. and Kitagawa, M.: Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27^{Kip1} enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Cancer Research* 66(24):11623-11631, 2006..
18. Kono, S., Suzuki, H., Oda, T., Miyajima, H., Takahashi, Y., Shirakawa, K., Ishikawa, K., and Kitagawa, M.: Biochemical features of ceruloplasmin gene mutations linked to aceruloplasminemia. *Neuromolecular Med.* 8(3):361-374, 2006.

19. Gao, Y., Kitagawa, K., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T. and Kitagawa, M.: Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor. *Hokkaido. J. Med. Sci.* 81:101-105, 2006.
20. Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T. Hatakeyama, S., Nakayama K.I., Yamamoto, T., Konno, H. and Kitagawa, M.: Degradation of Tob1 mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitination. *Cancer Research* 66: 8477-8483, 2006.
21. Takemura, M., Yoshida, S., Akiyama, T., Kitagawa, M., Yamada, Y.: Role of the second-largest subunit of DNA polymerase α in the interaction between the catalytic subunit and hyperphosphorylated retinoblastoma protein in late S phase. *Biochem. Biophys. Acta* 1764: 1447-1453, 2006.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.: Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *Kidney Int.* 69: 1733-1740, 2006.
27. 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- β . *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： 細胞のを与えるとRB蛋白質のリン酸化部位は大部分が脱リン酸化されるのにSer612のみは逆にリン酸化が高まり、それがE2F1との複合体形成を促進することを発見した。また、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、逆に、p53が細胞膜周辺でエンドサイトーシスや細胞運動も制御するという全く予想外のことを発見した。

A. 研究目的

RB蛋白質はDNAにダメージ後のSer612のリン酸化の意義を明らかにする。一方、p53においては、p53が細胞膜周辺でクラスリンの重鎖と共局在する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。さらにその際のE2F-1とRB蛋白質との結合を解析した。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³⁵S-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。一方、電子顕微鏡などで細胞膜周辺でのp53を観察した。

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。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、p53上の相同性があるアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換するとp53の転写活性化能もCHCへ

の結合能も大きく低下することを見いだした。さらに、CHCは核内でp53と結合する時にはC末端でTriskelionという3量体を形成していないことも証明した。そして、EGFを加えるとp53は細胞膜付近のアクチンファイバー周辺に集まることや、p53をノックダウンするとアクチンファイバーのメッシュ状構造が形成されなくなることも見いだした。さらにp53をノックダウンすると細胞運動が亢進し、そこに正常なp53を戻してやると再び細胞運動が抑制されることもわかった。

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。

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。また、p53が細胞運動を抑制しているということは、p53が変異して失活すると癌細胞の浸潤や転移が置き易くなることをも示唆しており、今後そういう方向へ研究が発展することも期待される。

E. 結論

RB蛋白質のSer612のリン酸化、および細胞膜周辺でのp53の働き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. Inoue, Y., Kitagawa, M. and Taya, Y.: Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.*, 26, 2083-2093 (2007)
2. Ohki, R., Kawase, T., Ohta, T., Ichikawa, H. and Taya, Y.: Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci.*, 98, 189-200 (2007)
3. M. Enari, K. Ohmori, I. Kitabayashi and Y. Taya.: Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev.*, 20, 1087-1099 (2006).
4. Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek and Y. Shiloh.: Chromatin relaxation in response to DNA double strand breaks: a novel ATM- and KAP-1-dependent pathway. *Nature Cell Biol.*, 8, 870-876 (2006).
5. S. Ohkubo, T. Tanaka, Y. Taya, K. Kitazato and C. Prives.: Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription. *J. Biol Chem.*, 281, 16943-16950 (2006).
6. Y. Pereg, S. Lam, A. Teunisse, S. Biton, Meulmeester, L. Mittelman, D. Delia, K. Okamoto, Y. Taya, Y. Shiloh and A. Jochemsen.: Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylation of Hdmx iresponse to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 6819-6831 (2006).
7. Okamoto, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.: KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 216-222 (2006)

2. 学会発表

1. Yoichi Taya: p53 and clathrin heavy chain regulate mutual functions in nucleus and cytoplasm. 第13回 p53国際ワークショップ、ニューヨーク、2006年5月21日
2. M. Enari, K. Ohmori, and Y. Taya: REQUIREMENT OF CLATHRIN HEAVY CHAIN FOR p53-p300 INTERACTION IN p53-MEDIATED TRANSCRIPTION. 第13回 p53 国際ワークショップ、ニューヨーク、2006年5月22日
3. Yoshie Endo, Masato Enari, Kazuji Ohmori and Yoichi Taya: REGULATION OF CLATHRIN-MEDIATED ENDOCYTOSIS BY p53

第13回 p53国際ワークショップ、ニューヨーク、2006年5月22日

4. Kazuji Ohmori, Masato Enari, and Yoichi Taya: INHIBITION OF p53-MEDIATED TRANSCRIPTION BY CLATHRIN LIGHT CHAIN. 第13回 p53 国際ワークショップ、ニューヨーク、2006年5月22日
5. Yoichi Taya: Generation and application of a panel of phospho-specific antibodies against 13 in vivo phosphorylation sites of the tumor suppressor RB protein. 「ヒト抗体とハイブリドーマ」に関する第12回国際カンファレンス、モンテゴベイ (ジャマイカ)、2006年5月10日
6. Yoichi Taya: p53 and clathrin heavy chain regulate mutual function. 第20回国際生化学・分子生物学会議、京都、2006年6月22日
7. Masami Kodama, Yoichi Taya: Identification of the p53 Ser46 kinase using an ATP pocket mutated ATM and a corresponding ATP analogue. バンフ (カナダ)、2006年9月9日
8. 江成 政人、大森 一二、田矢 洋一: クラスリン重鎖による p53-p300 相互作用の安定化、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
9. 岡本康司、後藤由季子、田矢洋一: 14-3-3 結合を介して p53 の活性化を誘導する Mdmx-S367 リン酸化酵素の同定、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
10. 児玉 昌美、田矢 洋一: 改変 ATM を用いた p53 の Ser46 リン酸化酵素の同定、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
11. 大森一二、江成政人、遠藤克枝、田矢洋一: クラスリン軽鎖による p53 依存的転写活性の抑制、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
12. 遠藤克枝、江成政人、大森一二、田矢洋一: p53 によるクラスリンを介したエンドサイトーシス制御機構の解析、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日
13. 大木理恵子、川瀬竜也、田矢洋一: 新規p53標的遺伝子p53PADによるAKTの抑制を介したアポトーシス誘導機構の解明、日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006年12月8日
14. 遠藤克枝、江成政人、大森一二、田矢洋一: p53によるクラスリンを介したエンドサイトーシス制御機構の解析、日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006年12月8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れががん治療への応用

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れが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 及び NRP2 と DFNA5 の機能を解析した。SEMA3F と NRP2 は腫瘍血管新生抑制作用を介したパラクリンの抗腫瘍効果を有すること、オートクリンの細胞増殖抑制作用を有することを示した。また、DFNA5 は p53 と協調して抗癌剤に対する細胞死を増強することを示した。SEMA3F-NRP2 経路の血管新生抑制作用と細胞増殖抑制作用、DFNA5 の細胞死誘導作用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 NRP2 遺伝子及び DFNA5 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。p53 をノックダウンした大腸がんをヌードマウスに移植したところ、コントロールに比べ、腫瘍の増大と血管新生の増加を認めた。この腫瘍における SEMA3F

NRP2 の発現レベルを調べたところ、p53 ノックダウン細胞株から発生した腫瘍で、発現の低下を認めた。この腫瘍にアデノウイルスを用いて SEMA3F を導入したところ、腫瘍増殖の抑制と血管新生抑制を認めた。さらに、p53 ノックダウン腫瘍で、SEMA3F の機能的レセプターである NRP2 の発現低下を認め、NRP2 もまた p53 によってその発現が制御される p53 標的遺伝子であることを証明した。SEMA3F と NRP2 の結合は細胞増殖を抑制することを証明した。

DFNA5 遺伝子は元々、遺伝性難聴疾患の原因遺伝子として単離されたが、我々は DFNA5 が p53 の標的遺伝子であることを同定した。我々の行った機能解析から、DFNA5 は正常型 p53 の存在する状況では、エトポシドなどの抗癌剤による細胞死を増強したが、正常型 p53 の非存在下では、逆に抗癌剤の耐性に関わる可能性を明らかとした。同時期に、他グループより、胃がんにおいて高頻度にメチル化で不活性化される遺伝子として報告された。

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。また、p53 ノックダウン腫瘍の解析から、p53 による腫瘍血管新生抑制の重要なメディエーターの一つが SEMA3F であることを明らかとなった。さらに SEMA3F のレセプターである NRP2 も p53 の標的遺伝子であることを証明し、p53 が SEMA3F-NRP2 経路を、リガンドとレセプターの両方を制御することで、腫瘍血管抑制や細胞増殖抑制をオートクリンやパラクリンの様式で制御する可能性を示したことで、SEMA3F-NRP2 経路の応用による腫瘍血管新生、および細胞増殖を標的とした新しい治療法の開発が期待される。

DFNA5 遺伝子の更なる機能解析を進めることで、抗癌剤によって誘導されるメカニズムの詳細が明らかとなり、より効果的な抗癌剤による細胞死誘導法の開発や、抗癌剤による細胞死に耐性のメカニズムを明らかとし、耐性腫瘍に対する新しい治療戦略を開発する可能性が開かれた。

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. 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*, 97: 633-641, 2006

2. Masuda Y, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Ohnishi S, Miyamoto Y, Ichikawa H, Ohta T, Ohki M, Kiyono T, Egami H, Baba H and Arakawa H. The potential role of DFNA5—a hearing impairment gene—in p53-mediated cellular response to DNA damage. *J Hum Genet*, 51: 652-664, 2006

3. Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y and Arakawa H. Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-

regulated tumor angiogenesis suppression.
Cancer Res, 67: 1451-1460, 2007

2. 学会発表

1. 二村学、中村康之、喜多村憲章、大西志保、加美野宏樹、宮本祐士、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会一般口演 4-4 p53 関連遺伝子(1) 演題「p53によるSEMA3F-NRP2経路の制御」

2. 加美野宏樹、二村学、中村康之、大西志保、宮本祐士、喜多村憲章、市川仁、太田力、大木操、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会一般口演 4-4 p53 関連遺伝子(1) 演題「BLNKによるがん抑制のメカニズムについて」

3. 宮本祐士、二村学、大西志保、加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、市川仁、太田力、大木操、馬場秀夫、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会一般口演 4-6 p53 関連遺伝子(3) 演題「NCCRI2による細胞死誘導のメカニズムについて」

4. 喜多村憲章、二村学、中村康之、加美野宏樹、大西志保、宮本祐士、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会一般口演 4-6 p53 関連遺伝子(3) 演題「ネトリンによるp53依存性アポトーシス抑制のメカニズムについて」

5. 中村康之、二村学、加美野宏樹、大西志保、宮本祐士、喜多村憲章、市川仁、清野透、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会ポスター4-2 p53 関連遺伝子(1) 演題「ガンマ線照射後にp53によって制御される遺伝子群の解析」

6. 大西志保、二村学、加美野宏樹、中村康之、宮本祐士、喜多村憲章、市川仁、太田力、大木操、荒川博文 第65回日本癌学会学術総会ポスター4-2 p53 関連遺伝子(1) 演題「p53 標的遺伝子としてのニューロ遺伝子NCCRI1の同定」

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欠損胎児性繊維芽細胞では、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^{INK4a} 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^{SEI-1} 蛋白の機能を解明するために p34^{SEI-1} 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^{SEI-1}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^{SEI-1}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^{SEI-1}蛋白の多くはPP2A複合体と結合していることから、p34^{SEI-1}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^{SEI-1}蛋白の作用機序解明の糸口を見つめることが出来た。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こり、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癌抑制経路の撓乱が起こるこ

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- β . *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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
服部隆行 北川雅敏	ユビキチンシステムによる細胞周期制御	北川雅敏	細胞周期集中マスター	羊土社	日本	2006	105-115
北川雅敏	p53およびRB蛋白質のプロテアソーム依存的分解機構	田中啓二 大隅良典	ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー	共立出版	日本	2006	1376-1381

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
Inoue, Y., Kitagawa, M. and Taya, Y.	Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage.	<i>EMBO J.</i> ,	26	2083-2093	2007
Ohki, R., Kawase, T., Ohta, T., Ichikawa, H. and Taya, Y.	Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis.	<i>Cancer Sci.</i>	98	189-200	2007
M. Enari, K. Ohmori, I. Kitabayashi and Y. Taya	Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription.	<i>Genes Dev.</i>	20	1087-1099	2006
Y. Ziv, D. Bielopouloski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D.C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek and Y. Shiloh.	Chromatin relaxation in response to DNA double strand breaks: a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway.	<i>Nature Cell Biol.</i>	8	870-876	2006
S. Ohkubo, T. Tanaka, Y. Taya, K. Kitazato and C. Prives.	Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53 dependent transcription.	<i>J. Biol Chem.</i>	281	16943-16950	2006
Y. Pereg, S. Lam, A. Teunisse, S. Biton, Meulmeester, L. Mittelman, D. Delia, K. Okamoto, Y. Taya, Y. Shiloh and A. Jochemsen.	Differential roles of ATM- and Chk2-mediated phosphorylation of Hdmx in response to DNA damage.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	26	6819-6831	2006
Okamoto K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.	KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> ,	351	216-222	2006
Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y, Arakawa H	Possible role of Semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression.	<i>Cancer Research</i>	67 (4)	1451-1460	2007
Masuda Y, Futamura, M., Kamino, H., Nakamura Y, Kitamura N, Ohnishi S, Miyamoto Y, Ichikawa H, Ohta T, Ohki M, Kiyono T, Egami H, Baba H, Arakawa, H.	The potential role of DFNA5-a hearing impairment gene-in p53-mediated cellular response to DNA damage	<i>Journal of Human Genetics</i>	51 (8)	652-664	2006
Nakamura, Y., Futamura, M., Kamino, H., Yoshida, K., Nakamura, Y.,	Identification of p53-46F as a super p53 with an enhanced ability to induce p53-dependent apoptosis.	<i>Cancer Science</i>	97 (7)	633-641	2006

Arakawa, H.					
Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, <u>Kitabayashi I</u> , Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S.	Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1.	<i>Nature</i>	446	in press	2007
Nakamura Y, Yamagata T, Maki K, Sasaki K, <u>Kitabayashi I</u> , Mitani K.	TEL/ETV6 Binds to Corepressor KAP1 via the HLH Domain.	<i>Int J Hematol.</i>	84	377-380	2006
Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, <u>Kitabayashi I</u> , Ito E.	Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acutemegakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome.	<i>Leukemia</i>	20	1002-1008	2006
Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, <u>Kitabayashi I</u> .	MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells.	<i>Genes & Dev.</i>	20	1321-1330	2006
Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N., Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, <u>Kitabayashi I</u> .	Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation.	<i>EMBO J.</i>	25	3955-3965	2006
Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H. and <u>Hara, E.</u>	Mitogenic signalling and the p16 ^{INK4a} /Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence.	<i>Nature Cell Biology</i>	8	1291-1297	2006
Zannetti, C., Mondini, M., Andrea, M-D., Caposio P., <u>Hara E.</u> , Peters, G., Gribaudo, G., Gariglio M., and Landolfo, S.	The expression of p16 ^{INK4a} tumor suppressor is upregulated by human cytomegalovirus infection and required for optimal viral replication	<i>Virology</i>	349	79-86	2006
Murao, K., Kubo, Y., Ohtani, N., <u>Hara, E.</u> and Arase, S.	Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways.	<i>British Journal of Dermatology</i>	155	999-1005	2006
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>	25	2477-2488	2006
Gao, Y., Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Kikuchi, H., Isobe, T., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Tanaka, T., Konno, H. and <u>Kitagawa, M</u>	Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27 ^{Kip1} enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis	<i>Cancer Research</i>	66	11623-11631	2006
Kono, S., Suzuki, H., Oda, T., Miyajima, H., Takahashi, Y., Shirakawa, K., Ishikawa, K., and <u>Kitagawa, M</u>	Biochemical features of ceruloplasmin gene mutations linked to aceruloplasminemia.	<i>Neuromolecular Med.</i>	8	361-374	2006
Gao, Y., Kitagawa, K., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T. and <u>Kitagawa, M.</u>	Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor.	<i>Hokkaido. J. Med. Sci.</i>	8	101-105	2006
Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T. Hatakeyama,	Degradation of Tob1 mediated by SCF ^{Skp2} -dependent ubiquitination.	<i>Cancer Research</i>	66	8477-8483	2006

S., Nakayama K.I., Yamamoto, T., Konno, H. and <u>Kitagawa, M.</u>					
Takemura, M., Yoshida, S., Akiyama, T., <u>Kitagawa, M.</u> , Yamada, Y.	Role of the second-largest subunit of DNA polymerase α in the interaction between the catalytic subunit and hyperphosphorylated retinoblastoma protein in late S phase.	<i>Biochem. Biophys. Acta</i>	1764	1447-1453	2006
Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A. Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., <u>Kitagawa, M.</u> and Hishida, A.	Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury.	<i>Kidney Int.</i>	69	1733-1740	2006