

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（12名）、研究生（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1名、研究補助員4名、事務員1名）の体制で研究を進めている（2000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1999年4月より矢田雅佳（九大・医）、今木裕幸（九大・医）が入学し、さらに臨床大学院生として中道郁夫（九大・医・2内）、恒松良祐（九大・医・産婦）が研究に参加している。また松本雅記（前年度までCREST技術員）を非常勤研究員として、1999年4月より採用した。

次いで退職者として1999年3月31日付けで研究生の服部公彦が退学した。

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）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（1999年4月より）、西村直子（1999年4月より）を、事務員として木村美保子（継続）をJST派遣職員として受け入れている。白根道子は2000年3月31日付けでJSTを退職した。

A. p27^{Kip1} を分解する 2 つの経路の発見

今まで再現性などについて論争が絶えなかった p27^{Kip1} のユビキチン化のメカニズムについて、私達は独自に改良した *in vitro* ユビキチン化アッセイ法を開発し、p27^{Kip1} のユビキチン化における詳細を検討した。この方法における改良点は、プロテアソームの完全な除去、阻害剤によるアイソペプチダーゼ活性の除去、ユビキチンの過剰な利用、等であり、これによって非常に不安定なユビキチン化された p27^{Kip1} という分解過程に至る中間産物を高い再現性で検出することに成功した。この方法を用いて p27^{Kip1} 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、p27^{Kip1} 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 p27^{Kip1} 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 p27^{Kip1} のユビキチン化部位を検索した。具体的には p27^{Kip1} のリジンを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、p27^{Kip1} 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。さらに私達は、p27^{Kip1} 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 p27^{Kip1} 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。その切断部位は N 末端に近いサイクリン結合ドメイン付近であることが推定された。その付近で p27^{Kip1} を切断した分子を再構築し、その機能を調べたところ、CDK 阻害活性は正常の 100 分の 1 程度まで減少していた。つまりこの切断は、p27^{Kip1} の機能を著しく下げる機能があることが明らかとなった。この活性は実際に *in vivo* 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。興味深いことに、p27^{Kip1} のユビキチン化部位に変異を導入した変異体 (KR5) においてはユビキチン化は激減していたものの、この切断は正常型と同じように受けることが示された。つまり p27^{Kip1} はユビキチン依存性蛋白質分解とユビキチン非依存性蛋白質切断の 2 つの独立した機構によって分解を受け、これらが細胞の G₁ から S 期への移行に非常に重要であることが示唆された (Shirane et al., J. Biol. Chem., 1999a)。

B. 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, Cul1, F-box 蛋白質をクローニングした。特に F-box 蛋白質に関しては数種類の F-box 蛋白質を単離し、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 シグナル伝達系に關与する因子) 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 カテニンである。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 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 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 (SCF^{FWD1}) が カテニンのユビキチン依存性分解機構に關与していることが明らかになった (Kitagawa et al., EMBO J., 1999)。

C. I B 群をユビキチン化する SCF 複合体の単離同定と構造機能連関の解析

FWD1 の 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 B のリン酸化部位とほぼ同一であることから、FWD1 が I B と結合する可能性を検討

した。FWD1 はリン酸化された I B 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 B 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 (Hatakeyama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999)。この反応系で I B の 32 番と 36 番目のセリン残基がリン酸化されることが FWD1 の結合に必須なことが判明した。また Skp1 及び F-box 蛋白質に変異を導入して、その必要領域を決定した (Hattori *et al.*, J. Biol. Chem., 1999)。さらに I B 以外の I B ファミリー分子である I B や I B も FWD1 と結合し、ユビキチン化を受けることが明らかとなった (Shirane *et al.*, J. Biol. Chem., 1999b)。

D. I B をリン酸化するキナーゼの上流キナーゼ NAK の発見と FWD1 との結合

名古屋市立大学医学部の中西 真博士との共同研究で、I B のリン酸化に関わるキナーゼ (IKK) をリン酸化して活性化する上流キナーゼ NAK を発見し、その生物学的性質の検討を行った。NAK は IKK の活性化ループをリン酸化する活性を持ち、NAK の過剰発現で NF- κ B 依存性の転写が活性化されることがわかった。この転写活性化は IKK のドミナントネガティブ変異体の導入によって阻害されたことから、NAK は I B を直接リン酸化するのではなく、IKK の上位に位置するキナーゼであることがわかった。NAK は SCF 複合体型ユビキチンリガーゼの基質認識コンポーネントである FWD1 と結合することが明らかとなった。さらに NAK は PKC の活性化に引き続いて起こることが判明した (Tojima *et al.*, Nature, 2000)。

業績目録

原著論文

1. Nakamura, S., Tatuno, I., Noguchi, Y., Kitagawa, M., Kohn, L. D., Saito, Y., and Hirai, A. 1999.
73-kDa heat shock cognate protein interacts directly with P27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, during G1/S transition.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 257, 340-343.
2. Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., and Kitagawa, M. 1999a.
Down-regulation of p27^{Kip1} by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing.
J. Biol. Chem. 274, 13886-13893.
3. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-i., and Nakayama, K. 1999.

An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin.

EMBO J. 18, 2401-2410.

4. Nishimura, M., Tanaka, T., Yasuda, T., Kurakata, S., Kitagawa, M., Yamada, K., Saito, Y., and Hirai, A. 1999.
Effect of pravastatin on type IV collagen secretion and mesangial cell proliferation.
Kidney Int. 56, S97-S100.
5. Urase, K., Momoi, T., Fujita, E., Isahara, K., Uchiyama, Y., Tokunaga, A., Nakayama, K.-i., and Motoyama, N. 1999.
Bcl-xL is a negative regulator of caspase-3 activation in immature neurons during development.
Dev. Brain Res. 116, 69-78.
6. Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kogawa, K., Akashi, T., Kondo, S., Sakai, Y., Tsukiyama, T., Kitamura, D., Niho, Y., and Watanabe, T. 1999.
Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse: in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission.
FEBS Lett. 455, 101-104.
7. Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S. Y., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. 1999.
RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11364-11369.
8. Watanabe, Y., Watanabe, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Nakayama, K.-i., and Motoyama, N. 1999.
pRb phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase (Cdk) 2 and Cdk4 in retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells.
Brain Res. 842, 342-350.
9. Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., and Nakayama, K.-i. 1999b.
Common pathway for the ubiquitination of β -catenin, I β , and I β mediated by the F-box protein FWD1.

- J. Biol. Chem. 274, 28169-28174.
10. Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., and Nakayama, K.-i. 1999.
Molecular dissection of the interactions among I B , FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of I B .
J. Biol. Chem. 274, 29641-29647.
 11. Miura, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., and Nakayama, K.-i. 1999.
Structure and expression of the gene encoding mouse F-Box protein, Fwd2.
Genomics 62, 50-58.
 12. Takahashi, K., Nakayama, K.-i., and Nakayama, K. 2000.
Mice lacking a CDK inhibitor, p57^{Kip2}, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation.
J. Biochem. 127, 73-83.
 13. Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E. A., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, I., Nishihori, H., Watano, K., Ogasawara, K., Matsushima, K., and Onoe, K. 2000.
Delayed clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of Src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse.
Immunobiol. 201, 432-449.
 14. Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., and Nakanishi, M. 2000.
NAK is an I B kinase-activating kinase.
Nature 404, 778-782.

総説

1. 畠山鎮次. 1999.
蛋白分解からみた NF- B シグナル伝達制御機構.
実験医学 (増刊)「免疫研究の新たな展開」 17, 1502-1509.
2. 中山敬一. 1999.
未踏の雪原「ユビキチンワールド」.

JSI Newsletter 7, 25.

3. 白根道子, 中山敬一. 2000.
CDK インヒビター p27^{Kip1} の分解機構と癌.
Molecular Medicine 37, 176-185.
4. 中山啓子, 中山敬一. 2000.
SCF 複合体によるユビキチン化依存性のタンパク質分解.
生化学 72, 113-117.

著書

1. 中山敬一, 中山啓子. 1999.
p57.
Bio Science 新用語ライブラリー「細胞周期」第2版(田矢洋一・野島博・花岡文雄 編、
羊土社、東京) 152-153.

学会発表

1. Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Ishida, N., Nakamichi, I., Nakayama, K.-i. (1999, 5/6).
Ubiquitin-dependent degradation of I B is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF/FWD1.
Cold Spring Harbor Symposium "Biology of proteolysis", Cold Spring Harbor, NY.
2. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Ishida, N., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-i. (1999, 5/6).
An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of -catenin.
Cold Spring Harbor Symposium "Biology of proteolysis", Cold Spring Harbor, NY.
3. 中山敬一. (1999, 5/17).
SCF 複合体によるユビキチン化.(招待講演)
千里ライフサイエンスセミナー「細胞内シグナルの制御 -ユビキチンとプロテアソーム-」, 吹田.
4. Nakayama, K.-i. (1999, 9/10).
Regulation of cellular functions by SCF ubiquitin ligase. (Invited speaker)
The 14th Workshop on France-Japan Cooperative Cancer Research Program, Sendai, Japan.
5. Kominami, K.-i., Nakayama, K.-i. (1999, 9/26).
Isolation and characterization of fission yeast SCF mutants.

The first international fission yeast meeting , Edinburgh, UK .

6. 中山敬一 . (1999 , 9/29).
SCF 複合体による蛋白質分解のメカニズム . (シンポジウム)
第 58 回日本癌学会総会 , 広島 .
7. 北川雅敏, 畠山鎮次, 菊池章, 中山啓子, 中山敬一 . (1999 , 10/1).
-カテニンのユビキチン化に関わる分子 FWD1 の同定と機能解析 . (ワークショップ)
第 58 回日本癌学会総会 , 広島 .
8. 藤田史岳, 東島由一郎, 畠山鎮次, 中山敬一, 本山昇, 佐々木實, 伊藤誠, 池田恭治, 中西真 . (1999 , 10/8).
新規 I B キナーゼの同定と機能解析 .
第 72 回日本生化学会大会 , 横浜 .
9. 北川雅敏, 畠山鎮次, 白根道子, 中山啓子, 中山敬一 . (1999 , 10/9).
細胞周期制御因子およびシグナル伝達因子の分解の分子機構 .
第 72 回日本生化学会大会 , 横浜 .
10. 中山敬一, 畠山鎮次, 北川雅敏, 白根道子, 松本雅記, 服部公彦, 中山啓子 . (1999 , 10/9).
I B のユビキチンリガーゼ SCF/FWD1 複体の同定 . (シンポジウム)
第 72 回日本生化学会大会 , 横浜 .
11. 畠山鎮次, 中山啓子, 中野裕康, 奥村康, 菊池章, 小野江和則, 中山敬一 . (1999 , 12/1).
I B と -catenin の分解に関するユビキチン化酵素複合体 SCF/FWD1 . (ワークショップ)
第 29 回日本免疫学会総会 , 京都 .
12. 白根道子, 畠山鎮次, 服部公彦, 中山啓子, 中山敬一 / (1999 , 12/7).
I B 、 I B 、 I B の F-box 蛋白質 FWD1 によるユビキチン化 .
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
13. 人見奏恵, 福慶あゆみ, 小野達也, 北川雅敏, 東秀明, 玉井克之, 田矢洋一 . (1999 , 12/7).
RB 蛋白質上の Cdk4 と Cdk2 特異的リン酸化部位と生理的意義 .
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
14. 石田典子, 北川雅敏, 中山敬一 . (1999 , 12/7).
p27^{Kip1} における主要リン酸化部位の解析 .
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
15. 服部公彦, 畠山鎮次, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一 . (1999 , 12/7).
FWD1 の SCF 複合体形成および I B 認識の分子機構 .

- 第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
16. 藤本淳司，東島由一郎，Chen, Y., 畠山鎮次，中山敬一，金子葉子，本山昇，池田恭治，Karin, M., 中西真。(1999, 12/9).
新規 NF- κ B 活性化キナーゼ (NAK) 遺伝子の機能解析。
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
17. 北川雅敏，畠山鎮次，白根道子，中山啓子，中山敬一。(1999, 12/9).
細胞の悪性化に関与する特異的蛋白質の分解の分子機構。(ワークショップ)
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
18. 土橋洋，北川雅敏，亀谷徹。(1999, 12/9).
ラット褐色細胞腫細胞株 (PC12) における分化制御因子としての cdc2、cdk2。
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
19. 築山忠維，畠山鎮次，北川雅敏，中山啓子，中山敬一。(1999, 12/9).
T 細胞の分化と細胞周期：p27^{Kip1} トランスジェニックマウスの解析。
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
20. 中山敬一。(1999, 12/9).
SCF 複合体によるユビキチン化機構。(ワークショップ)
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
21. 畠山鎮次，北川雅敏，松本雅記，白根道子，服部公彦，中野裕康，奥村康，菊池章，中山啓子，中山敬一。(1999, 12/9).
I κ B と β -catenin の分解に関与するユビキチン化酵素複合体 SCF^{FWD1}。(ワークショップ)
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
22. 山中篤志，畠山鎮次，小南欽一郎，松本雅記，北川雅敏，中山敬一。(1999, 12/9).
哺乳類 E2-C の周期的発現は APC によって制御されている。
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
23. 小南欽一郎，中山敬一，登田隆。(1999, 12/9).
分裂酵母の細胞周期制御におけるユビキチンリガーゼの役割。(ワークショップ)
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
24. 高井裕之，富永薫，本山昇，池田恭治，中西真，永濱裕康，中山啓子，中山敬一。(1999, 12/10).
Chk1 キナーゼ欠損マウスを用いたマウス Chk1 キナーゼの機能解析。(ワークショップ)
第 22 回日本分子生物学会年会，福岡。
25. Nakayama, K., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i. (2000, 1/11).

Ubiquitin-dependent degradation of cyclin E mediated by the ubiquitin ligase SCF^{Skp2}.

Keystone Symposium "Cancer, Cell Cycle, and Therapeutics" , Steamboat Springs, CO .