

平成10年度
厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
研究報告書

老年病・老化に関わる遺伝子と機能解析

平成11年3月

主任研究者 池田 恭治

平成10年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告	1
老年病・老化に関わる遺伝子と機能解析	2
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. 分担研究報告	19
① 細胞周期のチェックポイントに関わる遺伝子と機能解析	20
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
② Klotho 遺伝子と老年病	31
京都大学大学院医学研究科 病理系腫瘍生物学講座 教授	鍋島 陽一
③ 劣性遺伝子の機能的スクリーニング法の開発	35
東京工業大学 生命理工学部 教授	石川 冬木
④ レトロウイルスを利用したシグナルシーケンストラップ法の開発	40
東京大学医科学研究所 造血因子探索部門 助教授	北村 俊雄

1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

老年病・老化に関わる遺伝子と機能解析に関する研究

主任研究者 池田 恭治 長寿医療研究センター老年病研究部長

研究要旨

早老症の原因遺伝子である ATM (ataxia teleangiectasia mutated) からのシグナルを伝達するヒトチェックポイント遺伝子 hChk1 キナーゼと hCds1 キナーゼを同定し、細胞周期の S、G1、M 期において、役割分担しながらゲノムを安定に維持する上で重要な機能を担うことを明らかにした。一方、液性メカニズムが関与すると考えられる老年病のモデルマウス Klotho において、Klotho 蛋白が血液中を循環すること、アデノウイルス発現ベクターの投与で症状が改善することを立証し、Klotho 蛋白が老年病の治療に有効である可能性を示した。さらに ATM、WRN、Klotho 以外にも老化・老年病に関わる遺伝子を広く探索するツールとして、レトロウイルスベクターを用いたアンチセンス cDNA ライブラリーによる劣性遺伝子の機能的スクリーニング法とシグナルシーケンストラップ法を開発した。

池田 恭治 長寿医療研究センター
老年病研究部
部長

北村 俊雄 東京大学医科学研究所
造血因子探索研究部門
助教授

鍋島 陽一 京都大学大学院医学研究科
病理系腫瘍生物学講座
教授

石川 冬木 東京工業大学
生命理工学部
教授

A. 研究目的

老化や老年病の発症には、環境からのストレスあるいは代謝の結果内因性に発生する活性酸素などのストレスに対する抵抗性の減弱が大きく関与すると理解される。なかでも Werner 症候群や末梢血管拡張性失調症 (AT) に代表される早老症の原因遺

伝子 WRN と ATM が同定され、DNA の複製や修復に関与することから、DNA 傷害からゲノムを安定に維持する機構の破綻が老化と密接に関連すると考えられる。

一方、分担研究者の鍋島らが樹立した Klotho マウスは老年病のモデルとして注目されているが、その多彩な症候群の発症には液性メカニズムの関与が想定されている。そこで本研究では、ATM と Klotho という対極的な老化・老年病関連遺伝子に焦点を絞り、1) ATM からゲノム維持機構さらに老化に至るシグナル経路の解明、2) Klotho マウスにおける液性因子の同定と老年病治療への応用、3) Klotho による液性機序とチェックポイントに関わる老化メカニズムとの共通点や相互関係を明確にすることを目的とした。さらに、ATM、Klotho、WRN 以外にも老化に関わる遺伝子を広く探索・同定するツールとして、レトロウイルスベクターによる発現クローニング法を利用した機能的スクリーニング系の開発を行った。

B. 研究方法

1. ATM からのシグナル伝達経路の

解析

ヒト Chk1、Cds1 キナーゼのクローニングは、分裂酵母の SpChk1、SpCds1 の FHA およびキナーゼドメインの核酸配列に基づいて degenerate primer を合成し、PCR によって線維芽細胞から得られた産物をもとに、RACE (rapid amplification of PCR ends) と EST (expressed sequence

tag) を駆使して行った。

リコンビナント蛋白は、バキュロウイルスを用いて、昆虫細胞 Sf9 で発現させた。GST 融合蛋白は、pGEX ベクターに組み込んで大腸菌で発現させ、グルタチオンカラムで精製した。hChk1 および hCds1 に対する特異的抗体は、Sf9 細胞で合成したリコンビナント蛋白で家兎を免疫し、リコンビナント蛋白をカップルさせたセファロースカラムで精製したものを Western 解析、免疫沈降の実験に用いた。細胞内局在は、固定した細胞を特異的抗体で処理した後、FITC 抱合抗ウサギ IgG で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。キナーゼ活性の測定は、hChk1 はヒストン H3 を、hCds1 の場合は Cdc25C を基質として行った。hCds1 の染色体局在は、FISH (fluorescence in situ hybridization) にて行った。

ヒトおよびマウスの Chk1、Cds1 遺伝子を単離し、targeting ベクターを作成した上で、ES 細胞に導入し、通常の方法に従ってノックアウトマウスを作成した。ヒト Chk1 遺伝子のプロモーター解析は、さまざまな長さの 5'-flanking 領域を種々の細胞にカルシウムリン酸法で E2F/DP1 とともに transfect し、CAT assay で転写活性を評価した。

2. Klotho 遺伝子の機能解析

培養細胞系に Klotho cDNA を導入して合成した Klotho 蛋白を用いて、市販の人工基質、ならびにグリコセラミドを用いて、 β -glucosidase 酵素活性を測定した。Klotho 蛋白に対するポリクローナル、モノクロー

ナル抗体を作成し、腎臓細胞、血中における Klotho 蛋白をウエスタンブロットで解析した。マウスの膜型 Klotho 蛋白をコードする cDNA を発現するアデノウイルスベクターを作製して、マウス尾静脈より注射し、Klotho 変異症状の回復を解析した。

3. 老年病・老化に関わる新規遺伝子のスクリーニング法の開発

1) アンチセンス技術を応用した劣性遺伝子の機能的スクリーニング系の開発

アンチセンス技術は、対象とする遺伝子が2個以上存在しても、それを優性的に阻害することができる。逆に、この方法によって二つの遺伝子コピーの両方を阻害して初めて表現型を示す劣性遺伝子の同定が可能になるものと期待される。ヒト細胞を用いた cDNA ライブラリーの機能的スクリーニングには、レトロウイルスベクターが感染効率が非常に高いために、きわめて有効であると考えられている。一方、レトロウイルスベクターは、プロモーターの選択次第で外来遺伝子の高い発現量が望めること、また、感染した細胞のゲノム DNA にレトロウイルス遺伝子が組み込まれることから一過的な発現でなく永続的な発現が期待できること、などから、アンチセンス法とレトロウイルスベクターを組み合わせることにより、劣性遺伝子の機能的スクリーニング法の確立を試みた。

今年度は、レトロウイルスにより導入されたアンチセンス遺伝子が実際に標的遺伝

子の機能を失活できるか否かを検討するために、モデル実験系として Fas/Fas-ligand によるアポトーシス誘導経路における信号伝達分子の同定のための基礎的検討を行った。Fas を恒常的に強制発現させたマウス繊維芽細胞 Balb-3T3 に、既に Fas によるアポトーシス誘導に必須であることが知られている Caspase-8 のアンチセンス cDNA を発現した場合に、細胞が Fas 抵抗性を獲得するか否かを解析した。

2) レトロウイルス発現系を利用したシグナルシーケンストラップ法の開発

分泌蛋白質や膜蛋白質などシグナル配列を有する蛋白質の cDNA スクリーニング系を開発する目的で、レトロウイルス発現系と活性型サイトカインレセプター MPL を利用した新しいシグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) を開発した。膜貫通部位の点突然変異によって、リガンド非存在下でもホモダイマーを形成して増殖シグナルを伝達する活性型レセプター MPL* の細胞外部位欠失変異体 (Δ MPL*) を作成した。 Δ MPL* と cDNA 断片融合 cDNA ライブラリーを作成し、ウイルス感染により IL-3 依存性細胞 Ba/F3 に導入した。cDNA の断片がシグナル配列を含んでいる場合には、シグナル配列により cDNA- Δ MPL* 融合蛋白質が細胞膜上に発現され、Ba/F3 細胞に自律増殖能を賦与する。

SST-REX 法は、従来のシグナルシーケンストラップ法に比べ、ソーティングの

かわりに細胞増殖という簡便なアッセイ系を使うので簡単に実験が行える。またクローニングした cDNA のうち 99% 以上のものがシグナル配列を含んでおり従来の方法に較べ実験精度においても大変優れている。そこで本年度は、脂肪細胞への分化誘導が可能な前脂肪細胞株 3T3-L1 の分化誘導後の SST-REX 用の cDNA ライブラリーを作成し、脂肪細胞特異的な分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を同定し、解析した。

C. 研究結果と考察

I. 早老症遺伝子 ATM からのシグナル伝達経路の解明

早老症の原因遺伝子である ATM からのシグナル伝達に重要な役割を果たすヒト Chk1 キナーゼおよび Cds1 キナーゼをクローニングし、これら遺伝子産物の機能を解明した。

1. ヒト Chk1 キナーゼの構造と機能

分裂酵母の SpChk1 キナーゼ遺伝子の配列をもとに degenerate PCR により、ヒト Chk1 キナーゼ cDNA を得、これをもとに全長の cDNA をクローニングした。

hChk1 キナーゼが細胞周期のどの時期で機能するかを解析した結果、hChk1 の発現は、G0 期では低く、G1/S 期の境界から M 期にかけて増加し、次の G1 期では再び低下するという変動パターンを示すことが明らかとなった。次に、細胞由来の Chk1 活性が細胞周期の各時期でどのように制御されているか、また DNA 傷害に反応してどう変化するのかを明らかにするために、まず昆虫細胞で発現させた hChk1

が *in vitro* で Cdc25C の 216 番目のセリン残基をリン酸化することを証明した。さらに、我々が作成した hChk1 に対する特異的抗体は哺乳動物由来の細胞から hChk1 を免疫沈降し、沈降物の中に内因性の Cdc25C リン酸化活性を検出することができることを示した。

ヒト正常線維芽細胞 MJ90 を用いて、細胞周期の進行の過程で Chk1 活性がどのように変化するかを免疫沈降とキナーゼアッセイで追跡調査した。その結果、細胞由来の Chk1 活性は、蛋白の発現パターンとほぼ一致して、S 期の開始と呼応して急激に上昇し M 期まで高い活性を持続した。また、Cdc25C の総発現量は細胞周期の各時期でほとんど変化しなかったが、リン酸化型 Cdc25C が hChk1 キナーゼ活性と一致して G2 期にピークを示した。また hChk1 キナーゼは、DNA 傷害の有無に関わらず、S、G2、M 期に核内に局在した。以上の成績は、Elledge らの報告 (Science 1997) と異なり、DNA 傷害がなくても Cdc25C は hChk1 によってリン酸化を受けており、G2/M チェックポイント機構作動の準備段階を形成することを示唆する (Kaneko Y et al, Oncogene 1999 in press)。

Elledge らは、紫外線や X 線などで生じた DNA 傷害に反応して、hChk1 蛋白が SDS-PAGE 上でシフトしリン酸化をうける可能性を指摘している (Science 1997)。我々は、ヒト正常線維芽細胞を用いて種々のゲノムストレスに対する hChk1 蛋白の挙動を詳細に検討したが、hChk1 蛋白のリン酸化も Cdc25C のリン酸化フォーム

の増加も観察されなかった。

分裂酵母の Chk1 キナーゼは rad 3 の下流で働くことが知られていることから、我々は hChk1 が、rad3 の哺乳類ホモログである ATM の下流で機能するか否かを、AT 患者由来の線維芽細胞を用いて調べた。その結果、AT 細胞においても、hChk1 活性が検出され、蛋白レベルも正常細胞と同じく細胞周期の進行によって制御されていた。以上の結果から、少なくとも細胞周期特異的な hChk1 キナーゼの発現は ATM には依存せず、細胞周期の S、G2、M 期にわたって Cdc25C を恒常的にリン酸化状態に保つことでチェックポイント機構に関与していることが示唆された。

さらに我々は、hChk1 キナーゼが M 期にもその発現と活性が持続することに着目し、有糸分裂期におけるゲノム情報の正確な分配に重要な紡錘体形成チェックポイントにおける hChk1 の役割を検討した。その結果、細胞をノコダゾールで処理して微小管の集合を阻害すると、hChk1 キナーゼがリン酸化されることを示し、さらに hChk1 のリン酸化は、AT 細胞や p53 機能を欠失した癌細胞でも見られることから、hChk1 の M 期チェックポイント機能は ATM や p53 とは独立に働くことがわかった。

M 期チェックポイントにおける hChk1 キナーゼのターゲット分子を同定する目的で、酵母の two-hybrid スクリーニングを行った結果、ヒストン H3 が hChk1 と相互作用するとの結果を得た。そこで、ヒストン H3 を基質として hChk1 キナーゼの

活性を追跡したところ、ノコダゾール処理によって約 10 倍増加することが判明した。

近年、紡錘体形成チェックポイントに関わる MAD1、2、3 や BUB1、2、3 遺伝子が同定され、なかでもヒト BUB1 の変異が染色体分配の異常からヒトの悪性腫瘍を起こすことが報告され注目を集めている (Cahill DP et al, Nature 1998)。乳癌細胞株 T-47D は、MAD2 遺伝子の発現が低く紡錘体形成チェックポイントが十分に作動しないことが知られている (Li Y et al, Science 1996)。そこで我々は、hChk1 キナーゼが MAD2 を制御するのか、あるいは MAD2 が hChk1 を制御するのかを明らかにする目的で、T-47D 細胞を用いてノコダゾールに対する hChk1 の反応性を解析した。その結果、MAD2 を欠く T-47D 細胞では、ノコダゾールで微小管集合を阻害しても hChk1 のリン酸化は観察されず、M 期の停止も起こらないことが明らかとなった。したがって、hChk1 キナーゼは MAD2 蛋白の下流で機能することが示唆された。

最後に、hChk1 キナーゼの分裂期チェックポイントにおける役割を明らかにするために、正常 hChk1 と K38M 変異蛋白をテトラサイクリンで発現誘導する実験系を組み立て、ノコダゾールに対する細胞の反応を解析した。その結果、正常 hChk1 を発現させた細胞は、ノコダゾール処理後 M 期で停止したが、不活性型変異 K38M を発現させた細胞は M 期の停止が十分に起こらず、変異蛋白が内在する正常 hChk1 に対して dominant negative に作用した結

果、紡錘体形成チェックポイントが阻害されたものと解釈された。

以上の成績をまとめると、hChk1 キナーゼは、有糸分裂期に紡錘体に何らかの傷害が生じて染色体に正しく付着しないと活性化され、細胞を M 期に停止させることで、遺伝情報の正確な分配とゲノムの安定性を保証するというきわめて重要な機能を担っているものと結論づけられた (Kaneko Y et al. submitted)。

hChk1 キナーゼ遺伝子の細胞周期特異的な発現の制御機構を解明する目的で、ヒト染色体遺伝子を単離し構造を決定した。プロモーター領域は、TATA 配列を欠き G/C に富む housekeeping タイプのものであった。さまざまな長さのプロモーター領域を含むフラグメントを作成して転写活性化能を解析した結果、-125bp 付近にある E2F 結合部位が E2F/DP1 による hChk1 遺伝子の転写活性化および細胞周期依存的な、すなわち S から M 期に特異的な hChk1 遺伝子の発現に必須の要素であることが明らかとなった。

以上の結果は、DNA ポリメラーゼ、チミジンキナーゼ、サイクリン A、サイクリン E など S 期への進行に重要な遺伝子の転写を活性化し、癌遺伝子でもある転写因子 E2F が、一方では、hChk1 キナーゼのようなゲノムを安定に維持するチェックポイント遺伝子の転写をも同時に活性化することを意味する。

Chk1 キナーゼの個体における機能、とりわけ哺乳動物の老化における役割を解明する第一歩としてノックアウトマウスを作

成した。これまでのところ Chk1^{-/-}マウスは生まれておらず、胎生期のごく初期、おそらく 2 細胞期から胚盤胞期の間で致死になるという知見を得ている。このことは Chk1 が初期胚の卵分割に必須の遺伝子であることを意味している。現在、過排卵させた雌マウスから受精卵を採取し胚盤胞期に至るどの段階で致死になるかを検討するとともに、Cre-lop P 系を用いて、*in vitro* および *in vivo* で Chk1 遺伝子の誘導型ノックアウトのシステムを構築している。

2. ヒト Cds1 キナーゼの構造と機能

分裂酵母では、ATM ホモログである rad 3 からのシグナルは、Chk1 と Cds1 キナーゼを介する二つの伝達系に分岐することが知られている。我々は、哺乳動物において ATM から老化に至るシグナルカスケードを解明するためには、Cds1 のヒトホモログを同定することが不可欠であると考え、分裂酵母 Cds1 の FHA およびキナーゼドメインの遺伝子配列に基づいてヒト Cds1 遺伝子をクローニングした。同遺伝子は、Elledge らのグループにより hChk2 としてほぼ同時にクローニングされた (Science, Dec 1998)。

細胞周期の進行に伴う hCds1 の発現パターンを解析したところ、hChk1 と同じく、G1/S 移行期から M 期にかけて発現が著明に高まり、この時期に核内に局在するという結果を得た。FISH により hCds1 の遺伝子座を探索したところ、22q11.2 に局在することが明らかになり、悪性 rhabdoid 腫瘍で変異が報告された

hSNF5/INI1 がこの遺伝視座に隣接するという最近の報告 (Nature 1998) と合わせ、hCds1 が癌化に関与する可能性が考えられた。

hCds1 が DNA 傷害チェックポイントにおいて何らかの役割を果たすか否かを検証するために、細胞に紫外線を照射した後の hCds1 蛋白の挙動を特異的抗体を用いて解析した。その結果、正常線維芽細胞 MJ90 においても、p53 機能を欠失した HeLa 細胞においても、hCds1 蛋白は DNA 傷害に反応してリン酸化を受けることが明らかになった。さらに、Cdc25C を基質に Cds1 のキナーゼ活性を測定したところ、紫外線照射によって約 5 倍上昇することが判明した。Cdc25C の S216A 変異蛋白はリン酸化されないことから、hCds1 は Cdc25C の 216 番目のセリン残基をリン酸化すると結論した。hCds1 の活性化は、電離放射線やアルキル化剤のメチルメタンスルホン酸 (MMS) 処理によって生じた DNA 損傷に対しても認められたことから、幅広いタイプの DNA 傷害に反応して hCds1 が活性化されることが示唆された。

興味あることに、AT 由来の細胞において hCds1 は、紫外線や MMS 処理によってはリン酸化されたが、電離放射線に対してはリン酸化されなかったことから、AT 細胞における X 線感受性は ATM 依存的な hCds1 の活性化の傷害によって起こること、また hCds1 が、DNA 損傷の種類により、ATM 依存性の経路と ATM を介さない経路の少なくとも二つの異なるメカニズムで活性化されることが示唆された。この

成績は、AT 患者が電離放射線によってもたらされる DNA 損傷に対して特異的に感受性が高いという臨床的事実と合致する。

hCds1 の発現を数多くの細胞株で比較研究したところ、正常 p53 を有する細胞では発現レベルが低く、p53 機能を欠失した癌細胞では発現レベルが高いという興味ある結果が得られた。そこで、p53 機能と hCds1 の発現との相互関係を追求する目的で、ヒト正常線維芽細胞 WI-38 を SV40 T 抗原、HPV E6 あるいは E7 で形質転換させ、それぞれ p53 と pRb、p53 のみ、pRb のみの機能を阻害した場合の hCds1 の発現を解析した。その結果、WI-38 親株細胞に比較して、E7、E6、SV40 T で transform した細胞において、この順で hCds1 の段階的な発現の増加を認めた。

さらに、これらの細胞に正常 p53 をアデノウイルスベクターを用いて導入したところ、hCds1 の発現は p53 機能が傷害されている SV40 T 抗原、HPV E6 形質転換株でのみ有意に抑制され、pRb 機能のみを傷害させた HPV E7 株では p53 導入の効果は認められなかった。以上の結果から、hCds1 の発現は p53 によって負に制御されており、p53 機能が失われて G1 チェックポイント機構が働かない細胞では代償的に Cds1 の発現が誘導され、G2 期の DNA 傷害チェックポイントに重要な役割を果たしていることが示唆される。p53 機能を欠失した癌細胞が、抗癌剤や X 線治療に抵抗性を示す機序に Cds1 の代償作用が関与している可能性が考えられ、hCds1 は新たな癌治療のターゲットとなりうる可能性

がある。

Cds1 の個体における機能を解明する目的で、ヒトおよびマウスの遺伝子を単離し、マウス Cds1 遺伝子をもとにノックアウト作成のためのターゲティングベクターを作成した。

II. 新規 I κ B キナーゼのクローニング

ヒト正常線維芽細胞において紫外線によって誘導され、ストレス応答に関与する遺伝子を探索する過程で、我々は、I κ B キナーゼに類似したキナーゼドメイン、ロイジンジッパーモチーフを有する新規遺伝子をクローニングした。I κ B キナーゼ α および I κ B キナーゼ β とのホモロジーは約 30-50% であつた。新規 I κ B キナーゼの組織分布を Northern プロットで解析した結果、多くの組織において恒常的に発現していたが、なかでも精巣と骨格筋においてとりわけ高い発現が観察された。

我々がクローニングした新規 I κ B キナーゼは、I κ B α (1-54)をリン酸化し、S36A 変異蛋白はリン酸化しないことから、*in vitro* では 36 番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが判明した。また、新規 I κ B キナーゼは、E3-ubiquitin ligase の存在下で I κ B α をユビキチン化し、その結果として、NF- κ B 結合部位をもつレポーター遺伝子の転写を促進することから、実際に細胞内で NF- κ B を活性化する機能を有することが立証されている。

III. Klotho 遺伝子の機能解析

β -glucosidase には活性中心を担う 2 つの保存された配列があり、特に各々の配列中のグルタミン酸残基が活性にとって重要であると報告されている。ところが、mKL1、mKL2 いずれも、2 つの保存されるべきグルタミン酸残基のうち的一方が保存されておらず、実際の活性測定においても、活性の存在を示唆する結果が得られなかつた。

腎臓の膜成分を抗体を用いて解析したところ、全長型と C 端側のドメイン (mKL2) に相当する分子を同定した。この結果により mKL1 に相当する部分が分泌されていることが示唆されたことから、野性型マウスの血清より mKL1 の同定を試みたが、検出できなかつた。そこで、全長型 Klotho 蛋白を高発現するマウスを作製し、その血清を解析し、血中より N 端側のドメイン (mKL1) に相当すると推定される分子を同定した。

アデノウイルス発現ベクターを用いたレスキュー実験により多くの変異症状が改善することを確認した。この場合、アデノウイルス発現ベクターを発症後に注射しており、一旦発症した後でも多くの症状は回復可能であることを示唆しているが、短期間の実験では異所性の石灰沈着を回復させることができないことが示された。この実験では Klotho 蛋白が肝臓で発現しており、腎臓で発現しなくても機能することが示され、Klotho が液性因子として作用することを強く示唆している。

IV. 老年病・老化に関わる新規遺伝子のスクリーニング法の開発

Klotho、WRN、ATM 以外にも広く老化・老年病に関わる遺伝子を探索するツールとして、今年度は以下の二つの方法を開発した。

1. アンチセンス技術を用いた劣性遺伝子の機能的スクリーニング系の開発

検定に用いる細胞として、Fas を恒常的に強制発現させたマウス繊維芽細胞 Balb-3T3 (以下、Fas-Balb3T3、京都大学・米原教授より供与された) を用いた。また、マウス Caspase-8 完全長 cDNA (京大・米原教授より供与) を鋳型に用いて、開始コドン ATG を含むそれぞれ長さが 160 bp, 550 bp, 1160 bp, 2000 bp (full length) の cDNA を PCR を用いて作成し、これらのアンチセンス RNA を発現するようなレトロウイルスベクターを、pMX-puro ベクター (東大・北村助教授より供与) をもとに作成した。これらのベクターを、パッケージング細胞である BOS23 (Warren Pear より供与) に一過性にトランスフェクションし、高いタイターのウイルスストックを得た。これを Fas-Balb3T3 細胞に感染し、ウイルスゲノムがインテグレーションした細胞クローンを、ピューロマイシン抵抗性を用いて薬剤選択により得た。このようにして得られた Caspase-8 アンチセンス cDNA 発現細胞クローンを、それぞれ複数個、抗 Fas 抗体で処理し、mock ベクターを取り込んだクローンとともに、アポトー

シス誘導の効率を定量化した。以下にその結果を示す。

抗 Fas 抗体を加えたときの生存率

mock	19 % (19/99)
Full length (sense)	11 % (13/118)
160 bp (anti-sense)	88 % (64/73)
550 bp (anti-sense)	90 % (47/52)
1160 bp (anti-sense)	90 % (63/70)
Full length (anti-sense)	92 % (54/59)

Anti-sense cDNA を発現したものは、どの長さの cDNA であっても、mock ウイルスを感染した時と比較して、大きく抗 Fas 抗体処理後の生存率が増加した。このことは、期待通りに、アンチセンス cDNA が Caspase-8 の機能を阻害していることを示唆している。また、完全長のセンス cDNA を導入した場合には、mock の場合よりさらにアポトーシスを起こしやすいことを示唆する結果を示した。この差が有意であるか否かは、さらに実験回数を増やして再現する必要があるが、Balb3 細胞では、Caspase-8 の量がアポトーシス反応の律速段階の一つである可能性がある。

2. レトロウイルス発現系を利用したシグナルシークエンストラップ法の開発

脂肪細胞分化のモデル系として、前脂肪細胞株 3T3-L1 細胞から SST-REX 用の cDNA ライブラリーを作成し、Ba/F3 細胞の IL-3 非依存性増殖を指標にしてシグ

ナルシークエンストラップを行った。取得した 102 クローンのうち 95 クローンが解析可能であった。うち 12 クローン 10 種類が未知の遺伝子であった。なお取得した既知の遺伝子は、1 クローンを除きすべてシグナルペプチドを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質で、実験系が正確に動いていることが確認できた。

一方、取得した未知の遺伝子のうち 3 種類は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する新規遺伝子で、1 種類はレンズ表皮由来増殖因子に相同性を有する遺伝子、残りの 6 種類は既知の遺伝子に全く相同性を持たない遺伝子であった。これら 10 種類の未知遺伝子について Northern Blot 解析を行ったところ、6 つの遺伝子の発現は脂肪細胞分化に従って誘導あるいは増強することが判明した。現在、これらのクローンの全長 cDNA をクローニングして解析中である。

D. 結論

ATM から老化へのシグナル伝達を理解する大きな手がかりとして、hChk1、hCds1 遺伝子を同定した。ヒト Chk1、Cds1 キナーゼは、細胞周期の S、G2、M 期において、ATM 依存性および非依存性の経路で働き、チェックポイント制御を通してゲノムを安定に維持する重要な機能を担っていることが明らかになった。hChk1 に関しては、初期胚の卵分割に必須の遺伝子であることがノックアウトマウスの表現型から示唆された。また生体のストレス応答に重要な役割を果たすと予想される新規 IκB キ

ナーゼをクローニングした。

Klotho 蛋白には分泌型が存在し、これを発現することによって老年病の治療に応用できる可能性を示した。Klotho マウスにおける液性機序と DNA 傷害やストレスを介する経路との相互関係は今後に残された重要な課題である。

レトロウイルス発現ベクターとアンチセンス技術やシグナルシークエンストラップ法を組み合わせることによって、ATM、Klotho 以外にも老化・老年病に関わる劣性遺伝子あるいは分泌蛋白・膜蛋白を広く探索する機能的遺伝子スクリーニング系を確立した。今後これらの技術を駆使して、まだまだ多く残されている老化関連遺伝子を同定していく必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

主任研究者

- ① Kaneko Y, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M. Cell cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene*, in press (1999).
- ② Kaneko Y, Watanabe N, Ikeda K, Nakanishi M. Human Chk1 kinase at the mitotic spindle assembly checkpoint. Submitted
- ③ Tominaga K, Morisaki H, Fujimoto A,

- Takana T, Ohtsubo M, Hirai M, Okayama H, Ikeda K, Nakanishi M. p53-regulated expression of human Cds1 kinase in DNA damage checkpoint. Submitted
- ④ Tanikawa M, Yamada K, Tominaga K, Morisaki H, Kaneko Y, Ikeda K, Suzuki M, Kiho T, Tomokiyo K, Furuta K, Noyori R, Nakanishi M Potent prostaglandin A_i that suppresses tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E. J Biol Chem 273: 18522-18527, 1998
- ⑤ Hashimoto Y, Kohri K, Kaneko Y, Morisaki H, Kato T, Ikeda K, Nakanishi M Critical role for the 3₁₀ helix region of p57^{Kip2} in cyclin-dependent kinase 2 inhibition and growth suppression. J Biol Chem 273: 16544-16550, 1998
- ⑥ Yamada Y, Hosoi T, Makimoto F, Tanaka H, Seino Y, Ikeda K TGF-β1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. Am J Med 1999 in press
- ⑦ Menjo M, Kaneko Y, Ogata E, Ikeda K, Nakanishi M Critical role for p27^{Kip1} in cell cycle arrest after androgen depletion in mouse mammary carcinoma cells (SC-3). Oncogene 17: 2619-2627, 1998
- ⑧ Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y TGF-β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. J Biol Chem 273: 27091-27096, 1998
- 分担研究者
鍋島陽一
- ① Yoshida N, Yoshida S., Fujisawa-Sehara A., and Nabeshima Y. Variation of MyoD and myf-5, which precedes myogenin expression and irreversible commitment, specifies the differentiating and "Reserve Cells" upon myogenesis. J. Cell Sci. 111, 769-779 (1998)
- ② Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Koro-o M., Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted Klotho protein. Biochem. Biophys. Res. Comm.242, 626-630 1998
- ③ Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. FEBS Letters

424, 6-10, 1998

- ④ Okuda A., Fukushima A., Nishimoto M., Orimo A., Yamagishi T., Nabeshima Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg H.G., Muramatsu M. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17, 2019-2032 1998
- ⑤ Kurisaki T., Masuda A., Yagami-Hiromasa T., Nabeshima Y. and Fujisawa-Sehara A. Spatially and temporally-restricted expression of meltrin a and b in mouse embryo. *Mechan. Dev.* 73, 211-221 (1998)
- ⑥ Takahashi S., Esumi E., Nabeshima Y., Asashima M. Regulation of the Xmyf-5 and XmyoD expression pattern during early *Xenopus* development. *Zoolog. Sci.* 15, 231-238 (1998)
- ⑦ Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 248, 324-329 (1998)
- ⑧ Nakagoshi H., Hoshi M., Nabeshima Y., Matsuzaki F. defective proventriculus encodes a novel homeodomain protein required for the functional specification in *Drosophila* midgut. *Gene & Develop.* in press
- ⑨ Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Downregulation of the klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 865-871 (1998)
- ⑩ Ohyama Y., Kurabayashi M., Masuda H., Nakamura T., Aihara Y., Kaname T., Suga T., Arai M., Aizawa H., Matsumura Y., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R. Molecular cloning of Rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press
- ⑪ Yamashita T., Nifuji A., Furuya K., Nabeshima Y., Noda M. Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J. Endocrinology* 159,

1-8 (1998)

- ⑫ Hoshino M., Suzuki E., Miyake T., Sone M., Komatsu A., Nabeshima Y., Hama C.

Neural expression of Hikaru genki protein during embryonic and larval development of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* in press

- ⑬ Kameya S., Miyagoe-Y., Nonaka I., Ikemoto T., Endo M., Honaoka K., Nabeshima Y., Takeda S., α 1-Syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274, 2193-2200 (1999)

石川冬木

- ① Ishikawa, F. Aging clock, the watchmaker's masterpiece. *Cell. Mol. Life Sci.*, in press (1999)
- ② 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).
- ③ 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).

- ④ 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).
- 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 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).
- ⑦ Ishikawa, F. Research analysis: FISH goes with the flow. *Nature Biotechnology* 16: 723-724 (1998).
- ⑧ Hatakeyama, S., Fujita, K., Omine, M.

and Ishikawa, F. The jumping translocation at 1q21 involves shortened telomeres. *Blood*, 91: 1514-1519 (1998).

⑨ 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).

北村俊雄

- ① Yang, Y-L., Lei, G., Xu, S., Holland, C.A., Kitamura, T., Hunter, K. and Cunningham, J.M. (1999) Receptors for polytropic and xenotropic murine leukemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. *Nature Genetics* 21, 216-219.
- ② Nosaka, T., Onishi, M., Kawashima, T., Yamada, K., Misawa, K., Ariyoshi, K., Towatari, K., Saito, H., Tani, K., Asano, S., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1999) Identification and characterization of constitutively active STAT5. *Molecular Biology of Hematopoiesis*. in press.
- ③ Kitamura, T. and Morikawa, Y. (1999) Isolation of cDNAs for T cell antigens by retroviral-mediated expression cloning.

Methods in Molecular Biology. in press.

- ④ Mukasa, R., Homma, T., Ohtsuki, T., Hosono, O., Souta, A., Kitamura, T., Fukuda, M., Watanabe, S., and Morimoto, C. (1999) Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol.* in press.
- ⑤ Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Pestell, R.G., and Kanakura, Y. (1999) Involvement of cyclin D1 in STAT5-mediated cell growth. *EMBO J.* in press.
- ⑥ Kojima, T., and Kitamura, T. (1999) A novel signal sequence trap method using retrovirus-mediated gene transfer. *Nature Biotechnol.* in press.
- ⑦ Yagisawa, M., Saeki, K., Okuma, E., Kitamura, T., Kitagawa, S., Hirai, H., Yazaki, Y., Takaku, F., and Yuo, A. (1999) Signal transduction pathways in normal human monocytes stimulated by cytokines and mediators: comparative study with normal human neutrophils or transformed cells and the putative roles in functionality and cell biology. *Exp. Hematol.* in press.
- ⑧ Onishi, M., Nosaka, T., and Kitamura, T. (1998) Cytokine receptors: Structures

- and signal transduction. *Int. Rev. Immunol.* 16: 617-634.
- ⑨ Kitamura, T. (1998) New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. *Int. J. Hematol.* 67:351-359.
- ⑩ Hata, D., Kawakami, Y., Inagaki, N., Lantz, C.S., Kitamura, T., Khan, W.N., Tashiro, M., Maeda-Yamamoto, M., Miura, T., Han, W., Hartman, S.E., Yao, L., Nagai, H., Goldfeld, A.E., Alt, F.W., Galli, S.J., Witte, O.N., Kawakami, T. (1998) Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεRI-dependent mast cell degranulation and cytokine production. *J. Exp. Med.* 187: 1235-1247.
- ⑪ Morikawa, Y., Nishida, H., Misawa, K., Nosaka, T., Miyajima, A., Senba, E. and Kitamura, T. (1998) Induction of synaptosomal associated protein-23kd (SNAP-23) by various cytokines. *Blood* 92: 129-135.
- ⑫ Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A.L.-F., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1998) Identification and characterization of a constitutive active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 18:3871-3879.
- ⑬ Jinno, A., Shimizu, N., Soda, Y., Haraguchi, Y., Kitamura, T., and Hoshino, H. (1998) Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T-cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 243:497-502.
- ⑭ Kawashima, T., Kawasaki, H., Kitamura, T., Nojima, Y., and Morimoto, C. (1998) Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDa protein associated with the interleukin-12 receptor β1 subunit. *Cell. Immunol.* 186:39-44.
- ⑮ Kitamura, T., Onishi, M., Yahata, T., Kanakura, Y., and Asano, S. Activating mutations of the transmembrane domain of MPL in vitro and in vivo: Incorrect sequence of MPL-K, an alternative spliced form of MPL. (1998) *Blood* 92:2596-2597.
- ⑯ Dairaghi, D.J., Premack, B.A., Kitamura, T., Soo, K.S., Bacon, K.B., and Schall, T.J. (1998) RANTES-induced activation correlates with CD3 expression. *J. Immunol.* 168: 426- 433.
- ⑰ Duan, Y., Naruse, T., Kawashima, T., Morikawa, Y., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Kitamura, T., and Suda,

T. (1998) Expression and functional analysis of a hemopoietic progenitor antigen, NJ-1 (114/A10), in a megakaryocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 401-406.

2. 学会発表

主任研究者

- ① 金子葉子、池田恭治、中西真 ヒト Chk1 キナーゼの細胞周期依存的発現と活性制御 第57回日本癌学会、平成10年10月1日 横浜
- ② 金子葉子、藤本淳司、森崎弘史、池田恭治、中西真 ヒト Chk1 キナーゼの細胞周期依存的発現と活性制御 第71回日本生化学会、平成10年10月14日 名古屋
- ③ 森崎弘史、安藤昭一、長田嘉穂、池田恭治、中西真 老化細胞における G1 期停止の分子機構 第71回日本生化学会、平成10年10月16日 名古屋
- ④ 藤本淳司、富永薫、池田恭治、中西真 ヒト Chk1 キナーゼの構造解析 第71回日本生化学会、平成10年10月16日 名古屋
- ⑤ 東島由一郎、長澤圭一、藤本淳司、秋田英俊、寺沢求、池田恭治、中西真 細胞周期の制御に関与する新しい蛋白 Nek4 の一次構造とその解析 第71回

日本生化学会大会、平成10年10月16日 名古屋

- ⑥ 金子葉子、森崎弘史、池田恭治、中西真 ヒト Chk1 キナーゼの紡錘体形成チェックポイント機構における役割 第21回日本分子生物学会年会、平成10年12月16-19日 横浜
 - ⑦ 藤本淳司、富永薫、池田恭治、中西真 ヒト Chk1 キナーゼの構造及び機能解析 第21回日本分子生物学会年会、平成10年12月16-19日 横浜
 - ⑧ 森崎弘史、金子葉子、平井百樹、岡山博人、池田恭治、中西真 ヒト CDS1 キナーゼのクローニング 第21回日本分子生物学会年会、平成10年12月16-19日 横浜
- 分担研究者
北村俊雄
- ① IL-3-independent cell proliferation and IL-3-induced apoptosis through a constitutive active STAT5. Kitamura, T. and Nosaka, T. (11th Symposium for Molecular Biology of hematopoiesis, Bormio, Italy 1998).
 - ② A novel expression cloning method FL-REX that is designed to screen cDNA libraries based on the localization of the cDNA products. Misawa, K., Morita, S., Nosaka, T., Kaneko, T., Nakahata, T.,

and Kitamura, T. (27th Internal Society for Experimental Hematology, Vancouver, August 1998).

③ IL-3 induced apoptosis through constitutive active STAT5. Nosaka, T. and Kitamura, T. (27th Internal Society for Experimental Hematology, Vancouver, August 1998).

④ New approaches in hematopoiesis research using retrovirus-mediated expression screening. (2nd International Symposium for Stem Cell Regulation, Tokyo, October 1998)

⑤ SST-REX: 恒常的活性型受容体を用いた新規 Signal Sequence Trap 法 小嶋哲郎、北村俊雄 (第 21 回 日本分子生物学会、横浜、平成 10 年 1 2 月)

F. 知的所有権の取得状況

2) 特許取得

なし

3) 実用新案登録

なし

4) その他

シグナルシーケンストラップ法
(発明者：小嶋哲郎、北村俊雄)

新規 TNF 受容体様タンパク質
(発明者：小嶋哲郎、北村俊雄)

新規サイトカイン受容体様タンパク質
(発明者：藤尾圭志、北村俊雄)

以上特許出願中