

東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授

岸本 健雄

「細胞増殖の制御機構」

1. 研究実施の概要

細胞増殖の制御は、生物の存立の基礎であり、細胞外からの情報の細胞内でのシグナル伝達と細胞周期制御との連携に基づいている。本研究では、シグナル伝達機構と細胞周期制御機構の研究が、従来、それぞれにおいては目覚ましい進展をみせているにもかかわらず互いに独立してなされてきたことに着目し、両分野の研究を統一して細胞増殖制御の分子機構について一貫した理解を得ることをめざした。この目的を達成するために、シグナル伝達機構の方からその下流の細胞周期制御をめざすアプローチと、逆に細胞周期制御機構の方からその上流のシグナル伝達をめざすアプローチとの両方向から研究を進めた。解析の手掛りは、シグナル伝達に関しては重点を GTP 結合タンパク質（ヘテロ 3 量体 GTP 結合タンパク質と単量体低分子量 GTP 結合タンパク質）の機能に置く一方、細胞周期制御に関しては全真核細胞に共通した細胞周期進行の基幹因子であるサイクリン・CDK (cyclin-dependent kinase) 複合体群に置いた。実験系としてはヒトデ・カエル等の卵細胞と哺乳動物由来の培養体細胞とを併用し、シグナル伝達と細胞周期制御の接点を現実の生物現象との対応において追求した。

< 上代・伊東グループ：シグナル伝達→細胞周期 >

細胞内シグナル伝達において分子スイッチとして働く GTP 結合タンパク質は、 $\alpha\beta\gamma$ の 3 つのサブユニットよりなるヘテロ 3 量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) と Ras や Rho/Rec/Cdc42 などの低分子量 GTP 結合タンパク質に大別される。G タンパク質および低分子量 GTP 結合タンパク質を介するシグナル伝達により調節される細胞の増殖や分化、細胞骨格系や細胞の運動性についての分子、細胞レベルでの研究を行った。G タンパク質に関してはヒト胎児腎由来 293 細胞での遺伝子発現系を用いて、G タンパク質共役受容体を介するシグナルによってストレス応答性 MAP キナーゼに属する JNK と p38 が活性化されることを見い出した。さらに G タンパク質のどのサブユニットを介してそれぞれの MAP キナーゼが活性化されるか検討したところ、G タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) と G タンパク質 Gq の α サブユニット ($G\alpha_q/11$) が JNK と p38 を活性化するのに対して、 $G\alpha_i$ と $G\alpha_{12}$ は JNK のみを活性化することが明らかとなった。また、G タンパク質による JNK と p38 の活性化において Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質と、その上流にチロシンキナーゼが関与することが明らかとなった。一方、 $G\beta\gamma$ を介するシグナルによる c-fos プロモーターの活性化に Rho と JNK が関係することを示した。また、トロロニン受容体を介する筋芽細胞の分化抑制に $G\beta\gamma$ と $G\alpha_{12}$ を介するシグナル伝達系が働いていること、G タンパク質 Gq と共役する受容体 (α_1 アドレナリン受容体) を介するシグナルによる JNK と p38 の活性化が 293 細胞の増殖抑制に関与することを見い出した。さらに NIH3T3 細胞においてリゾフォスファチジン酸 LPA による細胞の伸展が、 $G\alpha_i$ と $G\beta\gamma$ とその下流の Rac と Cdc42 を介するシグナル伝達経路により調節されていることを明らかにした。

一方、Ras ファミリーおよび Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の生理機能と活

性調節機構について研究を行なった。Ras の標的タンパク質であるセリン・トレオニンキナーゼ Raf-1 について、その活性化因子の精製を行ない、Ras の二量体化の重要性を明らかにした。また、Ras が T 細胞活性化や血球系細胞の生存に重要であることを示し、その下流のシグナル伝達系を解析した。他の Ras ファミリータンパク質については、R-Ras が血球系細胞の生存、筋芽細胞の分化に関与することや、Ral が癌細胞の足場依存性増殖を制御していることを示した。さらに、ファルネシル化阻害剤の Ras による細胞癌化の抑制効果を検討した。Rho ファミリーに関しては、Rac が血球系細胞の細胞死を阻止することを見だし、その下流のシグナル伝達系を Ras の場合と比較して解析した。また、Ras のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として同定されていた Ras-GRF1 が、G タンパク質共役受容体刺激、チロシンキナーゼ Src によるリン酸化依存的に Rac に対する GEF 活性を示すことを明らかにした。さらに、Ras-GRF1 が Cdc42 の標的タンパク質であるチロシンキナーゼ ACK1 によってもリン酸化され、Ras GEF 活性が亢進することを見いだした。一方、Rho ファミリーに対する GEF である Dbl が、ACK1 によってリン酸化、活性化されることを明らかにした。

< 岸本・久永グループ：細胞周期→シグナル伝達 >

ホルモンによる卵減数分裂→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、それぞれに対応したシグナルがあり、それらに基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。これらのシグナルがどのようにして細胞周期制御に帰着するのかを、サイクリン・CDK 等の細胞周期制御因子群の方からその上流をめざす方向で解析を進めた。

その結果、減数第一分裂の再開すなわち G2/M 期移行に関しては、卵成熟誘起ホルモンによる細胞外刺激に共役したヘテロ 3 量体 GTP 結合タンパク質から、PI3 キナーゼ-Akt/PKB 経路を介して、M 期開始因子であるサイクリン B・Cdc2 キナーゼの活性化に至るシグナル伝達の全経路を同定することができた。これは、細胞外シグナルから M 期開始をもたらす細胞周期制御系までに至る全情報伝達経路を、単に卵細胞系にとどまらず、あらゆる生物システムを通じてはじめて同定したものである。従来、Akt/PKB は細胞死を回避するための情報伝達因子であるとみなされていたが、本研究は、その下流に新規な経路が存在し、細胞周期制御系に直結していることをはじめて示したものである。

他方、卵細胞における MAP キナーゼ系の解析から、その上流の MAPKKK として、無脊椎動物で初めて Mos を同定した。それに基づき、Mos-MAP キナーゼ経路を介したシグナル伝達が、減数第二分裂の成立とともにその後の細胞周期停止 (減数第二分裂中期、あるいは減数分裂完了後の G1 期での停止；従って単為発生の抑制) に必須であることを明らかにした。従来、Mos は、脊椎動物卵にのみ存在して、減数第二分裂中期での細胞周期停止にかかわると考えられていた。それに対し、本研究の成果は、単にそれに限ることなく、すべての後生動物を通じて、減数分裂周期から体細胞分裂周期への転換を負に制御するためのシグナル伝達系が Mos-MAP キナーゼ経路である、という新しい概念を提唱するものである。

これらの成果は、シグナル伝達系と細胞周期制御系との直接的連携を初めて明らかにしたものである。しかもそれらは、解析の対象とされた生物種に限ることなく、動物の未成熟卵における卵成熟の開始（減数第一分裂の再開）の機構、減数分裂の本質であるゲノム半減の機構、受精のタイミングの位置づけ、および受精によるS期あるいは発生の開始の機構という、いずれも生物学上の積年の課題について、分子レベルでの普遍的な解答をもたらす大きな手掛りとなるものである。特に、卵細胞型細胞周期制御の特異性に関わるシグナル伝達の分子機構については、ほぼ全容の概要を明らかにすることができたといえる。

M期開始の最初期段階については、サイクリンB・Cdc2キナーゼの不活性化因子と活性化因子のバランスの逆転が鍵であり、それをもたらすシグナル、あるいはtrigger kinaseの実体解明が、近年の最大懸案であった。従来、その有力候補としてPlk(polo-like kinase)が考えられていたが、本研究の結果、減数第一分裂のG2/M期移行に限ってはPlkはtrigger kinaseとはならず、Akt/PKBがその機能を担うことが明らかになった。さらに、チェックポイント・キナーゼChk1とCds1/Chk2の解析から、これらのキナーゼは、いわゆるDNA損傷・未複製チェックポイントが活性化されていない、通常のG2/M期移行に際しても、M期開始を負に制御している可能性が判明した。これらの知見は、M期開始制御の情報ネットワークについて、新たな視点からの解析を求めるものである。

さらに、終末分化し増殖を停止した神経細胞におけるCDKの役割を明らかにするため、脳Cdc2関連キナーゼCdk5の活性制御機構を検討した。Cdk5のキナーゼ活性は、活性化サブユニットp35の量によって規定されていた。p35の合成は脳由来神経栄養因子(BDNF)により促進された。一方、p35の分解は速く、p35の量の主要な決定因子であった。p35の分解はプロテアソームによって行われており、その分解シグナルはp35のCdk5による自己リン酸化であった。神経細胞ではグルタミン酸刺激により自己リン酸化が促進し、p35の分解およびCdk5の不活性化が誘導されていた。一方、神経細胞死の際にはp35はカルパインによってp25へと限定分解される。この限定分解の正常細胞内での防御機構としても自己リン酸化が機能していた。この分解に抑制的に働いている自己リン酸化は加齢とともに減少しており、老化に伴う神経細胞死の促進との関連が示唆された。

2 . 主な研究成果

(1) 論文発表

<1996 年>

Okumura, E., Sekiai, T., Hisanaga, S., Tachibana, K., and Kishimoto, T. Initial triggering of M-phase in starfish oocytes: A possible novel component of MPF besides cdc2 kinase. *J. Cell Biol.* 132, 125-135 (1996).

Honma, N., Uchida, A., Hirose, H., Srsen, V., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Two types of apoptotic cell death of rat central nervous system-derived neuroblastoma B50 and B104 cells: apoptosis induced during proliferation and after differentiation. *J. Neurochem.* 67, 1856-1865 (1996).

Uchida, K., Muramatsu, T., Tachibana, K., Kishimoto, T., and Furuya, M. Isolation and characterization of the cDNA for an A-like cyclin in *Adiantum capillus-veneris* L. *Plant Cell Physiol.* 37, 825-832 (1996).

Kishimoto, T. Starfish maturation-promoting factor. *Trends Biochem. Sci.* 21, 35-37 (1996).

Kozasa, T., Kaziro, Y., Ohtsuka, T., Grigg, J. J., Nakajima, S., and Nakajima, Y. G protein specificity of the muscarine-induced increase in an inward rectifier potassium current in AtT-20 cells. *Neurosci. Res.* 26, 289-297 (1996).

Miyake, M., Mizutani, S., Koide, H., and Kaziro, Y. Unfarnesylated transforming Ras mutant inhibits the Ras-signaling pathway by forming a stable Ras.Raf complex in the cytosol. *FEBS Lett.* 378, 15-18 (1996).

Ohtsuka, T., Kaziro, Y., and Satoh, T. Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 1310, 223-232 (1996).

Satoh, T., Kato, J., Nishida, K., and Kaziro, Y. Tyrosine phosphorylation of ACK in response to temperature shift-down, hyperosmotic shock, and epidermal growth factor stimulation. *FEBS Lett.* 386, 230-234 (1996).

<1997 年>

Tachibana, K., Machida, T., Nomura, Y., and Kishimoto, T. MAP kinase links the fertilization signal transduction pathway to the G1/S-phase transition in starfish eggs. *EMBO J.* 16, 4333-4339 (1997).

Ando, S., Ikuhara, T., Kamata, T., Sasaki, Y., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Ito, H., and Inagaki, M. Role of the pyrrolidine ring of proline in determining the substrate specificity of cdc2 kinase or cdk5. *J. Biochem.* 122, 409-414 (1997).

Honma, N., Hosono, Y., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Phosphorylation of retinoblastoma protein at apoptotic cell death in rat neuroblastoma B50 cells. *Neurosci. Lett.* 235, 45-48 (1997).

Itoh, T. J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T., and Hotani, H. Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* 36, 12574-12582 (1997).

Ookata, K., Hisanaga, S., Sugita, M., Okuyama, A., Murofushi, H., Kitazawa, H., Chari, S., Bulinski, J. C., and Kishimoto, T. MAP4 is the in vivo substrate for cdc2 kinase in HeLa cells--- Identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4---. *Biochemistry* 36, 15873-15883 (1997).

Kishimoto, T., and Okumura, E. *In vivo* Regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. in *Progress in Cell Cycle Res.* (Meijer, L., Guidet, S., and Philippe, M. eds.), vol. 3, pp.241-249, Plenum Press, New York (1997).

Edamatsu, H., Kaziro, Y., and Itoh, H. Inducible high-level expression vector for mammalian cells, pEF-LAC carrying human elongation factor 1 α promoter and lac operator. *Gene* 187, 289-294 (1997).

Hirasawa, A., Sugawara, T., Awaji, T., Tsumaya, K., Itoh, H., and Tsujimoto, G. Subtype-specific differences in subcellular localization of α 1-adrenoceptors: chlorethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface α 1-adrenoceptors irrespective of the subtype. *Mol. Pharmacol.* 52, 764-770 (1997).

Nishiya, T., Uehara, T., Edamatsu, H., Kaziro, Y., Itoh, H., and Nomura, Y. Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon- γ -induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *FEBS Lett.* 408, 33-38 (1997).

Suzuki, J., Kaziro, Y., and Koide, H. An activated mutant of R-Ras inhibits cell death caused by cytokine deprivation in BaF3 cells in the presence of IGF-I. *Oncogene* 15, 1689-1697 (1997).

Terada, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. Ras-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in response to interleukin-3 stimulation in hematopoietic BaF3 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 4544-4548 (1997).

Tomura, H., Itoh, H., Sho, K., Sato, K., Nagao, M., Ui, M., Kondo, Y., and Okajima, F. $\beta\gamma$ subunits of pertussis toxin-sensitive G proteins mediate A1 adenosine receptor agonist-induced activation of phospholipase C in collaboration with thyrotropin. A novel stimulatory mechanism through the cross-talk of two types of receptors. *J. Biol. Chem.* 272, 23130-23137 (1997).

Umemori, H., Inoue, T., Kume, S., Sekiyama, N., Nagao, M., Itoh, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K., and Yamamoto, T. Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the α subunit. *Science* 276, 1878-1881 (1997).

Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. C-terminal mutation of G protein β subunit affects differentially extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 7602-7607 (1997).

Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of G $\beta\gamma$ and G $\alpha_q/11$ subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 27771-27777 (1997).

<1998 年>

Okano-Uchida, T., Sekiai, T., Lee, K., Okumura, E., Tachibana, K., and Kishimoto, T. *In vivo* Regulation of cyclin A/Cdc2 and cyclin B/Cdc2 through meiotic and early cleavage cycles in starfish. *Dev. Biol.* 197, 39-53 (1998).

Shimada, A., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. An indirect role for cyclin B-Cdc2 in inducing chromosome condensation in *Xenopus* egg extracts. *Biol. Cell.* 90, 519-530 (1998).

Wada, Y., Ishiguro, K., Itoh, T.J., Uchida, T., Hotani, H., Saito, T., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Microtubule-stimulated phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 by cdk5 decreases its microtubule nucleation activity. *J. Biochem.* 124, 738-746 (1998).

Saito, T., Ishiguro, K., Onuki, R., Nagai, Y., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Okadaic acid-stimulated degradation of p35, an activator of CDK5, by proteasome in cultured neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 775-778 (1998).

Kishimoto, T. Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. *Seminars Cell Dev. Biol.* 9, 549-557 (1998).

Deng, J., Kawakami, Y., Hartman, S. E., Satoh, T., and Kawakami, T. Involvement of Ras in Bruton's tyrosine kinase-mediated JNK activation. *J. Biol. Chem.* 273, 16787-16791 (1998).

Edamatsu, H., Kaziro, Y., and Itoh, H. Expression of an oncogenic mutant G α_i2 activates Ras in Rat-1 fibroblast cells. *FEBS Lett.* 440, 231-234 (1998).

Mitamura, S., Ikawa, H., Mizuno, N., Kaziro, Y., and Itoh, H. Cytosolic nuclease activated by caspase-3 and inhibited by DFF-45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 480-484 (1998).

Mizutani, S., Koide, H., and Kaziro, Y. Isolation of a new protein factor required for activation of Raf-1 by Ha-Ras: partial purification from rat brain cytosols. *Oncogene* 16, 2781-2786 (1998).

Nagao, M., Yamauchi, J., Kaziro, Y., and Itoh, H. Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine kinase in G $\alpha_q/11$ -induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 22892-22898 (1998).

Suzuki, J., Kaziro, Y., and Koide, H. Synergistic action of R-Ras and IGF-1 on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-1 control distinct anti-apoptotic kinase pathways. *FEBS Lett.* 437, 112-116 (1998).

Tago, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. Functional involvement of mSos in interleukin-3 and thrombin stimulation of the Ras, mitogen-activated protein kinase pathway in BaF3 murine hematopoietic cells. *J. Biochem.* 123, 659-667 (1998).

Tanaka, T., Kohno, T., Kinoshita, S., Mukai, H., Itoh, H., Ohya, M., Miyazawa, T., Higashijima, T., and Wakamatsu, K. α helix content of G protein α subunit is decreased upon activation by receptor mimetics. *J. Biol. Chem.* 273,

3247-3252 (1998).

<1999 年>

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

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

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

Kishimoto, T. Oocyte maturation and spawning in starfish. in *Encyclopedia of Reproduction* (Knobil, E. and Neill, J. D. eds.), vol.3, pp.481-488, Academic Press, San Diego (1999).

Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., and Shimizu, T. Critical duration of intracellular Ca^{2+} response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 274, 5163-5169 (1999).

Kawano, T., Chen, L., Watanabe, S. Y., Yamauchi, J., Kaziro, Y., Nakajima, Y., Nakajima, S., and Itoh, H. Importance of the G protein γ subunit in activating G protein-coupled inward rectifier K^{+} channels. *FEBS Lett.* 463, 355-359 (1999).

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

Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. The Src family tyrosine kinase is involved in Rho-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase by $G\alpha_{12}$. *Oncogene* 18, 4425-4434 (1999).

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

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

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

Ueda, H., Yamauchi, J., Itoh, H., Morishita, R., Kaziro, Y., Kato, K., and Asano, T. Phosphorylation of F-actin-associating G protein γ_{12} subunit enhances fibroblast motility. *J. Biol. Chem.* 274, 12124-12128 (1999).

Watanabe, S. Y., Albsoul-Younes, A. M., Kawano, T., Itoh, H., Kaziro, Y., Nakajima, S., and Nakajima, Y. Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology. *Neurosci. Res.* 33, 71-78 (1999).

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

<2000 年>

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. 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 (2000).

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

Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275, 17166-17172 (2000).

Kawahara, H., Kasahara, M., Nishiyama, A., Ohsumi, K., Goto, T., Kishimoto, T., Saeki, Y., Yokosawa, H., Shimbara, N., Murata, S., Chiba, T., Suzuki, K., and Tanaka, T. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J.* 19, 4144-4153 (2000).

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., and Kishimoto, T. Residual Cdc2 activity remaining at

meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *EMBO J.* 19, 4513-4523 (2000).

Nishiyama, A., Tachibana, K., Igarashi, Y., Yasuda, H., Tanahashi, N., Tanaka, K., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. A non-proteolytic function of the proteasome is required for the dissociation of Cdc2 and cyclin B at the end of M-phase. *Genes Dev.* 14, 2344-2357 (2000).

Tachibana, K., Tanaka, D., Isobe, T., and Kishimoto, T. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 14301-14306 (2000).

Kishimoto, T. Meiotic cell-cycle control. Human Frontier Science Program Workshop IX "Cell Division and the Replicon" (Fangman, W.L., Kishimoto, T., Kohiyama, M., and Coath, C. eds), pp.140-145. Human Frontier Science Program, Strasbourg (2000).

Edamatsu, H., Kaziro, Y., and Itoh, H. LUCA15, a putative tumour suppressor gene encoding an RNA-binding nuclear protein, is down-regulated in ras-transformed Rat-1 cells. *Genes Cells* 5, 849-858 (2000).

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

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

Kawano, Y., Okamoto, I., Murakami, D., Itoh, H., Yoshida, M., Ueda, S., and Saya, H. Ras oncoprotein induces CD44 cleavage through phosphoinositide 3-OH kinase and the Rho family of small G proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 29628-29635 (2000).

Kawashima, T., Hirose, K., Satoh, T., Kaneko, A., Ikeda, Y., Kaziro, Y., Nosaka, T., and Kitamura, T. MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood* 96, 2116-2124 (2000).

Kiyono, M., Kato, J., Kataoka, T., Kaziro, Y., and Satoh, T. Stimulation of Ras guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25Mm upon tyrosine phosphorylation by the Cdc42-regulated kinase ACK1. *J. Biol. Chem.* 275, 29788-29793 (2000).

Kiyono, M., Kaziro, Y., and Satoh, T. 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 (2000).

Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. Thrombin-induced inhibition of myoblast differentiation is mediated by G $\beta\gamma$. *FEBS Lett.* 472, 297-301 (2000).

Nakano, K., Yamauchi, J., Nakagawa, K., Itoh, H., and Kitamura, N. NESK, a member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and is expressed during the late stages of embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 20533-20539 (2000).

Suzuki, J., Kaziro, Y., and Koide, H. Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* 19, 1138-1146 (2000).

Suzuki, J., Yamazaki, Y., Guang, L., Kaziro, Y., and Koide, H. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4658-4665 (2000).

Terada, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. 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 (2000).

Ueda, H., Itoh, H., Yamauchi, J., Morishita, R., Kaziro, Y., Kato, K., and Asano, T. G protein $\beta\gamma$ subunits induce stress fiber formation and focal adhesion assembly in a Rho-dependent manner in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275, 2098-2102 (2000).

Yamaguchi, T., Nagahama, M., Itoh, H., Hatsuzawa, K., Tani, K., and Tagaya, M. Regulation of the Golgi structure by the α -subunits of heterotrimeric G proteins. *FEBS Lett.* 470, 25-28 (2000).

Yamauchi, J., Kawano, T., Nagao, M., Kaziro, Y., and Itoh, H. Gi-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7633-7640 (2000).

<2001 年>

Misaki, K., Mukai, H., Yoshinaga, C., Oishi, K., Isagawa, T., Takahashi, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T., and Ono, Y. PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: Possible involvement of PKN in the regulation of cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 125-129 (2001).

Taniguchi, S., Fujita, Y., Takahashi, H., Hayashi, S., Kakita, A., Murayama, S., Saido, T., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* 489, 46-50 (2001).

Uchida, A., Tashiro, T., Komiya, Y., Yorifuji, H., Kishimoto, T., Nabeshima, Y., and Hisanaga, S. Neurofilaments of *Klotho*, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J. Neurosci. Res.* 64, 364-370 (2001).

Gotoh, T., Ohsumi, K., Matsui, T., Takisawa, H., and Kishimoto, T. Inactivation of the checkpoint kinase Cds1 is dependent on cyclin B-Cdc2 kinase activation at the meiotic G2/M-phase transition in *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* 114, 3397-3406 (2001).

Chang, W., Gruber, D., Chari, S., Kitazawa, H., Hamazumi, Y., Hisanaga, S., and Bulinski, J. C. Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 114, 2879-2887 (2001).

Bibb, J. A., Nishi, A., O'Callaghan, J. P., Ule, J., Lan, M., Snyder, G. L., Horiuchi, A., Saito, T., Hisanaga, S., Czernik, A. J., Nairn, A. C., and Greengard, P. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5. *J. Biol. Chem.* 276, 14490-14497 (2001).

Ueda, H., Morishita, R., Yamauchi, J., Itoh, H., Kato, K., and Asano, T. Regulation of Rac and Cdc42 pathways by Gi during lysophosphatidic acid-induced cell spreading. *J. Biol. Chem.* 276, 6846-6852 (2001).

Yamauchi, J., Itoh, H., Shinoura, H., Miyamoto, Y., Hirasawa, A., Kaziro, Y., and Tsujimoto, G. Involvement of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in $\alpha 1B$ -adrenergic receptor/Gaq-induced inhibition of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1019-1023 (2001).

Yamazaki, Y., Kaziro, Y., and Koide, H. Ral promotes anchorage-independent growth of a human fibrosarcoma, HT1080. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 868-873 (2001).

Kato-Stankiewicz, J., Ueda, S., Kataoka, T., Kaziro, Y., and Satoh, T. Epidermal growth factor stimulation of the ACK1/Dbl pathway in a Cdc42 and Grb2-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 470-477 (2001).

Ohtsuki, T., Watanabe, Y., Takemoto, C., Kawai, G., Ueda, T., Kita, K., Kojima, S., Kaziro, Y., Nyborg, J., and Watanabe, K. An "elongated" translation elongation factor Tu for truncated tRNAs in nematode mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 21571-21577 (2001).

Yamauchi, J., Tsujimoto, G., Kaziro, Y., and Itoh, H. Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and 6 (MKK6) in Gq-signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 23362-23372 (2001).

Yamauchi, J., Itoh, H., Shinoura, H., Miyamoto, Y., Tsumaya, K., Hirasawa, A., Kaziro, Y., and Tsujimoto, G. Gaq-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase 4/c-Jun N-terminal kinase cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 1087-1094 (2001).

Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., and Kaziro, Y. Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett.* 507, 295-298 (2001).

< 2002 年 >

Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nature Cell Biol.* 4, No.2, in press (2002).

Alim, M.A., Hossain, M. S., Arima, K., Takeda, K., Izumiyama, Y., Nakamura, M., Kaji, H., Shinoda, T., Hisanaga, S., and Ueda, K. Tubulin seeds α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* in press (2002).

Edamatsu, H., Kaziro, Y., and Itoh, H. Differential display of mRNAs regulated by G-protein signaling. *Methods Enzymol.* 345, 521-529 (2002).

(2) 口頭発表

国際会議での講演発表

< 1996 年 >

Kishimoto, T., and Tachibana, K. Regulation of G1/S-phase transition at fertilization in mature starfish eggs. 7th

French-Czech-Slovak Conference on "Physiology of Reproduction" (Liblice, Czech, 1996, 5).

Kishimoto, T. Start and finish in oocyte maturation. 2nd BIO-TIT International Symposium on "Regulation of Cell Cycle and Expression of Cellular Functions" (K. Nagai and T. Kishimoto) (Yokohama, 1996, 9).

Kishimoto, T. Starfish oocyte maturation and fertilization. 12th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology "-Biology of Reproduction-" (M. Hoshi, K. Hoshi, T. Kishimoto, M. Morisawa, M. Takahashi, Y. Nagahama and T. Yahara) (Hayama, 1996, 11).

Kaziro, Y. Korean Biochemical Society (Plenary lecture, Seoul, Korea, 1996, 5).

Kaziro, Y. GTP-binding proteins involved in signal transduction. International Symposium on Proteins and Enzymes at Institute for Basic Sciences, Chungbuk National University (Chungbuk, Korea, 1996, 5).

< 1997 年 >

Kishimoto, T., Ohsumi, K., and Tachibana, K. Repression of S-phase during meiotic cycles in *Xenopus* and starfish oocytes. EMBO Workshop on "Meiotic Maturation: Signal Transduction Pathways and Checkpoint Controls" (Cuenca, Spain, 1997, 9).

Kishimoto, T. Downregulation of MAP kinase links egg activation to the entry into S-phase in starfish. Developmental Biology of the Sea Urchin XI (Woods Hole, U.S.A., 1997, 9).

Kishimoto, T. Initial activation of cdc2 kinase at the entry into M-phase. Jacques Monod Conference on "The Cell Cycle" (Roscoff, France, 1997, 10).

Kishimoto, T. End of meiotic cell cycle: initiation of the first cleavage cycle. International Symposium on "Germ Cell Development and Meiotic Regulation" (M. Yamamoto, Y. Nagahama, S. Abe, T. Kishimoto and N. Sagata) (Hakone, 1997, 11).

Kishimoto, T. Maturation of starfish oocyte maturation. 13th International Congress of Comparative Endocrinology, Symposia "Historical Development of Comparative Endocrinology in Japan" (Yokohama, 1997, 11).

Kaziro, Y. Function of GTP-binding proteins in the cellular signaling system. The Third Hamamatsu International Symposium on Biophotonics: Molecular Communication in Cellular Physiology (Hamamatsu, Japan, 1997, 2).

Kaziro, Y. Symposium of FAOBMB (Manila, Philippine, 1997, 12).

< 1998 年 >

Hisanaga, S. Dephosphorylation and phosphorylation of neuronal intermediate filament, neurofilaments. 3rd International Conference on Cellular Regulation by Protein Phosphatases. Hiroshima University School of Medicine (Hiroshima, 1998, 11).

Kaziro, Y. Intracellular signal transduction and function of GTP-binding proteins. Carmen and Severo Ochoa Memorial Lecture 1998 (Madrid, Spain, 1998, 11).

< 1999 年 >

Kishimoto, T. Meiotic cell cycle control. Human Frontier Science Program 10th Anniversary Workshop "Replicon Theory and Cell Division" (W. Fangman, T. Kishimoto and M. Kohiyama) (Strasbourg, France, 1999, 5).

Kishimoto, T. Meiotic and early embryonic cell cycle control in starfish. UNESCO-ICRO International Training Course on Molecular Aspect of Fertilization and Early Development (Asamushi, 1999, 10) .

Hisanaga, S., and Kishimoto, T. Molecular Mechanism of mitotic microtubule-destabilization by phosphorylation of MAP4 with cdc2 kinase. The 42nd NIBB conference. "Tubulin 30 Years Later", National Institute for Basic Biology (Okazaki, 1999, 2).

Kaziro, Y. A family of GTP-binding proteins: Their function in cellular signaling systems. 99th General Meeting of the American Society for Microbiology (Chicago, USA, 1999, 6).

Kaziro, Y. Riken Symposium (Tokyo, Japan, 1999, 10).

Kaziro, Y. A family of GTP-binding proteins: Their function in cellular signaling systems. 3rd Workshop on "Molecular Biology and Biotechnology" of the Association of East Asian Research Universities (AEARU) (Plenary lecture, Tokyo, Japan, 1999, 11)

< 2000 年 >

Kishimoto, T. Meiotic cell cycle control by starfish Mos. Jacques Monod Conference on "The Cell Division Cycle" (Roscoff, France, 2000, 4)

Kishimoto, T. Meiotic and early embryonic cell cycle control in starfish---Greetings from the sea---. Window to the zygote 2000: An advanced course (UNESCO-ICRO) of cell and molecular biology of gametes, fertilization and early embryonic development (Prague, Czech Republic, 2000, 8).

Kishimoto, T. Meiotic cell cycle control in oocytes. International symposium of reproductive biology (incorporating the 9th French-Czech-Slovak Colloquium of reproductive biology9 (Stara Lesna, Slovakia, 2000, 9).

Kishimoto, T. Signalling pathway leading to the activation of cyclin B/Cdc2 kinase at at meiotic G2/M-phase transition. 4th UK-Japan cell cycle workshop(Cambridge, UK, 2000, 9).

Kishimoto, T. A key linking 1-methyladenine signalling to regulatory components of cyclin B-Cdc2. HFSP group meeting (Woods Hole, USA, 2000,10).

Kishimoto, T., Nishiyama, A., and Tachibana, K. A nonproteolytic function of the proteasome is responsible for the dissociation of the cyclin B-Cdc2 complex at the end of M-phase. International Meeting on "Cellular functions of AAA proteins in search of common molecular basis" (Kyoto, 2001, 3).

国際会議でのポスター発表 19 件

国内の学会発表

口頭発表とポスター発表の総計 190 件

(3) 受賞等

受賞

上代淑人 1999 年度 日本学士院賞
2000 年 米国科学アカデミー外国人会員

新聞報道

久永真市：いずれもアルツハイマー病脳で蓄積をしていることが見つかった p25 について、p25 へ分解する酵素がカルパインであることを見つけたことに関する報道。

平成 12 年 6 月 1 日 毎日新聞、東京新聞、産経新聞、日経新聞、
日本工業新聞、日経産業新聞、化学工業日報

平成 12 年 6 月 5 日 日刊工業新聞

平成 12 年 6 月 7 日 教育学术