

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、遺伝学的・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因子の量的制御機構を選択的蛋白分解の視点から取り組んでいる。

細胞学部門は昨年に引き続き、中山敬一教授、北川雅敏助教授、畠山鎮次助手の教官を中心に大学院生（9名）、研究生（2名）、研究補助員（1名）、研究支援推進員（1名）、非常勤研究員（1名）、科学技術振興事業団派遣職員（技術員2名、研究補助員4名）の体制で研究を進めている（1999年3月31日現在）。

本年度の人事異動について、まず新規参入者としては以下の通りである。大学院生として1998年4月より池辺千穂（九大・理修）、石田典子（筑波大・理）、宮本顕友（鳥大・医修）が入学し、さらに臨床大学院生として南嶋洋司（九大・医・1外）、丸山俊一郎（九大・医・神内）が研究に参加している。また研究生（A）として1998年4月1日より服部公彦（鳥大・医・1内）、5月16日より中道郁夫（九大・医・2内）を受け入れている。その他1997年4月1日より研究補助員として瀧本亜紀を採用した。

次いで退職者として1998年9月1日付けで非常勤研究員の豊野孝が九州歯科大学歯学部助手として転出した。また研究支援推進員であった西村直子は1999年3月31日をもって任期満了となった。また共同研究者として研究に参加していた北川恭子（産業医大・医）が1998年5月31日に、富永薫（国立長寿研）が1998年9月30日にそれぞれ所属研究室に帰還した。

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（継続）、松本雅記（1998年4月1日より）を、研究補助員として安河内亮子（継続）、下原田加代子（継続）、松下純恵（1998年4月1日より）、竹内智子（1998年4月1日より）を、事務員として木村美保子（1998年4月1日より）をJST派遣職員として受け入れている。松本雅記、竹内智子は1999年3月31日付けでJSTを退職した。

A. p27Kip1の発現量調節機構の解明

a. p27Kip1をユビキチン化する分子メカニズムの解明

p27Kip1をユビキチン化する分子機構を明らかにするために、まず p27Kip1を *in vitro* でユビキチン化するアッセイを開発した。これを用いて p27Kip1をユビキチン化する活性が細胞周期でどのように変化するかを検討したところ、p27Kip1のユビキチン化能は G1期から S 期にかけて上昇することが明らかとなった。これは p27Kip1の分解時期と生理的に一致する結果である。またさらにこの *in vitro* 系を用いて p27Kip1のユビキチン化部位を検索した。具体的には p27Kip1のリジンを実アルギニンに置き換えた変異体を系統的に作製し、それを基質としたユビキチン化能を検討したところ、p27Kip1のユビキチン化部位は K134, K153, K165であることが明らかとなった。

b. p27Kip1を非ユビキチン依存的に切断するメカニズムの解析

上記 p27Kip1のユビキチン依存的分解機構の研究の過程で、ユビキチン化に依存せずに p27Kip1を切断する活性が細胞抽出液中に存在することを発見した。この活性は実際に *in viro* でも見られることから単なる *in vitro* の artifact ではないことが明らかとなった。その活性は ATP 要求性で多くの proteinase 抑制剤に対して抵抗性であったが、キモスタチンと PMSF はこの活性を阻害した。またプロテアソーム阻害剤もこの活性を阻害することから、この反応はプロテアソームによるユビキチン非依存性の部位特異的切断という新しい蛋白分解システムであることが示唆された。

c. p27Kip1トランスジェニックマウスの作製

p27Kip1を Lck プロモーターの下流に接続して T 細胞特異的に p27Kip1が発現するようにしたトランスジェニックマウスを作製したところ、発現量の異なる 3 ラインが作製できた。発現量の最も高いものは胸腺が著しく小さく、CD4-8-分画がかなりの部分を占めていた。発現量の中程度のもの、低いものではこのような変化は認めなかった。さらに末梢リンパ球における増殖能の程度を調べると、発現量の高いものは増殖能が有意に障害されていた。またヒツジ赤血球を注射して二次濾胞の形成能を調べたところ、発現量の高いトランスジェニックマウスではその形成能が阻害されていた。このことより p27Kip1の効果にはある一定の閾値があること、CD4-8-での増殖阻害は分化にとっても重大な障害をもたらすことが明らかとなった。すなわち T 細胞の分化にとって増殖することは単に数を増やすだけではなく、分化についてのチェックポイントになっていることが示唆された。

B. ユビキチンリガーゼ (E3) の単離同定と機能解析

a. β カテニンをユビキチン化する SCF 複合体の単離同定

近年発見された細胞周期を制御するユビキチンリガーゼ (E3) である SCF 複合体の哺乳類でのコンポーネント Skp1, Cull1, F-box 蛋白をクローニングした. 特に F-box 蛋白に関しては数種類の F-box 蛋白を単離し, そのうちの FWD1 という分子はショウジョウバエにおいて Armadillo (Wingless シグナル伝達系に参与する因子) を分解する Slimb という分子のホモログであることがわかった. Wingless (哺乳類では Wnt という) シグナルは哺乳類においても発生分化増殖に重要な役割を果たすことが示唆されており, Armadillo に対応する分子は β カテニンである. β カテニンはその異常蓄積が大腸癌を引き起こすことが知られている. FWD1 はリン酸化された β カテニンと結合し, そのユビキチン化を促進する. FWD1 から F-box を欠失した (Skp1 に結合できない) 変異体は β カテニンのユビキチン化を抑制し, 蛋白質を安定化させる. このことから FWD1 を含む SCF 複合体 (SCFFWD1) が β カテニンのユビキチン依存性分解機構に参与していることが明らかになった.

b. $I\kappa B\alpha$ をユビキチン化する SCF 複合体の単離同定

FWD1 の β カテニン上での結合部位のアミノ酸配列は, 同じくユビキチン化される分子である $I\kappa B\alpha$ のリン酸化部位とほぼ同一であることから, FWD1 が $I\kappa B\alpha$ と結合する可能性を検討した. FWD1 はリン酸化された $I\kappa B\alpha$ と特異的に結合し, そのユビキチン化を亢進させて不安定化させることが明らかとなった. その結果として $I\kappa B\alpha$ から遊離した NF- κ B は核内に移行し, 種々の標的遺伝子の転写を活性化することによって炎症を引き起こすことが示唆された.

c. サイクリン E をユビキチン化する SCF 複合体の単離同定

F-box 蛋白の一つである Skp2 はやはり Skp1/Cul1 と SCF 複合体 (SCF^{Skp2}) を形成する. Skp2 の結合蛋白を調べていたところ, サイクリン A とサイクリン E が結合することがわかった. どちらも Skp2 の過剰発現によってユビキチン化が亢進することが明らかとなった. Skp2 の結合はサイクリン E のパートナーである CDK2 によって阻害された. このことから Skp2 は CDK2 の結合していない遊離型のサイクリン E と結合し, ユビキチン化することによってサイクリン E を不安定化していることが示唆された. さらにこの現象が生理的であるかどうかを調べるために, Skp2 ノックアウトマウスを作製し, そのマウスから初代培養線維芽細胞 (MEF) を得てその解析を行ったところ Skp2 欠損 MEF ではサイクリン E が著しく貯留していることが明らかとなった. このことより Skp2 はサイクリン E 特異的ユビキチンリガーゼ (E3) としてサイクリン E の分解に必須の役割を果たしていることが示された.

原著論文

1. Hatakeyama, S., Hamasaki, A., Negishi, I., Loh, D.Y., Sendo, F., Nakayama, K. and Nakayama, K.-i. 1998.
Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1.
Int. Immunol. 10, 631-637.
2. Ikebe, C., Ohashi, K. and Mizuno, K. 1998.
Identification of testis-specific (Limk2t) and brain-specific (Limk2c) isoforms of mouse LIM-kinase 2 gene transcripts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 307-312.
3. Okusaka, T., Okada, S., Ishii, H., Ikeda, M., Nakasuka, H., Nagahama, H., Iwata, R., Furukawa, H., Takayasu, K., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S. and Yoshimori, M. 1998.
Transarterial chemotherapy with zinostatin stimalamer for hepatocellular carcinoma.
Oncology 55, 276-283.
4. Kunisada, T., Yoshida, H., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Hemmi, H., Nishimura, E., Shultz, L. D., Nishikawa, S. and Hayashi, S. 1998.
Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors.
Development 125, 2915-2923.
5. Kawana, H., Tamaru, J., Tanaka, T., Hirai, A., Saito, Y., Kitagawa, M., Mikata, A., Harigaya, K. and Kuriyama, T. 1998.
Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer.
Am. J. Pathol. 153, 505-513.
6. Miyamoto, A., Kunisada, T., Yamazaki, H., Miyake, K., Nishikawa, S.I., Sudo, T., Shultz, L.D. and Hayashi, S.I. 1998.
Establishment and characterization of pro-B cell lines from motheaten mutant mouse defective in Shp-1 protein tyrosine phosphatase.
Immunol. Lett. 63, 75-82.
7. Tanaka, T., Tatsuno, I., Noguchi, Y., Uchida, D., Oeda, T., Narumiya, S., Yasuda, T., Higashi, H., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i., Saito, Y. and Hirai, A. 1998.
Activation of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in growth-stimulated rat astrocytes. Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the induction of cyclin E gene expression.

- J. Biol. Chem. 273, 26772-26778.
8. Nagata, M., Nakayama, K.-i., Terada, Y., Hoshi, S. and Watanabe, T. 1998.
Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage.
Am. J. Pathol. 153, 1511-1520.
 9. Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K.-i. and Hatakeyama, S. 1998.
Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene.
J. Exp. Med. 188, 1985-1992.
 10. Koujyo, T., Hatakeyama, S., Yamada, H., Iwabuchi, K., Kajino, K., Ogasawara, K., Onoe, K. and Fujimoto, S. 1998.
Induction of endometriosis and adenomyosis by transvaginal pituitary transplantation in mice with and without natural killer cell activity.
Am. J. Reprod. Immunol. 40, 441-446.
 11. Terano, T., Shiina, T., Noguchi, Y., Tanaka, T., Tatsuno, I., Saito, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M. and Hirai, A. 1999.
Geranylgeranyl-pyrophosphate plays a key role for the G1 to S transition in vascular smooth muscle cells.
J. Arterioscler. Thromb. 5, 1-6.
 12. Terano, T., Tanaka, T., Tamura, Y., Kitagawa, M., Higashi, H., Saito, Y. and Hirai, A. 1999.
Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2 cyclin E complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 254, 502-506.
 13. Nishimura, M., Tanaka, T., Yasuda, T., Kurakata, S., Kitagawa, M., Yamada, K., Saito, Y. and Hirai, A. 1999.
Collagen secretion and growth of mesangial cells require geranylgeranylpyrophosphate.
Kidney Int. 55, 520-528.
 14. Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Higashi, H., Nakano, H., Okumura, K., Onoe, K. and Good, R.A. 1999.
Ubiquitin-dependent degradation of I kappa B alpha is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 3859-3863.

総 説

1. Nakayama, K.-i. and Nakayama, K. 1998.
Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development.
Bioessays 20, 1020-1029.

学会発表

1. 田中知明, 龍野一郎, 内田大学, 保田立二, 北川雅敏, 平井愛山, 斎藤 康 (1998, 6/5).
星状神経細胞 (アストロサイト) の増殖と G1/S 期移行における Rho small GTPase の役割.
第71回日本内分泌学会, 福岡.
2. 中村 晋, 野口義彦, 平井愛山, 保田立二, 北川雅敏, 斎藤 康 (1998, 6/6).
ラット甲状腺 FRTL-5細胞増殖, とくに G1/S 期移行時の Cdk 阻害蛋白 p27Kip1の分解と heat shock conjugate protein 70 (HSC70) の関与.
第71回日本内分泌学会, 福岡.
3. 平井愛山, 中村 晋, 野口義彦, 保田立二, 北川雅敏, 斎藤 康 (1998, 6/6).
がん細胞の増殖における small GTPase (Ras および Rho) の活性化とその修飾脂質としてのイソプレノイドの要求性.
第71回日本内分泌学会, 福岡.
4. 中山敬一 (1998, 7/16).
ノックアウトマウスの医学生物学への貢献.
第18回日本臨床化学会夏期セミナー, 福岡.
5. 中山敬一, 永濱裕康, 石田典子, 白根道子, 森 正樹, 高橋勝彦, 畠山鎮次, 北川雅敏, 中山啓子 (1998, 9/30).
細胞周期のブレーキ p27及び p57の分化と発癌に関する役割.
第57回日本癌学会総会 (シンポジウム), 横浜.
6. 北川雅敏, 人見奏恵, 東 秀明, 古川雄祐, 平井愛山, 中山敬一, 田矢洋一 (1998, 9/30).
サイクリン依存性キナーゼによる RB 蛋白質の部位特異的リン酸化と細胞分化における意義.
第57回日本癌学会総会, 横浜.
7. 川名秀忠, 田丸淳一, 張ヶ谷健一, 三方淳男, 平井愛山, 田中知明, 斎藤 康, 北川雅敏, 栗山喬之 (1998, 10/2).
ヒト非小細胞肺癌組織における p27 (Kip1), cyclin dependent kinase 2と増殖率の検討.
第57回日本癌学会総会, 横浜.

8. 武村政春, 北川雅敏, 田矢洋一, 玉井克之, 秋山 徹, 吉田松年 (1998, 10/2).
高リン酸化型 Rb 蛋白質の生化学的性質.
第57回日本癌学会総会, 横浜.
9. 渡邊裕美, 北川雅敏, 中山敬一, 渡邊 武, 本山 昇 (1998, 10/16).
神経分化時における Rb 蛋白のリン酸化と細胞周期制御機構の解析.
第21回日本生化学会年会 (ワークショップ), 名古屋.
10. Nakayama, K.-i. (1998, 11/15).
Roles of p27 and p57 CDK inhibitors in development and oncosuppression.
The 1998 Japanese-German Workshop, Kumamoto, JAPAN.
11. 富永洋平, 作見邦彦, 續 輝久, 築山忠維, 中別府雄作 (1998, 12/17).
OGG1遺伝子欠損マウスの樹立と解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
12. 服部公彦, 畠山鎮次, 中山啓子, 北川雅敏, 中山敬一 (1998, 12/17).
マウス Skp1 と F-box protein, FWD1 の結合特性の解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
13. 三浦正徳, 畠山鎮次, 中山啓子, 北川雅敏, 中山敬一 (1998, 12/17).
新規 F-Box 蛋白, FWD2 の genomic DNA クローニングとその解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
14. 南嶋洋司, 畠山鎮次, 豊野 孝, 北川雅敏, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/17).
マウス Skp1 cDNA 及び genomic DNA のクローニング.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
15. 白根道子, 春宮裕見子, 石田典子, 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一, 北川雅敏 (1998, 12/17).
p27Kip1 の発現レベルを調節する 2 種類の分解機構.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
16. 田中知明, 龍野一郎, 野口義彦, 内田大学, 保田立二, 北川雅敏, 中山敬一, 平井愛山, 斎藤 康 (1998, 12/18).
アストロサイトの増殖と G1/S 期移行における Rho small GTPase の役割.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
17. 畠山鎮次, 北川雅敏, 白根道子, 松本雅記, 服部公彦, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/18).
新規マウス F-Box 蛋白の cDNA クローニング及び細胞生物学的解析.
第21回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 横浜.
18. 北川雅敏, 畠山鎮次, 白根道子, 石田典子, 平井愛山, 田中知明, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/18).

- 細胞増殖関連蛋白質の分解機構- p27Kip1を中心として.
第21回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 横浜.
19. 松本雅記, 畠山鎮次, 北川恭子, 北川雅敏, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/18).
マウス Skp2の cDNA および genomic DNA のクローニングとその解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
20. 人見奏恵, 小野達也, 北川雅敏, 東 秀明, 池田雅子, 田矢洋一 (1998, 12/18).
RB 蛋白質上の Cdk4と Cdk2特異的リン酸化部位.
第21回日本分子生物学会年会 (ワークショップ), 横浜.
21. 山中篤志, 畠山鎮次, 北川雅敏, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/18).
Mitotic Cyclin 分解に関与する UbcH10マウスホモログ, UbcM5の cDNA クローニング及び生化学的解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
22. 野口義彦, 龍野一郎, 中村 晋, 田中知明, 内田大学, 保田立二, 北川雅敏, 成宮 周, 斎藤 康, 平井愛山 (1998, 12/18).
ラット甲状腺 FRTL5細胞におけるコレステロール合成経路中間代謝産物の細胞周期 G1/S 移行への関与.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
23. 築山忠維, 畠山鎮次, 北川雅敏, 中山啓子, 中山敬一 (1998, 12/19).
胸腺細胞特異的発現 p27Kip1トランスジェニックマウスの作製と解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.
24. 渡邊裕美, 渡邊 武, 北川雅敏, 中山敬一, 本山 昇 (1998, 12/19).
神経分化時における Rb 蛋白質のリン酸化と細胞周期制御機構の解析.
第21回日本分子生物学会年会, 横浜.