

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書・分担研究報告書

研究課題名	老化時計としてのテロメアの役割
主任研究者	石川冬木（東京工業大学生命理工学部）
分担研究者	井出利憲（広島大学医学部）
	吉栖正生（東京大学医学部）
	中西 真（国立療養所中部病院長寿医療研究センター）

老化時計としてのテロメアの役割に関する研究

主任研究者 石川 冬木 東京工業大学生命理工学部 教授

研究要旨 細胞老化が染色体テロメアの短小化により誘導される現象について、特に以下の4点について解析を行った。第一に、正常体細胞が多数回の細胞分裂の末に細胞老化を迎えるのは、テロメアを伸長させる酵素テロメラーゼが多く存在しないことによる。そこで、このテロメラーゼの触媒サブユニット遺伝子の転写制御機構を明らかにした。第二に、テロメアの短小化がどの程度直接的に細胞老化につながるのかを明らかにするために、本来テロメラーゼを持たないヒト正常線維芽細胞にテロメラーゼを異所的に発現させてテロメア長を維持できるか、またその結果として細胞老化を回避できるかを検討した。第三に、テロメア短小化により引き起こされる老化シグナルの実体を明らかにするために、ATM 遺伝子の下流に存在する新規細胞周期制御蛋白質を同定した。最後に、老化細胞に特徴的な遺伝子発現動態を解析した。以上の研究の結果、テロメア短小化によりもたらされる細胞老化は、単純な過程で引き起こされるのではなく、おそらく相互に作用しあういくつかの経路を介して生じるものと考えられた。

分担研究者氏名・所属施設名

及び所属施設における職名

井出 利憲 広島大学医学部 教授

吉栖 正生 東京大学医学部老年病 講師

中西 真 名古屋市立大学医学部 助教授

ある分裂回数の後に細胞老化がおこることは老化プログラムの存在を示唆するものであるが、その分子実体が知られていなかったために、「老化プログラム仮説」の真偽については長い論争の歴史があった。しかし、最近、染色体末端テロメアが「老化時計」に相当する可能性が注目されている。

染色体末端テロメアは、染色体が安定に存在するために必須な染色体の構成要素である。テロメア DNA は細胞分裂に伴う通常の DNA 複製では完全には合成されない。この結果、テロメア DNA は細胞分裂のたびに次第に短小化する。このことから、テロメア長は受精して個体が発生して以来細胞が行ってきた総細胞分裂回数を記録するレコーダーに例えられる。高齢者の体細胞や細胞培養を繰り返した老化細胞は、非常に短いテロメア長を示し、それ以上短小化することはない。この時期に応じて細胞は老化を示す、すなわち増殖刺激に不応性となることから、テロメアの短小化と細胞老化とは何らかの因果関係にあるのではないかと近年興味を持たれてきた。

A. 研究目的

古くより老化の原因として、「誤り蓄積仮説」と「老化プログラム仮説」とが提唱されてきた。後者は、細胞もしくは個体に老化現象を発動する仕組みが具わっており、その信号により老化が積極的に誘起されると考える。この仮説に基づくと、老化プログラムには、いつ老化を起こすかを決定する「老化時計」、老化時計が「巻き戻った」時に活性化される「老化シグナル」、そして実際に老化形質をもたらす「老化イフェクター分子」の存在が想定される。正常体細胞は有限の細胞分裂回数しか行うことができず、分裂可能回数を終え増殖刺激に対して不応となった細胞は老化細胞と呼ばれる。老化細胞は個体老化や成人病の少なくとも一部、すなわち動脈硬化症や高齢者の免疫不全などを説明することができる。

生殖細胞は世代をこえて続く数多くの細胞分裂を行うにもかかわらず、長いテロメア長を維持するこ

とができる。これは、生殖細胞に短小化したテロメアを伸長化させる酵素テロメラーゼの活性が特異的に存在するためである。テロメラーゼはいまだ未知の機構により胎児が発生して組織が分化するとほとんどの正常体細胞では検出されなくなる。このため、正常体細胞は加齢とともに総細胞分裂回数が更新しテロメア長が短小化する。ヒトテロメラーゼの分子実体は長らく不明であったが、1997年に我々やいくつかのグループにより独立してヒトテロメラーゼをコードする遺伝子 TERT (telomerase reverse transcriptase)がクローン化された。ごく最近、TERTを本来テロメラーゼ活性をもたない正常細胞に遺伝子導入しテロメラーゼ活性を誘導すると、テロメア長の伸長とともに継代培養を繰り返しても細胞老化が回避されることが報告された。この事実は、実際にテロメア長が細胞老化を誘導する老化時計に相当し、テロメラーゼは老化時計をリセットする酵素であることを示している。本研究の目的は、テロメアと細胞老化の因果関係が証明されたことを受けて、その間の分子的な因果律を明らかにすることである。本研究の延長には、テロメア老化時計をリセットする酵素としてのテロメラーゼのアゴニストを用いることで、動脈硬化症などの細胞老化に基づく成人病を予防する手段を開発することを視野に入れている。

B. 研究方法

1. ヒトテロメア触媒サブユニット遺伝子 TERT のプロモーター解析

ヒトおよびマウス BAC ライブラリー、ファージライブラリーを用いて、それぞれの種における TERT 遺伝子プロモーター領域を新規にクローン化し、塩基配列を決定した。次に、特にヒト TERT 遺伝子プロモーターについて、種々の欠失変異体を作成し、これにルシフェラーゼ遺伝子のコーディング領域を融合させてプロモーター活性のレポーター遺伝子を作成した。レポーター遺伝子をヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞、ヒト白血病細胞株 K562 に遺伝子導入し、発現されるルシフェラーゼの酵素活性を測定することで変異体のプロモーター活性を測定した。内部標準として同時に遺伝子導入したベータガラクト

シダーゼ遺伝子を用い、その酵素活性を参照することで、実験間の遺伝子導入効率の差を補正した。プロモーターの塩基配列決定により、同領域に種々の既知転写因子の結合配列が存在したため、これらの転写因子の影響をみるために、それぞれの遺伝子を同時に遺伝子導入してレポーター活性の活性化あるいは抑制を検討した。

2. ヒトテロメラーゼ触媒サブユニットの異所的発現による細胞老化過程の変化の解析

テロメラーゼの触媒サブユニット hTERT の cDNA を、ヒト正常線維芽細胞およびその SV40 トランスフォーム細胞に導入し、薬剤選択によって cDNA を導入された細胞をクローニングする。これらのクローン細胞を継代培養し、テロメラーゼ活性、テロメアサイズ、継代可能回数、細胞老化マーカーの発現などを調べる。

3. テロメア短小化により誘導される老化シグナルの解析

分裂酵母において、DNA 障害時に rad3 依存的に活性化され、細胞周期停止を引き起こす Chk1 および Cds1 キナーゼのヒトホモログを degenerate PCR 法を用いてクローニングした。さらに、これらキナーゼの DNA 障害チェックポイントにおける役割と、ATM との関連性について生化学的に解析した。

4. 老化細胞における遺伝子転写活性の解析

血管内皮細胞機能の検討のために、老化させていない、ウシ頸動脈血管内皮細胞 bovine carotid endothelial cells (BCEC) を用い、そのコントロールとして、同じく老化していないラット大動脈血管平滑筋細胞 rat aortic smooth muscle cells (RASMC) を用いた。

食品中の抗酸化物質として RW-PF を、adsorption chromatography により精製し (Suntory 基礎研究所)、細胞培養液中に添加した。増殖能の検討は、セル・カウンターによる計測と、[3H]サイミジンの取り込みで検討した。サイクリン A の発現は、それぞれの種のサイクリン A cDNA をプローブとして、ノーザン・ブロットで検討した。サイクリン A プロモーター活性は、ヒトサ

イクリン A 遺伝子の 5' 上流配列を luciferase 遺伝子に結合した応答遺伝子を transfection することにより検討した。サイクリンAの転写調節において、そのプロモーターの ATF コンセンサス配列に結合する転写因子が重要であることが判明しているため 2)、その配列(TGACGTCA) を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして、核抽出物を用いて gel shift assay を行った。ATF コンセンサス配列に結合する転写因子 ATF-1 と CREB の mRNA 発現も検討した。

C. 研究結果

1. ヒトテロメア触媒サブユニット遺伝子 TERT のプロモーター解析 (石川)

テロメラーゼは、触媒サブユニット TERT、付属蛋白質 TEP1 および鋳型 RNA, hTR よりなる複合体である。すでに我々は、テロメラーゼ活性の有無は、中でも TERT 遺伝子の発現の有無により調節されることを明らかにした (Nature Genetics, 18: 65-68, 1998)。そこで本研究においては、TERT 遺伝子のプロモーター領域を解析することで、どのような分子メカニズムにより遺伝子発現が調節されているのかを明らかにした。そのために、まず、ヒトおよびマウス TERT 遺伝子のプロモーター領域を独自にクローン化し、その塩基配列を決定した。その結果、これらの二つの種では塩基配列がほとんど保存されていないことが明らかとなり、ヒトとマウスでは TERT 遺伝子の転写調節機構が異なるものと予想された。

次に、特にヒト TERT 遺伝子プロモーターに注目して、そのプロモーター活性制御にシスに重要な配列とトランスに作用する因子を同定することを試みた。ヒト TERT 遺伝子転写開始点より上流約 1 kb のクローンを出発材料とし、上流側から種々の長さの配列を欠失した変異体を作成し、ルシフェラーゼを用いてプロモーター活性を測定した。その結果、プロモーターとしてのほとんどの活性は、転写開始点より下流+47 より上流-245 の領域で十分であることがわかった。次に、この領域に含まれる myc 蛋白質結合配列、および MZF 蛋白質結合配列の役割を

明らかにするために、myc 遺伝子あるいは MZF 遺伝子を共発現させて、これらのトランス因子がプロモーターに及ぼす影響を検討した。その結果、myc はプロモーターの活性化に、また、MZF は抑制に作用することが明らかとなった。

2. ヒトテロメラーゼ触媒サブユニットの異所的発現による細胞老化過程の変化の解析 (井出)

C 末端に myc タグのついた hTERT をヒト正常線維芽細胞 TIG-3 に導入したとき、1) テロメラーゼ活性が発現した、2) 薬剤耐性クローンのうち、テロメラーゼ活性を示すクローンが得られる頻度は期待に比べて非常に低かった、3) 得られたテロメラーゼ陽性クローンは若干の分裂寿命延長を示したが、不死化細胞は得られなかった、4) 増殖停止すると老化マーカーである β -gal が発現した。同様のプラスミドを SV 40 トランスフォーム線維芽細胞 (有限分裂寿命) に導入したとき、1) テロメラーゼ活性が発現した、2) 期待通りの頻度で薬剤耐性クローンが得られた、3) 大部分のクローンがテロメラーゼ活性陽性であった、4) テロメラーゼ陽性クローンは分裂寿命延長を示した、5) テロメラーゼ活性の強さと寿命延長の間には相関がみられた、6) テロメラーゼ活性強度は継代中にほとんど変化しなかった、7) 大部分のクローンはやがて増殖を停止し、不死化クローンはわずかしかが得られなかった、8) 増殖停止すると老化マーカーである β -gal が発現した、9) テロメラーゼ活性強度が不死化細胞より強いものでも不死化しなかった、10) テロメアサイズはほとんどのクローンで継代とともに短縮した。

次に、myc タグをはずした hTERT を IRES ベクターにつないで正常線芽細胞 TIG-3 に導入したとき、1) テロメラーゼ活性が発現した、2) 薬剤耐性クローンが得られる頻度は期待に比べて非常に低かったが、得られたクローンはすべてテロメラーゼ活性陽性であった、3) 得られたクローンは分裂寿命延長を示したが、不死化細胞は得られなかった、4) 増殖停止すると老化マーカーである β -gal が発現した、5) テロメアサイズは延長しており、寿命の限界まで短縮しなかった。同様のプラスミドを SV 4

0トランスフォーム線維芽細胞（有限分裂寿命）に導入したとき、1）テロメラーゼ活性が発現した、2）期待通りの頻度で薬剤耐性クローンが得られ、得られたクローンはすべてテロメラーゼ活性陽性であった、3）大部分のクローンが分裂寿命延長を示し、不死化したものと考えられた、4）テロメアサイズはもとの細胞より著しく延長していた、5）T抗原を失活させたとき、有限分裂寿命の延命細胞はただちに増殖を停止したが、hTERTを導入してテロメアが延長したものでは増殖を継続した。

hTERT タンパク質の細胞内局在を抗体により調べたところ、C末端に myc タグのついた hTERT タンパク質は主として細胞内に存在していたが、タグのついていない hTERT タンパク質は主として核内に局在していた。

3. テロメア短小化により誘導される老化シグナルの解析（中西）

酵母 Cds1 ホモログとして同定された hCds1 は、UV あるいは電離放射線による DNA 障害に反応してリン酸化をうけてキナーゼ活性が活性化されることが分かった。また、hCds の電離放射線に対する反応は、ATM 依存的に起こることが明らかになった。さらに、この hCds1 遺伝子は正常細胞ではその mRNA の発現は低い、p53 遺伝子に変異が起こると発現が強く誘導された。このことから、p53 欠失癌細胞における抗ガン剤耐性すなわち DNA 障害を効率的に修復する機構に hCds1 が大きく関与していることが分かった。

一方、昨年度の本研究にて同定した hChk1 のノックアウトマウスの解析から、hChk1 は発生初期における卵分割から体細胞分裂への移行に重要な役割を持つことが示唆された。

4. 老化細胞における遺伝子転写活性の解析（吉栖）

red wine から精製した RW-PF の polyphenol 含有量を Folin-Denis 法で測定したところ 52.4 % であった。予備実験として行った細胞増殖への影響を検討した結果を下図に示すが、red wine 摂取後に想定される濃度である 1~10 mM の RW-PF によって、BCEC の細胞増殖は影響を受けなかった

（図 A B）。一方、興味深いことに、同じ濃度の RW-PF は、RASMC の細胞増殖を濃度依存的に抑制した（図 C D）。この結果は、ヒトの細胞を用いた場合も同様であった。

この細胞増殖抑制作用は、RW-PF を引き続きカラムにて分離した祖抽出物（Fraction 1-6）においても同様に認められた。このことは、polyphenol のうちで、monomer に富む成分（Fraction 1-4）と、polymer に富む成分（Fraction 5,6）に、基本的に作用の差のないことを示している。RW-PF は、RASMC のサイクリン A mRNA の発現を濃度依存的に、また 24 時間以内に抑制した。BCEC のサイクリン A mRNA の発現には有意の影響を認めなかった。RASMC において、RW-PF は、濃度依存的にサイクリン A プロモーターの活性を抑制し、その機能部位が ATF コンセンサス配列であることが確認された。その配列を含むプローブで行った gel shift assay によって、RW-PF が ATF コンセンサス配列に特異的に結合する蛋白量を濃度依存的に減少させることが認められた。ATF コンセンサス配列に結合する転写因子 ATF-1 と CREB の RASMC における mRNA 発現も、RW-PF により、濃度依存的に、かつ経時的に減少した。

D. 考察

テロメアの短小化による細胞老化について4つの異なるアプローチから検討した。石川は、そもそもテロメアの短小化が起こる原因である多くの正常体細胞からテロメラーゼ活性が検出されない理由について、テロメアラーゼ触媒サブユニット TERT 遺伝子のプロモーター解析により研究を行った。その結果、テロメラーゼは、細胞が増殖しており、なおかつ未分化な状態の時にのみ TERT の転写が活性化され、誘導されることを明らかにした。このことは、テロメラーゼを活性化することによりテロメアの短小化、すなわち老化時計の進行を遅らせるためには、細胞を未分化状態に戻せば良いことを示唆している。今後の細胞老化予防を考えるにあたって貴重な成果であるといえる。

井出は、本来テロメラーゼを持たないヒト正常線

維芽細胞について TERT 遺伝子を強制発現させることによりテロメラーゼを異所性に発現させた。C 末端にタグ配列をもつリコンビナント蛋白質は、細胞質より核への移行に異常があることを見いだした。タグ配列をもたないリコンビナント TERT 蛋白質を用いた場合でも、全く正常な線維芽細胞と SV40T 抗原でトランスフォームされた線維芽細胞では、TERT の強制発現がもたらす結果が異なった。このことは、SV40T 抗原により阻害されるテロメラーゼとは独立の老化因子が存在することを示唆しており大変興味深い。

中西は、細胞老化をもたらすシグナル蛋白質として ATM 遺伝子に注目をし、ATM の下流にヒト Cds1 蛋白質が存在することを示した。すでに、ATM の蛋白質リン酸化活性により p53 および Cds1 がリン酸化されることは報告されているが、今後、Chk1 や Cds1 が老化細胞においていかなる意義を持つのかを明らかにすることが重要である。

吉栖は、全く新規に、赤ワインに添加される抗酸化剤であるポリフェノールにより血管平滑筋細胞の増殖が抑制されることを見いだした。この事実は、赤ワインの摂取量が多いフランス人に動脈硬化性病変が比較的少ないことを説明することができ、疫学上非常に重要な所見である。

以上に述べた本年度の本研究成果により、テロメア老化時計の分子機構に多くの観点からの解明の糸口が得られてきたことは間違いない。今後、さらに詳細な解析により、老化誘導の全貌を明らかにする予定である。

E. 結論

テロメア短小化による細胞老化誘導について、テロメアが短小化する原因、テロメア短小化が細胞老化とどの程度密接な関係を持つか、どのような信号伝達分子により細胞老化が誘導される可能性があるのか、の研究を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表
(石川冬木)

1. Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*, 18: 65-68 (1998).
2. Hatakeyama, S., Fujita, K., Omine, M. and Ishikawa, F. The jumping translocation at 1q21 involves shortened telomeres. *Blood*, 91: 1514-1519 (1998).
3. Ishikawa, F. Research analysis: FISH goes with the flow. *Nature Biotechnology* 16: 723-724 (1998).
4. Naito, T., Matsuura, A. and Ishikawa, F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM-homologues. *Nature Genetics*, 20: 203-206 (1998).
5. Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A. and Ishikawa, F. Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element is induced in survivors defective for telomerase. *J. Biol. Chem.*, 273: 33360-33366 (1998).
6. Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Fujimoto, J., Nakayama, J., Ishikawa, F., Ide, T. and Tahara, E. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 89: 1099-1103 (1998).
7. Hatakeyama, S., Osawa, M., Omine, M., and Ishikawa, F. JTB, a novel membrane protein gene at 1q21 rearranged in a jumping translocation. *Oncogene*, in press (1999).

8. Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J., Ishikawa, F., Tahara, E., and Ide, T. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, in press (1999).
 9. Ishikawa, F. Aging clock, the watchmaker's masterpiece. *Cell. Mol. Life Sci.* in press (1999)
 10. Ishikawa, F. and Naito, T. Why do we have linear chromosomes? - a matter of Adam and Eve. *Mut. Res.* in press (1999)
- (井出利憲)
1. Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genet.*, 18: 65-68, 1998
 2. Tokutake, K., Takehisa, M., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T. and Furuichi Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 765-772, 1998
 3. Li, H.-C., Tahara, H., Tsuyama, N. and Ide, T. A hVt11 homologue: its expression depends on population doubling levels in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247:70-74, 1998
 4. Hirose, M., Abe-Hashimoto, J., Tahara, H., Ide, T. and Yoshimura, T. A new method to detect and measure telomerase activity by transcription-mediated amplification (TMA) and hybridization protection assay (HPA). *Clinical Chem.*, 44:2446-2452, 1998
 5. Hiyama, T., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Tahara, E., Tahara, H., Ide, T., Haruma, K., Yasui, W., Kajiyama, G., and Tahara, E. In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J. Cancer Res.*, 89: 1187-1194, 1998
 6. Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Fujimoto, J., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 1099-1103, 1998
 7. Ito, Y., Ide, T. and Mitsui, Y. Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.*, 105: 105-114, 1998
 8. Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J., Ishikawa, F., Tahara, E. and Ide, T. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic components, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. *Oncogene*, 18:1561-1567, 1999
 9. Sugimoto, M., Ide, T. and Furuichi, Y. A new aspect of Epstein Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines: senescence and immortalization. *Mech. Ageing Dev.*, 107: 51-60, 1999
 10. Kitamoto, M. and Ide, T. Telomerase activity in precancerous hepatic

nodules. *Cancer*, 85: 245-246, 1999

11. Nakamura, A., Matsuura, S., Tauchi H., Hanada, R., Ohashi, H., Hasegawa, T., Honda, K., Masuno, M., Imaizumi, K., Sugita, K., Ide, T., Komatsu, K. Four novel mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Japanese patients. *J. Hum. Genet.*, 44: 48-51, 1999

(吉栖正生)

1. Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, Sugimoto N, Liang YQ, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:353-356, 1998.
2. Yet SF, Folta SC, Jain MK, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Zhang D, Marria PB, Yoshizumi M, Chin MT, Perrella MA, Lee ME: Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the mouse Crp2/SmLim gene. Preferential expression of its promoter in the vascular smooth muscle cells of transgenic mice. *J Biol Chem* 273:10530-10537, 1998.
3. Akishita M, Kozaki K, Eto M, Yoshizumi M, Ishikawa M, Toba K, Orimo H, Ouchi Y: Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:17-21, 1998.
4. Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME: Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in

vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 273:1026-1031, 1998.

5. Eto M, Akishita M, Ishikawa M, Kozaki K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Ako J, Sugimoto N, Nagano K, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y: Cytokine-induced expression of parathyroid hormone-related peptide in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:339-343, 1998.

(中西 真)

1. Hashimoto, Y., Kohri, K., Kaneko, Y., Morisaki, H., Kato, T., Ikeda, K., and Nakanishi, M. *J. Biol. Chem.* 273, 16544-16550 (1998)
2. Tanikawa, M., Yamada, K., Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Ikeda, K., Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Noyori, R., and Nakanishi, M. *J. Biol. Chem.* 273, 18522-18527 (1998)
3. Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., Fukushima, S., Takeuchi, Y., Nakanishi, M., and Noyori, R. *J. Med. Chem.* 41, 3084-3090 (1998)
4. Menjo, M., Kaneko, Y., Ogata, E., Ikeda, K., and Nakanishi, M. *Oncogene* 17, 2619-2627 (1998)
5. shikawa, T. Akimaru, K., Nakanishi, M., Tomokiyo, K., Furuta, K., and Suzuki, M. *Biochem. J.* 336, 569-576 (1998)
6. Yanagisawa, K., Kosaka, A., Iwahana, H., Nakanishi, M., and Tominaga, S. *J. Biochem.* 125, 36-40 (1998)
7. Nakanishi, K., Nakanishi, M., and Kukita, F. *Brain Res. Protocol* in press
8. Kaneko Y., Watanabe, N., Morisaki, H.,

Akita, H., Fujimoto, A., Tominaga, K.,
Terasawa, M., Tachibana, A., Ikeda, K.,
and Nakanishi, M. Oncogene in press

2. 学会発表

(石川冬木)

Hatakeyama, S. and Ishikawa, F. Cold
Spring Harbor Meeting: Telomere and
Telomerase. March 25-28, 1999, Cold
Spring Harbor, New York, USA

(吉栖正生)

Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S,
Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Toba K,
Ouchi Y: Red Wine Polyphenols Inhibit
Proliferation of Vascular Smooth Muscle
Cells and Downregulate Expression of
Cyclin A. American Heart Association the
71st Scientific Sessions, Dallas, USA

他、多数

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

テロメレーズの構造と機能解析に関する研究

主任研究者 石川 冬木 東京工業大学生命理工学部 教授

研究要旨 ヒトおよびマウステロメレーズの触媒サブユニット TERT 遺伝子のプロモーター領域を新規にクローニングし塩基配列を決定した。特に、ヒト TERT 遺伝子プロモーターについては、ルシフェラーゼとの融合遺伝子を作成し、ヒト 293 細胞や K562 細胞に遺伝子導入して、そのプロモーター活性を定量化し、プロモーターとして最小限必要な領域を決定した。この系に、いくつかの転写因子の発現ベクターを共発現させ、それらの因子のプロモーターへの影響を検討した。その結果、myc が発現活性化に、MZF が発現抑制に関与している結果が得られた。これらの結果は、生理的にテロメレーズを持たない細胞に人為的にテロメレーズを誘導して細胞老化を阻止する技術を開発する上で重要であると考えられた。

A. 研究目的

染色体テロメア長は、細胞分裂のたびに短小化するが、それがある閾値に到達したときに細胞老化が誘導されるものと考えられる。テロメレーズは、このようなテロメアの短小化に拮抗してテロメアを伸長させる機能をもつため、テロメア老化時計をリセットする酵素であると言える。しかし、ほとんどの正常体細胞はテロメレーズ活性を持たないために、細胞分裂回数の亢進とともに老化時計が進んでいく。本研究では、このように細胞老化の鍵を握るテロメレーズの発現機構を明らかにする目的で、テロメレーズ触媒サブユニット遺伝子(TERT, telomerase reverse transcriptase)のプロモーター領域の解析を行った。

B. 研究方法

ヒトおよびマウス BAC ライブラリー、ファージライブラリーを用いて、それぞれの種における TERT 遺伝子プロモーター領域を新規にクローン化し、塩基配列を決定した。次に、特にヒト TERT 遺伝子のプロモーターについて、種々の欠失変異体を作成し、これにルシフェラーゼ遺伝子のコーディング領域を融合させてプロモーター活性のレポーター遺伝子を作成した。レポーター遺伝子をヒト胎児腎細胞由来の 293 細胞、ヒト白血病細胞株 K562 に遺伝子導入

し、発現されるルシフェラーゼの酵素活性を測定することで変異体のプロモーター活性を測定した。内部標準として同時に遺伝子導入したベータガラクトシダーゼ遺伝子を用い、その酵素活性を参照することで、実験間の遺伝子導入効率の差を補正した。プロモーターの塩基配列決定により、同領域に種々の既知転写因子の結合配列が見いだされたので、これらの転写因子の影響をみるために、それぞれの遺伝子を同時に遺伝子導入してレポーター活性の活性化あるいは抑制を検討した。

C. 研究結果

テロメレーズは、触媒サブユニット TERT、付属蛋白質 TEPI および鋳型 RNA, hTR よりなる複合体である。すでに我々は、テロメレーズ活性の有無は、中でも TERT 遺伝子の発現の有無により調節されることを明らかにした (Nature Genetics, 18: 65-68, 1998)。そこで本研究においては、TERT 遺伝子のプロモーター領域を解析することで、どのような分子メカニズムにより遺伝子発現が調節されているのかを明らかにした。そのために、まず、ヒトおよびマウス TERT 遺伝子のプロモーター領域を独自にクローン化し、その塩基配列を決定した。その結果、これらの二つの種では塩基配列がほとんど保存されていないことが明らかとなり、ヒトとマウスでは

TERT 遺伝子の転写調節機構が異なるものと予想された。

次に、特にヒト TERT 遺伝子プロモーターに注目して、そのプロモーター活性制御に重要なシス配列とトランスに作用する因子を同定することを試みた。ヒト TERT 遺伝子転写開始点より上流約 1 kb のクローンを出発材料とし、上流側から種々の長さの配列を欠失した変異体を作成し、ルシフェラーゼを用いてプロモーター活性を測定した。その結果、プロモーターとしてのほとんどの活性は、転写開始点より下流+47 より上流-245 の領域で十分であることがわかった。次に、この領域に含まれる myc 蛋白質結合配列、および MZF 蛋白質結合配列の役割を明らかにするために、myc 遺伝子あるいは MZF 遺伝子を共発現させて、これらのトランス因子がプロモーターに及ぼす影響を検討した。その結果、myc はプロモーターの活性化に、また、MZF は抑制に作用することが明らかとなった。

D. 考察

今回、ヒト TERT 遺伝子の発現に関わることが明らかとなった myc と MZF に関しては、以下のような事実が既に知られている。myc は、細胞分裂に必要な DNA 複製を行うために重要な転写因子であり、G1-S 期において一過的に活性化される。すなわち、myc は細胞増殖と関連が深い。一方、MZF は、血液細胞の中でも顆粒球と呼ばれる細胞が増殖を停止して最終的な分化を行うときに強く誘導される。我々の結果は、TERT 遺伝子の転写が誘導され、テロメラーゼが活性化されるためには、活性化因子の myc が増加し、抑制因子の MZF が存在しないことが必要であることを示唆している。逆に、細胞が増殖をしていないか（活性化因子の欠損）、細胞が分化している（抑制因子の存在）時には、テロメラーゼ活性が見られないことを予想している。これは、細胞が未熟で増殖している場合のみテロメラーゼが活性化しているという従来の見解を説明する。以上の見解は、今後、生理的にテロメラーゼを発現していない細胞に人為的にテロメラーゼを誘導し細胞老化を阻止する技術を開発する上で大きな貢献をす

るものと期待される。

E. 結論

テロメラーゼ活性の有無を規定するテロメラーゼ触媒遺伝子 TERT の発現調節機構を明らかにした。今後、テロメラーゼ活性の低下による細胞老化の誘導機構について明らかにしたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*, 18: 65-68 (1998).
2. Hatakeyama, S., Fujita, K., Omine, M. and Ishikawa, F. The jumping translocation at 1q21 involves shortened telomeres. *Blood*, 91: 1514-1519 (1998).
3. Ishikawa, F. Research analysis: FISH goes with the flow. *Nature Biotechnology* 16: 723-724 (1998).
4. Naito, T., Matsuura, A. and Ishikawa, F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM-homologues. *Nature Genetics*, 20: 203-206 (1998).
5. Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A. and Ishikawa, F. Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element is induced in survivors defective for telomerase. *J. Biol. Chem.*, 273: 33360-33366 (1998).
6. Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Fujimoto, J., Nakayama, J., Ishikawa, F., Ide, T. and Tahara, E. Expression of

telomerase catalytic component,
telomerase reverse transcriptase, in
human gastric carcinomas. Jpn. J.
Cancer Res. (Gann) 89: 1099-1103
(1998).

7. Hatakeyama, S., Osawa, M., Omine, M.,
and Ishikawa, F. JTB, a novel
membrane protein gene at 1q21
rearranged in a jumping translocation.
Oncogene, in press (1999).
8. Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E.,
Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K.,
Nakayama, J., Ishikawa, F., Tahara, E.,
and Ide, T. Immuno-histochemical
detection of human telomerase
catalytic component, hTERT, in human
colorectal tumor and non-tumor tissue
sections. Oncogene, 18, 1561-1567
(1999).
9. Ishikawa, F. Aging Clock, the
watchmaker's masterpiece. Cell. Mol.
Life Sci. in press (1999)
10. Ishikawa, F. and Naito, T. Why do we
have linear chromosomes? - a matter of
Adam and Eve. Mut. Res. in press
(1999)

3. その他
なし

2. 学会発表

Hatakeyama, S. and Ishikawa, F. Cold
Spring Harbor Meeting: Telomere and
Telomerase. March 25-28, 1999, Cold
Spring Harbor, New York, USA

他、多数

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

テロメレーズの強制発現による細胞寿命の延長に関する研究

分担研究者 井出 利憲 広島大学医学部 教授

研究要旨 ヒト正常線維芽細胞は、テロメレーズの活性を発現させることによってテロメアサイズが延長するが、分裂寿命に関しては若干の延長は見られるものの不死化にはいたらなかった。不死化するためには、さらに細胞機能の変化が必要と考えられた。

A. 研究目的

ヒト正常体細胞にはテロメレーズがなく、テロメアは細胞分裂とともに短縮し、これが分裂寿命の有限性を決めているものと考えられる。他方、無限分裂寿命を獲得した不死化細胞には、多くの場合テロメレーズが発現していて、細胞分裂にともなうテロメア短縮が妨げられている。テロメレーズが発現することが不死化の十分条件であるか否かは現在不明である。本研究の目的は、正常細胞にテロメレーズを発現させることで不死化させることができるか否かを調べることを目的とする。

B. 研究方法

石川らがクローニングした、テロメレーズの触媒サブユニット hTERT の cDNA を、ヒト正常線維芽細胞およびその SV40 トランスフォーム細胞に導入し、薬剤選択によって cDNA を導入された細胞をクローニングする。これらのクローン細胞を継代培養し、テロメレーズ活性、テロメアサイズ、継代可能回数、細胞老化マーカーの発現などを調べる。

C. 研究結果

C 末端に myc タグのついた hTERT をヒト正常線維芽細胞 TIG-3 に導入したとき、1) テロメレーズ活性が発現した、2) 薬剤耐性クローンのうち、テロメレーズ活性を示すクローンが得られる頻度は期待に比べて非常に低かった、3) 得られたテロメレーズ陽性クローンは若干の分裂寿命延長を示したが、不死化細胞は得られなかった、4) 増殖停止すると

老化マーカーである β -gal が発現した。同様のプラスミドを SV40 トランスフォーム線維芽細胞（有限分裂寿命）に導入したとき、1) テロメレーズ活性が発現した、2) 期待通りの頻度で薬剤耐性クローンが得られた、3) 大部分のクローンがテロメレーズ活性陽性であった、4) テロメレーズ陽性クローンは分裂寿命延長を示した、5) テロメレーズ活性の強さと寿命延長の間には相関がみられた、6) テロメレーズ活性強度は継代中にほとんど変化しなかった、7) 大部分のクローンはやがて増殖を停止し、不死化クローンはわずかしかが得られなかった、8) 増殖停止すると老化マーカーである β -gal が発現した、9) テロメレーズ活性強度が不死化細胞より強いものでも不死化しなかった、10) テロメアサイズはほとんどのクローンで継代とともに短縮した。

次に、myc タグをはずした hTERT を IRES ベクターにつないで正常線芽細胞 TIG-3 に導入したとき、1) テロメレーズ活性が発現した、2) 薬剤耐性クローンが得られる頻度は期待に比べて非常に低かったが、得られたクローンはすべてテロメレーズ活性陽性であった、3) 得られたクローンは分裂寿命延長を示したが、不死化細胞は得られなかった、4) 増殖停止すると老化マーカーである β -gal が発現した、5) テロメアサイズは延長しており、寿命の限界まで短縮しなかった。同様のプラスミドを SV40 トランスフォーム線維芽細胞（有限分裂寿命）に導入したとき、1) テロメレーズ活性が発現した、2) 期待通りの頻度で薬剤耐性クローンが得られ、

得られたクローンはすべてテロメラーゼ活性陽性であった、3) 大部分のクローンが分裂寿命延長を示し、不死化したものと考えられた、4) テロメアサイズはもとの細胞より著しく延長していた、5) T 抗原を失活させたとき、有限分裂寿命の延命細胞はただちに増殖を停止したが、hTERT を導入してテロメアが延長したものでは増殖を継続した。

hTERT タンパク質の細胞内局在を抗体により調べたところ、C 末端に myc タグのついた hTERT タンパク質は主として細胞内に存在していたが、タグのついていない hTERT タンパク質は主として核内に局在していた。

D. 考察

C 末端に myc タグのついた hTERT を導入した際に、テロメラーゼ活性は発現するが、テロメアの延長が見られず、SV40 トランスフォーム細胞の不死化も見られないのは、テロメラーゼが核内へ移行しないためであると考えられた。核内へ移行して機能すれば、正常線維芽細胞とその SV40 トランスフォーム細胞のいずれにおいても、テロメアサイズの著しい延長を示した。これらの細胞では、テロメア結合タンパク質などによるテロメアサイズの上限はかなり長いところに設定されているが、テロメラーゼが存在しない場合には分裂毎に一方向的に短縮するものと考えられた。

E. 結論

ヒト正常線維芽細胞は、テロメラーゼの活性を発現させるとテロメアが延長するが、分裂寿命の若干の延長は見られるものの不死化にはいたらないことがわかった。不死化するためには、さらに SV40 の T 抗原による細胞機能の変化が必要と思われる。テロメアサイズの維持あるいは延長と不死化とは直接の因果関係にないことなど、従来の単純なモデルでは説明できない新たな事実を含んでいる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Tahara, E., Ide, T. and Ishikawa, F. Telomerase activation by the catalytic component gene TRT in human primary fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nature Genet.*, 18: 65-68, 1998
2. Tokutake, K., Takehisa, M., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T. and Furuichi Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 765-772, 1998
3. Li, H.-C., Tahara, H., Tsuyama, N. and Ide, T. A hVt1l homologue: its expression depends on population doubling levels in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247:70-74, 1998
4. Hirose, M., Abe-Hashimoto, J., Tahara, H., Ide, T. and Yoshimura, T. A new method to detect and measure telomerase activity by transcription-mediated amplification (TMA) and hybridization protection assay (HPA). *Clinical Chem.*, 44:2446-2452, 1998
5. Hiyama, T., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Tahara, E., Tahara, H., Ide, T., Haruma, K., Yasui, W., Kajiyama, G., and Tahara, E. In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J. Cancer Res.*, 89: 1187-1194, 1998
6. Yasui, W., Tahara, H., Tahara, E., Fujimoto, J., Nakayama, J.-I., Ishikawa, F., Ide, T., and Tahara, E. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in

- human gastric carcinomas. Jpn. J. Cancer Res., 89: 1099-1103, 1998
7. Ito, Y., Ide, T. and Mitsui, Y. Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. Mech. Ageing Dev., 105: 105-114, 1998
8. Tahara, H., Yasui, W., Tahara, E., Fujimoto, J., Ito, K., Tamai, K., Nakayama, J., Ishikawa, F., Tahara, E. and Ide, T. Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic components, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. Oncogene, 18:1561-1567, 1999
9. Sugimoto, M., Ide, T. and Furuichi, Y. A new aspect of Epstein Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines: senescence and immortalization. Mech. Ageing Dev., 107: 51-60, 1999
10. Kitamoto, M. and Ide, T. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. Cancer, 85: 245-246, 1999
11. Nakamura, A., Matsuura, S., Tauchi H., Hanada, R., Ohashi, H., Hasegawa, T., Honda, K., Masuno, M., Imaizumi, K., Sugita, K., Ide, T., Komatsu, K. Four novel mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Japanese patients. J. Hum. Genet., 44: 48-51, 1999

2. 学会発表
多数につき略

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

老化細胞における転写制御機構の解析に関する研究

分担研究者 吉栖 正生 東京大学医学部老年病 講師

研究要旨 老化細胞における転写制御機構の解明を老化制御に応用するため、抗酸化物質の老化抑制作用を検討している過程で、食品中の抗酸化物質である Red Wine Polyphenol が、血管平滑筋細胞の増殖を抑制すること、細胞周期制御因子サイクリンAの転写制御が、その増殖抑制作用と密接に関連していることが明らかとなった。

A. 研究目的

引き続き、細胞老化にともなう増殖能低下のメカニズムを解明するために、血管内皮細胞における細胞周期制御因子サイクリンA1遺伝子発現の転写調節機構を解析している。その結果、セル・サイクルによる調節部位として近年注目されている、CDE (cell cycle-dependent element) - CHR (cell cycle genes homology region) サイトへの結合蛋白量が、老化細胞で上昇せず、むしろ軽度に低下していることを見いだしたため、その質的差違の検討を続けている。

一方、老化した血管内皮細胞において、その増殖能が低下しているだけでなく、その正常な生理機能（血管拡張調節能、抗凝固能）が障害されていることが知られている。我々は、食品中の自然の抗酸化物質に着目し、それが血管内皮細胞機能を改善し、老化制御に発展する可能性を検討している。

その過程において、食品中の抗酸化物質である Red Wine Polyphenol (RW-PF) が、コントロールとして用いた血管平滑筋細胞の増殖を抑制する興味深い現象を見いだしたため、その抑制機構をサイクリンAの転写制御との関連で詳細に検討した（投稿中）。

B. 研究方法

血管内皮細胞機能の検討のために、老化させていない、ウシ頸動脈血管内皮細胞 bovine carotid endothelial cells (BCEC) を用い、そのコントロ

ールとして、同じく老化していないラット大動脈血管平滑筋細胞 rat aortic smooth muscle cells (RASMC) を用いた。

食品中の抗酸化物質として RW-PF を、adsorption chromatography により精製し（Suntory 基礎研究所）、細胞培養液中に添加した。

増殖能の検討は、セル・カウンターによる計測と、[3H]サイミジンの取り込みで検討した。サイクリンAの発現は、それぞれの種のサイクリンA cDNA をプローブとして、ノーザン・プロットで検討した。

サイクリンAプロモーター活性は、ヒトサイクリンA 遺伝子の 5' 上流配列を luciferase 遺伝子に結合した応答遺伝子を transfection することにより検討した。サイクリンAの転写調節において、そのプロモーターの ATF コンセンサス配列に結合する転写因子が重要であることが判明しているため²⁾、その配列(TGACGTCA) を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして、核抽出物を用いて gel shift assay を行った。ATF コンセンサス配列に結合する転写因子 ATF-1 と CREB の mRNA 発現も検討した。

C. 研究結果

red wine から精製した RW-PF の polyphenol 含有量を Folin-Denis 法で測定したところ 52.4 % であった。

予備実験として行った細胞増殖への影響を検討した結果を下図に示すが、red wine 摂取後に 想定され

る濃度である 1~10 mM の RW-PF によって、BCEC の細胞増殖は影響を受けなかった (図 A B)。一方、興味深いことに、同じ濃度の RW-PF は、RASMC の細胞増殖を濃度依存的に抑制した (図 C D)。この結果は、ヒトの細胞を用いた場合も同様であった。

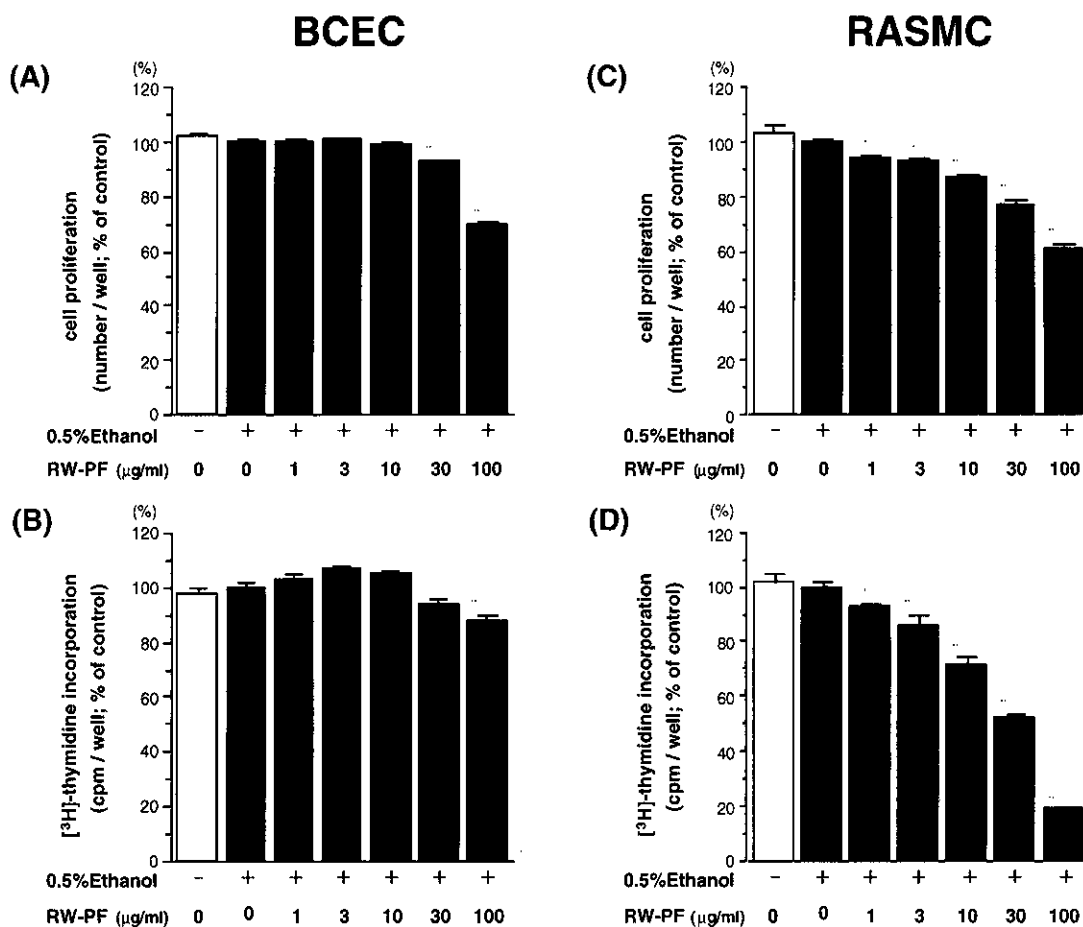
この細胞増殖抑制作用は、RW-PF を引き続きカラムにて分離した祖抽出物 (Fraction 1-6) においても同様に認められた。このことは、polyphenol のうちで、monomer に富む成分 (Fraction 1-4) と、polymer に富む成分 (Fraction 5,6) に、基本的に作用の差のないことを示している。

RW-PF は、RASMC のサイクリン A mRNA の

発現を濃度依存的に、また 24 時間以内に抑制した。

BCEC のサイクリン A mRNA の発現には有意の影響を認めなかった。RASMC において、RW-PF は、濃度依存的にサイクリン A プロモーターの活性を抑制し、その機能部位が ATF コンセンサス配列であることが確認された。その配列を含むプローブで行った gel shift assay によって、RW-PF が ATF コンセンサス配列に特異的に結合する蛋白量を濃度依存的に減少させることが認められた。

ATF コンセンサス配列に結合する転写因子 ATF-1 と CREB の RASMC における mRNA 発現も、RW-PF により、濃度依存性に、かつ経時的に減少した。



食品中天然抗酸化物質 RW-PF による血管平滑筋細胞増殖抑制

D. 考察

酸化ストレスによる老化の進行を少しでも抑制するために、抗酸化作用を持つ物質、特に天然の食品中の抗酸化物質が注目されている。本研究においては、抗酸化物質と考えられる RW-PF の老化制御における可能性を検討する過程で、偶然に血管平滑筋細胞増殖抑制作用を見いだした。内皮細胞と平滑筋細胞は、レドックス状態への応答が違ふことが知られ、この両細胞の増殖に対する顕著な差違は、十分に理解できるうえに、臨床的にも重要である。

老化、特に病的老化過程である動脈硬化において、近年、マクロファージおよびその泡沫化だけではなく、中膜血管平滑筋細胞の内膜への遊走と、新生内膜におけるその増殖の病的意義が注目されている。

本研究は、適量の red wine 摂取が、動脈硬化の予防につながる可能性を示唆するものであり、“French paradox”³⁾、と呼ばれる red wine 大量消費国における低い冠動脈疾患率の一つの説明となりうる。

今後は、当初想定した RW-PF による血管内皮細胞、特に老化した血管内皮細胞の機能の有無を検討していくこと、あわよくば老化した血管内皮細胞の細胞増殖機能を回復させる可能性がないかを検討し、本来の老化細胞における転写制御機構の解析に結びつけていきたい。

E. 結論

食品中の抗酸化物質 RW-PF に、強力な血管平滑筋細胞増殖抑制作用を認めた。この作用は、病的老化過程である動脈硬化病変の進行に拮抗する可能性がある。血管内皮細胞の機能や、老化した血管内皮細胞の増殖能へ作用の検討は、今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, Sugimoto N, Liang YQ, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in rat aortic smooth

muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:353-356, 1998.

2. Yet SF, Folta SC, Jain MK, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Zhang D, Marria PB, Yoshizumi M, Chin MT, Perrella MA, Lee ME: Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the mouse Crp2/SmLim gene. Preferential expression of its promoter in the vascular smooth muscle cells of transgenic mice. *J Biol Chem* 273:10530-10537, 1998.
3. Akishita M, Kozaki K, Eto M, Yoshizumi M, Ishikawa M, Toba K, Orimo H, Ouchi Y: Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:17-21, 1998.
4. Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME: Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 273:1026-1031, 1998.
5. Eto M, Akishita M, Ishikawa M, Kozaki K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Ako J, Sugimoto N, Nagano K, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y: Cytokine-induced expression of parathyroid hormone-related peptide in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:339-343, 1998.

2. 学会発表

1. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y: Red Wine Polyphenols Inhibit Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Downregulate Expression of

Cyclin A. American Heart Association the
71st Scientific Sessions, Dallas, U.S.A.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

老化細胞における細胞周期制御機構の解析に関する研究

分担研究者 中西 真 名古屋市立大学医学部 助教授

研究要旨 染色体末端テロメア長が短小化することで、恒常的な細胞周期停止が起こり、老化細胞特有の形質が導入される。しかしながら、テロメア短小化のシグナル伝達経路について未だ全く不明である。本研究では、早老症の原因遺伝子の 1 つである ATM がテロメア短小化のシグナリングに重要であると考え、ATM を介して活性化される Chk1 および Cds1 キナーゼを同定し、その機能解析を行った。

A. 研究目的

テロメアの短小化が細胞老化を引き起こすことは多くの研究から明らかとなっているが、いかなる分子機構によりテロメアの短小化がモニターされ、またいかなる情報伝達系により細胞周期停止あるいは老化形質の導入が引き起こされるのかについて全く分かっていない。分裂酵母においては、ヒト ATM のホモログが染色体末端テロメアの安定化に重要であることから、ヒト細胞においても ATM あるいは ATR がテロメア短小化のシグナル伝達系に関与すると思われる。本研究では、ATM あるいは ATR を中心としたシグナル伝達経路を解明し、テロメア短小化あるいは DNA 障害時における生理的役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

分裂酵母において、DNA 障害時に rad3 依存的に活性化され、細胞周期停止を引き起こす Chk1 および Cds1 キナーゼのヒトホモログを degenerate PCR 法を用いてクローニングした。さらに、これらキナーゼの DNA 障害チェックポイントにおける役割と、ATM との関連性について生化学的に解析した。

C. 研究結果

酵母 Cds1 ホモログとして同定された hCds1 は、UV あるいは電離放射線による DNA 障害に反応してリン酸化をうけてキナーゼ活性が活性化されるこ

とが分かった。また、hCds の電離放射線に対する反応は、ATM 依存的に起こることが明らかになった。さらに、この hCds1 遺伝子は正常細胞ではその mRNA の発現は低い、p53 遺伝子に変異が起こると発現が強く誘導された。このことから、p53 欠失癌細胞における抗ガン剤耐性すなわち DNA 障害を効率的に修復する機構に hCds1 が大きく関与していることが分かった。

一方、昨年度の本研究にて同定した hChk1 のノックアウトマウスの解析から、hChk1 は発生初期における卵分割から体細胞分裂への移行に重要な役割を持つことが示唆された。

D. 考察

hCds1 は早老症の原因遺伝子である ATM の下流で働き、DNA 修復機構に何らかの働きを持つことが示唆された。hChk1 は培養細胞株を用いた研究から、DNA 複製チェックポイントにおいて活性化されることから、卵分割後期において複製チェックポイントが活性化されることが体細胞分裂への移行を決定していると考えられる。

E. 結論

ヒト細胞における ATM を介したシグナル伝達経路の一端が明らかになった。今後これらの分子がテロメア短小化にどのような役割を持つかを明らかにしていきたい。