

細胞学部門

Department of Molecular and Cellular Biology

細胞学部門では、細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを、主に発生工学的手法を用いて研究を進めている。つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を破壊したマウス（ノックアウトマウス）を人工的に作製し、その異常を調べることによって、その分子の持つ生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである。特に免疫系と神経系の細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御についての解析に焦点を当てて取り組んでいる。

細胞学部門では1月1日付けで教授・勝木元也が東京大医科学研究所・教授に、4月1日付けで助手・饗場 篤が同大学研究所・助教授に専任配置換えになり、それに伴って事務官木村美保子を除く全構成員が3月31日までに当部門から外部へ移籍した。10月1日より新教授中山敬一が着任し、現在研究室のセットアップを行っている。

A. 発生工学を利用した細胞周期・アポトーシス制御因子の研究

a. p27Kip1遺伝子欠損マウスの作製と解析

細胞の増殖は分化と成熟に従って厳密にコントロールされており、組織がある一定の大きさに達すると細胞増殖が停止してそれ以上大きくなることはない。このコントロールの破綻は癌の発生につながるものと信じられているが、このコントロールの分子機構に関しては未だ不明な点が多い。最近、細胞周期を負に制御する分子としてサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害分子（CDK inhibitors: CKI）が発見された。現在までに哺乳類では7種類のCKIが発見されているが、その中の一つであるp27は接触阻害や血清飢餓、あるいは増殖抑制を起こすようなサイトカイン（TGF- β など）投与時にその発現が高まることがわかっている。p27は生化学的にサイクリンD/CDK4に結合してその活性を阻害することによって、その基質であるRbのリン酸化を阻害することが示唆されている。p27蛋白は神経系、リンパ系、生殖器系に特に強く発現している。

私達はp27の生体における役割を検討するために、p27遺伝子を破壊したマウス（p27ノックアウトマウス）を作成し、その異常を検討した。すると驚くべきことに体のサイズが正常よりも30~50%以上も大きい巨大マウスになり、正常マウスでp27を強く発現している組織ほど、ノックアウトマウスでは過形成の度合いが大きいことが明らかとなった。特に胸腺や脾臓などの免疫系、網膜や副腎髄質などの神経系、精巣や卵巣などの生殖器系などが200~500%の過形成を示した。胸腺は正常の3~5倍の胸腺細胞を含み、そのCDK2活性は正常の約10倍に上昇していた。しかしT細胞の分化及び胸腺の構造には特に異常はなく、また胸腺細胞のアポトーシ

スも正常であった。このことより、p27は胸腺細胞の増殖を負にコントロールしていることが明らかとなった。

TGF- β やRapamycinはp27を介してその増殖抑制作用を発揮すると考えられている。そこでp27を欠損した末梢T細胞における増殖能及びTGF- β やRapamycinによる増殖抑制を調べた。予想に反してp27の有無はT細胞の増殖速度に影響を与えないことがわかった。またTGF- β やRapamycinはp27を持たないT細胞の増殖も抑制した。このことからp27はTGF- β やRapamycinの作用に必須ではないことが明らかになった。p27ノックアウトマウスより初代培養の繊維芽細胞を調製し、接触阻害や血清飢餓等によりG1期停止を誘導すると、このp27欠損細胞においても正常にG1期停止が起こり増殖は抑制された。即ち接触阻害や血清飢餓等による増殖停止にp27は必須でないことが明らかになった。

卵巣では顆粒膜細胞の過形成や卵胞腔の形成不全により卵胞の成熟が障害され、雌不妊となる。また網膜の光受容体細胞の過形成により網膜の層状構造に異常を呈する。さらに生後3ヶ月頃から下垂体中葉由来の良性腫瘍の発生が認められる。これらp27ノックアウトマウスにおける異常の一部はRb不活性化の結果と類似しており、またCyclinD1不活性化の表現型と逆であることから、Rb-CyclinD-p27が遺伝学的に因果関係があることが強く示唆される。そして特に網膜、下垂体、卵巣がこの制御系に強く依存しているらしい。しかしp27の欠損は明らかにRbやサイクリンDの欠損よりも広範囲に及んでいるので、さらに他のRbファミリーやサイクリンを制御している可能性が大きい。逆にRbの欠損の方がp27の欠損よりも重症なので、p27以外にもRbの機能を制御している分子の存在が考えられる。以上よりp27が細胞増殖の制御、特に組織の大きさの決定に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

b. p57Kip2遺伝子欠損マウスの作製と解析

まず129/Sv系マウスのゲノムDNAライブラリーよりp57 cDNAをプローブとしてp57遺伝子を単離した。次に遺伝子構造を解析し、分子機能に重要と思われる部分をネオマイシン耐性遺伝子によって置き換えたジーンターゲティング用ベクターを構築した。このジーンターゲティング用ベクターをEmbryonic Stem (ES)細胞に電氣的に導入し、ネオマイシン誘導体G418にてジーンターゲティング用ベクターが導入されたクローンを濃縮し、最終的に相同組換えを起こしたクローンを得た。このES細胞では1組のp57遺伝子のうち、一方の遺伝子が破壊されていることになる。このES細胞をC57BL/6マウスの受精後3.5日令の胚(胚盤胞)にマイクロインジェクションし、偽妊娠させた仮親マウスの子宮内に戻して成長させ、キメラマウスを作製した。このキメラマウスをマウスと交配して、変異p57遺伝子を第2世代に移行させ、この第2世代マウス同士を交配させることによって、正常p57遺伝子を持たないマウス(p57ノックアウトマウス)を作製した。p57はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害因子であり、特に神経系に強い発現が認められることから、神経細胞の過形成又は腫瘍の発生が予想され、神経

系の発達異常によって胎児期に死亡する可能性もある。そこでまず p57ノックアウトマウスを飼育観察し、出生率、成長遅延又は促進の有無、腫瘍形成の有無等を調べるとともに、全身の病理組織学的検索を行っているところである。さらに神経学的検索や動物行動学的検索を行って脳機能の状態を評価し、またノックアウトマウスから線維芽細胞、リンパ球、表皮細胞、神経節細胞等の細胞を初代培養し、その増殖や細胞周期に異常がないかどうかを調べる予定である。

原著論文

1. Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., and Nakayama, K.-i. 1996.
Mice lacking p27Kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors.
Cell 85, 707-720.
2. Nagata, M., Nakauchi, H., Nakayama, K.-i., Nakayama, K., Loh, D.Y., and Watanabe, T. 1996.
Apoptosis during an early stage of nephrogenesis induces renal hypoplasia in bcl-2-deficient mice.
Am. J. Path. 148, 1601-1611.
3. Senju, S., Negishi, I., Motoyama, N., Wang, F., Nakayama, K.-i., Nakayama, K., Lucas, P.J., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Yonehara, S., and Loh, D.Y. 1996.
Functional significance of the Fas molecule in naive lymphocytes.
Int. Immunol. 8, 423-431.

総説

1. 中山敬一, 中山啓子. 1996.
Bcl-2欠損マウス.
血液・腫瘍科, 32, 302-311.

著書

1. 中山敬一. 1996.
免疫系と細胞死 — Bcl-2.
バイオサイエンス用語ライブラリー：免疫（斎藤 隆, 竹森利忠編）pp.121-123.
羊土社, 東京.
2. 中山敬一, 中山啓子. 1996.

細胞接着分子—CD4.

バイオサイエンス用語ライブラリー：細胞接着（宮坂昌之・矢原一郎編）pp.104-105.
羊土社，東京.

3. 中山啓子，中山敬一．1996.

細胞接着分子—CD8.

バイオサイエンス用語ライブラリー：細胞接着（宮坂昌之・矢原一郎編）pp.106-104.
羊土社，東京.

4. 中山敬一，中山啓子．1996.

T細胞の分化.

バイオサイエンス用語ライブラリー：アポトーシス（三浦正幸・山田武編）pp.144-145.
羊土社，東京.

学会発表

1. 中山敬一（1996，7/5）.

p27ノックアウトマウスにおける異常.

ロシユセミナー「細胞周期研究の現状と将来」，東京.

2. 中山啓子，石田典子，白根道子，猪又 晃，井上智彰，宍戸信之，堀井郁夫，Loh, Dennis, Y., 中山敬一（1996，8/27）.

シンポジウム 細胞周期調節のT細胞分化に与える影響：p27ノックアウトマウスを用いた解析.

第19回日本分子生物学会，札幌.

3. 中山啓子，石田典子，白根道子，猪又 晃，井上智彰，宍戸信之，堀井郁夫，Loh, Dennis, Y., 中山敬一（1996，8/29）.

p27ノックアウトマウスにおける成長の促進と多臓器腫大.

第19回日本分子生物学会，札幌.

4. 中山敬一（1996，10/30）.

シンポジウム T細胞分化における細胞周期調節：p27ノックアウトマウスを用いた解析.

第46回日本アレルギー学会，宇都宮.

5. 中山敬一（1996，11/16）.

p27ノックアウトマウスにおける多彩な異常.

第6回別府ハーバー国際シンポジウム，別府.

6. 中山敬一（1996，11/25）.

免疫系における細胞周期調節機構.

Immunology New Wave in YOKOHAMA '96，横浜.

7. 中山敬一 (1996, 11/26).

シンポジウム T細胞分化における細胞周期調節—p27ノックアウトマウスによる知見から—.

第26回日本免疫学会, 横浜.

8. 中山敬一 (1996, 12/10).

p27Kip1 の生体内における役割.

第12回理研シンポジウム, 東京.