

1. 分 担 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）
分担研究報告書

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に関する研究

分担研究者 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 ATM の下流で老化のシグナル伝達に関わると思われるヒト Chk1 キナーゼおよび Cds1 キナーゼをクローニングし、ともに細胞周期の S、G2、M 期に発現して独自の機能を担っていることを見いだした。hChk1 は、有糸分裂期の紡錘体形成チェックポイントにおいて重要な役割を果たすとともに、ノックアウトマウスの表現型から初期胚の卵分割にも必須の遺伝子であることが判明した。一方、hCds1 は G2 期の DNA 傷害チェックポイントに関わり、p53 機能を失って G1 チェックポイント機構が働かない細胞で代償的にその発現が高まることが明らかとなった。hChk1 および hCds1 の発現および活性は、ATM 依存性・非依存性の複雑な経路で制御され、異なるチェックポイント経路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果たしていることが示唆された。さらに、紫外線などのストレスの初期応答に関与する新規 I κ B キナーゼを同定した。

キーワード： 早老症、ATM、チェックポイント、Chk1、Cds1

A. 研究目的

老化や老年病の発症には、紫外線、電離放射線、薬物を含む環境からのさまざまな外的ストレス、あるいは代謝の結果生体内で発生する活性酸素などの内的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。近年、代表的な早老症である Werner 症候群や末梢血管拡張性運動失調症 ataxia teleangiectasia (AT) の原因遺伝

子 WRN と ATM (AT mutated) が同定され、これらの遺伝子産物が DNA の複製や修復に関与することから、さまざまなストレスによって起こる 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。

AT は、小脳の変性に基づく運動失調症、顔面皮膚や眼の血管拡張症、免疫機能低下、電離放射線に対する感受性の増大、早老症、

性腺機能低下症、高発癌性などを特徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である。ATMの原因遺伝子 ATM は1995年に同定され、その遺伝子産物が PI3 キナーゼファミリーに属する蛋白質リン酸化酵素であり、p53 や c-Abl のリン酸化などを介して DNA 傷害に対する細胞恒常性維持に重要な役割を演じていると考えられている。しかしながら、その機能異常がいかなる分子機構により老化形質の発現を引き起こすかはまったく謎である。

本研究事業における我々の目的は、ATM を介したゲノム維持機構さらに老化形質を制御するシグナル経路を解明することである。本年度は、酵母の系で積み重ねられたチェックポイント制御機構の知見から、ATM からのシグナルを伝達する上で鍵となる Chk1 および Cds1 キナーゼのヒト相同遺伝子を同定し、ノックアウトマウスの作成を含めて哺乳動物細胞における Chk1、Cds1 の機能を解明することを目標に研究を推進した。

B. 研究方法

ヒト Chk1、Cds1 キナーゼのクローニングは、線維芽細胞由来の cDNA を用いて、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

スペクターを用いて、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兔を免疫し、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。Northern、Western 解析、免疫沈降はスタンダードの方法で行った。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。

C. 研究結果

I. ヒト Chk1 キナーゼの構造と機能

1. ヒト Chk1 キナーゼのクローニング

分裂酵母の SpChk1 キナーゼは、DNA 傷害によってリン酸化を受け、チェックポイント機構に関わっていることが示されているが、このリン酸化は ATM のホモログ

である rad3+ に依存する。我々は、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。

2. 細胞周期特異的な Chk1 キナーゼの発現

hChk1 キナーゼが細胞周期のどの時期で機能するかを明らかにする目的で、ヒト正常線維芽細胞 MJ-90 を血清除去で同調させ、血清を再添加した後の hChk1 mRNA の発現パターンを、hChk1 cDNA プロンプを用いた Northern 解析で追跡した。その結果、hChk1 mRNA 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。さらに Western 解析によって、hChk1 蛋白も S 期から M 期にかけて発現が著明に上昇することを確認した。

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かを検討した。まず、昆虫細胞で発現させた hChk1 が *in vitro* で Cdc25C をリン酸化すること、Cdc25C の S216A 変異蛋白はリン酸化されないこと、hChk1 の K38M 変異蛋白はリン酸化活性をまったく欠くことを示し、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。興味あることに、hChk1 は自己リン酸化能力も備わっていた。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 キナーゼが、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 (Oncogene 1999 in press)。

3. Chk1 キナーゼの紡錘体形成チェックポイントにおける役割

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。

出芽酵母の 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早老症 AT の原因遺伝子 ATM の下流で機能するか否かを、ATM 機能が欠損している 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。さらに、AT 細胞においても、hChk1 は DNA 傷害に対してリン酸化も活性化も受けなかった。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 期に恒常的に Cdc25C を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、SDS-PAGE 上での hChk1 蛋白のバンドがシフトし、フォスファターゼ処理でもとの位置に戻ることから、hChk1 キナーゼがリン酸化されることが示された。ノコダゾールによる hChk1 キナーゼのリン酸化は 4 時間後から観察され、可逆的で、S 期に同調させた細胞では M 期に進行するまで見られないことから、薬物そのものの影響ではなく M 期における紡錘体形成チェックポイントが

活性化された結果と解釈された。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 (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 (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、同じ癌細胞でも MAD2 を発現する HeLa 細胞とは対照的に、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)。さらに、hChk1 キナーゼが紡錘体形成チェックポイントのみならず、S 期の複製チェックポイントにも関与している結果を得ており、現在制御メカニズムを詳細に解析中である。

4. ヒト Chk1 キナーゼの転写制御機構

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。遺伝子構造はヒトとマウスの間でよく保存

され、hChk1 遺伝子は 13 の exon から成り約 30kb の長さに及んだ。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。数カ所に転写因子 E2F の結合部位と相同性を示す DNA 配列が認められたことから、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。その結果、-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エLEMENT 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し、興味ある知見と考える。E2F が癌遺伝子でありながら、ノックアウトマウスが高発癌性を示すというパラドックスを解くヒントは、E2F が一方で Chk1 のような“ゲノムの守護神”の発現誘導にも関わっているという我々の成績に隠されているかもしれない。

5. Chk1 キナーゼの個体レベルでの機能解析

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 が初期胚の卵分割から体細胞分裂への移行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-loxP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。

II. ヒト Cds1 キナーゼの構造と機能

1. ヒト Cds1 キナーゼのクローニング

分裂酵母では、ATM ホモログである rad3 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、哺乳動物における 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 degenerate primer を合成し PCR を行ったところ、SpCds1 と相同性の高い遺伝子産物を得た。さらに全長の hCds1 をクローニングしたところ、543 個のアミノ酸から成る新規遺伝子が得られたので以下の生化学的解析を行った。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)。

2. DNA 傷害チェックポイントにおける Cds1 キナーゼの役割と p53 による発現制御

hCds1 cDNA プローブと hCds1 蛋白に対する特異的抗体を作成し、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ること、この時期に hCds1 は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 がこの遺伝子座と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、電気泳動における移動度が低下す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事実と合致する。

hCds1 の発現を数多くの細胞株で調査研究したところ、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比較的高いという興味ある結果が得られた。そこで、p53 機能と hCds1 の発現との相互間系を追求する目的で、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 の発現を検討した。その結果、WI-38 親株細胞に比較して、E7、E6、SV40 T の順で transform した細胞において hCds1 の発現増加を認めた。

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ことも考えられ、この意味で hCds1 は新たな癌治療のターゲットとなる可能性がある。

3. Cds1 キナーゼの個体レベルでの機能解析

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。

III. 新規 I κ B キナーゼの構造と機能

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、ロイシ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%であった。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、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 IκB キナーゼは、IκBα(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 IκB キナーゼは、E3-ubiquitin ligase の存在下で IκBαをユビキチン化し、その結果として、κB 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-κB を活性化することが明らかになった。

D. 考察

1. Chk1 と Cds1 の同定と機能解析

早老症の原因遺伝子 ATM は、370 kD の巨大な蛋白質で、DNA 二重鎖切断の再結合に関与する DNA-PK の触媒サブユニット DNA-PKcs や分裂酵母 rad 3 に相同の ATR などと同じファミリーに属する。ATM は、X 線や活性酸素などのストレス、あるいは減数分裂や V(D)J 組み換えの過程で生じる DNA 切断のセンサーとして機能し、多様な細胞内シグナル経路を活性化することによってゲノムを監視するという重要な役割を担っている。ATM のターゲットとしては、c-Abl や主として G1 期のチェックポイントに関わる p53 が知られているのみで、AT 患者における多様な表現型を理解するためには、ATM の下流に位置するシグナル分子、とりわけ、ATM

からのシグナルを伝達し、エフェクターを介して、最終的に細胞周期の制御因子やゲノムの修復装置、アポトーシス機構におけるターゲット分子に至るまでのカスケードを同定することが最重要課題である。

我々は、細胞周期のチェックポイントに関わる遺伝子の多くが、酵母から哺乳動物まで種を越えて保存されていることを利用して、酵母とのアナロジーから、センサーである ATM からのシグナルを伝達する経路で鍵となるヒトキナーゼ hChk1 と hCds1 を同定した。さらにこれらのキナーゼが、細胞周期の S 期から M 期にかけて発現し、S 期には複製チェックポイント (hChk1)、G2 期には DNA 傷害チェックポイント (hCds1)、また M 期の紡錘体形成チェックポイント (hChk1) と、それぞれ機能分担しながら総和としてゲノムの維持に重要な役割を果たしていることを解明した。しかも hCds1 においては、p53 によってその発現が制御されていることを立証し、G1 期チェックポイントとの密接な関連も浮き彫りになった。

Chk1 のノックアウトマウスの作成から、体細胞におけるチェックポイントに加えて、初期胚の卵分割にも必須の遺伝子であることが示唆され、ショウジョウバエにおける *grapes* 変異と合致する。生後、とりわけ成熟後の老化過程における Chk1 の機能解明には、誘導型のノックアウトマウスの作成が必要となり、現在その作成を急いでいるところである。

2. 新規 IκB キナーゼの同定

生物は、紫外線、電離放射線、微生物による感染などの外的ストレスや環境の変化に対応しながら生存する能力を獲得しており、老化は、このようなストレスに対して生体のホメオスタシスを維持する機能の低下が大きく関わりと考える。なかでも、慢性の紫外線暴露による皮膚の老化・皮膚癌の発生、細菌やウイルスを含むさまざまな微生物に対する防御能力の低下は、生理的あるいは病的老化を特徴づける顕著な例である。NF- κ B は、外界からのさまざまな刺激に反応してターゲット遺伝子の転写を制御する多彩な因子である。最近、I κ B をリン酸化するキナーゼとして IKK α および IKK β が、またキナーゼ活性を制御する因子として NEMO (IKK γ)、IKAP、NIKなどが同定され、これらが細胞内で大きな複合体を形成し、多くのストレスに対して多様でかつ的確な細胞応答をするよう配備されているものと考えられる。

本研究の大きな成果として、新規の IKK をクローニングし、かつこれが今まで謎であった I κ B ϵ をリン酸化するキナーゼであることを証明した点が挙げられる。新規 IKK は、従来の IKK α や IKK β よりも、昨年に審良らがクローニングした IKK により類似しており、同じ IKK ファミリーの中でも一つのサブファミリーを形成するものと考えられる。興味あることに、審良らの IKK が LPS などによって白血球に特異的に発現誘導されるのに対して、我々の IKK は、多くの組織で恒常的に発現しており、より普遍的な機能を担っている可能性がある。とりわけその発現が高い精巣と骨

格筋を含め、生体における機能の解明には単独あるいはいろいろな組み合わせのノックアウトマウスの作成が必要と考えられ、現在精力的に進めている。

E. 結論

早老症の原因遺伝子 ATM からゲノムの維持機構、老化へのシグナル伝達経路において鍵となる二つのキナーゼ hChk1 と hCds1 (hChk2) をクローニングした。ともに細胞周期の G1/S、G2、M 期に発現し、DNA 傷害に対するチェックポイント、DNA 複製チェックポイント、紡錘体チェックポイントで重要な機能を果たし、ゲノムを安定に維持する上で必須の役割を果たすことが明らかとなった。さらに Chk1 については、ノックアウトマウスの表現型から、胎生初期の受精卵の分割に必須であることが示唆された。Chk1 や Cds1 (Chk2) の、個体が成熟したあとのストレス応答、とりわけ老化における役割は、誘導型ノックアウトマウスの作成が必要となる可能性が高く、現在この面の研究を進めている。

NF- κ B の活性化に関わる新規 I κ B キナーゼのクローニングにも成功し、個体レベルでの機能解析のため現在ノックアウトマウス作成を急いでいる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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* 1999 in press
- ② Kaneko Y, Watanabe N, Ikeda K, Nakanishi M. Human Chk1 kinase at the mitotic spindle assembly checkpoint. Submitted
- ③ Tominaga K, Morisaki H, Fujimotot 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 A₁ 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
2. 学会発表
- 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

成 10 年 12 月 16-19 日、横浜

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

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

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

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

Kl o t h o 遺伝子と老年病に関する研究

分担研究者 鍋島 陽一 京都大学大学院医学研究科教授

研究要旨

Klotho 蛋白の機能ドメイン、mKL1、mKL2の配列からは酵素活性を推測することは困難なように思えたが、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った。よって、酵素活性をもつかどうかは不明である。腎臓の膜には全長型と C 端側のドメイン (mKL2) に相当する分子が同定され、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。この結果は mKL1 に相当する部分が分泌されていることを示唆している。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。このケースでは 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た。

A. 研究目的

個体老化の研究はその必要性和緊急性から人類が直面している最重要課題の一つとして認識されてから久しいが、その分子機構の研究は未だ嶺明期にあると言える。このような中で、我々は挿入突然変異によって早期老化症状を呈するトランスジェニックマウス系統を樹立し、その原因遺伝子、Klotho を同定した。そこで、本研究課題では、Klotho 蛋白が β -glucosidase に相当する酵素活性をもつかどうか、Klotho 蛋白が個体においてどのように存在するかを解析することにより Klotho 蛋白の機能

を明らかにすることを目的とした。なお、臨床応用を目的としてアデノウイルスベクターによる Klotho 遺伝子の導入とその効果を解析した。

B. 研究方法

Klotho 蛋白が β -glucosidase と相同性をもつことから、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、酵素活性を測定した。Klotho 蛋白の存在様式を解析する目的で、多数のポリ、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。

C. 研究結果

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、mKL 1、mKL 2 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いない。配列からは酵素活性を推測することは困難なように思えたが、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った。糖鎖化学の専門家に酵素活性の解析を依頼したが、現時点では活性を示す結果を得ていない。よって、酵素活性をもつかどうかは不明である。

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 mKL 1 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 mKL 1 の同定を試みたが、検出できなかった。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。このケースでは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た。

D. 考察

得られた結果は Klotho 蛋白はプロセスされて細胞外に分泌され、機能していることを示唆しており、この仮説はヒトにおいて分泌型が発現していることによっても支持されている。現在、ヒト分泌型蛋白によってレスキューできるかどうかを解析している。また、分泌された Klotho 蛋白の作用機構を解析するためには、相互作用する分子の解析が必須であるが、タグをもつキメラ蛋白を大量に調製して、結合組織、細胞を検討している。

E. 結論

mKL 1、mKL 2 いずれも、 β -glucosidase の活性中心を担う 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いない。配列からは酵素活性を推測することは困難なように思えたが、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った。よって、酵素活性をもつかどうかは不明である。

腎臓の膜には全長型と C 端側のドメイン (mKL2) に相当する分子が同定され、

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。この結果は mKL 1 に相当する部分が分泌されていることを示唆している。

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。このケースでは 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た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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., Kuro-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)
2. 学会発表
- G. 知的所有権の取得状況
- 5) 特許取得
なし
- 6) 実用新案登録
なし
- 7) その他

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

劣性遺伝子の機能的スクリーニング法の開発に関する研究

分担研究者 石川 冬木 東京工業大学・生命理工学部 教授

研究要旨

劣性遺伝子の機能的クローニング方法を樹立するために、アンチセンスを発現するレトロウイルス cDNA ライブラリー法を検討した。基礎実験として、アポトーシス誘導に必須な caspase8 遺伝子のアンチセンス cDNA の発現により fas 抗原によるアポトーシス誘導が起こらなくなることをマウス細胞を用いて証明した。

A. 研究目的

莫大な長さをもつヒトゲノム DNA の中から、疾病と関連のある遺伝子を同定するためには、いくつかの方法がある。ひとつは、遺伝的あるいは後天的におきた遺伝子異常と疾患との関連が明らかにされている場合に、その遺伝子異常を来している遺伝子本体を同定する方法である。Positional cloning や癌細胞における染色体異常を利用した解析により、このような手法を用いて多くの遺伝子がこれまでに同定されてきた。もう一つの方法として、特定の機能をもつ遺伝子を何らかの試験管内アッセイ系を使って機能的にスクリーニングする方法がある。目的としている遺伝子がヒト遺伝子であるため、特にヒト細胞を用いたスクリーニング系はこのような目的のために有用である。すなわち、ヒト遺伝子ライブラリー（多くの場合、cDNA ライブラリー）

をヒト細胞に発現させ、特定の表現型を誘導するにいたった遺伝子を同定する方法である。一般に、ヒト細胞は DNA 導入効率が高くはない場合が多いので、このような機能的スクリーニングにおいては、導入効率が一貫して高いことに特徴があるレトロウイルスベクターを利用することが多い。これまでに、レトロウイルスベクターを用いた cDNA スクリーニングにより、増殖因子受容体などの多くの重要な遺伝子が同定されてきたことは周知の通りである。

以上述べた戦略は、遺伝子を導入することで表現型が誘導される優性な遺伝子のクローニング技術である。しかし、疾患と関連する遺伝子は常に優性な遺伝子であるとは限らず、癌抑制遺伝子のように相同染色体上にある二つの遺伝子が両方とも機能を失って、はじめて表現型を示す遺伝子も多い。ところが、このような劣勢遺伝子は、

たとえば癌抑制遺伝子である家族性網膜芽細胞腫の原因遺伝子 Rb のように、多くは遺伝的異常をもつ遺伝子として positional cloning により得られたものが多く、これまでに機能的スクリーニングにより得られた報告はなかった。

しかし、遺伝性疾患の解析は限られた対象についてのみ可能であり、広く疾病と関連した劣性遺伝子を同定するためには、機能的スクリーニング法の開発が非常に重要である。そこで、本研究では、同じく分担研究者である東京大学・北村助教授や、その他に東京大学・菅野助教授、京都大学・米原教授との共同研究として、劣性遺伝子の機能的スクリーニング系の開発を試みた。

B. 研究方法

アンチセンス技術は、対象とする遺伝子 mRNA と相補的な DNA もしくは RNA を発現させ、対象遺伝子の転写あるいは翻訳を阻害することで、その遺伝子機能を失わせる方法である。アンチセンスは、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。

歴史的には、アンチセンス技術は、1980年代初頭、ターゲットとする遺伝子の逆向きの cDNA を持つ発現プラスミドを細胞内に導入し、ウイルス遺伝子の発現が抑制できることがはじめて報告されて注目を集めた。この原法は、ターゲットとする遺伝子 RNA とアンチセンス RNA がアニー

ングし、翻訳が阻害されることを期待するものであったが、その後の多くの研究において、この方法は必ずしも十分な成果をおさめなかった。その理由として、アンチセンス RNA が細胞質の中でターゲット mRNA をトラップする効率がきわめて低いことなどがある。

先に述べたように、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、我々は、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を確立できるものと考えた。

そこで、今年度においては、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-ligand や抗 Fas 抗体により細胞膜上の Fas を活性化すると、FADD を介して、システインプロテアーゼである Caspase-8 が活性化され、さらにそれが Caspase-3 などのグループ I Caspase を活性化し、最終的にアポトーシスが誘導され

る。この一連の信号伝達経路を担う分子は、これまでに多くのものが同定されているが、いまだ知られていないものが存在する可能性は十分にある。また、この経路は直列的であるため、その構成要素の一つでも失活すると、細胞は Fas 刺激を受けてもアポトーシスを起こさず、増殖を続けると予想される。逆に、アンチセンス cDNA をもつレトロウイルスライブラリーを細胞に感染させ、Fas 抵抗性のクローンを得ることができれば、それは、Fas によるアポトーシス誘導経路に必須な分子のアンチセンスを発現している可能性がある。

そこで、本研究では、この戦略の基礎的検討のために、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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

今回、我々は、レトロウイルスを用いたアンチセンス cDNA の発現により遺伝子を機能的に失活させることができる可能性を示すことができた。現在、遺伝子転写、翻訳のどの段階で遺伝子機能が阻害されているのかを明らかにするために、Caspase-8 の蛋白質量をアンチセンス cDNA の有無により比較検討している。

より長期的な実験計画としては、本法を用いて、多数の遺伝子ライブラリーの中から目的のものをクローン化することができるかどうかは次の大きな目標である。そのために、現在、東大・菅野助教授と共同して、cap-site cDNA ライブラリーの構築を行っている。

E. 結論

レトロウイルスベクターを用いたアンチセンス cDNA ライブラリーを構築し、それが疾患と関連する劣性遺伝子の機能的スクリーニングに有用である可能性を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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).