

九州大学生体防御医学研究所 教授

中山 敬一

「神経細胞における増殖制御機構の解明」

## 1. 研究実施の概要

日本人の3大死因は、癌・心虚血性疾患・脳血管障害であるが、これらは全て細胞増殖の問題として捉えることができる。癌は細胞増殖が無制限に起こることがその原因であり、一方、心虚血性疾患と脳血管障害では欠損した組織再生が起こらないことが治療の道を閉ざしている。本研究プロジェクトのテーマは、「なぜ神経細胞は分裂しないか」という点にあるが、これは裏を返せば、「なぜ細胞は分裂するのか」というメカニズムを知ることであり、その本質的なメカニズムを理解することが本研究の目的である。特に細胞周期におけるG0期（静止期）からの脱出機構は、神経細胞等の非分裂性細胞で喪失している能力であるが、その分子メカニズムに関しては全く不明であり、本研究におけるわれわれの最終目標はそのG0期からの脱出に関する分子メカニズムを明らかにすることである。

細胞周期は非常に多くの制御分子によって調節が行われている複雑な系であるが、大きく分ければ細胞周期を回転させるためのアクセル分子と停止させるためのブレーキ分子が存在する。われわれはまずブレーキ分子の代表格であるp27Kip1とp57Kip2の時空間軸における発現パターンを詳細に解析したところ、脳の発生過程において、神経細胞の増殖時期・部位においては両分子は全く発現していないが、増殖が止まって分化が始まるときに両分子が発現してくることを明らかにした。p27Kip1とp57Kip2のノックアウトマウスを作製し、個体における両ブレーキ分子の役割を明らかにすると共に、トランスジェニックマウスも作製して、ブレーキの過剰発現が増殖だけでなく、分化にも影響することを明らかにした。p27Kip1とp57Kip2の両者を欠損させたマウスは、残念ながら胎盤形成が障害されて胎仔の成長が止まってしまい、詳細な神経細胞における解析が不可能であったため、現在コンディショナルノックアウト法によって成体マウスにおいて両ブレーキを不活化する実験を進めている。

次にわれわれは、p27Kip1の発現の調節の問題に取り組んだ。上述したようにp27Kip1は増殖期の細胞には発現しておらず、非増殖期の細胞には高発現している。非増殖期にある細胞が再び増殖を開始する際には、p27Kip1は急速に分解される。このブレーキ分子の分解による解除機構は、細胞がG0期からG1期に入るための必要条件であり、その機構を明らかにすべく、まずp27Kip1の分解機構の生化学的解析を行った。p27Kip1はユビキチン・プロテアソーム系によって破壊させることが知られていたため、まずユビキチン化によって破壊される分子でユビキチン化の一般原理を追求することを目指した。そのときに用いた分子はWnt系のシグナル伝達分子である $\beta$ カテニンとNF- $\kappa$ B系のシグナル伝達分子であるI $\kappa$ B $\alpha$ である。これらをユビキチン化するメカニズムは、p27Kip1のユビキチン化するメカニズムと非常によく似ている。これら一連の研究からユビキチン化に必要な酵素であるユビキチンリガーゼ(E3)の性質が明らかとなってきた。これらはユビキチンリガーゼの中でもSCF複合体と呼ばれる分子複合体であり、それはSkp1、Cul1、Rbx1、F-boxタンパク質の4者から構成されていた。驚くべきことにF-boxタンパク質は多数存在し、種々の基質に対するアダプター的な役割を果たすことが明らかとなった。

われわれは p27Kip1 のユビキチン化に必要な F-box タンパク質である Skp2 の生理的作用を調べるために Skp2 ノックアウトマウスを作製して、その異常を検討したところ、Skp2 ノックアウトマウスでは p27Kip1 の分解異常とそれによる蓄積の他に、サイクリン E の蓄積、染色体や中心体の過剰複製等の異常が認められた。これらの異常が本当に p27Kip1 の分解障害によるものかどうかを調べるために、Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスを作製したところ、染色体や中心体の過剰複製は消失し、これらは p27Kip1 の分解が正常に行われなかったために起こったことが遺伝学的に証明された。

しかしながら、Skp2 ノックアウトマウスの解析は全く予想しなかった問題を提起した。Skp2 ノックアウトマウスにおいても G0 期から G1 期に移行する際には p27Kip1 はユビキチン化によって分解されてしまうのである。つまり、G0-G1 移行期には別のユビキチンリガーゼが作用して p27Kip1 を分解してしまうことが想定された。われわれはその未知のユビキチンリガーゼを、 $\beta$ カテニンや I $\kappa$ B $\alpha$  の解析を通じて培ってきた *in vitro* ユビキチン化技術を用いて、生化学的に精製することに成功し、その遺伝子を単離した。われわれはこの新規分子を KPC(Kip1-ubiquitylation Promoting Complex)と名付けた。KPC は KPC1 と KPC2 からなるヘテロ二量体であった。KPC の発現をコントロールすることによって p27Kip1 の分解は変化し、最終的に G0-G1 移行期の p27Kip1 の分解に関わっている責任分子は KPCであることを証明した。これによって、細胞周期におけるブレーキ分子 p27Kip1 の発現制御機構の全貌がほぼ解明された。

北川グループは、p27Kip1 の分解に従来から重要だと考えられてきたユビキチン依存性の機構の他にタンパク質の切断によるものがあるということを見出し、それを詳細に生化学的解析を行った。このタンパク質切断によって p27Kip1 は N 末端から 30 番目付近で切り離され、この分子はブレーキ分子としての活性を喪失することが明らかとなった。これは従来のユビキチン・プロテアソーム系の機構とは全く異なる機構で行われていることが明らかとなっており、現在この切断に関わる酵素を精製中である。

## 2. 研究構想

神経細胞は胎児期にのみ細胞分裂により増殖するが、生後は殆ど分裂せず傷害があっても再生することがない。そのため脳血管障害や脳腫瘍、神経変性疾患（パーキンソン病やアルツハイマー病等）で傷害された神経組織は生命の危機や重篤な後遺症につながり医学的に重大な問題となっている。成熟神経細胞が細胞分裂しない理由は今まで殆ど明らかでなかったが、申請者らは細胞周期を止める 2 つの類似した分子 p27、p57 が神経系に強く発現していることを見出し、その分子が神経細胞の増殖を停止させている可能性を示唆する結果を得た。本研究は脳に高発現している p27、p57 の発現制御機構を明らかにし、分子生物学的・生化学的なアプローチと発生工学的なアプローチから、神経細胞の細胞周期停止メカニズムを明らかにするとともに、その阻害剤や遺伝子治療法を開発することによって最終的に上記の疾患の治療への応用の道を探求することを目的としている。

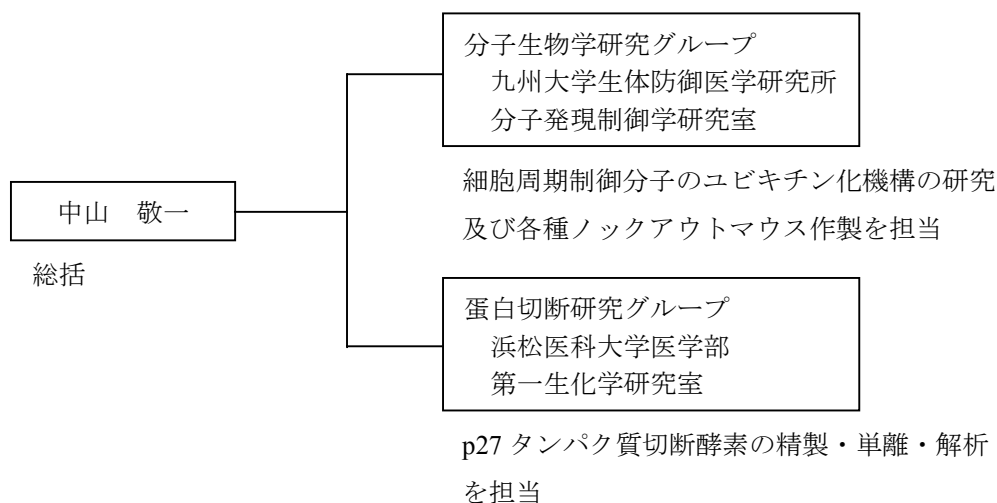
また細胞周期制御機構を研究している上で、必然的にタンパク質のユビキチン化依存性の分解機構についての基本的な理解が必要となり、細胞周期に関わらず多くの細胞生命現象に関わるユビキチン化のメカニズムを明らかにすることが重要と考えられた。モデルシステムとしてのユビキチン化メカニズムを考慮する上で、発生分化や発癌にとって重要なシグナル伝達系である Wnt シグナル伝達系の中心的分子  $\beta$  カテニンや NF- $\kappa$ B シグナル伝達系における I $\kappa$ B $\alpha$  の発現制御機構の研究を並行して行い、その知見を細胞周期制御分子のユビキチン化に関わる分子機構解明に役立てるよう研究を進めた。

細胞周期制御の研究が進むにつれて、ユビキチン化の分子機構に対する理解が深まったため、これらを利用してユビキチン化が関与する神経変性疾患の病因解明と治療法の確立を目指す研究も同時に行った。特にポリグルタミン病をモデルケースとして疾患発症に関わる因子を同定し、治療法への理論的基盤を構築することを目的として研究を行った。

サブグループ毎の役割分担は、ほとんど大部分の研究を分子生物学研究グループ（九州大学生体防御医学研究所・中山 敬一）が行い、p27 におけるユビキチン化非依存性タンパク質切断メカニズムの研究を、蛋白切断研究グループ（浜松医科大学医学部・北川 雅敏）が行った。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



### 4. 研究期間中の主な活動

#### (1) ワークショップ・シンポジウム等

該当なし

## 5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内0件、海外90件)

1. Tatsuno, I., Tanaka, T., Oeda, T., Yasuda, T., Kitagawa, M., Saito, Y., Hirai, A.: Geranylgeranylpyrophosphate, a metabolite of mevalonate, regulates the cell cycle progression and DNA synthesis in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 241: 376-382 (1997).
2. Terano, T., Shiina, T., Noguchi, Y., Tanaka, T., Tatsuno, I., Saito, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Hirai, A.: Geranylgeranylpyrophosphate plays a key role for the G1 to S transition in vascular smooth muscle cells. *Journal of Atherosclerosis & Thrombosis*, 5: 1-6 (1998).
3. Miyamoto, A., Kunisada, T., Hemmi, H., Yamane, T., Yasuda, H., Miyake, K., Yamazaki, H., Hayashi, S.I.: Establishment and characterization of an immortal macrophage-like cell line inducible to differentiate to osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 242: 703-709 (1998).
4. Matsumoto, M., Yamaguchi, T., Fukumaki, Y., Yasunaga, R., Terada, S.: High pressure induces G2 arrest in murine erythroleukemia cells. *J. Biochem.*, 123: 87-93 (1998).
5. Noguchi, Y., Nakamura, S., Yasuda, T., Kitagawa, M., Kohn, L.D., Saito, Y., Hirai, A.: Newly synthesized Rho A, not Ras, is isoprenylated and translocated to membranes coincident with progression of the G1 to S phase of growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J. Biol. Chem.*, 273: 3649-3653 (1998).
6. Hatakeyama, S., Hamasaki, A., Negishi, I., Loh, D.Y., Sendo, F., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1. *Int. Immunol.*, 10: 631-637 (1998).
7. Ikebe, C., Ohashi, K., Mizuno, K.: Identification of testis-specific (Limk2t) and brain-specific (Limk2c) isoforms of mouse LIM-kinase 2 gene transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 246: 307-312 (1998).
8. Okusaka, T., Okada, S., Ishii, H., Ikeda, M., Nakasuka, H., Nagahama, H., Iwata, R., Furukawa, H., Takayasu, K., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., Hirohashi, S., Yoshimori, M.: Transarterial chemotherapy with zinzostatin stimalamer for hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 55: 276-283 (1998).
9. Kawana, H., Tamaru, J., Tanaka, T., Hirai, A., Saito, Y., Kitagawa, M., Mikata, A., Harigaya, K., Kuriyama, T.: Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. *Am. J. Pathol.*, 153: 505-513 (1998).
10. Kunisada, T., Yoshida, H., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Hemmi, H., Nishimura, E., Shultz, L.D., Nishikawa, S., Hayashi, S.: Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. *Development*, 125: 2915-2923 (1998).
11. Kominami, K., Sethsmith, H., Toda, T.: Apc10 and Ste9/Srw1, two regulators of the Apc-Cyclosome, as well as the Cdk inhibitor Rum1 are required for G (1) cell-cycle arrest in fission yeast. *EMBO J.*, 17: 5388-5399 (1998).
12. Miyamoto, A., Kunisada, T., Yamazaki, H., Miyake, K., Nishikawa, S.I., Sudo, T., Shultz, L.D., Hayashi, S.I.: Establishment and characterization of Pro-B cell lines from Motheaten mutant mouse defective in Shp-1 protein tyrosine phosphatase. *Immunology Lett.*, 63: 75-82 (1998).
13. Tanaka, T., Tatsuno, I., Noguchi, Y., Uchida, D., Oeda, T., Narumiya, S., Yasuda, T., Higashi, H., Kitagawa, M., Nakayama, K.-I., Saito, Y., Hirai, A.: 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 (1998).
14. Nagata, M., Nakayama, K.-I., Terada, Y., Hoshi, S., Watanabe, T.: Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am. J. Pathol.*, 153: 1511-1520 (1998).
  15. Kominami, K., Ochotorena, I., Toda, T.: Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells*, 3: 721-735 (1998).
  16. Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S.: Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.*, 188: 1985-1992 (1998).
  17. Koujyo, T., Hatakeyama, S., Yamada, H., Iwabuchi, K., Kajino, K., Ogasawara, K., Onoe, K., Fujimoto, S.: Induction of endometriosis and adenomyosis by transvaginal pituitary transplantation in mice with and without natural killer cell activity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 40: 441-446 (1998).
  18. Terano, T., Tanaka, T., Tamura, Y., Kitagawa, M., Higashi, H., Saito, Y., Hirai, A.: Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2 cyclin E complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 254: 502-506 (1999).
  19. Nishimura, M., Tanaka, T., Yasuda, T., Kurakata, S., Kitagawa, M., Yamada, K., Saito, Y., Hirai, A.: Collagen secretion and growth of mesangial cells require geranylgeranylpyrophosphate. *Kidney Int.*, 55: 520-528 (1999).
  20. Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Higashi, H., Nakano, H., Okumura, K., Onoe, K., Good, R.A., Nakayama, K.-I.: 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 (1999).
  21. Nakamura, S., Tatuno, I., Noguchi, Y., Kitagawa, M., Kohn, L.D., Saito, Y., Hirai, A.: 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 (1999).
  22. Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I., Kitagawa, M.: Down-regulation of p27 (Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J. Biol. Chem.*, 274: 13886-13893 (1999).
  23. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K.-I., Nakayama, K.: An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.*, 18: 2401-2410 (1999).
  24. Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kogawa, K., Akashi, T., Kondo, S., Sakai, Y., Tsukiyama, T., Kitamura, D., Niho, Y., Watanabe, T.: 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 (1999).
  25. Kohzaki, H., Ito, K., Huang, G., Wee, H.J., Murakami, Y., Ito, Y.: Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO (MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. *Oncogene*, 18: 4055-4062 (1999).
  26. Nishimura, M., Tanaka, T., Yasuda, T., Kurakata, S., Kitagawa, M., Yamada, K., Saito, Y.,

- Hirai, A.: Effect of pravastatin on type IV collagen secretion and mesangial cell proliferation. *Kidney Int.*, 56: S97-S100 (1999).
27. Urase, K., Momoi, T., Fujita, E., Isahara, K., Uchiyama, Y., Tokunaga, A., Nakayama, K.-I., Motoyama, N.: Bcl-xL is a negative regulator of caspase-3 activation in immature neurons during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 116: 69-78 (1999).
  28. Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S.Y., Ong, A.M., Hatakeyama, S., Weissman, A.M.: RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11364-11369 (1999).
  29. Watanabe, Y., Watanabe, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Nakayama, K.-I., Motoyama, N.: 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 (1999).
  30. Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Common pathway for the ubiquitination of I kappa B alpha, I kappa B beta, and I kappa B epsilon mediated by the F-box protein FWD1. *J. Biol. Chem.*, 274: 28169-28174 (1999).
  31. Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.-I.: Molecular dissection of the interactions among I kappa B alpha, FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B alpha. *J. Biol. Chem.*, 274: 29641-29647 (1999).
  32. Kohzaki, H., Ito, Y., Murakami, Y.: Context-dependent modulation of replication activity of *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7428-7435 (1999).
  33. Miura, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K.-I.: Structure and expression of the gene encoding mouse F-Box protein, Fwd2. *Genomics*, 62: 50-58 (1999).
  34. Takahashi, K., Nakayama, K.-I., Nakayama, K.: Mice lacking a CDK inhibitor, p57(Kip2), exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.*, 127: 73-83 (2000).
  35. 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., Onoe, K.: 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 (2000).
  36. 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.: NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. *Nature*, 404: 778-782 (2000).
  37. Dobashi, Y., Shoji, M., Kitagawa, M., Noguchi, T., Kameya, T.: Simultaneous suppression of cdc2 and cdk2 activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 12572-12580 (2000).
  38. Tanaka, T., Tatsuno, I., Uchida, D., Moroo, I., Morio, H., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Saito, Y., Hirai, A.: Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J. Neurosci.*, 20: 2852-2859 (2000).
  39. 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.: Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.*, 19: 2069-2081 (2000).
40. Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A., Kitagawa, M.: Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.*, 275: 16235-16241 (2000).
  41. Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, N., Nakayama, K.-I.: Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev.*, 14: 1439-1447 (2000).
  42. Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett.*, 476: 306-311 (2000).
  43. Osaka, F., Saeki, M., Katayama, S., Aida, N., Toh, E.A., Kominami, K., Toda, T., Suzuki, T., Chiba, T., Tanaka, K., Kato, S.: Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *EMBO J.*, 19: 3475-3484 (2000).
  44. Yamanaka, A., Hatakeyama, S., Kominami, K.-i., Kitagawa, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.-I.: Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting Complex/Cyclosome. *Mol. Biol. Cell*, 11: 2821-2831 (2000).
  45. Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27 (Kip1), increases its protein stability. *J. Biol. Chem.*, 275: 25146-25154 (2000).
  46. 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.: Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity*, 13: 561-571 (2000).
  47. Hara, H., Kishihara, K., Matsuzaki, G., Takimoto, H., Tsukiyama, T., Tigelaar, R.E., Nomoto, K.: Development of dendritic epidermal T cells with a skewed diversity of gamma delta TCRs in V delta 1-deficient mice. *J. Immunol.*, 165: 3695-3705 (2000).
  48. Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Ueno, H., Minamishima, Y.A., Farber, J.L., Tanaka, M.: A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene*, 19: 5281-5290 (2000).
  49. Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T., Toda, T.: 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 (2000).
  50. Tsukiyama, T., Ishida, N., Shirane, M., Minamishima, Y.A., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Down-regulation of p27 (Kip1) expression is required for development and function of T cells. *J. Immunol.*, 166: 304-312 (2001).
  51. Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K., Nakayama, K.-I.: Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. *Anat. Embryol.*, 203: 77-87 (2001).
  52. Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K.-I., Yoshimura,



- A.: The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.*, 276: 12530-12538 (2001).
53. Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y.A., Nishio, S., Nagai, E., Tanaka, M.: Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 126: 13-19 (2001).
54. Kamura, T., Burian, D., Khalili, H., Schmidt, S.L., Sato, S., Liu, W.J., Conrad, M.N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Shilatifard, A.: Cloning and characterization of ELL-associated proteins EAP45 and EAP20 - A role for yeast EAP-like proteins in regulation of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.*, 276: 16528-16533 (2001).
55. Ageta, H., Kato, A., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I., Isojima, Y., Sugiyama, H.: Regulation of the level of Vesl-1S/Homer-1a proteins by ubiquitin-proteasome proteolytic systems. *J. Biol. Chem.*, 276: 15893-15897 (2001).
56. Morishita, H., Makishima, T., Kaneko, C., Lee, Y.S., Segil, N., Takahashi, K., Kuraoka, A., Nakagawa, T., Nabekura, J., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284: 142-149 (2001).
57. Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Nakayama, K.-I.: U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.*, 276: 33111-33120 (2001).
58. Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C., Conaway, J.W.: Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 276: 29748-29753 (2001).
59. Shono, M., Sato, N., Mizumoto, K., Minamishima, Y.A., Nakamura, M., Maehara, N., Urashima, T., Saimura, M., Qian, L., Nishio, S., Nagai, E., Tanaka, M.: Effect of serum depletion on centrosome overduplication and death of human pancreatic cancer cells after exposure to radiation. *Cancer Lett.*, 170: 81-89 (2001).
60. Malek, N.P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakidis, T.R., Roberts, J.M.: A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, 413: 323-327 (2001).
61. Ikeda, H., Yoshimoto, T., Shida, N., Miyoshi, I., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., Oshima, M., Taketo, M.M.: Morphologic and molecular analysis of estrogen-induced pituitary tumorigenesis in targeted disruption of transforming growth factor-beta receptor type II and/or p27 mice. *Endocrine*, 16: 55-65 (2001).
62. Kiernan, R.E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J.C., Lorca, T., Nakayama, K.-I., Benkirane, M.: Interaction between Cyclin T1 and SCF(SKP2) Targets CDK9 for Ubiquitination and Degradation by the Proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 7956-7970. (2001).
63. Maruyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ishida, N., Kawakami, K., Nakayama, K.-I.: Characterization of a Mouse Gene (Fbxw6) That Encodes a Homologue of *Caenorhabditis elegans* SEL-10. *Genomics*, 78: 214-222. (2001).
64. Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 48937-48943. (2001).
65. Doira, N., Kanematsu, T., Matsuda, M., Takeuchi, H., Nakano, H., Ito, Y., Nakayama, K.,

- Nakayama, K.-I., Hirata, M.: Hyperinsulinemia in PRIP-1 gene deleted mice. *Biomed. Res.*, 22: 157-165 (2001).
66. Xiang, Z., Ahmed, A.A., Moller, C., Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S., Nilsson, G.: Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation. *J. Exp. Med.*, 194: 1561-1569 (2001).
67. Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Branton, P.E.: Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.*, 15: 3104-3117. (2001).
68. Murillas, R., Simms, K.S., Hatakeyama, S., Weissman, A.M., Kuehn, M.R.: Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 277: 2897-2907 (2002).
69. Ikebe, C., Kominami, K.-I., Toda, T., Nakayama, K.-I.: Isolation and Characterization of a Novel F-Box Protein Pof10 in Fission Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 1399-1407 (2002).
70. Yamanaka, A., Yada, M., Imaki, H., Koga, M., Ohshima, Y., Nakayama, K.-I.: Multiple Skp1-Related Proteins in *Caenorhabditis elegans*. Diverse Patterns of Interaction with Cullins and F-Box Proteins. *Curr. Biol.*, 12: 267-275 (2002).
71. Minamishima, Y.A., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res.*, 62: 995-999 (2002).
72. Yoshida, K., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Matsuda, A., Yamamoto, K., Ito, M., Ohno, S., Nakayama, K.-I.: Involvement of p27(KIP1) degradation by Skp2 in the regulation of proliferation in response to wounding of corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 364-370 (2002).
73. Kanematsu, T., Jang, I.S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., Hirata, M., Nakayama, K.-I.: Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *EMBO J.*, 21: 1004-1011 (2002).
74. Shimoda, K., Tsutsui, H., Aoki, K., Kato, K., Matsuda, T., Numata, A., Takase, K., Yamamoto, T., Nukina, H., Hoshino, T., Asano, Y., Gondo, H., Okamura, T., Okamura, S., Nakayama, K.-I., Nakanishi, K., Niho, Y., Harada, M.: Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. *Blood*, 99: 2094-2099 (2002).
75. Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.*, 277: 14355-14358 (2002).
76. Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature*, 416: 865-869 (2002).
77. Chi, T.H., Wan, M., Zhao, K., Taniuchi, I., Chen, L., Littman, D.R., Crabtree, G.R.: Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature*, 418: 195-199 (2002).
78. Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.-I., Takahashi, R.:

- CHIP Is Associated with Parkin, a Gene Responsible for Familial Parkinson's Disease, and Enhances Its Ubiquitin Ligase Activity. *Mol. Cell*, 10: 55-67 (2002).
79. Masuda, T.A., Inoue, H., Sonoda, H., Mine, S., Yoshikawa, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Mori, M.: Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.*, 62: 3819-3825 (2002).
80. Kamura, T., Brower, C.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W.: A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of the VHL ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, 277: 30388-30393 (2002).
81. Brower, C.S., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Kamura, T., Pause, A., Stearman, R., Klausner, R.D., Malik, S., Lane, W.S., Sorokina, I., Roeder, R.G., Conaway, J.W., Conaway, R.C.: Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 10353-10358 (2002).
82. Nakamichi, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I.: Formation of Mallory Body-like Inclusions and Cell Death Induced by Deregulated Expression of Keratin 18. *Mol. Biol. Cell*, 13: 3441-3451 (2002).
83. Garcia-Fernandez, L.F., Losada, A., Alcaide, V., Alvarez, A.M., Cuadrado, A., Gonzalez, L., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., Fernandez-Sousa, J.M., Munoz, A., Sanchez-Puelles, J.M.: Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene*, 21: 7533-7544 (2002).
84. Shimoda, K., Kamesaki, K., Numata, A., Aoki, K., Matsuda, T., Oritani, K., Tamiya, S., Kato, K., Takase, K., Imamura, R., Yamamoto, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K.-I., Harada, M.: Tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN-alpha-induced suppression of B lymphocyte formation. *J. Immunol.*, 169: 4707-4711 (2002).
85. Kaneko, C., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K., Nakayama, K.-I.: Characterization of the mouse gene for the U-box-type ubiquitin ligase UFD2a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
86. Seto, Y., Nakajima, H., Suto, A., Shimoda, K., Saito, Y., Nakayama, K.-I., Iwamoto, I.: Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.*, in press.
87. Tomari, S., Nagahama, H., Shu, Y., Hoshi, S., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., Nagata, M.: Glomerular differentiation in p27 and p57 double-mutant metanephroi. *Anat. Embryol.*, in press.
88. Taniuchi, I., Sunshine, M.J., Festenstein, R., Littman, D.R.: Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation. *Mol. Cell*, in press.
89. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.-C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D.R.: Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*, in press.
90. Shirane, M., Nakayama, K.-I.: Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, in press.

(2) 特許出願（国内4件、海外0件）

① 国内

1. 中山敬一、中山啓子、北川雅敏、 畠山鎮次: I $\kappa$ B または  $\beta$  カテニンのユビキチン化を促進するユビキチンリガーゼ SCF 複合体の F-ボックスタンパク. 特願平 10-343437. 1998, 12/2.
2. 中山敬一、中山啓子、畠山鎮次: サイクリン E をユビキチン化分解するユビキチンリガーゼ SCF 複合体の F-ボックスタンパク. 特願 2000-036372. 2000, 2/15.
3. 中西真、中山敬一: NF- $\kappa$ B を活性化する酵素タンパク質. 特願 2000-110481. 2000, 4/12.
4. 山本健二、中山敬一: カテプシン関連遺伝子改変非ヒト哺乳動物. 特願 2002-153641. 2002, 5/28.
5. 中山敬一、嘉村巧: 新規ユビキチンリガーゼ特願 2002-156257. 2002, 5/29.

② 海外

該当なし

(3) 新聞報道等

① 新聞報道

- ・ 2002年4月25日付 日本経済新聞「リンパ球抑えるたんぱく質発見/九州大」
- ・ 2002年4月25日付 日本産業新聞「リンパ球制御するたんぱく質発見/九大/免疫異常改善に道」
- ・ 2002年4月25日付 日本工業新聞「信号伝達物質 PKC- $\delta$ /自己免疫疾患に関与/九大」
- ・ 2002年4月25日付 日刊工業新聞「信号伝達物質 PKC- $\delta$ /細胞増殖を抑制/九州大が特定/自己免疫疾患と関与」
- ・ 2002年4月26日付 西日本新聞「リウマチやアレルギー・・・自己免疫疾患の発症メカニズム解明/関与タンパク質を特定」
- ・ 2002年12月23日付 朝日新聞「「細胞死」機能スイッチ解明」/九州大チーム/がん治療に応用期待」
- ・ 2002年12月23日付 日本経済新聞「細胞死抑制するたんぱく質発見/九州大教授ら」
- ・ 2002年12月23日付 西日本新聞「細胞死抑制に関与タンパク質を発見/新抗がん剤開発に道/九大・中山教授らグループ/英国専門誌に発表」
- ・ 2002年12月23日付 時事通信「細胞死抑える分子発見＝新しい抗がん剤開発に期待-九州大教授ら」
- ・ 2002年12月24日付 日本工業新聞「九大、新型抗がん剤開発へ細胞自殺死の抑制法を解明」

(4) その他特記事項

特になし