

## 附属発生工学実験施設

### Laboratory of Embryonic and Genetic Engineering

附属発生工学実験施設では、サービス業務として発生工学的技術供与（トランスジェニックマウスやノックアウトマウス作製）、マウス胚保存業務、マウス飼育維持の管理業務等を行っている。また、マウス胚保存業務により各部門のマウス飼育数の軽減の一助となった。研究分野では発生工学的技術を利用し、特に蛋白質の特異的分解機構に関わる一連の分子群を全て破壊するプロジェクトを現在進行中である。

附属発生工学実験施設は昨年に引き続き、中山敬一教授（併任、施設長）、中山啓子助教授（副施設長）、小南欽一郎助手の教官を中心に山田ユカリ技官、非常勤研究員（1名）、研究支援推進員（1名）、研究補助員（2名）の体制でサービス業務と研究を進めている（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。1999年4月より非常勤研究員として神崎秀嗣を、研究支援推進員として大浦睦美を採用し、より充実したサービス・研究が遂行できる体制となった。

次いで退職者として2000年3月31日付けで非常勤研究員の神崎秀嗣が退職した。

#### A. CDK インヒビター p57<sup>Kip2</sup> の遺伝子欠損マウスの作製と解析

細胞周期を負に制御する CDK インヒビター p57<sup>Kip2</sup> の遺伝子をクローニングし、その構造を決定した。さらに ES 細胞内で相同組換えによって p57<sup>Kip2</sup> 遺伝子を破壊し、定法に従って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死亡し、強いチアノーゼを認め、胃内には母乳の欠損していたことから、呼吸困難及び嚥下困難によって死亡していることが推定された。これを裏付けるように口蓋裂や骨格異常が認められた。さらに腸管の部分欠損が高頻度で認められた。p57<sup>Kip2</sup> はゲノム刷り込み現象が認められる遺伝子で母性発現するため、母性由来遺伝子に変異がある場合には、例え父性由来遺伝子が正常であってもノックアウトマウスと同じ形質を示した。全ての p57 ノックアウトマウスのうち、約 1 割は死亡せずに生き残るが、その成長は著しく遅延し、体重は正常の半分から 4 分の 1 程度にとどまった。また腔開口せず、成体となっても腔閉鎖が認められた。このマウスは予想された発がん傾向は全く認められなかったことにより、p57<sup>Kip2</sup> はがん抑制遺伝子ではないことが明らかとなった。また p57 ノックアウトマウスにおいて、p57<sup>Kip2</sup> 遺伝子の異常と考えられている Beckwith-Wiedemann 症候群に類似した症状は少なく、Beckwith-Wiedemann 症候群の原因が単純に p57<sup>Kip2</sup> の欠損である可能性は考えにくいと思われた（Takahashi et al., J. Biochem., 2000）。

## B. F-box 蛋白質の構造及び機能発現解析

SCF 複合体型ユビキチンリガーゼにおける基質認識サブユニットである F-box 蛋白質の中で、FWD2 という新規 F-box 蛋白質の cDNA をクローニングした。FWD2 は肝臓に多く発現し、精巣、肺、心臓、骨格筋等にも若干発現している。近縁の蛋白質である FWD1 が核に多く発現しているのに対し、FWD2 は細胞質に特異的に発現していることが明らかとなった。さらに FWD2 は細胞内で Skp1, Cul1 と結合しており、SCF 複合体を構成していることが生化学的に証明された。FWD2 の遺伝子をクローニングし、その構造を決定したところ、F-box ドメインは大きな単一エクソン(エクソン 1)にコードされていることがわかった(Miura et al., Genomics, 1999)。

## C. 神経細胞の発生段階における RB 蛋白質のリン酸化状態の解析

感染防御学部門本山 昇助教授との共同研究として、神経細胞の分化における RB 蛋白質のリン酸化状態を調べるために、未熟神経細胞株 P19 細胞をレチノイン酸処理して分化させ、私達が以前に作製したリン酸化 RB 蛋白質特異的抗体を用いて検討を行った。その結果、未分化な P19 細胞では RB 蛋白質は高度にリン酸化されていたが、セリン 601 とセリン 773 はリン酸化されていなかった。しかしながらレチノイン酸処理をするとこれらの両サイトは強力にリン酸化された。CDK4 活性は未分化な P19 細胞には検出できなかったが、レチノイン酸処理によって CDK4 活性が上昇した。逆に CDK2 活性とセリン 605 のリン酸化は未分化の P19 細胞及びレチノイン酸処理した P19 細胞で検出された。これらの結果より、CDK2 と CDK4 は RB 蛋白質の異なる部位をリン酸化していること、レチノイン酸処理によって恐らく CDK4 の活性化によりセリン 601 とセリン 773 が新たにリン酸化を受けることが示された(Watanabe et al., Brain Res., 1999)。

## D. Bcl-x ノックアウトマウスにおける神経細胞内カスパーズの活性化の解析

Bcl-x とカスパーズ 3 は、線虫 *Caenorhabditis elegans* の遺伝学的にアポトーシスを制御している Ced-9 と Ced-3 の哺乳類におけるホモログである。私達は以前に Bcl-x ノックアウトマウスが激しい神経細胞死を起こして、胎生 13 日付近で死亡することを示したが(Motoyama et al., Science, 1995)、今回私達はこの Bcl-x ノックアウトマウスにおいて、発達中の神経細胞におけるカスパーズ 3 の活性化が亢進していることを発見した。このことから高等生物においても Bcl-x とカスパーズ 3 は拮抗的な関係にあり、Bcl-x の欠損はカスパーズの活性化につながるということが初めて証明された(Urase et al., Dev. Brain Res., 1999)。

## 業績目録

### 原著論文

1. Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., and Kitagawa, M. 1999.  
Down-regulation of p27<sup>Kip1</sup> by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing.  
J. Biol. Chem. 274, 13886-13893.
2. 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  $\beta$ -catenin.  
EMBO J. 18, 2401-2410.
3. 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.
4. Kohzaki, H., Ito, K., Huang, G., Wee, H. J., Murakami, Y., and Ito, Y. 1999.  
Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2.  
Oncogene 18, 4055-4062.
5. Watanabe, Y., Watanabe, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Nakayama, K., 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.
6. Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., and Nakayama, K.-i. 1999.  
Molecular dissection of the interactions among  $\beta$ -catenin, FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of  $\beta$ -catenin.  
J. Biol. Chem. 274, 29641-29647.
7. Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., and Nakayama, K.-i. 1999.

- Common pathway for the ubiquitination of *p53*, *p27*, and *p21* mediated by the F-box protein FWD1.  
J. Biol. Chem. 274, 28169-28174.
8. Kohzaki, H., Ito, Y., and Murakami, Y. 1999.  
Context-dependent modulation of replication activity of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors.  
Mol. Cell. Biol. 19, 7428-7435.
  9. 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.
  10. Takahashi, K., Nakayama, K.-i., and Nakayama, K. 2000.  
Mice lacking a CDK inhibitor, *p57<sup>Kip2</sup>*, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation.  
J. Biochem. 127, 73-83.
  11. Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., and Nakanishi, M. 2000.  
NAK is an *p53*-activating kinase.  
Nature 404, 778-782.

## 総説

1. 小南欽一郎. 1999.  
ユビキチンリガーゼ SCF の役割とその修飾.  
細胞工学 18, 622-631.
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. Toda, T., Ochotorena, I., and Kominami, K. 1999.  
Two distinct ubiquitin-proteolysis pathways in the fission yeast cell cycle.  
Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences. 354, 1551-1557.
4. 白根道子, 中山敬一. 2000.  
CDK インヒビター *p27<sup>Kip1</sup>* の分解機構と癌.  
Molecular Medicine 37, 176-185.

5. 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. 小南欽一郎. 1999.  
APC.  
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) 22-23
2. 小南欽一郎. 1999.  
SCF/Pop1Pop2.  
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) 20-21.
3. 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. Katayama, S., Kominami, K.-i., Toda, T. (1999, 5/6) .  
Genetic and biochemical characterization of fission yeast SCF-ubiquitin ligase .  
Cold Spring Harbor Symposium "Biology of proteolysis" , Cold Spring Harbor, NY .
2. 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        is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF/FWD1 .  
Cold Spring Harbor Symposium "Biology of proteolysis" , Cold Spring Harbor, NY .
3. 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 .

4. 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 .
5. Kominami, K.-i., Ochotorena, I., Toda, T. ( 1999 , 5/19 ) .  
Two distinct F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form homo- and hetero-complexes in the fission yeast SCF ubiquitin ligase .  
The Japanese Biochemical Society and CGGH Forum "Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease" , Naruto, Tokushima, Japan .
6. 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 .
7. Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K.-i., Toda, T., Hunt, T. ( 1999 , 9/26 ) .  
Two distinct proteolytic pathways ensure that Cdc13 and Cig2 levels oscillate out of phase .  
The first international fission yeast meeting , Edinburgh, UK .
8. Kitamura, K., Kominami, K.-i., Yamano, H., Hunt, T., Toda, T. ( 1999 , 9/26 ) .  
Dual regulation of Cig2 proteolysis by two distinct E3 ubiquitin-ligases .  
The first international fission yeast meeting , Edinburgh, UK .
9. 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 .
10. 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 .
11. 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 .
12. 神崎秀嗣, 伊藤公成, 黄剛, 魏熙俊, 村上洋太, 伊藤嘉明 . ( 1999 , 10/7 ) .  
32Dcl3 細胞の顆粒球への分化は AML1/ETO(MTG8)により阻止されるが高レベルで発

- 現している Bcl-2 によっては阻止されない .  
第 72 回日本生化学会大会 , 横浜 .
13. 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 .
14. 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 .
15. 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 複合体の同定 . ( シンポジウム )  
第 72 回日本生化学会大会 , 横浜 .
16. 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 .
17. 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 .
18. 神崎秀嗣 , 伊藤嘉明 , 村上洋太 . ( 1999 , 12/7 ) .  
出芽酵母 ARS1 複製の転写因子による調節機構 .  
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
19. 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 .
20. 石田典子 , 北川雅敏 , 中山敬一 . ( 1999 , 12/7 ) .  
p27<sup>Kip1</sup> 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 .
21. 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 .
22. 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- 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 .
23. 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<sup>Kip1</sup> 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 .
24. 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 .
25. 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 .
26. 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 .
27. 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 B と -catenin の分解に関するユビキチン化酵素複合体 SCF<sup>FWD1</sup> . (ワークショップ)  
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
28. 逢坂文男, 佐伯美帆, 片山輪, 会田理子, 東江昭夫, 小南欽一郎, 千葉智樹, 登田隆, 田中啓二, 加藤誠志 . (1999 , 12/9) .  
分裂酵母 NEDD8 翻訳後修飾システムは cullin/cdc53 family 蛋白質群の機能に必須である .  
第 22 回日本分子生物学会年会 , 福岡 .
29. 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 .
30. Nakayama, K., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i. (2000 , 1/11) .  
Ubiquitin-dependent degradation of cyclin E mediated by the ubiquitin ligase SCF<sup>Skp2</sup> .  
Keystone Symposium "Cancer, Cell Cycle, and Therapeutics" , Steamboat Springs, CO .