「生命活動のプログラム」
平成７年度採択研究代表者

岸本　健雄

（東京工業大学大学院生命理工学研究科　教授）

「細胞増殖の制御機構」

１．研究実施の概要

本研究の目的は、細胞増殖制御の分子機構を、細胞周期制御因子とシグナル伝達機構の連携にもとづいて明らかにすることにある。具体的には、⑴卵細胞を主な材料として、卵成熟・初期発生・細胞分化という時間軸に沿って、シグナル伝達から細胞周期制御因子に至る経路を解析するとともに、⑵哺乳動物由来の培養細胞系を主に用いて、細胞膜から核への増殖と分化等のシグナル伝達の分子機構およびそれに伴う細胞周期の制御を、GTP結合タンパク質の機能を中心として解析している。

平成11年度の研究により、⑴については特に、細胞外刺激からM期開始の引金であるサイクリンB・Cdc2の活性化に至るシグナル伝達の全経路を同定できる可能性が判明した；さらに、減数分裂の本質であるゲノム半減は、Mos-MAPキナーゼを介したシグナル伝達系が減数第二分裂を成立させることによるという点について、概ねの決着を得た。他方⑵については特に、Rasによって誘導される足場非依存性増殖に際し、低分子量GTP結合タンパク質であるRalが細胞周期の負の制御因子であるp27（Kip1）の細胞内の量を調節している可能性を示唆した；さらに、筋発生における筋芽細胞の移動と分化に際し、様々な低分子量GTP結合タンパク質が利用されていることを明らかにした。

２．研究実施内容

＜Ａグループ＞

ホルモンによる卵成熟（卵減数分裂）→受精による初期卵割→胞胚期における体細胞型細胞周期の確立→細胞分化と細胞増殖の停止という発生・分化過程においては、それぞれの時間軸に対応したシグナルがあり、それらにもとづいて細胞周期の進行、停止、抑制あるいは様式の転換がおこっている。これらのシグナルからサイクリン・Cdk等の細胞周期制御因子群に至る経路の解析を試みた。

⑴　未成熟卵におけるG2期停止の解除：　M期開始の引金はCdc2キナーゼ（サイクリンＢ・Cdc2複合体）の活性化であり、これは、Cdc25フォスファターゼの活性化とWee1ファミリーキナーゼ（Wee1、Myt1）の不活性化による。今年度には、卵成熟誘起ホルモンの卵外からの刺激→卵表の三量体G蛋白質→PI3キ

ナーゼ→PKB→Cdc25の活性化とMyt1の不活性化→Cdc2キナーゼの活性化、というシグナル伝達経路が機能している可能性が判明した。これは、細胞外シグナルからCdc2キナーゼに至る全経路の同定として、あらゆる実験系を通じて最初のものになると期待される。

⑵　減数分裂周期におけるM/M期移行：　ヒトデ卵におけるMos→MAPキナーゼ系の解析から、減数第一分裂を終了した卵母細胞は潜在的には既に初期胚型細胞周期を遂行する能力をもつにもかかわらず、Mosがこれを回避してあえて減数第二分裂を実現していること；これこそが、脊椎動物・無脊椎動物を通じたMosの本質的機能であること、が判明した。さらにアフリカツメガエル卵の場合は、減数分裂間期に存在する低レベルの活性のCdc2キナーゼが、少量のWee1の活性を抑制することによってＳ期の抑制に貢献することが判明した。これらにより、減数分裂の本質であるゲノム半減の機構について、大概の決着が得られたといえる。

⑶　受精によるＳ期の開始：　ヒトデ卵受精に際してのＳ期開始には、通常の体細胞型細胞周期におけるＳ期には必須とされるサイクリンＥとＡが、必要ではないと判明した。これは、未受精卵におけるG1期停止点が、通常の体細胞周期におけるG1期停止点（制限点あるいはスタート）とは異なることを意味しており、受精によるS期の開始という生物学上の往年の課題について、新たな視点を提供するものである。

⑷　細胞分化と細胞増殖停止：　ホヤ胚を用いた解析から、脊索細胞系譜と筋肉細胞系譜とでは、細胞分化に伴う増殖停止の機構が異なることが判明した。現在、そのための細胞内シグナルを解析中である。他方、p35・Cdk5複合体は増殖を停止した神経細胞特異的に発現しているが、ラット胎児脳初代培養系の解析から、p35がカルパインによって限定分解を受け、これが神経細胞死と並行していることが判明した。p35の限定分解の細胞死における役割を検討中である。

＜Ｂグループ＞

前年度に引き続き、三量体GTP結合タンパク質（Gタンパク質）および低分子量GTP結合タンパク質を中心として、細胞内シグナル伝達系の解析を行った。

⑴　Gタンパク質によるMAPキナーゼ活性化の分子機構：　Gタンパク質の各種サブユニット（Ｇβγ、Ｇαi、Ｇαq/11、Ｇα12/13）→チロシンキナーゼ→低分子量GTP結合タンパク質（Ras、Rhoファミリー）→MAPキナーゼ（ERK、JNK）という普遍的なシグナル伝達経路の存在証明について、ほぼ決着を得た。

⑵　Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質の活性調節：　レセプターに応答したRhoファミリーの活性調節機構を解明するために、Rhoファミリーに対するGEFとして同定されているDblについて解析した。その結果、チロシンキナー

ゼACK1は、活性型Cdc42との相互作用によって活性化され、Dblをリン酸化してそのGEF活性を上昇させることを見いだした。したがってACK1からDblを介する系は、Rhoファミリー GTP結合タンパク質間のクロストークを制御している可能性がある。

⑶ Rasの二量体形成： RasがRaf-1を活性化するために膜局在を必要とするのは、膜上でRasが二量体を形成することによることを明らかにした。

⑷ Ralの機能： RalはRasによって誘導される足場非依存性増殖に関与しており、この際、Ralが細胞周期の負の制御因子であるp27（Kip1）の細胞内の量を調節している可能性が示唆された。

⑸ 筋発生における低分子量GTP結合タンパク質の役割： 筋発生に際しての筋芽細胞の移動、分化におけるGTP結合タンパク質の役割を調べる目的で、マウス衛星細胞由来C2C12細胞を用いて研究を進めた。その結果、Ras→Ral-GEF→Ralという経路がC2C12細胞の走化性因子による移動に重要であることが示された。さらに、筋管細胞への分化において、R-Rasは、細胞死を抑制して最終的に分化する細胞の数を増やしていることも見いだした。

⑹ Ras-GRF1によるRasおよびRacシグナル伝達系の調節： Ras-GRF1は、脳に特異的に発現しているGEFであり、記憶の固定化段階などの脳の高次機能の発現に重要な役割を担っていると考えられている。このRas-GRF1については、Gタンパク質共役レセプターからGβγを介するシグナルがそのチロシンリン酸化を誘導し、それによってRas-GRF1のRacに対するGEF活性がもたらされることが判明した。シナプスで機能している多くの神経伝達物質は、Gタンパク質共役レセプターあるいはイオンチャネル型レセプターを介して神経活動を制御している。Ras-GRF1は、おそらくこれらのレセプターの下流で、RasやRacといったGTP結合タンパク質を介するシグナル伝達系の調節機能を担っていると考えられる。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Kishimoto, T. (1999). Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. Develop. Biol. 214, 1-8.

○Uchida, A., Yorifuji, H., Lee, V. M.Y., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (1999). Neurofilaments of aged rats: The strengthened interneurofilament interaction and the reduced amount of NF-M. J. Neurosci. Res. 58, 337-348.

○Srsen, V., Kitazawa, H., Sugita, M., Murofushi, H., Bulinski, J.C., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (1999). Serum-dependent phosphorylation of human MAP4 at ser696 in cultured mammalian cells. Cell Struc. Funct. 24, 321-327.

○Kitazawa, H., Iida, J., Uchida, A., Haino-Fukushima, K., Itoh, T.J., Hotani, H., Ookata,

K., Murofushi, H., Bulinski, J.C., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000). Ser787 in the proline-rich region of human MAP4 is a critical phosphorylation site that reduces its activity to promote tubulin polymerization. Cell Struc. Funct. 25, 33-39.

○Tokuoka, H., Saito, T., Yorifuji, H., Wei, F-Y., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000). Brain-derived neurotrophic factor-induced phosphorylation of neurofilament-H subunit in primary cultures of embryo rat cortical neurons. J. Cell Sci. 113, 1059-1068.

○岸本健雄（1999）．cdc2/MPF；サイクリンＢ．「BioScience用語ライブラリー /細胞周期　改訂第２版」（田矢・野島・花岡編）羊土社.

○岸本健雄（2000）．細胞増殖と細胞周期.「現代生物科学」第８章（山田晃弘、中澤透編）放送大学.

○Kiyono, M., Satoh, T., and Kaziro, Y. (1999). G protein βγ subunit-dependent Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25Mm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4826-4831

○Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1999). The Src family tyrosine kinase is involved in Rho-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase by Gα12. Oncogene 18, 4425-4434

○Nishida, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. (1999). Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. Oncogene 18, 407-415

○Nishida, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. (1999). Association of the proto-oncogene product Dbl with G protein βγ subunits. FEBS Lett. 459, 186-190

○Sun, Y., Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1999). Activation of c-fos promoter by Gβγ -mediated signaling: involvement of Rho and c-Jun N-terminal kinase. J. Biochem. 125, 515-521

○Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1999). Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein βγ subunit in human embryonal kidney 293 cells. J. Biol. Chem. 274, 1957-1965

○Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H., and Kaziro, Y. (2000). Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. J. Biol. Chem. 275, 3737-3740

○Kato, J., Kaziro, Y., and Satoh, T. (2000). Activation of the guanine nucleotide exchange factor Dbl following ACK1-dependent tyrosine phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268, 141-147

○Kiyono, M., Kaziro, Y., and Satoh T. (2000). Induction of Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25Mm following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src. J. Biol. Chem. 275, 5441-5446

○Suzuki, J., Kaziro, Y., and Koide, H. (2000). Positive regulation of skeletal myogenesis

by R-Ras. Oncogene 19, 1138-1146
○Terada, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. (2000). Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 449-455
○Yamauchi, J., Kawano, T., Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. (2000). Gi-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase in human embryonal kidney 293 cells. J. Biol. Chem. 275, 7633-7640
○千田和広、加藤茂明、伊東　広、福井泰久 (1999)．真核細胞のシグナル伝達研究を整理する．蛋白質核酸酵素 44, 2535-2564
○水谷　伸、小出　寛 (1999)．Raf-1/A-Raf/B-Raf．Bio Science用語ライブラリー「細胞内シグナル伝達」第2版（山本　雅　編）128-129、羊土社
○水野憲一、伊東　広 (1999)．Caspaseファミリーの構造と機能．臨床免疫 32, 426-434