

細胞学部門

Department of Molecular and Cellular Biology

細胞学部門では、細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを、生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている。つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し、最終的にはその遺伝子を破壊したマウス（ノックアウトマウス）を人工的に作製し、その異常を調べることによって、その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである。特に免疫系と神経系の細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御についての解析に焦点を当てて取り組んでいる。

細胞学部門では1997年3月1日付けで米国 NIH より畠山鎮次博士を助手として採用した。また同年5月1日付けで萬有製薬研究所から北川雅敏博士を助教授として招き、ここに中山敬一教授の下、全スタッフが揃った。また事務官木村美保子は1998年3月31日に定年退官となった。

大学院生として1997年4月より山中篤志（宮崎大・農）、築山忠維（明治大・農修）が入学し、さらに臨床大学院生として三浦正徳（九大・医）、6月より特別研究学生として永濱裕康（熊大・医）が研究に参加している。その他1997年4月1日付けで非常勤研究員として豊野孝（九大・農博）、同年6月16日付けで研究支援推進員として西村直子（九大・薬博）、1997年10月1日より研究生として石田典子（筑波大・生物）、4月1日より研究補助員として松下純恵を採用した。また共同研究者として1997年6月1日より北川恭子（産業医大・医）、同年11月1日より富永薫（国立長寿研）が研究に参加することになった。

1997年11月より当研究室は科学技術振興事業団（JST）による戦略的基礎研究推進事業（CREST）の支援を受けることとなり、技術員として白根道子（1998年2月1日より）、研究補助員として安河内亮子（1997年12月1日より）、下原田加代子（1998年1月1日より）を JST 派遣職員として受け入れている。

A. 発生工学を利用した細胞周期・アポトーシス制御因子の研究

a. p57Kip2遺伝子欠損マウスの作製と解析

まず129/Sv系マウスのゲノム DNA ライブラリーより p57 cDNA をプローブとして p57 遺伝子を単離した。次に遺伝子構造を解析し、分子機能に重要と思われる部分をネオマイシン耐性遺伝子によって置き換えたジーンターゲティング用ベクターを構築した。このジーンターゲティング用ベクターを Embryonic Stem (ES) 細胞に電気的に導入し、ネオマイシン誘導体 G418にてジーンターゲティング用ベクターが導入されたクローンを濃縮し、最終的に相同組換えを起こしたクローンを得た。この ES 細胞では1組の p57 遺伝子のうち、一方の遺伝子が破壊され

ていることになる。この ES 細胞を C57BL/6 マウスの受精後 3.5 日令の胚（胚盤胞）にマイクロインジェクションし、偽妊娠させた仮親マウスの子宮内に戻して成長させ、キメラマウスを作製した。このキメラマウスをマウスと交配して、変異 p57 遺伝子を第 2 世代に移行させ、この第 2 世代マウス同志を交配させることによって、正常 p57 遺伝子を持たないマウス（p57 ノックアウトマウス）を作製した。

p57 ノックアウトマウスは生直後に呼吸不全症状を呈して死亡する。主な以上は口蓋裂、軟骨内骨形成不全、腸管形成異常である。また父親由来の正常な対立遺伝子と母親由来の破壊された対立遺伝子を持つヘテロの個体も全くノックアウトマウスと同じ形質を示すことから、この遺伝子がゲノムインプリンティングを受けていることが明らかとなった。p57 ノックアウトマウスの約 10% は生後も生存することのできる個体が存在するが、これらは一様に成長障害が認められ、成体でも標準の 1/2～1/4 しか体重が増加しない。また雌マウスでは全例膣閉鎖を認める。これらの所見は Rb ファミリーのノックアウトマウスと類似している点がいくつか認められ、CDK インヒビターである p57 とその下流に位置すると考えられる Rb ファミリー分子の遺伝的関係を示唆するものである。

p57 ノックアウトマウスから初代培養線維芽細胞を作製し、その細胞周期の性質を調べた。正常の増殖速度、血清飢餓時や電離放射線照射によるチェックポイントの制御などを詳細に調べたが、特に明らかな異常を認めなかった。このことから線維芽細胞において p57 の役割は不要又は他の分子（p21 や p27）によって代償され得るものであることが示された。

b. p27Kip1, p57Kip2 の発現様式の解析

発生段階において p27 と p57 がどのように発現するのかを解析するために、いろいろなステージの胎仔を免疫組織化学で解析した。その結果、脳神経・皮膚・腸管・気管支・腎糸球体・レンズ・軟骨細胞等において p27 と p57 の共発現が認められた。特にこれらの組織では細胞が増殖を停止する分化時期に一致して p27 と p57 が発現しており、p27 や p57 が分化における増殖停止を引き起こしている可能性を示唆した。逆に p27 だけが特異的に発現している組織として胸腺・網膜・副腎（髄質）等があり、これらは p27 ノックアウトマウスにおいて強い過形成を示した臓器であることから、p27 と p57 の両方が発現している組織では p27 の欠損による異常は p57 によって補われるが、p27 だけしか発現していない組織においてはその異常が顕著に現れるという可能性が考えられる。

c. Protein Kinase C δ (PKC δ) 遺伝子欠損マウスの作製と解析

まず 129/Sv 系マウスのゲノム DNA ライブラリーより PKC δ cDNA をプローブとして PKC δ 遺伝子を単離した。次に遺伝子構造を解析し、分子機能に重要と思われる部分をネオマイシン耐性遺伝子によって置き換えたジーンターゲティング用ベクターを構築した。このジーンター

ゲティング用ベクターを Embryonic Stem (ES) 細胞に電氣的に導入し、ネオマイシン誘導体 G418にてジーンターゲティング用ベクターが導入されたクローンを濃縮し、最終的に相同組換えを起こしたクローンを得た。この ES 細胞では 1 組の PKC δ 遺伝子のうち、一方の遺伝子が破壊されていることになる。この ES 細胞を C57BL/6マウスの受精後3.5日令の胚(胚盤胞)にマイクロインジェクションし、偽妊娠させた仮親マウスの子宮内に戻して成長させ、キメラマウスを作製した。このキメラマウスをマウスと交配して、変異 p57遺伝子を第 2 世代に移行させ、この第 2 世代マウス同志を現在交配中である。この子供の約 1/4 は正常 p57 遺伝子を持たないマウス (PKC δ ノックアウトマウス) が生まれてくる予定である。

B. 細胞周期・アポトーシス制御因子の特異的蛋白分解機構に関する研究

a. p27Kip1の特異的ユビキチン化に関わる分子群の同定

p27は合成速度よりも分解速度によってその蛋白発現量が規定されており、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されることが知られている。しかしながらその分子機構はほとんど明らかではない。私達は酵母のサイクリン依存性キナーゼ阻害分子である Sic1 (*S. cerevisiae*) や Rum1 (*S. pombe*) のユビキチン依存性分解機構から p27も同様のメカニズムで分解されていると推定し、マウスにおける相当分子の検索を進めている。

まずマウス細胞からの抽出液を用いて *in vitro* において p27をユビキチン化することに成功し、その細胞周期による活性の変動、リン酸化の必要性、ユビキチン付加部位の同定など基本的な生化学的性質の同定を行った。さらに現在この活性を指標にユビキチンリガーゼ (E3) を精製中である。精製終了後、アミノ酸配列の同定と遺伝子の単離を行う。さらに酵母の変異株を相補する活性のある遺伝子を、マウス cDNA ライブラリーを酵母に発現させることによって機能相補遺伝子を得ている。これらの中で p27のユビキチンリガーゼ (E3) をコードしているものがないかどうか検討中である。

また酵母との類似性によってこのユビキチンリガーゼ (E3) が SCF 複合体である可能性がある。そこで私達はデータベース検索を行い、マウスにおける SCF 複合体のコンポーネントである Skp1, Cul1, FWD1等を発見した。現在これらの詳細な生化学的性質の検討を行っている。最終的にはノックアウトマウス・トランスジェニックマウスを作製して個体レベルでの機能解析を行う予定である。

原著論文

1. Matsuzaki, Y., Nakayama, K.-i., Nakayama, K., Tomita, T., Isoda, M., Loh, D.Y. and Nakauchi, H. 1997.

Role of bcl-2 in the development of lymphoid cells from the hematopoietic stem cell. *Blood* 89, 853-862.

2. Hatakeyama, S., Jensen, J. P. and Weissman, A. M. 1997.
Subcellular localization and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein ligases.
J. Biol. Chem. 272, 15085-15092.
3. Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Oeda, T., Tahara, K., Terano, T., Narumiya, S., Kohn, L. D. and Saito, Y. 1997.
Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells.
J. Biol. Chem. 272, 13-16.
4. Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Yoshida, E., Nishimura, S. and Kitagawa, M. 1997.
Expression of p16 suppresses the unbounded and anchorage dependent growth of a glioblastoma cell line that lacks p16ink4a.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 743-750.
5. Dobashi, Y., Chigira, M., Shoji, M., Wakata, Y., Kitagawa, M., Tamauchi, H., Akiyama, T. and Kameya, T. 1997.
Cell cycle control with minimal participation of Cdk2 in a murine fibrosarcoma clone cultured in protein-free medium.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 232, 622-625.
6. Suzuki-Takahashi, I., Higashi, H., Yoshida, E., Nishimura, S. and Kitagawa, M. 1997.
Effect of exogenous p16ink4a on growth of cells with various status of cell-cycle regulators.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 386-392.
7. Kikuchi, J., Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Kitagawa, M., Komatsu, N. Miura, Y. and Kitagawa, S. 1997.
Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocystec differentiation: Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization.
Blood 89, 3980-3990.
8. Terano, T., Shiina, T., Yamamoto, K., Ban, T., Hirai, A., Tamura, Y., Saito, Y. and Kitagawa, M. 1997.
Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit DNA synthesis through inhibiting cdk2 kinase in vascular smooth muscle cells.
Atherosclerosis IV: Adv. Atherosclerosis Res. 811, 369-377.

9. Tatsuno, I., Tanaka, T., Oeda, T., Yasuda, T., Kitagawa, M., Saito Y. and Hirai. A. 1997.
Geranylgeranyl-pyrophosphate, a metabolite of mevalonate, regulates the cell cycle progression and DNA synthesis in human lymphocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 376-382.
10. Noguchi, Y., Nakamura, S., Yasuda, T., Kitagawa, M., Kohn, L. D., Saito, Y. and Hirai, A. 1998.
Newly synthesized Rho A, not Ras is isoprenylated and translocated to membranes coincident with progression of the G1 to S phase of growth stimulated rat FRTL-5 cells.
J. Biol. Chem. 273, 3649-3653.

総 説

1. 中山敬一, 中山啓子. 1997.
p27Kip1ノックアウトマウス—細胞周期抑制分子の生理的役割.
実験医学15, 88-90.
2. 中山敬一, 中山啓子. 1997.
迅速 Mini-prep (Quick-prep) 法.
実験医学15, 185-186.
3. 中山敬一, 中山啓子. 1997.
平底チューブを使いこなそう.
実験医学15, 568-569.
4. 中山敬一, 中山啓子. 1997.
ゲルの写真にこだわる.
実験医学15, 932-933.
5. 中山啓子, 中山敬一. 1997.
免疫研究の最前線'97-'98—T細胞分化における細胞周期調節.
実験医学(増刊) 15, 1315-1321.
6. 中山啓子, 中山敬一. 1997.
CDK インヒビター欠損マウスにおける病態.
臨床免疫29, 1285-1291.
7. 中山啓子, 中山敬一. 1997.
p27Kip1による T リンパ球の増殖制御.
免疫1997~1998 34, 80-88.
8. 中山敬一, 中山啓子. 1997.

Bcl-2ファミリーによる生体制御.

現代化学 (増刊)「アポトーシス研究の新展開」35, 87-95.

9. 北川雅敏, 田矢洋一. 1997.

サイクリン依存性キナーゼによる RB 蛋白質のリン酸化と細胞周期の制御.

蛋白質核酸酵素 (増刊) 42, 1594-1602.

著 書

1. 中山啓子, 中山敬一. 1997.

CD4.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 82-83.

2. 中山啓子, 中山敬一. 1997.

CD8.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 84-85.

3. 中山啓子, 中山敬一. 1997.

p16Ink4a.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 381-382.

4. 中山啓子, 中山敬一. 1997.

p27Kip1.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 383.

5. 中山啓子, 中山敬一. 1997.

p57Kip2.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 384.

6. 北川雅敏 北川恭子. 1997.

Cyclin A2.

Molecular Medicine Vol.34 臨時増刊号 ノックアウトマウス・データブック (黒川清・
笹月健彦監修; 中山書店, 東京) 126-127.

学会発表

1. 中山敬一 (1997, 6/2).

- シンポジウム X I. 視床下部・下垂体研究最近の進歩：p27Kip1ノックアウトマウスにおける多臓器腫大と下垂体腫瘍の発生。
第70回日本内分泌学会，東京。
2. 中山敬一 (1997, 6/3).
シンポジウム 2. 遺伝子改変動物の病理と免疫疾患：細胞増殖のブレーキ p27Kip1の生体内における役割。
第86回日本病理学会，札幌。
3. 中山敬一 (1997, 9/18).
教育講演. T細胞数のコントロール：細胞周期とアポトーシスによる調節。
第25回日本臨床免疫学会，東京。
4. 田矢洋一，人見奏恵，三原圭一郎，池田雅子，鈴木 理，玉井克之，熊谷久美子，中島喜一郎，東 英明，北川雅敏 (1997, 9/24).
シンポジウム リン酸化部位特異的抗体を用いた RB 蛋白質と p53の解析。
第56回日本生化学会，金沢。
5. 土橋 洋，千木良正機，北川雅敏，秋山 徹，亀谷 徹 (1997, 9/25).
無蛋白培地培養細胞における細胞周期制御因子の異常。
第56回日本癌学会，京都。
6. 人見奏恵，池田雅子，玉井克之，北川雅敏，田矢洋一 (1997, 9/27).
RB 蛋白質上のすべてのリン酸化サイトに対応する抗体の作製とそれを用いた生理機能の解析。
第56回日本癌学会，京都。
7. 瀬川 薫，北川雅敏，箕輪明子 (1997, 9/27).
p53のC末端領域に存在する修復様活性。
第56回日本癌学会，京都。
8. Nakayama, K.-i., Mori, M. and Nakayama, K. (1997, 10/2).
“Oncogenes and development” Roles of p27Kip1 in development and tumor suppression.
The 12th Workshop on Japan-France Cooperative Cancer Research Program,
Utsunomiya.
9. 中山敬一 (1997, 10/18).
細胞増殖のブレーキ p27Kip1の生体内における役割。
日本薬学会九州支部コロキウム，福岡。
10. 畠山鎮次，Weissman, M. A., 中山敬一 (1997, 10/30).
マウスユビキチンリガーゼ E6-AP 及び Nedd-4の cDNA クローニング：細胞生物学的解析と結合蛋白質の同定。

- 第27回日本免疫学会, 札幌.
11. 浜崎安純, 仙道富士郎, Loh, D. Y., 中山敬一, 畠山鎮次 (1997, 10/30).
新しい bcl-2 family member, A1-a を欠損するマウスの好中球アポトーシスの解析.
第27回日本免疫学会, 札幌.
 12. 中山敬一 (1997, 11/23).
特別講演. 細胞増殖ブレーキ役 p27 と p57 の生体内における役割と発癌への関与ーノックアウトマウスを用いた解析ー.
日本皮膚科学会第303回福岡地方会, 福岡.
 13. 畠山鎮次, 豊野 孝, Weissman, M. A., 中山敬一 (1997, 12/16).
マウスユビキチンリガーゼ E6-AP 及び Nedd-4 の cDNA クローニング: 細胞生物学的解析と結合蛋白質の同定.
第20回日本分子生物学会, 京都.
 14. 中山敬一, 森 正樹, 高橋勝彦, 中山啓子 (1997, 12/18).
ワークショップ「サイクリン依存性キナーゼとそのインヒビター」 p27Kip1 及び p57Kip2 による細胞増殖の調節と発癌への関与.
第20回日本分子生物学会, 京都.
 15. 北川雅敏, 田矢洋一 (1997, 12/18).
ワークショップ「サイクリン依存性キナーゼとそのインヒビター」サイクリン依存性キナーゼによる RB タンパク質の部位特異的リン酸化とその生理的意義.
第20回日本分子生物学会, 京都.
 16. Nakayama, K.-i. (1998, 1/26).
“Molecular basis of complexed system” Roles of Kip CDK inhibitors, p27 and p57, in development and tumor suppression.
The Hot Spring Harbor Symposium 1998, Beppu.
 17. Nakayama, K., Takahashi, K., Takahashi, M., Matsumura, Y., Negishi, I., Matsushima, H., Loh, D. Y. and Nakayama, K.-i. (1998, 3/30).
“The Cell Cycle” Mice lacking a tumor suppressor candidate, p57Kip2, display no tumorigenesis.
Keystone Symposium, Keystone.