

戦略的創造研究推進事業 C R E S T
研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題「細胞成長を司るたんぱく質群の同定と機能解析」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成18年3月

研究代表者 米澤 一仁
(神戸大学バイオシグナル研究センター、教授)

代：吉川 潮
(神戸大学バイオシグナル研究センター、教授)

1 研究実施の概要

細胞成長（細胞サイズの増大）は多細胞生物における器官や個体の大きさの決定、その均衡の維持における重要なプロセスであり、細胞分裂（細胞数の増加）とは異なる制御を受けていると考えられている。一方、ラパマイシンは第3の免疫抑制剤として期待されている薬剤であり、その哺乳類細胞内標的たんぱく質としてセリンスレオニンたんぱく質リン酸化酵素である mammalian Target of Rapamycin (mTOR) が単離された。研究代表者らは mTOR が細胞環境中のアミノ酸バランスを感知し、細胞成長の主要な過程である mRNA 翻訳開始を調節していることを突き止め、さらに mTOR は Regulatory associated protein of mTOR (Raptor) をはじめとした細胞成長を司ると想定されるたんぱく質複合体を形成していることを見い出した。本チームはプロテオーム解析法によって mTOR を中心とする細胞成長を司るたんぱく質の候補群を迅速かつ高効率に同定し、生化学、分子生物学、細胞生物学的手法、モデル生物系での解析によって、それらの分子の機能解析を行うことにより細胞成長制御機構の解明ならびに細胞成長を制御しうる薬剤の探索、各種医療分野への応用を目指し、神戸大学内外の5グループにより以下の7項目の研究を実施した。

(1) 細胞成長を司るたんぱく質群の同定と分子間相互作用解析（神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁）

プロテオミクス的手法を主要な研究実施方法として、mTOR・Raptor たんぱく質複合体の構成因子の解析を進めた。具体的にはこれまでに同定した構成因子および mTOR シグナル伝達系に働くことが知られているたんぱく質を Tag 付加体として培養細胞に発現させ、質量分析法による共精製たんぱく質の同定、クローニング、分子間相互の結合、リン酸化を中心とした翻訳後修飾基の解析、細胞成長における生理的な意義の検討を行った。今後、mTOR シグナリングを標的とした抗癌剤の開発といった新たな治療法への発展が期待される。

(2) 細胞成長を司るたんぱく質群の細胞内における時間・空間的変動の解析（神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁）

蛍光標識たんぱく質を哺乳動物細胞内で発現させ、さらに蛍光標識分子を時期・組織特異的に発現制御しうる遺伝子操作動物を作製し、細胞および個体レベルで分子の細胞内局在の変化を解析した。その結果、PKC をはじめとするたんぱく質リン酸化酵素群のライブイメージングにより、情報伝達における時間的・空間的相互作用の重要性を証明した。今後、mTOR を介する情報伝達系が細胞内のどこで、いつ行われるかを、生細胞内で解析することにより、時空間制御機構を標的とする新しい薬物の開発につながる事が期待される。

(3) 細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析（神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁）

細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析し、PKC の類縁酵素である PKN 結合たんぱく質 CG-NAP が様々な情報たんぱく質群を細胞内の特異的な領域に局在させることを見い出した。また PI3 キナーゼより活性化を受け mTOR 系に入力するたんぱく質リン酸化酵素 PKB が熱ショック等の細胞ストレスにより細胞増殖因子による活性化とは異なる分子機構により活性化型に変換されることが明らかとなった。一方、AMP-activated protein kinase (AMPK) が mTOR シグナル系に抑制的に作用していることを明らかにし、さらに mTOR・Raptor たんぱく質複合体の

構成因子と結合するたんぱく質として AMPK の特定のサブユニットを検出した。

- (4) ノックアウト ES 細胞およびノックアウトマウスを用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析 (京都大学再生医科学研究所、グループリーダー 山中伸弥)

ES 細胞において mTOR のキナーゼドメインをネオマイシン耐性遺伝子と置き換える相同組み換えをおこし、同 ES 細胞を胚盤胞に移植することによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。ヘテロ変異マウスは外觀上正常であり、妊性も有していた。しかしヘテロ変異マウス同士の交配からはホモ変異マウスは誕生しなかった。ホモ変異マウスは胎生期に致死であると考えられたので、胎児の組織学的に解析することにより受精後 5.5 日胚において細胞増殖の抑制が認められた。しかし一つ一つの細胞は正常な形態を示したことから、アポトーシス等は生じていないと考えられた。また ES 細胞においてコンディショナルに mTOR をノックアウトする系を樹立し、細胞レベルでの機能解析を行った結果、mTOR は初期胚や ES 細胞における細胞増殖に必須であるとともに、細胞の大きさも制御している因子であることが明らかとなった。一方、ヘテロ欠損マウスを用いて、糖・脂質・エネルギー代謝などの生理作用や、膵臓 β 細胞の細胞成長能などを検討することにより、mTOR ヘテロノックアウトマウスは高脂肪食に対して、抗肥満作用のあることが判明した。なお、mTOR は PI3 キナーゼの下流で作用することが知られているが、私たちはインスリン受容体に結合し PI3 キナーゼを活性化する新しい因子 Visfatin を報告した。Visfatin が ES 細胞や初期発生において果たす役割を、遺伝子ノックアウトにより解析した。マウス臓器別の発現確認から、Visfatin の発現量は未分化 ES 細胞において高く、分化細胞では減少することがわかった。Visfatin 遺伝子ホモ変異マウスは、着床直後に致死となった。一方、Visfatin 遺伝子ヘテロ変異マウスは高インスリン血症や耐糖能異常を示した。以上の研究により、PI3 キナーゼ経路に関与する 2 つの因子である mTOR と Visfatin はともに細胞増殖に必須であることがわかった。

- (5) 出芽酵母を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析 (自然科学研究機構基礎生物学研究所、グループリーダー 鎌田芳彰)

真核細胞のモデル生物である出芽酵母を用いて、多岐にわたる TOR シグナルに関わる新規因子の探索とそれらの因子の TOR シグナルによる制御機構の解析を行うことを目的として 3 点の現象に注目して研究を行った。

a) TOR による自食作用制御メカニズムの解析

TOR シグナル経路は Atg1 プロテインキナーゼ複合体を介して自食作用を負に制御することが知られている。そこで、TOR による Atg1 複合体コンポーネント (Atg1, Atg13, Atg17) の挙動の生化学的な解析を Atg17 を中心に行った。その結果、Atg17 は Atg1 複合体の重要なコンポーネントとして、Atg1 への結合を介して自食作用誘導を TOR 制御下に行っていることが明らかとなった。さらに Atg17 が少なくとも二量体を形成し、二量体形成が Atg1 との結合および自食作用の誘導に必要であることを見出し、また新規 Atg たんぱく質が Atg17 と結合し、Atg1 の基質となることを発見した。今後、自食作用の制御機構を改変することにより、異常たんぱく質の細胞内蓄積・凝集を起因とする疾病の治療や病原菌耐性の獲得を目指した応用が可能になると考えられる。

b) TOR による Ypk プロテインキナーゼを介したアクチン構築の制御

TOR はラパマイシン非感受性の TOR たんぱく質複合体(TORC2)を形成することが知られている。TORC2 は低分子量 GTPase Rho1 などを通じて、アクチン構築、細胞壁合成などを制御しているが、その経路における TOR の直接のターゲットは不明であった。そこで、遺伝学的手法を用いて TOR の直接の基質となる因子を同定することを試みた。その結果、5' 端の欠けた YPK2 遺伝子断片 (YPK2-224) が *tor2* 変異株の多コピーサプレッサーとして得られた。全長 YPK2 遺伝子はサプレッサーとして機能しなかったが、YPK2 の M224 付近には哺乳細胞の mTOR 基質によく保存されたアミノ酸シーケンス (TOS motif) に類似した配列が存在し、TOS motif 変異体は全長でも *tor2* 変異株の高温感受性、アクチン欠損などを抑圧することが分かった。また Ypk2 は Tor2 直下の基質であり、その C 末のリン酸化を通じて活性化を受け、アクチン構築に関与していることが示された。この結果は哺乳細胞における TORC2 経路解明のモデル系となろう。

c) 酵母 TOR-Raptor 複合体の遺伝学的研究

哺乳細胞 mTOR 複合体のコンポーネント Raptor は出芽酵母では KOG1 遺伝子にコードされており、TOR などと共にラパマイシン感受性複合体 (TORC1) を形成している。mTOR ノックアウト細胞や KOG1 破壊株は致死性を示すため、より詳細な TOR 複合体の機能解析ができない。そこで、出芽酵母を用いて KOG1 の高温感受性変異体を作成し、その変異株の遺伝学的解析を行った。その結果、TOR-KOG1 経路が細胞周期において、未知の機能を果たしていることを明らかにした。さらに、*kog1* 変異株の多コピーサプレッサーをいくつか取得し、そのうちの一つはプロテインキナーゼをコードしており細胞周期制御に深く関与していることが分かった。また、その活性および核への細胞内局在が TORC1 により制御を受けていることを世界に先駆けて見出した。本研究により TORC1 経路と細胞周期の密接な関係が初めて浮き彫りとなった。

(6) mRNA の翻訳と細胞成長を司るたんぱく質群の相互作用解析 (城西国際大学薬学部、グループリーダー 懸川友人)

mTOR の阻害剤ラパマイシンの添加により他の mRNA 種に先駆けて Terminal Oligo Pyrimidine (TOP) mRNAs の翻訳が抑制される。本研究において TOP 配列に結合するたんぱく質 (CNBP、PTB、La、AUF1) の細胞内動態を解析し、我々が結合活性を見出した AUF1 のみがラパマイシン添加により細胞質中に増加し、非翻訳状態の TOP mRNAs と挙動を共にしていることを明らかにした。さらにリボソームの生合成に関わる Ki67 の核小体での挙動と AUF1 の連動を示唆する結果が得られた。今後、TOP 領域と相互作用をするたんぱく質や TOP mRNAs 以外の mRNA 種を検索することで、細胞の増殖と肥大化のメカニズムの解明が進むと考えられる。また、受傷シグナルによる治癒関連遺伝子の発現制御にラパマイシン感受性の経路が重要である可能性が示され、治癒にかかわる転写因子の内、受傷後 5 分までに受傷シグナルにより翻訳誘導される mRNA を 2 種類同定した。これらの結果から、細胞外のアミノ酸微小環境と細胞の翻訳ポテンシャルが創傷治癒の効率に影響を与えていることが示唆され、創傷治癒の効率を高めるためのターゲットとして、さらに詳細を検討する必要性が高まった。

(7) 細胞成長を司るたんぱく質群の機能を制御する化合物の探索(味の素(株) 医薬カンパニー医薬研究所 グループリーダー 竹鼻健司)

mTOR シグナル経路を活性化する素材としてのアミノ酸に着目して、mTOR の制御機能を指標にして細胞成長を制御する手法を開発することにより、人類の健康・医療上に有用な食品や医薬品などの製品開発につなげることを意図し、さらにアミノ酸が持つ様々な生理機能や薬理機能に対して細胞成長シグナル/mTOR シグナル伝達経路という軸でメカニズム研究を進めることにより、アミノ酸作用の特徴を最大限に活かした、より安全性が高く有効な投与法や適応症を提案できると考えて研究に取り組んだ。まず動物細胞培養用の培地中のアミノ酸の組成を様々に変換させた培養液ライブラリーを作製し、このライブラリーを用いて、様々な細胞におけるmTOR シグナルへのアミノ酸要求性を検討した。その結果、細胞種によりそのプロファイルが異なることが明らかとなり、アミノ酸から mTOR へのシグナルのインプットには複数の経路があることが想定され、臓器や細胞の違いにより、こうした経路を使い分けている可能性が示唆された。しかし、いずれの細胞においてもロイシンを含む分岐鎖アミノ酸が最も重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また肝硬変においては血中の分岐鎖アミノ酸(BCAA)濃度が低下し、BCAAの補充が、肝性脳症などの合併症の症状緩和や、低アルブミン血症の改善により、患者の生命予後やQOLにも良い効果を持つことが知られている。BCAAによる肝硬変の病態改善の作用機序について、動物モデルや細胞を用いた検討を行った結果、BCAAの投与は肝臓内でのmTORシグナルの活性化を介して、肝硬変病態においても肝でのアルブミン合成を促すことが明らかとなった。今後は、mTORを中心とした栄養生理の分子メカニズムの研究の発展とともに、アミノ酸の持つ食経験に基づく高い安全性を活かした健康・医療分野における新製品の開発が期待される。

本チームは米澤一仁教授を研究代表者として5グループを組織し、細胞成長の制御機構の解明を目指した研究を実施した。研究対象となったたんぱく質群のなかには、いまだに細胞成長制御におけるその意義が明らかではないものが含まれているが、当初、計画した検索としては一定の成果をおさめたと考えている。平成17年7月8日に米澤一仁研究代表者が急逝したことから、本チームは同年度末をもって終了することとなった。平成14年度の研究開始から4年度に渡り、ご支援をいただいたことに深甚の謝意を表す。

2 研究構想

細胞増殖は生命活動にとって中心的役割を果たす現象である。細胞増殖には「細胞分裂（細胞数の増加）」と「細胞成長（細胞サイズの増大）」という2つの現象が混在しているが、これまで両者は明確に区別されることなく、「細胞増殖」は主として「細胞分裂」を表現する用語として用いられてきた。しかし、現在では「細胞成長」は多細胞生物において器官や個体の大きさを決定し、またその均衡を維持するための重要なプロセスであり、「細胞分裂」とは異なる制御を受けていると考えられている。

一方、ラパマイシンはマクロライド系有機化合物であり第3の免疫抑制剤として期待されている薬剤であり、このラパマイシンの細胞内標的たんぱく質が、まず出芽酵母で同定され Target of Rapamycin (TOR) と命名された。なお、TOR はセリンスレオニンたんぱく質リン酸化酵素活性を持つ。続いて研究代表者のグループを含む複数のグループから TOR の哺乳類オルソログ、mammalian TOR (mTOR) が単離された。また、ゲノムプロジェクトの進展により TOR は生物種間で進化的に保存されていることが明らかにされ、研究代表者らは mTOR が細胞環境中のアミノ酸バランスを感知し、mRNA 翻訳開始に関わる eIF-4E 結合たんぱく質の活性を調節していることを突き止め、mTOR が数種のたんぱく質と複合体を形成していることを見出した。この複合体が細胞成長を司るたんぱく質群であるとの仮説のもと、その解析を実施し複合体の構成因子である新規たんぱく質の同定に成功した。Regulatory associated protein of mTOR (Raptor) と名付けられたこの新規 mTOR 結合たんぱく質は mTOR を介する eIF-4E 結合たんぱく質 (4EBP1) のリン酸化を促進する機能を有し、RNA interference (RNAi) 法やノックアウト実験による解析から mTOR の機能を制御する極めて重要な分子であることを明らかにした。

上述のように、研究代表者らは免疫抑制剤ラパマイシンの細胞内標的分子 mTOR が細胞環境の栄養状態を感知し、「細胞成長」をコントロールすることを示唆する成果を得ている。しかし、mTOR による栄養感知機構と情報伝達システムについてはほとんど不明である。本研究では、プロテオーム解析法によって mTOR を中心とする「細胞成長」を司るたんぱく質の候補群を迅速かつ高効率に同定し、生化学、分子生物学、細胞生物学的手法、モデル生物系での解析によって、それらの分子の機能解析を行うことにより「細胞成長」制御機構の解明、ならびに「細胞成長」を制御する薬剤を探索し、各種医療分野への応用を目指した。具体的には以下の項目の研究を計画した。

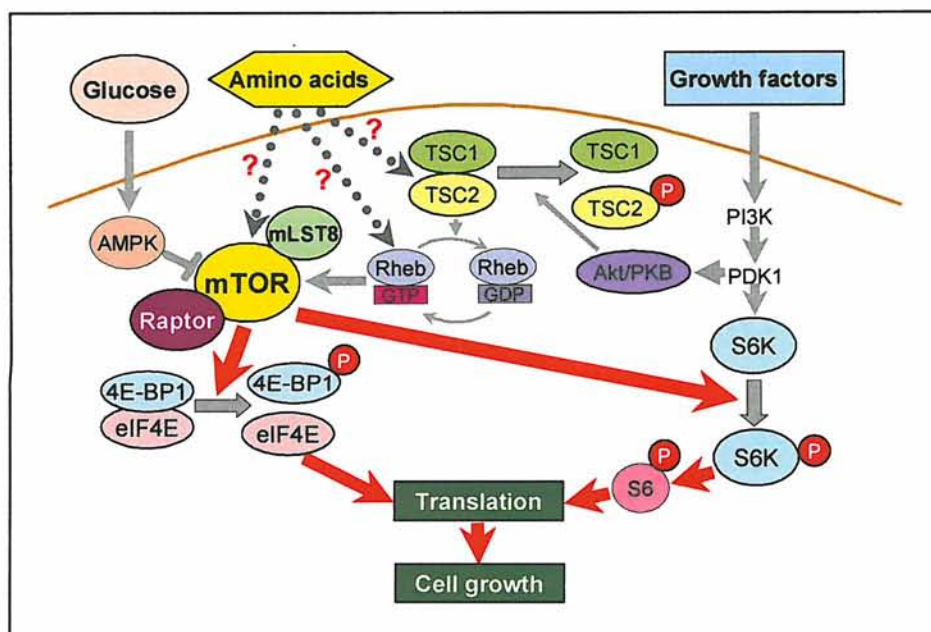


図 1. mTOR シグナリング

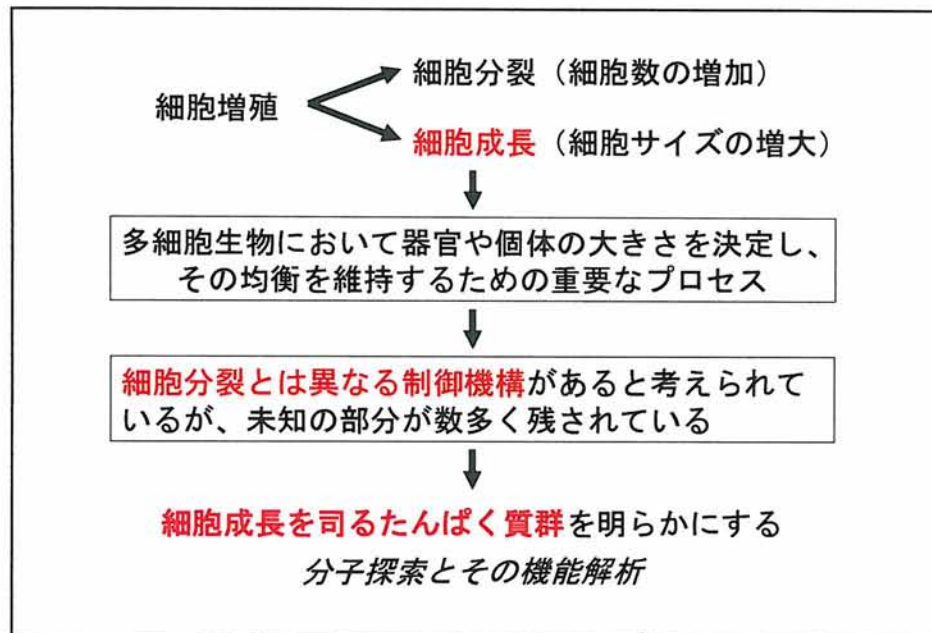


図2. mTOR シグナルに関与する分子群の解析

米澤一仁グループ

- 1) 細胞成長を司るたんぱく質群の同定と分子間相互作用解析
- 2) 細胞成長を司るたんぱく質群の細胞内における時間・空間的変動の解析
- 3) 細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析

なお、当初は「翻訳後修飾基の解析」、「RNAi を用いた機能解析」といった項目に細分した計画を立案したが、実際の研究進展においては個々のたんぱく質の同定とともにこれらの解析を実施したことから、本報告書においては上記のように整理を行った。

山中伸弥グループ

- 4) ノックアウト ES 細胞およびノックアウトマウスを用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

鎌田芳彰グループ

- 5) 出芽酵母を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

懸川友人グループ

- 6) mRNA の翻訳と細胞成長を司るたんぱく質群の相互作用解析

竹鼻健司グループ

- 7) 細胞成長を司るたんぱく質群の機能を制御する化合物の探索

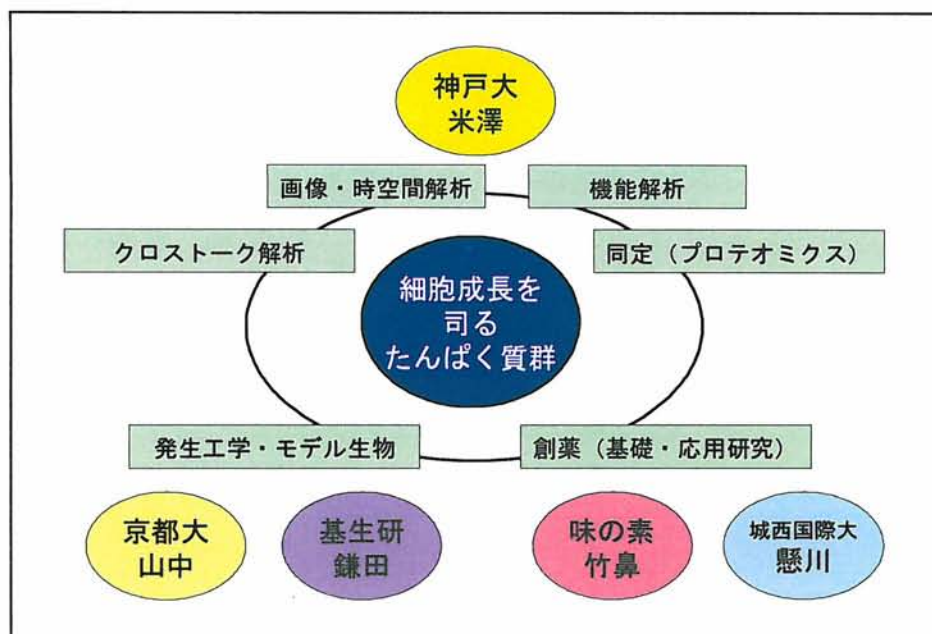


図3. 研究体制

3 研究内容

3. 1 細胞成長を司るたんぱく質群の同定と分子間相互作用解析（米澤グループ）：
神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁

(1) 実施の内容

プロテオミクスの手法を主要な研究実施方法としてCREST予算により整備したLCQ Advantageを活用して、mTOR・Raptorたんぱく質複合体の構成因子の解析を進めた。具体的にはRaptorやこれまでに同定した構成因子たんぱく質mLST8、およびmTORシグナル伝達系に抑制的に働くことが知られている結節性硬化症原因遺伝子産物TSC1、TSC2にFLAG-Tagを付加しHEK293細胞に発現させ、これらのリコンビナントたんぱく質と共精製されるたんぱく質を、SDS-PAGEによって分離し、質量分析法によって同定を試みた。同定されたたんぱく質は直ちにクローニングし、mTORやRaptorおよび本研究で新規に見い出されたそれぞれの分子間相互の結合を検討するとともに、リン酸化を中心とした翻訳後修飾基を主としnano-LC-MS/MSによって解析し、同定された翻訳後修飾については、分子生物学的手法、細胞生物学的な手法によって、細胞成長におけるその生理的な意義の検討を行った。個々のたんぱく質については以下の成果が得られた。

a) Heat shock protein 90 (Hsp90)

FLAG-Raptorに有意に結合するたんぱく質の一つとして、主要な分子シャペロンHeat shock protein (Hsp) 90が同定された。mTOR複合体に対するHsp90の寄与を検討するため、Hsp90の阻害剤ゲルダナマイシンのmTORシグナリングに対する効果を検討した。その結果、ゲルダナマイシン存在下ではmTORの下流因子であるリボソームたんぱく質S6、S6リン酸化酵素、翻訳開始因子4E結合たんぱく質1のリン酸化が阻害された。また、mTORの自己リン酸化部位Ser-2481のリン酸化レベルが低下した。Hsp90は標的たんぱく質の正確な立体構造の維持と機能の発現を支援する機能を有している。ゲルダナマイシン存在下でmTORの下流因子ならびにmTOR自身のリン酸化が抑制されたことからRaptorを含むmTOR複合体がHsp90の標的であることが示唆された。ゲルダナ

マイシンは抗癌剤としての薬効があり、臨床治験が行われているが、この薬剤の作用点の一つが mTOR シグナリングである可能性が高い。

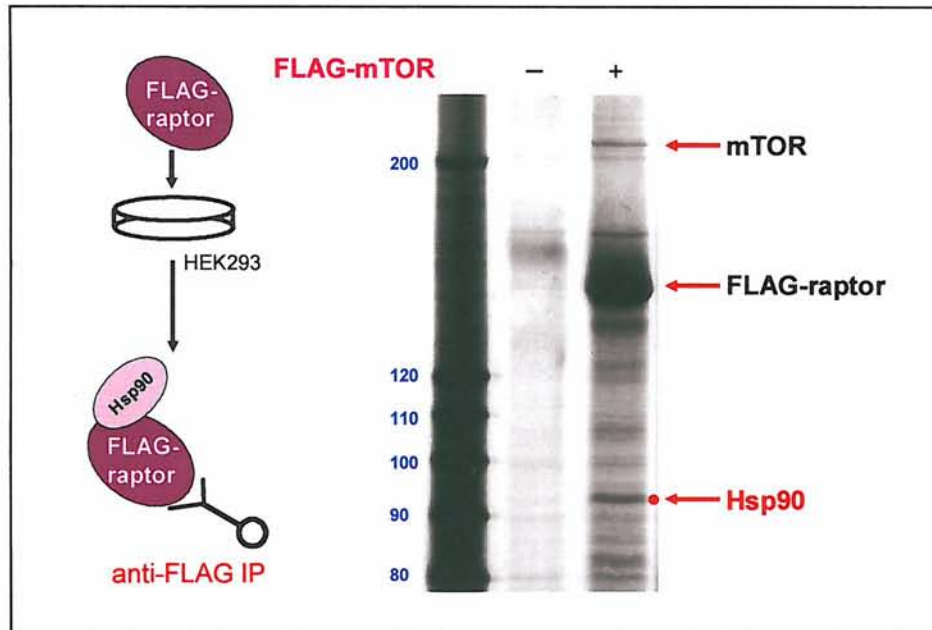


図 4. FLAG-raptor 結合たんぱく質の探索

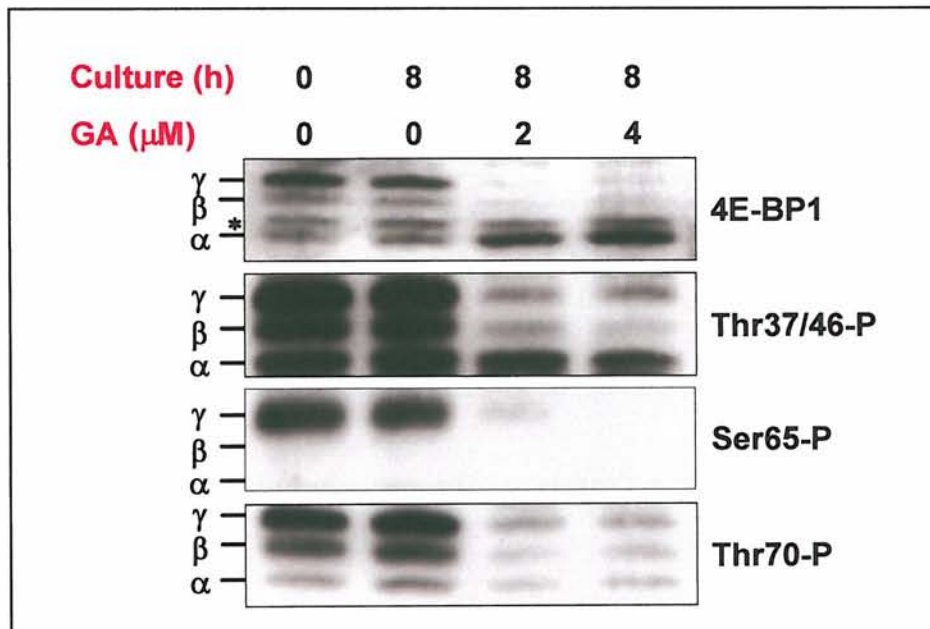


図 5. 4E-BP1 のリン酸化に対する geldanamycin の効果

b) AMPK (AMP-activated protein kinase)

細胞のエネルギー代謝ストレスによって細胞内 AMP レベルを感知し活性化されるセリンスレオニンたんぱく質リン酸化酵素である AMP-activated protein kinase (AMPK) のシグナル伝達系が mTOR シグナル系に抑制的に作用していることを明らかにした。また、最近、AMPK が TSC2 をリン酸化することが、mTOR シグナル伝達系抑制の分子メカニズムであるとの報告がなされたが、本研究に

より AMPK 三量体の特定のサブユニットが mTOR・Raptor たんぱく質複合体の構成因子の一部と結合し、両者の結合は細胞刺激により解離することが示された。

c) Rheb (ras homolog enriched in brain)

Rheb は他の GTP 結合たんぱく質と同様に GTP 結合型と GDP 結合型の変換によって活性が調整されており、GTP 結合型の Rheb は mTOR の正の制御因子として働くことが示唆されている。しかしながら、Rheb の具体的な mTOR の制御機構は不明であった。Rheb による mTOR 制御メカニズムの詳細を検討したところ、以下のことが判明した。

- ・ Rheb と mTOR が直接結合することを実証し、その結合はグアニンヌクレオチド非依存的であった
- ・ GTP 結合モチーフに変異が導入され、不活性型となった Rheb は mTOR のたんぱく質リン酸化酵素活性を抑制した。
- ・ GTP 結合モチーフに変異が導入され、活性型となった Rheb は mTOR のたんぱく質リン酸化酵素活性を促進した。

従って、活性型である GTP 結合型 Rheb の直接の標的たんぱく質は mTOR であり、mTOR の活性化は結合している Rheb の GTP と GDP の変換によって制御されていることが明らかとなった。

d) Protein A (仮称)

全長 mLST8 および Raptor の WD40 ドメイン構造を持つカルボキシル末端側領域に Protein A が有意に結合していることが見い出された。本たんぱく質はアミノ酸代謝に重要な役割を担うことが知られ、細胞内で過剰発現させた FLAG-mLST8 に加え、内因性の mLST8 との結合が観測された。さらに mTOR の上流因子である結節性硬化症原因遺伝子産物 TSC2 や Rheb との結合も確認することができた。mLST8 や Raptor 等の mTOR 関連因子が細胞環境中のアミノ酸を感知して Protein A の活性を調節している可能性が示唆される。

e) Raptor 結合たんぱく質

FLAG-Raptor と共精製されるたんぱく質として Protein B (仮称) が同定された。本たんぱく質はリン酸化酵素 PKB の基質として報告されたたんぱく質である。Protein B 上には2つのリン酸化部位が存在し、それぞれのリン酸化部位がアミノ酸バランスを感知して変動していることを示唆する結果が得られた。なお、Protein B とは別に Raptor に対する新規結合候補たんぱく質としてあるヒト遺伝性疾患の原因遺伝子を見い出した。この遺伝子産物は癌細胞の低酸素に対する抵抗性を付与する機能や、低酸素下の新生血管造成等に関与するたんぱく質であり、各種変異体を作成し Raptor との結合部位、様式などを解析した結果、栄養環境センサーである mTOR シグナル系と酸素センサーとして機能する細胞内シグナル系とのつながりを示す結果が得られた。

f) Protein C (仮称)

結節性硬化症原因遺伝子産物である TSC1 と TSC2 の複合体のそれぞれに FLAG-Tag を付加したリコンビナントたんぱく質を HEK293 細胞に発現させ、共精製されるたんぱく質として約 30 kDa の機能未知たんぱく質 (Protein C) が同定された。このたんぱく質は、そのアミノ酸配列から低分子量 GTP 結合たんぱく質の GTPase 活性促進たんぱく質と相同的なドメインを持ち、さらに内因性の Protein C と TSC1-TSC2 複合体との結合が確認された。特にその結合は、TSC1 を介している可能性が示唆された。TSC1-TSC2 複合体は、Rheb、Rac1、Rab5、Rho といった低分子量 GTP 結合たんぱく質に機能することが報告されており、

実際にこれら低分子量GTP結合たんぱく質の一部と Protein C との結合を示す結果が得られた。

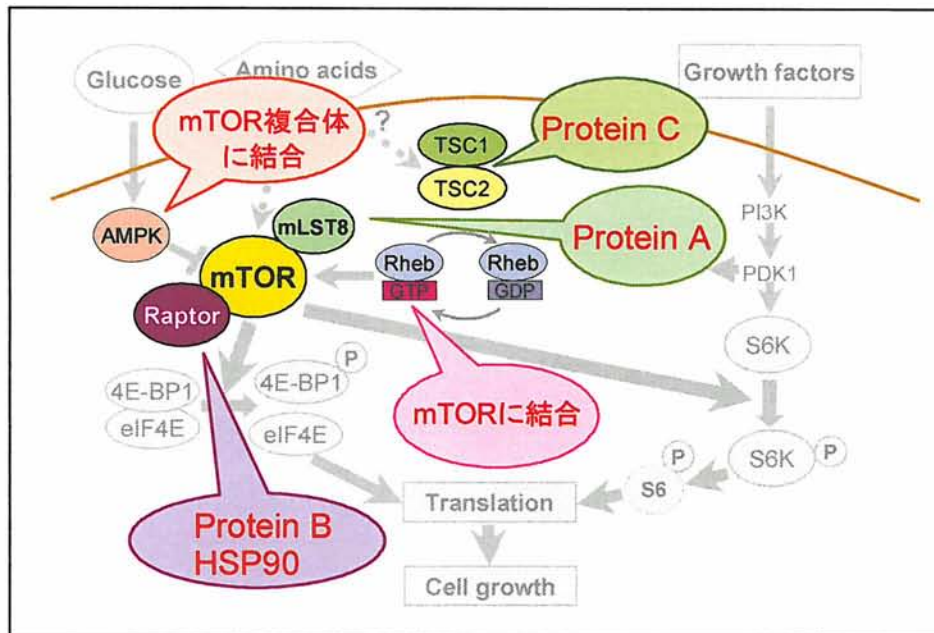


図6. mTOR シグナル分子結合たんぱく質の探索

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

- 研究代表者らによる mTOR および Raptor の同定とこれらを含むたんぱく質複合体 (TORC1) による細胞環境中のアミノ酸バランス感知と細胞成長制御の提唱により、国内外で多くの関連した研究が開始された。本研究では他に先んじて新規結合たんぱく質の同定と解析を実施しているが、ごく最近ではラパマイシン非感受性の mTOR たんぱく質複合体 (TORC2) が報告されており、本研究課題はさらに注目を集めており、今後、以前にも増して競って研究が行われると予想される。
- Raptor に有意に結合するたんぱく質の一つとして Hsp90 が同定され、従来、Hsp90 の阻害剤として知られていたゲルダナマイシンが mTOR シグナリング系を抑制することが明らかになった。ゲルダナマイシンは抗癌剤として臨床治験が行われているが、この薬剤の作用点の一つが mTOR シグナリングであることが示され、また今後、mTOR シグナリングを標的とした抗癌剤の開発が行われる可能性が高い。
- Raptor に対する新規結合候補たんぱく質は、癌抑制遺伝子の一つであり、特に癌細胞の低酸素に対する抵抗性を付与する機能や、低酸素下の新生血管造成等に関与するたんぱく質である。栄養環境センサーとして機能する mTOR シグナルの一つとして、酸素センサーとして機能する細胞内シグナルの分子基盤の解明につながる事が期待される。臨床的には、癌特性の理解と新しい治療法の開発につながる事が期待される。

3. 2 細胞成長を司るたんぱく質群の細胞内における時間・空間的変動の解析 (米澤一仁グループ): 神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁

(1) 実施の内容

蛍光標識した目的のたんぱく質を哺乳動物細胞内で発現させ、様々な細胞外からの刺激により誘導される目的分子の時間的・空間的な変化を明らかにし、さらに蛍光標識分子を時期・組織特異的に発現制御しうる遺伝子操作動物を作製し、個体レベルで分子の細胞内局在の変化を解析した。その結果、PKCをはじめとするリン酸化酵素群のライブイメージングにより、情報伝達における時間的・空間的相互作用の重要性を証明した。さらに、蛍光標識分子を時期・組織特異的に発現制御しうる遺伝子操作動物を作製し、従来想定しなかった情報伝達の伝播現象を見い出した。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

今後、mTOR を介する情報伝達系が細胞内のどこで、いつ行われるかを、生細胞内で解析することにより、より研究を深化させるとともに、時空間制御機構を標的とする新しい薬物の開発にもつながることが期待される。

3. 3 細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析 (米澤一仁グループ): 神戸大学バイオシグナル研究センター、グループリーダー 米澤一仁

(1) 実施の内容

細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析について、たんぱく質リン酸化酵素 PKB、PKN、PKC によるリン酸化カスケードとのクロストークを検討した。PKC の類縁酵素である PKN については、細胞骨格構築の情報伝達を制御する分子であることが知られており、本研究では同定された「細胞成長を司るたんぱく質群」が、PKN のリン酸化カスケードとクロストークを行うのか、あるいは PKC など現在知られている様々なリン酸化カスケード群とクロストークするかを検討した。また、本研究により細胞のエネルギー代謝ストレスによって細胞内 AMP レベルを感知し活性化されるセリンスレオニンたんぱく質リン酸化酵素である AMPK が項目 3. 1 に記載したように mTOR シグナル系に抑制的に作用していることを見い出したことから、細胞成長を司るたんぱく質群と同様に解析を行うこととした。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

- ・ PKB は細胞増殖因子の下流に位置し、細胞増殖の促進および細胞死の抑制に関わることが知られているが、本研究により熱ショック等の細胞ストレスにより細胞増殖因子による活性化とは異なる分子機構により活性化型に変換されることが明らかとなった。今後はストレス刺激と細胞増殖・成長との関係の検討が重要な課題といえる。
- ・ 「細胞成長を司るたんぱく質群」が、PKN のリン酸化カスケードとクロストークを行うのか、あるいは PKC など現在知られている様々なリン酸化カスケード群とクロストークするかを検討する過程で見い出した PKN 結合たんぱく質 CG-NAP が様々な情報たんぱく質群を細胞内の特異的な領域に局在させることを見い出した。
- ・ 当初は、細胞成長を司るたんぱく質群とクロストークするシグナル系として PKB、PKN、PKC によるリン酸化カスケードを想定したが、AMPK が mTOR シグナル系に抑制的に作用していることを見い出した。そこで、細胞成長を司るたんぱく質群と AMPK とのクロストークを検討することとした。その過程で、mTOR・

Raptorたんぱく質複合体の構成因子と結合するたんぱく質として AMPK の特定のサブユニットが見い出された。本例はたんぱく質の機能的側面からの研究が複合体形成という構造的な観点からも支持される成果に結びついたものであり、本研究で用いられている手法が今後、さらに広まることを予想している。

3. 4 ノックアウト ES 細胞およびノックアウトマウスを用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析 (山中伸弥グループ) : 京都大学再生医科学研究所、グループリーダー 山中伸弥

(1) 実施の内容

TOR (Target of rapamycin) は酵母から哺乳類に至るまで高度に保存されているセリンスレオニンキナーゼである。酵母やショウジョウバエにおいては遺伝学的な解析から TOR が細胞増殖 (分裂) と成長 (大きさ) の両者の調節において重要な働きをすることが示されている。しかし哺乳類の TOR (mTOR) の機能は不明な点が多かった。これまでに mTOR 遺伝子に点変異を有するマウス胚や、ラパマイシンで処理されたマウス胚が終脳の増殖異常を示すことが報告されているが、これらはいずれも partial loss of function であり、mTOR の真の生体内機能は不明のままであった。そこで私たちは、ES 細胞における相同組み換えにより mTOR 遺伝子のノックアウトを行った。

ES 細胞において mTOR のキナーゼドメインをネオマイシン耐性遺伝子と置き換える相同組み換えをおこし、同 ES 細胞を胚盤胞に移植することによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。ヘテロ変異マウスは外観上正常であり、妊性も有していた。しかしヘテロ変異マウス同士の交配からはホモ変異マウスは誕生しなかった。ホモ変異マウスは胎生期に致死であると考えられたので、胎児の組織解析を行った。

またホモ変異の ES 細胞を樹立し、細胞レベルでの機能解析も行った。mTOR たんぱく質は C 末端の数アミノ酸がキナーゼ活性に必須であることが知られている。そこで、mTOR 遺伝子の最終エクソンを 2 つの loxP 配列で囲んだターゲティングベクターを作成し、相同組み換え ES 細胞を樹立した。また選択薬剤の濃度を上げて培養することにより、ホモ変異 ES 細胞も樹立した。この ES 細胞に、膜透過性の CRE たんぱく質である TAT-CRE を投与し、mTOR の C 末端 3 アミノ酸を除去した。この細胞において mTOR の下流である 4EBP1 の活性や細胞増殖を測定した。

ヘテロ欠損マウスを用いて、特に糖・脂質・エネルギー代謝などの生理作用や、膵臓 β 細胞の細胞成長能などを検討した。mTOR 遺伝子ヘテロ欠損マウスの解析においては、糖負荷やインスリン負荷を行い、インスリン感受性やインスリン分泌能、脂質代謝などを検討し、更に高脂肪食負荷を加えて、表現型の解析を行った。

一方、mTOR は PI3 キナーゼの下流で作用することが知られているが、私たちはインスリン受容体に結合し PI3 キナーゼを活性化する新しい因子 Visfatin を報告した。Visfatin が ES 細胞や初期発生において果たす役割を、遺伝子ノックアウトにより解析した。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

mTOR ホモノックアウトマウスは着床後早期に致死となることがわかった。組織学的に解析すると受精後 5.5 日胚において細胞増殖の抑制が認められた。しかし一つ一つの細胞は正常な形態を示したことから、アポトーシス等は生じていないと考えられた。

次に ES 細胞においてコンディショナルに mTOR をノックアウトする系を樹立した。TAT-CRE 添加により mTOR 遺伝子を破壊すると、下流因子である 4EBP1

のリン酸化は速やかに停止した。またこの ES 細胞の増殖も速やかに停止した。また細胞サイズの減少も観察された。したがって、mTOR は初期胚や ES 細胞における細胞増殖に必須であるとともに、細胞の大きさも制御している因子であることが明らかとなった。

mTOR ヘテロノックアウトマウスは高脂肪食に対して、抗肥満作用のあることが判明し、mTOR シグナルは生体では、脂質・エネルギー代謝の制御に関与している可能性が考えられた。成人病の大きな悪化因子である肥満のメカニズムとその治療法に対して、mTOR シグナルの重要性を示す物と考えられた。

マウス臓器別の発現確認から、Visfatin の発現量は未分化 ES 細胞において高く、分化細胞では減少することがわかった。Visfatin 遺伝子ホモ変異マウスは、着床直後に致死となった。一方、Visfatin 遺伝子ヘテロ変異マウスは高インスリン血症や耐糖能異常を示した。

以上の研究により、PI3 キナーゼ経路に関与する 2 つの因子である mTOR と Visfatin はともに細胞増殖に必須であることがわかった。今後、これらの因子を阻害する因子は、抗腫瘍薬の有力な候補となると考えられる。またヘテロ変異マウスの解析から両者とも糖代謝においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。抗腫瘍薬に加えて抗糖尿病薬の開発にもつながることが期待される。

3. 5 出芽酵母を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析（鎌田芳彰グループ）：自然科学研究機構基礎生物学研究所、グループリーダー 鎌田芳彰

(1) 実施の内容

当グループは、「真核細胞のモデル生物」出芽酵母を用いて、多岐にわたる TOR シグナルに関わる新規因子の探索とそれらの因子の TOR シグナルによる制御機構の解析を行うことを目的として研究を行った。特に、我々は 3 点の現象に注目して研究を行うことにした。

a) TOR による自食作用制御メカニズムの解析

TOR シグナル経路は Atg1 プロテインキナーゼ複合体を介して自食作用を負に制御することが知られている。そこで、TOR による Atg1 複合体コンポーネント (Atg1, Atg13, Atg17) の挙動の生化学的な解析を、Atg17 を中心に行った。

栄養成長にある細胞 (TOR が活性化されていると考えられる) では Atg1-Atg17 の結合は見られず、TOR 阻害剤であるラパマイシン投与時にこの結合が見られた。この結合は ATG13 遺伝子依存的であった。さらに、この結合が自食作用に必須であるか調べるために、我々は、Atg1 結合能を失った ATG17 変異体の作成に取り組んだ。Atg17C24R 変異体は Atg1, Atg13 との結合能を失っており、atg17C24R 変異株では、Atg1 キナーゼ活性化、自食作用の誘導が見られないことが観察された。これらの結果から、Atg17 は Atg1 複合体の重要なコンポーネントとして、Atg1 への結合を介して、自食作用誘導を (TOR 制御下に) 行っていることが明らかとなった (Suzuki et al. 2002, Kabeya et al. 2005)。

さらに我々は、上記の結果の他に、Atg17 が少なくとも二量体になることを two-hybrid 法、免役沈降法を用いて見出した。Atg17 同士の結合サイトをすでに同定し、(最低でも) 二量体を形成することが、Atg1 との結合に必須であること、自食作用の誘導に必要であることを見出ししている。さらに、われわれは、新規 Atg たんぱく質が Atg17 と結合し、Atg1 の基質となることを発見した (Kawamata et al. 2005)。

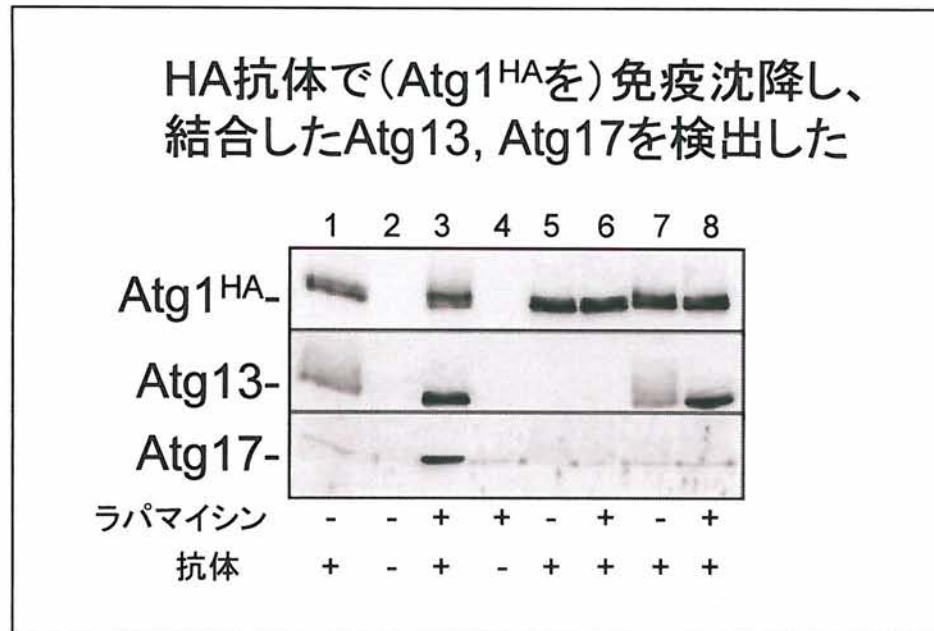


図 7. TOR は Atg1 複合体形成を制御する

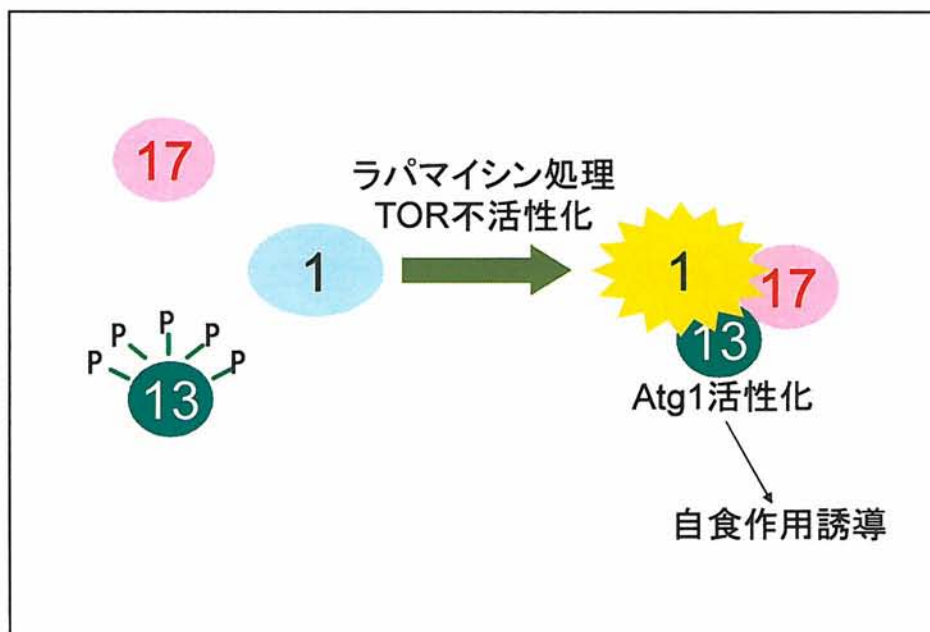


図 8. TOR による自食作用誘導の模式図

b) TOR による Ypk プロテインキナーゼを介したアクチン構築の制御

TOR はラパマイシン非感受性の TOR たんぱく質複合体 (TORC2) を形成することが知られている。TORC2 は低分子量 GTPase Rho1 などを通じて、アクチン構築、細胞壁合成などを制御しているが、その経路における TOR の直接のターゲットは不明であった。そこで、遺伝学的手法を用いて、TOR の直接の基質となる因子を同定することを試みた。

我々はアクチン構築、細胞壁合成に欠損の見られる *tor2* 変異体株を単離し、次にその変異株の多コピーサプレッサーを取得し、その表現型を調べた。その結果、5'端の欠けた YPK2 遺伝子断片 (YPK2-224) が *tor2* 変異株の多コピーサプレッサー

一として得られた。予想に反して、全長 YPK2 遺伝子はサプレッサーとして機能しなかった。YPK2 の M224 付近を探索した結果、哺乳細胞の mTOR 基質によく保存されたアミノ酸シーケンス (TOS motif) に類似したシーケンスを発見した。その一つ D239 に変異を入れたところ、YPK2^{D239A} は全長でも *tor2* 変異株の高温感受性、アクチン欠損などを抑圧することが分かった。次に、我々は、Ypk2 が TOR の直接の基質となりうるか *in vitro* キナーゼアッセイ法により検証した。その結果、Tor2 たんぱく質は直接 Ypk2 の C 末 (2 カ所) をリン酸化することが分かった。Ypk2 のリン酸化サイトはその機能に必須であり、TOR によるリン酸化が Ypk2 の機能を制御していることを示している。しかしながら、そのリン酸化サイトと D239A を組み合わせた変異体は Ypk2 としての機能、および *tor2* サプレッサーとしての機能を保持していることが判明した。さらに、Ypk2 自身のキナーゼアッセイを行った結果、Ypk2 の活性は、1, TOR2 によるリン酸化依存的であること、2, D239A 変異体は TOR2 非依存的に活性化されていること、3, リン酸化サイトと D239A を組み合わせた変異体は活性が回復していることが解った。これらの結果から、Ypk2 (おそらく Ypk1 も) は Tor2 直下の基質であり、その C 末のリン酸化を通じて活性化を受け、アクチン構築に関与していることが示された (Kamada et al. 2005)。

また、最近、S. Emr のグループが新規たんぱく質 Slm1/2 が TOR2 の基質であること、アクチン構築に必要であることを報告した。つまり、我々が考えている Ypk1/2 とその機能がオーバーラップするたんぱくが発見されたのである。そこで、我々は、Ypk と Slm 間に遺伝的相互作用があるか検証することにした。SLM1SLM2 の 2 重破壊株は致死性を示すが、その致死性は活性化型である YPK2^{D239A} により相補された。この結果は、SLM の生育に必須な機能を YPK が肩代わりできることを示している。現在、Ypk2 のキナーゼ活性が *slm* 変異株で変化しているか、調べている。

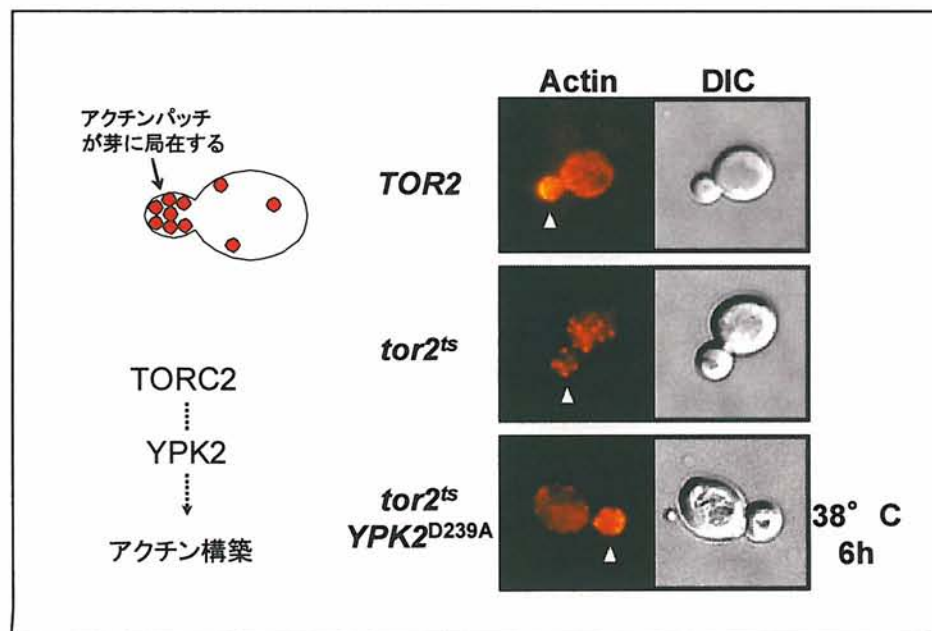


図 9. YPK2^{D239A} は *tor2* 変異体のアクチン異常を抑圧する

c) 酵母 TOR-Raptor 複合体の遺伝学的研究

哺乳細胞 mTOR 複合体のコンポーネント Raptor は出芽酵母では KOG1 遺伝子にコードされており、TOR などと共にラパマイシン感受性複合体 (TORC1) を形成している。mTOR ノックアウト細胞や KOG1 破壊株は致死性を示すため、より詳細な TOR 複合体の機能解析ができない。そこで、出芽酵母を用いて KOG1 の高温感受性変異体を作成し、その変異株の遺伝学的解析を行った。

我々は、low fidelity PCR 法を用いた random mutagenesis を KOG1 遺伝子に対して行い、kog1 高温感受性変異株を 2 株取得した。Kog1 たんぱく質は TOR 複合体 (TORC1) の主要なコンポーネントであること、TORC1 は、ラパマイシン感受性 TOR 経路を担っていることから、これらの変異株は、制限温度下では、ラパマイシン投与と同等の表現型を示すことが期待された。実際に、MEP2 発現などの表現型については、従来ラパマイシン投与による TOR 不活性化で見られるのと同じ結果が得られた。一方、いくつかの表現型、例えば、自食作用の誘導については、変異株を制限温度下に移すだけでは観察されなかった。

興味深いことに、我々は、kog1 高温感受性変異株の様々な表現型を調べた結果、TOR-KOG1 経路が細胞周期において、未知の機能を果たしていることを明らかにした。さらに、kog1 変異株の多コピーサプレッサーをいくつか取得し、そのうちのひとつ (遺伝子 D, 仮称) が、細胞周期に深く関与していることが解った。D 遺伝子はプロテインキナーゼをコードしており、その活性は細胞周期の様々なステップにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、D たんぱく質の活性制御、特に核への細胞内局在が TORC1 により制御を受けていることを、世界に先駆けて見い出した。また、kog1 変異株においても細胞内局在の正常な D 変異体も取得し、TORC1 による D の制御の詳細なメカニズムを明らかにしようとしている (Nakashima et al. 投稿中)。

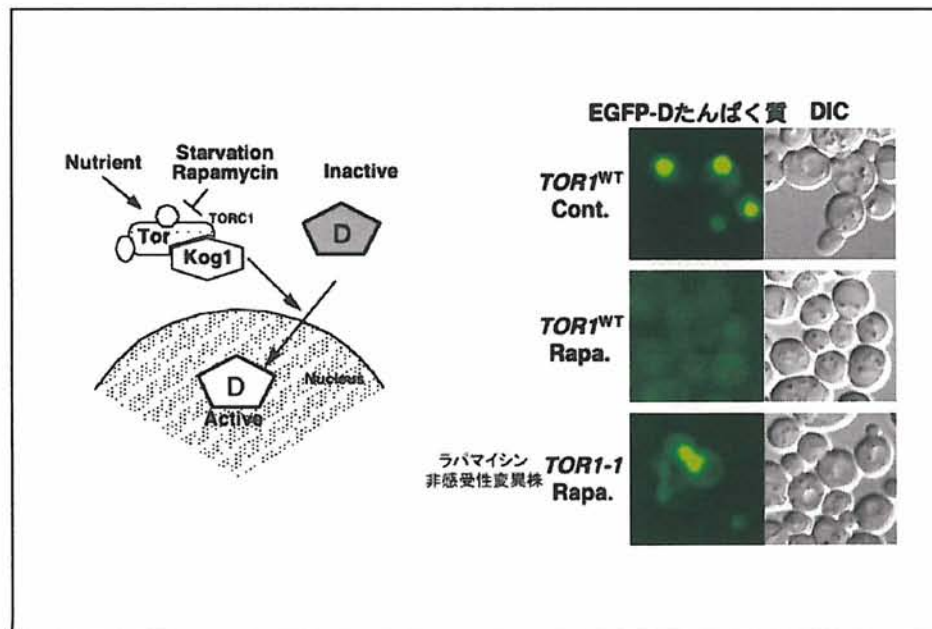


図 10. TOR は細胞周期たんぱく質 D (仮称) の核移行を制御する

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

- ・出芽酵母は真核細胞のモデル系として、様々な生命現象の解明に大きな役割を果たしてきた。TOR 研究においても、例外でなく、酵母を用いた遺伝学的、生化学的研究は大きな貢献を果たしている。当グループの研究成果もその一角を占めていると自負している。

本研究によって、TOR による Atg1 複合体を介した自食作用誘導の制御機構が詳細に明らかになった。自食作用に関わる Atg たんぱく質の多くは酵母から高等動物まで広く保存されている。このことは、自食作用の基本的メカニズムもまた広く保存されていることを示唆する。

出芽酵母における自食作用の研究の進歩は、高等動物における自食作用の生理的意義の解明の爆発的展開につながった。動物では、アルツハイマー病やパーキンソン病など、異常たんぱく質の細胞内蓄積・凝集を起因とする数々の病気と自食作用との関連が取り沙汰され、植物では、病原菌耐性と自食作用の関連が報告されている。これらの動物植物においても TOR-Atg1 系による自食作用誘導メカニズムが保存されているならば、今後、この系の制御機構を改変することにより、上記の疾病の治療や病原菌耐性の獲得を目指した応用が可能になると考えられる。

- ・出芽酵母においてはラパマイシン非感受性 TOR 経路 (TORC2 経路) の存在が以前から知られていたが、これが哺乳細胞にも保存されていることが判明したのは、最近のことである。出芽酵母においても、TORC2 経路の直接の下流因子 (=TORC2 基質) は不明であった。これは、TOR 研究において、阻害剤ラパマイシン投与による細胞の挙動変化ばかりに注目してきた結果ともいえる。

本研究において TORC2 経路の直下の因子として Ypk1/2 を同定した。この結果は、出芽酵母における TORC2 経路のさらなる解明に留まらず、哺乳細胞における TORC2 経路解明のモデル系となろう。出芽酵母では、前述の通り、TORC2 経路は酵母細胞壁合成に深く関与している。細胞壁合成の阻害剤は、抗真菌薬剤としての応用が可能であり、本研究の成果は新規の抗真菌薬剤への応用、あるいはその作用機作解明への糸口となる可能性を秘めている。

- ・本研究課題にあるとおり、TOR は細胞成長を司るたんぱく質として知られている。一方で、多くの細胞では、細胞成長と細胞増殖は密接に関係している。しかしながら、これまでの研究では、TOR が細胞増殖や細胞周期を直接的に制御している実験結果は得られてこなかった。それは、上に述べたとおり、TOR や Raptor のノックアウト細胞や破壊株が致死性を示すために詳細な解析が難しいことや、ラパマイシン投与による最終表現型ばかりに注目して研究が行われてきたことに寄ると考えられる。

Raptor ホモログである酵母 KOG1 遺伝子の高温感受性変異体の解析を行った本研究により、TORC1 経路と細胞周期の密接な関係が初めて浮き彫りとなった。TOR 経路同様、細胞周期制御メカニズムもまた、酵母細胞と哺乳細胞では多くの面で保存されている。今後は本研究で明らかとされた結果が哺乳細胞でも保存されている可能性についても検討を重ねる予定である。また、TOR 阻害剤ラパマイシンは抗癌剤としての作用が注目されている。細胞の癌化と細胞周期には密接な関係があり、本研究は抗癌剤としてのラパマイシンの作用機作に関する解明に大きく役立つものと期待される。

3. 6 mRNA の翻訳と細胞成長を司るたんぱく質群の相互作用解析 (懸川友人グループ) : 城西国際大学薬学部、グループリーダー 懸川友人

(1) 実施の内容

- a) mTOR の制御を最も敏感に受ける mRNA 種として Terminal Oligo Pyrimidine (TOP) mRNAs が知られており、mTOR の阻害剤ラパマイシンの比較的低濃度の添加により他の mRNA 種に先駆けてその翻訳が抑制される。ラパマイシンに強い感受性を示すラット顎下リンパ節および BJAB 細胞において mTOR シグナルの最終ターゲットと考えられる TOP 配列に結合するたんぱく質の細胞内動態を解析した。TOP に結合することが示されているたんぱく質 (CNBP、PTB、La、AUF1) のうち、我々が結合活性を見出した AUF1 のみがラパマイシン添加に

より細胞質中に増加し、非翻訳状態の TOP mRNAs と核および細胞質挙動を共にしていることを免疫沈澱後の RT-PCR 法により明らかにした。さらにリボソームの生合成に関わる Ki67 の核小体での挙動と AUF1 の連動を示唆する結果が得られた。TOP mRNAs に含まれるが、ラパマイシンによる翻訳抑制に非感受であることが知られている rp L13b mRNA は、AUF1 抗体により免疫沈澱されなかった。また、AUF1 の 4 種の splicing variant の内 p42 および p45 はラパマイシン処理により発現の割合が増加することを確認した。

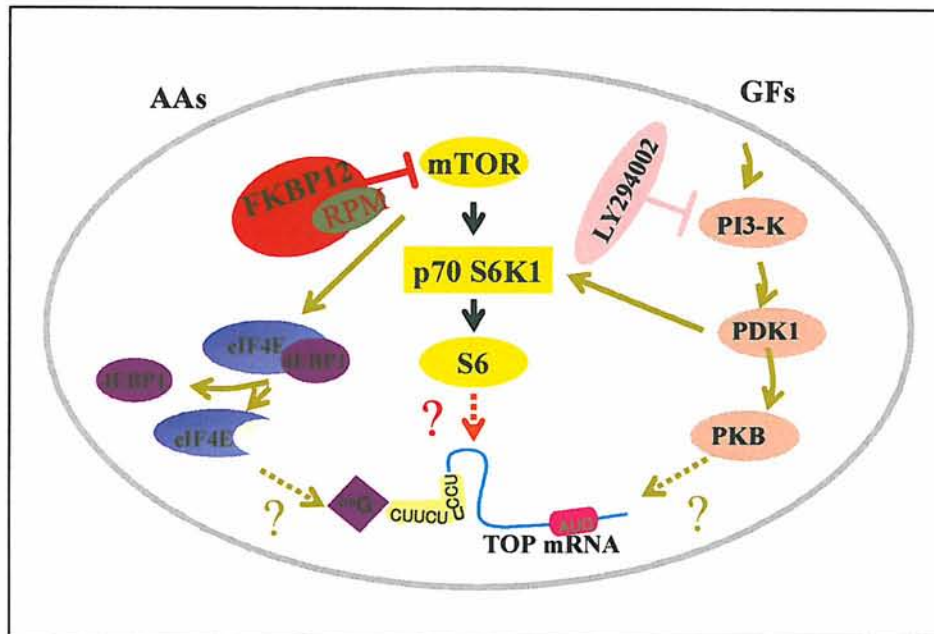


図 1 1. TOP mRNAs の翻訳調節機構

- b) 創傷治癒に関与する遺伝子の発現は従来転写過程が重要であるとされてきたが、受傷後 20 分までは翻訳過程がその後 48 時間の治癒効率を制御することが実験創傷治癒系を用いた阻害剤のキネティクス解析より明らかになった。また、受傷シグナルによる治癒関連遺伝子の発現制御にラパマイシン感受性の経路が重要である可能性が示された。治癒にかかわる転写因子の内、受傷後 5 分までに受傷シグナルにより翻訳誘導される mRNA を 2 種類同定した。さらにこれらの転写因子の潜在的結合配列を共通にプロモーター領域にもち、治癒にかかわることが知られている MMP-9 および MMP-2 の発現を解析し、受傷 15 分までの翻訳過程が阻害されると、受傷から 48 時間後の MMP-9 および MMP-2 活性が有意に低下することを見出した。

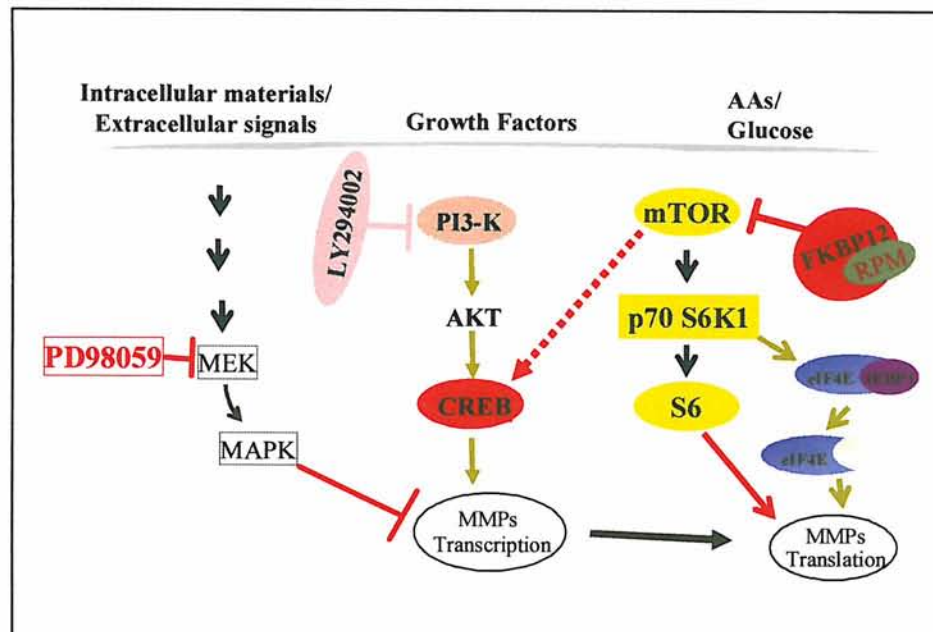


図 1 2. 受傷シグナルによる MMPs 発現調節の情報伝達経路

- c) 多岐にわたる薬剤の副作用により引き起こされる drug-induced gingival hyperplasia (歯肉肥厚；DGV) では細胞の増殖と肥大が同時に観察される。そこで DGV に mTOR が関与している可能性を Ang II、ET-1 誘発性歯肉線維芽細胞増殖において各種阻害剤を用いて検討した。MEK および ERK 阻害剤により Ang II、ET-1 誘発歯肉線維芽細胞の増殖はほぼ完全に抑制され、mTOR 経路との有意なクロストークは観察されなかった。このことより、歯肉肥厚は nutrient に拠らず、増殖因子依存の情報伝達系により細胞のサイズが増大している可能性が示唆された。
- (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果
- ・ mTOR より下流のシグナルは 4EBP あるいはリボソームたんぱく質 S6 のリン酸化を介して伝わりと理解されているが、さらにその下流の伝達機構は明らかでない。AUF1 は 4 種の splicing variants のうち小さい 2 variants は mRNA の安定性・分解に関わっていることが示されている。今回ラパマイシンに hyper sensitive な TOP mRNAs の翻訳抑制機構への AUF1 の大きい 2 variants の関与が示された。TOP mRNAs に結合する因子のうちラパマイシンへの応答が示されたのは今回が初めてであり、大きい variants の AUF1 と相互作用をするたんぱく質や TOP mRNAs 以外の mRNA 種を検索することで、細胞の増殖と肥大化のメカニズムの解明が進むと考えられる。
 - ・ 創傷治癒への関与が知られている遺伝子のうち、少なくとも MMPs が受傷シグナルから繋がっていると予想される mTOR シグナル伝達系の影響を強く受けることが明らかとなった。MMP-2 および MMP-9 プロモーターに結合する転写因子 mRNAs の中で 2 種類が受傷後速やかに翻訳誘導されるが明らかとなり、細胞外のアミノ酸微小環境と細胞の翻訳ポテンシャルが創傷治癒の効率に影響を与えていることが示唆され、創傷治癒の効率を高めるためのターゲットとして、さらに詳細を検討する必要性が高まった。

3. 7 細胞成長を司るたんぱく質群の機能を制御する化合物の探索 (竹鼻健司グループ) : 味の素 (株) 医薬カンパニー医薬研究所 グループリーダー 竹鼻健司

(1) 実施の内容

細胞成長を司る mTOR シグナルは糖やアミノ酸などの栄養素や酸素分圧などの環境要因やホルモン、細胞増殖因子などによりその機能が制御される。とりわけアミノ酸は最も重要な制御因子のひとつであり、アミノ酸飢餓により細胞レベルでの mTOR の活性はほとんど完全に阻害される。アミノ酸によるシグナルが如何なる分子を介したセンシングメカニズムにより伝達されているかは依然として明らかではないが、細胞内でのアミノ酸濃度の上昇が、何らかのセンサーにより認識されて、シグナルの発生源になることが想定されている。一方で、由来となる臓器や細胞種により、細胞内へのアミノ酸取り込みや、細胞内でのアミノ酸代謝は特異性が知られており、このことから、mTOR の活性化に対する各種アミノ酸の効果は、臓器や細胞により異なることが考えられる。mTOR シグナル経路を活性化する素材としてのアミノ酸に着目して、mTOR の制御機能を指標にして細胞成長を制御する手法を開発することにより、人類の健康・医療上に有用な食品や医薬品などの製品開発につなげることを意図して研究に取り組んだ。さらに、アミノ酸が持つ様々な生理機能や薬理機能に対して細胞成長シグナル/mTOR シグナル伝達経路という軸でメカニズム研究を進めることにより、アミノ酸作用の特徴を最大限に活かした、より安全性が高く有効な投与法や適応症を提案できると考えた。

a) mTOR シグナルを制御するアミノ酸の検討

本研究を進めるにあたり、動物細胞培養用の培地中のアミノ酸の組成を様々に変換させた培養液ライブラリーを作製し、この培地ライブラリーを用いて、様々な細胞を用いて mTOR シグナルを活性化するために必要十分とされるアミノ酸の要求性を検討した。その際に、mTOR 下流因子のひとつである S6 kinase のリン酸化程度を指標にした。その結果、細胞種により微小ながらそのプロファイルが異なることが明らかとなった。いずれの細胞の場合でも、ロイシンが最も強い mTOR シグナルの活性化能を示すが、たとえば、肝細胞ではロイシンだけで十分な活性化が得られるのに対して、骨格筋由来細胞では、ロイシン単独では約 50 % 程度の活性化しか得られない。また、ある種の細胞では、メチオニンやアルギニンにも弱い mTOR シグナルの活性化が得られるが、別の細胞種においては、これらのアミノ酸が mTOR 活性化に対して何の影響も与えない。こうしたことから、アミノ酸から mTOR へのシグナルのインプットには複数の経路があることが想定され、臓器や細胞の違いにより、こうした経路を使い分けている可能性が示唆された。

b) アミノ酸の生理・薬理作用と mTOR シグナル

mTOR の活性化に中心的な役割を有しているロイシンは分岐鎖アミノ酸 (BCAA) と呼ばれるグループの一員であり、その構造及び生体内の代謝動態的には、他のアミノ酸とは異なる特徴がある。すなわち、BCAA はその代謝酵素の第一段階にあたるアミノ基転移酵素が肝臓にはほとんど発現していないために、経口から摂取され、小腸で吸収されたアミノ酸は初回に肝臓を通過した後、全身の臓器にいきわたる。BCAA の主たる代謝の場は、そのアミノ基転移酵素の局在から、骨格筋や心臓、すい臓、胃などや脳と考えられている。

ある種の疾患や病態においては、血中の BCAA 濃度が低下することが知られているが、たとえば、肝臓病においては、その局在を肝臓に持つ他の多くのアミノ酸代謝酵素の活性が低下する中で、BCAA の骨格筋での代謝は代償的に亢進するため、血中の BCAA 濃度は低下する。こうした血中アミノ酸のインバランスが、肝臓病の病態として特徴的な、栄養不全や脳神経系症状に及ぼす原因のひとつとも考えられている。肝臓病における BCAA の補充は、肝性脳症などの合併症の症状の緩和や、低アルブミン血症を改善することが知られており、わが国では、BCAA 顆粒製剤が非代償性肝硬変患者の低アルブミン血症の改善の目的で臨床的に用いられており、肝硬変患者の生命予後の改善や QOL の改善に寄与していることが知られている。肝硬変病態は

様々な合併症を伴う複合的な疾患と捉えられるが、BCAA が如何なる作用機序により、肝硬変の病態改善に貢献しているのか、その機序には細胞成長シグナル mTOR の関与があるのかどうかを、動物モデルや細胞をもちいた実験により検討を行った。その結果、これまでに次のような結論を得ている。BCAA の投与は肝臓内での mTOR シグナルの活性化を介して、肝硬変病態においても、肝でのアルブミン合成を促すことが明らかとなった。また、BCAA は骨格筋に働きかけ、ラパマイシンに耐性の mTOR 非依存的で PKC を介した新たなシグナルにより糖の取り込みを促進すること、骨格筋では mTOR を介してグリコーゲン合成酵素の活性を促進することも明らかにした。このように、BCAA は肝硬変病態において異常を来した、たんぱく質、アミノ酸、糖代謝の正常化に働き、そのときに mTOR などの細胞成長を促すシグナル伝達経路が極めて重要な役割を果たしている。最近では、ラパマイシンに感受性の無い新しい mTOR シグナルが、哺乳動物細胞内にも存在するとの報告もあり、こうした、BCAA の糖代謝やアミノ酸代謝への新たな生理作用が mTOR を介したもののなのかどうかに関しては、さらに慎重な検討を要する。

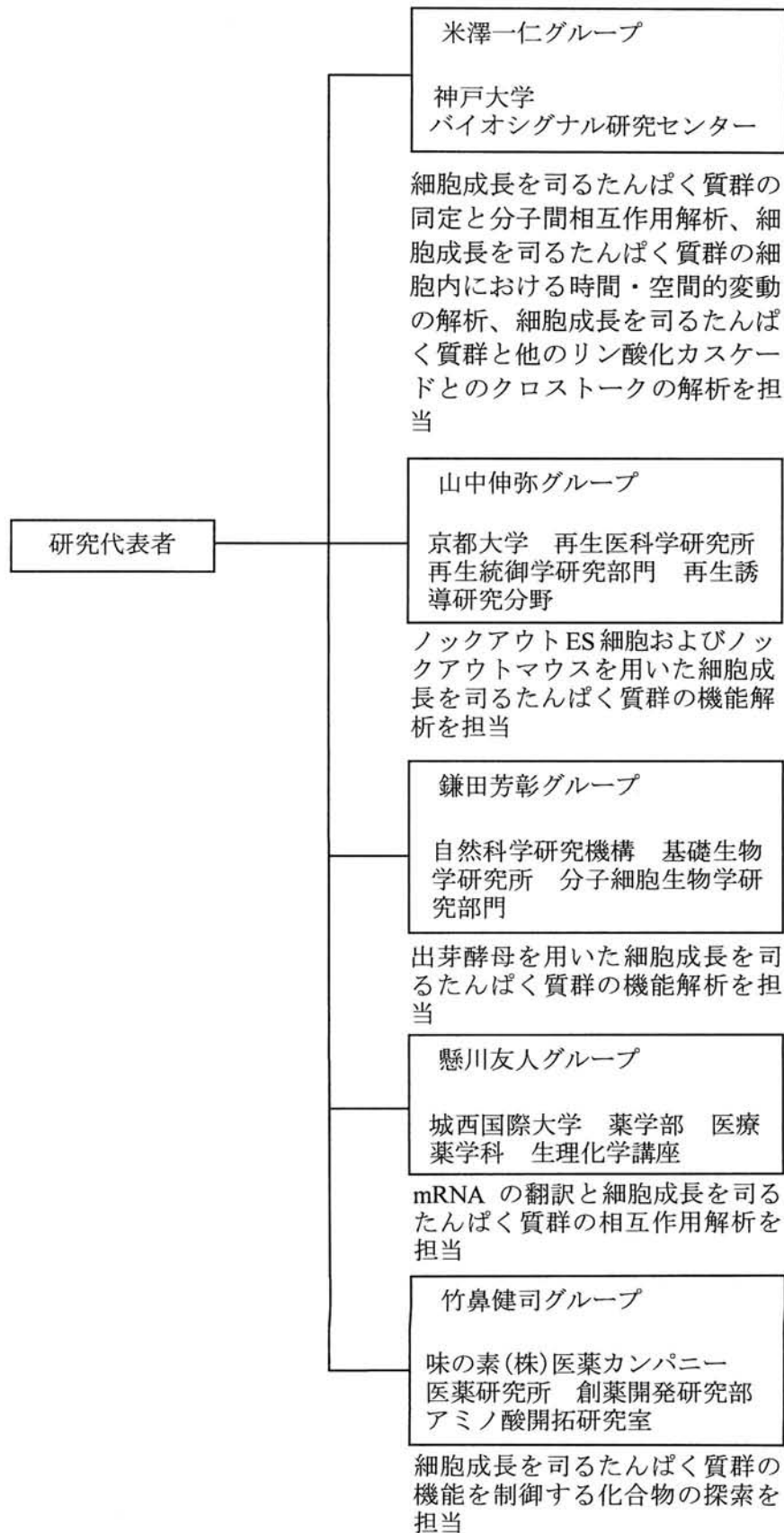
(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

これまでの研究結果から、アミノ酸栄養による mTOR の活性化には臓器や細胞種により、特異性が異なること、また、mTOR シグナルによる生理・薬理作用への寄与にも臓器、細胞種による差異があることが明らかになりつつある。mTOR を中心とした細胞成長シグナルの研究はまだ発展途上にあり、こうした研究成果を注視しながら、真に人類の福祉に貢献できる健康・医療分野での製品の開発につなげるべく、課題を明確にしていかなければならない。今後は、BCAA の生理作用を中心としたアミノ酸がもつ代謝・エネルギー調節作用における mTOR やその関連分子の役割について、さらに検討を行い、アミノ酸と各種の代謝調節機能分子群とのシグナル伝達経路のクロストークについて明らかにしたい。

アミノ酸は、従来考えられていたような、たんぱく質の構成成分・材料としての役割に加えて、種々の生理・薬理作用の調節に積極的に働きかけていることが明らかになりつつある。今後は、mTOR を中心とした栄養生理の分子メカニズムの研究の発展とともに、アミノ酸の持つ食経験に基づく高い安全性を活かした健康・医療分野における新製品の開発が期待される。

4 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

①米澤一仁グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
米澤 一仁	神戸大学バイオシグナル研究センター	教授	研究の統括	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
吉川 潮	神戸大学バイオシグナル研究センター	教授	たんぱく質リン酸化反応に関する研究指導	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
小野 功貴	神戸大学バイオシグナル研究センター	教授	たんぱく質リン酸化反応に関する研究指導	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
齋藤 尚亮	神戸大学バイオシグナル研究センター	教授	免疫蛍光染色を用いた研究指導	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
吉野 健一	神戸大学バイオシグナル研究センター	助手	質量分析法を用いたたんぱく質研究	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
大城 紀子	神戸大学バイオシグナル研究センター	助手	mTOR 結合たんぱく質の研究	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月
宮本 裕恵	神戸大学バイオシグナル研究センター	CREST 研究補助員	研究の補助	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
藤井 香織	神戸大学バイオシグナル研究センター	CREST 研究補助員	研究の補助	平成 15 年 10 月～ 平成 18 年 3 月
加藤 里絵	神戸大学バイオシグナル研究センター	CREST 研究補助員	研究の補助 (事務)	平成 16 年 5 月～ 平成 18 年 3 月
中嶋 昭雄	神戸大学バイオシグナル研究センター	神戸大学 COE 研究員	mTOR 結合たんぱく質の研究	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
竹村 久美	神戸大学バイオシグナル研究センター	派遣社員	研究の補助	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
原 賢太	神戸大学大学院医学系研究科	神戸大学 COE 研究員	Raptor 結合たんぱく質の研究	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
大路 剛	神戸大学大学院医学系研究科	D4	アミノ酸シグナルの研究	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
江口 賢史	神戸大学大学院医学系研究科	D3	細胞成長の研究	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
宮本 崇史	神戸大学大学院自然科学研究科	D2	mTOR シグナルの研究	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
谷村 圭子	神戸大学大学院医学系研究科	M2	mTOR シグナルの研究	平成 15 年 10 月～ 平成 18 年 3 月

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
小野 隆正	神戸大学大学院自然科学研究科	M1	アミノ酸シグナルの研究	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
内藤 武志	神戸大学理学部生物学科	4 年	アミノ酸シグナルの研究	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
徳永 千春	神戸大学バイオシグナル研究センター	助手	—	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 2 月
岩田 麻友子	神戸大学バイオシグナル研究センター	CREST 研究補助員	—	平成 16 年 4 月～ 平成 16 年 9 月
吉見 典子	神戸大学バイオシグナル研究センター	CREST 研究補助員	—	平成 15 年 10 月～ 平成 16 年 2 月
大塚 聡	神戸大学大学院医学系研究科	研究生	—	平成 16 年 4 月～ 平成 16 年 8 月
廣田 和子	神戸大学大学院医学系研究科	M2	—	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
岡本 澄子	神戸大学大学院自然科学研究科	M2	—	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
川西 一平	神戸大学大学院自然科学研究科	M2	—	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
高橋 里菜子	神戸大学大学院自然科学研究科	M2	—	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
村上 未玲	神戸大学大学院自然科学研究科	M2	—	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月

②山中伸弥グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
山中 伸弥	京都大学 再生医科学研究 所 再生統御 学 研究 部門 再生誘導研究 分野	教授	マウスにおける遺伝子 改変	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
村上 未玲	奈良先端科学 技術大学院大 学 バイオサ イエンス研究 科	D3	遺伝子改変マウスの解 析	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
飯田 純子	奈良先端科学 技術大学院大 学 遺伝子教 育研究センタ ー	CREST 研 究補助員	—	平成 15 年 4 月～ 平成 15 年 10 月

③鎌田芳彰グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
鎌田 芳彰	自然科学研究 機構 基礎生 物 学 研究 所 分子細胞生 物学研究部門	助手	出芽酵母を用いた TOR シグナル経路の解析	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

④懸川友人グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
懸川 友人	城西国際大学 薬学部 医療 薬学科 生理 化学講座	教授	実験創傷および成長因 子誘発による細胞の成 長に関わる転写因子の 同定	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
大内 希	城西国際大学 薬学部 医療 薬学科 生理 化学講座	助手	歯肉線維芽細胞の細胞 肥大へ関与する成長因 子の検討	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

⑤竹鼻健司グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
竹鼻 健司	味の素(株)医薬 カンパニー 医薬研究所 創薬開発研究 部 アミノ酸 開拓研究室	主任研究 員	細胞成長を司るたんぱ く質群を制御する化合 物の探索	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

5 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

年月日	名 称	場 所	参加人数	概要
平成 15 年 4 月 18 日	平成 15 年度 米澤チー ム研究参加者会議	神戸大学・ バイオシグ ナル研究セ ンター	10 名	各グループの代表者が集 まり、今後の研究体制につ いて、それぞれの役割を明 確にすることを目的とし た。今後の研究体制につ いて確認するとともに、研究 課題遂行にあたっての活 発な討論が行われた。
平成 15 年 4 月 18 日	第 4 回 PIKPK 研究会	神戸大学・ 神大会館六 甲ホール	32 名	mTOR が含まれる PI キナ ーゼ関連酵素 (PIKPK) フ ァミリーの国内の研究者 が集まり、それぞれの分野 の最新の知見の紹介を主 たる目的とした。各種 PIKPK ファミリーをすべ てカバーする分野の研究 者が参加し、活発な討論と 情報交換が行われた。
平成 15 年 10 月 18 日	第 76 回日本生化学会 大会 ワークショップ	パシフィコ 横浜	約 150 名	ラパマイシンの臨床応用 が進みつつある中、TOR シ グナルの研究の裾野が広 がりつつある。さまざまな 生物種で TOR シグナルを 解析している研究者の意 見交換の場を提供するこ とを目的とした。各演者よ り TOR シグナル研究の最 新の知見が紹介され、活 発な討論が行われるとと もに、約 150 名の聴衆が 参加し、TOR シグナル研 究への関心の高まりがう かがわれた。
平成 16 年 12 月 8 日	第 27 回日本分子生物 学会年会 ワークショ ップ	神戸ポート アイランド	約 250 名	臓器移植や虚血性心疾患 治療等様々な臨床医学 の場での利用が注目され ているラパマイシンの標 的たんぱく質 mTOR の細胞 内における機能解析に従 事する研究者の意見交換 の場を提供した。各演者 より TOR の細胞における 機能解析の最近の知見が 紹介され、活発で有意義 な討論が行われた。聴衆 は 250 名を超え、立ち見 が出るほどの関心の高 さであった。

(2) 招聘した研究者等

氏 名 (所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
該当なし			

6 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 26件、海外 58件)

米澤一仁グループ

(国内) 19件

- 1) 米澤一仁、吉野健一、徳永千春
細胞内ラパマイシン標的蛋白質 (mTOR) に結合する新規分子 raptor の同定と機能解析
ゲノムニュース 5, 22-25 (2003)
- 2) 米澤一仁
mTOR/raptor-p70S6 キナーゼ
栄養評価と治療 20 (2), 81-85 (2003)
- 3) 米澤一仁
ラプター (raptor)
生化学 75 (4), 323 (2003)
- 4) 徳永千春、吉野健一、原 賢太、米澤一仁
アミノ酸-mTOR-raptor シグナル伝達系の解明とインスリン作用
糖尿病学 2003, 21-31 (2003)
- 5) 酒井規雄、白井康仁、齋藤尚亮
ターゲティングを指標にしたプロテインキナーゼ C (PKC) の機能解析
日本薬理学雑誌 121 (6), 421-434 (2003)
- 6) 白井康仁、酒井規雄、齋藤尚亮
プロテインキナーゼ C のターゲティング機構
蛋白質核酸酵素 48 (9), 1241-1247 (2003)
- 7) 吉野健一、徳永千春、原 賢太、米澤一仁
細胞成長を司る情報伝達システムの中央情報集積装置 mTOR 複合体
蛋白質核酸酵素 48 (10), 1378-1385 (2003)
- 8) 大城紀子、吉野健一、徳永千春、米澤一仁
アミノ酸と細胞内シグナル伝達—蛋白質合成を中心に
栄養評価と治療 20 (5), 478-482 (2003)
- 9) 徳永千春、大城紀子、吉野健一、原 賢太、米澤一仁
ラパマイシン標的タンパク質 mTOR シグナル伝達系
細胞工学 23 (3), 340-348 (2004)

- 10) 中嶋昭雄、米澤一仁
細胞環境中のアミノ酸バランスを感知する mTOR シグナル伝達機構
BIO Clinica **19** (4), 18-22 (2004)
- 11) 吉野健一、大城紀子、徳永千春、米澤一仁
質量分析法と配列データベースを利用するタンパク質同定法
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. **52** (3), 106-129 (2004)
- 12) 米澤一仁
mTOR (mammalian Target of Rapamycin).
生体の科学 倍大特集 生体の科学の New Key Word **55** (5), 382-383 (2004)
- 13) 米澤一仁
肝臓病の最近の話題「mTOR」について
Liv 日常診療に診る肝臓病治療 **6**, 11 (2004)
- 14) 山本利義、松崎秀紀、吉川 潮
プロテインキナーゼ活性測定法
実験医学別冊 培養細胞実験ハンドブック 細胞培養の基本と解析法のすべて
(2004)
- 15) 白井康仁、齋藤尚亮
糖尿病性血管合併症とジアシルグリセロールキナーゼ
日本薬理学雑誌 **124** (2), 128 (2004)
- 16) 米澤一仁
ラパマイシン
臨床免疫学 (下), 718-722 (2005)
- 17) 吉野健一
質量分析による蛋白質同定法
日本細菌学雑誌 **60** (2), 397-417 (2005)
- 18) 吉野健一、大城紀子、米澤一仁
細胞成長を制御するラパマイシン標的タンパク質 mTOR 複合体
実験医学 **23** (12), 1939-1945 (2005)
- 19) 原 賢太、米澤一仁
mTOR シグナルの分子メカニズムと生理的役割
最新医学 **60** (7), 53-60 (2005)

(海外) 4 4 件

- 1) Kikkawa, U., Matsuzaki, H., and Yamamoto, T.
Protein Kinase C δ (PKC δ): Activation mechanisms and functions.
J. Biochem. **132** (6), 831-839 (2002)
- 2) Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B.E., Witters, L.A., Mimura, O., and Yonezawa, K.
A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway.
Genes Cells **8** (1), 65-79 (2003)

- 3) Hidayat, S., Yoshino, K., Tokunaga, C., Hara, K., Matsuo, M., and Yonezawa, K.
Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **301** (2), 417-423 (2003)
- 4) Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K.
The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif.
J. Biol. Chem. **278** (18), 15461-15464 (2003)
- 5) Shindo, M., Irie, K., Masuda, A., Ohigashi, H., Shirai, Y., Miyasaka, K., and Saito, N.
Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes: DGK γ and DGK β are new targets of tumor-promoting phorbol esters.
J. Biol. Chem. **278** (20), 18448-18454 (2003)
- 6) Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., and Hirayama, T.
Protein-tyrosine phosphatase α , RPTP α , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor.
J. Biol. Chem. **278** (21), 19183-19189 (2003)
- 7) Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A.
Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1.
Nat. Cell Biol. **5** (5), 427-432 (2003)
- 8) Nishizuka, Y., and Kikkawa, U.
Early studies of protein kinase C: A historical perspective.
Methods Mol. Biol. **233**, 9-18 (2003)
- 9) Mukai, H., and Ono, Y.
Expression and purification of protein kinase C from insect cells.
Methods Mol. Biol. **233**, 21-34 (2003)
- 10) Saito, N.
Fluorescence imaging of protein kinase C translocation in living cells.
Methods Mol. Biol. **233**, 93-103 (2003)
- 11) Takahashi, M., and Ono, Y.
Pulse-chase analysis of protein kinase C.
Methods Mol. Biol. **233**, 163-170 (2003)
- 12) Yamamoto, T., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Matsuzaki, H., and Kikkawa, U.
Tyrosine phosphorylation of protein kinase C.
Methods Mol. Biol. **233**, 207-216 (2003)
- 13) Fredholm, B.B., Assender, J.W., Irenius, E., Kodama, N., and Saito, N.
Synergistic effects of adenosineA₁ and P2Y receptor stimulation on calcium mobilization and PKC translocation in DDT₁ MF-2 cells.
Cell. Mol. Neurobiol. **23** (3), 379-400 (2003)

- 14) Yonezawa, K.
Identification of TOR-interacting proteins.
Mol. Interv. **3** (4), 189-193 (2003)
- 15) Oka, M., Okada, T., Nakamura, S., Ohba, M., Kuroki, T., Kikkawa, U., Nagai, H., Ichihashi, M., and Nishigori, C.
PKC δ inhibits PKC α -mediated activation of phospholipase D1 in a manner independent of its protein kinase activity.
FEBS Lett. **554** (1-2), 179-183 (2003)
- 16) Yonezawa, K., Yoshino, K., Tokunaga, C., and Hara, K.
Kinase activities associated with mTOR.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279**, 271-282 (2004)
- 17) Yonezawa, K., Tokunaga, C., Oshiro, N., and Yoshino, K.
Raptor, binding partner of target of rapamycin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313** (2), 437-441 (2004)
- 18) Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yonezawa, K.
mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313** (2), 443-446 (2004)
- 19) Yagi, K., Shirai, Y., Hirai, M., Sakai, N., and Saito, N.
Phospholipase A2 products retain a neuron specific γ isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain -a molecular mechanism for sustained enzyme activity.
Neurochem. Int. **45** (1), 39-47 (2004)
- 20) Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K.
Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function.
Genes Cells **9** (4), 359-366 (2004)
- 21) Matsuzaki, H., Yamamoto, T., and Kikkawa, U.
Distinct activation mechanisms of protein kinase B by growth-factor stimulation and heat-shock treatment.
Biochemistry **43** (14), 4284-4293 (2004)
- 22) Gotoh, Y., Oishi, K., Shibata, H., Yamagiwa, A., Isagawa, T., Nishimura, T., Goyama, E., Takahashi, M., Mukai, H., and Ono, Y.
Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF- κ B signaling pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **314** (3), 688-694 (2004)
- 23) Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., and Nawa, H.
Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites.
J. Neurosci. **24** (44), 9760-9769 (2004)
- 24) Yonezawa, K.
mTOR signaling pathway.
Hepatol. Res. **30S**, S9-S13 (2004)

- 25) Kajimoto, T., Shirai, Y., Sakai, Y., Yamamoto, T., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., and Saito, N.
Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation, and activation of protein kinase C δ in the Golgi complex.
J. Biol. Chem. **279** (13), 12668-12676 (2004)
- 26) Ueyama, T., Lennartz, M.R., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., and Saito, N.
Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through β I protein kinase C during Fc γ R-mediated phagocytosis in microglia.
J. Immunol. **173** (7), 4582-4589 (2004)
- 27) Sakai, N., Tsubokawa, H., Matsuzaki, M., Kajimoto, T., Takahashi, E., Ren, Y., Ohmori, S., Shirai, Y., Matsubayashi, H., Chen, J., Duman, R.S., Kasai, H., and Saito, N.
Propagation of γ PKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in γ PKC-GFP transgenic mice.
Genes Cells **9** (10), 945-957 (2004)
- 28) Kuriyama, M., Taniguchi, T., Shirai, Y., Sasaki, A., Yoshimura, A., and Saito, N.
Activation and translocation of PKC δ is necessary for VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **325** (3), 843-851 (2004)
- 29) Yonezawa, K.
Mammalian target of rapamycin (mTOR).
NASH and Nutritional Therapy (Okita, K. (Ed.)) 92-99 (2005)
- 30) Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H-S., Mukai, H., and Ono, Y.
Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex.
Genes Cells **10** (1), 75-86 (2005)
- 31) Seki, T., Matsubayashi, H., Amano, T., Shirai, Y., Saito, N., and Sakai, N.
Phosphorylation of PKC activation loop plays an important role in receptor-mediated translocation of PKC.
Genes Cells **10** (3), 225-239 (2005)
- 32) Fukunaga-Takenaka, R., Shirai, Y., Yagi, K., Adachi, N., Sakai, N., Merino, E., Merida, I., and Saito, N.
Importance of chroman ring and tyrosine phosphorylation in the subtype-specific translocation and activation of diacylglycerol kinase α by D- α -tocopherol.
Genes Cells **10** (4), 311-319 (2005)
- 33) Sakakibara, K., Sato, K., Yoshino, K., Oshiro, N., Hirahara, S., Hasan, A.K.M.M., Iwasaki, T., Ueda, Y., Iwao, Y., Yonezawa, K., and Fukami, Y.
Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization.
J. Biol. Chem. **280** (15), 15029-15037 (2005)

- 34) Hayashi, S., Ueyama, T., Kajimoto, T., Yagi, K., Kohmura, E., and Saito, N.
Involvement of γ PKC in estrogen-induced neuroprotection on focal brain ischemia through G protein-coupled estrogen receptor.
J. Neurochem., **93** (4), 883-891 (2005)
- 35) Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J.
Rheb binds and regulates the mTOR kinase.
Curr. Biol. **15** (8), 702-713 (2005)
- 36) Nakauchi, M., Yoshino, K., Yonezawa, K., and Suzuki, N.
Involvement of general transcriptional coactivator PC4 in the transcription of medaka fish intestine-specific membrane guanylyl cyclase gene (OIGC6).
J. Biochem. **137** (4), 509-515 (2005)
- 37) Isagawa, T., Takahashi, M., Kato T.Jr., Mukai, H., and Ono, Y.
Involvement of protein kinase PKN1 in G2/M delay caused by arsenite.
Mol. Carcinog. **43** (1), 1-12 (2005)
- 38) Abdel-Raheem, I.T., Hide, I., Yanase, Y., Shigemoto-Mogami, Y., Sakai, N., Shirai, Y., Saito, N., Hamada, F.M., El-Mahdy, N.A., Elsisy, A.E.-D.E., Sokar, S.S., and Nakata, Y.
Protein kinase C- α mediates TNF release process in RBL-2H3 mast cells.
Br. J. Pharmacol. **145** (4), 415-423 (2005)
- 39) Taguchi, K., Yoshinaka, K., Yoshino, K., Yonezawa, K., and Maekawa, S.
Biochemical and morphologic evidence of the interaction of oligodendrocyte membrane rafts with actin filaments.
J. Neurosci. Res. **81** (2), 218-225 (2005)
- 40) Mukai, H., Isagawa, T., Goyama, E., Tanaka, S., Bence, N.F., Tamura, A., Ono, Y., and Kopito, R.R.
Formation of morphologically similar globular aggregates from diverse aggregation-prone proteins in mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** (31), 10887-10892 (2005)
- 41) Seki, T., Adachi, N., Ono, Y., Mochizuki, H., Hiramoto, K., Amano, T., Matsubayashi, H., Matsumoto, M., Kawakami, H., Saito, N., and Sakai, N.
Mutant protein kinase Cy found in spinocerebellar ataxia type 14 is susceptible to aggregate and cause cell death.
J. Biol. Chem. **280** (32), 29096-29106 (2005)
- 42) Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M.R., Takeya, R., Sumimoto, H., and Saito, N.
Isoform-specific membrane targeting mechanism of Rac during Fc γ R-mediated phagocytosis: Positive charge-dependent and independent targeting mechanism of Rac to the phagosome.
J. Immunol. **175** (4), 2381-2390 (2005)
- 43) Adachi, N., Oyasu, M., Taniguchi, T., Yamaguchi, Y., Takenaka, R., Shirai, Y., and Saito N.
Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain.
Mol. Brain Res. **139** (2), 288-299 (2005)

- 44) Sato, K., Yoshino, K., Tokmakov, A.A., Iwasaki, T., Yonezawa, K., and Fukami, Y.
Signal transduction of egg fertilization: Focused proteomics on membrane/lipid rafts.
Methods Mol. Biol. in press (2005)

山中伸弥グループ

(国内) 3 件

- 1) 高橋和利、山中伸弥
ES 細胞の腫瘍形成能を促進する新規 Ras 遺伝子 ERas
細胞工学 **22 (7)**, 768-769 (2003)
- 2) 三井 薫、徳沢佳美、山中伸弥
分化多能性維持に必須のホメオプロテイン Nanog
細胞工学 **22 (7)**, 770-771 (2003)
- 3) 高橋和利、山中伸弥
ES 細胞で特異的に機能する “癌遺伝子” ERas
実験医学 **21 (13)**, 1757-1759 (2003)

(海外) 3 件

- 1) Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S.
mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells.
Mol. Cell. Biol. **24 (15)**, 6710-6718 (2004)
- 2) Wang, X., Beugnet, A., Murakami, M., Yamanaka, S., and Proud, C.G.
Distinct signaling events downstream of mTOR co-operate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins.
Mol. Cell Biol. **25 (7)**, 2558-2572 (2005)
- 3) Takahashi, K., Nakagawa, M., Young, S.G., and Yamanaka, S.
Differential membrane localization of ERas and Rheb, Two Ras-related proteins involved in the PI3 kinase / mTOR pathway.
J. Biol. Chem. **280 (38)**, 32768-32774 (2005)

鎌田芳彰グループ

(国内) 0 件

(海外) 5 件

- 1) Suzuki, N., Kamada, Y., and Ohsumi, Y.
Studies of cargo delivery to the vacuole mediated by autophagosomes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Dev. Cell **3 (6)**, 815-824 (2002)

- 2) Kamada, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y.
Autophagy in Yeast: A TOR-mediated response to nutrient starvation.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279**, 73-84 (2004)
- 3) Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., and Ohsumi, Y.
Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy.
Mol. Biol. Cell **16** (5), 2544-2553 (2005)
- 4) Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N. N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y.
TOR2 directly phosphorylates the AGC YPK2 to regulate actin polarization.
Mol. Cell. Biol. **25** (16), 7239-7248 (2005)
- 5) Kawamata, T., Kamada, Y., Suzuki, K., Oota, S., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.
Characterization of a novel autophagy specific gene, ATG29.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **338** (4), 1884-1889 (2005)

懸川友人グループ

(国内) 4 件

- 1) 懸川友人、根本麻代、松田 恵、斎藤浩美、小林 弘
ラパマイシンの NF- κ B 誘導作用
Jpn. J. Antibiot. **56** (Suppl. A), 97-99 (2003)
- 2) 松田 恵、後藤亜耶乃、斎藤浩美、小林 弘、懸川友人
スピラマイシンの細胞増殖抑制作用
Jpn. J. Antibiot. **56** (Suppl. A), 121-123 (2003)
- 3) 懸川友人、平田 悟、斎藤浩美、小林 弘
ラパマイシンによる mRNA 選択的な翻訳抑制への hnRNP D の関与
Jpn. J. Antibiot. **57** (Suppl. A), 88-91 (2004)
- 4) 懸川友人、大内 希、額賀路嘉、砂塚敏明、大村 智
「新規マクロライド誘導体 EM703 の生物評価」TOP mRNAs 翻訳系に及ぼす影響
について
Jpn. J. Antibiot. **58** (Suppl. A), 77-79 (2005)

(海外) 2 件

- 1) Lao, Q., Kuge, O., Fukamachi, T., Kakegawa, T., Saito, H., Nishijima, M., and Kobayashi, H.
An IkB- β COOH terminal region protein is essential for the proliferation of CHO cells under acidic stress.
J. Cell. Physiol. **203** (1), 186-192 (2005)
- 2) Ohsawa, M., Ohuchi, N., Taniguchi, Y., Kizawa, Y., Koike, K., Iwamoto, K., Hayashi, K., and Murakami, H.
Inhibition of angiotensin II- and endothelin-1-stimulated proliferation by selective MEK inhibitor in cultured rabbit gingival fibroblasts.
Fundam. Clin. Pharmacol. **19**(6), 677-686 (2005)

竹鼻健司グループ

(国内) 0 件

(海外) 4 件

- 1) Nishitani, S., Takehana, K., Fujitani, S., and Sonaka, I.
Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **288** (6), G1292-1300 (2004)
- 2) Nishitani, S., and Takehana, K.
Pharmacological activities of branched-chain amino acids: Augmentation of albumin synthesis in liver and improvement of glucose metabolism in skeletal muscle.
Hepatol. Res. **30S**, 19-24 (2004)
- 3) Nishitani, S., Ijichi, C., Takehana, K., Fujitani, S., and Sonaka, I.
Pharmacological activities of branched-chain amino acids: Specificity of tissue and signal transduction.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313** (2), 387-389 (2004)
- 4) Matsumura, T., Morinaga, Y., Fujitani, S., Takehana, K., Nishitani, S., and Sonaka, I.
The oral administration of BCAA activates the mTOR signal in cirrhotic rat liver.
Hepatol. Res. **in press** (2005)

(2) 口頭発表

- ①招待、口頭発表 (国内 60 件、海外 10 件)
- ②ポスター発表 (国内 44 件、海外 11 件)
- ③プレス発表 0 件

米澤一仁グループ

- ①招待、口頭発表 (国内 46 件、海外 7 件)

- 1) 米澤一仁、吉野健一、徳永千春、原 賢太 (神戸大・バイオシグナル研)
アミノ酸バランスを感知して細胞成長を制御する mTOR Signaling
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日
- 2) 吉野健一、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
質量分析法とコンセンサス配列データベースを利用する新規蛋白質の探索
大阪大学蛋白質研究所セミナー「プロテオーム・ペプチドーム最前線」(大阪)
平成 15 年 2 月 6 日～7 日
- 3) 吉野健一、原 賢太、大城紀子、Sujuti Hidayat、徳永千春、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
ヒトプロテオミクス研究のための EST コンセンサス配列データベースの有効利用
第一回ヒトプロテオーム学会 (つくば) 平成 15 年 2 月 13 日～14 日

- 4) Yonezawa, K., Tokunaga, C., and Yoshino, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Identification and characterization of Raptor, a novel binding partner of mTOR.
Conference for Patho-Physiological Aspects of BCAA (Tokyo, Japan), March 28-29, 2003
- 5) Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Crosstalk between energy sensing system and mTOR signaling pathway.
Conference for Patho-Physiological Aspects of BCAA (Tokyo, Japan), March 28-29, 2003
- 6) 江口賢史、野島洋樹、徳永千春、大城紀子、吉野健一、原 賢太、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR 結合分子 raptor は TOS motif を介して mTOR 基質蛋白と結合する
第 4 回 PIKPK 研究会 (神戸) 平成 15 年 4 月 18 日
- 7) 吉野健一 (神戸大・バイオシグナル研)
分岐鎖アミノ酸シグナル伝達系の中核分子 mTOR に結合し、その活性を制御する新規分子 raptor の同定と機能解析
第 39 回日本肝臓学会総会サテライトシンポジウム 第 5 回「AJINOMOTO Award」
受賞記念講演会 (福岡) 平成 15 年 5 月 22 日
- 8) Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Cellular functions and molecular mechanisms of signaling pathways mediated by target of rapamycin.
CDB Seminar (Kobe, Japan), June 23, 2003
- 9) 吉野健一 (神戸大・バイオシグナル研)
質量分析法と配列データベースを利用した蛋白質の同定
第 30 回 BMS コンファレンス (淡路) 平成 15 年 7 月 6 日～9 日
- 10) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
細胞成長システム制御因子分子情報の集積と構築
2003 年度特定「ゲノム」4 領域合同班会議 (福岡) 平成 15 年 8 月 20 日～22 日
- 11) Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Visualization of PKC translocation in brain slice.
The 7th Membrane Research Forum (Nagoya, Japan), August 20, 2003
- 12) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR 結合分子 raptor と mTOR 基質蛋白間の結合様式の解析
第 62 回日本癌学会総会 (名古屋) 平成 15 年 9 月 25 日～27 日
- 13) Yonezawa, K.¹, Tokunaga, C.¹, Hara, K.², and Yoshino, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.,
²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
Cellular signaling through an mTOR-containing complex.
第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日
- 14) Kikkawa, U. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Activation mechanisms of protein kinase B and protein kinase C.
Mini-Symposium on Cell Signaling and Gene Expression (Taiwan), October 22, 2003
- 15) Shirai, Y., and Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Regulation of PKC targeting.
Mini-Symposium on Cell Signaling and Gene Expression (Taiwan), October 22, 2003

- 16) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
エネルギー感知系と **mTOR** シグナル伝達系のクロストークについての研究
肝臓栄養シンポジウム-BCAA 製剤の 15 年の歩みと将来- (東京) 平成 15 年 11 月 1 日
- 17) Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Nutrient-dependent regulation of intracellular signaling pathways in hepatocytes.
15th Yamaguchi Symposium on Liver Disease (Yamaguchi, Japan), December 6-7, 2003
- 18) 大城紀子、吉野健一、徳永千春、江口賢史、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
Rapamycin による mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル抑制機構
第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 15 年 12 月 10 日～13 日
- 19) Yoshino, K., Tokunaga, C., and Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Mass spectrometric identification and functional analysis of novel protein components of mTOR (mammalian target of rapamycin) complex.
第 8 回日韓がん研究ワークショップ (沖縄) 平成 15 年 12 月 19 日～20 日
- 20) Kikkawa, U. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Introduction of the PKC family.
Conference on lipid messenger signaling, The First COE International Meeting (Kobe, Japan), January 26-28, 2004
- 21) 齋藤尚亮 (神戸大・バイオシグナル研)
ライブイメージングからわかるプロテインキナーゼ C の新たな機能
アイソトープ放射線薬学研究会 (大阪) 平成 16 年 3 月 29 日
- 22) 松崎秀紀、山本利義、吉川 潮 (神戸大・バイオシグナル研)
Distinct activation mechanisms of protein kinase B by growth factor stimulation and heat shock treatment.
第 5 回日英細胞周期国際会議 (奈良) 平成 16 年 4 月 14 日
- 23) 小野功貴 (神戸大・バイオシグナル研)
タンパク質リン酸化酵素 **PKN** の細胞増殖制御における機能
神戸大学 21 世紀 COE プログラム「蛋白質のシグナル伝達機能」第 1 回合同会議 (神戸)
平成 16 年 4 月 30 日
- 24) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
RNA 翻訳制御スイッチとして働くラパマイシン標的蛋白 mTOR シグナルの研究
文部科学省科学研究費特定領域研究「RNA 情報網」二班「RNA スイッチ」班会議 (東京)
平成 16 年 5 月 22 日～23 日
- 25) Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
mTOR and its binding partner, raptor.
Workshop on the proteins controlling cell growth and their role in tumour formation: mTOR, TSC and PTEN (Madrid, Spain), May 23-26, 2004

- 26) 吉野健一¹、佐藤賢一²、大城紀子¹、榊原圭一²、徳永千春¹、深見泰夫²、米澤一仁¹ (¹神戸大・バイオシグナル研、²神戸大・遺伝子実験センター)
EST コンセンサス配列データベースを用いた新規チロシンリン酸化蛋白質の同定
第 52 回質量分析総合討論会 (名古屋) 平成 16 年 6 月 2 日～4 日
- 27) Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
PKC targeting mechanism and its physiological significance.
The Annual Meeting of the ASBMB and the 8th Conf. of the IUBMB (Boston, USA), June 12-16, 2004
- 28) 白井康仁¹、中村朋文¹、秀 和泉²、仲田義啓²、齋藤尚亮¹ (¹神戸大・バイオシグナル研、²広島大・院・医歯薬学総合)
イメージングによるヒスタミン分泌における PKC の機能解析
第 105 回日本薬理学会近畿部会 (徳島) 平成 16 年 6 月 17 日
- 29) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR シグナル伝達系についての最近の話題
第 11 回肝細胞研究会 ランチョンセミナー (宇部) 平成 16 年 7 月 2 日
- 30) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
ラパマイシンの細胞内標的蛋白 mTOR を介するシグナル伝達機構について
第 23 回神戸虚血性心疾患セミナー (神戸) 平成 16 年 7 月 16 日
- 31) Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Visualization of PKC signaling.
12th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (San Diego, USA), July 27, 2004
- 32) 周 静¹、原 賢太¹、神田水鈴¹、山田克己¹、安田尚史¹、森山啓明¹、永田正男¹、米澤一仁² (¹神戸大・医・老年内科、²神戸大・バイオシグナル研)
栄養環境感知システムとして機能する mTOR シグナルにおける Raptor の役割
神戸大学 21 世紀 COE プログラム「糖尿病をモデルとしたシグナル伝達病」第 2 回研究討論会 (淡路) 平成 16 年 7 月 30 日
- 33) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
アミノ酸情報感知伝達システムを担う分子情報の集積と構築
2004 年度「特定」ゲノム 4 領域合同班会議 (神戸) 平成 16 年 8 月 18 日～20 日
- 34) 吉川 潮 (神戸大・バイオシグナル研)
熱ショックによる蛋白質リン酸化酵素 PKB の活性化機構
日本ハイパーサーミア学会 第 21 回大会 (京都) 平成 16 年 9 月 25 日
- 35) 齋藤尚亮、白井康仁、山口泰人、松原岳大 (神戸大・バイオシグナル研)
DGK と PKC の分子機能協関の解析
平成 16 年度生理学研究所研究会 (岡崎) 平成 16 年 10 月 7 日～8 日

- 36) Fukami, Y.^{1,2}, Sakakibara, K.², Iwasaki, T.¹, Yoshino, K.³, Satou, K.¹, and Yonezawa, K.³
(¹Res. Ctr. Environ. Genom., Kobe Univ., ²The Grad. Sch. Sci. Tech. Kobe Univ., ³Biosig. Res. Ctr. Kobe Univ.)
Molecular identification of uroplakin III as a raft protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization of *Xenopus* eggs.
第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 37) Eguchi, S.¹, Tokunaga, C.¹, Oshiro, N.¹, Nakashima, A.¹, Hara, K.², Yoshino, K.¹, and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. Med.)
Binding between 4EBP1 and raptor is regulated by mTOR phosphorylation of 4EBP1.
第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 38) 米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
ラパマイシンの細胞内標的蛋白 mTOR を介するシグナル伝達機構
OMCC セミナー (大阪府立成人病センター) (大阪) 平成 16 年 10 月 22 日
- 39) 齋藤尚亮 (神戸大・バイオシグナル研)
PKC のイメージングによる情報伝達機構の時空間解析
自律神経学会 (長崎) 平成 16 年 10 月 28 日～29 日
- 40) 吉野健一 (神戸大・バイオシグナル研)
エレクトロスプレーイオン化-四重極-飛行時間型質量分析計の魅力
ジャスコインタナショナル プロテオームセミナー 平成 16 年 11 月 2 日 (東京)、11 月 5 日 (大阪)
- 41) 齋藤尚亮 (神戸大・バイオシグナル研)
PKC シグナリングとその生理的意義
バイオイメージング学会 (京都) 平成 16 年 11 月 6 日
- 42) Kikkawa, U. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
PKC: Initial studies and current topics.
Mini-Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, National Cheng Kung University (Tainan, Taiwan), November 23-25, 2004
- 43) Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Molecular mechanism of PKC targeting and physiological significance in cellular responses.
Mini-Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, National Cheng Kung University (Tainan, Taiwan), November 23-25, 2004
- 44) 米澤一仁、大城紀子、中嶋昭雄、江口賢史、徳永千春、吉野健一 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR を介し細胞機能を制御するシグナル伝達系の研究
第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日～11 日
- 45) 稲村直子¹、那波宏之¹、原 賢太²、米澤一仁³、武井延之¹ (¹新潟大・脳研、²神戸大・医・老年内科、³神戸大・バイオシグナル研)
神経細胞における mTOR シグナルによる翻訳調節と脳機能への関与
第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日～11 日

- 46) Takei, N.¹, Inamura, N.¹, Qi, S.¹, Mizuno, M.¹, Namba, H.¹, Hara, K.³, Yonezawa, K.², and Nawa, H.¹ (¹Niigata Univ., Brain Res. Inst., ²Kobe Univ., Biosig. Res. Ctr., ³Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. Med.)

mTOR-mediated translational activation during the learning paradigm.

第27回日本分子生物学会年会（神戸） 平成16年12月8日～11日

- 47) 原 賢太（神戸大・医・老年内科）

アミノ酸バランス感知システムとして機能する mTOR シグナル伝達系と蛋白合成・細胞成長

第17回肝再生研究会（東京） 平成16年12月17日

- 48) 大城紀子（神戸大・バイオシグナル研）

mTOR を介する細胞内シグナル伝達機構について

神戸大学 21 世紀 COE プログラム「蛋白質のシグナル伝達機能」 定期学術会合（神戸） 平成17年3月18日

- 49) 大 路 剛^{1,2}, Sujuti Hidayat¹, 中嶋昭雄¹, 吉野健一¹, 大城紀子¹, 吉川 潮¹, 米澤一仁¹ (¹神戸大・バイオシグナル研, ²神戸大・院・医・老年内科)

mTOR シグナリングに対する分子シャペロン Hsp90 の寄与

第52回日本生化学会近畿支部例会（神戸） 平成17年5月28日

- 50) 山本利義、梶本（馬田）さやか、吉川 潮（神戸大・バイオシグナル研）

酸化ストレスによる PKC δ 分子種が受ける修飾と活性調節機構

第52回日本生化学会近畿支部例会（神戸） 平成17年5月28日

- 51) 松崎秀紀¹, 林 忠紘², 山本利義¹, 吉川 潮¹ (¹神戸大・バイオシグナル研, ²神戸大・院・自然科学)

PKB による FOXO4 (AFX) 転写因子の制御機構の解析

第52回日本生化学会近畿支部例会（神戸） 平成17年5月28日

- 52) 原 賢太（神戸大・医・老年内科）

mTOR シグナルの役割

神戸大学 21 世紀 COE プログラム「糖尿病をモデルとしたシグナル伝達病」第3回研究討論会（淡路） 平成17年7月21日

- 53) 齋藤尚亮（神戸大・バイオシグナル研）

PKC ターゲティングの重要性と PKC 作用薬スクリーニングへの応用

第6回創薬ビジョンシンポジウム（東京） 平成17年7月22日

②ポスター発表 （国内 32件、海外 6件）

- 1) 吉野健一、原 賢太、大城紀子、丸木佳子、Sujuti Hidayat、徳永千春、米澤一仁（神戸大・バイオシグナル研）

新規 mTOR 結合蛋白質 p150^{Raptor} の精製と質量分析法による同定・構造解析

第25回日本分子生物学会年会（横浜） 平成14年12月11日～14日

- 2) Sujuti Hidayat、原 賢太、丸木佳子、吉野健一、徳永千春、米澤一仁（神戸大・バイオシグナル研）

新規 mTOR 結合蛋白質 p150^{Raptor} の mTOR-p70^{S6K} Signaling における機能の解析

第25回日本分子生物学会年会（横浜） 平成14年12月11日～14日

- 3) 丸木佳子、原 賢太、Sujuti Hidayat、吉野健一、徳永千春、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
新規 mTOR 結合蛋白質 p150^{Raptor} の mTOR-4EBP1 Signaling における機能の解析
 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日

- 4) 甘 翔¹、北川 円²、吉野健一³、米澤一仁³、加藤晃弘⁴、井上弘一⁴、磯野克己^{1,2}
 (¹神戸大・院・自然科学、²神戸大・理、³神戸大・バイオシグナル研、⁴埼玉大・理・遺伝)
ミトコンドリアリボソームの比較解析：構成と機能の進化
 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日

- 5) 市野 晃、松崎秀紀、山本利義、吉川 潮 (神戸大・バイオシグナル研)
転写因子 AFX の PI 3-kinase/PKB 経路によるリン酸化反応と細胞内局在の制御
 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日

- 6) 力武恭子、上山健彦、衛藤三佳、白井康仁、齋藤尚亮 (神戸大・バイオシグナル研)
受容体特異的な γ PKC オシレーションの制御機構
 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋) 平成 15 年 7 月 23 日～25 日

- 7) Eguchi, S.¹, Tokunaga, C.¹, Nojima, H.¹, Oshiro, N.¹, Yoshino, K.¹, Hara, K.², and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
mTOR binding protein, raptor, binds to mTOR substrates via TOS motif.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 8) Okamoto, S.¹, Yoshino, K.¹, Tokunaga, C.¹, Oshiro, N.¹, Hara, K.², Avruch, J.³, and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med., ³MGH, Harvard Univ.)
The seven WD-repeats protein Gable is one of components of mTOR complex.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 9) 大庭春奈、松崎秀紀、金城慶子、山本利義、吉川 潮 (神戸大・バイオシグナル研)
The interaction between PKB and HSP27 induced by heat shock.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 10) 金城慶子、松崎秀紀、大庭春奈、山本利義、吉川 潮 (神戸大・バイオシグナル研)
The structure and activation mechanisms of the PKB family.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 11) Mochida, Y., Shirai, Y., Matsubara, T., Kuriyama, M., Oshiro, N., Yoshino, K., Yonezawa, K., Ono, Y., and Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Functional and molecular interaction between DGK γ and γ PKC.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 12) Takahashi, M., and Ono, Y. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
The role of CG-NAP (centrosome and Golgi localized PKN-associated protein) in the nucleation of microtubules from the centrosome.
 第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

- 13) Mochida, Y., Shirai, Y., Matsubara, T., Kuriyama, M., Ohshiro, N., Yoshino, K., Yonezawa, K., Ono, Y., and Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Direct binding and phosphorylation of two purkinje cell-enriched kinases, DGK γ and γ PKC, regulate their spatio-temporal activities.
 Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), November 8-12, 2003
- 14) Eguchi, S., Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yonezawa, K. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif.
 The New Frontier of RNA Science (Kyoto, Japan), November 24-27, 2003
- 15) 有田恭子¹、甘 翔²、吉野健一³、米澤一仁³、加藤晃弘⁴、井上弘一⁴、北川 円²
 (¹神戸大・院・自然科学、²神戸大・理・生物、³神戸大・バイオシグナル研、⁴埼玉大・理・遺伝)
ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子の構造と機能：比較解析と進化的意義
 第26回日本分子生物学会年会(神戸) 平成15年12月10日～13日
- 16) Sakakibara, K.¹, Yoshino, K.², Oshiro, N.², Hirahara, S.¹, Nishihira, Y.¹, Fukuda, T.¹, Hassan, A.K.M.M.¹, Iwasaki, T.³, Sato, K.³, Yonezawa, K.^{1,2}, and Fukami, Y.^{1,3} (¹The Grad. Sch. Sci. Tech., ²Biosig. Res. Ctr., ³Res. Ctr. Environ. Genom., Kobe Univ.)
Molecular identification of *Xenopus* egg uroplakin III that localizes to rafts and is tyrosine-phosphorylated upon fertilization.
 第26回日本分子生物学会年会(神戸) 平成15年12月10日～13日
- 17) 後藤祐輔、大石久美子、加藤友久、高橋美樹子、向井秀幸、小野功貴(神戸大・バイオシグナル研)
タンパク質リン酸化酵素 PKN1 による TRAF2-NF- κ B シグナル伝達経路の調節
 第26回日本分子生物学会年会(神戸) 平成15年12月10日～13日
- 18) 周 静¹、原 賢太¹、安田尚史¹、森山啓明¹、永田正男¹、米澤一仁²、横野浩一¹
 (¹神戸大・医・老年内科、²神戸大・バイオシグナル研)
栄養センサーmTORを介した細胞内シグナルにおける Raptor の役割
 第47回日本糖尿病学会年次学術集会(東京) 平成16年5月13日～15日
- 19) Yoshino, K.¹, Sato, K.², Oshiro, N.¹, Sakakibara, K.³, Tokunaga, C.¹, Fukami, Y.^{2,3}, and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr. Kobe Univ., ²Res. Ctr. Environ. Genom. Kobe Univ., ³The Grad. Sch. Sci. Tech. Kobe Univ.)
Mass spectrometric identification of a novel egg plasma membrane rafts-associated protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization.
 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry (Tennessee, USA), May 23-27, 2004
- 20) Umada, S.¹, Yamamoto, T.², Matsuzaki, H.², and Kikkawa, U.² (¹Kobe Univ. Grad. Sch. Med., ²Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Protein complex formation of PKC δ through its regulatory domain induced by oxidative stress.
 The Annual Meeting of the ASBMB and the 8th Conf. of the IUBMB (Boston, USA), June 12-16, 2004

- 21) Oshiro, N.¹, Yoshino, K.¹, Hidayat, S.¹, Tokunaga, C.¹, Hara, K.², Eguchi, S.,¹, Avruch, J.³, and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med., ³MGH, Harvard Univ.)
Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function.
 Gordon Research Conferences "Second Messengers & Protein Phosphorylation" (New Hampshire, USA) June 20-25, 2004
- 22) 米澤一仁、江口賢史、徳永千春、大城紀子、中嶋昭雄、吉野健一 (神戸大・バイオシグナル研)
RNA 翻訳制御スイッチとして働くラパマイシン標的蛋白 mTOR シグナルの研究
 第 6 回 RNA ミーティング (第 6 回日本 RNA 学会年会) (熊本) 平成 16 年 8 月 4 日～6 日
- 23) Kawanishi, I.¹, Yoshino, K.¹, Oshiro, N.¹, Nakashima, A.¹, Hara, K.², Tokunaga, C.¹, and Yonezawa, K.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
Identification and functional analysis of phosphorylation sites of a novel protein raptor which is an essential scaffold protein for mTOR signaling.
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 24) Fukami, Y.^{1,2}, Sakakibara, K.², Iwasaki, T.¹, Yoshino, K.³, Satou, K.¹, and Yonezawa, K.³ (¹Res. Ctr. Environ. Genom., Kobe Univ., ²The Grad. Sch. Sci. Tech. Kobe Univ., ³Biosig. Res. Ctr. Kobe Univ.)
Molecular identification of uroplakin III as a raft protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization of *Xenopus* eggs.
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 25) Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H-S., Mukai, H., and Ono, Y. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Possible involvement of CG-NAP in centrosome duplication by anchoring cyclin-cdk complexes to centrosomes.
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 26) 榎木 薫¹、助信直恵¹、吉川恭子¹、山本利義²、吉川 潮²、松本美左子³、瀬谷司³、榎木 修¹ (¹広島大・医歯薬学総合、²神戸大・バイオシグナル研、³大阪府立成人病センター研)
Toll-like receptor の細胞内情報伝達における PKC δ の役割
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 27) Takenaka, R.^{1,2,3}, Shirai, Y.¹, Yagi, K.², Adachi, N.¹, Sakai, N.³, and Saito, N.¹ (¹Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ²Clin. Pharmacy, Kobe Pharmaceut. Univ., ³Mol. Pharmacol. Neurosci., Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)
Tyrosine phosphorylation is necessary for vitamin E-induced subtype-specific translocation and activation of DGK α .
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日
- 28) Sanse, K., Shirai, Y., Matsubara, T., Yamaguchi, Y., and Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
The domains involved in membrane localization of DGK γ .
 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 16 年 10 月 13 日～16 日

- 29) Shirai, Y., Murakami, T., Matsubara, T., Adachi, N., Oyasu, M., Taniguchi, T., and Saito, N. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Distinct neurite outgrowth induced by ϵ PKC and DGK β .
 Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting (San Diego, USA), October 22-29, 2004
- 30) 中川 優¹、入江一浩¹、小宮裕介¹、柳田 亮¹、山中宣博¹、大東 肇¹、津田健一郎²、柏木香保里³、齋藤尚亮³ (¹京大・院・農、²NEC・基礎研、³神戸大・バイオシグナル研)
CH/ π 相互作用に着目したプロテインキナーゼ C アイソザイム選択的な薬剤の分子設計
 天然有機化合物討論会 (広島) 平成 16 年 10 月 23 日
- 31) 吉野健一、大城紀子、高橋里菜子、江口賢史、中嶋昭雄、谷村圭子、大路 剛、徳永千春、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR を中枢としたアミノ酸情報感知伝達/細胞成長制御システムを担う分子探索
 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日~11 日
- 32) 中嶋昭雄、岡本澄子、徳永千春、吉野健一、川西一平、江口賢史、大城紀子、米澤一仁 (神戸大・バイオシグナル研)
mTOR 複合体を構成する WD リピード蛋白質 mLST8 の機能解析
 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日~11 日
- 33) 有田恭子¹、甘 翔²、北川 円²、吉野健一³、米澤一仁³、加藤晃弘⁴、井上弘一⁴、磯野克己⁵ (¹神戸大・院・自然科学、²神戸大・理・生物、³神戸大・バイオシグナル研、⁴埼玉大・理・遺伝、⁵独立行政法人・製品評価技術基盤機構)
***Neurospora crassa* ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子の同定と機能の進化的解析**
 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日~11 日
- 34) Iwasaki, T.¹, Sato, K.¹, Yoshino, K.², Kosuge, K.^{1,3}, Sakakibara, K.³, Ou, Z.¹, Ueda, Y.¹, Owada, K.⁴, Yonezawa, K.², and Fukami, Y.^{1,3} (¹Res. Ctr. Environ. Genom., Kobe Univ., ²Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ³The Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., ⁴Kyoto Pharmaceut. Univ.)
Molecular identification and immunochemical characterization of Src tyrosine kinase *Xenopus* eggs.
 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日~11 日
- 35) Isagawa, T., Takahashi, M., Kato, T.Jr., Mukai, H., and Ono, Y. (Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)
Involvement of protein kinase PKN1 in G2/M delay caused by arsenite.
 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 16 年 12 月 8 日~11 日
- 36) 周 静¹、原 賢太¹、神田水鈴¹、安田尚史¹、森山啓明¹、永田正男¹、米澤一仁²、横野浩一¹ (¹神戸大・医・老年内科、²神戸大・バイオシグナル研)
栄養センサーmTOR による von Hippel-Lindau 癌抑制遺伝子 (pVHL) の制御
 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会 (神戸) 平成 17 年 5 月 13 日

- 37) 吉野健一¹、米原久美子²、大城紀子¹、川俣朋子²、磯野克己^{2,3}、田村厚夫²、米澤一仁^{1,2} (¹神戸大・バイオシグナル研、²神戸大・院・自然科学、³神戸大・理・生物)
ナノエレクトロスプレーイオン化四重極/飛行時間型タンデム質量分析法を用いた分子量 6,000 を超える高分子量ペプチドのアミノ酸配列解析: in-house 配列データベース検索エンジンの新たな利用法
第 53 回質量分析総合討論会 (さいたま) 平成 17 年 5 月 25 日~27 日

- 38) 松崎秀紀¹、林 忠紘²、山本利義¹、吉川 潮¹ (¹神戸大・バイオシグナル研、²神戸大・院・自然科学)
Regulation of intracellular localization and transcriptional activity of FOXO4 by protein kinase B through phosphorylation on the motif sites conserved among the FOXO family.
5th Salk/EMBL Oncogenes and Growth Control Meeting (California, USA), August 14, 2005

③プレス発表 0 件

山中伸弥グループ

①招待、口頭発表 (国内 3 件、海外 2 件)

- 1) 高橋和利、山中伸弥 (奈良先端大・遺伝子教育研)
Embryonic stem cells express a transforming oncogene.
Mouse Molecular Genetics Meeting (Heidelberg, Germany), September 3-7, 2003
- 2) 村上未玲^{1,2}、原 賢太³、一阪朋子¹、米澤一仁²、山中伸弥¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研、²神戸大・バイオシグナル研、³神戸大・医・老年内科)
Essential role of mTOR in cell proliferation and growth in early mouse development and embryonic stem cells.
2nd NAIST Bio-COE International Symposium (Nara, Japan), January 19-20, 2004
- 3) 村上未玲¹、原 賢太³、一阪朋子¹、米澤一仁²、山中伸弥¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研、²神戸大・バイオシグナル研、³神戸大・医・老年内科)
「**Essential role of mTOR in cell proliferation and growth in early mouse development and embryonic stem cell**」
日本分子生物学会 第 4 回春季シンポジウム (奈良) 平成 16 年 5 月 19 日~20 日
- 4) Murakami, M.¹, Ichisaka, T.¹, Maeda, M.², Oshiro, N.³, Hara, K.⁴, Edenhofer, F.⁵, Kiyama, H.², Yonezawa, K.³, and Yamanaka, S.¹ (¹Res. and Educ. Ctr. for Genet. Inf., Nara Inst. of Sci. and Technol., ²Dept. of Anatomy and Neurobiol., Osaka City Univ. Med. Sch., ³Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ⁴Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
Essential role of mTOR in cell proliferation and growth in early mouse development and embryonic stem cells.
Gordon Research Conferences "Second Messengers & Protein Phosphorylation" (New Hampshire, USA), June 20-25, 2004
- 5) 村上未玲¹、原 賢太³、一阪朋子¹、米澤一仁²、山中伸弥¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研、²神戸大・バイオシグナル研、³神戸大・医・老年内科)
ES 細胞の増殖を制御する mTOR および関連因子の解析
第 110 回日本解剖学会総会 シンポジウム (富山) 平成 17 年 3 月 29 日~31 日

②ポスター発表 (国内 7 件、海外 2 件)

- 1) 高橋和利、三井 薫、山中伸弥 (奈良先端大・遺伝子教育研)
未分化 ES 細胞において特異的に発現する新規 Ras 類似遺伝子 E-Ras の機能解析
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日
- 2) 二村圭祐、佐々木玲子、三井 薫、山中伸弥 (奈良先端大・遺伝子教育研)
eIF4G 類似蛋白質 NAT1 の補因子の探索
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日
- 3) 村上未玲^{1,2}、原 賢太²、米澤一仁²、山中伸弥¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研、²神戸大・バイオシグナル研)
ラパマイシン標的蛋白質 mTOR の機能解析
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日
- 4) 山中伸弥、高橋和利 (奈良先端大・遺伝子教育研)
Embryonic stem cells express a transforming oncogene.
ISSCR First Annual Meeting (Washington DC, USA), June 8-11, 2003
- 5) Murakami, M.¹, Ichisaka, T.¹, Hara, K.³, Yonezawa, K.², and Yamanaka, S.¹ (¹Res. and Educ. Ctr. for Genet. Inf., Nara Inst. of Sci. and Technol., ²Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ³Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
Essential role of mTOR in cell proliferation and growth in early mouse development and embryonic stem cells.
5th SLB-NAIST-KRIBB international symposium (2003) (Seoul, Korea), November 14, 2003
- 6) Murakami, M.¹, Ichisaka, T.¹, Hara, K.³, Yonezawa, K.², and Yamanaka, S.¹ (¹Res. and Educ. Ctr. for Genet. Inf., Nara Inst. of Sci. and Technol., ²Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ., ³Dept. of Geriatr., Kobe Univ. Sch. of Med.)
Essential role of mTOR in cell proliferation and growth in early mouse development and embryonic stem cell.
The New Frontier of RNA Science, RNA2003 Kyoto (Kyoto, Japan), November 26, 2003
- 7) 村上未玲^{1,2}、原 賢太^{2,3}、一阪朋子¹、米澤一仁²、山中伸弥¹ (¹奈良先端大・遺伝子教育研、²神戸大・バイオシグナル研、³神戸大・医・老年内科)
細胞成長を担う mTOR の機能解析
第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸) 平成 15 年 12 月 10 日～13 日
- 8) 村上未玲¹、高橋和利²、一阪朋子²、岸本加恵³、西澤雅子³、平松隆司³、山中伸弥² (¹奈良先端大・バイオサイエンス、²京都大・再生医科学研、³住友製薬・ゲノム研)
ES 細胞における ERAS および VISFATIN の機能解析
第三回幹細胞シンポジウム (淡路) 平成 16 年 4 月 21 日～23 日
- 9) 村上未玲¹、一阪朋子²、西澤雅子³、岸本加恵³、平松隆司³、山中伸弥² (¹奈良先端大・バイオサイエンス、²京都大・再生医科学研、³住友製薬・ゲノム研)
初期胚発生と ES 細胞における Visfatin の機能解析
第 28 回日本分子生物学会年会 平成 16 年 12 月 7 日～10 日

③プレス発表 0 件

鎌田芳彰グループ

①招待、口頭発表 (国内 4 件、海外 0 件)

- 1) 鎌田芳彰、大隅良典 (基生研)
Tor によるプロテインキナーゼを介した酵母の自食作用の制御
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜) 平成 14 年 12 月 11 日～14 日
- 2) 鎌田芳彰、大隅良典 (基生研)
Yeast SGK homolog YPK2 acts at the downstream of TOR.
第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日
- 3) 鎌田芳彰 (基生研)
出芽酵母における **TOR** シグナルに関わる因子の解析
平成 16 年度神戸大学大学院医科学専攻医学研究先端講義 (神戸) 平成 16 年 10 月 29 日
- 4) Kamada, Y. (Natl. Inst. for Basic Biol.)
Analyses of protein kinases involved in TOR signaling
「細胞周期制御」国際シンポジウム **Cell Cycle and Development** (名古屋)
平成 17 年 11 月 21 日～22 日

②ポスター発表 (国内 2 件、海外 1 件)

- 1) 壁谷幸子、鎌田芳彰、大隅良典 (基生研)
Apg17p-Apg1p-Apg13p 結合体はオートファジーに必須である
第 56 回日本細胞生物学会大会 (大津) 平成 15 年 5 月 14 日～16 日
- 2) Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., and Ohsumi, Y. (Natl. Inst. Basic Biol.)
The role of yeast Atg17 in autophagy as a component of Atg1 kinase complex.
第 57 回日本細胞生物学会大会 (大阪) 平成 16 年 5 月 28 日
- 3) Kawamata, T.^{1,2}, Kamada, Y.², Suzuki, K.², Oota, S.³, Ohsumi, M.³, and Ohsumi, Y.² (¹Grad. Sch. of Sci. & Tech., Kobe Univ., ²Natl. Inst. Basic Biol., ³Teikyo Univ. of Sci. & Tech.)
Identification and analyses of a novel autophagy gene, Atg29.
Yeast Cell Biology Meeting (Cold Spring Harbor, USA), August 18, 2005

③プレス発表 0 件

懸川友人グループ

①招待、口頭発表 (国内 5 件、海外 0 件)

- 1) 懸川友人 (千葉大・院・薬・遺伝子薬物学)
Rapamycin による **Terminal oligo pyrimidine mRNA** の選択的翻訳抑制への **AUF1/hnRNP D** の関わり
第 4 回 PIKPK 研究会 (神戸) 平成 15 年 4 月 18 日
- 2) 懸川友人、平田 悟、斎藤浩美、小林 弘 (千葉大・院・薬・遺伝子薬物学)
ラパマイシンによる **mRNA** 選択的な翻訳抑制への **hnRNP D** の関与
第 10 回マクロライド新作用研究会 (東京) 平成 15 年 7 月 26 日

- 3) 懸川友人¹、大内 希¹、額賀路嘉¹、砂塚敏明²、大村 智² (¹城西国際大・薬、²北里大・北里生命科学研究)

TOP mRNAs 翻訳系に及ぼす影響について

第11回マクロライド新作用研究会 (東京) 平成16年7月16日

- 4) 懸川友人 (城西国際大・薬)

実験創傷治癒の初期における翻訳過程の重要性

第48回日本薬学会関東支部大会 (千葉) 平成16年10月9日

- 5) 懸川友人¹、大内 希¹、中村智香²、二村典行²、石井伊都子³、吾妻安良太⁴、工藤翔二⁴ (¹城西国際大・薬・生理化学、²城西国際大・薬・生体分析学、³千葉大・院・薬学研究院、⁴日本医科大・第四内科)

クラリスロマイシンの細胞内分布

第12回マクロライド新作用研究会 (東京) 平成17年7月15日

②ポスター発表 (国内 3件、海外 1件)

- 1) Hirata, S., Matsuda, M., Saito, H., Kakegawa, K., and Kobayashi, H. (Grad. Sch. of Pharmac. Sci., Chiba Univ.)

Relationship of AUF1/hnRNP D to rapamycin-induced translational repression of the terminal oligo pyrimidine mRNAs.

第76回日本生化学会大会 (横浜) 平成15年10月15日～18日

- 2) Kakegawa, T.¹, Nukuga, M.¹, Ohuchi, N.¹, and Kaspar, R.L.² (¹Faculty of Pharmaceut. Sci., Josai Intl. Univ., ²SomaGenics, Inc., USA)

Identification of AUF1 p45 as a rapamycin-responsible binding protein to 5'-terminal oligopyrimidine element of mRNAs.

Translational Control, the 2004 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (New York, USA), September 9, 2004

- 3) Ohuchi, N.¹, Taniguchi, Y.², Hayashi, K.³, Kizawa, Y.⁴, Koike, K.⁵, Ohsawa, M.⁶, Iwamoto, K.⁵, Nukaga, M.¹, Kakegawa, T.¹, Murakami, H.⁵ (¹Josai Intl. Univ., ²Kinjo Gakuin Univ., ³Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ⁴Nihon Univ. Coll. Pharmacy, ⁵Toho Univ. Sch. Pharmaceut. Sci., ⁶Nihon Univ. Coll. Ind. Tech.)

Inhibition of angiotensin II- and endothelin-1-induced proliferation by EGF receptor kinase inhibitor in cultured rabbit gingival fibroblasts.

第78回日本薬理学会年会 (横浜) 平成17年3月22日

- 4) 大内 希¹、懸川友人¹、森田吉一²、小林 弘² (¹城西国際大・薬、²千葉大・院・薬)

実験創傷治癒初期における翻訳過程の重要性

日本薬学会第125年会 (東京) 平成17年3月30日

③プレス発表 0件

竹鼻健司グループ

①招待、口頭発表 (国内 2 件、海外 1 件)

1) 竹鼻健司 (味の素 (株)・医薬研)

Tissue-specific pharmacological activities of branched-chain amino acids mediated by mTOR pathway activation.

第 76 回日本生化学会大会 (横浜) 平成 15 年 10 月 15 日～18 日

2) 西谷しのぶ、竹鼻健司、惣中一郎 (味の素 (株)・医薬研)

イソロイシンによる耐糖能改善のメカニズム解析

第 40 回日本肝臓学会総会 (東京) 平成 16 年 6 月 3 日

3) 河上麻美¹、竹鼻健司¹、惣中一郎¹、細川 優²、清水 誠³ (¹味の素(株)・医薬研、²実践女子大・生活化学、³東京大・院・農学生命科学・応用生命化学・食糧化学研究室)

Branched-chain amino acids promote the gene expression of taurine biosynthetic enzyme, cysteine dioxygenase.

9th International Congress of Amino Acids and Proteins (Vienna, Austria), August 12, 2005

②ポスター発表 (国内 0 件、海外 1 件)

1) 西谷しのぶ、竹鼻健司、惣中一郎 (味の素 (株)・医薬研)

Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis.

11th United European Gastroenterology Week (Madrid, Spain), November 4, 2003

③プレス発表 0 件

(3) 特許出願 (国内 0 件、海外 1 件)

①国内 該当なし

②海外

発明者	米澤一仁、原 賢太、吉野健一、徳永千春
発明の名称	哺乳動物のラパマイシン標的蛋白質 (mTOR) に結合する性質を持つ新規蛋白質及びその遺伝子
出願番号	PCT 国際出願 (PCT/JP02/012835)
出願日	平成 16 年 5 月 27 日
取得日	未定

(4) 受賞等

①受賞 該当なし

②新聞報道 該当なし

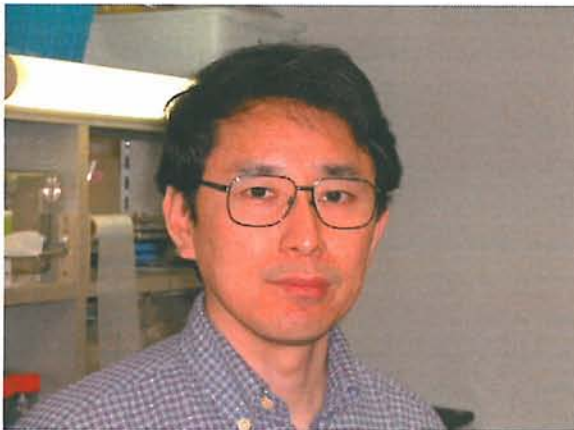
③その他 該当なし

(5) その他特記事項 該当なし

7 結び

本チームは米澤一仁教授（神戸大学バイオシグナル研究センター）を研究代表者として、細胞成長の制御機構の解明を目指した。研究体制として米澤グループ、山中グループ、鎌田グループ、懸川グループ、竹鼻グループの合計5グループを組織し、細胞成長を司るたんぱく質の同定、およびそれらのたんぱく質の生化学的、分子生物学的、細胞生物学的手法による解析、ならびにモデル生物系での研究を実施した。目標とした細胞成長を司るたんぱく質の同定については、検索により機能が未知であったたんぱく質群が候補として挙げられた。これらのたんぱく質群のなかには、いまだに細胞成長制御におけるその意義が明らかではないものが含まれているが、当初、計画した検索としては一定の成果をおさめたと考えている。特に神戸大学バイオシグナル研究センターにおいては、本戦略的創造研究推進事業により、プロテオーム解析からたんぱく質の機能解析に至る一連の研究体制が導入され、センターの活動を支える柱の一つとなっている。今後、細胞成長を制御するたんぱく質群および関連たんぱく質の様々な視点による解析を通じたシグナル伝達研究の発展が期待される。

本チームは平成17年7月8日に米澤一仁研究代表者が急逝したことから、同年度末をもって終了することとなった。平成14年度の研究開始から4年度に渡り、ご支援をいただいたことに深甚の謝意を表する。



米澤一仁教授（研究室にて）