

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（2001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押川 清孝（福大・理博）を、研究支援推進員として大浦睦美（継続）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。

A. SCF 複合体の基質認識コンポーネント Skp2 のノックアウトマウス作製と解析

我々は生医研細胞学部門と共同研究において、サイクリン E のユビキチン化依存性タンパク質分解機構に Skp2 が関与していることを明らかにした。Skp2 は SCF 複合体のレセプターサブユニット（F-box タンパク質）であり、サイクリン E や p27^{Kip1} と結合してユビキチンを付加する反応を媒介する分子であることが判明した。サイクリン E と Skp2 の結合はサイクリン E の生理的パートナーである CDK2 が存在すると競合的に阻害されることから、Skp2 は CDK2 に結合していないフリーのサイクリン E のユビキチン化に関与していることが推定される。

Skp2 の個体における生理的重要性を検討するために ES 細胞において Skp2 遺伝子座をジーンターゲット法によって破壊し、それをマウス胚に顕微注入してキメラマウスを作製し、交配によって Skp2 ノックアウトマウスを作製した。Skp2 ノックアウトマウスはほぼメンデルの法則に則った比率で出生し、特に発癌等の疾病は認められないが、成長が遅延し、その体重は正常コントロールの約 2/3 でしかない。細胞中にはサイクリン E と p27^{Kip1} の特異的な蓄積を認めた。またサイクリン E の細胞周期における量的変動が消失し、サイクリン E が常時発現するようになっていた。Skp2 の基質として報告されていたサイクリン A や E2F-1 は量的には変化を認めなかった。細胞学的には Skp2 を欠失した細胞は増殖が障害され、アポトーシスに陥る細胞が増加していた。細胞は核の腫大、染色体倍数性の増加、中心体数の過剰等の異常が出現し、これは Endoreduplication が起こっているものと推測された。特に肝臓・腎臓・肺・精巣等でこの傾向が強く観察された（Nakayama *et al.*, EMBO J. 19: 2069-2081, 2000）。

B. 細胞周期のチェックポイント制御に関わる分子 Chk1 のノックアウトマウス作製と解析

細胞周期においてはチェックポイントと呼ばれるファイルセーフ機構が存在し、その機構にはチェックポイントキナーゼと呼ばれるタンパク質リン酸化酵素が重要な役割を果たしている。その中でも Chk1 は酵母において DNA 傷害チェックポイントに関わる因子として同定された。しかし哺乳類において Chk1 ホモログがどのような生理的重要性を持っているのは不明であった。我々は名古屋市立大学第二生化学講座の中西真博士と共同研究によって、ES 細胞において Chk1 遺伝子座をジーンターゲティング法によって破壊し、それをマウス胚に顕微注入してキメラマウスを作製し、交配によって Chk1 ノックアウトマウスを作製した。Chk1 ノックアウトマウスは出生せず、胎仔期の解析によって胚盤胞期に異常な分裂像を示して個体発生が著しく障害されていることが判明した。胚盤胞を体外培養すると、Chk1 ノックアウトマウス由来の胚盤胞では内部細胞塊の成長が障害され、アポトーシスによって死滅してしまうことが明らかとなった。Chk1 ノックアウトマウスの胚盤胞において DNA 複製阻害や DNA 傷害によって起こるはずの細胞周期停止は消失し、これらのチェックポイント機構に Chk1 が必須の役割を果たしていることが証明された。さらに酵母とは異なり、哺乳類の個体発生においては DNA 傷害等の外的要因がなくても細胞周期の正常な維持には Chk1 が必要であることが明らかとなった。

C. p27^{Kip1} トランスジェニックマウスの作製と解析

T 細胞の増殖は分化特異的に制御されているが、その増殖が分化に必須であるかどうかは依然不明である。CDK インヒビターである p27^{Kip1} は T 細胞の全分化過程を通じて高い発現を示すが、増殖能の高い CD4⁺CD8⁻ステージの胸腺細胞と活性化された成熟 T 細胞においては例外的にその発現が低下する。その発現低下の生理的な意義を調べるために、我々は生医研細胞学部門と共同研究として p27^{Kip1} を LCK 近位プロモーター下に挿入して T 細胞に強制的に発現させるようなトランスジェニックマウスを作製した。その結果、発現レベルの異なる 3 つのラインを確立した。胸腺における細胞数は p27^{Kip1} の発現が高いラインほど低下し、それは末梢における成熟 T 細胞においても同様であった。T 細胞の分化は CD4⁺CD8⁻CD25⁺CD44^{low} ステージで阻害されていた。トランスジェニックマウスにおける末梢 T 細胞は、抗原刺激に対する免疫応答性が弱く、抗体の産生上昇が強く阻害されていた。さらに二次濾胞の形成も著しく障害されていることなどから、結果として p27^{Kip1} の生理的な発現低下は、T 細胞の分化や増殖、さらには免疫反応において必須の機構であることが明らかとなった (Tsukiyama *et al.*, *J. Immunol.* 166: 304-312, 2001) .

D. p27^{Kip1} と p57^{Kip2} のマウス胚発生における時空間的発現解析

細胞周期を負に制御する分子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害分子である $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ は互いに構造的、機能的に類似した分子である。我々はマウス胎仔の発生過程における $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ の組織内発現の経時的变化とその発現様式について免疫染色を行いその解析、比較を行った。胎仔の脳、レンズ、神経節、腎臓、心臓、肺、肝臓、皮膚においては、 $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ の発現は部位、時期ともに概ね一致することが明らかとなった。またそれが増殖能の喪失や終末分化の時期とほぼ一致することが判明した。一方で網膜、胸腺、脾臓、精巣、卵巣では $p27^{Kip1}$ のみの発現が認められ、逆に口蓋、消化管、膵臓、軟骨、骨格筋においては $p57^{Kip2}$ のみの発現が認められた。副腎においては $p27^{Kip1}$ は髄質のみに発現を認めたのに対し、 $p57^{Kip2}$ は皮質においてのみ発現が認められ、また心臓においては $p27^{Kip1}$ が内皮細胞及び心筋細胞において発現が認められるのに対し、 $p57^{Kip2}$ は内皮細胞のみにその発現が認められるといった、同一臓器において $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ が異なる発現様式を示す場合も認められた。 $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ の組織内発現の経時的变化の解析により、 $p57^{Kip2}$ は主に胎仔期における器官形成に主にその役割があり、一方 $p27^{Kip1}$ は成体組織における発現が $p57^{Kip2}$ に比べて多く認められることにより、いくつかの臓器においては器官形成のみならず、臓器の維持にもその役割があることが推測された。抗 $p27^{Kip1}$ 抗体又は抗 $p57^{Kip2}$ 抗体と抗 BrdU 抗体の蛍光二重染色による解析により、 $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ の発現は BrdU を取り込んでいない細胞のみに発現が認められることから、これらの分子が実際に個体発生過程においても細胞増殖に関して負の役割を果たすことが予測された。 $p27^{Kip1}$ 及び $p57^{Kip2}$ の空間的・時間的な発現様式はそれぞれのノックアウトマウスの表現型をうまく説明することができ、これらの分子が胎仔期の器官発生に重要な役割を担っていることを示唆している (Nagahama et al., Anat. Embryol 203: 77-87, 2001)。

E. サイトカインレセプターからのシグナル伝達に關与するキナーゼ Tyk2 のノックアウトマウス作製と解析

Janus キナーゼ群はサイトカインレセプターからのシグナル伝達に重要な役割を果たしている。Tyk2 は 4 種類ある Janus キナーゼのうちの 1 つであり、現在までに IFN α 、IL-10、IL-12 レセプターからのシグナル伝達に關与することが示唆されていた。我々は九大・医学部・第一内科との共同研究において ES 細胞において Tyk2 遺伝子座をジーンターゲット法によって破壊し、それをマウス胚に顕微注入してキメラマウスを作製し、交配によって Tyk2 ノックアウトマウスを作製した。Tyk2 ノックアウトマウスはほぼメンデルの法則に則った比率で出生し、特に発癌等の疾病は認められない。Tyk2 ノックアウトマウスでは低濃度の IFN α に対しては反応性が減弱していたが、高濃度の IFN α に対しては正常に反応した。このマウスは IL-12 に対してはほとんど反応せず、 T_H1 への分化が阻害されていることが示された。一方で IL-6 や IL-10 への反応は正常に起こり、これらのシグナルについては Tyk2 が必ずしも必要でないことが明らかとなった (Shimoda et al., Immunity 13: 561-571, 2000)。

業績目録

原著論文

1. Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M. 2000.
NAK is an I κ B kinase-activating kinase.
Nature 404, 778-782.
2. Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i., Hatakeyama, S. 2000.
Targeted disruption of *Skp2* results in accumulation of cyclin E and p27^{Kip1}, polyploidy and centrosome overduplication.
EMBO J. 19, 2069-2081.
3. Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, N., Nakayama, K.-i. 2000.
Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in *Chk1*^{-/-} mice.
Genes Dev. 14, 1439-1447.
4. Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E. A., Kominami, K., Toda, T., Suzuki, T., Chiba, T., Tanaka, K., Kato, S. 2000.
Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast.
EMBO J. 19, 3475-3484.
5. Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A., Nakayama, K., Nakayama, K.-i. 2000.
Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxy acetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and *Aldh2* gene targeting mouse.
FEBS Lett. 476, 306-311.
6. Yamanaka, A., Hatakeyama, S., Kominami, K.-i., Kitagawa, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.-i. 2000.
Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting Complex/Cyclosome.
Mol. Biol. Cell 11, 2821-2831.
7. Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i. 2000.
Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27^{Kip1}, increases its protein

stability.

J. Biol. Chem. 275, 25146-25154.

8. Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S., Niho, Y., Nakayama, K. -i. 2000.
Tyk2 plays a restricted role in IFN α signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function.
Immunity 13, 561-571.
9. Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T., Toda, T. 2000.
The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases.
Mol. Cell 6, 1377-1387.
10. Tsukiyama, T., Ishida, N., Shirane, M., Minamishima, Y. A., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-i. 2001.
Down-regulation of p27^{Kip1} expression is required for development and function of T cells.
J. Immunol. 166, 304-312.
11. Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K., Nakayama, K. -i. 2001.
Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27^{Kip1} and p57^{Kip2} during mouse development.
Anat. Embryol. 203, 77-87.

総説

1. 小南欽一郎. 2000.
タンパク質分解は酵母細胞周期を制御する.
実験医学 (増刊)「細胞周期研究のフロンティア」 18, 923-932.
2. 中山敬一, 中山啓子. 2000.
SCF複合体: 千の顔を持つユビキチンリガーゼ.
実験医学 18, 1457-1464.
3. 中西真, 中山敬一. 2000.
G2/M期チェックポイントにおける Chk1 の機能.
実験医学 18, 1814-1816.
4. 畠山鎮次, 中山敬一. 2000.
NF- κ B と Wnt シグナルを制御するユビキチン-プロテアソーム依存性タンパク質分解システム.

- Molecular Medicine (増刊)「免疫 2000-01」 37, 52-68.
5. 服部公彦, 中山敬一. 2000.
細胞内タンパク質の分解制御を担うユビキチンシステム : SCF 複合体によるユビキチン化.
化学と生物 38, 653-660.
 6. 矢田雅佳, 中山敬一. 2000.
真核生物におけるユビキチン-プロテアソーム介在性蛋白質分解機構.
臨床免疫 34, 495-503.
 7. 中山敬一. 2000.
ノックアウトマウスリスト 細胞死 : 制御.
生体の科学 (増刊) 51, 424-425.
 8. 中山敬一, 中山啓子. 2001.
SCF 複合体の多面的な作用機構.
実験医学 (増刊)「タンパク質分解の最前線 2001」 19, 132-141.

著書

1. 中山啓子, 中山敬一. 2000.
マウスを用いた細胞周期異常の解析
医学&サイエンスシリーズ わかる細胞周期と癌 (田矢洋一 編、羊土社、東京) 102-109
2. 白根道子, 中山敬一. 2000.
Bcl-2 ファミリー分子群
バイオサイエンス新用語ライブラリー : 免疫 (斉藤隆・竹森利忠 編、羊土社、東京) 222-223
3. 中山啓子, 中山敬一. 2001.
CDK インヒビターの機能と発現調節
わかる実験医学シリーズ「細胞周期がわかる」(中山敬一 編、羊土社、東京) 44-53
4. 中山敬一. 2001.
細胞周期という名のエンジン - その精緻なメカニズムの探究
わかる実験医学シリーズ「細胞周期がわかる」(中山敬一 編、羊土社、東京) 12-21

学会発表

1. Hatakeyama, S., Nakayama, K., Matsumoto, M., Shirane, M., Tsukiyama, T., Minamishima, Y. A., Nakamichi, I., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i. (2000, 5/18).
Ubiquitin-dependent degradation of cyclin E is mediated by a ubiquitin ligase SCF^{Skp2}.

- Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
2. Tsukiyama, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K.-i. (2000 , 5/19).
Down-regulation of p27^{Kip1} is required for T cell development .
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
 3. Shirane, M., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i. (2000 , 5/19).
Down-regulation of p27^{Kip1} by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing .
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
 4. 小口健, 中辻祐司, 佐古田三郎, 中山敬一 (2000 , 5/25).
反応性グリオシス抑制への試み-2 .
第 41 回日本神経学会総会, 松本 .
 5. 北川雅敏, 中山敬一 (2000 , 10/5).
CDK 阻害蛋白質 p27^{Kip1} のリン酸化と分解の制御機構 .(ミニシンポジウム)
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
 6. 中山啓子, 畠山鎮次, 北川雅敏, 小南欽一郎, 中山敬一 (2000 , 10/6).
染色体倍数性及び中心体複製に異常をきたすノックアウトマウスの解析 .(シンポジウム)
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
 7. 中山敬一, 畠山鎮次, 北川雅敏, 小南欽一郎, 中山啓子 (2000 , 10/6).
Rb 経路の上流に位置するサイクリン E と p27^{Kip1} の蛋白分解機構 .(シンポジウム)
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
 8. 中山敬一, 畠山鎮次, 北川雅敏, 小南欽一郎, 中山啓子 (2000 , 10/12).
サイクリン E 及び p27^{Kip1} のユビキチン化因子のノックアウトマウスによる機能解析 .(シンポジウム)
第 73 回日本生化学会大会, 横浜 .
 9. 李勝範, 東島由一郎, 藤田史岳, 北村賢三, 山田千里, 畠山鎮次, 中山敬一, 本山昇, 池田恭治, 中西真 (2000 , 10/14).
IKK 活性化キナーゼとしての NAK の同定とその遺伝子構造 .
第 73 回日本生化学会大会, 横浜 .
 10. 兼松隆, 吉村研治, 鍋倉淳一, 赤池紀生, 中山啓子, 中山敬一, 平田雅人 (2000 , 10/14).
GABAA 受容体情報伝達における p130、新規 IP3 結合蛋白質の役割 .
第 73 回日本生化学会大会, 横浜 .
 11. 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一 (2000 , 11/15).
NF- κ B シグナル及び細胞周期制御に関するユビキチンリガーゼ : FWD1 と Skp2 .

- 第 30 回日本免疫学会年会，仙台．
12. Nakayama, K.-i. (2000, 11/17).
SCF ubiquitin ligase regulating cell cycle and NF- κ B signaling . (Invited speaker)
US-Japan and German-Japan Joint Immunology Meeting , Sendai, Japan .
 13. 中山敬一 (2000, 12/8).
細胞周期をコントロールするユビキチン化システム：肝細胞を中心に . (招待講演)
肝再生研究会，東京．
 14. 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一 (2000, 12/15).
ユビキチンリガーゼ SCF^{Skp2} によるサイクリン E と p27^{Kip1} の発現制御：ノックアウトマウスを用いた解析から . (シンポジウム)
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 15. 山中篤志, 矢田雅佳, 今木裕幸, 大島靖美, 中山敬一 (2000, 12/15).
C. elegans SKP1 ファミリーの生化学的及び機能的解析 .
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 16. 北川恭子, 川本俊弘, 櫻田尚樹, 中山啓子, 中山敬一 (2000, 12/15).
Aldehyde dehydrogenase(ALDH) 2 遺伝子多型の methoxyacetaldehyde (MALD)代謝への影響 .
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 17. 石田典子, 北川雅敏, 畠山鎮次, 中山敬一 (2000, 12/16).
p27^{Kip1} の安定性に関わる主要リン酸化部位 Ser10 の機能解析 .
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 18. 北川雅敏, 原太一, 石田典子, 三浦正徳, 中山啓子, 中山敬一 (2000, 12/16).
CDK 阻害蛋白質 p27^{Kip1} のリン酸化シグナルと分解の制御機構 .
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 19. 北村憲司, 山野博之, 小南欽一郎, Hunt, T., 登田隆 (2000, 12/16).
三種のユビキチン・プロテアソーム経路による S 期サイクリンの発現量制御 .
第 23 回日本分子生物学会年会，神戸．
 20. Nakayama, K., Nagahama, H., Kitagawa, M., Nakayama, K.-i. (2001, 1/11).
Generation and characterization of *Skp2*^{-/-} *p27*^{-/-} doubly knockout mice .
Keystone Symposia "Cell Cycle 2001" , Taos, NM .
 21. Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-i. (2001, 1/11).
Phosphorylation at serine-10, a major phosphorylation site of p27^{Kip1}, increases its protein stability .
Keystone Symposia "Cell Cycle 2001" , Taos, NM .

22. Nakayama, K.-i. (2001 , 1/31).
Regulation of the cell cycle at the G₁-S transition by proteolysis of cyclin E and p27^{Kip1} .
(Invited speaker)
Molecular network of G₁-S regulation in eukaryotic cells: from G₁ regulators to DNA replication machinery , Tokyo, Japan .
23. Nakayama, K.-i. (2001 , 2/24).
Gene targeting of SCF ubiquitin ligase in mice . (Invited speaker)
The 10th Hot Spring Harbor Symposium "Molecular aspects of complex systems" , Beppu, Japan .